

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

**«Μελέτη της ζύμωσης της φυσικής μαύρης ελιάς  
ποικιλίας Καλαμών με τη χρήση επιλεγμένων  
στελεχών ζυμών ως καλλιέργειες εκκίνησης»**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Σοφία Κερκέζου



**Επιβλέπων: Ευστάθιος Πανάγου, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α.**

**Αθήνα, 2017**

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

**«Μελέτη της ζύμωσης της φυσικής μαύρης ελιάς  
ποικιλίας Καλαμών με τη χρήση επιλεγμένων  
στελεχών ζυμών ως καλλιέργειες εκκίνησης»**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Σοφία Κερκέζου



**Επιβλέπων: Ευστάθιος Πανάγου, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α.**

**Αθήνα, 2017**

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

**«Μελέτη της ζύμωσης της φυσικής μαύρης ελιάς  
ποικιλίας Καλαμών με τη χρήση επιλεγμένων  
στελεχών ζυμών ως καλλιέργειες εκκίνησης»**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

Κερκέζου Σοφία

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

**Πανάγου Ευστάθιος, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α.  
Νυχάς Γεώργιος – Ιωάννης, Καθηγητής Γ.Π.Α.  
Τσακαλίδου Ευθυμία, Καθηγήτρια Γ.Π.Α.**

**ΑΘΗΝΑ 2017**

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων στο πλαίσιο του Π.Μ.Σ. «Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του Ανθρώπου».

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα καθηγητή κ. Ευστάθιο Πανάγου που με εμπιστεύτηκε και μου ανέθεσε το θέμα της διπλωματικής μου μελέτης. Επίσης θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για τη στήριξη αλλά και την καθοδήγηση που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια του πειραματικού μέρους καθώς και κατά την συγγραφή του τελικού κειμένου.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Μπονάτσου Σταματούλα για την καθοδήγησή της κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, αλλά και την πλέον φίλη μου, προπτυχιακή φοιτήτρια Παντέρη Ηρώ τόσο για την άψογη συνεργασία που είχαμε κατά την εκτέλεση των πειραμάτων όσο και για τις ευχάριστες στιγμές που περάσαμε μαζί. Ακόμη νοιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω την κ. Τρυφίνοπούλου Πασχαλίτσα, ΕΔΠ του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου για τις συμβουλές και την πολύτιμη βοήθειά της στο χώρο του εργαστηρίου, καθώς επίσης και τον κ. Παραμυθιώτη Σπυρίδωνα, ΕΔΠ του Εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών για τις γνώσεις που μου παρείχε σχετικά με τη μοριακή βιολογία αλλά και στην κατανόηση του βιοπληροφορικού μέρους της μελέτης μου.

Τέλος να επισημάνω πως στην επιτυχή ολοκλήρωση του μεταπτυχιακού μου συντέλεσαν οι συμφοιτητές μου, αλλά και άτομα που δραστηριοποιούνται στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων καθώς με συμβούλευαν, με στήριζαν και δημιουργούσαν με τον τρόπο τους ένα ευχάριστο κλίμα εντός του εργαστηρίου. Τέλος να ευχαριστήσω τους γονείς που με στήριζαν και με βοήθησαν ψυχολογικά καθ' όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η πορεία της ζύμωσης της ελιάς ποικιλίας Καλαμών με τη χρήση καλλιεργειών εκκίνησης από ζύμες που είχαν προηγουμένως απομονωθεί και ταυτοποιηθεί από ζυμώσεις φυσικής μαύρης ελιάς. Τα στελέχη των ζυμών που χρησιμοποιήθηκαν χαρακτηρίστηκαν από προηγούμενη εργασία για το *in vitro* προβιοτικό δυναμικό τους και ήταν: *Pichia kluyveri* Y5, *Metschnikowia pulcherrima* Y14, *Pichia guilliermondii* Y22, *Saccharomyces cerevisiae* Y34 και *Candida molendinolei* Y45. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκαν δύο ενοφθαλμισμοί της άλμης με τα ανωτέρω στελέχη ζυμών σε μονοκαλλιέργεια, ο πρώτος έγινε την 7<sup>η</sup> ημέρα της ζύμωσης ενώ ο δεύτερος την 130<sup>η</sup> ημέρα.

Σκοπός της διατριβής ήταν η μελέτη της επιβίωσης των προαναφερθέντων στελεχών ζυμών, σε διάφορα χρονικά διαστήματα της ζύμωσης, με χρήση μοριακών τεχνικών. Έγινε γενετικός διαχωρισμός των ζυμών που απομονώθηκαν από την άλμη και τον καρπό σε συγκεκριμένα στάδια της ζύμωσης (7<sup>η</sup>, 70<sup>η</sup> και 150<sup>η</sup> ημέρα) που αντιστοιχούν στο αρχικό, ενδιάμεσο και τελικό σημείο της επεξεργασίας. Σε αυτά τα στελέχη πραγματοποιήθηκε ομαδοποίηση με τη μέθοδο της *rep*-PCR και τη χρήση του εκκινητή GTG<sub>5</sub> που ενισχύει παλλίνδρομες διασκορπισμένες αλληλουχίες στο γονιδίωμα των ζυμών. Η ομαδοποίηση των στελεχών με βάση το ηλεκτροφορητικό τους προφίλ πραγματοποιήθηκε με χρήση του προγράμματος Bionumerics. Παράλληλα έγιναν δειγματοληψίες σε τακτά χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια της ζύμωσης για την απαρίθμηση της δυναμικής του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων, ζυμών και εντεροβακτηρίων σε επιλεκτικά υποστρώματα. Παράλληλα καταγράφηκε η μεταβολή της τιμής του pH και της ογκομετρούμενης οξύτητας κατά την διάρκεια της επεξεργασίας.

Παρατηρήθηκε ότι οι ζύμες που απομονώθηκαν κατά τη διάρκεια του πειράματος παρουσιάζουν έντονη ετερογένεια στο πρώτο στάδιο της ζύμωσης (7<sup>η</sup> ημέρα), ενώ κατά το ενδιάμεσο (70<sup>η</sup> ημέρα) και το τελικό στάδιο (150<sup>η</sup> ημέρα) παρατηρούμε το σχηματισμό μεγάλων ομάδων ζυμών με βάση τα αποτελέσματα των αντίστοιχων δένδρογραμμάτων. Είναι χαρακτηριστικό ότι τα επιλεγμένα στελέχη ζυμών που χρησιμοποιήθηκαν ως καλλιέργειες εκκίνησης δεν ανιχνεύθηκαν στο τέλος της ζύμωσης ενώ κανένα στέλεχος από τις επιλεγμένες καλλιέργειες εκκίνησης δεν ανιχνεύθηκε στην άλμη και στον καρπό της ελιάς κατά την 70<sup>η</sup> ημέρα της ζύμωσης, καθώς το γενετικό τους προφίλ διέφερε από τα γενετικά

προφίλ των υπολοίπων ζυμών που απομονώσαμε πιθανότατα λόγω ανταγωνισμού από την αυτόχθονη μικροχλωρίδα της ελιάς.

Σχετικά με τον πληθυσμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων στην άλμη, αρχικά κυμάνθηκε σε 6,5-7,0 log CFU/ml, στη συνέχεια αυξήθηκε σε 8,0 log CFU/ml και σταθεροποιήθηκε σε 6,0 log CFU/ml στο τέλος της επεξεργασίας. Τα εντεροβακτήρια μηδενίστηκαν από τις πρώτες ημέρες της ζύμωσης τόσο στην ελιά όσο και στην άλμη, με τη διαφορά ότι ο αρχικός πληθυσμός αυτών στην ελιά ήταν περίπου 7,0 – 8,0 log CFU/g ενώ στην άλμη 4,0-5,0 log CFU/ml. Τέλος, σχετικά με τη μεταβολή του πληθυσμού των ζυμών στην άλμη παρουσιάστηκε αύξηση της τάξης του ενός λογαρίθμου αμέσως μετά τον εμβολιασμό και από 4 log CFU/ml έφτασε σε 5 log CFU/ml, με ορισμένες περιπτώσεις να αγγίζει και τους 6,0 log CFU/ml. Στην ελιά ο πληθυσμός ξεκίνησε και πάλι από τους 4,0 log CFU/g αυξήθηκε κατά έναν λογάριθμο και κατέληξε τις τελευταίες μέρες να κυμαίνεται στα αρχικά του επίπεδα. Η τιμή του pH κυμάνθηκε από  $5,5 \pm 0,5$  κατά μέσο όρο στην έναρξη της ζύμωσης σε  $4,0 \pm 0,2$  στο τέλος της επεξεργασίας, ενώ η ογκομετρούμενη οξύτητα αυξήθηκε σταδιακά σε  $0,5 \pm 0,1$  % (β/ο) γαλακτικό οξύ κατά μέσο όρο στο τέλος της ζύμωσης (150 ημέρες).

## ABSTRACT

In the present study, the inoculated fermentation of natural black Kalamata olives with selected strains of yeasts as starter cultures was studied. The selected yeast strains used in the fermentations were: *Pichia kluyveri* Y5, *Metschnikowia pulcherrima* Y14, *Pichia guilliermondii* Y22, *Saccharomyces cerevisiae* Y34, and *Candida molendinolei* Y45. In particular, yeasts were inoculated as monocultures in the brines and their survival was monitored using molecular techniques at specific time intervals, namely beginning (day 7), middle (day 70), and end (day 150) of fermentation. The isolated strains were grouped by the rep-PCR method using the GTG<sub>5</sub> primer that amplifies pulsed-scattered sequences in the yeast genome. At the same time, sampling was carried out at regular time intervals during fermentation to allow for the determination of the population dynamics of lactic acid bacteria, yeasts and enterobacteria together with changes in pH values and titratable acidity in the brines.

Results showed that the yeasts isolated during the experiment showed a strong heterogeneity in the early stage of fermentation (day 7), whereas in the middle and final stages of fermentation the formation of large groups of yeasts was observed. None of the inoculated yeast strains survived in any fermentation process due to intense competition from the indigenous microbiota of olives. Regarding the population dynamics of lactic acid bacteria in the brines, they were enumerated at 6.5-7.0 log CFU/ml at the beginning of fermentation, followed by a rapid increase to 8.0 log CFU/ml in the first 10 days of the process and finally stabilized at 6.0 log CFU/ml. A different profile for lactic acid bacteria was observed on olive fruits where the population was maintained stable at 7.0-8.0 log CFU/g with slight variations throughout the process. The counts of enterobacteria declined rapidly from the onset of fermentation and this microbial group could not be enumerated in both brine and olives after 50 days in the majority of fermentation vessels. It needs to be noted that the initial population of enterobacteria was higher on olives (7.0-8.0 log CFU/g) compared to the brine (4.0-5.0 log CFU/ml). Concerning the population changes in yeasts during the process, an increase of 1 log cycle was observed right after the inoculation, from 4.0 to 5.0 log CFU/ml, whereas in certain vessels yeasts were enumerated at 6.0 log CFU/ml. In the case of olive fruits, the initial yeast population was 4.0 log CFU/g and maintained at this level throughout the process. Finally, the values of pH changed from 5.5 to 4.0 at the beginning and end of fermentation, respectively, whereas titratable acidity gradually increased to 0.5 g of lactic acid/100 ml of brine at the end of all processes.

## Πίνακας περιεχομένων

Ευχαριστίες.....	3
Περίληψη.....	4
Abstract.....	6
<b>A. Εισαγωγή.....</b>	<b>8</b>
<b>1. Ελιά.....</b>	<b>8</b>
1.1. Ιστορικά στοιχεία.....	8
1.2. Βοτανικά στοιχεία.....	9
1.3. Οικονομικά στοιχεία.....	10
1.4. Παραγωγή – Κατανάλωση Επιτραπέζιας Ελιάς.....	11
1.5. Χημική σύσταση ελαιοκάρπου.....	11
<b>2. Επεξεργασία ελαιοκάρπου.....</b>	<b>14</b>
<b>3. Ζύμωση ελιάς.....</b>	<b>15</b>
3.1. Προκαταρτικό στάδιο.....	16
3.2. Ενδιάμεσο στάδιο.....	17
3.3. Τελικό στάδιο.....	17
<b>4. Παράγοντες που επηρεάζουν τη διαδικασία της ζύμωσης.....</b>	<b>18</b>
<b>5. Ζύμες.....</b>	<b>19</b>
5.1. Θετικές επιδράσεις ζυμών.....	20
5.2. Αρνητικές επιδράσεις ζυμών.....	27
<b>6. Καλλιέργειες εκκίνησης.....</b>	<b>28</b>
<b>7. Μοριακές τεχνικές.....</b>	<b>33</b>
7.1. Μοριακοί δείκτες.....	33
7.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	34
7.3. Repetitive sequence based PCR (Rep- PCR).....	38
7.4. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.....	39
<b>B. Σκοπός.....</b>	<b>41</b>
<b>Γ. Πειραματική διαδικασία.....</b>	<b>42</b>
<b>Δ. Αποτελέσματα – Συζήτηση.....</b>	<b>49</b>
<b>Ε. Συμπεράσματα.....</b>	<b>86</b>
<b>ΣΤ. Βιβλιογραφία.....</b>	<b>88</b>



# A. Εισαγωγή

## 1. Ελιά

### 1.1. Ιστορικά στοιχεία

Η ελιά όπως αναφέρει ο μύθος ήταν το δώρο της θεάς Αθηνάς στους κατοίκους της πόλης της Αθήνας, οι οποίοι σε ένδειξη ευγνωμοσύνης έδωσαν το όνομα της θεάς στην πόλη τους, η οποία στη συνέχεια τους δίδαξε την καλλιέργειά της. Είναι χαρακτηριστικό το γνωστό επεισόδιο της φιλονικίας της Αθηνάς με τον Ποσειδώνα για το όνομα της Αθήνας (Loussert & Brousse 1980).

Στην Ακρόπολη υπήρχε η ιερή ελιά της Αθηνάς, η πρώτη ελιά που η θεά χάρισε στους Έλληνες, και στην Ακαδημία οι 12 ιερές ελιές, οι μορμύρες, και ο ιερός ελαιώνας από τον οποίο προερχόταν το λάδι που δινόταν ως έπαθλο στους νικητές των Παναθηναίων. Ενδεικτικό της σημασίας της ελιάς για την Αθήνα είναι ότι οι Αθηναίοι στα νομίσματά τους απεικόνιζαν την Αθηνά με στεφάνι ελιάς στο κράνος της και έναν αμφορέα με λάδι ή ένα κλαδί ελιάς. Μια άλλη παράδοση αναφέρει ότι ο Ηρακλής (του οποίου το ρόπαλο ήταν από αγριελιά) έφερε βλαστάρι ελιάς από τη χώρα των Υπερβορείων (μυθικός λαός που οι Έλληνες πίστευαν ότι κατοικούσε πέρα από τον Βορρά ή κατά άλλη ερμηνεία στον ουρανό) και το φύτεψε στην Ολυμπία. Με τα κλαδιά του κότινου, της αγριελιάς αυτής, στεφανώνονταν οι ολυμπιονίκες. Με κλάδους ελιάς ήταν στεφανωμένο και το χρυσελεφάντινο άγαλμα του Διός στην Ολυμπία, έργο του Φειδία, ένα από τα επτά θαύματα του αρχαίου κόσμου. Η καλλιέργεια της ελιάς υπολογίζεται ότι ξεκίνησε πριν από 7.000 χρόνια. Οι έρευνες παρουσιάζουν απολιθώματα ελιάς στον ελληνικό χώρο με την εντυπωσιακή ηλικία των 50.000 - 60.000 ετών ενώ στη δυτική Πελοπόννησο χρονολογήθηκαν με ακρίβεια δείγματα γύρης ελιάς 2.000 ετών. Ξεκινώντας από τα μινωικά και τα μυκηναϊκά χρόνια, ένα πλήθος ευρημάτων στο βασικό ελαιώνα της Ελλάδας, την Πελοπόννησο, την Κρήτη, τα Ιόνια Νησιά, τις Κυκλάδες και την Κύπρο αλλά και σε άλλες περιοχές επιβεβαιώνει τη παρουσία του δέντρου στον ελληνικό χώρο: μεγάλες αποθήκες ελαίου και πιθάρια στην μυκηναϊκή Πύλο, δεκάδες πινακίδες Γραμμικής Α και Β με το χαρακτηριστικό ιδεόγραμμα του ελαιόδεντρου και τοιχογραφίες ελιάς στην Κνωσό ([www.el.wikipedia.org](http://www.el.wikipedia.org)). 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).

Η καλλιέργεια της ελιάς εξαπλώθηκε σε όλη τη λεκάνη της Μεσογείου και σε αυτό συνέβαλαν διάφοροι πολιτισμοί της Μεσογείου όπως οι Φοίνικες, οι Έλληνες και οι Εβραίοι. Εκτός από τη Μεσόγειο, τον XX αιώνα οι άποικοι επέκτειναν τη φύτευση των ελαιόδεντρων και τη διαδικασία παραγωγής των ελιών σε χώρες του τότε νέου κόσμου όπως στην Καλιφόρνια, Μεξικό και Σαν Ντιέγκο. Κατά τον ίδιο τρόπο οι μισθοφόροι μετέφεραν το ελαιόδεντρο και το διάδωσαν σε χώρες όπως η Αυστραλία, η νότια Αφρική καθώς και σε χώρες της Άπω Ανατολής όπως την Ιαπωνία (Connell 1994).

## 1.2. Βοτανικά στοιχεία

Η ελιά ανήκει στην οικογένεια Oleaceae και η βοτανική ονομασία της είναι *Olea europaea*. Ένα από τα χαρακτηριστικά των ειδών του γένους *Olea* sp. 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).

Υπάρχουν σήμερα περισσότερα από 850 εκατομμύρια παραγωγικών δέντρων ελιάς και 1000 ποικιλίες ελιάς, 139 από τις οποίες περιλαμβάνονται στον παγκόσμιο κατάλογο ποικιλιών ελιάς του Διεθνούς Συμβουλίου Ελαιοκομίας (IOOC 1990). Αυτές οι 139 ποικιλίες βρίσκονται σε 23 χώρες, αν και η εξάπλωση της καλλιέργειας της ελιάς εντοπίζεται στην περιοχή της Μεσογείου, με την Ελλάδα να καλύπτει 765.000 στρέμματα καλλιεργούμενης έκτασης με ελιές και να παράγει 405.600 τόνους λάδι, δηλαδή το 19,7% της παραγωγής στην Ευρωπαϊκή Ένωση, καθώς επίσης και 104.300 τόνους επιτραπέζιας ελιάς που αντιστοιχεί στο 16,0% της συνολικής παραγωγής της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Niaounakis and Halvadakis 2006).

Η ποικιλία «Καλαμών» αποτελεί μια από τις καλύτερες ποικιλίες για επιτραπέζια χρήση και χρησιμοποιείται για την παρασκευή του γνωστού και μοναδικού στον κόσμο εμπορικού τύπου «φυσικές μαύρες ελιές ελληνικού τύπου» (Greek style natural black olives). Το δέντρο είναι αρκετά εύρωστο, τα κλαδιά του έχουν αναρριχητική τάση και χαρακτηριστικά μεγάλα φύλλα. Ο καρπός έχει σχήμα κυλινδροκωνικό και για το λόγο αυτό η ποικιλία ονομάζεται και αετονυχολιά ή αετονυχιά Καλαμών. Κατά μέσο όρο ο καρπός έχει βάρος 5-6 γρ. και ο πυρήνας είναι λείος και αποσπάται εύκολα από τη σάρκα. Σαν δέντρο είναι μέτριας παραγωγικότητας, απαιτητικό σε εδαφική και ατμοσφαιρική υγρασία, ανθεκτικό στην αλατότητα του εδάφους καθώς και στο βερτισίλιο. Ως προς την ωρίμανση του καρπού θεωρείται μεσοπρώιμη ποικιλία και ωριμάζει από τα τέλη Νοεμβρίου έως το Δεκέμβριο. Θα

πρέπει να σημειωθεί ότι η ποικιλία ωριμάζει τον καρπό της πρώιμα, δηλαδή το Νοέμβριο, αν το φορτίο είναι μειωμένο ή αργά το Δεκέμβριο, αν το φορτίο της είναι βαρύ. Θεωρείται ποικιλία ανθεκτική στην προσβολή του δάκου και έχει ειδικές απαιτήσεις ως προς το έδαφος, την υγρασία και το μικροκλίμα της περιοχής καλλιέργειάς της. Πιο συγκεκριμένα απαιτεί μέσης σύστασης γόνιμα εδάφη με τιμή pH 7,0. Κατά την περίοδο της ανθοφορίας-καρπώδεσης απαιτεί μειωμένη ατμοσφαιρική υγρασία, ενώ κατά την περίοδο έντονης ξηρασίας των θερινών μηνών έχει ανάγκη (ανάλογα με τον τύπο του εδάφους) από τρεις ή και περισσότερες αρδεύσεις για να δώσει ικανοποιητικό για εμπορία μέγεθος καρπού. Τέλος, θα πρέπει να αναφερθεί ότι είναι απαιτητική ποικιλία σε ηλιακή ακτινοβολία και παρουσιάζει σε αρκετές περιπτώσεις βλαστομανία. (Kailis *et al.* 2007)

### 1.3.Οικονομικά-εμπορικά στοιχεία

Τα τελευταία δεκαπέντε χρόνια η εμπορευσιμότητα του καρπού της ποικιλίας Καλαμών αυξάνεται με πολύ γοργούς ρυθμούς. (Κυριτσάκης 2007). Ο ιδιαίτερος τρόπος επεξεργασίας της ελιάς Καλαμών και η συντήρηση του τελικού προϊόντος σε άλμη στην οποία έχει προστεθεί ξύδι (οξάλμη) προσδίδει ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά στο προϊόν που τυγχάνει ιδιαίτερης εκτίμησης στις διεθνείς αγορές.

Σήμερα υπολογίζεται ότι η παραγωγή μεταποιημένου προϊόντος υπερβαίνει τους 55.000 τόνους ετησίως και αναμένεται στα επόμενα 10 χρόνια η παραγωγή του συγκεκριμένου εμπορίου τύπου να φτάσει τους 100.000 τόνους (ΔΟΕΠΕΛ 2017). Από αυτούς ποσοστό περίπου 85% εξάγεται στις ΗΠΑ, ΕΕ και τρίτες χώρες, ενώ οι υπόλοιποι οδηγούνται στην εγχώρια κατανάλωση. Οι τιμές που απολαμβάνουν οι παραγωγοί τα τελευταία τρία χρόνια θεωρούνται ικανοποιητικές, αφού ο μέσος όρος τους κυμαίνεται μεταξύ 1-2 €/κιλό αναλόγως μεγέθους, που καθορίζεται με διάφορες διαβαθμίσεις της τιμής σε τεμάχια ανά κιλό. Εδώ θα πρέπει να σημειωθεί ότι η αυξημένη ζήτηση για μεγάλου μεγέθους καρπούς έχει οδηγήσει τις τιμές μέχρι και 2,5 €/κιλό. Φυσικά οι τιμές λιανικής πώλησης του προϊόντος έπειτα από επεξεργασία και τυποποίηση φθάνουν πολύ ψηλότερα. Ενδεικτικά αναφέρουμε ότι η πρώτη ποιότητα καρπών που εμπορικά χαρακτηρίζονται με τον όρο Giants φθάνουν σε αρκετές περιπτώσεις να πωλούνται περισσότερο από 2 € τα 250 γραμμάρια προϊόντος (ICAP 2014).

#### 1.4. Παραγωγή- Κατανάλωση Επιτραπέζιας Ελιάς

Οι επιτραπέζιες ελιές είναι ένα από τα σημαντικότερα ζυμούμενα προϊόντα φυτικής προέλευσης στην βιομηχανία των τροφίμων με εκτιμώμενη παγκόσμια παραγωγή που υπερβαίνει τα 2 εκατομμύρια τόνους το χρόνο (IOC 2016). Η ανάπτυξη αυτού του προϊόντος σχετίζεται κυρίως με τις Μεσογειακές χώρες, με την Ισπανία, την Ιταλία, την Ελλάδα, την Αίγυπτο και την Τουρκία να αποτελούν τις κύριες χώρες παραγωγής.

Σύμφωνα με το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιοκομίας (International Olive Council) η Ευρωπαϊκή Ένωση κατέχει το 33,7% της παγκόσμιας παραγωγής επιτραπέζιας ελιάς. Η Ελλάδα συνεισφέρει σημαντικά στο ποσοστό αυτό, καθώς είναι η τρίτη χώρα παραγωγής επιτραπέζιας ελιάς στην Ευρώπη. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι για την ελαιοκομική περίοδο 2016/17 η παγκόσμια παραγωγή εκτιμάται ότι θα διαμορφωθεί σε 2.736.500 τόνους παρουσιάζοντας αύξηση 3%. Η αύξηση αυτή αποδίδεται σύμφωνα με το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιοκομίας στην αυξημένη παραγωγή ορισμένων χωρών όπως η Αίγυπτος με 500.000 τόνους (+ 6%), η Τουρκία με 433.000 τόνους (+ 9%), η Ελλάδα με 234.000 τόνους (+23%), το Ιράν με 75.000 τόνους (+ 10%). Ωστόσο, η Ισπανία, η πρώτη παραγωγός χώρα, θα σημειώσει μείωση περίπου 16% (IOC 2016)

Όσον αφορά στην κατανάλωση της επιτραπέζιας ελιάς, τις πρώτες θέσεις καταλαμβάνουν κατά σειρά η Ισπανία, η Γαλλία και η Ιταλία και άλλες. Η Ελλάδα με ετήσια κατανάλωση 15.000 τόνων επιτραπέζιας ελιάς καταλαμβάνει την 7<sup>η</sup> θέση. (<http://www.internationaloliveoil.org/>)

#### 1.5. Χημική σύσταση του ελαιόκαρπου

##### **Υγρασία**

Η υγρασία αποτελεί το σπουδαιότερο συστατικό της σάρκας του νωπού καρπού καθώς περιέχεται σε ποσοστό 60-70% (β/β). Ωστόσο, όσο χαμηλότερο είναι το ποσοστό της υγρασίας του μεσοκαρπίου, τόσο υψηλότερη είναι η θρεπτική και ενεργειακή αξία της ελιάς. Η περιεκτικότητα του νωπού καρπού σε νερό είναι υπεύθυνη για τη διατήρηση της σπαργής του και της μη αφυδάτωσής του επάνω στο δέντρο. Ο νωπός καρπός μπορεί να συρρικνωθεί μόνο κάτω από ακραίες συνθήκες του περιβάλλοντος ή λόγω γήρανσης (Kailis *et al.* 2007). Η περιεκτικότητα του ελαιόκαρπου σε υγρασία ποικίλλει και εξαρτάται κυρίως από το στάδιο συγκομιδής του καρπού καθώς επίσης και από τη μέθοδο της καλλιέργειας που εφαρμόζεται (ξηρικά ή ποτιστικά ελαιόδενδρα). Κατά την επεξεργασία του ελαιόκαρπου παρατηρείται μείωση του ποσοστού υγρασίας.

### **Λιπαρές ουσίες**

Η περιεκτικότητα του νωπού καρπού σε λιπαρές ουσίες κυμαίνεται από 20 μέχρι 25% (β/β). Το 98% των λιπαρών ουσιών στον ελαιόκαρπο αποτελούν τα τριγλυκερίδια, τα διγλυκερίδια (1,1%) ενώ υπάρχουν και ελεύθερα λιπαρά οξέα σε ποσοστό 0,3%. Το κυριότερο λιπαρό οξύ είναι το ελαϊκό και ακολουθούν το παλμιτικό, το λινολεϊκό, το λινολενικό και το στεατικό. Κατά την ωρίμανση και την αύξηση του βάρους του ελαιόκαρπου υπάρχει διακύμανση της περιεκτικότητάς του στα διάφορα λιπαρά οξέα. Στο ελαϊκό οξύ παρατηρείται αύξηση κατά την ωρίμανση, ενώ στα υπόλοιπα μείωση κατά την αύξηση του βάρους του καρπού. Τέλος, στον καρπό συναντάμε φωσφολιπίδια και γαλακτολιπίδια τα οποία υπάρχουν στις μεμβράνες των κυττάρων του καρπού και αυξάνονται με την ανάπτυξή του. (Κυριτσάκης 1993).

### **Υδατάνθρακες**

Η περιεκτικότητα των ολικών υδατανθράκων κυμαίνεται από 8-12% (β/β). Η σάρκα του νωπού καρπού περιέχει τόσο διαλυτά σάκχαρα όσο και πολυμερή σακχάρων. Τα διαλυτά σάκχαρα αποτελούν η γλυκόζη, η φρουκτόζη, ημανιτόλη και η σακχαρόζη, με κυρίαρχη τη γλυκόζη. Τα σάκχαρα αυτά αποτελούν το 0,5-5% του βάρους του νωπού καρπού, συμμετέχουν σε μεταβολικές διαδικασίες και αποτελούν τα ζυμώσιμα συστατικά του ελαιόκαρπου. Στα πολυμερή των σακχάρων ανήκουν η κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη, η λιγνίνη και η πηκτίνη. Οι δύο πρώτες αποτελούν δομικά συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων και η μείωσή τους οδηγεί στη διαφοροποίηση των κιναισθητικών οργανοληπτικών χαρακτηριστικών της ελιάς. Οι πηκτίνες είναι ειδικά σάκχαρα πολυγαλακτουρονικού οξέος και αποτελούν δομικά συστατικά των κυττάρων. Κατά την υδρόλυσή τους, η σάρκα χάνει την υφή της και μαλακώνει. Έχει βρεθεί ότι κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης η συγκέντρωση των σακχάρων στον ελαιόκαρπο μειώνεται καθώς αυξάνεται η ποσότητα του ελαιολάδου που συντίθεται. Για το λόγο αυτό έχει αποδοθεί συσχέτιση ανάμεσα στη μείωση των σακχάρων και τη βιοσύνθεση του ελαιολάδου (Garrido Fernández *et al.* 1997).

### **Φαινολικές ενώσεις**

Ο καρπός της ελιάς είναι πλούσιος σε φαινολικές ουσίες, η συγκέντρωση των οποίων κυμαίνεται από 1-3 % επί νωπού βάρους ανάλογα με την ποικιλία (Fernández Díez *et al.* 1972). Η σημαντικότερη φαινολική ουσία είναι η ελευρωπαΐνη, η οποία περιέχεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα φύλλα του ελαιόδενδρου (60-90 mg/g επί ξηρού βάρους) (Tassou 1993).

Για να μπορέσει να καταναλωθεί η ελιά πρέπει η ελευρωπαϊνή να υποστεί υδρόλυση είτε με τη δράση οξέων και αλκάλων ή με τη δράση ενζύμων. Το μόριο της ελευρωπαϊνής περιέχει ένα γλυκοζιτικό και έναν εστερικό δεσμό. Με την ενζυμική υδρόλυση αυτή η ελευρωπαϊνή 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-φαινυλ-αιθανόλη. Συγκεκριμένα η ενζυμική υδρόλυση της ελευρωπαϊνής γίνεται με το ένζυμο β-γλυκοζιδάση με τη δράση του οποίου απελευθερώνεται γλυκόζη (που χρησιμοποιείται από τους οργανισμούς ως πηγή άνθρακα) και ένα άγλυκο μόριο εστέρα. Το τελευταίο μετατρέπεται σε πιο απλά παράγωγα όπως το ελενολικό οξύ (άπικρη ουσία), με την δράση του ενζύμου εστεράση. Η εκκρίση αυτή απαιτεί ένα στάδιο ζύμωσης των ελιών σε άλμη για ορισμένους μήνες ή την χρήση NaOH (μέθοδος ισπανικού τύπου) (Ciafardini *et al.* 1994).

Παρόλα αυτά, μελέτες έχουν δείξει ότι η ελευρωπαϊνή είναι μια ιδιαίτερα σημαντική ουσία καθώς παρουσιάζει αντιμικροβιακή δράση έναντι παθογόνων μικροοργανισμών και μυκήτων που παράγουν τοξίνες (Fleming *et al.* 1969,1973, Walter *et al.* 1973, Garrido Fernández & Vaughn 1978, Federici & Bonghi 1983, Tassou *et al.* 1991, Ruiz-Barba *et al.* 1993, Tassou 1993, Tassou & Nychas 1994,1995, Rozes & Peres 1996).

### **Πρωτεΐνες**

Η περιεκτικότητα του καρπού σε πρωτεΐνη είναι χαμηλή και κυμαίνεται μεταξύ του 1-3% επί νωπού βάρους ανάλογα με την ποικιλία (Fernández-Díez *et al.* 1991). Οι διαλυτές πρωτεΐνες είναι ιδιαίτερα σημαντικές κατά τη ζύμωση, καθώς τα οξυγαλακτικά βακτήρια για να ξεκινήσουν τη ζύμωση, χρειάζονται εκτός από τα σάκχαρα και αμινοξέα πρωτεϊνών. Κατά την επεξεργασία του ελαιοκάρπου παρατηρείται μείωση της περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη.

### **Χρωστικές**

Οι χρωστικές διακρίνονται σε δύο κατηγορίες τις λιποδιαλυτές και τις υδατοδιαλυτές. Στις λιποδιαλυτές χρωστικές ανήκουν η χλωροφύλλη η οποία έχει πράσινο χρώμα και είναι υπεύθυνη για την φωτοσύνθεση, καθώς και τα α- και β- καροτένια τα οποία όπως και οι τριτερπενικοί υδατάνθρακες έχουν κίτρινο χρώμα. Αντίθετα, στις υδατοδιαλυτές χρωστικές ανήκουν οι ανθοκυάνες με μωβ-μαύρο χρώμα. Κατά την ωρίμαση του καρπού της ελιάς η χλωροφύλλη μειώνεται ενώ το β-καροτένιο και οι ανθοκυάνες αυξάνονται. (Minguez-Monsquera *et al.* 1989, 1991).

## **Ιχνοστοιχεία**

Ο ελαιόκαρπος είναι πολύ καλή πηγή ιχνοστοιχείων. Περιέχει σε μεγάλη συγκέντρωση ανόργανα στοιχεία όπως K, Ca, P, Na, Mg και S, ενώ σε μικρότερες ποσότητες Fe, Zn, Cu, Mn, N και Βο. Τα επίπεδα εξαρτώνται από την ποικιλία, την ωριμότητα του καρπού καθώς και από τη διαδικασία μεταποίησής του. Τα ανόργανα συστατικά ως υδατοδιαλυτά χάνονται σε μεγάλο ποσοστό στα διάφορα στάδια επεξεργασίας του καρπού, με εξαίρεση το νάτριο λόγω της χρήσης άλατος στη δημιουργία της άλμης, καθώς και της προσθήκης του καυστικού νατρίου για τις Ισπανικού τύπου επιτραπέζιες ελιές.

## **Βιταμίνες**

Οι βιταμίνες διακρίνονται στις υδατοδιαλυτές στις οποίες ανήκουν οι βιταμίνες C, B1, B2 και B6 και στις λιποδιαλυτές στις οποίες ανήκουν πρόδρομες ενώσεις της βιταμίνης A και η βιταμίνη E (τοκοφερόλες). Βιταμίνες υπάρχουν στον ελαιόκαρπο αλλά μπορούν να αυξηθούν με τη μικροβιακή δραστηριότητα κατά τη ζύμωση της ελιάς (Kailis & Harris 2007). Κατά την επεξεργασία της επιτραπέζιας ελιάς οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες χάνονται, ενώ οι λιποδιαλυτές οι οποίες έχουν και αντιοξειδωτική δράση παραμένουν.

## **Οργανικά οξέα**

Τα οργανικά οξέα περιέχονται στη σάρκα της ελιάς σε μικρές συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 0,5-1 % επί νωπού βάρους (Garrido Fernández *et al.* 1997). Τα κύρια οργανικά οξέα της σάρκας του ελαιόκαρπου είναι το κιτρικό, το οξαλικό και το μηλικό οξύ. Η περιεκτικότητά τους στον ελαιόκαρπο εξαρτάται από την ποικιλία της ελιάς, την ωριμότητά της και τις συνθήκες καλλιέργειας. Ο Μπαλατσούρας (1995) αναφέρει ότι τα οργανικά οξέα δεν έχουν ιδιαίτερη σημασία στην επεξεργασία της πράσινης ελιάς Ισπανικού τύπου, καθώς εξουδετερώνονται με την προσθήκη της ελιάς στο καυστικό νάτριο. Αντίθετα, τα οργανικά οξέα έχουν ιδιαίτερη σημασία στη ζύμωση της φυσικής μαύρης ελιάς, διότι εκχυλίζονται στην άλμη και δημιουργούν στα αρχικά στάδια της ζύμωσης ένα ελαφρώς όξινο περιβάλλον που είναι απαραίτητο για την ομαλή έναρξη της ζύμωσης.

## **2. Επεξεργασία ελαιοκάρπου**

Ο ελαιόκαρπος συλλέγεται στο στάδιο της πλήρους ωρίμανσης αλλά όχι της υπερωρίμανσης, όταν έχει αποκτήσει βαθύ μελανοϊώδες χρώμα και συνεκτική υφή. Η συγκομιδή της ελιάς Καλαμών πραγματοποιείται ως εξής. Αρχικά τοποθετούνται κάτω από το δέντρο και γύρω από τον κορμό του ελαιόπανα και στη συνέχεια οι ελιές συγκομίζονται

με τα χέρια ή με πλαστικές χτένες και κατ' εξαίρεση σε ψηλά δέντρα ή απομακρυσμένα σημεία της κόμης, η συλλογή γίνεται με ραβδισμό ο οποίος όμως δε συνιστάται γιατί τραυματίζει τις ελιές και το δέντρο. Με το τέλος της συγκομιδής των καρπών απομακρύνονται οι κλαδίσκοι και τα φύλλα καθώς και οι καρποί που είναι ακατάλληλοι για επεξεργασία (Μπαλατσούρας 1992). Μετά τη συλλογή οι καρποί τοποθετούνται σε πλαστικούς περιέκτες (τελάρα), με λείες εσωτερικές επιφάνειες για να μην τραυματίζονται οι ελιές και μεταφέρονται στους χώρους επεξεργασίας.

Οι ελιές της ποικιλίας Καλαμών υφίστανται επεξεργασία με βάση την ελληνικού τύπου μέθοδο παρασκευής φυσικών μαύρων ελιών σε άλμη. Τα διάφορα στάδια που ακολουθούνται για την παρασκευή αυτού του τύπου επιτραπέζιας ελιάς είναι τα ακόλουθα (IOOC 1990):

- Συγκομιδή
- Μεταφορά στο χώρο επεξεργασίας
- Ταξινόμηση
- Πλυσίματα με νερό
- Τοποθέτηση σε άλμη
- Ζύμωση των ελιών
- Ταξινόμηση και κατάταξη κατά μέγεθος
- Συσκευασία

### **3. Ζύμωση ελιάς**

Ζύμωση ορίζεται η διαδικασία κατά την οποία οργανικές ενώσεις όπως τα σάκχαρα, υφίστανται βιοχημικές μεταβολές από τη δράση μικροοργανισμών ή ενζύμων παράγοντας οξέα, αιθανόλη, διοξείδιο του άνθρακα και άλλους μεταβολίτες. Στην τεχνολογία των τροφίμων με τον όρο ζύμωση εννοούμε την παραγωγή διαφόρων εδώδιμων και γενικά ωφέλιμων προϊόντων με την ελεγχόμενη δράση μικροοργανισμών πάνω στα γεωργικά προϊόντα ή τα υποπροϊόντα αυτών (Μπλούκας 2004). Η προέλευση της τεχνολογίας της ζύμωσης των τροφίμων τοποθετείται στην αρχαιότητα. Η ζύμωση αποτελεί μέθοδο επεξεργασίας και παραγωγής νέων προϊόντων, γνωστά ως ζυμούμενα προϊόντα ή τρόφιμα και μέθοδο συντήρησης των προϊόντων πρωτογενούς παραγωγής. Η μέθοδος αυτή παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα καθώς χρησιμοποιεί ήπιες συνθήκες επεξεργασίας οι οποίες διατηρούν και συχνά βελτιώνουν τη θρεπτική αξία και την πεπτικότητα των τροφίμων. Επιπλέον, παράγει προϊόντα με χαρακτηριστικό άρωμα και υφή, έχει μικρές απαιτήσεις σε



ενέργεια λόγω των ήπιων συνθηκών επεξεργασίας που εφαρμόζονται. Οι κύριες ζυμώσεις που εφαρμόζονται στη βιομηχανία τροφίμων για παραγωγή νέων προϊόντων είναι η γαλακτική ζύμωση, η αλκοολική και η οξική.

Η διαδικασία της ζύμωσης της ελιάς πραγματοποιείται μέσα σε άλμη. Τα σάκχαρα ως υδατοδιαλυτές ουσίες διαχέονται από την σάρκα του ελαιοκάρπου στην άλμη δημιουργώντας ένα κατάλληλο υπόστρωμα στο οποίο θα αναπτυχθεί η ενδογενής μικροχλωρίδα, κυρίως οξυγαλακτικά βακτήρια και ζύμες, αρχίζοντας έτσι τη διαδικασία της ζύμωσης. Κατά τη ζύμωση, οι μικροοργανισμοί μεταβολίζουν τα σάκχαρα του ελαιοκάρπου παράγοντας γαλακτικό οξύ.

### **3.1.Το προκαταρκτικό στάδιο.**

Το στάδιο αυτό διαρκεί 7-14 ημέρες και αρχίζει τη στιγμή που οι ελιές θα καλυφθούν με την άλμη και ολοκληρώνεται όταν αποκατασταθεί το ισοζύγιο της κατανομής των ζυμώσιμων υλικών και των προϊόντων της ζύμωσης μεταξύ νωπού καρπού και άλμης. Στην αρχή του σταδίου αυτού, οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται εξαρτώνται από την κυρίαρχη μικροχλωρίδα του νωπού καρπού, το νερό, τον εξοπλισμό, κ.α. Η αυτόχθονη μικροχλωρίδα του καρπού της ελιάς διαφέρει ανάλογα με την ποικιλία, αλλά εξαρτάται και από τον τόπο καλλιέργειας, την ωριμότητα του καρπού, τις καλλιεργητικές τεχνικές, την εποχή του χρόνου, το μικροκλίμα της περιοχής, τη χρήση ή όχι φυτοφαρμάκων καθώς και από την κατάσταση στην οποία βρίσκεται ο καρπός και τη διαδικασία μεταποίησης (Pelagatti *et al.* 1980, Tassou *et al.* 1993).

Στον καρπό της ελιάς έχει καταγραφεί μεγάλη ποικιλία μικροοργανισμών που ανήκουν κυρίως στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια όπως αυτά της οικογένειας *Enterobacteriaceae* και του γένους *Pseudomonas*. Έχουν επίσης ανιχνευτεί θετικά κατά Gram βακτήρια του γένους *Clostridium*, ζύμες και περιστασιακά μύκητες (Heperkan 2013). Επικρατούν τα αρνητικά κατά Gram αερόβια βακτήρια (*Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp.) τα οποία αποτελούν την κυρίαρχη ενδογενή μικροχλωρίδα του καρπού. (Tassou 1993). Σημαντική επίσης είναι η παρουσία ορισμένων θετικών κατά Gram βακτηρίων όπως το *Clostridium butyricum* αλλά και του *Bacillus* spp., τα οποία σχετίζονται με την βουτυρική ζύμωση και την παραγωγή πηκτινολυτικών ενζύμων αντίστοιχα και προκαλούν αλλοίωση του τελικού προϊόντος. Οι μικροοργανισμοί αυτοί καταμετρούνται τις 2-3 πρώτες μέρες, ενώ παύουν να ανιχνεύονται μετά από τις 10-14 ημέρες της ζύμωσης.

### 3.2. Το ενδιάμεσο στάδιο

Η διάρκεια αυτού του σταδίου είναι 2-3 εβδομάδες. Επικρατούν τα οξυγαλακτικά βακτήρια τα οποία μεταβολίζουν τα σάκχαρα παράγοντας γαλακτικό οξύ με αποτέλεσμα να μειώνεται η τιμή του pH και να αυξάνεται η τιμή της ογκομετρούμενης οξύτητας στην άλμη.

### 3.3. Το τελικό στάδιο

Στο τελικό στάδιο έχουμε συνέχεια της γαλακτικής ζύμωσης έως ότου εξαντληθούν τα ζυμώσιμα συστατικά και η ογκομετρούμενη οξύτητα και το pH φτάσουν στα επιθυμητά επίπεδα.

Συγκεκριμένα, όσον αφορά στη μικροβιολογία της ζύμωσης, κατά το ξεκίνημά της παρατηρείται ανάπτυξη των μικροοργανισμών που ανήκουν στην οικογένεια *Enterobacteriaceae*. Κατά τη διάρκεια όμως της ζύμωσης, οι μικροοργανισμοί της οικογένειας αυτής μειώνονται σταδιακά και δεν ανιχνεύονται στο τέλος της επεξεργασίας. Είδη των γενών *Clostridium* και *Pseudomonas* ανιχνεύονται επίσης στην αρχή της ζύμωσης. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και εξαιτίας του χαμηλού pH είναι αδύνατον να επιβιώσουν μέχρι το τέλος. Σύμφωνα με το Διεθνές Ελαιοκομικό Συμβούλιο (IOOC 2004), η μέγιστη τιμή του pH για τους καρπούς που συντηρούνται με βάση τα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά είναι 4,1, ενώ για αυτούς που διατηρούνται έπειτα από παστερίωση είναι 4,3 (Montaño *et al.* 2010). Το παθογόνο βακτήριο *Clostridium botulinum* έχει απομονωθεί μόνο από θερμικά επεξεργασμένο/κονσερβοποιημένο προϊόν όπου το pH είχε υπερβεί την τιμή 4,6. Επιπλέον, το φυτοπαθογόνο στέλεχος *Pseudomonas savastanoi*, που προκαλεί τη φυματίωση της ελιάς, έχει απομονωθεί μόνο από ακατέργαστες ελιές. Κάτω από κατάλληλες συνθήκες επεξεργασίας, είδη των γενών *Clostridium* και *Pseudomonas* δεν αποτελούν πρόβλημα στις ζυμούμενες ελιές (Heperkan 2013).

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια μετατρέπουν τα σάκχαρα σε γαλακτικό οξύ και άλλα οργανικά οξέα και αποτελούν τα πιο σημαντικά βακτήρια κατά την επεξεργασία της επιτραπέζιας ελιάς (Heperkan 2013). Όπως είναι γνωστό, τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι οι κύριοι μικροοργανισμοί για την οξίνιση της άλμης στην οποία βασίζεται η σταθερότητα του τελικού προϊόντος (Botta *et al.* 2014). Στις ζυμούμενες ελιές έχουν ανιχνευτεί τόσο ομοζυμωτικά οξυγαλακτικά βακτήρια που ανήκουν στα γένη *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp. και *Pediococcus* spp. όσο και ετεροζυμωτικά του γένους *Leuconostoc* spp. και ορισμένα *Lactobacillus* spp.

Μαζί με τα οξυγαλακτικά βακτήρια, οι ζύμες παίζουν καθοριστικό ρόλο στη ζύμωση των επιτραπέζιων ελιών. Καθώς τα οξυγαλακτικά βακτήρια μειώνονται κατά τη ζύμωση της φυσικής μαύρης ελιάς λόγω της παρουσίας των φαινολικών ενώσεων, οι ζύμες κυριαρχούν και συνεισφέρουν σημαντικά στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των επιτραπέζιων ελιών. Τα πιο συχνά γένη ζυμών που συναντάμε είναι *Candida*, *Pichia*, *Saccharomyces*, ενώ συναντώνται επίσης και γένη όπως *Debaryomyces*, *Issatchenkia*, *Zygorulaspota* και *Wickerhamomyces*. (Marquin *et al.* 1992, Garrido-Femández *et al.* 1997). Η συνεισφορά των ζυμών στη ζύμωση της επιτραπέζιας ελιάς δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως μέχρι σήμερα. Πιστεύεται πάντως ότι με την παραγωγή πτητικών ουσιών κυρίως αιθανόλης και ακεταλδεΐδης συμβάλλουν στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος, κυρίως στην οσμή (Fleming *et al.* 1969).

Οι μύκητες εμφανίζονται στις ελιές σε μικρότερο βαθμό και η ανάπτυξή τους είναι υπεύθυνη για την υποβάθμιση της υφής (μαλάκωμα) του ιστού της ελιάς, τη γεύση και την οσμή μούχλας και την ανάπτυξη μυκοτοξινών (Heperkan *et al.* 2006). Οι σημαντικότεροι μύκητες ανήκουν στα γένη *Aerobasidium* spp., *Geotrichum* spp. και *Penicillium* spp.

#### **4. Παράγοντες που επηρεάζουν την διαδικασία της ζύμωσης.**

Η διαδικασία της ζύμωσης είναι ένα πολυπαραγοντικό φαινόμενο. Οι παράγοντες οι οποίοι την επηρεάζουν είναι κυρίως ενδογενείς όπως το pH, η ενεργότητα νερού, η διαθεσιμότητα θρεπτικών στοιχείων, τα οργανικά οξέα, η παρουσία αντιμικροβιακών ουσιών, η δομή της επιδερμίδας του καρπού καθώς επίσης και εξωγενείς όπως η θερμοκρασία, η συγκέντρωση NaCl, η προσθήκη ζυμώσιμων συστατικών, η χρήση καλλιεργειών εκκίνησης (Srygroulou & Nychas 1999).

Ο έλεγχος της θερμοκρασίας κατά τη ζύμωση σε επίπεδα όπου τα οξυγαλακτικά βακτήρια παρουσιάζουν τη μέγιστη δραστηριότητά τους (20-25°C) αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες. Επίσης ο έλεγχος και η συνεχής διόρθωση της αλατοπεριεκτικότητας εντός των δοχείων ζύμωσης.

Όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία της ζύμωσης, το προϊόν θα έχει αποκτήσει συγκεκριμένες φυσικοχημικές ιδιότητες όπως αλατοπεριεκτικότητα, pH και οργανικά οξέα που το καθιστούν σταθερό και ασφαλές χωρίς να είναι απαραίτητη η θερμική επεξεργασία. 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, Duran Quintana *et al.* 1971, Gonzalez Cancho *et al.* 1975). Η συγκέντρωση αυτή μειώνεται

σημαντικά, περίπου στο μισό, όταν αποκατασταθεί το ισοζύγιο άλατος μεταξύ σάρκας του καρπού και άλμης (Εξαρχος & Λεγάκης 1968). Κάτω από χαμηλές συγκεντρώσεις άλατος είναι δυνατόν να επικρατήσουν τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια και να οδηγήσουν σε εκτροπή τη ζύμωση, με τη δημιουργία σοβαρών ασθενειών όπως η αεριοπάθηση και η zarateria. 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 διαδικασία της ζύμωσης είναι μία αργή διαδικασία λόγω του αργού ρυθμού εκχύλισης των σακχάρων και των υπόλοιπων διαλυτών συστατικών καθώς επίσης και της παρουσίας της ελευρωπαϊνης. Έτσι για την περιγραφή της, μπορεί να διαχωριστεί σε τρία διακριτά στάδια: α) το προκαταρκτικό, β) το ενδιάμεσο και γ) το τελικό (Tassou 1993, Garrido - Fernández 1997).

Σημαντική είναι επίσης η προσθήκη άλατος μετά το πέρας της ζύμωσης και εφόσον οι ελιές θα παραμείνουν στις δεξαμενές ζύμωσης κατά το καλοκαίρι. Σε αυτή την περίπτωση η συγκέντρωση του άλατος θα πρέπει να αυξηθεί στο 8,5-9,0% προκειμένου να αποτραπεί η ανάπτυξη των προπιονικών βακτηρίων τα οποία θα προκαλέσουν δευτερογενείς ζυμώσεις και υποβάθμιση της ποιότητας του προϊόντος (Borbolla y Alcalá *et al.* 1975, Rejano Navarro *et al.* 1978, Gonzalez-Cancho *et al.* 1980).

Σχετικά με την οξίνιση της άλμης είναι επιθυμητή η μείωση της αρχικής τιμής 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 οξέως κατάλληλου (food grade) για τρόφιμα, ενώ είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν και άλλα οξέα όπως οξικό οξύ και υδροχλωρικό οξύ κατάλληλο για τρόφιμα (Duran Quintana *et al.* 1991, 1994, Garcia Garcia *et al.* 1992, Fernández González *et al.* 1993, Garrido Fernández *et al.* 1997).

## 5. Ζύμες

Οι ζύμες είναι μονοκύτταροι ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί με μεγάλη σημασία στη βιομηχανία τροφίμων και ποτών. (Querol & Fleet 2006). Ταξινομούνται στο βασίλειο των

μυκήτων με περισσότερα από 1.500 αναγνωρισμένα είδη (Kurtzman & Fell 2006). Τα γενικά χαρακτηριστικά που αποδίδονται στις ζύμες είναι τα ακόλουθα (Μπαλατσούρας 2006):

- Είναι ευρείας διαδόσεως στη φύση όπως και τα βακτήρια.
- Ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των ζυμών κατέχει ενδιάμεση θέση μεταξύ εκείνου των βακτηρίων και των μυκήτων.
- Οι ζύμες στην πλειοψηφία τους είναι μεσόφιλοι μικροοργανισμοί και εμφανίζουν το βέλτιστο ανάπτυξής τους στην περιοχή 25-28°C. Ελάχιστα είδη ζυμών αναπτύσσονται σε θερμοκρασία ανώτερη των 30°C (*Cyniclomyces guttulatus*, *Pityrosporium ovalis*, παράσιτα θερμόαιμων ζώων) ενώ πολλά είδη μπορεί να αναπτυχθούν σε θερμοκρασίες 0-15°C (*Rhotodorula* spp.).
- Οι ζύμες στο σύνολό τους είναι οξεόφιλοι μικροοργανισμοί. Προτιμούν ελαφρώς ή μετρίως όξινο περιβάλλον με pH μεταξύ 4,5-6,5. Τα είδη των ζυμών που αναπτύσσονται σε μικρότερες τιμές pH ( $\approx 3,7$ ) και στην ουδέτερη ή αλκαλική περιοχή (7-8) είναι περιορισμένα. Έτσι, έχουν την ικανότητα να αλλοιώνουν τρόφιμα με ελαφρώς ή καταφανώς όξινη αντίδραση, ενώ σπάνια αλλοιώνουν τρόφιμα που δεν έχουν υποστεί γαλακτική ζύμωση.
- Οι ζύμες έχουν εκπροσώπους που αντέχουν σε μεγάλη ωσμωτική πίεση του υποστρώματος (ωσμόφιλες, ωσμοανθεκτικές, αλόφιλες, αλοανθεκτικές). Με αυτόν τον τρόπο, επιβιώνουν σε τρόφιμα πλούσια σε σάκχαρα ή σε αλάτι στα οποία η ενεργότητα του νερού είναι χαμηλή.
- Ως προς τις απαιτήσεις τους σε οξυγόνο οι ζύμες κατατάσσονται στις αυστηρώς αερόβιες (οξειδωτικές) και στις προαιρετικά αναερόβιες.

### 5.1. Θετικές επιδράσεις των ζυμών στη ζύμωση της ελιάς

Για πολλά χρόνια η έρευνα σχετικά με τη χρήση καλλιιεργειών εκκίνησης στη ζύμωση των ελιών ήταν εστιασμένη στα οξυγαλακτικά βακτήρια. Τα τελευταία χρόνια ωστόσο, άρχισε να δίνεται έμφαση και να ερευνάται ο ρόλος και η σημαντικότητα των ζυμών κατά την επεξεργασία της επιτραπέζιας ελιάς. Οι έρευνες εστιάστηκαν τόσο στις τεχνολογικές εφαρμογές των ζυμών ως καλλιέργειες εκκίνησης όσο και στην συμβολή τους στην ανθρώπινη υγεία (προβιοτικές και λειτουργικές ιδιότητες).

Η χρήση των ζυμών μπορεί να ενισχύσει τεχνολογικά τη διαδικασία της ζύμωσης με συγκεκριμένους τρόπους:

- **Ενίσχυση οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του καρπού**

Οι ζύμες έχουν την ικανότητα να παράγουν ενώσεις όπως αιθανόλη, γλυκερόλη, ανώτερες αλκοόλες, εστέρες και άλλες πτητικές ενώσεις οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία της γεύσης και στη διατήρηση της υφής κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (Carrido *et al.* 1995, Arroyo-López *et al.* 2008, 2012). Ορισμένοι παράγοντες μπορούν να συνεισφέρουν στο παραγόμενο άρωμα των ζυμών. Στους παράγοντες αυτούς ανήκουν οι αλλαγές στις συνθήκες της ζύμωσης όπως η διαφορετική θερμοκρασία, το pH, ο αερισμός, η φύση και η συγκέντρωση του υποστρώματος. Στην ενίσχυση του αρώματος από τις ζύμες σημαντικό ρόλο παίζουν τα ένζυμα λιπάση και εστεράση τα οποία εμφανίζονται σε αρκετά στελέχη ζυμών της ελιάς. Μέσω της δραστηριότητάς τους παρατηρείται αύξηση των ελεύθερων λιπαρών οξέων τα οποία αποτελούν πρόδρομες ενώσεις για το σχηματικό ποικίλων αρωματικών ουσιών (Hernandez *et al.* 2007, Roderiguez-Gomez *et al.* 2010, 2012, Arroyo-López *et al.* 2012).

#### ■ **Παράγοντες βιοελέγχου**

Οι ζύμες μπορεί να θεωρηθούν παράγοντες βιοελέγχου καθώς παράγουν ουσίες όπως η αιθανόλη και τοξικές πρωτεΐνες ή γλυκοπρωτεΐνες οι οποίες καλούνται θανατηφόροι παράγοντες (killer factors). Οι ουσίες αυτές μπορούν να αναστείλλουν την ανάπτυξη των μυκήτων και άλλων μη επιθυμητών ζυμών και βακτηρίων (Viljoe 2006, Arroyo-López *et al.* 2012). Με αυτόν τον τρόπο μπορούν να περιοριστούν οι ανάγκες για μεγάλη συγκέντρωση άλατος και συντηρητικών οι οποίες υπό διαφορετικές συνθήκες θα ήταν αναγκαίες για την σταθερότητα του προϊόντος.

#### ■ **Αντιοξειδωτική δράση**

Οι θετικές στην καταλάση ζύμες συμβάλλουν στη διατήρηση του καρπού ενάντια στην οξείδωση του από τα ακόρεστα λιπαρά οξέα που περιέχει και στον σχηματισμό περοξειδίων (Hernandez *et al.* 2007, Arroyo-López *et al.* 2012). Οι ζύμες έχουν την ικανότητα να συνθέτουν βιοενεργές ενώσεις όπως τα καροτενοειδή, το κιτρικό οξύ και τοκοφερόλες με σημαντική αντιοξειδωτική δράση (Abbas 2006, Arroyo-López *et al.* 2008).

#### ■ **Ενίσχυση της ανάπτυξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων**

Οι ζύμες εμφανίζονται ως ενεργοί μικροοργανισμοί κατά τη ζύμωση της επιτραπέζιας ελιάς συνθέτοντας ουσίες όπως βιταμίνες, αμινοξέα και πουρίνες ή διασπώντας σύνθετους υδατάνθρακες, οι οποίοι είναι απαραίτητοι για την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων του γένους *Lactobacillus* (Viljoen 2006).

#### ■ **Αποδόμηση πολυφαινολών**

Οι επιτραπέζιες ελιές υποβάλλονται σε χημική επεξεργασία με καυστικό νάτριο (NaOH) προκειμένου να διασπαστεί η ελευρωπαΐνη η οποία προσδίδει τη χαρακτηριστική πικρή

γεύση στον καρπό. Πολλές ζύμες όπως και οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν την ικανότητα να αποδομούν την ελευρωπαΐνη και να μειώνουν τη συγκέντρωσή της στον καρπό της ελιάς, στην άλμη καθώς και στα λύματα που παράγονται κατά την επεξεργασία του προϊόντος. Η δράση του ενζύμου β-γλυκοζιδάση που διαθέτουν πολλά στελέχη ζυμών έχει την ικανότητα να βιοδιασπά τα φαινολικά συστατικά και μπορεί να οδηγήσει στη μείωση μεγάλων ποσοτήτων λυμάτων που παράγονται κατά την επεξεργασία τη ελιάς και τη δημιουργία ενός περισσότερο φυσικού προϊόντος (Argoyo-López *et al.* 2008).

#### ■ **Ικανότητα αύξησης σε υψηλές συγκεντρώσεις άλατος**

Η ζύμωση της φυσικής μαύρης ελιάς γίνεται μέσα σε άλμη που περιέχει 8-10% (β/ο) NaCl, συγκεντρώσεις που για ορισμένα στελέχη ζυμών μπορεί να δρουν παρεμποδιστικά στην ανάπτυξή τους. Το γεγονός αυτό φανερώνει τη σημασία της ικανότητας ανάπτυξης των ζυμών σε υψηλές συγκεντρώσεις άλατος καθώς με αυτό τον τρόπο καθορίζονται όχι μόνο ποια στελέχη θα αναπτυχθούν κατά την ζύμωση, αλλά και ποιο στέλεχος θα κυριαρχήσει καθώς και οι μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις (Romero-Gil *et al.* 2013).

Ανεξάρτητα από τις τεχνολογικές ιδιότητες των ζυμών που αναφέραμε παραπάνω, η εφαρμογή τους κατά την επεξεργασία της επιτραπέζιας ελιάς θα μπορούσε να έχει ευεργετικές επιδράσεις και στην ανθρώπινη υγεία, όπως:

#### ■ **Προβιοτική δράση**

Σύμφωνα με το FAO/WHO (2001) ως προβιοτικά ορίζονται οι ζωντανοί μικροοργανισμοί οι οποίοι όταν χορηγηθούν σε επαρκείς ποσότητες έχουν ευεργετική επίδραση στην υγεία του ανθρώπου. Οι μικροοργανισμοί αυτοί πρέπει να είναι ασφαλείς για τον καταναλωτή και μεταβολικά ενεργοί μέσα στο γαστρεντερικό σωλήνα. Τα προβιοτικά προσλαμβάνονται είτε ως συστατικά τροφίμων είτε ως μη τροφικά παρασκευάσματα που χρησιμοποιούνται ως βιοθεραπευτικοί παράγοντες (Argoyo-López *et al.* 2012). Οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί είναι συνήθως ανθρώπινης προέλευσης και δεν είναι παθογόνοι. Επίσης, είναι επιθυμητή η ακινητοποίησή τους στο επιθήλιο του εντέρου, η ανταγωνιστική δράση έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών καθώς και η ανθεκτικότητά τους σε αντιβιοτικές ουσίες. Οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί διατηρούνται ζωντανοί όταν βρίσκονται σε λυοφιλωμένη μορφή καθώς και όταν εμβολιάζονται σε ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα.

Οι επιτραπέζιες ελιές μελετώνται ως φορείς προβιοτικών μικροοργανισμών που εισέρχονται στον άνθρωπο με την κατανάλωση του τελικού προϊόντος. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν μεγάλη εφαρμογή στον συγκεκριμένο τομέα τα τελευταία χρόνια. Πρόσφατα

τα προβιοτικά χαρακτηρίστηκαν ως ζωντανοί μικροοργανισμοί που παρουσιάζουν αντοχή στις γαστρικές, χολικές και παγκρεατικές εκκρίσεις, προσκολλώνται στα επιθηλιακά κύτταρα και δημιουργούν αποικίες στο έντερο του ανθρώπου (Del Piano *et al.* 2006, Sahadeva *et al.* 2011). Ωστόσο, οι ζύμες παρουσιάζουν εξίσου μεγάλο ενδιαφέρον όσον αφορά στην προβιοτική τους δράση. Ένας σημαντικός αριθμός ζυμών που απομονώθηκε από την επιφάνεια ελαιόκαρπου επιβίωσε κατά την πέψη στον γαστρεντερικό σωλήνα, παρεμπόδισε την ανάπτυξη παθογόνων βακτηρίων και εμφάνισε ικανότητα προσκόλλησης σε καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα, ενώ παράλληλα είχε και ανοσοδιεγερτική δράση. Απαραίτητα προαπαιτούμενα για να θεωρηθούν οι ζύμες αυτές εν δυνάμει προβιοτικοί μικροοργανισμοί είναι η ικανότητα προσκόλλησής τους στην επιφάνεια του ελαιόκαρπου, η επιβίωση κατά την αποθήκευση και συντήρησή του και παράλληλα η δυνατότητα πρόσληψης από τους καταναλωτές σε υψηλούς πληθυσμούς (Argoyo-López *et al.* 2012). Για τον λόγο αυτό, μελετήθηκε ο σχηματισμός βιοϋμενίων από ζύμες και οξυγαλακτικά βακτήρια, πολλά από τα οποία έχουν την ικανότητα να προσκολλώνται και να σχηματίζουν αποικίες στην επιφάνεια του ελαιόκαρπου. Ο σχηματισμός των συγκεκριμένων βιοϋμενίων βελτιώνει παράλληλα και τη βιωσιμότητά τους κατά την πέψη (Argoyo-López *et al.* 2012, Dominguez-Manzano *et al.* 2012).

Η περισσότερο διαδεδομένη μορφή χορήγησης των προβιοτικών μικροοργανισμών είναι μέσω των ζυμούμενων τροφίμων και των αναψυκτικών. Στην Ευρώπη, ο τομέας των γαλακτοκομικών προϊόντων καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος στην αγορά των προβιοτικών. Τα προϊόντα με τη μεγαλύτερη κατανάλωση είναι τα προβιοτικά γιαούρτια και τα προϊόντα γάλακτος που έχουν υποστεί ζύμωση. Μερικά από τα προβιοτικά τρόφιμα περιέχουν επιπλέον βιοενεργά συστατικά όπως φυτικές στανόλες και στερόλες που μειώνουν τα επίπεδα της χοληστερόλης (Hilliam 1998). Οι πρώτες αναφορές σχετικά με την μείωση των επιπέδων χοληστερόλης στο αίμα έγιναν την δεκαετία του 60 όπου παρατηρήθηκε σε πολεμιστές στην Κέννα ότι καταναλώνοντας 4 λίτρα γάλα ζυμώμενο με άγρια στελέχη βακτήρια γαλακτικού οξέος ημερησίως είχαν χαμηλότερα επίπεδα χοληστερόλης στο αίμα. Από τότε ξεκίνησαν να γίνονται έρευνες σε ζώα αλλά και σε ανθρώπους. (Lay- Gaik Ook *et al.* 2010).

Επίσης πολλοί άνθρωποι υποφέρουν από δυσανεξία στη λακτόζη, δηλαδή αδυναμία του οργανισμού να μεταβολίσει την λακτόζη, το βασικό σάκχαρο του γάλακτος. Αυτή η αδυναμία οφείλεται στην έλλειψη του ενζύμου λακτάση, που κανονικά παράγεται από κύτταρα του λεπτού εντέρου. Εκτιμάται ότι περίπου 70% των ενηλίκων παγκοσμίως εμφανίζουν μειωμένη παραγωγή λακτάσης. Τα ποσοστά δυσανεξίας στη λακτόζη ποικίλουν από περιοχή σε περιοχή του κόσμου, και μπορεί να κυμαίνονται από 5% στη Βόρεια Ευρώπη



έως 70% στη Σικελία και πάνω από 90% σε κάποιες χώρες της Ασίας και της Αφρικής. Στην Ελλάδα εκτιμάται ότι περίπου 30% των παιδιών κάτω των 5 ετών εμφανίζουν κάποια ανεπάρκεια λακτάσης και συνακόλουθα συμπτώματα δυσανεξίας στη λακτόζη, ενώ το ποσοστό αυξάνεται πριν την εφηβεία (<https://el.wikipedia.org>). Έτσι λοιπόν έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον η χρήση προβιοτικών σε τρόφιμα η χορήγηση των οποίων μπορεί να συμβάλλει στην αποκατάσταση της χλωρίδας του εντέρου και κατ'επέκταση στην καταπολέμηση της πάθησης. Έτσι λοιπόν οι προβιοτικές ελιές αποτελούν ένα εναλλακτικό τρόφιμο για την ενίσχυση του οργανισμού τους με προβιοτικά στελέχη.

- Τα προβιοτικά τρόφιμα πρέπει να είναι ασφαλή και να περιλαμβάνουν τον κατάλληλο αριθμό προβιοτικών μικροοργανισμών σε επαρκή ποσότητα την στιγμή της κατανάλωσης. Τότε παρέχουν μια σειρά από οφέλη για την υγεία, κυρίως μέσω της διατήρησης της φυσιολογικής εντερικής μικροχλωρίδας και την προστασία έναντι γαστρεντερικών παθογόνων (D'Aimmo *et al.* 2007, Lourens-Hattingh & Viljoen, 2001), της ενίσχυσης του ανοσοποιητικού συστήματος (Gilliland 1991), την μείωση του επιπέδου της χοληστερόλης στον ορό και της αρτηριακής πίεσης, της αντικαρκινογόνου δράσης (Sadaf Ajmal & Nuzhat Ahmed 2009), της βελτίωσης της χρησιμοποίησης των θρεπτικών ουσιών και της διατροφικής αξίας των τροφίμων (Lourens-Hattingh & Viljoen 2001).

Βιοαποικοδόμηση των φυτικών συμπλόκων  
Το φυτικό οξύ αποτελεί την κύρια μορφή αποθήκευσης του φωσφόρου στους ώριμους σπόρους των φυτών και βρίσκεται σε αφθονία στον ελαιόκαρπο. Το φυτικό οξύ λόγω της ικανότητάς του να σχηματίζει χηλικές ενώσεις με ιόντα μετάλλων όπως το ασβέστιο, ο σίδηρος και το μαγνήσιο, δημιουργεί αδιάλυτα σύμπλοκα, η διάσπαση των οποίων απαιτεί ειδικά ένζυμα. Επειδή στον ανθρώπινο γαστρεντερικό σωλήνα απουσιάζουν αυτά τα ένζυμα, η αποφωσφορυλίωση των φυτικών συμπλόκων καταλύεται από ένζυμα των ζυμών (Olstorpe *et al.* 2009, Mosleji-Jenabian *et al.* 2010, Arroyo-López *et al.* 2012).

#### ■ Βιοενίσχυση με βιταμίνες

Το φολικό οξύ είναι απαραίτητος παράγοντας στη βιοσύνθεση των νουκλεοτιδίων και στον κυτταρικό διπλασιασμό. Η πρόσληψη σημαντικής ποσότητας φολικού οξέος μειώνει τον κίνδυνο καρδιακών ασθενειών και του καρκίνου. Οι ζύμες ακολουθούν το βιοσυνθετικό μονοπάτι παραγωγής φολικού οξέος (Moslehi-Jenabian *et al.* 2010, Arroyo-López *et al.* 2012).

#### ■ Μείωση των επιπέδων χοληστερόλης

Η αύξηση των επιπέδων χοληστερόλης στο αίμα αποτελεί σημαντικό κίνδυνο για εμφάνιση χρόνιων καρδιαγγειακών νοσημάτων στον άνθρωπο. Ορισμένοι μικροοργανισμοί

εμφανίζουν ικανότητα μείωσης των επιπέδων αυτών εξαιτίας διαφόρων παραγόντων όπως η υδρολυτική τους δράση στα χολικά άλατα, ο δεσμός των μικροβιακών κυττάρων με τη χοληστερόλη και η βιοαφομοίωσή της (Begley *et al.* 2006, Arroyo-Lopez *et al.* 2012). Σύμφωνα με μελέτες, στελέχη ζυμών απομονωμένα από επιτραπέζιες ελιές παρουσίασαν ικανότητα μείωσης της χοληστερόλης σε ποσοστά πάνω από 60% κάτι το οποίο υποδεικνύει ότι θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν με βιοθεραπευτικό σκοπό (Kourelis *et al.* 2010, Arroyo-López *et al.* 2012).

#### ■ Παραγωγή βιοενεργών ενώσεων και φυσικών αντιοξειδωτικών

Ορισμένα είδη ζυμών παράγουν φυσικά αντιοξειδωτικά όπως καροτενοειδή, τοκοφερόλες, κιτρικό οξύ, ασκορβικό οξύ (Abbas 2006). Επιπλέον, η παραγωγή βιοενεργών ενώσεων επιβραδύνει την οξείδωση των λιπαρών ουσιών και βελτιώνει την ανθρώπινη υγεία (Arroyo-López *et al.* 2012).

#### ■ Βιοαποδόμηση ή βιοαπορρόφηση μυκοτοξινών

Στελέχη της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* παρουσιάζουν αποτοξινωτική δράση που οφείλεται στην προσκόλληση μυκοτοξινών σε συστατικά του κυτταρικού της τοιχώματος (Franzetti *et al.* 2011, Arroyo-López *et al.* 2012). Οι ζύμες αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν ώστε να μειώσουν τα επίπεδα των μυκοτοξινών τόσο απευθείας πάνω στον ελαιόκαρπο όσο και μέσα στο ανθρώπινο γαστρεντερικό σωλήνα σε περίπτωση που η τοξίνη έχει προσληφθεί.

Συνοψίζοντας όλα τα παραπάνω, γίνεται εμφανές ότι λόγω τόσο της αρνητικής όσο και της θετικής επίδρασης που παρουσιάζουν οι ζύμες στη ζύμωση της ελιάς, υπάρχει συνεχές και αυξανόμενο ενδιαφέρον για την εξέλιξη των τεχνικών που αφορούν την ταξινόμηση, την ταυτοποίησή τους καθώς και τη χρήση τους στη ζύμωση της επιτραπέζιας ελιάς.

### **Ενζυμική δραστηρότητα**

Οι περισσότερες αντιδράσεις στους ζωντανούς οργανισμούς δεν εκτελούνται με ικανοποιητικούς ρυθμούς χωρίς κατάλυση. Οι καταλύτες των βιολογικών αντιδράσεων είναι πρωτεϊνικής φύσεως μόρια που καλούνται ένζυμα. Η μελέτη της ενζυμικής δραστηρότητας αποτελεί κρίσιμο σημείο στην επιλογή των ζυμών ως καλλιέργειες εκκίνησης καθώς μπορεί να ενισχύσει ή και να μειώσει την ποιότητα της πρώτης ύλης με την παραγωγή ορισμένων μεταβολιτών και δευτερευόντων συστατικών. Όσον αφορά στις επιτραπέζιες ελιές, η ενζυμική δραστηρότητα των ζυμών περιλαμβάνει τόσο επιθυμητά όσο και ανεπιθύμητα χαρακτηριστικά. Παρακάτω θα αναλυθούν οι δράσεις των κυριότερων ενζύμων με έμφαση στη ζύμωση της επιτραπέζιας ελιάς:

### ■ Εστεράση και λιπάση

Η λιπολυτική ικανότητα των ενζύμων αυτών αποτελεί επιθυμητό χαρακτηριστικό, καθώς μέσα από τον καταβολισμό των ελεύθερων λιπαρών οξέων ενισχύεται η γεύση της επιτραπέζιας ελιάς με τον σχηματισμό πτητικών ουσιών (Hernandez *et al.* 2007, Rodriguez-Gomez *et al.* 2012). Οι ουσίες που σχετίζονται με την δραστηριότητα αυτή είναι η αιθανόλη, η γλυκερόλη, ανώτερες αλκοόλες, εστέρες και άλλες πτητικές ουσίες (Garrido-Fernandez *et al.* 1997).

### ■ β-Γλυκοζιδάση

Η βασική ιδιότητα του ενζύμου αυτού σχετίζεται με την αποδόμηση των φαινολικών συστατικών και συγκεκριμένα στην περίπτωση της επιτραπέζιας ελιάς με την αποδόμηση της ελευρωπαΐνης. Με αυτόν τον τρόπο γίνεται φανερό ότι μπορούμε να αντικαταστήσουμε τις χημικές μεθόδους εκπίκρισης του καρπού με βιολογική προσέγγιση (Bevilacqua *et al.* 2012).

### ■ Αλκαλική φωσφατάση

Πρόκειται για ένα υδρολυτικό ένζυμο υπεύθυνο για την αφαίρεση φωσφορικών ομάδων από πολλά είδη μορίων όπως τα νουκλεοτίδια, οι πρωτεΐνες και τα αλκαλοειδή. Η διαδικασία αφαίρεσης των φωσφορικών ομάδων καλείται αποφωσφορυλίωση. Κατά τη διαδικασία αυτή πραγματοποιείται η απελευθέρωση ανόργανου φωσφόρου που καθίσταται διαθέσιμος και διευκολύνεται η μεταφορά του μέσω των μεμβρανών στο κύτταρο (Arroyo Lopez *et al.* 2012).

Σύμφωνα με έρευνες πολλά είδη μικροοργανισμών θεωρείται ότι έχουν προβιοτικό δυναμικό. Σήμερα στα τρόφιμα χρησιμοποιούνται ευρέως τα γένη *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*. Κύρια αιτία είναι τόσο λόγω της μακράς ιστορίας ασφαλούς χρήσης τους στα τρόφιμα, αλλά και επειδή τα βακτήρια του γένους *Lactobacillus* είναι κυρίαρχοι μικροοργανισμοί στο λεπτό έντερο και του γένους *Bifidobacterium* στο παχύ έντερο. Τα τελευταία χρόνια γίνονται έρευνες σχετικές με την χρήση ορισμένων ζυμών που φαίνεται να έχουν θετική επίδραση στην ανθρώπινη υγεία (Salomeh Moslehi-Jenabian *et al.* 2010). Στη συγκεκριμένη δημοσίευση αναφέρεται εκτός των άλλων και το είδος *Saccharomyces cerevisiae*, η πιο κοινή ζύμη που χρησιμοποιείται στη ζύμωση των τροφίμων, η οποία έχει δείξει ενδιαφέρουσες τεχνολογικές ιδιότητες, μεταξύ των οποίων είναι η προβιοτική της δράση (*Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*). Επίσης κάποια είδη ζυμών συμβάλλουν στη μείωση καρδιαγγειακών νοσημάτων, στη

νόσο του Αλτσχάιμερ (*Saccharomyces exiguous* και *Candida lambica*) (Witthuhn *et al.* 2005, Patring *et al.* 2006), σε νευρολογικής φύσεως ασθένειες, βιοαποδομούν ορισμένες μυκοτοξίνες (*Phaffia rhodozyma*, *Xanthophyllomyces dendrorhous*) έχουν αντιφλεγμονώδη δράση, κ.α. (Hjortmo 2005).

Διαφορετικά είδη ζυμών όπως *Debaryomyces hansenii*, *Torulasporea delbrueckii*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lodderae* έχουν παρουσιάσει ανθεκτικότητα κατά τη διέλευση από τον γαστρεντερικού σωλήνα του ανθρώπου και συμβάλουν στην καταπολέμηση εντεροπαθήσεων (Kumura *et al.* 2004, Sazawal *et al.* 2006).

Όσον αφορά στο είδος *Saccharomyces cerevisiae* var *bouardii* έχει αποδειχθεί η ικανότητα προσκόλλησής του στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου, η παραγωγή παραγόντων που εξουδετερώνουν βακτηριακές τοξίνες αλλά και η διαμόρφωση του μονοπατιού σηματοδότησης κυττάρου-ξενιστή που συνδέεται με προ-φλεγμονώδη απόκριση κατά τη διάρκεια της βακτηριακής μόλυνσης (Sazawal *et al.* 2006). Για την εμφάνιση του ευεργετικού αποτελέσματος απαιτείται συγκεκριμένος αριθμός κυττάρων του προβιοτικού μικροοργανισμού. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, για την καθημερινή κατανάλωση προβιοτικών μικροοργανισμών ο προτεινόμενος αριθμός είναι  $10^8$  έως  $10^9$  κύτταρα/mL ή και  $10^9$  έως  $10^{10}$  κύτταρα/mL όταν αναμένονται σημαντικές απώλειες ύστερα από την παραμονή στο περιβάλλον του στομάχου (Sanders 2007).

## **5.2.Αρνητικές επιδράσεις των ζυμών στη ζύμωση της ελιάς**

Ο σημαντικότερος σκοπός της ζύμωσης είναι η συντήρηση των καρπών με την παραγωγή γαλακτικού οξέος το οποίο παράγεται κυρίως από τα στελέχη των ειδών *Lactobacillus pentosus* και *Lactobacillus plantarum*. Ένα ασφαλές και σταθερό προϊόν θα πρέπει να έχει τιμή pH μικρότερη από 4,3, διαφορετικά είναι δυνατή η βλάστηση των σπορίων του *Clostridium botulinum* καθώς επίσης και η ανάπτυξη/επιβίωση των αλλοιογόνων εντεροβακτηριων για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (Garrido - Fernández *et al.* 1997). Γενικά τα οξυγαλακτικά βακτήρια υπερτερούν πληθυσμιακά έναντι των ζυμών κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας της ελιάς. Ωστόσο σε ορισμένες περιπτώσεις οι ζύμες μπορούν να κυριαρχήσουν στη ζύμωση με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός προϊόντος με ηπιότερη γεύση και μικρότερη διάρκεια συντήρησης. Αυτό για πρώτη φορά παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια της ζύμωσης της φυσικής μαύρης ελιάς σε διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl στην άλμη (Tassou *et al.* 2002). Η υπερβολική αύξηση των ζυμών έναντι των οξυγαλακτικών

βακτηρίων θα μπορούσε επίσης να οδηγήσει στην έντονη παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα, το οποίο εισέρχεται στην ελιά και δημιουργεί σχισμές στο μεσοκάρπιο που οδηγούν στην υποβάθμιση της ποιότητας του καρπού που είναι γνωστή με την ονομασία «Alabrand» (Vaughn *et al.* 1972, Durán Quitana *et al.* 1979, Fernández Díez *et al.* 1985). Η επικράτηση των ζυμών οφείλεται στην αυξημένη συγκέντρωση του NaCl στην άλμη κατά τη διάρκεια της ζυμωτικής διαδικασίας (>8%).

Ένα ακόμη μη επιθυμητό χαρακτηριστικό ορισμένων ζυμών είναι η υποβάθμιση της υφής (μαλάκωμα) του ελαιοκάρπου εξαιτίας της παραγωγής ορισμένων ενζύμων όπως πρωτεάσες, ξυλανάσες, πηκτινάσες. Επίσης έχουν βρεθεί συγκεκριμένα στελέχη ζυμών τα οποία προκαλούν την ανάπτυξη υμενίων στην επιφάνεια της άλμης και αλλοιώνουν τον καρπό κατά τη διάρκεια αποθήκευσής του λόγω των πολυγαλακτουρονασών που παράγουν (Vaughn *et al.* 1969).

## 6. Καλλιέργειες εκκίνησης

Η ζύμωση της επιτραπέζιας ελιάς πραγματοποιείται κυρίως από την αυτόχθονη μικροχλωρίδα του καρπού. Τα δομικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος βελτιώνονται με τη χρήση καλλιεργειών εκκίνησης, ενώ παράλληλα μπορεί να μειωθεί ο κίνδυνος για ανάπτυξη αλλοιογόνων και παθογόνων μικροοργανισμών. Επομένως, η χρήση καλλιεργειών εκκίνησης είναι ιδιαίτερης σημασίας στη ζύμωση της ελιάς, καθώς συμβάλλουν στον έλεγχο της ασφάλειας και της ποιότητας του τελικού προϊόντος.

Οι καλλιέργειες εκκίνησης αποτελούν παρασκευάσματα ζωντανών μικροοργανισμών των οποίων η μεταβολική δραστηριότητα έχει επιθυμητή επίδραση στο υπόστρωμα της ζύμωσης (DFG-Senate Commission of Food Safety 2010, Bevilacqua *et al.* 2012).

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται αυξανόμενο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη και χρήση καλλιεργειών εκκίνησης στη ζύμωση της επιτραπέζιας ελιάς προκειμένου να διασφαλιστεί ελεγχόμενη διαδικασία ζύμωσης (Panagou *et al.* 2008, Corsetti *et al.* 2012).

Τα κυριότερα στελέχη που χρησιμοποιούνται σήμερα για την δημιουργία καλλιεργειών εκκίνησης είναι τα οξυγαλακτικά βακτήρια *Lactobacillus plantarum* και *Lactobacillus pentosus*, τα οποία είναι κυρίως υπεύθυνα για τη ζύμωση της επιτραπέζιας ελιάς (Borbolla y Alcalá & Rejano Navarro 1979, Vaughn 1982, van den Berg *et al.* 1993). Τα στελέχη

κυκλοφορούν στο εμπόριο σε λυοφιλωμένη μορφή, και πριν προστεθούν στην άλμη θα πρέπει να δραστηριοποιηθούν σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας.

Πιο συγκεκριμένα, από δεδομένα που έχουν προκύψει από διάφορες μελέτες (Garcia Garcia *et al.* 1992, Fernandez Gonzalez *et al.* 1993, Montano *et al.* 1993, Durân Quintana *et al.* 1999, Spyropoulou & Nychas 1999, Spyropoulou *et al.* 2001), ο ρόλος των καλλιιεργειών εκκίνησης που έχουν επιλεγεί βάσει των ιδιοτήτων τους είναι:

- (i) Η βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών της επιτραπέζιας ελιάς
- (ii) Η ελεγχόμενη διαδικασία της ζύμωσης
- (iii) Η διατήρηση και βελτιστοποίηση των διατροφικών και ωφέλιμων χαρακτηριστικών του προϊόντος
- (iv) Η παρεμπόδιση ανάπτυξης ανεπιθύμητων αλλοιόγονων ή παθογόνων μικροοργανισμών κατά τη ζύμωση
- (v) Η παραγωγή επιτραπέζιας ελιάς που θα αποτελεί φορέα μικροοργανισμών με προβιοτικό δυναμικό
- (vi) Η εξασφάλιση της σταθερότητας του τροφίμου και η επέκταση της διάρκειας ζωής του.

Παρόλα αυτά, η επιλογή και εφαρμογή συγκεκριμένων εναρκτήριων στελεχών εμφανίζει ποικίλες δυσκολίες. Οι συνθήκες που επικρατούν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης μπορεί να αναστείλουν την ανάπτυξη και να παρεμποδίσουν την επιβίωση των επιλεγμένων καλλιιεργειών.

Γίνεται λοιπόν κατανοητό ότι η επιλογή μικροοργανισμών απομονωμένων από το περιβάλλον της επεξεργασίας της επιτραπέζιας ελιάς με επιθυμητά χαρακτηριστικά ως καλλιιεργειες εκκίνησης, μπορεί να συμβάλλει στη βελτίωση της επεξεργασίας και της ποιότητας του τελικού προϊόντος. Παρόλα αυτά όμως, η επιλογή και χρήση συγκεκριμένων στελεχών εμφανίζει σημαντικές δυσκολίες. Συγκεκριμένα, η επιλογή μη καταλλήλων στελεχών μπορεί να οδηγήσει σε εκτροπή της ζύμωσης και δημιουργία ανεπιθύμητων μεταβολικών προϊόντων. Παράλληλα, η παρουσία παρεμποδιστικών ουσιών (π.χ. φαινολικές ουσίες) ή η ύπαρξη ακατάλληλων συνθηκών κατά τη ζύμωση (π.χ. χαμηλή θερμοκρασία) μπορεί να εμποδίσουν την ανάπτυξη και τη δράση των επιλεγμένων στελεχών. Η αρνητική και θετική επίδραση των ζυμών κατά τη διαδικασία της ζύμωσης, καθώς επίσης η δράση και ο ρόλος τους είτε μεμονωμένα είτε σε συνδυασμό με τα οξυγαλακτικά βακτήρια χρειάζεται περαιτέρω έρευνα. Σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη, η ζύμη *Candida boidinii* φαίνεται να

διακρίνεται από τα υπόλοιπα είδη ως η περισσότερο κατάλληλη καλλιέργεια εκκίνησης στη ζύμωση της επιτραπέζιας ελιάς (Heperkan *et al.* 2013).

Η επιλογή μιας καλλιέργειας εκκίνησης είναι περίπλοκη διαδικασία. Εντούτοις, παρόλο που δεν υπάρχουν συγκεκριμένα κριτήρια επιλογής, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η διαδικασία που προτάθηκε από τους Carnevali *et al.* (2012) για άλλους μικροοργανισμούς και τρόφιμα με κάποιες τροποποιήσεις. Γενικά, η επιλογή περιλαμβάνει τα παρακάτω τρία βήματα:

### **1. Απομόνωση και *in vitro* μελέτη**

Οι ζύμες που χρησιμοποιούνται ως καλλιέργειες εκκίνησης στη ζύμωση της επιτραπέζιας ελιάς είναι προτιμότερο να έχουν απομονωθεί από την αυτόχθονη μικροχλωρίδα του προϊόντος. Πολλές και διαφορετικές προσεγγίσεις χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό και την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών που έχουν απομονωθεί. Σε πολλές έρευνες, ακολουθώντας διάφορες μεθόδους καλλιέργειας, ζύμες απομονώθηκαν από ελιές και άλμη χρησιμοποιώντας εκλεκτικά υποστρώματα. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε έλεγχος της καθαρότητας της αποικίας και έπειτα ταυτοποίηση. Για την ταυτοποίηση συγκεκριμένων μικροοργανισμών προτείνεται από πολλούς ερευνητές η πολυφασική προσέγγιση, κατά την οποία χρησιμοποιούνται φαινοτυπικά και γονοτυπικά χαρακτηριστικά. Μοριακές μέθοδοι όπως η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) εντοπίζουν γενετικές ομοιότητες μεταξύ των μικροοργανισμών. Περαιτέρω αναλύσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν για σύγκριση μεμονωμένων γονιδίων, ή και ολόκληρου του γονιδιώματος (Heperkan *et al.* 2013).

Σε πρόσφατες μελέτες, γίνεται χρήση μεθόδων «ανεξάρτητης καλλιέργειας» στις οποίες το DNA και το RNA απομονώνονται απευθείας από το τρόφιμο. Προτείνεται μάλιστα, η σύγκριση μεταξύ των αποτελεσμάτων των δύο μεθόδων για τον προσδιορισμό και την επιλογή των καταλληλότερων στελεχών για τη ζύμωση της ελιάς (Botta & Coccolin 2012).

Τα στελέχη ζυμών που χρησιμοποιούνται ως καλλιέργειες εκκίνησης διαφέρουν ανάλογα με το είδος του ζυμούμενου προϊόντος. Παρόλα αυτά, τα επιλεγμένα στελέχη πρέπει να παρουσιάζουν ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά. Οι μικροοργανισμοί πρέπει να προσαρμόζονται εύκολα στο περιβάλλον της ζύμωσης, να μην εμφανίζουν παθογένεια, ενώ παράλληλα να έχουν προβιοτικά και τεχνολογικά χαρακτηριστικά. Συγκεκριμένα, τα επιλεγμένα στελέχη πρέπει να έχουν την ικανότητα να μειώνουν το pH της άλμης μέσω της παραγωγής οργανικών οξέων, να αναπτύσσονται στις συνθήκες που επικρατούν κατά τη ζύμωση (χαμηλό pH, υψηλή αλατοπεριεκτικότητα, φτωχό σε θρεπτικά συστατικά υπόστρωμα), να αφομοιώνουν τις φαινολικές ουσίες), να οδηγούν σε επιθυμητό οργανοληπτικό προφίλ μέσω της παραγωγής πτητικών ενώσεων, να παράγουν συγκεκριμένα

ένζυμα που επιδρούν θετικά στο τελικό προϊόν και να διαθέτουν εν δυνάμει προβιοτικές ιδιότητες που προάγουν την υγεία και την πρόληψη των ασθενειών. Επιπλέον, η ικανότητα των στελεχών να αναπτύσσονται και να κυριαρχούν έναντι της ενδογενούς μικροχλωρίδας του ελαιοκάρπου είναι ένα προαπαιτούμενο για την επιλογή τους ως καλλιέργειες εκκίνησης στη ζύμωση της επιτραπέζιας ελιάς. Τα διάφορα στελέχη ελέγχονται *in vitro* για συγκεκριμένες ιδιότητες, οι οποίες παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

## **2. Επικύρωση σε εργαστηριακή κλίμακα**

Η επιλογή ζυμών που προορίζονται ως καλλιέργειες εκκίνησης για τις επιτραπέζιες ελιές είναι μια σύνθετη διαδικασία που περιλαμβάνει ένα βήμα χαρακτηρισμού σε εργαστηριακό επίπεδο καθώς επίσης και επικύρωση σε εργαστηριακό επίπεδο. Ο χαρακτηρισμός σε εργαστηριακό επίπεδο εστιάζει στην εκτίμηση ορισμένων τεχνολογικών και λειτουργικών χαρακτηριστικών (Bevilacqua *et al.* 2012)

## **3. Επικύρωση σε βιομηχανική κλίμακα**

Το τελευταίο βήμα στην επιλογή και βελτιστοποίηση των εκκινήτων που μελετήθηκαν σε εργαστηριακή κλίμακα είναι η επαλήθευση των χαρακτηριστικών τους σε βιομηχανικό επίπεδο. Ωστόσο λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, μπορούμε να εστιάσουμε την επαλήθευση αυτή στα παρακάτω σημεία (Bevilacqua *et al.* 2012):

- Στον τομέα της ζύμωσης
- Στην επίδραση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά
- Στην παραγωγή βιομάζας
- Στην αποθήκευση και διατήρηση των ζυμών, δηλαδή στην ικανότητα αντοχής στην αφυδάτωση και την βιωσιμότητά τους κατά τη συντήρηση σε συνθήκες ψύξης (Bevilacqua *et al.* 2012).



ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ	ΕΠΙΘΥΜΗΤΕΣ	ΑΝΕΠΙΘΥΜΗΤΕΣ
<b>ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΕΣ</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ικανότητα επιβίωσης / ανάπτυξης σε διαφορετική συγκέντρωση αλατιού</li> <li>• Ικανότητα επιβίωσης / ανάπτυξης σε υψηλές και χαμηλές τιμές pH</li> <li>• Ικανότητα αποσύνδεσης στην επιδερμίδα ελιάς</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Παραγωγή CO<sub>2</sub></li> <li>• Αφομοίωση γαλακτικού οξέος</li> </ul>
<b>ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΕΣ</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Επιβιώστε σε συνθήκες που προσομοιώνουν τη διέλευση μέσω του γαστρεντερικού σωλήνα</li> <li>• Ικανότητα πρόσφυσης και αποικισμού των επιθηλιακών κυττάρων</li> <li>• Αντιμικροβιακή δράση κατά των παθογόνων</li> <li>• Ικανότητα συσσωμάτωσης με παθογόνα</li> </ul>	
<b>ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Αφομοίωση/αποδόμηση ελευρωπαΐνης</li> <li>• Παραγωγή βιταμινών</li> <li>• Αντιμυκητιακή και αντιμικροβιακή δράση</li> </ul>	
<b>ENZYMΙΚΗ ΔΡΑΣΗ</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Εστεράση</li> <li>• β-γλυκοσιδάση</li> <li>• Καταλάση</li> <li>• Φυτάση</li> <li>• Λιπολυτική δράση</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Πρωτεολυτική και ξυλανολυτική δράση</li> </ul>

**Πίνακας 1** Τεχνολογικές, προβιοτικές και λειτουργικές ιδιότητες ζυμών στην επιτραπέζια ελιά (Arroyo-López *et al.* 2008, Bevilacqua *et al.* 2012).

## 7. Μοριακές τεχνικές

Η ανάπτυξη των μοριακών τεχνικών στα μέσα της δεκαετίας του 80 παρείχε σημαντικά εργαλεία για την ανίχνευση και ταυτοποίηση διαφόρων οργανισμών. Οι μοριακές τεχνικές παρέχουν μεγάλη ευαισθησία και εξειδίκευση και φέρουν άμεσα αποτελέσματα.

Ορισμένες από τις μοριακές τεχνικές που χρησιμοποιούνται πιο συχνά είναι η PCR και οι εφαρμογές της (όπως RT-PCR, nested PCR, RFLP, AFLP), η ηλεκτροφόρηση πηκτής παλλομένου πεδίου (PFGE) και η τυποποίηση μέσω αλληλούχισης (MST).

### 7.1. Μοριακοί δείκτες

Οι μοριακοί δείκτες είναι τμήματα DNA χωρίς άμεση επίδραση στο φαινότυπο, που παρουσιάζουν διαφορές μεταξύ των προς μελέτη ατόμων, η ανάδειξη των οποίων χρησιμοποιείται για τη μελέτη της κληρονομικότητας χαρακτηριστικών και της ποικιλομορφίας μεταξύ των ατόμων πληθυσμών. Το κύριο πλεονέκτημα των μοριακών δεικτών έναντι των μορφολογικών είναι ότι ανιχνεύουν διαφορές στις αλληλουχίες DNA και όχι στα προϊόντα που αυτές εκφράζουν. Έτσι μηδενίζεται η επίδραση του περιβάλλοντος που μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένα συμπεράσματα (Wünsch *et al.* 2002). Οι πρώτοι μοριακοί δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms) (Botstein *et al.* 1980). Οι δείκτες RFLPs είναι πολυμορφισμοί δηλαδή κληρονομήσιμες διαφορές που παράγονται από τα διαφορετικά σημεία κοπής των περιοριστικών ενζύμων στα διαφορετικά άτομα του πληθυσμού και το τμηματοποιημένο DNA διαχωρίζεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Ακολουθεί υβριδισμός κατά Southern, υβριδισμός με κατάλληλο ανιχνευτή DNA και λήψη της οπτικής εικόνας με αυτοραδιογραφία με ραδιοενεργό ισότοπο. Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι τα αποτελέσματα είναι σταθερά και επαναλήψιμα ενώ μεγάλο μειονέκτημα αποτελεί το υψηλό κόστος, η απαιτούμενη ποσότητα του DNA αλλά και η έκθεση των χρηστών σε υψηλές εντάσεις ακτινοβολίας.

Στη συνέχεια αναπτύχθηκαν νέες μέθοδοι μοριακών δεικτών που βασίζονται στον *in vitro* πολλαπλασιασμό. Αρχικά περιγράφηκε μία μέθοδος δημιουργίας μοριακών δεικτών με πολυμορφισμό, τα RAPDs. (Williams *et al.* 1990). Πρόκειται για μοριακό δείκτη που βασίζεται στο διαφορικό πολλαπλασιασμό με την βοήθεια της PCR, τυχαίων αλληλουχιών ενός δείγματος DNA με εκκινητές που αποτελούνται από μικρές ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες. Στη συνέχεια εμφανίστηκαν οι μοριακοί δείκτες δεύτερης γενιάς στους οποίους ανήκουν οι ISSPs και οι AFLPs. Ακολούθησαν αυτοί της τρίτης γενιάς IFLPs και SNPs.

## **7.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης**

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης επινοήθηκε από τον Mullis το 1985 και έφερε επανάσταση στη μοριακή γενετική. Η μέθοδος αυτή είναι ευρέως διαδεδομένη με το όνομα PCR από τα αρχικά των λέξεων Polymerase Chain Reaction. Ένα μεγάλο πρόβλημα πριν την ανακάλυψη αυτής της μεθόδου αποτελούσε η ανάλυση των γονιδίων όπου λόγω της σπανιότητάς τους μέσα στο γονιδίωμα ήταν δύσκολη η ανάλυση αλλά και η απομόνωσή τους. Έτσι λοιπόν με την επινοήση της PCR η δυσκολία αυτή ξεπεράστηκε. Με την τεχνική αυτή αντιγράφεται *in vitro* κατά εκατομμύρια φορές ένα τμήμα γονιδιακού δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος (DNA) οποιασδήποτε προέλευσης. Πρόκειται για μία ενζυμική μέθοδο σύνθεσης γονιδιακού DNA. Η τεχνική αυτή αποτελεί εύχρηστο εργαλείο και βρίσκει ευρεία εφαρμογή στην ιατρική, στη βιολογία, στην ιολογία, στην ιατροδικαστική και σε άλλες επιστήμες ( Λύτρας 1997). Τα συστατικά αυτής είναι τα εξής:

### Αλληλουχία μήτρα (template DNA):

Τα αρχικό υλικό για την διεξαγωγή της PCR αποτελεί ένα δείγμα DNA στο οποία περιέχεται η αλληλουχία που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Στο στάδιο αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί μικρή ποσότητα από το γενομικό DNA (ακόμη και ένα μόριο αρκεί) το οποίο έχουμε απομονώσει από τον οργανισμό που μας ενδιαφέρει να μελετήσουμε.

### DNA πολυμεράση:

Η DNA πολυμεράση είναι το ένζυμο που μπορεί να συνθέσει μία νέα αλυσίδα DNA συμπληρωματική με μία αλυσίδα μήτρα. Για να ξεκινήσει (εκκινήσει) το ένζυμο τη σύνθεση χρειάζεται ένα τμήμα δίκλωνου DNA και για τον λόγο αυτό προστίθεται στην αντίδραση δύο ειδικοί ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινήτες. Η DNA πολυμεράση μπορεί να επιμηκύνει μια αλυσίδα DNA με την προσθήκη νουκλεοτιδίων ενός κάθε φορά στο 3'-OH άκρο. Τα προστιθέμενα αυτά νουκλεοτίδια είναι τριφωσφορικά και χάνουν κατά την αντίδραση τις δύο φωσφορικές ομάδες. Η επιλογή του νουκλεοτιδίου γίνεται βάσει της αρχής της συμπληρωματικότητας. Τα τελευταία χρόνια ως ένζυμο στην αντίδραση χρησιμοποιείται η θερμοανθεκτική Taq DNA πολυμεράση η οποία έχει απομονωθεί από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus aquaticus* που ζει μέσα στο νερό σε θερμοκρασίες 75°C. Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου είναι 72°C ενώ είναι αρκετά σταθερό σε θερμοκρασία 94°C.

### Εκκινητές (primers):

Οι εκκινητές επιλέγονται με σκοπό να υβριδίσουν εκατέρωθεν του τμήματος DNA που πρόκειται να ενισχυθεί. Ως αφετηρίες χρησιμοποιούνται δύο μικρά μόρια (ζεύγος) ολιγονουκλεοτιδίων. Καθεμία έχει αλληλουχία βάσεων συμπληρωματική προς εκείνη που βρίσκεται στο 3-OH άκρο των δύο αντιπαράλληλων αλυσίδων του DNA-προτύπου. Καθορίζουν τα άκρα του τμήματος που θα αντιγραφεί και αντιπροσωπεύουν τις περιοχές από τις οποίες θα ξεκινήσει η διαδικασία της σύνθεσης αντιγράφων DNA. Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται έχουν τα εξής χαρακτηριστικά:

- Το μήκος τους κυμαίνεται από 18 έως 30 ζεύγη βάσεων ενώ όσο μεγαλύτερο είναι το μήκος τους τόσο αυξάνεται η ειδικότητα πρόσδεσής τους με την αλυσίδα μήτρα.
- Η περιεκτικότητα τους σε G-C κυμαίνεται από 40 έως 60% καθώς εκκινητές πλούσιοι σε G-C είναι πιο ανθεκτικοί σε υψηλές θερμοκρασίες υβριδισμού αλλά και πιο επιρρεπείς σε αυτουβριδισμό.
- Σχεδιάζονται με τέτοιο τρόπο ώστε να αποφεύγεται ο σχηματισμός ομοδιμερών και ετεροδιμερών μεταξύ τους καθώς και ο σχηματισμός δευτερογενούς δομής.
- Η θερμοκρασία τήξης (melting temperature,  $T_m$ ) του ενός εκκινητή πρέπει να είναι παραπλήσια με του δεύτερου και να κυμαίνεται μεταξύ 55°C και 80°C. Η τιμή  $T_m$  εξαρτάται από την ποσοστιαία σύστασή της σε ζεύγη βάσεων κυρίως G-C αλλά και A-Ta και υπολογίζεται με διάφορους μαθηματικούς τύπους. Καθώς αυξάνεται το μήκος των εκκινητών αυξάνεται και η τιμή της παραμέτρου  $T_m$ . Αν η τιμή  $T_m$  αυξηθεί υπερβολικά η θερμοκρασία που θα απαιτείται για την υβριδοποίηση θα είναι μεγαλύτερη από την θερμοκρασία στην οποία η πολυμεράση καταλύει την σύνθεση των νέων αλυσίδων.

### Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs)

Τα τέσσερα 5'-τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) αποτελούν ουσιώδη δομικά στοιχεία για την σύνθεση των νέων αλυσίδων και είναι απαραίτητα για την επιμήκυνση των εκκινητών.

### Ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης (Buffer)

Το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης περιέχει τα εξής συστατικά: Tris HCl (pH=8,3 στους 20°C) MgCl<sub>2</sub>, KCl, Tween 20 ή TritonX-100 και ζελατίνη ή βόεια αλβουμίνη. Αυτά τα

συστατικά υποβοηθούν τη διαδικασία αντιγραφής. Πιο συγκεκριμένα για την Taq DNA πολυμεράση χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα που περιλαμβάνει 10mM TrisHCl (pH: 8,4), 50mM KCl, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01% gelatine, 0,01% NP40, 0,01% Tween20. Τα δύο τελευταία αντιδραστήρια αποτελούν μη ιοντικές αμφιφιλικές ενώσεις, η παρουσία των οποίων είναι απαραίτητη για την αύξηση της προοδευτικότητας της πολυμεράσης. Το KCl διευκολύνει την υβριδοποίηση των εκκινητών και ενισχύει την δραστηριότητα της πολυμεράσης ενώ τα ιόντα Mg<sup>2+</sup> είναι απαραίτητα για την σταθερότητα του ενζύμου και ταυτόχρονα έχουν σημαντική επίδραση τόσο στην απόδοση όσο και στην εξειδίκευση της αντίδρασης. Επίσης αυτά σχηματίζουν διαλυτά σύμπλοκα με τα dNTPs τα οποία αποτελούν υπόστρωμα του ενζύμου. Χαμηλές συγκεντρώσεις μπορούν να δώσουν λίγο προϊόν ενώ υψηλές αυξάνουν την απόδοση της αντίδρασης αλλά μπορεί να εμφανίσουν μη ειδικά προϊόντα. Το ρυθμιστικό διάλυμα εξασφαλίζει βέλτιστο pH και συνθήκες αλατότητας για την δράση της πολυμεράσης.

#### Νερό (ddH<sub>2</sub>O):

Πρόκειται για διπλά απιονισμένο νερό το οποίο προστίθεται στο μίγμα ύστερα από τον υπολογισμό του όγκου των παραπάνω διαλυμάτων για να συμπληρώσει τον τελικό όγκο της αντίδρασης.

Μία αντίδραση PCR περιλαμβάνει τρία διακριτά στάδια:

#### 1) Αποδιάταξη (denaturation)

Στο στάδιο αυτό πραγματοποιείται αποδιάταξη της δίκλωνης αλυσίδας DNA σε μονόκλινα τμήματα DNA στο οποία θα υβριδίσουν οι εκκινητές (primers). Η αποδιάταξη αυτή προϋποθέτει αυξημένη θερμοκρασία καθώς πραγματοποιείται και παύση όλων των ενζυμικών αντιδράσεων. Συνήθως η θερμοκρασία που χρησιμοποιείται είναι οι 94°C. Εάν η θερμοκρασία είναι χαμηλή ή η διάρκεια του σταδίου μικρή τότε είναι δυνατόν να αποτύχει η πλήρης αποδιάταξη του γενομικού DNA.

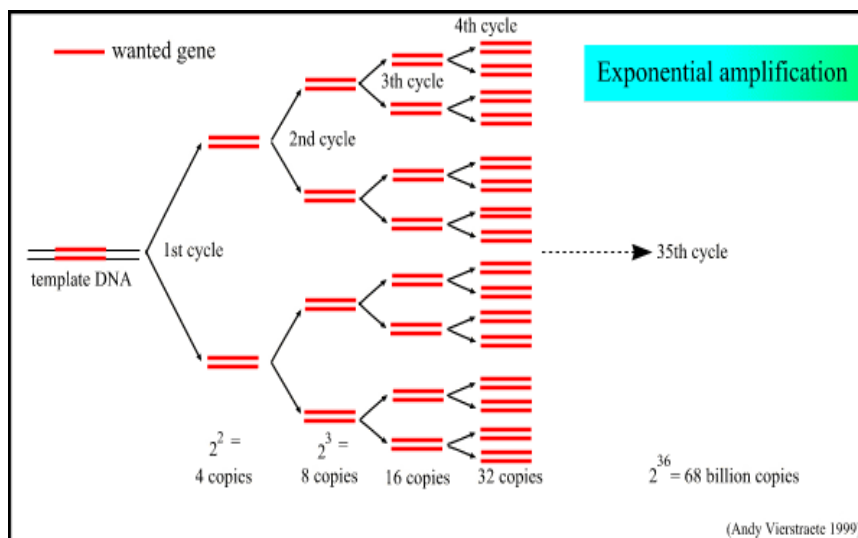
#### 2) Υβριδισμός (annealing)

Σε αυτό το στάδιο η θερμοκρασία μειώνεται ώστε να πραγματοποιηθεί ο υβριδισμός των εκκινητών με τις πλέον μονόκλωνες αλυσίδες DNA. Η κατάλληλη θερμοκρασία για το στάδιο αυτό υπολογίζεται βάσει της θερμοκρασίας τήξης των εκκινητών (40°C-60°C) καθώς και από το πόσο ειδικοί είναι οι εκκινητές για την ακολουθία που θέλουμε να ενισχύσουμε. Η αύξηση της θερμοκρασίας υβριδισμού των εκκινητών οδηγεί σε μείωση της απόδοσης της αντίδρασης ενώ χαμηλότερες θερμοκρασίες είναι δυνατό να έχουν ως αποτέλεσμα τη

συσσώρευση μη ειδικών προϊόντων λόγω του μη τέλει υβριδισμού των εκκινητών σε εναλλακτικές θέσεις στη μήτρα DNA.

### 3) Επιμήκυνση (extension)

Στο στάδιο αυτό η θερμοκρασία φτάνει στους 72°C που είναι η βέλτιστη θερμοκρασία για την Taq DNA πολυμεράση όπου καθοδηγεί την επιμήκυνση των εκκινητών με την προσθήκη κατάλληλων dNTPs συνθέτοντας έτσι τους νέους κλώνους. Η χρονική διάρκεια του σταδίου εξαρτάται από το μέγεθος του προϊόντος της αντίδρασης. Συνήθως απαιτείται περίπου 1min για κάθε 1Kb τελικού προϊόντος.



Εικόνα 1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Όταν ολοκληρώνεται ο πρώτος κύκλος αντίδρασης έχουμε δύο θυγατρικές δίκλωνες αλυσίδες DNA. Τα στάδια επαναλαμβάνονται για 30-35 κύκλους (Εικόνα 1) και στο τέλος των  $n$  κύκλων η αντίδραση θα έχει δώσει  $2^n$  δίκλιωνα μόρια DNA αντίγραφα της αρχικής αλληλουχίας που θέλουμε να ενισχύσουμε. Στο τέλος κάθε αντίδρασης για να ολοκληρωθεί η επιμήκυνση σε όλες τις μονόκλωνες περιοχές πραγματοποιείται ένα τελικό βήμα επιμήκυνσης στους 72°C για 10-15 λεπτά.

Η συσσώρευση του τελικού προϊόντος της αντίδρασης PCR αυξάνεται εκθετικά ακολουθώντας την παρακάτω σχέση:

$$X_n = X_m(1+Ex)^{n-m}$$

Όπου:

$X_n$ : Ο αριθμός των προϊόντων στον κύκλο  $n$  ( $n \geq m$ )

$X_m$ : Ο αριθμός των προϊόντων στον κύκλο  $m$  ( $m \leq n$ )

$E_x$ : Η αποδοτικότητα της ενίσχυσης ( $0 \leq E_x \leq 1$ )

$n-m$ : Ο αριθμός των κύκλων ενίσχυσης που εκτελέστηκαν μεταξύ των κύκλων  $n$  και  $m$ .

Με τον όρο αποδοτικότητα της αντίδρασης PCR ορίζεται ο μέσος όρος των συμπληρωματικών αλυσίδων DNA που παράγονται από κάθε μονόκλωνη αλυσίδα μήτρα στο τέλος κάθε κύκλου ενίσχυσης. Στην ιδανική περίπτωση έχουμε  $E_x = 1$  όπου κάθε αλυσίδα μονόκλωνη αντιγράφεται. Όμως υπάρχουν κάποιοι παράγοντες οι οποίοι συμβάλλουν στην μείωση του συντελεστή απόδοσης. Τέτοιοι παράγοντες μπορεί να είναι:

- Το μέγεθος της ενισχυόμενης περιοχής, με την αποδοτικότητα να μειώνεται όσο αυτή αυξάνεται.
- Η συγγένεια της χρησιμοποιούμενης πολυμεράσης.
- Η παρουσία παρεμποδιστών της DNA πολυμεράσης στο δείγμα της μήτρας DNA.
- Ο σχηματισμός δευτεροταγών δομών στις μονόκλωνες αλυσίδες DNA λόγω συμπληρωματικότητας μεταξύ διαφορετικών περιοχών της αλληλουχίας στόχου στις οποίες δημιουργούν εμπόδια κατά την διαδικασία αντιγραφής.
- Η ύπαρξη στη δίκλωνη μήτρα DNA περιοχών πλούσιων σε ζεύγη GC οι οποίες μειώνουν την αποτελεσματικότητα κατά το στάδιο της αποδιάταξης.

### 7.3. Repetitive sequence based PCR (REP – PCR)

Η μέθοδος της rep-PCR βασίζεται στην ενίσχυση των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών των δύο κλώνων του πυρηνικού καθώς και του πλασμιδιακού DNA του προκαρυωτικού γονιδιώματος με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης και τη χρήση ενός εκκινητή ο οποίος φέρει παλλίνδρομη αλληλουχία, δηλαδή διαβάζεται ίδια και στις δύο κατευθύνσεις. Έτσι μπορεί να υβριδίσει και να ενισχύσει διακριτές περιοχές του ευκαρυωτικού και του προκαρυωτικού γονιδιώματος. Η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε στηριζόμενη στην παρατήρηση της παρουσίας συντηρημένων επαναλαμβανόμενων

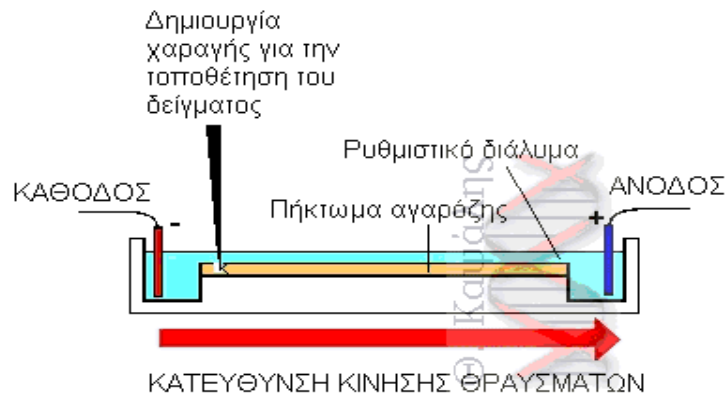
αλληλουχιών που είναι διεσπαρμένες σε ολόκληρο το γονιδίωμα των Gram αρνητικών και θετικών βακτηρίων (Louws *et al.* 1999) αλλά και των μυκήτων (George *et al.* 1998). Πρωταρχική εφαρμογή της μεθόδου έγινε στα πρότυπα γονιδιώματα των βακτηρίων *Escherichia coli* και *Salmonella* spp.. Η οικογένεια των εκκινητών REP έχει μήκος μεταξύ 33 και 40 bp και δίνει 500 έως 1000 αντίγραφα ανά γονιδίωμα. Τα ενισχυμένα θραύσματα του DNA, όταν διαχωριστούν με ηλεκτροφόρηση, δίνουν ένα χαρακτηριστικό δακτυλικό αποτύπωμα (προφίλ), το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διάκριση σε υποείδη ακόμη και σε στελέχη.

## 7.4. Ηλεκτροφόρηση

Τόσο οι πρωτεΐνες όσο και τα νουκλεϊκά οξέα είναι δυνατόν να αναλυθούν μέσω της ηλεκτροφόρησης. Τέτοιου είδους μόρια τα οποία διαφέρουν ως προς το ηλεκτρικό τους φορτίο, το μέγεθος και το σχήμα τους κινούνται με διαφορετικές ταχύτητες μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο και έτσι είναι δυνατόν να διαχωριστούν υπό κατάλληλες συνθήκες, διατηρώντας τις βιολογικές τους ιδιότητες. Η ταχύτητα με την οποία κινούνται τα μόρια μέσα σε ένα πήκτωμα είναι συναρτήση του μήκους του φορτίου τους αλλά και του σχήματός τους. Τα μικρά τμήματα κινούνται γρηγορότερα από τα μεγαλύτερα. Ένα μηχάνημα ηλεκτροφόρησης φαίνεται στην Εικόνα 2.

Χρησιμοποιούνται διαφορετικά υλικά ανάλογα με τα απόλυτα μεγέθη των τμημάτων που πρόκειται να διαχωριστούν και τις σχετικές διαφορές τους. Τα τμήματα με μέγεθος από 100 ζεύγη βάσεων έως αρκετές χιλιάδες είναι δυνατόν να διαχωριστούν σε ένα πήκτωμα αγαρόζης 1,5%. Η αγαρόζη προέρχεται από το άγαρ και είναι ένα γραμμικό πολυμερές που είναι σχεδόν ελεύθερο από φορτισμένα μόρια. Περιέχει εναλλασσόμενες μονάδες γαλακτόζης και 3,6-άνυδρης γαλακτόζης. Σχηματίζει αριστερόστροφες έλικες που εμπλέκονται η μία εντός της άλλης. Διαλυτοποιείται στο νερό σε υψηλές θερμοκρασίες και σχηματίζει καθώς ψύχεται, πήκτωμα. Η συγκέντρωση αγαρόζης που θα χρησιμοποιηθεί στο πήκτωμα καθορίζεται από το μέγεθος του DNA που θα αναλυθεί. Χαμηλές συγκεντρώσεις (0,4%w/v-1,2%w/v) χρησιμοποιούνται στον διαχωρισμό μεγάλων τμημάτων DNA ενώ υψηλές (έως 2,4%w/v) για τον διαχωρισμό μορίων μικρού μεγέθους.





Εικόνα 2 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Το διάλυμα φόρτωσης χρησιμοποιείται για:

- την αύξηση της πυκνότητας των δειγμάτων ώστε να εξασφαλισθεί η μεταφορά των δειγμάτων στα πηγαδάκια.
- την προσθήκη χρώματος στα δείγματα για την διευκόλυνση της μεταφοράς τους.
- Την διευκόλυνση της παρακολούθησης της ηλεκτροφόρησης.

Απαραίτητη σε μία ηλεκτροφόρηση αποτελεί η προσθήκη μαρτύρων μοριακού βάρους (ladder) για την εκτίμηση του αποτελέσματος.

## **B. Σκοπός**

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επιβίωσης επιλεγμένων στελεχών ζυμών με προβιοτικό δυναμικό, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν ως καλλιέργειες εκκίνησης κατά τη ζύμωση της φυσικής μαύρης ελιάς ποικιλίας Καλαμών. Η επιβίωση των επιλεγμένων στελεχών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση μοριακών τεχνικών τόσο στην άλμη όσο και στον ελαιόκαρπο σε τρία διακριτά χρονικά διαστήματα που αντιστοιχούν στο αρχικό (7<sup>η</sup> ημέρα), ενδιάμεσο (70<sup>η</sup> ημέρα) και τελικό (150<sup>η</sup> ημέρα) στάδιο της ζύμωσης. Επιπλέον πραγματοποιήθηκαν σε τακτά χρονικά διαστήματα μικροβιολογικές αναλύσεις σε επιλεκτικά υποστρώματα για την καταγραφή της δυναμικής των μικροβιακών ομάδων που επικρατούν στα διάφορα στάδια της ζύμωσης (οξυγαλακτικά βακτήρια, εντεροβακτήρια, ζύμες) ενώ παράλληλα προσδιορίστηκε η μεταβολή της τιμής του pH και της ογκομετρούμενης οξύτητας κατά την επεξεργασία.

## Γ. Πειραματική διαδικασία

Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν φυσικές μαύρες ελιές ποικιλίας Καλαμών που συγκομίστηκαν τον Οκτώβριο 2016. Οι ελιές ήταν προσφορά της εταιρείας Κωνσταντόπουλος Α.Ε. που βρίσκεται στην περιοχή της Κατερίνης στη Β. Ελλάδα και η μεταφορά τους στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων πραγματοποιήθηκε εντός 24 ωρών από την παραλαβή τους στο εργοστάσιο. Κατά την άφιξή τους στο εργαστήριο, οι ελιές πλύθηκαν δύο φορές με νερό βρύσης, ακολούθησε ποιοτική διαλογή για την απομάκρυνση των κτυπημένων και προσβεβλημένων καρπών και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε δοχεία ζύμωσης συνολικού όγκου 20 λίτρων. Κάθε δοχείο περιείχε 12 κιλά ελαιόκαρπου και 8 λίτρα άλμης 7% (β/ο) σε NaCl. Το πρώτο δοχείο αποτελούσε το μάρτυρα που δεν περιείχε καλλιέργεια εκκίνησης και η ζύμωση πραγματοποιήθηκε με την αυτόχθονη μικροχλωρίδα του καρπού. Τα υπόλοιπα δοχεία ενοφθαλμίστηκαν με τα στελέχη των επιλεγμένων ζυμών σύμφωνα με τον Πίνακα 2. Η επιλογή των συγκεκριμένων στελεχών έγινε με βάση το τεχνολογικό και προβιοτικό δυναμικό τους σύμφωνα με τα αποτελέσματα προηγούμενης εργασίας (Bonatsou *et al.* 2015).

Τα στελέχη Y5 και Y22 απομονώθηκαν από την άλμη φυσικής μαύρης Κονσερβολιάς και παρουσίασαν επιβίωση σε συνθήκες προσομοίωσης της πέψης. Τα στελέχη Y14 και Y34 απομονώθηκαν επίσης από την άλμη κατά τη διάρκεια ζύμωσης της Κονσερβολιάς και εκτός από τη δυνατότητα επιβίωσης κατά την πέψη χαρακτηρίζονται επιπλέον για την παραγωγή ενδοκυτταρικής και εξωκυτταρικής φυτάσης (Bonatsou *et al.* 2015). Τέλος το στέλεχος Y45 χρησιμοποιήθηκε ως καλλιέργεια εκκίνησης επειδή αποτελεί κυρίαρχο στέλεχος στο τέλος της ζύμωσης της φυσικής μαύρης ελιάς σύμφωνα με τα αποτελέσματα προηγούμενης μελέτης (Nisiotou *et al.* 2010).

Πίνακας 2: Ζυμώσεις που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία\*.

Κωδικός ζύμωσης	Χειρισμός
C <sub>A/B</sub>	Ζύμωση με την αυτόχθονη χλωρίδα
S <sub>1A/B</sub>	Ζύμωση με καλλιέργεια εκκίνησης <i>Pichia kluyveri</i> Y5
S <sub>2A/B</sub>	Ζύμωση με καλλιέργεια εκκίνησης <i>Metschnikowia pulcherrima</i> Y14
S <sub>3A/B</sub>	Ζύμωση με καλλιέργεια εκκίνησης <i>Pichia guilliermondii</i> Y22
S <sub>4A/B</sub>	Ζύμωση με καλλιέργεια εκκίνησης <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y34
S <sub>5A/B</sub>	Ζύμωση με καλλιέργεια εκκίνησης <i>Candida molendinolei</i> Y45

\*Σε όλες τις ζυμώσεις η αλατοπυκνωτικότητα της αρχικής άλμης ήταν 7% (β/ο) σε NaCl. Τα γράμματα A και B στους κωδικούς των ζυμώσεων αντιστοιχούν στα διαφορετικά δοχεία ζύμωσης που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε χειρισμό.

#### Προετοιμασία ενοφθαλμίσματος ζυμών

Για κάθε στέλεχος ζύμης, πραγματοποιήθηκε μεταφορά ποσότητας 50 ή 100 μl από υγρή καλλιέργεια σε 5 ή 10 ml υγρού υποστρώματος YM (Yeast Mold Broth), κατάλληλου για ανάπτυξη ζυμών και μυκήτων και ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία 25°C για 18 ώρες υπό ανάδευση (160 rpm). Η μεταφερόμενη ποσότητα σχετίζεται με τη δυναμική και το ρυθμό ανάπτυξης κάθε στελέχους και προσδιορίστηκε ξεχωριστά για καθένα από τα στελέχη ώστε να μην υπάρχουν σημαντικές αποκλίσεις στους αρχικούς πληθυσμούς. Μετά την επώαση των υγρών καλλιεργειών, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 5000 στροφές σε θερμοκρασία 4°C για 10 λεπτά, απομάκρυνση του υπερκειμένου και επαναιώρηση των κυττάρων σε διάλυμα Ringer. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε έλεγχος του μικροβιακού φορτίου πριν τον ενοφθαλμισμό στα δοχεία ζύμωσης ώστε ο πληθυσμός των ζυμών να είναι 10<sup>8</sup> cfu/ml. Στα δοχεία ζύμωσης προστέθηκαν 80 ml από το εναιώρημα των ζυμών ώστε ο αρχικός πληθυσμός μέσα στα δοχεία να είναι 10<sup>6</sup> cfu/ml. Ο ενοφθαλμισμός πραγματοποιήθηκε την 7<sup>η</sup> ημέρα της ζύμωσης και η δειγματοληψία για την μοριακή ανάλυση στην άλμη έγινε την ίδια μέρα ενώ στην ελιά έγινε τρεις μέρες αργότερα ώστε να δώσουμε χρόνο στις ζύμες να προσκολληθούν πάνω στον καρπό.

### Μικροβιολογικές αναλύσεις

Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, οι μικροβιολογικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν τόσο στον καρπό της ελιάς όσο και στην άλμη σύμφωνα με τη μέθοδο των δεκαδικών αραιώσεων. Για την πληρέστερη καταγραφή της δυναμικής των μικροβιακών ομάδων πραγματοποιήθηκαν συνολικά 16 δειγματοληψίες κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (150 ημέρες) σε προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα ως ακολούθως: 1<sup>η</sup>, 4<sup>η</sup>, 7<sup>η</sup>, 10<sup>η</sup>, 15<sup>η</sup>, 20<sup>η</sup>, 30<sup>η</sup>, 40<sup>η</sup>, 50<sup>η</sup>, 60<sup>η</sup>, 70<sup>η</sup>, 80<sup>η</sup>, 90<sup>η</sup>, 110<sup>η</sup>, 130<sup>η</sup> και 150<sup>η</sup> ημέρα αντίστοιχα. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε μικροβιολογική ανάλυση στο νωπό ελαιόκαρπο κατά την παραλαβή του από τη μεταποιητική μονάδα.

Τα θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι συνθήκες επώασης για την καταμέτρηση των μικροβιακών ομάδων που μελετήθηκαν (οξυγαλακτικά βακτήρια, ζύμες, εντεροβακτήρια) παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

**Πίνακας 3.** Θρεπτικά υλικά και συνθήκες επώασης που χρησιμοποιήθηκαν για την καταμέτρηση των μικροβιακών ομάδων που μελετήθηκαν.

Ομάδες μικροοργανισμών	Θρεπτικό υλικό	Προσθήκη αντιβιοτικού	Τεχνική εμβολιασμού	Συνθήκες επώασης
εντεροβακτήρια	VRBGa	-	Ενσωμάτωση	37 °C / 24h, αναερόβιες (διπλή στρώση άγαρ)
Ζύμες	RBC	Χλωραμφενικόλη	Επιφανειακή επίστρωση	25 °C / 72h, αερόβιες
Οξυγαλακτικά βακτήρια	MRS	Κυκλοεξαμίδιο	Ενσωμάτωση	30 °C / 48h, αναερόβιες (διπλή στρώση άγαρ)

Για την καταμέτρηση των μικροβιακών ομάδων εφαρμόστηκε η παρακάτω διαδικασία:

#### α) Δειγματοληψία στην άλμη

Ποσότητα 1 ml άλμης από κάθε δοχείο ζύμωσης λαμβάνονταν ασηπτικά και ακολουθούσε παρασκευή των διαδοχικών αραιώσεων με μεταφορά 1 ml δείγματος προηγούμενης αραιώσεως σε 9 ml αποστειρωμένου ορρού Ringer. Οι κατάλληλες κατά περίπτωση δεκαδικές αραιώσεις χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό διπλής σειράς τρυβλίων για κάθε χρησιμοποιούμενο μικροβιολογικό υπόστρωμα του Πίνακα 3. Μετά το τέλος της επώασης, για την καταμέτρηση των αποικιών επιλέχθηκαν τα τρυβλία εκείνα στα οποία ο αριθμός των αποικιών ήταν μεγαλύτερος από 30 και μικρότερος από 300 και στη συνέχεια το αποτέλεσμα

εκφράστηκε ως cfu μικροοργανισμών/ml άλμης. Τα αποτελέσματα μετασχηματίστηκαν σε λογαριθμική μορφή και εκφράστηκαν ως log CFU/ml άλμης ή log CFU/g ελιάς.

β) Δειγματοληψία στον καρπό.

Ποσότητα 10 g ελιών, στις οποίες είχε προηγουμένως αφαιρεθεί ασηπτικά ο πυρήνας, τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένη σακούλα stomacher. Ακολούθησε προσθήκη 90 ml αποστειρωμένου διαλύματος Ringer και έντονη ανάδευση σε ομογενοποιητή τύπου stomacher για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια ακολουθείται ακριβώς η ίδια διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω για την άλμη, με τη διαφορά ότι το τελικό αποτέλεσμα εκφράζεται σε cfu μικροοργανισμών/g ελιάς ή σε log(CFU)/g ελιάς μετά το λογαριθμικό μετασχηματισμό.

Παράλληλα με τις μικροβιολογικές αναλύσεις και στα ίδια χρονικά διαστήματα μετρήθηκε η τιμή του pH καθώς και η τιμή της ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας στην άλμη. Η μέτρηση της τιμής του pH πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ψηφιακού πεχαμέτρου 827 pH lab με απευθείας εμβάπτιση του ηλεκτροδίου στο δείγμα της άλμης μετά το πέρας της μικροβιολογικής ανάλυσης. Ο προσδιορισμός της ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας έγινε με τιτλοδότηση της άλμης με 0,1 N NaOH χρησιμοποιώντας σαν δείκτη φαινολοφθαλεΐνη 1 % (β/ο). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε g γαλακτικού οξέος/100 ml άλμης. Για κάθε δείγμα άλμης ελήφθη ο μέσος όρος 2 επαναλήψεων.

#### **Απομόνωση αποικιών από τα τρυβλία των ζυμών για μοριακές αναλύσεις**

Με στόχο την απομόνωση στελεχών ζυμών κατά τη διάρκεια των ζυμώνσεων, αντιπροσωπευτικός αριθμός αποικιών (περίπου 20%) από κάθε τρυβλίο με θρεπτικό υλικό RBC, από τα δείγματα άλμης και ελιάς, λαμβάνονταν υπό ασηπτικές συνθήκες και μεταφέρονταν σε νέο τρυβλίο με υλικό YM με την μέθοδο της διαδοχικής εξάπλωσης (streaking). Στη συνέχεια αφού ελέγχθηκε η καθαρότητα των νέων αποικιών, με παρατήρηση των τρυβλίων, μεταφέρθηκαν σε υγρό θρεπτικό υλικό Nutrient Broth [(g/l): Yeast extract 3.0, malt extract 3.0, Bacteriological peptone 5.0, Dextrose (D- Glycose) 10.0, pH 7.2 ±0.2] στο οποίο είχε προστεθεί 20% γλυκερόλη και αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία -80°C.

## Απομόνωση DNA

Έπειτα ακολουθείτε απομόνωση του DNA των δειγμάτων που αποθηκεύτηκαν στους -80 με χρήση Kit της εταιρείας Analytik Jena. Στη συνέχεια έγινε προσδιορισμός της συγκέντρωσης και καθαρότητας των νουκλεϊκών οξέων. Ο έλεγχος της ποιότητας και της συγκέντρωσης του DNA πραγματοποιήθηκε με φωτόμετρο Quawell Q5000 (Quawell Technology Inc, San Jose, CA, USA). Ο μηδενισμός της συσκευής γινόταν με ρυθμιστικό διάλυμα Tris – EDTA (TE) και στη συνέχεια τοποθετούνταν σταγόνα 2  $\mu\text{L}$  από κάθε δείγμα. Η φωτομέτρηση για το DNA γινόταν σε μήκος κύματος 260 nm και από την τιμή της οπτικής απορρόφησης (O.D.) υπολογίστηκε αυτόματα η συγκέντρωση σε ng/ $\mu\text{L}$ . Παράλληλα, γινόταν μέτρηση του ίδιου δείγματος στα 280 και στα 230 nm για έλεγχο της περιεκτικότητας του δείγματος σε πρωτεΐνες και σάκχαρα, αντίστοιχα. Όταν ο λόγος 260/280 είναι ανάμεσα στις τιμές 1.8-2, τότε το δείγμα θεωρείται καθαρό. Αντίθετα, όταν ο λόγος είναι μικρότερος από 1.8 τότε πιθανότατα υπάρχουν προσμίξεις πρωτεϊνών στο δείγμα. Ένα δεύτερο μέτρο καθαρότητας νουκλεϊκών οξέων αποτελεί ο λόγος 260/230. Σε δείγματα υψηλής καθαρότητας από σάκχαρα, ο συγκεκριμένος λόγος κυμαίνεται μεταξύ 1,8 και 2,2. Οι χαμηλότερες τιμές φανερώνουν την παρουσία συνεκχυλιζόμενων προσμίξεων οι οποίες μπορεί να προκαλέσουν προβλήματα στην ενίσχυση του DNA.

## Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Αρχικά έγινε PCR ελέγχου με διαφορετικές συνθήκες και διαφορετικές συγκεντρώσεις τόσο του DNA των δειγμάτων όσο και των αντιδραστηρίων της PCR με στόχο τη σταθεροποίηση όσο το δυνατόν πλουσιότερου και ευδιάκριτου προφίλ κατά την εφαρμογή της τεχνικής της ηλεκτροφόρησης. Ο εκκινητής που χρησιμοποιήθηκε για την Rep-PCR είναι ο GTG<sub>5</sub> με αλληλουχία GTGGTG GTGGTGGTG. Η καλύτερη αναλογία για την επίτευξη της πιο αποτελεσματικής αντίδρασης ήταν:

Αντιδραστήρια	Τελική συγκέντρωση
<b>Buffer D</b>	5x
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	2mM
<b>dNTPs</b>	0,2mM
<b>GTG<sub>5</sub> primer</b>	0,5 $\mu\text{M}$
<b>Taq pol</b>	
<b>Template DNA</b>	2,0 $\mu\text{l}$
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	

Για τις αντιδράσεις PCR όλων των στελεχών που απονώθηκαν χρησιμοποιήθηκε ο θερμικός κυκλοποιητής ProFlex PCR System (Applied Biosystems). το DNA δίνεται σε ng/μl. Εσείς είχατε σταθερή συγκέντρωση DNA? Οι συνθήκες που επιλέχθηκαν για τις αντιδράσεις στον θερμικό κυκλοποιητή ήταν οι εξής: 5 λεπτά σε θερμοκρασία 94°C, 30 κύκλοι με: 30 sec σε θερμοκρασία 94°C, 1 λεπτό σε θερμοκρασία 40°C, 8 λεπτά σε θερμοκρασία 72°C. Με το πέρας των 30 κύκλων ακολούθησαν 16 λεπτά σε θερμοκρασία 72°C.

Ταυτόχρονα γίνεται χρώση των νουκλεϊκών οξέων με ειδικές χρωστικές (βρωμιούχο αιθίδιο) και μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης γίνεται η φωτογράφησή τους. Η ηλεκτροφορητική εικόνα του δείγματος παρέχει στοιχεία για την καθαρότητα του και ελέγχει την επιτυχία και την απόδοση της PCR.

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την ηλεκτροφόρηση ήταν:

- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα TAE (Tris-Acetate-EDTA) (40 mM Tris, 20 mM Acetic acid, 1 mM EDTA, pH 8,2)
- ✓ Αγαρόζη συγκέντρωσης 1,5% (w/v) (Sigma, Taufkirchen, Germany)
- ✓ 1kb DNA Ladder (Invitrogen, Grand Island, USA)
- ✓ Βρωμιούχο αιθίδιο 40 μL / L (10 mg/mL) (Sigma, Taufkirchen, Germany)

### **Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης**

Τα προϊόντα της PCR αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1,5 % (w/v) σύμφωνα με την ακόλουθη διαδικασία:

- Σε 120 mL διαλύματος ηλεκτροφόρησης TAE, προστέθηκαν 1,44 g αγαρόζης (1,5% w/v).
- Το διάλυμα θερμάνθηκε μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη.
- Το διάλυμα τοποθετήθηκε σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία είχε ειδική χτένα και στερεοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου σχηματίζοντας την πηκτή.
- Η χτένα απομακρύνθηκε και η πηκτή βυθίστηκε σε διάλυμα TAE 1/10. Στα κενά πηγαδάκια που σχηματίστηκαν από τη χτένα τοποθετήθηκαν τα δείγματα. Στον αρχικό και τελικό πηγαδάκι προστέθηκαν 4 μL από τον 1 kb DNA Ladder (Invitrogen).



- Η πηκτή ηλεκτροφορήθηκε στα 80 V για 180 min.
- Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης ακολουθεί φωτογράφιση της πηκτής σε ειδικό UV θάλαμο.

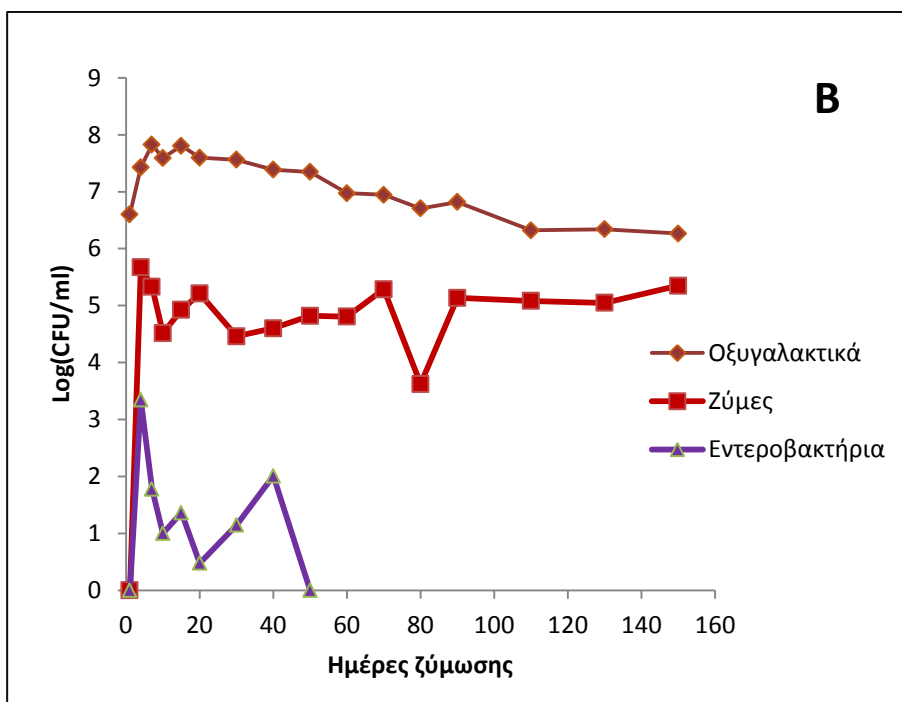
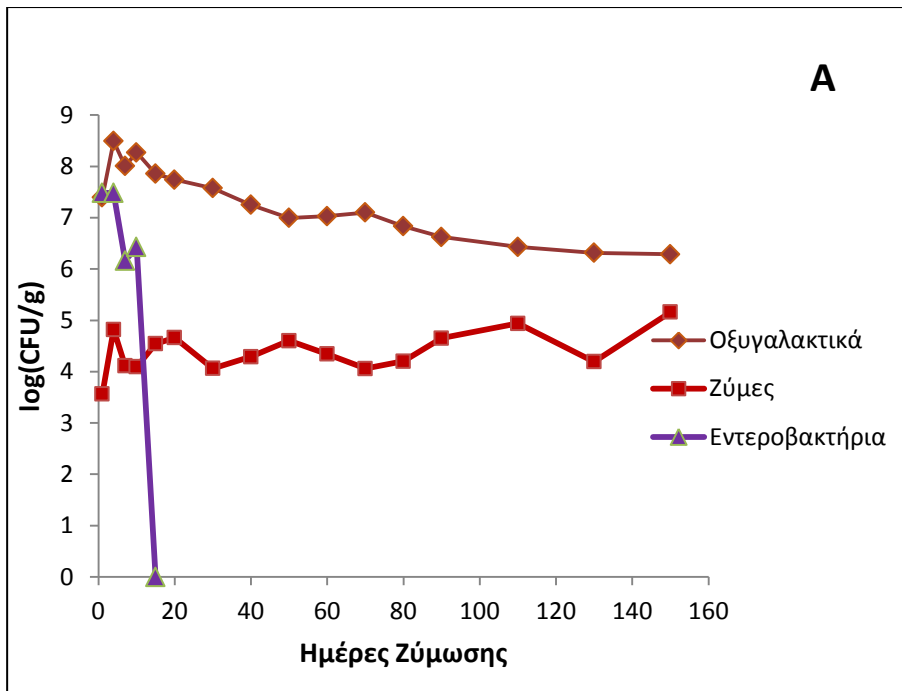
Τα μόρια του DNA διακρίνονται ως φωτεινές ζώνες λόγω του φθορισμού του βρωμιούχου αιθιδίου όταν η πηκτή εκτεθεί σε UV ακτινοβολία (High Performance Ultraviolet Transilluminator, UltraViolet Products, UK). Η συσκευή UV συνδέεται με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή και ηλεκτρονικό υπολογιστή. Μέσω ειδικού λογισμικού προγράμματος (Doc-IT 2.4.0.2., Syngene, Cambridge, UK) γίνεται η επεξεργασία και αποθήκευση της φωτογραφίας της ηλεκτροφόρησης. Τα δείγματα φωτογραφήθηκαν έτσι ώστε να ακολουθήσει ομαδοποίηση των στελεχών με τη βοήθεια του αλγορίθμου UPGMA του προγράμματος Bionumerics (Applied Maths, Keijkstraat, Belgium).

Το πρόγραμμα Bionumerics συγκρίνει τις ζώνες στα ηλεκτροφορητικά προφίλ των στελεχών, μεταξύ των στελεχών, αλλά και με το μάρτυρα μοριακών μαζών (1 kb ladder). Από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων προκύπτει ένα δενδρόγραμμα, στο οποίο τα στελέχη ομαδοποιούνται με βάση τα ποσοστά ομοιότητας των ηλεκτροφορητικών προφίλ τους.

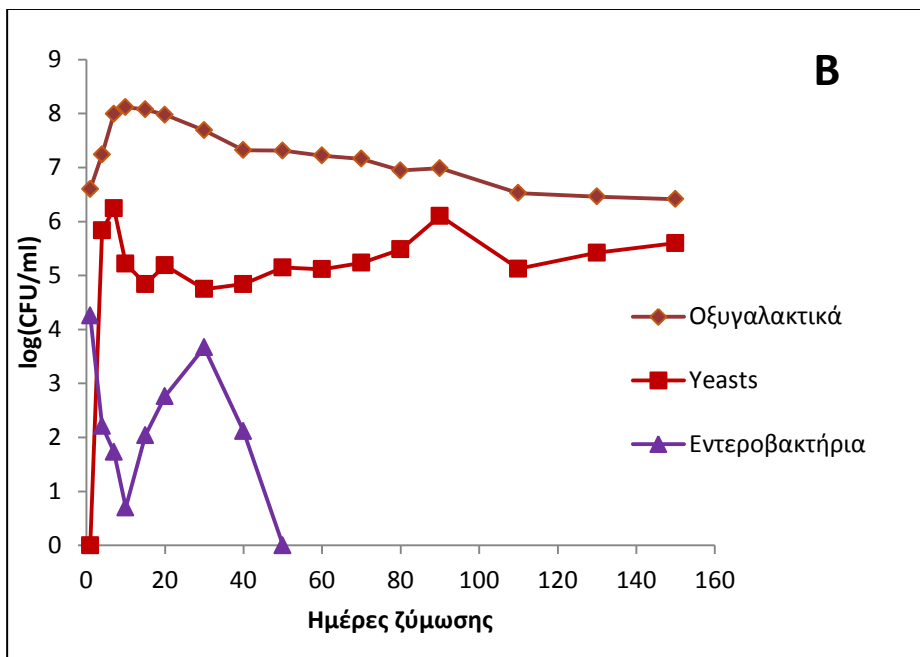
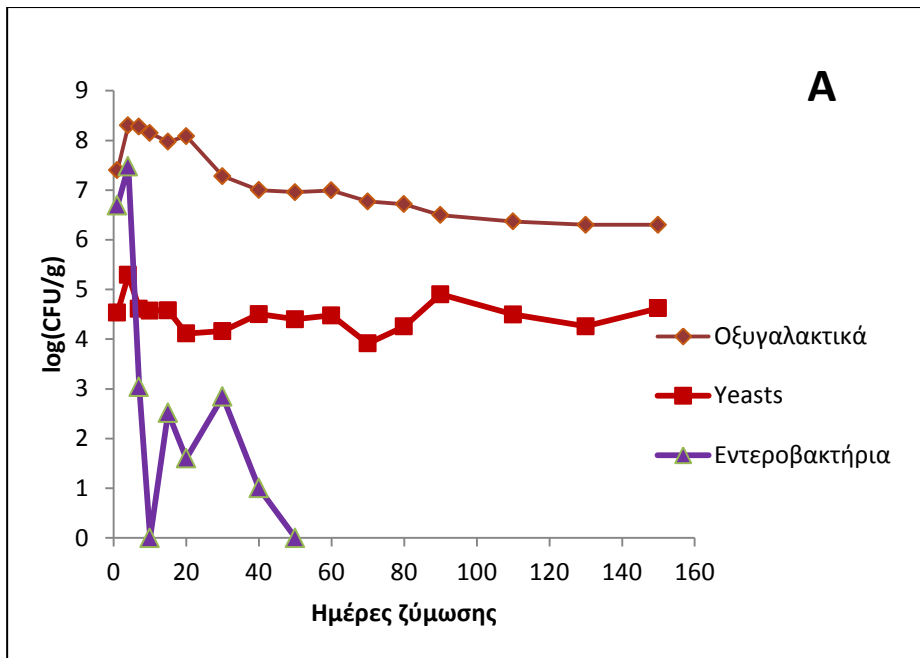
## Δ. Αποτελέσματα- Συζήτηση

Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε τόσο στον καρπό της ελιάς όσο και στην άλμη σε κάθε δοχείο ζύμωσης. Όπως αναφέραμε και στην πειραματική διαδικασία η πρώτη δειγματοληψία έγινε στο νωπό καρπό κατά την παραλαβή του από τη μεταποιητική μονάδα και πριν τοποθετηθεί στην άλμη (χρόνος 0).

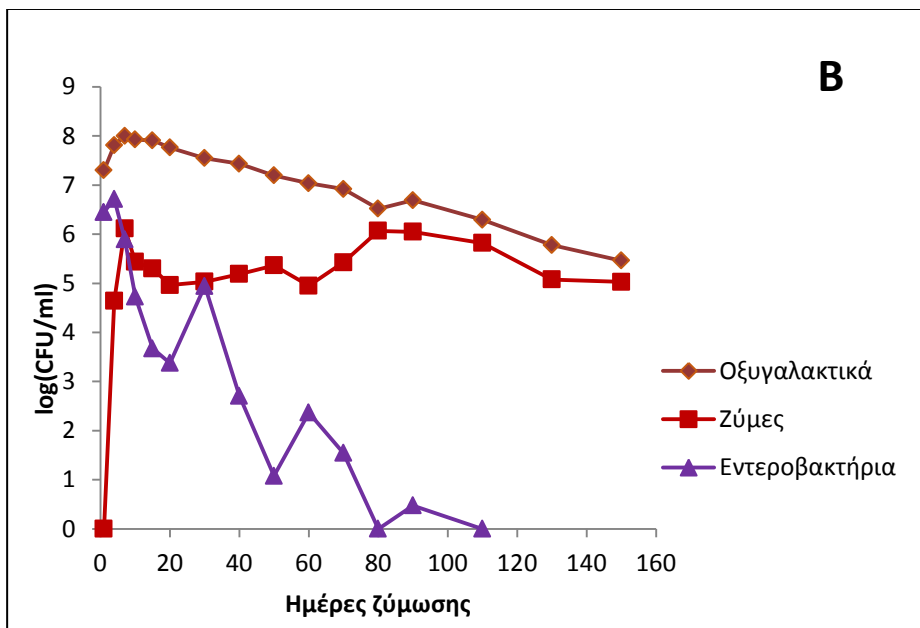
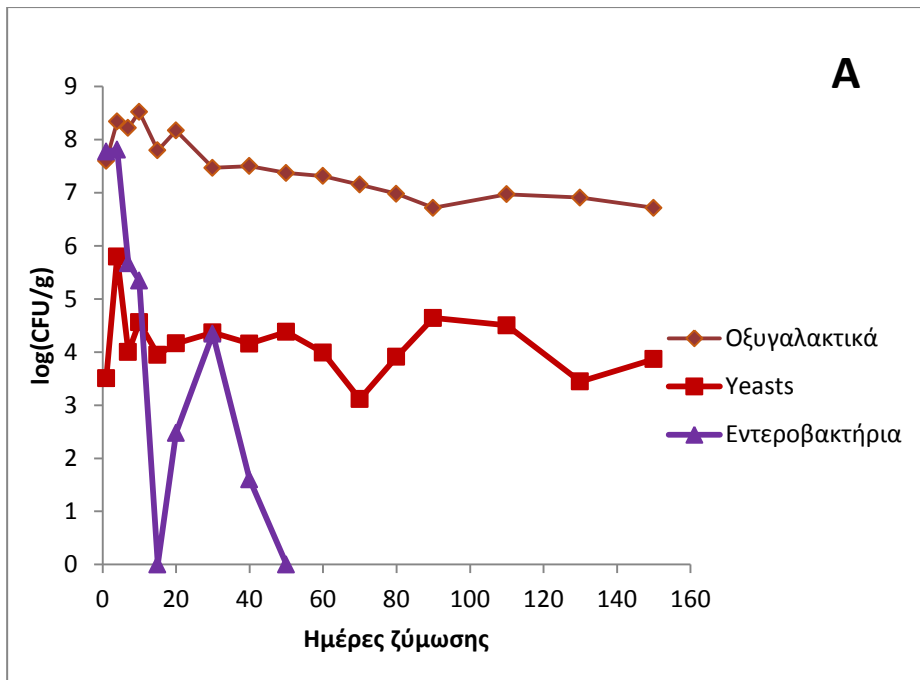
Η μεταβολή της μικροχλωρίδας στον καρπό της ελιάς και στην άλμη κατά τη διάρκεια της ζύμωσης παρουσιάζεται στα Διαγράμματα 1-6 Παρατηρούμε ότι ο πληθυσμός των εντεροβακτηρίων στον καρπό της ελιάς κατά την έναρξη της ζύμωσης ήταν σε υψηλότερα επίπεδα σχετικά με την άλμη, με διαφορά που σε ορισμένες ζυμώσεις κυμάνθηκε από 2,0-3,0 log CFU/g. Σε όλες όμως τις περιπτώσεις ο πληθυσμός των εντεροβακτηρίων παρουσίασε γρήγορη μείωση και μηδενίστηκε μέσα στις 10-20 πρώτες ημέρες της ζύμωσης, με εξαίρεση τις ζυμώσεις με καλλιέργειες εκκίνησης *Pichia kluyveri* / Y5 και *Metschnikowia pulcherrima* / Y14 όπου ο πληθυσμός τους μηδενίστηκε την 50<sup>η</sup> και 100<sup>η</sup> ημέρα της ζύμωσης. Αντίστοιχη πορεία παρουσίασε η δυναμική της μεταβολής του πληθυσμού των εντεροβακτηρίων στην άλμη, η επιβίωση των οποίων παρουσίασε μεγαλύτερη διακύμανση συγκριτικά με τον καρπό της ελιάς. Συγκεκριμένα, στις ζυμώσεις με καλλιέργειες εκκίνησης *Pichia guilliermondii* / Y22 και *Candida molendinolei* / Y45 δεν καταμετρήθηκαν εντεροβακτήρια στο περιβάλλον της άλμης από την έναρξη της ζύμωσης, ενώ στη ζύμωση με καλλιέργεια εκκίνησης *Metschnikowia pulcherrima* / Y14 η εν λόγω ομάδα βακτηρίων επιβίωσε μέχρι την 110<sup>η</sup> ημέρα. Η πορεία των εντεροβακτηρίων που παρατηρήθηκε στο πείραμά μας βρίσκεται σε συμφωνία με βιβλιογραφικά δεδομένα (Panagou *et al.* 2003) καθώς τα οξυγαλακτικά βακτήρια με την οξίνιση της άλμης λόγω παραγωγής γαλακτικού οξέως δεν επιτρέπουν την επιβίωση των εντεροβακτηρίων παρά μόνο στην αρχή της ζύμωσης.



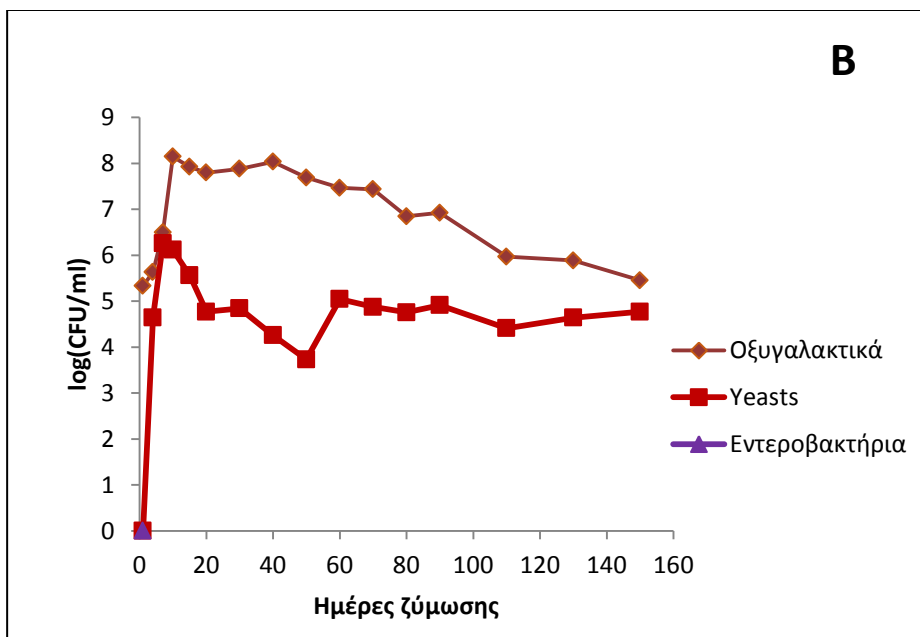
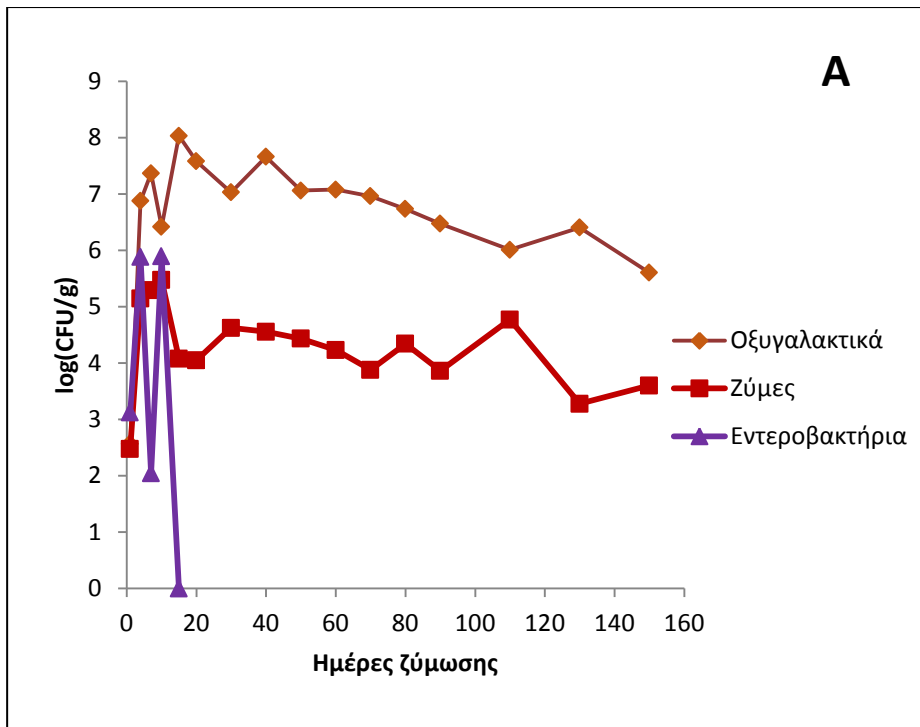
**Διάγραμμα 1** Μεταβολή του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων ( $\diamond$ ), ζυμών ( $\square$ ) και εντεροβακτηρίων ( $\triangle$ ) στην ελιά (A) και άλμη (B) κατά τη ζύμωση της φυσικής μαύρης ελιάς ποικιλίας Καλαμών με την αυτόχθονη μικροχλωρίδα (μάρτυρας).



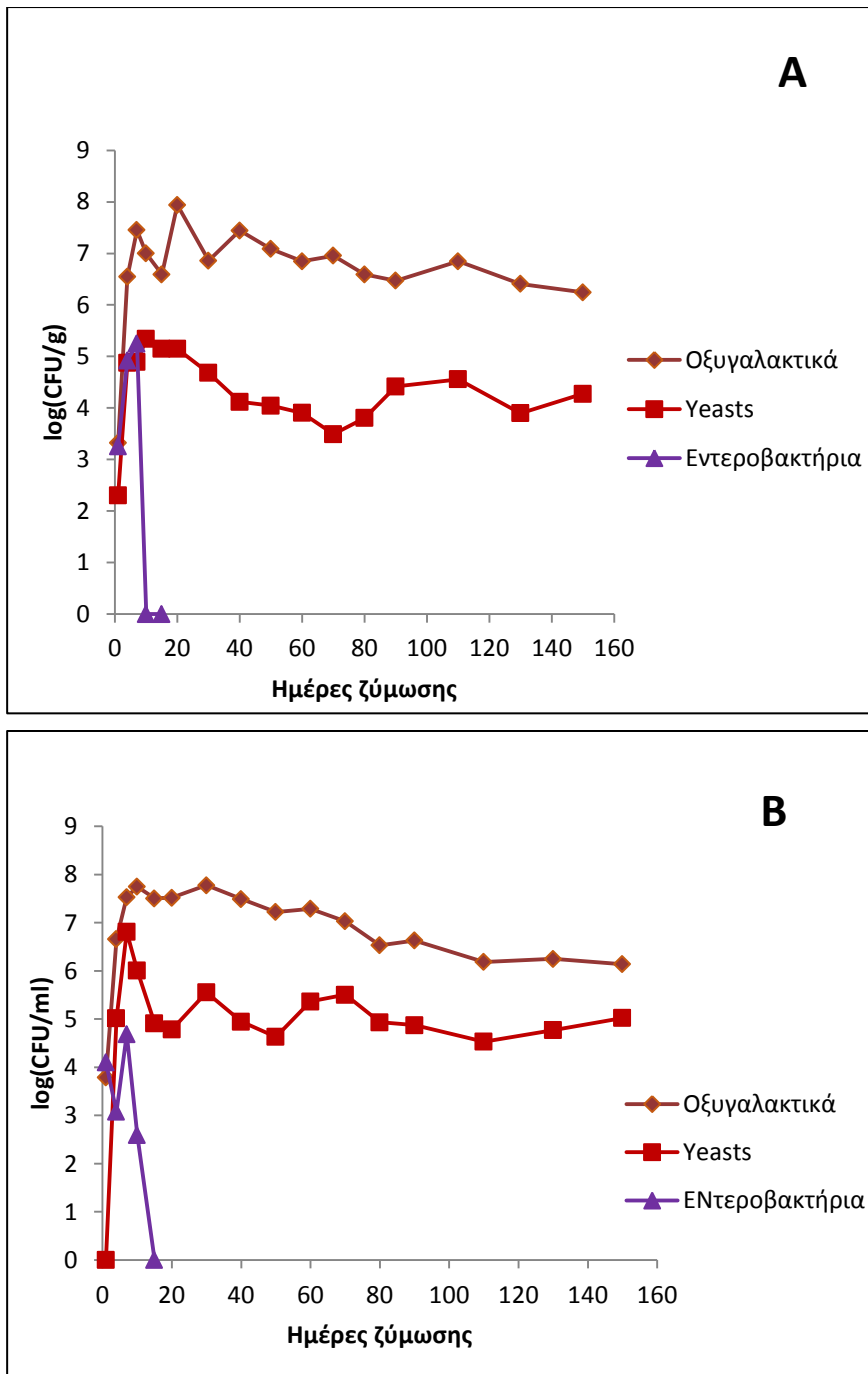
**Διάγραμμα 2:** Μεταβολή του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων ( $\diamond$ ), ζυμών ( $\square$ ) και εντεροβακτηρίων ( $\triangle$ ) στην ελιά (A) και άλμη (B) κατά τη ζύμωση της φυσικής μαύρης ελιάς ποικιλίας Καλαμών με καλλιέργεια εκκίνησης *Pichia kluyveri* Y5.



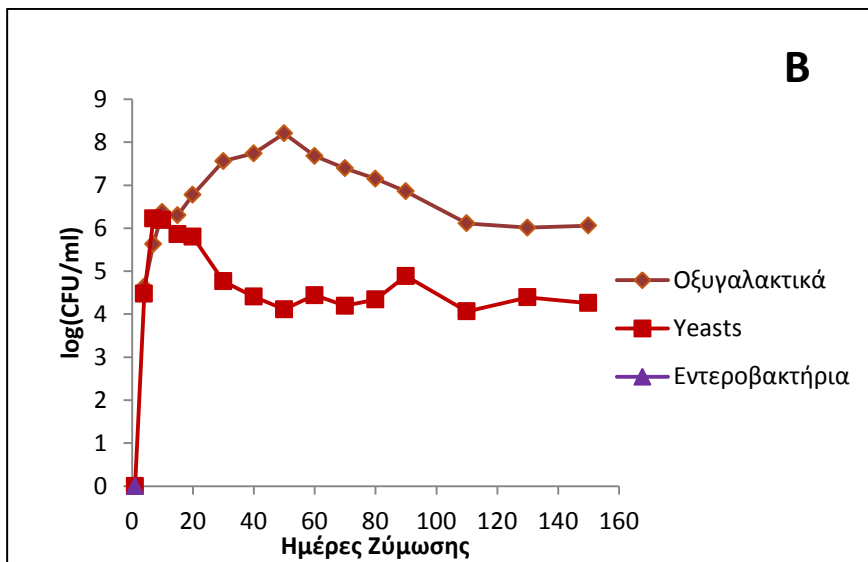
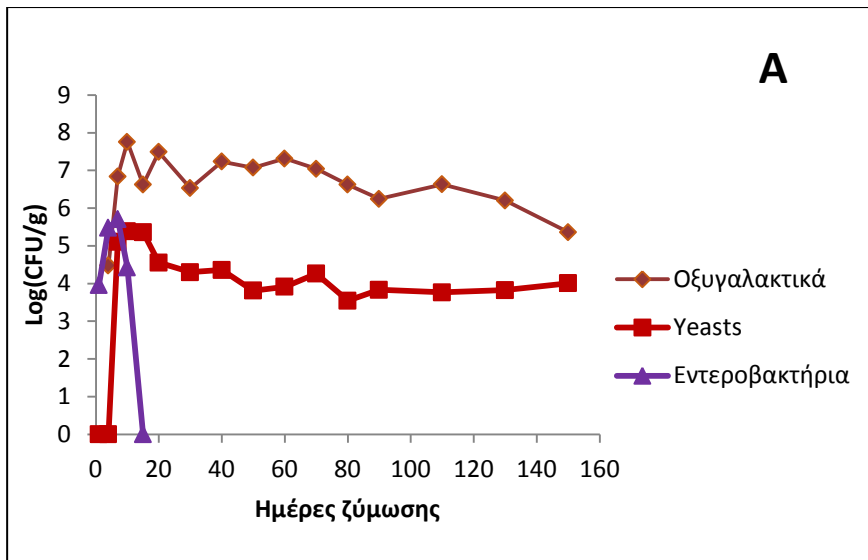
**Διάγραμμα 3:** Μεταβολή του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων (◇), ζυμών (□) και εντεροβακτηρίων (△) στην ελιά (A) και άλμη (B) κατά τη ζύμωση της φυσικής μαύρης ελιάς ποικιλίας Καλαμών με καλλιέργεια εκκίνησης *Metschnikowia pulcherrima* Y14.



Διαγραμμα 4 Μεταβολή του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων ( $\diamond$ ), ζυμών ( $\square$ ) και εντεροβακτηρίων ( $\triangle$ ) στην ελιά (A) και άλμη (B) κατά τη ζύμωση της φυσικής μούρης ελιάς ποικιλίας Καλαμών με καλλιέργεια εκκίνησης *Pichia guilliermondii* / Y22



Διαγραμμα 5 Μεταβολή του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων ( $\diamond$ ), ζυμών ( $\square$ ) και εντεροβακτηρίων ( $\triangle$ ) στην ελιά (A) και άλμη (B) κατά τη ζύμωση της φυσικής μαύρης ελιάς ποικιλίας Καλαμών με καλλιέργεια εκκίνησης *Saccharomyces cerevisiae* Y34.



Διαγραμμα 6 Μεταβολή του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων ( $\diamond$ ), ζυμών ( $\square$ ) και εντεροβακτηρίων ( $\triangle$ ) στην ελιά (A) και άλμη (B) κατά τη ζύμωση της φυσικής μαύρης ελιάς ποικιλίας Καλαμών με καλλιέργεια εκκίνησης *Candida molendinolei* Y45.



Στα παραπάνω διαγράμματα περιγράφεται η πορεία μεταβολής του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων στον ελαιόκαρπο και την άλμη κατά τη ζύμωση. Παρατηρούμε ότι στην άλμη ο πληθυσμός αρχικά κυμάνθηκε σε 5,0 log CFU/ml και παρουσίασε σταδιακή αύξηση τις 10 πρώτες ημέρες της ζύμωσης μέχρι τους 8,0 log CFU/ml. Από το χρονικό αυτό σημείο και μέχρι το τέλος της ζύμωσης ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων παρουσίασε μείωση και σταθεροποιήθηκε σε περίπου 6 log CFU/ml. Σχετικά με τον πληθυσμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων στον καρπό της ελιάς, παρατηρείται γενικά αυξημένος πληθυσμός σε σχέση με την άλμη που κυμαίνεται σε 7,0-8,0 log CFU/g. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων στον καρπό της ελιάς παρουσίασε μικρή μείωση και διαμορφώθηκε σε 7,0 log CFU/g. Εξαιρέση αποτελούν οι ζυμώσεις με καλλιέργειες εκκίνησης *Pichia guilliermondii* / Y22, *Saccharomyces cerevisiae* / Y34 και *Candida molendinolei* / Y45 στις οποίες καταμετρήθηκε μικρότερος πληθυσμός οξυγαλακτικών βακτηρίων στον καρπό (4,5-5,0 log CFU/g), ο οποίος αυξήθηκε σε 8,0 log CFU/g τις πρώτες 20 ημέρες της ζύμωσης και διαμορφώθηκε στο τέλος της ζύμωσης σε πληθυσμό 6,0 log CFU/g.

Τέλος στα διαγράμματα 1- 6 εμφανίζεται και η πορεία ανάπτυξης του πληθυσμού της τρίτης ομάδας μικροοργανισμών που μελετήσαμε, των ζυμών. Η παρουσία των ζυμών στα διάφορα στάδια της ζύμωσης της ελιάς είναι τεκμηριωμένη από τη βιβλιογραφία (Marquina et al. 1992, Kotzekidou 1997, Tassou et al. 2002, Hernández et al. 2006), με επικρατέστερα τα γένη *Candida*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* και *Debaryomyces* (Garrido-Fernández et al. 1997, Arroyo-López et al. 2012). Ο πληθυσμός τους μπορεί να είναι αρκετά υψηλός στο ζυμούμενο προϊόν, επηρεάζοντας έτσι τα τεχνολογικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος, συμπεριλαμβανομένου και του οργανοληπτικού χαρακτήρα (Garrido-Fernández et al. 1997, Rodríguez-Gómez et al. 2010, Arroyo-López et al. 2012).

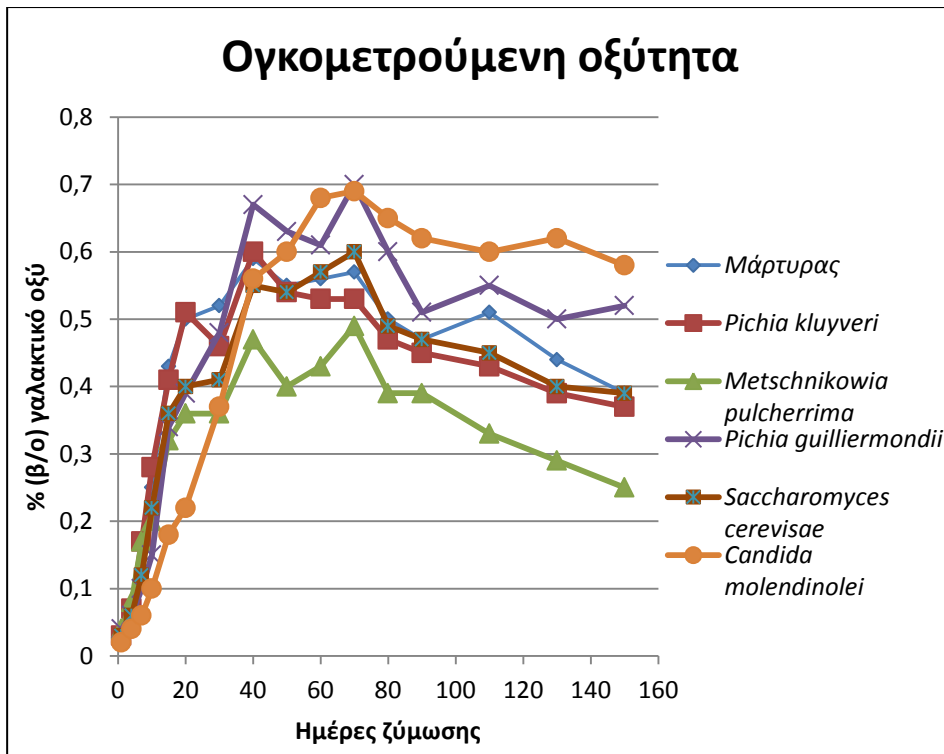
Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται αυξανόμενο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη και χρήση καλλιεργειών εκκίνησης στην επεξεργασία της επιτραπέζιας ελιάς προκειμένου να διασφαλιστεί ελεγχόμενη διαδικασία ζύμωσης (Panagou et al. 2008, Corsetti et al. 2012). Τα κυριότερα στελέχη που χρησιμοποιούνται σήμερα για την δημιουργία καλλιεργειών εκκίνησης είναι τα οξυγαλακτικά βακτήρια *Lactobacillus plantarum* και *Lactobacillus pentosus*, τα οποία είναι κυρίως υπεύθυνα για τη ζύμωση της επιτραπέζιας ελιάς (Borbolla y Alcalá & Rejano Navarro 1979, Vaughn 1982, van den Berg et al. 1993). Τα στελέχη αυτά κυκλοφορούν στο εμπόριο σε λυοφιλωμένη μορφή, και πριν προστεθούν στην άλμη θα πρέπει να δραστηριοποιηθούν σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας. Εκτός από τα οξυγαλακτικά βακτήρια, το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας έχει στραφεί στη

χρήση ζυμών ως καλλιέργειες εκκίνησης στη μεταποίηση της ελιάς. Σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη, η ζύμη *Candida boidinii* διακρίνεται από τα υπόλοιπα είδη ως η περισσότερο κατάλληλη καλλιέργεια εκκίνησης στη ζύμωση της επιτραπέζιας ελιάς (Heperkan et al. 2013).

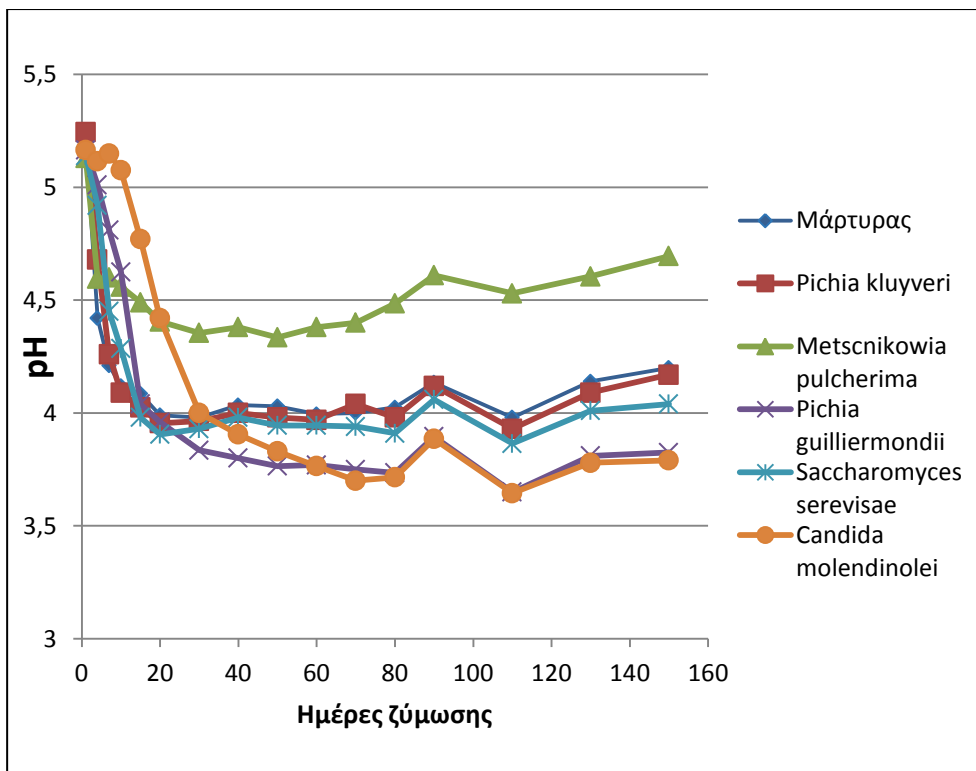
Σύμφωνα με την πειραματική διαδικασία κατά τη διάρκεια της ζύμωσης πραγματοποιήθηκαν δύο εμβολιασμοί της άλμης με πληθυσμό  $10^6$  CFU/ml από τα πέντε στελέχη (Πίνακας 2) τα οποία επιλέξαμε λόγω των τεχνολογικών αλλά και προβιοτικών τους ιδιοτήτων (Bonatsou *et al.* 1015). Ο πρώτος εμβολιασμός των καλλιεργειών εκκίνησης πραγματοποιήθηκε την 7<sup>η</sup> ημέρα της ζύμωσης. Η προσθήκη των καλλιεργειών επηρέασε τη διαδικασία της ζύμωσης καθώς στα περισσότερα δοχεία παρατηρήθηκε αύξηση του πληθυσμού των ζυμών κατά περίπου  $2,0 \log$  CFU/ml (Διάγραμματα 2-6). Ειδικότερα, στην άλμη παρουσιάστηκε αύξηση του πληθυσμού των ζυμών κατά ένα περίπου λογάριθμο, από  $4,0 \log$  CFU/ml σε  $5 \log$  CFU/ml, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις ο πληθυσμός ανήλθε σε  $6,0 \log$  CFU/ml. Στον καρπό της ελιάς ο αρχικός πληθυσμός ήταν  $4,0 \log$  CFU/g, αυξήθηκε κατά έναν λογάριθμο στις 20 πρώτες ημέρες της ζύμωσης και μειώθηκε στο αρχικό επίπεδο στο τέλος της επεξεργασίας.

Η πληθυσμιακή υπεροχή των οξυγαλακτικών βακτηρίων τόσο στην άλμη όσο και στις ελιές από την αρχή της ζύμωσης επηρέασε την ανάπτυξη και επικράτηση των ζυμών. Σύμφωνα με τον Viljoen (2006) τα οξυγαλακτικά βακτήρια με τα εντεροβακτήρια και τις ζύμες αλληλεπιδρούν και πιο συγκεκριμένα η ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων προάγει την ανάπτυξη των ζυμών λόγω της παραγωγής γαλακτικού οξέος και αναστέλλει αυτή των εντεροβακτηρίων. Έτσι στην προκειμένη περίπτωση αφού έχει παραχθεί το γαλακτικό οξύ από τα οξυγαλακτικά βακτήρια κατά τη διάρκεια της ζύμωσης παρατηρείται μηδενισμός των εντεροβακτηρίων και μία μικρή λογαριθμική αύξηση των ζυμών στην αρχή της ζύμωσης. Για να ενισχύσουμε τον πληθυσμό των ζυμών έναντι των οξυγαλακτικών βακτηρίων κρίθηκε σκόπιμο να επαναληφθεί η προσθήκη των καλλιεργειών εκκίνησης στην άλμη την 13<sup>η</sup> ημέρα της ζύμωσης. Η ποσότητα ενοφθαλμίσματος που προστέθηκε στην άλμη ήταν 80 ml έτσι ώστε ο θεωρητικός πληθυσμός των ζυμών στην άλμη να είναι  $10^6$  CFU/ml. Από τα αποτελέσματα των μικροβιολογικών αναλύσεων προέκυψε ότι δεν επηρεάστηκε ο μικροβιακός πληθυσμός των ζυμών καθώς τα οξυγαλακτικά βακτήρια ήταν η επικρατούσα μικροχλωρίδα και σταθερά υπερείχαν σε πληθυσμό έναντι των ζυμών.

Η μεταβολή της τιμής της ογκομετρούμενης οξύτητας και του pH παρουσιάζονται στα Διαγράμματα 7 και 8 αντίστοιχα.



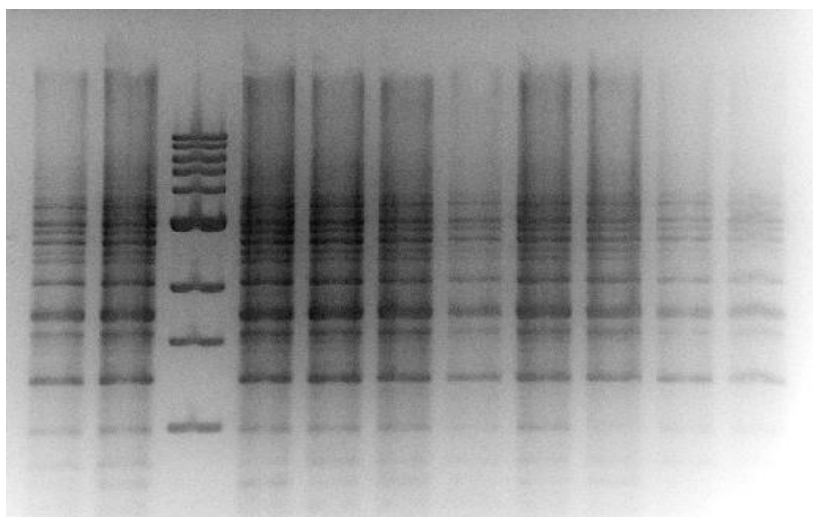
**Διάγραμμα 7:** Μεταβολή της ογκομετρούμενης οξύτητας εκφρασμένης σε % (β/ο) γαλακτικό οξύ στην άλμη κατά τη ζύμωση της φυσικής μαύρης ελιάς Καλαμών με επιλεγμένα στελέχη ζυμών ως καλλιέργειες εκκίνησης .



**Διάγραμμα 8:** Μεταβολή της τιμής pH στην άλμη κατά τη διάρκεια ζύμωσης της φυσικής μαύρης ελιάς ποικιλίας Καλαμών με επιλεγμένα στελέχη ζυμών ως καλλιέργειες εκκίνησης.

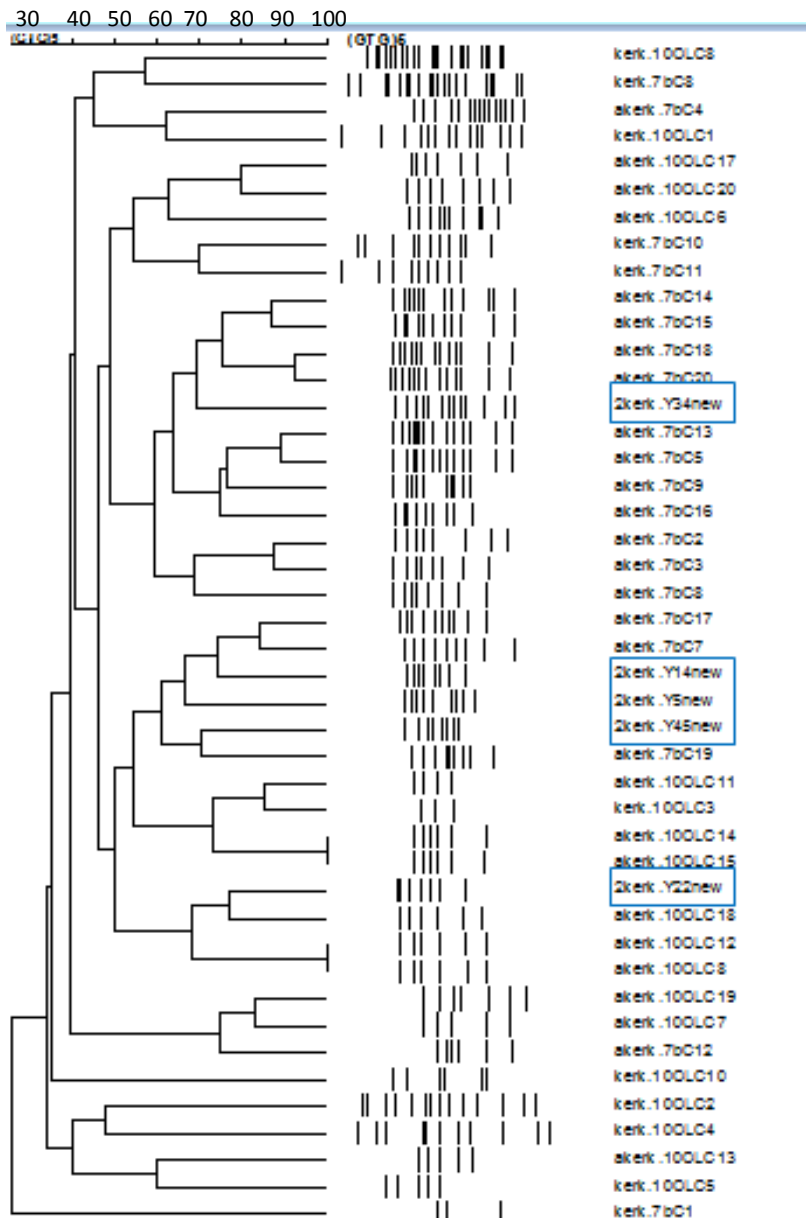
Η μεταβολή των παραμέτρων αυτών παρουσίασε παρόμοια πορεία σε όλες τις ζυμώσεις. Συγκεκριμένα, η ογκομετρούμενη οξύτητα σημείωσε αύξηση μέχρι την 80<sup>η</sup> περίπου ημέρα της ζύμωσης, ανάλογα με την καλλιέργεια εκκίνησης που χρησιμοποιήθηκε, και ακολούθησε σταδιακή μείωση μέχρι το τέλος της επεξεργασίας. Το υψηλότερο και χαμηλότερο προφίλ ογκομετρούμενης οξύτητας παρουσίασαν οι ζυμώσεις με καλλιέργειες εκκίνησης *Candida molendinolei* Y45 και *Metschnikowia pulcherrima* Y14. Το ποσοστό γαλακτικού οξέος στο τέλος της ζύμωσης κυμάνθηκε από 0,25-0,59 g γαλακτικού οξέως/100 ml άλμης. Σύμφωνα με το πρότυπο του Διεθνούς Συμβουλίου Ελαιοκομίας για την εμπορία της επιτραπέζιας ελιάς (IOC 2004), η ελάχιστη τιμή της ογκομετρούμενης θα πρέπει να είναι 0,3% προκειμένου να εξασφαλιστεί η μικροβιολογική σταθερότητα του προϊόντος κατά τη συντήρηση. Από το Διάγραμμα 10 παρατηρούμε ότι η ζύμωση με καλλιέργεια εκκίνησης *Metschnikowia pulcherrima* Y14 δεν πληροί την απαίτηση του εμπορικού προτύπου και συνεπώς η εν λόγω ζύμωση δε θα πρέπει να θεωρηθεί επιτυχής. Η μεταβολή της τιμής του pH (Διάγραμμα 11) βρίσκεται σε συμφωνία με τη μεταβολή της ογκομετρούμενης οξύτητας, υπό την έννοια ότι υψηλές τιμές ογκομετρούμενης οξύτητας συνέβαλαν σε χαμηλότερες τιμές pH στην άλμη. Στην πλειονότητα των ζυμώσεων, η τιμή του pH παρουσίασε ταχεία μείωση μέχρι την 20<sup>η</sup> ημέρα της ζύμωσης και στη συνέχεια διατηρήθηκε σταθερή ή παρουσίασε μικρές διακυμάνσεις μέχρι το τέλος της επεξεργασίας. Τιμές pH < 4,0 παρουσίασαν οι ζυμώσεις με καλλιέργειες εκκίνησης *Candida molendinolei* Y45 και *Pichia guilliermondii* Y22. Η μέγιστη τιμή pH για να θεωρείται ασφαλής η ζύμωση της φυσικής μαύρης ελιάς είναι 4,3 (IOC 2004) και σύμφωνα με την τιμή αυτή τόσο η ζύμωση με την αυτόχθονη μικροχλωρίδα όσο και οι ζυμώσεις με καλλιέργειες εκκίνησης *Saccharomyces cerevisiae* / Y34 και *Pichia kluyveri* / Y5 θεωρούνται ότι είναι εντός των προδιαγραφών του προτύπου για την εμπορία της επιτραπέζιας ελιάς. Θα πρέπει να τονιστεί ότι σε συμφωνία με τις τιμές της ογκομετρούμενης οξύτητας, η τελική τιμή pH στη ζύμωση με καλλιέργεια εκκίνησης *Metschnikowia pulcherrima* / Y14 ήταν 4,6, γεγονός που καθιστά το συγκεκριμένο προϊόν μη ασφαλές για τον καταναλωτή.

Παρακάτω παρατίθεται μία ενδεικτική φωτογραφία ηλεκτροφόρησης rep-PCR 10 στελεχών ζυμών που απομονώθηκαν από το τελικό σημείο της ζύμωσης της φυσικής μαύρης ελιάς ποικιλίας Καλαμών με καλλιέργεια εκκίνησης *Metschnikowia pulcherrima* / Y14 (Εικόνα 3). Κάθε ζώνη είναι προϊόν αλληλουχιών της ενίσχυσης διαφόρων τμημάτων DNA από το γονιδίωμα κάθε στελέχους με τη χρήση παλλινδρομου εκκινητή GTG<sub>5</sub>.



**Εικόνα 3** Ενδεικτική εικόνα στην οποία φαίνονται προϊόντα ηλεκτροφόρησης rep-PCR σε 10 στελέχη που έχουν απομονωθεί από το τελικό σημείο της ζύμωσης με καλλιέργεια εκκίνησης *Metschnikowia pulcherrima* / Y14 (150<sup>η</sup> ημέρα). Γίνεται οπτικός διαχωρισμός σε μία ομάδα. Η τρίτη σε σειρά στήλη αποτελεί τον μάρτυρα μαριακής μάζας 1kB.

Το πρώτο σημείο αποτελούσε την αρχή της ζυμωτικής διαδικασίας (7<sup>η</sup> ημέρα) όπου πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός της άλμης με 5 επιλεγμένα στελέχη ζυμών ως καλλιέργειες εκκίνησης. Οι εικόνες των ηλεκτροφορήσεων αναλύθηκαν με το πρόγραμμα Bionumerics, με το οποίο τα στελέχη ομαδοποιήθηκαν με βάση τα ποσοστά ομοιότητας των ηλεκτροφορητικών τους προφίλ σε ορισμένες ομάδες. Στελέχη με ποσοστά ομοιότητας > 80% θεωρήθηκαν ότι αποτελούν μια ομάδα.



**Σχήμα 1** Δενδρογράμμα της ανάλυσης κατά συστάδες (cluster analysis) των ζυμών κατά την έναρξη της αυθόρμητης ζύμωσης της φυσικής μαύρης ελιάς ποικιλίας Καλαμών, με βάση τα ποσοστά ομοιότητας των ηλεκτροφορητικών προφίλ όπως λήφθηκαν με τη μέθοδο rep-PCR.

Στο Σχήμα 1 παρατηρούμε την έντονη ποικιλότητα των ζυμών που επικρατεί κατά την αυθόρμητη ζύμωση της φυσικής μαύρης ελιάς Καλαμών. Παρουσιάζονται πολλά και διαφορετικά γενετικά προφίλ με βάση την ομαδοποίηση των ποσοστών ομοιότητας των ηλεκτροφορητικών τους προφίλ με χρήση του προγράμματος Bionumerics 6. Ταυτοχρόνως κατά την ομαδοποίηση και την κατασκευή του δενδρογράμματος χρησιμοποιήθηκαν και τα γενετικά προφίλ των επιλεγμένων στελεχών ζυμών που χρησιμοποιήθηκαν ως καλλιέργειες εκκίνησης στις υπόλοιπες ζυμώσεις, ώστε να διαπιστωθεί εάν ανιχνεύονται στην αυτόχθονη μικροχλωρίδα της συγκεκριμένης ζύμωσης. Τα στελέχη αυτά στο Σχήμα 1 περιβάλλονται από

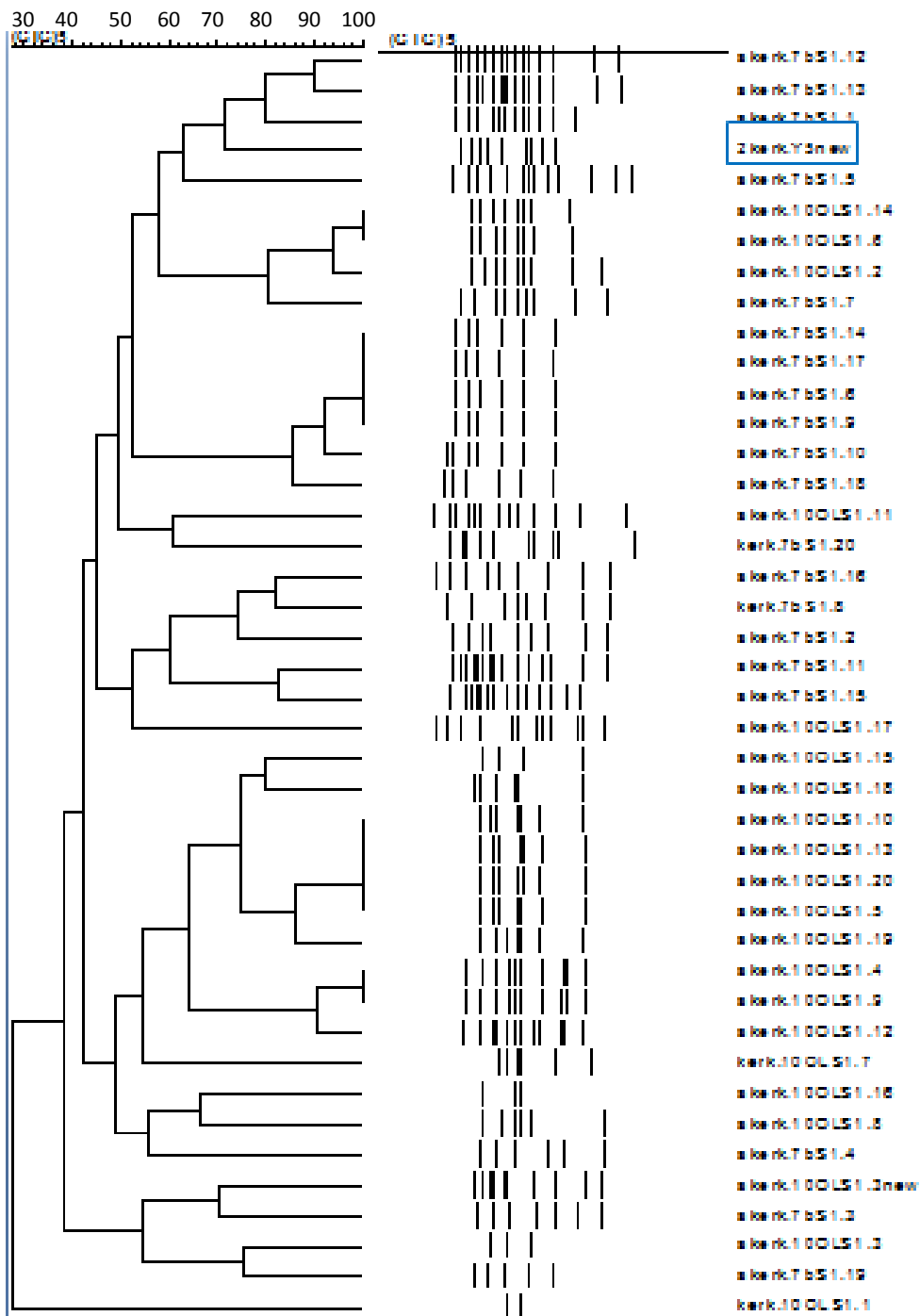
πλαίσιο. Έχουμε απομονώσει τα στελέχη δύο φορές το κάθε ένα με κωδικούς «old» και «new» για επιβεβαίωση ότι πρόκειται για την ίδια αλληλουχία άρα και το ίδιο στέλεχος. Ο κωδικός «old» αντιστοιχεί στην πρώτη ανανέωση του στελέχους ζύμης που χρησιμοποιήσαμε ως καλλιέργεια εκκίνησης, ενώ ο κωδικός «new» στη δεύτερη ανανέωση και κατ' επέκταση απομόνωση του στελέχους ζύμης.

Στα Σχήματα 2-18 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης κατά συστάδες με βάση τα ποσοστά ομοιότητας των ηλεκτροφορητικών προφίλ των ζυμών όπως προέκυψαν με τη μέθοδο ger-PCR για τις διαφορετικές ζυμώσεις που μελετήθηκαν. Στα σχήματα παρουσιάζεται ο διαχωρισμός των 40 στελεχών ζυμών (20 άλμης και 20 ελιά) μαζί με τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ως καλλιέργειες εκκίνησης σε κάθε περίπτωση.

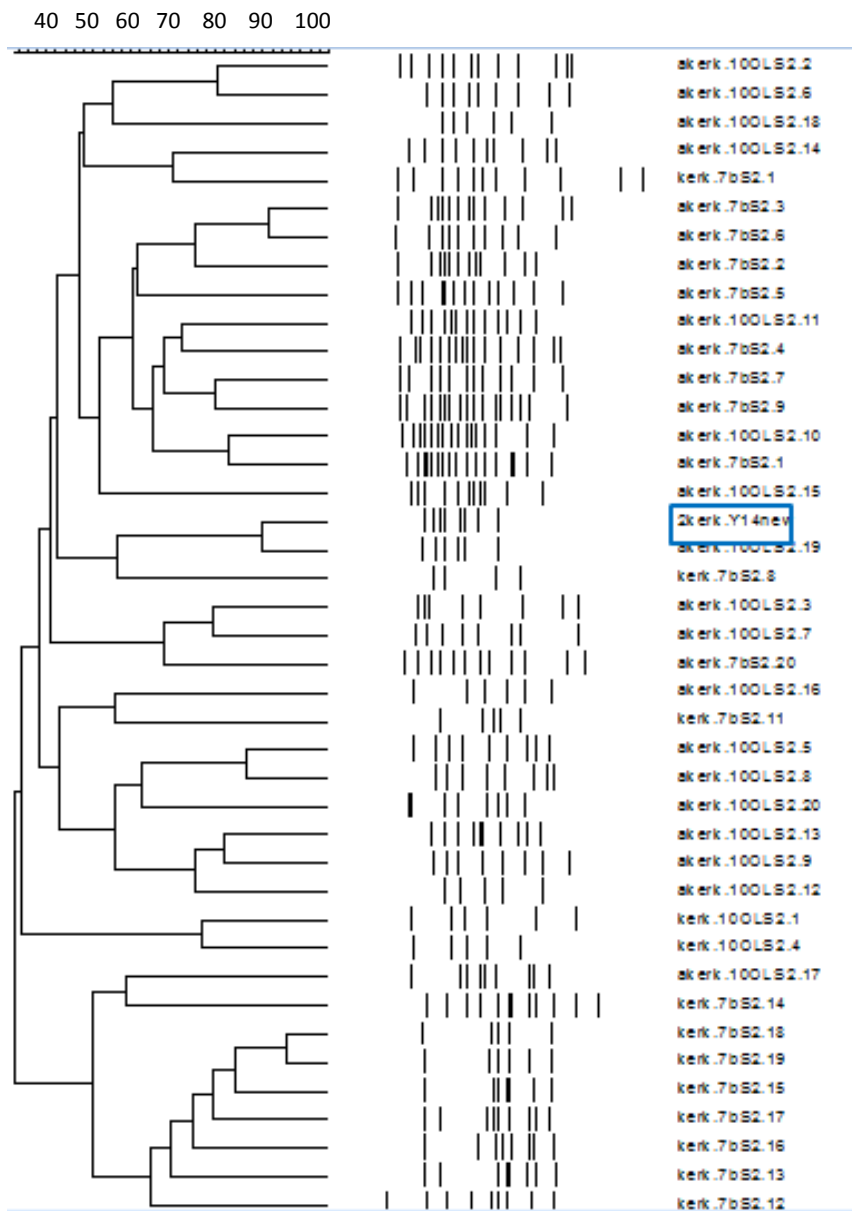
Συγκεκριμένα, στο Σχήμα 2 στη περίπτωση της ζύμωσης με καλλιέργεια εκκίνησης *Pichia kluyveri* (Y5<sub>new</sub>) οι απομονώσεις αφορούν στην 7<sup>η</sup> ημέρα ζύμωσης για την άλμη την ημέρα δηλαδή κατά την οποία πραγματοποιήθηκε ο ενοφθαλμισμός και στην 10<sup>η</sup> για τον καρπό, καθώς αφήσαμε ένα χρονικό περιθώριο στις καλλιέργειες εκκίνησης να μεταφερθούν από την άλμη στον καρπό της ελιάς ώστε να μπορούν να απομονωθούν, όπως και στο δοχείο μάρτυρα που αναφερθήκαμε παραπάνω. Κάποια στελέχη φαίνεται να είναι ομαδοποιημένα με ποσοστό ομολογίας >90% ενώ κάποια άλλα ξεχωριστά. Στο Σχήμα 3 στην περίπτωση δηλαδή της ζύμωσης με το στέλεχος *Metschnikowia pulcherrima* (Y14<sub>new</sub>) κάποια στελέχη φαίνεται να είναι ομαδοποιημένα ενώ τα περισσότερα διαφέρουν μεταξύ τους. Στο Σχήμα 4 φαίνεται το δενδρόγραμμα που προέκυψε από τη ζύμωση με το στέλεχος *Pichia guilliermondii* (Y22<sub>new</sub>). Κάποια στελέχη επίσης είναι ομαδοποιημένα ενώ τα περισσότερα να αποτελούν μια ξεχωριστή ομάδα με τη διαφορά πως έχει μειωθεί ο αριθμός των διαφορετικών στελεχών άρα και ομάδων. Στο Σχήμα 5 στη περίπτωση της ζύμωσης με το στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* (Y34<sub>new</sub>) και πάλι ορισμένα στελέχη φαίνεται να είναι ομαδοποιημένα και κάποια να αποτελούν μια ξεχωριστή ομάδα με τη διαφορά πως τα περισσότερα δείγματα άλμης έχουν δημιουργήσει μια ξεχωριστή ομάδα που σημαίνει πως αποτελούν το ίδιο στέλεχος το οποίο έχει μεγάλο ποσοστό επιβίωσης στην άλμη και υπερισχύει. Όσον αφορά στον καρπό της ελιάς φαίνεται πως έχουμε έντονες διαφοροποιήσεις. Στη περίπτωση της ζύμωσης με το στέλεχος *Candida molendinolei* (Y45<sub>new</sub>) (Σχήμα 6) παρατηρούμε ότι δείγματα άλμης και δείγματα καρπού της ελιάς έχουν δημιουργήσει δύο διακριτές ομάδες πέρα από κάποια δείγματα τα οποία δεν φαίνεται να είναι ομαδοποιημένα. Αυτό δείχνει πως έχει μειωθεί η ποικιλότητα των στελεχών στο δοχείο με καλλιέργεια εκκίνησης *Candida molendinolei* πιθανόν λόγω ανταγωνισμού μεταξύ τους.

Θα πρέπει να τονιστεί ότι κανένα στέλεχος από τις καλλιέργειες εκκίνησης που χρησιμοποιήθηκαν στις ζυμώσεις δεν ανιχνεύτηκε τόσο στην άλμη όσο και στον καρπό της ελιάς κατά την έναρξη της ζύμωσης καθώς το γενετικό τους προφίλ διέφερε από τα γενετικά προφίλ των υπολοίπων ζυμών που απομονώσαμε.

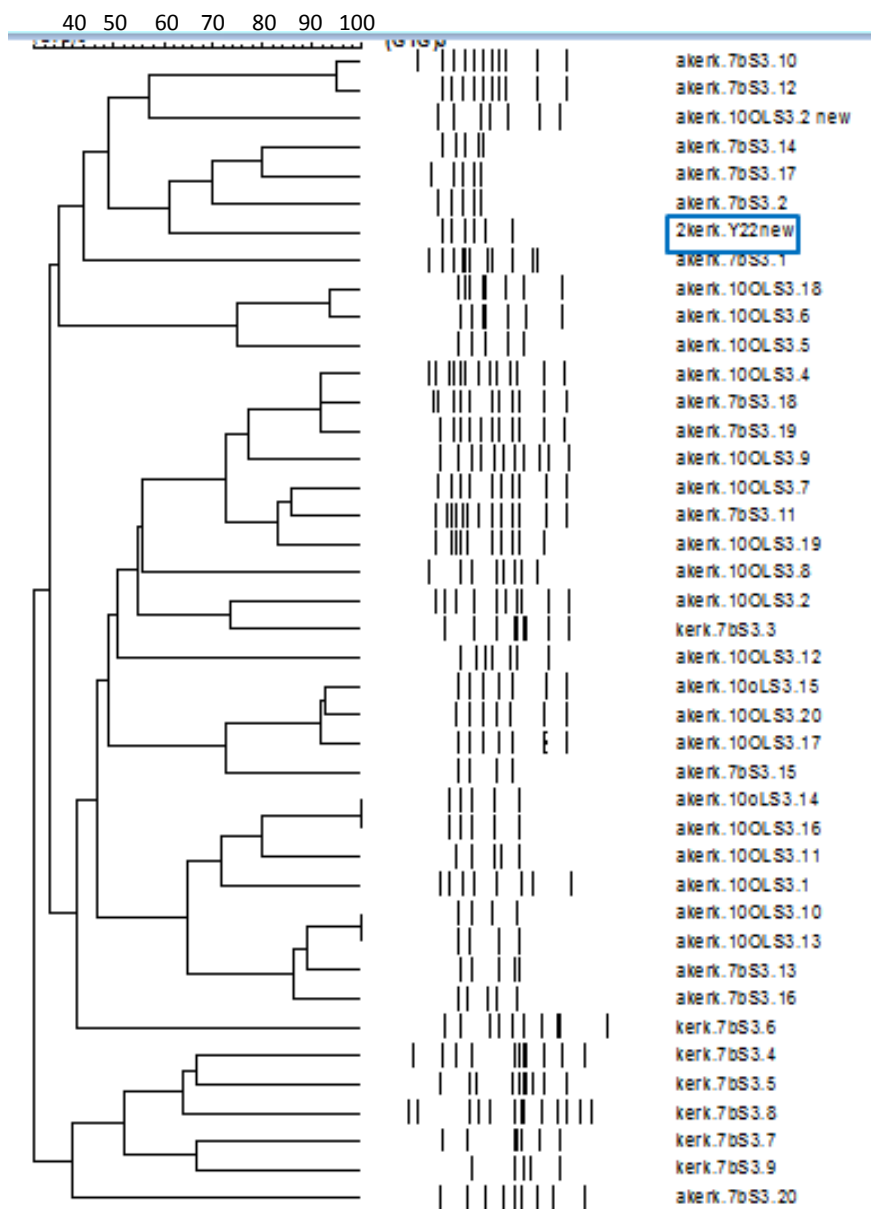




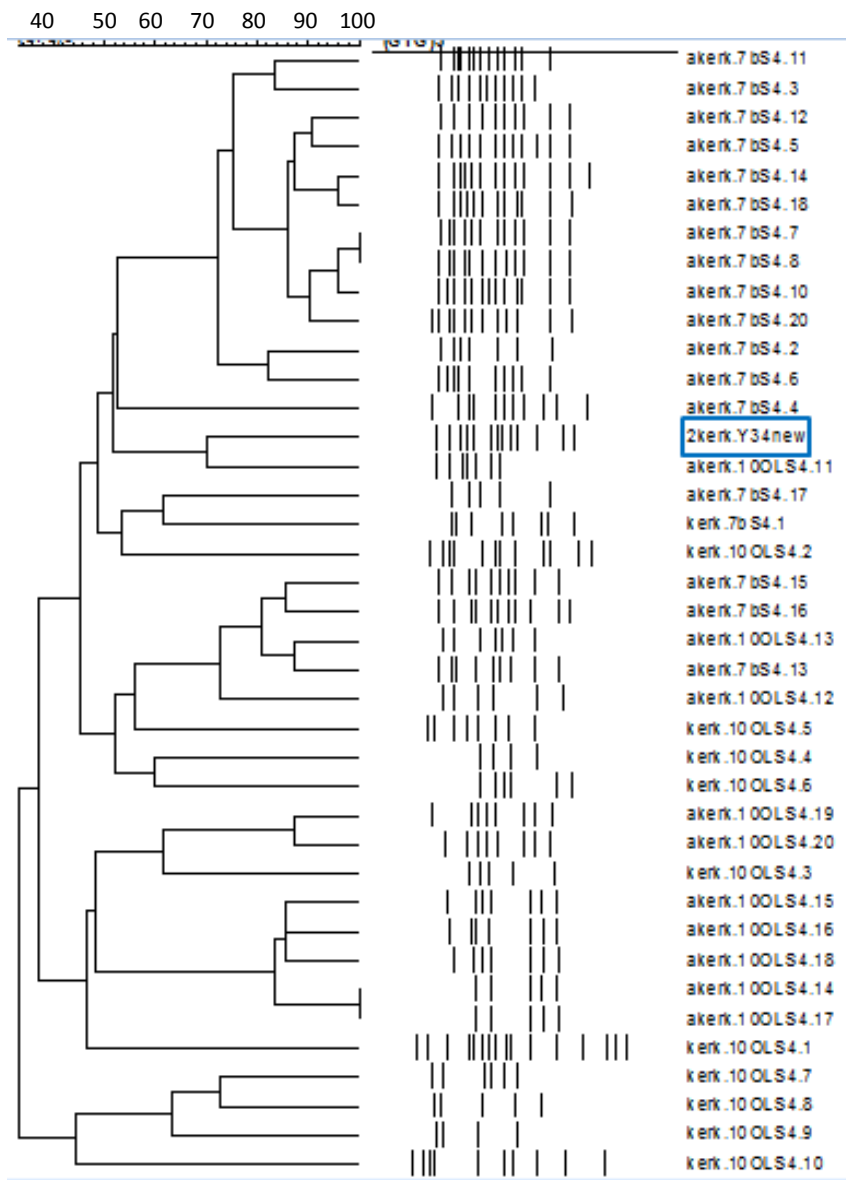
Σχήμα 2 Δενδρόγραμμα ανάλυσης κατά συστάδες (cluster analysis) κατά την έναρξη της ζύμωσης της φυσικής μαύρης ελιάς ποικιλίας Καλαμών με καλλιέργεια εκκίνησης *Pichia kluyveri* Y5 με βάση τα ποσοστά ομοιότητας των ηλεκτροφορητικών προφίλ όπως λήφθηκαν με τη μέθοδο rep-PCR.



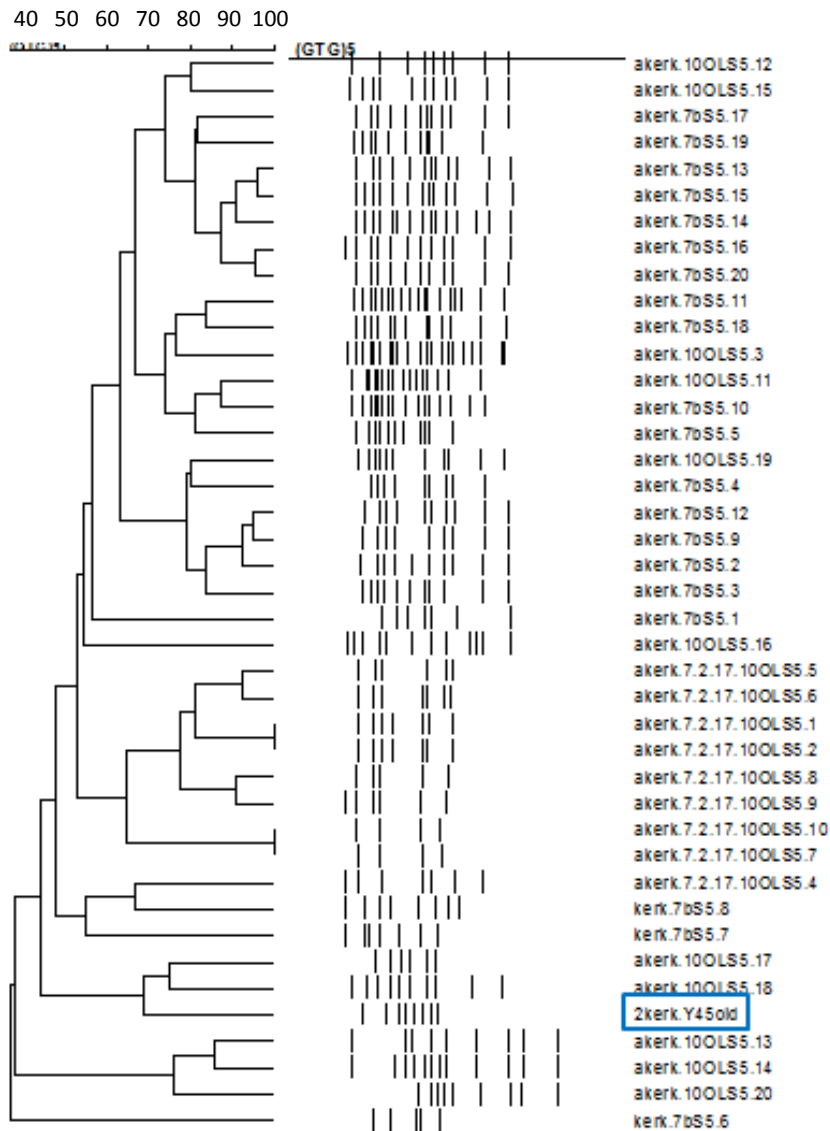
Σχήμα 3 Δενδρόγραμμα ανάλυσης κατά συστάδες (cluster analysis) κατά την έναρξη της ζύμωσης της φυσικής μαύρης ελιάς ποικιλίας Καλαμών με καλλιέργεια εκκίνησης *Metschnikowia pulcherrima* Y14 με βάση τα ποσοστά ομοιότητας των ηλεκτροφορητικών προφίλ όπως λήφθηκαν με τη μέθοδο rep-PCR.



Σχήμα 4 Δενδρόγραμμα ανάλυσης κατά συστάδες (cluster analysis) κατά την έναρξη της ζύμωσης της φυσικής μαύρης ελιάς ποικιλίας Καλαμών με καλλιέργεια εκκίνησης *Pichia guilliermondii* Y22 με βάση τα ποσοστά ομοιότητας των ηλεκτροφορητικών προφίλ όπως λήφθηκαν με τη μέθοδο rep-PCR.

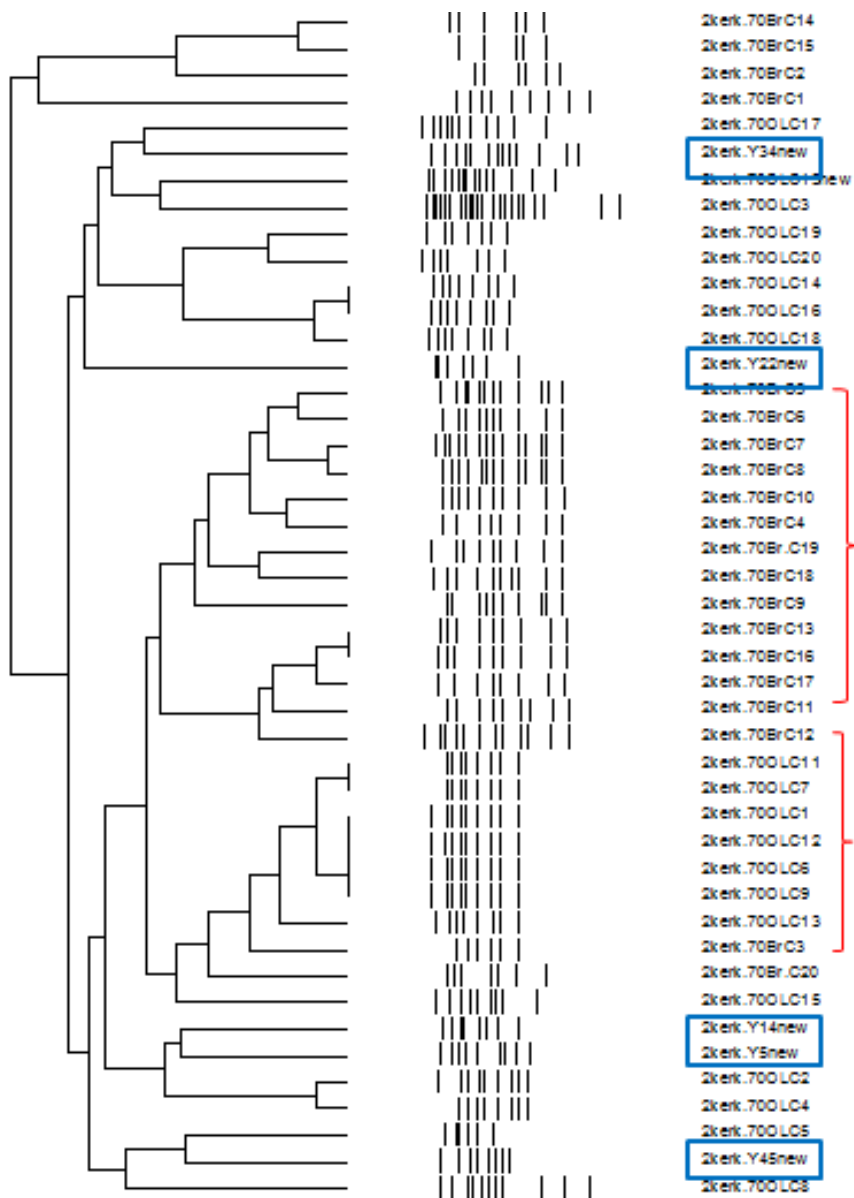


Σχήμα 5 Δενδρόγραμμα ανάλυσης κατά συστάδες (cluster analysis) κατά την έναρξη της ζύμωσης της φυσικής μούρης ελιάς ποικιλίας Καλαμών με καλλιέργεια εκκίνησης *Saccharomyces cerevisiae* Y34 με βάση τα ποσοστά ομοιότητας των ηλεκτροφορητικών προφίλ όπως λήφθηκαν με τη μέθοδο rep-PCR.



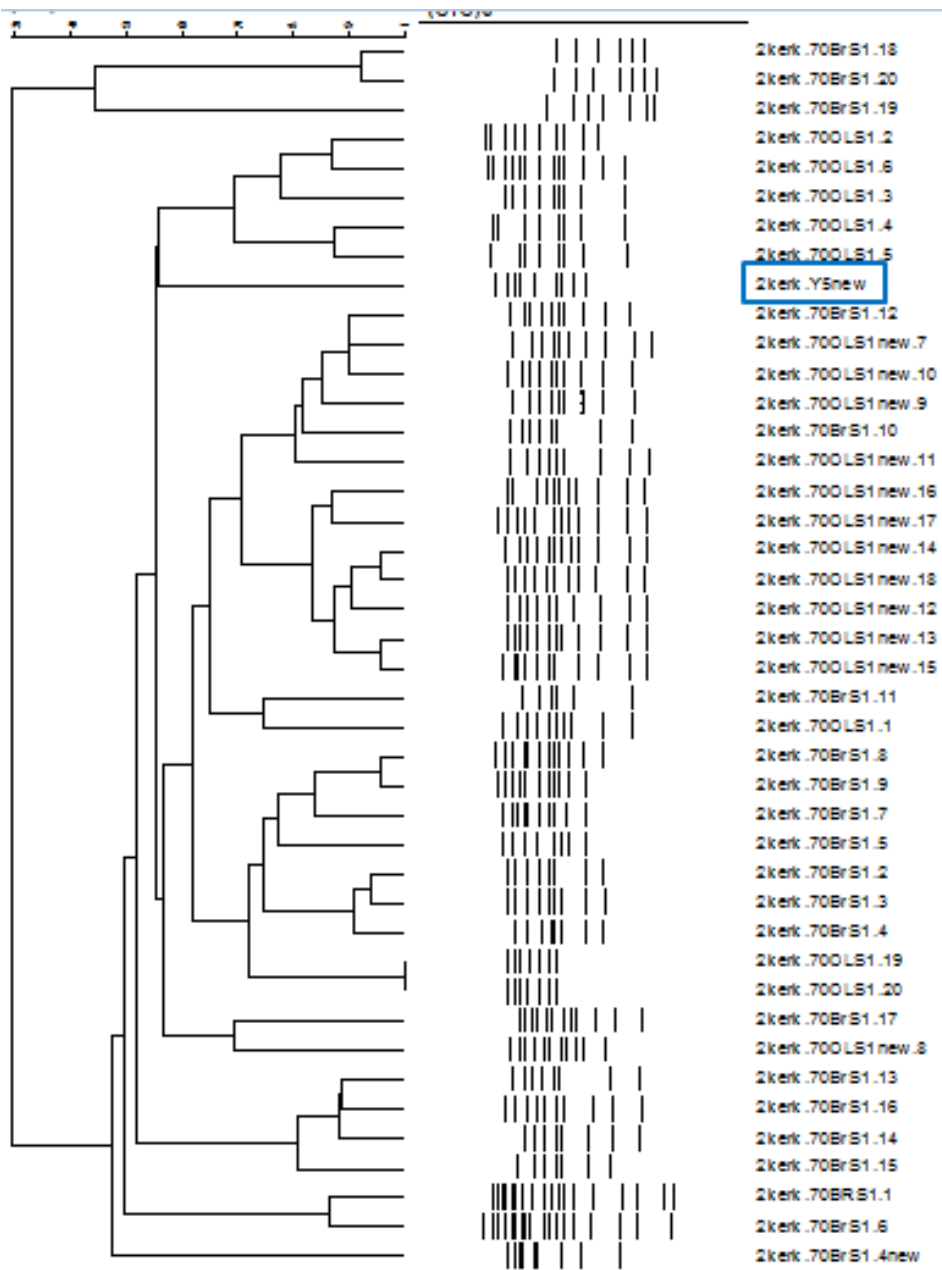
Σχήμα 6 Δενδρόγραμμα ανάλυσης κατά συστάδες (cluster analysis) κατά την έναρξη της ζύμωσης της φυσικής μαύρης ελιάς ποικιλίας Καλαμών με καλλιέργεια εκκίνησης *Candida molendinolei* Y45 με βάση τα ποσοστά ομοιότητας των ηλεκτροφορητικών προφίλ όπως λήφθηκαν με τη μέθοδο rep-PCR.

Το δεύτερο χρονικό σημείο των μοριακών αναλύσεων ταυτίζεται με τη μέση της ζύμωσης, δηλαδή την 70<sup>η</sup> ημέρα. Τα αποτελέσματα των μικροβιολογικών αναλύσεων έδειξαν ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν αρχίσει ήδη να μειώνονται με σταθερό ρυθμό, ενώ ταυτοχρόνως φαίνεται μία μικρή κορυφή να δημιουργείται μεταξύ της 70<sup>ης</sup> και της 80<sup>ης</sup> ημέρας της ζύμωσης που σχετίζεται με την αύξηση των ζυμών (Διαγράμματα 1-6). Ακολουθούμε ακριβώς την ίδια πειραματική διαδικασία με το πρώτο χρονικό σημείο και παίρνουμε τα παρακάτω δενδρογράμματα:



Σχήμα 7 Δενδρογράμμα της ανάλυσης κατά συστάδες (cluster analysis) των ζυμών κατά την 70<sup>η</sup> ημέρα της αυθόρμητης ζύμωσης της φυσικής μαύρης ελιάς ποικιλίας Καλαμών, με βάση τα ποσοστά ομοιότητας των ηλεκτροφορητικών προφίλ όπως λήφθηκαν με τη μέθοδο rep-PCR.

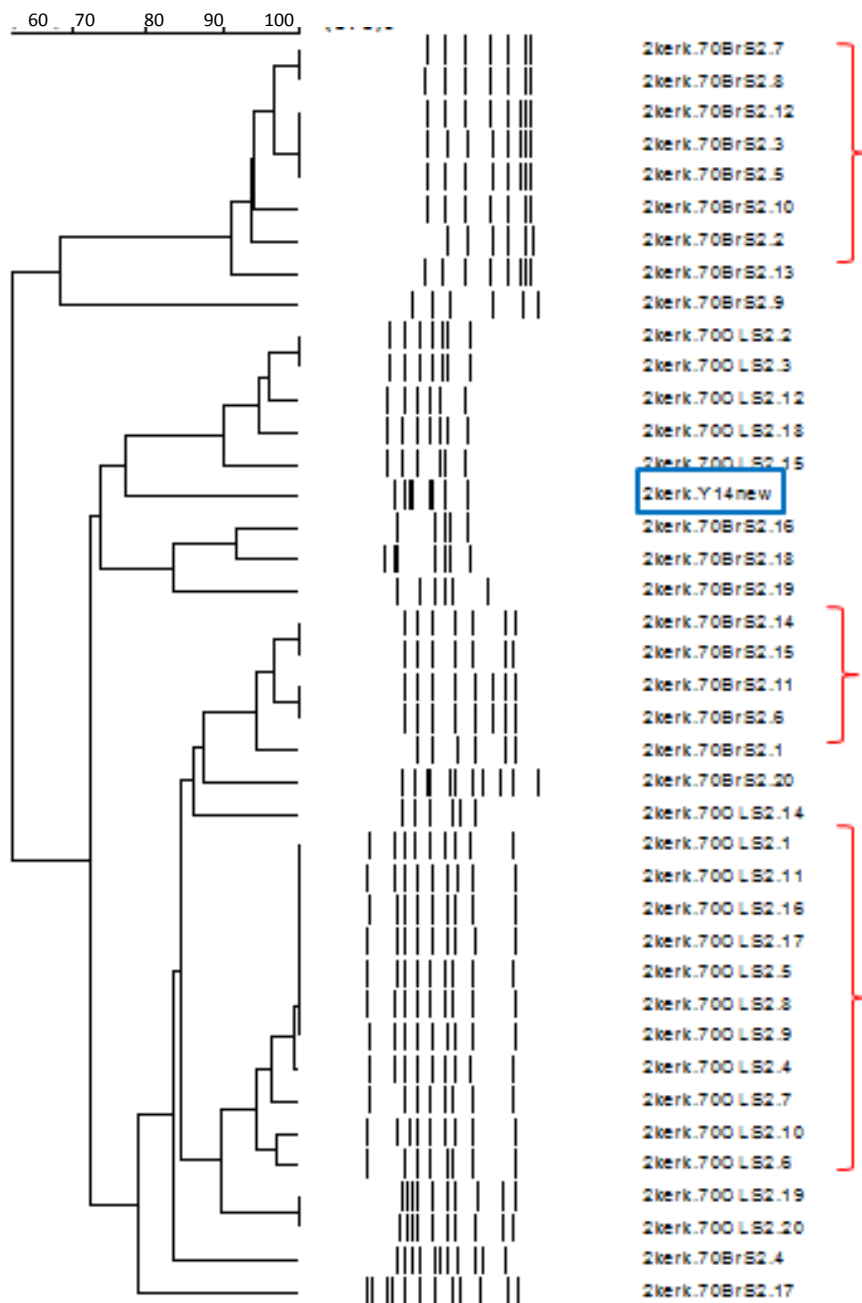
Στο σχήμα 7 παρατηρούμε ότι έχει μειωθεί ο αριθμός των διαφορετικών στελεχών σε σχέση με το πρώτο χρονικό σημείο (7<sup>η</sup> ημέρα) δηλαδή έχει σταθεροποιηθεί κατά μίαν έννοια ο πληθυσμός των ζυμών. Στη συγκεκριμένη ζύμωση δεν έχει προηγηθεί εμβολιασμός με κάποιο στέλεχος και πραγματοποιείται με τη δράση της αυτόχθονης μικροχλωρίδας. Ταυτοχρόνως κατά την ομαδοποίηση και την κατασκευή του δένδρογράμματος με τη χρήση του προγράμματος Bionumerics 6, χρησιμοποιήθηκαν και τα γενετικά προφίλ των στελεχών ζυμών που εμβολιάσαμε στις υπόλοιπες ζυμώσεις ώστε να ελεγχθεί κατά πόσο τα εν λόγω στελέχη ζυμών ανήκουν στην αυτόχθονη μικροχλωρίδα της συγκεκριμένης ζύμωσης. Φαίνεται ότι τα προφίλ τους δεν ταιριάζουν με τα προφίλ της υπόλοιπης μικροχλωρίδας και δεν ανιχνεύονται στο συγκεκριμένο δοχείο στην μέση της ζύμωσης.



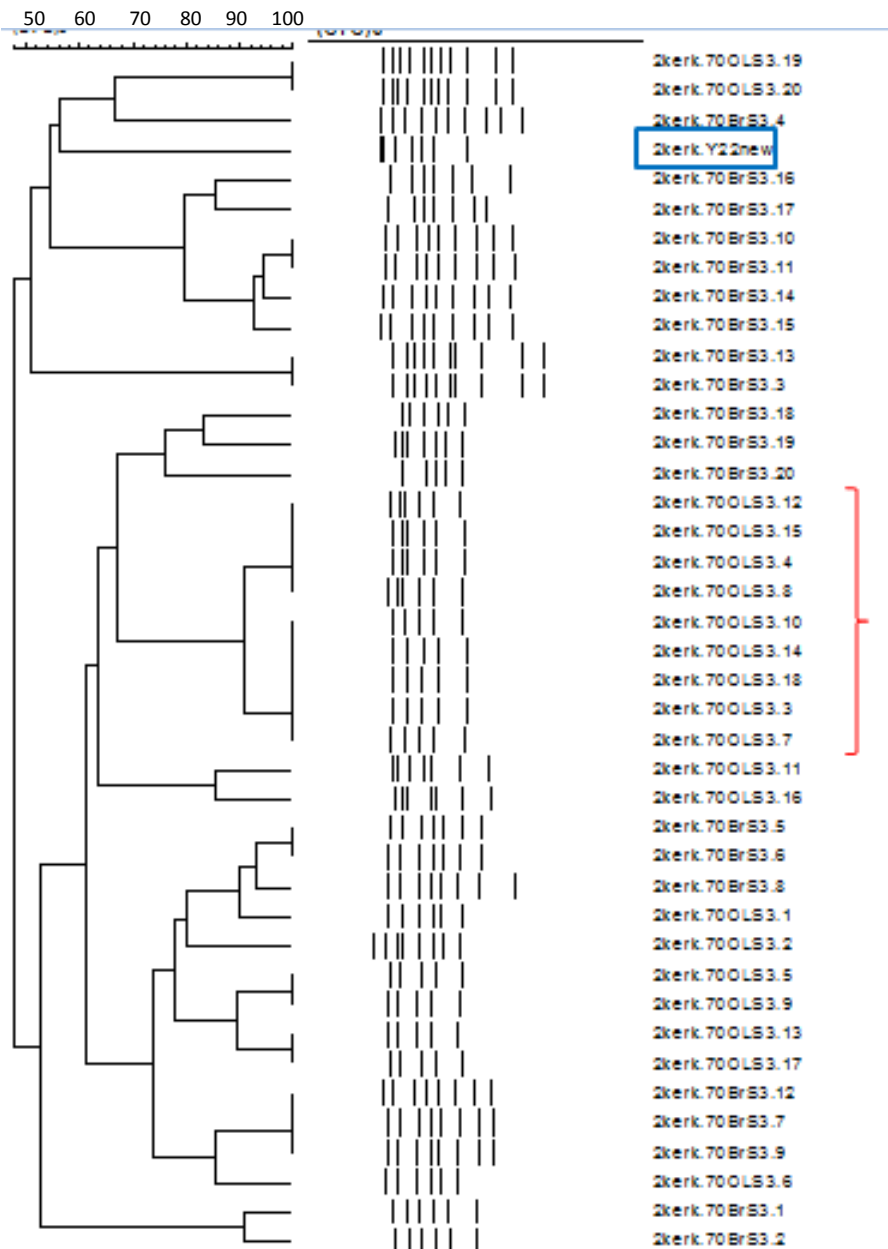
Σχήμα 8 Δενδρόγραμμα ανάλυσης κατά συστάδες (cluster analysis) κατά την 70<sup>η</sup> ημέρα της ζύμωσης της φυσικής μούρης ελιάς ποικιλίας Καλαμών με καλλιέργεια εκκίνησης *Pichia kluyveri* Y5 με βάση τα ποσοστά ομοιότητας των ηλεκτροφορητικών προφίλ όπως λήφθηκαν με τη μέθοδο rep-PCR.



Στο Σχήμα 8 στην περίπτωση της ζύμωσης με την καλλιέργεια εκκίνησης *Pichia kluyveri* (Y5new) παρατηρούμε στη μέση περίπου του δενδρογράμματος μια ομάδα αρκετά μεγάλη που περιλαμβάνει δείγματα καρπού ελιάς που ανήκουν στην ίδια ομάδα με ποσοστό ομολογίας > 90 % όπου φαίνεται να κυριαρχούν στη συγκεκριμένη ζύμωση. Στη μέση περίπου του δενδρογράμματος παρατηρούμε μία ομάδα αρκετά μεγάλη που περικλύει δείγματα καρπού ελιάς και ανήκουν στην ίδια ομάδα. Συγκριτικά με το πρώτο χρονικό σημείο της ανάλυσης (7<sup>η</sup> ημέρα) φαίνεται ότι μειώνεται η ποικιλομορφία των ζυμών και επικρατούν συγκεκριμένα στελέχη τόσο στην ελιά όσο και στην άλμη. Στη περίπτωση της ζύμωσης με καλλιέργεια εκκίνησης *Metschnikowia pulcherrima* (Y14new) (Σχήμα 9) παρατηρούμαι ότι έχουν δημιουργηθεί τρεις διακριτές ομάδες στελεχών με ποσοστά ομολογίας έως και 100% όπου και επικρατούν έναντι των υπολοίπων. Στο Σχήμα 10 στη περίπτωση της ζύμωσης με το στέλεχος *Pichia guilliermondii* (Y22new) τα περισσότερα δείγματα φαίνεται να είναι ομαδοποιημένα και ελάχιστα να αποτελούν μια ξεχωριστή ομάδα, σε αντίθεση και πάλι με το πρώτο σημείο. Στη ζύμωση με το στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* (Y34new) (Σχήμα 11) φαίνεται τα δείγματα άλμης όπου στο περασμένο σημείο αποτελούσαν μία ομάδα να έχουν διαχωριστεί σε περισσότερες. Στο Σχήμα 12 φαίνεται η ομαδοποίηση των 40 δειγμάτων μαζί με το στέλεχος *Candida molendinolei* (Y45new) με το οποίο έχουμε ενοφθαλμίσει το δοχείο. Στο σχήμα παρατηρούμε δύο διακριτές ομάδες. Η μία ομάδα περιλαμβάνει μόνο δείγματα ελιάς που ανήκουν στο ίδιο στέλεχος ενώ η άλλη διακριτή ομάδα περιλαμβάνει και δείγματα ελιάς αλλά και άλμης που σημαίνει ότι το στέλεχος ανιχνεύθηκε και στον καρπό αλλά και στην άλμη. Σχετικά με το στέλεχος που εμβολιάσαμε παρατηρούμε πως παρουσιάζει γενετικό προφίλ με ποσοστό ομολογίας 85% με το δείγμα 2kerk.70OLS5.19.

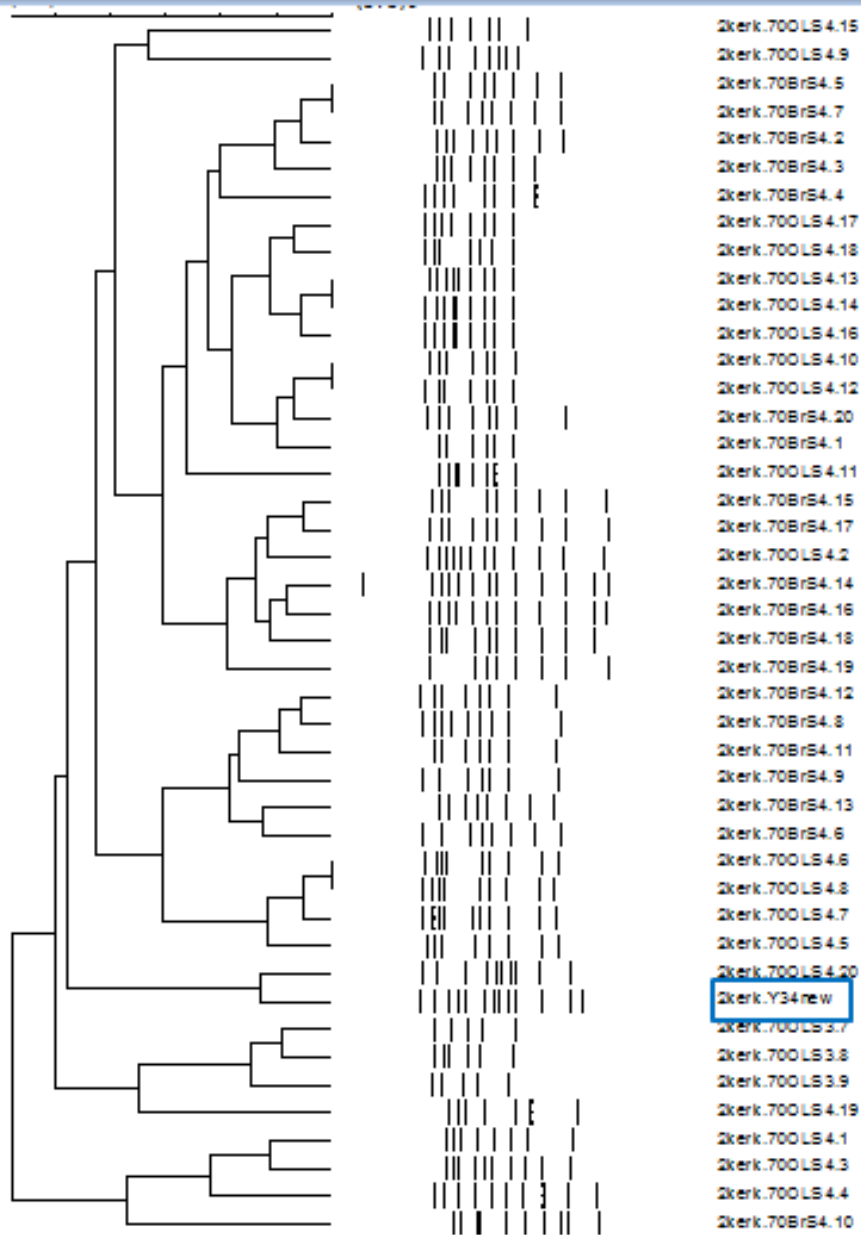


Σχήμα 9 Δενδρόγραμμα ανάλυσης κατά συστάδες (cluster analysis) κατά την 70<sup>η</sup> ημέρα της ζύμωσης της φυσικής μούρης ελιάς ποικιλίας Καλαμών με καλλιέργεια εκκίνησης *Metschnikowia pulcherrima* Y14 με βάση τα ποσοστά ομοιότητας των ηλεκτροφορητικών προφίλ όπως λήφθηκαν με τη μέθοδο rep-PCR.

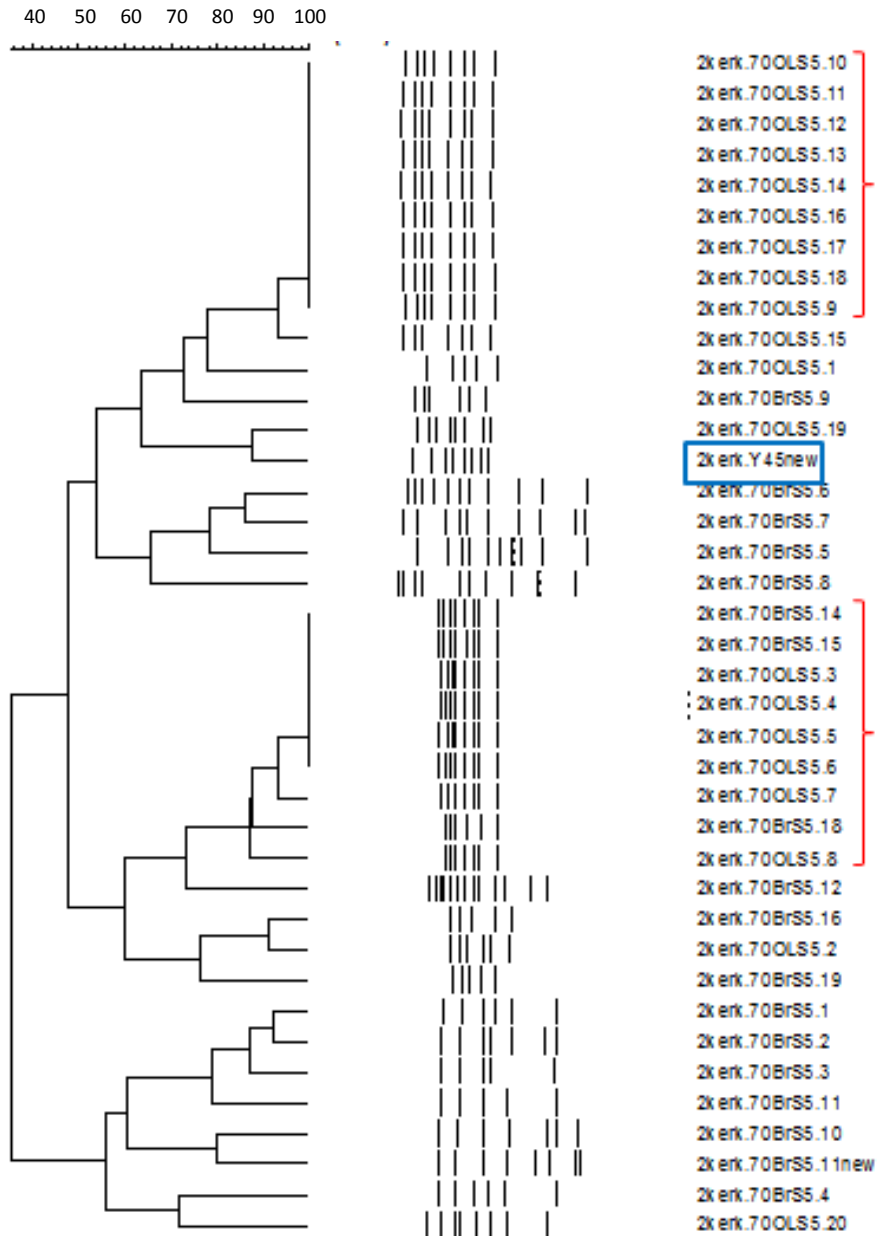


Σχήμα 10 Δενδρόγραμμα ανάλυσης κατά συστάδες (cluster analysis) κατά την 70<sup>η</sup> ημέρα της ζύμωσης της φυσικής μαύρης ελιάς ποικιλίας Καλαμών με καλλιέργεια εκκίνησης *Pichia guilliermondii* Y22 με βάση τα ποσοστά ομοιότητας των ηλεκτροφορητικών προφίλ όπως λήφθηκαν με τη μέθοδο rep-PCR.

40 50 60 70 80 90 100



Σχήμα 11 Δενδρόγραμμα ανάλυσης κατά συστάδες (cluster analysis) κατά την 70<sup>η</sup> ημέρα της ζύμωσης της φυσικής μαύρης ελιάς ποικιλίας Καλαμών με καλλιέργεια εκκίνησης *Saccharomyces cerevisiae* Y34 με βάση τα ποσοστά ομοιότητας των ηλεκτροφορητικών προφίλ όπως λήφθηκαν με τη μέθοδο rep-PCR.



Σχήμα 12 Δενδρόγραμμα ανάλυσης κατά συστάδες (cluster analysis) κατά την 70<sup>η</sup> ημέρα της ζύμωσης της φυσικής μαύρης ελιάς ποικιλίας Καλαμών με καλλιέργεια εκκίνησης *Candida molendinolei* Y45 με βάση τα ποσοστά ομοιότητας των ηλεκτροφορητικών προφίλ όπως λήφθηκαν με τη μέθοδο rep-PCR.

Το τρίτο χρονικό σημείο των μοριακών αναλύσεων ταυτίζεται με το τέλος της ζύμωσης, δηλαδή την 150<sup>η</sup> ημέρα. Τα αποτελέσματα των μικροβιολογικών αναλύσεων έδειξαν ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν σταθεροποιηθεί, ενώ ταυτοχρόνως φαίνεται να έχουν σταθεροποιηθεί και οι ζύμες (Διαγράμματα 1-6). Ακολουθούμε ακριβώς την ίδια πειραματική διαδικασία με το πρώτο και δεύτερο χρονικό σημείο και παίρνουμε τα παρακάτω δενδρογράμματα (Σχήματα 13-18).

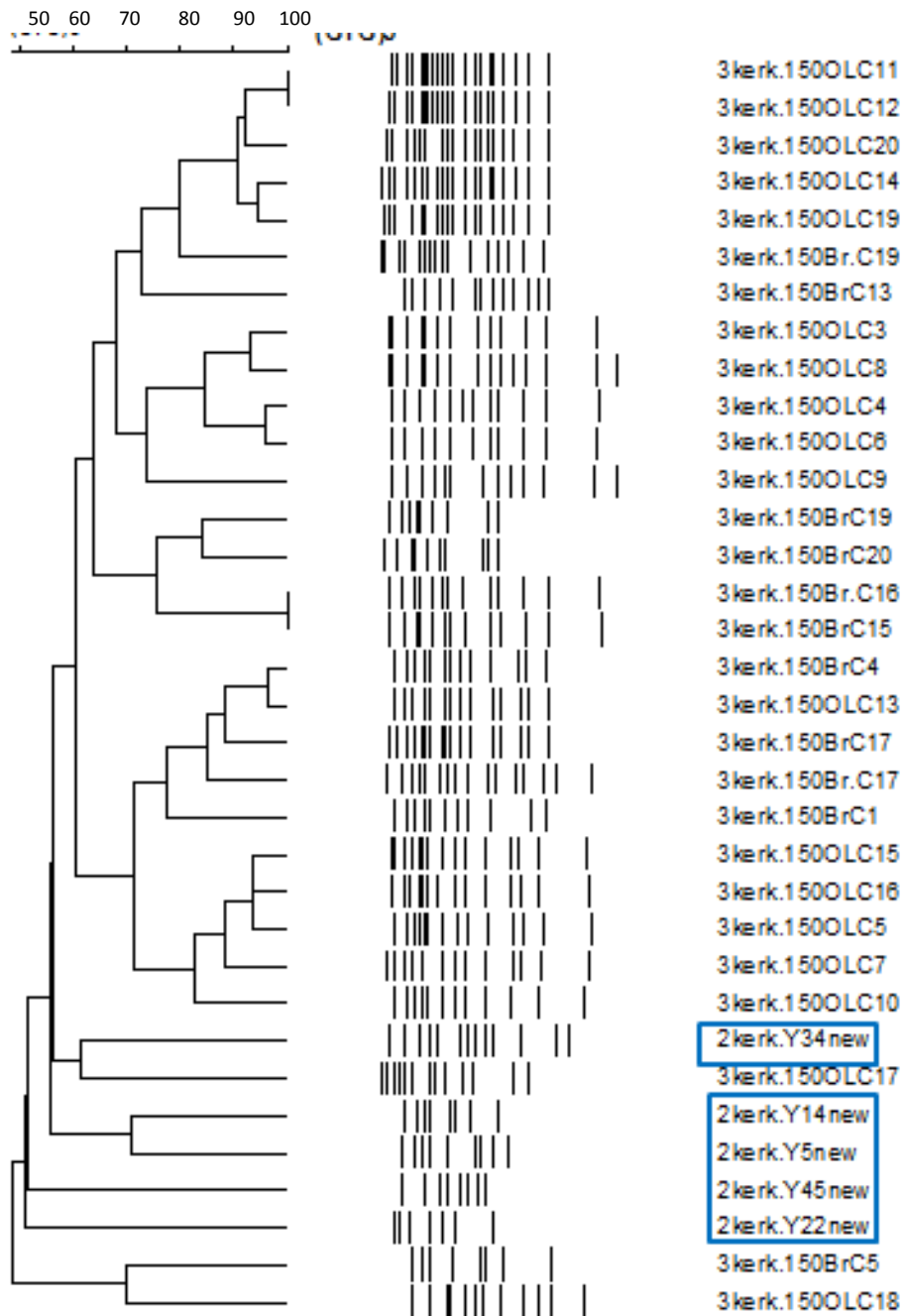
Στο σχήμα 13 παρατηρούμε πως δημιουργούνται κάποιες ομάδες στελεχών. Παρουσιάζονται κάποια διαφορετικά γενετικά προφίλ βάση του προγράμματος του Bionumerics 6. Το συγκείμενο δοχείο αποτελεί τον μάρτυρα και ακολουθεί την φυσιολογική πορεία της ζύμωσης. Ταυτοχρόνως κατά την ομαδοποίηση και την κατασκευή του δενδρογράμματος χρησιμοποιήθηκαν και τα γενετικά προφίλ των στελεχών ζυμών που εμβολιάσαμε στα υπόλοιπα 5 δοχεία ώστε να φανεί εάν και κατά πόσο ανήκουν και ανιχνεύονται στην αυτόχθονη μικροχλωρίδα της συγκεκριμένης ζύμωσης. Φαίνεται ότι τα προφίλ τους δεν ταιριάζουν με τα προφίλ της υπόλοιπης χλωρίδας και δεν ανιχνεύονται στο συγκεκριμένο δοχείο στην μέση της ζύμωσης. Συγκρίνοντας το δενδρόγραμμα της 150<sup>ης</sup> ημέρα με αυτό της 7<sup>ης</sup> ημέρας της ζύμωσης δηλαδή του τελικού και αρχικού σημείου ζύμωσης που επιλέξαμε να κάνουμε τις μοριακές αναλύσεις οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι το μικροβιακό φορτίο σταθεροποιείται με το πέρας της ζύμωσης και η ποικιλότητα των μικροοργανισμών όσων αφορά στις ζύμες μειώνεται έντονα καθώς δημιουργούνται και κυριαρχούν συγκεκριμένα στελέχη τα οποία έχουν ομαδοποιηθεί. Αυτό ισχύει για όλες τις περιπτώσεις της ζύμωσης που πραγματοποιήθηκε στα 6 δοχεία.

Στο Σχήμα 14 φαίνεται ο διαχωρισμός των 40 στελεχών (20 άλμης με κωδικούς «150b» και 20 ελιάς με κωδικούς «150Ol») μαζί με το στέλεχος *Pichia kluyveri* (Y5new) το οποίο έχουμε ενοφθαλμίσει στο δοχείο. Συγκριτικά με το πρώτο σημείο στο συγκεκριμένο δοχείο φαίνεται να μειώθηκε αρκετά η διαφορετικότητα των στελεχών και να επικράτησαν συγκεκριμένα στελέχη τόσο στην ελιά όσο και στην άλμη. Στη περίπτωση της ζύμωσης με καλλιέργεια εκκίνησης *Metschnikowia pulcherrima* (Y14new) είναι ξεκάθαρο ότι έχουν δημιουργηθεί διακριτές ομάδες στελεχών όπου και επικρατούν έναντι των υπολοίπων με ποσοστά ομολογίας > 90%. Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορούμε να αναφερθούμε και στο ίδιο στέλεχος με ποσοστό ομολογίας που φτάνει στο 100%.

Στο Σχήμα 16, στη ζύμωση δηλαδή με καλλιέργεια εκκίνησης *Pichia guilliermondii* (Y22new) τα περισσότερα στελέχη φαίνεται να είναι ομαδοποιημένα και ελάχιστα να

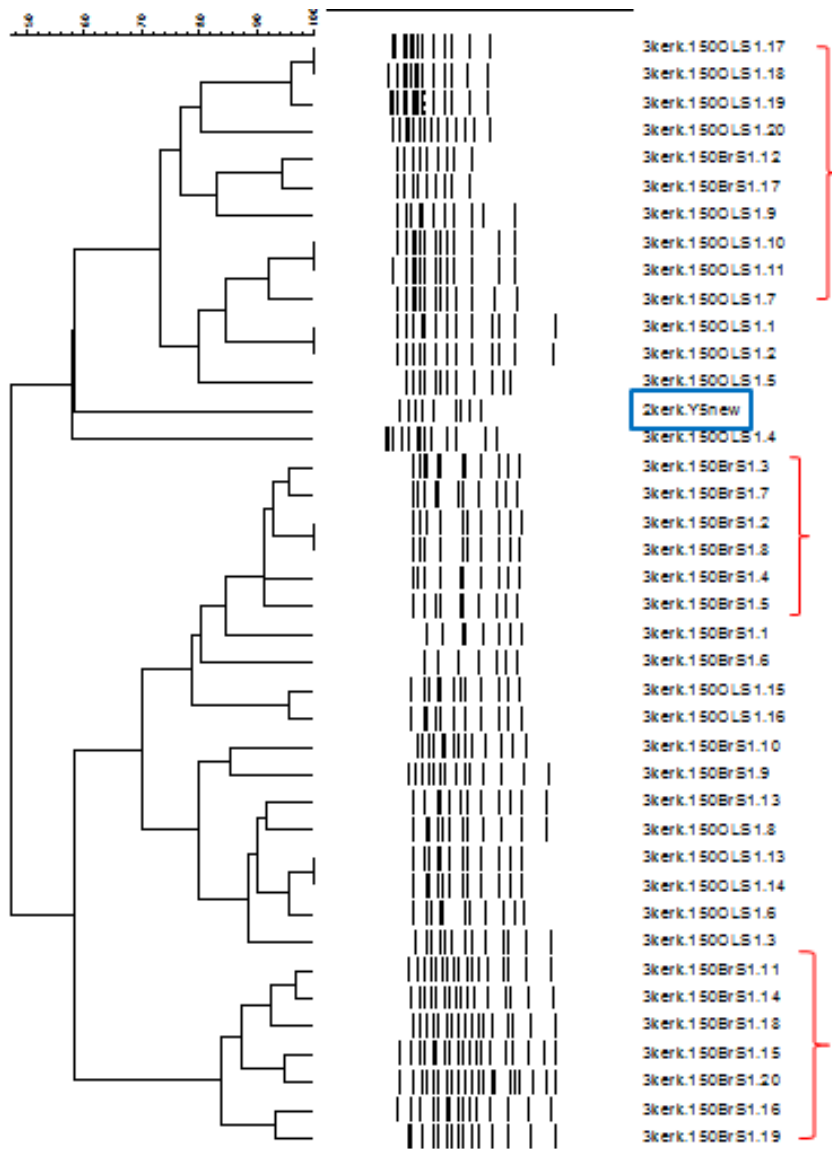
αποτελούν μια ξεχωριστή ομάδα, σε αντίθεση με το πρώτο σημείο όπου υπάρχει έντονη μικροβιακή ποικιλότητα στο δοχείο. Στην περίπτωση αυτή επίσης παρατηρούμε πως ξεχωριστή ομάδα δημιουργούν δείγματα που έχουν απομονωθεί από άλμη και διαφορετική από ελιά. Οι δύο αυτές ομάδες διαφέρουν μεταξύ τους κατά 30%. Αυτό δείχνει πως το μικροβιακό φορτίο μεταξύ ελιάς και άλμης μπορεί να ποικίλει.

Στο Σχήμα 17 φαίνεται ο διαχωρισμός των 40 στελεχών (20 άλμης με κωδικούς «150b» και 20 ελιάς με κωδικούς «150O1») μαζί με το στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* (Y34new). Στην παρούσα κατάσταση φαίνεται πως κάποια δείγματα άλμης εμπεριέχονται σε ομάδα που έχουν δημιουργήσει απομονώσεις καρπού αλλά και το αντίστροφο. Αυτό δείχνει την έντονη αλληλεπίδραση που υπάρχει μεταξύ άλμης και καρπού. Τέλος στη περίπτωση της ζύμωσης με το στέλεχος *Candida molendinolei* (Y45new) (Σχήμα 18) παρατηρούμε δύο διακριτές ομάδες. Η μία ομάδα περιλαμβάνει μόνο δείγματα ελιάς που ανήκουν στο ίδιο στέλεχος ενώ η άλλη διακριτή ομάδα περιλαμβάνει και δείγματα ελιάς αλλά και άλμης που σημαίνει ότι το στέλεχος ανιχνεύθηκε και στον καρπό αλλά και στην άλμη. Σχετικά με τα στελέχη που εμβολιάσαμε συμπεραίνουμε ότι και πάλι δεν ανιχνεύθηκε η επιβίωση τους σε κανένα δοχείο ζύμωσης ούτε στο τελικό σημείο της διαδικασίας (150<sup>η</sup> ημέρα ζύμωσης).

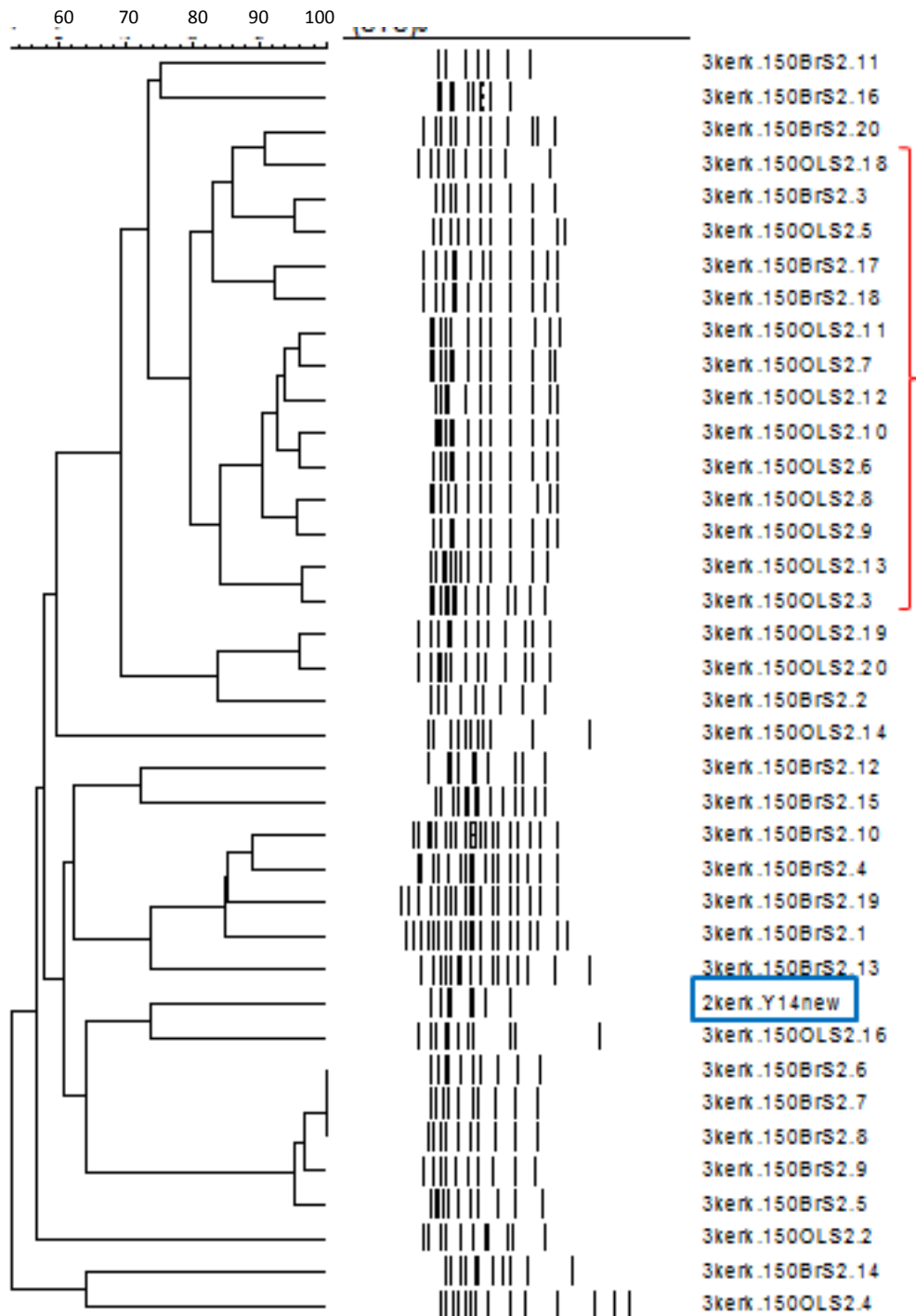


Σχήμα 13 Δενδρόγραμμα της ανάλυσης κατά συστάδες (cluster analysis) των ζυμών κατά την τελευταία ημέρα της αυθόρμητης ζύμωσης της φυσικής μαύρης ελιάς ποικιλίας Καλαμών, με βάση τα ποσοστά ομοιότητας των ηλεκτροφορητικών προφίλ όπως λήφθηκαν με τη μέθοδο rep-PCR.

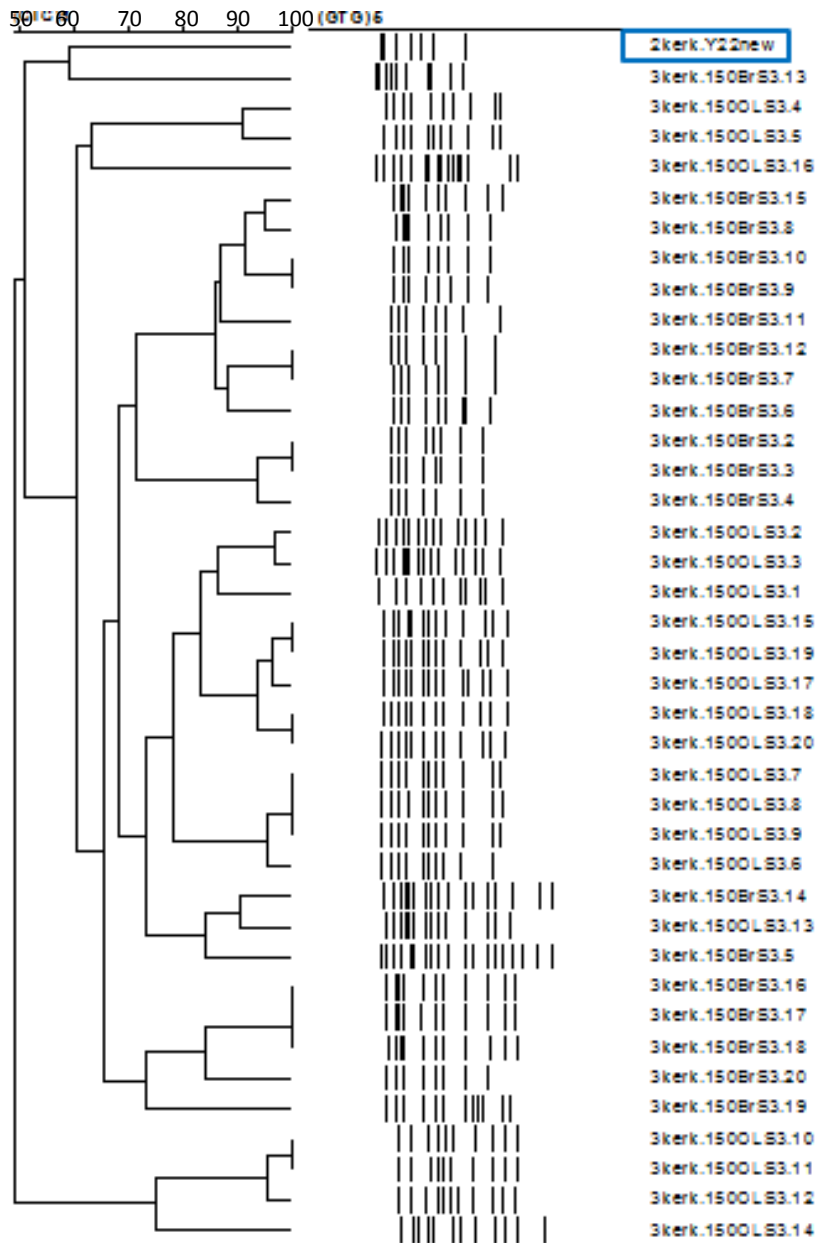




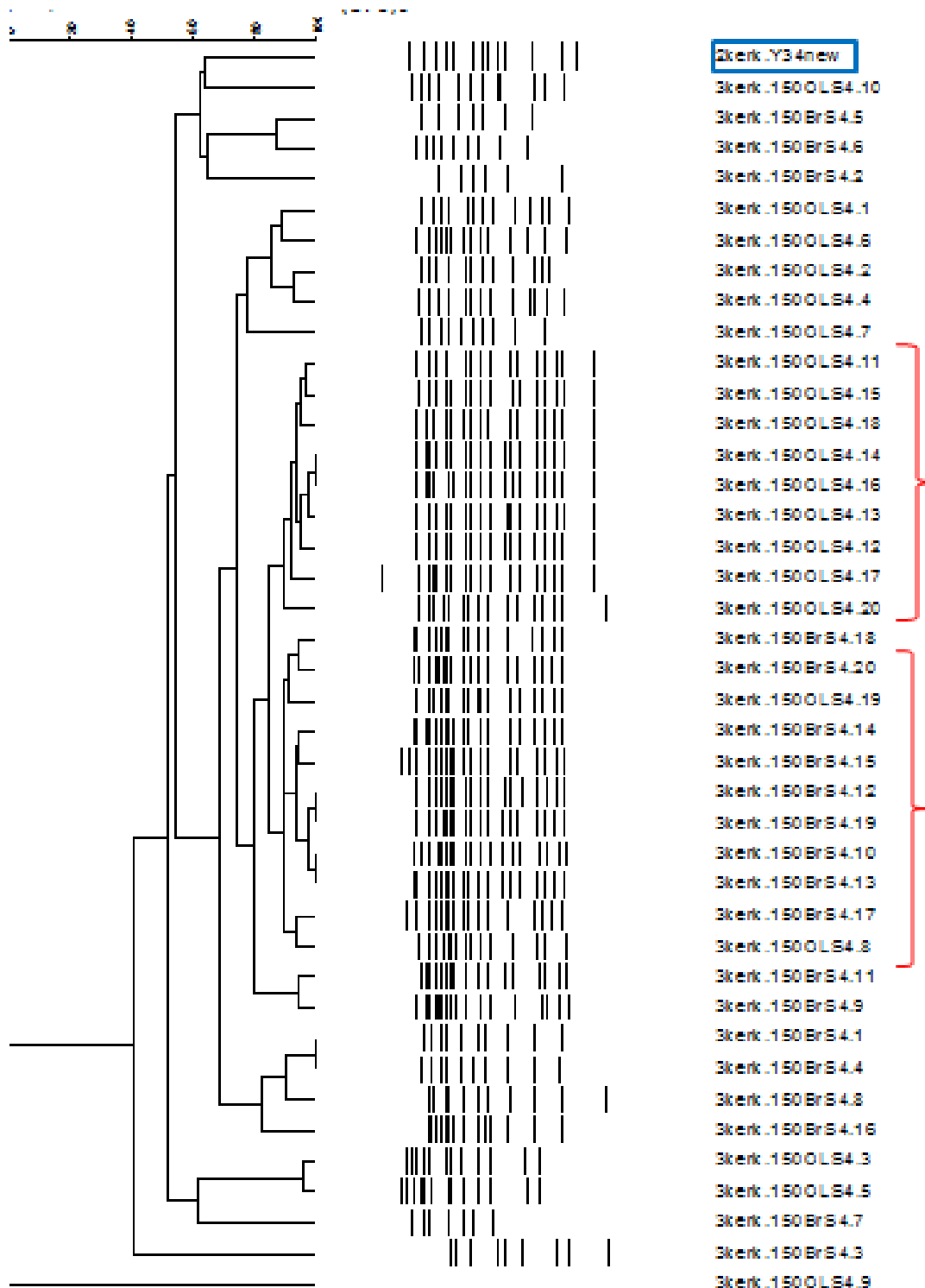
Σχήμα 14 Δενδρόγραμμα ανάλυσης κατά συστάδες (cluster analysis) κατά την 150<sup>η</sup> ημέρα της ζύμωσης της φυσικής μαύρης ελιάς ποικιλίας Καλαμών με καλλιέργεια εκκίνησης *Pichia kluyveri* Y5 με βάση τα ποσοστά ομοιότητας των ηλεκτροφορητικών προφίλ όπως λήφθηκαν με τη μέθοδο rep-PCR.



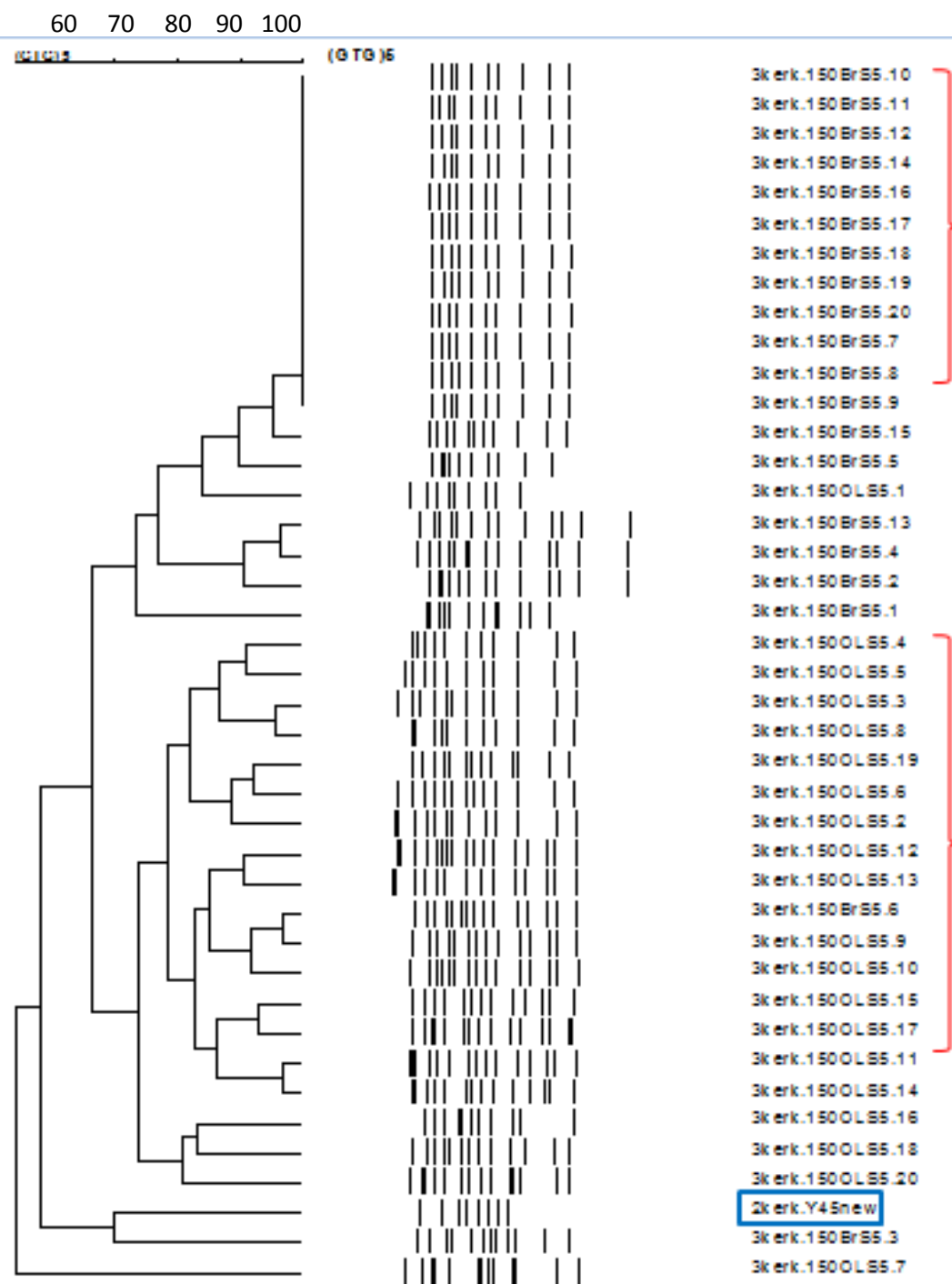
Σχήμα 15 Δενδρόγραμμα ανάλυσης κατά συστάδες (cluster analysis) κατά την 150<sup>η</sup> ημέρα της ζύμωσης της φυσικής μαύρης ελιάς ποικιλίας Καλαμών με καλλιέργεια εκκίνησης *Metschnikowia pulcherrima* Y14 με βάση τα ποσοστά ομοιότητας των ηλεκτροφορητικών προφίλ όπως λήφθηκαν με τη μέθοδο rep-PCR.



Σχήμα 16 Δενδρόγραμμα ανάλυσης κατά συστάδες (cluster analysis) κατά την 150<sup>η</sup> ημέρα της ζύμωσης της φυσικής μαύρης ελιάς ποικιλίας Καλαμών με καλλιέργεια εκκίνησης *Pichia guilliermondii* Y22 με βάση τα ποσοστά ομοιότητας των ηλεκτροφορητικών προφίλ όπως λήφθηκαν με τη μέθοδο rep-PCR.



Σχήμα 17 Δενδρόγραμμα ανάλυσης κατά συστάδες (cluster analysis) κατά την 150<sup>η</sup> ημέρα της ζύμωσης της φυσικής μαύρης ελιάς ποικιλίας Καλαμών με καλλιέργεια εκκίνησης *Saccharomyces cerevisiae* Y34 με βάση τα ποσοστά ομοιότητας των ηλεκτροφορητικών προφίλ όπως λήφθηκαν με τη μέθοδο rep-PCR.



Σχήμα 18 Δενδρόγραμμα ανάλυσης κατά συστάδες (cluster analysis) κατά την 150<sup>η</sup> ημέρα της ζύμωσης της φυσικής μαύρης ελιάς ποικιλίας Καλαμών με καλλιέργεια εκκίνησης *Candida molendinolei* Y45 με βάση τα ποσοστά ομοιότητας των ηλεκτροφορητικών προφίλ όπως λήφθηκαν με τη μέθοδο rep-PCR.

Κατά την υλοποίηση της παρούσας μελέτης σε διάφορα στάδια παρουσιάστηκαν ορισμένα προβλήματα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα δεν ανιχνεύθηκαν τα στελέχη ζυμών με τα οποία ενοφθαλμίστηκαν τα δοχεία ζύμωσης σε κανένα στάδιο. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να συσχετιστεί με τη μειωμένη αρχικά συγκέντρωση NaCl η οποία κυμαινόταν στο 7% και επέτρεψε την ταχεία αύξηση και επικράτηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων από την αρχή της ζύμωσης. Εναλλακτικά, σύμφωνα με άλλες μελέτες, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί υψηλότερη συγκέντρωση άλατος (>8 %) η οποία θα ευνοούσε την κυριαρχία των ζυμών έναντι των οξυγαλακτικών βακτηρίων (Tassou *et al.* 2002, Lopez *et al.* 2005, Arroyo-López *et al.* 2008).

Σύμφωνα με τους Botta & Cocolin (2012) γίνονται προσπάθειες απομόνωσης μικροοργανισμών ανεξαρτήτως καλλιέργειας (culture independent) απευθείας από το ίδιο το τρόφιμο με αποτέλεσμα την απομόνωση του συνολικού μικροβιακού φορτίου και όχι ένα ποσοστό αυτού. Ένα ακόμη πρόβλημα είναι οι φυσικοχημικές συνθήκες που επικρατούν κατά τη ζύμωση της φυσικής μαύρης ελιάς. Ειδικότερα, η τιμή του pH, η αλατότητα αλλά και η θερμοκρασία είναι παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών και στην περίπτωση μας των ζυμών (Arroyo-López *et al.* 2008). Επιπλέον η διαδικασία προσαρμογής των ζυμών που επρόκειτο να χρησιμοποιηθούν ως καλλιέργειες εκκίνησης σε κατάλληλες συνθήκες άλατος και pH κρίνεται απαραίτητη και θα μπορούσε να αποτελέσει λύση όσον αφορά στην επιβίωση τους κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Ενδιαφέρουσα προοπτική είναι η ενίσχυση του γονιδίου 26S rRNA των στελεχών που απομονώθηκαν κατά την παρούσα εργασία και πιο συγκεκριμένα αυτών που κυριάρχησαν στην ζύμωση με σκοπό την ταυτοποίηση τους και την περαιτέρω μελέτη του προβιοτικού τους δυναμικού με σκοπό τη χρήση τους για δημιουργία προβιοτικών τροφίμων.

## Ε. Συμπεράσματα

- ✓ Τόσο ο πρώτος όσο και ο δεύτερος ενοφθαλμισμός φάνηκε να μην επηρέασε τη μεταβολή του μικροβιακού πληθυσμού των τριών ομάδων μικροοργανισμών που καταμετρήθηκαν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (Οξυγαλακτικά βακτήρια, ζύμες και εντεροβακτήρια).
- ✓ Σε όλη τη διάρκεια της ζύμωσης κυριάρχησαν τα οξυγαλακτικά βακτήρια με πληθυσμό στον καρπό που έφτασε σε 8,0 log CFU/g κατά μέσο όρο τις πρώτες ημέρες της ζύμωσης και σταθεροποιήθηκε σε 7,0 log CFU/g στο τέλος της ζύμωσης, ενώ στην άλμη η μεταβολή του πληθυσμού παρουσίασε ανοδική πορεία και στο τέλος σταθεροποιήθηκε σε 6 log CFU/ml.
- ✓ Η πληθυσμιακή πυκνότητα των ζυμών στην άλμη παρουσίασε μικρή αύξηση τις πρώτες ημέρες της ζύμωσης ιδιαίτερα μετά τον πρώτο ενοφθαλμισμό και σε ορισμένες περιπτώσεις έφτασε σε 7,0 log CFU/ml. Κατά την πορεία όμως της ζύμωσης ο πληθυσμός τους στην άλμη μειώθηκε και κυμάνθηκε σε 4,0-5,0 log CFU/ml. Ο πληθυσμός των ζυμών στον καρπό κυμάνθηκε σε χαμηλότερα επίπεδα και δεν φάνηκε να επηρεάστηκε ιδιαίτερος σε κανένα στάδιο της ζύμωσης της μαύρης ελιάς από τον ενοφθαλμισμό που είχε προηγηθεί.
- ✓ Τα εντεροβακτήρια μηδενίστηκαν από τις πρώτες ημέρες της ζύμωσης τόσο στην άλμη όσο και στον καρπό με μία μικρή καθυστέρηση στις ζυμώσεις με καλλιέργειες εκκίνησης *Pichia kluyveri* /Y5 και *Metschnikowia pulcherrima* /Y14.
- ✓ Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των περισσότερων ζυμώσεων (pH και ογκομετρούμενη οξύτητα) ήταν εντός των ορίων του διεθνούς προτύπου για την εμπορία της επιτραπέζιας ελιάς από το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου. Παρόλα αυτά, η ζύμωση με καλλιέργεια εκκίνησης *Metschnikowia pulcherrima* Y14 παρουσίασε τιμή pH μεγαλύτερη από 4,5 καθιστώντας το τελικό προϊόν μη ασφαλές για τον καταναλωτή.
- ✓ Τέλος η μοριακή ανάλυση αφορούσε στις ζύμες σε τρία διακριτά σημεία της ζύμωσης της φυσικής μαύρης ελιάς καλαμών (7<sup>η</sup>, 70<sup>η</sup>, 150<sup>η</sup> ημέρα ζύμωσης) και έδειξε ότι στην αρχή της ζύμωσης υπάρχουν έντονες διαφοροποιήσεις μεταξύ των δειγμάτων που απομονώσαμε τόσο στην άλμη όσο και στον καρπό με βάση τα δενδρογράμματα που προέκυψαν από την ομαδοποίηση των ηλεκτροφορητικών προφίλ καθώς δημιουργούνται πολλές μικρές ομάδες που φέρουν διαφορετικές αλληλουχίες. Την

70<sup>η</sup> και την 150<sup>η</sup> ημέρα της ζύμωσης φαίνεται πως ο πληθυσμός έχει σταθεροποιηθεί στην ελιά αλλά και στην άλμη και έχουν επικρατήσει ορισμένα στελέχη σε κάθε δοχείο. Απομονώσεις από την άλμη φαίνεται σε ορισμένες περιπτώσεις να ταυτίζονται με απομονώσεις από τον καρπό της ελιάς γεγονός που αποδεικνύει πως ορισμένοι μικροοργανισμοί που βρίσκονται στην άλμη μεταφέρονται στην ελιά ή και το αντίστροφο.

- ✓ Τέλος η παρούσα μελέτη έδειξε πως οι επιλεγμένες καλλιέργειες εκκίνησης δεν επικράτησαν σε κανένα στάδιο της ζύμωσης, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί σε ανταγωνισμό τόσο από τα οξυγαλακτικά βακτήρια όσο και από τις αυτόχθονες ζύμες.



## ΣΤ. Βιβλιογραφία

- Argyri A.A., Mallouchos, A., Panagou, E.Z., Tassou, C.C. (2014). Performance of two potential probiotic *Lactobacillus* strains from the olive microbiota as starters in the fermentation of heat shocked green olives. *International Journal Food Microbiology*, 171, 68–76.
- Arroyo-López F.N., Durán-Quintana M.C., Ruiz-Barba, J.L., Querol, A., Garrido-Fernández A. (2006). Use of molecular methods for the identification of yeast associated with table olives. *Food Microbiology*. Volume 23, Issue 8, Pages 791–796.
- Arroyo-López F.N., Querol A., Bautista-Gallego J. and Garrido-Fernández A. (2008) Role of yeasts in table olive production. *International Journal of Food Microbiology* 128, 189-196.
- Arroyo-López F.N., Romero-Gil V., Bautista-Gallego J., Rodríguez-Gómez F. and Jiménez-Díaz R. (2012) Yeasts in table olive processing: desirable or spoilage microorganisms? *International Journal of Food Microbiology* 160, 42–49.
- Barnett, J.A., Payne, R.W., Yarrow, D., (1990). *Yeasts: Characteristics and Identification*, Second edition. University Press, Cambridge.
- Bevilacqua A., Corbo M.R. and Sinnigaglia M. (2012) Selection of yeasts as starter cultures for table olives: a step-by-step procedure. Department of Food Science. University of Foggia. Italy. *Frontiers in Microbiology* 3, 194.
- Blana V.A., Grounta, A., Tassou, C.C., Nychas, G. J., Panagou, E.Z. (2014). Inoculated fermentation of green olives with potential probiotic *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus plantarum* starter cultures isolated from industrially fermented olives. *Food Microbiol.*, 38, 208–218.
- Bonatsou, S.; Benítez, A.; Rodríguez-Gómez, F.; Panagou, E.Z.; Arroyo-López, F.N. (2015). Selection of yeasts with multifunctional features for application as starters in natural black table olive processing. *Food Microbiology*, 46, 66–73.
- Borbolla y Alcalá, J.M.R., Rejano Navarro, L. and Nosti Vega, M. (1975) La formación de ácido propiónico durante la conservación de las aceitunas verdes de mesa. *Grasas y Aceites* 26, 153-160.

- Botstein D., White R.L., Skolnick M., and Davis R.W. (1980 May). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms . *Am J Hum Genet.*; 32(3): 314–331..
- Botta C., Langerholc T., Cencic A .and Cocolin L. (2014) In vitro Selection and Characterization of New Probiotic Candidates from Table Olive Microbiota. *PLOS one* 9, e94457 .
- Brown D F , M Warner, C E Taylor, and R E Warren. *J Clin Pathol.* 1988 Automated screening of blood cultures with the Malthus microbiological growth analyser. Jun; 41(6): 671–675.
- Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., & Scher, J. 2011. Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., & Scher, J. (2011). *Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications.* *Journal of Food Engineering*, 104, 467–483.
- Corsetti A., Perpetuini G., Schirone M., Tofalo R. and Suzzi G. 2012. Application of starter cultures to table olive fermentation: an overview on the experimental studies. *Frontiers in Microbiology* 3, 248.
- De Bellis, P., Valerio, F., Sisto, A., Lonigro, S. L., Lavermicocca, P. 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. *International Journal of Food Microbiol.* 2010, 140, 6–13
- Del Piano, M.,Morelli, L., Strozzi, G.P., Allesina, S., Barba, M., Deidda, F., Lorenzini, P., Ballar´e, M., Montino, F., Orsello, M., Sartori, M., Garello, E., Carmagnola, S., Pagliarulo, M. and Capurso, L. 2006. Probiotics: from research to consumer. *Digestive and Liver Disease* 38: 248-255.
- Denis J. Reen Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Basic Protein and Peptide Protocols.* 1994. Volume 32 of the series *Methods in Molecular Biology™* pp 461-466.
- Duran Quintana, M.C., Garrido Fernandez, A., Gonzalez Cancho, F. and Fernandez Diiez, M.J. (1971) Aceitunas negras maduras en salmuera. Estudio fisico-quimico y microbiològico de la fermentación. *Grasas y Aceites* 22, 167-177.
- Durán Quitana, M.C., González, F., Garrido, A., 1979. Aceitunas negras al natural en salmuera. Ensayos de producción de alambrado. Inoculación de diversos

microorganismos aislados de salmueras de fermentación. *Grasas y Aceites* 30, 361–367.

- Durân Quintana, M.C., Garcia Garcia, P., Brenes Balbuera, M. and Fernandez Gonzalez, M.J. (1991) Aceitunas tipo negras. Estudio comparativo de tres procedimientos para la concervación previa de frutos de la variedad Gordal (*Olea europea regalis*). *Grasas y Aceites* 42, 106-113.
- Durân Quintana, M.C., Garcia Garcia, P., Brenes Balbuera, M. and Garrido Fernandez, A. (1994) Induced lactic acid fermentation during the preservation stage of ripe olives from Hojiblanca cultivar. *Journal of Applied Bacteriology* 76, 377-382.
- FAO/WHO (2006). Probiotics in Food. Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation, FAO Food and Nutrition Paper No. 85. World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Fernández Díez, M.J., Castro y Ramos, R., Garrido Fernández, A., González Cancho, F., González Pellisó, F., Nosti Vega, M., Heredia Moreno, A., Mínguez Mosquera, M.I., Rejano Navarro, L., Durán Quintana, M.C., Sánchez Roldán, F., García García, P., Castro Gómez-Millán, A. (1985). Biotecnología de la Aceituna de Mesa. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Gráficas Urpe, Madrid (España).
- Fernández Díez M.J. (1991) Processing table olives. In: Encyclopedia of Food Science and Technology (edited by Hui, Y.H.). Wiley & Sons, New York. pp. 1910-1925
- Fleming H.P., Walter W.M. and Etchells J.L. (1969) Isolation of a bacterial inhibitor from green olives. *Applied Microbiology* 18, 856-860.
- Fleming H.P., Walter W.M. and Etchells J.L. (1973) Antimicrobial properties of oleuropein and products of its hydrolysis from green olives. *Applied Microbiology* 26, 777-782.
- Garcia Garcia, P., Durân Quintana, M.C., Brenes Balbuera, M., and Garrido Fernandez, A. (1992) Lactic fermentation during the storage of 'Alorena' cultivar untreated green table olives. *Journal of Applied Bacteriology* 73, 324-330.
- Garrido Fernández, A., Fernández Díaz, M.J., Adams, R.M., 1997. Tables Olives: Production and Processing. Chapman & Hall, London, UK

- George, M.L.C., Nelson, R.J., Zeigler, R.S., Leung, H., 1998. Rapid Population Analysis of *Magnaporthe grisea* by Using rep-PCR and endogenous Repetitive DNA sequences. *Phytopathology*, 88 (3), 223-229).
- Gilliland, S.E.,( 1991), *Properties of yogurt*, in *Therapeutic Properties of Fermented Milks*,Robinson, R.K., Ed., Elsevier Applied Science, London, p. 75.
- Heperkan D. (2013) Microbiota of table olive fermentations and criteria of selection for their use as starters. Department of Food Engineering, Faculty of Chemical and Metallurgical Engineering, Istanbul Technical University, Istanbul, Turkey.
- Heperkan D., Erol-Meriç B., Sismanoglu G., Dalkiliç G. and Güler F. K. (2006) Mycobiota, mycotoxigenic fungi and citrinin production in black olives. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 571, 203–210
- Hjortmo, S., Patring, J., Jastrebova, J., Andlid, T., (2005). Inherent biodiversity of folate content and composition in yeasts. *Trends Food Science Technology*, 16, 311-316.
- ICAP (2014). Κλαδική μελέτη για την επιτραπέζια ελιά.
- IOOC (International Olive Oil Council) (1990) Table olive processing. Madrid.
- Joanne Engebrecht, Kenneth Neelson , Michael Silverman March 1983. Bacterial bioluminescence: Isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*.. Volume 32, Issue 3, , Pages 773-781
- John G.K. Williams, Anne R. Kubelik, Kenneth J. Livak, J. Antoni Rafalski and Scott V. Tingey. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* (1990) 18 (22): 6531-6535.
- Klaenhammer T.R. (2001). *Probiotics and Prebiotics*. In: M.P. Doyle (Ed.), *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers* (pp. 87C95). Washington, DC, USA: ASM Press.
- Kotzekidou P. (1997) Identification of yeasts from black olives in rapid system microtitre plates. *Food Microbiology* 14, 609–616.
- Krasaekoopt W, Bhandari B and Deeth H (2003). *Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt*. *International Dairy Journal* 13 3-13.

- Kumura, H. Tanoue, Y., Tsukahara, M.; Tanaka, T., Shimazaki, K. (2004). Screening of dairy yeast strains for probiotic applications. *Journal Dairy Science*, 87, 4050-4056.
- Kurtzman, C.P., Fell, J.W., 2006. Yeast systematic and phylogeny—implications of molecular identification methods for studies in ecology. In: Rosa, C.A., Peter, G. (Eds.), *The Yeast Handbook*. Springer-Verlag Berlin Herdelberg, Germany, pp. 11–30.
- L. Vanne M. Karwoski, S. Karppinen, A.-M. Sjöberg. 1996. HACCP-based food quality control and rapid detection methods for microorganisms. *Food Control*. Volume 7, Issue 6, December 1996, Pages 263-276
- Lavermicocca P., Valerio F., Lonigro S. L., De Angelis M., Morelli L., Callegari M. L. 2005. Study of adhesion and survival of Lactobacilli and Bifidobacteria on table olives with the aim of formulating a new probiotic food. *Appl. Environ. Microbiol.*
- Lay-Gaik Ooi and Min-Tze Liong. 2010. Cholesterol-lowering Effects of Probiotics and Prebiotics: A Review of in Vivo and in Vitro Findings. *International Journal Mol Scie*, 11(6): 2499-2522.
- Lessard, M., Dupuis, M., Gagnon, N., Nadeau, E., Matte, J.J., Goulet, J., Fairbrother, J.M. Administration of *Pediococcus acidilactici* or *Saccharomyces cerevisiae boulardii* modulates development of porcine mucosal immunity and reduces intestinal bacterial translocation after *Escherichia coli* challenge. *J. Anim Sci*. 2009, 87, 922-934
- Louws F.J., Rademaker J.L.W., de Bruijn F.J. THE THREE DS OF PCR-BASED GENOMIC ANALYSIS OF PHYTOBACTERIA: Diversity, Detection, and Disease Diagnosis. *Annual review pf phytopathology*, 37, 1999.
- Marquina, D., Peres, C., Caldas, F.V., Marques, J.F., Peinado, J.M. and I. Spencer-Martins (1992) Characterization of the yeast population in olive brines. *Letters in Applied Microbiology* 14, 279-283.
- Minguéz-Monsquera, I.M., Garri do-Fern an dez, J. and Gandul, B. (1989) Pigment changes in olives during fermentation and brine storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 37, 8-11.
- Minguéz-Monsquera, I.M., Gandul, B., Montano, A. and Garri do-Fernandez, J. (1991) Determination of chlorophylls and carotenoids by high-performance liquid

chromatography during olive lactic fermentation. *Journal of Chromatography* 585,259-266.

- Niaounakis M., Halvadakis C.P. (2006). Olive processing waste management: literature review and patent survey, second edition. Italy: Elsevier
- Panagou E.Z., Tassou C.C. and Katsaboxakis, K.Z. (2002) Microbiological, physicochemical and organoleptic changes in dry-salted olives of Thassos variety stored under different modified atmospheres at 4 and 20 °C. *International Journal of Food Science and Technology* 36, 1-7.
- Panagou E.Z., Schillinger U., Franz C.M.A.P. and Nychas, G.J. (2008) Microbiological and biochemical profile of cv. Conservolea naturally black olives during controlled fermentation with selected strains of lactic acid bacteria. *Food Microbiology* 25, 328–358.
- Patring, J.D.M.; Hjortmo, S.B.; Jastrebova, J.A.; Svensson, U.K.; Andlid, T.A.; Jägerstad, I.M. Characterization and quantification of folates produced by yeast strains isolated from kefir granules. *Eur. Food Res. Technol.* 2006, 223, 633-637.
- Querol, A., Fleet, G., 2006. *Yeasts in Food and Beverages*. Springer-Verlag, Berlin, Germany. Rodríguez-Gómez, F., Arroyo-López, F.N., López-López, A., Bautista-Gallego, J., Garrido- Fernández, A. Lipolytic activity of the yeast species associated with the fermentation/storage phase of ripe olive processing. *Food Microbiology* 27, 604–612.
- Rafter, J. (2003). Probiotics and colon cancer. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 17: 849-859.
- Rejano Navarro, L., Fernandez Villasante, J., Marquez Gonzalez, J., Albarreal Lopez, J., Gonzalez Cancho, F. and Fernandez Diez, MJ. (1978) Efecto del tiempo de almacenamiento del fruto fresco sobre el proceso de elaboración de aceitunas verdes estilo sevillano. XTV Asamblea Miembros Instituto de la Grasa, Sevilla, Spain
- Rodríguez-Gomez, F., Romero-Gil, V., Bautista-Gallego, J., García-García, P., Garrido-Fernandez, A., Arroyo-López F.N. 2014a. Production of potential probiotic Spanish-style green table olives at pilot plant scale using multifunctional starters. *Food Microbiol.*, 44, 278–287

- Rozés N. and Peres C. (1996) Effect of oleuropein and sodium chloride on viability and metabolism of *Lactobacillus plantarum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 45, 839-843.
- Ruiz-Barba J.L., Brenes Balbuera M., Jimenez-Diaz R., Garcia Garcia P. and GarridoFemández A. (1993) Inhibition of *Lactobacillus plantarum* by polyphenols extracted from two different kinds of olive brine. *Journal of Applied Bacteriology* 74, 15-19.
- Sadaf Ajmal\* and Nuzhat Ahmed. Probiotic potential of lactobacillus strains in human infections. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 3(12) pp. 851-855 December, 2009
- Sahadeva, R.P.K., Leong, S.F., Chua, K. H., Tan, C.H., Chan, H.Y., Tong, E.V., Wong, S.Y.W. and Chan, H.K. (2011). Survival of commercial probiotic strains to pH and bile *International Food Research Journal* 18(4): 1515-1522.
- Saloomeh Moslehi-Jenabian, Line Lindegaard Pedersen and Lene Jespersen. Beneficial Effects of Probiotic and Food Borne Yeasts on Human Health. *Nutrients* 2010, 2, 449-473, doi:10.3390/nu2040449.
- Sanders, M.E., Gibson, G., Gill, H.S. & Guarner, F. (2007) Probiotics: their potential to impact human health. *CAST issue paper* No. 36, October 2007.
- Sazawal, S., Hiremath, G., Dhingra, U., Malik, P., Deb, S., Black, R.E. Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials. *Lancet Infect. Dis.* 2006, 6, 374-382.
- Shorte Colette b, Arthur C. Ouwehand a, Pirkka V. Kirjavainen a, Seppo Salminen, (January 1999) Probiotics: mechanisms and established effects, *International Dairy Journal* Volume 9, Issue 1, , Pages 43-52.
- Spyropoulou, K.E. and Nychas, G. J.E. 1999. Addition of fermentable substrates and thiamine during the fermentation of green olives with or without starter cultures. In 17<sup>th</sup> International Symposium of the International Committee on Food Microbiology and Hygiene (ICFMH) Pp. 685-689, Veldhoven, The Netherlands).
- Tassou C.C. and Nychas G.-J.E. (1994) Inhibition of *Staphylococcus aureus* by olive phenolic in broth and in a model food system. *Journal of Food Protection* 57, 120-124.
- Tassou, C.C. (1993) Microbiology of olives with emphasis on the antimicrobial activity of phenolic compounds.

- Tassou, C.C., Panagou, E.Z., 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.
- Van den Berg, D.J.C., Smits, A., Pot, B., Ledebouer, A.M., Kersters, K., Verbakel, J.M.A. and Verrips, C.T. (1993) Isolation, screening and identification of lactic acid bacteria from traditional food fermentation processes and culture collections. *Food Biotechnology!*, 189-205.
- Vaughn, R.H., Jakubczyk, T., MacMillan, J.D., Higgins, T.E., Dave, B.A., Crampton, V.M., 1969. Some pink yeast associated with softening of olives. *Applied Microbiology* 18, 771–775.
- Vaughn, R.H., Stevenson, K.E., Davé, B.A., Park, H.C., 1972. Fermenting yeasts associated with softening and gas-pocket formation in olives. *Applied Microbiology* 23, 316–320.
- Viljoen, B.C., 2006. Yeast ecological interactions. Yeast–yeast, yeast bacteria, yeast–fungi interactions and yeasts as biocontrol agents. In: Querol, A., Fleet, H. (Eds.), *Yeasts in Food and Beverages*. Springer–Verlag, Berlin, pp. 83–110.
- Walter W.M., Fleming H.P. and Etchells J.L. (1973) Preparation of antimicrobial compounds by hydrolysis of oleuropein from green olives. *Applied Microbiology* 26, 773-776.
- Witthuhn, R.C.; Schoeman, T.; Britz, T.J. Characterisation of the microbial population at different stages of Kefir production and Kefir grain mass cultivation. *Int. Dairy J.* 2005, 15, 383-389.
- Wünsch A., J.I. Hormaza (2002). Cultivar identification and genetic fingerprinting of temperate fruit tree species using DNA markers. *Euphytica* , Volume 125, Issue 1, pp 59-67.
- Εξαρχου, Κ.Δ. και Λεγάκι, Φ.Α. (1968) Διερεύνησις χαρακτηριστικών τινών της εφαρμοζόμενης εις την πράξιν μεθόδου επεξεργασίας και διατηρήσεως εντός άλμης των μαύρων βρώσιμων ελαιών. *Δελτίον Εργασιών του Ινστιτούτου Τεχνολογίας Φυτικών Προϊόντων*. Σελ. 43-70, Λυκόβρυσις, Αθήναι.
- Λύτρας Α. (1997). Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμέρασης (PCR): εφαρμογές μοριακής βιολογίας στην ιατρική. *Επιθεώρηση υγείας*, τεύχος: 47, σ. 36-38
- Μπαλατσούρα, Γ. (1990). *Μικροβιολογία τροφίμων*. Εκδοση Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών



- Μπαλατσούρας Γ. (1992). Σύγχρονη ελαιοκομία (το ελαιόδενδρο - το ελαιόλαδο - η επιτραπέζια ελιά - η ελαιουργία), Η επιτραπέζια ελιά. Τόμος τρίτος. Αυτοέκδοση: Αθήνα.
- Μπαλατσούρα, Γ. (1995) Η επιτραπέζια ελιά. Ποικιλίες, χημική σύσταση, εμπορικοί τύποι, ποιοτικά χαρακτηριστικά, συσκευασία, εμπορία. Έκδοση Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών
- Μπαλατσούρας Γ. (2006). Μικροβιολογία τροφίμων- Εκδόσεις Έμβρυο, Σ, .
- Μπλούκας- Σταμούλης, Επεξεργασία και συντήρηση τροφίμων. Εκδόσεις ΑΘ, Αθήνα, 2004.
- Παπαδογιάννη, Ι.Ν., Σαμανίδου, Β.Φ., Ενόργανη χημική ανάλυση, Θεσσαλονίκη 2001. Στράτης, Βουτλαρόπουλος και Ζαχαριάδης, 1999). Στράτης Ι.Α., Βουτλαρόπουλος Α.Ν. και Ζαχαριάδης Ι.Α., Ποσοτική Χημική ανάλυση, Θεσσαλονίκη 1999.