



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

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ & ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ
ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Συγκριτική μελέτη του οικοσυστήματος οξυγαλακτικών βακτηρίων και ζυμών κατά την αυθόρμητη ζύμωση ελιάς Καλαμών



Ελευθερία Ι. Δελή

Επιβλέπων καθηγητής:

Πανάγου Ευστάθιος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Αθήνα, 2021

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

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Συγκριτική μελέτη του οικοσυστήματος οξυγαλακτικών βακτηρίων και ζυμών κατά την αυθόρμητη ζύμωση ελιάς Καλαμών

“Comparative study of microbial consortia of lactic acid bacteria and yeasts during the spontaneous fermentation of Kalamata variety olives”

Ελευθερία Ι. Δελή

Εξεταστική επιτροπή:

Ευστάθιος Πανάγου, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Γεώργιος-Ιωάννης Νυχάς, Καθηγητής ΓΠΑ

Ελευθέριος Δροσινός, Καθηγητής ΓΠΑ

Συγκριτική μελέτη του οικοσυστήματος οξυγαλακτικών βακτηρίων και ζυμών κατά την αυθόρμητη ζύμωση ελιάς Καλαμών

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ελιά αποτελεί ένα αναπόσπαστο κομμάτι της Μεσογειακής διατροφής και καλλιεργείται ευρέως στην Ελλάδα ήδη από την αρχαιότητα. Η σημαντική διατροφική αξία που κατέχει η ελιά τη δεδομένη στιγμή οδηγεί σε περαιτέρω μελέτη της. Έτσι, στην παρούσα μελέτη θελήσαμε να εξετάσουμε το μικροοικοσύστημα της ελιάς και πιο συγκεκριμένα να διερευνήσουμε την βιοποικιλότητα των οξυγαλακτικών βακτηρίων και των ζυμών κατά την αυθόρμητη ζύμωσή της από τις περιοχές της Μεσσηνίας και της Αιτωλοακαρνανίας για την ποικιλία Καλαμών. Οι ελιές είχαν μεταποιηθεί με την ελληνικού τύπου τεχνική από του ίδιους τους παραγωγούς των περιοχών και στάλθηκαν μετά το πέρας της ζύμωσης στο εργαστήριο. Η εξέταση της μικροχλωρίδας πραγματοποιήθηκε με κλασσική μικροβιολογική ανάλυση χρησιμοποιώντας επιλεκτικά υποστρώματα για την ανίχνευση των ζυμών και των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Ακολούθησε ταυτοποίηση με αλληλουχίες του 16S rRNA γονιδίου για τα οξυγαλακτικά βακτήρια και με αλληλουχίες του 26S rRNA γονιδίου για τις ζύμες μέσω της RAPD-PCR, αφού πρώτα είχε προηγηθεί η απομόνωση και η ομαδοποίηση τους. Ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων κυμάνθηκε σε υψηλά επίπεδα ενώ των ζυμών ήταν αρκετά χαμηλά. Το γένος *Lactobacillus* κυριάρχησε και στις 2 περιοχές, ενώ το γένος *Pediococcus* και το γένος *Lactobacillus* κυριάρχησαν για την περιοχή της Αιτωλοακαρνανίας. Τέλος, στην περίπτωση των ζυμών για την περιοχή της Μεσσηνίας κυριάρχησε το είδος *Pichia manshurica* ενώ στην Αιτωλοακαρνανία κυριάρχησαν τα είδη *Candida Boidinii* και *Pichia membranifaciens*.

Επιστημονική περιοχή: Διατροφή Ανθρώπου

Λέξεις κλειδιά: επιτραπέζια ελιά, Καλαμών, βιοποικιλότητα, οξυγαλακτικά βακτήρια, ζύμες, RAPD-PCR

Comparative study of microbial consortia of lactic acid bacteria and yeasts during the spontaneous fermentation of Kalamata variety olives

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

ABSTRACT

Olive is an integral part of the Mediterranean diet and has been widely cultivated in Greece since antiquity. The significant nutritional value of olives at the moment leads to its further study. Thus, in the present study we wanted to examine the olive micro-ecosystem and more specifically to investigate the biodiversity of lactic acid bacteria and yeasts during its spontaneous fermentation from the regions of Messinia and Aitoloakarnania for the Kalamata variety. Olives had been processed with the Greek style technique by the producers of the areas and were send after the fermentation to the laboratory. The microflora was examined by standard microbiological analysis using selective growth media for the detection of yeasts and lactic acid bacteria. This was followed by identification with 16S rRNA gene sequencing for lactic acid bacteria and 26S rRNA gene sequencing for yeast by RADP-PCR, having previously isolated grouped them. The population of lactic acid bacteria ranged in high levels while the yeast population was quite low. The genus *Lactobacillus* dominated in both regions, while the genus *Pediococcus* coexisted with the genus *Lactobacillus* for the region of Aitoloakarnania. Finally, in the case of yeasts for the region of Messinia, the species *Pichia manshurica* dominated while in Aitoloakarnania the species *Candida Boidinii* and *Pichia membranifaciens* dominated.

Scientific area: Human nutrition

Keywords: table olives, Kalamata olives, biodiversity, lactic acid bacteria, yeasts, RAPD-PCR

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Ευστάθιο Πανάγου, ο οποίος με εμπιστεύτηκε και μου ανέθεσε το θέμα της διπλωματικής μου. Με την καθοδήγηση και τις συμβουλές του μπόρεσε να ολοκληρωθεί ομαλά η μελέτη. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Γ. Ιωάννη Νυχά και τον κ. Ελευθέριο Δροσινό για την συμμετοχή τους στην εξεταστική επιτροπή της μελέτης μου.

Ευχαριστώ θερμά την Αικατερίνη Τζαμουράνη για την πολύτιμη βοήθεια αλλά και στήριξη της, καθώς και για τον χρόνο που μου αφιέρωσε ώστε να ολοκληρώσω τόσο το πειραματικό μέρος όσο και την συγγραφή της διπλωματικής μου. Ευχαριστώ επίσης τον κ. Σπύρο Παραμυθιώτη για τις συμβουλές του σχετικά με τις μοριακές τεχνικές που περιλαμβάνει η μελέτη αλλά και όλα τα παιδιά του εργαστηρίου για το υπέροχο κλίμα που επικρατούσε στο εργαστήριο.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και τον Παναγιώτη, οι οποίοι με την αδιάκοπη στήριξη τους με βοήθησαν να ολοκληρώσω επιτυχώς αυτή την εργασία.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1. ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	1
2. ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΥ	3
3. ΕΙΔΗ ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΑΣ ΕΛΙΑΣ	4
4. ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΕΛΙΩΝ	5
5. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΑΣ ΕΛΙΑΣ	8
6. ΖΥΜΩΣΗ ΕΛΙΑΣ	10
7. ΖΥΜΕΣ	11
8. ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ	12
9. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ	13
i. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)	14
ii. RAPD-PCR	15
iii. MULTIPLEX PCR.....	16
10. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ	16
ΣΚΟΠΟΣ	17
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	18
1. ΔΕΙΓΜΑΤΑ	18
2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΦΟΡΤΙΟΥ	20
3. ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ	21
4. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ	22
i. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ-ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ-ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΣ ΑΠΟΙΚΙΩΝ	22
ii. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ-ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΓΕΝΟΜΙΚΟΥ DNA.....	23
iii. ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΟΥ DNA.....	25
iv. RAPD-PCR	26
v. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ	28
5. ΒΙΟΝΥΜΕΡΙΚΑ	29
6. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ	29
7. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΖΥΜΩΝ	30
8. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ PCR	31

9. MULTIPLEX PCR	32
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ	34
1. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ	34
i. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ	34
ii. ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ.....	36
2. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ.....	37
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	49
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	51
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	57

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Η ελιά θεωρείται ευρέως ένα από τα αρχαιότερα καλλιεργούμενα δέντρα στον κόσμο. Ανήκει στο γένος των καρποφόρων δέντρων της οικογένειας των Ελαιοειδών (Oleaceae). Λέγεται πως καλλιεργείται από τα χρόνια της αρχαιότητας και πιθανότατα φυτεύτηκε για πρώτη φορά στην Ελλάδα. Η σημασία της ελιάς στην Ελλάδα είναι τεράστια. Ήδη από την αρχαιότητα υπήρξε σύμβολο σοφίας και ειρήνης (Μίλη, 2014). Αποτελεί ένα αειθαλές δέντρο, αργά αναπτυσσόμενο και αντέχει αρκετά στο χρόνο, καθώς μπορεί να επιβιώσει για 500 χρόνια (Rhizoroulou, 2007). Επιπλέον, συνεισφέρει σημαντικά στην οικονομία της χώρας, καθώς μαζί με την Ισπανία, την Ιταλία και Πορτογαλία αποτελούν τους μεγαλύτερους παραγωγούς επιτραπέζιας ελιάς στην Ευρώπη, κατέχοντας έτσι το 35% της παγκόσμιας παραγωγής (Kazou *et.al.*, 2020). Σε οικονομικό επίπεδο, η παγκόσμια παραγωγή επιτραπέζιας ελιάς για την περίοδο 2019/20 αγγίζει τους 2.925.500 τόνους (ΙΟΟC, πίνακας 7-παράρτημα). Στην Ελλάδα, η οποία κατατάσσεται ως η δεύτερη χώρα στην Ευρώπη, η παραγωγή φτάνει τους 207.000 τόνους (ΙΟΟC, πίνακας 8-παράρτημα).



Εικόνα 1. Δέντρο ελιάς

Σημαντικό χαρακτηριστικό στην διατήρηση της ποιότητας αλλά και της οικονομικής σημασίας της ελιάς και των παραγώγων της είναι η σωστή και επιμελής καλλιέργεια της. Παρόλη την προσαρμοστικότητα που έχει σαν φυτό, καθώς μπορεί να αναπτυχθεί ακόμα και σε απότομες πλαγιές, υπάρχουν αρκετοί παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη της. Γενικά, το μεσογειακό κλίμα είναι το ιδανικό για να καλλιεργηθεί η ελιά (Μίλη, 2014). Οι πολύ υψηλές θερμοκρασίες κατά την ανάπτυξη επηρεάζουν αρνητικά τον τελικό καρπό δημιουργώντας ακόμα και μείωση του μεγέθους, θέτοντας έτσι σαν ιδανική θερμοκρασία τιμές μεταξύ 30°C και 45°C, ενώ μια έντονη χιονόπτωση σε συνδυασμό με μια απότομη πτώση της θερμοκρασίας μπορεί να καταστρέψει τελείως το δέντρο προκαλώντας βλάβη και στα φύλλα (Μίλη 2014, D'Angeli et.al. 2003). Από την άλλη πλευρά, η ελιά είναι ένα δέντρο που δεν έχει μεγάλες απαιτήσεις σε νερό και επιβιώνει και σε περιοχές με χαμηλή βροχόπτωση και ξηρές συνθήκες, αρκεί βέβαια να γίνονται κάποιες επιπρόσθετες αρδεύσεις (Μίλη 2014, Wahbi et.al. 2005). Επίσης, η ελιά επηρεάζεται έντονα και από ισχυρούς ανέμους ενώ μπορεί να αναπτυχτεί και σε άγονα εδάφη. Ιδανικά εδάφη για την ανάπτυξη της είναι εκείνα που μπορούν να συγκρατούν την υγρασία (Μίλη 2014).

Με μία γρήγορη ματιά μπορούμε να δούμε ότι η ελιά είναι ένα δέντρο που ευνοείται αρκετά από το κλίμα της Ελλάδας, όμως σίγουρα η γεωγραφική θέση αλλά και οι συνθήκες που επικρατούν μπορούν να επηρεάσουν το τελικό προϊόν. Η μορφολογία του εδάφους, το μικρόκλιμα της κάθε περιοχής, η εμπειρία και οι καλλιεργητικές τεχνικές του κάθε γεωργού, καθώς και οι ποικιλίες της ελιάς και η βιοποικιλότητα τους μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι όλα αυτά είναι ικανά να επηρεάσουν το τελικό προϊόν της ελιάς σε όλους τους τομείς.

2. ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΥ

Ο ελαιόκαρπος αποτελείται από 3 μέρη: την εξωτερική επιδερμίδα, το επικάρπιο, το μεσοκάρπιο που είναι ουσιαστικά η σάρκα και το ενδοκάρπιο που είναι ο πυρήνας (Μίλη, 2014). Το μεσοκάρπιο είναι το σημαντικότερο τμήμα του ελαιόκαρπου καθώς είναι και το εδώδιμο μέρος, καταλαμβάνοντας το 70-90% του βάρους του καρπού (Πανάγου, 2002).



Εικόνα 2. Ελαιόκαρπος

Η μέση χημική σύσταση του μεσοκαρπίου σε νωπό βάρος είναι η εξής (Μίλη, 2014):

- Νερό 50-75%
- Λιπαρές ουσίες 10-30%
- Αναγωγικά ζάχαρα 2-6%
- Μη αναγωγικά ζάχαρα 0,1-0,3%
- Πρωτεΐνες 1-2%
- Φυτικές ίνες 1-4%
- Φαινολικές ενώσεις 1-3%
- Οργανικά οξέα 0,5-1,0%
- Πηκτίνες 0,3-0,6%
- Ανόργανες ενώσεις 0,6-1,0%
- Λοιπά στοιχεία 3-7%

3. ΕΙΔΗ ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΑΣ ΕΛΙΑΣ

Σύμφωνα με το International Olive Oil Council (2004) επιτραπέζια ελιά σημαίνει το προϊόν:

- που παρασκευάζεται από υγιείς καρπούς των ποικιλιών της καλλιεργημένης ελιάς (*Olea europaea L.*) που επιλέγονται για την παραγωγή ελιών των οποίων ο όγκος, το σχήμα, η αναλογία σάρκας-πυρήνα, η γεύση, η σταθερότητα και η ευκολία αποκόλλησης από τον πυρήνα τους καθιστά κατάλληλους για ειδική επεξεργασία.
- που επεξεργάζεται για να απομακρυνθεί η πικρή γεύση της και συντηρείται με φυσική ζύμωση, ή με θερμική επεξεργασία, με ή χωρίς την προσθήκη συντηρητικών.
- που είναι συσκευασμένο με ή χωρίς υγρό συσκευασίας.

Ανάλογα με τον βαθμό ωριμότητας των καρπών, η επιτραπέζια ελιά μπορεί να ταξινομηθεί ως εξής (*International Olive Oil Council, 2004*):

- Πράσινες ελιές: οι καρποί συλλέγονται κατά την περίοδο ωρίμανσης, πριν τον χρωματισμό και όταν έχουν φτάσει στο κανονικό μέγεθος.
- Ελιές κατά την αλλαγή χρώματος: οι καρποί συγκομίζονται πριν από το στάδιο της πλήρους ωρίμανσης, κατά την αλλαγή χρώματος.
- Μαύρες ελιές: οι καρποί συγκομίζονται όταν είναι πλήρως ώριμοι ή ελαφρώς πριν επιτευχθεί η ωρίμανση.

Οι εμπορικοί τύποι ελιάς, ύστερα από την διαδικασία της εκτίκρισης, μπορεί να διαφέρουν είτε στον τρόπο συντήρησης είτε στο χρώμα που θα διαθέτουν. Η διαδικασία της απομάκρυνσης της πικρής γεύσης από την σάρκα γίνεται ή με αλκαλική επεξεργασία ή με εμβάπτιση σε υγρό για την αραίωση της πικρής ένωσης ή με βιολογικές διεργασίες.

Τα είδη των εμπορικών τύπων ελιάς, σύμφωνα με το *IOOC/2004*, είναι τα εξής:

- Επεξεργασμένες ελιές σε άλμη: πράσινες ελιές, ελιές κατά τη διαδικασία αλλαγής χρώματος ή μαύρες ελιές που έχουν υποστεί αλκαλική επεξεργασία και στη συνέχεια συσκευάζονται σε άλμη στην οποία υφίστανται πλήρη ή μερική ζύμωση και διατηρούνται ή όχι με την προσθήκη όξινων παραγόντων.
- Φυσικές ελιές σε άλμη: πράσινες ελιές, ελιές κατά τη διαδικασία αλλαγής χρώματος ή μαύρες ελιές τοποθετημένες απευθείας σε άλμη στην οποία υφίστανται πλήρη ή μερική ζύμωση και διατηρούνται ή όχι με την προσθήκη όξινων παραγόντων.
- Αφυδατωμένες ή συρρικνωμένες ελιές: πράσινες ελιές, ελιές κατά τη διαδικασία αλλαγής χρώματος ή μαύρες ελιές που έχουν υποστεί ή όχι ήπια αλκαλική επεξεργασία, διατηρημένες σε άλμη ή μερικώς αφυδατωμένες σε ξηρό αλάτι ή/και με θέρμανση ή με οποιαδήποτε άλλη τεχνολογική διαδικασία.
- Ελιές που μαυρίζουν με οξείδωση: πράσινες ελιές ή ελιές κατά τη διαδικασία αλλαγής χρώματος διατηρούνται σε άλμη, έχοντας υποστεί ζύμωση ή όχι, σκουραίνουν με οξείδωση σε αλκαλικό μέσο και διατηρούνται σε ερμητικά σφραγισμένους περιέκτες που υπόκεινται σε θερμική αποστείρωση. Θα αποκτήσουν ένα ομοιόμορφο μαύρο χρώμα.
- Λοιπά είδη: υπάρχουν και άλλοι τρόποι που μπορούν να παρασκευαστούν ανάλογα με τον παρασκευαστή. Σε οποιαδήποτε περίπτωση θα πρέπει να συμμορφώνονται με τους γενικούς ορισμούς του προτύπου και η ονομασία να είναι κατάλληλη ώστε να μην προκαλείται σύγχυση στους καταναλωτές.

4. ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΕΛΙΩΝ

Οι σημαντικότερες ποικιλίες επιτραπέζιας ελιάς που παράγονται στην Ελλάδα είναι η Κονσερβολιά, η Χαλκιδικής, η Θάσου και η Καλαμών.

- Κονσερβολιά: Είναι μια από τις σημαντικότερες ποικιλίες στην Ελλάδα σε οικονομικό επίπεδο καθώς στην συγκεκριμένη ποικιλία

αναλογεί το 80-85% της παραγωγής επιτραπέζιας ελιάς (Bleve *et.al.*, 2015). Η ποικιλία αυτή καλλιεργείται κυρίως στην κεντρική Ελλάδα και συγκεκριμένα στη Φθιώτιδα, Φωκίδα, Μαγνησία, Αιτωλοακαρνανία, Άρτα και Εύβοια (Argyri *et.al.*, 2020). Το βάρος του καρπού κυμαίνεται μεταξύ 5-8 g κατά μέσο όρο (Μπαλατσούρας, 1995). Επεξεργάζονται ως Ισπανικού τύπου πράσινες ελιές αλλά και σαν φυσικές μαύρες ελιές (Panagou, 2015). Η συλλογή ξεκινάει τον Σεπτέμβριο όπου μαζεύονται οι πράσινες ελιές και συνεχίζεται έως τις αρχές του χειμώνα για τις φυσικές μαύρες ελιές (DOEPEL International Table Olive Organisation). Η συγκεκριμένη ποικιλία ελιάς παρουσιάζει μεγάλη αναλογία σάρκας και πυρήνα, περίπου 8:1 έως και 10:1, ανήκοντας έτσι στις μικροπύρηνες ποικιλίες (Πανάγου 2002, Panagou 2015). Τέλος, η διαδικασία της ζύμωσης και της ωρίμανσης ποικίλλει ανάλογα με τον τύπο ελιάς που επιθυμούμε να κατασκευάσουμε. Συνήθως για τις φυσικές μαύρες ελιές κυμαίνεται από 3 με 9 μήνες, ενώ για τις πράσινες ελιές από 2,5 με 6 μήνες (DOEPEL International Table Olive Organisation).



Εικόνα 3. Κονσερβολιά

- Χαλκιδική: Καλλιεργείται στην περιοχή της Χαλκιδικής αλλά και στην Κεντρική και Ανατολική Μακεδονία (DOEPEL International Table Olive Organisation). Επεξεργάζονται ως Ισπανικού τύπου πράσινες ελιές, καθώς το χρώμα της ποικιλίας στο στάδιο της πλήρους ωριμότητας δεν γίνεται ποτέ εντελώς μαύρο (Πανάγου 2002, Argyri *et.al.* 2020). Χαρακτηρίζονται και αυτές από μεγάλη αναλογία σάρκας και πυρήνα, συγκεκριμένα 10:1 (Panagou, 2015).

Η συγκεκριμένη ποικιλία επιτραπέζιας ελιάς ανήκει στην αδρόκαρπη ποικιλία, με βάρος καρπού από 6-10 g (Πανάγου, 2002). Συλλέγονται στα μέσα Σεπτεμβρη έως και τον Οκτώβρη και η ζύμωση και ωρίμανση διαρκεί από 2 έως 6 μήνες ανάλογα με την ωριμότητα της ελιάς αλλά και την επικρατούσα θερμοκρασία περιβάλλοντος (DOEPEL International Table Olive Organisation).



Εικόνα 4. Ελιές Χαλκιδικής

- Θάσου: Ο συγκεκριμένος τύπος ελιάς καλλιεργείται κυρίως στη Θάσο και στην ευρύτερη περιοχή. Επεξεργάζονται ως ξηρές αλατισμένες ελιές με αναλογία σάρκας και πυρήνα 6:1. Δεν είναι ευρέως γνωστές και καταναλώνονται κυρίως τοπικά (Panagou, 2015).
- Καλαμών: Θεωρείται η δεύτερη πιο σημαντική ποικιλία έπειτα από την ποικιλία Κονσερβοελιά (Bleve et.al, 2015). Η επιτραπέζια ελιά Καλαμών καλλιεργείται κατά κύριο λόγο στην Πελοπόννησο και στην κεντρική Ελλάδα. Η μεγαλύτερη παραγωγή λαμβάνει χώρα στις περιοχές της Αιτωλοακαρνανίας, Λακωνίας, Φθιώτιδας και Μεσσηνίας (DOEPEL International Table Olive Organisation). Η συγκεκριμένη επιτραπέζια ελιά χαρακτηρίζεται από το σκούρο χρώμα και την τραγανή υφή του τελικού προϊόντος, κατέχοντας τη μεγαλύτερη ζήτηση για εξαγωγές (Kazou et.al., 2020) . Αποτελεί το 20% της συνολικής παραγωγής στην Ελλάδα και επεξεργάζονται ως φυσικές μαύρες ελιές, ενώ παρουσιάζουν αναλογία σάρκας και πυρήνα 8:1 (Panagou, 2015). Ανήκει στις μεσόκαρπες ποικιλίες με βάρος καρπού μεταξύ 3-6 g (Πανάγου, 2002). Η ελιά Καλαμών συλλέγεται από αρχές Νοέμβρη έως και τις αρχές του χειμώνα, όταν

θα έχει το σωστό βαθύ μαύρο χρώμα χωρίς όμως να έχει ωριμάσει πλήρως, ενώ υφίστανται φυσική ζύμωση και διατηρείται σε άλμη όπου εκεί ολοκληρώνεται και η ωρίμανση έχοντας σαν αποτέλεσμα εξαιρετικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της (DOEPEL International Table Olive Organisation, Kalogiouri 2020). Τέλος, λόγω της μεγάλης ζήτησης της συγκεκριμένης ελιάς εκτιμάται ότι σε 10 χρόνια η παραγωγή της θα ξεπεράσει τους 100.000 τόνους (DOEPEL International Table Olive Organisation).



Εικόνα 5. Ελιές ποικιλίας Καλαμών

5. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΑΣ ΕΛΙΑΣ

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, πριν την εμπορική διάθεση της ελιάς χρειάζεται να γίνει κατάλληλη επεξεργασία έτσι ώστε να απομακρυνθεί η πίκρα και να είναι βρώσιμη. Οι κυριότερες μέθοδοι είναι η Ισπανική, η Ελληνική και η τύπου Καλιφόρνιας.

- Ισπανικού τύπου

Αρχικά γίνεται η συγκομιδή και διαλογή των καρπών της ελιάς. Ακολουθεί εμβάπτιση της ελιάς σε αραιό διάλυμα NaOH (2-3%), στοχεύοντας στην αποικοδόμηση των πολυφαινολών και την αύξηση της διαπερατότητας του κυτταρικού τοιχώματος (Arroyo-Lopez *et.al.*, 2008). Εν συνεχεία, μόλις το διάλυμα διεισδύσει περίπου στα 2/3 της απόστασης μεταξύ επιφάνειας και πυρήνα (Zipori *et.al.*, 2014), ακολουθεί έκπλυση με νερό για να απομακρυνθεί η περίσσεια ποσότητα αλκαλίου και συντήρηση σε άλμη, όπου πραγματοποιείται αυθόρμητη ζύμωση κυρίως από

οξυγαλακτικά βακτήρια (*Gomez et.al.* 2006, *Arponte et.al.* 2012). Η ζύμωση διαρκεί περίπου 3-7 μήνες ενώ επιτυγχάνεται μέσω βακτηρίων γαλακτικού οξέος (*Perpetuini et.al.*, 2020). Το τελικό προϊόν χαρακτηρίζεται από χαμηλές τιμές pH, συνήθως 3,8-4,0, ενώ λαμβάνεται μετά από διάστημα 30-60 ημερών ύστερα από την παραμονή μέσα στην άλμη (*Conte et.al.*, 2020).

- Ελληνικού τύπου

Μετά τη συλλογή του καρπού, οι ελιές τοποθετούνται απευθείας σε άλμη με συγκέντρωση αλατιού περίπου 6-10% w/v, υποβάλλοντας τις σε αυθόρμητη ζύμωση (*Bleve et.al.*, 2014). Οι ελιές, λόγω της διάχυσης της ελευρωπαϊκής από την σάρκα στην άλμη, χάνουν την πίκρα που τις χαρακτηρίζει (*Ramirez et.al.*, 2016). Η διάρκεια της ζύμωσης κυμαίνεται στους 8-12 μήνες, έως ότου επιτευχθεί η εκπίκριση (*Conte et.al.*, 2020). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η διάχυση των ζυμώσιμων ενώσεων μέσω του δέρματος, όταν δεν έχουν υποστεί ο ελιές επεξεργασία με αλκάλια, είναι αργή (*Gomez et.al.*, 2006). Η διαδικασία της ζύμωσης επιτυγχάνεται κυρίως από βακτήρια γαλακτικού οξέος και ζύμες (*Perpetuini et.al.*, 2020).

- Τύπου Καλιφόρνιας

Αφού ολοκληρωθεί η συγκομιδή και διαλογή των καρπών οι ελιές συντηρούνται σε άλμη (*Arroyo-Lopez et.al.*, 2008). Αρχικά πραγματοποιείται επεξεργασία του καρπού με αραιά διαλύματα NaOH, διεισδύοντας 1-2 mm μεταξύ σάρκας και πυρήνα (*Marsilio et.al.*, 2001). Πραγματοποιούνται πλύσεις με νερό ενδιάμεσα (*Arroyo-Lopez et.al.*, 2008) και εν συνεχεία πραγματοποιείται η διαδικασία σκούρησης του καρπού μέσω της οξειδωσης (*Perpetuini et.al.*, 2020). Κατά την παραπάνω επεξεργασία, οι ελιές βυθίζονται στο νερό όπου μέσω αυτού διοχετεύεται αέρας (*Marsilio et.al.*, 2001). Μόλις οι ελιές αποκτήσουν το κατάλληλο χρώμα ακολουθεί πλύσιμο και αερισμός του νερού έως ότι το pH αγγίζει το 8 και έπειτα προστίθενται άλατα σιδήρου βελτιώνοντας την ανάπτυξη του χρώματος (*Marsilio et.al.*, 2001). Τέλος,

αποθηκεύονται σε ερμητικά σφραγισμένα δοχεία και υπόκεινται σε θερμική αποστείρωση (*Perpetuini et.al.*, 2020).

6. ΖΥΜΩΣΗ ΕΛΙΑΣ

Η ζύμωση της επιτραπέζιας ελιάς στοχεύει στην συντήρηση αλλά και ενίσχυση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του τελικού προϊόντος (*Anagnostopoulos et.al.*, 2019). Γενικά, τα τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση δημιουργήθηκαν μέσω αυθόρμητης διαδικασίας η οποία με την πάροδο των χρόνων βελτιώθηκε εξασφαλίζοντας την ασφάλεια και ποιότητα του προϊόντος (*Vaccalluzzo et.al.*, 2020). Οι συνηθέστεροι μικροοργανισμοί κατά την αυθόρμητη ζύμωση είναι οι *Enterobacteriaceae*, *Leuconostoc*, *Pseudomonas*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, ζύμες και οι μύκητες (*Portilha-Cunha et.al.*, 2020). Η ζύμωση της επιτραπέζιας ελιάς βασίζεται στην ικανότητα των οξυγαλακτικών βακτηρίων να παράγουν οξύ και να μειώνουν το pH (*Hurtado et.al.*, 2012).

Γενικά, η διαδικασία της φυσικής ζύμωσης της ελιάς χωρίζεται σε 3 φάσεις. Τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια κυριαρχούν στην αρχή της ζύμωσης παίζοντας σημαντικό ρόλο, ενώ φτάνουν στο μέγιστο αριθμό τους την δεύτερη μέρα κιόλας, αφού οι ελιές έχουν μπει στην άλμη (*Hurtado et.al.*, 2012). Η φάση αυτή διαρκεί μέχρι να αυξηθούν τα οξυγαλακτικά βακτήρια, συνήθως χρειάζονται 48-72h (*Lanza*, 2013). Στο διάστημα εκείνο, τα οξυγαλακτικά βακτήρια ή οι ζύμες, ανάλογα ποιος είναι υπεύθυνος για την ζύμωση, αρχίζουν να εμφανίζονται, ενώ τα Gram αρνητικά βακτήρια μέσα στο διάστημα των επόμενων εβδομάδων εξαφανίζονται (1-4 εβδομάδες) οδηγώντας έτσι στο τέλος της δεύτερης φάσης (*Hurtado et.al.*, 2012). Η δεύτερη φάση θα διαρκέσει μέχρι να αναπτυχθεί το γένος *Lactobacillus*, ενώ μπορεί να εμφανιστούν και τα γένη *Pediococcus* και *Leuconostoc*, το οποίο γίνεται συνήθως σε διάστημα 2 εβδομάδων (*Lanza*, 2013). Σε ιδανικές συνθήκες το pH αγγίζει το 4 ξεκινώντας έτσι η Τρίτη φάση, όπου τα οξυγαλακτικά βακτήρια ή οι ζύμες, ή και τα δύο, καταναλώνουν τα προϊόντα που παράχθηκαν (*Hurtado et.al.*, 2012).

7. ΖΥΜΕΣ

Αρχικά, οι ζύμες είναι μονοκύτταροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί, οι οποίοι ανήκουν στο βασίλειο των μυκήτων, ενώ παράλληλα απομονώνονται από υποστρώματα πλούσια σε σάκχαρα (Arroyo-Lopez *et.al.*, 2008). Οι περισσότερες ζύμες αναπαράγονται ασεξουαλικά, μέσω της διαδικασίας της εκκόλαψης, παρόλα αυτά υπάρχουν ζύμες που αναπαράγονται έπειτα από σύζευξη κυττάρων δημιουργώντας ασκοσπόρια εντός του κυττάρου. (Bullerman, 2003).

Οι ζύμες είναι αερόβιοι και προαιρετικά αναερόβιοι οργανισμοί, παράγοντας βιομάζα ή αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα αντίστοιχα. Γενικά, οι ανάγκες των ζυμών σε υγρασία είναι χαμηλότερες από εκείνες των βακτηρίων θέτοντας σαν χαμηλότερο όριο της ενεργότητας νερού a_w μεταξύ 0,88 με 0,94. Η ελάχιστη και βέλτιστη τιμή της a_w για κάθε είδος του οργανισμού μεταβάλλεται ανάλογα τις συνθήκες που επικρατούν κατά την ανάπτυξη, όπως το pH, τη θερμοκρασία, το διαθέσιμο οξυγόνο, διάφορους ανασταλτικούς παράγοντες και παράγοντες που εξασφαλίζουν την απαραίτητη ενέργεια του οργανισμού. Η ιδανική θερμοκρασία ανάπτυξης των ζυμών κυμαίνεται από 25-30 °C, όμως είναι ικανοί γενικά να αναπτυχθούν σε ένα εύρος τιμών από 0°C έως 47° καθώς και σε τιμές pH μεταξύ 4 και 4,5. Οι ζύμες παρόλα αυτά δεν έχουν την δυνατότητα να αναπτυχθούν κάτω από αλκαλικές συνθήκες. (Bullerman, 2003)

Τα πιο συχνά είδη ζυμών που έχουν απομονωθεί από διάφορες ποικιλίες ελιάς είναι τα είδη *Candida*, *Pichia*, *Saccharomyces*, ενώ σε μικρότερο βαθμό τα είδη *Debaryomyces*, *Issatchenkia*, *Zygorulasporea* και *Wickerhamomyces* (Heperkan, 2013).

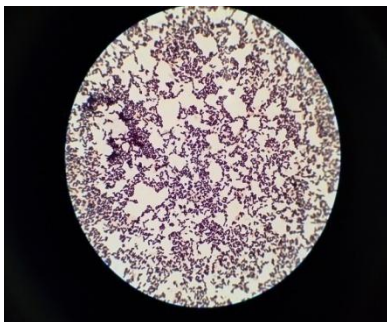
Η παρουσία των ζυμών κατά την διαδικασία της ζύμωσης των ελιών παίζει σημαντικό ρόλο. Όταν τα οξυγαλακτικά βακτήρια υπερισχύουν έναντι των ζυμών, επικρατεί ένα όξινο περιβάλλον με pH σε τιμές <4,3 (Arroyo-Lopez *et.al.*, 2012). Σε διαφορετική περίπτωση, μπορεί να υπερισχύσουν οι ζύμες και να προκύψει ένα προϊόν με ήπια γεύση και μικρότερη διάρκεια ζωής (Arroyo-Lopez *et.al.*, 2008). Επιπλέον, οι ζύμες μπορεί να οδηγήσουν στον σχηματισμό θυλάκων αερίου (Bleve *et.al.*, 2014) λόγω της παραγωγής CO₂ στα πρώιμα

στάδια της ζύμωσης (Bleve *et.al.*, 2015). Οι ζύμες μπορούν να οδηγήσουν και στο μαλάκωμα του ιστού της ελιάς αλλά και στο θόλωμα της άλμης, ενώ μπορεί να προκαλέσουν διόγκωση στην συσκευασία και απελευθέρωση οσμών και δυσάρεστων γεύσεων (Perpetuini *et.al.*, 2020).

Οι ζύμες όμως έχουν και έναν αρκετά ευεργετικό χαρακτήρα και αυτό γιατί συντελούν στην παραγωγή πτητικών ενώσεων και μεταβολιτών ικανών να βελτιώσουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος, στην απελευθέρωση θρεπτικών ενώσεων που ενισχύουν την ανάπτυξη των LAB αλλά διαθέτουν και δραστικότητα έναντι ανεπιθύμητων μικροοργανισμών μειώνοντας τις φαινολικές ενώσεις (Bleve *et.al.*, 2014). Συγκεκριμένα, οι ζύμες ενισχύουν το άρωμα και την γεύση του προϊόντος μέσω της δραστικότητας ζυμών, όπως οι λιπάσες και οι εστεράσες, που οδηγούν στον σχηματισμό αρωματικών ενώσεων όπως η γλυκερόλη, η αιθανόλη και άλλες πτητικές ενώσεις (Bonatsou *et.al.*, 2018). Οι ζύμες έχουν επίσης την ικανότητα να συμβάλλουν στην σύνθεση βιοδραστικών ενώσεων οι οποίες λειτουργούν ως αντιοξειδωτικά (Arroyo-Lopez *et.al.*, 2008). Τέλος, οι ζύμες παράγουν αιθανόλη αλλά και τοξικές πρωτεΐνες ή γλυκοπρωτεΐνες, είναι ικανές να αναστείλουν την ανάπτυξη μυκήτων αλλά και άλλων μη επιθυμητών ειδών ζυμών και βακτηρίων (Arroyo-Lopez *et.al.* 2012).

8. ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) χαρακτηρίζονται ως Gram αρνητικά βακτήρια, αρνητικά στην αντίδραση καταλάσης, έχοντας σχήμα σφαιρικό ή ραβδοειδές χωρίς να σχηματίζουν σπόρια (Taylor, 2004). Παραδοσιακά χρησιμοποιούνται στην ζύμωση γαλακτοκομικών προϊόντων, κρέατος, ψαριού αλλά και λαχανικών όπως αγγουράκι τουρσί και επιτραπέζιες ελιές (Hurtado *et.al.*, 2012).



Εικόνα 6. Βάκιλοι LAB

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια LAB είναι μια ομάδα βακτηρίων ικανά να οδηγήσουν σε ζύμωση γαλακτικού οξέος και μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες, τους homofermentative, οι οποίοι

παράγουν κυρίως γαλακτικό οξύ, αλλά και στους heterofermentative, οι οποίοι παράγουν γαλακτικό οξύ σε συνδυασμό με αιθανόλη ή/και CO₂ (Portilha-Cunha et.al., 2020). Τα οξυγαλακτικά βακτήρια που σχετίζονται με τα τρόφιμα περιλαμβάνουν είδη των γενών *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus* και *Streptococcus*, αλλά και των ειδών *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Sporolactobacillus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* και *Weissella* (Ashaolu et.al., 2020). Ως αποτέλεσμα αυτών, η ικανότητα των οξυγαλακτικών βακτηρίων να παράγουν γαλακτικό οξύ κρατώντας έτσι χαμηλό το pH, παρεμποδίζει την ανάπτυξη άλλων βακτηρίων (Hurtado et.al., 2012).

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια γενικά αναπτύσσονται σε όξινο περιβάλλον, σε τιμές pH χαμηλότερες από 4, ενώ από την παραγωγή του γαλακτικού οξέος η τιμή μπορεί να πέσει και χαμηλότερα, ενώ η θερμοκρασία ανάπτυξης τους κυμαίνεται μεταξύ 20°C και 32°C (Taylor, 2004). Η δραστηριότητα των LAB οδηγεί σε οξίνιση της άλμης, μέσω της παραγωγής γαλακτικών οξέων, όπου όχι μόνο μειώνεται το pH αλλά παρέχει και μικροβιολογικό έλεγχο στο τελικό προϊόν παρατείνοντας και την διάρκεια ζωής του (Anagnostopoulos et.al., 2019). Έχει, δηλαδή, την δυνατότητα να εμποδίζει την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών (Bleve et.al., 2014) αλλά και να επιβραδύνει τον ρυθμό αλλοίωσης του τροφίμων από άλλα βακτήρια και αυτό χάρις τις περιβαλλοντικές συνθήκες που δημιουργούν τα οξυγαλακτικά βακτήρια (Taylor, 2004).

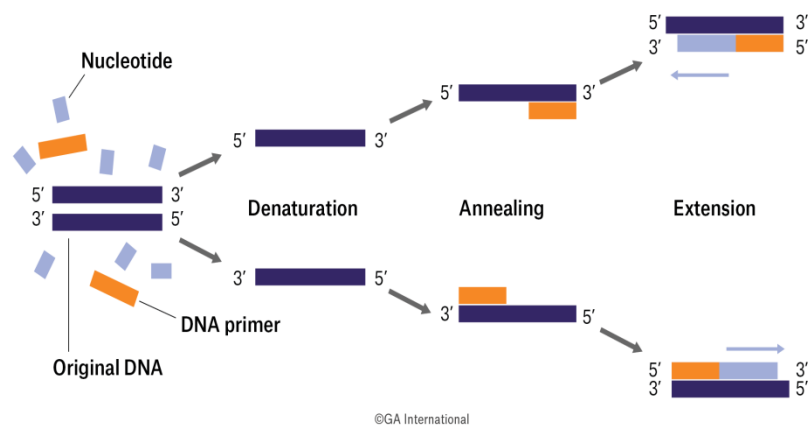
9. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Οι μοριακές τεχνικές τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί και εφαρμόζονται ολοένα και περισσότερο στον κλάδο της μικροβιολογίας τροφίμων. Σε σχέση με τις κλασσικές μικροβιολογικές μεθόδους, που αποτελούν μεθόδους αναφοράς, σκοπό έχουν να εξετάσουν γενικά τον μεταβολισμό των βακτηρίων με πιο απλούς και μη χρονοβόρους τρόπους (Κυριαζής, 2014). Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται στην εκάστοτε μοριακή μέθοδο χωρίζονται με βάση το αν στηρίζονται στην καλλιέργεια μικροοργανισμών ή όχι. Αυτό σημαίνει πως στην πρώτη περίπτωση χρειάζεται

να γίνει η μικροβιολογική ανάλυση του εκάστοτε τροφίμου απομονώνοντας μετά το DNA ή RNA από τον μικροοργανισμό που επιθυμούμε να αναλύσουμε, ενώ στην δεύτερη περίπτωση το DNA ή RNA απομονώνεται απευθείας από το τρόφιμο.

i. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) βασίζεται στον υβριδισμό συγκεκριμένων ολιγονουκλεοτιδίων σε ένα συγκεκριμένο τμήμα DNA και στην *in vitro* σύνθεση εκατομμυρίων αντιγράφων DNA (Fajardo *et.al.*, 2010). Η μέθοδος PCR είναι πλέον αρκετά συνηθισμένη, απλή και ένα οικονομικό εργαλείο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε φαρμακευτικές ή βιολογικές έρευνες, σε νοσοκομειακές αναλύσεις αλλά και σε τρόφιμα και ποτά (Klančnik *et.al.*, 2012). Μια αντίδραση PCR αποτελείται από 3 στάδια τα οποία θα επαναληφθούν αρκετές φορές (Παραμυθιώτης, 2010). Γενικά, χρειάζονται 35 με 40 κύκλοι για την παροχή επαρκούς ποσότητας DNA με σκοπό την περαιτέρω ανάλυσή του (Klančnik *et.al.*, 2012). Αρχικά, ξεκινάει η μετουσίωση σε υψηλές θερμοκρασίες, κοντά στους 95°C, όπου οι κλώνοι του μορίου DNA διαχωρίζονται λόγω διάσπασης των δεσμών τους (Singh *et.al.*, 2014). Εν συνεχεία, ακολουθεί το στάδιο του υβριδισμού, όπου τα μόρια εκκινητές υβριδίζονται στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο μητρικό μόριο DNA σε θερμοκρασίες μεταξύ 45-60°C (Παραμυθιώτης, 2010). Μετά την υβριδοποίηση των εκκινητών, ξεκινάει η επιμήκυνση, ώστε να προκύψει ένας συμπληρωματικός κλώνος, αντίγραφο του DNA (Joshi *et.al.*, 2010).



Εικόνα 7. Στάδια PCR

Η PCR για να λειτουργήσει ορθά απαιτεί κάποια βασικά χαρακτηριστικά, ξεκινώντας από το πρότυπο DNA που περιέχει την περιοχή που επιθυμούμε να ενισχυθεί (*Rahman et.al.*, 2013). Τα μόρια εκκινητές, ή αλλιώς primers, παίζουν σημαντικό ρόλο καθώς βοηθούν στην ενίσχυση της περιοχής DNA που έχουμε επιλέξει και σχεδιάζονται ώστε να είναι αποδοτικοί και εξειδικευμένοι ώστε να αποφεύγονται λάθη (*Singh et.al.*, 2014). Επιπλέον, χρειαζόμαστε ένα ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο παρέχει κατάλληλο χημικό περιβάλλον για την DNA πολυμεράση (*Rahman et.al.*, 2013). Τα τριφωσφορικά δεσοξυριβονουκλεοτίδια (dNTP's) παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στην μέθοδο αυτή καθώς είναι δομικές μονάδες των νουκλεϊκών οξέων χωρίς τα οποία δεν μπορεί να ολοκληρωθεί η σύνθεση του κλώνου DNA (*Παραμυθιώτης*, 2010). Τέλος, αναπόσπαστο κομμάτι αποτελεί η DNA πολυμεράση. Το ένζυμο DNA πολυμεράση δρα ως καταλύτης κατά την διαδικασία αντιγραφής του DNA (*Παπαναστασοπούλου*, 1997). Γενικά, η DNA πολυμεράση απομονώθηκε αρχικά από το βακτήριο *Thermus aquaticus* από τον Thomas Brock το 1965, ενώ η βέλτιστη θερμοκρασία δραστηριότητάς της είναι μεταξύ 75°C με 80°C (*Klančnik et.al.*, 2012).

ii. RAPD-PCR

Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στην τεχνική PCR και χρησιμοποιεί μικρά συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια τυχαίων αλληλουχιών ως εκκινητές για να ενισχύσει μικρές ποσότητες του συνολικού γονιδιωματικού DNA (*Bardacki*, 2001). Ουσιαστικά αυτή η τεχνική περιλαμβάνει την ενίσχυση τυχαίων τμημάτων του γονιδιωματικού DNA, χρησιμοποιώντας μικρούς και αυθαίρετους εκκινητές χωρίς να απαιτείται η γνώση του προηγούμενου γονιδιωματικού δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος (*Rocco et.al.*, 2014). Γενικά, η μέθοδος RAPD-PCR έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση πολυμορφισμού σε μελέτες που εξετάζουν π.χ. την γενετική ποικιλομορφία, την ταυτοποίηση ποικιλιών ή έχουν χρησιμοποιηθεί ακόμα και σε μελέτες γονοτοξικότητας (*Atienzar et.al.*, 2006).

iii. MULTIPLEX PCR

Η τεχνική multiplex είναι μια αντίδραση ενίσχυσης κατά την οποία χρησιμοποιούνται 2 ή και 3 εκκινητές στον ίδια αντίδραση με σκοπό να ενισχυθούν ταυτόχρονα περισσότερες από μία μοναδικές αλληλουχίες στόχοι σε ένα δείγμα (Κυριαζής, 2014). Αποτελεί κλειδί στο διαχωρισμό μικροοργανισμών, οι οποίοι είναι γενοτυπικά στενά συνδεδεμένοι και παρουσιάζουν παρόμοιους φαινότυπους (Torriani *et.al.*, 2001).

10. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Το DNA είναι ένα αρνητικά φορτισμένο μόριο με αποτέλεσμα όσο μεγαλύτερο είναι το μόριο τόσο μεγαλύτερο και το αρνητικό φορτίο. Η ικανότητα αυτή του μορίου DNA αποτελεί και τη βάση της μεθόδου ηλεκτροφόρησης. Η ηλεκτροφόρηση είναι μία τεχνική που στοχεύει στο διαχωρισμό φορτισμένων σωματιδίων μέσω ενός ηλεκτρικού πεδίου. Έτσι, κατά την ηλεκτροφόρηση τα αρνητικά φορτισμένα μόρια κινούνται προς τον θετικό πόλο (Παραμυθιώτης, 2010). Τα φορτισμένα μόρια κινούνται μέσα στο υπόστρωμα και διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους (Παλαιολόγου, 2015).

Η συνηθέστερη μορφή ηλεκτροφόρησης είναι εκείνη κατά την οποία χρησιμοποιείται πήκτωμα αγαρόζης (Παλαιολόγου, 2015). Η αποτελεσματικότητά τους φαίνεται στον διαχωρισμό θραυσμάτων DNA μεταξύ 100 bp και 25 kb (Lee *et.al.*, 2012).

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης ακολουθεί η χρώση των μορίων εμβαπτίζοντας τα σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (Παραμυθιώτης, 2010), ενώ σε αρκετές περιπτώσεις το αιθίδιο ενσωματώνεται και στη πηκτή. Όταν εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία, ηλεκτρόνια στον αρωματικό κύκλο του μορίου του αιθιδίου ενεργοποιούνται, οδηγώντας έτσι στην απελευθέρωση ενέργειας (φως). Το βρωμιούχο αιθίδιο αποτελεί ένα ύποπτο προϊόν μεταλλαξιογόνο και καρκινογόνο και συνιστάται προσοχή στον χειρισμό του (Lee *et.al.*, 2012).

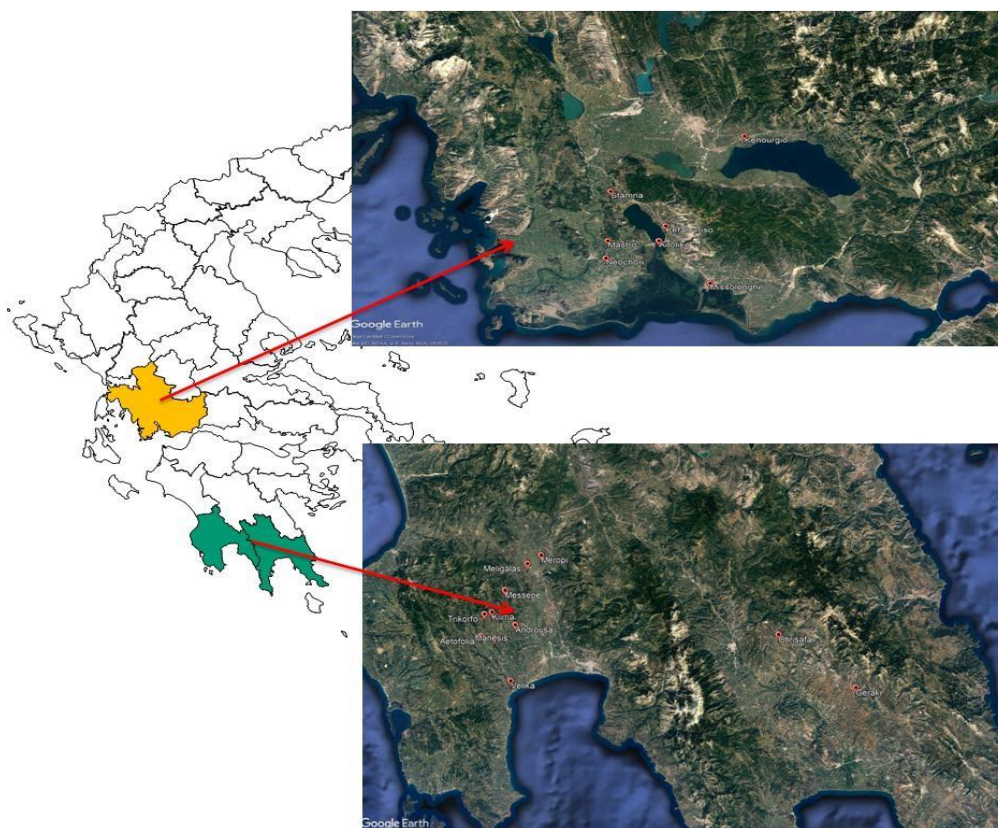
ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η μελέτη του μικροοικοσυστήματος και πιο συγκεκριμένα της βιοποικιλότητας των οξυγαλακτικών βακτηρίων και ζυμών κατά την αυθόρμητη ζύμωση της φυσικής μαύρης ελιάς της ποικιλίας Καλαμών από την περιοχή της Μεσσηνίας και της Αιτωλοακαρνανίας. Οι ελιές είχαν μεταποιηθεί με την ελληνικού τύπου τεχνική από του ίδιους τους παραγωγούς των περιοχών και στάλθηκαν μετά το πέρας της ζύμωσης στο εργαστήριο. Πραγματοποιήθηκαν οι απαραίτητες μικροβιολογικές αναλύσεις αλλά και φυσικοχημικές καταγράφοντας το pH για το εκάστοτε δείγμα. Επιπλέον, ακολούθησε ταυτοποίηση με αλληλουχίες του 16S rRNA γονιδίου για τα οξυγαλακτικά βακτήρια και με αλληλουχίες του 26S rRNA γονιδίου για τις ζύμες μέσω της RAPD-PCR, αφού πρώτα είχε προηγηθεί η απομόνωση και η ομαδοποίηση τους.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη αναλύθηκαν ελιές της ποικιλίας Καλαμών. Οι ελιές προέρχονταν από την περιοχή της Μεσσηνίας και Αιτωλοακαρνανίας. Ο αριθμός των δειγμάτων ήταν 30, εκ των οποίων τα 15 δείγματα ήταν από την περιοχή της Μεσσηνίας και τα υπόλοιπα από την περιοχή της Αιτωλοακαρνανίας. Οι ελιές είχαν μεταποιηθεί με την ελληνικού τύπου από του ίδιους τους παραγωγούς των περιοχών και στάλθηκαν μετά το πέρας της ζύμωσης στο εργαστήριο. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η δειγματοληψία δεν πραγματοποιήθηκε από το προσωπικό του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων αλλά από τοπικές μεταποιητικές μονάδες. Κατά την άφιξη τους στο εργαστήριο οι ελιές υποβλήθηκαν σε μικροβιολογικές, φυσικοχημικές και μοριακές αναλύσεις.



Εικόνα 8. Γεωγραφική απεικόνιση των δειγμάτων ανάλογα με την περιοχή προέλευσης. Κίτρινη περιοχή: Αιτωλοακαρνανία, Πράσινη περιοχή: Μεσσηνία.

<i>Δείγμα</i>	<i>Περιοχή Προέλευσης</i>
1	Αετοφωλία Μεσσηνίας
2	Γεράκι Λακωνίας
3	Μάνεσης Μεσσηνίας
4	Βέλικα Μεσσηνίας
5	Γεράκι Λακωνίας
6	Μεσσηνία
7	Τρίκορφο Μεσσηνίας
8	Λιβανάτες Φθιώτιδας
9	Αιτωλικό Αιτ/νίας
10	Νεοχώρι Αιτ/νίας
11	Ανδρούτσα Μεσσηνίας
12	Κλήμα Μεσσηνίας
13	Μελιγαλάς Μεσσηνίας
14	Μερώπη Μεσσηνίας
15	Κλάδα Μεσσηνίας
16	Μεσολόγγι Αιτ/νίας
17	Μεσολόγγι Αιτ/νίας
18	Αιτωλικό Αιτ/νίας
19	Σταμνά Αιτ/νίας
20	Κεφαλόβρυσο Αιτ/νίας
21	Χρυσοβέρι Αιτ/νίας
22	Καινούργιο Αιτ/νίας
23	Αιτωλικό Αιτ/νίας
24	Μάστρου Αιτ/νίας
25	Νεοχώρι Αιτ/νίας
26	Νεοχώρι Αιτ/νίας
27	Σταμνά Αιτ/νίας
28	Χρυσάφα Λακωνίας
29	Γεράκι Λακωνίας
30	Τρίκορφο Μεσσηνίας

Πίνακας 1. Αντιστοίχιση των δειγμάτων με την περιοχή προέλευσης

2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΦΟΡΤΙΟΥ

Ο προσδιορισμός του μικροβιακού φορτίου πραγματοποιήθηκε στον καρπό του ζυμωμένου τελικού προϊόντος για να προσδιοριστεί η δυναμική του πληθυσμού των κυριότερων ομάδων μικροοργανισμών στο τέλος της ζύμωσης, δηλαδή των οξυγαλακτικών βακτηρίων και των ζυμών. Η μικροβιολογική ανάλυση των δειγμάτων έγινε με τη μέθοδο των δεκαδικών αραιώσεων. Τα δείγματα αναλύθηκαν με δύο βιολογικές επαναλήψεις.

Κατά την δειγματοληψία, υπό ασηπτικών συνθηκών, ζυγίστηκαν 10 g εκπυρηνωμένου καρπού από κάθε δείγμα, τοποθετήθηκαν σε σακούλες stomacher και προστέθηκαν επιπλέον 90 mL διαλύματος Ringer στο κάθε δείγμα. Οι σακούλες εν συνεχεία τοποθετήθηκαν στον ομογενοποιητή Stomacher (Lab Blender 400) για 1min έχοντας έτσι πλέον και την πρώτη αραιώση του δείγματός μας. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις 1:10 όπου 1mL δείγματος μεταφέρθηκε σε 9 mL αποστειρωμένου διαλύματος Ringer. Τέλος, οι κατάλληλες κατά περίπτωση δεκαδικές αραιώσεις χρησιμοποιήθηκαν για τον ενοφθαλμισμό διπλής σειράς τρυβλίων για κάθε χρησιμοποιούμενο μικροβιολογικό υπόστρωμα για την απαρίθμηση των εκάστοτε μικροοργανισμών.



Εικόνα 9. Παρασκευή μικροβιολογικού θρεπτικού υποστρώματος

Για τον προσδιορισμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB) ποσότητα 1 mL από σειρά διαδοχικών αραιώσεων ομογενοποιημένου δείγματος ενοφθαλμίστηκε με την τεχνική της ενσωμάτωσης στο επιλεκτικό υπόστρωμα de Man-Rogosa-Sharp (MRS, Biolife, Italy) και ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία 30°C για 3 μέρες και καταμέτρηση των αποικιών (James WMesser κ.α., 1999). Προκειμένου να παρεμποδιστεί η ανάπτυξη των

ζυμών, έγινε προσθήκη 0,05% (β/ο) cycloheximide (Sigma, St. Louis, Mo.) στο υπόστρωμα μετά την αποστείρωση.

Αντίστοιχα, για τον προσδιορισμό των ζυμών ποσότητα 0,1 mL από σειρά διαδοχικών αραιώσεων ομογενοποιημένου δείγματος ενοφθαλμίστηκε με την τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης στο επιλεκτικό υπόστρωμα Rose Bengal Agar (RBC, LAB M, USA) που περιείχε το αντιβιοτικό Chloramphenicol (LAB M) για την παρεμπόδιση της ανάπτυξης των βακτηρίων (James W Messer κ.α., 1999). Ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία 25°C για 3 μέρες και καταμέτρηση των αποικιών.

Μετά το τέλος της επώασης των τρυβλίων πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση των αποικιών. Για την καταμέτρηση επιλέχθηκαν τα τρυβλία που περιείχαν 30-300 αποικίες. Για τον προσδιορισμό του τελικού πληθυσμού των μικροοργανισμών, ο μέσος όρος του αριθμού των αποικιών πολλαπλασιάστηκε με την αραιώση που χρησιμοποιήθηκε και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε \log_{10} CFU/g ($N = \frac{C_1 + C_2}{n_1 + (n_2/10)} \times \frac{1}{V} \times \frac{1}{d_1}$, όπου: N=cfu/g, C₁=το συνολικό άθροισμα των αποικιών (cfu) στα n₁ τρυβλία της αραιώσης d₁, C₂= το συνολικό άθροισμα των αποικιών στα n₂ τρυβλία της επόμενης αραιώσης, V=όγκος εμβολίου (g) (Εργαστηριακές Σημειώσεις μαθήματος Μικροβιολογίας Τροφίμων)).

3. ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

Κατά την διάρκεια της πειραματικής ανάλυσης έγινε και ο προσδιορισμός της τιμής του pH των δειγμάτων κάνοντας χρήση του ψηφιακού πεχάμετρου (Russel Inc., Boston MA). Έγινε απευθείας εμβάπτιση του ηλεκτροδίου στην σακούλα Stomacher, η οποία περιείχε ομογενοποιημένο υγρό αποτελούμενο από τον καρπό της ελιάς για το κάθε δείγμα και διάλυμα Ringer.

4. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

i. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ-ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ-ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΣ ΑΠΟΙΚΙΩΝ

Στην παρούσα πτυχιακή μελέτη μοριακές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με στόχο τον προσδιορισμό της βιοποικιλότητας των ζυμών και των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα υπό μελέτη δείγματα. Τα τρυβλία που επιλέχθηκαν για την απομόνωση των μικροοργανισμών ήταν αυτά που περιείχαν τα μικροβιολογικά θρεπτικά υποστρώματα MRS (Biolife, Italy) (για τα οξυγαλακτικά βακτήρια) και RBC (LAB M, USA) (για τις ζύμες). Από κάθε τρυβλίο της μεγαλύτερης αραιώσης με αριθμό αποικιών πραγματοποιήθηκε δειγματοληπτικά η επιλογή του 20% των μεμονωμένων αποικιών με στόχο την παραλαβή αντιπροσωπευτικού δείγματος. Στην περίπτωση που οι αποικίες στη μικρότερη αραιώση ήταν πολύ λίγες (<30) τότε απομονώθηκε όλο το πλήθος των απαριθμούμενων αποικιών. Συνολικά απομονώθηκαν 429 οξυγαλακτικά βακτήρια και 95 ζύμες.

Στην περίπτωση των ζυμών, οι αποικίες μεταφέρθηκαν ασηπτικά σε τρυβλία μέσω της γραμμωτής επίστρωσης (streaking) σε θρεπτικό υπόστρωμα Brain Heart Infusion Agar (LAB M, UK) και ακολούθησε επώαση στους 25 °C για 2-3 ημέρες. Εν συνεχεία, επιλέχθηκαν καθαρές μεμονωμένες αποικίες οι οποίες εμβαιπίστηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν θρεπτικό υπόστρωμα Brain Heart Infusion Broth (LAB M, UK) και επώαστηκαν εκ νέου για 2-3 ημέρες στους 25°C.

Αντίστοιχα, για τα οξυγαλακτικά βακτήρια, οι αποικίες μεταφέρθηκαν ασηπτικά σε δοκιμαστικούς σωλήνες, οι οποίοι περιείχαν θρεπτικό υπόστρωμα MRS Broth (LAB M, UK) και επώαστηκαν για 2 μέρες στους 30°C. Στη συνέχεια, με την τεχνική της γραμμικής επίστρωσης (streaking) μεταφέρθηκαν αποικίες σε τρυβλία με



Εικόνα 10. Μέθοδος γραμμικής εξάπλωσης streaking οξυγαλακτικών βακτηρίων

θρεπτικό υπόστρωμα MRS Agar (LAB M, UK) και χρειάστηκε επώαση για 2 ημέρες στους 30°C. Έπειτα, επιλέχθηκαν καθαρές μεμονωμένες αποικίες οι οποίες εμβαιπίστηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν θρεπτικό υπόστρωμα MRS Broth (LAB M, UK) με επώαση εκ νέου για 2 ημέρες στους 30°C.

Ακολούθως, ορισμένος όγκος (0,5 mL) καθαρών εμπλουτισμένων αποικιών των ζυμών και των οξυγαλακτικών βακτηρίων μεταφέρθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες, σε μικροφιαλίδια (vials) που περιείχαν 0,5 mL γλυκερόλης και τέλος αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία -80°C. Ο στόχος της συγκεκριμένης διαδικασίας είναι η παρασκευή αποθήκης των απομονωμένων καλλιιεργειών.

Ορισμένη ποσότητα του εμπλουτισμένου διαλύματος (1,5 mL) τόσο των βακτηρίων όσο και των ζυμών, αφού μεταγγίστηκε σε μικροφιαλίδια τύπου erppendorf, φυγοκεντρήθηκε για 10 min στα 5000g (ThermoFisher Scientific, Heraeus Multifuge 1S-R) δύο φορές. Συγκεκριμένα, μετά την πρώτη φυγόκεντρο πραγματοποιήθηκε απομάκρυνση του υπερκείμενου και εκ νέου φυγοκέντρηση του ιζήματος, αφού πρώτα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 1mL διαλύματος Ringer. Σκοπός είναι να καθαριστεί όσο καλύτερα γίνεται η βιομάζα των καλλιιεργειών. Στη συνέχεια τα ιζήματα αποθηκεύτηκαν στους -20°C μέχρι την χρήση τους στο επόμενο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας.

ii. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ-ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΓΕΝΟΜΙΚΟΥ DNA

Η απομόνωση του DNA των οξυγαλακτικών βακτηρίων και των ζυμών βασίζεται στην ιδιότητα του ενζύμου της λυσοζύμης και του ενζύμου της λυτικάσης αντίστοιχα. Και τα δύο έχουν σαν κύριο ρόλο την λύση των κυττάρων, το οποίο είναι βασικό εργαλείο για την απομόνωση του DNA.

Τα στάδια της διαδικασίας απομόνωσης έχουν ως εξής (Bonatsou *et.al.* 2018, Doulgeraki *et.al.* 2011):

- Επαναδιάλυση της βιομάζας (από τους -20°C) σε ρυθμιστικό διάλυμα που αποτελούνταν από 1M σορβιτόλη και 0,1 M EDTA (pH 7,5). Για τις ζύμες χρησιμοποιήθηκε 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος και προστέθηκαν 8μL λυτικάσης ενώ για τα βακτήρια χρησιμοποιήθηκε

0,5 mL ρυθμιστικού διαλύματος με λυσοζύμη σε συγκέντρωση 25 mg/mL.

- Επώαση για 2h σε θερμοκρασία 37°C (με ανάδευση κάθε 30 min σε συσκευή vortex). Μετά το πέρας της επώασης πραγματοποιήθηκε έντονη ανάδευση για 30 sec.
- Φυγοκέντρηση για 10 min σε 17000 g, σε θερμοκρασία 4°C.
- Επαναδιάλυση σε 0,5 mL ρυθμιστικού διαλύματος που αποτελείται από 50 Mm Tris και 20 mM EDTA (pH 7,4)
- Προσθήκη 50 µL 10% SDS και επώαση σε θερμοκρασία 65°C για 30 min. Το διάλυμα δωδεκασουλφονικού νατρίου (Sodium Dodecyl Sulphate, SDS) παίζει σημαντικό ρόλο στην απομόνωση υψηλής ποιότητας και καθαρότητας DNA. Το SDS βοηθά στη διάσπαση των μεμβρανών και την αποδιάταξη των πρωτεϊνών με αποτέλεσμα να απελευθερώνεται το DNA.
- Προσθήκη 0,2 mL οξικού καλίου και παραμονή στον πάγο για 30 min. Το οξικό κάλιο (Potassium Acetate) καθιζάνει το SDS αλλά και τις δεσμευμένες πρωτεΐνες για να επιτρέψει την απομάκρυνση τους από το DNA.
- Φυγοκέντρηση για 10 min σε 17000 g, σε θερμοκρασία 4°C.
- Προσθήκη του υπερκείμενου σε καθαρό μικροφιαλίδιο erpendorf και επανάληψη της φυγοκέντρησης στις ίδιες συνθήκες. Αυτό το βήμα επαναλήφθηκε άλλη μια φορά.
- Μεταφορά του υπερκείμενου σε καθαρό μικροφιαλίδιο erpendorf και επανάληψη της φυγοκέντρησης στις ίδιες συνθήκες. Αυτό το βήμα επαναλήφθηκε άλλη μια φορά.
- Μεταφορά του υπερκείμενου σε καθαρό μικροφιαλίδιο erpendorf, προσθήκη 700 µL ισοπροπανόλης (-20°C) και παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min.
- Φυγοκέντρηση για 10 min σε 17000 g σε θερμοκρασία 4°C και απόρριψη το υπερκείμενου.
- Προσθήκη 0,5 mL αιθανόλης 70% (-20°C) και επανάληψη τη φυγοκέντρησης. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται δύο φορές.

- Αναμονή έως ότου εξατμιστεί πλήρως η αιθανόλη, προσέχοντας να μην στεγνώσει το ίζημα.
- Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 50 μL ddH₂O.
- Τοποθέτηση δειγμάτων στους 4°C μέχρι την χρήση τους.



Εικόνα 11. Συσκευή φυγοκέντρωσης που χρησιμοποιήθηκε στις μοριακές αναλύσεις (Heraeus Fresco 21 Centrifuge)

iii. ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΟΥ DNA

Τόσο η συγκέντρωση όσο και η καθαρότητα του DNA υπολογίστηκε με την χρήση νανοφωτόμετρου (NanoPhotometer, Implen). Αρχικά, μετρήθηκε η συγκέντρωση του DNA, η οποία εκφράστηκε σε ng/ μL , δηλαδή η ποσότητα του νουκλεϊκού οξέος (ng) ανά όγκο διαλύματος μL , και στη συνέχεια η απορρόφηση στα μήκη κύματος 260 nm, όπου εκεί παρουσιάζεται η μέγιστη απορρόφηση για τα νουκλεϊκά οξέα. Σε μήκη κύματος 280 nm παρουσιάζουν την μέγιστη απορρόφηση τους οι πρωτεΐνες ενώ στα 230 nm άλλες ουσίες όπως φαινόλες και υδατάνθρακες. Για την ομαλή διεξαγωγή της RAPD PCR συγκεντρώσεις DNA οι οποίες υπέρβαιναν τα 250 ng/ μL αραιώνονταν με κατάλληλη ποσότητα δις αποστειρωμένου ddH₂O και γινόταν εκ νέου η φωτομέτρηση τους. Τα αποτελέσματα της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του δείγματος παρουσιάζονταν ως ο λόγος 260/280, ενώ ως συμπληρωματικό μέτρο της καθαρότητας των νουκλεϊκών οξέων αποτελούσε ο λόγος 260/230. Για να πληροί τις συνθήκες καθαρότητας το DNA έπρεπε ο λόγος 260/280 να είναι περίπου 1,8 (αποδεκτά όρια είναι 1,8-2). Σε ορισμένες

περιπτώσεις, αν εμφανιστούν αποκλίσεις στις παραπάνω τιμές, κατά πάσα πιθανότητα οφείλονται στην πρόσμιξη πρωτεϊνών ή φαινόλης στο τελικό απομονωμένο DNA, κάτι το οποίο ενδέχεται να επηρεάσει την ομαλή λειτουργία των μετέπειτα μοριακών τεχνικών. Τέλος, ο λόγος 260/230 όταν εμφανίζει τιμές άνω του 2 υποδηλώνει δείγματα καθαρών νουκλεϊκών οξέων, όμως οι πρωτεΐνες, άλατα και άλλες ουσίες που απορροφούν σε μήκη 230 nm μπορούν να μειώσουν τον λόγο αυτό.

iv. RAPD-PCR

Αρχικά, τόσο για τα βακτήρια όσο και για τις ζύμες χρησιμοποιήθηκε ο εκκινητής M13 με αλληλουχία 5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3' (*Hadjilouka et.al.*, 2014). Πριν την διεξαγωγή της RAPD-PCR έγινε η προετοιμασία των δειγμάτων. Αναμείχθηκε ποσότητα 50ng DNA (βακτηρίων και ζυμών) με τις ποσότητες των αντιδραστηρίων που αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες (μL)	Συγκέντρωση
Buffer B (Kapa biosystems)	2	
dNTP's (Kapa biosystems)	0,4	0.2mM
MgCl ₂ (Kapa biosystems)	0,8	2.5mM
Primer (Eurofins Genomics)	0,8	0.4μM
Taq (Kapa biosystems)	0,2	1U
DNA	1-3	100 ng/μl
ddH ₂ O	14,8-12,8	
ΣΥΝΟΛΟ	20	

Πίνακας 2. Αναλογίες αντιδραστηρίων RAPD-PCR



Εικόνα 12. Θερμικός κυκλοποιητής

Έπειτα τα δείγματα τοποθετήθηκαν στον θερμικό κυκλοποιητή (ThermoFisher Scientific, ProFlex PCR) και εκτελέστηκε η RAPD-PCR με τις εξής συνθήκες:

- 1 κύκλος: 95°C για 3 min
- 3 κύκλοι:
 - 95°C για 3 min
 - 35°C για 5 min με σταδιακή αύξηση στους 72°C με 0,6°C/s
 - 72°C για 5 min
- 32 κύκλοι:
 - 95°C για 1 min
 - 55°C για 2 min με σταδιακή αύξηση στους 72°C με 0,6°C/s
 - 72°C για 3 min
- 1 κύκλος: 72 °C για 10 min

v. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Κατά την ηλεκτροφόρηση πέρα από τα δείγματα τοποθετήθηκε και κατάλληλος μάρτυρας (DNA Ladder, Nippon Genetics) για τον καλύτερο προσδιορισμό και σύγκριση του μεγέθους των προϊόντων της PCR.

Η διαδικασία που παρασκευάστηκε η πηκτή αγαρόζης είναι η εξής:

- Διαλύουμε και εν συνεχεία θερμαίνουμε 2,25 g αγαρόζης σε 150 mL ρυθμιστικού διαλύματος TAE μέχρι το διάλυμα μας να είναι διαυγές. (TAE1X)
- Το διάλυμα τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, στην οποία τοποθετούνται 3 ειδικές χτένες σχηματίζοντας έτσι τις θέσεις στις οποίες θα φορτώσουμε τα δείγματα μας.
- Η συσκευή ηλεκτροφόρησης παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 20' μέχρι να σταθεροποιηθεί το διάλυμα αγαρόζης.
- Μετά την πήξη του διαλύματος αφαιρούνται οι χτένες, τοποθετείται η συσκευή στο μηχάνημα ηλεκτροφόρησης και καλύπτεται με διάλυμα TAE 1X.
- Ακολουθεί η φόρτωση των δειγμάτων στα πηγαδάκια της ηλεκτροφόρησης. Στα προϊόντα της PCR προστέθηκαν 3μL από τη χρωστική κυανούν της βρωμοθυμόλης με γλυκερόλη (μπλε χρώμα) κάνοντας έτσι πιο εύκολη την τοποθέτηση τους στα πηγαδάκια αλλά και την καλύτερη παρακολούθηση τους κατά την ηλεκτροφόρηση. Σε κάθε σειρά τοποθετείται δεξιά και αριστερά ο DNA Ladder και ενδιάμεσα τοποθετούνται τα δείγματα μας.
- Η ηλεκτροφόρηση διαρκεί 1h και 20 min στα 120 volt.
- Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης η πηκτή της αγαρόζης αφαιρείται από την συσκευή και εμποτίζεται σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου για περίπου 10' και έπειτα τοποθετείται σε νερό.

Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης ακολούθησε η έκθεση της πηκτής αγαρόζης σε ακτινοβολίες UV μέσα σε ειδικό θάλαμο. Αφού εκτέθηκαν τα δείγματα σε ακτινοβολίες UV, τα τμήματα του DNA εμφανίστηκαν ως φωτεινές ή μαύρες ζώνες. Χρησιμοποιήθηκε απαραίτητο

λογισμικό (Quantity One) έτσι ώστε να παρθούν οι εικόνες των δειγμάτων DNA, οι οποίες επεξεργάστηκαν σε επόμενη φάση.

5. BIONUMERICS

Όλα τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν καταλλήλως μέσω λογισμικού προγράμματος. Συγκεκριμένα, η μετατροπή, η κανονικοποίηση και η περαιτέρω ανάλυση πραγματοποιήθηκαν μέσω του συντελεστή Dice και η ανάλυση συμπλέγματος UPGMA μέσω του λογισμικού Bionumerics, έκδοση 6.1 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). Ο αλγόριθμος UPGMA, έχοντας σαν βάση τον συντελεστή ομοιότητας Dice, ομαδοποιεί όλα τα στελέχη σε ένα ενιαίο φυλογενετικό δέντρο. Τμήματα ζωνών τα οποία έμοιαζαν μεταξύ τους σε αρκετά μεγάλο βαθμό (>80%) ομαδοποιήθηκαν. Με βάση την ομαδοποίηση, επιλέχθηκε αντιπροσωπευτικός αριθμός μικροοργανισμών για ταυτοποίηση μέσω της αλληλούχισης του 16S rRNA γονιδίου για τα οξυγαλακτικά βακτήρια και αλληλούχισης του 26S rRNA γονιδίου για τις ζύμες.

6. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Με στόχο την ταυτοποίηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων, επιλέχθηκε η μέθοδος 16S rRNA-PCR, η οποία στοχεύει στην ενίσχυση και αλληλούχιση της περιοχής V₁/V₃ του γονιδίου 16S rRNA που υπάρχει σε όλα τα βακτήρια. Χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές P₁V₁ (5'-GCG GCG TGC CTA ATA CAT GC-3') και P₄V₃ (5'-ATC TAC GCA TTT CAC CGC TAC-3') (Eurofins Genomics, USA). Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι αναλογίες τους αναφέρονται στον πίνακα παρακάτω (Πίνακας 3).

Αντιδραστήρια	Ποσότητες (μL)	Συγκέντρωση
Buffer B (Kapa biosystems)	5	
dNTP's (Kapa biosystems)	1	0.2mM
P1V1(Eurofins Genomics)	1	0.2μM
P4V3(Eurofins Genomics)	1	0.2μM
Taq (Karabiosystems)	0,2	1U
DNA	2	50ng/μl
ddH ₂ O	39.8	
ΣΥΝΟΛΟ	50	

Πίνακας 3. Αναλογίες αντιδραστηρίων 16S rRNA-PCR

Η 16S rRNA-PCR εκτελέστηκε με τις εξής συνθήκες:

- αρχική αποδιάταξη στους 94°C για 5 min
- 35 κύκλοι:
 - 94°C για 1 min
 - 42°C για 1 min
 - 72°C για 2 min
- 1 κύκλος: 72°C για 10 min

7. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΖΥΜΩΝ

Κατά την ταυτοποίηση των ζυμών, εφαρμόστηκε η μέθοδος 26S rRNA-PCR, η οποία στοχεύει στην ενίσχυση και αλληλούχιση της περιοχής D₁/D₂ του γονιδίου 26S rRNA που υπάρχει στις ζύμες. Χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές NL₁ (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG AAG-3') και NL₄ (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3') (Eurofins Genomics). Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι αναλογίες τους αναφέρονται στον πίνακα παρακάτω (Πίνακας 4).

Αντιδραστήρια	Ποσότητες (μL)	Συγκέντρωση
Buffer B (Kapa biosystems)	5	
dNTP's (Kapa biosystems)	1	0.2mM
P1V1(Eurofins Genomics)	1	0.2μM
P4V3(Eurofins Genomics)	1	0.2μM
Taq (Karabiosystems)	0,2	1U
DNA	2	50 ng/μl
ddH ₂ O	39.8	
ΣΥΝΟΛΟ	50	

Πίνακας 4. Αναλογίες αντιδραστηρίων 26S rRNA-PCR

Η 26S rRNA-PCR εκτελέστηκε με τις εξής συνθήκες:

- αρχική αποδιάταξη στους 94°C για 5 min
- 36 κύκλοι:
 - 94°C για 1 min
 - 52°C για 1 min
 - 72°C για 2 min
- 1 κύκλος: 72°C για 10 min

8. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ PCR

Τα προϊόντα από τις προηγούμενες PCR ηλεκτροφορήθηκαν, με την διαδικασία που αναφέρθηκε και νωρίτερα, αλλά και φωτομετρήθηκαν υπολογίζοντας την συγκέντρωση του κάθε δείγματος ώστε να είναι κατάλληλη για να σταλούν για αλληλούχιση. Εν συνεχεία τα δείγματα μέσω του NucleoSpin®, Gel and PCR Clean-up της MACHEREY-NAGEL έγινε ο καθαρισμός των δειγμάτων τηρώντας το πρωτόκολλο που αναγράφει το συγκεκριμένο PCR Clean-up kit. Ο καθαρισμός γίνεται έτσι ώστε να απομακρυνθούν τυχόν πρωτεΐνες, ένζυμα, υπολείμματα εκκινητών αλλά και

ρυθμιστικά διαλύματα από τα προϊόντα της PCR. Τέλος, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε microplate το οποίο στάλθηκε σε εξωτερικό εργαστήριο (CEMIA, Λάρισα). Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης ελέγχθηκαν μέσω του προγράμματος FinchTV ενώ η ταυτοποίηση πραγματοποιήθηκε με τη βάση δεδομένων BLAST του NCBI. Περιέχει ταυτοποιημένα στελέχη τα οποία συγκρίθηκαν με τα αποτελέσματα της αλληλούχισης που προηγήθηκε στηρίζοντας έτσι την όλη διαδικασία στον ομοιότητα που εμφανίζουν τα στελέχη μεταξύ τους.

9. MULTIPLEX PCR

Τα είδη *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactiplantibacillus pentosus* και *Lactiplantibacillus paraplantarum* συσχετίζονται στενά γονοτυπικά και παρουσιάζουν πολύ παρόμοιους φαινότυπους. Έτσι, κατά την ταυτοποίηση των δεδομένων που λάβαμε από το εξωτερικό εργαστήριο μέσω της βάσης BLAST του NCBI, δεν μπορούσαμε να διαχωρίσουμε ξεκάθαρα τους ανωτέρω μικροοργανισμούς με την μέθοδο 16S rRNA-PCR. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα τον άμεσο και ακριβή διαχωρισμό τους, ο οποίος επιτεύχθηκε μέσω της multiplex PCR. Τα δείγματα, τα οποία άνηκαν σε αυτά τα 3 γκρουπ μικροοργανισμών, προετοιμάστηκαν πριν την διεξαγωγή της multiplex PCR.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την συγκεκριμένη μέθοδο ήταν οι εξής: paraF (5'-GTC ACA GGC ATT ACG AAA AC-3'), pentF (5'-CAG TGG CGC GGT TGA TAT C-3'), planF (5'-CCG TTT ATG CGG AAC ACC TA-3'), pREV (5'-TCG GGA TTA CCA AAC ATC AC-3') (Eurofins Genomics, USA) (Torriani et.al., 2001). Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι αναλογίες τους αναφέρονται στον πίνακα παρακάτω (Πίνακας 5).

Αντιδραστήρια	Ποσότητες (μL)
Buffer B	2
paraF (0,25μM)	0,5
pentF (0,25 μM)	0,5

planF (0,12 μM)	0,25
pREV (0,25μM)	0,5
dNTP'S (12μM)	0,48
Taq (1U)	0,2
ddH ₂ O	14,57-13,57
DNA (50 ng/μL)	1-2
ΣΥΝΟΛΟ	20

Πίνακας 5. Αναλογίες αντιδραστηρίων multiplex PCR

Η multiplex PCR εκτελέστηκε εντός του θερμικού κυκλοποιητή με τις εξής συνθήκες:

- 1 κύκλος: 94°C για 3 min
- 30 κύκλοι:
 - 94°C για 30 sec
 - 56°C για 10 sec
 - 72°C για 30 sec
- 1 κύκλος: 72°C για 5 min

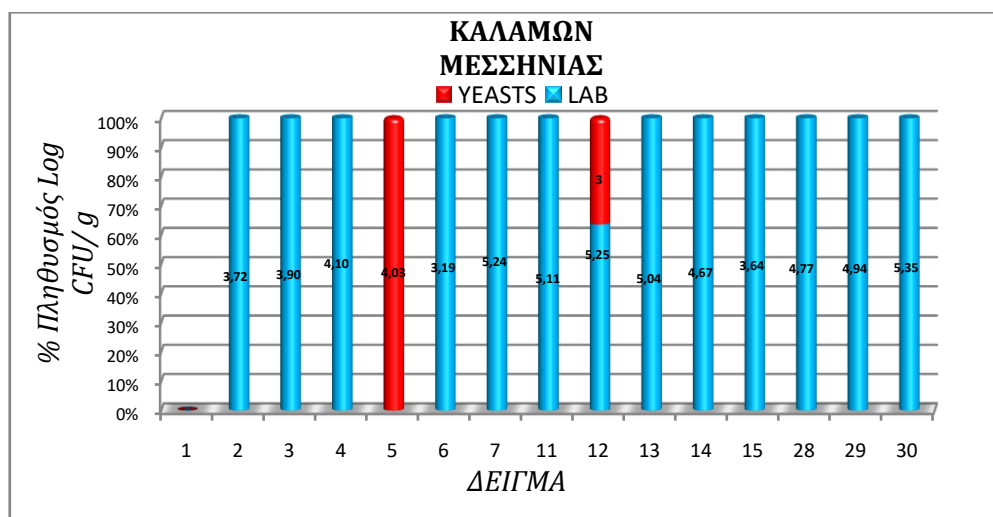
Ουσιαστικά τα αποτελέσματα της PCR συγκρίθηκαν με βάση τον ladder (1kb ladder, εταιρεία) που χρησιμοποιήθηκε στην συγκεκριμένη μέθοδο. Συγκεκριμένα, ο εκκινητής pentF είναι ο ειδικός εκκινητής για το *Lactiplantibacillus pentosus* με θέσεις νουκλεοτιδίων 109 έως 127, ο εκκινητής planF για *Lactiplantibacillus plantarum* με θέσεις νουκλεοτιδίων 9 έως 28 και ο paraF για *Lactiplantibacillus paraplantarum* με θέσεις νουκλεοτιδίων 220 έως 239. Άρα, το αναμενόμενο μέγεθος του ενισχυμένου DNA αναμένεται στα 318 bp για τον *Lactiplantibacillus plantarum*, στα 218 bp για τον *Lactiplantibacillus pentosus* και στα 107 bp για τον *Lactiplantibacillus paraplantarum*.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ

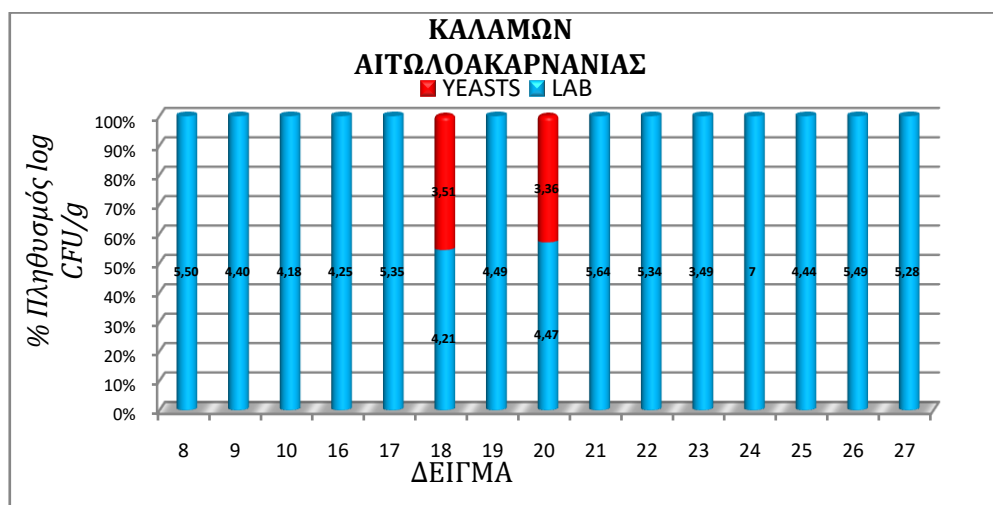
1. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

i. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μικροβιολογικών αναλύσεων των ελιών ποικιλίας Καλαμών από τις περιοχές της Μεσσηνίας και Αιτωλοακαρνανίας. Και για τις δύο περιοχές εμφανίζεται η ανάπτυξη των μικροβιακών πληθυσμών των οξυγαλακτικών βακτηρίων και ζυμών, εκφρασμένη σε log CFU/g.



Διάγραμμα 1. Σύγκριση του ποσοστού συγκέντρωσης των οξυγαλακτικών βακτηρίων και των ζυμών για κάθε δείγμα στην περιοχή της Μεσσηνίας.



Διάγραμμα 2. Σύγκριση του ποσοστού συγκέντρωσης των οξυγαλακτικών βακτηρίων και των ζυμών για κάθε δείγμα στην περιοχή της Αιτωλοακαρνανίας.

Στο Διάγραμμα 1 εμφανίζονται αναλυτικά οι συγκεντρώσεις τόσο των ζυμών όσο και των οξυγαλακτικών βακτηρίων για τα δείγματα ελιών που αφορούν την περιοχή της Μεσσηνίας. Συγκριτικά, αναφέρεται το ποσοστό που κατέχει ο κάθε μικροβιακός πληθυσμός στο αντίστοιχο δείγμα. Όπως μπορούμε να διακρίνουμε στο Δείγμα 1 δεν υπάρχει ανάπτυξη βακτηρίων και ζυμών. Γενικά η ανάπτυξη των ζυμών είναι μικρή και εμφανίζεται μόνο στα Δείγματα 5 και 12, όπου στο Δείγμα 5 αποτελούν τον κυρίαρχο μικροβιακό πληθυσμό αφού δεν έχουν αναπτυχθεί καθόλου οξυγαλακτικά βακτήρια. Επίσης, η συγκέντρωση και για τους δύο μικροοργανισμούς κυμαίνεται περίπου μεταξύ 3-5 log CFU/g.

Στο Διάγραμμα 2 εμφανίζονται αντίστοιχα αναλυτικά οι συγκεντρώσεις τόσο των ζυμών όσο και των οξυγαλακτικών βακτηρίων για τα δείγματα ελιών που αφορούν την περιοχή της Αιτωλοακαρνανίας. Παρατηρούμε και εδώ ότι η ανάπτυξη των ζυμών είναι περιορισμένη και συγκεκριμένα εμφανίζεται στα Δείγματα 18 και 20. Επίσης, στις ελιές της συγκεκριμένης περιοχής οι συγκεντρώσεις για τους δύο μικροοργανισμούς που μελετάμε κυμαίνονται πάλι περίπου μεταξύ 3-5 log CFU/g με μόνη εξαίρεση το Δείγμα 24 που φτάνει στα 7 log CFU/g.

Γενικά και στις δύο περιοχές βλέπουμε ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια αποτελούν τον κυρίαρχο μικροβιακό πληθυσμό στο σύνολο των δειγμάτων μας. Η ύπαρξη των ζυμών είναι περιορισμένη. Αντίστοιχη μελέτη έχει δείξει ότι ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων και των ζυμών κυμαίνεται σε τιμές των 6 log CFU/g αλλά και ότι τόσο οι ζύμες όσο και τα οξυγαλακτικά βακτήρια αποτελούν τους κυρίαρχους πληθυσμούς, με τα βακτήρια να υπερισχύουν συνήθως των ζυμών (Panagou et al., 2006). Στην προκειμένη περίπτωση βέβαια η ανάπτυξη των ζυμών είναι σχεδόν ανύπαρκτη στο μεγαλύτερο μέρος των δειγμάτων μας. Συγκεκριμένα, κατά την καταμέτρηση των ζυμών, σε ορισμένα δείγματα είχαν εμφανιστεί αποικίες οι οποίες όμως ήταν σε πολύ μικρό αριθμό (1-2 αποικίες) με αποτέλεσμα να μην είναι εφικτή η καταμέτρηση τους και να μην αποτελούν μέρος των μικροβιολογικών αποτελεσμάτων μας. Γενικά έχει παρατηρηθεί ότι οι ζύμες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των ελιών, όμως στα πρώτα στάδια είναι ικανές να παράγουν τόσο πολύτιμους αυξητικούς παράγοντες (π.χ. βιταμίνες) οι οποίες να ευνοούν κατά πολύ την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων (Hurtado

et al., 2012). Έτσι ο ενδεχόμενος ανταγωνισμός μεταξύ οξυγαλακτικών βακτηρίων και ζυμών οδήγησε στη μικρή ή και καθόλου ανάπτυξη των ζυμών και στην κυριαρχία των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Επίσης, στις περιπτώσεις που έχουμε αυθόρμητη ζύμωση, η όλη διαδικασία υποκινείται από αυτόχθονους οργανισμούς και κυριαρχεί ένα οικοσύστημα μεταβλητό και ακαθόριστο. Η δυναμική της εκάστοτε ζύμωσης επηρεάζεται και από το αρχικό μικροβιολογικό φορτίο της ελιάς, τη περιοχή αλλά και από τις εκάστοτε πρακτικές που ακολουθήθηκαν (Portilha-Cunha et.al., 2020).

ii. ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

Στο παρακάτω διάγραμμα εμφανίζονται οι τιμές του pH για το σύνολο των δειγμάτων μας στις περιοχές της Μεσσηνίας και της Αιτωλοακαρνανίας.

<i>Μεσσηνία</i>		<i>Αιτωλοακαρνανία</i>	
<i>Δείγμα</i>	<i>pH</i>	<i>Δείγμα</i>	<i>pH</i>
1	3,93	8	4,04
2	3,84	9	3,94
3	3,78	10	4,52
4	3,92	16	3,87
5	4,29	17	4,03
6	3,58	18	4,84
7	4,09	19	3,85
11	4,4	20	3,71
12	3,96	21	3,65
13	4,58	22	3,74
14	4,44	23	3,72
15	3,92	24	4,38
28	4,5	25	3,72
29	4,1	26	4,17
30	4,31	27	4,24

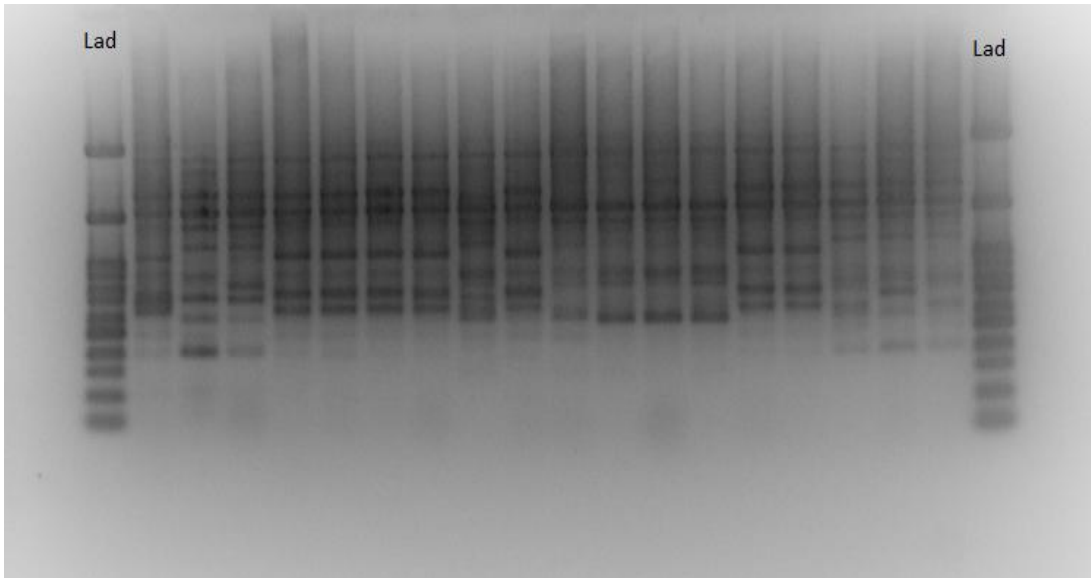
Πίνακας 6. Τιμές pH για το σύνολο των δειγμάτων.

Όπως μπορούμε να διακρίνουμε οι τιμές του pH για τα δείγματα μας κυμαίνονται μεταξύ 3,6-4,5. Δεν παρουσιάζονται μεγάλες αποκλίσεις εκτός από την περίπτωση του Δείγματος 18, όπου η τιμή του pH αγγίζει το 4,8.

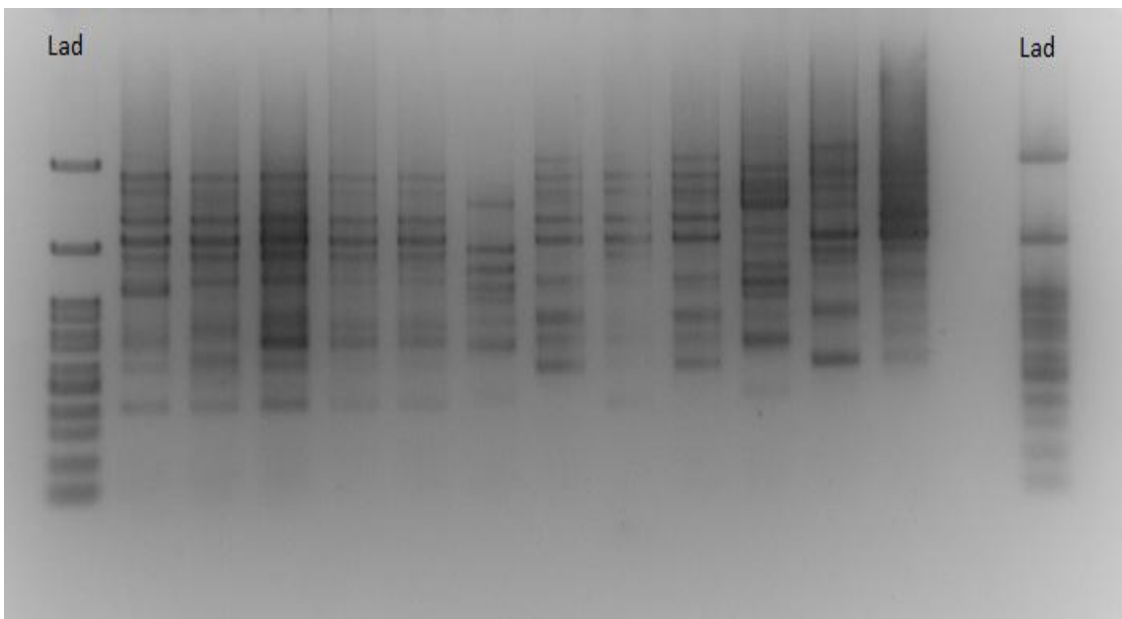
Γενικά, το όριο του pH, για το είδος ελιάς που χρησιμοποιούμε στο πείραμα μας, βρίσκεται περίπου στο 4,3 και έχει παρατηρηθεί ότι οι ελιές Καλαμών εμφανίζουν μεγαλύτερη τιμή οξύτητας από άλλα είδη (π.χ. Κονσερβοελιά) κάτι που ενδεχομένως να οφείλεται σε καλύτερη ικανότητα ζύμωσης (Panagou *et al.*,2006). Συμπερασματικά, το pH κυμαίνεται σε τιμές που ευνοείται αρκετά η ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων (αναπτύσσεται σε τιμές pH 4-4,5 ή και χαμηλότερα), όπως μπορούμε να διακρίνουμε και από τα αποτελέσματα της μικροβιακής ανάλυσης.

2. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

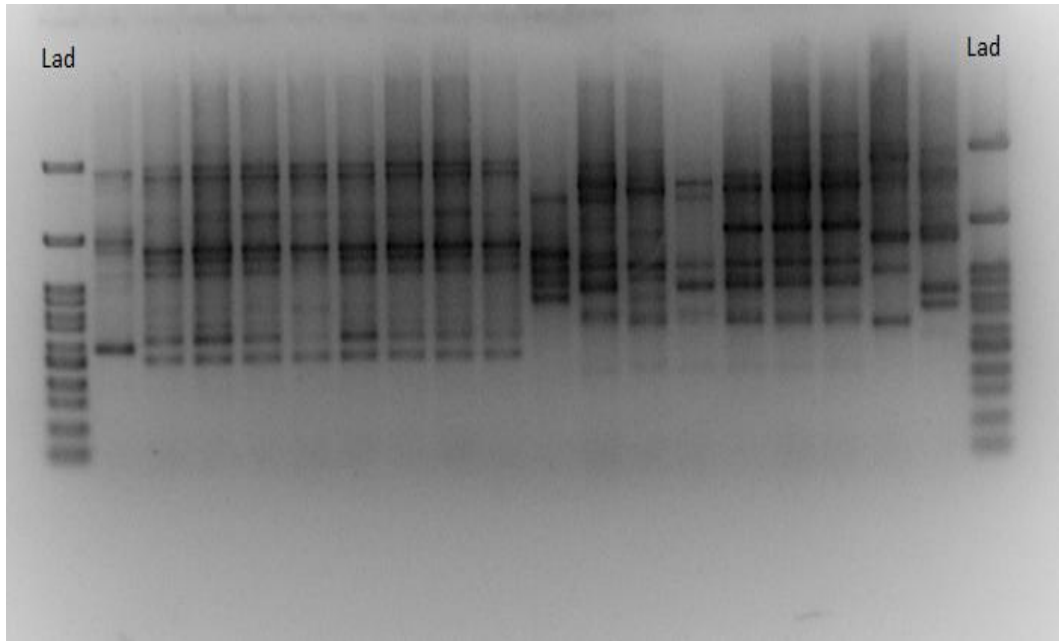
Αρχικά, από το κάθε δείγμα απομονώθηκαν περίπου 15 αποικίες οξυγαλακτικών βακτηρίων και ζυμών όπου ήταν εφικτή η απαρίθμηση τους. Συνολικά τα δείγματα ήταν 30, οπότε απομονώθηκαν 435 αποικίες οξυγαλακτικών βακτηρίων (στο δείγμα 1, όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα δεν υπήρξε αύξηση οξυγαλακτικών βακτηρίων) και αντίστοιχα 40-60 αποικίες ζυμών. Οι αποικίες αυτές απομονώθηκαν σύμφωνα με τα πρωτόκολλα που περιγράφηκαν προηγουμένως ενώ στη συνέχεια ακολούθησε η ενίσχυση των τμημάτων αυτών με την τεχνική της RAPD-PCR με τη χρήση του εκκινητή M13. Με την ολοκλήρωση της συγκεκριμένης διαδικασίας ακολούθησε η ηλεκτροφόρηση των στελεχών σε πηκτή αγαρόζης δίνοντας προφίλ ζωνών για κάθε διαφορετικό στέλεχος. Ενδεικτικά παρουσιάζονται παρακάτω προφίλ στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων αλλά και ζυμών.



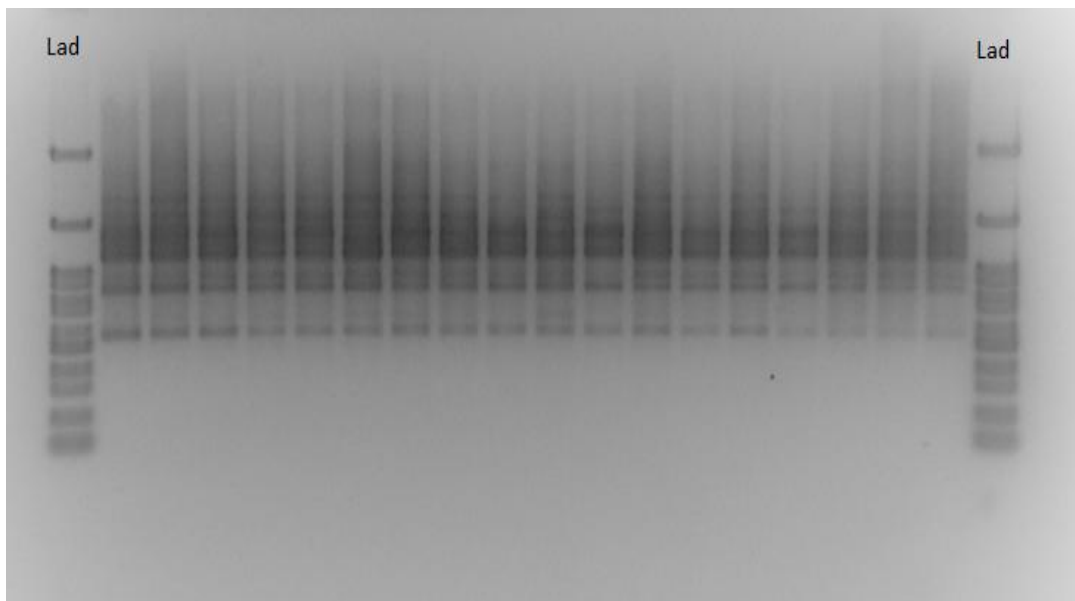
***Εικόνα 13.** Ενδεικτική φωτογραφία προϊόντων ηλεκτροφόρησης της RAPD-PCR σε πηκτή αгарόζης για 18 βακτηριακά στελέχη. Η πρώτη και τελευταία στήλη αποτελεί τον μάρτυρα μοριακής μάζας 1kbp.*



***Εικόνα 14.** Ενδεικτική φωτογραφία προϊόντων ηλεκτροφόρησης της RAPD-PCR σε πηκτή αгарόζης για 12 βακτηριακά στελέχη. Η πρώτη και τελευταία στήλη αποτελεί τον μάρτυρα μοριακής μάζας 1kbp.*



Εικόνα 15. Ενδεικτική φωτογραφία προϊόντων ηλεκτροφόρησης της RAPD-PCR σε πηκτή αгарόζης για 18 βακτηριακά στελέχη. Η πρώτη και τελευταία στήλη αποτελεί τον μάρτυρα μοριακής μάζας 1kbp.

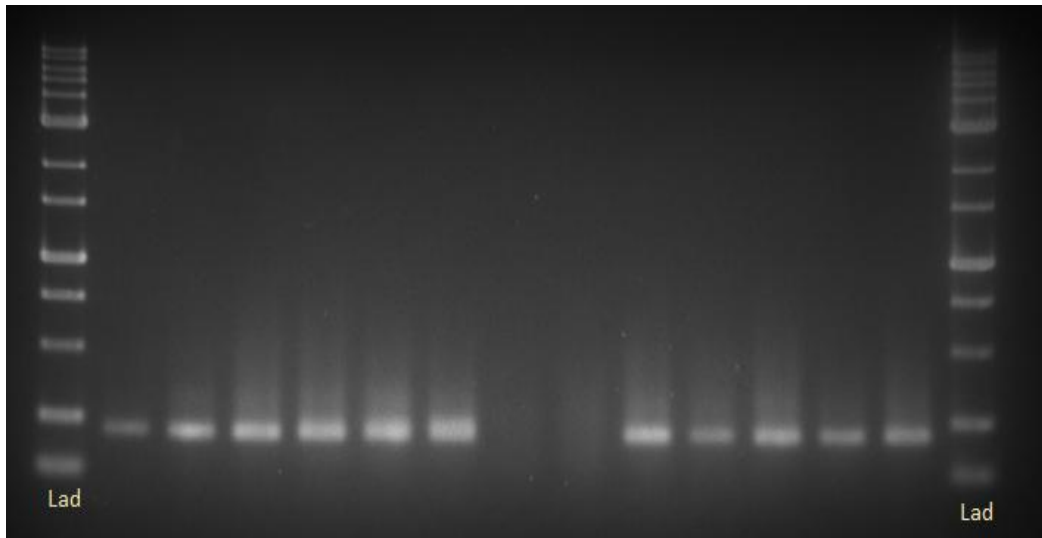


Εικόνα 16. Ενδεικτική φωτογραφία προϊόντων ηλεκτροφόρησης της RAPD-PCR σε πηκτή αгарόζης για 18 στελέχη ζυμών. Η πρώτη και τελευταία στήλη αποτελεί τον μάρτυρα μοριακής μάζας 1kbp.

Έπειτα, τα αποτελέσματα των ηλεκτροφορήσεων επεξεργάστηκαν μέσω του προγράμματος Bionumerics και ομαδοποιήθηκαν ανάλογα με την ομοιότητα που παρουσίαζαν σε ένα τελικό δενδρόγραμμα. Τα τελικά δενδρογράμματα που δημιουργήθηκαν τόσο για τα οξυγαλακτικά (Εικόνα 19-22, παράρτημα) όσο και για τις ζύμες (Εικόνα 23, παράρτημα) παρουσιάζονται στο παράρτημα.

Τα δείγματα ομαδοποιήθηκαν ανάλογα την ομοιότητά τους σε συστάδες (cluster). Από κάθε cluster επιλέχθηκε αντιπροσωπευτικός αριθμός στελεχών (5-7) ώστε να γίνει ταυτοποίηση αυτών μέσω της 16S rRNA PCR. Αντίστοιχα το ίδιο συνέβη και στην περίπτωση των ζυμών. Από κάθε cluster επιλέχθηκε ανάλογο αντιπροσωπευτικό δείγμα ώστε να γίνει η ταυτοποίηση αυτών μέσω της 26S rRNA PCR. Και οι δύο μέθοδοι έχουν αναλυθεί ως προς τις συνθήκες που έλαβαν χώρα εκτενώς σε προηγούμενο κεφάλαιο. Γενικά, από κάθε cluster επιλέχθηκε τουλάχιστον ένα στέλεχος ενώ έγινε προσπάθεια επιλογής στελεχών που εμφάνιζαν κάποια διαφορετικότητα σε σχέση με το σύνολο.

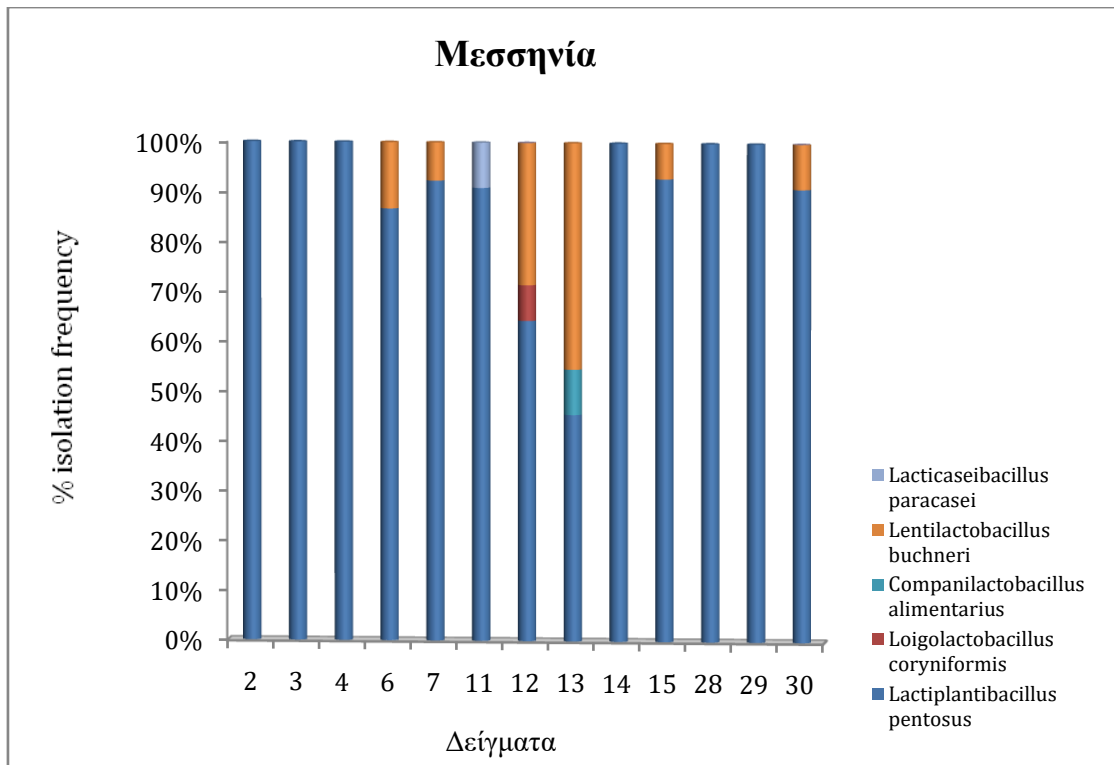
Με το πέρας της ταυτοποίησης και ενώ τα δείγματα στάλθηκαν σε κατάλληλο εργαστήριο για αλληλούχιση, έγινε έλεγχος των αποτελεσμάτων μέσω του FinchTV ενώ η ταυτοποίηση πραγματοποιήθηκε με τη βάση δεδομένων BLAST του NCBI. Ανάλογα τους μικροοργανισμούς που εμφανίστηκαν στα αποτελέσματα, έγινε η σχετική ομαδοποίηση των στελεχών. Παρατηρήθηκε όμως πως τα είδη *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactiplantibacillus pentosus* και *Lactiplantibacillus paraplantarum* συσχετίζονται στενά γονοτυπικά και παρουσιάζουν πολύ παρόμοιους φαινότυπους. Έτσι για τον ακριβή διαχωρισμό τους πραγματοποιήθηκε η τεχνική της multiplex PCR.



*Εικόνα 17. Ενδεικτική φωτογραφία προϊόντων ηλεκτροφόρησης της Multiplex PCR σε πηκτή αγαρόζης για τον διαχωρισμό των στελεχών *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactiplantibacillus pentosus* και *Lactiplantibacillus paraplantarum*. Η πρώτη και τελευταία στήλη αποτελεί τον μάρτυρα (ladder).*

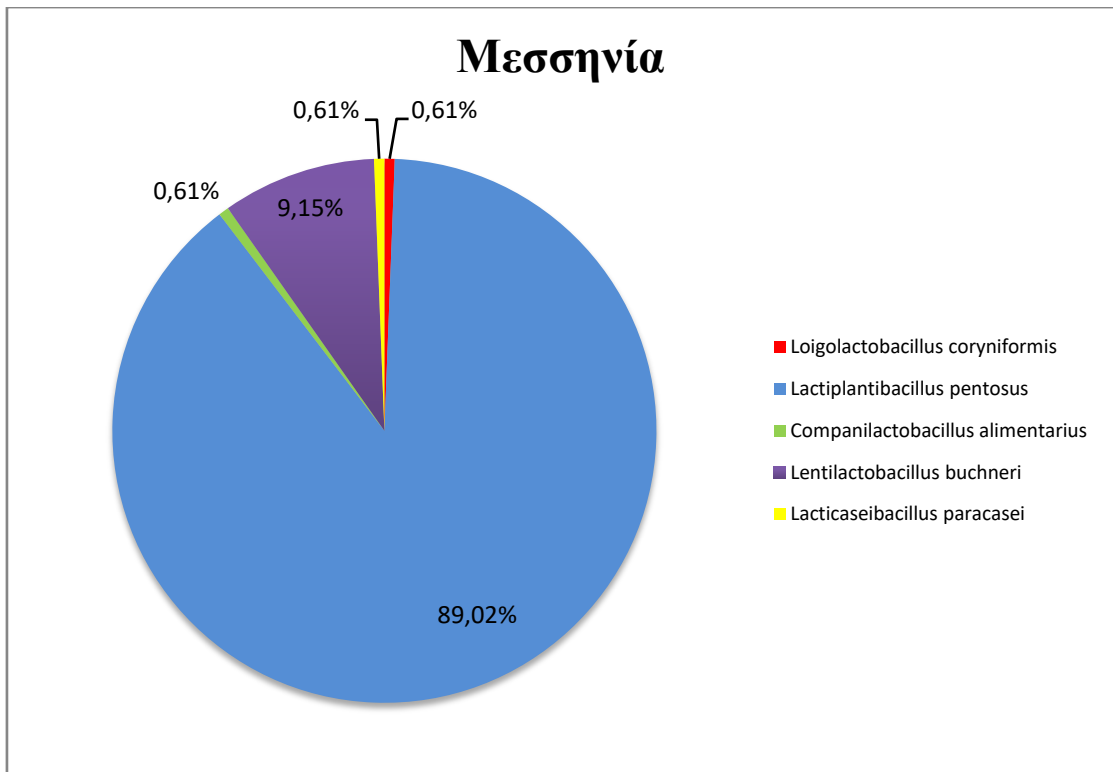
Όπως φαίνεται και στην φωτογραφία παραπάνω, τα αποτελέσματα της PCR κατηγοριοποιούνται με βάση τα bp που διαθέτει το κάθε είδος συγκρίνοντας τα με αυτά του ladder.

Τα στελέχη ομαδοποιήθηκαν ανάλογα την περιοχή, δηλαδή Μεσσηνία και Αιτωλοακαρνανία αντίστοιχα, και ανάλογα τον μικροοργανισμό, οξυγαλακτικά βακτήρια και ζύμες. Τα αποτελέσματα φαίνονται αναλυτικά σε σχετικά διαγράμματα παρακάτω.



Διάγραμμα 3. Ποσοστιαία αναλογία του κάθε είδους LAB για κάθε δείγμα στην περιοχή της Μεσσηνίας.

Όπως μπορούμε να διακρίνουμε και παραπάνω το είδος βακτηρίου που κυριαρχεί στον καρπό της ελιάς για την περιοχή της Μεσσηνίας είναι το *Lactiplantibacillus pentosus* (89,02%), εκτός από το δείγμα 13 που εκεί κυριαρχεί το *Lentilactobacillus buchneri*. Δεύτερο σε ποσοστό ακολουθεί το *Lactilactobacillus buchneri* (9,15%), ενώ τα είδη *Lactocaseibacillus paracasei* (0,61%), *Companilactobacillus alimentarius* (0,61%) και *Loigolactobacillus coryniformis* (0,61%) βρίσκονται σε αρκετά μικρό ποσοστό καθώς εμφανίζονται μόλις σε 3 δείγματα.

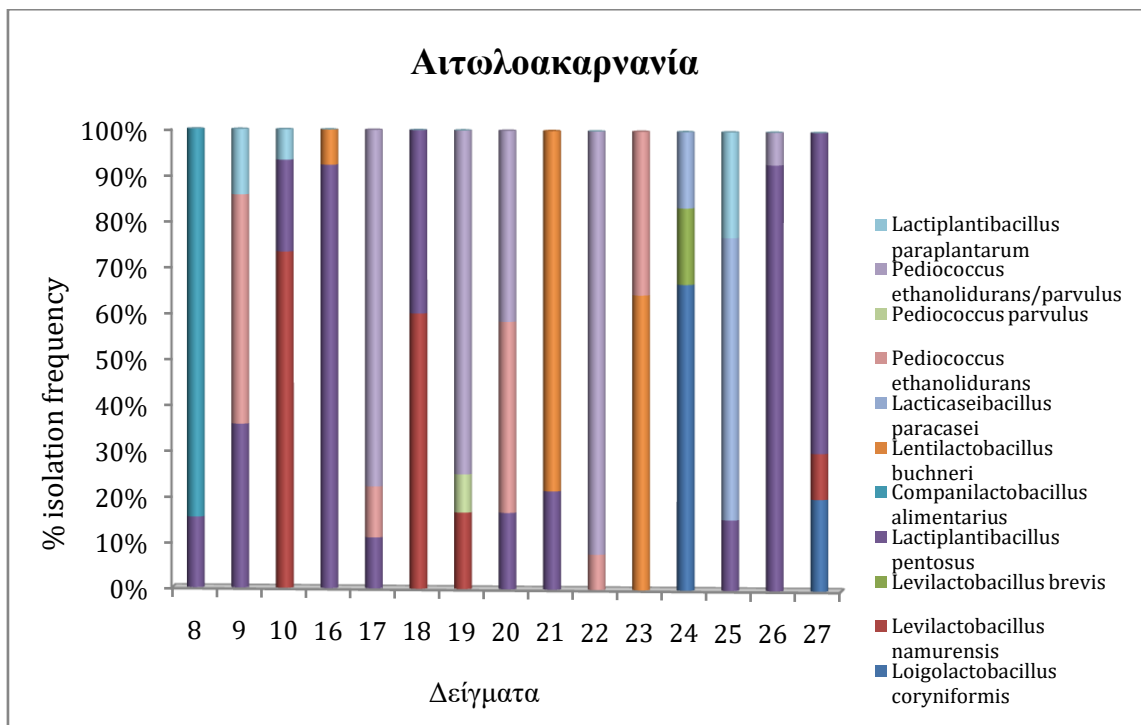


Διάγραμμα 4. Ποσοστιαία αναλογία των ειδών οξυγαλακτικών βακτηρίων για την περιοχή της Μεσσηνίας.

Είναι εμφανές ότι το είδος *Lactiplantibacillus pentosus* αποτελεί σχεδόν το 89% του συνόλου των δειγμάτων για την Μεσσηνία. Γενικά, το *Lactiplantibacillus pentosus* και το *Lactiplantibacillus plantarum* αποτελούν τα κυρίαρχα είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων που απομονώνονται από τις επιτραπέζιες ελιές. Σχετικές μελέτες έχουν δείξει πως το *Lactiplantibacillus pentosus* αποτελεί το κυρίαρχο είδος σε ελιές φυσικής ζύμωσης ενώ ακολουθεί το *Lactiplantibacillus plantarum*, το οποίο πιστεύεται ότι επικρατεί σε ελιές Ισπανικού τύπου (Tofalo *et. al.*, 2014). Πολλά είδη *Lactiplantibacillus plantarum*, τα οποία είχαν ταυτοποιηθεί σε επεξεργασμένες ελιές, επανεξετάστηκαν και βρέθηκε τελικά ότι άνηκαν στο είδος *Lactiplantibacillus pentosus* (Hurtado *et.al.*, 2012). Μελέτη έχει δείξει ότι η ύπαρξη του *Lactiplantibacillus pentosus* οδηγεί στην μειωμένη πιθανότητα αλλοίωσης του τροφίμου ενώ παίζει σημαντικό ρόλο και στην υδρόλυση της ελαιοευρωπεΐνης (Portilha-Cunha *et.al.*, 2020).

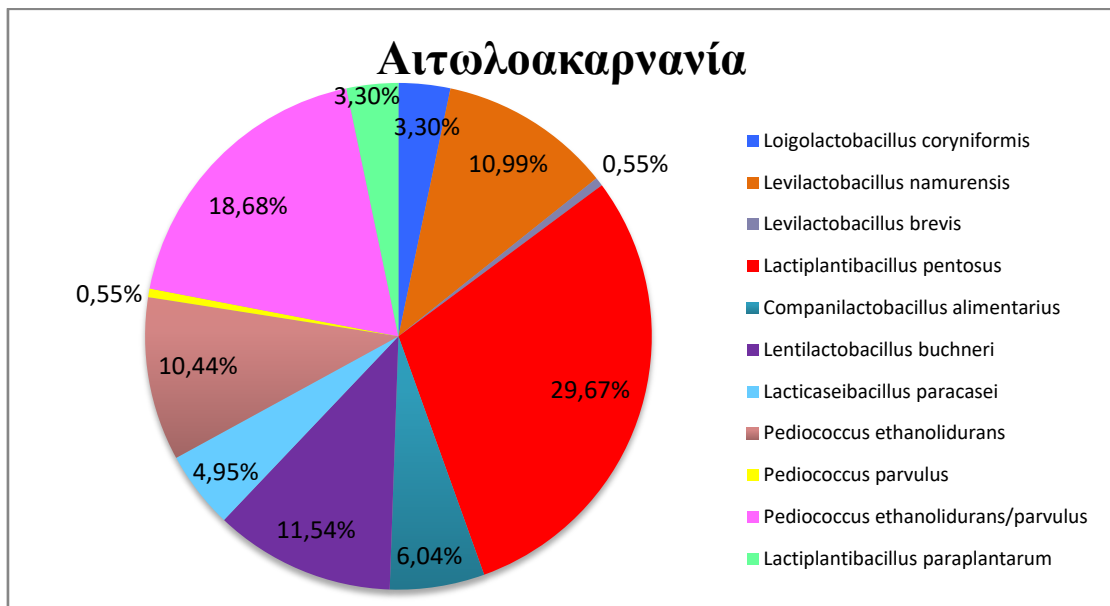
Εν συνεχεία, σε γεωγραφικό επίπεδο, το είδος *Lactiplantibacillus pentosus* και *Loigolactobacillus coryniformis* έχει βρεθεί γενικά σε φυσικές μαύρες ελιές ποικιλίας Καλαμών και Κονσερβοελιάς αντίστοιχα, ενώ το είδος

Companilactobacillus alimentarius έχει εμφανιστεί σε μαύρες ελιές στην περιοχή της Τουρκίας και το *Lacticaseibacillus paracasei* σε φυσικές ή Ισπανικού τύπου πράσινες ελιές σε διάφορες περιοχές όπως Αλγερία, Ισπανία και Ιταλία (Portilha-Cunha et.al., 2020). Σε σύγκριση αυτών αξίζει να αναφέρουμε πως το είδος *Lentilactobacillus buchneri* είναι διαδεδομένο στη φύση και η απομόνωσή του προέρχεται από διάφορα είδη όπως π.χ. τουρσί, διάφορα τυριά και ενσίρωση χόρτου (Heinl et. al., 2017). Τα είδη *L.buchneri* και *L.brevis* έχουν συσχετιστεί με το τελικό στάδιο της ζύμωσης της ελιάς, ενώ το είδος *L. parafarraginis*, που αποτελεί μέρος του *L. buchneri* group, έχει εμφανιστεί αντίστοιχα σε επιτραπέζιες ελιές (Montaño et.al., 2013). Γενικά το είδος *Lentilactobacillus buchneri* έχει την ικανότητα να παράγει οξύ σε αναερόβιες και αερόβιες συνθήκες κρατώντας σταθερό το pH σε χαμηλές τιμές (Heinl et. al., 2017). Βέβαια, αρκετές αναφορές έχουν αποφανθεί ότι ορισμένα στελέχη DNA του *Levilactobacillus brevis* υβριδοποιούνται με εκείνα άλλων *Lactobacilli*, όπως του *LentiLentilactobacillus buchneri*, και για αυτό συνιστάται η ηλεκτροφορική κινητικότητα της αφυδρογονάσης γαλακτικού οξέος για τον διαχωρισμό τους (Teixera, 1999).



Διάγραμμα 5. Ποσοστιαία αναλογία του κάθε είδους LAB για κάθε δείγμα στην περιοχή της Αιτωλοακαρνανίας.

Στην περιοχή της Αιτωλοακαρνανίας, όπως παρατηρούμε από τα διαγράμματα 6 και 7, υπάρχει μεγαλύτερη βιοποικιλότητα και διαφορετικότητα στα δείγματα και αυτό γιατί έχουμε την ανάπτυξη περισσότερων ειδών βακτηρίων σε σχέση με τα δείγματα της Μεσσηνίας αλλά και δεν υπάρχει η κυριαρχία ενός μόνο είδους στο εκάστοτε δείγμα. Αναλυτικότερα, σε αυτά τα δείγματα πέρα από το γένος *Lactobacillus* κάνει την εμφάνιση του και το γένος *Pediococcus*.



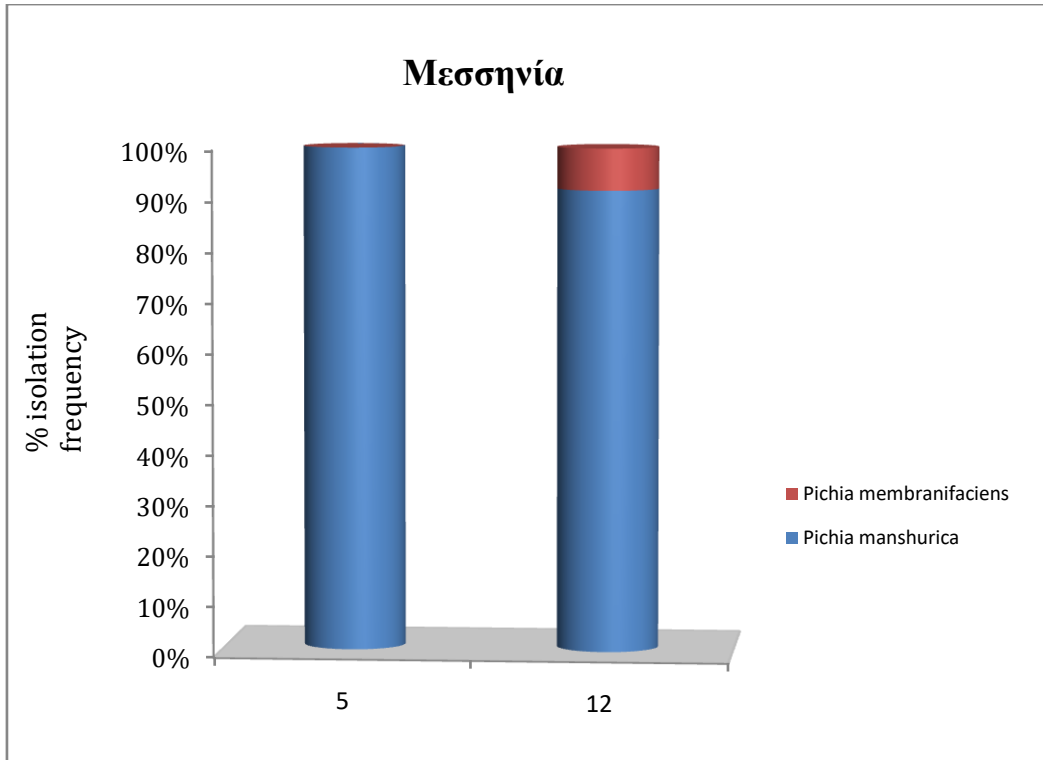
Διάγραμμα 6. Ποσοστιαία αναλογία των ειδών οξυγαλακτικών βακτηρίων για την περιοχή της Αιτωλοακαρνανίας.

Τα είδη *Lactiplantibacillus pentosus*, *Companilactobacillus alimentarius*, *Loigolactobacillus coryniformis*, *Lacticaseibacillus paracasei* και *Lentilactobacillus buchneri* εμφανίζονται και στα δείγματα της Αιτωλοακαρνανίας όπως και της Μεσσηνίας, με κυρίαρχο είδος για ακόμη μια φορά το είδος *Lactiplantibacillus pentosus*. Συγκεκριμένα, στα δείγματα 16, 26 και 27 κυριαρχεί ο *Lactiplantibacillus pentosus* (29,67%), στα δείγματα 10 και 18 ο *Levilactobacillus namurensis* (10,99%) και στα δείγματα 21 και 23 ο *Lentilactobacillus buchneri* (11,54%). Είναι, επίσης, εμφανές ότι στα δείγματα 24, 8 και 25 κυριαρχούν τα είδη *Loigolactobacillus coryniformis* (3,3%), *Companilactobacillus alimentarius* (6,4%) και *Lacticaseibacillus paracasei* (4,95%) αντίστοιχα.

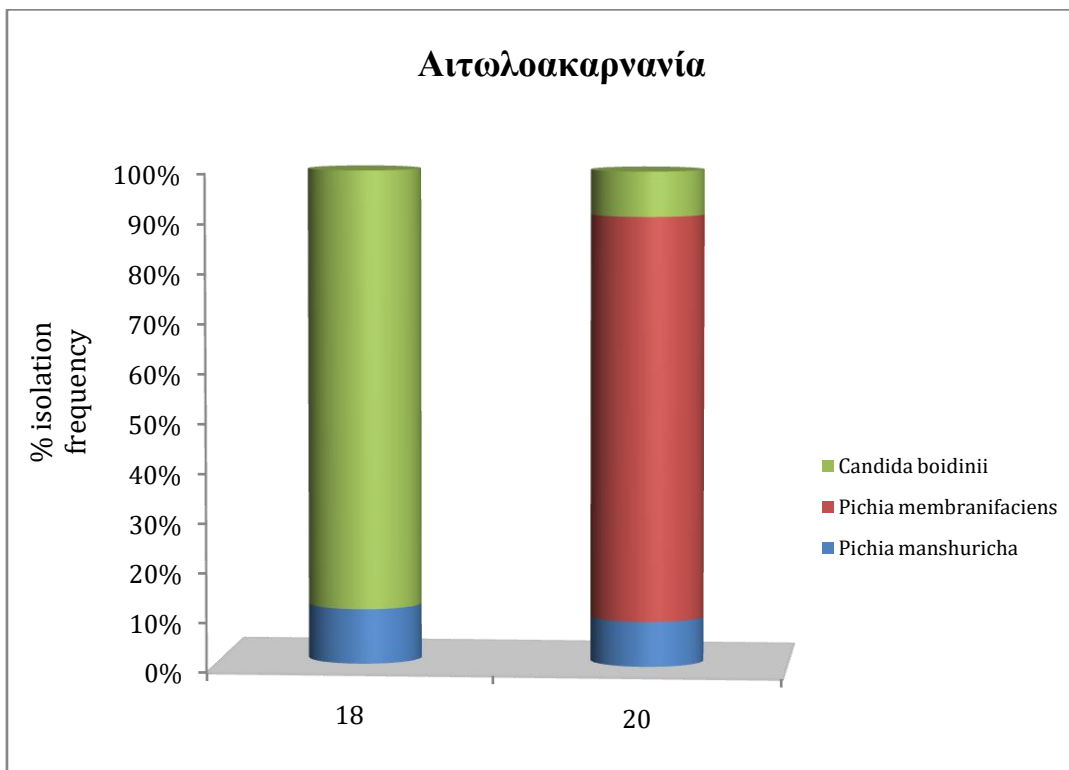
Υπάρχουν όμως τρία ακόμα είδη, όπου ανήκουν στο γένος *Lactobacillus*, που εμφανίστηκαν αποκλειστικά στα δείγματα της Αιτωλοακαρνανίας. Συγκριμένα το είδος *Lactiplantibacillus paraplantarum*, το οποίο έχει ανιχνευτεί, σε αντίστοιχη μελέτη, σε φυσικές μαύρες ελιές Καλαμών σε αντίστοιχο μικρό ποσοστό όπως και στην δική μας περίπτωση (Panagou *et.al.*, 2012). Παρόλα αυτά όμως αποτελεί χαρακτηριστικό είδος οξυγαλακτικού βακτηρίου σε ελιές φυσικής ζύμωσης. Το είδος *Levilactobacillus namurensis* έχει εντοπιστεί πάλι σε μαύρες ελιές στην Τουρκία ενώ το είδος *Levilactobacillus brevis* είτε σε φυσικές μαύρες ή πράσινες ελιές είτε σε Ισπανικού τύπου ελιές (Portilha-Cunha *et.al.*, 2020).

Πέρα από το είδος *Lactiplantibacillus pentosus*, κατά την ταυτοποίηση των ειδών, σε αρκετά μεγάλο ποσοστό εμφανίστηκε και το γένος *Pediococcus* ενώ παρατηρήθηκε αρκετά μεγάλη ομοιότητα μεταξύ των ειδών *P.parvulus* και *P.ethanolidurans* και λόγω αυτού δεν ήταν εύκολος ο διαχωρισμός τους. Παρόλα αυτά και τα 2 είδη μαζί κατέχουν σχεδόν το ίδιο ποσοστό συνολικά με αυτό του *Lactiplantibacillus pentosus*, δείχνοντας την κυριαρχία και τον ανταγωνισμό μεταξύ τους. Στα δείγματα 17, 19, 20 και 22 κυριαρχεί το είδος *Pediococcus ethanolidurans/parvulus* και στα δείγματα 9 και 20 το *Pediococcus ethanolidurans*. Το είδος *P.ethanolidurans* έχει ανιχνευτεί γενικά σε φυσικές μαύρες ελιές ποικιλίας Κονσερβοελιά (Argyri *et.al.*, 2020) ενώ το *P.parvulus* σε φυσικές πράσινες ελιές ή και Ισπανικού τύπου ελιές σε Ιταλία και Ισπανία (Portilha-Cunha *et.al.*, 2020). Στελέχη του είδους *Pediococcus ethanolidurans* έχουν απομονωθεί από ένα κελάρι αποσταγμένου αλκοολούχου ποτού σε επαρχιακή πόλη της Κίνας (Limeng *et.al.*, 2006), όμως πρώτη φορά εμφανίστηκαν σε μαύρες ελιές Κονσερβοελιά σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (Doulgeraki *et.al.*, 2012).

Από την άλλη πλευρά τα αποτελέσματα των ζυμών δείχνουν την κυριαρχία συγκεκριμένων ειδών στα δείγματα που παρουσίασαν ζύμες.



Διάγραμμα 7. Ποσοστιαία αναλογία του κάθε είδους ζύμης για κάθε δείγμα στην περιοχή της Μεσσηνίας.



Διάγραμμα 8. Ποσοστιαία αναλογία του κάθε είδους ζύμης για κάθε δείγμα στην περιοχή της Αιτωλοακαρνανίας.

Στην περιοχή της Μεσσηνίας κυριαρχεί το είδος *Pichia manshurica*, με την συνύπαρξη του είδους *Pichia membranifaciens* σε μικρό ποσοστό στο δείγμα 12. Για την περιοχή της Αιτωλοακαρνανίας κυριαρχεί το είδος *Candida Boidinii* στο πρώτο δείγμα ενώ στο δεύτερο το είδος *Pichia membranifaciens*. Σε πολύ μικρό ποσοστό εμφανίζεται και το είδος *Pichia manshurica* και στα δύο δείγματα. Και τα τρία είδη ζυμών έχουν βρεθεί πάλι σε φυσικές μαύρες ελιές Καλαμών (Panagou et.al., 2018). Ο αριθμός των δειγμάτων που εμφάνισαν ζύμες είναι αρκετά μικρός με αποτέλεσμα να μην υπάρχουν τόσο πολλά είδη μικροοργανισμών όσο στα οξυγαλακτικά βακτήρια. Αυτό μας δείχνει μια πολύ πιο ξεκάθαρη εικόνα της βιοποικιλότητας για την κάθε περιοχή. Και τα τρία είδη κυριαρχούν, με μεγαλύτερα σε ποσοστό τα είδη *Pichia manshurica* και *Candida Boidinii*, για Μεσσηνία και Αιτωλοακαρνανία αντίστοιχα. Γενικά, το είδος *Candida Boidinii* έχει αποδειχτεί ότι έχει την ικανότητα προσκόλλησης και αποικισμού στο δέρμα της ελιάς, δημιουργώντας ένα biofilm, αποδεικνύοντας έτσι ότι αποτελούν και μια πιθανή καλλιέργεια εκκίνησης σε ζυμωμένες ελιές (Heperkan, 2013). Το είδος *Pichia membranifaciens*, από την άλλη, από σχετικές μελέτες, έχει αποδειχτεί ότι απομονώνοντας το απευθείας από αλατισμένες ελιές παρουσιάζει μέτρια δραστικότητα καταλάσης και εστεράσης. Γενικά, οι ζύμες με θετική εστεράση είναι επιθυμητές επειδή συμβάλλουν στην βελτίωση της γεύσης, ενώ με θετική καταλάση διατηρούν τις ελιές έναντι της οξειδωσης των ακόρεστων λιπαρών οξέων και του σχηματισμού υπεροξειδίων (Doulgeraki et.al., 2012).

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί πως έχει λάβει χώρα παρόμοια μελέτη, η οποία όμως λειτούργησε με ανεξάρτητες από την καλλιέργεια τεχνικές. Σύμφωνα λοιπόν με την μελέτη των Kazou et.al. 2020, χρησιμοποιήθηκε μεταγονιδιωματική τεχνική κατά την οποία εμφανίστηκαν πολύ περισσότερα είδη από όσα βρέθηκαν με την εξαρτημένη στη καλλιέργεια τεχνική στη συγκεκριμένη μελέτη. Συγκεκριμένα, και τότε το γένος *Lactobacillus* ήταν ένα από τα κυρίαρχα βακτήρια ενώ εμφανίστηκε και πληθώρα άλλων βακτηρίων όπως το γένος *Leuconostoc*. Το ίδιο ισχύει και στην περίπτωση των ζυμών. Στην συγκεκριμένη μελέτη εμφανίστηκαν μόνο 2 γένη ζυμών, *Pichia* και *Candida*, ενώ στην μελέτη των Kazou at.al. εμφανίστηκαν και πάλι περισσότερα ένα εκ των οποίων και το είδος *Saccharomyces*.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Όπως είναι εμφανές, η ελιά είναι ένα δέντρο που έχει σημαντική αξία για την ελληνική οικονομία. Ένα σύνολο παραγόντων, όπως η αυτόχθονη μικροχλωρίδα του ελαιοκάρπου, οι καιρικές συνθήκες, η γεωγραφική θέση και τα χημικά συστατικά, μπορούν να καθορίσουν το τελικό προϊόν. Η συγκεκριμένη μελέτη σκόπευε στον εντοπισμό των κυριάρχων μικροοργανισμών και πιο αναλυτικά στην χαρτογράφηση της βιοποικιλότητας των οξυγαλακτικών βακτηρίων και ζυμών κατά την αυθόρμητη ζύμωση φυσικής μαύρης ελιάς σε δύο διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές. Τα αποτελέσματα αυτής δείχνουν πως στην περίπτωση των οξυγαλακτικών βακτηρίων η βιοποικιλότητα της κάθε περιοχής διαφοροποιείται ενώ στην περίπτωση των ζυμών αυτό είναι εμφανές σε μικρότερο επίπεδο, συμπεραίνοντας ότι τελικά η γεωγραφική θέση ίσως να παίζει σημαντικό ρόλο στην επιτραπέζια ελιά.

Σε μικροβιολογικό επίπεδο, η ανάπτυξη των βακτηρίων ήταν πολύ μεγαλύτερη από εκείνη των ζυμών, δείχνοντας τον ανταγωνισμό αυτών των δύο και την τελική υπέρσχυση των βακτηρίων. Σε μοριακό επίπεδο, στην περίπτωση των οξυγαλακτικών βακτηρίων, παρατηρήθηκε πως το κυρίαρχο είδος και για τις δύο περιοχές αποτελεί το *Lactiplantibacillus pentosus*. Η βιοποικιλότητα και στις δύο περιοχές, της Μεσσηνίας και Αιτωλοακαρνανίας, εμφανίζει μεγάλο ενδιαφέρον. Συγκεκριμένα, στην περιοχή της Μεσσηνίας κυριαρχεί το γένος *Lactobacillus* ενώ στην περιοχή της Αιτωλοακαρνανίας συνυπάρχουν σχεδόν σε ίδιο ποσοστό τα γένη *Lactobacillus* και *Pediococcus*.

Στην περίπτωση των ζυμών, λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι σε κάθε περιοχή κυριαρχεί διαφορετικό είδος ζυμών θα μπορούσαμε να οδηγηθούμε στο συμπέρασμα ότι κάτι τέτοιο ισχύει και στην περίπτωση των ζυμών. Παρόλο το μεγάλο ποσοστό που εμφανίζει το εκάστοτε είδος ζύμης στο κάθε δείγμα ξεχωριστά, λόγω του μικρού αντιπροσωπευτικού δείγματος που χρησιμοποιήσαμε, δεν μπορεί να αποτελέσει ξεκάθαρη εικόνα για την βιοποικιλότητα της κάθε περιοχής. Αξίζει να σημειωθεί πως σε σύγκριση με άλλες μελέτες, φάνηκε πως τεχνικές οι οποίες εξαρτώνται από την καλλιέργεια δεν μας προσφέρουν μια ολοκληρωμένη εικόνα για το

μικροβιακό φορτίο του εκάστοτε δείγματος. Η χρήση τεχνικών ανεξάρτητες από την καλλιέργεια θα βοηθήσει μελλοντικά στην καλύτερη μελέτη των προϊόντων λαμβάνοντας έτσι και περισσότερες πληροφορίες.

Συμπερασματικά, η γεωγραφική θέση και το μικρόκλιμα της κάθε περιοχής μπορεί να επηρεάσει τη βιοποικιλότητα του τελικού προϊόντος και την ανάπτυξη συγκεκριμένων μικροοργανισμών σε επίπεδο γένους αλλά και είδους. Αυτό παρουσιάζουν και τα παραπάνω αποτελέσματα, καθώς σε κάθε δείγμα κατά κύριο λόγο έχουμε την εμφάνιση διαφορετικών ειδών βακτηρίων αλλά και συνολικά βλέπουμε μια βιοποικιλότητα διαφορετική για την εκάστοτε περιοχή. Η φυσική ζύμωση ξεκινά αυθόρμητα προκαλώντας ένα μικροβιακό οικοσύστημα αρκετά περίπλοκο και μεταβλητό δίνοντας αυτή την πολυπλοκότητα στο τελικό προϊόν.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ

Ευστάθιος Ζ. Πανάγου, Διδακτορική διατριβή: Ζύμωση συντήρηση και οικολογία της επιτραπέζιας ελιάς, 2002, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ι.Δ. Κυριαζής, Μ.Ε. Καμπούρης, Κ. Πουλάς, Γ.Π. Πατρινός, Review Μοριακές τεχνικές για την ανίχνευση και το χαρακτηρισμό μικροοργανισμών, Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής 2014, 31(1):23-40

Μίλη Ελένη, Η καλλιέργεια της ελιάς, Υπουργείο Γεωργίας, Φυσικών Πόρων και Περιβάλλοντος, Τμήμα Γεωργίας, Έκδοση 12/2014, Λευκωσία-Κύπρος

Μίλη Ελένη, Θεραπευτική Αξία των Προϊόντων της Ελιάς και η Σημασία τους στη Μεσογειακή Διατροφή και την Ανθρώπινη Υγεία , Υπουργείο Γεωργίας, Φυσικών Πόρων και Περιβάλλοντος, Τμήμα Γεωργίας, Έκδοση 12/2014, Λευκωσία-Κύπρος

Μ. Παπαναστασοπούλου, Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης, Περιγραφή της μεθόδου και εφαρμογής της στην ανίχνευση ιών, ΔΕΛΤΙΟΝ ΕΛΛ. ΚΤΗΝ. ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ 1997, 48(2): 61-69

Μπαλατσούρας Γ., Η επιτραπέζια ελιά. Ποικιλίες, χημική σύσταση, εμπορικοί τύποι, ποιοτικά χαρακτηριστικά, συσκευασία, εμπορία, 1995, Έκδοση Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Νυχάς Γεώργιος Ιωάννης, Ευστάθιος Ζ. Πανάγου, Εργαστηριακές Σημειώσεις του μαθήματος «Μικροβιολογία Τροφίμων», Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Παλαιολόγου, Δ., (2015). Ηλεκτροφόρηση DNA. Εργαστηριακές ασκήσεις γενετικής του ανθρώπου. Μοριακή Βιολογία και Γενετική.

Παραμυθιώτης Σπυρίδων, Σημειώσεις μαθήματος Μοριακή Βιοτεχνολογία Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα 2010

Σημειώσεις εργαστηρίου γενετικής του ανθρώπου 2014
<https://eclass.teiath.gr/modules/document/file.php/TIE178/%CE%A3%CE%B7%CE%BC%CE%B5%CE%B9%CF%8E%CF%83%CE%B5%CE%B9%CF%82%20%CE%B5%CF%81%CE%B3%CE%B1%CF%83%CF%84%CE%B7%CF%81%CE%AF%CE%BF%CF%85%20%CE%B3%CE%B5%CE%BD%CE%B5%CF%84%CE%B9%CE%BA%CE%AE%CF%82%20%CF%84%CE%BF%CF%85%20%CE%B1%CE%BD%CE%B8%CF%81%CF%8E%CF%80%CE%BF%CF%85%202014.pdf>

Abd El-Latif Hesham, Virginia Wambui, Henry Ogola J.O., Julius M. Maina, Phylogenetic analysis of isolated biofuel yeasts based on 5.8S-ITS rDNA and D1/D2 26S rDNA sequences, *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* (2014) 12, 37–43

Agapi I. Doulgeraki, Paraskevi Pramateftaki, Anthoula A. Argyri, George-John E. Nychas, Chrysoula C. Tassou, Efstathios Z. Panagou, Molecular characterization of lactic acid bacteria isolated from industrially fermented Greek table olives, *LWT - Food Science and Technology* 50 (2013) 353-356

Agapi I. Doulgeraki, Olga Hondrodinou, Vassilis Iliopoulos, Efstathios Z. Panagou, Lactic acid bacteria and yeast heterogeneity during aerobic and modified atmosphere packaging storage of natural black *Conservolea* olives in polyethylene pouches, *Food Control* 26 (2012) 49-57

Agapi I. Doulgeraki, Spiros Paramithiotis, George-John Nychas, 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 (2011) 77-83

Agni Hadjilouka, Nikolaos D. Andritsos, Spiros Paramithiotis, Marios Mataragas and Eleftherios H. Drosinos, *Listeria monocytogenes* Serotype Prevalence and Biodiversity in Diverse Food Products, *Journal of Food Protection*, Vol. 77, No. 12, (2014), Pages 2115–2120

Albert Hurtado, Cristina Reguant, Albert Bordons*, Nicolas Rozès, Lactic acid bacteria from fermented table olives, 2012, *Food Microbiology* 31 (2012) 1-8

Alfredo Montaña, Antonio Higinio Sánchez, Francisco Javier Casado, Víctor Manuel Beato, Antonio de Castro, Degradation of ascorbic acid and potassium sorbate by different *Lactobacillus* species isolated from packed green olives, *Food Microbiology* 34 (2013) 7-11

Antonio Higinio Sánchez Gómez, Pedro García García and Luis Rejano Navarro, Trends in table olive production, Elaboration of table olives, *Grasas Y Aceites*, 57 (1), Enero-Marzo, 86-94, (2006), ISSN: 0017-3495

Daniela Campaniello, Antonio Bevilacqua, Daniela D'Amato, Maria Rosaria Corbo, Clelia Altieri and Milena Sinigaglia, Microbial Characterization of Table Olives Processed According to Spanish and Natural Styles, *Food Technol. Biotechnol.* 43 (3) 289–294 (2005)

Dimitrios A. Anagnostopoulos, Vlasios Goulas, Eleni Xenofontos, Christos Vouras, Nikolaos Nikoloudakis and Dimitrios Tsaltas, Benefits of the Use of Lactic Acid Bacteria Starter in Green Cracked Cypriot Table Olives Fermentation, 2019, *Foods* 2020, 9, 17

DOEPEL, Greek Table Olives, Our Natural Treasure, Interprofessional Table Olives Organisation

https://olivetreeroute.gr/wp-content/uploads/Studies_Publications_017a.pdf

Dr Efstathios Z. Panagou, Table olives processing in Greece, 2015, Agricultural University of Athens, LAB of Microbiology and Biotechnology of Foods
<https://afidol.org/wp-content/uploads/2017/05/EF-Panagou-traitement-des-olives-en-Grece-VO.pdf>

Dr. Mohini Joshi, Dr .Deshpande J.D, POLYMERASE CHAIN REACTION: METHODS, PRINCIPLES AND APPLICATION, 2010, International Journal of Biomedical Research, 1 [5] [2010]81-97

Efstathios Z. Panagou, Ulrich Schillinger, Charles M.A.P. Franz, George-John E. Nychas, Microbiological and biochemical profile of cv. Conservolea naturally black olives during controlled fermentation with selected strains of lactic acid bacteria, Food Microbiology 25 (2008) 348–358

Eva Ramírez, Manuel Brenes, Pedro García, Eduardo Medina, Concepción Romero, Oleuropein hydrolysis in natural green olives: Importance of the endogenous enzymes, Food Chemistry 206 (2016) 204–209

F.N. Arroyo-López, A. Querol, J. Bautista-Gallego, A. Garrido-Fernández, Role of yeasts in table olive production, 2008, International Journal of Food Microbiology 128 (2008) 189–196

F.N. Arroyo-López, V. Romero-Gil, J. Bautista-Gallego, F. Rodríguez-Gómez, R. Jiménez-Díaz, P. García-García, A. Querol, A. Garrido-Fernández, Yeasts in table olive processing: Desirable or spoilage microorganisms?, International Journal of Food Microbiology 160 (2012) 42–49

Fevzi Bardakci, Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers, Turk J Biol, 25 (2001) 185-196

Franck A. Atienzar, Awadhesh N. Jha, The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: A critical review, Mutation Research 613 (2006) 76–102

Gianluca Bleve, Maria Tufariello, Miriana Durante, Francesco Grieco, Francesca Anna Ramires, Giovanni Mita, Maria Tasioula-Margari, Antonio Francesco Logrieco, Physico-chemical characterization of natural fermentation process of Conservolea and Kalamata table olives and development of a protocol for the pre-selection of fermentation starters, Food Microbiology 46 (2015) 368-382

Gianluca Bleve, Maria Tufariello, Miriana Durante, Ezio Perbellini, Francesca A. Ramires, Francesco Grieco, Maria S. Cappello, Stefania De Domenico, Giovanni Mita, Maria Tasioula-Margari and Antonio F. Logrieco, Physico-chemical and microbiological characterization of spontaneous fermentation of Cellina di Nardò and Leccino table olives, frontiers in Microbiology, October 2014, Volume 5, Article 570

Giorgia Perpetuini, Roberta Prete, Natalia Garcia-Gonzalez , Mohammad Khairul Alam and Aldo Corsetti, Review, Table Olives More than a Fermented Food, 2020, Faculty of BioScience and Technology for Food, Agriculture and Environment, University of Teramo

Hepkan, Dilek (2013). Microbiota of table olive fermentations and criteria of selection for their use as starters. *Frontiers in microbiology*, 4, 143.

Hurtado A., Reguant C., Bordons A., & Rozès N. (2012). Lactic acid bacteria from fermented table olives. *Food microbiology*, 31(2012), 1-8.

International Olive Council

<http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/76-the-olive-tree>

Isaac Zipori, Arnon Dag1, and Yizhar Tugendhaft, Mechanical Harvesting of Table Olives:Harvest Efficiency and Fruit Quality, *Hortscience* 49(1):55–58. 2014

J R N Taylor, *Foods and Nonalcoholic Beverages*, 2004, University of Pretoria, Pretoria, South Africa

Jagtar Singh, Niti Birbian, Shweta Sinha and Akshra Goswami, A critical review on PCR, its types and applications, *Int. J. Adv. Res. Biol.Sci.* 1(7): (2014): 65–80

James W Messer, Eugene W Rice and Clifford H Johnson, 1999, Pour Plate Technique, US Environmental Protection Agency

James W Messer, Eugene W Rice and Clifford H Johnson, 1999, Spread Plate Technique, US Environmental Protection Agency

Klančnik, A., Kovač, M., Toplak, N., Piskernik, S., & Jeršek, B. (2012). PCR in food analysis. *Polymerase chain reaction. In tech. p*, 195-220.

Konstantina Argyri, Agapi I. Doulgeraki, Evanthia Manthou, Athena Grounta, Anthoula A. Argyri, George-John E. Nychas and Chrysoula C. Tassou, Microbial Diversity of Fermented Greek Table Olives of Halkidiki and Konservolia Varieties from Different Regions as Revealed by Metagenomic Analysis, 2020, *Microorganisms* 2020, 8, 1241

L B Bullerman, *Fungi in Food – An Overview*, 2003, University of Nebrask- Lincoln, Lincoln, NE, USA

L. Rocco, I. V. Valentino, G. Scapigliati, V. Stingo, RAPD-PCR analysis for molecular characterization and genotoxic studies of a new marine fish cell line derived from *Dicentrarchus labrax*, *Cytotechnology* (2014) 66:383–393

Limeng Liu, Bin Zhang, Huichun Tong and Xiuzhu Dong, *Pediococcus ethanolidurans* sp. nov., isolated from the walls of a distilled-spirit-fermenting cellar, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2006), 56, 2405–2408

M.Psani and P.Kotzekidou, Technological characteristics of yeast strains and their potential as starter adjuncts in Greek-style black olive fermentation, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* volume 22, pages 1329–1336(2006)

M. Francisca Portilha-Cunha, Angela C. Macedo and F. Xavier Malcata, A Review on Adventitious Lactic Acid Bacteria from Table Olives, *Foods* 2020, 9, 948; doi:10.3390

MT Rahman, MS Uddin, R Sultana, A Moue, M Setu, Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review, 2013, *AKMMC J* 2013: 4(1): 30-36

Maria Kazou, Aikaterini Tzamourani, Efstathios Z. Panagou and Effie Tsakalidou, 2020, Unraveling the Microbiota of Natural Black cv. Kalamata Fermented Olives through 16S and ITS Metataxonomic Analysis, Agricultural University of Athens, Microorganisms 2020, 8, 672

Maria Aponte, Giuseppe Blaiotta, Francesco La Croce, Agata Mazzaglia, Vittorio Farina, Luca Settanni, Giancarlo Moschetti, Use of selected autochthonous lactic acid bacteria for Spanish-style table olive Fermentation, Food Microbiology 30 (2012) 8-16

Natasa P. Kalogiouri, Reza Aalizadeh, Marilena E. Dasenaki and Nikolaos S. Thomaidis, Authentication of Greek PDO Kalamata Table Olives: A Novel Non-Target High Resolution Mass Spectrometric Approach, Molecules 2020, 25, 2919; doi:10.3390

Panagou E. Z., Tassou C. C., & Skandamis P. N. (2006). Physicochemical, microbiological, and organoleptic profiles of Greek table olives from retail outlets. *Journal of food protection*, vol69, No7, 2006, 1732-1738.

Paola Conte, Costantino Fadda, Alessandra Del Caro, Pietro Paolo Urgeghe and Antonio Piga, Table Olives: An Overview on Effects of Processing on Nutritional and Sensory Quality, Foods 2020, 9, 514; doi:10.3390

Paula C M Teixeira, *Lactobacillus brevis*, 1999

Pei Yun Lee, John Costumbrado, Chih-Yuan Hsu, Yong Hoon Kim, Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments, . *Vis. Exp.* (62),e3923, doi:10.3791/3923 (2012).

Rosanna Tofalo, Giorgia Perpetuini, Maria Schirone, Aurora Ciarrocchi, Giuseppe Fasoli, Giovanna Suzzi, Aldo Corsetti, *Lactobacillus pentosus* dominates spontaneous fermentation of Italian table olives, LWT - Food Science and Technology 57 (2014) 710-717

S. Wahbi, R. Wakrim, B. Aganchich, H. Tahi, R. Serraj, Effects of partial rootzone drying (PRD) on adult olive tree (*Olea europaea*) in field conditions under arid climate I. Physiological and agronomic responses, Agriculture, Ecosystems and Environment 106 (2005) 289–301

Sandra Torriani, Giovanna E. Felis and Franco Dellaglio, Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* Gene Sequence Analysis and Multiplex PCR Assay with *recA* Gene-Derived Primers, Applied and Environmental Microbiology, Aug. 2001, p. 3450–3454

Simone D'Angeli, Rui Malhó, Maria Maddalena Altamura, Low-temperature sensing in olive tree: calcium signaling and cold acclimation, Plant Science 165 (2003) 1303–1313

Siti Hajar Mohd Azhar, Rahmath Abdulla, Siti Azmah Jambo, Hartinie Marbawi, Jualang Azlan Gansau, Ainol Azifa Mohd Faik, Kenneth Francis Rodrigues, Yeasts in sustainable bioethanol production: A review, Biochemistry and Biophysics Reports 10 (2017) 52–61

Sophia Rhizopoulou, *Olea europaea* L. A Botanical Contribution to Culture, 2007, American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci., 2 (4): 382-387

Stamatoula Bonatsou, Chrysoula C. Tassou, Efstathios Z. Panagou and George-John E. Nychas, Review, Table Olive Fermentation Using Starter Cultures with Multifunctional Potential, *Microorganisms* 2017, 5, 30; doi:10.3390

Stamatoula Bonatsou, Spiros Paramithiotis and Efstathios Z. Panagou, Evolution of Yeast Consortia during the Fermentation of Kalamata Natural Black Olives upon Two Initial Acidification Treatments, 2018, vol 8, article 2673

Stamatoula Bonatsou, Chrysoula C. Tassou, Efstathios Z. Panagou and George-John E. Nychas, Table Olive Fermentation Using Starter Cultures with Multifunctional Potential, *Microorganisms* 2017, 5, 30

Stefan Heindel, Reingard Grabherr, Systems biology of robustness and flexibility: *Lentilactobacillus buchneri*—A show case, 2017, *Journal of Biotechnology* 257 (2017) 61–69

Tolulope Joshua Ashaolu 1,2 and Anna Reale, A Holistic Review on Euro-Asian Lactic Acid Bacteria Fermented Cereals and Vegetables, Review 2020, *Microorganisms* 2020, 8, 1176

Vaccalluzzo A., Pino A., Russo, N., De Angelis, M., Caggia, C., Randazzo, C.L., FoodOmics as a new frontier to reveal microbial community and metabolic processes occurring on table olives fermentation, *Food Microbiology* (2020)

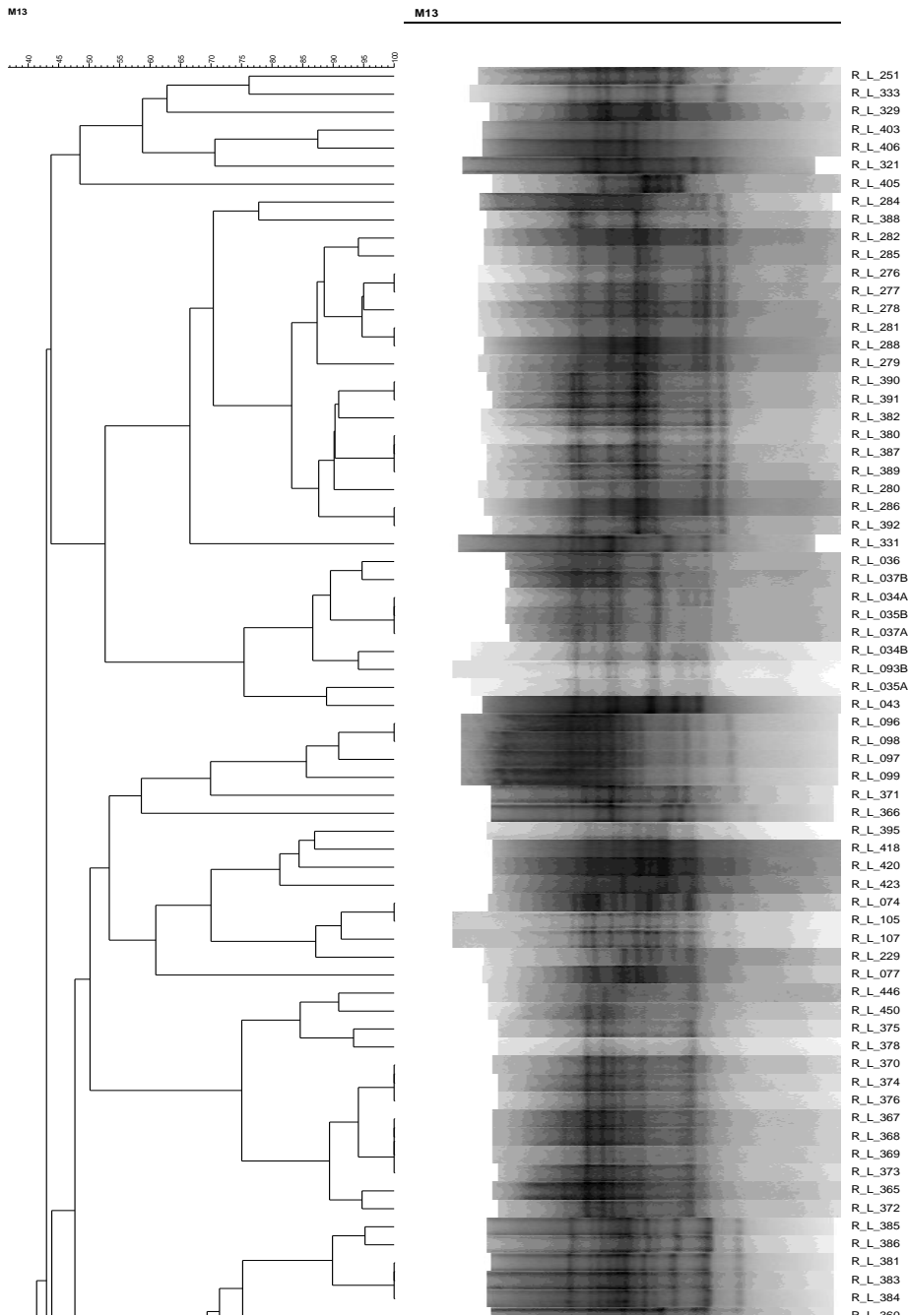
Violeta Fajardo, Isabel González, María Rojas, Teresa García and Rosario Martín, A review of current PCR-based methodologies for the authentication of meats from game animal species, *Trends in Food Science & Technology* 21 (2010) 408-421

EIKONEΣ

- Εικόνα εξωφύλλου: <http://www.lakonizin.gr/>
- Εικόνα 3: <https://fitoriakonstantinou.gr/index.php/info/varieties/olive/129-amfissis>
- Εικόνα 5: <https://ladasfoods.gr/%CE%B5%CE%BB%CE%B9%CE%B5%CF%83-%CE%BA%CE%B1%CE%BB%CE%B1%CE%BC%CF%89%CE%BD/>
- Εικόνα 4: <https://ladasfoods.gr/%CF%80%CF%81%CE%B1%CF%83%CE%B9%CE%BD%CE%B5%CF%83-%CE%B5%CE%BB%CE%B9%CE%B5%CF%83-%CF%87%CE%B1%CE%BB%CE%BA%CE%B9%CE%B4%CE%B9%CE%BA%CE%B7%CF%83/>
- Εικόνα 6: <https://blog.labtag.com/a-brief-history-of-pcr-and-its-derivatives/>
https://www.labtag.com/pcr-labels/?utm_source=BLOG&utm_medium=CTA_BANNERS&utm_campaign=PCR

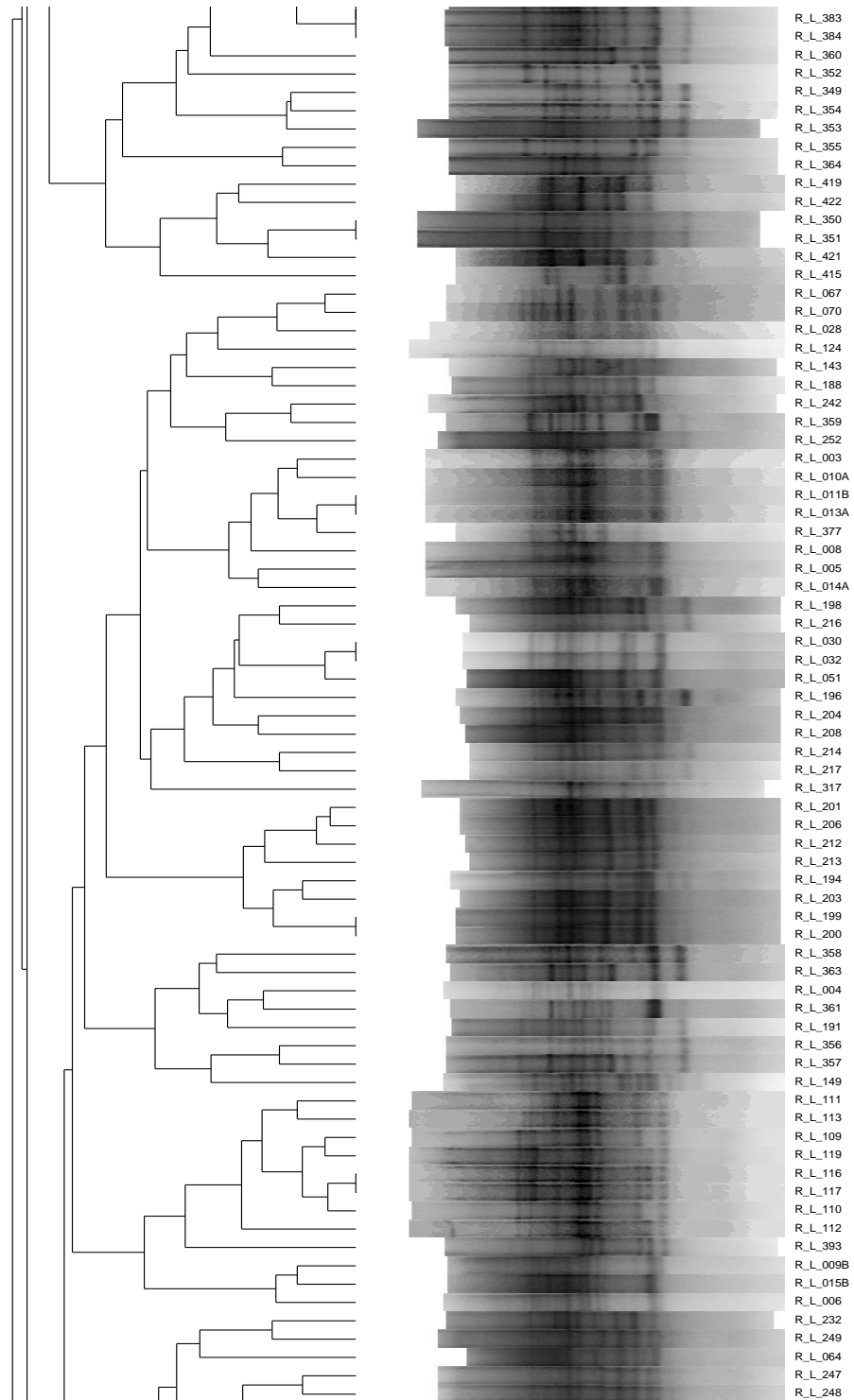
Εικόνα 18.

Φυλογενετικό δέντρο στο οποίο απεικονίζεται η ομαδοποίηση στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων απομονωμένων από ελιές ποικιλίας Καλαμών ανάλογα με το προφίλ που προέκυψε από τη RAPD-PCR.



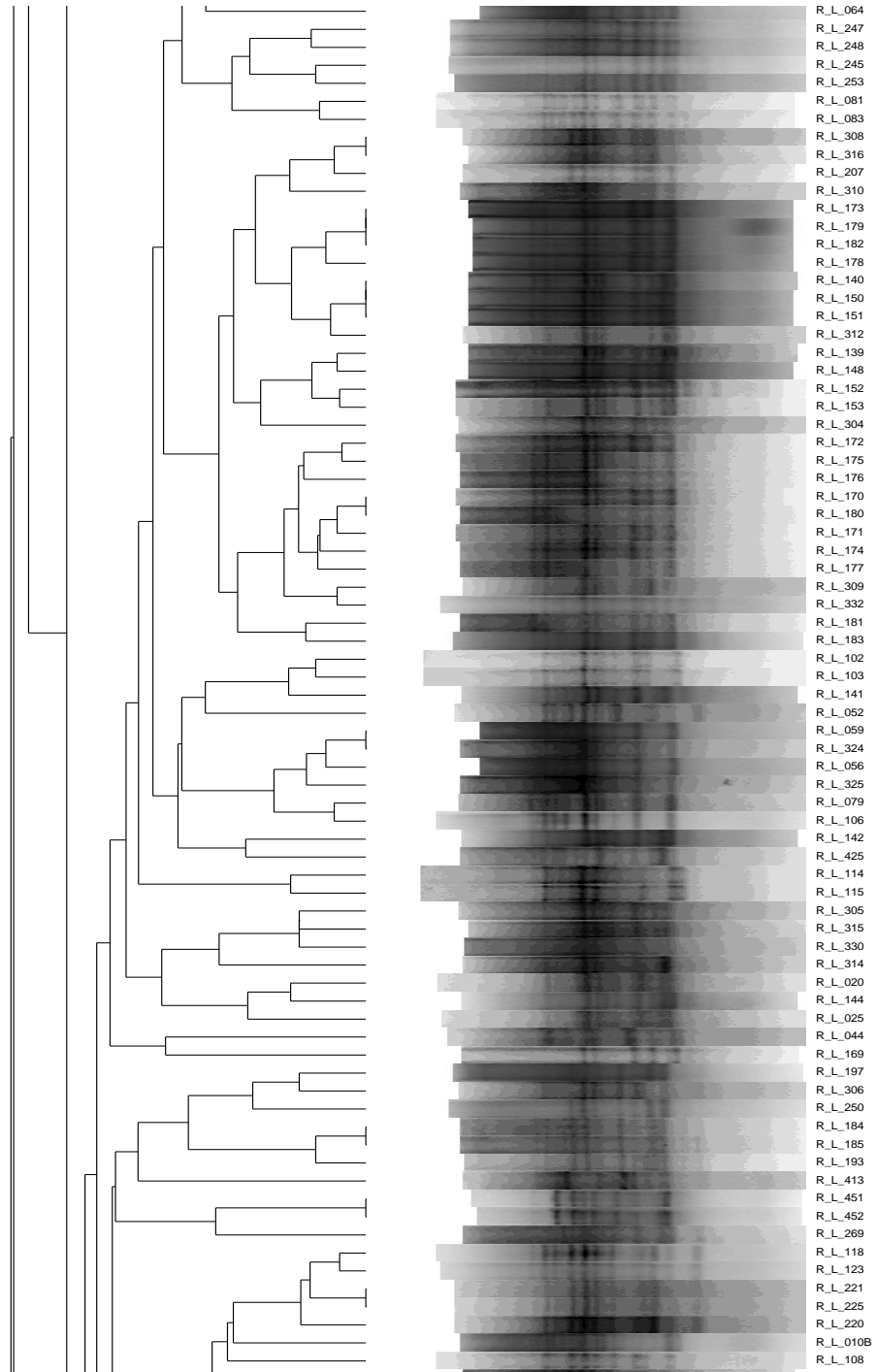
Εικόνα 19.

Φυλογενετικό δέντρο στο οποίο απεικονίζεται η ομαδοποίηση στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων απομονωμένων από ελιές ποικιλίας Καλαμών ανάλογα με το προφίλ που προέκυψε από τη RAPD-PCR.



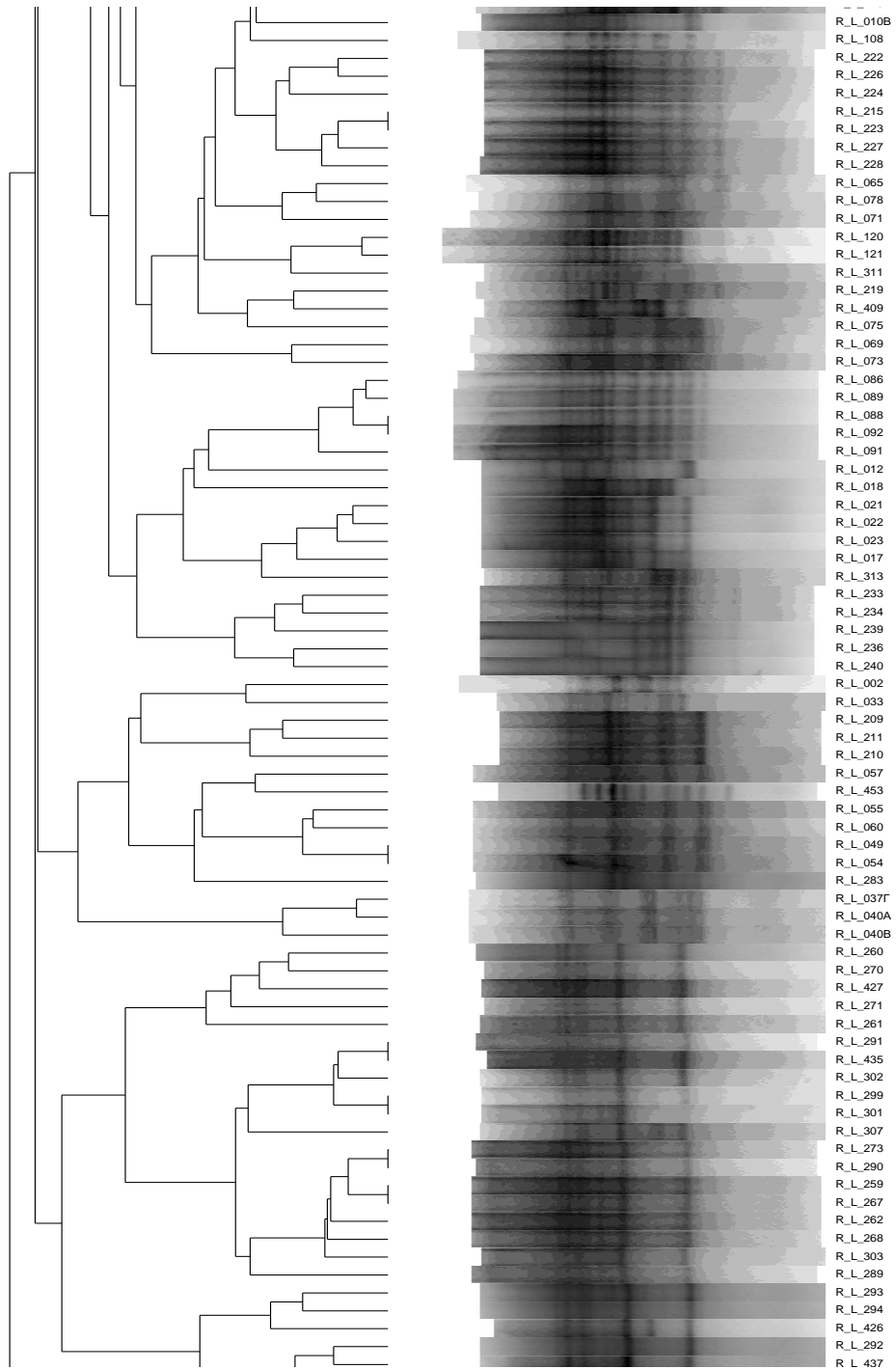
Εικόνα 20.

Φυλογενετικό δέντρο στο οποίο απεικονίζεται η ομαδοποίηση στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων απομονωμένων από ελιές ποικιλίας Καλαμών ανάλογα με το προφίλ που προέκυψε από τη RAPD-PCR.



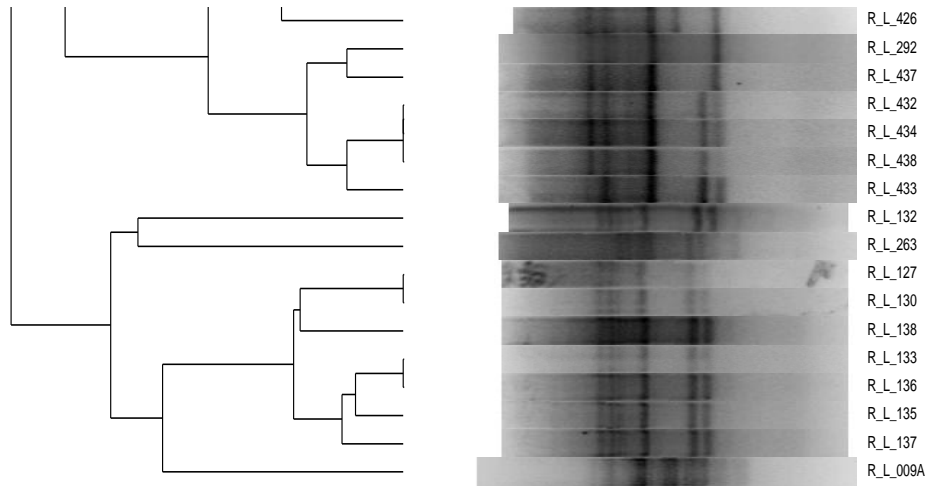
Εικόνα 21.

Φυλογενετικό δέντρο στο οποίο απεικονίζεται η ομαδοποίηση στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων απομονωμένων από ελιές ποικιλίας Καλαμών ανάλογα με το προφίλ που προέκυψε από τη RAPD-PCR.



Εικόνα 22.

Φυλογενετικό δέντρο στο οποίο απεικονίζεται η ομαδοποίηση στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων απομονωμένων από ελιές ποικιλίας Καλαμών ανάλογα με το προφίλ που προέκυψε από τη RAPD-PCR.



Εικόνα 23.

Φυλογενετικό δέντρο στο οποίο απεικονίζεται η ομαδοποίηση στελεχών ζυμών απομονωμένων από ελιές ποικιλίας Καλαμών ανάλογα με το προφίλ που προέκυψε από τη RAPD-PCR.

