

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΑΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ
ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**‘‘Η μικροχλωρίδα Ελληνικών ποικιλιών επιτραπέζιας ελιάς
και το αντιμικροβιακό δυναμικό της’’**



Μαρίνα Σ. Κουτσομπού

Επιβλέπουσα: Έφη Τσακαλίδου, Καθηγήτρια ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ 2016

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΑΣ
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ
ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**“Η μικροχλωρίδα Ελληνικών ποικιλιών επιτραπέζιας ελιάς
και το αντιμικροβιακό δυναμικό της.”**

Μαρίνα Σ. Κουτσομπού

Όνομα επιβλέποντος: Έφη Τσακαλίδου, Καθηγήτρια ΓΠΑ

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

Επιβλέπουσα: Έφη Τσακαλίδου, Καθηγήτρια ΓΠΑ

Μέλη: Ευστάθιος Πανάγου, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

Αναστάσιος Ακτύπης, Λέκτορας ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ 2016

Περίληψη

Οι επιτραπέζιες ελιές θεωρούνται από τα πιο σημαντικά και διαδεδομένα παραδοσιακά λαχανικά που έχουν υποστεί ζύμωση στον δυτικό κόσμο και κυρίως στις χώρες της Νότιας Ευρώπης. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια και οι ζύμες παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της ζύμωσης των επιτραπέζιων ελιών. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια, όπως στελέχη του γένους *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* και *Leuconostoc*, είναι η πιο σημαντική ομάδα των βακτηρίων στις ελιές, ενώ οι ζυμομύκητες επηρεάζουν τη διαδικασία της ζύμωσης είτε θετικά είτε αρνητικά, ανάλογα με το είδος. Στην παρούσα μελέτη, τρεις διαφορετικές Ελληνικές ποικιλίες επιτραπέζιων ελιών, Καλαμών, Κονσερβολιά και Άμφισσα μελετήθηκαν χρησιμοποιώντας τόσο τη συμβατική μικροβιολογική ανάλυση, καθώς και την προσέγγιση της μεταγονιδιωματικής. Χρησιμοποιώντας επιλεκτικά μέσα ανάπτυξης και συνθήκες, η κλασική μικροβιολογική ανάλυση αποκάλυψε ότι οι μεσόφιλοι ράβδοι, οι μεσόφιλοι κόκκοι και οι ζύμες ήταν οι κυρίαρχες μικροβιολογικές ομάδες. Συνολικά απομονώθηκαν 42 οξυγαλακτικά βακτήρια και 71 ζύμες. Αυτά ομαδοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας την τεχνική προσδιορισμού του γονότυπου των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών (rep-PCR). Αντιπροσωπευτικές απομονώσεις από κάθε ομάδα προσδιορίστηκαν σε επίπεδο είδους μέσω της αλληλουχίας 16S rDNA γονιδίου (βακτήρια) και της περιοχής ITS (ζύμες). Για τη μεταγονιδιωματική ανάλυση ένα πρωτόκολλο που αναπτύχθηκε στο Εργαστήριο Γαλακτοκομίας εφαρμόστηκε και τα δείγματα DNA αναλύθηκαν. Αυτή είναι η πρώτη έκθεση σχετικά με την μεταγονιδιωματική ανάλυση της μικροβιακής ποικιλότητας των Ελληνικών επιτραπέζιων ελιών.

Λέξεις-κλειδιά: επιτραπέζια ελιά, οξυγαλακτικά βακτήρια, Καλαμών, Κονσερβολιά, Αμφίσση μικροβιολογική ανάλυση, μεταγονιδιωματική ανάλυση

Abstract

Table olives are considered to be among the most significant and widespread traditional fermented vegetables in Western world and mostly in Southern European countries. Lactic acid bacteria (LAB) and yeast populations play an important role in the table olive fermentation process. LAB genera, such as *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* and *Leuconostoc*, are the most important group of bacteria in olives, while yeasts influence the fermentation process either positively or negatively, depending on the species. In the present study, three different naturally fermented Greek table olive cultivars, namely Kalamata, Conservolea and Amfissa were studied using both the conventional microbiological analysis as well as the metagenomics approach. Using selective growth media and conditions, the classical microbiological analysis revealed that mesophilic rods, mesophilic cocci and yeasts were the dominant microbiological groups. A total of 42 LAB and 71 yeasts isolates have been selected. These were grouped using the genotyping technique of repetitive element sequence-based polymerase chain reaction (rep-PCR). Representative isolates of each group were identified at the species level through 16S rDNA gene sequencing (bacteria) and ITS region sequencing (yeasts). For the metagenomics analysis, a protocol developed in our laboratory has been applied and the DNA samples have been analyzed. This is the first report on the metagenomic analysis of the microbial diversity of Greek table olives.

Key words: table olives, lactic acid bacteria, Kalamon, Conservolea, Amfissa microbiological analysis, metagenomic analysis

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γαλακτοκομίας του Τμήματος Επιστήμης τροφίμων και διατροφής του ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου κ. Έφη Τσακαλίδου για την συμπαράσταση, την επιστημονική υποστηρίξη, την καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής. Επίσης θα ήθελα να την ευχαριστήσω για το χρόνο που αφιέρωσε, το αμέριστο ενδιαφέρον και τις καίριες υποδείξεις της για τη συγγραφή της παρούσας διατριβής.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους κ. Ευστάθιο Πανάγου, επίκουρο καθηγητή του ΓΠΑ, και κ. Αναστάσιο Ακτύπη, λέκτορα του ΓΠΑ που δέχτηκαν να συμμετέχουν στην τριμελή εξεταστική επιτροπή.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. Ράνια Αναστασίου η οποία με την επιστημονική κατάρτιση και τις υποδείξεις της με βοήθησε σημαντικά στο πειραματικό όσο και στο θεωρητικό μέρος της μελέτης.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην υποψήφια διδάκτωρα Μαρία Κάζου για την πολυτίμη βοήθεια της σε όλα τα στάδια των πειραμάτων και κυρίως στο κομμάτι της μεταγονιδιωαμτικής ανάλυσης καθώς και στην συγγραφή της παρούσας μελέτης.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου και στα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου για την πολύ καλή συνεργασία που είχα μαζί τους.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την υλική και ηθική υποστήριξη αλλά και τους μεταπτυχιακούς συμφοιτητές-φίλους μου για τη στήριξη και την κατανόηση μέχρι τέλους.

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη.....	3
Abstract	4
Ευχαριστίες.....	5
1 Εισαγωγή.....	8
1.1 Ιστορική αναδρομή.....	8
1.2 Βοτανικά στοιχεία	9
1.3 Δομή και χημική σύσταση ελαιοκαρπού.....	10
1.3.1 Ελευρωπαΐνη	12
1.4 Διατροφή και ελιά	13
1.5 Τρόποι παρασκευής επιτραπέζιας ελιάς.....	15
1.5.1 Ελιές Ισπανικού τύπου	16
1.5.2 Μαύρες ελιές τύπου Καλιφόρνιας.....	21
1.5.3 Μαύρες ελιές Ελληνικού τύπου	25
1.6 Ελληνικές ποικιλίες επιτραπέζιας ελιάς	29
1.6.1 Εμπορικοί τύποι επιτραπέζιας ελιάς στην Ελλάδα.....	32
1.6.2 Προϊόντα ΠΟΠ (Προστατευόμενης ονομασίας προέλευσης)/ ΠΓΕ (Προστατευόμενης γεωγραφικής προέλευσης)	34
1.7 Μικροβιολογία και έλεγχος της ζύμωσης	36
1.8 Οξυγαλακτικά βακτήρια.....	39
1.8.1 Οξυγαλακτικά βακτήρια και ζύμωση.....	41
1.8.2 Επίδραση των ζυμών στη ζύμωση των επιτραπέζιων ελιών	42
1.9 Αντιμικροβιακές ενώσεις των οξυγαλακτικών βακτηρίων	43
1.9.1 Βακτηριοσίνες	43
1.10 Μεταγονιδιωματική ανάλυση.....	49
1.11 Νομοθεσία	52
1.12 Οικονομική σημασία	55
2 Σκοπός της μελέτης	58
3 Υλικά και μέθοδοι	59
3.1 Μικροβιολογικές αναλύσεις.....	59
3.2 Χρώση Gram	62
3.3 Δοκιμή καταλάσης	63
3.4 Απομόνωση βακτηριακού DNA.....	63
3.5 Ομαδοποίηση στελεχών με την μέθοδο rep-PCR.....	65
3.6 Ταυτοποίηση στελεχών με αλληλούχηση του γονιδίου 16S rDNA	68
3.7 Μεταγονιδιωματική ανάλυση.....	71
3.8 Μελέτη αντιμικροβιακής δράσης των οξυγαλακτικών βακτηρίων	74

4	Αποτελέσματα – Συζήτηση	77
4.1	Μικροβιολογική ανάλυση	77
4.2	Ομαδοποίηση με την μέθοδο <i>rep</i> -PCR.....	82
4.3	Ταυτοποίηση στελεχών με την αλληλούχηση του γονιδίου 16S rDNA.....	85
4.4	Μεταγονιδιωματική ανάλυση.....	88
4.5	Μελέτη αντιμικροβιακής δράσης των οξυγαλακτικών βακτηρίων	99
5	Συμπεράσματα.....	100
6	Βιβλιογραφία.....	101
7	Παράρτημα	113

1 Εισαγωγή

1.1 Ιστορική αναδρομή

Η ιστορία της ελαιόδεντρου χάνεται στα βάθη των αιώνων και προηγείται της ύπαρξης των ανθρώπων, με τους ιστορικούς να κάνουν λόγο για προϊόν της φύσης από την εποχή των παγετώνων. Άρρηκτα συνδεδεμένη με τη Μεσόγειο και τους λαούς της, εδώ και περίπου 6000 χρόνια, υπήρξε βασικός πυλώνας της δημιουργίας πολιτισμού (Θεριός 2005).

Ως δώρο Θεού χαρακτηρίστηκε από τους αρχαίους μας προγόνους, καθώς ευδοκίμησε και προϋπήρξε από αυτούς, ως ιερό δένδρο κυρίαρχο σε κάθε πεδιάδα και βουνό της Μεσογείου, προβάλλει ως μοναδικό σύμβολο του τόπου μας, σύντροφος των κατοίκων της και αντικείμενο λατρείας (Μπαλατσούρας 1995).

Πολλοί ιστορικοί θεωρούν ότι ο τόπος προέλευσης του ελαιόδεντρου είναι η Μικρά Ασία και η Συρία, λόγω του εντοπισμού της «προγόνου» της, της αγριελιάς, που οι βουνοπλαγιές τους είναι κατάφυτες από αυτή. Μέσω των κατοίκων της Παλαιστίνης διαδόθηκε και καλλιεργήθηκε στην Μεσόγειο μεταγενέστερα με πρώτη περιοχή την Κύπρο και στη συνέχεια την Κρήτη.

Νεότερες έρευνες όμως από τον 19^ο αιώνα από ξένους και Έλληνες επιστήμονες απέδειξαν, ότι η ελιά βρίσκεται στο χώρο της Μεσογείου από την Νεολιθική εποχή και μάλιστα ως τόπο καταγωγής της ορίζουν την περιοχή της Κρήτης. Την άποψη αυτή έρχεται να ενισχύσει περαιτέρω και η Ελληνική «μυθολογία» που θεωρεί την ελιά Αθηναϊκή. Δεν είναι καθόλου τυχαίο άλλωστε πως η θεά Αθηνά εμφανίζεται να λογομαχεί με τον Ποσειδώνα για την κυριαρχία επί της πόλης των Αθηνών, με τελική επικράτηση της πρώτης προσφέρουσας στους πολίτες ένα κλάδο ελιάς (Κωστελένιος 2012).

Η ελιά δεν ήταν απλά μια τροφή και αλλά μέσο κυριαρχίας και σύμβολο λατρείας. Δεν θα μπορούσε να είναι τυχαίο ότι λόγω αυτής της «κληρονομιάς» και της ιστορίας η ελιά ως δέντρο παίρνει στη Βοτανολογία την ονομασία *Olea europea*, αποτελώντας ως και τις μέρες μας τη βασικότερη γεωργική εργασία στο τόξο των λαών της Μεσογείου. Το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου (International Olive Oil

Council, IOOC) μάλιστα σε έρευνα του το 2008 θεωρεί ότι το 98% των γεωργικών εκτάσεων της ελαιοκομίας βρίσκονται στη Μεσόγειο

1.2 Βοτανικά στοιχεία

Η καλλιεργούμενη ελιά (*Olea europaea* L.), η οποία ανήκει στην οικογένεια των Oleaceae, είναι ένα αείφυλλο δένδρο που προήλθε από τροπικά και υποτροπικά είδη. Υπάρχουν δυο εκδοχές που προσδιορίζουν την πιθανή προέλευσή του. Η μια ορίζει ότι προέρχεται από την αγριελιά που συναντάται μέχρι και σήμερα σε «άγρια» κατάσταση στη Βόρεια Αφρική, την Πορτογαλία, τη Νότια Γαλλία, την Ιταλία και τις περιοχές της Μαύρης Θάλασσας. Η άλλη εκδοχή ορίζει ως τόπο προέλευσης της ελιάς την τροπική Αφρική και συγκεκριμένα θεωρείται ότι έχει προκύψει από εξέλιξη του είδους *Olea chrysophylla*. Ανεξάρτητα από την προέλευσή της, η ελιά είναι γεγονός ότι εξαπλώθηκε σε πάρα πολύ μεγάλη έκταση στην Ευρωπαϊκή ήπειρο και πιθανολογείται ότι αυτός είναι ο λόγος της ονομασίας *Olea europaea* (ελιά η ευρωπαϊκή) (Κυριτσάκης, 1993).

Ένα από τα χαρακτηριστικά των ειδών του γένους *Olea* είναι η μακροζωία τους, που μπορεί να ξεπεράσει και τα 100 χρόνια, χωρίς μάλιστα να σταματήσει ή να μειωθεί η παραγωγικότητα αυτών των δένδρων. Η ελιά είναι ένα δένδρο που αντέχει σε ξηρές και θερμές περιοχές καθώς και σε άγονα εδάφη. Επίσης έχει την ικανότητα να βλαστάνει ξανά μετά από τραυματισμό ή καταστροφές του υπέργειου τμήματός της (Κυριτσάκης, 1993).

Το είδος *Olea europaea* απαρτίζεται από 2600 ποικιλίες (Θεριός, 2005). Οι καλλιεργούμενες ποικιλίες ελιάς διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με τη χρήση τους:

- ποικιλίες που παράγουν καρπό για βρώση (επιτραπέζιες ελιές)
- ποικιλίες που παράγουν καρπό για παραγωγή ελαιολάδου και
- ποικιλίες που παράγουν καρπό και για ελαιοποίηση και για επιτραπέζια κατανάλωση

Τα δένδρα της ελιάς δίνουν καρπούς, οι οποίοι είναι πικροί και κατά συνέπεια μη βρώσιμοι, λόγω της παρουσίας της πολυφαινόλης ελευρωπαΐνη. Χρειάζονται αρκετά κρύο χειμώνα για την καρπόδεση και μεγάλο διάστημα ζεστής περιόδου για την ανάπτυξη και την ωρίμανση των καρπών. Η παγωνιά κατά την

διάρκεια της ανοιξιάτικης άνθησης και οι ζεστοί άνεμοι είναι επιβλαβείς για την παραγωγή των ελιών. Τα δένδρα της ελιάς έχουν μεγάλη διάρκεια ζωής και μπορούν να επιζήσουν κάτω από δυσμενείς συνθήκες. Μεγαλώνουν κάτω από τροπικές συνθήκες αλλά αντέχουν και σε κάποιες ώρες παγετώνα κατά την άνθιση και την παραγωγή καρπού (Kailis *et al.*, 2007).

1.3 Δομή και χημική σύσταση ελαιοκαρπού

Ο καρπός της ελιάς είναι *δρύπη* και έχει αυγοειδές σχήμα που συχνά καταλήγει σε μυτερό άκρο. Η κύρια διαφορά του από τα άλλα πυρηνόκαρπα (ροδάκινα, βερίκοκο, κεράσι κλπ.) σχετίζεται με τη χημική του σύσταση και τους οργανοληπτικούς του χαρακτήρες και οφείλεται σε τρεις λόγους (Μπαλατσούρας 1995):

- Τη μικρή περιεκτικότητα της σάρκας σε σάκχαρα
- Την αυξημένη περιεκτικότητα της νωπής σάρκας σε λάδι
- Την ύπαρξη στη σάρκα μιας πικρής ένωσης, της ελευρωπαϊνης (oleuropein)

Τα κύρια συστατικά της σάρκας του ελαιοκαρπού είναι το νερό, οι λιπαρές ουσίες, τα σάκχαρα, οι πρωτεΐνες, οι πηκτίνες, τα οργανικά οξέα, οι ταννίνες, η ελευρωπαϊνή και τα ανόργανα συστατικά. Η σύνθεση του ελαιοκαρπού διαφέρει ανάλογα με την ποικιλία, την περιοχή καλλιέργειας, τη χρονιά και το στάδιο ανάπτυξης. Αυτός είναι ο λόγος που κάποιες ελιές περιέχουν μικρό ποσοστό ελαιολάδου και μεγάλο ποσοστό σακχάρων, όπως συμβαίνει στις μεγαλόκαρπες ποικιλίες, και συνήθως χρησιμοποιούνται για βρώση. Αντίθετα, στις μικρόκαρπες ποικιλίες περιέχεται μεγαλύτερο ποσοστό ελαιολάδου και για αυτό προορίζονται για ελαιοποίηση (Κυριτσάκης, 1993).

Η ποσότητα του περιεχόμενου νερού, το οποίο συνήθως αντιπροσωπεύει το 70% του νωπού βάρους του καρπού, είναι αυτή που καθορίζει το τελικό σχήμα του καρπού. Μέσα στο νερό του κυτταρικού χυμού βρίσκονται διαλυμένα τα σάκχαρα, η ελευρωπαϊνή, τα οργανικά οξέα, οι ταννίνες και άλλα κυτταρικά συστατικά. Η ποσότητα του νερού και του λαδιού εξαρτάται από το στάδιο ανάπτυξης, την ποικιλία και τις συνθήκες του περιβάλλοντος.

Τα διαλυτά σάκχαρα που περιέχονται στην ελιά (κυρίως γλυκόζη, φρουκτόζη,

μανιτόλη και σακχαρόζη) έχουν ιδιαίτερη σημασία για τη ζύμωσή της από τους μικροοργανισμούς. Η ζύμωση αυτή συντελεί στην συντήρηση της ελιάς αλλά και της προσδίδει ιδιαίτερη γεύση και άρωμα. Έχει βρεθεί ότι κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης η συγκέντρωση των σακχάρων στον ελαιόκαρπο μειώνεται καθώς αυξάνεται η ποσότητα του ελαιολάδου που συντίθεται, γεγονός που έχει αποδοθεί στη συσχέτιση ανάμεσα στη μείωση των σακχάρων και τη βιοσύνθεση του ελαιολάδου (Garrido Fernández *et al.*, 1997).

Οι φαινολικές ενώσεις που περιέχονται στην ελιά ευθύνονται για διάφορα σημαντικά χαρακτηριστικά της ελιάς, όπως είναι η πικρή της γεύση, η δημιουργία σκούρου χρώματος μετά από τραυματισμό της, αλλά και η παρεμπόδιση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών που επιτελούν τη ζύμωση, η οποία λαμβάνει χώρα κατά την επεξεργασία της επιτραπέζιας ελιάς. Οξειδώνονται παρουσία αλκαλικού διαλύματος και για το λόγο αυτό οι επιτραπέζιες ελιές Ισπανικού τύπου που υφίστανται αυτή την επεξεργασία λαμβάνουν ένα σκούρο πράσινο χρώμα.

Εκτός από την ελευρωπαΐνη, στον καρπό της ελιάς αλλά και στα φύλλα της περιέχονται και άλλες φαινολικές ενώσεις, οι οποίες έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες, όπως για παράδειγμα η τυροσόλη και η υδροξυτυροσόλη που προκύπτουν και από την υδρόλυση της ελευρωπαΐνης.

Ο ελαιόκαρπος περιέχει μια ποσότητα πρωτεϊνών της τάξεως του 1.5-3% που κυμαίνεται ανάλογα με το στάδιο ωρίμανσης και την ποικιλία. Απαντώνται επίσης ελεύθερα αμινοξέα, όπως το ασπαρτικό οξύ, το γλουταμινικό οξύ, η αργινίνη κ.ά.

Το ελαιόλαδο περιέχεται στη σάρκα της ελιάς σε ποσοστό 17-35% και επηρεάζει τη συνεκτικότητά της καθώς και το σχήμα της. Τα λιπαρά οξέα που υπάρχουν στο ελαιόλαδο είναι ακόρεστα (κυρίως το ελαϊκό C18:1 που είναι μονοακόρεστο, αλλά και λινελαϊκό C18:2, λινολενικό C18:3 κ.ά) και κορεσμένα (κυρίως παλμιτικό C16:0 και στεατικό C18:0). (Θερίος, 2005).

Στην ελιά περιέχονται επίσης ανόργανα στοιχεία, όπως κάλιο, ασβέστιο, φώσφορος, νάτριο, μαγνήσιο, μαγγάνιο, σίδηρος, ψευδάργυρος, χλώριο. Το μεγαλύτερο ποσοστό, συγκριτικά με τα άλλα, καλύπτει το κάλιο. Τέλος, στον καρπό της ελιάς συναντάμε ορισμένα οργανικά οξέα, όπως το οξικό, το οξαλικό, το

μηλονικό, το γαλακτικό, το τρυγικό, το μηλικό και το κιτρικό. Γενικά τα οξέα του καρπού της ελιάς συμπαρασύρονται από τα φυτικά υγρά και μεταφέρονται στα απόνερα μαζί με άλλα υδατοδιαλυτά συστατικά (Κυριτσάκης, 1993).

Η σταδιακή αλλαγή στο χρώμα της ελιάς από πράσινο σε μαύρο, οφείλεται στη σύνθεση ανθοκυανών, οι οποίες αυξάνονται με την πρόοδο της ωρίμανσης του καρπού και η τελική τους συγκέντρωση μπορεί να φτάσει το 0.5g/100g της σάρκας του φρέσκου καρπού.

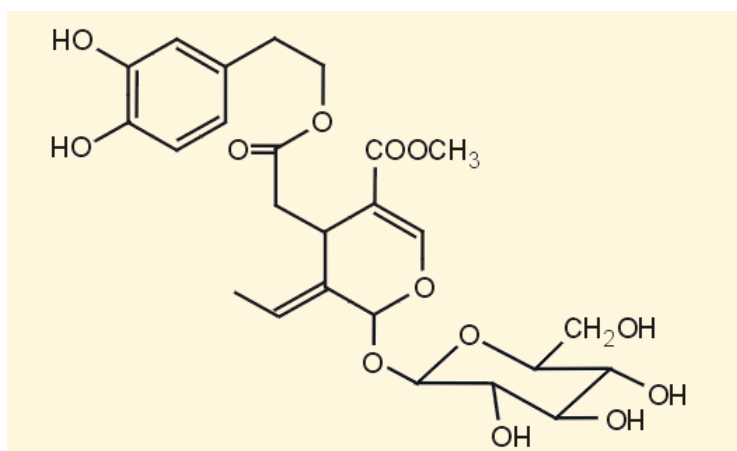
1.3.1 Ελευρωπαΐνη

Η πρώτη πολυφαινόλη που απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε από την ελιά είναι η ελευρωπαΐνη, ένας εστέρας του ελενολικού οξέος με αιθανόλη (Panizzi *et al.*, 1960). Σε αυτήν οφείλεται σε μεγάλο βαθμό η πικρή γεύση του ελαιόκαρπου. Στις άγουρες ελιές απαντάται σε υψηλότερο ποσοστό σε σχέση με τις ώριμες ελιές, στις οποίες η ελευρωπαΐνη έχει οξειδωθεί και έτσι τους δίνει το χαρακτηριστικό μαύρο χρώμα. Είναι υδατοδιαλυτή ένωση, μη διαλυτή στο ελαιόλαδο γι' αυτό δε δημιουργεί πρόβλημα κατά την ελαιοποίηση, καθώς απομακρύνεται με τα φυτικά υγρά.

Αντίθετα στις ελιές που προορίζονται για βρώση, η ελευρωπαΐνη πρέπει να απομακρυνθεί με συνεχείς εκπλύσεις (παρασκευή ελιών Ελληνικού τύπου) ή με προσθήκη διαλύματος καυστικού νατρίου και κατόπιν εκπλύσεις με νερό (παρασκευή ελιών Ισπανικού τύπου). Για να μπορέσει να καταναλωθεί η ελιά πρέπει η ελευρωπαΐνη να υποστεί υδρόλυση είτε με τη δράση οξέων και αλκάλων είτε με τη δράση ενζύμων. Το μόριο της ελευρωπαΐνης (Εικόνα 1.1) περιέχει ένα γλυκοζιτικό και έναν εστερικό δεσμό. Με την ενζυμική υδρόλυση, διασπάται σε γλυκόζη και ένα άγλυκο μόριο, το οποίο στη συνέχεια υδρολύεται προς μόρια, τα οποία δεν είναι πικρά, όπως είναι το ελενολικό οξύ και η 3,4-διυδροξυ-φαινυλο-αιθανόλη.

Η εκπίκραση αυτή απαιτεί ένα στάδιο παραμονής των ελιών σε άλμη για κάποιους μήνες (μέθοδος Ελληνικού τύπου) ή την χρήση NaOH (μέθοδος Ισπανικού τύπου) (Ciafardini *et al.*, 1994). Τέλος, η ελευρωπαΐνη έχει ισχυρή αντιμικροβιακή δράση. Για παράδειγμα, παρεμποδίζει την ανάπτυξη και την παραγωγή τοξίνης από το βακτήριο *Staphylococcus aureus* (Tassou and Nychas, 1994), αλλά και την

βλάστηση και τον πολλαπλασιασμό των спорίων του βακτηρίου *Bacillus cereus* (Tassou *et al.*, 1991).



Εικόνα 1.1: Το μόριο της ελευρωπαΐνης

1.4 Διατροφή και ελιά

Οι διατροφικές ανάγκες του ανθρώπου καλύπτονται από την κατανάλωση τροφών πλούσιων σε πρωτεΐνες, τροφών που περιέχουν σάκχαρα ή υδατάνθρακες, καθώς και τροφών με υψηλό περιεχόμενο λιπιδίων. Στην τελευταία κατηγορία ανήκουν και οι επιτραπέζιες ελιές, οι οποίες περιέχουν λιπίδια σε ποσοστό 20-30% του βάρους τη σάρκας τους. Λόγω της υψηλής θερμιδικής της αξίας η ελιά αποτέλεσε κύρια τροφή στους λαούς γύρω από την λεκάνη της Μεσογείου, όπου κυρίως καλλιεργήθηκε (Μπαλατσούρας, 1995).

Η βιολογική αξία της ελιάς προσδιορίζεται από ορισμένα συστατικά με μηδαμινή θερμιδική αξία που όμως είναι απαραίτητα για τη σωστή διατροφή του ανθρώπου. Συστατικά τα οποία προσδιορίζουν την βιολογική αξία της ελιάς είναι κάποια αμινοξέα, λιπαρά οξέα, βιταμίνες, ανόργανα συστατικά και πολυφαινόλες όπως η ελευρωπαΐνη.

Στη σάρκα της ελιάς περιέχονται χαμηλά επίπεδα διαλυτών και μη διαλυτών πρωτεϊνών σε συγκέντρωση 1.5–3%. Διαλυτές πρωτεΐνες μπορούν να μεταφερθούν στην άλμη εξασφαλίζοντας αμινοξέα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών που επιτελούν τη ζύμωση (Kailis *et al.*, 2007).

Στην υψηλή βιολογική αξία της ελιάς συμβάλλουν τα λιπίδια με την ποιότητά τους και τον μέτριο βαθμό κορεσμού τους. Το κύριο ακόρεστο λιπαρό οξύ του ελαιολάδου είναι το ελαϊκό οξύ, το οποίο είναι μονοακόρεστο (C18:1) και κατέχει πλεονεκτική θέση έναντι άλλων ακόρεστων λιπαρών οξέων διότι παρουσιάζει μεγάλη αντοχή στο τάγγισμα. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, και κυρίως το λινελαϊκό (C18:2), είναι σημαντικά για τον ανθρώπινο οργανισμό λόγω του ότι δεν μπορεί να τα συνθέσει και θα πρέπει να καλύπτουν το 1-2% της ολικής θερμιδικής αξίας του διαιτολογίου του.

Οι επιτραπέζιες ελιές είτε πράσινες είτε ώριμες θεωρούνται πηγές βιταμινών για τον άνθρωπο. Οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες χάνονται κατά τη διαδικασία της επεξεργασίας της επιτραπέζιας ελιάς ενώ οι διαλυτές στο λάδι διατηρούνται στο προϊόν έως την κατανάλωσή του. Υδατοδιαλυτές βιταμίνες είναι το ασκορβικό οξύ (Βιταμίνη C), η θειαμίνη (Βιταμίνη B1), η ριβοφλαβίνη (Βιταμίνη B2) και η νιασίνη (Βιταμίνη B3). Οι διαλυτές στο λάδι χρωστικές είναι τα καροτενοειδή, πολύ καλή πηγή Βιταμίνης A και οι τοκοφερόλες, βιταμίνες του συμπλέγματος της βιταμίνης E, οι οποίες είναι και αντιοξειδωτικές (Kailis *et al.*, 2007).

Τα ανόργανα συστατικά σε φρέσκιες ακατέργαστες ελιές περιλαμβάνουν μακροστοιχεία και ιχνοστοιχεία. Στα μακροστοιχεία περιλαμβάνονται ο φώσφορος, το νάτριο, το κάλιο και το μαγνήσιο που βρίσκεται σε ιδιαίτερα υψηλή συγκέντρωση στην ελιά και είναι πολύτιμο συστατικό για τη σωστή διατροφή του ανθρώπου. Τα ιχνοστοιχεία που απαντώνται στην ελιά και είναι απαραίτητα για τον άνθρωπο, περιλαμβάνουν το βόρειο, το χαλκό, το σίδηρο, τον ψευδάργυρο και το μαγγάνιο. Τα επίπεδα αυτών των στοιχείων εξαρτώνται από τις συνθήκες καλλιέργειας, την ποιότητα του εδάφους, τη διαθεσιμότητα του νερού και την ποσότητα των λιπασμάτων που χρησιμοποιούνται. Οι φυσικές ελιές είναι μια καλή πηγή πρόσληψης ιχνοστοιχείων που εξαρτώνται βέβαια από την ποικιλία, την ωρίμανση και τη μέθοδο επεξεργασίας (Kailis *et al.*, 2007).

Η παρουσία πολυφαινόλων στις ελιές και ειδικά η ελευρωπαΐνη καθώς και τα προϊόντα που προκύπτουν από την υδρόλυσή της, χαρακτηρίζονται από αντιοξειδωτικές ιδιότητες και ικανότητα απομάκρυνσης των ελευθέρων ριζών, καθώς και από αντιμικροβιακές ιδιότητες, ιδιότητες που συμβάλλουν στην καλή υγεία του ανθρώπου (Ucella, 2001). Η ελευρωπαΐνη, όπως και οι πικρές ουσίες των

εσπεριδοειδών, επιζητούνται από το καταναλωτικό κοινό σε μικροποσότητες, γιατί βελτιώνουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των προϊόντων, στα οποία απαντώνται. Εισαγόμενες στον οργανισμό αυξάνουν την έκκριση του γαστρικού υγρού και τονώνουν την όρεξη. Ειδικά οι υπόπικρες επιτραπέζιες ελιές που παράγονται στην χώρα μας, όχι μόνο δεν βλάπτουν, αλλά δρουν ευνοϊκά σε περιπτώσεις παθήσεων του στομάχου (Μπαλατσούρας, 1995).

1.5 Τρόποι παρασκευής επιτραπέζιας ελιάς

Οι τρεις τρόποι παρασκευής επιτραπέζιων ελιών που διαθέτουν μεγάλη οικονομική και εμπορική σημασία διεθνώς είναι τα εξής:

1. οι πράσινες ελιές Ισπανικού τύπου,
2. οι μαύρες ελιές τύπου Καλιφόρνιας
3. οι φυσικές μαύρες ελιές Ελληνικού τύπου

Οι τρόποι παρασκευής μοιάζουν στο ότι τα τελικά προϊόντα παρασκευάζονται και διατηρούνται σε αραιωμένα υδατικά διαλύματα χλωριούχου νατρίου (NaCl) διαφορετικών συγκεντρώσεων. Κάθε μέθοδος παίρνει το όνομά της από τη χώρα (ή την πολιτεία), στην οποία αναπτύχθηκε και χρησιμοποιήθηκε. Ανάλογα με τη μέθοδο, οι καρποί συλλέγονται σε διαφορετικό στάδιο της ωρίμανσης. Στις δύο πρώτες μεθόδους, η απομάκρυνση της πικρής γεύσης επιτυγχάνεται με αλκαλική κατεργασία. Στην περίπτωση της Ελληνικής μεθόδου, όμως, οι καρποί τοποθετούνται απευθείας στην άλμη και η απομάκρυνση της ελευρωπαΐνης είναι αργή και μερική. Οι οργανοληπτικές ιδιότητες κάθε προϊόντος διαφέρουν σημαντικά, όταν οι παράμετροι προσαρμόζονται από την τεχνολογία στις προτιμήσεις του καταναλωτή, οι οποίες εξαρτώνται από την περιοχή ή τη χώρα στην οποία κυκλοφορεί το προϊόν.

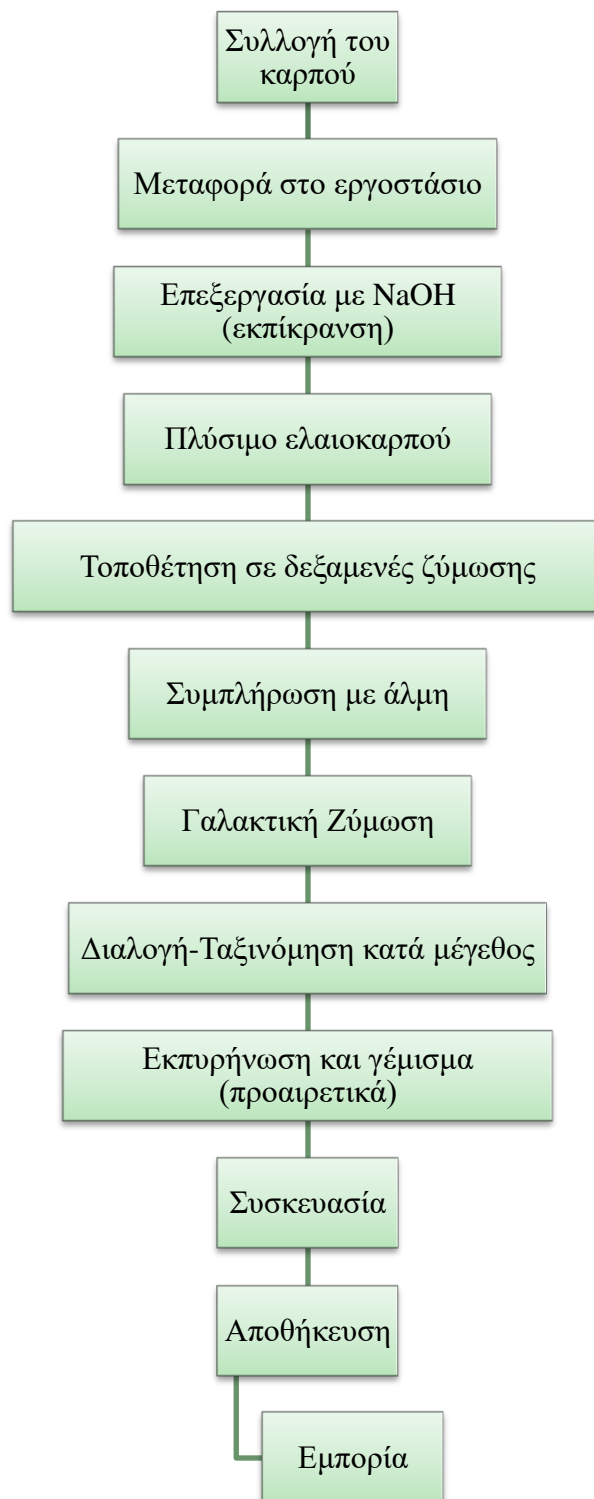
Στην περίπτωση των πράσινων ελιών Ισπανικού τύπου, η γαλακτική ζύμωση συνιστά τη βασική διεργασία. Από την άλλη, στην περίπτωση των φυσικών μαύρων ελιών Ελληνικού τύπου, η κύρια διεργασία που είναι υπεύθυνη για την αυθόρμητη ζύμωση είναι η δράση ζυμών, καθώς και γαλακτικών βακτηρίων σε μικρότερο βαθμό. Οι μαύρες ελιές τύπου Καλιφόρνιας δεν χρειάζονται απαραίτητα μία διαδικασία ζύμωσης, και μπορεί να γίνει η επεξεργασία τους κατευθείαν με

αλκαλικό διάλυμα και να οξειδωθούν, στη συνέχεια ξέπλυμα, τοποθέτηση στην άλμη, κονσερβοποίηση και αποστείρωση. Ωστόσο, ένα μέρος της σοδειάς μπορεί να τοποθετηθεί απευθείας σε άλμη για μια μεταβλητή περίοδο συντήρησης και να γίνει η επεξεργασία της στη συνέχεια. Σε αυτή την περίπτωση πραγματοποιείται μία ζύμωση παρόμοια με εκείνη που γίνεται κατά την παραγωγή των φυσικών μαύρων ελιών Ελληνικού τύπου.

1.5.1 Ελιές Ισπανικού τύπου

Ανάμεσα στις πράσινες ελιές, που αποτελούν περίπου το 42% της παγκόσμιας παραγωγής επιτραπέζιων ελιών, το σημαντικότερο εμπορικό προϊόν είναι οι Ισπανικού τύπου, οι οποίες με τη σειρά τους αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό του διεθνούς εμπορίου. Σύμφωνα με το Διεθνές Ποιοτικό Πρότυπο για τις Επιτραπέζιες Ελιές στο Διεθνές Εμπόριο (Trade Standard Applying to Table Olives, COI/OT/NC no. 1 of December 2004) αυτές οι ελιές περιγράφονται ως «κατεργασμένες σε αλκαλικό διάλυμα και στη συνέχεια συσκευασμένες σε άλμη στην οποία υποβάλλονται σε πλήρη γαλακτική ζύμωση» (Fernandez Diez, 1991). Γενικά, μπορούν να διατηρούνται και ως έχουν, ωστόσο αν η ζύμωση δεν είναι πλήρης, τότε φέρουν την ονομασία «πράσινες ελιές σε άλμη» και δεν λέγονται πλέον Ισπανικού τύπου. Σε αυτή την περίπτωση, η περαιτέρω συντήρησή τους, σε τιμές pH εντός των ορίων που ορίζονται από το Πρότυπο, πρέπει να διασφαλίζεται με (1) αποστείρωση ή παστερίωση, (2) προσθήκη συντηρητικών, (3) ψύξη, ή (4) χρήση αδρανούς αερίου, χωρίς άλμη.

Άλλες πράσινες ελιές παρασκευάζονται χωρίς να προηγηθεί αλκαλική κατεργασία και τοποθετούνται απευθείας σε άλμη, είτε για να υποβληθούν σε φυσική ζύμωση, είτε για να διατηρηθούν με κάποια από τις τεχνικές που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Ωστόσο, η εμπορική τους σημασία είναι μικρή, παρόλο που τα τελικά προϊόντα που προκύπτουν από αυτή τη διαδικασία μπορεί να είναι εξαιρετικής ποιότητας. Τα διάφορα στάδια παραγωγής πράσινων ελιών Ισπανικού τύπου σε άλμη φαίνονται στο Σχήμα 1.1.



Σχήμα 1.1: Διάγραμμα επεξεργασίας πράσινης επιτραπέζιας ελιάς Ισπανικού τύπου (Μπαλατσούρας, 2004)

Οι καρποί συλλέγονται όταν το χρώμα τους είναι ακόμα πράσινο ή κιτρινοπράσινο ενώ η συγκομιδή γίνεται χειρωνακτικά, παρά τις πολυάριθμες προσπάθειες που έχουν γίνει προκειμένου να γίνεται μηχανική συγκομιδή. Οι φρέσκοι ελαιόκαρποι μεταφέρονται στο εργοστάσιο είτε σε κιβώτια είτε σε καλάθια μεγαλύτερης χωρητικότητας. Οι καρποί παραμένουν εκεί για ένα χρονικό διάστημα από μερικές ώρες μέχρι 3-4 ημέρες, ανάλογα με την ποικιλία. Μετά από τη διαλογή και την προαιρετική ταξινόμηση κατά μέγεθος, οι καρποί οδηγούνται προς αλκαλική κατεργασία.

Οι καρποί υπόκεινται σε κατεργασία με αραιωμένο διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) για την εξάλειψη του μεγαλύτερου μέρους της ελευρωπαΐνης. Σε αυτή την κατεργασία, το αλκαλικό διάλυμα διεισδύει στο σάρκωμα σε βάθος 2/3 με 3/4 της απόστασης μεταξύ φλοιού και πυρήνα. Η συγκέντρωση του αλκαλικού διαλύματος κυμαίνεται γενικά από 1.3 μέχρι 2.6% w/v, ανάλογα με τη θερμοκρασία, την ποικιλία και το στάδιο ωρίμανσης των καρπών, και ρυθμίζεται με τέτοιο τρόπο ώστε η κατεργασία να χρειάζεται έναν καθορισμένο αριθμό ωρών για να επιτύχει την κατάλληλη για κάθε ποικιλία διείσδυση (Fernandez Diez, 1991; Garrido Fernandez *et al.*, 1997).

Ο προσεκτικός έλεγχος των παραγόντων που αναφέρθηκαν προηγουμένως (συγκέντρωση αλκαλικού διαλύματος, διείσδυση αλκαλικού διαλύματος και χρόνος της κατεργασίας) έχει τεράστια επίδραση στην ποιότητα του τελικού προϊόντος. Όταν γίνεται η επεξεργασία των καρπών με πολύ χαμηλής συγκέντρωσης διάλυμα και επομένως για περισσότερο χρόνο προκαλείται αλλαγή στο χρώμα σε βαθμό που να είναι οριακά αποδεκτό και η ζύμωση να είναι φτωχή. Στον αντίποδα, μία υψηλή συγκέντρωση μπορεί να προκαλέσει ελαττώματα στην υφή και μεγάλες απώλειες ζυμώσιμης ύλης, που είναι σημαντική για την περαιτέρω ζύμωση.

Μετά την αλκαλική κατεργασία, οι καρποί ξεπλένονται με νερό για απομάκρυνση της μεγαλύτερης ποσότητας του αλκαλικού διαλύματος που παραμένει στο σάρκωμα. Η διάρκεια και ο αριθμός των απαιτούμενων καθαρισμών είναι επίσης σημαντικοί παράγοντες. Επιπλέον, μπορεί να προκληθεί και εκτεταμένη απώλεια οργανικών αλάτων και, ως συνέπεια αυτής, εξάλειψη της ρυθμιστικής ικανότητας του μέσου. Τέλος, μεγάλος χρόνος εκπλύσεων μπορεί να

οδηγήσει σε σοβαρή βακτηριακή μόλυνση, προτού οι καρποί τοποθετηθούν στην άλμη. Αντίθετα, υπερβολικά σύντομες εκπλύσεις προκαλούν μεγάλη συγκέντρωση οργανικών αλάτων στους καρπούς, που συνακόλουθα εμποδίζει την επίτευξη κατάλληλων τιμών pH κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (Garrido Fernandez *et al.*, 1997).

Μετά από τις εκπλύσεις, οι καρποί τοποθετούνται σε διάλυμα χλωριούχου νατρίου (NaCl), όπου λαμβάνει χώρα η γαλακτική ζύμωση. Μέσω ώσμωσης, η άλμη μετατρέπεται σε ένα πλούσιο μέσο καλλιέργειας για τους μικροοργανισμούς που είναι υπεύθυνοι για τη ζύμωση. Η ταχύτητα αυτής της μετατροπής εξαρτάται από την ποικιλία, την αλκαλική κατεργασία και τις εκπλύσεις, την αναλογία καρπών προς άλμη, τη συγκέντρωση αλάτων, τη θερμοκρασία, κτλ. Η σειρά με την οποία γίνεται αντιληπτή η ανάπτυξη κάθε μικροοργανισμού εξαρτάται από τις απαιτήσεις του σε θρεπτικά συστατικά.

Η αρχική συγκέντρωση της άλμης είναι αρκετά σημαντική. Αν είναι πολύ χαμηλή, η επίσης χαμηλή ωσμωτική πίεση μπορεί να οδηγήσει σε φθορά από σπόρια μικροοργανισμών του είδους *Clostridium* κατά τη διάρκεια του πρώτου σταδίου της ζύμωσης, εφόσον η τιμή του pH παραμένει πολύ υψηλή. Στον αντίποδα, αν η συγκέντρωση του άλατος είναι πολύ υψηλή, οι καρποί μπορεί να συρρικνωθούν μη αντιστρεπτά.

Μετά την αρχική μείωση της συγκέντρωσης του άλατος, πρέπει να υπάρξει βαθμιαία αύξησή της για τη διατήρηση της καλής υφής των καρπών και για την επίτευξη καλύτερης ζύμωσης και αποθήκευσης. Ωστόσο, η αύξηση άλατος πρέπει να γίνεται αρκετά αργά, για να επιτρέπουν τη σωστή ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων. Μία καλή προσέγγιση είναι η διατήρηση της συγκέντρωσης της άλμης μεταξύ 5 και 6% κατά τη μεγαλύτερη διάρκεια της φάσης της ζύμωσης, φτάνοντας στο 7% στο τέλος αυτού του σταδίου της διαδικασίας. Επιπλέον, μπορεί να αυξηθεί στο 8% ή και παραπάνω κατά τη φάση της αποθήκευσης, για την αποφυγή της ανάπτυξης προπιονικών βακτηρίων κατά τη διάρκεια του τελευταίου σταδίου της ζύμωσης, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε εξάντληση του γαλακτικού οξέος (Fernandez Diez, 1991).

Τα δοχεία που χρησιμοποιούνται σε όλα τα βασικά στάδια της μεθόδου (αλκαλική κατεργασία, εκπλύσεις, ζύμωση και περαιτέρω αποθήκευση του

ζυμωμένου προϊόντος) μπορεί να είναι εντελώς κλειστά, για να δημιουργούν αναερόβιες συνθήκες και να αποκλείουν την ανάπτυξη στρώματος μυκήτων στην επιφάνεια της άλμης.

Οι πράσινες ελιές τοποθετούνται σε γυάλινα βάζα ή κονσερβοποιούνται σε ερμητικά κλειστούς περιέκτες, οι οποίοι παρουσιάζουν συνήθως τα χαρακτηριστικά που φαίνονται στον Πίνακα 1.1. Το άνω όριο αυτών των παραμέτρων, που για τις πιο σημαντικές από αυτές καθορίζεται από τα διεθνή πρότυπα, επιτρέπει την ασφαλή αποθήκευση του εμφιαλωμένου ή κονσερβοποιημένου προϊόντος χωρίς παστερίωση, και χωρίς να σχηματίζεται ίζημα στον περιέκτη. Σύμφωνα με αυτά τα πρότυπα, εφόσον οι περιέκτες παστεριώνονται, η συγκέντρωση του άλατος θα πρέπει να μειώνεται μέχρι 2% και η τιμή του pH να αυξάνεται μέχρι 4,3 (Fernandez Diez, 1991).

Πίνακας 1.1: Τυπικό εύρος τιμών για τις βασικές φυσικοχημικές παραμέτρους των μικρών περιεκτών πράσινων ελιών Ισπανικού τύπου σε άλμη (Fernandez Diez, 1991)

Παράμετρος	Εύρος
Τιμή pH	3,2-4,0
Ελεύθερη οξύτητα, γαλακτικό οξύ %	0,4-0,6
Συνολική οξύτητα, κανονικότητα, N	0,02-0,07
Χλωριούχο Νάτριο, % w/v	5-7

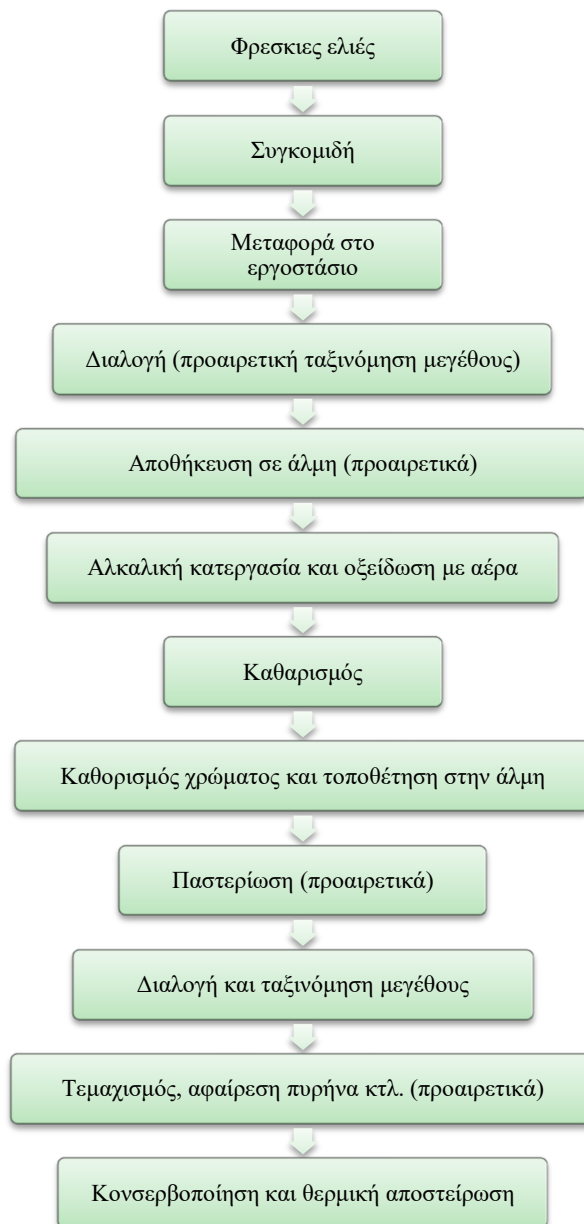
Η παραγωγή πράσινων ελιών Ισπανικού τύπου μπορεί να χωριστεί σε τρεις φάσεις: την αρχική, που περιλαμβάνει (α) την αλκαλική κατεργασία και τον καθαρισμό με νερό, (β) τη βασική, που περιλαμβάνει τη ζύμωση σε άλμη και τη δευτερεύουσα δράση άλλων μικροοργανισμών, και (γ) την τελική, που περιλαμβάνει τη συντήρηση στην άλμη και την εμφιάλωση. Οι αλλαγές στη χημική σύσταση των πράσινων ελιών Ισπανικού τύπου κατά τη διάρκεια αυτής της επεξεργασίας φαίνονται στον Πίνακα 1.2.

Πίνακας 1.2: Αλλαγές στη χημική σύσταση των πράσινων ελιών Ισπανικού τύπου σε άλμη κατά την επεξεργασία τους (Fernandez Diez, 1991)

Διεργασία	Αλλαγή στη Σύσταση
	<i>Αρχική Φάση</i>
Αλκαλική κατεργασία και καθαρισμός με νερό	Υδρόλυση ελευρωπαΐνης Απώλεια σακχάρων και οργανικών οξέων Σχηματισμός οργανικών οξέων από σάκχαρα
	<i>Βασική Φάση</i>
Ζύμωση σε άλμη, κυρίως γαλακτική Δευτερεύουσα δράση άλλων μικροοργανισμών	Σχηματισμός γαλακτικού οξέος από σάκχαρα και άλλα ζυμώσιμα συστατικά Σχηματισμός άλλων οργανικών οξέων Αποικοδόμηση των χρωστικών
	<i>Τελική Φάση</i>
Συντήρηση στην άλμη Εμφιάλωση	Καμία, υπό φυσιολογικές συνθήκες

1.5.2 Μαύρες ελιές τύπου Καλιφόρνιας

Το IOC standard περιγράφει τις μαύρες ελιές τύπου Καλιφόρνιας ως «ελιές που παραλαμβάνονται από καρπούς που, ενώ δεν έχουν ωριμάσει πλήρως, έχουν σκουρύνει με οξείδωση και των οποίων η πικρή γεύση έχει απομακρυνθεί μέσω κατεργασίας με αλκαλικά διαλύματα, και οι οποίες πρέπει να συσκευάζονται σε άλμη και να συντηρούνται με θερμική αποστείρωση» (Fernandez Diez, 1991). Οι κύριες χώρες-παραγωγοί είναι οι ΗΠΑ (46-48% της παγκόσμιας παραγωγής επιτραπέζιων ελιών αυτού του τύπου) και η Ισπανία (25-32%). Στο Σχήμα 1.2. φαίνονται τα διάφορα στάδια παραγωγής επιτραπέζιων ελιών αυτού του τύπου:



Σχήμα 1.2: Διάγραμμα ροής της παραγωγής μαύρων ελιών τύπου Καλιφόρνιας σε άλμη (Μπαλατσούρας, 1995)

Αυτή η διαδικασία μπορεί να ακολουθείται είτε απευθείας σε φρέσκες ελιές είτε μετά από μία περίοδο αποθήκευσης των ελιών σε άλμη, η διάρκεια της οποίας ποικίλει από 2 έως 6 μήνες. Η αιτία της προαιρετικής αποθήκευσης σε άλμη είναι ότι δεν μπορεί να γίνει απευθείας η επεξεργασία όλων των καρπών που είναι διαθέσιμοι κατά τη συγκομιδή, εξαιτίας της χωρητικότητας των εργοστασίων

επεξεργασίας, καθώς επίσης και ότι δεν είναι πρακτικό να κρατούνται μεγάλες ποσότητες κονσερβοποιημένων προϊόντων για πολύ καιρό.

Κατά την πρώτη διεργασία, διαλεγμένες φρέσκες ελιές υπόκεινται σε κατεργασία με υδατικά διαλύματα υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) για διαφορετικές χρονικές περιόδους, προκειμένου να γίνει σταδιακή διείδυση του διαλύματος στο σάρκωμα. Μετά από κάθε αλκαλική κατεργασία, οι καρποί τοποθετούνται σε καθαρό νερό και οξειδώνονται με εισαγωγή αέρα υπό πίεση για το μετασχηματισμό των πολυφαινολικών συστατικών, έτσι ώστε να επιτυγχάνεται ολοκληρωμένο μαύρισμα του φλοιού τους και ένας ενιαίος χρωματισμός στο σάρκωμα.

Το χρώμα του φλοιού του ελαιόκαρπου κατά την περίοδο της συγκομιδής ποικίλει από κιτρινοπράσινο μέχρι ιώδες, ενώ η γεύση, το χρώμα και η υφή του τελικού προϊόντος εξαρτώνται περαιτέρω από το στάδιο ωριμότητας και την ποικιλία. Οι Mission και Manzanilla στις ΗΠΑ και οι Hojiblanca και Cecerena στην Ισπανία είναι οι καλύτερες ποικιλίες για αυτού του τύπου την επεξεργασία (Fernandez Diez, 1991).

Ο αριθμός των αλκαλικών κατεργασιών κυμαίνεται παραδοσιακά μεταξύ 3 και 5, αν και στη σύγχρονη βιομηχανία υπάρχει τάση για μείωση αυτού του αριθμού στο μικρότερο δυνατό. Η συγκέντρωση του αλκαλικού διαλύματος εξαρτάται από το στάδιο ωριμότητας των καρπών, την ποικιλία, τη θερμοκρασία και την επιθυμητή διείδυση. Τα διαστήματα της οξείδωσης με αέρα, μεταξύ των αλκαλικών κατεργασιών συνήθως διαρκούν περίπου 12 h.

Οι δεξαμενές που χρησιμοποιούνται για την αλκαλική κατεργασία, την οξείδωση με αέρα και τους καθαρισμούς πρέπει να έχουν κατάλληλες ρυθμίσεις για να επιτυγχάνουν ενιαία κατανομή του υπό πίεση αέρα μέσα σε όλη τη μάζα των καρπών και του υγρού. Ο αριθμός και η διάρκεια των καθαρισμών πρέπει να είναι τέτοιοι, ώστε οι πλυμένες ελιές να έχουν τελική τιμή pH γύρω στο 7. Συνήθως, στο τελευταίο πλύσιμο προστίθεται στο νερό και διάλυμα γλυκονικού σιδήρου 0,1% για τη ρύθμιση του χρώματος που λαμβάνουν οι καρποί με την οξείδωση. Επιπλέον, οι ελιές τοποθετούνται σε άλμη που περιέχει 3% χλωριούχο νάτριο (NaCl), κονσερβοποιούνται και υπόκεινται σε θερμική αποστείρωση (Fernandez Diez, 1991).

Οι καρποί που δεν υπόκεινται σε απευθείας κατεργασία μετά τη συγκομιδή και που παραμένουν για μία μεταβλητή χρονική περίοδο σε άλμη, μπορεί να υποστούν μία αυθόρμητη διαδικασία ζύμωσης, παρόμοια σχεδόν σε όλους τους τομείς με αυτή που ακολουθείται για τις φυσικές μαύρες ελιές σε άλμη (Ελληνικού τύπου), όπως θα περιγραφεί παρακάτω. Μετά το πέρας της περιόδου αποθήκευσής τους, η επεξεργασία των καρπών γίνεται με τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε προηγουμένως για τους φρέσκους καρπούς. Ωστόσο, η συγκέντρωση των αλκαλικών διαλυμάτων και ο χρόνος κάθε κατεργασίας επηρεάζονται από τις συνθήκες που επικρατούσαν κατά την αποθήκευση και πρέπει να ελέγχονται με προσοχή.

Το τελικό προϊόν των μαύρων ελιών τύπου Καλιφόρνιας σε άλμη παρουσιάζει τυπικές τιμές pH μεταξύ 5,8 και 7,9 και συγκεντρώσεις άλατος μεταξύ 1 και 3% w/v NaCl. Ωστόσο, για συγκεκριμένες προτιμήσεις των καταναλωτών χρησιμοποιούνται επίσης συγκεντρώσεις άλατος κοντά στο 5% w/v (Fernandez Diez, 1991).

Η παραγωγή μαύρων ελιών τύπου Καλιφόρνιας μπορεί, επίσης, να χωριστεί σε τρεις φάσεις: (α) την αρχική, που περιλαμβάνει τη ζύμωση σε άλμη και είναι προαιρετική, (β) τη βασική, που περιλαμβάνει την αλκαλική κατεργασία, τον καθαρισμό, την οξείδωση με αέρα, την τοποθέτηση σε άλμη, την κονσερβοποίηση και τη θερμική αποστείρωση, και (γ) την τελική φάση, που περιλαμβάνει την αποθήκευση του σφραγισμένου και αποστειρωμένου προϊόντος. Οι αλλαγές στη χημική σύσταση των μαύρων ελιών τύπου Καλιφόρνιας σε άλμη κατά τη διάρκεια αυτής της επεξεργασίας φαίνονται στον Πίνακα 1.3.

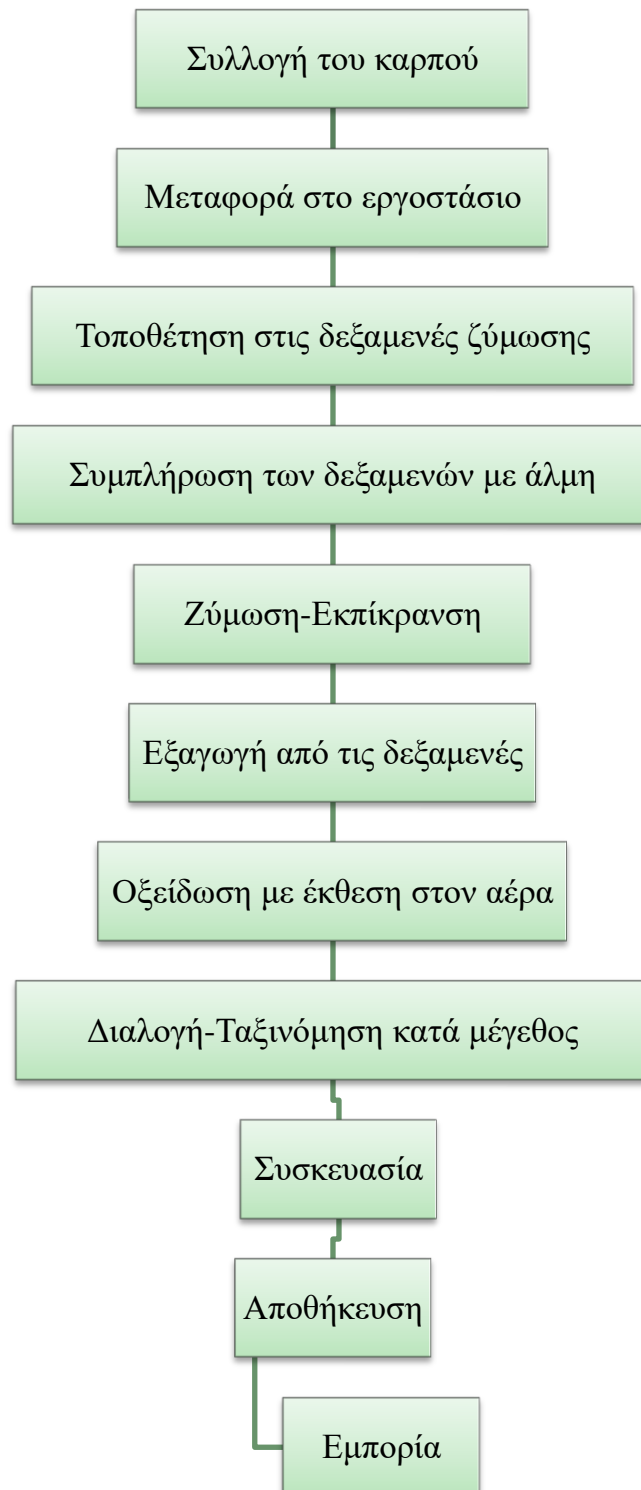
Πίνακας 1.3: Αλλαγές στη χημική σύσταση των μαύρων ελιών τύπου Καλιφόρνιας σε άλμη κατά την επεξεργασία τους (Fernandez Diez, 1991)

Διεργασία	Αλλαγή στη Σύσταση
<i>Αρχική Φάση (προαιρετική)</i>	
Ζύμωση σε άλμη, από γαλακτικά βακτήρια και ζύμες	Αργή απώλεια σακχάρων, τανινών και ελευρωπαΐνης Σχηματισμός οργανικών οξέων και πιθανώς αιθανόλης και άλλων αρωματικών ενώσεων
<i>Βασική Φάση</i>	
Αλκαλική κατεργασία	Υδρόλυση ελευρωπαΐνης
Καθαρισμός	Απώλεια σακχάρων και οργανικών οξέων
Οξειδωση με αέρα	οξέων
Τοποθέτηση σε άλμη	Σχηματισμός οργανικών οξέων από σάκχαρα
Κονσερβοποίηση	σάκχαρα
Θερμική αποστείρωση	Αποικοδόμηση χρωστικών
<i>Τελική Φάση</i>	
Αποθήκευση του σφραγισμένου και αποστειρωμένου προϊόντος	Καμία, υπό φυσιολογικές συνθήκες

1.5.3 Μαύρες ελιές Ελληνικού τύπου

Ανάμεσα στις μαύρες ελιές, που αντιστοιχούν περίπου στο 33-40% της παγκόσμιας παραγωγής επιτραπέζιων ελιών, το πιο σημαντικό εμπορικό προϊόν είναι οι ελιές Ελληνικού τύπου. Το πρότυπο του IOOC τις χαρακτηρίζει ακατέργαστες μαύρες ελιές και τις περιγράφουν ως «τοποθετημένες κατευθείαν σε άλμη». Διαθέτουν φρουτώδη γεύση, που γίνεται πιο έντονα αντιληπτή σε σχέση με τις κατεργασμένες μαύρες ελιές (μαύρες ελιές τύπου Καλιφόρνιας) και συνήθως διατηρούν μία ελαφρά πικρή γεύση. Συντηρούνται με φυσική ζύμωση μέσα στην άλμη (Fernandez Diez, 1991). Οι κύριες χώρες-παραγωγοί είναι η Τουρκία (24-27% της παγκόσμιας παραγωγής επιτραπέζιων ελιών αυτού του τύπου) και η Ελλάδα (18-21%). Τα διάφορα στάδια παραγωγής φυσικών μαύρων ελιών Ελληνικού τύπου φαίνονται στο Σχήμα 1.3:

Οι ελιές συλλέγονται όταν ωριμάσουν πλήρως ή λίγο πριν ολοκληρωθεί το στάδιο της πλήρους ωρίμανσης, και μπορεί, ανάλογα με την περιοχή, την ποικιλία και το χρόνο της συγκομιδής, να είναι κοκκινόμαυρες, πρασινόμαυρες, καστανόμαυρες, ιώδεις ή μελανοϊώδεις. Οι ελιές μεταφέρονται στο εργοστάσιο με τον τρόπο που περιγράφηκε και προηγουμένως για τις πράσινες ελιές Ισπανικού τύπου σε άλμη.



Σχήμα 1.3: Διάγραμμα επεξεργασίας επιτραπέζιας ελιάς Ελληνικού τύπου (Μπαλατσούρας, 2004)

Μετά τη διαλογή για το διαχωρισμό των ελαττωματικών καρπών, και μερικές φορές μετά από μία πρόχειρη ταξινόμηση για την εξάλειψη των μικρότερων σε μέγεθος, οι ελαιόκαρποι ξεπλένονται με νερό για την απομάκρυνση της επιφανειακής σκόνης και στη συνέχεια τοποθετούνται στην άλμη.

Οι δεξαμενές της ζύμωσης συνήθως είναι θαμμένες κάτω από το έδαφος για την αποφυγή υψηλών θερμοκρασιών, λόγω του υψηλού βαθμού ωρίμανσης των ελιών. Παραδοσιακά, στόχος είναι η διατήρηση αναερόβιων συνθηκών στα δοχεία για την αποφυγή της ανάπτυξης επιφανειακών μυκήτων, που επηρεάζουν την υφή και τη γεύση των ελιών.

Η διαδικασία της ζύμωσης είναι πολύ αργή, επειδή η διάχυση των διαλυτών συστατικών του καρπού στην άλμη είναι αργή, εξαιτίας του ότι δεν έχει υποβληθεί σε κατεργασία με αλκαλικό διάλυμα. Κατά τη ζύμωση αναπτύσσεται μία σύνθετη μικροχλωρίδα: αρνητικά κατά Gram βακτήρια, θετικοί κατά Gram βάκιλοι, ζύμες και, μερικές φορές, οξυγαλακτικά βακτήρια (Nychas et.al., 2002, Tassou et al, 2002). Οι τελευταίοι αναπτύσσονται σε μικρές σχετικά συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου (NaCl), κάτω από 7-8%. Οι ζύμες αποτελούν τον κυρίαρχο πληθυσμό, και τα πιο αντιπροσωπευτικά είδη είναι οι *Saccharomyces oleaginosus* και *Hansenula anomala*.

Υπό αυτές τις συνθήκες, το τελικό προϊόν έχει τιμή pH μεταξύ 4,5 και 4,8 και ελεύθερη οξύτητα από 0,1 έως 0,6%, εκφρασμένη σε γαλακτικό οξύ (Fernandez Diez, 1991). Για αυτό το λόγο, υπάρχει τάση να αυξάνεται βαθμιαία η συγκέντρωση της άλμης, η οποία συχνά φτάνει στο 10% ή και περισσότερο, στο τέλος της διαδικασίας της ζύμωσης.

Στη συνέχεια, οι ελιές που έχουν υποστεί ζύμωση αφήνονται για έκθεση στον αέρα, προκειμένου να βελτιωθεί το χρώμα τους, κατατάσσονται κατά μέγεθος και, τέλος, συσκευάζονται σε μία κατάλληλη νέα άλμη. Τα δοχεία που χρησιμοποιούνται σε αυτό το στάδιο είναι μεγάλα ξύλινα ή πλαστικά βαρέλια των 130-150 kg περίπου, μεταλλικά δοχεία των 10-15 kg, ή μικρότερες πλαστικές σακούλες.

Κατά τη διάρκεια αυτής της παραδοσιακής μεθόδου, υπάρχουν συχνά μεγάλες απώλειες σε ελιές συγκεκριμένων ποικιλιών, λόγω της ασθένειας της αεριοπάθησης (alambrado ή fish eye). Αυτό οφείλεται σε διάφορες αιτίες, όπως ο μεταβολισμός του καρπού, που επηρεάζεται από τις αναερόβιες συνθήκες του μέσου και το στάδιο

ωρίμανσης του ίδιου του καρπού, και η δράση των ζυμών όπως αναφέρθηκαν παραπάνω. Για την αποφυγή αυτών των απωλειών, έχει αναπτυχθεί μία ελεγχόμενη αερόβια μέθοδος, η οποία εισάγει αέρα μέσα στη μάζα των καρπών και την άλμη κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (Fernandez Diez, 1991).

Τέλος, υπάρχουν δύο μέθοδοι για τη συσκευασία των ελιών σε μικρά δοχεία που προορίζονται για τους καταναλωτές, οι οποίες θεωρούνται το ίδιο αποτελεσματικές:

1. η παστερίωση στους 80°C για 4 min, ή
2. η προσθήκη σορβικού καλίου 0,05%, το οποίο εκφράζεται ως σορβικό οξύ σε ισορροπία (Fernandez Diez, 1991).

Η παραγωγή των φυσικών μαύρων ελιών Ελληνικού τύπου σε άλμη μπορεί να χωριστεί σε δύο φάσεις: (α) τη βασική, που περιλαμβάνει την αυθόρμητη ζύμωση σε άλμη, και (β) την τελική, που περιλαμβάνει την αποθήκευση στην άλμη και την κονσερβοποίηση. Οι αλλαγές στη χημική σύσταση των φυσικών μαύρων ελιών Ελληνικού τύπου σε άλμη κατά τη διάρκεια αυτής της επεξεργασίας φαίνονται στον Πίνακα 1.4.

Πίνακας 1.4: Αλλαγές στη χημική σύσταση των φυσικών μαύρων ελιών Ελληνικού τύπου σε άλμη κατά την επεξεργασία τους (Fernandez Diez, 1991)

Διεργασία	Αλλαγή στη Σύσταση
<i>Αρχική Φάση</i>	
Καμία	Καμία
<i>Βασική Φάση</i>	
Αυθόρμητη ζύμωση σε άλμη. Επικρατούν οι ζύμες, μερικές φορές υπάρχουν γαλακτικά βακτήρια	Αργή απώλεια σακχάρων, τανινών και ελευρωπαΐνης Σχηματισμός οργανικών οξέων και οξικού αιθυλεστέρα
<i>Τελική Φάση</i>	
Αποθήκευση στην άλμη Κονσερβοποίηση	Καμία, υπό φυσιολογικές συνθήκες

1.6 Ελληνικές ποικιλίες επιτραπέζιας ελιάς

Σύμφωνα με το ΙΟΟC ως επιτραπέζια ελιά θεωρείται ο υγιής καρπός καθορισμένων ποικιλιών του καλλιεργούμενου ελαιοδέντρου, που συγκομίζεται σε κατάλληλο στάδιο ωριμότητας και ποιότητας ώστε μετά από κατάλληλες μορφές συντήρησης να δώσει ένα βρώσιμο προϊόν. Στην επεξεργασία μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορα υλικά ή αρτύματα. Κάθε μέθοδος επεξεργασίας στοχεύει στην αποικοδόμηση της ελαιοευρωπαϊνης που προσδίδει πικρή γεύση και καθιστά αδύνατο προς άμεση τροφή την ελιά.

Σύμφωνα με την Πανελλήνια Ένωση Μεταποιητών και Τυποποιητών Εξαγωγέων Επιτραπέζιων Ελιών (ΠΕΜΕΤΕ) στην Ελλάδα καλλιεργούνται κυρίως τρεις ποικιλίες ελιάς για επιτραπέζια χρήση: η **Καλαμών** (φυσική μαύρη), η **Κονσερβολιά** (πράσινη, πρασινοκόκκινη και μαύρη) και η **Χονδρολιά Χαλκιδικής** (πράσινη).

I. Καλαμών (Εικόνα 1.2)



Εικόνα 1.2: Ελιά Καλαμών

Η Καλαμών ή Ελιά Καλαμάτας είναι ίσως η πιο εξαιρετική επιτραπέζια ποικιλία προσαρμοσμένη στο μικροκλίμα και στα εδάφη της Μεσσηνίας απ' όπου διαδόθηκε και στην Λακωνία. Στις δύο αυτές περιοχές πραγματοποιείται κυρίως καλλιέργειά της. Αναπτύσσεται και ευδοκimeί σε περιοχές υψηλής ατμοσφαιρικής υγρασίας και έντονων βροχοπτώσεων. Θεωρείται μεσόκαρπη-αδρόκαρπη ποικιλία, με ιδιαίτερη ανθεκτικότητα στα υφάλμυρα νερά. Διαθέτει πολύ συμπαγή σάρκα με περιεκτικότητα λαδιού γύρω στο 25% και αρκετά ζυμώσιμα συστατικά (3-3,5%). Η επιδερμίδα του ώριμου καρπού αποκτά ένα βαθύ μαύρο χρώμα, η ωρίμανση γίνεται τον Νοέμβρη και παρατείνεται σε περίπτωση υπερπαραγωγής. Είναι ποικιλία αρκετά ανθεκτική στην

προσβολή του δάκου. Το ευνοϊκό κλίμα, η ηλιοφάνεια, ο μικρός κλήρος που επιτρέπει στον παραγωγό να περιποιείται κάθε δέντρο, είναι στοιχεία που βοηθούν στην συλλογή του ελαιόκαρπου στο σωστό βαθμό ωρίμανσης, δίνοντας άριστη ποιότητα, όπως σημειώνει το Υπουργείο Γεωργίας ενώ κάνει λόγο για προϊόν με τεράστια δυναμική. Τη βρίσκουμε και με τις ονομασίες καλαματιανή, χονδρολιά, αετονυχολιά, κορακολιά, νυχάτη κ.λπ. Συναντάται στη Λακωνία, στη Μεσσηνία, στη Φθιώτιδα, στην Αιτωλοακαρνανία και στην επαρχία της Κυνουρίας του νομού Αρκαδίας. Είναι κατάλληλη για επεξεργασία ως μαύρη ώριμη ελιά Ελληνικού τύπου. Χρησιμοποιείται για την παρασκευή μαύρων κονσερβών εκλεκτής ποιότητας. Είναι η πιο ακριβή μαύρη επιτραπέζια ελιά και πωλείται συσκευασμένη μέσα σε άλμη ή άλμη με ξύδι ή ελαιόλαδο.

II. Κονσερβολιά (Εικόνα 1.3)



Εικόνα 1.3: Ελιά ποικιλίας Κονσερβολιά

Είναι η πιο διαδεδομένη επιτραπέζια ποικιλία στην χώρα μας. Αποτελεί το 60% της συνολικής Ελληνικής παραγωγής και καλλιεργείται σχεδόν αποκλειστικά στην κεντρική Ελλάδα αλλά και σε άλλες περιοχές. Απαντάται σε Στερεά Ελλάδα (Φθιώτιδα, Φωκίδα, Βοιωτία, Αιτωλοακαρνανία), Ανατολική Θεσσαλία (Αγιά, Πήλιο), Ήπειρο (Άρτα, Παραμυθιά, Ηγουμενίτσα) και λιγότερο στην Αχαΐα και Ηλεία.

Μοιάζει με την Ισπανική ποικιλία Manzanilla, ποικιλία και είναι μεσόκαρπη μέχρι αδρόκαρπη (αρκετά μεγάλος καρπός) μήκους 2-3 εκ. και πάχους 2-2.5 εκ.. Το σχήμα της είναι στρογγυλό έως ωοειδές. Η σάρκα είναι συμπαγής αλλά σχετικά ελλειμματική σε λιπαρές ουσίες και ζυμώσιμα συστατικά, η επιδερμίδα λεπτή και

ελαστική αλλάζει σταδιακά χρώμα από πράσινο, ρόδινο, ερυθροϊώδες, ιώδες και μαύρο στην υπερωρίμανση της. Ωριμάζει από τα μέσα Νοέμβρη-τέλη Δεκέμβρη. Όταν προορίζεται για την παραγωγή πράσινης ελιάς Ισπανικού τύπου η συλλογή γίνεται δύο μήνες νωρίτερα. Έχει πολύ καλή τεχνολογική συμπεριφορά όταν υφίσταται επεξεργασία ως πράσινη, αλλά ως φυσική μαύρη υστερεί ποιοτικά κυρίως στην υφή καθώς η σάρκα μαλακώνει κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.

III. Χονδρολιά Χαλκιδικής (Εικόνα 1.4)



Εικόνα 1.4: Χονδρολιά Χαλκιδικής

Είναι ποικιλία διπλής χρήσης, δηλαδή χρησιμοποιείται και για λάδι αλλά και για επιτράπεζια ελιά, αδρόκαρπη, περισσότερο κι από την Κονσερβολιά, με το βάρος του καρπού να φτάνει και τα 14 γραμμάρια. Το κιλό απαρτίζεται από 120-140 καρπού και η σχέση σάρκας / πυρήνα είναι 9 μέρη σάρκα και ένα κουκούτσι. Η σάρκα δεν είναι πολύ συμπαγής και υστερεί στην περιεκτικότητα ζυμώσιμων συστατικών. Η ποικιλία αυτή, που καλλιεργείται αποκλειστικά στην Χαλκιδική, μοιάζει αρκετά με την Ιταλική *Ascolana tenera*. Κατά την ωρίμανση το χρώμα της επιδερμίδας περνάει διαδοχικά από το πράσινο στο αχυροκίτρινο, στο ρόδινο και τελικά στο ξεθωριασμένο ερυθρόμαυρο, αλλά ποτέ μαύρο. Ο προορισμός της Χονδρολιάς είναι η παραγωγή πράσινων ελιών Ισπανικού τύπου και λαδιού (20% απόδοση).

1.6.1 Εμπορικοί τύποι επιτραπέζιας ελιάς στην Ελλάδα

Ο κύριος σκοπός των παραδοσιακών και σύγχρονων μεθόδων επεξεργασίας είναι η μερική ή ολική απομάκρυνση της ελευρωπαΐνης που προσδίδει πικρή γεύση στον καρπό, έτσι ώστε να καταστεί εδώδιμος και αποδεκτός από το καταναλωτικό κοινό. Ο διαχωρισμός του καρπού και των μεθόδων επεξεργασίας βασίζεται στην ωριμότητα του νωπού καρπού και στο χρώμα του τελικού προϊόντος.

Για το λόγο αυτό έχουν καθιερωθεί τέσσερις τύποι επιτραπέζιας ελιάς: οι πράσινες (green), οι φυσικώς μαύρες (naturally black), οι ξανθές (turning colour) και οι τεχνητώς μαύρες (black oxidized ή black ripe).

Οι τρεις πρώτοι τύποι αναφέρονται στο χρώμα του καρπού που παραμένει πρακτικά αμετάβλητο σε όλη τη διάρκεια της επεξεργασίας. Αντίθετα, οι τεχνητώς μαύρες ελιές παρασκευάζονται είτε από πράσινες ελιές είτε από ελιές στο στάδιο αλλαγής χρώματος οι οποίες μαυρίζουν κατά την επεξεργασία τους με αλκαλικό διάλυμα και οξείδωση με αέρα.

Για την παρασκευή των διαφόρων τύπων επιτραπέζιων ελιών υπάρχουν πολλές διαφορετικές παραλλαγές των βασικών μεθόδων επεξεργασίας. Το IOOC έχει ομαδοποιήσει αυτές τις μεθόδους σε διάφορους εμπορικούς τύπους. Η ονομασία κάθε τύπου περιλαμβάνει πληροφορίες για την κατάσταση της πρώτης ύλης (π.χ. πράσινος, μαύρος καρπός), καθώς και την διαδικασία που ακολουθήθηκε για την εκπίκρυνση του καρπού (επεξεργασία με αλκαλικό διάλυμα ή απευθείας εμβάπτιση σε άλμη). Οι κυριότεροι εμπορικοί τύποι είναι οι ακόλουθοι:

- **Πράσινες ελιές σε άλμη.** Είναι το προϊόν που προέρχεται από πράσινους καρπούς, οι οποίοι έχουν αποκτήσει το κανονικό μέγεθός τους, είναι συνεκτικοί και υγιείς και υφίστανται εκπίκρυνση με τη χρήση αλκαλικού διαλύματος. Ακολούθως, οι καρποί εμβαπτίζονται σε άλμη όπου υφίστανται γαλακτική ζύμωση. Σε περίπτωση που η ζύμωση δεν είναι πλήρης, η συντήρηση του προϊόντος γίνεται με θερμική επεξεργασία ή με την προσθήκη συντηρητικών ουσιών. Το χρώμα του καρπού ποικίλλει από το φυσικό πράσινο μέχρι το κίτρινο.

- **Φυσικές πράσινες ελιές σε άλμη.** Τοποθετούνται απευθείας σε άλμη χωρίς προηγούμενη εκπίκραση με αλκαλικό διάλυμα όπου υφίστανται οξυγαλακτική ζύμωση.
- **Φυσικές μαύρες ελιές σε άλμη.** Είναι το προϊόν που προέρχεται από συνεκτικούς καρπούς οι οποίοι συγκομίζονται στο στάδιο πλήρους ωριμότητας ή λίγο πριν από αυτό, και τοποθετούνται απευθείας σε άλμη όπου υφίστανται μερική ή ολική γαλακτική ζύμωση. Ο χρωματισμός του τελικού προϊόντος ποικίλλει από καστανό μέχρι μαύρο με όλους τους ενδιάμεσους χρωματισμούς.
- **Φυσικές μαύρες ελιές τύπου ξηράλατος.** Είναι το προϊόν που προέρχεται από καρπούς στο στάδιο της πλήρους ωριμότητας ή υπερ-ωριμότητας, στους οποίους γίνεται επεξεργασία απευθείας με στρωμάτωση σε χονδόκοκκο αλάτι. Το τελικό προϊόν είναι συρρικνωμένο (ζαρωμένο), αρκετά αλμυρό και συντηρείται εκτός άλμης. Για τη βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών η επιφάνεια του καρπού καλύπτεται με ελαιολάδο στο οποίο είναι δυνατόν να προστίθενται αρωματικά φυτά.
- **Τσακιστές ελιές.** Είναι το προϊόν που προέρχεται από ολόκληρες ελιές, συνήθως πράσινες ή στο στάδιο αλλαγής χρώματος, οι οποίες προηγουμένως έχουν υποστεί ειδική επεξεργασία με την οποία διαρρηγνύεται η σάρκα χωρίς να σπάσει ο πυρήνας, ο οποίος παραμένει ολόκληρος μέσα στον καρπό. Στη συνέχεια γίνεται επεξεργασία των καρπών με ελαφρύ διάλυμα αλκάλειας και εμβαπτίζονται σε άλμη όπου υφίστανται γαλακτική ζύμωση. Οι ελιές αυτές διατηρούνται εντός άλμης και εμπλουτίζονται γευστικά με την προσθήκη ξυδιού και αρωματικών φυτών.
- **Χαρακτές ελιές.** Είναι το προϊόν που προέρχεται κυρίως από πράσινες ή μαύρες ελιές οι οποίες χαράσσονται κατά μήκος του μεγάλου άξονα τους και τοποθετούνται σε άλμη όπου υφίστανται γαλακτική ζύμωση. Οι ελιές αυτές διατηρούνται εντός άλμης και εμπλουτίζονται γευστικά με την προσθήκη ξυδιού και αρωματικών φυτών

1.6.2 Προϊόντα ΠΟΠ (Προστατευόμενης ονομασίας προέλευσης)/ ΠΓΕ (Προστατευόμενης γεωγραφικής προέλευσης)

Σύμφωνα με τον Κανονισμό αριθ. 2081/92 του Συμβουλίου, η Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ) δίνει τη δυνατότητα στις χώρες-μέλη να εγγράψουν ορισμένα μεταποιημένα ή μη αγροτικά προϊόντα, τα οποία παρουσιάζουν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά ποιότητας λόγω του ιδιαίτερου τρόπου και του τόπου παραγωγής τους, στο λεγόμενο Μητρώο Προϊόντων Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (ΠΟΠ) ή Προστατευόμενης Γεωγραφικής Ένδειξης (ΠΓΕ). Με αυτό τον τρόπο δίνεται η δυνατότητα στα προϊόντα αυτά μπορούν να διατίθενται στην αγορά με το αντίστοιχο ειδικό σήμα και να προστατεύονται σε κοινοτικό επίπεδο από τον αθέμιτο ανταγωνισμό άλλων ομοειδών προϊόντων διαφορετικής προέλευσης.

Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης (ΠΟΠ)

Η ονομασία μιας περιοχής, ενός συγκεκριμένου χώρου ή μιας χώρας, με την οποία ορίζεται ένα προϊόν που προέρχεται από την εν λόγω γεωγραφική περιοχή και του οποίου η ποιότητα ή τα χαρακτηριστικά οφείλονται κυρίως ή αποκλειστικά στο συγκεκριμένο γεωγραφικό περιβάλλον. Η παραγωγή και η μεταποίηση του προϊόντος πρέπει να λαμβάνουν χώρα σε μία οριοθετημένη γεωγραφική περιοχή και με αναγνωρισμένη τεχνογνωσία που ακολουθείται στην περιοχή.

Προστατευόμενη Γεωγραφική Ένδειξη (ΠΓΕ)

Η ονομασία μιας περιοχής, ενός συγκεκριμένου χώρου ή μιας χώρας, με την οποία ορίζεται ένα προϊόν που προέρχεται από την εν λόγω γεωγραφική περιοχή και του οποίου η ποιότητα ή η φήμη μπορεί να αποδοθεί στο γεωγραφικό χώρο με τους φυσικούς ή και ανθρώπινους παράγοντες που περιλαμβάνει. Εδώ ο δεσμός με τη γεωγραφική περιοχή αρκεί να ισχύει τουλάχιστον για ένα από τα στάδια της παραγωγής, της μεταποίησης ή της επεξεργασίας. Επιπλέον, το προϊόν θα πρέπει να έχει αποκτήσει ένα καλό όνομα από το οποίο μπορεί να επωφεληθεί με την αναγνώριση της γεωγραφικής ένδειξης.

Η Ευρωπαϊκή νομοθεσία, και άρα και η εθνική, προστατεύει τη καταχωρισμένη ονομασία από:

- κάθε παράνομη άμεση ή έμμεση εμπορική χρήση.
- οποιαδήποτε αντιποίηση, απομίμηση ή υπαινιγμός.
- οποιαδήποτε άλλη ψευδή ή παραπλανητική ένδειξη.
- οποιαδήποτε άλλη πρακτική ικανή να παραπλανήσει τον καταναλωτή.

Η αναγνώριση από την ΕΕ των παραδοσιακών προϊόντων γεωγραφικής προέλευσης (ΠΓΕ) αποσκοπεί επίσης να θέσει στην διάθεση του καταναλωτή σαφείς και συνοπτικές πληροφορίες για την προέλευση αυτών των προϊόντων και για την μεθοδολογία παραγωγής τους που πρέπει να σέβεται τους βασικούς και ποιοτικά καθοριστικούς παραδοσιακούς όρους. Ο οργανισμός ελέγχου της πιστής εφαρμογής των προδιαγραφών και των όρων του σχετικού ευρωπαϊκού κανονισμού (αριθ. 1151/2012) είναι ο Agrocert. (Οργανισμός Πιστοποίησης και Επίβλεψης Γεωργικών Προϊόντων), νομικό πρόσωπο ιδιωτικού δικαίου, υπό την εποπτεία του Υπουργείου Γεωργικής Ανάπτυξης και Τροφίμων.

Οι τύποι Ελληνικών επιτραπέζιων ελιών που έχουν χαρακτηριστεί ως ΠΟΠ ή ΠΓΕ σύμφωνα με το Υπουργείο Ανάπτυξης και Τροφίμων παρουσιάζονται στον **Πίνακα 1.5.**

Πίνακας 1.5 Ελληνικές Επιτραπέζιες ελιές χαρακτηρισμένες ως ΠΟΠ-ΠΓΕ

Ελιά Καλαμάτας	ΠΟΠ
Κονσερβολιά Αμφίσσης	ΠΟΠ
Κονσερβολιά Άρτας	ΠΓΕ
Κονσερβολιά Αταλάντης	ΠΟΠ
Κονσερβολιά Ροβίων	ΠΟΠ
Κονσερβολιά Στυλίδας	ΠΟΠ
Θρούμπα Θάσου	ΠΟΠ
Θρούμπα Χίου	ΠΟΠ
Θρούμπα Αμπαδιάς Ρεθύμνης Κρήτης	ΠΟΠ
Κονσερβολιά Πηλίου Βόλου	ΠΓΕ
Πράσινες Ελιές Χαλκιδικής	ΠΓΕ

Η υψηλή ποιότητα που χαρακτηρίζει τις Ελληνικές επιτραπέζιες ελιές έχει αποδοθεί στις ιδιότητες του εδάφους, στην αυξημένη ηλιοφάνεια και στις κλιματικές συνθήκες σε συνδυασμό με το γεγονός ότι αποτελεί ένα φυσικό προϊόν, το οποίο συλλέγεται με το χέρι και η επεξεργασία του γίνεται με παραδοσιακό τρόπο (Μπαλατσούρας, 2004)

1.7 Μικροβιολογία και έλεγχος της ζύμωσης

Μελέτες (Nychas et al. 2002; Panagou et al. 2006) πάνω στις μικροβιακές και φυσικοχημικές μεταβολές κατά τη διάρκεια της ζύμωσης κυρίως των πράσινων ελιών ποικιλίας Κονσερβολιά έχουν οδηγήσει στην αναγνώριση τριών διαδοχικών φάσεων:

1. Κατά τη διάρκεια της πρώτης φάσης, η οποία σε γενικές γραμμές διαρκεί περίπου 7-14 ημέρες, η άλμη έχει υψηλό pH το οποίο σταδιακά μειώνεται και φτάνει κοντά στη τιμή 6. Οι μικροοργανισμοί που χαρακτηρίζουν με τη παρουσία τους αυτή τη φάση ανήκουν στα εντεροβακτήρια (Enterobacteriaceae).

2. Στη δεύτερη φάση, περίπου 3 εβδομάδες, οι γαλακτοβάκιλλοι και οι ζύμες αναπτύσσονται πολύ γρήγορα και τα εντεροβακτήρια μειώνονται μέχρις ότου εξαφανιστούν πλήρως όταν το pH φτάσει κοντά στο 4,5.

3. Κατά τη διάρκεια της τρίτης και τελευταίας φάσης η οποία διαρκεί έως ότου εξαντληθεί κάθε ζυμώσιμο υλικό, αφθονούν τα οξυγαλακτικά βακτήρια και συνυπάρχουν και κάποιες ζύμες. Το τελικό pH φτάνει το 4,0 ή και λιγότερο και η τελική οξύτητα αναμένεται σε 0,7-1,0% ως γαλακτικό οξύ (Sanchez et al., 2000; Μπαλατσούρας, 1995)

Οι κυριότεροι παράγοντες που είναι υπεύθυνοι για την επιτυχή έναρξη και ολοκλήρωση της ζύμωσης είναι:

- I. ενδογενείς (intrinsic), όπως το pH, η ενεργότητα νερού, η διαθεσιμότητα θρεπτικών στοιχείων, τα οργανικά οξέα, η παρουσία αντιμικροβιακών ουσιών (π.χ. ελευρωπαΐνη), η δομή της επιδερμίδας του καρπού και
- II. εξωγενείς (extrinsic), όπως η θερμοκρασία ζύμωσης, η συγκέντρωση NaCl, η προσθήκη ζυμώσιμων συστατικών, η χρήση καλλιεργειών εκκίνησης (Spygroulou et. al., 2001).

Ο έλεγχος των παραμέτρων αυτών, καθορίζει τη σύνθεση και τον πληθυσμό της μικροβιακής χλωρίδας, επιλέγει τις διαφορετικές ομάδες μικροοργανισμών που κατευθύνουν τη ζύμωση, και επηρεάζει τη σύνθεση των μεταβολικών προϊόντων των μικροοργανισμών.

Έλεγχος της θερμοκρασίας: Ο έλεγχος της θερμοκρασίας κατά τη ζύμωση σε επίπεδα όπου τα οξυγαλακτικά βακτήρια παρουσιάζουν τη μέγιστη δραστηριότητά τους (20-25 °C), αποτελεί ίσως τον σημαντικότερο παράγοντα για τον έλεγχο της πορείας της ζύμωσης. Η διατήρηση σταθερής θερμοκρασίας μπορεί να γίνει είτε με θερμοστάτηση του χώρου μέσα στον οποίο είναι εγκατεστημένες οι δεξαμενές είτε με διοχέτευση μέρους της άλμης μέσα από εναλλάκτη θερμότητας. Η πρώτη λύση δεν είναι εφικτή λόγω του μεγάλου κόστους, ενώ η δεύτερη έχει δώσει ικανοποιητικά αποτελέσματα στην Ισπανία χωρίς όμως να εφαρμόζεται στη χώρα μας. Μία ιδιαίτερα επιτυχής εναλλακτική λύση είναι η τοποθέτηση των δεξαμενών ζύμωσης μέσα στο έδαφος προκειμένου να εκμεταλλευτούμε τις μικρότερες διακυμάνσεις της θερμοκρασίας του εδάφους. Η λύση αυτή εφαρμόζεται από μερικές βιομηχανίες στη χώρα μας κυρίως για τη ζύμωση του πράσινου ελαιοκάρπου. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ο έλεγχος της θερμοκρασίας δεν αποτελεί ιδιαίτερο πρόβλημα για τις πράσινες ελιές, οι οποίες συγκομίζονται νωρίς το φθινόπωρο και ζυμώνονται σε περίοδο (Οκτώβριο-Νοέμβριο) που οι θερμοκρασίες στις περισσότερες περιοχές της Ελλάδας είναι ήδη αρκετά υψηλές (15-20°C). Αντίθετα, σημαντικό πρόβλημα υπάρχει στη ζύμωση της φυσικής μαύρης ελιάς, η οποία συγκομίζεται αργότερα (Νοέμβριο-Δεκέμβριο), και η ζύμωσή της οποίας διακόπτεται από τις χαμηλές θερμοκρασίες του χειμώνα και αρχίζει εκ νέου την Άνοιξη.

Έλεγχος και συνεχής διόρθωση της αλατοπεριεκτικότητας της άλμης: Η αρχική συγκέντρωση του άλατος στην άλμη κυμαίνεται από 6-10% ανάλογα με την ποικιλία, το στάδιο ωριμότητας και τον τρόπο επεξεργασίας της επιτραπέζιας ελιάς (Balatsouras 1990). Κάτω από χαμηλές συγκεντρώσεις άλατος είναι δυνατόν να επικρατήσουν τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια και να οδηγήσουν τη ζύμωση σε εκτροπή, με τη δημιουργία σοβαρών ασθενειών όπως η αεριοπάθηση και η zapateria. Για τον λόγο αυτό είναι απαραίτητος ο έλεγχος και η συμπλήρωση της άλμης με χονδρό αλάτι σε τακτά χρονικά διαστήματα ώστε η αλατοπεριεκτικότητα να επανέλθει στο αρχικό επίπεδο. Η απαραίτητη ποσότητα άλατος προστίθεται στην

επιφάνεια της δεξαμενής ζύμωσης ενώ η διάλυση της επιτυγχάνεται με κυκλοφορία της άλμης μέσω ειδικής φορητής αντλίας.

Οξίνιση της άλμης: Πραγματοποιείται τη στιγμή που οι ελιές εμβαπτίζονται στην άλμη προκειμένου να μειωθεί η αρχική τιμή του pH σε 4,0-4,5 προκειμένου να παρεμποδιστεί η δράση των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων που επικρατούν στο προκαταρκτικό στάδιο της ζύμωσης. Σκοπός του χειρισμού αυτού είναι η μείωση της χρονικής διάρκειας του προκαταρκτικού σταδίου στο ελάχιστο, δημιουργώντας τις κατάλληλες συνθήκες για την επικράτηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Ο απλούστερος τρόπος οξίνισης της άλμης που εφαρμόζεται σε μεγάλη κλίμακα από τις βιομηχανίες είναι με τη χρήση γαλακτικού οξέος του εμπορίου, ενώ είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν και άλλα οξέα, όπως το οξικό και το υδροχλωρικό οξύ κατάλληλο για τρόφιμα (Garrido Fernández et.a., 1997).

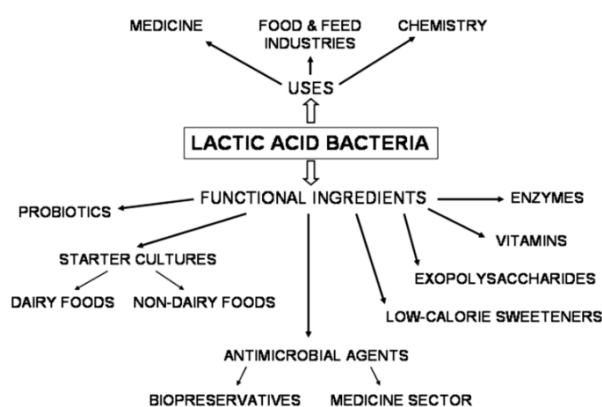
Εμβολιασμός της άλμης με καλλιέργειες εκκίνησης (starter cultures): Η χρήση καλλιεργειών εκκίνησης από επιλεγμένα στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων, τα οποία έχουν απομονωθεί από τη φυσική χλωρίδα της ελιάς, μπορεί να βοηθήσει σημαντικά στην εξασφάλιση μίας ελεγχόμενης ζύμωσης και τη δημιουργία τελικού προϊόντος με συγκεκριμένα φυσικοχημικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Η χρήση καθαρών στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων στη ζύμωση της επιτραπέζιας ελιάς παραμένει σε πειραματικό επίπεδο και δεν εφαρμόζεται ευρέως σε βιομηχανική κλίμακα (Holzapfel 2001). Οι δυσκολίες έγκεινται στην επιλογή μη καταλλήλων στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων, στην έλλειψη ζυμώσιμων συστατικών καθώς και αμινοξέων και βιταμινών, στην αλατοπεριεκτικότητα της άλμης, στη θερμοκρασία ζύμωσης, στο pH της άλμης, στην παρουσία παρεμποδιστικών ουσιών (π.χ. φαινολικές ουσίες) (Montaño et al. 2000).

Τα κυριότερα στελέχη που χρησιμοποιούνται σήμερα για την δημιουργία καλλιεργειών εκκίνησης είναι ο *Lactobacillus plantarum* και ο *Lactobacillus pentosus*, οι οποίοι είναι κυρίως υπεύθυνοι για τη ζύμωση της επιτραπέζιας ελιάς. Τα στελέχη κυκλοφορούν στο εμπόριο σε λυοφιλωμένη μορφή, και πριν προστεθούν στην άλμη θα πρέπει να ενεργοποιηθούν σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο. Το καταλληλότερο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας για την ανανέωση του *Lactobacillus plantarum* αποτελείται από NaCl (10 g), γλυκόζη (10 g), εκχύλισμα ζύμης (3 g) σε ένα λίτρο απεσταγμένο νερό (pH 6,4). Ανεξαρτήτως πάντως της σύστασης του θρεπτικού μέσου

για την καλλιέργεια του μικροοργανισμού, θα πρέπει να προστίθεται σε αυτό αλάτι σε περιεκτικότητα 4-5% προκειμένου η καλλιέργεια εκκίνησης να προσαρμοστεί καλύτερα στο περιβάλλον της άλμης. Θα πρέπει να τονιστεί, ότι η μέχρι σήμερα επιλογή των καθαρών καλλιεργειών οξυγαλακτικών βακτηρίων στηριζόταν αποκλειστικά και μόνο στην παραγωγή γαλακτικού οξέος (Holzapfel 2001, Sánchez et.al., 2001). Νεώτερες όμως έρευνες (Panagou et al. 2008) έχουν δείξει ότι ορισμένα στελέχη διαθέτουν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά, όπως ικανότητα διάσπασης της ελευρωπαΐνης, παραγωγή βακτηριοσινών, ικανότητα ζύμωσης σε χαμηλές θερμοκρασίες. Τα χαρακτηριστικά αυτά δημιουργούν νέους ορίζοντες στις βιομηχανίες μεταποίησης της επιτραπέζιας ελιάς και μπορεί να οδηγήσουν σε ασφαλέστερα, περισσότερο φυσικά και μεγαλύτερης διατροφικής αξίας προϊόντα.

1.8 Οξυγαλακτικά βακτήρια

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια θεωρούνται από τις πιο σημαντικές κατηγορίες μικροοργανισμών και διαδραματίζουν πρωτεύοντα ρόλο στη βιομηχανία τροφίμων για την παραγωγή πολλών ζυμούμενων προϊόντων, όπως τα γαλακτοκομικά προϊόντα (τυριά, γιαούρτι, βούτυρο), τα προϊόντα κρέατος (σαλάμι), το κρασί, τα ψάρια, τα λαχανικά (ελιές, ξινολάχανο) και τα προϊόντα αρτοποιίας (ψωμί). Χωρίς να γνωρίζουν την επιστημονική βάση, οι άνθρωποι χιλιάδες χρόνια πριν χρησιμοποιούσαν αυτή την ομάδα βακτηρίων για την παραγωγή και συντήρηση των τροφίμων (Εικόνα 1.5).



Εικόνα 1.5: Εφαρμογές οξυγαλακτικών βακτηρίων (Florou-Paneri et.al.,2013)

Πιστεύεται ότι το πρώτο τυρί παρασκευάστηκε μεταξύ του Τίγρη και του Ευφράτη πριν 8000 χρόνια (Ross *et al.*,2002). Μέθοδοι ζύμωσης του κρέατος είχαν αναπτυχθεί ήδη από τον 15^ο π.Χ. αιώνα στην Κίνα και στην Βαβυλωνία, ενώ τρόποι ζύμωσης λαχανικών ήταν ήδη γνωστοί στην Κίνα τον 3^ο π.Χ. αιώνα.

Στη βιομηχανία τροφίμων τα οξυγαλακτικά χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο ως καλλιέργειες (εναρκτήριες και μη εναρκτήριες) επηρεάζοντας τα τεχνολογικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των παραγόμενων προϊόντων ενώ μέσω των αντιμικροβιακών ουσιών που παράγουν συμβάλλουν στη συντήρηση των τροφίμων.

Στα οξυγαλακτικά ανήκουν και τα γένη *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* και *Streptococcus*. Τα βακτήρια αυτά είναι διαδεδομένα στη φύση και απαντώνται κυρίως στα φυτά ενώ συχνή είναι η παρουσία κάποιων στον ανθρώπινο οργανισμό. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια χωρίζονται σε δύο ομάδες ανάλογα με τα τελικά προϊόντα του μεταβολισμού τους. Η μια είναι η ομοζυμωτική ομάδα που περιλαμβάνει εκείνα τα οξυγαλακτικά βακτήρια που παράγουν γαλακτικό οξύ ως μοναδικό προϊόν γαλακτικής ζύμωσης (όπως *Pediococcus*, *Streptococcus* και κάποια είδη του γένους *Lactobacillus*) και η άλλη ομάδα είναι ετεροζυμωτική που περιλαμβάνει είδη των γενών *Leuconostoc* και *Lactobacillus*, τα οποία μέσω της οξυγαλακτικής ζύμωσης παράγουν ισάριθμες ποσότητες γαλακτικού οξέος, διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) και αιθανόλης ή οξικού οξέος. Οι ετεροζυμωτικοί παράγουν επίσης ενώσεις (π.χ. ακεταλδεΐδη και διαακετύλιο) που προσδίδουν ιδιαίτερη γεύση και άρωμα σε ορισμένα προϊόντα. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια για την ανάπτυξή τους έχουν ανάγκη διάφορα αμινοξέα, βιταμίνες του συμπλέγματος Β, πουρίνες και πουριμιδίνες. Είναι μεσόφιλα και μπορούν να αναπτύσσονται σε θερμοκρασία 5 °C έως 45 °C. Αναπτύσσονται ακόμα και σε χαμηλά pH (συνήθως 4.0-4.5 αλλά και σε χαμηλότερα). Είναι Gram θετικά βακτήρια και δεν μπορούν να συνθέσουν το ένζυμο καταλάση.

1.8.1 Οξυγαλακτικά βακτήρια και ζύμωση

Η οξυγαλακτική ζύμωση είναι το σημαντικότερο στάδιο στην παραγωγή επιτραπέζιων ελιών. Η ομαλή εξέλιξη αυτής της ζύμωσης δίνει ένα άριστο ποιοτικά προϊόν με μεγάλη διάρκεια ζωής και εμπορική αξία ενώ αντίθετα η εκτροπή της ζύμωσης οδηγεί σε ένα προϊόν ποιοτικά υποβαθμισμένο. Για την πραγματοποίηση μιας επιτυχημένης ζύμωσης θα πρέπει μέσα στους περιέκτες που τοποθετούνται οι ελιές να επικρατούν όσο το δυνατόν περισσότερο αναερόβιες συνθήκες. Επίσης, στη σάρκα του ελαιοκάρπου πρέπει, μετά την έκλυση και την εκπίκραση, να παραμένουν αρκετά ζυμώσιμα σάκχαρα, τα οποία θα μεταφερθούν στην άλμη και θα επιτρέψουν την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων που επιτελούν τη συγκεκριμένη ζύμωση και παράγουν οξέα όπως γαλακτικό και οξικό. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση οξέων και μείωση του pH της άλμης. Τα κύρια γένη που εμπλέκονται με την ζύμωση των επιτραπέζιων ελιών είναι τα *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* και *Streptococcus* (Kailis et al., 2007). Η ανάπτυξη των παραπάνω μικροοργανισμών παράλληλα με την δράση των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων επηρεάζει την οξύτητα του τελικού προϊόντος. Επιπλέον, παρατηρείται έντονη ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων κυρίως του είδους *Lactobacillus plantarum*, ο οποίος υπό κανονικές συνθήκες κυριαρχεί και είναι υπεύθυνος για την ζύμωση των πράσινων ελιών. Ωστόσο έχουν ταυτοποιηθεί και άλλα είδη όπως *L. casei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus coryniformis* και *Lactobacillus brevis*, η παρουσία των οποίων εξαρτάται από την ποικιλία της ελιάς. Λόγω της ανάπτυξης του *L. plantarum* που είναι και ο επικρατέστερος μικροοργανισμός παρατηρείται μια σταθερή αύξηση της οξύτητας καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης με επακόλουθη μείωση του pH σε τιμές γύρω στο 4 ή και χαμηλότερα. Ο αριθμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων μειώνεται όταν τα θρεπτικά συστατικά του υποστρώματος εξαντληθούν και το pH φτάσει σε τόσο χαμηλές τιμές που καθιστούν αδύνατη ακόμη και την ανάπτυξη του *L. plantarum*, του πιο ανθεκτικού γαλακτοβακίλλου που ολοκληρώνει τις περισσότερες ζυμώσεις των λαχανικών (Garrido Fernandez et al., 1997).

Σε ορισμένες ποικιλίες ελιάς, όταν η περιεκτικότητα της άλμης σε αλάτι είναι χαμηλή (κάτω από 5%), αναπτύσσονται επίσης θετικοί κατά Gram κόκκοι (*Pediococcus* και *Leuconostoc*) κατά τη διάρκεια των πρώτων ημερών της ζύμωσης.

Επιπλέον, εάν η συγκέντρωση του άλατος δεν είναι μεγαλύτερη από 8%, είναι δυνατόν να παρατηρηθεί και ανάπτυξη οξυγαλακτικών βακτηρίων σε όλη τη διάρκεια της ζύμωσης. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια αναπτύσσονται μόνο όταν η συγκέντρωση του άλατος είναι χαμηλή (κάτω από 8%). Αρχικά εμφανίζονται σχεδόν αποκλειστικά οι κόκκοι *Leuconostoc* και *Pediococcus* αλλά μετά από είκοσι ημέρες κυριαρχούν τα οξυγαλακτικά βακτήρια (Garrido Fernandez et al., 1997).

Παράγοντες, όπως η συγκέντρωση της άλμης, η περιεκτικότητά της σε ελευρωπαΐνη, η θερμοκρασία της ζύμωσης και το pH, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην πορεία εξέλιξης της ζύμωσης αυτής (Nychas et al., 2002), όπως αναφέρθηκε και παραπάνω.

1.8.2 Επίδραση των ζυμών στη ζύμωση των επιτραπέζιων ελιών

Η παρουσία των ζυμών κατά τη ζύμωση των ελιών μπορεί να έχει θετική αλλά και αρνητική επίδραση στην παραγωγή του προϊόντος. Η ανάπτυξη των ζυμών οδηγεί στο σχηματισμό διαφόρων προϊόντων (όπως αιθανόλη, ακεταλδεΰδη, οξικό οξύ κ.ά) που συμβάλλουν στη γεύση και το άρωμα των ελιών. Τα κυριότερα είδη ζυμών που συμμετέχουν στη ζύμωση Ελληνικών μαύρων ελιών σε άλμη είναι τα *Torulaspora delbrueckii*, *Debaryomyces hansenii*, *Cryptococcus laurentii* (Kotzekidou, 1997). Οξειδωτικές ζύμες όμως, όπως για παράδειγμα τα είδη *Saccharomyces oleaginosus* και *Hansenula anomala*, ευθύνονται για αλλοιώσεις στις ελιές, όπως είναι το μαλάκωμα των καρπών και η δημιουργία φυσαλίδων αέρα στο εσωτερικό τους, μια αλλοίωση που είναι γνωστή ως «μάτι ψαριού» (Vaughn et al., 1972). Επίσης, η δημιουργία αναερόβιων συνθηκών είναι σημαντικός παράγοντας για την αποτροπή ανάπτυξης επιφανειακών ζυμών και μυκήτων που καταναλώνουν τα σάκχαρα και τα οξέα από την άλμη αυξάνοντας το pH αυτής, αλλά ταυτόχρονα μπορούν να παράγουν και επικίνδυνες μυκοτοξίνες.

Τέλος η ανάπτυξη των ζυμών σε υψηλούς πληθυσμούς στις συσκευασμένες ελιές, εφόσον υπάρχουν εναπομείναντα σάκχαρα στις συσκευασμένες ελιές, έχει αρνητικές συνέπειες μόνο. Για παράδειγμα, όταν επικρατούν αερόβιες συνθήκες, καταναλώνουν το γαλακτικό και οξικό οξύ που έχει παραχθεί κατά τη ζύμωση ή έχει προστεθεί στην τελική συσκευασία με αποτέλεσμα μικρότερη διάρκεια συντήρησης του προϊόντος. Επίσης στις συσκευασμένες ελιές οι ζύμες μπορεί να παράγουν

αυξημένη ποσότητα αερίου (CO₂) που οδηγεί σε φούσκωμα του περιέκτη συσκευασίας, να προκαλέσουν θόλωμα στην άλμη και να παράγουν δύσσομα προϊόντα (Garrido-Fernandez et al., 1997; Arroyo-López et al., 2008).

1.9 Αντιμικροβιακές ενώσεις των οξυγαλακτικών βακτηρίων

Η συντηρητική δράση των εναρκτήριων καλλιεργειών στα τρόφιμα και στα ποτά οφείλεται στην συνδυαστική δράση διαφόρων αντιμικροβιακών μεταβολιτών που παράγονται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Οι μεταβολίτες αυτοί περιλαμβάνουν οργανικά οξέα, όπως το γαλακτικό, το οξικό και το προπιονικό οξύ, που παράγονται ως τελικά προϊόντα και δημιουργούν ένα όξινο περιβάλλον που είναι εχθρικό ως προς την ανάπτυξη πολλών παθογόνων και αλλοιωγόνων μικροοργανισμών. Τα οξέα, πιστεύεται ότι ασκούν την αντιμικροβιακή τους δράση με το να μειώνουν το ενδοκυτταρικό pH και επομένως να αναστέλλουν διάφορες μεταβολικές δραστηριότητες (Doores, 1993). Έχουν ευρύ φάσμα δράσης και αναστέλλουν τα Gram-θετικά και Gram-αρνητικά βακτήρια αλλά και τις ζύμες και τους μύκητες.

Επίσης ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ικανότητά των οξυγαλακτικών να παράγουν πλήθος διαφορετικών ενώσεων με αντιμικροβιακές ιδιότητες. Σύμφωνα με τον Roos et al. (2002) μια από τις ομάδες των αντιμικροβιακών αυτών ενώσεων βακτηριοσίνες. Οι Nettles & Barefoot, (1993) και Ennahar et al.(2000) αναφέρουν πως αρκετές βακτηριοσίνες είναι δραστικές έναντι αλλοιωγόνων και παθογόνων βακτηρίων. όπως είναι το *Clostridium* sp., ο *Staphylococcus aureus* και η *Listeria monocytogenes*. Η πιο διαδεδομένη βακτηριοσίνη ως φυσικό συντηρητικό είναι η νισίνη, η οποία παράγεται από το είδος *Lactococcus lactis* και δρα εναντίον Gram θετικών βακτηρίων. Η νισίνη είναι η πιο μελετημένη από όλες τις βακτηριοσίνες και χρησιμοποιείται ως συντηρητικό (E234) στα τρόφιμα σε περισσότερες από 50 χώρες συμπεριλαμβανομένων των ΗΠΑ και της ΕΕ με την εμπορική ονομασία “nisaplin”.

1.9.1 Βακτηριοσίνες

1.9.1.1 Ορισμός

Οι βακτηριοσίνες αποτελούν μια μεγάλη ομάδα αντιβακτηριακών ενώσεων πρωτεϊνικής φύσεως, οι οποίες παράγονται από πλήθος μικροοργανισμών, που περιλαμβάνουν και παθογόνα στελέχη από Gram (+) και Gram (-)

μικροοργανισμούς. Οι ενώσεις αυτές διακρίνονται για την μεγάλη ετερογένεια, ως προς την δομή τους, τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες και τον τρόπο δράσης τους. Διαιρούνται σε τέσσερις κλάσεις ανάλογα με τις γενετικές και βιοχημικές τους ιδιότητες.

Οι βακτηριοσίνες συντίθεται ριβοσωμικά, (Dufour et al. 2006). Η παραγωγή τους σχετίζεται με τη μικροβιακή ανάπτυξη και εξαρτάται από τις συνθήκες του περιβάλλοντος ανάπτυξης, όπως το pH, η θερμοκρασία και τα θρεπτικά συστατικά.

Τα περισσότερα οξυγαλακτικά παράγουν βακτηριοσίνες που είναι δραστικές κυρίως έναντι στελεχών συγγενών φυλογενετικά. Παρ' όλα αυτά τα τελευταία χρόνια έχουν απομονωθεί βακτηριοσίνες με ευρύτερο φάσμα παρεμπόδισης που περιλαμβάνει και παθογόνα Gram (+) βακτήρια που ανήκουν σε διαφορετικά γένη από τα οξυγαλακτικά. Η ιδιότητα των βακτηριοσινών αυτών να αναστέλουν την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών, είχε ως αποτέλεσμα οι επιστήμονες να επικεντρώσουν το ενδιαφέρον τους στην αναζήτηση εναλλακτικών μορφών συντήρησης των τροφίμων με πιο φυσικό τρόπο, χωρίς τη χρήση χημικών συντηρητικών.

1.9.1.2 Ταξινόμηση

Οι βακτηριοσίνες που παράγονται από τα Gram θετικά βακτήρια, όπως προαναφέρθηκε διαιρούνται σε τέσσερις κύριες ομάδες, την Κλάση I (Class I), την Κλάση II (Class II), την Κλάση III (Class III) και την Κλάση IV (Class IV) (Balciunas et al., 2013; Mc Auliffe et al., 2001; Metaxopoulos et al., 2003)

Η **Κλάση I (Lantibiotics)** περιλαμβάνει, χαμηλής μοριακής μάζας (<5KDa, 19-38 αμινοξέα) πολυκυκλικά θερμοάντοχα πεπτίδια (Cintas et al.,2001), τα οποία χαρακτηρίζονται από την παρουσία ασυνήθιστων αμινοξέων, όπως η λανθειονίνη (Lan) και η 3-μεθυλο-λανθειονίνη (Melan)

Η Κλάση I χωρίζεται περαιτέρω σε δυο υποκατηγορίες βάσει της δομής των βακτηριοσινών. Στην πρώτη ομάδα, **τύπος A (Type A)**, ανήκουν τα λαντιβιοτικά που έχουν γραμμικό σχήμα, είναι υδρόφοβα, θετικά φορτισμένα και σχηματίζουν πόρους στην κυτταροπλασματική μεμβράνη του κυττάρου-στόχου, ενώ η δεύτερη ομάδα, **τύπος B (Type B)**, περιλαμβάνει σφαιρικά, αρνητικά ή ουδέτερα λαντιβιοτικά

(Cleveland et al., 2001), τα οποία παρεμβαίνουν σε διάφορες ενζυμικές αντιδράσεις του κυττάρου-στόχου. (Zacharof et al., 2012).

Η πιο χαρακτηριστική βακτηριοσίνη αυτής της κλάσης είναι η νισίνη (nisin), η οποία ανήκει στον τύπο Α και παράγεται από στελέχη του *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

Η **Κλάση II (Non Lantibiotics)** περιλαμβάνει βακτηριοσίνες μικρού μοριακού βάρους (< 10 KDa), , μη τροποποιημένα πεπτίδια που δεν περιέχουν λανθειονίνη στο μόριο τους (Cleveland et al., 2001; Zacharof et al., 2012), παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στη θέρμανση και δρουν επί της μεμβράνης των κυττάρων προκαλώντας διάτρηση και έξοδο μορίων από τα κύτταρα.. Η Κλάση II υποδιαιρείται σε 3 υποομάδες:

- **IIa** (βακτηριοσίνες τύπου πεδιοσίνης). Είναι η πιο κοινή κλάση. Περιλαμβάνει πεπτίδια, τα οποία είναι δραστικά έναντι του γένους *Listeria*. Οι βακτηριοσίνες αυτές δεν είναι τόσο δραστικές έναντι των σπορίων αλλά είναι περισσότερο αποτελεσματικές από τη νισίνη σε ορισμένα τρόφιμα, όπως το κρέας. Η πιο γνωστή βακτηριοσίνη της κατηγορίας αυτής είναι η Πεδιοσίνη PA-1.
- **IIb** (two-peptide bacteriocins). Περιλαμβάνει βακτηριοσίνες που αποτελούνται από δύο πεπτίδια (λακτοκοκκίνη G).
- **IIc**. Πεπτίδια που απαιτούν ανηγμένα μόρια κυστεΐνης για την εκδήλωση της δραστηριότητας (λακτοκοκκίνη B).

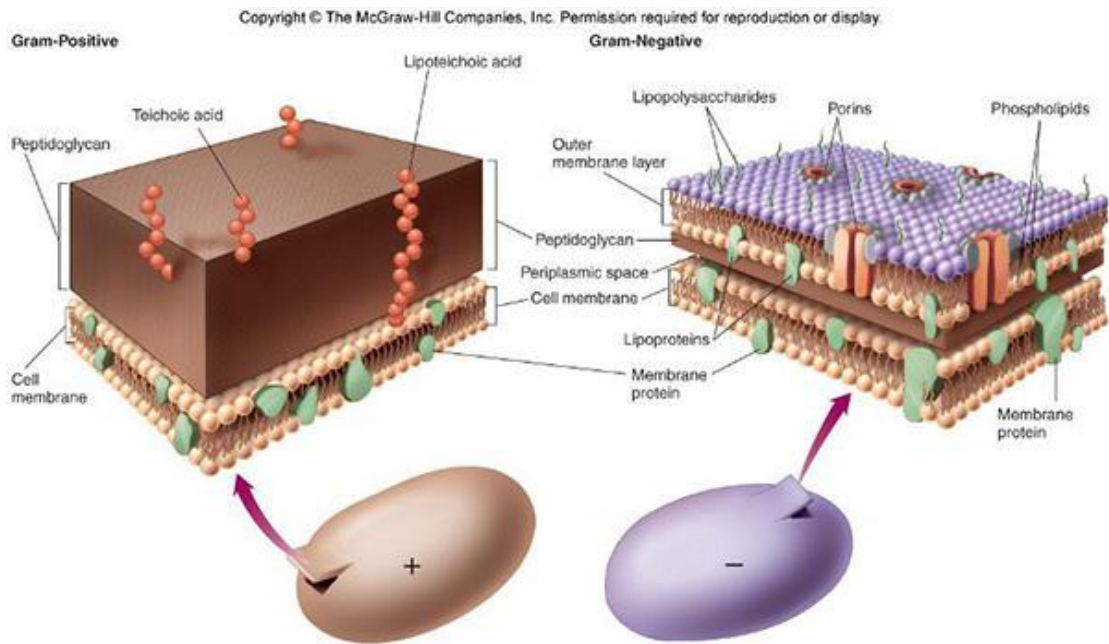
Η **Κλάση III** περιλαμβάνει βακτηριοσίνες υψηλής μοριακής μάζας (>30 kDa), οι οποίες δεν είναι σταθερές στη θέρμανση και αδρανοποιούνται σε υψηλές θερμοκρασίες. Η πιο αντιπροσωπευτική βακτηριοσίνη αυτής της ομάδας είναι η ελβετισίνη J (helveticin J).

Τέλος, η **Κλάση IV** περιλαμβάνει σύνθετες βακτηριοσίνες που αποτελούνται από ένα πρωτεϊνικό τμήμα και από ένα υδατανθρακικό ή λιπαρό τμήμα, το οποίο απαιτείται για την εκδήλωση της βιολογικής τους δράσης.

1.9.1.3 Τρόπος δράσης

Πριν γίνει αναφορά στον τρόπο δράσης των βακτηριοσινών θα πρέπει να επισημανθεί ότι τα Gram αρνητικά βακτήρια είναι πιο ανθεκτικά έναντι των βακτηριοσινών σε σύγκριση με τα Gram θετικά. Αυτή η διαφορά οφείλεται στη διαφορετική σύνθεση του κυτταρικού τους τοιχώματος (Εικόνα 1.6). Και στους δυο τύπους η κυτταροπλασματική μεμβράνη που συνδέει το κυτταρόπλασμα με το εξωτερικό περιβάλλον περικλείεται από ένα στρώμα πεπτιδογλυκανίου, το οποίο είναι λεπτότερο στα Gram αρνητικά βακτήρια.

Επιπλέον τα Gram αρνητικά έχουν ένα ακόμη περίβλημα, την επονομαζόμενη εξωτερική μεμβράνη, η οποία αποτελείται από φωσφολιπίδια, πρωτεΐνες και λιποπολυσακχαρίτες (LPS). Το περίβλημα αυτό είναι μη διαπερατό από τα περισσότερα μόρια. Όμως η παρουσία πόρων σε αυτό επιτρέπει την ελεύθερη διάχυση των μορίων με μοριακή μάζα μικρότερη των 600 Da. Οι μικρότερες βακτηριοσίνες που παράγονται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν μοριακή μάζα περίπου 3 kDa και άρα είναι πολύ μεγάλες για να πετύχουν το στόχο τους, δηλαδή την κυτταροπλασματική μεμβράνη (Abee et al, 1995; Juodeikiene et al., 2012). Το πρόβλημα αυτό μπορεί να αντιμετωπιστεί με τη χρήση χηλικών ενώσεων (EDTA), οι οποίες δεσμεύουν τα ιόντα Mg από τους λιποπολυσακχαρίτες της εξωτερικής κυτταρικής μεμβράνης επηρεάζοντας έτσι τη διαπερατότητά της. Επομένως με αυτό τον τρόπο τα Gram αρνητικά βακτήρια καθίστανται ευαίσθητα στη δράση των βακτηριοσινών (Deegan et al., 2006, Holzapfel Et al., 1995).



Εικόνα 1.6: Απεικόνιση κυτταρικής μεμβράνης και κυτταρικού τοιχώματος των αρνητικών και θετικών κατά Gram βακτηρίων

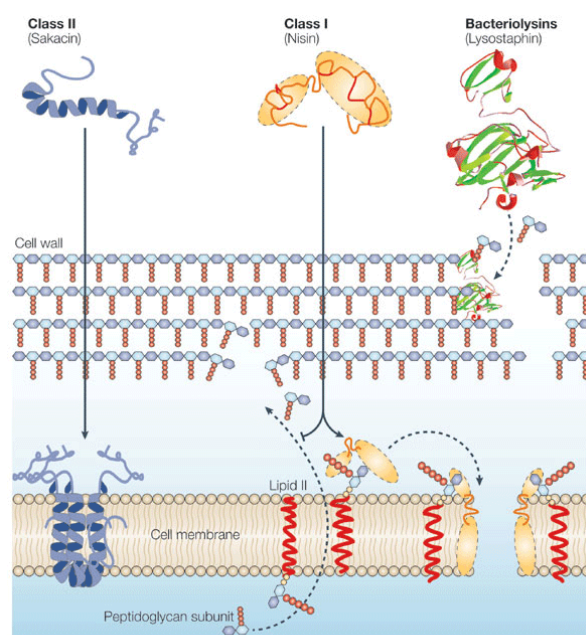
Ο μηχανισμός δράσης των βακτηριοσινών σύμφωνα με τους Tagg et al. (1976) αποτελεί μια διαδικασία που μπορεί να διακριθεί σε δύο στάδια.

Η πρώτη φάση συνίσταται στην προσρόφηση της βακτηριοσίνης πάνω σε εξειδικευμένους ή μη υποδοχείς, που βρίσκονται στο κυτταρικό τοίχωμα των ευαίσθητων στελεχών. Στο στάδιο αυτό οι βακτηριοσίνες δεν προκαλούν καμία αλλοίωση στο κύτταρο. Πρόκειται για αντιστρεπτή φάση και η απομάκρυνση της βακτηριοσίνης κατά την διάρκεια του σταδίου αυτού, έχει ως αποτέλεσμα την διατήρηση της δομής της μεμβράνης χωρίς να προκληθούν βλάβες στα βακτηριακά κύτταρα.

Η δεύτερη φάση είναι μη αντιστρεπτή και περιλαμβάνει αλλοιώσεις στα ευαίσθητα κύτταρα, οι οποίες είναι χαρακτηριστικές για κάθε βακτηριοσίνη. Το αποτέλεσμα είναι η απώλεια ATP, ιόντων και άλλων σημαντικών κυτταρικών συστατικών, παραδείγματος χάριν αμινοξέων, τα οποία περιέχονται μέσα στο κύτταρο και την παρεμπόδιση μεταφοράς των αμινοξέων μέσα στα βακτηριακά κύτταρα (Abee et al. 1995).

Δύο μοντέλα έχουν προταθεί για τον τρόπο δράσης των λαντιβιοτικών τύπου A. Κατά το πρώτο μοντέλο τα λαντιβιοτικά προσδένονται στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων και σχηματίζουν πόρους καταλαμβάνοντας κάθετη θέση ως προς την μεμβράνη σύμφωνα με τον Sahl (1991). Στο δεύτερο μοντέλο, τα μόρια του λαντιβιοτικού προσδένονται παράλληλα στην κυτταρική μεμβράνη και αλληλοεπιδρούν με τα φωσφολιπίδια μέσω ιοντικών και πάλι δυνάμεων δημιουργώντας δομή διπλοστοιβάδας με το υδρόφοβο μέρος του πεπτιδίου να προσανατολίζεται προς το εσωτερικό της μεμβράνης. Ως αποτέλεσμα έχουμε και πάλι την δημιουργία πόρων (Van De Hooven et al. 1996).

Γενικά, η δραστηριότητα των βακτηριοσινών σύμφωνα με τον (Ennahar et al. 2000) είναι αποτέλεσμα των υδρόφοβων και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων των αμφίφιλων, θετικά φορτισμένων πεπτιδίων με την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Στην Εικόνα 1.7 παρουσιάζεται ο μηχανισμός δημιουργίας πόρων πάνω στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των ευαίσθητων κυττάρων.



Copyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Microbiology

Εικόνα 1.7: Τρόποι δράσης βακτηριοσινών

1.10 Μεταγονιδιωματική ανάλυση

Η ανθρωπότητα έχει ωφεληθεί σε μεγάλο βαθμό από τη μελέτη των μικροβίων από τότε που αυτά ανακαλύφθηκαν. Παρόλα αυτά, τα περισσότερα οφέλη προήλθαν από τη μελέτη ελάχιστων από τα εκατομμύρια είδη μικροβίων που υπάρχουν στο περιβάλλον. Ο αναδυόμενος κλάδος της μεταγονιδιωματικής ανοίγει τον δρόμο για την εξερεύνηση των μικροβίων που δεν έχουν μέχρι στιγμής απομονωθεί και για τη μελέτη ολόκληρων μικροβιακών βιοκοινοτήτων (www.national-academies.org).

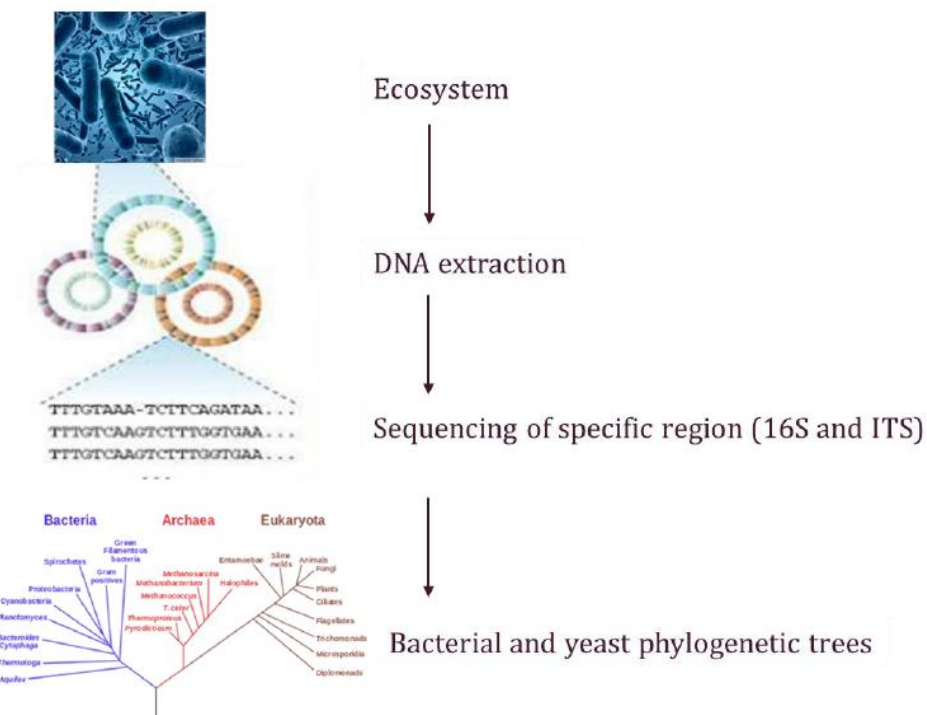
Με τη μεταγονιδιωματική ανάλυση χαρακτηρίζεται το γενετικό υλικό, το οποίο έχει προέλθει απευθείας από κάποιο περιβαλλοντικό δείγμα. Αντίστοιχα, ο όρος μεταγονιδίωμα αναφέρεται στο σύνολο των γονιδίων διαφορετικών οργανισμών που περιέχονται σε ένα δείγμα, όπως είναι το έδαφος και το νερό.



Εικόνα 1.8 : Σημαντικές στιγμές για τη μικροβιολογία (The new science of Metagenomics: Revealing the secrets of our microbial planet, National Academy of Sciences, 2007)

Η προσέγγιση και οι μέθοδοι της μεταγονιδιωματικής υπερβαίνουν μεμονωμένα γονίδια και γονιδιώματα και επιτρέπουν τη μελέτη όλων των γονιδιωμάτων μίας βιοκοινοτήτας μικροβίων ως σύνολο (Σχήμα 1.4). Τα εργαλεία της κλασικής μικροβιολογίας βασίζονται ως επί το πλείστον στην απομόνωση μικροοργανισμών από επιλεκτικά θρεπτικά υλικά – δηλαδή σε καλλιέργειες που περιέχουν μικροοργανισμούς συγκεκριμένων ειδών. Αυτό σημαίνει ότι η τεράστια πλειονότητα του μικροβιακού κόσμου δεν ήταν μέχρι τώρα προσβάσιμη στην επιστήμη επειδή δεν είναι δυνατή η καλλιέργεια παρά μόνο ενός πολύ μικρού ποσοστού από τα

εκατομμύρια είδη μικροβίων που εκτιμάται ότι υπάρχουν στη γη –θεωρείται ότι το ποσοστό αυτό είναι μικρότερο από 1% (Kergourlay, Taminiau, Daube, & Champomier Verges, 2015; Riesenfeld, Schloss, & Handelsman, 2004). Παρέχοντας πρόσβαση στο γονιδίωμα μίας βιοκοινότητας μικροβίων χωρίς τη χρήση της συμβατικής μικροβιολογίας και καλλιέργειας των μικροοργανισμών, η μεταγονιδιωματική υπερβαίνει τους περιορισμούς της κλασικής γονιδιωματικής και μικροβιολογίας.



Εικόνα 1.9: Σχηματική απεικόνιση σχεδιασμού ροής για τη φυλογενετική ανάλυση των μικροοργανισμών ενός οικοσυστήματος με τη χρήση της μεταγονιδιωματικής ανάλυσης (diversity assay)

Οι προσεγγίσεις της μεταγονιδιωματικής θα ενωθούν πιθανότατα με τις προσεγγίσεις αυτών των κλασικών επιστημονικών κλάδων, δίνοντάς μας μία πολύ πιο ξεκάθαρη εικόνα του κόσμου των μικροβίων.

Η μεταγονιδιωματική περιλαμβάνει πολλές διαφορετικές καινοτόμες τεχνικές και προσεγγίσεις, ενώ καθώς θα αναπτύσσεται θα εμφανίζονται πιθανότατα και άλλες προσεγγίσεις. Αυτή τη στιγμή το πρώτο βήμα σε πολλές μελέτες μεταγονιδιωματικής είναι το ίδιο: λήψη ενός περιβαλλοντικού δείγματος όπως είναι το έδαφος, το

θαλασσινό νερό ή το ανθρώπινο στόμα και στη συνέχεια απομόνωση του γενετικού υλικού. Δημιουργείται έτσι μία «βιβλιοθήκη» που περιέχει τμήματα των γονιδιωμάτων όλων των μικροβίων του δείγματος. Οι νέες τεχνολογίες αλληλούχησης όμως επιτρέπουν την αλληλούχηση του DNA άμεσα από το δείγμα, κάτι που βελτιώνει την όλη διαδικασία.

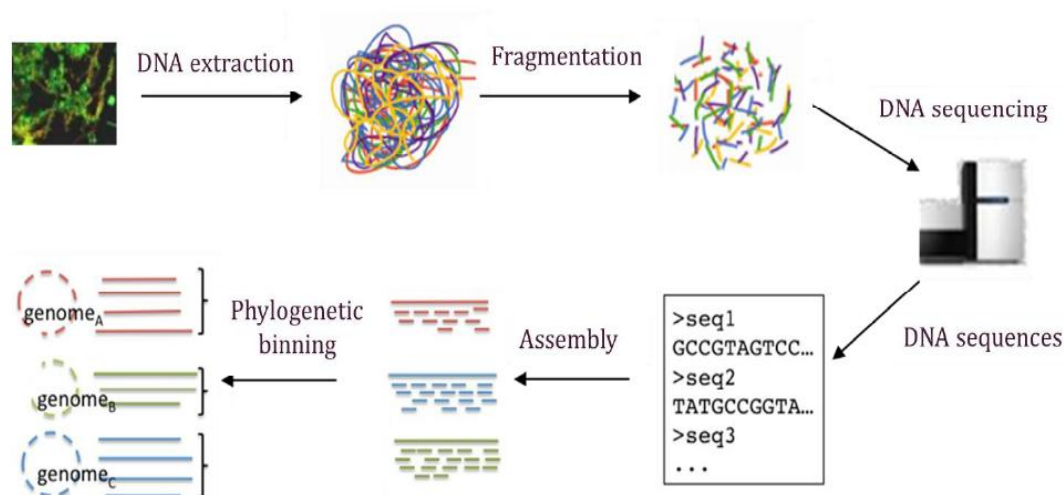
Η μεταγονιδιωματική βιβλιοθήκη δεν είναι όμως ξεκάθαρα οργανωμένη σε τόμους που περιέχουν το γονιδίωμα ενός είδους ο καθένας. Αντιθέτως, αποτελείται από εκατομμύρια τυχαία τμήματα DNA που προέρχονται από όλα τα μικρόβια της βιοκοινότητας του δείγματος. Έχοντας πλέον στα χέρια τους μία βιβλιοθήκη γονιδιωμάτων, οι επιστήμονες το χρησιμοποιούν ανάλογα με το τι θέλουν να διερευνήσουν. Στη συνέχεια η αλληλουχία μπορεί να αναλυθεί με πολλούς διαφορετικούς τρόπους. Για παράδειγμα, οι ερευνητές μπορούν να χρησιμοποιήσουν την αλληλουχία μίας βιοκοινότητας για να προσδιορίσουν μερικώς την αλληλουχία του γονιδιώματος (shotgun metagenomics), ή μπορεί να χρησιμοποιήσουν την αλληλουχία για να αναλύσουν το γονιδίωμα της βιοκοινότητας ως σύνολο, κάτι που μπορεί να μας προσφέρει πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με την οικολογία και την εξέλιξη των πληθυσμών (Cocolin et al., 2013)).

Η μεταγονιδιωματική ανάλυση με βάση τη λειτουργία ή λειτουργική μεταγονιδιωματική (functional metagenomics) μελετά τα προϊόντα που μπορούν να παράγουν τα μικρόβια μίας βιοκοινότητας. Οι ερευνητές που ασχολούνται με τη λειτουργική μεταγονιδιωματική σαρώνουν μεταγονιδιωματικές βιβλιοθήκες αναζητώντας διάφορες λειτουργίες, όπως η παραγωγή κάποιας βιταμίνης ή κάποιου αντιβιοτικού (Handelsman, 2004). Μέσω της μεθόδου αυτής, οι επιστήμονες μπορούν να βρουν λειτουργίες άγνωστες στον περιορισμένο αριθμό μικροβίων που μπορούν να αναπτυχθούν σε ένα εργαστήριο. Χάρη στη μέθοδο αυτή έχουν ήδη ανακαλυφθεί νέα αντιβιοτικά. Μία άλλη προσέγγιση της λειτουργικής μεταγονιδιωματικής, την οποία μπορούμε να εφαρμόσουμε χάρη στις πρόσφατες τεχνολογικές εξελίξεις, μας επιτρέπει την άμεση εξαγωγή και ταυτοποίηση νέων πρωτεϊνών και μεταβολιτών (προϊόντων κυτταρικών διαδικασιών) από μία βιοκοινότητα μικροβίων.

Η μεταγονιδιωματική, με βάση την ανάλυση θραυσμάτων γονιδίων (shotgun metagenomics) (Εικόνα 1.10), αναφέρεται στην ανάλυση του γενετικού υλικού που προέρχεται απευθείας από το περιβάλλον. Στην πραγματικότητα, στις περισσότερες

περιπτώσεις, οι λεγόμενες «μεταγονιδιωματικές μελέτες» βασίζονται στην ανάλυση ενός μόνο τύπου γονιδίου: το γονίδιο 16S rRNA, που είναι ο πιο ισχυρός δείκτης για τον χαρακτηρισμό βακτηριακών ειδών και για τις φυλογενετικές μελέτες. Στον τομέα της διατροφής, οι μελέτες βασίζονται κυρίως στο γονίδιο 16S (Sharpton , 2014).

Η διαθεσιμότητα των νέων μοριακών τεχνικών για τον χαρακτηρισμό της μικροβιακή χλωρίδας προκάλεσε το ενδιαφέρον όσον αφορά τη δυνατότητα να ξεπεραστούν οι περιορισμοί της κλασικής μικροβιολογίας, ή ακριβέστερα, για να συμπληρωθεί η παραδοσιακή μικροβιολογία με ανεξάρτητες της καλλιέργειας τεχνικές. Με αυτόν τον τρόπο, διάφορα τρόφιμα, τόσο ζυμούμενα αλλά και μη, έχουν διερευνηθεί χρησιμοποιώντας αυτή την διπλή προσέγγιση.



Εικόνα 1.10: Σχηματική απεικόνιση σχεδιασμού ροής για τη μερική αλληλούχηση του συνόλου των μικροοργανισμών ενός οικοσυστήματος (shotgun metagenomics)

1.11 Νομοθεσία

Η ΕΕ με μια σειρά κανονισμών για τα τρόφιμα έχει δώσει τις κατευθυντήριες γραμμές στα κράτη μέλη για την επίτευξη υψηλού επιπέδου προστασίας της ζωής και της υγείας του ανθρώπου. Για να εξασφαλιστεί η ασφάλεια των τροφίμων, πρέπει να ελέγχονται όλα τα στάδια της αλυσίδας παραγωγής από τον πρωτογενή τομέα, τη μεταποίηση, μέχρι και τη διάθεση στον τελικό καταναλωτή. Οι κανονισμοί αυτοί είναι δεσμευτικοί για όλες τις χώρες της ΕΕ υιοθετώντας κοινές αρχές και ορισμούς,

με στόχο την εξασφάλιση ασφαλών τροφίμων για τους πολίτες αλλά και την ελεύθερη κυκλοφορία των προϊόντων της κοινότητας.

Σύμφωνα με τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών (2014) η επιτραπέζια ελιά εμπίπτει στην κατηγορία προϊόντων φυτικής προέλευσης που συντηρούνται με αλάτι, ξύδι, λάδι και οινόπνευμα. Ειδικότερα είναι «ημιώριμοι ή ώριμοι καρποί της ευρωπαϊκής ελιάς που διατίθενται για κατανάλωση κατόπιν επεξεργασίας και που έγιναν διατηρήσιμοι είτε με αλάτισμα, είτε τοποθετήθηκαν σε άλμη σε ξύδι ή σε ελαιόλαδο».

Στόχοι της Νομοθεσίας για τα Τρόφιμα είναι να εξασφαλίζεται η ποιότητα των προϊόντων, η δημόσια υγιεινή, η ασφάλεια των καταναλωτών, η διασφάλιση της ελεύθερης κυκλοφορίας των αγαθών και τέλος η απόδοση της πρωταρχικής ευθύνης σε περίπτωση προβληματικού προϊόντος. Σε κάθε χώρα υπάρχει σωρεία διατάξεων και νόμων. Εμείς όμως επικεντρωνόμενοι στις επιχειρήσεις επιτραπέζιας ελιάς πρέπει να τονίσουμε ότι επιβάλλεται να διαθέτουν ένα ολοκληρωμένο σύστημα διασφάλισης ποιότητας με βάση τις αρχές των διεθνών προτύπων του Συστήματος Ανάλυσης Κινδύνων και Κρίσιμων Σημείων Ελέγχου ή κοινώς ονομαζόμενο HACCP. Πρόκειται για ένα ολοκληρωμένο προληπτικό σύστημα για τον έλεγχο και την ασφάλεια υγιεινής των τροφίμων που πρέπει να εφαρμόζεται σε όλα τα στάδια της μεταποιητικής διαδικασίας. Από την παραλαβή των πρώτων υλών μέχρι την αποθήκευση του τελικού προϊόντος. Για τις επιχειρήσεις τυποποίησης επιτραπέζιας ελιάς, η εφαρμογή του HACCP είναι απαραίτητη και η μη εφαρμογή έχει νομικές κυρώσεις. Ο αρμόδιος κρατικός φορέας για τον έλεγχο και τις διατάξεις του κανονισμού 852/2004 είναι ο ΕΦΕΤ (Ενιαίος Φορέας Ελέγχου Τροφίμων) ενώ θα πρέπει να σημειωθεί πως υπάρχουν και τα πρότυπα ποιότητας, κοινώς λεγόμενα ISO (όπως το ΕΛΟΤ 1416) που αυξάνουν ακόμη περισσότερο την ασφάλεια του τροφίμου.

Νομοθεσία για την μεταποίηση και την τυποποίηση του ελαιοκάρπου. Η κάθε επιχείρηση που τυποποιεί και συσκευάζει επιτραπέζια ελιά θα πρέπει να συμμορφώνεται με συγκεκριμένους κανόνες που αναφέρονται συνοπτικά παρακάτω. Ο έλεγχος στην Ελλάδα γίνεται από τον Ε.Φ.Ε.Τ .

- i. Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 178/2002 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου. Καθορίζει τις γενικές αρχές και απαιτήσεις της νομοθεσίας για τα τρόφιμα και τις διαδικασίες σε θέματα ασφάλειας τροφίμων. Καθιερώνει την

Γενική Αρχή Ασφάλειας Τροφίμων (European Food Safety Authority, EFSA) και γενικός σκοπός είναι η προστασία της υγείας του καταναλωτή και των συμφερόντων του. Υποχρεώνει τις επιχειρήσεις να εφαρμόζουν διαδικασίες ελέγχου όλης της αλυσίδας παραγωγής των τελικών προϊόντων και εισάγει την Ιχνηλασιμότητα (traceability), τη μέθοδο ανεύρεσης/ανάκλησης σημαντικών πληροφοριών σε σχέση με το κάθε στάδιο του κύκλου ζωής του τροφίμου.

- ii. Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 852/2004 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου για την υγιεινή των τροφίμων. Αναφέρεται σε όλες τις επιχειρήσεις που επεξεργάζονται και πωλούν τρόφιμα και επιβάλλει κανόνες ορθής πρακτικής και υγιεινής. Βασικά σημεία του είναι η εφαρμογή διαδικασιών που στηρίζονται στο HACCP και η εγγραφή των επιχειρήσεων σε μητρώα. Το άρθρο 5 του κανονισμού προβλέπει μια ευελιξία ως προς την τήρηση των αρχών στις μικρές και μικρομεσαίες επιχειρήσεις. Επίσης καθορίζεται ο Υπεύθυνος για την τήρηση των διαδικασιών αλλά και οι φορείς που πραγματοποιούν τους ελέγχους.
- iii. Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 882/2004 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου. Αναφέρεται στους γενικούς κανόνες και τις αρχές ως προς τον έλεγχο στις μονάδες, σε οποιοδήποτε στάδιο της παραγωγής, από τους φορείς, με σκοπό την εξάλειψη ή τη μείωση σε αποδεκτό επίπεδο των κινδύνων για τον άνθρωπο, μέσω του περιβάλλοντος.
- iv. Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου. Καθορίζει τα μικροβιολογικά κριτήρια για συγκεκριμένους μικροοργανισμούς και τους κανόνες εφαρμογής που οφείλουν να συμμορφώνονται οι επιχειρήσεις
- v. Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1169/2011 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου σχετικά με την παροχή πληροφοριών για τα τρόφιμα στους καταναλωτές. Με τον κανονισμό αυτό καθορίζονται οι απαιτήσεις και οι πληροφορίες που πρέπει να αναγράφονται στη σήμανση των τροφίμων, με σκοπό την ασφάλεια των καταναλωτών, την πληροφόρησή τους και τη σωστή χρήση των προϊόντων.
- vi. Οδηγία 89/107/ΕΟΚ. Αναφέρεται στα πρόσθετα που μπορούν να χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα που προορίζονται για κατανάλωση. «Πρόσθετο» θεωρείται κάθε ουσία που έχει θρεπτική αξία ή όχι, δεν καταναλώνεται συνήθως μόνη της ως τρόφιμο, ούτε χρησιμοποιείται ως χαρακτηριστικό συστατικό τροφίμων και της οποίας η σκόπιμη προσθήκη στα τρόφιμα για τεχνολογικούς

- λόγους, κατά τα στάδια της παραγωγής, έχει ως αποτέλεσμα να αποτελέσει η ίδια η τα παράγωγά της συστατικά των τελικών προϊόντων, άμεσα ή έμμεσα.
- vii. Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 299/2008. Καθορίζει τα ανώτατα όρια καταλοίπων φυτοφαρμάκων πάνω ή μέσα στα τρόφιμα. Ειδικότερα ο κλάδος της μεταποίησης και της επεξεργασίας της επιτραπέζιας ελιάς εμπίπτει στις παρακάτω οδηγίες:
 - viii. Οδηγία 90/642/ΕΟΚ που προσδιορίζει τα ανώτατα όρια καταλοίπων φυτοφαρμάκων σε οπωροκηπευτικά προϊόντα.
 - ix. Οδηγία 2006/59/ΕΚ που για την επιτραπέζια ελιά καθορίζει το ανώτατο όριο υπολειμμάτων του φενθείου και του ισοδυνάμου του σε οξυγόνο και τα σουλφοξείδια και οι σουλφόνες του εκφραζόμενα σε φενθείο.
 - x. Οδηγία 2000/24/ΕΚ και αυτή προσδιορίζει τα ανώτατα όρια περιεκτικότητας σε κατάλοιπα φυτοφαρμάκων σε οπωροκηπευτικά.

1.12 Οικονομική σημασία

Η καλλιέργεια της ελιάς διαδραματίζει πρωτεύοντα ρόλο στην οικονομία των χωρών που ευδοκιμεί, αφού αξιοποιεί εκτάσεις που είναι ακατάλληλες για άλλες καλλιέργειες. Συμβάλλει και στην προστασία των εδαφών από τις διαβρώσεις. Επιπλέον, αποτελεί ένα υπολογίσιμο κλάσμα του Ακαθάριστου Εθνικού Προϊόντος (Α.Ε.Π.) των χωρών αυτών, των οποίων μέσω των εξαγωγών ελαιολάδου και επιτραπέζιων ελιών τονώνεται το εμπορικό ισοζύγιο (Lombardo 1988).

Το 40-45% του συνόλου της παγκόσμιας παραγωγής επιτραπέζιας ελιάς αντιστοιχεί σε πράσινες ελιές, το 30-35% σε μαύρες ελιές διαφόρων τύπων (φυσικές μαύρες, μαύρες με οξειδωση, ξηράλατες), ενώ το υπόλοιπο καλύπτεται από ελιές στο στάδιο χρώματος στροφής (ξανθες ελιές) (Μπαλατσούρας 1995). Όσον αφορά τις χώρες παραγωγής των διαφόρων τύπων επιτραπέζιας ελιάς, η Ισπανία είναι η κύρια παραγωγός χώρα πράσινων ελιών, η Τουρκία και η Ελλάδα αποτελούν τις κύριες χώρες παραγωγής φυσικά ώριμων (μαύρων) ελιών, ενώ οι ΗΠΑ των ελιών μαυρισμένων με οξειδωση (Garrido Fernández et al. 1997, Piga et al. 2001).

Σύμφωνα με το ΙΟΟC, η Ελλάδα κατέχει τη δεύτερη θέση στην Ευρώπη σε παραγωγή επιτραπέζιας ελιάς με μέση ετήσια παραγωγή 231.000 τόνους (για τα έτη 2014/15) που αντιστοιχεί στο 15.1% της παραγωγής στην Ευρώπη. Πρώτη έρχεται η Ισπανία με μέση ετήσια παραγωγή 547.000 τόνους (72,7% της παραγωγής στην

Ευρώπη) και τρίτη η Ιταλία με αντίστοιχη παραγωγή που φτάνει στους 42.000 τόνους που αντιστοιχεί σε ποσοστό 9.2% της παραγωγής στην Ευρώπη (για τα έτη 2014/15).

Η καλλιέργεια της ελιάς έχει μεγάλη οικονομική σημασία για την Ελλάδα. Τα τελευταία χρόνια καλλιεργείται σε όλα σχεδόν τα διαμερίσματα της χώρας. Στην Ελλάδα υπάρχουν περίπου 30 εκατομμύρια καλλιεργούμενα ελαιόδεντρα επιτραπέζιας ελιάς σε έκταση περίπου 1,5 εκατομμυρίου στρεμμάτων. Συγκεκριμένα η Στερεά Ελλάδα παράγει το 60-70% των βρώσιμων ελιών, ακολουθεί η Πελοπόννησος με κέντρο παραγωγής την Καλαμάτα και στη συνέχεια η Θεσσαλία με κέντρο παραγωγής το Βόλο. Σημαντική παραγωγή παρουσιάζει η Κρήτη αλλά και η Χαλκιδική, που συνήθως προορίζεται για ιδιοκατανάλωση.

Η αξία της εξαγόμενης επιτραπέζιας ελιάς, αντιστοιχεί στο 6,5% περίπου των εξαγωγών Ελληνικών αγροτικών προϊόντων και το 1,3% του συνόλου των ελληνικών εξαγωγών. Η Ελλάδα καλύπτει το 16,5% των Ευρωπαϊκών εξαγωγών επιτραπέζιας ελιάς μετά την Ισπανία με αντίστοιχο ποσοστό 76%. Σύμφωνα με την Πανελλήνια Ένωση Μεταποιητών και Τυποποιητών Εξαγωγέων Επιτραπέζιων Ελιών (ΠΙΕΜΕΤΕ) η Ελλάδα εξάγει περίπου 80.000 τόνους επιτραπέζιων ελιών ετησίως, σε περίπου 80 χώρες σε όλο τον κόσμο κυρίως Ιταλία, Η.Π.Α., Αυστραλία, Γερμανία, Καναδά, Βουλγαρία, Ηνωμένο Βασίλειο και Σαουδική Αραβία (IOOC, <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/132-world-table-olive-figures>..).

Από τις εξαγωγές περίπου το 30% εξάγεται χύμα, περίπου το 50% σε δοχεία 20 λίτρων που απευθύνεται σε χονδρεμπόρους που τις διαθέτουν στον τελικό καταναλωτή και μόνο το 20% σε μικρότερες συσκευασίες, σε βάζα, κονσέρβες, φακελάκια διαφόρων μεγεθών, η διατηρησιμότητα των οποίων εξασφαλίζεται με παστερίωση, αποστείρωση και συσκευασία υπό κενό.

Οι Ελληνικές ποικιλίες επιτραπέζιας ελιάς έχουν μεγάλη διατροφική αξία, είναι πλούσιες σε αντιοξειδωτικά και θεωρούνται απ' τις καλύτερες στον κόσμο. Σ' αυτό συντελούν τόσο η γεύση τους όσο και η ποιότητά τους που οφείλεται κυρίως στις ιδιαίτερες εδαφολογικές και κλιματολογικές συνθήκες της Ελλάδας και στη μη αλκαλική επεξεργασία.

Οι επιτραπέζιες ελιές Ελληνικής προέλευσης είναι κατά ποσοστό 60% πράσινες ελιές (είτε ολόκληρες είτε εκπυρηνωμένες και γεμιστές με αμύγδαλο, φέτα ή κόκκινη πιπεριά) και κατά ποσοστό 40% ελιές καλαμών και μαύρες ελιές.

2 Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση και αποτύπωση της μικροχλωρίδας σε ώριμα δείγματα επιτραπέζιων ελιών αυθόρμητης ζύμωσης με κλασσικές μικροβιολογικές μεθόδους αλλά και με τη χρήση της μοριακής και μεταγονιδιωματικής ανάλυσης καθώς και η διερεύνηση της αντιμικροβιακής δράσης των οξυγαλακτικών βακτηρίων που θα απομονωθούν.

Για την πραγματοποίηση της μελέτης αυτής χρησιμοποιήθηκαν τρεις ποικιλίες επιτραπέζιων ελιών αυθόρμητης ζύμωσης και συγκεκριμένα οι ποικιλίες Καλαμών, Κονσερβολιά και Άμφισσα,

3 Υλικά και μέθοδοι

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης μελετήθηκαν ελιές αυθόρμητης ζύμωσης. Στον Πίνακα 3.1 φαίνονται η ποικιλία, η προέλευση, η σοδειά των ελιών που μελετήθηκαν καθώς και ο χρόνος ζύμωσης.

Πίνακας 3.1: Δείγματα ελιών

Ποικιλία	Συνεταιρισμός	Σοδειά A (15 μήνες)	Σοδειά B (6 μήνες)
Καλαμών	Μεσολογγίου	2012-2013	2014-2015
Κονσερβολιά	Ροβίων	2012-2013	2014-2015
Άμφισσας	Άμφισσας	2012-2013	2014-2015

3.1 Μικροβιολογικές αναλύσεις

Οι μικροβιολογικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε δείγματα άλμης καθώς και σε δείγματα καρπού της ελιάς και περιλάμβαναν τη μέτρηση των πληθυσμών της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX), ζυμών-μυκήτων, εντεροβακτηρίων, οξυγαλακτικών βακτηρίων (βακίλων και κόκκων), προπιονικών βακτηρίων και ψευδομονάδων.

Η μικροβιολογική ανάλυση των δειγμάτων έγινε με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων. Συγκεκριμένα, για τα δείγματα άλμης ελήφθηκε ασηπτικά 1ml άλμης από κάθε ποικιλία και ακολούθησε η διαδικασία των διαδοχικών αραιώσεων με μεταφορά 1ml δείγματος προηγούμενης αραιώσης σε 9 ml ορρού Ringer. Για τα δείγματα καρπού και άλμης λήφθησαν 25g καρπού και άλμης από κάθε ποικιλία, τα οποία ομογενοποιήθηκαν σε συσκευή Stomacher 400 (Seward-Laboratory Blender, BA 7021, London SE1 1PP, UK) Οι κατάλληλες ανά περίπτωση δεκαδικές αραιώσεις χρησιμοποιούνταν για τον εμβολιασμό μιας διπλής σειράς τρυβλίων για κάθε χρησιμοποιούμενο μικροβιολογικό υπόστρωμα. Οι κατηγορίες των μικροοργανισμών που προσδιορίστηκαν ήταν οι ακόλουθες:

- **Οξυγαλακτικά βακτήρια:** καταμετρήθηκαν με την τεχνική της ενσωμάτωσης (1 ml/plate) στο υπόστρωμα de Man-Rogosa-Sharp Agar (MRS, Biokar) με προσθήκη κυκλοεξαμιδίου 0.05% w/w και ρύθμιση του pH στο 5.2, με επώαση σε θερμοκρασία 30 °C για 3 έως 5 ημέρες.

- **Εντεροβακτήρια:** Ποσότητα 1ml από σειρά διαδοχικών αραιώσεων ομογενοποιημένου δείγματος εμβολιάστηκε με την τεχνική της ενσωμάτωσης στο επιλεκτικό υπόστρωμα Violet Red Bile Agar (VRBA, LAB M). Ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία 37 °C για 24 ώρες.
- **Ζύμες:** Ποσότητα 0,1 ml από σειρά διαδοχικών αραιώσεων του ομογενοποιημένου δείγματος εμβολιάστηκε με την τεχνική της επιφανειακής εξάπλωσης στο επιλεκτικό υπόστρωμα Yeast extract glucose chloramphenicol agar (YGC, Merck). Ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία 25 °C για 3 ημέρες.
- **Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα:** Ποσότητα 1ml από σειρά διαδοχικών αραιώσεων ομογενοποιημένου δείγματος εμβολιάστηκε με την τεχνική της ενσωμάτωσης στο υπόστρωμα Plate Count Agar (PCA, Biokar). Ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία 30 °C για 3 ημέρες.
- **Προπιονικά Βακτήρια:** Ποσότητα 1ml από σειρά διαδοχικών αραιώσεων ομογενοποιημένου δείγματος εμβολιάστηκε με την τεχνική της ενσωμάτωσης στο επιλεκτικό υπόστρωμα Pal Propiobac (Standa, France). Ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία 32 °C σε αυστηρά αναερόβιες συνθήκες (Gas Pak) για 6 ημέρες.
- **Ψευδομονάδες:** Ποσότητα 1ml από σειρά διαδοχικών αραιώσεων ομογενοποιημένου δείγματος, εμβολιάστηκε με την τεχνική της ενσωμάτωσης στο υπόστρωμα Pseudomonas Agar Base (Oxoid, Germany) με προσθήκη αντιβιοτικού Pseudomonas CFC supplement SR0103. Ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία 30 °C για 48 ώρες.

Για τον υπολογισμό του τελικού πληθυσμού των μικροοργανισμών χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος των δύο επαναλήψεων από κάθε αραιώση. Η επιλογή του κατάλληλου τρυβλίου για καταμέτρηση έγινε σύμφωνα με τον αριθμό των αποικιών που αναπτύχθηκαν σε αυτό. Τα τρυβλία που επιλέχθηκαν είχαν περισσότερες από 30 και λιγότερες από 300 αποικίες. Στην περίπτωση που δύο αραιώσεις έδιναν κατάλληλο αριθμό αποικιών, τότε επιλέγονταν αυτή με τον μεγαλύτερο αριθμό αποικιών. Για τον υπολογισμό του τελικού πληθυσμού των μικροοργανισμών ανά ml άλμης ή ανά g καρπού και άλμης, ο μέσος όρος του αριθμού των αποικιών πολλαπλασιάστηκε με την αραιώση που χρησιμοποιήθηκε. Τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι συνθήκες επώασης που εφαρμόστηκαν για την καταμέτρηση των παραπάνω μικροβιακών ομάδων παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα 3.2 που ακολουθεί.

Πίνακας 3.2: Συνθήκες ανάπτυξης που χρησιμοποιήθηκαν για την καταμέτρηση των μικροοργανισμών

Ομάδες μ.ο.	Θρεπτικό Μέσο	Θερμοκρασία °C	Χρόνος (μέρες)	Συνθήκες	Τεχνική	Παρατηρήσεις
LAB	MRS (Biokar, France)	30	3	Αναερόβιες (διπλή στρώση άγαρ)	Ενσωμάτωση	pH=5.2 Προσθήκη κυκλοεξαμιδίου 0.05% w/v
Total plate count (mesophilic)	PCA (Biokar, France)	30	3	Μικροαερόφιλες	Ενσωμάτωση	-
Yeasts and moulds	YGC (Merck, Germany)	25	3	Μικροαερόφιλες	Επίστρωση	Περιέχει chloramphenicol 0.1 % w/v
Propionic acid bacteria	Pal Propiobac (Standa, France)	30	6	Αναερόβιες (Gas Pack)	Ενσωμάτωση	Προσθήκη πενικιλίνης
Pseudomonas	Pseudomonas Agar Base (Oxoid,)	30	2	Μικροαερόφιλες	Επίστρωση	Προσθήκη PSEUDOMONAS CFC SELECTIVE AGAR SUPPLEMENT SR0103
Coliforms	VRBA (Lab M, UK)	37	1	Αναερόβιες (διπλή στρώση άγαρ)	Ενσωμάτωση	Προετοιμασία την ημέρα της ανάλυσης, βράσιμο 1', δεν αποστειρώνεται

Με στόχο την απομόνωση στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων αλλά και ζυμών, 10 αποικίες από τα τρυβλία με υλικό MRS Agar και YGC Agar, που προέκυψαν από τα δείγματα άλμεων και καρπών, λήφθησαν υπό ασηπτικές συνθήκες, μεταφέρθηκαν σε υγρό θρεπτικό υλικό Nutrient Broth, στο οποίο είχε προστεθεί 20% γλυκερόλη και αποθηκεύονταν στους -80 °C για περαιτέρω μελέτη.

Η επιλογή των αποικιών έγινε μετά από προσεκτική παρατήρηση στο στερεοσκόπιο της μορφολογίας της κάθε αποικίας σε σχέση με το σχήμα, το μέγεθος, την υφή αλλά και το χρώμα της.

Οι επιλεγμένες αποικίες υποβλήθηκαν σε διαδοχικές εξαπλώσεις με μικροβιολογικό κρίκο (streaking) σε τρυβλία με το θρεπτικό υπόστρωμα, από το οποίο συλλέχθηκαν, μέχρι να παρουσιάζουν σταθερή μακροσκοπική και μικροσκοπική μορφή, οπότε θεωρήθηκαν καθαρές καλλιέργειες και διατηρήθηκαν στους -80°C σε πλαστικά φιαλίδια όγκου 2 ml (cryovials) με MRS broth και γλυκερόλη 20% (v/v) στην περίπτωση των βακτηρίων και με YES broth YES broth (MP Biomedicals, United States) και γλυκερόλη 20% (v/v) στην περίπτωση των ζυμών.

Σε κάθε αποικία βακτηρίου που απομονώθηκε έγινε χρώση Gram και δοκιμή της καταλάσης ενώ για την περίπτωση των ζυμών έγινε μόνο δοκιμή καταλάσης.

3.2 Χρώση Gram

Χρώση κατά Gram (Gram stain) ονομάζεται η μέθοδος η οποία κατατάσσει τα είδη των βακτηρίων σε δύο μεγάλες ομάδες, τα "θετικά κατά Gram" και τα "αρνητικά κατά Gram". Στην πρώτη περίπτωση τα βακτήρια λαμβάνουν μπλε-ιώδες χρώμα ενώ στη δεύτερη λαμβάνουν ερυθρό χρώμα. Η διαφορά αυτή οφείλεται στη χημική σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων και ιδιαίτερα στην ύπαρξη ή μη πεπτιδογλυκάνης. Τα κατά gram θετικά βακτήρια έχουν τοίχωμα υψηλής περιεκτικότητας σε πεπτιδογλυκάνη και χαμηλότερης σε λιπίδια ενώ τα gram αρνητικά διαθέτουν και μια εξωτερική λιπιδική στοιβάδα που βρίσκεται πάνω από την κυτταρική μεμβράνη.

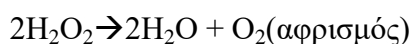
Προετοιμασία παρασκευάσματος. Αφού αναμείξουμε τα κύτταρα με απιονισμένο νερό και τα εξαπλώσουμε στην αντικειμενοφόρο πλάκα προσηλώνουμε το παρασκεύασμα με την βοήθεια του λύχνου Bunsen. Η προσήλωση προκαλεί αδρανοποίηση των ενζυμικών συστημάτων και σκλήρυνση των κυτταρικών δομών.

Χρώση κυττάρων. Βάφουμε το προσηλωμένο παρασκεύασμα με τη χρωστική του κρυσταλλικού ιώδους για 30sec και αφού ξεπλύνουμε με απιονισμένο νερό καλύπτουμε την αντικειμενοφόρο πλάκα με το διάλυμα ιωδίου και αφήνουμε να δράσει για 30sec. Ξεπλένουμε με απεσταγμένο νερό και αποχρωματίζουμε με

αιθανόλη. Η αιθανόλη ξεπλένεται με νερό και στη συνέχεια τοποθετούμε τη χρωστική σαφρανίνη για 30 sec. Ολοκληρώνουμε ξεπλένοντας με νερό. Στη συνέχεια γίνεται παρατήρηση του παρασκευάσματος στο μικροσκόπιο.

3.3 Δοκιμή καταλάσης

Η καταλάση είναι ένα ένζυμο που παράγεται από τα περισσότερα βακτήρια και καταλύει την διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο:



Αρνητικά ως προς την καταλάση είναι τα περισσότερα αναερόβια βακτήρια, όπως αυτά που ανήκουν στα γένη *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* και *Clostridium*.

Προετοιμασία. Σε αντικειμενοφόρο πλάκα ρίχνουμε 1ml αραιού διαλύματος H_2O_2 (1:10 με νερό). Αφού τοποθετήσουμε ποσότητα κυττάρων γίνεται παρατήρηση της δημιουργίας ή όχι αφρισμού. Η παρατήρηση αφρισμού δηλώνει θετική δοκιμή.

3.4 Απομόνωση βακτηριακού DNA

Οι Pitcher και Saunders (1989) ανέπτυξαν ένα πρωτόκολλο για την απομόνωση υψηλής ποιότητας και καθαρότητας βακτηριακού DNA ικανού να χρησιμοποιηθεί στις διαδικασίες, αλληλούχησης. Με τη μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται η εκχύλιση του DNA με τη χρήση θειοκυανιούχου γουανιδίνης (GES) ενός παράγοντα που αποδιατάσσει πρωτεΐνες. Το πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε ελαφρώς τροποποιημένο και περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Ανανέωση κυττάρων (εμβόλιο 1% v/v) σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα (MRS broth, BioKar, France) από τους -80°C (MRS broth, 20% v/v γλυκερόλη). Ανάπτυξη καλλιέργειας στους 30°C για 15-18 h ώστε τα κύτταρα να βρίσκονται στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης και να αποφευχθεί η αποδόμηση του DNA .
2. Παραλαβή κυττάρων από 1,5 mL καλλιέργειας με φυγοκέντρηση 10.000 rpm / 2 min.

3. Επαναιώρηση των κυττάρων σε 1mL PBS (Phosphate Buffered Saline, pH=7.4). Ακολουθεί θέρμανση στους 65 °C για 10 min, φυγοκέντρηση 10.000 rpm / 2 min και πλήρης απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού.
4. Στο ίζημα προστίθενται 100 µL διαλύματος λυσοζύμης (50 mg/mL) (lysozyme) (L6876, Sigma-Aldrich Chemie GmbH Munich, Germany) σε TE buffer (10mmol Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, pH=8), 10 µL μουτανολυσίνης (mutanolysin) (5 U/µL) και 20 µL RNAάσης (RNAase) (Sigma kit, GenElute). Ακολουθεί επώαση στους 37 °C για 30 min με περιοδική ήπια ανάδευση των μικροφιαλιδίων (ανά 10min).
5. Μεταφορά των δειγμάτων σε απαγωγό και προσθήκη 0,5 mL αντιδραστηρίου GES (60g Guanidium thiocyanate, 0.5 mol/L EDTA, 5% v/v Sarcosyl). Ακολουθεί ήπια ανάδευση και ψύξη σε πάγο για 5 min.
6. Προσθήκη 0.25 mL παγωμένου οξικού αμμωνίου (7,5 mol/L), ήπια ανάδευση και παραμονή στον πάγο για 10 min.
7. Προσθήκη 0,5 mL χλωροφόρμιου και έντονη ανάδευση των δειγμάτων ώστε να επιτευχθεί ανάμιξη των δύο φάσεων.
8. Ακολουθεί φυγοκέντρηση υπό ψύξη (13.000 rpm / 15 min / 4 °C). Επανάληψη φυγοκέντρωσης εάν οι φάσεις δεν έχουν διαχωριστεί πλήρως.
9. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο μικροφιαλίδιο. Αποφυγή λήψης των πρωτεϊνών της μεσόφασης.
10. Προσθήκη 0,54 όγκους παγωμένης ισοπροπανόλης και ήπια ανάδευση μέχρι κατακρήμνισης του DNA.
11. Φυγοκέντρηση στις 7.000 rpm / 2 min και προσεκτική απόχυση του υπερκείμενου.
12. Προσθήκη 0,7 ml παγωμένης αιθανόλης (70% v/v) και ανάδευση. Ακολουθεί φυγοκέντρηση 8000 rpm/ 1min και απόχυση υπερκείμενου.
13. Επανάληψη βήματος 12 τρεις φορές.
14. Πλήρης απομάκρυνση της αιθανόλης στο τελευταίο πλύσιμο. Τοποθέτηση των δειγμάτων στους 37 °C για 2-3 min για να εξατμιστεί η αιθανόλη.
15. Προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος TE buffer (40-60 µL), ανάλογα με το μέγεθος του ιζήματος.
16. Τοποθέτηση των δειγμάτων στους 37 °C για 24 h και έπειτα στους 4 °C μέχρι τη χρήση τους.

Έλεγχος συγκέντρωσης και ποιότητας DNA

Ο έλεγχος της ποιότητας και της συγκέντρωσης του DNA πραγματοποιήθηκε με το φωτόμετρο Quawell Q5000 Read First (Quawell Technology, Inc, San Jose, CA 95161 U.S.A.), σε 1-2μl του εκχυλίσματος. Το όργανο αυτό μετράει σε μήκος κύματος $\lambda=260\text{nm}$ την συγκέντρωση του DNA σε ng/μl. Επίσης δίνει χρήσιμες τιμές για άλλες παραμέτρους που αφορούν την ποιότητα του DNA, όπως είναι η απορρόφηση (A) στα 280nm και 230nm, και τους λόγους 260/280, και 260/230. Οι δυο αυτοί λόγοι αποτελούν δείκτες της καθαρότητας του DNA. Μια τιμή ~1.8 είναι γενικά αποδεκτή ως «καθαρό» DNA. Τιμή εμφανώς χαμηλότερη μαρτυρά την ύπαρξη πρωτεϊνών, φαινολών, ή άλλων προσμίξεων, οι οποίες απορροφούν έντονα ή κοντά στα 280nm. Οι τιμές 260/230 για καθαρό νουκλεϊκό οξύ είναι συχνά υψηλότερες από τις τιμές 260/280, και είναι συχνά στο εύρος 1.8-2.2. Αν οι τιμές είναι χαμηλότερες, μαρτυράται η παρουσία συνεκχυλιζόμενων προσμίξεων, οι οποίες θα προκαλέσουν μετέπειτα προβλήματα κατά την ενίσχυση του βακτηριακού DNA.

Προετοιμασία των δειγμάτων προς ενίσχυση

Τα δείγματα τα οποία περιέχουν το βακτηριακό DNA διαλυτοποιημένο σε 30μL TE, αραιώνονται βάσει της συγκέντρωσης του DNA που λήφθηκε από το φωτόμετρο με ρυθμιστικό διάλυμα TE, έτσι ώστε να επέλθουν σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται περίπου στα 25 ng/μL DNA που θα χρησιμοποιηθούν για την τεχνική της rep-PCR και περίπου στα 200 ng/μL DNA για την αλληλούχιση του 16S γονιδίου.

3.5 Ομαδοποίηση στελεχών με την μέθοδο rep-PCR

Η μέθοδος που αναφέρεται ως rep-PCR αναπτύχθηκε στηριζόμενη στην παρατήρηση της παρουσίας συντηρημένων επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών διασπαρμένων σε ολόκληρο το γονιδίωμα των κατά Gram αρνητικών και θετικών βακτηρίων (Louws et al., 1999) αλλά και μυκήτων (George et al., 1998). Έτσι αναπτύχθηκαν αντίστοιχα οι REP-PCR, ERIC-PCR και BOX-PCR μεθοδολογίες για την ενίσχυση των τμημάτων μεταξύ των παραπάνω επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών.

Τα ενισχυμένα αυτά τμήματα μπορούν να αναλυθούν σε πηκτή αгарόζης, οδηγώντας σε ένα προφίλ που αναφέρεται ως rep-PCR γενωμικό αποτύπωμα. Τα rep-

PCR γενωμικά αποτυπώματα που προέρχονται από απομονωμένα στελέχη βακτηρίων, επιτρέπουν την ταυτοποίηση σε επίπεδο γένους, είδους και στελέχους. Ο διαχωρισμός αυτών των θραυσμάτων σε πηκτή αγαρόζης αποδίδει εξαιρετικά εξειδικευμένα δακτυλικά αποτυπώματα DNA. Η μεθοδολογία έχει αποδειχθεί ότι είναι ιδιαίτερα αξιόπιστη, γρήγορη και αναπαραγωγίμη στην ταχεία ταυτοποίηση των βακτηρίων.

Η ενίσχυση του DNA εφαρμόστηκε σε όλα τα διαθέσιμα βακτηριακά στελέχη σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Mohammed et.al. (2009). Αναλυτικά οι ποσότητες των αντιδραστηρίων φαίνονται στον πίνακα 3.3. Οι συνθήκες της αντίδρασης στον θερμικό κυκλοποιητή (Mastercycler Gradient της εταιρίας Eppendorf) ήταν οι εξής:

- 2 min στους 92° C
- 30 κύκλοι
 - 30 s στους 92° C
 - 2 min στους 40° C
 - 3 min στους 72° C
- 3 min στους 72° C

Πίνακας 3.3: Ποσότητες αντιδραστηρίων για τη rep-PCR

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά αντίδραση
2xReadyMix	12.5 μl
DNA template	1 μl (25ng/μl)
BOXAIR (7.5 pmol/μl)	1 μl
ddH ₂ O	10.5 μl
Τελικός Όγκος	25 μl

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Το DNA είναι ένα μόριο αρνητικά φορτισμένο, λόγω των φωσφορικών ομάδων που βρίσκονται στο φωσφοδιεστερικό σκελετό. Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης επιτρέπει το διαχωρισμό, το χαρακτηρισμό και την απομόνωση τμημάτων DNA. Η βασική αρχή της μεθόδου βασίζεται στο ότι μόρια DNA υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου λόγω του αρνητικού φορτίου του φωσφορικού σκελετού, θα μετακινηθούν προς το θετικό πόλο με ταχύτητα που εξαρτάται από το μέγεθος του και το σχήμα του.

με τα μικρότερα κομμάτια να κινούνται γρηγορότερα και τα μεγαλύτερα αργότερα. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, γίνεται χρώση των νουκλεϊκών οξέων, με ειδικές χρωστικές (βρωμιούχο αιθίδιο), και φωτογράφιση τους. Τέλος, η ηλεκτροφορητική εικόνα του δείγματος παρέχει στοιχεία για την καθαρότητα του και ελέγχει την απόδοση της PCR.

Για την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω υλικά:

- Ρυθμιστικό διάλυμα TAE (Tris-acetate-EDTA) (40mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.2)
- Αγαρόζη συγκέντρωσης 1,2% (w/v) (Sigma)
- 1kb DNA Ladder (Invitrogen)
- Βρωμιούχο αιθίδιο 6μl (10 mg/ml) (Sigma, Taufkirchen, Germany).
- Διάλυμα φόρτωσης (6x) (Loading Buffer) (NEB)

Διαδικασία ανάλυσης DNA σε πηκτή αγαρόζης:

- Διαλυτοποίηση με θέρμανση 1.44 g αγαρόζης σε 120ml ρυθμιστικού διαλύματος TAE (1x).
- Προσθήκη 6μL διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου και μεταφορά του μίγματος σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης ώστε να στερεοποιηθεί.
- Αφού στερεοποιηθεί η πηκτή γίνεται προσθήκη διαλύματος TAE (running buffer), έτσι ώστε η πηκτή να βρίσκεται πλήρως βυθισμένη σε αυτό.
- Φόρτωση των δειγμάτων στους κατάλληλους υποδοχείς (πηγαδάκια), αφού πρώτα είχε προστεθεί σε κάθε δείγμα μικρή ποσότητα loading buffer, το οποίο βοηθάει την καθίζηση των δειγμάτων. Στον αρχικό υποδοχέα προστίθεται 4 μl από τον 1kb DNA Ladder .
- Εφαρμογή κατάλληλου δυναμικού (60V) για περίπου δύο ώρες (140 min.)
- Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης ακολούθησε φωτογράφιση σε ειδικό UV θάλαμο.

Έλεγχος της πηκτής αγαρόζης

Τα μόρια του DNA διακρίνονται ως πορτοκαλί ζώνες λόγω του φθορισμού του βρωμιούχου αιθιδίου όταν η πηκτη εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία. Η συσκευή UV συνδέεται με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή και ηλεκτρονικό υπολογιστή. Μέσω ειδικού λογισμικού γίνεται η επεξεργασία και αποθήκευση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης. Τα δείγματα φωτογραφήθηκαν ώστε να ακολουθήσει ταυτοποίηση σε επίπεδο στελεχών με τη βοήθεια του αλγορίθμου UPGMA του προγράμματος Bionumerics.

Ομαδοποίηση στελεχών με χρήση του προγράμματος Bionumerics

Το πρόγραμμα Bionumerics συγκρίνει τις ζώνες άγνωστων στελεχών με τους μάρτυρες των μοριακών μεγεθών και στηριζόμενο στην απόκλιση και την ποσότητα ζωνών, δημιουργεί ένα φυλογενετικό δέντρο στο οποίο ομαδοποιούνται τα στελέχη. Από αυτά επιλέχθηκαν ενδεικτικά κάποια στελέχη για να πραγματοποιηθεί στη συνέχεια 16s-rDNA PCR προκειμένου να γίνει η ταυτοποίησή τους.

3.6 Ταυτοποίηση στελεχών με αλληλούχηση του γονιδίου 16S rDNA

Η χρήση των αλληλουχιών του γονιδίου 16S rRNA για τη μελέτη της βακτηριακής φυλογένεσης και ταξινόμησης είναι μακράν ο πιο κοινός γενετικός δείκτης καθαρότητας που χρησιμοποιείται για διάφορους λόγους. Οι λόγοι αυτοί περιλαμβάνουν:

- την παρουσία της αλληλουχίας σε όλα σχεδόν τα βακτήρια,
- τη λειτουργία του γονιδίου 16S rRNA που έχει παραμείνει ίδια με την πάροδο του χρόνου και,
- ότι το γονίδιο 16S rRNA (1500 bp) είναι σχετικά μικρό καθιστώντας ταχύτερη και φθηνότερη την αλληλούχησης του.

Για την ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους με τη βοήθεια του γονιδίου 16S χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο που περιγράφεται από τους Ntougias et al. (2006) Αναλυτικά οι ποσότητες των αντιδραστηρίων φαίνονται στον πίνακα 3.5. Οι συνθήκες της αντίδρασης στην PCR ήταν οι εξής:

- 2 min στους 94° C
- 30 κύκλοι
 - 30 s στους 94° C
 - 30 s στους 56° C
 - 1 min και 20 s στους 72° C
- 5 min στους 72° C
- Hold στους 10° C

Πίνακας 3.4: Ποσότητες αντιδραστηρίων για τη 16S-PCR

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά αντίδραση
2xReadyMix	25 μ l
DNA template	1 μ l (200 ng/ μ l)
Primer F (10 pmol/ μ l)	1 μ l
Primer R (10 pmol/ μ l)	1 μ l
ddH ₂ O	22 μ l
Τελικός Όγκος	50 μ l

Πίνακας 3.5: Αλληλουχίες εκκινητών 16sF και 16sR για την 16s PCR

16SF	5'-GGAGAGTTAGATCTTGGCTCAG-3'
16SR	3'- CCTCTCAATCTAGAACCGAGTC-5'

Καθαρισμός προϊόντων PCR

Αφού ελέγχθηκε η επιτυχία της αντίδρασης και η καθαρότητα των δειγμάτων της PCR με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης όπως περιγράφηκε πιο πάνω (Ενότητα 3.5.1) με τη μόνη διαφορά ότι τα δείγματα έτρεξαν σε αγαρόζη 1%, σε μεγαλύτερη τιμή δυναμικού (περίπου 100 mV) και για λιγότερο χρόνο (περίπου 40 min.), έγινε καθαρισμός των δειγμάτων της PCR με το κιτ NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up της Macherey-Nagel (Duren, Germany) βάσει του ακόλουθου πρωτοκόλλου:

- Προσθήκη όγκου 200 μ l προσδεδεικμένου παράγοντα NTI σε καθε 100 μ L του προϊόντος της PCR.

- Για την πρόσδεση του DNA, σε Eppendorf των 2 mL τοποθετήθηκε στήλη χαλαζία NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up και φορτώθηκαν περίπου 700 µL δείγματος. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 1 min σε 12.000 rpm. Το υγρό που διαπέρασε τη στήλη απορρίφθηκε και το βήμα επαναλήφθηκε μέχρι να φορτωθεί όλη η ποσότητα του δείγματος.
- Για την έκπλυση της στήλης προστέθηκαν 700 µL ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης (Wash Buffer NT3), στο οποίο είχε προστεθεί εξαρχής αιθανόλη, ακολούθησε φυγοκέντρηση για 1 min σε 11.000 rpm και απορρίφθηκε το υγρό που διαπέρασε τη στήλη.
- Προκειμένου να απομακρυνθεί εντελώς το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης και να στεγνώσει η στήλη επαναλήφθηκε φυγοκέντρηση για 1 min σε 11.000 rpm.
- Για να εξατμιστεί πλήρως η αιθανόλη, το Eppendorf παρέμεινε για 10-15min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Για να γίνει η έκλυση του DNA, η στήλη τοποθετήθηκε σε νέο Eppendorf του 1,5 mL, προστέθηκαν 20 µL ρυθμιστικού διαλύματος έκλυσης (Elution Buffer NE), επώαστηκε για 5 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 1 min σε 12.000 rpm.
- Διατήρηση του καθαρού πλέον προϊόντος στους -20°C.

Στη συνέχεια μετρήθηκε η συγκέντρωση του DNA στα δείγματα και διορθώθηκε σε περίπου 10 ng/µl ώστε να σταλούν για αλληλούχηση.

Ο προσδιορισμός νουκλεοτιδικής αλληλουχίας πραγματοποιήθηκε από την VBC-Biotech Service GmbH, Vienna, Austria

Ταυτοποίηση στελεχών

Η ταυτοποίηση των υπό μελέτη αλληλουχιών, πραγματοποιήθηκε με τη μηχανή αναζήτησης BLAST (Basic Local Alignment Tool) του NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST/>).

Το πρόγραμμα BLAST (Altschul et al., 1997) χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση των στελεχών σύμφωνα με την ομοιότητα τους με ταυτοποιημένα στελέχη που έχουν καταχωρηθεί στη βάση δεδομένων. Τα αποτελέσματα αλληλούχησης του άγνωστου τμήματος μπορούν να ταξινομηθούν σύμφωνα με τις

καταχωρήσεις στη βάση δεδομένων βάσει της ομοιότητας ή της τιμής εύρους απόκλισης (e-value).

3.7 Μεταγονιδιωματική ανάλυση

Το πρωτόκολλο για την απομόνωση του γενετικού υλικού από το οικοσύστημα των ελιών αναπτύχθηκε στο Εργαστήριο Γαλακτοκομίας και παρουσιάζεται παρακάτω:

1. Συλλογή 10 mL άλμης και φυγοκέντρηση στις 13000rpm/10min.
2. Έκπλυση της μάζας των κυττάρων με 1 mL αποστειρωμένο νερό.
3. Επαναδιάλυση των κυττάρων σε 1 mL αποστειρωμένο νερό και επώαση στους 65° C/10min. Στη συνέχεια ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000rpm/10min, και απόχυση υπερκειμένου.
4. Επαναδιάλυση της βιομάζας σε 500μl σορβιτόλη 1M, 0.1M EDTA (pH=7.5), 200U λυτικάση, 500μl λυσοζύμη (50mg/ml) (L6876, Sigma-Aldrich Chemie GmbH Munich, Germany), 40μl μουτανολυσίνη (5U/μl) και 100μl RNase A, και επώαση στους 37° C/2h.
5. Προσθήκη 20μl πρωτεΐνάση K (Sigma-Aldrich Chemie GmbH Munich, Germany) και επώαση στους 55° C/1h.
6. Φυγοκέντρηση στις 13000rpm/5min, απόχυση υπερκειμένου και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 0.5ml 50mM Tris-HCl (pH=7.4) 20mM EDTA και 50μl 20% SDS και επώαση στους 65° C/30min.
7. Προσθήκη 200μl οξικό αμμώνιο (7.5mol/l) και τοποθέτηση σε πάγο για 1h.
8. Φυγοκέντρηση στις 13000rpm/10min και μεταφορά του υπερκειμένου σε καινούριο μικροφιαλίδιο.
9. Προσθήκη 1 όγκου (1:1) παγωμένης ισοπροπανόλης και επώαση στους -20° C (overnight).
10. Την επόμενη μέρα γίνεται φυγοκέντρηση στις 8000rpm/20min στους 4° C.
11. Έκπλυση του ιζήματος δύο φορές με 700μl παγωμένης αιθανόλης (70% v/v).
12. Απομάκρυνση της αιθανόλης από το ίζημα και τοποθέτηση των φιαλιδίων στους 37° C/3-4min για να εξατμιστεί τελείως η αιθανόλη.
13. Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 30 μl TE buffer (10mmol Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, pH=8).
14. Επώαση στους 37° C/1h.

Ο έλεγχος της ποιότητας του DNA που απομονώθηκε πραγματοποιήθηκε με το φωτόμετρο Quawell Q5000 Read First (Quawell Technology, Inc, San Jose, CA 95161 U.S.A.), σε 2μl του εκχυλίσματος και με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (παραγραφος 4.1).

Για την επιβεβαίωση της παρουσίας DNA βακτηρίων και ζυμών έγινε απομόνωση DNA από καθαρή καλλιέργεια βακτηρίου (*S.macedonicus*) με το πρωτόκολλο που περιγράφηκε προηγουμένως (παράγραφος 4.1) αλλά και απομόνωση DNA ζύμης (*S.pombe*) με το πρωτόκολλο που περιγράφει ο Kopsahelis et al. (2007), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες, αντίστοιχα. Πραγματοποιήθηκε PCR με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών για το βακτηριακό DNA (το 16S rRNA γονίδιο του *S.macedonicus*), το DNA των ζυμών (η ITS περιοχή DNA του *S.pombe*) και το φυτικό DNA (το γονίδιο της ακτίνης από DNA Κορωνέικης ελιάς).

Οι συνθήκες αντίδρασης της PCR για το 16 S rRNA ήταν οι εξής:

- 2 min στους 94° C
- 30 κύκλοι
 - 30 s στους 94° C
 - 30 s στους 56° C
 - 1 min και 20 s στους 72° C
- 5 min στους 72° C
- Παραμονή στους 10° C

Οι συνθήκες αντίδρασης της PCR για την περιοχή ITS των ζυμών ήταν οι εξής:

- 2 min στους 95° C
- 35 κύκλοι
 - 30 s στους 95° C
 - 30 s στους 55° C
 - 1 min στους 72° C
- 10 min στους 72° C
- Παραμονή στους 10° C

Οι συνθήκες αντίδρασης της PCR για το γονίδιο της Ακτίνης ήταν οι εξής:

- 5 min στους 95° C
- 32 κύκλοι
 - 1 min στους 94° C
 - 1 min στους 57° C
 - 2 min στους 72° C
- 10 min στους 72° C
- Παραμονή στους 10° C

Αναλυτικά οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για τα δείγματα φαίνονται στους πίνακες που ακολουθούν.

Πίνακας 3.7 Αντιδραστήρια PCR για το βακτηριακό DNA

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά αντίδραση					
	Τυφλό δείγμα	<i>S. macedonicus</i> (+)	<i>S. pombe</i> (-)	Καλαμών	Κονσερβολιάς	Άμφισσας
2xReadyMix	12.5 μl	12.5 μl	12.5 μl	12.5 μl	12.5 μl	12.5 μl
DNA template	-	200ng	200ng	10 μl	10 μl	10 μl
Primer 16S (10pmol/μl) (F)	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl
Primer 16S (10pmol/μl) (R)	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl
ddH₂O	10.5 μl	9.5 μl	9.5 μl	0.5 μl	0.5 μl	0.5 μl
Τελικός Όγκος	25 μl	25 μl	25 μl	25 μl	25 μl	25 μl

Πίνακας 3.8: Αντιδραστήρια PCR για το DNA ζυμών

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά αντίδραση					
	Τυφλό δείγμα	<i>S. macedonicus</i> (-)	<i>S. pombe</i> (+)	Καλαμών	Κονσερβολιάς	Άμφισσας
2xReadyMix	12.5 μl	12.5 μl	12.5 μl	12.5 μl	12.5 μl	12.5 μl
DNA template	-	200ng	200ng	10 μl	10 μl	10 μl
Primer ITS1 (10pmol/μl)(F)	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl
Primer ITS4 (R) (10pmol/μl)	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl
ddH₂O	10.5 μl	9.5 μl	9.5 μl	0.5 μl	0.5 μl	0.5 μl
Τελικός Όγκος	25 μl	25 μl	25 μl	25 μl	25 μl	25 μl

Πίνακας 3.8: Αντιδραστήρια PCR για το φυτικό DNA

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά αντίδραση				
	Τυφλό δείγμα	Φυτικό DNA (+)	Καλαμών	Κονσερβολιάς	Αμφισσας
2xReadyMix	12.5 μl	12.5 μl	12.5 μl	12.5 μl	12.5 μl
DNA template	-	200ng	10 μl	10 μl	10 μl
Primer Actin2 (10pmol/μl) (F)	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl
Primer Actin3 (10pmol/μl) (R)	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl
ddH₂O	10.5 μl	9.5 μl	0.5 μl	0.5 μl	0.5 μl
Τελικός Όγκος	25 μl	25 μl	25 μl	25 μl	25 μl

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πηκτή αγαρόζης. Η διαδικασία περιγράφεται στην παράγραφο 3.5

Στη συνέχεια τα δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχηση και έγινε επεξεργασία των αποτελεσμάτων με τον MG-RAST server (Meyer et al., 2008) (<http://metagenomics.anl.gov/>)

3.8 Μελέτη αντιμικροβιακής δράσης οξυγαλακτικών βακτηρίων

Για τον προσδιορισμό της αντιμικροβιακής δράσης εφαρμόστηκε η μέθοδος διάχυσης του υπερκείμενου καλλιέργειας των ευαίσθητων στελεχών σε τρυβλία (Well Diffusion Assay, WDA). Το παθογόνο στέλεχος που εξετάζεται σε κάθε περίπτωση ως προς το αν παρεμποδίζεται χαρακτηρίζεται ως «στόχος» και είναι εκείνο με το οποίο είναι εμβολιασμένο το θρεπτικό υπόστρωμα στο τρυβλίο. Το στέλεχος, του οποίου το υπερκείμενο υγρό χρησιμοποιούμε μετά από φυγοκέντρηση χαρακτηρίζεται ως «παραγωγό» στέλεχος.

Τα 42 στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από άλμη ελιών εξεταστήκαν για την παραγωγή αντιμικροβιακής δράσης. Από τα 47 εξεταζόμενα στελέχη τα 17 ανήκουν στο γένος *Lactobacillus* και τα υπόλοιπα 15 στο γένος *Pediococcus*. Για την ανάπτυξη των «παραγωγών» στελεχών χρησιμοποιήθηκε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα MRS (de Man Rogosa and Sharp, Biokar Diagnostics France) αλλά και εργαστηριακό γάλα (10% w/v), εμπλουτισμένο με εκχύλισμα ζύμης (0.3% w/v), εμβολιασμένο σε ποσοστό 1% (v/v). Η θερμοκρασία ανάπτυξης για όλα τα

στελέχη ήταν 30° C υπό μικροαερόφιλες συνθήκες για 24h.. Στη συνέχεια οι καλλιέργειες φυγοκεντρήθηκαν στα 10000 rpm για 15min και στους 4° C. Έγινε συλλογή των υπερκειμένων και το pH του υπερκειμένου ρυθμίστηκε στο 6.5 χρησιμοποιώντας διάλυμα 1N NaOH

Για την ανάπτυξη των «στόχων» στελεχών χρησιμοποιήθηκε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα ανάλογα με το κάθε στέλεχος (Πίνακας 3.6) και στη συνέχεια επωάστηκαν για 18 ώρες. Τα «ευαίσθητα» στελέχη ενσωματώθηκαν σε στερεό θρεπτικό μέσο, αντίστοιχο με αυτό στο οποίο αναπτύχθηκαν με εμβόλιο, (0.1%, v/v, από φρέσκια καλλιέργεια). Μετά τη στερεοποίηση του μέσου ανοίχθηκαν οπές με τη βοήθεια αποστειρωμένων γυάλινων σιφωνίων τύπου Pasteur, στις οποίες προστέθηκαν 50 µL από το κάθε υπερκείμενο των «παραγωγών» στελεχών. Έπειτα, τα τρυβλία επωάστηκαν για 24 h

Η όποια αναστολή των «ευαίσθητων» μικροοργανισμών από το υπερκείμενο των «στόχων» ήταν εμφανής με τη μορφή μιας καθαρής ζώνης διάχυσης γύρω από την περιοχή που είχε τοποθετηθεί το υπερκείμενο. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα MRS και εργαστηριακό γάλα (10% w/v), εμπλουτισμένο με εκχύλισμα ζύμης(0.3% w/v).

Πίνακας 3.6 : Ευαίσθητα στελέχη

	Στέλεχος	Θρεπτικό Μέσο	Θερμοκρασία	Επίπεδο κινδύνου
Παθογόνα στελέχη σχετικά με τα τρόφιμα				
1	<i>Escherichia coli</i> CFA-I	BHI	37°C	2
2	<i>Escherichia coli</i> C1845	BHI	37°C	2
3	<i>Salmonella typhimurium</i> SL1344	BHI	37°C	2
4	<i>Klebsiella oxytoca</i> FMCC B-197	BHI	37°C	2
5	<i>Yersinia enterocolitica</i> FMCC B-89	BHI	37°C	2
6	<i>Yersinia enterocolitica</i> FMCC B-90	BHI	37°C	2
7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> FMCC B-26	BHI/TSB	30°C	2
8	<i>Bacillus cereus</i> LMG 6923 ^T	BHI/TSB	30°C	2
9	<i>Bacillus subtilis</i> FMCC B-109	BHI/TSB	30°C	1
10	<i>Listeria innocua</i> LMG 11387 ^T	BHI	30°C	1
11	<i>Listeria innocua</i> LMG 13568	BHI	30°C	1
12	<i>Listeria welshimeri</i> 15008	BHI	30°C	1
Παθογόνα στελέχη - ανθρώπινο γαστρεντερικό και / ή αναπνευστικό σύστημα				
13	<i>Streptococcus agalactiae</i> LMG 14694 ^T	BHI	37°C	2
14	<i>Streptococcus anginosus</i> LMG 14502 ^T	BHI	37°C	2
15	<i>Streptococcus pneumoniae</i> LMG 14545 ^T	BHI	37°C	2
16	<i>Streptococcus pyogenes</i> LMG 21599 ^T	BHI	37°C	2
Παθογόνα και ευκαιριακά παθογόνα - στοματική κοιλότητα				
17	<i>Streptococcus gordonii</i> LMG 14518 ^T	BHI	37°C	1
18	<i>Streptococcus mutans</i> LMG 14558 ^T	BHI	37°C	1
19	<i>Streptococcus oralis</i> LMG 14532 ^T	BHI	37°C	2
20	<i>Streptococcus salivarius</i> LMG 11489 ^T	BHI	37°C	1
21	<i>Streptococcus sanguinis</i> DSM 20068	BHI	37°C	1
22	<i>Streptococcus sobrinus</i> LMG 14641 ^T	BHI	37°C	1
23	<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 21705	BHI	37°C	2
Παθογόνα στελέχη απομονωμένα από τραύματα				
24	<i>Enterococcus faecalis</i> LMG 11396	BHI	37°C	2
25	<i>Staphylococcus aureus</i> LMG 8064	BHI	37°C	2
Στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων				
26	<i>Lactobacillus sakei</i> ACA-DC 2313	MRS	30°C	1
27	<i>Lactococcus lactis</i> LMG 6890 ^T	M17	30°C	1
28	<i>Streptococcus thermophilus</i> ACA-DC 4	M17	37°C	1
Ζύμες				
29	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (WT)	YES	30°C	1

4 Αποτελέσματα – Συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια διερεύνησης και αποτύπωσης της μικροχλωρίδας Ελληνικών ποικιλιών επιτραπέζιων ελιών αυθόρμητης ζύμωσης. Οι ποικιλίες που μελετήθηκαν ήταν η Καλαμών, η Κονσερβολιά και η Άμφισσα. Η μελέτη τους στηρίχθηκε τόσο στις κλασσικές μικροβιολογικές μεθόδους όσο και στη χρήση μοριακών τεχνικών καθώς και μεταγονιδιωματικής ανάλυσης. Παρότι υπάρχει πληθώρα μελετών για τη διερεύνηση του οικοσυστήματος των επιτραπέζιων ελιών είναι η πρώτη μελέτη με τη χρήση της μεταγονιδιωματικής ανάλυσης.

Στις ελιές αυθόρμητης ζύμωσης η ζύμωση επηρεάζεται έντονα από την ποικιλία της ελιάς αλλά και τις πρακτικές που εφαρμόζονται. Το οικοσύστημα της ζύμωσης των ελιών αποτελείται από ένα πολύπλοκο μίγμα Gram-αρνητικών βακτηρίων, οξυγαλακτικών και ζυμομυκήτων (Μπαλατσούρας, 1995; Garrido-Fernández et al., 1997). Τα Gram-αρνητικά βακτήρια είναι πολύ σημαντικά κατά τη διάρκεια των πρώτων ημερών της ζύμωσης και φτάνουν στο μέγιστο τη δεύτερη ημέρα της ζύμωσης (Hurtado et al., 2012). Εν τω μεταξύ, τα οξυγαλακτικά ή η ζύμες, ή και τα δύο, ανάλογα με το ποια είναι υπεύθυνα για τη ζύμωση, αρχίζουν να εμφανίζονται μετά από 18-24 ημέρες παραμονής στην άλμη. Τα Gram-αρνητικά βακτήρια εξαφανίζονται μέσα σε λίγες εβδομάδες (1-4), τερματίζοντας έτσι τη δεύτερη φάση της διαδικασίας. Σε ιδανικές συνθήκες, το pH φτάνει το 4 και η τρίτη φάση θα ξεκινήσει (Garrido-Fernández et al., 1997; Sánchez-Gómez et al., 2006; Hurtado et al., 2008).

4.1 Μικροβιολογική ανάλυση

Οι παρτίδες των ποικιλιών που μελετήθηκαν αφορούσαν ελιές στις οποίες είχε ολοκληρωθεί η ζύμωση (σοδειά 2012-2013, 15 μήνες παραμονή στην άλμη) αλλά και ελιές που βρίσκονταν σε φάση ζύμωσης (σοδειά 2014-2015, 6 μήνες παραμονή στην άλμη). Βάση της παρασκευής επιτραπέζιων ελιών Ελληνικού τύπου όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 1.5.3 οι ελιές τοποθετούνται κατευθείαν στην άλμη και αφήνονται να ζυμωθούν για 8-12 μήνες ώσπου να μειωθεί εντελώς η πικράδα τους. Γενικά η περίοδος της ζύμωσης εξαρτάται από την ποικιλία της ελιάς, την περιεκτικότητά της σε NaCl και τη θερμοκρασία (Tassou et al., 2002; Arroyo-Lopez et al., 2008; Panagou et al., 2008).

Οι πληθυσμοί των μικροβιακών ομάδων που προσδιορίστηκαν στα δείγματα των ελιών αυθόρμητης ζύμωσης παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.1 και 4.2 για την παρτίδα σοδειάς 2012-2013 και σοδειάς 2014-2015 αντίστοιχα.

Πίνακας 4.1: Μικροβιακοί πληθυσμοί (log cfu/g) δείγματος καρπού και άλμης (25g) των ποικιλιών επιτραπέζιων ελιών σοδειάς 2012-2013

Ομάδα Μικροοργανισμών	Θρεπτικό μέσο	Καλαμών (log cfu/g)	Άμφισσα (log cfu/g)	Κονσερβολιά (log cfu/g)
LAB	MRS	5.11	5.08	4.32
Total mesophilic count	PCA	5.30	4.98	4.51
Yeasts	YGC	4.92	5.18	4.72
Propionic acid bacteria	Pal Propiobac	-	-	-
Pseudomonas	Pseudomonas Agar Base	-	-	-
Coliforms	VRBA	-	-	-

* - :δεν ανιχνεύθηκε

Η μικροβιολογική ανάλυση (Πίνακας 4.1) δείγματος καρπού και άλμης των ποικιλιών σοδειάς 2012-2013 είχε ως αποτέλεσμα οι πληθυσμοί των οξυγαλακτικών βακτηρίων να κυμανθούν από 5.11, 5.08 και 4.32 log cfu/g για τις ποικιλίες Καλαμών, Άμφισσας και Κονσερβολιάς αντίστοιχα. Οι πληθυσμοί των ζυμών κυμάνθηκαν από 4.92, 5.18 και 4.72 log cfu/g για τις ποικιλίες Καλαμών, Άμφισσας και Κονσερβολιάς αντίστοιχα. Η ολική χλωρίδα κυμάνθηκε από 5.30, 4.98 και 4.51 log cfu/g για τις ποικιλίες Καλαμών, Άμφισσας και Κονσερβολιάς αντίστοιχα, ενώ δεν ανιχνεύτηκαν καθόλου πληθυσμοί προπιονικών βακτηρίων, ψευδομονάδων και κολοβακτηριδίων σε καμία από τις τρεις ποικιλίες.

Πίνακας 4.2: Μικροβιακοί πληθυσμοί (logcfu/ml) δείγματος άλμης των επιτραπέζιων ελιών σοδειάς 2014-2015.

Ομάδα Μικροοργανισμών	Θρεπτικό μέσο	Καλαμών (log cfu/ml)	Άμφισσα (log cfu/gml)	Κονσερβολιά (log cfu/ml)
LAB	MRS (0.05 % cyclohemide)	6.76	5.09	4.78
Total mesophilic count	PCA	6.61	5.54	4.78
Yeasts	YGC	4.72	5.37	4.81
Propionic acid bacteria	Pal Propiobac	-	-	-
Pseudomonas	Pseudomonas Agar Base	-	-	-
Coliforms	VRBA	-	-	-

* - :δεν ανιχνεύθηκε

Η μικροβιολογική ανάλυση (Πίνακας 4.2) δείγματος άλμης των ποικιλιών σοδειάς 2014-2015 είχε ως αποτέλεσμα οι πληθυσμοί των οξυγαλακτικών βακτηρίων να κυμανθούν από 6.76, 5.09 και 4.78 log cfu/ml για τις ποικιλίες Καλαμών, Άμφισσας και Κονσερβολιάς αντίστοιχα. Οι πληθυσμοί των ζυμών κυμάνθηκαν από 4.72, 5.37 και 4.81 log cfu/ml¹ για τις ποικιλίες Καλαμών, Άμφισσας και Κονσερβολιάς αντίστοιχα. Η ολική χλωρίδα κυμάνθηκε από 6.61, 5.54 και 4.78 log cfu/ml για τις ποικιλίες Καλαμών, Άμφισσας και Κονσερβολιάς αντίστοιχα, ενώ δεν ανιχνεύτηκαν καθόλου και εδώ πληθυσμοί προπιονικών βακτηρίων, ψευδομονάδων και κολοβακτηριδίων σε καμία από τις τρεις ποικιλίες.

Τα αποτελέσματα της μικροβιολογικής ανάλυσης παρουσίασαν ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Οι πληθυσμοί των ζυμών και των οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι μεγαλύτεροι στη σοδειά 2014-2015 και ειδικά στις ποικιλίες Άμφισσα και Καλαμών όπου διαφέρουν και έναν ολόκληρο λογαριθμικό κύκλο. Παρόμοιοι πληθυσμοί με αυτούς της σοδειάς 2014-2015 έχουν παρατηρηθεί και σε διάφορες άλλες μελέτες πράσινων και μαύρων ελιών (Nychas et al., 2002, Panagou et al., 2008, Doulgeraki et al., 2013). Οι πληθυσμοί της σοδειάς 2014-2015 είναι πιο χαμηλοί από αυτούς που αναφέρονται στη βιβλιογραφία. Το αποτέλεσμα αυτό ίσως να οφείλεται στο πέρας της ζύμωσης και την έλλειψη θρεπτικών συστατικών.

Όπως ήταν αναμενόμενο δεν ανιχνεύτηκαν πληθυσμοί της οικογένειας των *Enterobacteriaceae* (*Coliforms*) και των *Pseudomonas*. Η ανάπτυξη τους έχει παρατηρηθεί μόνο στην αρχή της ζύμωσης (Tassou et al., 2010; Alves et al., 2012; Randazzo et al., 2012). Οι ομάδες αυτές δεν ανιχνεύονται στο τέλος της διαδικασίας λόγω της οξίνισης του περιβάλλοντος των ελιών από τα οξυγαλακτικά βακτήρια (Panagou et al., 2003; Abriquel et al., 2011).

Τέλος η μη ανίχνευση προπιονικών βακτηρίων είναι θετικό αποτέλεσμα διότι θεωρούνται δείκτης του τέλους του χρόνου ζωής επιτραπέζιων ελιών, επειδή η ανάπτυξη αυτών των βακτηρίων μπορεί να προκαλέσει μια αύξηση στις τιμές του pH και τη δημιουργία συνθηκών για την ανάπτυξη παθογόνων βακτηρίων από τις προκύπτουσες οσμές (Plastourgos et al., 1957).

Συνολικά απομονώθηκαν από τη σοδειά 2012-2013 45 αποικίες οξυγαλακτικών βακτηρίων και 25 αποικίες ζυμών και από τις τρεις ποικιλίες ενώ από τη σοδειά 2014-2015 40 αποικίες οξυγαλακτικών βακτηρίων και 15 αποικίες ζυμών από τις τρεις ποικιλίες.

Η επιλογή των αποικιών έγινε μετά από προσεκτική παρατήρηση στο στερεοσκόπιο και ανάλογα με τα χαρακτηριστικά της μορφολογίας κάθε αποικίας (σχήμα, χρώμα, υφή). με στόχο την απομόνωση όσο το δυνατόν περισσότερων διαφορετικών μικροοργανισμών, για περαιτέρω μελέτη των ιδιοτήτων τους.

Από τις αποικίες που απομονώθηκαν κάποιες δεν αναπτύχθηκαν κατά τη διάρκεια της ανανέωσης και για το λόγο δεν προχωρήσαμε σε περαιτέρω μελέτη αυτών. Εκτός από την παρατήρηση της μορφολογίας της αποικίας στο στερεοσκόπιο πραγματοποιήθηκε χρώση Gram σε όλα τα οξυγαλακτικά βακτήρια και δοκιμή της καταλάσης για τα βακτήρια και τις ζύμες όπως περιγράφηκε προηγουμένως (παράγραφος 3.2 και 3.3). Τα βακτήρια ήταν θετικά κατά Gram και αρνητικά στη δοκιμή της καταλάσης ενώ στην περίπτωση των ζυμών η δοκιμή στην καταλάση ήταν θετική.

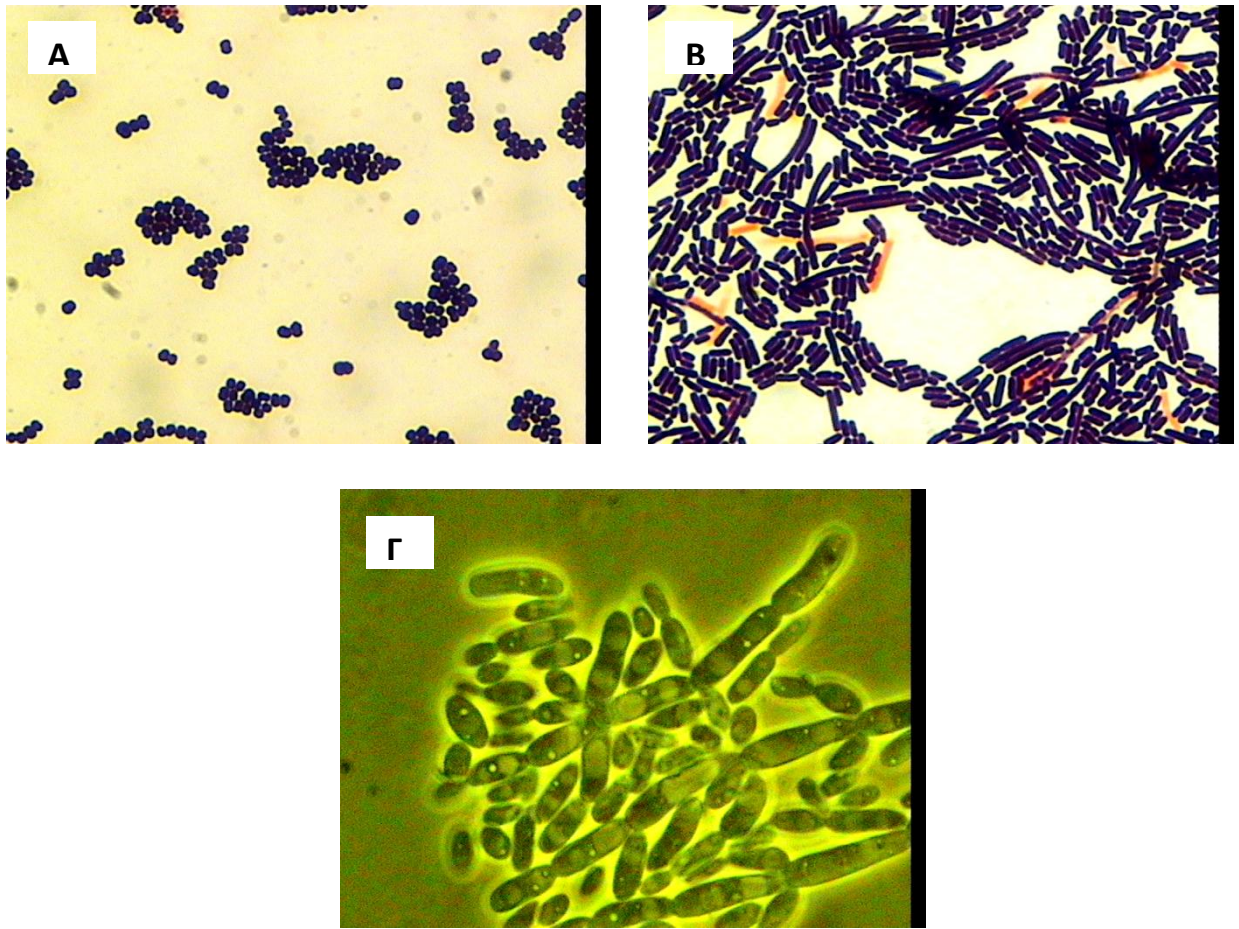
Για τη σοδειά 2012-2013 από τις 45 αποικίες από το υλικό MRS καταλήξαμε σε 5 βακτήρια και 22 ζύμες ενώ από τις 25 αποικίες από το YGC καταλήξαμε σε 23 ζύμες. Για τη σοδειά 2014-2015 από τις 40 αποικίες από το MRS καταλήξαμε σε 37 βακτήρια και 16 ζύμες ενώ από τις 15 αποικίες από το YGC καταλήξαμε σε 16 ζύμες. Οι αποικίες παρουσιάζονται πιο αναλυτικά στον **Πίνακα 4.3**

Πίνακας 4.3: Οι αποικίες που απομονώθηκαν από τις σοδειές 2012-2013 και 2014-2015 επιτραπέζιων ελιών αυθόρμητης ζύμωσης ποικιλιών Καλαμών, Κονσερβολιάς και Αμφισσας

Σοδειά 2012-2013					
Θρεπτικό απομόνωσης	Μικροοργανισμός	Ποικιλία			Σύνολο
		Καλαμών	Αμφισσα	Κονσερβολιά	
MRS	Οξυγαλακτικά βακτήρια	0	5	0	5
	Ζύμες	10	6	6	22
YGC	Ζύμες	13	5	5	23
Σοδειά 2014-2015					
MRS	Οξυγαλακτικά βακτήρια	0	22	15	37
(0.05% cycloheximide)	Ζύμες	10	0	0	10
YGC	Ζύμες	5	6	5	16
Σύνολο		38	44	31	113

Θα πρέπει εδώ να αναφερθεί ότι τα θρεπτικά υλικά για την ανίχνευση των μικροοργανισμών θεωρούνται επιλεκτικά, αλλά δεν αποκλείεται όμως η ανάπτυξη και άλλων μικροβιακών ομάδων ακόμα και με την προσθήκη αντιβιοτικών (MRS-cycloheximide; YGC-chloramphenicol). Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 4.3 στη σοδειά 2012-2013, 22 αποικίες που απομονώθηκαν από το MRS ήταν τελικά αποικίες ζυμών. Η ίδια εικόνα κυριαρχεί και στην ποικιλία Καλαμών σοδειάς 2014-2015 (10 αποικίες ζυμών). Έτσι συμπεραίνουμε ότι οι πληθυσμοί που είχαν καταμετρηθεί ως οξυγαλακτικά βακτήρια στις παραπάνω ποικιλίες δεν ήταν ακριβείς

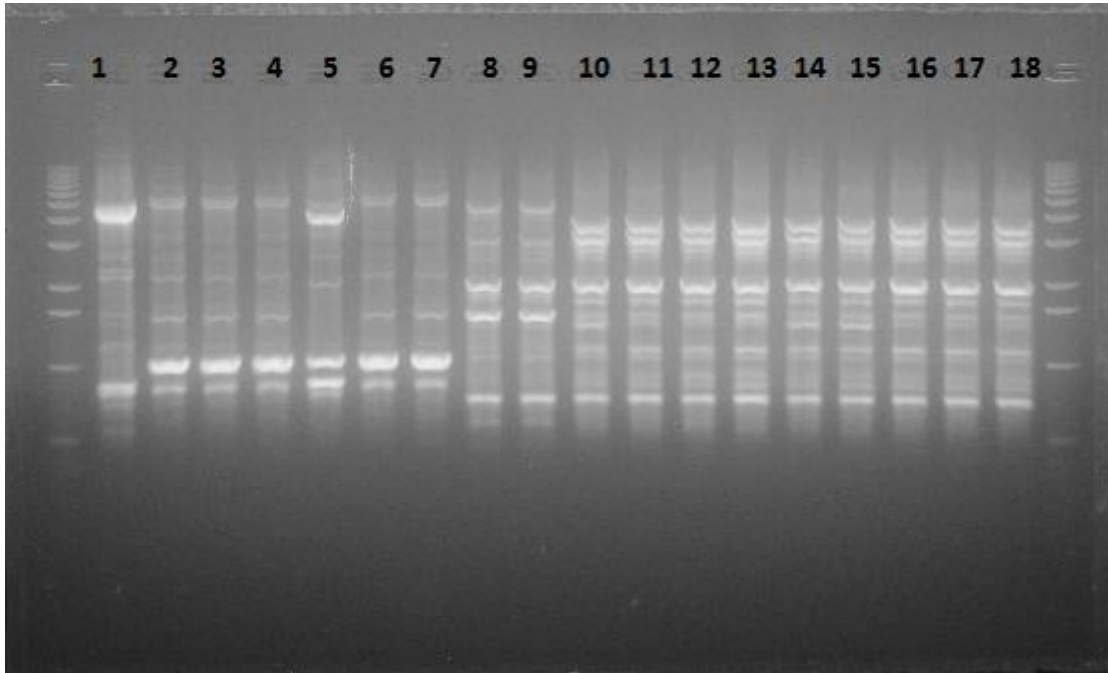
Στο σημείο αυτό παρατίθενται χαρακτηριστικές εικόνες (Εικόνα 4.1) κόκκων, βακίλων και ζυμών που απομονώθηκαν από τις ποικιλίες Αμφισσα, Καλαμών και Κονσερβολιά.



Εικόνα 4.1: Χαρακτηριστική εικόνα κόκκων (Α), βακίλων (Β) και ζυμών (Γ) από τις αποικίες που απομονώθηκαν

4.2 Ομαδοποίηση των στελεχών με την μέθοδο rep-PCR

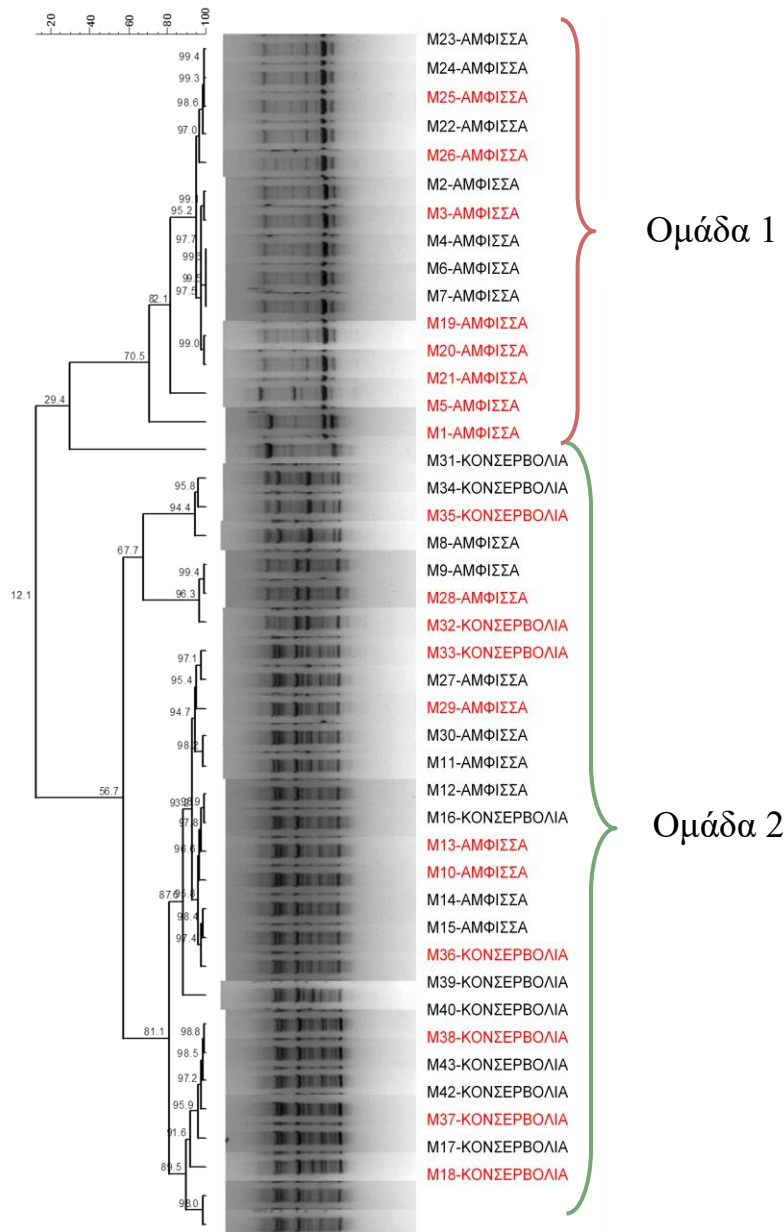
Το επόμενο βήμα της μελέτης ήταν η απομόνωση βακτηριακού DNA σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Pitcher et al. (1987). Με την τεχνική της rep-PCR ενισχύθηκαν συγκεκριμένα τμήματα του DNA και όπως φαίνεται και στην ηλεκτροφόρηση (Εικόνα 4.2) πήραμε συγκεκριμένα προφίλ για κάθε στέλεχος.



Εικόνα 4.2: Προϊόντα ηλεκτροφόρησης της ger-PCR για τα βακτήρια που απομονώθηκαν από τις ποικιλίες Άμφισσας (1-15) και Κονσερβολιάς (16-18) για τη σοδειά 2014-2015. Τα στελέχη είναι AM-L2 (1), AM-L6(2), AM-L17(3), AM-L19(4), AM-L20(5), AM-L21(6), AM-L22(7), AM-L24(8), AM-L27(9), AM-L29(10), AM-L30Α(11), AM-L35(12), KO-L16(13), KO-L18Α(14), KO-L19(15), KO-L21Α(16), KO-L22(17), KO-L24(18).

- *AM=Άμφισσα
- *KO=Κονσερβολιά
- *L=οξυγαλακτικά βακτήρια
- *Α=λεία
- *A=λευκή

Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι λόγω του πλούσιου φαινότυπου των ζωνών πραγματοποιήθηκε επιτυχής διαχωρισμός μεταξύ των διαφορετικών στελεχών. Η εικόνα της ηλεκτροφόρησης αναλύθηκε με το πρόγραμμα Bionumerics, το οποίο ομαδοποίησε τα στελέχη με το ίδιο προφίλ. Τα 42 προφίλ των στελεχών χωρίστηκαν σε 2 ομάδες (Εικόνα 4.5).

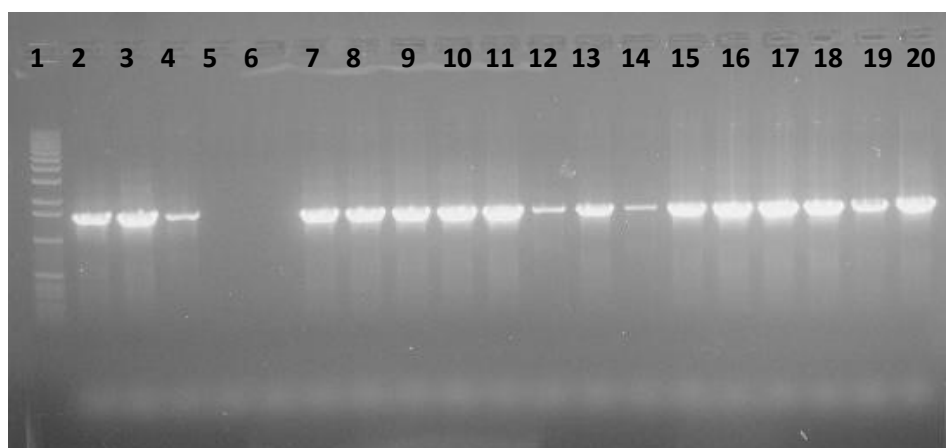


Εικόνα 4.5: Ομαδοποίηση των 42 βακτηρίων που απομονώθηκαν από διαφορετικές ποικιλίες επιτραπέζιων ελιών αυθόρμητης ζύμωσης κατά συστάδες, ανάλογα με το προφίλ που προέκυψε από τη *ger*-PCR. Με κόκκινο επισημαίνονται τα στελέχη που στάλθηκαν για αλληλούχηση του 16S rDNA γονιδίου.

Όλες οι απομονώσεις που ανήκαν σε μια συστάδα (cluster) θα μπορούσε να θεωρηθούν σαν αντίγραφα (κλώνοι) ενός και μόνο είδους, το οποίο έχει απομονωθεί αρκετές φορές λόγω του ότι τα προφίλ των επιμέρους στελεχών ήταν όμοια (Doulgeraki et al., 2013).

4.3 Ταυτοποίηση στελεχών με την αλληλούχηση του γονιδίου 16S rDNA

Αφού έγινε η ομαδοποίηση θα έπρεπε από κάθε ομάδα να επιλεγεί ένα στέλεχος για αλληλούχηση. Παρ' όλα αυτά επιλέχθηκαν παραπάνω του ενός στελέχη ώστε να είμαστε σίγουροι για το αποτέλεσμα. Στην Εικόνα 4.6 παρουσιάζονται τα προϊόντα της PCR των επιλεγμένων βακτηρίων στα οποία έχει ενισχυθεί το 16S rDNA γονίδιο.



Εικόνα 4.6: Προϊόντα PCR από την ομάδα 1 (2-9) και την ομάδα 2 (10-20) της rep-PCR. Το γονίδιο 16S που ενισχύθηκε με την PCR είναι γύρω στις 1600bp όπως φαίνεται και από τον δείκτη μεγέθους μοριακού βάρους (1). AM-L2 (2), AM-L5(3), AM-L6(4), AM-L10(5), AM-L17(6), AM-L22(7), AM-L24(8), AM-L24(9), AM-L29(10), AM-L30(11), AM-L30A(12), AM-L33(13), KO-L18A(14), KO-L19(15), KO-L20(16), KO-L22(17), KO-L23(18), KO-L24(19), KO-L24A(20).

Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης του γονιδίου 16S rDNA των επιλεγμένων βακτηρίων στοιχήθηκαν με το πρόγραμμα BLAST (Basic Local Alignment Tool) του NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST/>) τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.4 και αναλυτικά στον Πίνακα 4.5.

Πίνακας 4.4: Κατανομή ειδών που απομονώθηκαν στα τρία δείγματα ελιών

Είδος	Σοδειά 2012-2013		Σοδειά 2014-2015		Σύνολο
	Αμφισσα	Κονσερβολιά	Αμφισσα	Κονσερβολιά	
<i>P. ethanolidurans</i>	5	0	10	0	15
<i>L. plantarum</i>	0	0	12	15	27
Σύνολο	5	0	22	15	42

Πίνακας 4.5: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα αλληλούχησης 16S και ομαδοποίησης με το rep-PCR. Στον πίνακα φαίνεται η κωδικοποίηση του στελέχους, η ομάδα που ανήκει σύμφωνα με το rep-PCR αλλά και το είδος του μικροοργανισμού. Επίσης με κόκκινο επισημαίνονται τα στελέχη που στάλθηκαν για αλληλούχηση αλλά και η ποικιλία της ελιάς που προέρχεται κάθε στέλεχος.

Κωδικός στελέχους	Ομάδα (rep-PCR)	Είδος (γονίδιο 16S rDNA)	Ποικιλία (Σοδειά)
AM-L20	1	<i>Pediococcus ethanolidurans</i>	Άμφισσα (2012-2013)
AM-L21	1	<i>Pediococcus ethanolidurans</i>	Άμφισσα (2012-2013)
AM-L22	1	<i>Pediococcus ethanolidurans</i>	Άμφισσα (2012-2013)
AM-L19	1	<i>Pediococcus ethanolidurans</i>	Άμφισσα (2012-2013)
AM-L24	1	<i>Pediococcus ethanolidurans</i>	Άμφισσα (2012-2013)
AM-L7	1	<i>Pediococcus ethanolidurans</i>	Άμφισσα (2012-2013)
AM-L10	1	<i>Pediococcus ethanolidurans</i>	Άμφισσα (2012-2013)
AM-L16	1	<i>Pediococcus ethanolidurans</i>	Άμφισσα (2012-2013)
AM-L23	1	<i>Pediococcus ethanolidurans</i>	Άμφισσα (2012-2013)
AM-L25	1	<i>Pediococcus ethanolidurans</i>	Άμφισσα (2012-2013)
AM-L2	1	<i>Pediococcus ethanolidurans</i>	Άμφισσα (2012-2013)
AM-L6	1	<i>Pediococcus ethanolidurans</i>	Άμφισσα (2012-2013)
AM-L17	1	<i>Pediococcus ethanolidurans</i>	Άμφισσα (2012-2013)
AM-L18	1	<i>Pediococcus ethanolidurans</i>	Άμφισσα (2012-2013)
AM-L5	1	<i>Pediococcus ethanolidurans</i>	Άμφισσα (2012-2013)
KO-L16	2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Κονσερβολιά (2014-2015)
KO-L21A	2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Κονσερβολιά (2014-2015)
KO-L22	2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Κονσερβολιά (2014-2015)
AM-L26	2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Άμφισσα (2014-2015)
AM-L28	2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Άμφισσα (2014-2015)
AM-L29	2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Άμφισσα (2014-2015)
KO-L18A	2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Άμφισσα (2014-2015)
KO-L19	2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Κονσερβολιά (2014-2015)
AM-L27	2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Άμφισσα (2014-2015)
AM-L30A	2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Άμφισσα (2014-2015)
AM-L35	2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Άμφισσα (2014-2015)
AM-L31	2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Άμφισσα (2014-2015)
AM-L32	2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Άμφισσα (2014-2015)
KO-L20A	2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Κονσερβολιά (2014-2015)
AM-L33	2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Άμφισσα (2014-2015)
AM-L30	2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Άμφισσα (2014-2015)
AM-L34	2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Άμφισσα (2014-2015)
AM-L35A	2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Άμφισσα (2014-2015)

KO-L24	2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Κονσερβολιά (2014-2015)
KO-L18	2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Κονσερβολιά (2014-2015)
KO-L17	2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Κονσερβολιά (2014-2015)
KO-L23	2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Κονσερβολιά (2014-2015)
KO-L18μ	2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Κονσερβολιά (2014-2015)
KO-L21	2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Κονσερβολιά (2014-2015)
KO-L24A	2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Κονσερβολιά (2014-2015)
KO-L18A	2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Κονσερβολιά (2014-2015)
KO-L20	2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Κονσερβολιά (2014-2015)

*AM=Άμφισσα

*KO=Κονσερβολιά

*L=οξυγαλακτικά βακτήρια

*Λ=λεία

*A=λευκή

*μ=μικρή

Η Ομάδα 1 περιλαμβάνει 15 απομονώσεις προερχόμενες μόνο από την ποικιλία της Άμφισσας με επίπεδο ομοιότητας 82.1% σύμφωνα με τον δενδρογραμμα της rep-PCR, τα οποία ανήκουν στο είδος *Pediococcus ethanolidurans* σύμφωνα με την αλληλούχηση του 16S γονιδίου. Η Ομάδα 2 περιλαμβάνει 27 στελέχη που απομονώθηκαν τόσο από την ποικιλία της Άμφισσας όσο και από την ποικιλία της Κονσερβολιάς με επίπεδο ομοιότητας 81.1% και ανήκουν στο είδος *Lactobacillus plantarum*, σύμφωνα με την αλληλούχηση του γονιδίου 16S.

Στην παρούσα μελέτη ανιχνεύσαμε μόνο στελέχη του *L. plantarum* στη σοδειά 2014-2015. Ο *L. plantarum* μαζί με τον *Lactobacillus pentosus* είναι τα κυρίαρχα είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων στην αυθόρμητη ζύμωση των επιτραπέζιων ελιών (Hurtado et. al. 2008, Randazzo et al., 2004, Gabriel et al, 2011, Doulgeraki et al., 2012).

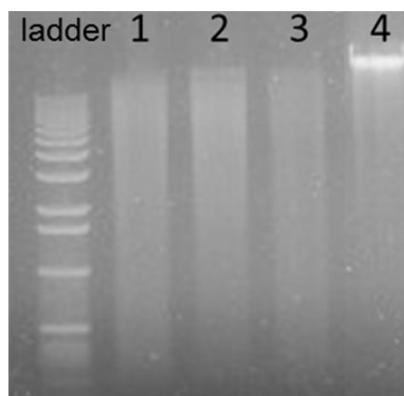
Ενδιαφέρον προκαλεί η παρουσία του *Pediococcus ethanolidurans* ο οποίος έχει περιγραφεί προσφάτως στην βιβλιογραφία (Liu, Zhang, Tong, & Dong, 2006) ως μικροοργανισμός που απομονώθηκε από κελάρι που πραγματοποιούνταν ζύμωση αποσταγμένου αλκοολούχου ποτού. Η παρουσία του αναφέρθηκε πρώτη φορά από την Doulgeraki et al. (2012) και συγκεκριμένα σε μαύρες ελιές ποικιλίας Κονσερβολιά συσκευασμένες σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα κατά την αποθήκευση.

4.4 Μεταγονιδιωματική ανάλυση

Η κλασική μικροβιολογία μας δίνει τη δυνατότητα μελέτης και απομόνωσης συγκεκριμένων μικροοργανισμών. Η μεταγονιδιωματική ανάλυση από την άλλη και γενικά οι μέθοδοι που δεν βασίζονται στην καλλιέργεια των μικροοργανισμών έχουν το πλεονέκτημα της μελέτης των μικροοργανισμών απευθείας από το οικοσύστημα, απομονώνοντας το ολικό DNA αυτών.

Τα δείγματα των επιτραπέζιων ελιών ποικιλιών Άμφισσας, Κονσερβολιάς και Καλαμών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν της σοδειάς 2014-2015. Η σοδειά αυτή επιλέχθηκε διότι η μικροβιολογική ανάλυση έδειξε αυξημένους πληθυσμούς οξυγαλακτικών βακτηρίων και ζυμών. Η σοδειά 2012-2013 είχε μικρότερους πληθυσμούς καθώς και απουσία βακτηρίων στις ποικιλίες Καλαμών και Κονσερβολία.

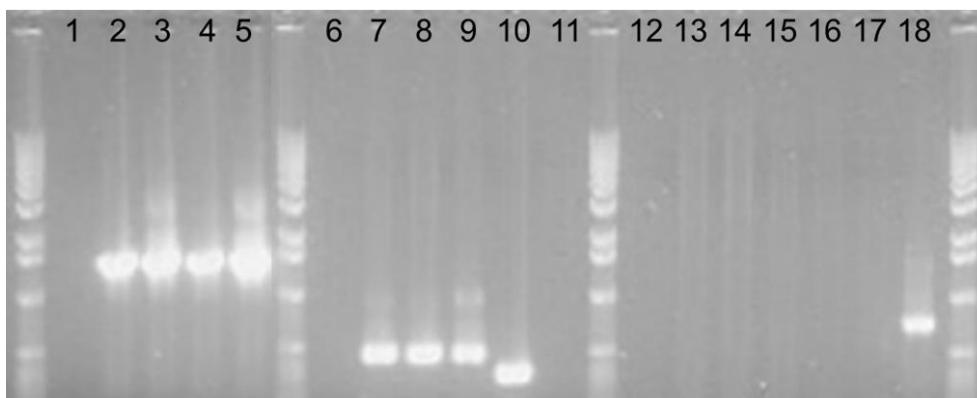
Η μικροβιολογική ανάλυση επιβεβαίωσε την παρουσία των βακτηρίων και των ζυμών και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε απομόνωση ολικού μικροβιακού DNA. Το DNA που απομονώθηκε από τα 3 δείγματα (Εικόνα 4.8) συγκρίθηκε με καθαρή καλλιέργεια βακτηρίου και όπως φαίνεται από την ηλεκτροφόρηση ήταν καλής ποιότητας και μεγάλου μοριακού βάρους.



Εικόνα 4.7. : Το ολικό DNA που απομονώθηκε από τα 3 δείγματα άλμης (Σοδειά 2014-2015): δείκτης μεγέθους μοριακού βάρους (ladder), ποικιλία Καλαμών (1), Κονσερβολιά (2) και Άμφισσα (3). Θετικός μάρτυρας ο *Streptococcus macedonicus* (4).

Η επιβεβαίωση της παρουσίας βακτηρίων και των ζυμών πραγματοποιήθηκε με την PCR με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών που ενισχύουν περιοχές του βακτηριακού DNA (16S rDNA γονίδιο) και του DNA των ζυμών. (περιοχή ITS DNA). Η ύπαρξη του φυτικού DNA θα δημιουργούσε προβλήματα στην ανάλυση

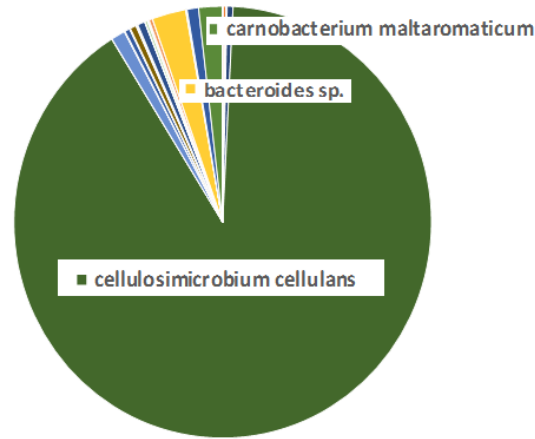
λόγω του μεγάλου μεγέθους του και γι αυτό το λόγο με την PCR επιβεβαιώθηκε η απουσία του σε σχέση με έναν θετικό και αρνητικό μάρτυρα (Εικόνα 4.9).



Εικόνα 4.8. Προϊόντα της PCR για την επιβεβαίωση παρουσίας DNA βακτηρίων, ζυμών αλλά και την απουσία φυτικού DNA (Σοδειά 2014-2015). Επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη βακτηριακού DNA 1-5, τυφλό (1), Καλαμών (2), Κονσερβολιά (3), Άμφισσα (4), θετικός μάρτυρας *S. macedonicus* (5), DNA ζυμών 6-11, τυφλό (6), Καλαμών (7), Κονσερβολιά (8), Άμφισσα(9), θετικός μάρτυρας *Saccharomyces pombe* (10), αρνητικός μάρτυρας *S. macedonicus* (11). Επιβεβαιώθηκε η απουσία φυτικού DNA 12-18, τυφλό (12), Καλαμών (13), Κονσερβολιά (14), Άμφισσα (15), αρνητικοί μάρτυρες *S. pombe* (16), *S. macedonicus* (17) θετικός μάρτυρας φυτικό DNA (18).

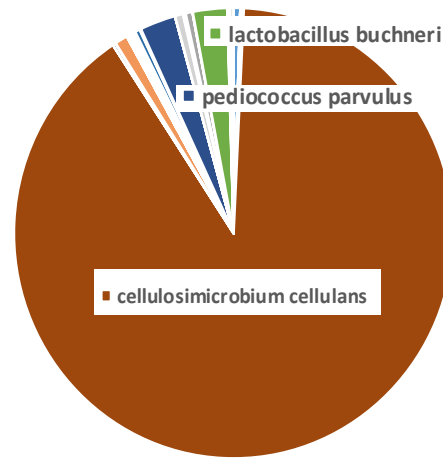
Το DNA που απομονώθηκε στάλθηκε για αλληλούχηση και συγκεκριμένα για την ταυτοποίηση των βακτηρίων και των ζυμών. Οι αλληλουχίες που προέκυψαν αναλύθηκαν με το πρόγραμμα MG-RAST. Η ανάλυση αποκάλυψε πληθώρα βακτηρίων και ζυμών στο οικοσύστημα της άλμης και για τα 3 δείγματα επιτραπέζιων ελιών σοδειάς 2014-2015. Στα Σχήματα 5 και 6 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης για την ταυτοποίηση των βακτηρίων και ζυμών

Καλαμών



Σχήμα 4.3. Κυκλική απεικόνιση με τα είδη των βακτηρίων που ταυτοποιήθηκαν με τη μεταγονιδιωματική ανάλυση και τη μέθοδο αλληλούχησης του γονιδίου 16S rDNA στις ελιές Καλαμών (Σοδειά 2014-2015)

Κονσερβολιά



- | | | | | | |
|---|--|---|---------------------------------------|------------------------------------|--|
| ■ <i>streptococcus thermophilus</i> | ■ <i>enterococcus faecium</i> | ■ <i>roseomonas mucosa</i> | ■ <i>lactobacillus coryniformis</i> | ■ <i>lactobacillus plantarum</i> | ■ <i>pseudomonas sp.</i> |
| ■ <i>microbacterium oxydans</i> | ■ <i>cellulosimicrobium cellulans</i> | ■ <i>streptococcus macedonicus</i> | ■ <i>staphylococcus aureus</i> | ■ <i>pseudomonas fragi</i> | ■ <i>pseudomonas putida</i> |
| ■ <i>marinobacterium sp.</i> | ■ <i>lactococcus lactis</i> | ■ <i>sediminibacterium sp.</i> | ■ <i>serratia quinivorans</i> | ■ <i>marinomonas sp.</i> | ■ <i>lactobacillus hokkaidonensis</i> |
| ■ <i>lactobacillus brevis</i> | ■ <i>micrococcus luteus</i> | ■ <i>suttonella spp.</i> | ■ <i>actinomyces spp.</i> | ■ <i>chromohalobacter spp.</i> | ■ <i>lactobacillus kefir</i> |
| ■ <i>kocuria salsicia</i> | ■ <i>alkalibacterium olivapovliticus</i> | ■ <i>sediminibacterium salmoneum</i> | ■ <i>chromohalobacter canadensis</i> | ■ <i>acholeplasma pleciae</i> | ■ <i>lactobacillus parabuchneri</i> |
| ■ <i>lactobacillus zeae</i> | ■ <i>providencia sp.</i> | ■ <i>maritimibacter alkaliphilus</i> | ■ <i>leuconostoc mesenteroides</i> | ■ <i>janthinobacterium lividum</i> | ■ <i>zunongwangia sp.</i> |
| ■ <i>marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> | ■ <i>pseudomonas fluorescens</i> | ■ <i>lactococcus spp.</i> | ■ <i>lactobacillus malefermentans</i> | ■ <i>delftia spp.</i> | ■ <i>lactobacillus parafarraginis</i> |
| ■ <i>lactobacillus delbrueckii</i> | ■ <i>pediococcus ethanolidurans</i> | ■ <i>bifidobacterium psychraerophilum</i> | ■ <i>arcobacter spp.</i> | ■ <i>pediococcus parvulus</i> | ■ <i>enhydrobacter aerosaccus</i> |
| ■ <i>marinobacter spp.</i> | ■ <i>streptococcus parauberis</i> | ■ <i>lactobacillus rapi</i> | ■ <i>salinicola halomonas salaria</i> | ■ <i>enterobacter sp.</i> | ■ <i>lactobacillus paracasei</i> |
| ■ <i>pseudomonas synxantha</i> | ■ <i>rothia sp.</i> | ■ <i>bacteroides sp.</i> | ■ <i>comamonas spp.</i> | ■ <i>shewanella baltica</i> | ■ <i>lactobacillus buchneri</i> |
| ■ <i>halanaerobium salsuginis</i> | ■ <i>lactobacillus namurensis</i> | ■ <i>martellella mediterranea</i> | ■ <i>stenotrophomonas rhizophila</i> | ■ <i>lactobacillus sp.</i> | ■ <i>carnobacterium maltaromaticum</i> |
| ■ <i>idiomarina sp.</i> | ■ <i>sufflavibacter maritimus</i> | ■ <i>zunongwangia atlantica</i> | ■ <i>lactobacillus curvatus</i> | ■ <i>gynuella sunshinyii</i> | |

Σχήμα 4.2. Κυκλική απεικόνιση με τα είδη των βακτηρίων που ταυτοποιήθηκαν με τη μεταγονιδιωματική ανάλυση και τη μέθοδο αλληλούχησης του γονιδίου 16S rDNA στις ελιες ποικιλίας Κονσερβολιάς (Σοδειά 2014-2015)

Άμφισσα



Σχήμα 4.3. Κυκλική απεικόνιση με τα είδη των βακτηρίων που ταυτοποιήθηκαν με τη μεταγονιδιωματική ανάλυση και τη μέθοδο αλληλούχησης του γονιδίου 16S rDNA στις ελιές ποικιλίας Άμφισσας (Σοδειά 2014-2015)

Παρατηρώντας τα Σχήματα 5α, β, γ βλέπουμε πληθώρα ειδών βακτηρίων σε όλες τις ποικιλίες. Το είδος του μικροοργανισμού που κυριαρχεί και στις τρεις είναι ο *Cellulosimicrobium cellulans*, κύρια ικανότητα του οποίου είναι η παραγωγή ενζύμων που λύουν το κυτταρικό τοίχωμα των ζυμών (Feraccini-Santos et al., 2009). Το είδος αυτό έχει βρεθεί κυρίως σε δείγματα έδαφος (Yoon et al. 2007), κλινικά δείγματα (Brown et al. 2006) καθώς και δείγματα βιομηχανικών υπολείμματων αλκοολικής ζύμωσης (Feraccini-Santos et al., 2009).

Στις επιτραπέζιες ελιές ποικιλίας Καλαμών (Σχήμα 5α) κυριαρχεί επίσης το γένος *Bacteroides* spp. Το γένος αυτό αποτελείται από Gram-αρνητικά, υποχρεωτικά αναερόβια βακτήρια, τα οποία αποτελούν το πιο σημαντικό τμήμα της γαστρεντερικής χλωρίδας των θηλαστικών, όπου διαδραματίζουν θεμελιώδη ρόλο στην επεξεργασία των σύνθετων μορίων σε απλούστερα στο έντερο του ξενιστή (Madigan et al., 2005; Wexler, 2007). Ωστόσο σημαντικό ποσοστό εμφανίζει και το *Carnobacterium maltaromaticum*, η παρουσία του οποίου έχει γίνει γνωστή σε διάφορα τρόφιμα, συμπεριλαμβανομένων των ψαριών, του κρέατος και των γαλακτοκομικών προϊόντων (Leisner J. et al., 2007) ενώ δεν έχει βρεθεί σε επιτραπέζιες ελιές.

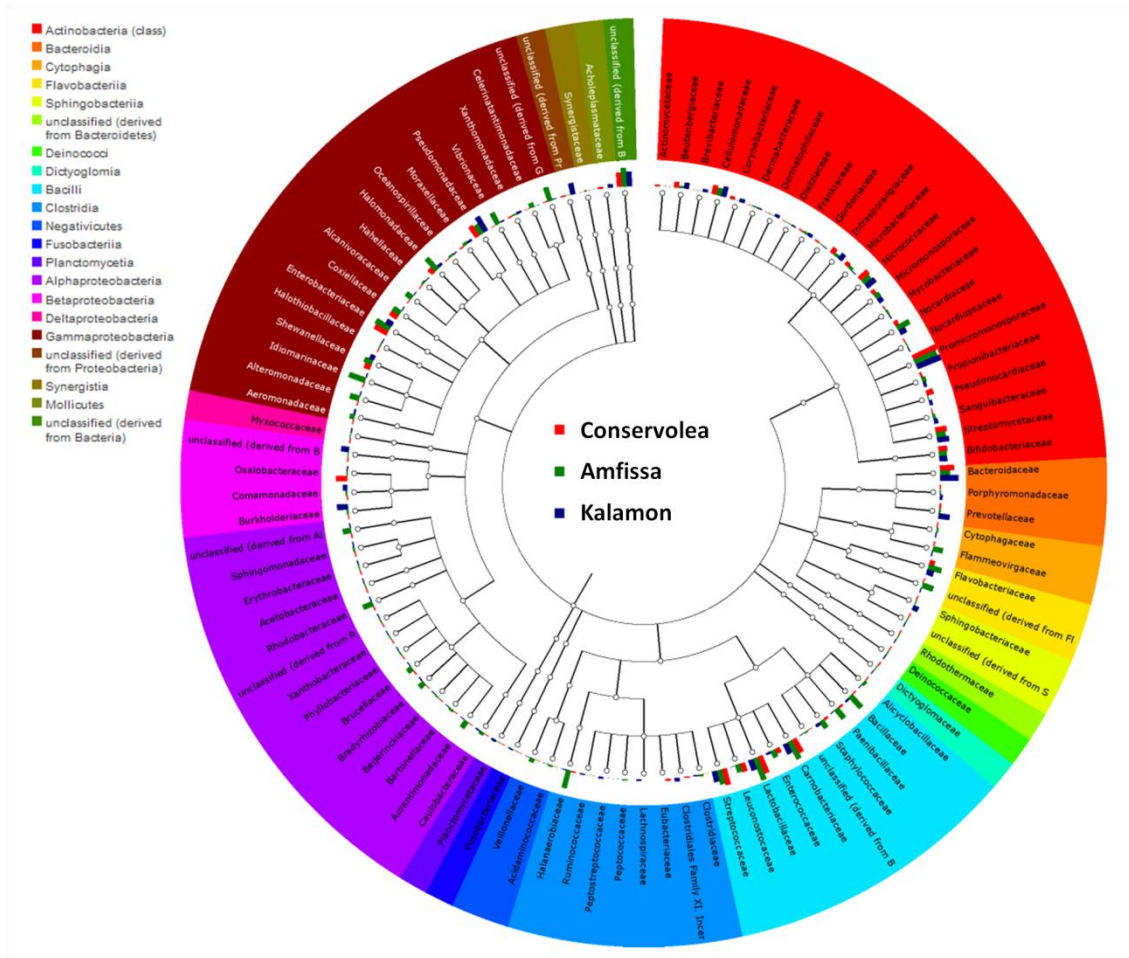
Η ποικιλία Κονσερβολιά (Σχήμα 5β) εκτός από τον *C. Cellulans*, περιέχει και το είδος του μικροοργανισμού *Lactobacillus buchneri*, ο οποίος που χρησιμοποιείται ως βακτηριακό εμβόλιο για τη βελτίωση της ενσίρωσης διαφόρων τροφών που προορίζονται για ζωοτροφές. Τέλος στην ποικιλία αυτή ανιχνεύθηκε επίσης και ο *Pediococcus parvulus*. Ο μικροοργανισμός αυτός είναι κυρίως υπεύθυνος για την δημιουργία ινώδους υφής σε κρασιά που εμφανίζουν υψηλό pH (> 3.8) (Dols-Lafargue and Lonvaud-Funel, 2009).

Η ποικιλία της Άμφισσας (Σχήμα 5γ) παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ποικιλομορφία σε είδη βακτηρίων σε σχέση με τις άλλες δύο ποικιλίες. Τα είδη μικροοργανισμών που παρουσιάζονται σε μεγαλύτερο ποσοστό σε αυτή είναι τα εξής: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus namurensis*, *Halanaerobium salsuginis* και *Salinicola halomonas salaria*, Ενώ βρεθηκαν σε μεγάλο ποσοστό και τα γένη *Lactobacillus* και *Idiomarina*. Ο *Lactobacillus plantarum* είναι ο κατεξοχήν κύριος υπεύθυνος για τη ζύμωση των

επιτραπέζιων ελιών σύμφωνα με τις κλασικές μικροβιολογικές μελέτες (Hurtado et al., 2012, Panagou et al., 2008, Doulgeraki et al., 2013). Το είδος *Halanaerobium salsuginis* έχει χρησιμοποιηθεί στην παραγωγή μιας ευρείας ποικιλίας προϊόντων διατροφής, όπως τα ψάρια που έχουν υποστεί ζύμωση, οι γαρίδες, το κρέας, τα φρούτα και τα λαχανικά (τουρσιά) (Kivisto et al., 2012) και ίσως αυτό να δικαιολογεί και την παρουσία του στο οικοσυστήμα των ελιών. Το είδος *Salinicola halomonas salaria* αρχικά απομονώθηκε από αλατούχο διάλυμα νερού στο Anmyeondo της Κορέας (Kim et al., 2007). Ο *Lactobacillus namurensis* απομονώθηκε για πρώτη φορά από παραδοσιακό βελγικό προζύμι (Scheirlinck I. et al., 2007). Βακτήρια του γένους *Idiomarina* απομονώθηκαν από περιβάλλοντα με υψηλή αλατότητα όπως τα ωκεάνια ύδατα, τα παράκτια ιζήματα και οι αλυκές (Jean W. D., et al. 2009).

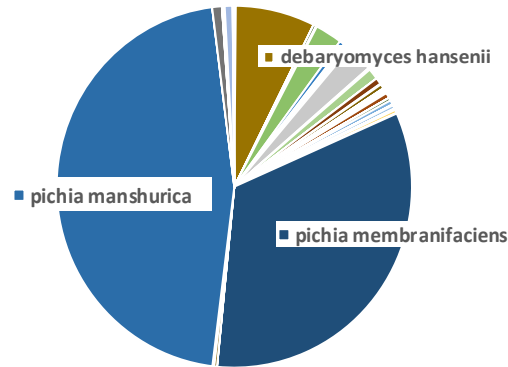
Η μεταγονιδιωματική ανάλυση των βακτηρίων δεν συμφωνεί με τις μελέτες της κλασικής μικροβιολογίας σε σχέση με τα είδη των βακτηρίων που επικρατούν στις ζυμώσεις των επιτραπέζιων ελιών. Τα είδη αυτά έχουν απομονωθεί από διαφορετικά οικοσυστήματα από αυτό των ελιών. Θα μπορούσαμε να πούμε όμως πως μοιάζουν με αυτό των ελιών καθώς πρόκειται για περιβάλλοντα με υψηλή αλατότητα αλλά και περιβάλλοντα ζύμωσης.

Στη συνέχεια ακολουθεί (Εικόνα 4.10) η φυλογενετική απεικόνιση σε επίπεδο οικογένειας των βακτηρίων που ταυτοποιήθηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος MG-Rast. Με το ίδιο χρώμα απεικονίζεται η τάξη που ανήκει η κάθε οικογένεια. Ενδιαφέρον προκαλεί ο αρκετά μεγάλος αριθμός των μη ταυτοποιημένων βακτηρίων σε όλες τις ποικιλίες που μελετήθηκαν τα οποία εμφανίζονται με πράσινο χρώμα πάνω στον κύκλο.



Εικόνα 4.10: Φυλογενετικό δέντρο βακτηρίων (Σοδειά 2014-2015). Στην εικόνα παρουσιάζονται οι τάξεις των βακτηρίων καθώς και οι οικογένειες που περιέχει η κάθε τάξη.

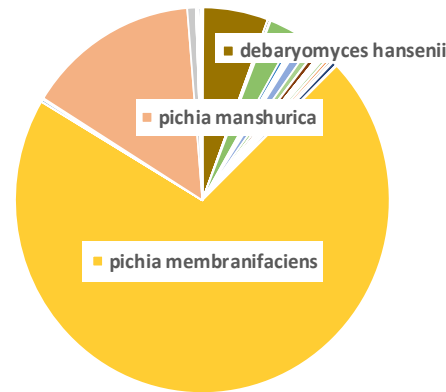
Καλαμών



- | | | | | | |
|--|---|---|--|---|--|
| ■ <i>nigrospora oryzae</i> | ■ <i>candida</i> sp. | ■ <i>trichosporon asteroides</i> | ■ <i>phoma medicaginis</i> | ■ <i>pseudocospoera cosmoepora vilior</i> | ■ <i>cystofilobasidium cryptococcus macerans</i> |
| ■ <i>coniochaeta lecythophora</i> sp. | ■ <i>trichosporon</i> sp. | ■ <i>cladosporium cladosporioides</i> | ■ <i>debaryomyces hansenii</i> | ■ <i>phoma herbarum</i> | ■ <i>candida parapsilosis</i> |
| ■ <i>candida hawaiiiana</i> | ■ <i>yamadazyma candida diddensiae</i> | ■ <i>capnobotryella</i> sp. | ■ <i>rhodotorula glutinis</i> | ■ <i>acremonium</i> sp. | ■ <i>kluveromyces lactis</i> |
| ■ <i>candida sake</i> | ■ <i>kazachstania bulderi</i> | ■ <i>peyronellaea glomerata</i> | ■ <i>debaryomyces</i> sp. | ■ <i>torula caligans</i> | ■ <i>trichosporon montevideense</i> |
| ■ <i>ramularia eucalypti</i> | ■ <i>dipodascus australiensis</i> | ■ <i>ogataea candida boidinii</i> | ■ <i>holtermanniella festucosa</i> | ■ <i>stachybotrys theobromae</i> | ■ <i>cryptococcus cyanovorans</i> |
| ■ <i>dioszegia crocea</i> | ■ <i>clavispora lusitaniae</i> | ■ <i>cryptococcus adeliensis</i> | ■ <i>kluveromyces marxianus</i> | ■ <i>filobasidium globisporum</i> | ■ <i>cryptococcus oeirensis</i> |
| ■ <i>alternaria alternata</i> | ■ <i>thelebolus globosus</i> | ■ <i>pichia candida thaimueangensis</i> | ■ <i>aspergillus versicolor</i> | ■ <i>malassezia restricta</i> | ■ <i>rhodotorula marina</i> |
| ■ <i>cordyceps confragosa</i> | ■ <i>aureobasidium pullulans</i> | ■ <i>malassezia globosa</i> | ■ <i>redeckera glomus fulvum</i> | ■ <i>walleimia sebi</i> | ■ <i>clavispora candida intermedia</i> |
| ■ <i>aspergillus</i> sp. | ■ <i>cryptococcus dimennae</i> | ■ <i>eurotium</i> sp. | ■ <i>phoma</i> sp. | ■ <i>cryptococcus ater</i> | ■ <i>walleimia</i> sp. |
| ■ <i>cryptococcus fragicola</i> | ■ <i>glomus</i> sp. | ■ <i>yamadazyma candida germanica</i> | ■ <i>cryptovalsa ampelina</i> | ■ <i>sporobolomyces coprosmae</i> | ■ <i>sterigmatomyces</i> sp. |
| ■ <i>fusarium gibberella fujikuroi</i> | ■ <i>galactomyces</i> sp. | ■ <i>candida metapsilosis</i> | ■ <i>paramicrosporidium fungal</i> sp. | ■ <i>cystofilobasidium macerans</i> | ■ <i>pichia fermentans</i> |
| ■ <i>galactomyces candidum</i> | ■ <i>candida tartarivovans</i> | ■ <i>penicillium tularense</i> | ■ <i>penicillium chermesinum</i> | ■ <i>kregervanrija fluxuum</i> | ■ <i>cyberlindnera jadinii</i> |
| ■ <i>fusarium</i> sp. | ■ <i>torulaspora</i> sp. | ■ <i>wickerhamomyces anomalus</i> | ■ <i>mycovalcium victoriae</i> | ■ <i>trichosporon faecale</i> | ■ <i>guehomomyces pullulans</i> |
| ■ <i>nakazawaea candida ernobii</i> | ■ <i>priceomyces carsonii</i> | ■ <i>pichia</i> sp. | ■ <i>penicillium roqueforti</i> | ■ <i>penicillium commune</i> | ■ <i>sporobolomyces</i> sp. |
| ■ <i>pichia membranifaciens</i> | ■ <i>pichia kudriavzevii</i> | ■ <i>rhodotorula</i> sp. | ■ <i>cryptococcus</i> sp. | ■ <i>trichosporon asahii</i> | ■ <i>rhizophydium</i> sp. |
| ■ <i>saccharomyces bayanus</i> | ■ <i>alternaria chalastospoera gossypii</i> | ■ <i>cladosporium</i> sp. | ■ <i>alternaria lewia infectoria</i> | ■ <i>saccharomyces cerevisiae</i> | ■ <i>yamadazyma candida atlantica</i> |
| ■ <i>pichia manshurica</i> | ■ <i>kazachstania barnettii</i> | ■ <i>galactomyces geotrichum</i> | ■ <i>phaeosphaeria</i> sp. | ■ <i>rhodotorula mucilaginoso</i> | ■ <i>asterotremella humicola</i> |
| ■ <i>filobasidium</i> sp. | ■ <i>acremonium alcalophilum</i> | ■ <i>cryptococcus daszewskae</i> | ■ <i>yarrowia lipolytica</i> | ■ <i>schwanniomyces etchellsii</i> | ■ <i>penicillium</i> sp. |
| ■ <i>cryptococcus victoriae</i> | ■ <i>monascus</i> sp. | ■ <i>pleospora</i> sp. | ■ <i>ceratobasidium</i> sp. | ■ <i>zygoascus steatolyticus</i> | |

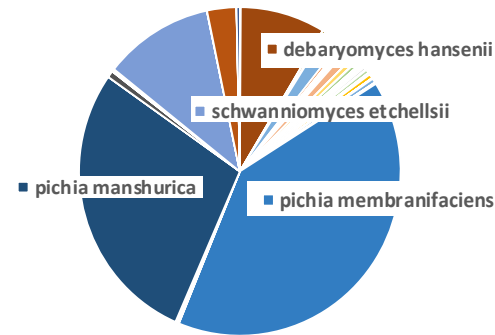
Σχήμα 4.4. Κυκλική απεικόνιση με τα είδη των ζυμών που ταυτοποιήθηκαν με τη μεταγονιδιωμική ανάλυση και τη μέθοδο αλληλούχησης της περιοχής ITS DNA στις ελιές Καλαμών (Σοδειά 2014-2015)

Κονσερβολιά



Σχήμα 4.5. Κυκλική απεικόνιση με τα είδη των ζυμών που ταυτοποιήθηκαν με τη μεταγονιδιωμιακή ανάλυση και τη μέθοδο αλληλούχησης της περιοχής ITS DNA στις ελιές ποικιλίας Κονσερβολιάς (Σοδειά 2014-2015)

Άμφισσα



- | | | | | |
|----------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---|
| ■ nigrospora oryzae | ■ candida sp. | ■ phoma medicaginis | ■ cryptococcus magnus | ■ cystofilobasidium cryptococcus macerans |
| ■ trichosporon sp. | ■ cladosporium cladosporioides | ■ debaryomyces hansenii | ■ phoma herbarum | ■ candida parapsilosis |
| ■ rhodotorula glutinis | ■ acremonium sp. | ■ kluyveromyces lactis | ■ candida sake | ■ kazachstania bulderi |
| ■ peyronellaea glomerata | ■ debaryomyces sp. | ■ torula caligans | ■ trichosporon montevidense | ■ ramularia eucalypti |
| ■ isaria farinosa | ■ dipodascus australiensis | ■ phaffia sp. | ■ ogataea candida boidinii | ■ holtermanniella festucosa |
| ■ cryptococcus cyanovorans | ■ debaryomyces fabryi | ■ clavispورا lusitaniae | ■ cryptococcus adeliensis | ■ kluyveromyces marxianus |
| ■ trichosporon mucoides | ■ filobasidium globisporum | ■ cryptococcus oeirensis | ■ alternaria alternata | ■ thelebolus globosus |
| ■ pichia candida thaimueangensis | ■ aspergillus versicolor | ■ malassezia restricta | ■ rhodotorula marina | ■ cordyceps confragosa |
| ■ aureobasidium pullulans | ■ redeckera glomus fulvum | ■ clavispورا candida intermedia | ■ aspergillus sp. | ■ cryptococcus dimennae |
| ■ eurotium sp. | ■ phoma sp. | ■ wallemia sp. | ■ cryptococcus fragicola | ■ glomus sp. |
| ■ yamadazyma candida germanica | ■ sporobolomyces coprosmae | ■ fusarium gibberella fujikuroi | ■ galactomyces sp. | ■ candida metapsilosis |
| ■ cystofilobasidium macerans | ■ pichia fermentans | ■ galactomyces candidum | ■ candida tartarivorans | ■ penicillium tularense |
| ■ penicillium chermesinum | ■ fusarium sp. | ■ wickerhamomyces anomalus | ■ mycalicium victoriae | ■ trichosporon faecale |
| ■ guehomyces pullulans | ■ nakazawaea candida ernobii | ■ priceomyces carsonii | ■ pichia sp. | ■ penicillium roqueforti |
| ■ penicillium commune | ■ sporobolomyces sp. | ■ pichia membranifaciens | ■ pichia kudriavzevii | ■ rhodotorula sp. |
| ■ cryptococcus sp. | ■ trichosporon asahii | ■ rhizophydium sp. | ■ saccharomyces bayanus | ■ alternaria chalastospora gossypii |
| ■ cladosporium sp. | ■ alternaria lewia infectoria | ■ saccharomyces cerevisiae | ■ yamadazyma candida atlantica | ■ pichia manshurica |
| ■ kazachstania barnettii | ■ galactomyces geotrichum | ■ phaeosphaeria sp. | ■ rhodotorula mucilaginoso | ■ asterotremella humicola |
| ■ monascus ruber | ■ filobasidium sp. | ■ cryptococcus daszewskae | ■ yarrowia lipolytica | ■ schwanniomycetes etchellsii |

Σχήμα 46. Κυκλική απεικόνιση με τα είδη των ζυμών που ταυτοποιήθηκαν με τη μεταγονιδιωμική ανάλυση και τη μέθοδο αλληλούχησης της περιοχής ITS DNA region στις ελιές ποικιλίας Άμφισσας (Σοδειά 2014-2015)

Τα κυρίαρχα γένη ζυμών που ταυτοποιήθηκαν με τη μεταγονιδιωματική ανάλυση και φαίνονται και στην κυκλική απεικόνιση είναι τα γένη *Pichia*, *Debaryomyces*, *Saccharomyces* και *Candida*. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τις κλασσικές μικροβιολογικές μελέτες που αποκάλυψαν τα κύρια γένη που είναι κυρίως παρόντα στο οικοσύστημα των επιτραπέζιων ελιών (Arroyo-Lopez et al., 2008). Μεταξύ των ειδών που αναγνωρίστηκαν και στις τρεις ποικιλίες επιτραπέζιων ελιών ήταν επίσης τα είδη *Pichia manshurica*, *Pichia membranifaciens* και *Debaryomyces hansenii*.

Όπως επισημαίνεται από τους Botta και Cocolin (2012), στον τομέα των ζυμών των επιτραπέζιων ελιών, οι επιστήμονες έχουν λάβει μόνο το πλεονέκτημα των μοριακών προσεγγίσεων κατά τα τελευταία χρόνια και οι περισσότερες μελέτες που διατίθενται σήμερα σχετίζονται με τη χρήση μοριακών μεθόδων για τον προσδιορισμό των απομονωμένων στελεχών (Hurtado et al., 2011; Hurtado et al., 2010; Silva et al., 2011; Doulgeraki et al., 2013). Σύμφωνα με τους Cocolin et al. (2013), οι μέθοδοι που δεν εξαρτώνται από την καλλιέργεια των μικροοργανισμών σπάνια έχουν εφαρμοστεί για τη μελέτη των αλλαγών που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της ζύμωσης της επιτραπέζιας ελιάς.

4.5 Μελέτη αντιμικροβιακών ιδιοτήτων οξυγαλακτικών βακτηρίων

Μελετήθηκε η αντιμικροβιακή δράση των υπερκειμένων που προέκυψαν από την ανάπτυξη των 42 στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα MRS και εργαστηριακό γάλα εμπλουτισμένο με ζύμη. Αξίζει να σημειωθεί ότι μόνο οι βάκιλοι έπηξαν το εργαστηριακό γάλα μετά από 18 ώρες επώασης στους 30° C ενώ υπήρξε απουσία πηκτικής ικανότητας στην περίπτωση των κόκκων.

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η ανίχνευση αντιμικροβιακή δράσης, η οποία δεν οφείλεται σε παραγόμενα οξέα, για αυτό έγινε και ρύθμιση του pH των υπερκειμένων στην τιμή 6.5.

Κανένα από τα υπερκείμενα που μελετήθηκαν από τα 42 στελέχη των οξυγαλακτικών βακτηρίων δεν ανέστειλε την ανάπτυξη των παθόγονων στελεχών στόχων (Πίνακας 3.8, Παράγραφος 3.5). Όσον αφορά τα στελέχη του *Pediococcus ethanolidurans* δεν υπάρχουν δημοσιευμένες μελέτες για πιθανή αντιμικροβιακή τους δράση.

5 Συμπεράσματα

Από τα παραπάνω πειράματα και την επεξεργασία των αποτελεσμάτων οδηγούμαστε στα εξής συμπεράσματα :

- Η σοδειά 2012-2013 στην οποία είχε παρέλθει κατά πολύ η διαδικασία της ζύμωσης είχε μικρότερους πληθυσμούς μικροοργανισμών σε σχέση με τη σοδειά 2014-2015 στην οποία η ζύμωση ήταν σε εξέλιξη.
- Τα κυρίαρχα είδη βακτηρίων που ταυτοποιήθηκαν και για τις 3 ποικιλίες ελιών στις σοδειές 2012-2013 και 2014-2015 σύμφωνα με την κλασσική μικροβιολογία ήταν ο *Lactobacillus plantarum* και ο *Pediococcus ethanolidurans*.
- Η μεταγονιδιωματική ανάλυση αποκάλυψε πληθώρα βακτηρίων και ζυμών στο οικοσύστημα της άλμης σοδειάς 2014-2015 και για τα 3 δείγματα φυσικών επιτραπέζιων ελιών.
- Η μελέτη έναντι των απομονωθέντων στελεχών αποκάλυψε την απουσία αντιμικροβιακής δράσης έναντι των ευαίσθητων στελεχών.

6 Βιβλιογραφία

Διαδίκτυο

www.olivenews.gr

www.elies-ladikalamatiano.gr

www.nap.edu.com

www.interanationaloliveoil.org

Ελληνική

1. Θεριός Ι.Ν. (2005) Ελαιοκομία. Εκδόσεις Γαρταγάνης, Θεσσαλονίκη.
2. Κυριτσάκης Κ. Α. (1993) Το ελαιόλαδο. Χημική σύνθεση, τεχνολογία, ποιοτικός έλεγχος, βιολογική αξία. Έκδοση Κυριτσάκη, Θεσσαλονίκη.
3. Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, 2014.
4. Κωστελένιος Δ. Γ. (2012) Στοιχεία Ελαιοκομίας Ιδιωτική Έκδοση, Αθήνα.
5. Μπαλατσούρας Δ. Γ. (1995) Η επιτραπέζια ελιά. Έκδοση Μπαλατσούρας, Αθήνα.

Ξενόγλωσση

1. A. T. Kivistö, M. T. Karp, Halophilic anaerobic fermentative bacteria. *J. Biotechnol.* **2011**, *152*, 114.
2. Abee, T., Krockel, L., Hill, C., 1995. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *International Journal of Food Microbiology* **28**, 169-185.
3. Abriouel, H., Benomar, N., Cobo, A., Caballero, N., Fernández Fuentes, M. A., Pérez-Pulido, R., et al. (2012). Characterization of lactic acid bac-teria from naturally-fermented Manzanilla Aloreña green table olives. *Food Microbiol.* **32**, 308–316
4. Abriouel, H., Benomar, N., Lucas, R., Galvez, A., 2011. Culture-independent study of the diversity of microbial populations in brines during fermentation of naturally-fermented Alore~na green table olives. *Int. J. Food Microbiol.* **144**, 487-496
5. Albert Hurtado, Cristina Reguant, Albert Bordons, Nicolas Rozès, 2012. Lactic acid bacteria from fermented table olives. *Food Microbiol.* **31**, 1-8.
6. Alves, M., Gonçalves, T., and Quintas T. (2012). Microbial quality and yeast population dynamics in cracked green table olives' fermentations. *Food Cont.* **23**, 363-368.

7. Anthoula A. Argyri, Georgia Zoumpopoulou, Kimon-Andreas G. Karatzas, Effie Tsakalidou, George-John E. Nychas, Efstathios Z. Panagou, Chrysoula C. Tassou, 2013. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. *Food Microb.* (33), 282-291.
8. Aponte M, Ventrino V, Blaiotta G, Volpe G, Farina V, et al. (2010) Study of green Sicilian table olive fermentations through microbiological, chemical and sensory analyses. *Food Microbiol* 27: 162–170.
9. Aponte, M., Blaiotta, G., La Croce, F., Mazzaglia, A., Farina, V., Set-tanni, L., and Moschetti, G. (2012). Use of selected autochthonous lactic acid bacteria for Spanish-style table olive fermentation. *Food Microbiol.* 30, 8–16.
10. Arroyo-López F.N., Querol A., Bautista-Gallego J., Garrido-Fernández A. (2008) Role of yeasts in table olive production. *International Journal of Food Microbiology* 128, 189-196.
11. Arroyo-Lopez, F.N., Duran-Quintana, M.C., Ruiz-Barba, J.L., Querol, A. and Garrido Fernandez, A. (2006). Use of molecular methods for the identification of yeast associated with table olives. *Food Microbiol* 23, 791–796.
12. Balatsouras G.D. (1990) Edible olive cultivars, chemical composition of fruit, harvesting, transportation, processing, sorting and packaging, styles of black olives, deterioration, quality standards, chemical analysis, nutritional and biological value of the end product. In *Olio d'oliva e olive da tavola: tecnologia e qualità*. Istituto Sperimentale per la Elaiotecnica, Pescara.
13. Balciunas, E.M., Castillo Martinez, F.A., Todorov, S.D., Gombossy de Melo Franco, B.D., Converti, A., Pinheiro de Souza Oliveira, R., 2013. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control.* 32, 134 –142.
14. Bautista-Gallego J, Rodríguez-Go´mez F, Barrio E, Querol A, Garrido-Fernández A, et al. (2011) Exploring the yeast biodiversity of green table olive industrial fermentations for technological applications. *Int J Food Microbiol* 147: 89–96.
15. Begley, M., Gahan, C.G., Hill, C., 2005. The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 625-651.
16. Beumer R.R. (2001) Microbiological hazards and their control: bacteria. In *Fermentation and Food Safety* (Ed. Adams M.R. and Robert Nout M.J.), Aspen Publishers Inc., Maryland.
17. Bevilacqua, A., Altieri, C., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., and Ouoba, L. I. I. (2010). Characterization of lactic acid bacteria isolated from Italian Bella di Cerignola table olives: selection of potential multifunctional starter cultures. *J. Food Sci.* 75, 536–544.

18. Blaiotta, G., Fusco, V., Ercolini, D., Aponte, M., Pepe, O., and Vil-lani, F. (2008). Lactobacillus strain diversity based on partial hsp60 gene sequences and design of PCR-restriction fragment length polymorphism assays for species identification and differentiation. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 208–215.
19. Borcakli, M., O'zay, G., Alperden, G., Ozsan, E. and Edrek, Y. (1993) Changes in the chemical and microbiological composition of two varieties of olive during fermentation. *Grasas Aceites* 44, 253–260.
20. Botta C, Cocolin L (2012) Microbial dynamics and biodiversity in table olive fermentation: culture-dependent and -independent approaches. *Front Microbiol* 3: 245.
21. Chamkha M, Sayadi S, Bru V, Godon JJ (2008) Microbial diversity in Tunisian olive fermentation brine as evaluated by small subunit rRNA – single strand conformation polymorphism analysis. *Int J Food Microbiol* 122: 211–215.
22. Ciafardini G., Marsilio V., Lanza B., and Pozzi N. (1994) Hydrolysis of oleuropein by *Lactobacillus plantarum* strains associated with olive fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 4142-4147.
23. Cintas, L.M., Casaus, M.P., Herranz, C., Nes, I.F., Hernandez, P.E., 2001. Review: Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Science and Technology International* 7: 281-305.
24. Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I.F., Chikindas, M. L., 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 71, 1–20.
25. Cocolin L, Alessandria V, Botta C, Gorra R, De Filippis F, et al. (2013) NaOH-Debittering Induces Changes in Bacterial Ecology during Table Olives Fermentation. *PLoS ONE* 8(7): e69074.
26. Coton, E., Coton, M., Levert, D., Casaregola, S. and Sohier, D. (2006) Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations. *Int J Food Microbiol* 108, 130–135.
27. Coughlan, L. M., Cotter, P. D., Hill, C., & Alvarez-Ordóñez, A. 2015. Biotechnological applications of functional metagenomics in the food and pharmaceutical industries. *Front Microbiol*, 6: 672.
28. De Bellis, P., Valerio, F., Sisto, A., Lonigro, S. L., and Lavermicocca, P. (2010). Probiotic table olives: microbial populations adhering on olive surface in fermentation sets inoculated with the probiotic strain *Lactobacillus paracasei* IMPC2.1 in an industrial plant. *Int. J. Food Microbiol.* 140, 6–13.

29. de Castro A., Montano A., Casado F-J., Sanchez A-H. and Rejano L. (2002) Utilization of *Enterococcus casseliflavus* and *Lactobacillus pentosus* as starter cultures for Spanish style green olive fermentation. *Food Microbiology* 19, 637-644.
30. de la Haba R. R., Sánchez-Porro C., Márquez M. C., Ventosa A. (2010). Taxonomic study of the genus *Salinicola*: transfer of *Halomonas salaria* and *Chromohalobacter salarius* to the genus *Salinicola* as *Salinicola salarius* comb. nov. and *Salinicola halophilus* nom. nov., respectively. *Int J Syst Evol Microbiol* 60, 963–971.
31. Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C., Ross, P., 2006. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal* 16, 1058 -1071.
32. Delgado A., Brito D., Peres C., Noé-Arroyo F. and Garrido-Fernández A. (2005) Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* B96 can be expressed as a function of temperature and NaCl concentration. *Food Microbiology* 22, 521-528.
33. Doores, S., 1993. In: Davidson, P.M, Branen, A.L. (Eds.), *Organic Acids*. Marcel Dekker, New York, pp. 95–136.
34. Doulgeraki AI, Pramateftaki P, Argyri AA, Nychas GJE, Tassou CC, et al.(2013) Molecular characterization of lactic acid bacteria isolated from industrially fermented Greek table olives. *LWT – Food Sci Technol* 50: 353–356.
35. Drider D. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2006;70:564–582.
36. Duffes F. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium* spp. strains in a simulated cold smoked fish system stored at 4°C. *Int J Food Microbiol.* 1999a;47:33–42.
37. Dufour, A., Hindre, T., Haras, D., Le Pennec, J.P., 2007. The biology of lantibiotics from the lactacin 481 group is coming of age. *FEMS Microbiology Reviews.* 31, 134 –167.
38. Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K., Ishizaki, A., 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiology Reviews* 24, 85-106
39. Ercolini D, H. P., Dodd CER. 2003. Bacterial community structure and location in Stilton cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* , 69: 3540 –3548.
40. Ercolini, D. 2013. High-throughput sequencing and metagenomics: moving forward in the culture-independent analysis of food microbial ecology. *Appl Environ Microbiol*, 79(10): 3148-3155.
41. Ermelinda L. Pereira, Elsa Ramalhosa, Ana Borges, Jose A. Pereira, Paula Baptista, 2015. YEAST dynamics during the natural fermentation process of table olives (Negrinha de Freixo cv.). *Food Microbiol.* 46, 582-586

42. F Meyer, D Paarmann, M D'Souza, R Olson, EM Glass, M Kubal, T Paczian, A Rodriguez, R Stevens, A Wilke, J Wilkening and RA Edwards (2008). The metagenomics RAST server – a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics*, 9:386- <http://metagenomics.anl.gov/>
43. Felske, A., Akkermans, A.D., De Vos, W.M., 1998. Quantification of 16S rRNAs in complex bacterial communities by multiple competitive reverse transcription-PCR in temperature gradient gel electrophoresis fingerprints. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 4581-4587.
44. Fernandez Gonzalez, M.J., Garcí'a, P., Garrido Fernandez, A. and Dura'n Quintana, M.C. (1993) Microflora of the aerobic preservation of directly brined green olives from Hojiblanca cultivar. *J Appl Bacteriol* 75, 226–233.
45. Flemming H.P., Mc Feeters R.F., and Daeschel M.A. (1985). The lactobacilli, pediococci, and leuconostocs: vegetable products. In *Bacterial Starter Cultures for Food* (Ed. Gilliland S.E.), CRC Press.
46. Florou-Paneri, P., Christaki, E., 2013. Bonos E., Lactic acid bacteria as source of functional ingredients. In Kongo, M. (Eds), *Lactic Acid Bacteria –R & D for Food, Health and Livestock Purposes* (589-614). Croatia: In Tech.
47. Fuller, R., 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66 (5), 365e378.
- Gänzle, M., Weber, S., Hammes, W., 1999a. Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins. *Int. J. Food Microbiol.* 46, 207-217.
48. Gänzle, M., Weber, S., Hammes, W., 1999a. Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins. *Int. J. Food Microbiol.* 46, 207-217.
49. Garcia, E., Luh, B.S., Martin, M.H., 2004. Olives. In: Barrett, D.M., Somogyi, L.P., Ramaswamy, H.S. (Eds.), *Processing Fruits Science and Technology*. CRC Press, Florida, pp. 1-13 (Chapter 31).
50. Garrido Fernández A., Fernández Díez M.J., Adams M.R. (1997) Table olives production and processing. Chapman and Hall, London, UK.
51. Garrido, A., Garcia, P., & Brenes, M. (1995). Olive fermentations. In: *Biotechnology: A multivolume Comprehensive Treatise*, edited by Reed. H.J. & Nagodawitana. T.W. VCH Inc., 593-625.
52. George, M. L. C., Nelson, R. J., Zeigler, R. S., 1998. Leung, H. Rapid Population Analysis of *Magnaporthe grisea* by Using rep-PCR and Endogenous Repetitive DNA Sequences. *Phytopathology*, 88 (3), 223-22

53. Handelsman, J. 2004. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol Mol Biol Rev*, 68(4): 669-685.
54. Hernandez, A., Martin, A., Aranda, E., Perez-Nevado, F. and Gordoba, M.G. (2007) Identification and characterization of yeast isolated from the elaboration of seasoned green table olives. *Food Microbiol* 24, 346–351.
55. Holzapfel, W.H., Geisen, R., Schillinger, U., 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology* 24, 343-362.
56. Hurtado A, Ben Othman N, Chammem N, Hamdi M, Ferrer S, et al. (2011) Characterization of *Lactobacillus* isolates from fermented olives and their bacteriocin gene profiles. *Food Microbiol* 28: 1514–1518.
57. Hurtado, A., Reguant, C., Bordons, A., and Rozes, N. (2010). Evaluation of a single and combined inoculation of a *Lactobacillus pentosus* starter for processing cv. Arbequina natural green olives. *Food Microbiol.* 27, 731–740.
58. Hurtado, A., Reguant, C., Esteve-Zarzoso, B., Bordons, A., Rozès, N., 2008. Microbial population dynamics during the processing of Arbequina table olives. *Food Research International* 41, 738-744.
59. Jean WD, Leu TY, Lee CY, Chu TJ, Lin SY, Shieh WY. 2009. *Pseudidiomarina marina* sp. nov. and *Pseudidiomarina tainanensis* sp. nov. and reclassification of *Idiomarina homiensis* and *Idiomarina salinarum* as *Pseudidiomarina homiensis* comb. nov. and *Pseudidiomarina salinarum* comb. nov., respectively. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59:53–59.
60. Jørgen J Leisner, Birgit Groth Laursen, Hervé Prévost, Djamel Drider, and Paw Dalgaard (SEP 2007). *Carnobacterium*: positive and negative effects in the environment and in foods. *FEMS Microbiol Rev* 31(5): 592–613.
61. Juodeikiene, G., Bartkiene, E., Viskelis, P., Urbonaviciene, D., Eidukonyte, D., Bobinas, C., 2012. Fermentation processes using lactic acid bacteria producing bacteriocins for preservation and improving functional properties of food products. In Marian Petre (Eds), *Advances in Applied Biotechnology* (pp 63-100).
62. Kailis S. and Harris D. (2007) *Producing Table olives*. Landlinks Press.
63. Kergourlay, G., Taminiou, B., Daube, G., & Champomier Verges, M. C. 2015. Metagenomic insights into the dynamics of microbial communities in food. *Int J Food Microbiol*, 213: 31-39.

64. Kim K. K., Jin L., Yang H. C., Lee S.-T. (2007). *Halomonas gomseomensis* sp. nov., *Halomonas janggokensis* sp. nov., *Halomonas salaria* sp. nov. and *Halomonas denitrificans* sp. nov., moderately halophilic bacteria isolated from saline water. *Int J Syst Evol Microbiol* 57, 675-681.
65. Klaenhammer, T. R., 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* 70, 337 – 349
66. Korabecna, M. (2007). "The Variability in the Fungal Ribosomal DNA (ITS1, ITS2, and 5.8 S rRNA Gene): Its Biological Meaning and Application in Medical Mycology." *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*.
67. Kotzekidou P. (1997) Identification of yeasts from black olives in rapid system microtitre plates. *Food Microbiology* 14, 609-616.
68. Kotzekidou P. and Tsakalidou E. (2006) Fermentation Biotechnology of Plant Based Traditional Foods of the Middle East and Mediterranean Region. In : *Food Biotechnology*, Eds. K. Shetty, G. Paliyath, A. Pometto & R. Levin. p. 1795-1828, CRC Press, Boca Raton, FL.
69. Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T, Robert V (2011) Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. In: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T, editors. *The yeasts: a taxonomic study*. Fifth edition. Elsevier. 87–110.
70. Kurtzman, C. P., Suzuki, M. 2010. Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Babjeviella*, *Meyerozyma*, *Millerozyma*, *Priceomyces* and *Sceffersomyces*. *Mycoscience*. 51(1):2-14.
71. Lanza, B., 2013. Abnormal fermentations in table-olive processing: microbial origin and sensory evaluation. *Front. Microbiol.* 4, 91.
72. Leone E.G. (2000). The globalization of olive oil market and the competitive position of the sector in Italy: an international comparison. *Olivae* 83, 10-14.
73. Lin, W.H., Yu, B., Lin, C.K., Hwang, W.Z., Tsen, H.Y., 2007. Immune effect of heat probiotic strains of lactic acid bacteria isolated from marketed foods and drugs. *Biomed. Environ. Sci.* 22 (5), 401-412.
74. Lopez-Velasco, G., Welbaum, G.E., Boyer, R.R., Mane, S.P., Ponder, M.A., 2011. Changes in spinach phylloepiphytic bacteria communities following minimal processing and re-refrigerated storage described using pyrosequencing of 16S rRNA amplicons. *J. Appl. Microbiol.* 110, 1203–1214.

75. Louws F.J., Rademaker, J.L.W., Bruijn, F.J.,1999. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: Diversity, Detection, and Disease Diagnosis. *Annual Review of Phytopathology*, 37, 81-125.
76. Lucena-Padros, H., Caballero-Guerrero, B., Maldonado-Barragan, A., Ruiz-Barba, J.L., 2014. Microbial diversity and dynamics of Spanish-style green table-olive fermentations in large manufacturing companies through culture dependent techniques. *Food Microbiol.* 42, 154-165.
77. M. Dols-Lafargue, A. Lonvaud-Funel. Polysaccharide production by grapes, must and wine microorganisms. H. König, G. Uden, J. Fröhlich (Eds.), *Biology of Microorganisms on Grapes*, in *Must and Wine*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg (2009), pp. 243–260
78. M. Duenas, A. Irastorza, K. Fernandez, A. Bilbao. Heterofermentative *Lactobacilli* causing ropiness in Basque country ciders. *Journal of Food Protection*, 58 (1995), pp. 76–80.
79. Madigan M, Martinko J, ed. (2005). *Brock Biology of Microorganisms* (11th ed.). Prentice Hall. ISBN 0-131-44329-1.
80. Mahjoub A. and Bullerman L.B. (1987) Mold growth and aflatoxin production on whole olives and olive pastes. *Sciences des Aliments* 7, 629-636.
81. Maragkoudakis, P.A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot,B., Tsakalidou, E., 2006. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *Int. Dairy J.* 16,189-199
82. Marquina, D., Peres, C., Caldas, F.V., Marques, J.F., Peinado, J.M. and Spencer Martin, J. (1992) Characterization of the yeast population in olive brines. *Lett Appl Microbiol* 14, 279–283.
83. Marsilio V., Seghetti L., Iannucci E., Russi F., Lanza B. and Felicioni M. (2005) Use of a lactic acid bacteria starter culture during green olive (*Olea europaea* L cv Ascolana tenera) processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85, 1084-1090.
84. McAuliffe, O., Ross, R. P., Hill, C., 2001. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiology Reviews* 25, 285–308
85. Menz G., Bradbury M. and Vriesekoop F. (2008) Changes in the Prefermentation Static Washing Regime of Kalamata Olives Affect the Fermentation Profile. *Food Technology Biotechnology* 46, 341-345.
86. Metaxopoulos, J., Mataragas, M., Drosinos, E.H., 2003. Bacteriocins: Classification, properties, production and mode of action (I). *Journal of the hellenic veterinary medical society* 53,335-344.

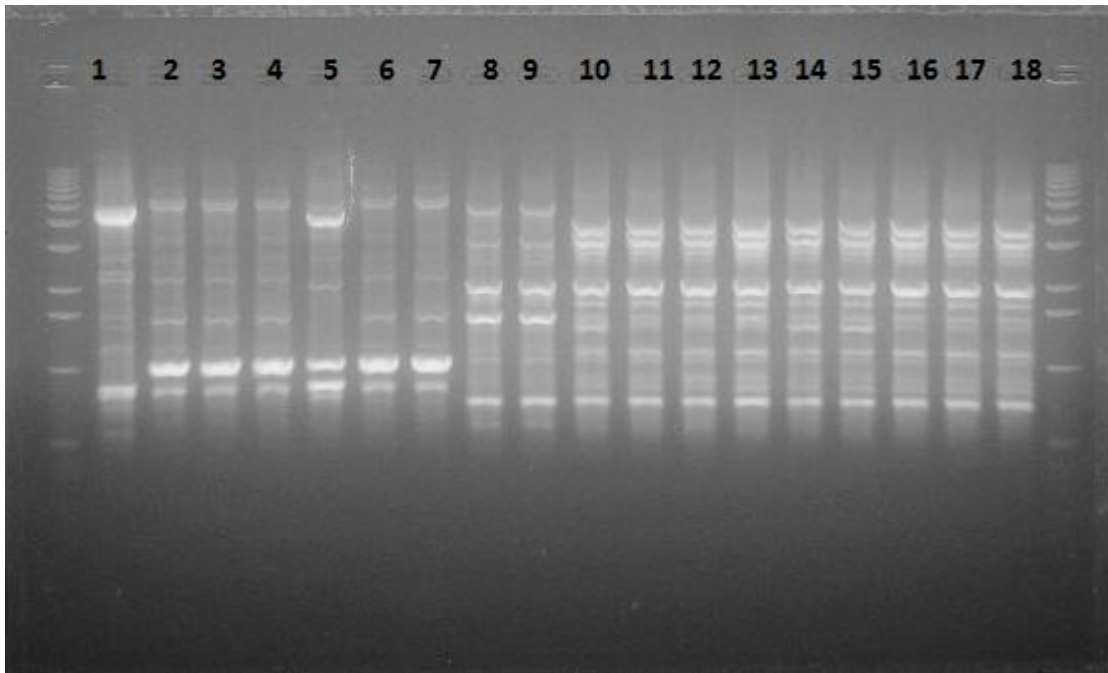
87. Metaxopoulos, J., Mataragas, M., Drosinos, E.H., 2003. Bacteriocins of lactic acid bacteria and their application on food as biopreservatives. (II). *Journal of the hellenic veterinary medical society* 54,69-77
88. Millette, M., Luquet, F.M., Lacroix, M., 2007. In vitro growth control of selected pathogens by *Lactobacillus acidophilus*- and *Lactobacillus casei*-fermented milk. *Lett. Appl. Microbiol.* 44, 314-319
89. Montano A., Sanchez A.H. and De Castro A. (1993) Controlled fermentation of Spanish- type green olives. *Journal of Food Science* 58, 842-844.
90. Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G.,. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. . *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 695-700.
91. Nisiotou, A.A., Chorianopoulos, N., Nychas, G.-J.E., Panagou, E.Z., 2010. Yeast heterogeneity during spontaneous fermentation of black *Conservolea* olives in different brine solutions. *J. Appl. Microbiol.* 108, 396-405.
92. Nychas G.-J.E., Panagou E.Z., Parker M.L., Waldron K.W. and Tassou C.C. (2002) Microbial colonization of naturally black olives during fermentation and associated biochemical activities in the cover brine. *Letters in Applied Microbiology* 34, 173–177.
93. Ouwehand, A.C., Salminen, S., 1998. The health effects of cultured milk products with viable and non viable bacteria. *Int. Dairy J.* 8, 749-758.
94. Özay G. and Borcakli M. (1996) Effect of brine replacement and salt concentration on the fermentation of naturally black olives. *Food Research International* 28,553-559.
95. Panagou E.Z. (2006) Greek dry-salted olives: Monitoring the dry-salting process and subsequent physico-chemical and microbiological profile during storage under different packing conditions at 4 and 20 °C. *LWT* 39, 322-329.
96. Panagou E.Z. and Tassou C.C. (2006) Changes in volatile compounds and related biochemical profile during control fermentation of cv. *Conservolea* green olives. *Food Microbiology* 23, 738-746
97. Panagou E.Z., Schillinger U., Franz C.M.A.P. and Nychas G.-J.E. (2008) Microbiological and biochemical profile of cv. *Conservolea* naturally black olives during controlled fermentation with selected strains of lactic acid bacteria. *Food Microbiology* 25, 348- 358.

98. Panagou, E.Z., Tassou, C.C., Katsaboxakis, C.Z., 2003. Induced lactic acid fermentation of untreated green olives of the conservolea cultivar by *Lactobacillus pentosus*. *J. Sci. Food Agric.* 83, 667-674.
99. Panizzi L.M., Scarpati M.L., Oriente E.G. (1960) Costituzione della Oleuropeina, glucoside amaro e ad azione ipotensiva dell'olivo. *Gazzetta Chimica Italiana* 90, 1449-1485.
100. Plastourgos S., Vaughn R. H. (1957). Species of *Propionibacterium* associated with zapatera spoilage of olives. *Appl. Environ. Microbiol.* 5 267–271
101. Psani, M. and Kotzekidou, P. (2006) Technological characteristics of yeast strains and their potential as starter adjuncts in Greek-style black olive fermentation. *World J Microbiol Biotechnol* 22, 1329–1336.
102. R. Tofalo, G. Perpetuini, M. Schirone, G. Fasoli, G. Suzzi, A. Corsetti. *Lactobacillus pentosus* dominates spontaneous fermentation of Italian table olives. *LWT-Food Sci. Technol.*, 57 (2014), pp. 710–717
103. Randazzo, C. L., Rajendram, R., and Caggia, C. (2010). “Lactic acid bacteria in table olive fermentations,” in *Olives and Olive Oil in Health and Disease*, eds V. R. Preedy and R. R. Watson (Singapore: Academic Press is an imprint of Elsevier), 369–376.
104. Ranjit, N.K. and Kung, Jr, L. 2000. The effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum*, or a chemical preservative on the fermentation and aerobic stability of corn silage. *Journal of Dairy Science* 83:526-535.
105. Riesenfeld, C. S., Schloss, P. D., & Handelsman, J. 2004. Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annu Rev Genet*, 38: 525-552.
106. Ruiz-Barba J.L., Cathcart D.P., Warner P.J. and Jimenez-Diaz R. (1994) Use of *Lactobacillus plantarum* LPCO10, a bacteriocin producer, as a starter culture in Spanish style green olive fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 2059-2064.
107. Sánchez-Gómez, A.H., García, P., Rejano, L., 2006. Trends in table olives production, elaboration of table olives. *Grasas y Aceites* 57, 86-94.
108. Scheirlinck I, van der Meulen R, van Schoor A, Cleenwerck I, Huys G, Vandamme P, de Vuyst L, Vancanneyt M. 2007. *Lactobacillus namurensis* sp. nov., isolated from a traditional Belgian sourdough. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 223–227
109. Server-Busson C., Foucaud C. and Leveau J.-Y. (1999) Selection of dairy *Leuconostoc* isolates for important technological properties. *Journal of Dairy Research* 66, 245-256.
110. Shah, N.P., 2007. Functional cultures and health benefits. *Int. Dairy J.* 17 (11), 1262-127

111. Silva T, Reto M, Sol M, Peito A, Peres CM, et al. (2011) Characterization of yeasts from Portuguese brined olives, with a focus on their potentially probiotic behavior. *LWT – Food Sci Technol* 44: 1349–1354.
112. Spyropoulou K.E. Chorianopoulos N.G., Skandamis P.N. and Nychas G.-J.E. (2001) Survival of *Escherichia coli* O157:H7 during the fermentation of Spanish-style green table olives (Conservolea variety) supplemented with different carbon sources. *International Journal of Food Microbiology* 66, 3-11.
113. Suzuki M. Mode of action of piscicocin CS526 produced by *Carnobacterium piscicola* CS526. *J Appl Microbiol.* 2005;98:1146–1151.
114. Tagg, J. R., Dajani, A.S., Wannamaker, L.W., 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriological Reviews* 40,722-756.
115. Tassou C.C., Panagou E.Z. and Katsaboxakis K.Z. (2002) Microbiological and physicochemical changes of naturally black olives fermented at different temperatures and NaCl levels in the brines. *Food Microbiology* 19, 605-615.
116. Tassou CC, Nychas GJ, Board RG. (1991) Effect of phenolic compounds and oleuropein on the germination of *Bacillus cereus* T spores. *Biotechnology Applied Biochemistry* 13: 231-7.
117. Tassou, C. C., Panagou, E. Z., and Nychas, G.-J. E. (2010). “Microbial colonization of naturally fermented olives,” in *Olives and Olive Oil in Health and Disease*, eds V. R. Preedy and R. R. Watson (Singapore: Academic Press is an imprint of Elsevier), 397–406.
118. Tassou, C.C., Nychas, G.J.E. (1994) Inhibition of *Staphylococcus aureus* by Olive Phenolics in Broth and in a Model Food System. *Journal of Food Protection* 57: 120- 124.
119. Torriani, S., Felis, G. E., and Delaglio, F. (2001). Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3450–3454.
120. Torsvik, V., Goksoyr, J., & Daae, F. L. 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 56(3): 782-787.
121. Tsapatsaris S., Kotzekidou P. (2004) Application of central composite design and response surface methodology to the fermentation of juice by *Lactobacillus plantarum* and *Debaryomyces hansenii*. *International Journal of Food Microbiology* 95, 157-168.
122. Ucella N. (2001) Olive biophenols: biomolecular characterization distribution and phytoalexin histochemical localization in the drupes. *Trends in Food Science and Technology* 11, 328-339.

123. V.K. Bhupathiraju, A. Oren, P.K. Sharma, R.S. Tanner, C.R. Woese, M.J. McInerney *Haloanaerobium salsugo* sp. nov., a moderately halophilic, anaerobic bacterium from a subterranean brine. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44 (1994), pp. 565–572
124. Vaughn R.H., Stevenson K.E., Dave B.A. and Park H.C.. (1972). Fermenting yeasts associated with softening and gas-pocket formation in olives. *Applied and Environmental Microbiology* 23, 316-320
125. Wexler, H. M. (Oct 2007). "Bacteroides: the good, the bad, and the nitty-gritty" *Clinical Microbiology Reviews* **20** (4): 593–621
126. Zacharof, M.P., Lovitt, R.W., 2012. Bacteriocins produced by lactic acid bacteria: A Review Article. *APCBEE Procedia* 2, 50-56.

7 Παράρτημα



Εικόνα 6.1 : Προϊόντα ηλεκτροφόρησης της ger-PCR για τα βακτήρια που απομονώθηκαν από τις ποικιλίες Άμφισσας (1-15) και Κονσερβολιάς (16-18).

Πίνακας 6.1: Στον πίνακα φαίνονται τα δείγματα που ενισχύθηκαν, η συγκέντρωση του δείγματος καθώς και ο λόγος καθαρότητας του DNA.

A/A	Απομόνωση	C ng/μl	260/280
1	AM-L5	25	1.939
2	AM-L7	25	1.979
3	AM-L10	27	1.848
4	AM-L16	27	1.617
5	AM-L18	25	1.974
6	AM-L23	26	1.723
7	AM-L25	25	1.782
8	AM-L26	27	1.848
9	AM-L28	27	1.903
10	AM-L30	25	1.906
11	AM-L31	24	1.607
12	AM-L32	24	1.726
13	AM-L33	24	1.811
14	AM-L34	25	1.889
15	AM-L35Λ	23	1.839
16	KO-L20A	27	1.743
17	KO-L18A.	27	1.883
18	KO-L20	26	1.867

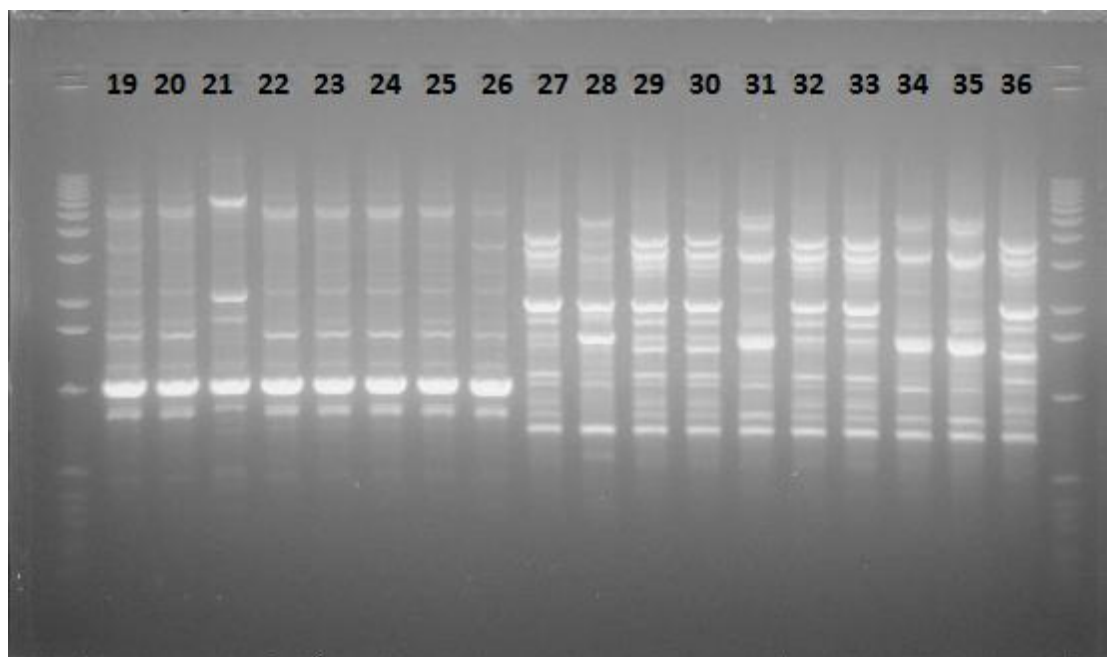
*AM=Άμφισσα

*KO=Κονσερβολιά

*L=οξυγαλακτικά βακτήρια

*Λ=λεία

*A=λευκή



Εικόνα 6.2 : Προϊόντα ηλεκτροφόρησης της ger-PCR για τα βακτήρια που απομονώθηκαν από τις ποικιλίες Άμφισσας (19-30) και Κονσερβολιάς (31-36).

Πίνακας 6.2: Στον πίνακα φαίνονται τα δείγματα που ενισχύθηκαν, η συγκέντρωση του δείγματος καθώς και ο λόγος καθαρότητας του DNA.

A/A	Απομόνωση	C ng/μl	260/280
19	AM-L2	17	1.603
20	AM-L6	12	1.95
21	AM-L17	10	1.637
22	AM-L19	16	1.784
23	AM-L20	21	1.632
24	AM-L21	20	1.956
25	AM-L22	19	1.819
26	AM-L24	21	1.752
27	AM-L27	22	1.643
28	AM-L29	19	1.831
29	AM-L30Λ	23	1.680
30	AM-L35	15	1.981
31	KO-L16	22	1.894
32	KO-L18A	23	1.306
33	KO-L19	28	1.971
34	KO-L21A	18	1.833
35	KO-L22	28	1.773
36	KO-L24	26	1.892

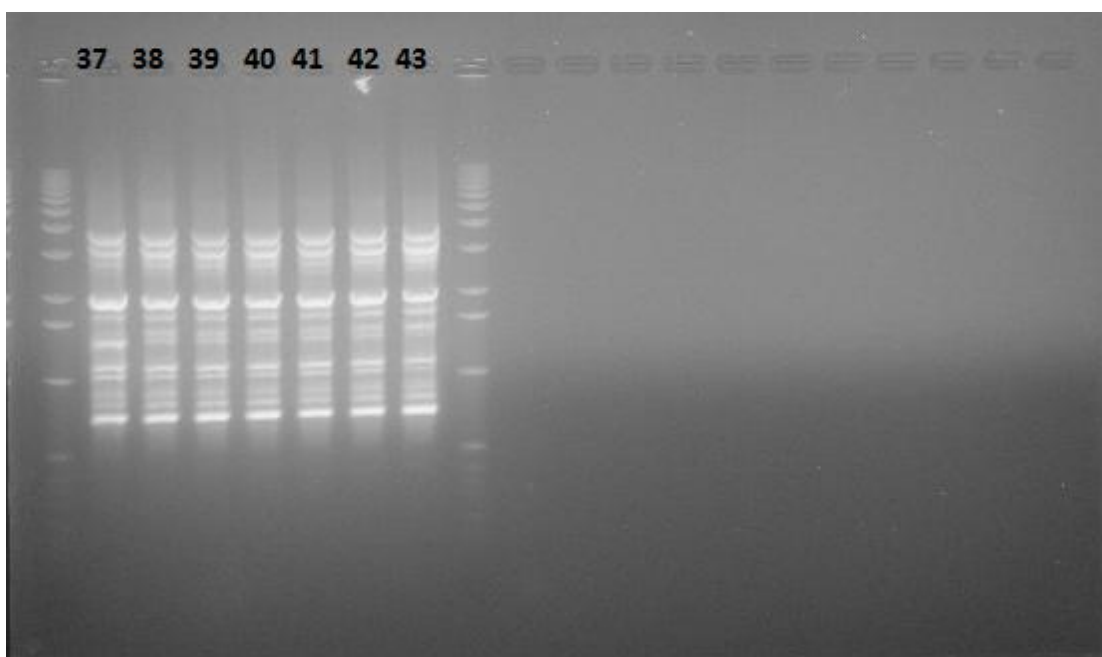
*AM=Άμφισσα

*KO=Κονσερβολιά

*L=οξυγαλακτικά βακτήρια

*Λ=λεία

*A=λευκή



Εικόνα 6.3 : Προϊόντα ηλεκτροφόρησης της ger-PCR για τα βακτήρια που απομονώθηκαν από την ποικιλία Κονσερβολιά (37-43).

Πίνακας 6.3: Στον πίνακα φαίνονται τα δείγματα που ενισχύθηκαν, η συγκέντρωση του δείγματος καθώς και ο λόγος καθαρότητας του DNA.

A/A	Απομόνωση	C ng/μl	260/280
37	KO-L24A	25	1.869
38	KO-L23	26	1.93
39	KO-L18	25	1.943
40	KO-L17	26	1.916
41	KO-L25	23	1.949
42	KO-L21	25	1.95
43	KO-L18μ	20	1.941

*KO=Κονσερβολιά

*L=οξυγαλακτικά βακτήρια

*A=λευκή

*μ=μικρή