



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ & ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

“Μελέτη των μικροβιολογικών και φυσικοχημικών χαρακτηριστικών κατά τη συντήρηση μαύρων επιτραπέζιων ελιών με προβιοτικό δυναμικό σε εύκαμπτους πολυστρωματικούς περιέκτες με χρήση τροποποιημένης ατμόσφαιρας.”



Ιωάννης Γ. Καραγιάννης

Βιολόγος

Επιβλέπων Καθηγητής:
Ευστάθιος Πανάγου

ΑΘΗΝΑ 2020



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Μελέτη των μικροβιολογικών και φυσικοχημικών χαρακτηριστικών κατά τη συντήρηση μαύρων επιτραπέζιων ελιών με προβιοτικό δυναμικό σε εύκαμπτους πολυστρωματικούς περιέκτες με χρήση τροποποιημένης ατμόσφαιρας.

“Study of microbiological and physicochemical characteristics during the preservation of black table olives with probiotic potential in flexible multilayer containers using modified atmospheres.”

Ιωάννης Γ. Καραγιάννης

Βιολόγος

Εξεταστική επιτροπή:

Ευστάθιος Πανάγου, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Γεώργιος-Ιωάννης Νυχάς, Καθηγητής ΓΠΑ

Αγάπη Δουλγεράκη, Δόκιμη Ερευνήτρια

Μελέτη των μικροβιολογικών και φυσικοχημικών χαρακτηριστικών κατά τη συντήρηση μαύρων επιτραπέζιων ελιών με προβιοτικό δυναμικό σε εύκαμπτους πολυστρωματικούς περιέκτες με χρήση τροποποιημένης ατμόσφαιρας

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου

Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η επιτραπέζια ελιά είναι ένα τρόφιμο με μεγάλη διατροφική αξία και αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της Μεσογειακής διατροφής. Η Ελλάδα είναι μία από τις κυριότερες χώρες παραγωγής της επιτραπέζιας ελιάς παγκοσμίως, με διάφορες ποικιλίες να καλλιεργούνται σε όλη της την επικράτεια. Τα τελευταία χρόνια, η ανάδειξη του προβιοτικού δυναμικού που θα μπορούσε να αποκτήσει ο ελαιόκαρπος μετά από κατάλληλη επεξεργασία, δύναται να ενισχύσει τα οφέλη του τροφίμου αυτού και κατ' επέκταση την εμπορική του αξία. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση της επίδρασης διαφορετικών τύπων συσκευασίας αλλά και της μερικής υποκατάστασης του χλωριούχου νατρίου, στη μεταβολή των μικροβιολογικών και φυσικοχημικών παραμέτρων της ζυμωμένης επιτραπέζιας ελιάς, ποικιλίας «Κονσερβολιάς», καθώς επίσης και η αξιολόγηση της επιβίωσης δύο στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων με προβιοτικό δυναμικό κατά τη συντήρησή της ελιάς, που ενοφθαλμίστηκαν στην αρχή της ζύμωσης. Η εξέταση της μικροχλωρίδας πραγματοποιήθηκε με κλασσική μικροβιολογική ανάλυση χρησιμοποιώντας επιλεκτικά υποστρώματα για την ανίχνευση της ολικής μικροβιακής χλωρίδας, των οξυγαλακτικών βακτηρίων, των ζυμών και των εντεροβακτηρίων. Σε συγκεκριμένο χρονικό διάστημα κατά τη συντήρηση των δειγμάτων, έλαβε χώρα απομόνωση στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων, τα οποία ομαδοποιήθηκαν και ταυτοποιήθηκαν στη συνέχεια με βάση την τεχνική *rep-PCR* και αλληλούχιση του γονιδίου 16S rRNA. Σε όλη τη διάρκεια της συντήρησης κυριάρχησαν τα οξυγαλακτικά βακτήρια, με τον πληθυσμό τους να κυμαίνεται περίπου σε 6,0 log CFU/g, ενώ δεν ανιχνεύτηκαν καθόλου εντεροβακτήρια. Ο πληθυσμός των ζυμών παρατηρήθηκε κοντά στο όριο ανίχνευσης της μεθόδου (2,0 log CFU/g), το οποίο και ξεπέρασε ελαφρώς, σχεδόν αποκλειστικά στις συσκευασίες κενού και για περιορισμένο διάστημα. Η απουσία διαφοροποίησης των δειγμάτων που ζυμώθηκαν με την μερική υποκατάσταση του κοινού αλατιού, είναι μια σημαντική παρατήρηση όσον αφορά στις αυξανόμενες απαιτήσεις για μειωμένη

πρόσληψη νατρίου από την κατανάλωση επιτραπέζιας ελιάς. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια *L. pentosus* B363 και *L. plantarum* B380 που προστέθηκαν ως καλλιέργειες εκκίνησης δεν καταφεραν να επιβιώσουν σε σημαντικό βαθμό, πιθανόν εξαιτίας του ανταγωνισμού τους με το βακτήριο *L. buchneri*, το οποίο ήταν και το κυρίαρχο στο σύνολο των δειγμάτων.

Επιστημονική περιοχή: Διατροφή ανθρώπου

Λέξεις κλειδιά: επιτραπέζια ελιά, Κονσερβολιά, οξυγαλακτικά βακτήρια, εναρκτήριες καλλιέργειες, προβιοτικό δυναμικό, συσκευασίες τροποποιημένης ατμόσφαιρας, ger – PCR

Study of microbiological and physicochemical characteristics during the preservation of black table olives with probiotic potential in flexible multilayer containers using modified atmospheres.

Department of Food Science and Human Nutrition
Laboratory of Microbiology and Food Biotechnology

ABSTRACT

The olive fruit is a product with great nutritional value and is an integral part of the Mediterranean diet. Greece is one of the world's leading producers of table olives, with many varieties grown throughout its territory. In recent years, the emergence of the probiotic potential that the olive fruit could acquire after proper processing, can enhance the benefits of this product and consequently its commercial value. The purpose of this study was to evaluate the effect of different types of packaging and partial replacement of sodium chloride by potassium chloride, on the changes in the microbiological and physicochemical parameters of fermented table olives of Conservolea variety, as well as the evaluation of the survival of two potentially probiotic lactic acid bacteria strains during the preservation of olives, which were inoculated at the beginning of fermentation. The microbiota was determined by classical microbiological analysis using selective growth media for the detection of total viable counts, lactic acid bacteria (LAB), yeasts and enterobacteria. LAB strains, isolated at a specific time point during the preservation of the samples, were later discriminated and identified based on the rep-PCR and 16S rRNA sequence. Lactic acid bacteria dominated during the whole preservation period, with a population of *ca.* 6.0 log CFU/g, while no enterobacteria were detected at all throughout the storage period. The population of yeasts was maintained close to the detection limit of the method (2.0 log CFU/g), which was slightly exceeded, almost exclusively in vacuum packaging and for a limited period of time. The absence of any differentiation of the samples fermented with partial substitution of sodium chloride by potassium chloride, is an important observation regarding the increasing demand for reduced sodium intake from the consumption of table olives. *Lb. pentosus* B363 and *Lb. plantarum* B380 added as starter cultures could not survive to a significant degree, possibly due to their competition with the bacterium *Lb. buchneri*, which was the dominant species in every table olive sample.

Scientific area: Human nutrition

Keywords: table olives, Conservolea, lactic acid bacteria, starter cultures, probiotic potential, modified atmosphere packaging, rep - PCR

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του τμήματος επιστήμης τροφίμων και διατροφής του ανθρώπου, στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω καταρχάς τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Ευστάθιο Πανάγου για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, αναθέτοντάς μου ένα αρκετά απαιτητικό θέμα για την διπλωματική μου μελέτη. Η άμεση ανταπόκρισή του σε κάθε πρόβλημα που προέκυπτε και η εν γένη εποικοδομητική συνεργασία που είχαμε, μου προσέφερε μεγάλη στήριξη κατά την υλοποίηση της παρούσας εργασίας.

Ευχαριστώ επίσης όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων για το άψογο περιβάλλον και κλίμα που δημιούργησαν στον χώρο του εργαστηρίου, χάρη στην ανιδιοτελή τους προθυμία για συνεργασία και την κατανόηση που έδειχναν σε κάθε δυσκολία. Ένα θερμό ευχαριστώ συγκεκριμένα στην Ευγενεία Σπυρέλη και Ειρήνη, οι οποίες έδειχναν προσωπική μέριμνα στην επισήμανση τόσο των κανόνων ασφαλείας όσο και των ορθών πρακτικών εντός του εργαστηρίου, συμβάλλοντας έτσι στην ομαλή λειτουργία του. Θα ήθελα να αναφερθώ ακόμα προσωπικά και να ευχαριστήσω ιδιαίτερα το μεταπτυχιακό φοιτητή Νικόλαο Σαρρή, η παρουσία του οποίου έδινε ζωντάνια στο εργαστήριο, καθώς επίσης και την Αικατερίνη Τζαμουράνη που με καθοδήγησε με υποδειγματική υπομονή κατά τη διάρκεια των πειραμάτων και που η βοήθεια που μου παρείχε σε διάφορα επίπεδα ήταν πραγματικά ανεκτίμητη.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω τους γονείς μου, Ειρήνη και Γεράσιμο, οι οποίοι με τη φροντίδα και τη στήριξη που μου παρέχουν συνεχώς, μου έδωσαν τη δυνατότητα να εργαστώ κάτω από τις καλύτερες συνθήκες για αυτή την εργασία.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	i
ABSTRACT	iii
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	iv
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Το δέντρο της ελιάς και ο καρπός της.....	1
1.2 Διατροφική αξία του καρπού.....	2
1.3 Ορισμός και κατηγορίες επιτραπέζιας ελιάς	3
1.3.1 Στάδια ωρίμανσης καρπού.....	3
1.3.2 Μέθοδος μεταποίησης ελαιόκαρπου	3
1.4 Ελληνικές ποικιλίες επιτραπέζιας ελιάς.....	7
1.4.1 Κονσερβολιά (<i>Olea europaea media rotunda</i>).....	7
1.4.2 Καλαμών (<i>Olea europaea var. ceraticarpa</i>)	8
1.4.3 Χαλκιδικής	9
1.5 Οικονομικά στοιχεία	10
1.6 Η μικροβιολογία του καρπού της ελιάς	11
1.6.1 Οξυγαλακτικά βακτήρια στην επιτραπέζια ελιά.....	14
1.6.2 Ο ρόλος των ζυμών στη ζύμωση της επιτραπέζιας ελιάς	15
1.7 Εναρκτήριες καλλιέργειες	17
1.8 Προβιοτικό δυναμικό	21
1.9 Ειδη συσκευασίας	24
1.9.1 Τροποποιημένες ατμόσφαιρες και συσκευασία κενού.....	25
1.10 Μοριακές τεχνικές.....	27
1.10.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης – PCR	27
1.10.2 Τεχνική rep – PCR	29
1.10.3 Αλληλούχιση γονιδίου 16S rRNA	30
2 ΣΚΟΠΟΣ	32
3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	33
3.1 Προετοιμασία – Προέλευση δειγμάτων	33
3.2 Προσδιορισμός αέριας σύστασης εντός των περιεκτών	35
3.3 Μικροβιολογικές αναλύσεις	36
3.4 Φυσικοχημικές αναλύσεις	37
3.4.1 Προσδιορισμός pH	37

3.4.2	Προσδιορισμός ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας	38
3.5	Στατιστική ανάλυση με τη μέθοδο Παλινδρόμησης Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (Partial Least Square Regression, PLS-R).....	38
3.6	Ταυτοποίηση οξυγαλακτικών βακτηρίων	39
3.6.1	Απομόνωση αποικιών οξυγαλακτικών βακτηρίων	39
3.6.2	Ανανέωση καλλιεργειών	40
3.6.3	Απομόνωση – Εκχύλιση γενομικού DNA.....	41
3.6.4	Φωτομέτρηση-αραίωση DNA.....	41
3.6.5	Ομαδοποίηση γενετικών αποτυπωμάτων των οξυγαλακτικών βακτηρίων με rep-PCR	42
3.6.6	Ηλεκτροφόρηση DNA	43
3.6.6.1	Μέθοδος Ηλεκτροφόρησης	43
3.6.6.2	Απεικόνιση ζωνών DNA.....	44
3.6.7	Επεξεργασία φωτογραφιών DNA και ομαδοποίηση στελεχών μέσω του προγράμματος BioNumerics	45
3.6.8	Αλληλούχιση γονιδίου 16s rRNA για ταυτοποίηση στελεχών	45
3.6.8.1	16S PCR- ηλεκτροφόρηση	45
3.6.8.2	Καθαρισμός προϊόντων της 16S PCR.....	47
3.6.8.3	Ταυτοποίηση των δειγμάτων	47
4.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	48
4.1	Ανάλυση σύστασης ατμόσφαιρας	48
4.2	Περιγραφή της μικροχλωρίδας της ελιάς	50
4.3	Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της ελιάς	60
4.4	Ανάλυση με τη μέθοδο Παλινδρόμησης Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων.....	64
4.5	Ταυτοποίηση οξυγαλακτικών βακτηρίων	67
4.5.1	Ομαδοποίηση στελεχών – rep-PCR.....	67
4.5.2	Ταυτοποίηση στελεχών.....	72
5.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	79
6.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	80
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	92

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Το δέντρο της ελιάς και ο καρπός της

Το είδος *Olea europaea* L., η γνωστή σε όλους μας ελιά, ανήκει στο γένος *Olea* της οικογένειας *Oleaceae*, η οποία περιλαμβάνει συνολικά 30 γένη και 600 είδη (Mushtaq et al., 2020). Το όνομα του γένους *Olea* προέρχεται από την ελληνική λέξη “ελιά” (Mushtaq et al., 2020), η οποία αποτελεί την κοινή ονομασία για κάθε ένα από τα 35 διαφορετικά είδη του γένους (Boskou, 2006). Το μοναδικό είδος από τα 35 που παράγει εδώδιμο καρπό είναι το *Olea europaea* (Mushtaq et al., 2020). Έχει ευρεία εξάπλωση στη περιοχή της Μεσογείου και αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα της (Boskou, 2006). Το δέντρο της ελιάς φτάνει κατά μέσο όρο τα 10 μέτρα σε ύψος (Mushtaq et al., 2020). Είναι αιθαλές, αναπτύσσεται με αργό ρυθμό και έχει προσδόκιμο όριο ζωής τα 500 έτη (Rhizoroulou, 2007). Η ελιά είναι ένα ερμαφρόδιτο δέντρο με την άνθησή του να ξεκινά μέσα στην άνοιξη (Rhizoroulou 2007). Αν και γενικά αποτελεί ένα αυτοφυές είδος, σε μεγάλο βαθμό τα άνθη επικονιάζονται και με τη βοήθεια του ανέμου (Rhizoroulou, 2007).

Ο καρπός της ελιάς ανήκει στην κατηγορία των φρούτων και πιο συγκεκριμένα αποτελεί δρύπη, λόγω της παρουσίας του ενδοκαρπίου που περιέχει το έμβρυο ή σπόρο και το οποίο περιβάλλεται από το περικάρπιο (Kailis, 2007). Το τελευταίο απαρτίζεται από το επικάρπιο ή φλοιό, του οποίου το χρώμα αλλάζει όσο ωριμάζει ο καρπός, και το μεσοκάρπιο, το τμήμα εκείνο που αποτελεί το κύριο μέρος της σάρκας και αντιπροσωπεύει το 65 με 83% του συνολικού βάρους του καρπού (Boskou, 2006). Συνήθως, αλλάζει χρώμα από πράσινο που έχει αρχικά σε μοβ ή σχεδόν μαύρο όταν φτάνει στο τέλος της ωρίμανσής του στα τέλη φθινοπώρου (Rhizoroulou, 2007). Η αλλαγή αυτή του χρώματος οφείλεται στη συσσώρευση μιας ομάδας χημικών αρχικά στην επιδερμίδα, τις ανθοκυανίνες, οι οποίες στη συνέχεια περνάνε στη σάρκα και φτάνουν να αλλάξουν χρώμα μέχρι και στη “πέτρα” ή πυρήνα στην περίπτωση των ώριμων μαύρων ελιών (Kailis, 2007).

Από χημικής άποψης, ο καρπός αποτελείται κυρίως από νερό (υγρασία 55-75%), εμφανίζει μεγάλα ποσοστά λιπαρών ουσιών (22% κατά μέσο όρο), ενώ τη

σύσταση συμπληρώνουν σε μικρότερες συγκεντρώσεις διάφορες πρωτεΐνες, σάκχαρα, οργανικά οξέα, ανόργανα στοιχεία και φαινολικές ουσίες (Πανάγου, 2002). Στην τελευταία κατηγορία ανήκει η ελευρωπαΐνη (Sindona, 2010), ίσως η χημική ουσία της ελιάς με τη μεγαλύτερη σημασία. Λόγω του κρίσιμου ρόλου που παίζει η ύπαρξή της για το στάδιο της μεταποίησης, θα αναφερθούμε σε αυτή με μεγαλύτερη λεπτομέρεια παρακάτω.

1.2 Διατροφική αξία του καρπού

Η μεγάλη διατροφική αξία της ελιάς είναι ένα από τα στοιχεία που την καθιστούν ουσιώδες και αναπόσπαστο κομμάτι της Μεσογειακής διαίτας (Boskou et al., 2015). Συγκριτικά με άλλες δρύπες, η ελιά έχει υψηλή περιεκτικότητα σε έλαια και χαμηλή σε σάκχαρα (Crisosto et al., 2011). Μεταξύ των λιπαρών οξέων που περιλαμβάνει, είναι και το απαραίτητο για τον άνθρωπο λινολεϊκό οξύ ($\omega 6$) (Ariani et al., 2019). Αν και τα ποσοστά της σε πρωτεΐνες είναι επίσης χαμηλά (1,0-2,2%), παρόλα αυτά είναι πλούσια σε απαραίτητα αμινοξέα (Boskou et al., 2015). Επιπλέον, ο καρπός της ελιάς διαθέτει σημαντική ποσότητα φυτικών ινών ($\geq 3\%$) που λειτουργούν σε μεγάλο βαθμό ως διαιτητικές ίνες, ενώ ακόμα χαρακτηρίζονται από υψηλή πεπτική ικανότητα (Ariani et al., 2019). Καταναλώνεται τόσο με τη μορφή ελαιολάδου, όσο και ως επιτραπέζια ελιά. Ο διαχωρισμός των ελιών που θα πάνε για παραγωγή ελαιολάδου με τις βρώσιμες, γίνεται με βάση την αναλογία σάρκας-πυρήνα, η οποία για την πρώτη περίπτωση είναι συνήθως μεταξύ 4:1 - 7:1 και για τη δεύτερη 7:1 - 10:1 (Boskou, 2006). Παρόλα αυτά υπάρχουν και περιπτώσεις όπου η ίδια ποικιλία μπορεί να διατίθεται και για τις δύο μορφές (Boskou, 2006).

Όσον αφορά τις επιτραπέζιες ελιές, ένα βασικό μειονέκτημα του τροφίμου αυτού, από διατροφικής άποψης, είναι η υψηλή πρόσληψη νατρίου που επιφέρει η κατανάλωσή του, το οποίο χρησιμοποιείται κατά την επεξεργασία της ελιάς και διατηρείται σε μεγάλες συγκεντρώσεις μέχρι και τη στιγμή της κατανάλωσης. Τα τελευταία χρόνια έχει προκύψει η ανάγκη για περιορισμό της χρήσης του άλατος στα τρόφιμα, καθώς η αυξημένη πρόσληψη νατρίου έχει συνδεθεί με καρδιαγγειακές ασθένειες (Rodríguez-Gómez et al., 2012a). Για αυτό, στην

περίπτωση της ελιάς έχει αναδειχθεί η χρησιμότητα της αντικατάστασης του NaCl με άλλα υποκατάστατα όπως το KCl ή το CaCl (López-López et al., 2016).

1.3 Ορισμός και κατηγορίες επιτραπέζιας ελιάς

Ως επιτραπέζια ελιά, σύμφωνα με το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου, ορίζεται το προϊόν που έχει παρασκευαστεί από τα φρούτα-καρπούς των ποικιλιών της καλλιεργούμενης ελιάς (*Olea europaea* L.) που έχουν επιλεγεί για την παραγωγή ελιών, των οποίων ο όγκος, το σχήμα, ο λόγος σάρκας προς πυρήνα, η σάρκα, η γεύση, η σταθερότητα και η ευκολία αποκόλλησης από τον πυρήνα τους τα καθιστούν ιδιαίτερα κατάλληλα για μεταποίηση, έχει υποστεί κατεργασία για την απομάκρυνση της πικρίας του και έχει διατηρηθεί μέσω φυσικής ζύμωσης ή θερμικής επεξεργασίας, με ή χωρίς την προσθήκη συντηρητικών και έχει συσκευαστεί με ή χωρίς την κάλυψη από υγρό.

Οι επιτραπέζιες ελιές μπορούν να χωριστούν σε επιμέρους κατηγορίες με δύο διαφορετικούς τρόπους, ανάλογα με το στάδιο ωρίμανσης τους και ανάλογα με τη μέθοδο μεταποίησης στην οποία υπόκεινται (Crisosto et al., 2011).

1.3.1 Στάδια ωρίμανσης καρπού

Όσον αφορά το στάδιο ωρίμανσης του φρέσκου καρπού της ελιάς υπάρχουν 3 κατηγορίες. Οι **πράσινες ελιές**, οι οποίες μαζεύονται κατά την περίοδο ωρίμανσης όταν φτάσουν το φυσιολογικό τους μέγεθος και πριν ξεκινήσουν να χρωματίζονται. Οι **ελιές στο στάδιο αλλαγής χρώματος**, όπου δεν έχει επέλθει πλήρης ωρίμανση ακόμα και η αλλαγή του χρώματός τους βρίσκεται σε ενδιάμεσο στάδιο. Στην τελευταία κατηγορία ανήκουν οι **μαύρες ελιές**, των οποίων η συγκομιδή πραγματοποιείται ενώ έχουν φτάσει στο στάδιο της πλήρους ωρίμανσης ή και λίγο πριν από αυτό (Crisosto et al., 2011, IOOC, 2004).

1.3.2 Μέθοδος μεταποίησης ελαιόκαρπου

Ο δεύτερος διαχωρισμός πραγματοποιείται με βάση τη μεταποιητική διαδικασία. Η ύπαρξη ενός φαινολικού γλυκοζίτη, της ελευρωπαΐνης, ευθύνεται για τη πικρή γεύση του νωπού ελαιοκάρπου και τον καθιστά μη εδώδιμο απευθείας μετά τη συγκομιδή. (Medina et al., 2016). Η ελευρωπαΐνη εμφανίζεται σε όλους

τους ιστούς της ελιάς και η σχετική της ποσότητα είναι υψηλότερη στα φύλλα και τους καρπούς (Sindona, 2010). Η αποικοδόμηση της τελευταίας αποτελεί το στόχο όλων των διαφορετικών μεθόδων επεξεργασίας (Medina et al., 2016), οι οποίες στοχεύουν στη μείωση της πικρής γεύσης που προσδίδει και να καταστήσουν τοιουτοτρόπως εδώδιμο τον καρπό (Boskou et al., 2015). Πρακτικά, αυτή η απομάκρυνση επιτυγχάνεται μέσω αλκαλικής επεξεργασίας, βιολογικών διεργασιών, ή και με εμβάπτιση των καρπών σε κατάλληλο υγρό ώστε να αραιωθεί η ελευρωπαϊνή (Rejano et al., 2010). Αξίζει να αναφερθεί πως κατά το τέλος της ωρίμανσής ορισμένων ποικιλιών παρατηρείται διάσπαση της ελευρωπαϊνής σε τέτοιο βαθμό, ώστε να μπορούν να καταναλωθούν απευθείας, χωρίς να απαιτείται κάποια επεξεργασία (Kailis, 2007). Ένα ελληνικό παράδειγμα αποτελεί η *Thrubolea* ή *Θρουμπολιά* (*Olea europaea* var. *media oblonga*), μια ποικιλία που ευδοκίμει στην περιοχή της Αττικής, σε μερικά νησιά του Αιγαίου και την Κρήτη (Kailis, 2007).

Παρακάτω θα γίνει αναφορά στις 5 ξεχωριστές κατηγορίες επεξεργασίας, στις οποίες μπορεί να υποβληθούν οι επιτραπέζιες ελιές (Medina et al., 2016, IOOC 2004). Ιδιαίτερη έμφαση θα δοθεί στους τρεις σημαντικότερους εμπορικούς τύπους που είναι οι ελιές ισπανικού τύπου, οι ελιές ελληνικού τύπου και οι ελιές τύπου Καλιφόρνιας (Romero-Gil et al., 2013).

- Επεξεργασμένες ελιές: Ο καρπός υφίσταται εκπίκρυνση μέσω της εμβάπτισής του σε αλκαλικό διάλυμα και στη συνέχεια βυθίζεται σε άλμη, όπου λαμβάνει χώρα η πλήρης ή μερική ζύμωση (Medina et al., 2016).

Εδώ ανήκουν μεταξύ άλλων και οι **πράσινες ελιές ισπανικού τύπου** (Spanish-style green olives), γνωστές επίσης ως τύπου Σεβίλλης. Το γεγονός πως ακολουθείται ζύμωση σε αυτές, τις διαχωρίζει από τις υπόλοιπες πράσινες ελιές της κατηγορίας (Rejano et al., 2010). Το αλκαλικό διάλυμα που χρησιμοποιείται κατά την επεξεργασία τους, περιέχει καυστικό νάτριο NaOH με περιεκτικότητα 1,8-3,5 % w/v (Lucena-Padrós et al., 2019). Η δράση του προκαλεί την υδρόλυση της ανεπιθύμητης ελευρωπαϊνής, την αύξηση της περατότητας του καρπού καθώς επίσης και άλλες αλλαγές που υποβοηθούν την ζύμωση που θα ακολουθήσει (Rejano et al., 2010). Η περατότητα του καρπού ευνοεί την

απελευθέρωση κυτταρικών χυμών όταν αυτός βυθιστεί στην άλμη, δημιουργώντας ένα μέσο κατάλληλο για ζύμωση (Medina et al., 2016). Το αλκαλικό διάλυμα αφήνεται μέχρις ότου διαποτίσει τα 2/3 της σάρκας και έπειτα ακολουθεί κατάλληλη έκπλυση του με νερό που διαρκεί 12 με 14 ώρες (Πανάγου, 2002). Ο καρπός μεταφέρεται στη συνέχεια προς ζύμωση σε άλμη περιεκτικότητας 6-8%, η οποία κρατάει συνήθως 3-4 εβδομάδες (Πανάγου, 2002). Η τιμή pH του προϊόντος στο τέλος της συγκεκριμένης επεξεργασίας είναι γύρω στο 4 και της ελεύθερης οξύτητας ξεπερνά το 0,6% (Medina et al., 2016).

- **Φυσικές ελιές:** Ο καρπός τοποθετείται απευθείας σε άλμη όπου λαμβάνει χώρα η πλήρης ή μερική ζύμωση, χωρίς να προηγηθεί κάποια χημική επεξεργασία. Η εκκίκραση επιτυγχάνεται κυρίως μέσω της αραίωσης της ελευρωπαΐνης στην άλμη (Rejano et al., 2010).

Ο σημαντικότερος εμπορικός τύπος αυτής της κατηγορίας είναι οι **φυσικές μαύρες ελιές ελληνικού τύπου** (Greek-style natural black olives). Χαρακτηριστικό γνώρισμα αυτού του τύπου είναι ότι πρόκειται για ένα φυσικό προϊόν όπως υποδεικνύεται και στην ονομασία του, λόγω της απουσίας χημικής παρέμβασης κατά την επεξεργασία. Οι ελιές τοποθετούνται σε ξύλινες, πλαστικές ή τσιμεντένιες δεξαμενές με αλατόνερο αμέσως μετά τη συγκομιδή, στις οποίες ακολουθεί ζύμωση (Crisosto et al., 2011). Οι δεξαμενές κλείνονται καλά ούτως ώστε να εξασφαλιστούν αναερόβιες συνθήκες και να αποφευχθεί η ανάπτυξη ανεπιθύμητων αερόβιων βακτηρίων στην επιφάνεια τους (Πανάγου, 2002). Η συγκέντρωση του άλατος ξεκινάει από 5% και αυξάνεται σταδιακά τους επόμενους μήνες μέχρι 10% (Crisosto et al., 2011). Η μικροχλωρίδα που παίζει τον κρισιμότερο ρόλο στη διεξαγωγή της ζύμωσης αποτελείται από ένα μεικτό πληθυσμό αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, ζυμών και γαλακτικών βακτηρίων (Πανάγου, 2002). Σε αυτή την επεξεργασία, η διάρκεια της ζύμωσης κρατάει αξιοσημείωτα μεγαλύτερο διάστημα (Medina et al., 2016) και άρα ο αναγκαίος χρόνος προκειμένου το προϊόν να ετοιμαστεί είναι εξίσου μεγαλύτερος. Κύρια αιτία αποτελεί το γεγονός πως απουσία αλκαλικής επεξεργασίας, η διάχυση των διαλυτών συστατικών, μεταξύ των οποίων και της ελευρωπαΐνης, από την επιδερμίδα των κυττάρων του καρπού προς την άλμη είναι αργή (Rejano et al.,

2010). Η επεξεργασία ολοκληρώνεται μετά το πέρας 6 με 9 μηνών και ανάλογα με τους πληθυσμούς των μικροοργανισμών που θα επικρατήσουν, παρατηρούνται διαφορετικές τιμές στο pH και την οξύτητα των τελικών προϊόντων (Πανάγου, 2002).

- Αφυδατωμένες και/ή συρρικνωμένες ελιές: Ο καρπός υπόκειται σε ήπια ή και καθόλου αλκαλική επεξεργασία και συντηρείται σε άλμη. Αντί για τη συντήρηση σε άλμη, ο καρπός μπορεί να αφυδατωθεί μερικώς σε ξηρό άλας και/ή μέσω θερμικής επεξεργασίας ή μέσω κάποιας άλλης τεχνολογικής διεργασίας. Κυριότερο παράδειγμα της κατηγορίας είναι οι μαύρες ελιές σε ξηρό άλας (Rejano et al., 2010).
- Ελιές μαυρισμένες μέσω οξείδωσης: Ο καρπός συντηρείται σε άλμη, υφίσταται προαιρετικά ζύμωση, μαυρίζει μέσω της οξείδωσής του που επιτυγχάνεται σε αλκαλικό μέσο και συντηρείται σε ερμητικά κλειστές συσκευασίες που έχουν υποστεί θερμική αποστείρωση (Medina et al., 2016).

Η κατηγορία αυτή περιγράφει τον εμπορικό τύπο, **μαύρες ελιές τύπου Καλιφόρνιας** (California-style black olives). Η συγκομιδή των καρπών που υπόκεινται σε αυτή την επεξεργασία γίνεται πριν την πλήρη ωρίμανση τους (Rejano et al., 2010). Συνήθως πριν την οξείδωση προηγείται η συντήρησή τους σε άλμη, όπου λαμβάνει χώρα ζύμωση παρόμοια με την περίπτωση των φυσικών μαύρων ελιών (Medina et al., 2016). Έπειτα, σε πρώτο στάδιο γίνεται εμβύθιση του καρπού σε διάλυμα καυστικού νατρίου (0,5-1,5 %) και κατόπιν, εφαρμόζεται αερισμός είτε απευθείας στο διάλυμα ή σε νερό στο οποίο μεταφέρονται προσωρινά οι ελιές (Crisosto et al., 2011). Αυτή η διαδικασία διαδοχικών εκθέσεων του καρπού σε διάλυμα καυστικού νατρίου και σε αερισμό επαναλαμβάνεται συνήθως 3 με 5 φορές και του προσδίδει το επιθυμητό μαύρο χρώμα (Rejano et al., 2010). Πιο συγκεκριμένα, ο αερισμός προκαλεί οξείδωση και πολυμερισμό των φαινολικών ενώσεων του καρπού, οι οποίες σχηματίζουν στη συνέχεια μια μαύρη χρωστική που επιτρέπει το ομοιόμορφο μαύρισμα των ελιών (Rejano et al., 2010). Το καυστικό νάτριο υποβοηθά την επεξεργασία καθιστώντας ευκολότερη την οξείδωση και

πολυμερισμό των φαινολικών ενώσεων (Crisosto et al., 2011). Οι μαυρισμένες ελιές ξεπλένονται τακτικά με νερό για να απομακρυνθεί το καυστικό νάτριο και τελικώς συντηρούνται σε άλμη με περιεκτικότητα 2,5% άλατος (Crisosto et al., 2011). Το τελικό προϊόν έχει συγκριτικά με άλλες διεργασίες πολύ υψηλές τιμές pH (5,8-7,9) και πολύ χαμηλές τιμές αλατότητας (1%-3%) (Rejano et al., 2010). Αυτές οι χημικές παράμετροι καθιστούν μη ασφαλές το προϊόν και γι'αυτό οι ελιές που παρασκευάστηκαν μέσω αυτής της επεξεργασίας πρέπει να αποστειρωθούν, ώστε να εμποδιστεί η πιθανότητα ανάπτυξης παθογόνων (Rejano et al., 2010).

- Ελιές ειδικής κατηγορίας: Ο καρπός μπορεί να επεξεργαστεί με μια ειδική διεργασία που χρησιμοποιείται μόνη της ή προστίθεται σε κάποια από τις προαναφερθείσες. Τέτοιοι εμπορικοί τύποι μπορούν να διατηρήσουν το όνομα "ελιά" μόνο εφόσον ο καρπός που χρησιμοποιήθηκε, συμμορφώνεται με τον ορισμό της επιτραπέζιας ελιάς που περιγράφηκε παραπάνω (Medina et al., 2016).

1.4 Ελληνικές ποικιλίες επιτραπέζιας ελιάς

Οι σημαντικότερες ποικιλίες επιτραπέζιας ελιάς σε παγκόσμιο επίπεδο εμπορίου είναι οι ποικιλίες Manzanilla, Gordal Sevillana και Hojiblanca από την Ισπανία, καθώς επίσης και οι ελληνικές ποικιλίες Kalamata ή Καλαμών και Conserved ή Κονσερβολιά (Rejano et al., 2010). Στην Ελλάδα, η ποικιλία Chalkidiki ή Χαλκιδικής συγκαταλέγεται μαζί με τις προαναφερθείσες ως οι 3 πιο σημαντικές (Fernandez et al., 1997), οι οποίες και θα περιγραφούν στη συνέχεια λίγο πιο εκτενώς.

1.4.1 Κονσερβολιά (*Olea europaea media rotunda*)



Εικόνα 1. Ελιές ποικιλίας Κονσερβολιά.

Η Κονσερβολιά ευδοκιμεί κυρίως στη Κεντρική Ελλάδα, σε περιοχές όπως η Εύβοια, η Αιτωλοακαρνανία και η Άρτα (Πανάγου, 2002). Ο καρπός της ζυγίζει περίπου 5 g, έχει ασύμμετρο στρογγυλό σχήμα ή ωειδές και αναλογία

σάρκας-πυρήνα 8-10:1 (Kailis, 2007), κάτι που τον καθιστά κατάλληλο για να χρησιμοποιηθεί ως επιτραπέζια ελιά. Έχει λεπτή και ελαστική επιδερμίδα και όταν ωριμάσει μπορεί να αντισταθεί ικανοποιητικά στο ζάρωμα ακόμα και σε υψηλές συγκεντρώσεις άλατος (12-19%) (Fernandez et al., 1997). Γιαυτό θέλει προσοχή όταν ακολουθείται φυσική ζύμωση της πράσινης ελιάς, όπου δεν είναι πλήρως ώριμη, ώστε να ξεκινήσει πρώτα με χαμηλές συγκεντρώσεις (π.χ. 4-5%) και να αυξηθούν στη συνέχεια σταδιακά (Πανάγου, 2002). Η συγκομιδή μιας ποσότητας του καρπού πραγματοποιείται ενώ είναι ακόμα πράσινες για να επεξεργαστούν ως πράσινες ελιές Ισπανικού τύπου και οι υπόλοιπες παραμένουν στο δέντρο μέχρι να μαυρίσει το χρώμα τους και να ακολουθήσουν την επεξεργασία φυσικών μαύρων ελιών σε άλμη (Fernandez et al., 1997).

1.4.2 Καλαμών (*Olea europaea* var. *ceraticarpa*)

Η ποικιλία Καλαμών είναι μια ελιά με εξαιρετική ποιότητα που εντοπίζεται στις περιοχές της Λακωνίας, Μεσσηνίας, Αργολίδας, Ηλείας, Κορινθίας, Φθιώτιδας και Αιτωλοακαρνανίας (Πανάγου, 2002). Ο καρπός της έχει βάρος περίπου 4.5-5 g, ασύμμετρα επιμηκυμένο σχήμα με μια προεξέχουσα άκρη στο κάτω μέρος και αναλογία σάρκας-πυρήνα 8-10:1 (Kailis, 2007). Έχει λεπτή, ελαστική επιδερμίδα και κατά την πλήρη ωρίμανση αποκτά ένα ωραίο, έντονο μαύρο χρώμα (Fernandez et al., 1997). Η συγκεκριμένη ποικιλία χρησιμοποιείται για την παραγωγή του εμπορικού τύπου μαύρης επιτραπέζιας ελιάς με την χαρακτηριστική ονομασία «χαρακτές ελιές Καλαμών σε οξάλη» (Πανάγου, 2002).

Η περίοδος συγκομιδής του καρπού ξεκινάει συνήθως προς τα τέλη Οκτωβρίου και τερματίζει μέσα στο Δεκέμβριο. Συνήθως κάποια στιγμή αυτήν την περίοδο η θερμοκρασία πέφτει σε πολύ χαμηλά επίπεδα, γεγονός που προκαλεί ζάρωμα στο καρπό που έχει παραμείνει στο δέντρο, καταστρέφοντας έτσι την εμπορική του αξία. Κατά τη συγκομιδή δίνεται ιδιαίτερη προσοχή και κυρίως στις αρχές, ώστε να μαζευτούν επιλεκτικά από το δέντρο μόνο όσες ελιές έχουν αποκτήσει το επιθυμητό μαύρο χρώμα. Οι υπόλοιπες αφήνονται πάνω στο δέντρο προκειμένου να ωριμάσουν πλήρως και να μαυρίσουν και μόνο τότε συνεχίζεται η συγκομιδή τους. Με βάση λοιπόν το διαθέσιμο χρόνο που έχει ο παραγωγός και ανάλογα με τις

εκτάσεις και την ποσότητα του καρπού, υπολογίζει την ταχύτητα με την οποία θα κινηθεί και άρα το πόση προσοχή θα δώσει στο διαχωρισμό των μαύρων από τις πράσινες ελιές κατά το μάζεμα.



Εικόνα 2. Ελιές ποικιλίας Καλαμών.

1.4.3 Χαλκιδικής

Η συγκεκριμένη ποικιλία πήρε το όνομα της από την περιοχή της Χαλκιδικής, στην οποία και καλλιεργείται κυρίως, αλλά εκτός από εκεί, συναντάται ακόμα στη Καβάλα, τις Σέρρες και σε πολλά παράλια της Βόρειας Ελλάδας (Πανάγου, 2002). Το βάρος του καρπού της κυμαίνεται μεταξύ 6-10 g και έχει εξαιρετική για επιτραπέζια ελιά αναλογία σάρκας-πυρήνα, ίση περίπου με 10:1 (Kailis, 2007). Το σχήμα του είναι επιμηκυσμένο, με μια προεξέχουσα άκρη στο κάτω μέρος, η οποία είναι ελαφρός καμπυλωτή (Fernandez et al., 1997). Εξαιτίας της αδυναμίας του να αποκτήσει κατάλληλο μαύρο χρώμα ακόμα και στο στάδιο της πλήρους ωριμότητας, ο καρπός επιλέγεται αποκλειστικά για παραγωγή πράσινων ελιών Ισπανικού τύπου (Fernandez et al., 1997). Επιπλέον, μπορεί να αναπτυχθούν αρνητικές οσμές κατά την επεξεργασία όπως η αλλοίωση Zarateria (Kailis 2007), καθώς η χαμηλή περιεκτικότητα σε ζυμώσιμα συστατικά καθιστούν εύκολη την αρνητική εκτροπή της φυσιολογικής ζύμωσης (Fernandez et al., 1997). Ακόμα, ένα άλλο μειονέκτημα που εντοπίζεται στη ζύμωση είναι ο σχηματισμός ενός ροζ δακτυλίου, αποτέλεσμα της δράσης χρωστικών της σάρκας, ο οποίος αν και δεν επηρεάζει τόσο από οργανοληπτική άποψη τον καρπό, εν τούτης υποβαθμίζει την εμπορική του αξία (Πανάγου, 2002).



Εικόνα 3. Ελιές κοικιλίας Χαλκιδικής.

1.5 Οικονομικά στοιχεία

Σύμφωνα με τα τελευταία διαθέσιμα δεδομένα, η παγκόσμια παραγωγή επιτραπέζιας ελιάς για την περίοδο 2019/20 ήταν περίπου 2.925.500 τόνοι (ΙΟΟC, 2019) (Πίνακες 1-2 - Παράρτημα). Η συμβολή της Ελλάδας σε αυτή είναι μεγάλη τόσο σε ευρωπαϊκό, όσο και σε παγκόσμιο επίπεδο. Η χώρα μας σε αυτόν τον τομέα κατατάσσεται τα τελευταία χρόνια στη δεύτερη θέση εντός των χωρών της Ευρωπαϊκής Ένωσης και μόλις στην πέμπτη θέση παγκοσμίως (ΙΟΟC, 2019). Από αυτήν προέρχεται πάνω από το ένα πέμπτο (>20%), κατά μέσο όρο, της συνολικής παραγωγής της Ευρώπης την τελευταία δεκαετία (ΙΟΟC, 2019). Ένα ακόμα στοιχείο με πολύ μεγάλο ενδιαφέρον προκύπτει αν κοιτάξουμε την ετήσια παραγωγή της Ελλάδας, αναλογικά με την έκταση της χώρας σε km². Συγκρίνοντας αυτή την αναλογία με την αντίστοιχη των άλλων κορυφαίων χωρών στην παραγωγή επιτραπέζιας ελιάς (τουλάχιστον 50.000 τόνοι/έτος), παρατηρούμε πως η Ελλάδα είναι πρώτη την τελευταία πενταετία. Με άλλα λόγια, για συγκεκριμένη γεωγραφική έκταση, η Ελλάδα παράγει τις περισσότερες ελιές παγκοσμίως, συγκριτικά με τις μεγαλύτερες σε παραγωγή χώρες.

Μέσα από την ανάγνωση των δεδομένων κατανάλωσης επιτραπέζιας ελιάς από τους διαθέσιμους πίνακες που μας παρέχει το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιοκομίας (ΙΟΟC, 2019) (Πίνακες 3-4 - Παράρτημα), τόσο στην Ευρώπη, όσο και σε παγκόσμια κλίμακα, φαίνεται να υπάρχει μια αυξανόμενη τάση τα τελευταία χρόνια. Στην Ευρώπη, ο κύριος καταναλωτής είναι η Ισπανία, πλησιάζοντας τους 200.000 τόνους ανά έτος τα τελευταία 5 χρόνια. Ακολουθούν στη συνέχεια κατά σειρά η Ιταλία, η Γαλλία, η Γερμανία, το Ηνωμένο Βασίλειο, ενώ η Ελλάδα βρίσκεται στην όγδοη θέση τα τελευταία 2 χρόνια, με 17.000 τόνους κατά μέσο όρο. Αξίζει να σημειωθεί πως τα στοιχεία αυτά, νέμεν μας πληροφορούν για τις χώρες με τη μεγαλύτερη κατανάλωση επιτραπέζιας ελιάς, αλλά από την άλλη δίνουν μια εσφαλμένη εικόνα για την προτίμηση σε επίπεδο πληθυσμών. Αν θελήσουμε να μάθουμε σε ποιες χώρες οι κάτοικοι δείχνουν τη μεγαλύτερη προτίμηση στις ελιές, θα πρέπει να συνυπολογίσουμε τις διαφορές στον αριθμό των κατοίκων που έχει η κάθε μία. Έτσι πέρα από την Ισπανία που εξακολουθεί να είναι πρώτη, κατ' αναλογία οι Έλληνες τρώνε περισσότερες ελιές από τους κατοίκους των υπόλοιπων χωρών που

αναφέρθηκαν. Προτίμηση σε μεγαλύτερο βαθμό από τους Έλληνες, πέρα από τους Ισπανούς, δείχνουν μόνο οι κάτοικοι της Βουλγαρίας και του Λουξεμβούργου από τις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης.

Δεδομένου ότι η κατανάλωση στη χώρα μας είναι μικρότερη από το ένα δέκατο της παραγόμενης ποσότητας, δεν είναι καθόλου περίεργο πως εξαγουμε μεγάλο τμήμα αυτής της ποσότητας, με την τελευταία δεκαετία να αγγίζει το 38% κατά μέσο όρο της ετήσιας παραγωγής. Μόλις τρεις χώρες σε όλο το κόσμο μας ξεπερνάνε σε ετήσιες εξαγωγές τα τελευταία χρόνια (ΙΟΟC, 2019) (Πίνακες 5-6 - Παράρτημα).

1.6 Η μικροβιολογία του καρπού της ελιάς

Η μελέτη της μικροχλωρίδας του ελαιοκάρπου είναι εξαιρετικής σημασίας, μιας και αυτή καθορίζει σε μεγάλο βαθμό χαρακτηριστικά όπως η ασφάλεια, η ποιότητα και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος μέσω της ζύμωσης (Arroyo-López et al., 2012). Η καταβολική δραστηριότητα των μικροοργανισμών, βελτιώνει την πέψη των ουσιωδών θρεπτικών αλλά και τη διαθεσιμότητα τους, αυξάνοντας έτσι τη θρεπτική αξία του τροφίμου (Peres et al., 2017). Μέσα από πολλές μελέτες, μπορούμε να διαπιστώσουμε πως η σύσταση της μικροχλωρίδας του καρπού διαφοροποιείται αρκετά κατά τα διάφορα στάδια παραγωγής του και ιδιαίτερα στη ζύμωση (Panagou et al., 2006, Lucena-Adrós et al., 2019, Argyri et al., 2014). Αρχικά, μετά και το στάδιο της συγκομιδής, στον καρπό της επιτραπέζιας ελιάς επικρατεί μια ενδογενής μικροχλωρίδα που αποτελείται από αρνητικά κατά Gram βακτήρια, κυρίως ψευδομονάδες και εντεροβακτήρια, από γαλακτικά βακτήρια, ζύμες και μύκητες (Tassou et al., 2010). Η αυτόχθονη αυτή μικροχλωρίδα συνοδεύεται πολλές φορές από μια ποικιλία μολυσματικών μικροοργανισμών (Tassou et al., 2010). Οι τελευταίοι προέρχονται από την επαφή των ελιών με τις διαφορετικές επιφάνειες κατά τη συγκομιδή και τη συντήρησή τους (Tassou et al., 2010). Διάφοροι παράγοντες επηρεάζουν τη σύνθεση της αυτόχθονης μικροχλωρίδας όπως η χρονική περίοδος, το μικροκλίμα της περιοχής, οι καλλιεργητικές τεχνικές, η ποικιλία και το στάδιο ωριμότητας του καρπού αλλά και η κατάστασή του (Πανάγου, 2002).

Η μικροχλωρίδα του ελαιοκάρπου κατά τη ζύμωση μπορεί να κατευθυνθεί με τις κατάλληλες συνθήκες και τεχνικές ευνοώντας την ανάπτυξη μόνο των επιθυμητών πληθυσμών, αποφεύγοντας διάφορες εκτροπές της διαδικασίας (Kailis, 2007). Μόνο οι επεξεργασμένες και οι φυσικές ελιές από τις 5 κατηγορίες επεξεργασίας που αναφέρθηκαν χρειάζεται να υποβληθούν στη διαδικασία της ζύμωσης (Hurtado et al., 2012). Αρχικά, στην άλμη κυριαρχούν τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια (Kailis, 2007). Από αυτά, μια από τις σημαντικότερες ομάδες μικροοργανισμών που παρατηρούνται συχνά είναι τα εντεροβακτήρια. Συνήθως εμφανίζονται κατά την αρχή της ζύμωσης και όσο λαμβάνει χώρα το στάδιο αυτό ο πληθυσμός τους μειώνεται σταδιακά, μέχρις ότου φτάσει σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα στο τέλος της διαδικασίας (Ariani et al., 2019). Γενικά, τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια ευθύνονται για την απελευθέρωση οξέων και την κατανάλωση οξυγόνου στην αρχή της ζύμωσης (Kailis, 2007). Αυτά, σε συνδυασμό και με άλλους παράγοντες, έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση της οξύτητας στην άλμη παράλληλα με την πτώση του pH και τελικώς, την δημιουργία κατάλληλων αναερόβιων συνθηκών για την έναρξη της ζύμωσης (Kailis, 2007). Στο αναερόβιο πια περιβάλλον αρχίζουν να αναπτύσσονται τα οξυγαλακτικά βακτήρια, τα οποία παίζουν τον καθοριστικό ρόλο στην ολοκλήρωση της ομαλής προετοιμασίας των ελιών ώστε να είναι έτοιμες για κατανάλωση (Randazzo et al., 2010).

Η δημιουργία των επιθυμητών οργανοληπτικών χαρακτηριστικών της ελιάς βασίζεται πρωτίστως στη διεργασία της οξυγαλακτικής ζύμωσης, κατά την οποία διασπώνται οι υδατάνθρακες, τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες με την έκκριση ενζύμων από τα οξυγαλακτικά βακτήρια και τις ζύμες κατά κύριο λόγο (Peres et al., 2017). Στο ξεκίνημα της ζύμωσης συνήθως πολλαπλασιάζονται πρώτα τα ταχύτερα αναπτυσσόμενα ετεροζυμωτικά οξυγαλακτικά βακτήρια, όπως αυτά του γένους *Leuconostoc* (Kailis, 2007). Παράλληλα, τα επίπεδα των πληθυσμών από τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια μειώνονται εξαιτίας της αύξησης των προηγούμενων (Randazzo et al., 2010). Ο έλεγχός του πληθυσμού τους από την ταχεία αύξηση των οξυγαλακτικών είναι απαραίτητος προκειμένου να αποφευχθεί πιθανή αλλοίωση του καρπού (Randazzo et al., 2010). Με την πάροδο του χρόνου, τα οξυγαλακτικά καταναλώνουν τα διαθέσιμα ζυμώμενα υποστρώματα και απελευθερώνουν CO₂,

γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ, αιθανόλη, μειώνοντας έτσι περαιτέρω το pH της άλμης και οι αναερόβιες συνθήκες διατηρούνται (Kailis, 2007). Ως αποτέλεσμα, μειώνεται ακόμα περισσότερο και ο πληθυσμός των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων (Kailis, 2007). Αν όμως οι συνθήκες δεν είναι κατάλληλες κατά τη ζύμωση λόγω χαμηλής αλατότητας ή μη επαρκούς οξύτητας, μπορεί να μην καταφέρουν τα οξυγαλακτικά να εμποδίσουν την επικράτηση αλλοιογόνων όπως το *Escherichia coli* ή στελεχών της φυλογενετικής ομάδας *Enterobacter aerogenes group*. Αυτά είναι υπεύθυνα για την εμφάνιση της ασθένειας της αεριοπάθησης (fish-eye) (Crisosto et al., 2011). Αρνητική επίπτωση μπορεί να έχει και αντίθετα μια υψηλή περιεκτικότητα αλατότητας (>8%), η οποία θα μπορούσε να ευνοήσει την ανάπτυξη ζυμών σε βάρος των οξυγαλακτικών βακτηρίων (Bonatsou et al., 2018).

Επιπροσθέτως, ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί στο να αποφευχθεί η ανάπτυξη μυκήτων στην επιφάνεια της άλμης, μερικοί εκ των οποίων μπορεί να προκαλέσουν αλλοίωση στον καρπό, όπως να του προσδώσουν μια γεύση μούχλας (Kailis 2007). Οι μύκητες είναι αερόβιοι, μπορούν να αναπτυχθούν σε μεγάλο θερμοκρασιακό εύρος (8-35°C), ενώ δείχνουν ανοχή στις τιμές pH και οξύτητας που επικρατούν στην άλμη κατά τη ζύμωση (Kailis, 2007). Φαίνεται λοιπόν ότι για να ελεγχθεί ο πληθυσμός τους είναι ουσιώδες να γίνει κατάλληλη δημιουργία και διατήρηση αναερόβιων συνθηκών στην επιφάνεια των δεξαμενών συντήρησης του καρπού, όπως έχουμε αναφέρει και νωρίτερα.

Το τελευταίο στάδιο της ζύμωσης είναι και το πιο μακρύ σε διάρκεια, κρατώντας μέχρι και δύο μήνες από την απόθεση των ελιών στην άλμη (Randazzo et al., 2010). Με την αύξηση της οξύτητας ξεκινάει και η αντικατάσταση των ετεροζυμωτικών από ομοζυμωτικά οξυγαλακτικά βακτήρια, τα οποία παράγουν αποκλειστικά γαλακτικό οξύ και είναι αυτά που επικρατούν συνήθως ως το τέλος της ζύμωσης (Kailis, 2007). Αφού ολοκληρωθεί η ζύμωση, οι τιμές του pH από 6,5-7,5 που ήταν αρχικά πέφτουν κοντά στο 4 ή και χαμηλότερα, ενώ αυτές τις οξύτητας ξεπερνάνε το 0,6% w/v (Kailis, 2007). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η μικροχλωρίδα που επικρατεί τελικά αποτελείται από είτε από οξυγαλακτικά βακτήρια, είτε από ζύμες που μπορεί να επικρατήσουν σε μερικές περιπτώσεις, καθώς επίσης και από έναν συνδυασμό τους (Hurtado et al., 2012). Στην πρώτη περίπτωση προκύπτει ένα

προϊόν με πιο όξινη γεύση και χαμηλό pH, εξαιρετικά επιθυμητά χαρακτηριστικά για τις φυσικές μαύρες ελιές (Panagou et al., 2008). Στην δεύτερη το προϊόν έχει πιο ήπια γεύση και είναι πιο δύσκολα συντηρήσιμο, ενώ στην τρίτη τα χαρακτηριστικά του εξαρτώνται από τον σχετικό πληθυσμό μεταξύ οξυγαλακτικών βακτηρίων και ζυμών (Panagou et al., 2008).

1.6.1 Οξυγαλακτικά βακτήρια στην επιτραπέζια ελιά

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική ζύμωση και κατ' επέκταση στη σωστή προετοιμασία της επιτραπέζιας ελιάς. Η σύσταση του πληθυσμού τους αποτελεί τον κύριο παράγοντα που καθορίζει την ποιότητα του τελικού προϊόντος (Randazzo et al., 2010). Φυλογενετικά, με τον όρο οξυγαλακτικά βακτήρια αναφερόμαστε στην τάξη *Lactobacillales*, γνωστή και ως LAB (lactic acid bacteria). Αυτά ανήκουν στην κλάση ή ομοταξία *Bacilli* και φέρουν κάποια ιδιαίτερα χαρακτηριστικά. Είναι κυρίως αναερόβια, υπό μορφή κόκκων ή βάκιλων και ανθεκτικά στην οξύτητα παράγουν γαλακτικό οξύ ως το κύριο τελικό προϊόν στη ζύμωση (Teneva-Angelova et al., 2018). Το γεγονός ότι είναι μεσόφιλα και ανθεκτικά στην οξύτητα, καθιστούν τις συνθήκες που επικρατούν κατά τη ζύμωση της ελιάς ιδανικές για την ανάπτυξή τους (Randazzo et al., 2010). Είναι ακόμα θετικά κατά Gram, αρνητικά στην καταλάση, δε παρουσιάζουν κίνηση, δε σχηματίζουν σπόρια και στερούνται κυτοχρωμάτων (Teneva-Angelova et al., 2018). Έχουν αποκτήσει την ιδιότητα να θεωρούνται ως ασφαλείς μικροοργανισμοί (generally recognized as safe ή GRAS), ενώ επίσης διαθέτουν ευεργετικές τεχνολογικές ιδιότητες (Peres et al., 2017). Μπορούν να βρεθούν σε ποικίλα οικοσυστήματα όπως φυτικά, ζωικά, καθώς επίσης και σε βλεννογόνους του ανθρώπινου σώματος (Teneva-Angelova et al., 2018).

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν βρεθεί σε πολλές κατηγορίες τροφίμων, μεταξύ άλλων σε γαλακτοκομικά προϊόντα, κρέατα, ψάρια, δημητριακά και λαχανικά (Teneva-Angelova et al., 2018). Όσον αφορά τις επιτραπέζιες ελιές, τα οξυγαλακτικά βακτήρια που επικρατούν είναι αυτά που ανήκουν στο γένος *Lactobacillus*, ενώ ακόμα, σε μικρότερους πληθυσμούς παρατηρούνται τα γένη των *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Enterococcus* και *Pediococcus* (Randazzo et al., 2010).

Πέραν της προστασίας που παρέχουν από την αλλοίωση του καρπού και τη συμβολή τους στην επίδοση της ζύμωσης, βοηθάνε ακόμα στο ξεπικρίσμα της ελιάς με τη διάσπαση της ελευρωπαϊνης (Peres et al., 2017). Ο διαχωρισμός τους σε ομοζυμωτικά και ετεροζυμωτικά που φάνηκε και παραπάνω, εξαρτάται από τα διαφορετικά μεταβολικά μονοπάτια εξόζης που ακολουθούν (Randazzo et al., 2010). Εκτός από γαλακτικό οξύ, τα δεύτερα παράγουν ισάριθμη ποσότητα CO₂ και οξικού οξέος με αιθανόλη, ενώ τα πρώτα παράγουν αποκλειστικά γαλακτικό οξύ (Kailis, 2007). Γιαυτό και οι συγκεντρώσεις του είναι αυξημένες στην άλμη της ελιάς όταν επικρατούν τα ομοζυμωτικά γαλακτικά βακτήρια έναντι των ετεροζυμωτικών (Kailis, 2007).

1.6.2 Ο ρόλος των ζυμών στη ζύμωση της επιτραπέζιας ελιάς

Οι ζύμες είναι μονοκύτταροι ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί που υπάγονται στο βασίλειο των μυκήτων και έχουν εξαιρετική σημασία για τη βιομηχανία τροφίμων και ποτών (Arroyo-López et al., 2012). Η κύρια λειτουργία τους είναι η διάσπαση των υδατανθράκων κατά την ζύμωση σακχάρων προς παραγωγή νερού, αιθανόλης, CO₂ και άλλων μικρότερων ενώσεων (Arroyo-López et al., 2008). Παρουσιάζουν διττό ρόλο στα οικοσυστήματα των τροφίμων μιας και έχουν εξαιρετικά ευεργετικές ιδιότητες για τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους, ενώ από την άλλη μεριά διαθέτουν υψηλό δυναμικό αλλοίωσης (Tofalo et al., 2013). Όπως και τα οξυγαλακτικά βακτήρια, ευδοκιμούν στις θερμοκρασίες όπου λαμβάνει χώρα η φυσική ζύμωση της επιτραπέζιας ελιάς και είναι συνήθως ανθεκτικές στην οξύτητα (Kailis 2007). Αυτές οι ιδιότητες μαζί με την ευρεία εξάπλωση που παρουσιάζουν γενικά στο περιβάλλον (Arroyo-López et al., 2008), εξηγούν τόσο την εμφάνιση τους, όσο και τη διατήρησή τους ορισμένες φορές κατά τη ζύμωση. Σε αυτό το σημείο επεξεργασίας της επιτραπέζιας ελιάς, τα συνηθέστερα γένη ζυμών που έχουν απομονωθεί περιλαμβάνουν τα *Aureobasidium*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Issatchenkia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Zygorulasporea*, *Wickerhamomyces* και *Nakazawaea* (Ruiz-Moyano et al., 2019).

Ορισμένες ζύμες εκδηλώνουν λιπολυτική δραστηριότητα χρησιμοποιώντας ένζυμα όπως οι λιπάσες και εστεράσες, τα οποία αυξάνουν την περιεκτικότητα σε

ελεύθερα λιπαρά οξέα (Rodríguez-Gómez et al., 2012b). Με αυτόν τον τρόπο σχηματίζονται αρωματικές ενώσεις όπως αιθανόλη, γλυκερόλη, ανώτερες αλκοόλες και άλλες ευεργετικές πτητικές ενώσεις που βελτιώνουν τόσο το άρωμα, όσο και τη γεύση του τελικού προϊόντος της ελιάς (Bonatsou et al., 2018).

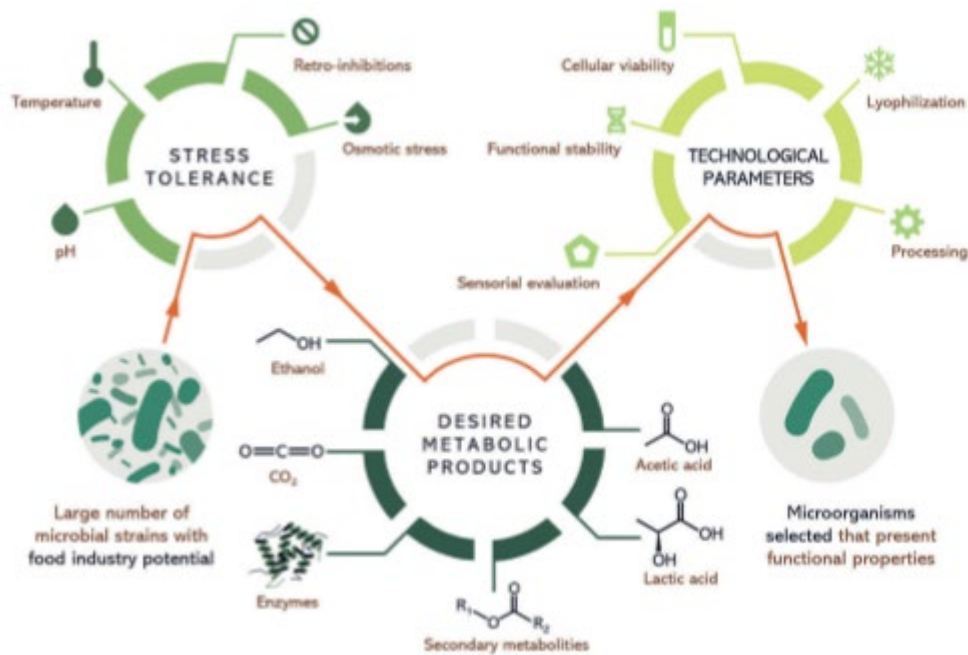
Κάποιες άλλες θετικές επιδράσεις των ζυμών που έχουν παρατηρηθεί, είναι η συμβολή τους στη διάσπαση της ελευρωπαϊίνης, η παρεμπόδιση της ανάπτυξης ανεπιθύμητων ζυμών και μυκήτων με την έκκριση τοξικών πρωτεϊνών και αιθανόλης, καθώς επίσης και η ενίσχυση του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων, συνθέτωντας απαραίτητα για την ανάπτυξή τους αμινοξέα, βιταμίνες, πουρίνες και απλούστερες ενώσεις πολύπλοκων υδατανθράκων (Arroyo-López et al., 2012).

Από την άλλη μεριά, μερικά στελέχη διαθέτουν ένζυμα με αρνητικές επιδράσεις για τον καρπό της ελιάς όπως πρωτεάσες, ξυλανάσες και πηκτινάσες, των οποίων η λειτουργία υποβαθμίζει την υφή του μαλακώνοντάς τον (Arroyo-López et al., 2012). Επιπλέον, η υπερβολική αύξηση του πληθυσμού των ζυμών μπορεί να οδηγήσει σε εκτεταμένη παραγωγή CO₂, το οποίο με τη σειρά του διαπερνά την ελιά και δημιουργεί σχισμές, οδηγώντας σε ένα τύπο αλλοίωσης που είναι γνωστός ως «Alambrado» (Arroyo-López et al., 2012). Ιδιαίτερα επιβλαβής είναι η ανάπτυξή τους κατά το στάδιο όπου το προϊόν έχει προετοιμαστεί για κατανάλωση και βρίσκεται συσκευασμένο (Rodríguez-Gómez et al., 2012b). Σε αυτό το στάδιο μπορεί να επέλθει αλλοίωση με την παραγωγή CO₂, τη δημιουργία δυσάρεστων οσμών και γεύσης, το θόλωμα της άλμης ή και το μαλάκωμα του καρπού (Rodríguez-Gómez et al., 2012b). Οι ζύμες μπορούν να αναπτυχθούν εκεί καταναλώνοντας το γαλακτικό και οξικό οξύ που παράχθηκε από τη ζύμωση (Arroyo-López et al., 2008). Αυτό όμως μπορεί να αποφευχθεί αν διατηρηθούν αυστηρά αναερόβιες συνθήκες στη συσκευασία, μιας και η ύπαρξη O₂ είναι αναγκαία για να γίνει χρήση των παραπάνω οξέων από τις ζύμες (Arroyo-López et al., 2008).

1.7 Εναρκτήριες καλλιέργειες

Με την ευρεία εξάπλωση στην αγορά και την παραγωγή σε μεγάλη κλίμακα τροφίμων που έχουν υποστεί ζύμωση, γεννήθηκε η ανάγκη της επιλογής κατάλληλων μικροοργανισμών για να χρησιμοποιηθούν κατά τη διάρκειά της και να προσδώσουν συγκεκριμένα πλεονεκτήματα στο τελικό προϊόν (Vinicius et al., 2019). Μάλιστα, η ιδιότητά τους να ξεκινάνε γρήγορα τη διαδικασία της ζύμωσης τους προσέδωσε και την ονομασία, εναρκτήριες καλλιέργειες (starter cultures) (Vinicius et al., 2019). Ως εναρκτήρια καλλιέργεια ή καλλιέργεια εκκίνησης, ορίζεται η παρασκευή ζωντανών μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται σκόπιμα για να ενισχύσουν την έναρξη της ζύμωσης, προκαλώντας συγκεκριμένες αλλαγές στη χημική σύνθεση και στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του υποστρώματος και εν τέλη δημιουργούν ένα πιο ομοιογενές προϊόν (Medina-Pradas et al., 2017). Ο κύριος λόγος για τον οποίο χρησιμοποιούνται αυτές οι καλλιέργειες, είναι η παραγωγή ζυμούμενων τροφίμων με υψηλή και σταθερή ποιότητα (Foerst et al., 2015). Αυτό το επιτυγχάνουν μέσα από τον έλεγχο που ασκούν στη διαδικασία της ζύμωσης, αυξάνοντας τις πιθανότητες επιτυχίας της, ενώ ταυτόχρονα συμβάλλουν στη βελτίωση της ασφάλειας, της συνοχής και των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του τελικού προϊόντος (Vinicius et al., 2019).

Προφανώς δεν είναι όλοι οι μικροοργανισμοί κατάλληλοι για να χρησιμοποιηθούν ως εναρκτήριες καλλιέργειες. Ο τρόπος με τον οποίο γίνεται η επιλογή εκείνων που πληρούν τις κατάλληλες προϋποθέσεις, είναι μέσο μιας συστηματικής και πολυσταδιακής προσέγγισης (Vinicius et al., 2019). Σε γενικές γραμμές, οι κεντρικοί πυλώνες που αποτελούν τα βασικά κριτήρια επιλογής είναι η αντίσταση ενάντια σε διάφορους στρεσογόνους παράγοντες, η παραγωγή επιθυμητών μεταβολικών προϊόντων, καθώς επίσης και οι τεχνολογικές δυνατότητες των εξεταζόμενων στελεχών (Vinicius et al., 2019). Με τον τελευταίο όρο αναφερόμαστε σε χαρακτηριστικά όπως την ικανότητα να παράγονται σε μεγάλη κλίμακα πάνω σε σχετικά φτηνά υποστρώματα, καθώς και την αντοχή στα διάφορα στάδια επεξεργασίας και προετοιμασίας της καλλιέργειας που απαιτούνται προτού γίνει η χρήση της (Vinicius et al., 2019).



Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση των κριτηρίων με τα οποία εξετάζεται ένα δυνητικά αποδεκτό στέλεχος μικροοργανισμών για να χρησιμοποιηθεί ως εναρκτήριο καλλιέργεια (Vinicius et al., 2019).

Προτού όμως αρχίσει η διαδικασία εξέτασης όλων αυτών των κριτηρίων, απαραίτητη προϋπόθεση για την επιλογή τους ως δυνητικά αποδεκτές καλλιέργειες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε τρόφιμα, είναι η εξασφάλιση της ασφάλειάς τους. Για αυτό το σκοπό, έχουν κατασκευαστεί λίστες με μικροοργανισμούς που θεωρούνται ασφαλής έπειτα από επιστημονική αξιολόγηση τόσο από την ευρωπαϊκή EFSA, όσο και από το αμερικανικό FDA (Russo et al., 2017). Έτσι, όσοι περιλαμβάνονται στις λίστες αυτές αποκτούν τον χαρακτηρισμό “QPS” (qualified presumption of safety) ή “GRAS” (generally recognized as safe) αντίστοιχα και θεωρούνται ακίνδυνοι για την υγεία των καταναλωτών (Russo et al., 2017). Στα περισσότερα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν αποδοθεί αμφότεροι οι χαρακτηρισμοί και μάλιστα οι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί είναι και οι πιο αντιπροσωπευτικοί της λίστας GRAS (Russo et al., 2017). Έτσι, αναδεικνύεται επιστημονικά η ασφαλής τους φύση και αυτό καθιστά δυνατή τη χρήση τους ως καλλιέργειες εκκίνησης χωρίς να εγκυμονούνται κίνδυνοι για την υγεία του καταναλωτή.

Τον πρώτο καιρό, ως πηγή εναρκτήριων καλλιεργειών για την επιτραπέζια ελιά, χρησιμοποιούνταν σε αρκετές περιπτώσεις “άγριοι” τύποι οξυγαλακτικών

βακτηρίων απομονωμένων από προηγούμενες ζυμώσεις επιτραπέζιας ελιάς, μια μέθοδος γνωστή ως «back-slopping» (Panagou et al., 2008). Δυστυχώς, αυτή η μέθοδος δεν εγγυάται τη σταθερή και καλή ποιότητα των προϊόντων που είναι αναγκαία, καθώς οι μεταβολικές δραστηριότητες τέτοιων βακτηρίων δεν είναι συγκεκριμένες, παρουσιάζοντας διαφορές ακόμα και μεταξύ στελεχών, γεγονός που μπορεί να επιφέρει διαφορές στην τελική γεύση και ποιότητα των επιτραπέζιων ελιών (Randazzo et al., 2010). Τα τελευταία χρόνια, η βιομηχανία επιτραπέζιας ελιάς κατευθύνεται στη χρήση καθαρών καλλιέργειών εκκίνησης για την επίτευξη μιας βελτιωμένης και περισσότερο προβλεπόμενης διαδικασίας ζύμωσης, αποφεύγοντας έτσι παρόμοια προβλήματα (Panagou et al., 2008). Σήμερα, τέτοιες καθαρές καλλιέργειες οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι διαθέσιμες στην αγορά και χρησιμοποιούνται σε διάφορα τρόφιμα (Blana et al., 2014), όπως γιαούρτια και τυριά (*Lactococcus lactis*, *S. thermophilus* και *Lb. delbrueckii*), ζυμώσιμα λαχανικά (*Leuc. mesenteroides* και *Lb. plantarum*), κρέατα (*Lb. pentosus* και *Ped. acidilactici*), αλλά και ελιές (*Lb. plantarum* και *Lb. pentosus*) (Vinicius et al., 2019).

Μια βασική προϋπόθεση που θα πρέπει να πληρεί ένα δυνητικά αποδεκτό στέλεχος οξυγαλακτικών βακτηρίων ώστε να χρησιμοποιηθεί κατά τη ζύμωσης της ελιάς, είναι η ικανότητα ανάπτυξης και κυριαρχίας στο ιδιαίτερο μικροπεριβάλλον της. Στο στάδιο της ζύμωσης, όπως έχει αναφερθεί, παρατηρείται όξινο pH και επίπεδα αλατότητας που ξεπερνούν το 5%, δύο παράγοντες στους οποίους είναι απαραίτητο να δείξει ανοχή το στέλεχος (Blana et al., 2014). Παράλληλα, πέρα από αντοχή σε χαμηλό pH, θα πρέπει να διαθέτει υψηλούς ρυθμούς όξυνσης του καρπού ελαττώνοντάς το και διατηρώντας το σε χαμηλές τιμές μέσω της παραγωγής οργανικών οξέων (Blana et al., 2014). Ουσιώδης είναι ακόμα η ανάπτυξη του στελέχους υπό την παρουσία των φαινολικών γλυκοζιτών “oleuropein” (ελευρωπαΐνη) και “verbascoside” (βερμπασκοζίτης), οι οποίοι απαντώνται στον καρπό της ελιάς και δρουν ως φυσικοί παρεμποδιστές (Randazzo et al., 2010). Επίσης, εκτός από ανοχή στην ελευρωπαΐνη θα πρέπει να μπορεί επιπλέον να τη διασπάσει, συνεισφέροντας με αυτόν τον τρόπο στο να γίνει κατάλληλη η ελιά προς βρώση (Chranioti et al., 2018). Προκειμένου να καταφέρει να επικρατήσει μεταξύ της υπόλοιπης μικροχλωρίδας του καρπού, καίρια είναι η ικανότητα του στελέχους

να αναπτύσσεται ταχεία μέσω της γρήγορης κατανάλωσης των ζυμώσιμων υποστρωμάτων (Tofalo et al., 2014).

Η απόκριση στη θερμοκρασία παίζει και αυτή σημαντικό ρόλο κατά την επιλογή ενός στελέχους ως πιθανή εναρκτήρια καλλιέργεια (Chranioti et al., 2018). Το κρύο κλίμα των περιοχών παραγωγής ελιάς που παρατηρείται κυρίως το χειμώνα, παρεμποδίζει τη μικροβιακή ανάπτυξη, καθιστώντας απαραίτητη την ικανότητα αντοχής σε χαμηλές θερμοκρασίες (Randazzo et al., 2010). Ακόμα, προτιμώνται στελέχη που έχουν τη δυνατότητα μέσω της δράσης τους να ενισχύσουν τη γεύση του τελικού προϊόντος, καθώς επίσης και αυτά που παράγουν βακτηριοκίνες, οι οποίες συνεισφέρουν στην ασφάλεια και την παράταση της διάρκειας ζωής του (Corsetti et al., 2012).

Τα στελέχη των οξυγαλακτικών βακτηρίων που θεωρούνται τα πιο κατάλληλα για να χρησιμοποιηθούν ως καλλιέργειες εκκίνησης κατά τη ζύμωση της επιτραπέζιας ελιάς, προέρχονται από τα είδη *Lb. plantarum* και *Lb. pentosus* (Heperkan, 2013). Μάλιστα, τα δύο αυτά είδη είναι και αυτά που κυριαρχούν συνήθως κατά την αυθόρμητη ζύμωση της επιτραπέζιας ελιάς (Hurtado et al., 2012). Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, ορισμένα στελέχη τους που είναι κατάλληλα για τη ζύμωση της επιτραπέζιας ελιάς διατίθενται στο εμπόριο προς πώληση (Randazzo et al., 2014). Στελέχη τους έχουν ακόμα χρησιμοποιηθεί σε πολλές μελέτες μέχρι τώρα σαν καλλιέργειες εκκίνησης για διαφορετικές ποικιλίες ελιάς, με πολύ ενθαρρυντικά αποτελέσματα (Blana et al., 2016, Argyri et al., 2014, Panagou et al., 2008, De Angelis et al., 2015, Zago et al., 2013, Tufarriello et al., 2015). Εξαιτίας της μεγάλης τους φυλογενετικής ομοιότητας τοποθετούνται στην ευρύτερη ομάδα *Lb. plantarum group*, η οποία περιλαμβάνει ακόμα τα *Lb. arizonensis*, *Lb. paraplantarum*, *Lb. xiangfangensis* και *Lb. fabifermentans* (Devi et al., 2019). Το *Lb. plantarum* χωρίζεται στα υποείδη *subsp. plantarum* και *subsp. argentoratensis* (Devi et al., 2016). Προσφατά, έχει επισημανθεί πως τα στενά συνδεδεμένα με αυτό είδη *Lb. herbarum*, *Lb. plajomi*, *Lb. modestisalitolerans* και *Lb. mudanjiangensis* θα πρέπει να προστεθούν και αυτά στη φυλογενετική ομάδα *Lb. plantarum group* (Wuyts et al., 2019).

Τα τελευταία χρόνια έχει αρχίσει να αναδεικνύεται ο καρπός της ελιάς ως ένα προϊόν, το οποίο θα μπορούσε δυνητικά να αποκτήσει και προβιοτικές ιδιότητες. Από τη στιγμή που κάτι τέτοιο αναμένεται να ενισχύσει την ήδη υψηλή θρεπτική αξία που παρέχει η επιτραπέζια ελιά, αναζητούνται για αυτό το σκοπό εναρκτήριοι καλλιέργειες που να διαθέτουν εκτός των άλλων και προβιοτικό δυναμικό (Blana et al., 2014). Εργαστηριακές μελέτες in vitro σε επιτραπέζιες ελιές έχουν αναδείξει πως τα είδη *Lb. plantarum* και *Lb. pentosus* διαθέτουν και προβιοτικές ιδιότητες (Bevilacqua et al., 2010, Bautista et al., 2013, Argyri et al., 2013, Botta et al., 2014), γεγονός που ενισχύει την καταλληλότητά τους για χρήση ως καλλιέργειες εκκίνησης και ενθαρρύνει τις προσπάθειες που γίνονται πάνω στο συγκεκριμένο προϊόν ώστε να αποκτήσει δυνητικά προβιοτικό χαρακτήρα.

1.8 Προβιοτικό δυναμικό

Με τον όρο προβιοτικά βακτήρια αναφερόμαστε σε εκείνους τους ζωντανούς μικροοργανισμούς, οι οποίοι αν καταναλωθούν σε κατάλληλες ποσότητες ως μέρος ενός τροφίμου, μπορούν να επιφέρουν οφέλη στην υγεία του καταναλωτή (Hotel et al., 2001). Ως προβιοτικά χαρακτηρίζονται τα τρόφιμα στα οποία έχει προηγηθεί ζύμωση και που περιέχουν μια ικανοποιητική ποσότητα ζωντανών και ενεργών μικροοργανισμών, αρκετά μεγάλη ώστε να αντέξει το δυσμενές περιβάλλον του πεπτικού συστήματος και να ασκήσει εξισορροπητική δράση στην εντερική μικροχλωρίδα (Argyri et al., 2016).

Σήμερα είναι γνωστοί διάφοροι τρόποι με τους οποίους τα προβιοτικά μπορούν να παρέχουν ευεργετικές επιπτώσεις στην υγεία τόσο των ανθρώπων όσο και των ζώων (Argyri et al., 2016). Μερικές από αυτές είναι η παρεμποδιστική δράση έναντι εντερικών παθογόνων μέσω της παραγωγής ανασταλτικών ουσιών (γαλακτικό οξύ, βακτηριοκίνες, κ.α.) αλλά και του ανταγωνισμού τους για τα θρεπτικά και τις θέσεις πρόσφυσης στο έντερο, η μείωση στα επίπεδα της χοληστερίνης και η διατήρηση της φυσιολογικής εντερικής μικροχλωρίδας (Kumar et al., 2016). Ακόμα, είναι πιθανό πως συμβάλλουν στο να παραμείνει ακέραια η διαπερατότητα των τοιχωμάτων του εντέρου, προφυλάσσοντας έτσι από γαστρεντερική λοίμωξη (Lavermicocca et al., 2010). Σε γενικές γραμμές, από τις

διάφορες λειτουργίες των προβιοτικών που έχουν προταθεί, οι περισσότερες σχετίζονται άμεσα ή έμμεσα με τη θετική επίδραση στη σύνθεση και λειτουργία της εντερικής μικροχλωρίδας (Kumar et al., 2016). Η εξέταση για τα πιθανά οφέλη που μπορούν να προκαλέσουν στην υγεία ορισμένοι μικροοργανισμοί γίνεται ξεχωριστά για κάθε διαφορετικό στέλεχος και όχι σε επίπεδο γένους ή και είδους (Anadon et al., 2016).

Για να εξασφαλιστεί όμως πως οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί θα είναι ενεργοί τη στιγμή της κατανάλωσης, πρέπει να ληφθούν υπόψη οι παράγοντες που επηρεάζουν την επιβίωση τους στο προϊόν (Anagnostopoulos et al., 2019). Σε αυτούς περιλαμβάνεται η φυσιολογική κατάσταση στην οποία βρίσκονται όταν προστίθενται στο τρόφιμο, οι αλληλεπιδράσεις με τις καλλιέργειες εκκίνησης που πιθανόν έχουν προστεθεί σε αυτό, καθώς επίσης και οι συνθήκες συντήρησης του τροφίμου και η χημική του σύνθεση (Anagnostopoulos et al., 2019).

Παρόλο που τα προβιοτικά τρόφιμα με τη μεγαλύτερη απήχηση στο εμπόριο είναι τα γαλακτοκομικά, ζυμώσιμα προϊόντα, τον τελευταίο καιρό αναδύεται η ανάγκη για νέα, διαφορετικού τύπου τρόφιμα με προβιοτικές ιδιότητες (Argyri et al., 2016). Οι κύριες αιτίες είναι η κάλυψη της ομάδας των καταναλωτών που παρουσιάζουν δυσανεξία στη λακτόζη και δε μπορούν να καταναλώσουν γαλακτοκομικά προϊόντα, αλλά και γενικά οι αυξημένες διατροφικές απαιτήσεις για δίαιτες με χαμηλής χοληστερίνης τρόφιμα (Lavermicocca et al., 2005). Έτσι, τα φυτικά, ζυμώσιμα προϊόντα με προβιοτικές ιδιότητες μπορούν να καλύψουν αυτές τις ανάγκες, προσελκύοντας περισσότερους καταναλωτές (Lavermicocca et al., 2005).

Ένα πιθανό τρόφιμο που έχει τη δυνατότητα να αποκτήσει με συνέπεια προβιοτικό δυναμικό είναι και η επιτραπέζια ελιά (Heperkan, 2013). Η τελευταία αποτελεί μια εξαιρετική πηγή θρεπτικών που μπορούν να δράσουν ως πρεβιοτικά και να παρέχουν προστασία στα στελέχη προβιοτικών μικροοργανισμών (Lavermicocca et al., 2010). Επιπλέον, οι Nychas et al. (2002) ανέδειξαν τη δυνατότητα της επιτραπέζιας ελιάς να δράσει ως βιολογικός φορέας επιλεγμένων προβιοτικών στελεχών, χάρη στους μικροσκοπικούς πόρους που έχει στο δέρμα της

(στόματα) και που οι οποίοι δρουν ως πύλες εισόδου, ευνοώντας τον αποικισμό από ενδοφυτικά βακτήρια (Peres et al., 2017). Η δημιουργία προβιοτικών ελιών αναμένεται να αυξήσει αρκετά την ήδη μεγάλη θρεπτική αξία που έχει το τρόφιμο αυτό και να του επιφέρει ένα ευνοϊκό οικονομικό αντίκτυπο (Peres et al., 2012).

Οι σημαντικότεροι μικροοργανισμοί που αξιοποιούνται για τις προβιοτικές τους ιδιότητες ανήκουν στα γένη *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* (Rodríguez-Gómez et al., 2015). Αν και μέχρι σήμερα απαντώνται κυρίως σε γαλακτοκομικά προϊόντα, διάφορες έρευνες εξετάζουν την επιτραπέζια ελιά ως έναν διαφορετικό δυνητικό φορέα με προβιοτικό δυναμικό. Οι Lavermicocca et al., (2005) παρατήρησαν σημαντική επιβίωση του *Lb. paracasei* σε εθελοντές που συμμετείχαν στην έρευνα, ενός πιθανού προβιοτικού στελέχους, αρκετό καιρό μετά την κατανάλωση επιτραπέζιων ελιών στις οποίες είχε προστεθεί αυτό. Αξίζει ακόμα να σημειωθεί πως οι Devi et al., (2016) κατέγραψαν θετικά αποτελέσματα εξετάζοντας ορισμένες προβιοτικές ιδιότητες από στελέχη της φυλογενετικής ομάδας *Lactobacillus plantarum group*, μεταξύ άλλων και των *Lactobacillus pentosus* και *Lactobacillus plantarum*, τα οποία αποτελούν τα κυρίαρχα είδη στη ζύμωση της επιτραπέζιας ελιάς. Οι Argyri et al., (2014) σημείωσαν πως αυτά τα δύο είδη είναι πολλά υποσχόμενα όσον αφορά την παραγωγή ελιών με προβιοτικό δυναμικό, έπειτα από τη σημαντική τους επιβίωση που παρατηρήθηκε στα δείγματα της μελέτης.

Ο τρόπος με τον οποίο εξετάζονται οι μικροοργανισμοί προκειμένου να τους αποδοθεί ο προβιοτικός χαρακτηρισμός γίνεται με βάση προκαθορισμένα κριτήρια (Teneva-Angelova et al., 2018). Πρώτα από όλα, αναγκαίο είναι να θεωρούνται ασφαλή για τον άνθρωπο ή το ζώο (GRAS status) και να μην εγκυμονεί κάποιον κίνδυνο η κατανάλωσή τους (Argyri et al., 2016). Το κάθε στέλεχος θα πρέπει να προκαλεί προφανώς κάποιο θετικό για την υγεία αποτέλεσμα, αλλά επιπλέον χρειάζεται να βρίσκεται σε θέση να ασκήσει τη δράση του τη στιγμή βρίσκεται στο σώμα του καταναλωτή (Kumar et al., 2016). Τα προβιοτικά θα πρέπει να περάσουν από το πολύπλοκο περιβάλλον του γαστρεντερικού σωλήνα για να φτάσουν στη θέση στόχο που είναι το παχύ έντερο (Lavermicocca et al., 2010). Επομένως, καίρια είναι η αντοχή τους στα γαστρικά και χολικά υγρά, στις χαμηλές και υψηλές τιμές pH, στο οξυγόνο και τη ζέση (Teneva-Angelova et al., 2018). Γιαυτό και μια βασική

εξέταση που λαμβάνει χώρα σε πολλές in vitro μελέτες είναι η δυνατότητα της επιβίωσης των επιλεγμένων στελεχών σε περιβάλλοντα παρόμοια με αυτό του γαστρεντερικού σωλήνα (Teneva-Angelova et al., 2018). Ένα άλλο βασικό κριτήριο είναι η ικανότητα προσκόλλησης στους βλεννογόνους του εντέρου και η παρεμπόδιση της προσκόλλησης άλλων παθογόνων μικροοργανισμών (Teneva-Angelova et al., 2018). Οι Devi et al., (2016) παρατήρησαν θετικά αποτελέσματα όσον αφορά την ικανότητα προσκόλλησης στελεχών του *Lb. plantarum*, καθώς επίσης και την αντοχή τους σε προσομοιωμένα περιβάλλοντα γαστρικών, χολικών υγρών και οξέων.

Ίσως το πιο κρίσιμο σημείο για την απόδοση του προβιοτικού χαρακτηρισμού στο τρόφιμο της επιτραπέζιας ελιάς είναι η διατήρηση σε υψηλά επίπεδα των προβιοτικών βακτηρίων που θα προστεθούν σε αυτή, έτσι ώστε να διασφαλιστούν οι θετικές επιδράσεις στην υγεία του καταναλωτή, ενώ ταυτόχρονα να παραμένουν αναλλοίωτα τα επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος (Peres et al., 2012). Τη στιγμή της κατανάλωσης, οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί θα πρέπει να είναι ενεργοί και να φτάνουν σε αριθμό αποικιών τουλάχιστον κοντά στα 6,0-9,0 log CFU/g τροφίμου, έτσι ώστε να μπορέσουν να ασκήσουν τις ευεργετικές για την υγεία επιδράσεις τους (Zielińska et al., 2018). Στην περίπτωση που αυτές συνδέονται με τον εποικισμό της εντερικής μικροχλωρίδας, θα πρέπει το συγκεκριμένο τρόφιμο να καταναλώνετε καθημερινά για να διατηρηθούν οι θετικές επιδράσεις (Lavermicocca et al., 2010).

1.9 Ειδη συσκευασίας

Ο βέλτιστος τρόπος με τον οποίο θα πρέπει να συσκευάζονται οι επιτραπέζιες ελιές, αποτελεί ένα ζήτημα που απασχολεί σε μεγάλο βαθμό αυτούς που ασχολούνται με τη διανομή αυτού του προϊόντος. Το βασικό πλεονέκτημα που προσφέρει η συσκευασία της επιτραπέζιας ελιάς είναι να ενισχύσει την οικονομική αξία του προϊόντος και να διευρύνει την εξάπλωσή του στην αγορά (Degirmencioglu, 2016). Οι διαφορετικοί τρόποι συσκευασίας που αναδύονται συνεχώς, έρχονται να απαντήσουν στις νέες απαιτήσεις των καταναλωτών. Προτού όμως γίνει εφικτή η χρήση μιας καινούργιας συσκευασίας, θα πρέπει πρώτα να

προηγηθούν πολλοί έλεγχοι που θα εξετάζουν την καταλληλότητά της στο να διατηρεί ασφαλές και ποιοτικό το προϊόν. Παλιότερα, οι φυσικές μαύρες ελιές που παράγονταν στην Ελλάδα και προορίζονταν για εγχώρια διάθεση, διατίθενταν «χύμα» στις τοπικές αγορές (Doulgeraki et al., 2012). Με την πάροδο του χρόνου εμφανίστηκε η τάση της συσκευασίας τους σε γυάλινα βάζα, πλαστικούς περιέκτες και σε κονσέρβες (Doulgeraki et al., 2012). Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μια προτίμηση, ειδικά στη λιανική πώληση, σε συσκευασίες από πολυαιθυλένιο ή πολυστρωματικούς περιέκτες που περιέχουν άλμη ή έχουν συμπληρωθεί με μείγμα αερίων (Doulgeraki et al., 2012). Οι καταναλωτές πλέον τείνουν να προτιμούν συσκευασίες μικρότερου μεγέθους ώστε να καταλαμβάνουν λιγότερο χώρο, με τους μικρούς, πλαστικούς περιέκτες να πλεονεκτούν (Romero et al., 2019). Επίσης, προτιμούν να μπορούν να είναι εμφανείς οι ελιές εντός του περιέκτη και γιαυτό εξετάζεται η αντικατάσταση της άλμης κυρίως για τις μαύρες ελιές, η οποία είναι σκουρόχρωμη, ενώ ακόμα ένα άλλο μειονέκτημα της άλμης είναι πως θα πρέπει να απομακρυνθεί με το άνοιγμα του περιέκτη (Romero et al., 2019).

1.9.1 Τροποποιημένες ατμόσφαιρες και συσκευασία κενού

Η προτίμηση που δείχνουν οι βιομηχανίες τροφίμων τον τελευταίο καιρό στην τεχνολογία των συσκευασιών τροποποιημένης ατμόσφαιρας αυξάνεται συνεχώς ως απάντηση στις νέες απαιτήσεις των καταναλωτών (Opara et al., 2019). Με τον όρο συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας (modified atmosphere packaging ή MAP), αναφερόμαστε στην τεχνική σφραγίσματος του προϊόντος σε ένα σύστημα συσκευασίας με διαφορετική ατμοσφαιρική σύσταση από αυτή του αέρα, παρέχοντας έτσι γύρω από το προϊόν το βέλτιστο δυνατό μείγμα αερίων (Opara et al., 2019). Η ιδέα αυτή ξεκίνησε να εφαρμόζεται μέσα στη δεκαετία του '60 (Lencki, 2014) και απέκτησε ευρεία εφαρμογή σε μεγάλη ποικιλία προϊόντων ήδη από τα τέλη του 90 (Μαΐου 2019). Η τεχνολογία των συσκευασιών MAP χρησιμοποιείται σε μια μεγάλη ποικιλία τροφίμων όπως τα νωπά φρούτα, λαχανικά, μανιτάρια, προϊόντα κρέατος και ιχθυηρών (Opara et al., 2019).

Αποτελεί μια φυσική τεχνολογία συντήρησης των τροφίμων που έχει ως στόχο να παρατείνει τη διάρκεια ζωής τους (Oliveira et al., 2020). Συνοπτικά, ο

τρόπος με τον οποίο επιτυγχάνεται αυτή η παράταση είναι χάρη στην επιβράδυνση χημικών ή ενζυμικών αντιδράσεων οξείδωσης, καθώς επίσης και στη μείωση ή ακόμα και την πλήρη παρεμπόδιση της ανάπτυξης παθογόνων ή αλλοιογόνων μικροοργανισμών (Majou, 2019). Οι επιπτώσεις αυτές οφείλονται στη δράση ορισμένων αερίων που εισάγονται μηχανικά σε αυτές τις συσκευασίες και απαρτίζουν την τροποποιημένη τους ατμόσφαιρα, με τα κυριότερα αέρια που επιλέγονται να είναι το CO₂, το N₂ και το O₂ (Oliveira et al., 2020). Ο διαφορετικός συνδυασμός από τα παραπάνω αέρια που θα επιλεγεί σε κάθε περίπτωση αλλά και η αναλογία της συγκέντρωσής τους, καθορίζεται μεταξύ άλλων από τις ιδιότητες των αερίων, τον επιθυμητό στόχο για το προϊόν, τα συγκεκριμένα χαρακτηριστικά του προϊόντος και τις ιδιότητες του υλικού της συσκευασίας (Majou, 2019). Το σημαντικότερο από τα 3 για τις συσκευασίες MAP είναι το CO₂, χάρη στις μυκητοστατικές και βακτηριοστατικές ιδιότητες του στα διάφορα συστήματα τροφίμων, εμποδίζοντας έτσι την ανάπτυξη αλλοιογόνων και παθογόνων μικροοργανισμών (Orara et al., 2019).

Η τεχνολογία MAP έχει ως βασικό σκοπό να περιορίσει τις αρνητικές επιδράσεις που προκαλεί το O₂ πάνω σε ορισμένα τρόφιμα, όπως η επιτραπέζια ελιά (Romero et al., 2019). Γενικά, τόσο οι υψηλές όσο και οι χαμηλές συγκεντρώσεις O₂ συμβάλλουν σε μεγάλο βαθμό στον έλεγχο του μικροβιακού πληθυσμού, προφανώς με διαφορετικά αποτελέσματα (Oliveira et al., 2020). Χαμηλά επίπεδα O₂ έχουν τη δυνατότητα να παρεμποδίσουν την ανάπτυξη αερόβιων βακτηρίων και να προωθήσουν από την άλλη μεριά την ανάπτυξη των αναερόβιων (Oliveira et al., 2020). Αυτό είναι αρκετά επιθυμητό για το στάδιο όπου παραμένουν οι ελιές μέσα στη συσκευασία, καθώς έτσι όχι μόνο ευνοείται η διατήρηση και ανάπτυξη των αναερόβιων οξυγαλακτικών βακτηρίων, αλλά και εμποδίζεται αυτή των ζυμών που όπως έχει αναφερθεί έχει αρνητικά αποτελέσματα για το προϊόν. Τη θέση του οξυγόνου, σε όσες περιπτώσεις κρίνεται αναγκαία η απομάκρυνσή του, έρχεται να αντικαταστήσει το αδρανές αέριο N₂ (Oliveira et al., 2020).

Οι συσκευασίες τροποποιημένης ατμόσφαιρας πιθανόν αποτελούν τον καταλληλότερο τρόπο για την διανομή εκείνων των επιτραπέζιων ελιών, οι οποίες

θα περιέχουν ικανοποιητικά επίπεδα προβιοτικών οξυγαλακτικών βακτηρίων, όταν αυτό καταστεί εφικτό (Argyri et al., 2016). Οι σημαντικότεροι λόγοι είναι πως τέτοιες ελιές θα πρέπει να μην αποστειρώνονται και άρα η πώλησή τους χύμα στην αγορά θα είναι επικίνδυνη για την ασφάλεια και θα πρέπει να αποφευχθεί, ενώ ακόμα θα είναι έτσι εφικτή η διάθεσή τους σε ελκυστικές εύχρηστες συσκευασίες που θα προσφέρουν προστιθέμενη αξία στο προϊόν (Argyri et al., 2016).

Ένας άλλος τρόπος συσκευασίας που έχει χρησιμοποιηθεί σε μελέτες επιτραπέζιας ελιάς είναι η συσκευασία υπό κενό. Το προϊόν τοποθετείται σε πλαστικό περιέκτη που αποτελείται από υλικό με όσο το δυνατόν χαμηλότερη διαπερατότητα σε οξυγόνο και σφραγίζεται, αφού πρώτα απομακρυνθεί όλος ο αέρας από μέσα (Degirmencioglu, 2016). Η πλήρης απομάκρυνση του αέρα είναι πρακτικά αδύνατη και γι' αυτό συνήθως παραμένει το 0,3-3% μετά το σφράγισμα (Irtwange, 2006). Η σύσταση αυτής της ποσότητας είναι πιθανόν να μεταβληθεί στο χρόνο, εξαιτίας παραγόντων όπως ο μεταβολισμός του μικροβιακού πληθυσμού και του προϊόντος αλλά και λόγω τυχόν διαπερατότητας της συσκευασίας στον αέρα (Irtwange, 2006). Αν και η συσκευασία υπό κενό εμποδίζει την ανάπτυξη ζυμών και μυκήτων λόγω της απουσίας οξυγόνου που παρέχει, πιθανόν να είναι ακατάλληλη για τρόφιμα όπως φρούτα και λαχανικά, επειδή έχει παρατηρηθεί ότι σε μερικά από αυτά επιταχύνει την αλλοίωση ποιοτικών χαρακτηριστικών τους (Soylemez et al., 2001).

1.10 Μοριακές τεχνικές

1.10.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης – PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ή PCR (Polymerase Chain Reaction), αποτελεί μια απλή, χαμηλού κόστους τεχνική, η οποία χρησιμοποιείται σε διάφορους τομείς όπως για ιατρική και βιολογική έρευνα, για αναλύσεις σε νοσοκομεία, σε εγκληματολογικά εργαστήρια, καθώς επίσης και στις βιομηχανίες τροφίμων και ποτών (Klančnik et al., 2012). Μεταξύ των πολλών εφαρμογών για τις οποίες μπορεί να καταστεί χρήσιμη, είναι και η δυνατότητα ανίχνευσης και ταυτοποίησης μικροοργανισμών όπως τα βακτήρια (Klančnik et al., 2012). Για αυτό το λόγο η PCR αποτελεί ένα εργαλείο που επιλέγεται στις περισσότερες μελέτες

επιτραπέζιας ελιάς, στις οποίες είναι απαραίτητο να εξεταστεί η επιβίωση των επιλεγμένων καλλιεργειών εκκίνησης (Panagou et al., 2008, Zago et al., 2013, Argyri et al., 2014, Randazzo et al., 2014, Tufariello et al., 2015). Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης βασίζεται στην ικανότητα της τεχνικής να αναγνωρίζει μια συγκεκριμένη αλληλουχία DNA, και σε μικρό χρονικό διάστημα να συνθέτει ένα μεγάλο αριθμό “αντιγράφων” της (Jalali et al., 2017). Ουσιαστικά, η τεχνική αυτή είναι μια προσομοίωση της φυσιολογικής διεργασίας όπου πραγματοποιείται η αντιγραφή του κυτταρικού DNA, κάθε στιγμή που τα κύτταρα εισέρχονται στο στάδιο της μίτωσης (Nelson et al., 2014).

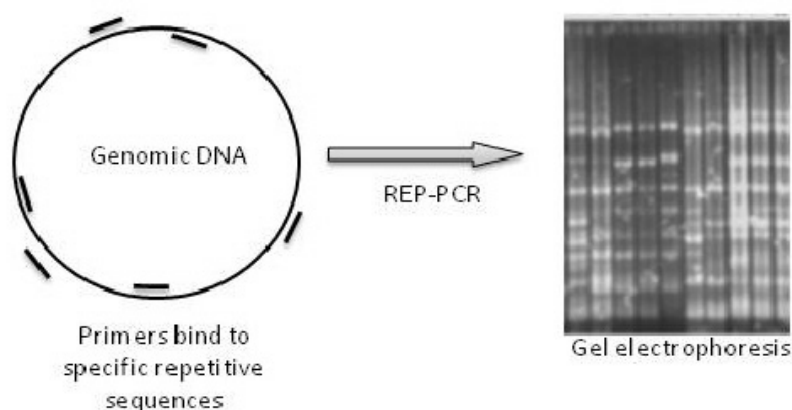
Συνοπτικά, ο τρόπος με τον οποίο λειτουργεί βασίζεται σε επαναλαμβανόμενα στάδια ή κύκλους θέρμανσης και ψύξης ενός μίγματος αντίδρασης που περιλαμβάνει την αλληλουχία στόχο (DNA template), μέχρι να παραχθεί μια μεγάλη ποσότητα πανομοιότυπων “αντιγράφων” της (Rosenberg 2017). Εκτός από την αλληλουχία στόχο, η αντίδραση της PCR περιλαμβάνει άλλα τρία κύρια συστατικά που είναι οι εκκινητές (primers), μια θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση (DNA polymerase) και τα 4 τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) (Canene-Adams, 2013). Οι πρώτοι αποτελούν μικρές αλυσίδες νουκλεοτιδίων, οι οποίες είναι ειδικά κατασκευασμένες ώστε να αναγνωρίζουν και να προσδένονται στο DNA-στόχο αφού αποδιαταχθεί η δομή της διπλής του έλικας, εξαιτίας της θέρμανσης (> 90°C) που εφαρμόζεται στην αρχή ενός κύκλου (Nelson et al., 2014). Με την πτώση της θερμοκρασίας που ακολουθεί (45-65 °C) γίνεται δυνατή η πρόσδεσή τους, και έτσι μπορούν να λειτουργήσουν ως σημείο εκκίνησης για την DNA πολυμεράση, η οποία προσθέτει τα διαθέσιμα δεοξυριβονουκλεοτίδια (σε θερμοκρασία 72 °C) δημιουργώντας μιάς νέα αλυσίδα, συμπληρωματική με το DNA-στόχο (Canene-Adams, 2013). Με την ολοκλήρωση ενός κύκλου διπλασιάζονται κάθε φορά τα παραγόμενα αντίγραφα, με συνέπεια να προκύπτει σύντομα μια πολύ μεγάλη ποσότητα σε μόλις μερικούς κύκλους (Rosenberg, 2017). Στο τέλος της διαδικασίας και προκειμένου να διαπιστωθεί πως παράχθηκε το επιθυμητό αποτέλεσμα, το προϊόν της αντίδρασης PCR αναλύεται με την τεχνική της ηλεκτροφόρησης (Canene-Adams, 2013). Συνήθως πάνω σε ένα πήκτωμα αγαρόζης, κατά την ηλεκτροφόρηση λαμβάνει χώρα ο διαχωρισμός των προϊόντων DNA με

βάση το μέγεθος και το φορτίο τους, ενώ στη συνέχεια ακολουθεί χρώση τους με βρωμιούχο αιθίδιο έτσι ώστε να είναι δυνατή η οπτική τους παρακολούθηση (Jalali et al., 2017).

1.10.2 Τεχνική rep – PCR

Η τεχνική της rep – PCR (Repetitive Element Palindromic – PCR) θεωρείται μια αξιόπιστη μέθοδος στα πεδία της ταξινόμησης, του προσδιορισμού μοριακών γονοτύπων, καθώς επίσης και για τον καθορισμό των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ συγγενών ειδών ή ακόμα και στελεχών (Tafvici et al., 2015). Τα τελευταία χρόνια έχει αναγνωριστεί η χρησιμότητά της στο διαχωρισμό μεταξύ βακτηρίων αλλά και ζυμών (Cissé et al., 2019).

Η ιδιαιτερότητα της μεθόδου βασίζεται σε κάποιες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες που βρίσκονται διάσπαρτες στο γονιδίωμα και οι οποίες αποτελούν το DNA-στόχο της τεχνικής (Zielinska et al., 2017). Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται πιο συχνά είναι οι REP, ERIC, BOX και (GTG)₅ (Κρίζονά et al., 2008), ενώ ακόμα υπάρχουν οι NGREP, DRREP και MBOREP (Cissé et al., 2019). Από αυτούς, οι (GTG)₅ και BOXAIR έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την αναγνώριση και τον χαρακτηρισμό βακτηρίων σε επίπεδο είδους από τα γένη *Bifidobacterium* και *Lactobacillus* (Κρίζονά et al., 2008). Η υβριδοποίηση τους με το DNA-στόχο λαμβάνει χώρα σε μη κωδικοποιήσιμες περιοχές και οι αλληλουχίες ανάμεσα τους πολλαπλασιάζονται με την τεχνική, δίνοντας μεγάλο αριθμό προϊόντων. Αυτά μετά την ηλεκτροφόρηση μπορούν να χρησιμοποιηθούν ώστε να καθοριστεί η γενετική συγγένεια μεταξύ των εξεταζόμενων στελεχών, μέσα από τη σύγκριση των διαφόρων μοτίβων ζωνών που προκύπτουν (Figueroa et al., 2015).



Εικόνα 5.
Σχηματική απεικόνιση της τεχνικής r rep – PCR.

Οι Gevers et al. (2001) κατέγραψαν τη δυνατότητα διάκρισης μεταξύ των στενά συγγενικών ειδών *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum* και *Lactobacillus paraplantarum*, χρησιμοποιώντας την τεχνική rep-PCR με τον εκκινητή (GTG)₅. Τόνισαν τη μεγάλη γενικά διακριτική ικανότητα της τεχνικής και σημείωσαν τις σημαντικές προοπτικές που έχει στην αναγνώριση γαλακτοβάκιλλων αλλά και άλλων οξυγαλακτικών βακτηρίων για τις βιομηχανίες ζυμούμενων τροφίμων. Διάκριση μεταξύ των *Lactobacillus pentosus* και *Lactobacillus plantarum* παρατήρησαν και οι Tofalo et al. (2014) με τον εκκινητή (GTG)₅. Η rep – PCR είναι μια τεχνική που μπορεί να χρησιμοποιηθεί εύκολα, έχει χαμηλό κόστος και μπορεί να δώσει τόσο γρήγορα, όσο και επαναλήψιμα αποτελέσματα (Tewari et al., 2019). Αν και μοιάζει με την RAPD-PCR, η διαφορά τους σε επίπεδο εκκινητών επιτρέπει στην πρώτη μια πιο ισχυρή διακριτική ικανότητα σε επίπεδο στελεχών για το γένος *Lactobacillus* (Singh et al., 2009).

1.10.3 Αλληλούχιση γονιδίου 16S rRNA

Η μέθοδος αλληλούχισης 16S- και 26S-rRNA αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για την αναγνώριση και το χαρακτηρισμό βακτηρίων και ζυμών (Cisse et al., 2019). Αυτό ισχύει και στην περίπτωση των βακτηρίων του γένους *Lactobacillus*, όπου το γονίδιο 16S rRNA είναι αρκετά χρήσιμο για τη φυλογενετική τους αναγνώριση και την ανάλυση του γένους (Kermanshahi et al., 2012). Εν συντομία, η διαδικασία της συγκεκριμένης αλληλούχισης DNA ξεκινάει με την ενίσχυση του δείγματος (DNA ή RNA) στην περιοχή του γονιδίου 16S rRNA, μέσω της τεχνικής PCR (Cocolin et al., 2007). Εξαιτίας ορισμένων τροποποιημένων δεοξυριβονουκλεοτιδίων που έχουν προστεθεί στην αντίδραση, η ενίσχυση του δείγματος σταματά σε διάφορα σημεία, καθώς αυτά εμποδίζουν την DNA πολυμεράση να συνεχίσει την επιμήκυνση όταν τοποθετηθούν από αυτή στο νέο αντίγραφο DNA (Rosenberg 2017). Έτσι, στο τέλος της PCR έχουν παραχθεί πολλά αντίγραφα με διαφορετικό μέγεθος, ανάλογα με το πότε τοποθετήθηκε κάποιο από τα τροποποιημένα δεοξυριβονουκλεοτίδια (Rosenberg, 2017). Τα τελευταία έχουν επιπλέον σημανθεί με φθορισμό, και όταν τα αντίγραφα διαχωρίζονται με την ηλεκτροφόρηση (τα μικρότερα σε μέγεθος αντίγραφα κινούνται ταχύτερα), ένα ειδικό λέιζερ τα

διεγείρει και στη συνέχεια μια κάμερα καταγράφει το φως που εκπέμπεται, το οποίο είναι διαφορετικό για κάθε μία από τις 4 βάσεις DNA (Cocolin et al., 2008).

Η συγκεκριμένη μέθοδος φέρει ορισμένους περιορισμούς, καθώς έχει παρατηρηθεί πως για παράδειγμα δε μπορεί να διακρίνει μεταξύ των στενά συγγενικών ειδών της φυλογενετικής ομάδας *Lb. plantarum group* (Corsetti et al., 2011). Αντίθετα, ο διαχωρισμός τους μπορεί να επιτευχθεί όπως αναφέρθηκε προηγουμένως μέσω της μοριακής τεχνικής rep – PCR (Corsetti et al., 2011). Μάλιστα, οι Tafvici et al., (2015) επισημαίνουν πως η συγκεκριμένη PCR μπορεί να θεωρηθεί ως συμπληρωματική μέθοδος της αλληλούχισης 16S rRNA.

2 ΣΚΟΠΟΣ

Ο στόχος της παρούσας μελέτης ήταν διττός και αφορούσε α) την εκτίμηση της επίδρασης της συσκευασίας στη μεταβολή των μικροβιολογικών και φυσικοχημικών παραμέτρων της επιτραπέζιας ελιάς και β) την αξιολόγηση της επιβίωσης των δύο στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων με προβιοτικό δυναμικό που ενοφθαλμίστηκαν στην αρχή της ζύμωσης κατά τη συντήρηση του τελικού προϊόντος σε διαφορετικές συνθήκες συσκευασίας. Όλα τα δείγματα ήταν φυσικές μαύρες επιτραπέζιες ελιές ποικιλίας «Κονσερβολιάς» και προέρχονται από την περιοχή της Λαμίας. Στο πλαίσιο αυτό πραγματοποιήθηκαν μικροβιολογικές και φυσικοχημικές αναλύσεις που περιλάμβαναν την απαρίθμηση της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (ΟΜΧ), των οξυγαλακτικών βακτηρίων, των ζυμών και των εντεροβακτηρίων, καθώς επίσης και τη μεταβολή του pH και της ογκομετρούμενης οξύτητας του ελαιοκάρπου. Επιπλέον, κατά τη διάρκεια της επτάμηνης συντήρησης μετρήθηκε η ποσοστιαία αναλογία των αερίων της τροποποιημένης ατμόσφαιρας (30% CO₂ και 70% N₂), ώστε να εξασφαλιστεί ότι διατηρείται σταθερή κατά τη διάρκεια της συντήρησης. Η επιβίωση των επιλεγμένων στελεχών (*Lactobacillus pentosus* B363 και *Lactobacillus plantarum* B380) και της κυρίαρχης μικροχλωρίδας ταυτοποιήθηκε με τη χρήση εξαρτώμενων από την καλλιέργεια (culture dependent) μοριακών τεχνικών στα δείγματα που είχαν ζυμωθεί με τα επιλεγμένα προβιοτικά στελέχη, στις δύο διαφορετικές αλατοπεριεκτικότητες (6% NaCl, 3% NaCl – 3% KCl) και στις τρεις συνθήκες συσκευασίας (αερόβια, υπό κενό, σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα).

3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Προετοιμασία – Προέλευση δειγμάτων

Σε προηγούμενη πτυχιακή μελέτη πραγματοποιήθηκε ζύμωση της φυσικής μαύρης ελιάς ποικιλίας «Κονσερβολιά» με εφαρμογή καλλιιεργειών εκκίνησης οξυγαλακτικών βακτηρίων με προβιοτικό δυναμικό με μερική υποκατάσταση του κοινού αλατιού.

Για τη μελέτη της επίδρασης της καλλιέργειας εκκίνησης των οξυγαλακτικών βακτηρίων στη φυσική ζύμωση της μαύρης ελιάς, σχεδιάστηκαν οι τρεις ακόλουθες περιπτώσεις:

- i. φυσική ζύμωση με την ενδογενή μικροχλωρίδα του καρπού,
- ii. ζύμωση με προσθήκη 100 mL καλλιέργειας εκκίνησης *Lactobacillus pentosus* B363 σε συγκέντρωση 9 log CFU/mL και
- iii. ζύμωση με προσθήκη 100 mL καλλιέργειας εκκίνησης *Lactobacillus plantarum* B380 σε συγκέντρωση 9 log CFU/mL.

Στη συνέχεια οι ελιές τοποθετήθηκαν σε δοχεία ζύμωσης χωρητικότητας 20 λίτρων, που περιείχαν 12,7 kg καρπού και περίπου 8 λίτρα άλμη, αλατοπεριεκτικότητας 6% σε NaCl. Αντίστοιχα, σε άλλα δοχεία τοποθετήθηκαν οι ελιές που ζυμώθηκαν με μερική υποκατάσταση του κοινού αλατιού (3% NaCl – 3% KCl). Οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας (20-25 °C) όπου και παρέμειναν για όλη τη διάρκεια της ζύμωσης (147 ημέρες).

Μετά το πέρας της ζύμωσης, πραγματοποιήθηκε διαλογή του ελαιοκάρπου, απομάκρυνση των ελαττωματικών και μετακίνηση σε κατάλληλες εγκαταστάσεις ώστε να συσκευαστούν κατάλληλα. Η συσκευασία πραγματοποιήθηκε στη μεταποιητική μονάδα επιτραπέζιας ελιάς «Γεωργούδης Α.Ε.» στη βιομηχανική περιοχή του Βόλου, στο νομό Μαγνησίας.



Εικόνα 6 – 7. Μηχάνημα τροφοδοσίας της ελιάς (αριστερά) και μηχάνημα τελικής συσκευασίας σε πολυστρωματικούς περιέκτες (δεξιά).

Για τη μελέτη της επιβίωσης των εναρκτήριων καλλιέργειών σε διαφορετικής σύστασης αλατοπεριεκτικότητες επιλέχθηκαν τρία είδη συσκευασιών:

- i. Πολυστρωματικός εύκαμπτος περιέκτης υπό αερόβιες συνθήκες
- ii. Πολυστρωματικός εύκαμπτος περιέκτης με χρήση τροποποιημένης ατμόσφαιρας (MAP) με αρχική σύσταση αερίου 30% CO₂ – 70% N₂
- iii. Πλαστικός εύκαμπτος περιέκτης υπό κενό (VACUUM)

Το πάχος του περιέκτη ήταν 102 μm και η περατότητά του στο οξυγόνο και τους υδρατμούς ήταν < 1,5 mL/m²/24 h και < 0,5 g/m²/24 h αντίστοιχα. Στο τέλος, όλες οι συσκευασίες μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο και συντηρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (20-25 °C) για χρονικό διάστημα 7 μηνών.

Τα δείγματα είχαν χρησιμοποιηθεί κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και σε προηγούμενες μελέτες πρωτού συσκευαστούν (πτυχιακή μελέτη Μαρία Καββαθά, Αθήνα 2019 και Γεωργία Καλόγρη, Αθήνα 2020)

Τα δείγματα με την εναρκτήρια καλλιέργεια *Lactobacillus pentosus* B363 συμβολίστηκαν ως "S1" κατά την κωδικοποίησή τους, αυτά με την εναρκτήρια καλλιέργεια *Lactobacillus plantarum* B380 ως "S2" και με την αυτόχθονη μικροχλωρίδα ως "C". Οι συνθήκες αλατότητας 6% NaCl και 3% NaCl – 3% KCl, κωδικοποιήθηκαν ως "6" και "3" αντίστοιχα. Τέλος, οι περιέκτες με τροποποιημένη

ατμόσφαιρα συμβολίστηκαν ως "MAP", οι περιέκτες υπό κενό ως "VP" και οι περιέκτες με αερόβιες συνθήκες ως "AIR". Σημειώνεται πως συγκεκριμένα για την κωδικοποίηση των δειγμάτων, οι συσκευασίες περιγράφονται με το γράμμα "M", "K" και "A" αντίστοιχα, στο τέλος κάθε κωδικού.

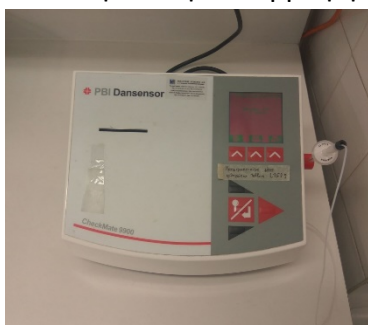
*S1= *L. pentosus* / *S2= *L. plantarum* / *S16= αλατοπεριεκτικότητα 6% NaCl / *S13= αλατοπεριεκτικότητας 3% NaCl – 3% KCl / *M= MAP (modified atmosphere packaging) / *K= Κενό ή Vacuum / *A= Air

Εικόνα 8. Ελιές συσκευασμένες σε αερόβιες συνθήκες και συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (λευκή συσκευασία), καθώς επίσης και σε συσκευασία κενού (διαφανής συσκευασία).



3.2 Προσδιορισμός αέριας σύστασης εντός των περιεκτών

Πριν από τη διεξαγωγή των μικροβιολογικών αναλύσεων, πραγματοποιήθηκε καταγραφή της σύστασης του αέρα που περιέχεται στις συσκευασίες τροποποιημένης ατμόσφαιρας. Η μέτρηση της συγκέντρωσης (%) των αερίων O₂ και CO₂ της τροποποιημένης ατμόσφαιρας πραγματοποιήθηκαν με αναλυτή αερίων Gas meter (CheckMate 9900). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με διάτρηση της συσκευασίας με την ειδική βελόνα δειγματοληψίας που διαθέτει η συσκευή και την απορρόφηση αερίου δείγματος.



Εικόνα 9. Όργανο ανάλυσης αερίων Gas meter (CheckMate 9900).

3.3 Μικροβιολογικές αναλύσεις

Σε κάθε δειγματοληψία, 2 περιέκτες (βιολογική επανάληψη) κάθε δείγματος (διαφορετικής εναρκτήριας καλλιέργειας, τύπου συσκευασίας και σύστασης αλατιού) αναλύθηκαν. Η συχνότητα δειγματοληψίας ήταν 30 ημέρες για 6 μήνες. Η μικροβιολογική ανάλυση των δειγμάτων έγινε με τη μέθοδο των διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων. Από κάθε δείγμα ζυγίστηκαν ασηπτικά 10 g εκπυρηνωμένου καρπού τα οποία μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένη σακούλα Stomacher που περιείχε 90 mL αποστειρωμένου διαλύματος $\frac{1}{4}$ strength Ringer's solution. Ακολούθησε ομογενοποίηση του δείγματος σε συσκευή Stomacher (LabBlender 400, Seward Medical, London, UK) για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, το ομογενοποιημένο δείγμα αραιώθηκε δεκαδικά και διαδοχικά σε σωληνάκια που περιείχαν 9 mL αραιωτικού διαλύματος Ringer. Τέλος, οι κατάλληλες κατά περίπτωση δεκαδικές αραιώσεις χρησιμοποιήθηκαν για τον ενοφθαλμισμό τρυβλίων, για κάθε χρησιμοποιούμενο μικροβιολογικό υπόστρωμα.

Οι μικροοργανισμοί προς ανίχνευση και απαρίθμηση ήταν: η ολική μεσόφιλη χλωρίδα (OMX), τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB), οι ζύμες και τα εντεροβακτήρια.

Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (OMX): Χρησιμοποιήθηκε το μη επιλεκτικό υπόστρωμα PCA agar (Plate Count Agar), το οποίο επιτρέπει την ανάπτυξη μεγάλου αριθμού μικροοργανισμών και η επιλογή του έγινε για τον εντοπισμό της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας των δειγμάτων. Τα τρυβλία μετά τον ενοφθαλμισμό επώαστηκαν σε θερμοκρασία 30°C για 3 ημέρες.

Οξυγαλακτικά βακτήρια: Χρησιμοποιήθηκε το επιλεκτικό υπόστρωμα MRS agar (de Man, Rogosa και Sharp's), το οποίο επιτρέπει την ανάπτυξη και την απαρίθμηση κυρίως των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Σε αυτό προστέθηκε κυκλοεξαμίδιο 0.05% w/w ως αντιβιοτικό για να εμποδίσει την ανάπτυξη ζυμών. Τα τρυβλία μετά τον ενοφθαλμισμό επώαστηκαν σε θερμοκρασία 30°C για 3 ημέρες.

Εντεροβακτήρια: Χρησιμοποιήθηκε το επιλεκτικό υπόστρωμα VRBGA agar (Violet Red Bile Glucose Agar), το οποίο επιτρέπει την ανάπτυξη και την απαρίθμηση των

εντεροβακτηρίων. Τα τρυβλία μετά τον ενοφθαλμισμό επώαστηκαν σε θερμοκρασία 37°C για 24 ώρες.

Ζύμες: Χρησιμοποιήθηκε το επιλεκτικό υπόστρωμα RBC agar (Rose Bengal Chloramphenicol Agar Base), με προσθήκη Chloramphenicol (X009, LAB M, UK) ως αντιβιοτικό. Το υπόστρωμα αυτό επιτρέπει την ανάπτυξη και τον εντοπισμό ζυμών. Τα τρυβλία μετά τον ενοφθαλμισμό επώαστηκαν σε θερμοκρασία 25°C για 3 ημέρες.

Τέλος, τα τρυβλία μετά από τον ενοφθαλμισμό τοποθετούνταν σε επωαστικούς θαλάμους κατάλληλης θερμοκρασίας, ανάλογα με το υπόστρωμα. Κατά την καταμέτρηση των αποικιών στο τέλος της επώασης, επιλέγονταν τρυβλία που είχαν περίπου 30 με 300 αποικίες και τα τελικά αποτελέσματα για κάθε περίπτωση εκφράστηκαν ως log CFU/g ελιάς με τη χρήση του ακόλουθου τύπου:

$$\log\text{CFU/gr} = \frac{c1 + c2}{n1 + n2/10} * \frac{1}{V} * \frac{1}{d}$$

Όπου,

- CFU ή colony forming unit είναι μια μονάδα μικροοργανισμού που μπορεί να σχηματίσει μια αποικία
- c1 και c2 είναι ο αριθμός των αποικιών από δύο διαδοχικές αραιώσεις του καταμετρούμενου μικροοργανισμού (πρέπει $30 \leq c1, c2 \leq 300$)
- n1 και n2 είναι ο αριθμός των τρυβλίων που καταμετρήθηκαν από μια αραιώση με το n2 να αντιστοιχεί στη μεγαλύτερη
- V είναι η ποσότητα του ομογενοποιημένου δείγματος που ενοφθαλμίστηκε σε mL
- d είναι ο αριθμός της μικρότερης αραιώσης

3.4 Φυσικοχημικές αναλύσεις

3.4.1 Προσδιορισμός pH

Η καταμέτρηση της τιμής του pH προσδιορίστηκε με τη χρήση ψηφιακού πεχαμέτρου Russell (USA) με απευθείας εμβάπτιση του ηλεκτροδίου του οργάνου

στην πρώτη δεκαδική αραίωση (-1) του ομογενοποιημένου δείγματος καρπού/διαλύματος Ringer μετά το πέρας της μικροβιολογικής ανάλυσης.

3.4.2 Προσδιορισμός ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας

Για τον προσδιορισμό της ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας στον καρπό της ελιάς, προηγήθηκε η παρασκευή διηθήματος. Σε ογκομετρική φιάλη ζυγίστηκαν 10 g καρπού και προστέθηκαν 190 mL νερό το οποίο είχε προηγουμένως βραστεί και ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από 5 λεπτά ακολουθήθηκε έντονη ανάδευση του μίγματος και διήθηση για την παραλαβή του διηθήματος. Ο προσδιορισμός της ογκομετρούμενης οξύτητας έγινε με τιτλοδότηση 20 mL διηθήματος με πρότυπο διάλυμα 0,1 NaOH με χρήση 2 – 3 σταγόνες του δείκτη φαινολοφθαλεΐνη 1% (w/v). Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν. Η αλλαγή του χρώματος ήταν εμφανής σε ερυθροϊώδη αποχρώσεις. Στη συνέχεια πραγματοποιούταν καταγραφή της κατανάλωσης του πρότυπου διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε κάθε φορά μέχρι το τελικό σημείο. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε g γαλακτικού οξέος/100 g καρπού με τη χρήση του ακόλουθου τύπου:

$$\frac{V * N * G}{1000} * 100$$

*V=κατανάλωση (μέσος όρος) σε mL

N=0,1

G=90

3.5 Στατιστική ανάλυση με τη μέθοδο Παλινδρόμησης Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (Partial Least Square Regression, PLS-R)

Τα αριθμητικά δεδομένα που συλλέχθηκαν τόσο από τη μικροβιολογική, όσο και από τη φυσικοχημική ανάλυση των δειγμάτων, επεξεργάστηκαν με τη μέθοδο της Παλινδρόμησης Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την πολυπαραγοντική προβολή των εκάστοτε δεδομένων, με στόχο να δημιουργηθεί μια σχέση μεταξύ ανεξάρτητων μεταβλητών (X) και εξαρτημένων μεταβλητών (Y) (Wold, 2001). Οι X και Y μεταβλητές προβάλλονται ταυτόχρονα, έτσι ώστε να

βρεθούν οι λανθάνουσες συνιστώσες των Χ μεταβλητών που θα προβλέπουν καλύτερα αυτές των Υ, ενώ ακόμα η μέθοδος μεγιστοποιεί τη διακύμανση μεταξύ τους (Berrueta, 2007). Στη συγκεκριμένη περίπτωση, ως ανεξάρτητες μεταβλητές χρησιμοποιήθηκαν τα αριθμητικά αποτελέσματα για τις αποικίες των οξυγαλακτικών βακτηρίων και της ΟΜΧ, καθώς επίσης και για τις τιμές του pH και τις ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας. Ως μοναδική εξαρτημένη μεταβλητή χρησιμοποιήθηκε ο χρόνος συντήρησης.

3.6 Ταυτοποίηση οξυγαλακτικών βακτηρίων

3.6.1 Απομόνωση αποικιών οξυγαλακτικών βακτηρίων

Από τα τρυβλία ενσωμάτωσης με το θρεπτικό MRS, στα οποία αναπτύχθηκαν οξυγαλακτικά βακτήρια κατά τη δειγματοληψία των ελιών, επιλέχθηκαν αυτά με αριθμό αποικιών 20 – 200. Υπό ασηπτικές συνθήκες, απομονώθηκε από κάθε τρυβλίο περίπου το 20% όλων των αποικιών, με στόχο την επιλογή αντιπροσωπευτικών αποικιών, σύμφωνα με τη μορφολογία που παρατηρούνταν. Ο καθαρισμός πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της γραμμωτής εξάπλωσης (streaking), όπου κάθε αποικία μεταφερόταν σε νέο, ξεχωριστό τρυβλίο MRS. Ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία 30°C για 48 ώρες. Η ίδια διαδικασία (δεύτερο streaking) πραγματοποιήθηκε εις διπλούν, για τον καλύτερο καθαρισμό των αποικιών. Η καθαρότητα των αποικιών ελέγχθηκε με μικροσκοπική παρατήρηση και χρώση Gram και πραγματοποιήθηκε και δοκιμή της καταλάσης για την εξασφάλιση απουσίας ζυμών. Κατόπιν, επαρκής βιομάζα μεμονωμένων και καθαρών αποικιών, 240 στο σύνολο, μεταφέρθηκε ασηπτικά σε vials με υγρό θρεπτικό υλικό MRS broth, στο οποίο είχε προστεθεί 20% (v/v) γλυκερόλη. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε συντήρηση τους στους -80°C, ολοκληρώνοντας έτσι το στάδιο δημιουργίας του stock.



Εικόνα 10. Πρώτο streaking με ανεπτυγμένες αποικίες οξυγαλακτικών βακτηρίων έπειτα από την επώαση των 2 ημερών.

3.6.2 Ανανέωση καλλιιεργειών

Για τη μετέπειτα εξαγωγή του γενομικού DNA από τις παραπάνω 240 αποικίες, είναι απαραίτητος ο εμπλουτισμός των καλλιιεργειών. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ανανέωση 100 μL της καθαρής αποικίας με εμβολιασμό σε 5 mL υγρού θρεπτικού υποστρώματος MRS broth από τα φιαλίδια με τις καθαρές απομονώσεις που συντηρούνται σε θερμοκρασία -80°C (MRS Broth, γλυκερόλη 20% v/v). Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε υπό ασηπτικές συνθήκες, αφού πρώτα προηγήθηκε σύντομη ανάδευση των δειγμάτων σε μηχανήμα vortex. Οι καλλιέργειες επώαστηκαν σε θερμοκρασία 30°C για 18 – 24 ώρες (μέχρι την εμφάνιση θολώματος). Με αυτή τη διαδικασία αναπτύσσονται τα οξυγαλακτικά βακτήρια, καθιστώντας έτσι διαθέσιμο ένα μεγάλο αριθμό κυττάρων τους για συλλογή. Μετά το πέρας 23 ωρών, έγινε δεύτερη ανανέωση ακολουθώντας την ίδια διαδικασία. Τέλος, προκειμένου να απομονωθεί ποσότητα κυττάρων καθαρών από το υγρό θρεπτικό υλικό, έλαβε χώρα το στάδιο του καθαρισμού. Αφού αναπτύχθηκαν τα οξυγαλακτικά βακτήρια της δεύτερης ανανέωσης, μεταφέρθηκε ασηπτικά ποσότητα 1,5 mL σε φιαλίδια τύπου erpendorf, όγκου 1,5 mL και στη συνέχεια έγινε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά σε 5000 g. Ακολούθησε απομάκρυνση του υπερκείμενου και οι αποικίες ξεπλύθηκαν με 1 mL διαλύματος ringier. Επαναλήφθηκε η φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες, απομακρύνθηκε στη συνέχεια ξανά το υπερκείμενο και τα καθαρά πλέον κύτταρα συντηρήθηκαν υπό μορφή pellet σε θερμοκρασία -20°C μέχρι την απομόνωση του DNA.



Εικόνα 11. Όργανο φυγοκέντρησης (Heraeus Multifuge 1S Centrifuge).

3.6.3 Απομόνωση – Εκχύλιση γενομικού DNA

Η διαδικασία κατά την οποία έγινε η εξαγωγή του DNA από τα κύτταρα των δειγμάτων, περιλαμβάνει μια σειρά από βήματα που βασίζονται στο παρακάτω πρωτόκολλο (Doulgeraki et al., 2011):

- 1) Επαναδιάλυση της βιομάζας (που συντηρούταν σε θερμοκρασία -20°C) σε 0,5 mL ρυθμιστικού διαλύματος 1M σορβιτόλης, 0.1M EDTA και λυσοζύμης σε συγκέντρωση 25mg/mL (pH=7,5).
- 2) Επώαση για 2h σε θερμοκρασία 37 °C (υπό διαρκή ανάδευση). Μετά το πέρας της επώασης πραγματοποιήθηκε έντονη ανάδευση για 30 sec.
- 3) Φυγοκέντρηση για 10 min σε 17000 g σε θερμοκρασία 4 °C και απομάκρυνση του υπερκειμένου υγρού.
- 4) Επαναδιάλυση σε 0,5 mL ρυθμιστικού διαλύματος που αποτελείται από 50 mM Tris και 20 mM EDTA (pH=7,4).
- 5) Προσθήκη 50 µL 10% SDS και επώαση σε θερμοκρασία 65 °C για 30 min.
- 6) Προσθήκη 0,2 mL οξικού καλίου και παραμονή στον πάγο για 30 min.
- 7) Φυγοκέντρηση για 10 min σε 17000 g σε θερμοκρασία 4 °C.
- 8) Προσθήκη του υπερκειμένου σε καθαρό μικροφιαλίδιο erpendorf και επανάληψη της φυγοκέντρησης στις ίδιες συνθήκες.
- 9) Μεταφορά του υπερκειμένου σε καθαρό μικροφιαλίδιο erpendorf, προσθήκη 0,7 mL ισοπροπανόλης (-20 °C) και παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min.
- 10) Φυγοκέντρηση για 10 min σε 17000 g σε θερμοκρασία 4 °C και απόρριψη του υπερκειμένου.
- 11) Προσθήκη 0,5 mL αιθανόλης 70% (-20 °C), επανάληψη της φυγοκέντρησης και απόρριψη του υπερκειμένου (το βήμα αυτό πραγματοποιείται δύο φορές).
- 12) Αναμονή έως ότου εξατμιστεί πλήρως η αιθανόλη.

3.6.4 Φωτομέτρηση-αραίωση DNA

Αφού εξατμιστεί η αιθανόλη από τα erpendorf, επαναδιαλύεται η απομονωμένη ποσότητα DNA σε 50 µL διπλά αποστειρωμένου υπερκάθαρου νερού

(dd H₂O). Στη συνέχεια, ελέγχεται η ποιότητα και η συγκέντρωση του DNA με το φωτόμετρο, με την προσθήκη 3 μL του διαλύματος σε αυτό. Η συγκέντρωση των νουκλεϊκών οξέων καταμετρείται στα 260 nm και εκφράζεται από το όργανο σε ng/μl. Επίσης, αποτυπώνεται η απορρόφηση στα 280 και 230 nm, καθώς επίσης και οι λόγοι καθαρότητας 260/280 και 280/230. Οι τελευταίοι αποτελούν δείκτες καθαρότητας του DNA. Τα αποτελέσματα της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του δείγματος παρουσιάζονται ως ο λόγος 260/280 nm, με ικανοποιητικές τιμές μεταξύ 1,8 και 2. Οι τιμές του λόγου 260/280 < 1,8 είναι ενδεικτικές της ύπαρξης προσμίξεων, συνήθως πρωτεϊνών ή φαινόλης που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διαδικασία της απομόνωσης. Ως ένα δευτερεύον μέτρο της καθαρότητας των νουκλεϊκών οξέων χρησιμοποιείται ο λόγος 260/230. Οι τιμές του λόγου 260/230 > 2 υποδηλώνουν δείγματα καθαρών νουκλεϊκών οξέων, παράγοντες όμως, όπως πρωτεΐνες, άλατα, ουρία, φαινόλη και υδατάνθρακες, απορροφούν στα 230 nm μειώνοντας το λόγο αυτό. Η επιθυμητή συγκέντρωση του DNA για την λειτουργία της rep-PCR που ακολουθήθηκε στη παρούσα εργασία είναι 50-100 ng/μl. Σε κάθε λοιπόν περίπτωση που ήταν απαραίτητο, έγινε αραιώση του δείγματος σε νέο φιαλίδιο erppendorf (1,5 mL όγκου) με κατάλληλη ποσότητα dd H₂O.

3.6.5 Ομαδοποίηση γενετικών αποτυπωμάτων των οξυγαλακτικών βακτηρίων με rep-PCR

Για να γίνει εφικτή η ομαδοποίηση των δειγμάτων σε επίπεδο στελέχους και ο έλεγχος της επιβίωσης των εναρκτήριων καλλιεργειών, έλαβε χώρα η μέθοδος της rep-PCR (repetitive element palindromic – PCR). Ο εκκινητής GTG₅ ήταν αυτός που επιλέχθηκε για να στοχεύσει σε συγκεκριμένες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες από το γονιδίωμα των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Η αλληλουχία του εκκινητή απεικονίζεται παρακάτω :

GTG₅ : 5'- GTGGTGGTGGTG GTG - 3'

Τα τμήματα του DNA που θα απομονωθούν και θα ενισχυθούν με την PCR, μπορούν στη συνέχεια να διαχωριστούν μέσω της ηλεκτροφόρησης και να μας δώσουν το γενετικό αποτύπωμα του κάθε βακτηρίου. Οι συνθήκες τις αντίδρασης κατά την οποία έγινε η ενίσχυση των τμημάτων DNA σε θερμικό κυκλοποιητή

ProFlex PCR System (Applied Biosystems), πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με (Mohammed et al., 2009), με διαφορά τον εκκινητή που επιλέχθηκε και με μια μικρή τροποποίηση στους θερμικούς κύκλους ως εξής:

- 95°C για 2 min
- 30 κύκλοι
 - 94°C για 30 min
 - 40°C για 1 min
 - 72°C για 4 min
- 65°C για 8 min

Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα:

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά αντίδραση (μL)
Buffer solution*	10
Primer GTG ₅	0,8
H ₂ O	8,2
DNA template	1-2
Τελικός όγκος	20

Πίνακας 1. Ποσότητες αντιδραστηρίων που εφαρμόστηκαν στην τεχνική της *rep* – PCR

* OneTaq-quick load 2x Mastermix with standard buffer (New England Biolands, UK). Αποτελεί έτοιμο mastermix και η ακριβής του σύσταση δεν δίνεται από την εταιρία.

3.6.6 Ηλεκτροφόρηση DNA

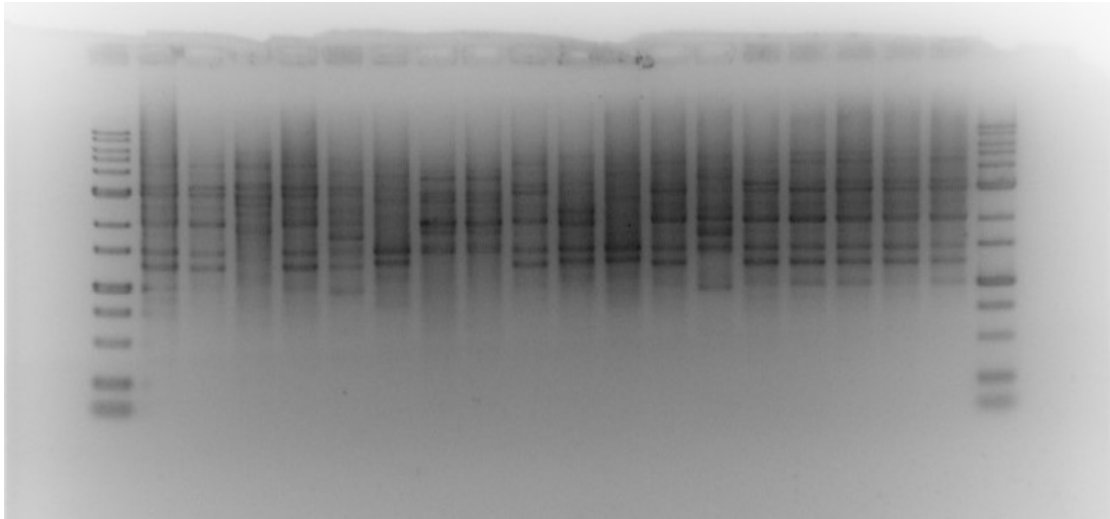
3.6.6.1 Μέθοδος Ηλεκτροφόρησης

Μετά το πέρας της PCR, αναλύθηκαν τα ενισχυμένα τμήματα DNA μέσω της ηλεκτροφόρησης. Για την παρασκευή της πηκτής αγαρόζης, ζυγίζονταν η ποσότητα αγαρόζης και μεταφερόταν σε διάλυμα TAE 1X (Tris-acetate-EDTA) (40mM Tris-acetate, 1mM EDTA, pH 8,2), έτσι ώστε να έχει τελική συγκέντρωση 1.3% (w/v). Το διάλυμα ομογενοποιήθηκε υπό θέρμανση και μεταφέρεται στην πλάκα

ηλεκτροφόρησης προς το σχηματισμό πηκτής για 20 min. Πριν την έναρξη της ηλεκτροφόρησης, προστέθηκε διάλυμα TAE 1X μέχρι να καλύψει πλήρως την πηκτή αгарόζης και κατόπιν, μεταφέρθηκε εκεί ποσότητα 8 μl από κάθε δείγμα. Σε κάθε σειρά, στην πρώτη και τελευταία θέση προστέθηκε ποσότητα 3.5 μl από 1kb DNA Ladder (Cleaver Scientific Ltd., UK). Στη συνέχεια, εφαρμόστηκε κατάλληλο δυναμικό (120 V) για 70 min. Τέλος, αφού ολοκληρώθηκε η ηλεκτροφόρηση, η πηκτή αгарόζης τοποθετήθηκε σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου 4% v/v για 15 min και μεταφέρθηκε σε ειδικό UV θάλαμο για φωτογράφιση.

3.6.6.2 Απεικόνιση ζωνών DNA

Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης οπτικοποιούνται με τη βοήθεια συσκευής που εκπέμπει υπεριώδη ακτινοβολία (UV Transilluminator) ώστε να είναι ορατές με ευκρίνεια οι ζώνες που έχουν δημιουργηθεί, από τις ακολουθίες DNA που έχουν ενισχυθεί. Για κάθε πηκτή αгарόζης αφέθηκε για 10 min. σε διάλυμα με τη φθορίζουσα χρωστική του βρωμιούχου αιθιδίου. Η συσκευή εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας συνδέεται με ειδική ψηφιακή φωτογραφική μηχανή και έτσι οι πηκτές αгарόζης φωτογραφίζονται άμεσα. Το σύστημα συνδέεται με ηλεκτρονικό υπολογιστή και με τη βοήθεια ενός ειδικού λογισμικού προγράμματος (Doc-IT 2.4.0.2., Syngene, Cambridge, UK), γίνεται επεξεργασία και αποθήκευση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης. Στόχος είναι η ομαδοποίηση των δειγμάτων σε επίπεδο στελεχών με τη χρήση του αλγορίθμου U.P.G.M.A. του προγράμματος BioNumerics (Applied Maths, Keijkstraat, Belgium).



Εικόνα 12. Ζώνες DNA σε πηκτή αγαρόζης μετά από χρώση σε βρομιούχο αιθίδιο και έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία.

3.6.7 Επεξεργασία φωτογραφιών DNA και ομαδοποίηση στελεχών μέσω του προγράμματος BioNumerics

Η μετατροπή, η κανονικοποίηση και η περαιτέρω ανάλυση πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τον συντελεστή Dice και η ανάλυση συμπλέγματος UPGMA με το λογισμικό πακέτο BioNumerics, έκδοση 6.1 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). Ο αλγόριθμος UPGMA κατασκευάζει ένα φυλογενετικό δέντρο που ομαδοποιεί όλα τα στελέχη που εξετάστηκαν στην εργασία, βάσει του συντελεστή ομοιότητας Dice. Κατά αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η ομαδοποίηση των στελεχών προς εξαγωγή συμπερασμάτων.

3.6.8 Αλληλούχηση γονιδίου 16s rRNA για ταυτοποίηση στελεχών

3.6.8.1 16S PCR- ηλεκτροφόρηση

Από το φυλογενετικό δέντρο που κατασκευάστηκε, επιλέχθηκαν αντιπροσωπευτικά δείγματα από κάθε ξεχωριστή του ομάδα με επίπεδο ομοιότητας τουλάχιστον 80%, προκειμένου να ταυτοποιηθούν σε επίπεδο είδους. Για να επιτευχθεί αυτό επιλέχθηκε η ενίσχυση των περιοχών V1 – V3 του γονιδίου 16S rRNA. Χάρη στο μέγεθος αλλά και την ποικιλότητα που εμφανίζει η περιοχή V3, αποτελεί μια από τις καλύτερες επιλογές κατά την αναγνώριση βακτηρίων (Tofalo, 2014). Σημειώνεται πως χρησιμοποιήθηκε ποσότητα DNA ως μήτρα και όχι RNA. Παρακάτω παρατίθενται οι συνθήκες που έλαβαν χώρα κατά την 16S-rRNA PCR:

- 94°C για 2 min
- 30 κύκλοι
 - 94°C για 30 sec
 - 56°C για 30 sec
 - 72°C για 90 sec
- 72°C για 15 min

Τα αντιδραστήρια και οι ποσότητές τους, όσο και οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση φαίνονται στους παρακάτω πίνακες:

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά αντίδραση (μl)
10X buffer solution B	5
primer P ₁ V ₁	1
primer P ₄ V ₃	1
dNTP's	1
TAQ	0,2
dd H ₂ O	39,8
DNA template	2-3
Τελικός όγκος	50

Πίνακας 2. Ποσότητες αντιδραστηρίων για τη 16S-PCR.

P ₁ V ₁	5'- GCGGCGTGCCTAATACATGC - 3'
P ₄ V ₃	5'- GCGGCGTGCCTAATACATGC - 3'

Πίνακας 3. Αλληλουχία εκκινητών P₁V₁ και P₄V₃ για τη 16S-PCR.

Στη συνέχεια ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.5.6.1 που εφαρμόστηκε για τα προϊόντα της rep-PCR, προκειμένου να διαπιστωθεί η επιτυχία της αντίδρασης.

3.6.8.2 Καθαρισμός προϊόντων της 16S PCR

Τα δείγματα έπειτα καθαρίστηκαν από τα υπόλοιπα αντιδραστήρια της PCR, έτσι ώστε να μείνει μόνο το DNA, με το kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up της Macherey-Nagel (Duren, Germany). Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε, περιγράφεται αναλυτικά στο εγχειρίδιο χρήσης της εταιρίας «PCR clean-up Gel extraction» και πιο συγκεκριμένα εντοπίζεται στις σελίδες 17 και 18 (https://www.takarabio.com/assets/documents/User%20Manual/NucleoSpin%20Gel%20and%20PCR%20Clean-up%20User%20Manual_Rev_04.pdf). Τα δείγματα αφού πέρασαν το στάδιο του καθαρισμού, φωτομετρήθηκαν για να διαπιστωθεί η συγκέντρωσή τους και αραιώθηκαν έτσι ώστε να έχουν περίπου 5 ng/μL. Τελικό στάδιο για τη μοριακή ταυτοποίηση των στελεχών είναι η αλληλούχιση, διαδικασία κατά την οποία προσδιορίζεται η πρωτοταγής δομή ενός μορίου, πιο συγκεκριμένα η σειρά των νουκλεοτιδίων της αλληλουχίας στόχου των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Το DNA που λήφθηκε στάλθηκε στην εταιρία Cemia (<http://chemia.eu/>) προς αλληλούχιση. Οι αλληλουχίσεις έγιναν και προς τις δύο κατευθύνσεις, χρησιμοποιώντας τον ανοδικό και τον καθοδικό εκκινητή.

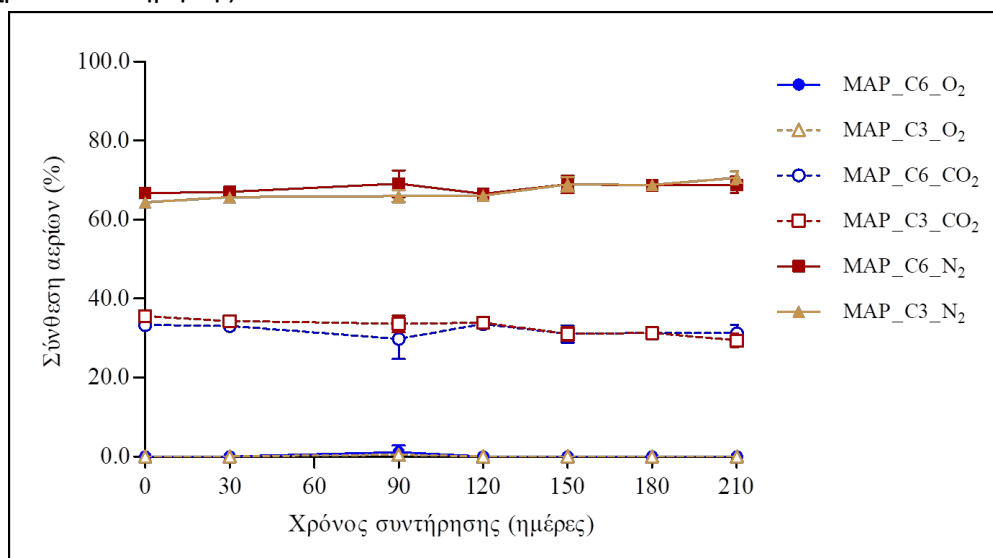
3.6.8.3 Ταυτοποίηση των δειγμάτων

Αφού έγιναν γνωστές οι αλληλουχίες των στελεχών, προσδιορίστηκε η γενετική τους ταυτότητα σε επίπεδο μέχρι και είδους με χρήση της μηχανής αναζήτησης BLAST (Basic Local Alignment Tool) του NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Η ταυτοποίηση των στελεχών μέσω του προγράμματος BLAST, επιτυγχάνεται βάση της ομοιότητάς τους με ταυτοποιημένα στελέχη, που είναι ήδη καταχωρημένα στη βάση δεδομένων. Με βάση αυτή γίνεται η σύγκριση των αλληλουχιών από τα άγνωστα δείγματά της παρούσας εργασίας, τα οποία μπορούν έτσι να ταξινομηθούν ανάλογα με την ομοιότητα ή την τιμή εύρους απόκλισης (e-value), η οποία αποτελεί το μέτρο ταξινόμησης, και στατιστικά σημαντικές ευθυγραμμίσεις θα πρέπει να είναι κοντά στο μηδέν (Newberg, 2008).

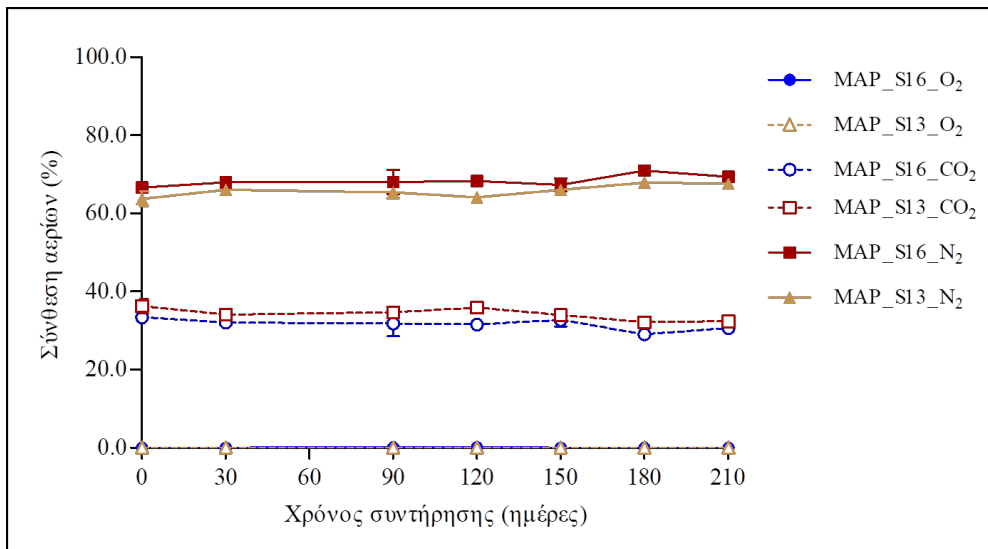
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Ανάλυση σύστασης ατμόσφαιρας

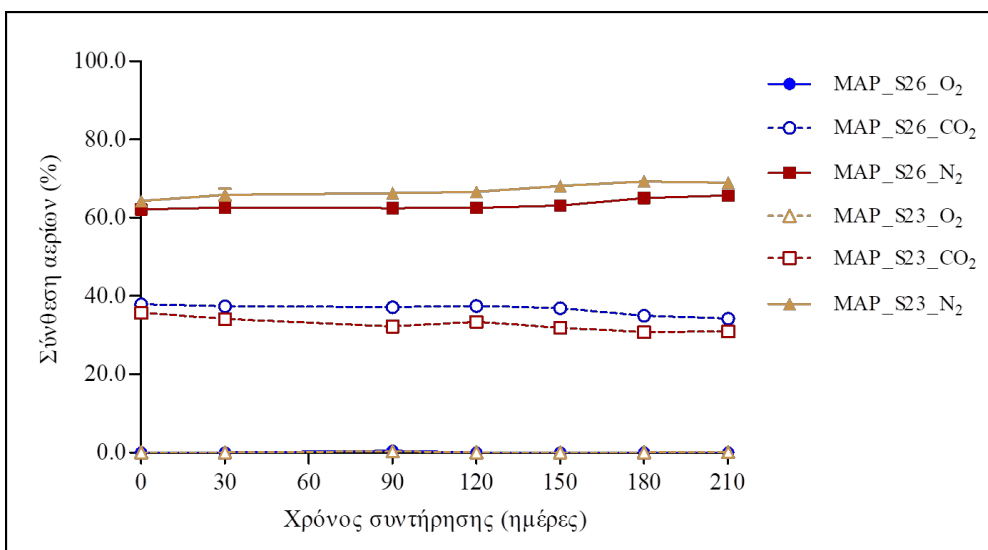
Στα Γραφήματα 1 – 3 που παρατίθενται παρακάτω, φαίνονται οι μεταβολές στη σύνθεση των βασικών αερίων (N_2 , CO_2 , O_2) κατά τη συσκευασία της ελιάς σε περιέκτες με τροποποιημένη ατμόσφαιρα (30% CO_2 και 70% N_2) σε σχέση με το χρόνο συντήρησης.



Γράφημα 1. Μεταβολή στη σύνθεση των αερίων κατά τη συσκευασία της φυσικής μαύρης Κονσερβολιάς σε εύκαμπτους περιέκτες με τροποποιημένη ατμόσφαιρα (MAP – 30% CO_2 και 70% N_2), η οποία ζυμώθηκε με την αυτόχθονη μικροχλωρίδα (C – Control) σε συνθήκες αλατότητας 6% NaCl (6), 3% NaCl – 3% KCl (3).



Γράφημα 2. Μεταβολή στη σύνθεση των αερίων κατά τη συσκευασία της φυσικής μαύρης Κονσερβολιάς σε εύκαμπτους πολυστρωματικούς περιέκτες με τροποποιημένη ατμόσφαιρα (MAP – 30% CO₂ και 70% N₂), η οποία ζυμώθηκε με την καλλιέργεια εκκίνησης *Lactobacillus pentosus* B363 (S1) σε συνθήκες αλατότητας 6% NaCl (6), 3% NaCl – 3% KCl (3).



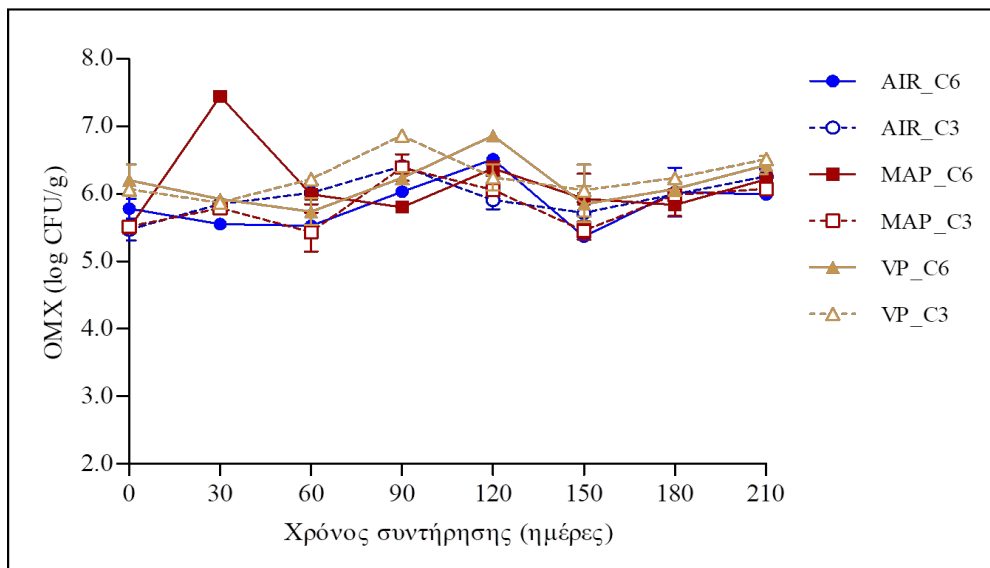
Γράφημα 3. Μεταβολή στη σύνθεση των αερίων κατά τη συσκευασία της φυσικής μαύρης Κονσερβολιάς σε εύκαμπτους πολυστρωματικούς περιέκτες με τροποποιημένη ατμόσφαιρα (MAP – 30% CO₂ και 70% N₂), η οποία ζυμώθηκε με την καλλιέργεια εκκίνησης *Lactobacillus plantarum* B380 (S2) σε συνθήκες αλατότητας 6% NaCl (6), 3% NaCl – 3% KCl (3).

Όπως προκύπτει από τα Γραφήματα 1 – 3 για τις συσκευασίες τροποποιημένης ατμόσφαιρας, σε καμία περίπτωση ζύμωσης (S1, S2, C) δεν καταγράφηκαν αξιοσημείωτες διαφοροποιήσεις στις συγκεντρώσεις των αερίων

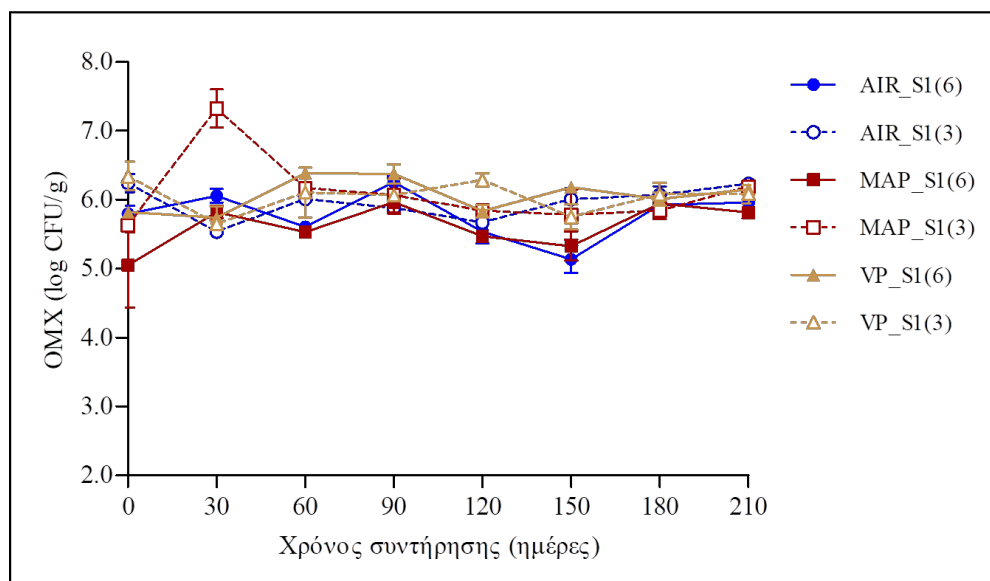
CO₂ και N₂ από τις αρχικές τιμές (30% CO₂ και 70% N₂), κατά την επτάμηνη συντήρηση. Παράλληλα, οι συγκεκριμένες συσκευασίες ήταν αδιαπέρατες στο O₂, δεδομένου ότι το αέριο είχε συγκέντρωση < 0,1% στο χρονικό αυτό διάστημα. Οι παρατηρήσεις αυτές είναι ιδιαίτερα σημαντικές γιατί υποδηλώνουν ότι η αρχική τροποποιημένη ατμόσφαιρα διατηρείται πρακτικά αμετάβλητη και εξασφαλίζει προστατευτική δράση κατά την περίοδο συντήρησης του καρπού. Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε συμφωνία με αντίστοιχη μελέτη (Doulgeraki et al., 2012), όπου χρησιμοποιήθηκαν τροποποιημένες συσκευασίες με παρόμοια αέρια σύσταση (20% CO₂ – 80% N₂) και η οποία έμεινε σχετικά σταθερή μέχρι το τέλος της συντήρησης. Επομένως, η αναλογία των αερίων και το υλικό της συσκευασίας κρίνονται ως τα πλέον κατάλληλα για τη διατήρηση της φυσικής μαύρης ελιάς σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας για μεγάλο χρονικό διάστημα.

4.2 Περιγραφή της μικροχλωρίδας της ελιάς

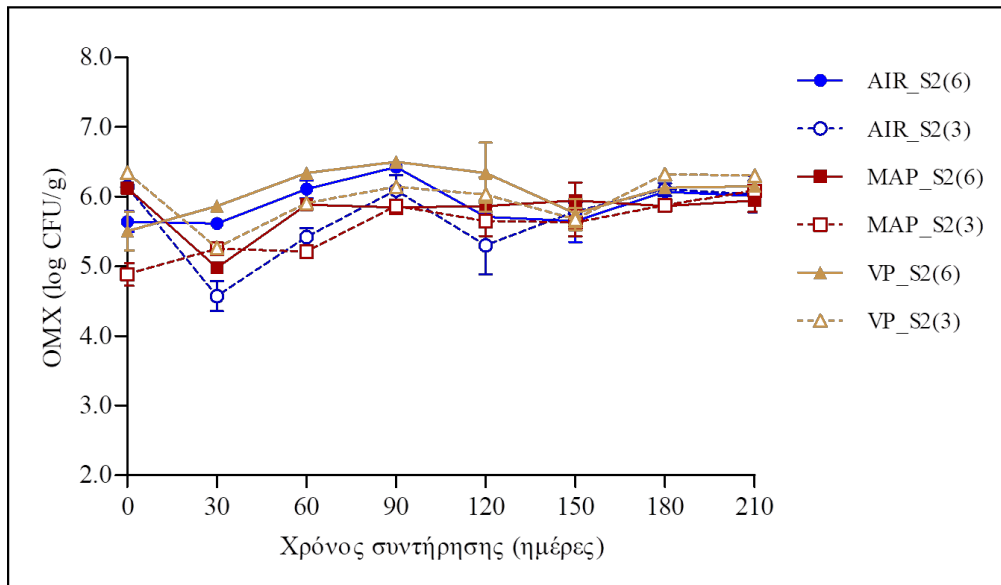
Η μεταβολή του πληθυσμού της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (ή OMX) στον καρπό της ελιάς, κατά τη διάρκεια συντήρησής της, παρουσιάζεται στα Γραφήματα 4–6 . Στο κάθε Γράφημα φαίνεται η μεταβολή της OMX στις διαφορετικές περιπτώσεις αλατότητας (6% NaCl, 3% NaCl – 3% KCl) και συσκευασίας (αερόβιες συνθήκες, τροποποιημένες ατμόσφαιρες, κενό), για τις τρεις διαφορετικές ζυμώσεις (με προσθήκη καλλιέργειας εκκίνησης *Lactobacillus pentosus* B363 (S1), *Lactobacillus plantarum* B380 (S2) και ζύμωση με την αυτόχθονη μικροχλωρίδα (C).



Γράφημα 4. Μεταβολή του πληθυσμού της OMX (log CFU/g) κατά τη συντήρηση του καρπού της φυσικής μαύρης Κονσερβολιάς, που ζυμώθηκε αρχικά με την αυτόχθονη μικροχλωρίδα (C) σε συνθήκες αλατότητας 6% NaCl (6), 3% NaCl – 3% KCl (3) και συσκευάστηκε σε εύκαμπτους περιέκτες υπό αερόβιες συνθήκες (AIR), τροποποιημένες ατμόσφαιρες (MAP) και κενό (VP).



Γράφημα 5. Μεταβολή του πληθυσμού της OMX (log CFU/g) κατά τη συντήρηση του καρπού της φυσικής μαύρης Κονσερβολιάς, που ζυμώθηκε αρχικά με την καλλιέργεια εκκίνησης *Lactobacillus pentosus* B363 (S1) σε συνθήκες αλατότητας 6% NaCl (6), 3% NaCl – 3% KCl (3) και συσκευάστηκε σε εύκαμπτους περιέκτες υπό αερόβιες συνθήκες (AIR), τροποποιημένες ατμόσφαιρες (MAP) και κενό (VP).



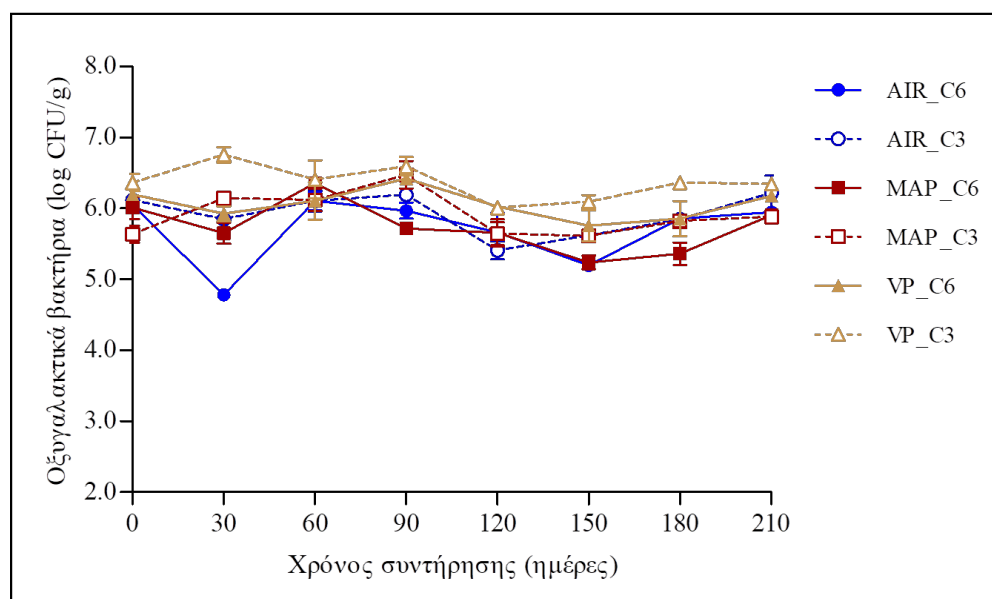
Γράφημα 6. Μεταβολή του πληθυσμού της OMX (log CFU/g) κατά τη συντήρηση του καρπού της φυσικής μαύρης Κονσερβολιάς, που ζυμώθηκε αρχικά με την καλλιέργεια εκκίνησης *Lactobacillus plantarum* B380 (S2) σε συνθήκες αλατότητας 6% NaCl (6), 3% NaCl – 3% KCl (3) και συσκευάστηκε σε εύκαμπτους περιέκτες υπό αερόβιες συνθήκες (AIR), τροποποιημένες ατμόσφαιρες (MAP) και κενό (VP).

Η μεταβολή του πληθυσμού της OMX ανεξαρτήτως των συνθηκών ζύμωσης και συσκευασίας, διακυμάνθηκε κατά μέσο όρο σε περίπου 6,0 log CFU/g. Κατά της πρώτες ημέρες μέχρι και την ημέρα 30^η ημέρα συντήρησης, δείγματα στα οποία ο πληθυσμός της OMX ήταν μικρότερος από 5,5 log CFU/g, παρουσίασαν αυξητική τάση στο πληθυσμό των μικροοργανισμών, οι οποίοι σταθεροποιήθηκαν κοντά σε 6,0 log CFU/g. Αντίθετα, στα υπόλοιπα δείγματα δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική μεταβολή της OMX μέχρι και το τέλος της συντήρησης. Επιπλέον, η διαφορετική αρχική περιεκτικότητα άλατος στην άλμη που χρησιμοποιήθηκε για τη ζύμωση της ελιάς πριν τη συσκευασία, δε φαίνεται να επηρέασε τη μεταβολή της OMX.

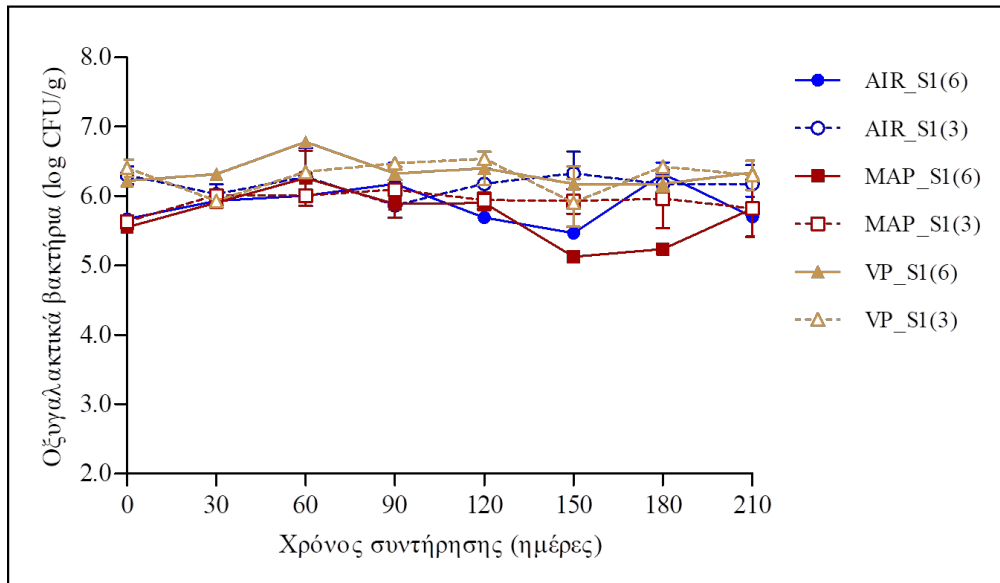
Πιο αναλυτικά, στην περίπτωση της αυθόρμητης ζύμωσης (Γράφημα 4), σε γενικές γραμμές οι τιμές της OMX ήταν παρόμοιες και στις τρεις συσκευασίες με αλατότητα 6%. Όσον αφορά στα δείγματα με την υποκατάσταση του κοινού άλατος (NaCl) κατά 50% από χλωριούχο κάλιο (KCl), τα επίπεδα της OMX ήταν ελαφρώς αυξημένα στην συσκευασία υπό κενό (0,3 log CFU/g κατά μέσο όρο) συγκριτικά με την αερόβια συσκευασία (AIR) και τη συσκευασία με τροποποιημένη ατμόσφαιρα (MAP), στις οποίες η τιμή της OMX ήταν παρόμοια.

Τα δείγματα που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος S1 (*L. pentosus*, Γράφημα 5), παρουσίασαν παρόμοια επίπεδα της OMX και στις τρεις συσκευασίες με 3% NaCl – 3% KCl σε αντίθεση με την περίπτωση της 6% αλατότητας (NaCl), όπου ο πληθυσμός της OMX ήταν πιο αυξημένος στις συσκευασίες κενού κατά 0,3 log CFU/g κατά μέσο όρο.

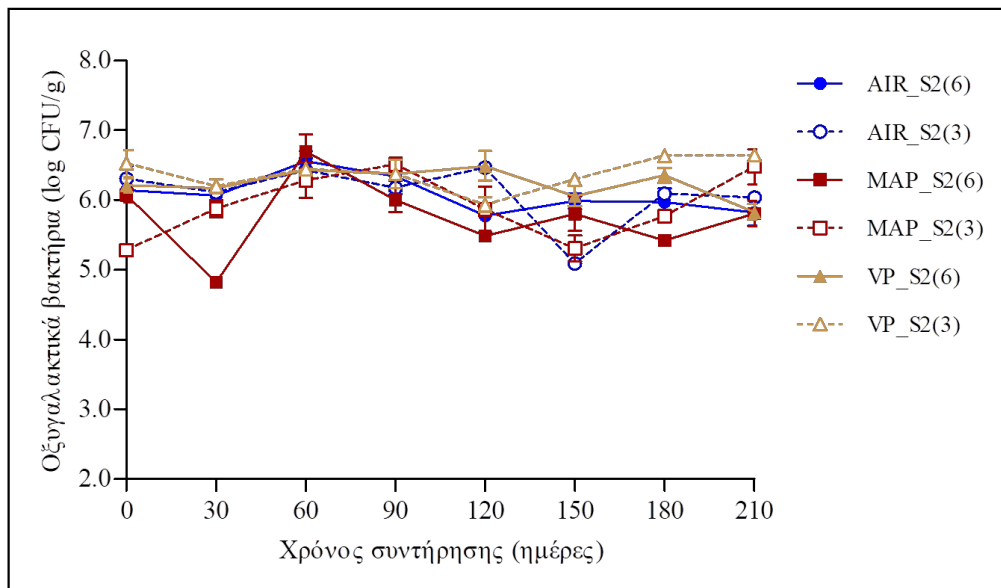
Επιπροσθέτως, στην περίπτωση των δειγμάτων που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος S2 (*L. plantarum*, Γράφημα 6), όπως και στην αυθόρμητη ζύμωση, παρατηρήθηκαν ελαφρώς αυξημένα επίπεδα της OMX μόνο στις συσκευασίες κενού με 3% NaCl – 3% KCl (0,3 log CFU/g κατά μέσο όρο) συγκριτικά με τις συσκευασίες AIR και MAP με αντίστοιχη αλατότητα. Αξίζει να σημειωθεί πως μεταξύ των διαφορετικών περιπτώσεων ζύμωσης (S1,S2 και C), δεν φάνηκε να υπάρχει κάποια σημαντική διαφοροποίηση στα επίπεδα του πληθυσμού της OMX που καταγράφηκαν μεταξύ των συσκευασιών με ίδια ατμοσφαιρική σύσταση.



Γράφημα 7. Μεταβολή του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων (log CFU/g) κατά τη συντήρηση του καρπού της φυσικής μαύρης Κονσερβολιάς, που ζυμώθηκε αρχικά με την αυτόχθονη μικροχλωρίδα (C) σε συνθήκες αλατότητας 6% NaCl (6), 3% NaCl – 3% KCl (3) και συσκευάστηκε σε εύκαμπτους περιέκτες υπό αερόβιες συνθήκες (AIR), τροποποιημένες ατμόσφαιρες (MAP) και κενό (VP).



Γράφημα 8. Μεταβολή του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων (log CFU/g) κατά τη συντήρηση του καρπού της φυσικής μαύρης Κονσερβολιάς, που ζυμώθηκε αρχικά με την καλλιέργεια εκκίνησης *Lactobacillus pentosus* B363 (S1) σε συνθήκες αλατότητας 6% NaCl (6), 3% NaCl – 3% KCl (3) και συσκευάστηκε σε εύκαμπτους περιέκτες υπό αερόβιες συνθήκες (AIR), τροποποιημένες ατμόσφαιρες (MAP) και κενό (VP).



Γράφημα 9. Μεταβολή του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων (log CFU/g) κατά τη συντήρηση του καρπού της φυσικής μαύρης Κονσερβολιάς, που ζυμώθηκε αρχικά με την καλλιέργεια εκκίνησης *Lactobacillus plantarum* B380 (S2) σε συνθήκες αλατότητας 6% NaCl (6), 3% NaCl – 3% KCl (3) και συσκευάστηκε σε εύκαμπτους περιέκτες υπό αερόβιες συνθήκες (AIR), τροποποιημένες ατμόσφαιρες (MAP) και κενό (VP).

Στα Γραφήματα 7-9 απεικονίζεται η μεταβολή του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων κατά τη διάρκεια της συντήρησης των δειγμάτων. Τα επίπεδα του πληθυσμού τους, όπως και στην ΟΜΧ, κυμάνθηκαν περίπου σε 6,0 log CFU/g. Πέρα από κάποιες μικρές διακυμάνσεις κατά τη διάρκεια της συντήρησης των επιτραπέζιων ελιών, η συγκέντρωση των αποικιών που καταγράφηκε στην αρχή της δε διέφερε σημαντικά από τις τελικές παρατηρούμενες τιμές. Αυτό οφείλεται πιθανότατα στο γεγονός ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν εισέλθει στη στάσιμη φάση της ανάπτυξής τους, όπου ο αριθμός των κυτταρικών διαιρέσεων των οξυγαλακτικών βακτηρίων ισούται με τον αριθμό των κυττάρων που θανατώνονται, με αποτέλεσμα ο συνολικός πληθυσμός τους να παραμένει σε γενικές γραμμές σταθερός (Panagou 2004). Μοναδική εξαίρεση αποτελεί η περίπτωση των δειγμάτων που συσκευάστηκαν υπό τροποποιημένες ατμόσφαιρες (MAP) και στα οποία προηγήθηκε ζύμωση σε 3% αλατότητα με προσθήκη εναρκτήριας καλλιέργειας S2 (*L. plantarum*), όπου καταμετρήθηκε πληθυσμός οξυγαλακτικών

βακτηρίων μεγαλύτερος κατά 1,0 log CFU/g στο τέλος της συντήρησης από ότι στην αρχή (6,5 και 5,3 log CFU/g αντίστοιχα). Πιθανότατα, αυτό δεν οφείλεται σε κάποια από τις συνθήκες επεξεργασίας (προσθήκη εμβολίου, συγκέντρωση αλατότητας, αέρια σύσταση συσκευασιών), αλλά μάλλον στο γεγονός πως αυτή η περίπτωση ήταν η μοναδική όπου ο αρχικός πληθυσμός ήταν σε χαμηλά επίπεδα κάτω από 5,5 log CFU/g. Όπως κυμάνθηκαν στις υπόλοιπες περιπτώσεις τα επίπεδα των οξυγαλακτικών βακτηρίων κοντά στους 6,0 log CFU/g, το ίδιο συνέβη και στη συγκεκριμένη, παρά την μικρή αρχική συγκέντρωση, και για αυτό παρατηρήθηκε πιθανόν αυτή η διαφορά.

Όπως φαίνεται από τους πληθυσμούς των οξυγαλακτικών βακτηρίων και της OMX η επικρατούσα μικροχλωρίδα των δειγμάτων της επιτραπέζιας ελιάς που μελετήθηκαν, αποτελείται σχεδόν εξ' ολοκλήρου από οξυγαλακτικά βακτήρια. Η επικράτηση τους σε αυτό το στάδιο βρίσκεται σε συμφωνία με βιβλιογραφικά δεδομένα (Lucena-Padrós et al. 2014a, Rodríguez-Gómez et al. 2013, Panagou et al. 2006), μιας και αποτελούν μαζί με τις ζύμες την επικρατούσα μικροχλωρίδα στο τέλος της φυσιολογικής ζύμωσης (Panagou et al. 2008). Επιπλέον, όπως προκύπτει από τις καμπύλες που περιγράφουν τη μεταβολή του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων, παρατηρούμε ότι ο πληθυσμός τους δεν παρουσίασε αξιοσημείωτη μεταβολή μεταξύ των δειγμάτων που διέφεραν ως προς τη συγκέντρωση της αλατότητας στην οποία ζυμώθηκαν αρχικά.

Σχετικά με την περίπτωση της αυθόρμητης ζύμωσης (Γράφημα 7), σε γενικές γραμμές οι συγκεντρώσεις του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων ήταν παρόμοιες στις συσκευασίες AIR και MAP, ενώ ήταν αυξημένες στις συσκευασίες κενού με αλατότητα 6% και 3% κατά 0,3 και 0,45 log CFU/g αντίστοιχα. Τα δείγματα που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος S1 (*L. pentosus*, Γράφημα 8), εμφάνισαν παρόμοια επίπεδα οξυγαλακτικών βακτηρίων στις συσκευασίες AIR και MAP με 6% αλατότητα, ενώ στις συσκευασίες κενού ήταν αυξημένα σε γενικές γραμμές κατά τουλάχιστον 0,45 log CFU/g. Αντίθετα, στις περιπτώσεις με 3% αλατότητα, οι συσκευασίες κενού και AIR παρουσίασαν παρόμοια επίπεδα, τα οποία ήταν μεγαλύτερα σε γενικές γραμμές από τις συσκευασίες MAP κατά τουλάχιστον 0,25 log CFU/g.

Επίσης, στην περίπτωση των δειγμάτων που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος S2 (*L. plantarum*, Γράφημα 9), καταγράφηκαν παρόμοια επίπεδα οξυγαλακτικών βακτηρίων στις συσκευασίες κενού και AIR με 6% αλατότητα, τα οποία ήταν αυξημένα κατά 0,3 log CFU/g από τις συσκευασίες MAP αντίστοιχης αλατότητας. Στις υπόλοιπες περιπτώσεις των δειγμάτων που ζυμώθηκαν σε 3% αλατότητα, παρατηρήθηκαν κατά την συντήρηση παρόμοια επίπεδα στις συσκευασίες AIR και MAP, τα οποία ήταν χαμηλότερα κατά 0,3 log CFU/g από τις συσκευασίες κενού.

Τέλος, μεταξύ των διαφορετικών περιπτώσεων ζύμωσης (S1,S2 και C), δεν φάνηκε να υπάρχει κάποια σημαντική διαφοροποίηση στα επίπεδα του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων που καταγράφηκαν μεταξύ των συσκευασιών με ίδια ατμοσφαιρική σύσταση, όπως ακριβώς παρατηρήθηκε και για την περίπτωση της OMX.

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν επίσης τα αποτελέσματα που καταγράφηκαν για τον πληθυσμό των ζυμών. Με εξαίρεση την αρχική τιμή του δείγματος S23A που σημείωσε 4,1 log CFU/g, δεν παρατηρήθηκε παρουσία ζυμών από την αρχή μέχρι και τον τρίτο μήνα συντήρησης (90 ημέρες). Σε αυτό το χρονικό διάστημα οι ζύμες διατηρήθηκαν σε πολύ χαμηλά επίπεδα, κάτω από το όριο ανίχνευσης (< 2,0 log CFU/g), ήδη από το τέλος της ζύμωσης. Σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα που περιγράφηκαν παραπάνω για τους πληθυσμούς της OMX και των οξυγαλακτικών βακτηρίων, μπορούμε με βεβαιότητα να πούμε πως η τελευταία ομάδα μικροοργανισμών επικράτησε των ζυμών κατά τη διαδικασία της ζύμωσης. Η εξαίρεση που καταγράφηκε, οφείλεται πιθανότατα στο γεγονός ότι στη συγκεκριμένη περίπτωση χρειάστηκε απλά παραπάνω χρόνος για να πέσουν τα επίπεδα των ζυμών σε παρόμοια επίπεδα με τις υπόλοιπες και όχι σε κάποιον ιδιαίτερο λόγο. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι από τον τέταρτο μέχρι και τον έκτο μήνα (120 – 180 ημέρες), σημειώθηκε μια μικρή αύξηση του πληθυσμού των ζυμών που κυμάνθηκε σε 3,0 log CFU/g περίπου, η οποία παρατηρήθηκε αποκλειστικά στις ελιές που συσκευάστηκαν υπό κενό (VP). Εκτός από μια περίπτωση, οι ζύμες εμφανίστηκαν μόνο στα δείγματα που ζυμώθηκαν με την αυτόχθονη μικροχλωρίδα και σε αυτά που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος *Lb. plantarum* B380 (S2) και όχι σε όσα είχαν εμβολιαστεί με το στέλεχος *Lb. pentosus* B363 (S1) (περίπτωση S13K).

Αντίθετα, στα δείγματα της επιτραπέζιας ελιάς που συσκευάστηκαν σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα δεν ανιχνεύτηκαν ζύμες κατά τη διάρκεια της συντήρησης. Επίσης ζύμες παρατηρήθηκαν και στις δύο περιπτώσεις αλατότητας του καρπού. Τον τελευταίο μήνα (ημέρα 210), είχαν πέσει ξανά τα επίπεδα των ζυμών κάτω από το όριο ανίχνευσης. Στον πίνακα 5 περιγράφονται τα επίπεδα των ζυμών που καταγράφηκαν κατά τη διάρκεια της συντήρησης των δειγμάτων. Οι συσκευασίες κενού περιέχουν συνήθως κάποιες μικρές ποσότητες αέρα (0,3 – 3%), καθώς δεν είναι εφικτή η πλήρης απομάκρυνσή του (Irtwange 2006). Ίσως αυτή είναι μια πιθανή εξήγηση για την μικρή αύξηση στον πληθυσμό των ζυμών που παρατηρήθηκε μόνο σε αυτές τις συσκευασίες. Αξίζει να σημειωθεί ακόμα ότι σε παρόμοια έρευνα, οι Degirmencioglu et al. (2011) παρατήρησαν πως οι συσκευασίες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (35% CO₂ και 65% N₂) μαζί με την προεπεξεργασία των δειγμάτων επιτραπέζιας ελιάς με χλωρίνη, περιόρισαν καλύτερα την ανάπτυξη των ζυμών από τις συσκευασίες κενού.

ΑΛΑΤΟΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ 6% NaCl						
ΔΕΙΓΜΑ	S16K	S16A	S26K	S26A	C6K	C6A
t (μήνες)	Ζύμες	Ζύμες	Ζύμες	Ζύμες	Ζύμες	Ζύμες
0	<2	<2	<2	<2	<2	<2
1	<2	<2	<2	<2	<2	<2
2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
3	<2	<2	<2	<2	<2	<2
4	<2	<2	3,5	<2	<2	<2
5	<2	<2	2,3	<2	2,4	<2
6	<2	<2	3,1	<2	3,0	<2
7	<2	<2	<2	<2	<2	<2
ΑΛΑΤΟΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ 3% NaCl - 3% KCL						
ΔΕΙΓΜΑ	S13K	S13A	S23K	S23A	C3K	C3A
t (μήνες)	Ζύμες	Ζύμες	Ζύμες	Ζύμες	Ζύμες	Ζύμες
0	<2	<2	<2	4,1	<2	<2
1	<2	<2	<2	<2	<2	<2
2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
3	<2	<2	<2	<2	<2	<2
4	<2	<2	<2	<2	3,2	<2
5	<2	<2	3,1	<2	3,2	<2
6	3,2	<2	3,1	<2	3,1	<2
7	<2	<2	<2	<2	3	<2

Πίνακας 4. Καταγραφή του πληθυσμού των ζυμών (log CFU/g) στον καρπό της φυσικής μαύρης Κονσερβολιάς για το σύνολο των δειγμάτων, με εξαίρεση εκείνων που συσκευάστηκαν σε περιέκτες με τροποποιημένη ατμόσφαιρα, καθώς σε αυτούς παρατηρήθηκε απουσία ζυμών καθ' όλη τη διάρκεια συντήρησης.

Αξίζει ακόμα να αναφερθεί πως παρατηρήθηκε απουσία εντεροβακτηρίων καθ' όλη τη χρονική διάρκεια του πειράματος και σε όλες τις συσκευασίες. Αυτό οφείλεται κατά κύριο λόγο στην επιτυχή ζύμωση των ελιών πριν τη συσκευασία, όπου οι τιμές της αλατότητας και ιδιαίτερα οι τιμές του pH στο τέλος της

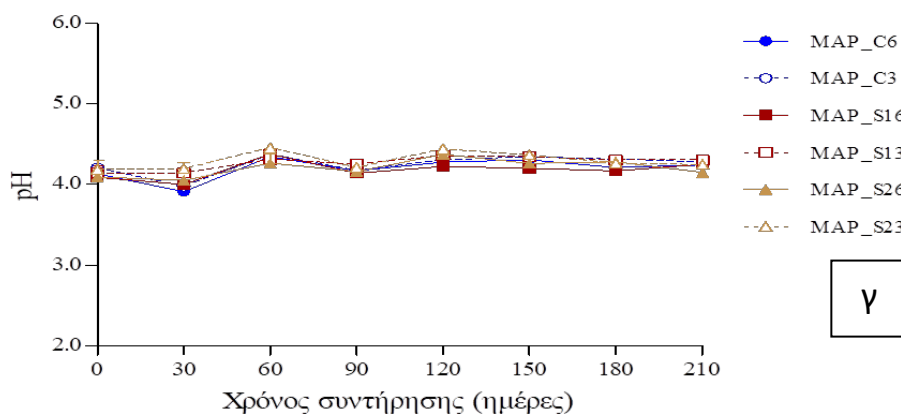
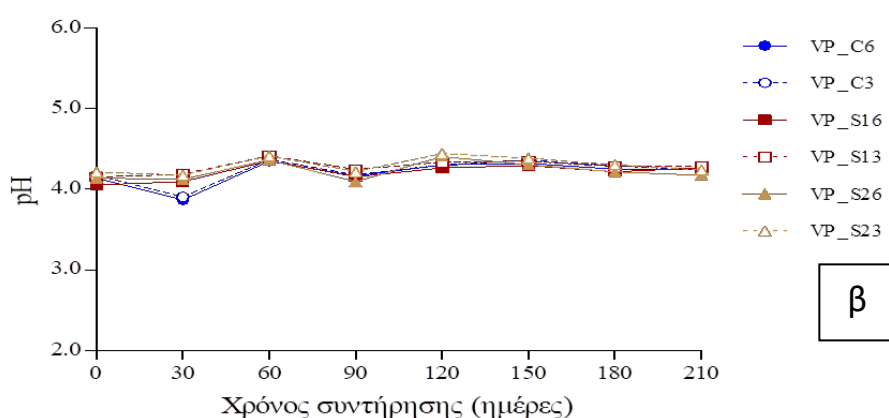
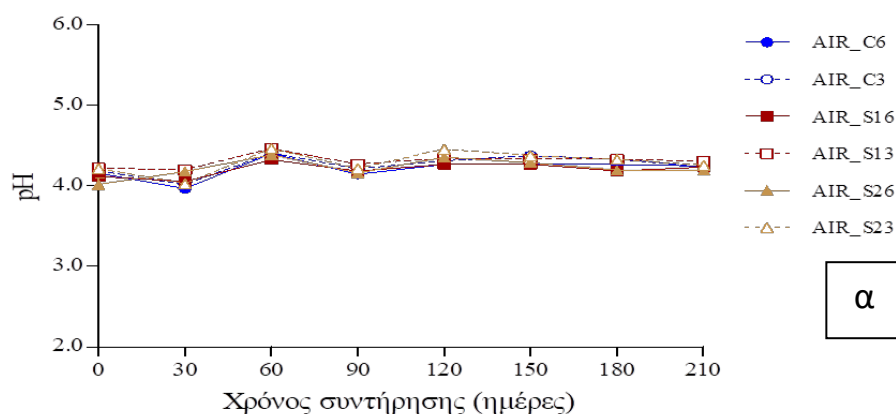
επεξεργασίας δημιούργησαν δυσμενές περιβάλλον για την επιβίωση της συγκεκριμένης ομάδας μικροοργανισμών. Κατά την πορεία μιας φυσιολογικής ζύμωσης στην επιτραπέζια ελιά αναπτύσσονται πρώτα τα εντεροβακτήρια μεταξύ άλλων αρνητικών κατά Gram βακτηρίων και στη συνέχεια τα επίπεδά τους πέφτουν παράλληλα με την πτώση του pH που λαμβάνει χώρα (Kailis 2007). Τα εντεροβακτήρια αποτελούν αλλοιογόνους μικροοργανισμούς για την επιτραπέζια ελιά και μάλιστα, ο περιορισμός του πληθυσμού τους σε χαμηλά, μη ανιχνεύσιμα επίπεδα, θεωρείται παράγοντας που χαρακτηρίζει επιτυχημένη τη ζύμωση (Blana et al. 2016). Για να εξασφαλιστεί η μικροβιολογική σταθερότητα του προϊόντος της επιτραπέζιας ελιάς, θα πρέπει όσον αφορά την τιμή της ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας στην άλμη να ξεπερνά το 0,3% (IOOC 2004). Στην περίπτωση μας είναι λογική η απουσία των εντεροβακτηρίων που παρατηρήθηκε, καθώς στο τέλος της ζύμωσης των δειγμάτων επιτραπέζιας ελιάς που έλαβε χώρα σε προηγούμενη εργασία, η ολική ογκομετρούμενη οξύτητα της άλμης βρισκόταν σε επίπεδα πάνω από 0,8%.

4.3 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της ελιάς

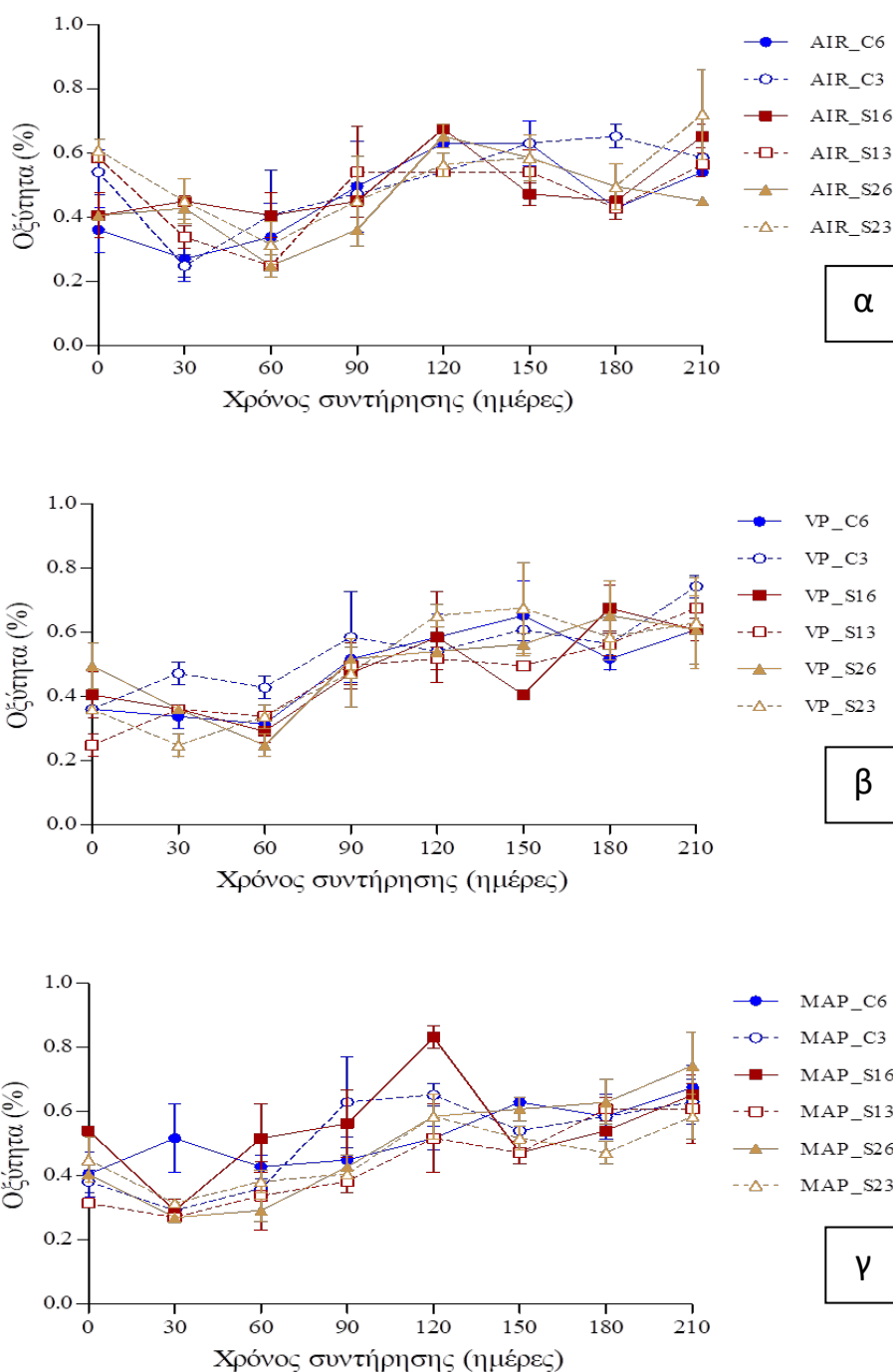
Στο Γράφημα 10 παρουσιάζεται η μεταβολή της τιμής του pH κατά τη διάρκεια της συντήρησης των δειγμάτων. Όπως προκύπτει σε όλες τις περιπτώσεις των συσκευασιών, οι τιμές του pH κυμάνθηκαν σε ένα περιορισμένο εύρος μεταξύ 4,0 και 4,5. Μεταξύ των αρχικών μετρήσεων (έναρξη της συντήρησης) μέχρι και τον δεύτερο μήνα (60 ημέρες), παρατηρήθηκαν μικρές μόνο διαφοροποιήσεις στη μεταβολή της τιμής του pH που δε ξεπέρασαν τις 0,45 μονάδες. Οι υπόλοιπες μετρήσεις έως και το τέλος της συντήρησης (210 ημέρες) είχαν σταθεροποιηθεί πλήρως, με την τιμή του pH να διαμορφώνεται μεταξύ 4,25 – 4,3. Σημειώνεται πως πιο κοντά στην τιμή 4,3 σταθεροποιήθηκαν τα δείγματα που ζυμώθηκαν σε άλμη 3% NaCl – 3% KCl, ενώ αυτά που ζυμώθηκαν σε 6% NaCl σταθεροποιήθηκαν πιο κοντά στην τιμή 4,25. Καμία αξιόλογη διαφορά δε σημειώθηκε ανάμεσα στις διαφορετικές περιπτώσεις ζύμωσης (C, S1, S2) ή μεταξύ των διαφορετικών τύπων συσκευασίας (AIR, VP, MAP).

Αντίθετα με το pH, η ολική ογκομετρούμενη οξύτητα παρουσίασε μεγαλύτερες διακυμάνσεις κατά τη συντήρηση των δειγμάτων στο ίδιο χρονικό

διάστημα (Γράφημα 11). Σε γενικές γραμμές παρατηρήθηκε τάση αύξησης στην οξύτητα της ελιάς κατά τη διάρκεια συντήρησης. Οι αρχικές τιμές που καταγράφηκαν ποικίλουν αρκετά, καλύπτοντας ένα εύρος από 0,25 μέχρι και 0,6 g γαλακτικού οξέος/100 g καρπού, με τις περισσότερες να βρίσκονται κοντά στην τιμή 0,4 g ή παραπάνω. Στη συνέχεια, μέσα στους πρώτους 2 μήνες παρατηρήθηκε για το σύνολο σχεδόν των δειγμάτων μια μείωση κοντά στα 0,3 g γαλακτικού οξέος/100 g καρπού, η οποία ήταν πιο έντονη όπως είναι λογικό στις περιπτώσεις που είχαν μεγάλη αρχική τιμή ($>0,5$ g), ενώ τα ίδια επίπεδα σημείωσαν σε αυτό το διάστημα και οι περιπτώσεις που είχαν ήδη μικρή αρχική συγκέντρωση ($<0,35$). Από τον τρίτο μήνα, η πορεία της ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας είχε αυξητική τάση έως και το τέλος της πειραματικής διαδικασίας, με την τελική τιμή να αποτελεί συνήθως και τη μέγιστη παρατηρούμενη. Αυτή, στις περισσότερες περιπτώσεις ξεπερνούσε τα 0,6 g γαλακτικού οξέος/100 g καρπού, ενώ η χαμηλότερη τελική τιμή που καταγράφηκε πλην μιας εξαίρεσης (S26A) ήταν 0,54. Τόσο η χρήση καλλιεργειών εκκίνησης κατά τη ζύμωση της ελιάς, όσο και οι συνθήκες αλατότητας της άλμης αλλά και η χρήση των διαφορετικών τύπων συσκευασίας, δεν επηρέασαν σημαντικά την τελική τιμή της ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας κατά τη συντήρηση του ελαιοκάρπου.



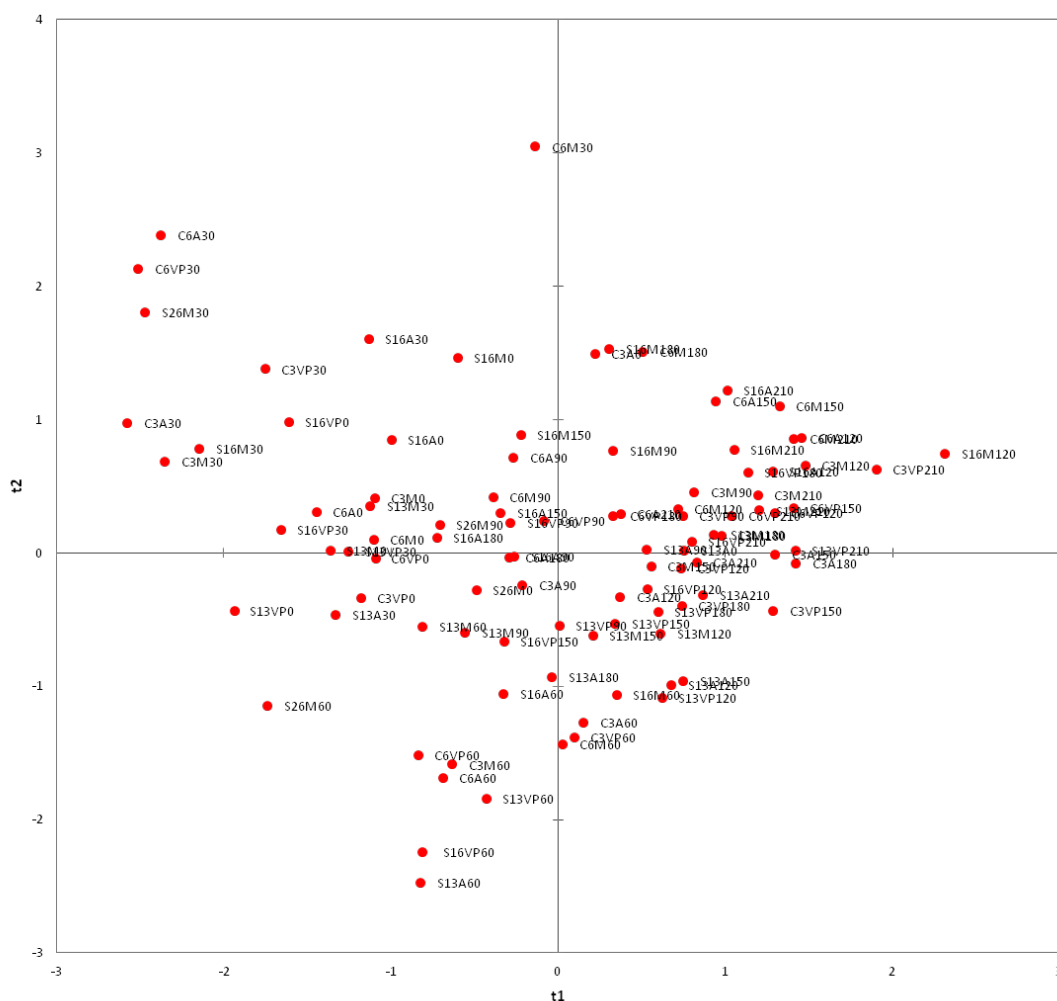
Γράφημα 10. Μεταβολή της τιμής του pH κατά την συντήρηση της φυσικής μαύρης Κονσερβολιάς που ζυμώθηκε με την αυτόχθονη μικροχλωρίδα (C) και τις καλλιέργειες εκκίνησης *Lb. pentosus* B363 (S1), *Lb. plantarum* B380 (S2), σε συνθήκες αλατότητας 6% NaCl (6), 3% NaCl – 3% KCl (3), για τις περιπτώσεις συσκευασίας σε αερόβιες συνθήκες (α), σε κενό (β) και σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (γ).



Γράφημα 11. Μεταβολή της ογκομετρούμενης οξύτητας κατά την συντήρηση της φυσικής μαύρης Κονσερβολιάς που ζυμώθηκε με την αυτόχθονη μικροχλωρίδα (C) και τις καλλιέργειες εκκίνησης *Lb. pentosus* B363 (S1), *Lb. plantarum* B380 (S2), σε συνθήκες αλατότητας 6% NaCl (6), 3% NaCl – 3% KCl (3), για τις περιπτώσεις συσκευασίας σε αερόβιες συνθήκες (α), σε κενό (β), σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (γ).

4.4 Ανάλυση με τη μέθοδο Παλινδρόμησης Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων

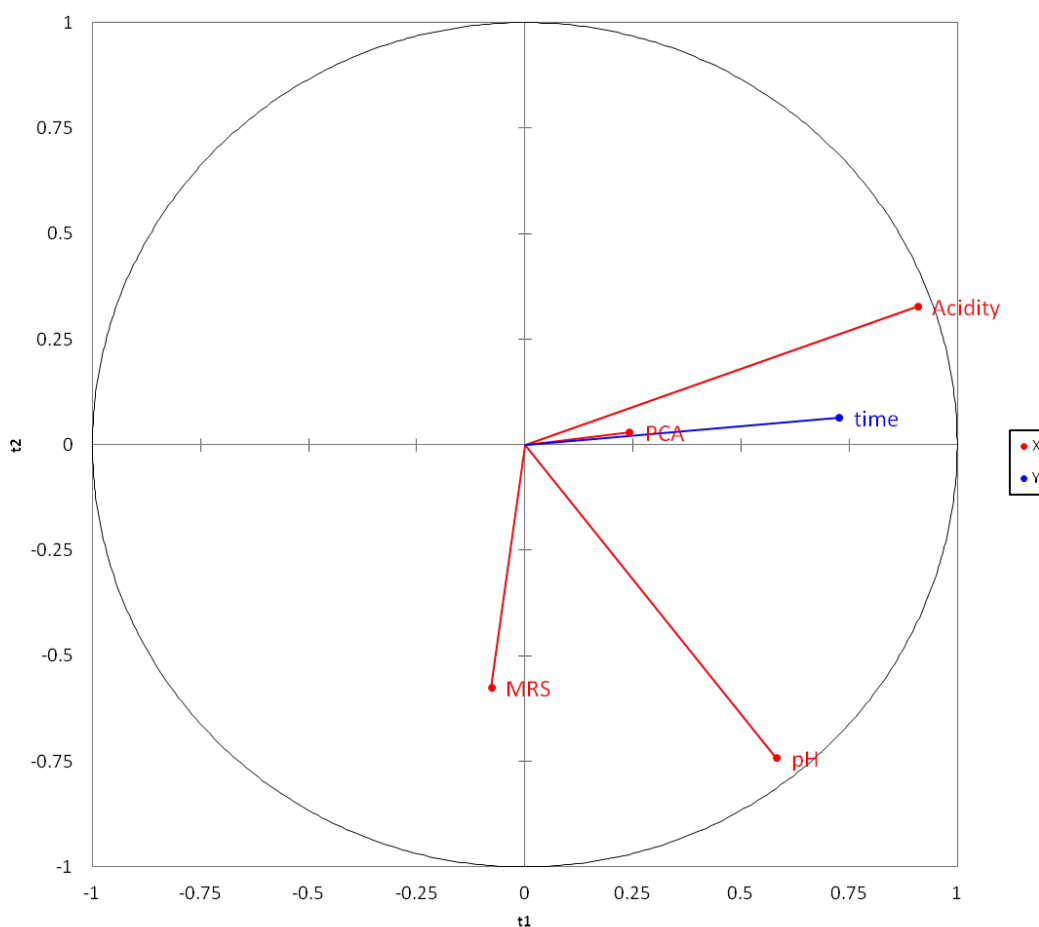
Κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη μέθοδο Παλινδρόμησης Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (PLS-R), χρησιμοποιήθηκαν ως ανεξάρτητες μεταβλητές (X) οι τιμές της ΟΜΧ, των οξυγαλακτικών βακτηρίων, του pH και της ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας, ενώ ο χρόνος συντήρησης αποτέλεσε τη μοναδική εξαρτημένη μεταβλητή (Y).



Γράφημα 12. Γράφημα διασποράς των δειγμάτων με τη μέθοδο PLS-R, όπου η κωδικοποίηση για κάθε δείγμα περιλαμβάνει στο τέλος τον χρόνο σε ημέρες (από 0 έως 210).

Παρατηρώντας το Γράφημα 12, φαίνεται πως τα δείγματα σε γενικές γραμμές διατάσσονται με συγκεκριμένο τρόπο, ανάλογα με τον χρόνο συντήρησης.

Αυτά που ανήκουν στους μικρούς χρόνους συντήρησης βρίσκονται προς την αριστερή πλευρά του γραφήματος, ενώ εκείνα με μεγάλους χρόνους προς τη δεξιά. Συνεπώς, μπορούμε να πούμε ότι ο οριζόντιος άξονας αντιπροσωπεύει το χρόνο συντήρησης. Όσον αφορά τις διαφορετικές περιπτώσεις αλατότητας και συσκευασίας, τα δείγματα δε φαίνεται να διαφοροποιούνται και να παρουσιάζουν κάποια συγκεκριμένη τάση ως προς αυτές τις παραμέτρους. Για αυτό το λόγο, ο άξονας γ του Γραφήματος 12 δε δείχνει κάτι ξεκάθαρο όπως στην περίπτωση του χ .

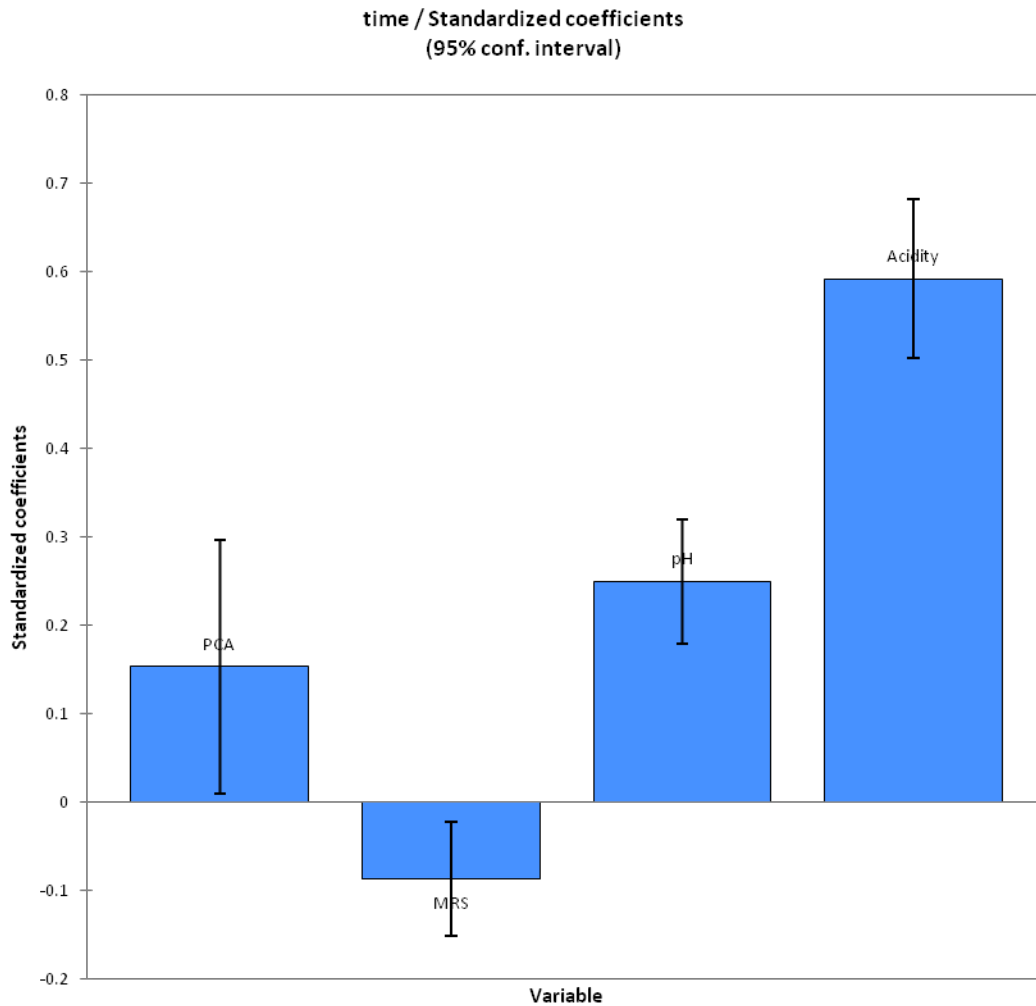


Γράφημα 13. Παρουσίαση της διασποράς μεταξύ των ανεξάρτητων μεταβλητών (X) και των εξαρτημένων μεταβλητών (Y) με τη μέθοδο PLS-R, όπου το PCA εκφράζει την OMX και το MRS τα οξυγαλακτικά βακτήρια.

Στη δεξιά μεριά του Γραφήματος 13 παρατηρούμε ότι βρίσκεται το διάνυσμα της εξαρτημένης μεταβλητής του χρόνου συντήρησης. Από αυτό συμπεραίνουμε ότι στην περιοχή αυτή αντιστοιχούν και τα δείγματα με τους μεγάλους χρόνους

συντήρησης, όπως είδαμε να συμβαίνει και στο Γράφημα 12. Το γεγονός πως τα αντίστοιχα διανύσματα για την ολική ογκομετρούμενη οξύτητα και το PCA (ΟΜΧ) βρίσκονται στο ίδιο τεταρτημόριο με αυτό του χρόνου συντήρησης, σημαίνει ότι αυτές οι μεταβλητές εκφράζουν μια θετική συσχέτιση με αυτόν, δηλαδή ότι αυξάνονται οι τιμές τους όσο αυξάνεται και ο χρόνος συντήρησης. Μάλιστα, μπορούμε επίσης να πούμε ότι παράλληλα με το χρόνο συντήρησης, η ολική ογκομετρούμενη οξύτητα αυξάνεται με μεγαλύτερο ρυθμό από ότι το PCA, καθώς το διάνυσμά της είναι μεγαλύτερο σε μήκος. Από την άλλη πλευρά, η μεταβλητή του MRS έχει αρνητική συσχέτιση με το χρόνο συντήρησης, καθώς τα διανύσματά τους βρίσκονται σε αντιδιαμετρικά τεταρτημόρια. Έτσι, ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων φαίνεται να έχει την τάση να μειώνεται όσο περνάει ο χρόνος συντήρησης.

Οι παρατηρήσεις αυτές προκύπτουν και από το Γράφημα 14, στο οποίο φαίνεται ακόμα πως τη μεγαλύτερη μεταβολή σε σχέση με τον χρόνο συντήρησης την έχει η ολική ογκομετρούμενη οξύτητα. Στη συνέχεια είναι το pH, λίγο πιο κάτω το PCA και τέλος είναι το MRS με τη μικρότερη μεταβολή. Μάλιστα, η στήλη που εκφράζει τη μεταβολή του MRS βρίσκεται κάτω από τον άξονα x'x, δείχνοντας έτσι την αρνητική του συσχέτιση με το χρόνο συντήρησης.



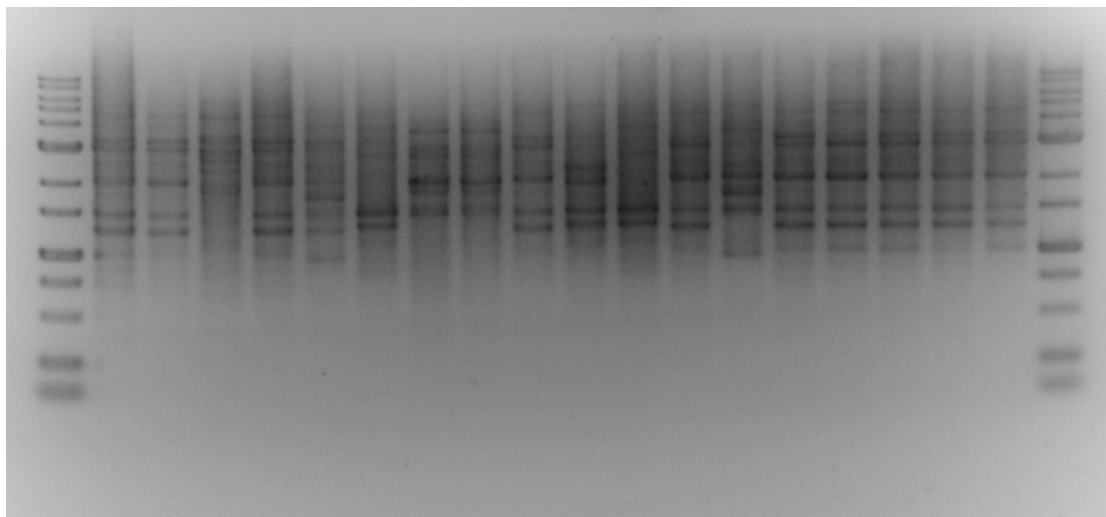
Γράφημα 14. Σχηματική απεικόνιση με τη μέθοδο PLS-R της μεταβολής των τεσσάρων ανεξάρτητων μεταβλητών (X), σε σχέση με το χρόνο συντήρησης.

4.5 Ταυτοποίηση οξυγαλακτικών βακτηρίων

4.5.1 Ομαδοποίηση στελεχών - rep-PCR

Έχοντας ως στόχο να εξεταστεί η επιβίωση των δύο στελεχών *Lb. pentosus* και *Lb. plantarum* (S1 και S2), τα οποία εφαρμόστηκαν ως καλλιέργειες εκκίνησης για την ενίσχυση της ζύμωσης δειγμάτων φυσικής μαύρης Κονσερβολιάς, ακολούθησε ομαδοποίηση των απομονώσεων με την τεχνική της rep-PCR. Με αυτή ενισχύθηκαν συγκεκριμένα, επαναλαμβανόμενα τμήματα από το DNA των δειγμάτων, τα οποία είχαν συλλεχθεί κατά το αρχικό στάδιο της συντήρησης (ημέρα 60). Τα δείγματα επιλέχθηκαν μόνο από τις περιπτώσεις ζύμωσης στις οποίες είχε εφαρμοστεί μια εκ των παραπάνω καλλιεργειών εκκίνησης και όχι από αυτές που

έδρασε η αυτόχθονη μικροχλωρίδα. Οι καλλιέργειες των οξυγαλακτικών βακτηρίων που μελετήθηκαν βρέθηκαν θετικές στη χρώση Gram και αρνητικές στη δοκιμή καταλάσης. Λόγω της διαφορετικότητας των αποτυπωμάτων των ζωνών με τη χρήση του εκκινήτη GTG₅, ο διαχωρισμός μεταξύ των διαφορετικών στελεχών πραγματοποιήθηκε με επιτυχία. Κάθε ζώνη, αποτελεί το γενετικό αποτύπωμα του κάθε στελέχους-δείγματος (Εικόνα 13).



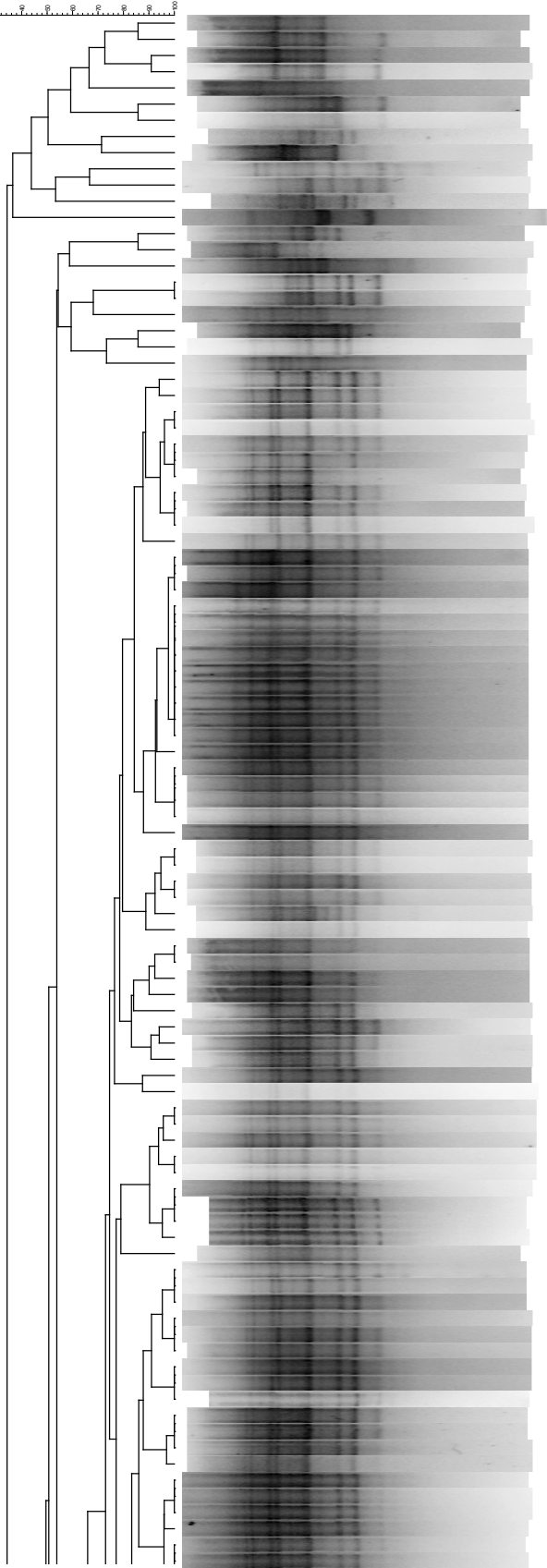
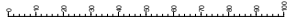
Εικόνα 13. Ενδεικτική φωτογραφία προϊόντων ηλεκτροφόρησης της ger-PCR σε πηκτή αгарόζης για 18 βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν από δείγματα με την καλλιέργεια εκκίνησης *Lb. plantarum*. Η πρώτη και τελευταία στήλη αποτελεί τον μάρτυρα μοριακής μάζας 1kbp. Οι κωδικοί των στελεχών με τη σειρά είναι: LP_151, LP_152, LP_153, LP_154, LP_155, LP_156, LP_157, LP_158, LP_159, LP_160, LP_161, LP_162, LP_163, LP_164, LP_165, LP_166, LP_167, LP_168. (LP: Lamia Project), * LP=Lamia Project

Το σύνολο των γενετικών αποτυπωμάτων των βακτηρίων όπως προέκυψαν με τη μέθοδο ger-PCR, αναλύθηκαν με το πρόγραμμα BioNumerics με στόχο την ομαδοποίηση και κατασκευή του φυλογενετικού δενδρογράμματος. Με τη χρήση του αλγορίθμου UPGMA έγινε ομαδοποίηση 230 στελεχών σε ένα φυλογενετικό δέντρο, βάσει του συντελεστή ομοιότητας Dice. Τόσο τα δείγματα των ζυμώσεων με την εναρκτήρια καλλιέργεια *Lb. pentosus* όσο και αυτά με την καλλιέργεια *Lb. plantarum*, ομαδοποιήθηκαν σε ένα ενιαίο φυλογενετικό δέντρο (Εικόνα 14-16) καθώς, όπως θα δούμε στη συνέχεια, δεν ήταν δυνατή η διάκριση των δειγμάτων

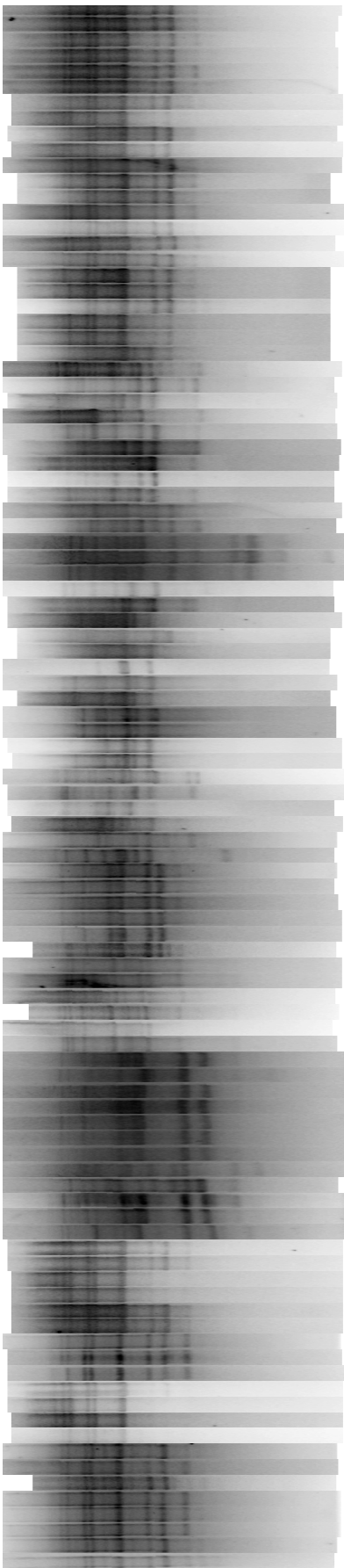
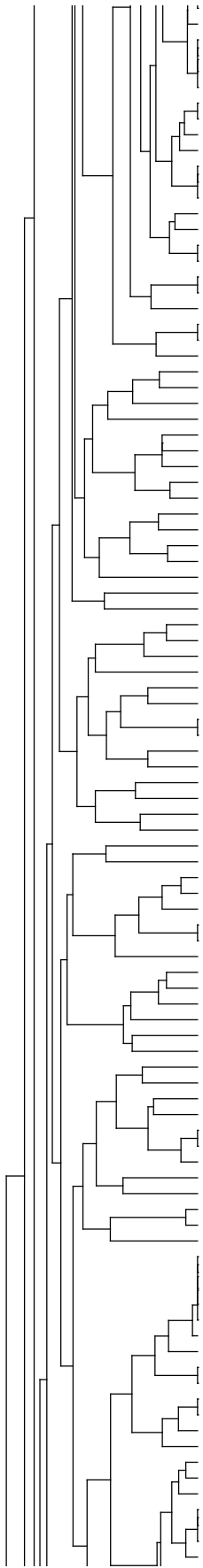
κατά την ταυτοποίηση τους μεταξύ των δύο αυτών ειδών. Αντίθετα, όσα από τα δείγματα ανήκαν σε ένα από τα δύο είδη, ταυτοποιήθηκαν από κοινού ως στελέχη του *Lb. plantarum* group. Όπως είναι διακριτό στο δενδρόγραμμα, τα γενετικά προφίλ των επιλεγμένων στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων (κυκλωμένοι κωδικοί) δεν ταυτίζονται με τις απομονώσεις και δε φαίνεται να έχουν επαρκή φυλογενετική συγγένεια ώστε να επιβεβαιωθεί η επιβίωση των εναρκτήριων καλλιεργειών κατά τη συντήρηση του καρπού.

GTGS

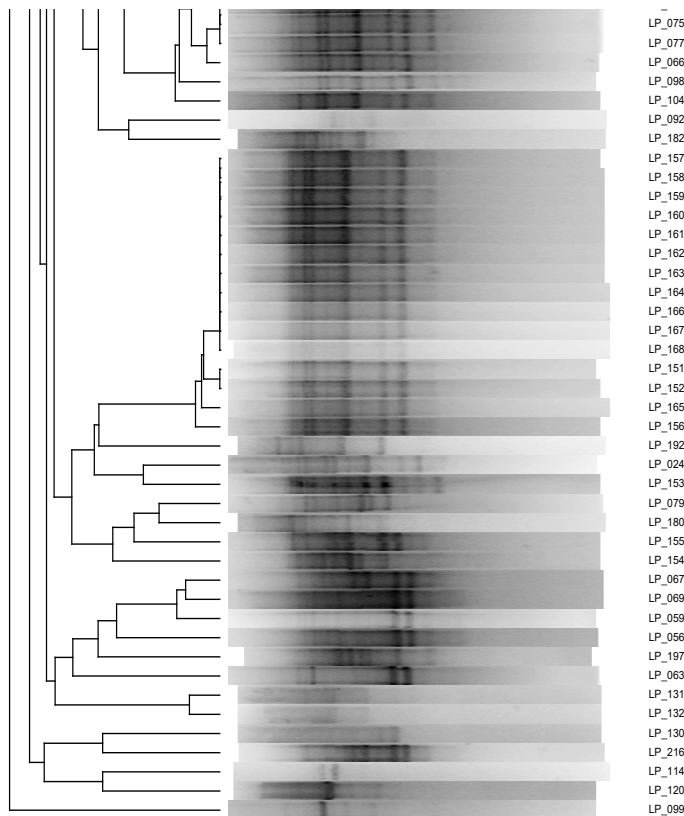
GTGS



- LP_126
- LP_199
- LP_124
- LP_214
- LP_127
- LP_207
- LP_211
- LP_998
- LP_219
- LP_007
- LP_089
- LP_999
- LP_008
- LP_119
- LP_188
- LP_070
- LP_084
- LP_090
- LP_100
- LP_202
- LP_212
- LP_050
- LP_085
- LP_086
- LP_091
- LP_094
- LP_020
- LP_062
- LP_195
- LP_087
- LP_117
- LP_093
- LP_019
- LP_143
- LP_147
- LP_145
- LP_133
- LP_134
- LP_135
- LP_136
- LP_137
- LP_138
- LP_139
- LP_140
- LP_144
- LP_141
- LP_146
- LP_148
- LP_149
- LP_150
- LP_142
- LP_222
- LP_223
- LP_082
- LP_083
- LP_221
- LP_224
- LP_128
- LP_129
- LP_123
- LP_125
- LP_217
- LP_088
- LP_220
- LP_218
- LP_065
- LP_096
- LP_039
- LP_044
- LP_038
- LP_045
- LP_046
- LP_052
- LP_229
- LP_228
- LP_227
- LP_209
- LP_048
- LP_049
- LP_051
- LP_028
- LP_080
- LP_081
- LP_071
- LP_076
- LP_225
- LP_171
- LP_172
- LP_173
- LP_175
- LP_040
- LP_047
- LP_043
- LP_041
- LP_029
- LP_031



- LP_043
- LP_041
- LP_029
- LP_031
- LP_034
- LP_037
- LP_189
- LP_190
- LP_170
- LP_191
- LP_033
- LP_196
- LP_198
- LP_036
- LP_057
- LP_026
- LP_054
- LP_200
- LP_201
- LP_194
- LP_203
- LP_204
- LP_206
- LP_042
- LP_061
- LP_169
- LP_027
- LP_021
- LP_074
- LP_122
- LP_115
- LP_118
- LP_032
- LP_053
- LP_010
- LP_018
- LP_011
- LP_002
- LP_121
- LP_174
- LP_210
- LP_208
- LP_097
- LP_016
- LP_205
- LP_058
- LP_060
- LP_213
- LP_215
- LP_055
- LP_113
- LP_116
- LP_184
- LP_064
- LP_102
- LP_072
- LP_101
- LP_105
- LP_107
- LP_109
- LP_231
- LP_030
- LP_035
- LP_025
- LP_226
- LP_022
- LP_023
- LP_009
- LP_013
- LP_006
- LP_012
- LP_005
- LP_015
- LP_014
- LP_017
- LP_103
- LP_001
- LP_003
- LP_004
- LP_178
- LP_179
- LP_181
- LP_183
- LP_186
- LP_187
- LP_078
- LP_111
- LP_112
- LP_176
- LP_177
- LP_185
- LP_193
- LP_068
- LP_106
- LP_230
- LP_073
- LP_075
- LP_077
- LP_066



Διάγραμμα 1. Φυλογενετικό δέντρο στο οποίο απεικονίζεται η ομαδοποίηση 228 στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων απομονωμένων από φυσική μαύρη Κονσερβολιά, η οποία προηγουμένως ζυμώθηκε με τη χρήση της καλλιέργειας εκκίνησης του στελέχους *L. pentosus* και *L. plantarum*, ανάλογα με το προφίλ που προέκυψε από τη ger-PCR. Με πράσινο είναι κυκλωμένα τα προφίλ που έδωσαν οι εναρκτήριες καλλιέργειες με κωδικούς LP_998 και LP_999 αντίστοιχα.

4.5.2 Ταυτοποίηση στελεχών

Έπειτα από την ομαδοποίηση των βακτηριακών απομονώσεων με το πρόγραμμα Bionumerics, επιλέχθηκαν 5-7 αντιπροσωπευτικά στελέχη από κάθε διαφορετική συστάδα (cluster) για να σταλούν προς αλληλούχιση. Η κάθε συστάδα αποτελούταν από δείγματα με τουλάχιστον 80% ομοιότητα. Συνολικά στάλθηκαν 61 δείγματα. Για την ταυτοποίηση των βακτηρίων ενισχύθηκε το γονίδιο 16S, μέσω της δοκιμής PCR (Εικόνα 14). Η ταυτοποίηση των βακτηρίων με βάση τα αποτελέσματα αλληλούχισης του γονιδίου 16S rDNA πραγματοποιήθηκε με σύγκριση με αλληλουχίες της βάσης δεδομένων BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) του NCBI (National Center for Biotechnology Information) ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)). Οι μικροοργανισμοί ταυτοποιήθηκαν σε επίπεδο είδους με ομοιότητα ακολουθιών από 97% έως 100% (Πίνακας 7 - Παράρτημα). Η

διαφοροποίηση μεταξύ των ειδών που ανήκουν στο *Lb. plantarum* group ήταν δυσχερής λόγω της ιδιαίτερα αυξημένης φυλογενετικής συγγένειάς τους. Εξαιτίας του θορύβου που προέκυψε κατά την αλληλούχιση σε ορισμένες περιπτώσεις, κατάφεραν να ταυτοποιηθούν 211 από τις 228 απομονώσεις.

Εικόνα 14: Πηκτή ηλεκτροφόρησης προϊόντων της 16S-rDNA PCR για 14 από τα 61 βακτηριακά στελέχη που επιλέχθηκαν να σταλούν προς αλληλούχιση. Η πρώτη στήλη αποτελεί τον μάρτυρα μοριακής μάζας (Ladder 1Kbp). Οι κωδικοί των στελεχών με τη σειρά είναι: LP_158, LP_165, LP_192, LP_153, LP_079, LP_155, LP_154, LP_059, LP_131, LP_130, LP_216, LP_114, LP_120, LP_099.

Τα στελέχη επιλέχθηκαν με τέτοιο τρόπο, έτσι ώστε να αντιπροσωπεύουν ικανοποιητικά τη μικροχλωρίδα των δειγμάτων επιτραπέζιας ελιάς, για τις περιπτώσεις των ζυμώσεων όπου εφαρμόστηκε εναρκτήρια καλλιέργεια. Συνεπώς, οι παρατηρήσεις και τα ποσοστά που θα περιγραφούν στη συνέχεια για αυτά τα επιμέρους στελέχη, ανταποκρίνονται και στο σύνολο της μικροβιακής βιοποικιλότητας των δειγμάτων, όπως καταγράφηκε στο δεύτερο μήνα της συντήρησής τους (ημέρα 60).

Συνολικά παρατηρήθηκαν 9 διαφορετικά είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων, 7 από τα οποία ανήκουν στο γένος *Lactobacillus* και 2 στο γένος *Pediococcus*. Πιο αναλυτικά, αναγνωρίστηκαν τα είδη *Lactobacillus buchneri*, *Lb. coryniformis*, *Lb. harbinensis*, *Lb. namurensis*, *Lb. vaccinostercus*, οι ομάδες *Lb. casei* group και *Lb. plantarum* group, καθώς επίσης και τα είδη *Pediococcus ethanolidurans*, *Pd.*

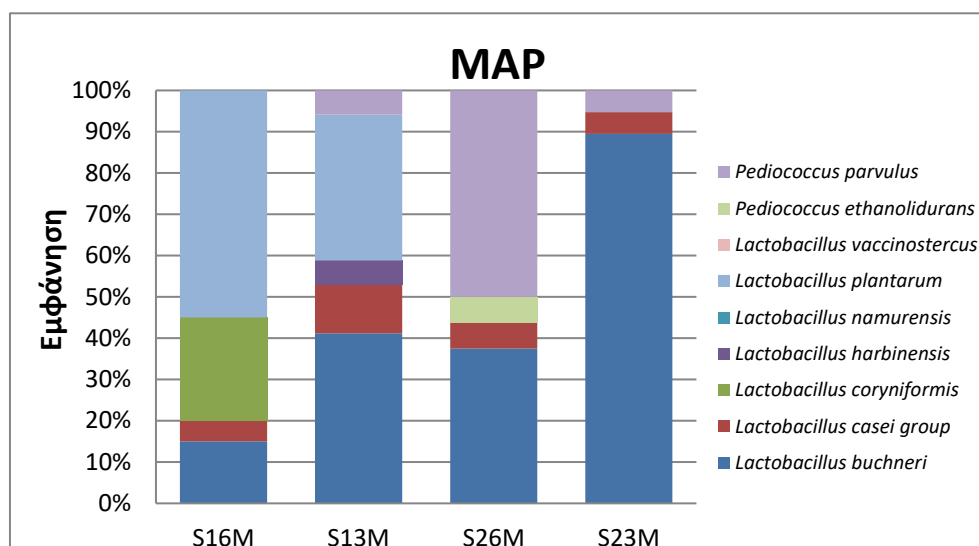
parvulus. Δυστυχώς, η επιβίωση των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν ως καλλιέργειες εκκίνησης ήταν μηδενική, με τις επιβεβαιωμένες περιπτώσεις που ανήκουν στο *Lb. plantarum group* να ανέρχονται μόλις σε 27 από τις 211 επί του συνόλου των δειγμάτων (12,8%).

Το είδος που κυριάρχησε με μεγάλη διαφορά είναι το *Lb. buchneri*, το οποίο ταυτοποιήθηκε σε περισσότερες από τις μισές περιπτώσεις των στελεχών που αναλύθηκαν (134/211 ή 63,5%). Το βακτήριο του είδους *Lb. buchneri* αποτελούνται από ακίνητες ράβδους και παρατηρούνται ως μεμονομένες ράβδοι ή σε μικρές αλυσίδες (Felis et al. 2014). Το είδος αυτό είναι ευρέως διαδεδομένο στη φύση, με στελέχη του να έχουν απομονωθεί από ζυμούμενα προϊόντα σόργου, κρασί, βύνη μύρας, πολτό ντομάτας, ελβετικό τυρί και από το ανθρώπινο πεπτικό σύστημα (Daughtry et al. 2018). Χαρακτηρίζεται ως προαιρετικά αναερόβιο και υποχρεωτικά ετεροζυμωτικό, συνεπώς παράγει τόσο γαλακτικό, όσο και οξικό οξύ (Heinl et al. 2017). Το *Lb. buchneri* ανήκει στην ευρωπαϊκή λίστα QPS, μιας και όλα τα στελέχη που έχουν αποδοθεί στο είδος θεωρούνται ασφαλή (Feichtinger et al. 2016). Παρά το σχετικά μικρό σε μέγεθος γενετικό υλικό που διαθέτει, μπορεί να αναπτυχθεί σε περιβάλλον όπου συνυπάρχει ανταγωνιστική μικροχλωρίδα, ενώ ακόμα είναι ανθεκτικό στην παρουσία οξυγόνου, σε υψηλές συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος ή αιθανόλης και σε χαμηλό pH (Heinl et al. 2017). Αυτά τα στοιχεία του μικροοργανισμού ίσως να μπορούν να αιτιολογήσουν σε κάποιον βαθμό την επιβίωση και επικράτηση του στο ιδιαίτερα απαιτητικό περιβάλλον της επιτραπέζιας ελιάς κατά τη ζύμωση. Παρόλα αυτά, η επικράτηση του *Lb. buchneri* στη μικροχλωρίδα της επιτραπέζιας ελιάς μετά και από το στάδιο της ζύμωσης, δεν είναι κάτι που έχει παρατηρηθεί να συμβαίνει συχνά. Ειδικά σε μελέτες όπου εφαρμόζονται καλλιέργειες εκκίνησης με στελέχη των *Lb. pentosus* και *Lb. plantarum*, τα κατεξοχήν κυρίαρχα είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων στη ζύμωση της επιτραπέζιας ελιάς (Hurtado et al. 2012), δε φαίνεται να υπάρχουν περιπτώσεις που να καταγράφουν την επικράτηση του *Lb. buchneri*. Στην παρούσα μελέτη, τα οξυγαλακτικά βακτήρια *Lb. pentosus* B363 και *Lb. plantarum* B380 δεν κατάφεραν να κυριαρχήσουν κατά την συσκευασία του ελαιοκάρπου σε εύκαμπτους πολυστρωματικούς περιέκτες και στη μετέπειτα συντήρηση του τελικού προϊόντος,

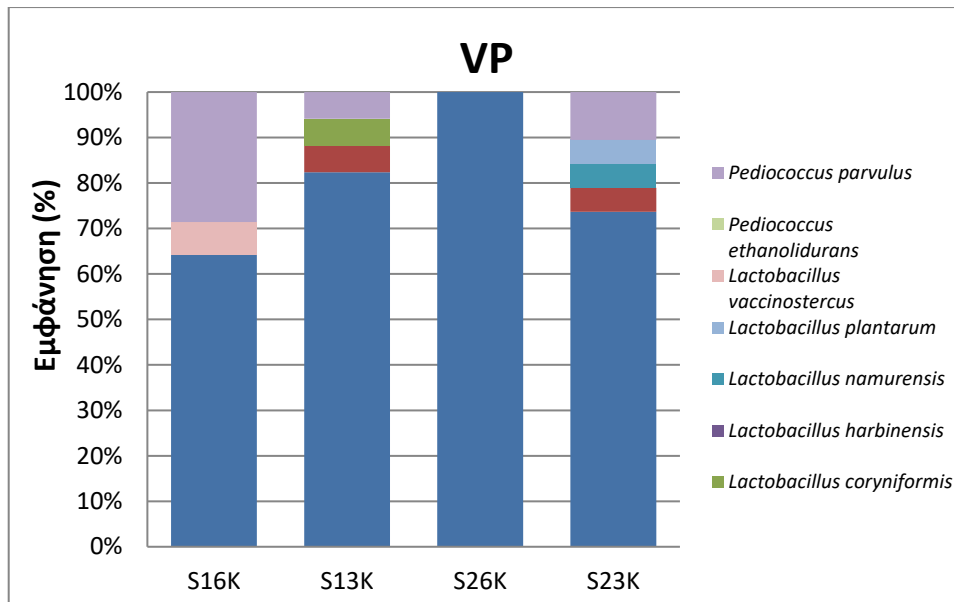
παρά το γεγονός ότι προστέθηκαν σε υψηλή συγκέντρωση στην έναρξη της ζύμωσης και επιβίωσαν σε υψηλό ποσοστό μετά την ολοκλήρωση της ζύμωσης.

Στα ίδια περίπου νούμερα με τις περιπτώσεις που ταυτοποιήθηκαν ως στελέχη του *Lb. plantarum group*, κυμάνθηκαν και αυτές για το *Pediococcus parvulus* (11,4%). Η εμφάνιση του μικροοργανισμού αυτού στη μικροχλωρίδα της επιτραπέζιας ελιάς διαφόρων ποικιλιών, έχει καταγραφεί σε αρκετές περιπτώσεις στο παρελθόν (Franzetti et al. 2011, Lucena-Padrós et al. 2014b, Randazzo et al. 2017). Συνήθως, το είδος αυτό σημειώνει σε αυτές τις μελέτες το μεγαλύτερο ποσοστό μεταξύ των υπόλοιπων παρατηρούμενων κόκκων που παρατηρούνται έως και το τελικό στάδιο της ζύμωσης. Το 2016 μπήκε στην ευρωπαϊκή λίστα QPS, καθώς δεν παρατηρήθηκε να ευθύνεται για τοξικούς παράγοντες ή για κάποια μορφή παθογένειας στον άνθρωπο και τα ζώα (Porto et al. 2017). Τα υπόλοιπα είδη ή φυλογενετικές ομάδες οξυγαλακτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν, κυμάνθηκαν σε μικρότερα επίπεδα, με ποσοστά που ξεπεράσαν το 6% για κάθε είδος ξεχωριστά).

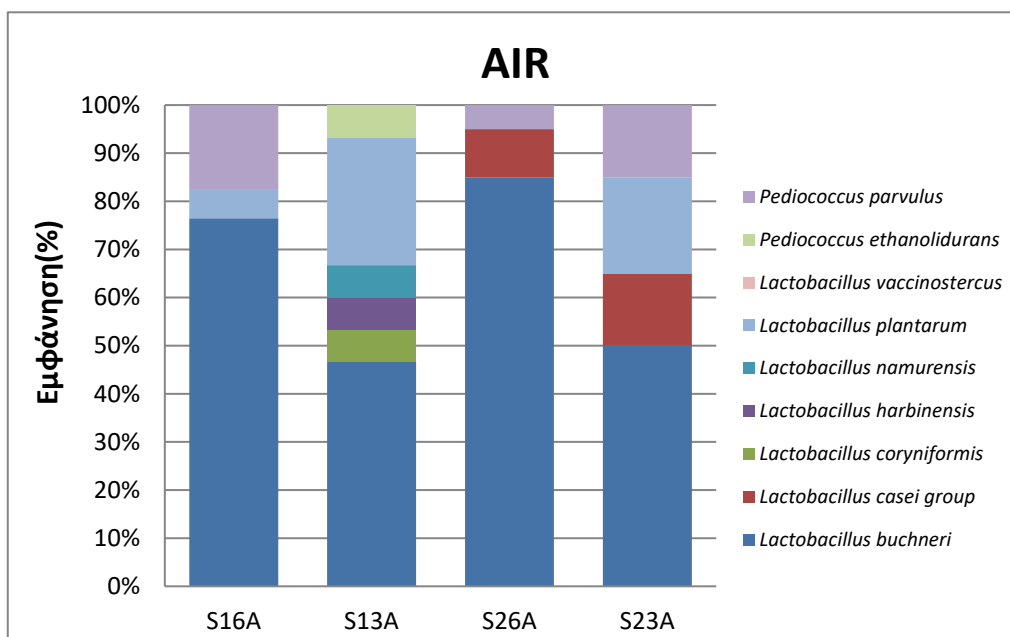
Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης των δειγμάτων, σχετικά με το πώς αυτά κατανεμήθηκαν για τις διαφορετικές περιπτώσεις ζύμωσης και αλατότητας σε ένα συγκεκριμένο τύπο συσκευασίας.



Διάγραμμα 2. Συχνότητα απομόνωσης (%) των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε δείγματα φυσικής μαύρης Κονσερβολιάς κατά το δεύτερο μήνα συντήρησης σε συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας (MAP), τα οποία ζυμώθηκαν με τις καλλιέργειες εκκίνησης *Lb. pentosus* B363 (S1), *Lb. plantarum* B380 (S2), σε συνθήκες αλατότητας 6% NaCl (6), 3% NaCl – 3% KCl (3).



Διάγραμμα 3. Συχνότητα απομόνωσης (%) των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε δείγματα φυσικής μαύρης Κονσερβολιάς κατά το δεύτερο μήνα συντήρησής τους σε συσκευασίες υπό κενό (VP), τα οποία ζυμώθηκαν με τις καλλιέργειες εκκίνησης *Lb. pentosus* B363 (S1), *Lb. plantarum* B380 (S2), σε συνθήκες αλατότητας 6% NaCl (6), 3% NaCl – 3% KCl (3).



Διάγραμμα 4. Συχνότητα απομόνωσης (%) των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε δείγματα φυσικής μαύρης Κονσερβολιάς κατά το δεύτερο μήνα συντήρησής τους σε αερόβιες συσκευασίες (AIR), τα οποία ζυμώθηκαν με τις καλλιέργειες εκκίνησης *Lb. pentosus* B363 (S1), *Lb. plantarum* B380 (S2), σε συνθήκες αλατότητας 6% NaCl (6), 3% NaCl – 3% KCl (3).

Όπως μπορούμε να συμπεράνουμε από τα παραπάνω Διαγράμματα 2 – 4, τα στελέχη της φυλογενετικής ομάδας *Lb. plantarum group* ανιχνεύτηκαν κατά κύριο λόγο στα δείγματα της ελιάς που ζυμώθηκαν με την καλλιέργειας εκκίνησης *Lb. pentosus* B363 (S1). Στις περιπτώσεις των δειγμάτων που ζυμώθηκαν με την καλλιέργειας εκκίνησης *Lb. plantarum* B380, σημειώθηκαν μόνο 5 από τα 22 αποτυπώματα της ομάδας *Lb. plantarum group*.

Όσον αφορά την κατανομή των στελεχών αυτής της φυλογενετικής ομάδας ανά είδος συσκευασίας, παρατηρείται ότι οι περισσότερες απομονώσεις βρέθηκαν στις συσκευασίες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (17/27) (Διάγραμμα 2). Ειδικότερα, στην περίπτωση S16M, τα στελέχη της συγκεκριμένης ομάδας υπερέβησαν σε ποσοστό το 50% των συνολικών ταυτοποιημένων απομονώσεων. Ο εν λόγω χειρισμός ήταν και η μοναδική περίπτωση όπου η συγκεκριμένη ομάδα οξυγαλακτικών βακτηρίων κατέγραψε μεγαλύτερο ποσοστό συγκριτικά με το βακτήριο *Lb. buchneri*. Σημειώνεται ακόμα πως τα στελέχη της φυλογενετικής ομάδας *Lb. plantarum group* που ταυτοποιήθηκαν στην περίπτωση των συσκευασιών MAP, προήλθαν στο σύνολό τους μόνο από δείγματα που είχαν εμβολιαστεί με την καλλιέργεια εκκίνησης *Lb. pentosus* B363 (S1).

Στις συσκευασίες υπό κενό (Διάγραμμα 3), η επιβίωση του *Lb. plantarum group* ανιχνεύθηκε σχεδόν σε μηδενικό επίπεδο, σημειώνοντας μόνο μία περίπτωση από τα 67 στο σύνολο στελέχη που ταυτοποιήθηκαν.

Στο Διάγραμμα 4, απεικονίζονται τα αποτελέσματα για τις συσκευασίες υπό αερόβιες συνθήκες, όπου βρέθηκαν οι υπόλοιπες 9 περιπτώσεις. Η πλειοψηφία των στελεχών (8/9) παρατηρήθηκε σε δείγματα που ζυμώθηκαν σε συνθήκες αλατότητας 3% NaCl – 3% KCl, σε αντίθεση με τις συσκευασίες MAP όπου υπήρχε σημαντικός αριθμός και στις δύο περιπτώσεις αλατότητας.

Στα Διαγράμματα 2-4 παρατηρούμε ακόμα πως από τις 12 διαφορετικές περιπτώσεις συσκευασιών και συνθηκών αλατότητας που μελετήθηκαν σε μοριακό επίπεδο, μόλις στις 5 η παρουσία του *Lb. buchneri* δεν ξεπέρασε το 50%. Αξίζει να σημειωθεί πως πλην μιας από αυτές τις 5 περιπτώσεις (S26M), παρατηρήθηκε και σημαντική εμφάνιση στελεχών του *Lb. plantarum group*. Δηλαδή, σε κάθε σχεδόν περίπτωση που δεν εμφανίστηκαν υψηλά ποσοστά του *Lb. buchneri*, έγινε σημαντική καταγραφή από στελέχη του *Lb. plantarum group*. Λαμβάνοντας αυτό

υπόψη, είναι πιθανό η μικρή επιβίωση που σημείωσαν οι καλλιέργειες εκκίνησης να οφείλεται στον ανταγωνισμό με στελέχη του είδους *Lb. buchneri* και εν τέλη στην επικράτηση των τελευταίων εις βάρος τους.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Εν κατακλείδι, οι πολυστρωματικοί περιέκτες με χρήση τροποποιημένης ατμόσφαιρας κατάφεραν να διατηρήσουν σταθερή την αρχική, επιθυμητή αναλογία των αερίων (30% CO₂ και 70% N₂) για μεγάλο χρονικό διάστημα και γι' αυτό κρίνονται κατάλληλοι για να εφαρμοστούν ως μια αξιόπιστη μέθοδος συσκευασίας της φυσικής μαύρης ελιάς. Η ζύμωση των δειγμάτων τόσο με την αυτόχθονη μικροχλωρίδα όσο και με την εφαρμογή των καλλιεργειών εκκίνησης *Lb. pentosus* B363, *Lb. plantarum* B380 που προηγήθηκε, δε φάνηκε να επηρέασαν σημαντικά τη μεταβολή των κύριων ομάδων μικροοργανισμών που μελετήθηκαν (ΟΜΧ, οξυγαλακτικά βακτήρια, ζύμες, εντεροβακτήρια) ή των φυσικοχημικών παραμέτρων (pH, ολική ογκομετρούμενη οξύτητα), κατά τη διάρκεια συντήρησης των δειγμάτων. Σε όλη τη διάρκεια της συντήρησης κυριάρχησαν τα οξυγαλακτικά βακτήρια, με τα επίπεδα του πληθυσμού τους να κυμαίνονται περίπου σε 6,0 log CFU/g κατά μέσο όρο. Αντίθετα, ο πληθυσμός των ζυμών παρέμεινε σε πολύ χαμηλές τιμές και έφτασε σε ανιχνεύσιμα επίπεδα μόνο για ένα περιορισμένο χρονικό διάστημα (ημέρα 120-180) και σχεδόν αποκλειστικά στις συσκευασίες κενού. Τα εντεροβακτήρια παρέμειναν σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα καθ' όλη τη διάρκεια συντήρησης των δειγμάτων. Η μερική υποκατάσταση του κοινού αλατιού (3% NaCl – 3% KCl) που εφαρμόστηκε για τη ζύμωση ενός υποσυνόλου των δειγμάτων, δε φάνηκε να επηρεάζει καθόλου τη μεταβολή των μικροβιολογικών και φυσικοχημικών τους χαρακτηριστικών. Αυτό αποτελεί μια θετική ένδειξη προς την υιοθέτηση ενός τρόπου για τη μείωση της πρόσληψης νατρίου από την κατανάλωση επιτραπέζιας ελιάς, δεδομένου σαφώς πως δε θα επιφέρει δυσμενείς επιπτώσεις στα οργανοληπτικά της χαρακτηριστικά. Από τη μοριακή ανάλυση των δειγμάτων προέκυψε σχεδόν μηδενική επιβίωση των καλλιεργειών εκκίνησης *Lb. pentosus* B363, *Lb. plantarum* B380, γεγονός που πιθανόν να οφείλεται στον ανταγωνισμό με το βακτήριο *Lb. buchneri* και την επικράτηση του συγκεκριμένου μικροοργανισμού στο τέλος της ζύμωσης. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί πως από τα στελέχη που ταυτοποιήθηκαν στο *Lb. plantarum group*, η μεγάλη τους πλειοψηφία προήλθε από τις περιπτώσεις των δειγμάτων που ζυμώθηκαν με την καλλιέργεια εκκίνησης *Lb. pentosus* B363 (S1).

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Anadón, A., Martínez-Larrañaga, M. R., Arés, I., & Martínez, M. A. (2016). Prebiotics and probiotics: An assessment of their safety and health benefits. *Probiotics, prebiotics, and synbiotics: Bioactive Foods in Health Promotion*, 1, 3.
- Anagnostopoulos, D. A., & Tsaltas, D. (2019). Fermented Foods and Beverages. In *Innovations in Traditional Foods* (pp. 257-291). Woodhead Publishing.
- Argyri, A. A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K. A. G., Tsakalidou, E., Nychas, G. J. E., Panagou, E. Z., & Tassou, C. C. (2013). Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. *Food Microbiology*, 33(2), 282-291.
- Argyri, A. A., Nisiotou, 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 of Food Microbiology*, 171, 68-76.
- Argyri, A. A., Panagou, E. Z., & Tassou, C. C. (2016). Probiotics from the olive microbiota. *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics. Bioactive Foods in Health Promotion*, 371-389.
- Ariani, A., Vincenzetti, S., & Polidori, P. (2019). Nutritional Properties of Table Olives and Their Use in Cocktails. In *Nutrients in Beverages* (pp. 509-541). Academic Press.
- Arroyo-López, F. N., Querol, A., Bautista-Gallego, J., & Garrido-Fernández, A. (2008). Role of yeasts in table olive production. *International Journal of Food Microbiology*, 128(2), 189-196.
- Arroyo-López, F. N., Romero-Gil, V., Bautista-Gallego, J., Rodríguez-Gómez, F., Jiménez-Díaz, R., García-García, P., Querol, A., & Garrido-Fernández, A. (2012). Yeasts in table olive processing: desirable or spoilage microorganisms? *International Journal of Food Microbiology*, 160(1), 42-49.
- Bautista-Gallego, J., Arroyo-López, F. N., Rantsiou, K., Jiménez-Díaz, R., Garrido-Fernández, A., & Cocolin, L. (2013). Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented table olives with probiotic potential. *Food Research International*, 50(1), 135-142.
- Berrueta, L. A., Alonso-Salces, R. M., & Héberger, K. (2007). Supervised pattern recognition in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 1158(1-2), 196-214.
- Bevilacqua, A., Altieri, C., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., & Ouoba, L. I. I. (2010). Characterization of lactic acid bacteria isolated from Italian Bella di Cerignola

- table olives: selection of potential multifunctional starter cultures. *Journal of Food Science*, 75(8), M536-M544.
- Blana, V. A., Grounta, A., Tassou, C. C., Nychas, G. J. E., & 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 Microbiology*, 38, 208-218.
- Blana, V. A., Polymeneas, N., Tassou, C. C., & Panagou, E. Z. (2016). Survival of potential probiotic lactic acid bacteria on fermented green table olives during packaging in polyethylene pouches at 4 and 20 C. *Food Microbiology*, 53, 71-75.
- Bonatsou, S., Karamouza, M., Zoumpopoulou, G., Mavrogonatou, E., Kletsas, D., Papadimitriou, K., Tsakalidou, E., Nychas, G. J. E., & Panagou, E. Z. (2018). Evaluating the probiotic potential and technological characteristics of yeasts implicated in cv. Kalamata natural black olive fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 271, 48-59.
- Boskou, D. (2006). Characteristics of the olive tree and olive fruit. In *Olive Oil* (pp. 13-19). AOCS Press.
- Boskou, D., Camposeo, S., & Clodoveo, M. L. (2015). Table olives as sources of bioactive compounds. In *Olive and Olive Oil Bioactive Constituents* (pp. 217-259). AOCS Press.
- Botta, C., Langerholc, T., Cencič, A., & Cocolin, L. (2014). In vitro selection and characterization of new probiotic candidates from table olive microbiota. *PLoS One*, 9(4).
- Canene-Adams, K. (2013). General PCR. In *Methods in Enzymology* (Vol. 529, pp. 291-298). Academic Press.
- Chranioti, C., Kotzekidou, P., & Gerasopoulos, D. (2018). Effect of starter cultures on fermentation of naturally and alkali-treated cv. Conservolea green olives. *LWT-Food Science and Technology*, 89, 403-408.
- Cissé, H., Kagambèga, B., Sawadogo, A., Tankoano, A., Sangaré, G., Traoré, Y., ... & Savadogo, A. (2019). Molecular characterization of *Bacillus*, lactic acid bacteria and yeast as potential probiotic isolated from fermented food. *Scientific African*, 6, e00175.
- Cocolin, L., & Ercolini, D. (Eds.). (2007). *Molecular techniques in the microbial ecology of fermented foods*. Springer Science & Business Media.
- Corsetti, A., Valmorri, S. (2011). Lactic acid bacteria | *Lactobacillus* spp.: *Lactobacillus plantarum*. In: Fuquay JW (ed) *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Second edn. Academic Press, San Diego, pp 111–118.

- Corsetti, A., Perpetuini, G., Schirone, M., Tofalo, R., & Suzzi, G. (2012). Application of starter cultures to table olive fermentation: an overview on the experimental studies. *Frontiers in Microbiology*, *3*, 248.
- Crisosto, C. H., Ferguson, L., & Nanos, G. (2011). Olive (*Olea europaea* L.). In *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits* (pp. 63-87e). Woodhead Publishing.
- Daughtry, K. V., Johanningsmeier, S. D., Sanozky-Dawes, R., Klaenhammer, T. R., & Barrangou, R. (2018). Phenotypic and genotypic diversity of *Lactobacillus buchneri* strains isolated from spoiled, fermented cucumber. *International Journal of Food Microbiology*, *280*, 46-56.
- De Angelis, M., Campanella, D., Cosmai, L., Summo, C., Rizzello, C. G., & Caponio, F. (2015). Microbiota and metabolome of un-started and started Greek-type fermentation of Bella di Cerignola table olives. *Food Microbiology*, *52*, 18-30.
- de Siqueira Oliveira, L., Eça, K. S., de Aquino, A. C., & da Silva, L. M. R. (2020). Modified and controlled atmosphere packaging. In *Fresh-Cut Fruits and Vegetables* (pp. 151-164). Academic Press.
- Değirmenciöğlü, N. (2011). Influence of temperature and modified atmosphere on the microbial profile of packed Gemlik dry-salted olives. *Journal of Food Safety*, *31*(1), 115-124.
- Değirmenciöğlü, N. (2016). Modern techniques in the production of table olives. *Products from Olive Tree*, 215.
- Devi, S. M., Aishwarya, S., & Halami, P. M. (2016). Discrimination and divergence among *Lactobacillus plantarum* Group (LPG) isolates with reference to their probiotic functionalities from vegetable origin. *Systematic and Applied Microbiology*, *39*(8), 562-570.
- Devi, S. M., & Halami, P. M. (2019). Genetic Variation of pln Loci Among Probiotic *Lactobacillus plantarum* Group Strains with Antioxidant and Cholesterol-Lowering Ability. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, *11*(1), 11-22.
- Dolci, P., Alessandria, V., Rantsiou, K., & Cocolin, L. (2015). Advanced methods for the identification, enumeration, and characterization of microorganisms in fermented foods. In *Advances in Fermented Foods and Beverages* (pp. 157-176). Woodhead Publishing.
- Doulgeraki, A. I., Paramithiotis, S., & Nychas, G. J. E. (2011). Characterization of the Enterobacteriaceae community that developed during storage of minced beef under aerobic or modified atmosphere packaging conditions. *International Journal of Food Microbiology*, *145*(1), 77-83.

- Doulgeraki, A. I., Hondrodinou, O., Iliopoulos, V., & Panagou, E. Z. (2012). Lactic acid bacteria and yeast heterogeneity during aerobic and modified atmosphere packaging storage of natural black Conservolea olives in polyethylene pouches. *Food Control*, 26(1), 49-57.
- Feichtinger, M., Mayrhofer, S., Kneifel, W., & Domig, K. J. (2016). Tetracycline resistance patterns of *Lactobacillus buchneri* group strains. *Journal of Food Protection*, 79(10), 1741-1747.
- Figueroa, C. J., Tang, Y. W., & Taur, Y. (2015). Principles and Applications of Genomic Diagnostic Techniques. In *Molecular Medical Microbiology* (pp. 381-397). Academic Press.
- Foerst, P., & Santivarangkna, C. (2015). Advances in starter culture technology: focus on drying processes. In *Advances in Fermented Foods and Beverages* (pp. 249-270). Woodhead Publishing.
- Franzetti, L., Scarpellini, M., Vecchio, A., & Planeta, D. (2011). Microbiological and safety evaluation of green table olives marketed in Italy. *Annals of Microbiology*, 61(4), 843-851.
- Garrido Fernandez, A., Fernández Díez, M. J., & Adams, M. R. (1997). Physical and chemical characteristics of the olive fruit. *Table Olives*. Chapman & Hall, London, United Kingdom, 67-109.
- Gevers, D., Huys, G., & Swings, J. (2001). Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters*, 205(1), 31-36.
- Heinl, S., & Grabherr, R. (2017). Systems biology of robustness and flexibility: *Lactobacillus buchneri*—a show case. *Journal of Biotechnology*, 257, 61-69.
- Hepkan, D. (2013). Microbiota of table olive fermentations and criteria of selection for their use as starters. *Frontiers in Microbiology*, 4, 143.
- Hotel, A. C. P., & Cordoba, A. (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. *Prevention*, 5(1), 1-10.
- Hurtado, A., Reguant, C., Bordons, A., & Rozès, N. (2012). Lactic acid bacteria from fermented table olives. *Food Microbiology*, 31(1), 1-8.
- IOOC. 2004. Trade Standard Applying to Table Olives, COI/OT/NC No. 1, Resolution No. RES-2/91-IV/04.
- Irtwange, S. V. (2006). Application of modified atmosphere packaging and related technology in postharvest handling of fresh fruits and vegetables. *Agricultural Engineering International: CIGR Journal*.

- Jalali, M., Zaborowska, J., & Jalali, M. (2017). The polymerase chain reaction: PCR, qPCR, and RT-PCR. In *Basic Science Methods for Clinical Researchers* (pp. 1-18). Academic Press.
- Kailis, S., & Harris, D. J. (2007). *Producing table olives*. Landlinks Press.
- Klančnik, A., Kovač, M., Toplak, N., Piskernik, S., & Jeršek, B. (2012). PCR in food analysis. *Polymerase Chain Reaction. In tech. p*, 195-220.
- Kermanshahi, R. K., & Peymanfar, S. (2012). Isolation and identification of *lactobacilli* from cheese, yoghurt and silage by 16S rDNA gene and study of bacteriocin and biosurfactant production.
- Křížová, J., Španová, A., & Rittich, B. (2008). RAPD and rep-PCR fingerprinting for characterization of *Bifidobacterium* species. *Folia Microbiologica*, 53(2), 99.
- Kumar, M., Nagpal, R., Hemalatha, R., Yadav, H., & Marotta, F. (2016). Probiotics and prebiotics for promoting health: through gut microbiota. *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics: Bioactive Foods in Health Promotion*, 938.
- Lavermicocca, P., Valerio, F., Lonigro, S. L., De Angelis, M., Morelli, L., Callegari, M. L., ... & Visconti, A. (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.*, 71(8), 4233-4240.
- Lavermicocca, P., Rossi, M., Russo, F., & Srirajaskanthan, R. (2010). Table olives: a carrier for delivering probiotic bacteria to humans. In *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention* (pp. 735-743). Academic Press.
- Lencki, R. W. (2014). Modified Atmosphere Packaging, for Minimally Processed Foods. In *Emerging Technologies for Food Processing* (pp. 613-628). Academic Press.
- Levin, R. E., Ekezie, F. G. C., & Sun, D. W. (2018). DNA-based technique: Polymerase chain reaction (PCR). In *Modern Techniques for Food Authentication* (pp. 527-616). Academic Press.
- López-López, A., Bautista-Gallego, J., Moreno-Baquero, J. M., & Garrido-Fernández, A. (2016). Fermentation in nutrient salt mixtures affects green Spanish-style Manzanilla table olive characteristics. *Food Chemistry*, 211, 415-422.
- Lucena-Padrós, H., Caballero-Guerrero, B., Maldonado-Barragán, A., & Ruiz-Barba, J. L. (2014a). Microbial diversity and dynamics of Spanish-style green table-olive fermentations in large manufacturing companies through culture-dependent techniques. *Food Microbiology*, 42, 154-165.
- Lucena-Padrós, H., Caballero-Guerrero, B., Maldonado-Barragán, A., & Ruiz-Barba, J. L. (2014b). Genetic diversity and dynamics of bacterial and yeast strains

- associated to Spanish-style green table-olive fermentations in large manufacturing companies. *International Journal of Food Microbiology*, 190, 72-78.
- Lucena-Padrós, H., & Ruiz-Barba, J. L. (2019). Microbial biogeography of Spanish-style green olive fermentations in the province of Seville, Spain. *Food Microbiology*, 82, 259-268.
- Medina, E., de Castro, A., Romero, C., Ramírez, E. M., & Brenes, M. (2016). Safety of fermented fruits and vegetables. In *Regulating Safety of Traditional and Ethnic Foods* (pp. 355-367). Academic Press.
- Medina-Pradas, E., Pérez-Díaz, I. M., Garrido-Fernández, A., & Arroyo-López, F. N. (2017). Review of vegetable fermentations with particular emphasis on processing modifications, microbial ecology, and spoilage. In *The Microbiological Quality of Food* (pp. 211-236). Woodhead Publishing.
- Mohammed, M., Abd El-Aziz, H., Omran, N., Anwar, S., Awad, S., & El-Soda, M. (2009). Rep-PCR characterization and biochemical selection of lactic acid bacteria isolated from the Delta area of Egypt. *International Journal of Food Microbiology*, 128(3), 417-423.
- Mushtaq, A., Hanif, M. A., Ayub, M. A., Bhatti, I. A., & Romdhane, M. (2020). Olive. In *Medicinal Plants of South Asia* (pp. 541-555). Elsevier.
- Nelson, W. M., Long, G. W., & Cockrell, L. M. (2014). Multiplexed, lateral flow, polymerase chain reaction (PCR) techniques for biological identification. In *Biological Identification* (pp. 54-68). Woodhead Publishing.
- Opara, U. L., Caleb, O. J., & Belay, Z. A. (2019). Modified atmosphere packaging for food preservation. In *Food Quality and Shelf Life* (pp. 235-259). Academic Press.
- Panagou, E. Z. (2004). Effect of different packing treatments on the microbiological and physicochemical characteristics of untreated green olives of the Conservolea cultivar. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(8), 757-764.
- Panagou, E. Z., & Tassou, C. C. (2006). Changes in volatile compounds and related biochemical profile during controlled fermentation of cv. Conservolea green olives. *Food Microbiology*, 23(8), 738-746.
- Panagou, E. Z., Schillinger, U., Franz, C. M., & Nychas, G. J. E. (2008). Microbiological and biochemical profile of cv. Conservolea naturally black olives during controlled fermentation with selected strains of lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, 25(2), 348-358.
- Peres, C. M., Peres, C., Hernández-Mendoza, A., & Malcata, F. X. (2012). Review on fermented plant materials as carriers and sources of potentially probiotic lactic acid bacteria—with an emphasis on table olives. *Trends in Food Science & Technology*, 26(1), 31-42.

- Peres, C. M., Peres, C., & Malcata, F. X. (2017). Role of Natural Fermented Olives in Health and Disease. In *Fermented Foods in Health and Disease Prevention* (pp. 517-542). Academic Press.
- Porto, M. C. W., Kuniyoshi, T. M., Azevedo, P. O. S., Vitolo, M., & Oliveira, R. P. D. S. (2017). *Pediococcus spp.*: an important genus of lactic acid bacteria and pediocin producers. *Biotechnology Advances*, 35(3), 361-374
- Pot, B., Felis, G. E., De Bruyne, K., Tsakalidou, E., Papadimitriou, K., Leisner, J., & Vandamme, P. (2014). The genus *Lactobacillus*. *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*, 249-353.
- Randazzo, C. L., Rajendram, R., & Caggia, C. (2010). Lactic acid bacteria in table olive fermentation. In *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention* (pp. 369-376). Academic Press.
- Randazzo, C. L., Todaro, A., Pino, A., Pitino, I., Corona, O., Mazzaglia, A., & Caggia, C. (2014). Giarraffa and Grossa di Spagna naturally fermented table olives: effect of starter and probiotic cultures on chemical, microbiological and sensory traits. *Food Research International*, 62, 1154-1164.
- Randazzo, C. L., Todaro, A., Pino, A., Pitino, I., Corona, O., & Caggia, C. (2017). Microbiota and metabolome during controlled and spontaneous fermentation of Nocellara Etna table olives. *Food Microbiology*, 65, 136-148.
- Rejano, L., Montaña, A., Casado, F. J., Sánchez, A. H., & de Castro, A. (2010). Table olives: varieties and variations. In *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention* (pp. 5-15). Academic Press.
- Rhizopoulou, S. (2007). *Olea europaea* L. A botanical contribution to culture. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 2(4), 382-387.
- Rodríguez-Gómez, F., Bautista-Gallego, J., Arroyo-López, F. N., Romero-Gil, V., Jiménez-Díaz, R., Garrido-Fernández, A., & García-García, P. (2013). Table olive fermentation with multifunctional *Lactobacillus pentosus* strains. *Food Control*, 34(1), 96-105.
- Rodríguez-Gómez, F., Bautista-Gallego, J., Romero-Gil, V., Arroyo-López, F. N., Garrido-Fernández, A., & García-García, P. (2012a). Effects of salt mixtures on Spanish green table olive fermentation performance. *LWT-Food Science and Technology*, 46(1), 56-63.
- Rodríguez-Gómez, F., Romero-Gil, V., Bautista-Gallego, J., Garrido-Fernández, A., & Arroyo-López, F. N. (2012b). Multivariate analysis to discriminate yeast strains with technological applications in table olive processing. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1761-1770.

- Rodríguez-Gómez, F., Romero-Gil, V., Arroyo-López, F. N., Gallego, J. B., García-García, P., & Garrido-Fernández, A. (2015). Effect of packaging and storage conditions on microbial survival, physicochemical characteristics and color of non-thermally preserved Green Spanish-style Manzanilla olives. *LWT-Food Science and Technology*, *63*(1), 367-375.
- Romero, C., Brenes, M., García-Serrano, P., Medina, E., & García-García, P. (2019). Packing black ripe olives in retortable pouches with different oxygen permeability. *Food Packaging and Shelf Life*, *20*, 100323.
- Romero-Gil, V., Bautista-Gallego, J., Rodríguez-Gómez, F., García-García, P., Jiménez-Díaz, R., Garrido-Fernández, A., & Arroyo-López, F. N. (2013). Evaluating the individual effects of temperature and salt on table olive related microorganisms. *Food Microbiology*, *33*(2), 178-184.
- Rosenberg, E. (2017). Chapter 8: DNA Sequencing and PCR. *It's in Your DNA: From Discovery to Structure, Function and Role in Evolution, Cancer and Aging*, 61-69.
- Ruiz-Moyano, S., Esperilla, A., Hernández, A., Benito, M. J., Casquete, R., Martín-Vertedor, D., & Pérez-Nevado, F. (2019). Application of ISSR-PCR as a rapid method for clustering and typing of yeasts isolated from table olives. *LWT-Food Science and Technology*, *109*, 250-254.
- Russo, P., Spano, G., & Capozzi, V. (2017). Safety evaluation of starter cultures. *Starter Cultures in Food Production*, eds B. Speranza, A. Bevilacqua, MR Corbo, and M. Sinigaglia (Hoboken, NY: John Wiley & Sons), 101-128.
- Sindona, G. (2010). A marker of quality of olive oils: the expression of oleuropein. In *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention* (pp. 95-100). Academic Press.
- Singh, S., Goswami, P., Singh, R., & Heller, K. J. (2009). Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species: a review. *LWT-Food Science and Technology*, *42*(2), 448-457.
- Soylomez, G., Brashears, M. M., Smith, D. A., & Cuppett, S. L. (2001). Microbial quality of alfalfa seeds and sprouts after a chlorine treatment and packaging modifications. *Journal of Food Science*, *66*(1), 153-157.
- Tafvizi, F., & Tajabadi Ebrahimi, M. (2015). Application of repetitive extragenic palindromic elements based on PCR in detection of genetic relationship of lactic acid bacteria species isolated from traditional fermented food products. *Journal of Agricultural Science and Technology*, *17*(1), 87-98.

- Tassou, C. C., Panagou, E. Z., & Nychas, G. J. (2010). Microbial colonization of naturally fermented olives. In *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention* (pp. 397-406). Academic Press.
- Teneva-Angelova, T., Hristova, I., Pavlov, A., & Beshkova, D. (2018). Lactic Acid Bacteria—From Nature Through Food to Health. In *Advances in Biotechnology for Food Industry* (pp. 91-133). Academic Press.
- Tewari, S., & Sharma, S. (2019). Molecular techniques for diagnosis of bacterial plant pathogens. In *Microbial Diversity in the Genomic Era* (pp. 481-497). Academic Press.
- Tofalo, R., Perpetuini, G., Schirone, M., Suzzi, G., & Corsetti, A. (2013). Yeast biota associated to naturally fermented table olives from different Italian cultivars. *International Journal of Food Microbiology*, 161(3), 203-208.
- Tofalo, R., Perpetuini, G., Schirone, M., Ciarrocchi, A., Fasoli, G., Suzzi, G., & Corsetti, A. (2014). *Lactobacillus pentosus* dominates spontaneous fermentation of Italian table olives. *LWT-Food Science and Technology*, 57(2), 710-717.
- Tufariello, M., Durante, M., Ramires, F. A., Grieco, F., Tommasi, L., Perbellini, E., ... & Bleve, G. (2015). New process for production of fermented black table olives using selected autochthonous microbial resources. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1007.
- Vinicius De Melo Pereira, G., De Carvalho Neto, D. P., Junqueira, A. C. D. O., Karp, S. G., Letti, L. A., Magalhães Júnior, A. I., & Soccol, C. R. (2020). A review of selection criteria for starter culture development in the food fermentation industry. *Food Reviews International*, 36(2), 135-167.
- Wold, S., Sjöström, M., & Eriksson, L. (2001). PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 58(2), 109-130.
- Wuyts, S., Allonsius, C. N., Wittouck, S., Thys, S., Lievens, B., Weckx, S., De Vuyst, L. & Sarah, L. (2019). Comparative genome analysis of *Lactobacillus mudanjiangensis*, an understudied member of the *Lactobacillus plantarum* group. *Microbial Genomics*, 5(9).
- Zago, M., Lanza, B., Rossetti, L., Muzzalupo, I., Carminati, D., & Giraffa, G. (2013). Selection of *Lactobacillus plantarum* strains to use as starters in fermented table olives: Oleuropeinase activity and phage sensitivity. *Food Microbiology*, 34(1), 81-87.
- Zielińska, D., Ołdak, A., Rzepkowska, A., & Zieliński, K. (2018). Enumeration and Identification of Probiotic Bacteria in Food Matrices. In *Advances in Biotechnology for Food Industry* (pp. 167-196). Academic Press.
- Πανάγου Ε. (2002). Ζύμωση, συντήρηση και οικολογία της επιτραπέζιας ελιάς. Διδακτορική Διατριβή. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών – Τμήμα Επιστήμης και

Τεχνολογίας Τροφίμων – Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων.

Πτυχιακή μελέτη Μαρία Καββαθά, Αθήνα 2019

Πτυχιακή μελέτη Γεωργία Καλόγρη, Αθήνα 2020

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 5. Παγκόσμια παραγωγή επιτραπέζιας ελιάς ανά έτος (<https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2020/04/OT-W901-29-11-2019-P-1.pdf>).

CONSEIL OLEICOLE INTERNATIONAL (NOVEMBRE 2019)
INTERNATIONAL OLIVE OIL COUNCIL (NOVEMBER 2019)

OLIVES DE TABLE - TABLE OLIVES

Tableau 1: PRODUCTION (1.000 tm) - Table 1: PRODUCTION (1,000 tonnes)

		1990/1	1991/2	1992/3	1993/4	1994/5	1995/6	1996/7	1997/8	1998/9	1999/0	2000/1	2001/2	2002/3	2003/4	2004/5	2005/6	2006/7	2007/8	2008/9	2009/10	2010/11	2011/12	2012/13	2013/14	2014/15	2015/16	2016/17	2017/18	2018/19 (prov.)	2019/20 (prev.)	
		(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)	(16)	(17)	(18)	(19)	(20)	(21)	(22)	(23)	(24)	(25)	(26)	(27)	(28)	(29)	(30)	
Albanie	Albania	13,5	18,0	12,5	13,0	8,0	18,0	12,0	11,0	30,5	34,5	33,5	48,0	63,5	59,0	85,5	68,5	81,0	6,0	20,0	18,0	28,0	27,0	41,0	28,5	30,0	30,0	38,0	30,0	30,0	30,0	
Algérie	Algeria	30,0	38,0	40,0	39,0	44,0	35,0	40,0	50,0	51,0	58,0	30,0	38,0	50,0	70,0	60,0	85,0	75,0	100,0	95,0	220,0	90,0	150,0	60,0	140,0	120,0	233,5	221,0	293,0	303,5	299,5	300,0
Argentine	Argentina	5,0	5,0	3,5	4,0	4,0	5,5	4,0	3,5	5,0	6,5	8,5	9,5	10,0																		100,0
Chypre	Cyprus																															
Croatie	Croatia									1,5	0,5	1,0	0,5	0,5	1,0	1,0	1,0	1,5	1,5	1,5	1,0	1,5	1,0	1,0								
Egypte	Egypt	10,5	38,5	53,0	41,0	49,0	60,0	25,0	50,0	41,0	85,0	70,0	135,0	340,0	95,0	194,5	200,0	436,0	432,0	440,0	409,0	350,0	384,5	453,0	400,0	450,5	335,5	550,0	750,0	400,0	690,0	
Iran	Iran														12,0	18,0	24,0	39,5	39,5	30,5	47,5	47,0	35,0	48,0	67,5	68,0	60,5	75,5	60,0	60,0	57,0	
Iraq	Iraq																	0,0	0,0	0,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0
Israël	Israel	17,0	10,5	14,0	4,0	13,0	16,0	18,0	12,5	12,0	15,0	19,5	12,0	24,5	7,5	18,5	10,0	24,0	9,0	17,0	9,5	19,0	17,0	19,0	14,0	17,0	15,0	16,0	17,0	18,0	19,0	
Jordanie	Jordan	16,0	8,0	12,5	7,5	13,0	10,0	16,5	36,0	8,0	24,0	13,0	28,0	26,5	29,0	23,0	24,0	29,5	27,0	34,0	54,0	26,0	28,0	19,5	34,5	35,5	19,0	29,0	25,0	30,0	30,0	
Liban	Lebanon	10,0	5,0	15,0	1,5	6,0	6,0	10,0	3,5	6,0	5,5	7,0	5,5	6,0	7,0	6,0	6,0	22,5	19,0	19,5	40,0	17,5	17,5	16,5	17,0	19,0	22,0	20,5	20,0	20,0	20,0	
Libye	Libya	3,0	3,5	2,5	3,0	3,0	5,0	4,0	3,5	3,5	3,0	2,5	2,5	3,0	3,5	4,5	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	
Maroc	Morocco	80,0	85,0	80,0	80,0	90,0	85,0	100,0	85,0	95,0	80,0	80,0	90,0	80,0	120,0	80,0	100,0	90,0	100,0	100,0	90,0	110,0	100,0	100,0	120,0	100,0	120,0	120,0	130,0	130,0	130,0	
Montenegro	Montenegro	0,5	1,0	2,0	2,0	2,5	1,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Palestine	Palestine			20,0	0,0	1,0	10,0	10,0	4,5	5,0	2,0	8,0	7,0	8,5	5,0	7,0	8,0	11,0	13,0	9,0	2,5	11,0	9,0	9,0	12,0	11,0	10,0	9,0	7,0	12,0	12,0	
Tunisie	Tunisia	12,0	14,0	12,0	13,0	11,0	9,0	15,0	13,0	14,0	13,5	11,5	6,5	6,5	26,0	13,0	26,5	15,0	18,0	18,0	22,0	20,0	24,0	25,0	22,0	26,0	26,0	22,0	28,0	20,0	28,0	
Turquie	Turkey	150,0	110,0	100,0	100,0	180,0	120,0	185,0	124,0	178,0	150,0	224,0	85,0	165,0	125,0	240,0	280,0	240,0	200,0	300,0	390,0	330,0	400,0	410,0	430,0	390,0	397,0	400,5	450,0	423,5	414,0	
UE	EU	363,5	474,0	372,0	360,0	367,5	369,0	370,5	486,0	500,0	620,5	578,5	784,5	844,5	759,0	739,5	623,5	714,5	720,5	677,0	675,0	828,5	741,0	780,5	794,0	868,0	886,5	842,0	912,5	822,0	808,5	
Uruguay																									0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
TOTAL A		711,0	810,5	739,0	668,0	752,0	750,0	810,5	883,0	979,0	1.082,5	1.096,5	1.217,5	1.430,5	1.317,0	1.497,0	1.457,0	1.761,0	1.786,0	1.855,5	2.077,0	2.132,5	2.088,5	2.178,0	2.283,5	2.377,5	2.241,0	2.515,0	2.856,5	2.347,0	2.650,5	
A. Saoudite	Saudi Arabia	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,5	3,5	4,0	2,0	4,0	4,0	3,0	4,0	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	
Australie	Australia	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,0	0,0	0,0	2,5	2,0	3,0	3,5	3,5	3,5	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	
Brazil	Brazil																															
Bulgarie	Bulgaria																															
Canada	Canada																															
Chili	Chile	6,0	9,0	6,5	7,0	8,0	7,0	10,5	6,0	8,0	9,0	10,0	8,0	11,0	6,5	9,0	10,0	28,0	14,0	20,0	25,0	26,0	34,0	34,0	34,0	12,5	13,0	13,0	13,0	13,0	13,0	
Etats-Unis	USA	114,0	57,0	144,0	105,5	72,0	66,0	144,0	90,5	77,5	129,0	60,0	120,0	81,0	100,0	87,0	116,0	18,0	109,0	47,5	24,0	154,0	26,0	78,0	82,5	33,5	70,5	60,5	82,0	15,5	73,5	
Japon	Japan																															
Mexique	Mexico	14,0	16,0	9,5	10,0	10,0	19,5	7,0	17,0	22,0	9,0	8,5	16,0	14,0	10,0	8,0	9,5	9,0	9,5	8,0	10,0	8,0	8,0	8,0	8,0	18,5	22,5	18,0	19,0	20,0	20,0	
Pérou	Peru	14,0	10,0	10,5	16,5	18,0	15,0	16,0	18,5	15,0	13,0	16,0	37,5	31,0	32,0	30,0	52,0	112,0	9,0	75,0	72,5	81,0	57,5	110,0	40,5	56,0	79,5	190,0	50,0	45,0	45,0	
Roumanie	Romania																															
Russie	Russia																															
Syrie	Syria	80,0	56,0	80,0	70,0	75,0	75,0	90,0	80,0	85,0	93,0	142,0	80,0	170,0	120,0	200,0	120,0	200,0	100,0	120,0	135,0	147,0	172,0	134,0	120,0	75,0	150,0	190,0	100,0	100,0	100,0	
Suisse	Switzerland																															
Autres P.prod.	Other pr.coun.	8,0	7,0	10,0	10,0	12,0	11,0	12,0	16,0	12,0	11,0	10,0	12,0	25,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	
Autr.P.un.imp.	Oth.non-prod.																															
TOTAL B		239,0	158,0	263,5	222,0	198,0	196,5	282,5	211,0	222,0	268,5	246,5	256,0	343,0	285,0	355,5	305,0	327,5	365,5	227,0	292,0	430,5	344,0	334,5	377,0	203,5	335,5	384,5	427,5	222,0	275,0	
WORLD TOTAL		950,0	968,5	1.002,5	890,0	990,0	946,5	1.093,0	1.094,0	1.201,0	1.351,0	1.343,0	1.473,5	1.773,5	1.602,0	1.852,5	1.762,0	2.088,5	2.151,5	2.082,5	2.369,0	2.563,0	2.432,5	2.512,5	2.660,5	2.581,0	2.576,5	2.899,5	3.284,0	2.569,0	2.925,5	

Πίνακας 6. Παραγωγή επιτραπέζιας ελιάς ανά έτος στην Ευρωπαϊκή Ένωση (<https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2020/04/OT-CE-901-29-11-2019-P.pdf>).

CONSEIL OLEICOLE INTERNATIONAL (NOVEMBRE 2015)
INTERNATIONAL OLIVE OIL COUNCIL (NOVEMBER 2015)

OLIVES DE TABLE - TABLE
OLIVES

Tableau 1: PRODUCTION (1.000 tm) - Table 1: PRODUCTION (1,000 tonnes)


	1990/91	1991/92	1992/93	1993/94	1994/95	1995/96	1996/97	1997/98	1998/99	1999/00	2000/01	2001/02	2002/03	2003/04	2004/05	2005/06	2006/07	2007/08	2008/09	2009/10	2010/11	2011/12	2012/13	2013/14	2014/15	2015/16	2016/17	2017/18 (prev.)	2018/19 (prev.)	2019/20 (prev.)	
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)	(16)	(17)	(18)	(19)	(20)	(21)	(22)	(23)	(24)	(25)	(26)	(27)	(28)	(29)	(30)	
Cyprus Cypria														9,1	10,1	7,5	6,1	4,0	2,9	3,0	3,5	3,6	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	
Croatie Croatia																								1,0	0,2	0,8	0,7	0,6	0,6	0,7	
Espagne Spain	230,0	268,3	223,7	205,2	235,6	203,0	244,0	310,0	359,6	431,0	415,0	575,4	448,3	579,4	537,5	420,3	499,7	553,3	485,7	492,6	606,6	521,5	491,0	572,2	555,6	601,0	596,1	561,7	587,8	500,0	
France France	1,0	2,7	2,0	2,0	2,0	1,1	2,0	2,0	2,0	2,0	1,8	2,0	2,0	2,0	2,0	1,2	1,5	1,5	1,6	1,9	1,4	1,1	1,4	1,1	1,1	1,1	0,7	1,3	1,3	1,3	
Grèce Greece	70,0	80,0	60,0	60,0	60,0	70,0	60,0	85,0	85,0	100,0	85,0	115,0	117,0	92,0	115,0	125,5	109,0	95,0	105,0	107,0	135,0	130,0	197,0	130,0	249,0	194,0	180,0	261,0	167,0	207,0	
Italie Italy	44,5	100,0	70,0	75,8	59,9	85,5	55,3	80,0	45,0	75,0	65,0	60,0	66,0	65,0	63,4	61,0	80,0	55,7	68,5	58,5	69,7	75,7	76,0	69,3	42,0	65,0	39,9	60,0	40,0	74,1	
Malte Malta																						0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Portugal Portugal	18,0	23,0	16,5	16,0	10,0	9,1	9,0	9,0	8,6	12,6	8,7	12,0	11,0	11,3	11,4	8,0	19,2	11,0	13,0	12,3	10,3	9,0	12,5	17,5	17,4	20,8	21,7	25,2	22,5	22,5	
Slovénie Slovenia																	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
TOTAL A)	383,5	474,0	372,2	360,0	367,5	368,7	370,3	486,0	500,2	620,6	576,3	764,4	644,3	758,8	739,4	623,5	714,5	720,5	676,7	675,4	828,5	741,0	780,7	793,9	868,1	886,5	841,9	912,6	822,0	808,4	
Allemagne 1) Germany 1)																															
Autriche Austria																															
Belgique Belgium																															
Bulgarie Bulgaria																															
Danemark Denmark																															
Estonie Estonia																															
Finlande Finland																															
Hongrie Hungary																															
Irlande Ireland																															
Lettonie Latvia																															
Lithuanie Lithuania																															
Luxembourg Luxembourg																															
Pays-Bas Netherlands																															
Pologne Poland																															
Rép. Tchèque Czech Rep.																															
Roumanie Romania																															
Royaume-Uni United King.																															
Slovaquie Slovakia																															
Suède Sweden																															
TOTAL B)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
TOTAL A + B	383,5	474,0	372,2	360,0	367,5	368,7	370,3	486,0	500,2	620,6	576,3	764,4	644,3	758,8	739,4	623,5	714,5	720,5	676,7	675,4	828,5	741,0	780,7	793,9	868,1	886,5	841,9	912,6	822,0	808,4	

Πίνακας 7. Παγκόσμια κατανάλωση επιτραπέζιας ελιάς ανά έτος (<https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2020/04/OT-W901-29-11-2019-C.pdf>).

CONSEIL OLEICOLE INTERNATIONAL (NOVEMBRE 2019)
INTERNATIONAL OLIVE OIL COUNCIL (NOVEMBER 2019)

OLIVES DE TABLE - TABLE OLIVES

Tableau 4: CONSOMMATION (1.000 tm) - Table 4: CONSUMPTION (1,000 tonnes)

		1996/7	1997/8	1998/9	1999/0	2000/1	2001/2	2002/3	2003/4	2004/5	2005/6	2006/7	2007/8	2008/9	2009/10	2010/11	2011/12	2012/13	2013/14	2014/15	2015/16	2016/17	2017/18	2018/19 (prev.)	2019/20 (prev.)
		(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)	(16)	(17)	(18)	(19)	(20)	(21)	(22)	(23)	(24)	(25)	(26)	(27)	(28)	(29)	(30)
																									
Albanie	Albania												7,5	20,0	19,0	28,5	28,0	41,0	29,0	31,0	30,0	31,5	31,5	31,5	31,5
Algérie	Algeria	14,0	12,5	31,0	25,0	33,0	47,0	60,5	64,0	80,0	80,0	81,5	88,0	97,5	134,0	189,0	186,0	172,0	205,0	240,0	234,0	297,0	300,0	305,0	303,0
Argentine	Argentina	16,0	15,0	16,0	18,0	12,5	13,0	13,5	20,0	15,0	15,0	15,0	13,0	14,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,5	25,0	35,0	40,0	40,0	35,0	35,0
Chypre	Cyprus	4,5	4,0	4,5	7,0	8,5	9,5	10,0																	
Croatie	Croatia			2,0	1,0	1,0	1,0	0,5	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	3,0	3,0	3,5	2,0	2,0							
Egypte	Egypt	29,0	32,5	43,5	77,0	57,0	75,0	190,0	138,0	200,0	170,0	300,0	350,0	380,0	340,0	300,0	300,0	330,0	319,0	369,0	319,0	400,5	555,0	450,0	500,0
Iran	Iran								12,0	19,5	25,5	40,5	40,5	32,5	47,5	50,5	37,5	49,0	63,5	67,0	58,5	71,0	55,0	60,5	57,5
Iraq	Iraq												0,0	0,0	9,0	14,0	23,5	23,5	19,5	30,0	23,5	23,5	23,5	24,0	24,0
Israël	Israel	16,0	13,5	12,0	14,5	19,0	21,5	23,5	21,5	21,5	18,0	25,0	21,5	21,0	21,5	23,5	21,0	24,0	19,5	22,0	22,0	20,0	22,0	21,0	22,0
Jordanie	Jordan	16,5	27,0	34,5	15,0	23,5	11,5	26,5	24,0	26,0	20,5	24,0	19,0	25,5	30,5	51,0	19,0	23,0	17,5	28,0	32,5	16,0	23,0	22,0	28,0
Liban	Lebanon	12,5	8,5	8,5	8,5	8,0	9,0	5,5	6,5	9,0	5,5	5,5	20,0	20,0	20,5	25,0	25,0	20,0	19,5	20,0	22,0	22,0	24,5	24,0	24,0
Libye	Libya	5,0	4,5	6,0	4,5	5,5	6,5	7,0	5,5	8,0	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	14,0	14,0	14,0	11,0	15,5	12,5	16,0	18,0	18,0
Moroc	Morocco	35,0	21,0	20,0	21,5	21,0	22,0	31,0	45,0	27,5	35,0	32,0	35,5	29,0	32,0	32,0	32,0	32,0	33,0	30,0	31,0	31,0	32,0	32,0	32,0
Montenegro	Montenegro	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1,0	0,5	1,0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Palestine	Palestine	9,0	5,0	6,0	4,5	9,0	8,0	9,0	9,0	7,0	6,0	7,5	13,0	5,0	5,0	10,5	8,0	8,0	12,0	11,0	10,0	9,0	9,0	7,0	11,0
Tunisie	Tunisia	14,5	12,5	13,5	12,5	11,0	8,0	8,5	24,0	13,0	24,0	16,0	18,0	10,0	20,0	20,0	20,0	22,0	21,0	26,0	23,0	20,0	25,0	20,0	25,0
Turquie	Turkey	132,0	127,0	149,0	130,0	125,0	100,0	114,0	96,0	175,0	221,0	180,0	190,0	240,0	260,0	300,0	350,0	350,0	355,0	330,0	318,5	332,0	355,0	360,0	330,0
UE	EU	319,0	341,0	392,0	421,5	461,0	525,0	538,5	572,5	548,0	564,5	628,0	577,0	546,0	510,0	592,0	664,5	589,0	530,5	542,0	578,5	572,0	595,0	576,0	588,5
Uruguay	Uruguay																	4,0	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	0,5
TOTAL A		623,5	624,5	739,0	761,0	795,5	855,5	1.037,0	1.039,5	1.151,5	1.194,0	1.364,0	1.400,0	1.434,5	1.494,5	1.682,0	1.745,5	1.739,5	1.702,0	1.784,0	1.753,5	1.900,5	2.105,0	1.986,5	2.028,0
A. Saoudite	Saudi Arabia	13,5	15,0	15,0	15,0	15,0	18,0	20,0	20,0	20,0	20,0	30,0	31,0	31,5	31,5	32,0	41,0	41,0	43,0	34,5	30,5	32,5	32,0	32,5	32,5
Australie	Australia	10,5	11,0	11,5	13,0	14,0	16,0	17,0	16,5	18,0	18,5	18,5	19,0	19,0	20,5	22,5	21,0	21,0	21,0	19,5	21,0	21,5	21,5	22,5	21,5
Bésil	Brazil	48,0	49,5	48,0	50,5	45,0	50,5	47,0	50,5	57,0	55,5	60,5	74,0	69,0	79,0	87,0	101,5	109,0	114,0	103,0	102,0	114,0	110,0	117,5	110,0
Bulgarie	Bulgaria	2,5	3,0	4,0	4,0	5,0	5,0	6,0	6,5	11,5	12,0														
Canada	Canada	17,0	18,0	18,5	19,5	20,5	22,0	23,5	23,5	23,5	25,0	25,5	26,0	26,0	27,5	27,5	27,5	27,5	29,0	29,0	29,0	30,0	28,5	31,5	31,0
Chili	Chile	8,5	8,0	8,0	8,5	9,0	8,0	12,5	7,5	10,5	11,5	28,0	16,0	21,0	29,0	30,0	32,0	32,0	34,0	38,0	27,5	28,0	30,0	32,5	29,0
Etats-Unis	USA	172,5	179,0	176,5	183,5	185,0	205,0	205,0	210,0	205,0	220,0	220,0	240,5	210,0	203,0	240,0	210,0	210,0	210,5	185,0	215,0	206,0	216,0	182,0	207,5
Japon	Japan	2,0	1,5	1,5	2,0	2,0	2,0	2,0	2,5	2,5	2,5	2,0	2,5	2,5	3,0	3,5	4,0	4,0	4,0	4,5	4,0	4,0	4,0	4,0	4,5
Mexique	Mexico	11,5	11,5	13,5	9,5	11,0	9,0	13,5	10,0	9,0	13,5	12,5	17,0	16,5	7,0	17,0	18,0	16,5	14,5	26,0	23,0	22,0	26,0	26,0	26,0
Pérou	Peru	15,5	14,0	14,5	14,5	9,0	9,0	30,5	20,5	19,0	19,0	40,0	60,0	25,5	50,0	50,0	50,0	40,0	40,0	40,0	32,0	45,0	60,0	60,0	65,0
Roumanie	Romania	10,0	8,5	9,5	9,5	17,0	17,0	17,0	17,0	27,0	10,5														
Russie	Russia	11,5	14,0	7,0	13,0	21,0	30,0	40,0	40,0	40,0	45,0	45,0	70,0	80,0	90,0	67,0	71,5	68,0	75,0	72,5	23,0	22,0	25,0	25,0	
Syrie	Syria	80,0	66,0	70,0	90,5	110,0	74,0	156,5	131,5	162,5	102,0	148,0	94,0	94,0	116,0	122,0	132,0	104,0	107,0	92,0	147,0	185,0	105,0	100,0	
Suisse	Switzerland	2,5	3,0	3,5	3,5	3,5	4,0	4,0	4,5	4,5	5,0	5,0	5,5	5,5	6,0	6,0	6,0	6,0	6,5	8,5	7,0	7,0	7,0	7,0	
Autr.P.prod.	Other pr.coun.	13,5	18,0	15,5	14,0	15,5	18,5	40,5	30,0	25,0	30,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0
Autr.P.un.imp.	Oth.non-prod.	23,0	28,5	30,0	30,0	33,0	39,0	56,0	40,0	40,0	45,0	30,0	40,0	40,0	40,0	50,0	70,5	70,5	70,5	70,0	60,0	80,0	71,0	81,5	80,0
TOTAL B		442,0	448,5	446,5	480,5	508,0	527,0	691,0	630,5	680,0	635,0	715,0	730,5	675,5	704,5	784,0	806,5	783,0	791,5	696,0	746,0	823,5	769,0	748,0	764,0
WORLD TOTAL		1.065,5	1.073,0	1.185,5	1.241,5	1.303,5	1.382,5	1.728,0	1.670,0	1.831,5	1.829,0	2.079,0	2.130,5	2.110,0	2.199,0	2.466,0	2.552,0	2.522,5	2.493,5	2.480,0	2.499,5	2.724,0	2.878,0	2.734,5	2.792,0

Πίνακας 8. Κατανάλωση επιτραπέζιας ελιάς ανά έτος στην Ευρωπαϊκή Ένωση (<https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2020/04/OT-CE-901-29-11-2019-C.pdf>).

CONSEIL OLEICOLE INTERNATIONAL (NOVEMBRE 2019)
INTERNATIONAL OLIVE OIL COUNCIL (NOVEMBER 2019)

OLIVES DE TABLE - TABLE OLIVES

Tableau 4 : CONSOMMATION (1.000 tm) - Table 4 : CONSUMPTION (1,000 tonnes)

	1990/91	1991/92	1992/93	1993/94	1994/95	1995/96	1996/97	1997/98	1998/99	1999/00	2001/02	2002/03	2003/04	2004/05	2005/06	2006/07	2007/08	2008/09	2009/10	2010/11	2011/12	2012/13	2013/14	2014/15	2015/16	2016/17	2017/18	2018/19 (prov.)	2019/20 (prov.)	
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(12)	(13)	(14)	(15)	(16)	(17)	(18)	(19)	(20)	(21)	(22)	(23)	(24)	(25)	(26)	(27)	(28)	(29)	(30)	
Cyprus													9,4	10,3	8,0	6,2	5,3	3,7	4,4	4,3	4,4	3,4	3,6	3,6	3,4	3,5	3,7	3,4	3,4	
Croatie																							1,3	0,8	2,3	2,4	2,3	2,5	2,4	
Espagne	100,0	110,0	125,0	120,0	116,0	116,0	100,0	113,0	159,7	167,5	215,6	192,7	205,0	167,4	214,1	243,8	183,6	147,7	107,9	150,0	217,9	188,6	175,4	189,3	182,7	191,0	191,9	185,8	190,0	
France	31,7	35,1	27,7	24,8	30,9	28,0	30,8	33,7	31,0	34,1	39,0	62,0	44,9	53,9	53,9	55,1	52,7	53,0	56,8	58,0	56,2	67,3	60,0	60,0	65,0	65,0	65,0	70,0	70,0	
Grèce	33,0	20,0	25,0	21,0	30,0	30,0	20,0	22,0	26,6	29,5	33,0	30,0	43,0	28,0	26,0	24,0	20,0	20,0	16,0	15,0	20,0	14,0	20,0	15,0	15,0	16,0	16,0	16,0	18,0	
Italie	138,0	144,0	130,0	130,0	113,0	125,0	112,0	114,3	110,0	116,8	150,0	150,0	150,0	147,2	139,0	122,0	122,0	138,5	122,4	148,0	139,8	145,2	119,7	101,0	126,3	84,7	106,8	89,4	94,0	
Malte													0,8	1,0	0,9	3,8	0,9	1,1	1,2	1,4	1,2	1,6	1,3	0,8	0,7	17,2	0,9	0,7	0,7	
Portugal	19,0	20,5	18,0	18,0	18,5	11,0	8,5	10,2	13,1	15,0	14,1	13,8	17,1	12,7	9,4	8,8	12,8	12,7	7,0	10,0	7,0	6,0	6,0	5,0	5,8	6,0	6,0	6,0	6,0	
Slovénie													0,6	0,1	0,4	1,1	0,9	0,7	1,0	1,0	1,0	0,6	0,7	0,6	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	
TOTAL A)	321,7	329,6	325,7	313,6	310,4	310,0	271,3	291,2	335,8	360,0	448,2	451,5	457,8	435,6	453,7	468,8	402,2	377,4	320,7	388,7	442,5	432,7	382,0	381,3	402,0	385,6	393,4	374,9	385,3	
Allemagne 1)	15,8	15,8	15,5	16,0	16,9	21,5	23,5	22,3	23,4	26,8	36,5	37,4	39,5	41,4	40,0	48,9	51,6	47,2	57,8	62,9	65,1	40,8	36,7	37,2	41,9	42,7	45,8	45,9	47,2	
Autriche					0,9	1,4	1,6	1,5	2,5	2,6	2,8	3,2	4,1	3,7	4,5	2,9	4,4	4,7	3,8	6,1	6,5	4,1	4,4	5,1	4,8	4,0	6,1	4,8	4,2	
Belgique											7,4	8,6	10,0	7,4	7,3	7,7	9,3	8,9	8,2	7,5	13,1	9,1	8,8	9,0	10,7	12,2	14,0	18,5	19,7	
Bulgarie																9,3	17,8	24,6	13,2	14,0	28,1	13,2	11,9	12,4	11,4	12,4	12,9	12,8	11,4	
Danemark	0,7	1,0	1,0	1,0	1,2	1,9	2,5	2,1	2,1	2,5	2,5	3,6	3,6	2,9	2,9	3,6	3,7	4,0	3,8	4,6	3,7	2,3	2,6	2,8	3,0	3,0	3,2	3,1	3,1	
Estonie													4,0	0,2	0,1	0,4	0,2	0,1	0,2	0,6	0,4	0,5	0,3	0,3	0,4	0,4	0,5	0,4	0,4	
Finlande					0,1	1,3	1,5	1,5	1,6	1,6	2,4	2,2	2,3	3,0	2,2	3,1	0,7	3,2	3,1	3,7	3,3	1,9	2,0	2,0	2,0	1,9	2,1	1,9	2,0	
Hongrie													0,9	0,2	0,3	0,6	1,3	1,1	0,9	1,2	1,5	1,2	1,7	2,0	2,4	2,7	3,7	3,8	3,9	
Irlande	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,3	0,2	0,2	0,4	0,3	0,5	0,4	0,5	0,5	0,3	0,3	0,3	0,3	0,9	1,1	1,3	1,4	1,6	1,8	1,9	2,1	1,8	
Lettonie													0,4	0,7	0,5	0,3	0,2	0,6	4,0	4,0	0,9	0,5	0,5	0,3	0,4	0,3	0,4	0,6	3,7	
Lituanie													0,4	0,9	1,1	0,3	0,7	0,7	1,2	1,4	1,5	0,8	1,2	1,1	1,0	1,0	1,2	0,9	1,1	
Luxembourg											0,3	0,4	0,5	1,8	1,8	0,2	0,2	0,6	0,8	0,6	0,6	0,9	0,9	1,0	0,9	1,1	1,4	1,5	1,5	
Pays-Bas	2,5	3,1	3,1	3,6	5,6	4,5	4,7	5,1	5,4	4,6	4,7	5,9	8,5	8,7	5,5	6,3	4,0	2,4	14,6	6,5	7,4	2,4	2,7	5,1	8,6	11,0	15,7	15,0	15,1	
Pologne													8,1	6,4	3,4	1,7	5,3	6,9	8,3	9,8	8,5	7,6	9,0	10,6	10,8	11,4	9,7	11,2	10,2	
Rép. Tchèque													2,4	2,2	3,3	0,4	0,3	1,2	0,9	5,0	5,0	9,2	2,2	3,3	3,7	3,8	3,8	3,9	3,8	
Roumanie																23,2	31,0	16,5	22,9	23,5	22,0	17,5	19,2	20,9	25,4	27,3	30,2	27,2	27,0	
Royaume-Uni	3,4	3,8	3,7	3,7	6,8	6,4	6,2	8,4	11,1	12,8	13,0	18,1	21,1	23,8	28,8	41,6	26,4	28,7	33,7	39,6	41,8	34,6	34,1	34,2	36,7	37,7	38,0	36,4	35,8	
Slovaquie													0,5	1,1	1,2	1,2	8,5	10,3	1,6	2,0	1,7	1,7	1,4	3,3	2,5	2,9	2,2	1,9	1,9	
Suède					2,1	2,4	3,6	4,3	4,1	4,4	8,7	7,1	7,9	7,5	9,7	9,1	8,9	9,9	10,3	10,4	10,3	7,1	7,8	8,5	8,7	8,7	9,2	9,5	9,5	
UEBL	2,3	2,5	2,8	2,8	2,2	2,8	3,8	4,2	5,8	6,4																				
TOTAL B)	24,7	26,2	26,1	27,1	37,9	42,1	47,5	49,7	56,0	61,7	76,7	86,8	114,7	112,1	110,9	161,3	174,8	171,9	189,4	203,7	222,1	156,5	148,5	160,5	176,8	186,4	201,8	201,4	203,2	
TOTAL A + B	346,4	355,8	351,8	340,7	348,3	352,1	318,8	340,9	391,8	421,7	524,9	538,3	572,5	547,7	564,6	628,1	577,0	549,3	510,1	592,4	664,6	589,2	530,5	541,8	578,8	572,0	595,1	576,0	588,5	

Πίνακας 9. Εξαγωγές επιτραπέζιας ελιάς ανά έτος σε παγκόσμια κλίμακα (<https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2020/04/OT-W901-29-11-2019-E.pdf>).

CONSEIL OLEICOLE INTERNATIONAL (NOVEMBRE 2019)
INTERNATIONAL OLIVE OIL COUNCIL (NOVEMBER 2019)

OLIVES DE TABLE - TABLE OLIVES

Tableau 3: EXPORTATIONS (1.000 tm) - Table 3: EXPORTS (1,000 tonnes)

		1990/1	1991/2	1992/3	1993/4	1994/5	1995/6	1996/7	1997/8	1998/9	1999/0	2000/1	2001/2	2002/3	2003/4	2004/5	2005/6	2006/7	2007/8	2008/9	2009/10	2010/11	2011/12	2012/13	2013/14	2014/15	2015/16	2016/17	2017/18	2018/19 (prev.)	2019/20 (prev.)			
		(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)	(16)	(17)	(18)	(19)	(20)	(21)	(22)	(23)	(24)	(25)	(26)	(27)	(28)	(29)	(30)			
Albanie	Albania																		0,0	1,0	1,5	2,0	1,5	2,0	2,0	3,0	4,0	4,0	3,0	3,0	3,0			
Algérie	Algeria	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0			
Argentine	Argentina	20,0	20,0	25,0	25,0	28,0	20,0	24,0	39,0	35,0	36,0	29,0	24,0	35,0	45,0	50,0	61,0	70,0	90,5	73,0	110,0	72,0	89,5	68,0	72,0	46,5	56,0	61,5	60,0	55,0	55,0			
Chypre	Cyprus	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,5	0,0	0,0	0,0	1,0	0,5										
Croatie	Croatia																																	
Egypte	Egypt	0,0	0,5	1,0	5,0	5,0	9,0	2,5	12,0	7,0	10,0	12,0	25,0	80,0	45,0	15,0	7,0	100,0	110,0	88,0	71,5	78,0	93,5	127,5	65,0	46,5	56,5	107,5	88,0	100,0	130,0			
Iran	Iran																																	
Israël	Israel	1,0	0,5	1,0	0,5	0,0	1,0	2,0	1,5	1,5	1,5	2,0	1,5	2,0	0,5	0,5	0,5	0,5	1,0	2,0	0,5	1,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0		
Jordanie	Jordan	1,0	0,0	1,0	3,0	2,0	1,5	0,5	1,5	2,0	1,0	0,5	1,5	2,0	3,0	3,0	17,5	0,5	11,0	2,0	4,0	3,0	7,5	0,5	4,0	5,0	7,0	9,5	8,0	5,0	5,0	5,0		
Liban	Lebanon	0,0	0,0	3,0	0,5	4,0	1,0	1,5	1,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,5	1,0	1,0	1,5	11,0	2,0	4,0	2,0	2,0	1,5	1,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0		
Libye	Libya	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0		
Maroc	Morocco	47,5	50,0	45,0	50,0	71,0	60,0	70,0	50,0	80,5	65,5	62,5	61,0	52,0	69,5	59,0	63,0	58,5	66,0	57,0	68,0	77,0	68,0	72,5	87,0	78,0	88,0	86,0	89,5	98,5	95,0	95,0		
Montenegro	Montenegro	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0		
Palestine	Palestine																																	
Tunisie	Tunisia	0,5	0,5	1,0	0,5	0,0	0,0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	1,0	1,0	1,0	0,0	0,5	1,5	2,0		
Turquie	Turkey	8,0	12,0	13,0	15,0	29,0	22,0	30,0	23,0	30,0	20,0	32,0	56,0	35,0	51,0	58,0	54,0	55,0	20,0	65,0	65,5	72,0	80,0	70,0	70,5	63,5	72,0	58,0	77,0	65,0	100,0	100,0		
UE *	EU *	112,5	107,5	106,5	92,5	100,5	114,0	121,5	145,5	150,5	193,0	205,5	214,0	229,0	206,5	237,0	254,0	261,0	248,0	239,0	300,0	290,5	298,0	270,0	283,5	315,0	278,5	285,0	300,0	300,0	253,5	253,5		
Uruguay	Uruguay																																	
TOTAL A		190,6	191,0	199,6	192,0	238,6	228,0	262,6	276,6	309,0	328,0	344,6	383,0	439,0	424,6	424,0	469,0	648,6	669,0	637,0	826,0	698,6	822,6	814,6	698,6	691,6	697,0	816,6	809,0	830,0	867,0	867,0		
A. Saoudite	Saudi Arabia							0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Australie	Australia	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Bésil	Brazil	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Bulgarie	Bulgaria	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Canada	Canada	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Chili	Chile	2,5	1,5	1,0	1,0	1,0	0,5	1,0	1,0	1,0	1,5	1,0	0,5	1,0	0,0	0,5	1,5	4,0	3,0	3,0	4,0	4,5	6,0	6,0	2,0	1,0	0,5	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	
Etats-Unis	USA	2,5	3,0	3,0	9,0	4,5	3,5	5,0	5,5	8,0	4,5	4,0	4,0	5,5	4,0	4,5	5,0	4,0	4,0	4,5	4,0	4,5	4,0	4,0	3,5	8,0	6,0	5,5	6,0	5,5	5,5	6,0	6,0	
Japon	Japan																																	
Mexique	Mexico	11,0	14,0	6,5	6,5	0,5	7,0	1,0	7,5	10,0	4,5	2,5	12,0	5,0	4,0	3,0	3,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Pérou	Peru	0,0	0,0	0,0	1,0	1,0	0,0	0,5	4,5	0,5	0,5	4,0	6,0	7,0	11,0	13,5	11,0	12,0	18,0	16,0	20,0	21,5	32,0	23,0	32,0	31,5	24,5	21,5	24,5	34,0	30,0	30,0	30,0	
Roumanie	Romania	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Russie	Russia	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Syrie	Syria	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	6,0	3,5	1,0	4,5	2,0	8,0	16,0	6,0	18,5	34,0	23,0	29,0	23,0	24,0	24,0	30,0	35,0	23,0	5,0	4,0	3,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Suisse	Switzerland	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Autres P.prod.	Other pr. comm.	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,5	0,5	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Autr.P.un.imp.	Other non-prod.	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
TOTAL B		19,0	18,6	10,6	17,6	3,0	17,0	12,0	20,0	24,6	16,6	19,6	38,6	24,6	37,6	69,0	44,0	49,6	48,6	47,6	87,0	80,6	77,0	66,6	49,6	42,6	44,0	38,0	33,6	48,6	41,0	41,0		
TOTAL MONDIAL WORLD		206,6	209,6	207,0	209,6	247,6	246,0	264,6	295,6	333,6	341,6	364,0	421,6	460,6	462,0	490,0	503,0	599,0	606,6	584,6	693,0	659,0	699,6	670,0	638,0	604,0	611,0	652,6	641,6	676,6	696,0	696,0		

Πίνακας 11. Συνολική καταγραφή της ταυτοποίησης των δειγμάτων μετά την αλληλούχηση του γονιδίου 16S. Στον πίνακα περιλαμβάνεται η κωδικοποίηση του κάθε στελέχους και η αντιστοίχσή του με το είδος στο οποίο ανήκει.

Κωδικός στελέχους	Είδος (γονίδιο 16S rRNA)	Κωδικός στελέχους	Είδος (γονίδιο 16S rRNA)
S26M18	<i>Pediococcus parvulus</i>	S26K20	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S23K19	<i>Pediococcus parvulus</i>	S26K18	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S26M14	<i>Pediococcus parvulus</i>	S26K6	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S23A14	<i>Pediococcus parvulus</i>	S26K7	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S23A7	<i>Pediococcus parvulus</i>	S26K8	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S23A11	<i>Pediococcus parvulus</i>	S26K9	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S16K18	<i>Lactobacillus vaccinoferus</i>	S26K10	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S16M7	<i>Lactobacillus coryniformis</i>	S26K11	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S13K18	<i>Lactobacillus coryniformis</i>	S26K12	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S16M8	<i>Lactobacillus plantarum group</i>	S26K13	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S26M8	<i>Pediococcus ethanolidurans</i>	S26K17	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S23K8	<i>Pediococcus parvulus</i>	S26K14	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S13M15	<i>Lactobacillus harbinensis</i>	S26K19	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S13A9	<i>Lactobacillus harbinensis</i>	S26A2	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S23A2	<i>Lactobacillus plantarum group</i>	S26A3	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S23A12	<i>Lactobacillus plantarum group</i>	S26A4	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S16A13	<i>Lactobacillus plantarum group</i>	S26K15	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S13K14	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S26M16	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S13K15	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S26M17	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S13K20	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S13K11	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S13A3	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S13K12	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S16M20	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S26A9	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S13M7	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S23M11	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S23K15	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S26K1	<i>Lactobacillus buchneri</i>

S13K16	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S26K2	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S26M6	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S26M13	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S13A2	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S26M15	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S16M19	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S13M19	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S26K16	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S13K17	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S26A1	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S16K10	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S23M7	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S16K12	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S13M10	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S16K15	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S13A5	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S16K19	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S16A1	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S23K9	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S16A6	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S23K10	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S16K20	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S23M8	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S16A8	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S23K11	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S16A9	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S16K14	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S16A16	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S23K16	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S23A18	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S23K18	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S23K1	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S16K17	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S23A20	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S13M2	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S23A9	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S16K7	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S16A11	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S16A19	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S16A12	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S23K20	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S16A14	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S23A1	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S16K9	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S23K14	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S13K9	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S23A3	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S13K10	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S23A4	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S13M16	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S23A6	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S13K4	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S16A4	<i>Pediococcus parvulus</i>
S23A19	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S13M6	<i>Pediococcus parvulus</i>
S23M9	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S23M6	<i>Pediococcus parvulus</i>
S23M10	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S16K8	<i>Pediococcus parvulus</i>
S23M12	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S16K2	<i>Pediococcus parvulus</i>

S23M14	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S13K2	<i>Pediococcus parvulus</i>
S16A2	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S26M12	<i>Pediococcus parvulus</i>
S16A10	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S26M4	<i>Pediococcus parvulus</i>
S16A5	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S26M7	<i>Pediococcus parvulus</i>
S16A3	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S16K13	<i>Pediococcus parvulus</i>
S16A18	<i>Pediococcus parvulus</i>	S16M15	<i>Lactobacillus plantarum</i> group
S16M10	<i>Lactobacillus coryniformis</i>	S16M14	<i>Lactobacillus plantarum</i> group
S16M18	<i>Lactobacillus coryniformis</i>	S16M17	<i>Lactobacillus coryniformis</i>
S16M11	<i>Lactobacillus coryniformis</i>	S13A12	<i>Lactobacillus coryniformis</i>
S16M2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	S16M1	<i>Lactobacillus plantarum</i> group
S26M11	<i>Pediococcus parvulus</i>	S16M3	<i>Lactobacillus plantarum</i> group
S23M13	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S16M4	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S23A10	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S23M17	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S23A8	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S23M18	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S16M16	<i>Lactobacillus casei</i> group	S23M20	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S23A5	<i>Lactobacillus casei</i> group	S23K3	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S13M3	<i>Lactobacillus casei</i> group	S23K6	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S13M5	<i>Lactobacillus casei</i> group	S23K7	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S23A13	<i>Lactobacillus casei</i> group	S13K7	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S23A15	<i>Lactobacillus casei</i> group	S13A20	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S16A20	<i>Pediococcus parvulus</i>	S26M1	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S26M2	<i>Pediococcus parvulus</i>	S23M15	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S26M5	<i>Lactobacillus casei</i> group	S23M16	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S23K4	<i>Lactobacillus casei</i> group	S23K5	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S13A11	<i>Pediococcus ethanolidurans</i>	S23K13	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S13M17	<i>Lactobacillus plantarum</i> group	S13M13	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S13A10	<i>Lactobacillus plantarum</i> group	S13A15	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S13A14	<i>Lactobacillus plantarum</i> group	S26A6	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S13A16	<i>Lactobacillus plantarum</i> group	S13K1	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S13A18	<i>Lactobacillus plantarum</i> group	S13K3	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S23A17	<i>Lactobacillus plantarum</i> group	S13K6	<i>Lactobacillus buchneri</i>

S16M9	<i>Lactobacillus plantarum</i> group	S13M12	<i>Lactobacillus plantarum</i> group
S16M13	<i>Lactobacillus plantarum</i> group	S13M14	<i>Lactobacillus plantarum</i> group
S16M6	<i>Lactobacillus plantarum</i> group	S13M4	<i>Lactobacillus plantarum</i> group
S16M12	<i>Lactobacillus plantarum</i> group	S13M1	<i>Lactobacillus plantarum</i> group
S16M5	<i>Lactobacillus plantarum</i> group	S23K17	<i>Lactobacillus plantarum</i> group
S26A13	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S26A7	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S26A14	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S23M1	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S26A15	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S26A12	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S26A16	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S16K5	<i>Pediococcus parvulus</i>
S26A17	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S26A8	<i>Pediococcus parvulus</i>
S26A18	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S13K8	<i>Lactobacillus casei</i> group
S26A19	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S23M19	<i>Lactobacillus casei</i> group
S26A20	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S26A11	<i>Lactobacillus casei</i> group
S23M2	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S26A10	<i>Lactobacillus casei</i> group
S23M3	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S13M11	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S23M4	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S13A7	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S26A5	<i>Lactobacillus buchneri</i>	S13A13	<i>Lactobacillus buchneri</i>
S13M8	<i>Lactobacillus plantarum</i> group	S13A1	<i>Lactobacillus namurensis</i>
S23A16	<i>Lactobacillus plantarum</i> group	S23K2	<i>Lactobacillus namurensis</i>
S26M9	<i>Pediococcus parvulus</i>		
Σύνολο	211		

*S1= *L. pentosus* / *S2= *L. plantarum* / *S16= αλατοπεριεκτικότητα 6% NaCl / *S13= αλατοπεριεκτικότητα 3% NaCl – 3% KCl / *M= MAP (modified atmosphere packaging) / *K= Κενό ή Vacuum / *A= Air