



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

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Προσδιορισμός επιβίωσης εναρκτήριων καλλιεργειών οξυγαλακτικών βακτηρίων με προβιοτικό δυναμικό κατά τη ζύμωση φυσικής μαύρης ελιάς σε άλμη μειωμένης αλατοπεριεκτικότητας με χρήση μοριακών τεχνικών

Αγγελική Σ. Κόχιλα-Ράρρα

Επιβλέπων καθηγητής:

Ευστάθιος Πανάγου, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α.

**ΑΘΗΝΑ
2020**

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

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Προσδιορισμός επιβίωσης εναρκτηρίων καλλιεργειών οξυγαλακτικών βακτηρίων με προβιοτικό δυναμικό κατά τη ζύμωση φυσικής μαύρης ελιάς σε άλμη μειωμένης αλατοπεριεκτικότητας με χρήση μοριακών τεχνικών

“Determination of survival of starter cultures of lactic acid bacteria with probiotic potential during fermentation of natural black olives in reduced salt brine using molecular techniques”

Αγγελική Σ. Κόχιλα-Ράρρα

Εξεταστική Επιτροπή:

Ευστάθιος Πανάγου, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Γεώργιος Ιωάννης Νυχάς, Καθηγητής ΓΠΑ

Ευθυμία Τσακαλίδου, Καθηγήτρια ΓΠΑ

Προσδιορισμός επιβίωσης εναρκτήριων καλλιεργειών οξυγαλακτικών βακτηρίων με προβιοτικό δυναμικό κατά τη ζύμωση φυσικής μαύρης ελιάς σε άλμη μειωμένης αλατοπεριεκτικότητας με τη χρήση μοριακών τεχνικών

ΠΜΣ Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου

Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επιβίωση εναρκτήριων καλλιεργειών οξυγαλακτικών βακτηρίων (*Lactobacillus plantarum* B380 και *Lactobacillus pentosus* B363), με εν δυνάμει προβιοτικό δυναμικό, στη ζύμωση της φυσικής μαύρης ελιάς ποικιλίας «Κονσερβολιά» με τη χρήση μοριακών τεχνικών. Από τη ζύμωση που υλοποιήθηκε στο εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, πραγματοποιήθηκε μοριακή ταυτοποίηση επιλεγμένων αποικιών με την τεχνική *rep*-PCR, προκειμένου να αξιολογηθεί η επιβίωση των εναρκτήριων καλλιεργειών σε επιλεγμένα χρονικά σημεία της ζύμωσης που συμπίπτουν με την έναρξη (5 ημέρες) και το τέλος της ζύμωσης (146 ημέρες). Για την ταυτοποίηση χρησιμοποιήθηκε ο γενετικός δείκτης 16S rDNA. Επιπλέον, με τη χρήση μοριακών τεχνικών ανεξάρτητων από την καλλιέργεια, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της μικροβιακής κοινότητας που απαντάται στον καρπό της ελιάς, στο αρχικό (5 ημέρες), ενδιάμεσο (75 ημέρες) και τελικό (146 ημέρες) στάδιο της ζύμωσης. Για την ταυτοποίηση των ζυμών χρησιμοποιήθηκε ο γενετικός δείκτης ITS2 ενώ για τα βακτήρια ο *gyrB*.

Στην εξαρτώμενη από την καλλιέργεια μέθοδο, ταυτοποιήθηκαν τρία είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum* και *Leuconostoc mesenteroides*. Επιπλέον, ο ενοφθαλμισμός των καλλιεργειών εκκίνησης ήταν επιτυχής καθώς κυριάρχησαν έναντι των υπόλοιπων οξυγαλακτικών βακτηρίων κατά την ολοκλήρωση της ζύμωσης. Συγκεκριμένα η παρουσία του *L. plantarum* B380 παρατηρήθηκε στο 89% των βακτηριακών απομονώσεων ενώ το στέλεχος *L. pentosus* B363 στο 83%.

Όσον αφορά στην μεταγενετική ανάλυση, η αλατότητα της άλμης και οι καλλιέργειες εκκίνησης δεν επηρέασαν σημαντικά την μικροβιακή κοινότητα της ελιάς κατά τη ζύμωση. Αντίθετα, ο χρόνος της ζύμωσης επηρέασε σημαντικά τον

πληθυσμό των ζυμών και σε μικρότερη έκταση τον πληθυσμό των βακτηρίων. Τα κυρίαρχα είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων ήταν το *L. pentosus* και το *L. collinoides* σε όλους τους τύπους ζυμώσεων. Στη ζύμωση με καλλιέργεια εκκίνησης το βακτήριο *L. plantarum*, κυρίαρχο ήταν στις περισσότερες περιπτώσεις το είδος *L. collinoides*, το οποίο φαίνεται να παρουσιάζει καλύτερη δυναμική από το *L. plantarum* για να επικρατήσει στο περιβάλλον της ζύμωσης. Η παρατήρηση αυτή βρίσκεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την εξαρτημένη από την καλλιέργεια μοριακή τεχνική, σύμφωνα με την οποία η καλλιέργεια εκκίνησης *L. plantarum* επικράτησε στο τέλος της ζύμωσης. Από την άλλη, η δυναμική της καλλιέργειας εκκίνησης *L. pentosus* επιβεβαιώθηκε και με τις δύο τεχνικές. Όσον αφορά στις ζύμες, κατά την ολοκλήρωση της διεργασίας παρατηρήθηκε χαμηλή ποικιλότητα με κυρίαρχο είδος το *Pichia membranifaciens* τόσο στην αυθόρμητη όσο και στις ελεγχόμενες ζυμώσεις.

Επιστημονική περιοχή: Ζύμωση φυσικής μαύρης ελιάς

Λέξεις κλειδιά: οξυγαλακτικά βακτήρια, καλλιέργεια εκκίνησης, ζύμωση ελιάς, μοριακές τεχνικές, άλμη μειωμένης αλατοπεριεκτικότητας

Determination of survival of starter cultures of lactic acid bacteria with probiotic potential during fermentation of natural black olives in reduced salt brine using molecular techniques

MSc Food Science and Technology

Department of Food Science and Human Nutrition

Laboratory of Food Microbiology and Biotechnology

ABSTRACT

The present work aimed at studying the survival of starter cultures of lactic acid bacteria (*Lactobacillus plantarum* B380 and *Lactobacillus pentosus* B363) with probiotic potential during the fermentation of natural black Conservolia olives using molecular techniques. The fermentation process took place in the laboratory of Food Microbiology and Biotechnology of the Agricultural University of Athens. Molecular identification of selected colonies was performed by culture-dependent techniques, PCR amplification of repetitive bacterial DNA elements fingerprinting (rep-PCR) in order to evaluate the survival of the starter cultures at selected fermentation time points (5 days and 146 days). Representative isolates were selected to be identified at species level by amplifying the 16S rDNA gene sequence. In addition, using culture-independent molecular techniques, the microbiome in the olive fruit was determined at the initial (5 days), middle (75 days) and final (146 days) stage of fermentation. The ITS2 genetic marker was used to identify yeasts, while *gyrB* was used for bacteria.

Three species of lactic acid bacteria, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides* were identified using culture-dependent molecular techniques. In addition, inoculation of the starter cultures was successful as they dominated over the remaining lactic acid bacteria at the end of the fermentation. Specifically, the presence of *L. plantarum* B380 was observed in 89% of bacterial isolates, while the strain *L. pentosus* B363 in 83%.

Regarding the metagenetic analysis, salinity and starter cultures did not affect the total microbiome of the olive samples during fermentation. On the contrary, fermentation time significantly affected the yeast population and to a lesser extent the bacteria. The predominant species of lactic acid bacteria were *L. pentosus* and *L. collinoides* in all types of inoculated fermentations. During the fermentation with *L. plantarum* as starter culture, *L. collinoides* was predominant in most cases, which

seems to have better dynamics than *L. plantarum*, in contrast to the results of the culture-dependent molecular technique. On the other hand, the dynamics of *L. pentosus* were confirmed by both techniques. Regarding the yeasts, at the end of the process, low diversity was observed with *Pichia membranifaciens* as the dominant species, during the spontaneous as well as the controlled fermentations.

Scientific area: Fermentation of natural black olives

Keywords: lactic acid bacteria, starter culture, olive fermentation, molecular techniques, reduced salt brine

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στο πλαίσιο του Π.Μ.Σ. «ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ». Με την ολοκλήρωση της, θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα κ. Ευστάθιο Πανάγου, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, που με εμπιστεύτηκε και μου ανέθεσε το θέμα της διπλωματικής μου διατριβής, καθώς και για την καθοδήγηση και τις συμβουλές του καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Γ. Ι. Νυχά, Διευθυντή του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων και την Καθηγήτρια κ. Ε. Τσακαλίδου, Διευθύντρια του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας, για τη συμμετοχή τους στην εξεταστική επιτροπή της διατριβής μου.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά την Αικατερίνη Τζαμουράνη για την βοήθεια, τη διαρκή στήριξη και εμπιστοσύνη που μου έδειξε, καθώς και για τις συμβουλές και τον χρόνο που μου αφιέρωσε καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος όσο και μετέπειτα για τη συγγραφή της μελέτης. Ακόμη, ευχαριστώ ιδιαίτερος την υποψήφια διδάκτορα Ευανθία Μάνθου, για την βοήθεια και τις σημαντικές υποδείξεις της στο πλαίσιο της μεταγενετικής ανάλυσης, καθώς και για την συμβολή της στην ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου διατριβής.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Τρυφίνοπούλου Πασχαλίτσα, ΕΔΙΠ του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου για τις συμβουλές και την πολύτιμη βοήθειά της στο χώρο του εργαστηρίου. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Μαρία Κάζου για την σημαντική βοήθεια και τις συμβουλές της στο πλαίσιο της μοριακής ανάλυσης rep-PCR κατά την έναρξη της μεταπτυχιακής μου μελέτης. Τέλος ευχαριστώ όλα τα μέλη του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων για τις συμβουλές τους και την εξαιρετική συνεργασία μας.

Με την άδειά μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της.

Πίνακας περιεχομένων

1. Εισαγωγή.....	1
1.1 Ελιά (<i>Olea europaea</i>).....	1
1.1.2 Ανάπτυξη καρπού.....	2
1.2 Ο καρπός της ελιάς.....	2
1.3 Επιτραπέζια ελιά	3
1.3.1 Χαρακτηριστικά του καρπού των επιτραπέζιων ποικιλιών ελιάς.	4
1.3.2 Εμπορικοί Τύποι Επιτραπέζιας Ελιάς	4
1.3.2 Κονσερβολιά (Αμφίσσης)	9
1.4 Ζύμωση.....	10
1.4.1 Αυθόρμητη ζύμωση.....	11
1.4.2 Ελεγχόμενη ζύμωση	15
1.4.3 Εκκινήτρες καλλιέργειες για την οξυγαλακτική ζύμωση επιτραπέζιων ελιών	16
1.4.4 Ωφέλιμες δράσεις οξυγαλακτικών βακτηρίων	18
1.4.5 Ζύμωση επιτραπέζιων ελιών με μειωμένα επίπεδα νατρίου	21
1.4.6 Οι ζύμες και ο ρόλος τους στη ζύμωση επιτραπέζιων ελιών	22
1.5 Μέθοδοι προσδιορισμού της μικροβιακής κοινότητας κατά τη ζύμωση της επιτραπέζιας ελιάς.....	25
1.5.1 Εξαρτώμενη από την καλλιέργεια μοριακή τεχνική.....	25
1.5.2 Ανεξάρτητη από την καλλιέργεια μοριακή τεχνική	27
1.5.3 Αλληλούχηση Επόμενης Γενιάς (next generation sequencing, NGS).....	27
1.5.4 Δείκτες αλληλούχησης για βακτήρια και ζύμες	30
1.6 Σκοπός.....	31
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	33
2.1 Δείγματα.....	33
2.2 Καθαρισμός Στελεχών.....	34
2.3 Μοριακές αναλύσεις εξαρτώμενες από την καλλιέργεια (culture-dependent).....	34
2.3.1 Εξαγωγή γενετικού υλικού (DNA) από τις βακτηριακές απομονώσεις.....	35
2.3.2 Μέτρηση ποσότητας και καθαρότητας DNA στο φασματοφωτόμετρο Nanophotometer της εταιρείας Implen.....	36
2.3.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης επαναλαμβανόμενων στοιχείων (rep-PCR)	37
2.3.4 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης και ανίχνευση των προϊόντων της rep-PCR	39
2.3.5 Φωτογράφιση και έλεγχος της πηκτής αгарόζης	40
2.3.6 Ομαδοποίηση στελεχών με χρήση του προγράμματος Bionumerics	40
2.3.7 Έλεγχος ποιότητας και ταυτοποίηση των απομονώσεων.....	41

2.3.8 Καθαρισμός των προϊόντων της PCR	42
2.3.9 Αλληλούχηση	42
2.3.10 Ταυτοποίηση στελεχών	43
2.4 Μεταγενετική Ανάλυση	43
2.4.1 Συλλογή δειγμάτων και εξαγωγή DNA.....	43
2.4.2 Κατασκευή βιβλιοθηκών και Miseq αλληλούχηση.....	44
2.4.3. Ανάλυση δεδομένων.....	46
3. Αποτελέσματα-Συζήτηση.....	48
3.1 Αποτελέσματα culture-dependent μοριακής ανάλυσης.....	48
3.1.1 Ομαδοποίηση με τη μέθοδο rep-PCR.....	48
3.1.2 Ταυτοποίηση στελεχών με την αλληλούχηση του γονιδίου 16S rDNA.....	51
3.2 Συζήτηση αποτελεσμάτων culture-dependent μοριακής ανάλυσης (rep-PCR).....	53
3.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση Μεταγενετικής ανάλυσης.....	57
3.3.1 Ταυτοποίηση βακτηρίων	57
3.3.2 Ταυτοποίηση ζυμομυκήτων.....	65
4. Συμπεράσματα.....	69
Βιβλιογραφία.....	70

1. Εισαγωγή

1.1 Ελιά (*Olea europaea*)

Η καλλιεργούμενη ελιά, *Olea europaea*, ανήκει στην οικογένεια *Oleaceae*, η οποία περιλαμβάνει 25 γένη και 688 είδη που βρίσκονται σε εύκρατες και τροπικές περιοχές (The Plant List, 2013). Τα φυτά της οικογένειας αυτής είναι κυρίως δέντρα και θάμνοι, πολλά από τα οποία παράγουν αιθέρια έλαια στα λουλούδια ή στα φρούτα τους (Janick and Paull, 2008). Το ελαιόδεντρο (*Olea europaea* subsp. *europaea*) είναι ένα αναπόσπαστο τμήμα του μεσογειακού χώρου και αποτελεί ένα από τα πρώτα δένδρα που καλλιεργήθηκαν από τους προϊστορικούς πολιτισμούς πριν από περίπου 6000 χρόνια, γύρω από τη λεκάνη της Μεσογείου. Για την καταγωγή του ελαιόδεντρου έχουν εκφραστεί πολλές



Εικόνα 1.1 Ελαιόδενδρο *O. europaea* subsp. *europaea*.
<https://www.cabi.org/isc/datasheet/37336>

διαφορετικές απόψεις, με την πλειοψηφία της επιστημονικής κοινότητας να θεωρεί ότι η ελιά προέρχεται από την Ανατολική Μεσόγειο και συγκεκριμένα από την Μικρά Ασία (Συρία και Παλαιστίνη). Η ελιά από τον τόπο καταγωγής της μεταφέρθηκε στη συνέχεια στην Κρήτη και από εκεί στην υπόλοιπη Ελλάδα, από όπου και επεκτάθηκε η καλλιέργεια της σε όλες τις χώρες της Μεσογείου από τους Ρωμαίους και τους Άραβες. Τον 18^ο-19^ο αιώνα εισήχθη στη Νότια και Βόρεια Αμερική, την Αυστραλία και τη Νότια Αφρική. Η καλλιέργεια της ελιάς στη χώρα μας είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη καθώς η Ελλάδα κατέχει τη τρίτη θέση στη συνολική παγκόσμια παραγωγή με δύο εκατομμύρια τόνους, πίσω από την Ισπανία και την Ιταλία (FAOSTAT, 2011).

1.1.2 Ανάπτυξη καρπού

Ο ετήσιος αναπτυξιακός κύκλος της ελιάς συνδέεται στενά με τις κλιματολογικές συνθήκες της περιοχής καλλιέργειας, η οποία είναι συνήθως ένα κλίμα μεσογειακού τύπου. Όσον αφορά την ανάπτυξη του ελαιόκαρπου, η οποία εξαρτάται και αυτή από το εκάστοτε κλίμα, αρχίζει το Σεπτέμβριο και τελειώνει τον Νοέμβριο. Οι ελιές συλλέγονται αργά το φθινόπωρο ή το χειμώνα, καθώς η περιεκτικότητα σε λάδι και τα χαρακτηριστικά του καρπού αλλάζουν με την ωρίμαση. Η περιβαλλοντική μεταβλητότητα μπορεί να είναι πιο σημαντική από τη γενετική για πολλά χαρακτηριστικά, συμπεριλαμβανομένης της περιεκτικότητας σε λάδι και της ποιότητας των καρπών (Bongi and Palliotti, 1994).

1.2 Ο καρπός της ελιάς

Το ελαιόδενδρο (*Olea europaea* L.) παράγει καρπούς ελιάς, οι οποίοι σπανίως χρησιμοποιούνται στη φυσική τους μορφή λόγω της υψηλής πικράδας των φρούτων και απαιτείται συγκεκριμένη επεξεργασία για την αποφυγή της. Επίσης, εκτός από τις ελιές που προορίζονται για κατανάλωση, το μεγαλύτερο μέρος της συγκομιδής χρησιμοποιείται από τη βιομηχανία για την παραγωγή ελαιολάδου (Gouvinhas et al., 1986). Οι ελιές είναι φρούτα σχετικά μικρού μεγέθους, μήκους περίπου 1,0 έως 4,0 cm και διαμέτρου 0,6 cm έως 2,0 cm, παρουσιάζοντας ελλειπτικό σχήμα. Το βάρος μιας ελιάς κυμαίνεται από 3 έως 20 γραμμάρια.



Εικόνα 1.2 Κλαδί ελιάς (*Olea europaea* subsp. *europaea*) με ώριμα φρούτα.
<https://www.cabi.org/isc/datasheet/37336>

Ο καρπός της ελιάς είναι μία δρύπη (όπως το κεράσι και το ροδάκινο) και αποτελείται από δύο βασικά μέρη: το περικάρπιο και τον ενδοκάρπιο. Το περικάρπιο αντιπροσωπεύει το 66-85% του βάρους του καρπού και αποτελείται από το επικάρπιο (επιδερμίδα) και το μεσοκάρπιο (σάρκα). Το ενδοκάρπιο (πυρήνας) περιέχει τους σπόρους, και αποτελεί λιγότερο από το 3% του συνολικού βάρους του ελαιόκαρπου.

Το περικάρπιο περιέχει 96-98% της συνολικής ποσότητας ελαίου, ενώ το υπόλοιπο 2-4% βρίσκεται στο ενδοκάρπιο (Kiritsakis, 1998).

1.3 Επιτραπέζια ελιά

Σύμφωνα με τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών η επιτραπέζια ελιά ανήκει στην κατηγορία των τροφίμων φυτικής προέλευσης, που διατηρούνται με αλάτι, ξύδι, ή λάδι. Οι χρησιμοποιούμενοι για την παρασκευή των ελιών καρποί πρέπει να είναι άρτιοι και να μην παρουσιάζουν καμία αλλοίωση. Για την εκκίκραση των πράσινων ελιών, επιτρέπεται η χρησιμοποίηση αραιών διαλυμάτων καυστικού νατρίου με την προϋπόθεση ότι αυτό θα απομακρυνθεί πλήρως με καλή έκπλυση, ενώ στις μαύρες ελιές δεν επιτρέπεται η χρήση αλκαλικών διαλυμάτων.

Ως επιτραπέζια ελιά ορίζεται το προϊόν το οποίο λαμβάνεται από υγιείς ώριμους καρπούς της καλλιεργούμενης ελιάς (*Olea europaea L.*), οι οποίοι έχουν επιλεγεί για την παραγωγή ελιών, των οποίων ο όγκος, το σχήμα, η αναλογία σάρκας-πυρήνα, η γεύση και η ευκολία αποκόλλησης από τον πυρήνα τους καθιστούν κατάλληλους για ειδική επεξεργασία. Όταν υποστούν την κατάλληλη επεξεργασία ώστε να αφαιρεθεί η πικρή γεύση δίνουν ένα προϊόν εδώδιμο και καλά συντηρούμενο ώστε να είναι εμπορεύσιμο. Συντηρείται με φυσική ζύμωση και/ή με θερμική διεργασία και/ή άλλα μέσα έτσι ώστε να αποτραπεί η αλλοίωση και να διασφαλισθεί η σταθερότητα του προϊόντος σε κατάλληλες συνθήκες αποθήκευσης με ή δίχως την προσθήκη συντηρητικών. Στην επεξεργασία αυτή μπορεί να προστεθούν διάφορα προϊόντα ή αρωματικές ύλες (αρτύματα) καλής ποιότητας (IOOC, 2004). Οι επιτραπέζιες ελιές είναι ένα από τα σημαντικότερα και δημοφιλέστερα παραδοσιακά ζυμωμένα φρούτα στον δυτικό κόσμο και ιδιαίτερα στις νότιες ευρωπαϊκές χώρες. Αυτό το προϊόν, μαζί με το ελαιόλαδο, αντιπροσωπεύει ένα από τα σημαντικότερα γεύματα στη μεσογειακή διατροφή. Η παγκόσμια παραγωγή επιτραπέζιων ελιών εκτιμάται σε 3.094.000 τόνους (σεζόν 2019-2020), ενώ στην Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ) η παραγωγή αγγίζει τους 2.011.000 τόνους στην (IOOC, 2020). Η Ισπανία κατέχει ηγετική θέση στην παραγωγή επιτραπέζιων ελιών με 500.000 τόνους, ακολουθούμενη από την Ελλάδα με 207.000 τόνους και την Ιταλία με 74.100 τόνους. Η κατανάλωση επιτραπέζιων ελιών αυξάνεται συνεχώς σε ολόκληρο τον κόσμο καθώς και την Ε.Ε. με τις χώρες παραγωγής να είναι και οι σημαντικότεροι καταναλωτές. Σύμφωνα με τη σημασία τους στις διεθνείς αγορές, η Καλαμάτα και η Κονσερβολιά είναι οι σημαντικότερες ποικιλίες επιτραπέζιων ελιών

μαζί με τις Manzanilla, Sevillana και Hojiblanca και σε μικρότερο βαθμό οι Bella di Cerignola και Ascolana Tenera (Bleve et al., 2015). Η Κονσερβολιά αντιπροσωπεύει την πιο σημαντική οικονομικά ποικιλία στην Ελλάδα, που αντιστοιχεί σε τουλάχιστον 80-85% της ελληνικής επιτραπέζιας παραγωγής ελιάς για εγχώρια και ξένη αγορά, ενώ η Καλαμάτα είναι η δεύτερη πιο σημαντική ποικιλία (Garrido-Fernandez et al., 1997). Ο καρπός της ελιάς δεν μπορεί να καταναλωθεί απευθείας από το δέντρο λόγω των ιδιόμορφων χαρακτηριστικών του (παρουσία της πικρής ένωσης ελευρωπαΐνης), για το λόγο αυτό, αναπτύχθηκαν διάφορες μέθοδοι για να γίνουν εύγευστες οι ελιές, όπως η διαδικασία της αλατοποίησης, της ζύμωσης και της οξίνισης (Benítez-Cabello et al., 2019). Στόχος των διάφορων επεξεργασιών που υφίσταται ο ελαιόκαρπος, πέραν της εκκίκρασης του ώστε να είναι εύγευστος προς κατανάλωση, είναι φυσικά η διασφάλιση της συντήρησης του προϊόντος που επιτυγχάνεται μέσω της δράσης των οξυγαλακτικών βακτηρίων, τα οποία μειώνουν αισθητά το pH.

1.3.1 Χαρακτηριστικά του καρπού των επιτραπέζιων ποικιλιών ελιάς.

Μέχρι τώρα δεν υπάρχουν επίσημα κριτήρια για την διάκριση μεταξύ των ελαιοποιήσιμων και των επιτραπέζιων ποικιλιών ελιάς, έχουν όμως καθιερωθεί ορισμένα κριτήρια για τα επιθυμητά χαρακτηριστικά του καρπού των ποικιλιών βρώσιμης ελιάς. Επιγραμματικά ορισμένα από αυτά είναι: μεγάλο μέγεθος του καρπού (αδρόκαρπες ποικιλίες, βάρος σάρκας/ βάρος πυρήνα), μικρή περιεκτικότητα της σάρκας σε έλαιο (<20%), αυξημένη περιεκτικότητα της σάρκας σε ζυμώσιμα συστατικά, εύκολος αποχωρισμός του πυρήνα από τη σάρκα και λεπτή ή μετρίου πάχους επιδερμίδα, που πρέπει να είναι ανθεκτική στις αντιξοότητες, στις οποίες θα εκτεθεί ο καρπός στον ελαιώνα (πρώιμος παγετός) ή κατά την επεξεργασία (παραμονή σε πυκνό αλκαλικό διάλυμα ή υψηλή συγκέντρωση NaCl) (Balatsouras, 1995).

1.3.2 Εμπορικοί Τύποι Επιτραπέζιας Ελιάς

Οι επιτραπέζιες ελιές αποτελούν αντικείμενο διεθνούς εμπορίου και κατατάσσονται σε εμπορικούς τύπους, σύμφωνα με τον Κανονισμό Ποιότητας του Διεθνούς Συμβουλίου Ελαιολάδου (IOOC, 2014), οι οποίοι προσδιορίζονται από δυο κυρίως χαρακτηριστικά: α) τον τύπο του νωπού προϊόντος (πρώτη ύλη) ο οποίος καθορίζεται από το βαθμό ωριμότητας του καρπού που οδηγείται στην επεξεργασία, βασικό ρόλο εδώ διαδραματίζει το χρώμα του καρπού της ελιάς και β) τη μέθοδο επεξεργασίας του καρπού και ιδιαίτερα τη μέθοδο εκκίκρασης του προϊόντος. Ο

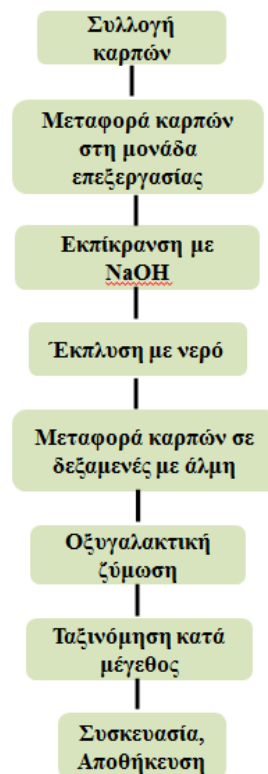
όρος ‘επεξεργασμένη’ (treated) συμπεριλαμβάνεται στην εμπορική ονομασία όταν οι ελιές εμβαπτίζονται σε διάλυμα καυστικού νατρίου για εκπίκραση.

Οι σημαντικότεροι τύποι επεξεργασμένων ελιών στο διεθνές εμπόριο είναι:

i. Πράσινες ελιές σε άλμη, γνωστές ως Ισπανικού τύπου (confites)

Οι ελιές αυτές τοποθετούνται σε διάλυμα καυστικού νατρίου περιεκτικότητας 1,2-2,7% (w/v), μέσα στο οποίο παραμένουν έως ότου να διαποτιστεί ένα μέρος της σάρκας του ελαιοκάρπου. Μετά την επεξεργασία του ελαιοκάρπου με αλκαλικό διάλυμα ακολουθεί έκπλυση με άφθονο νερό (Garrido-Fernández et al., 1995). Στη συνέχεια οι ελαιοκάρποι τοποθετούνται σε άλμη όπου πραγματοποιείται πλήρης ή μερική γαλακτική ζύμωση του καρπού. Οι ελιές που έχουν υποστεί πλήρη ζύμωση είναι γνωστές ως ελιές τύπου Σεβίλλης ή Ισπανικού τύπου. Οι μερικώς ζυμωμένες ελιές πρέπει να διατηρηθούν με την προσθήκη οργανικών οξέων, με αποστείρωση, παστερίωση, προσθήκη συντηρητικών ή ψύξη. Το αραιό διάλυμα καυστικού νατρίου (1,3-3,5%) εφαρμόζεται σε θερμοκρασία 12-21 °C για περίπου 5-12 ώρες. Η συγκέντρωση NaOH και ο χρόνος ποικίλλουν ανάλογα με την ωριμότητα του καρπού, τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος και την εκάστοτε μεταποιητική μονάδα. Η επεξεργασία ολοκληρώνεται όταν το μέτωπο του αλκάλειου διεισδύσει μέχρι περίπου τα δύο τρίτα έως τα τρία τέταρτα του πάχους του μεσοκαρπίου. Στη συνέχεια οι ελιές τοποθετούνται σε άλμη συγκέντρωσης περίπου 10-13% NaCl. Για να αποφευχθεί η συρρίκνωση του καρπού, αρχικά χρησιμοποιούνται χαμηλότερες συγκεντρώσεις NaCl με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας καθημερινά, στο επιθυμητό επίπεδο. Ωστόσο, οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις αλάτος αυξάνουν τον κίνδυνο αλλοίωσης λόγω της ανάπτυξης κλωστριδίων. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης προστίθεται άλας για να διατηρηθεί η συγκέντρωση του NaCl σε συγκέντρωση 5-6%. Αυτό το επίπεδο αυξάνεται στο 7% ή υψηλότερα στο τέλος της ζύμωσης για να αποφευχθεί η αλλοίωση λόγω της ανάπτυξης ανεπιθύμητων μικροοργανισμών. Το βέλτιστο εύρος θερμοκρασίας για τη διεργασία της ζύμωσης είναι 24-27 °C. Κατά την ολοκλήρωση το pH διαμορφώνεται σε 3,8-4,4 και η ογκομετρούμενη οξύτητα σε 0,8-1,2% εκφρασμένη σε γαλακτικό οξύ (Ferguson et al., 1994). Η ζύμωση μπορεί να ολοκληρωθεί σε 3-4 εβδομάδες ή μπορεί να διαρκέσει περισσότερο, ανάλογα με τη θερμοκρασία,

τη συγκέντρωση αλατιού και τα αρχικά επίπεδα οξυγαλακτικών βακτηρίων. Οι ελιές συσκευάζονται σε γυάλινους περιέκτες που περιέχουν νέα άλμη 7% και σφραγίζονται. Οι πράσινες ελιές που έχουν υποστεί ζύμωση μπορούν να χαραχθούν και να γεμιστούν με λωρίδες πιπεριάς που έχουν ήδη εμποτιστεί σε άλμη ή με άλλα υλικά πλήρωσης. Οι γεμιστές ελιές μπορούν να διατηρηθούν για αρκετές εβδομάδες σε 8% άλμη NaCl πριν από τη συσκευασία. Η παστερίωση χρησιμοποιείται όταν η ζύμωση είναι μερική ή όταν είναι επιθυμητό από τον μεταποιητή. Ορισμένοι επεξεργαστές παστεριώνουν σε θερμοκρασία 60 °C ή χρησιμοποιούν ζεστή άλμη σε θερμοκρασία 80-82 °C. Αυτή η πρακτική αποτρέπει τη δημιουργία ιζήματος στον πυθμένα του περιέκτη από βακτηριακή αύξηση (Harris et al., 1998).



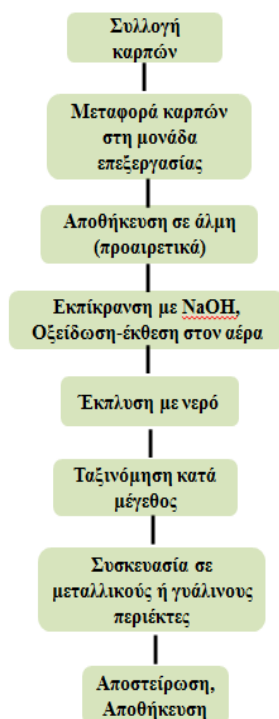
Σχήμα 1.1 Διάγραμμα επεξεργασίας επιτραπέζιας ελιάς Ισπανικού τύπου (Harris et al., 1998)

ii. Τεχνητώς μαύρες ελιές σε άλμη, τύπου Καλιφόρνιας

Η μέθοδος αυτή για την παραγωγή μαύρων ώριμων ελιών αναπτύχθηκε στην Καλιφόρνια περίπου το 1900 (Ferguson et al., 1994). Οι περισσότερες ελιές της Καλιφόρνιας (99%) υποβάλλονται σε επεξεργασία με αυτόν τον τρόπο,

δηλαδή δεν υφίστανται ζύμωση, με εξαίρεση τις ελιές που αποθηκεύονται σε άλμη πριν από τη μεταποίηση. Οι νωπές ελιές αποθηκεύονται συνήθως σε ελεγχόμενη ατμόσφαιρα (2% O₂) σε θερμοκρασία 5 °C ή 7 °C και μπορούν να διατηρηθούν έως 12 και 9 εβδομάδες, αντίστοιχα. Για την εκπίκρυνση των νωπών ή αποθηκευμένων καρπών, οι ελιές εμβαπτίζονται σε διάλυμα καυστικού νατρίου (0,5-2%) από τρεις έως πέντε φορές. Κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας διοχετεύεται ρεύμα αέρα στη δεξαμενή με αποτέλεσμα την οξείδωση των φαινολικών ενώσεων στον καρπό και τη δημιουργία ομοιόμορφου μαύρου χρωματισμού. Η σταθεροποίηση του μαύρου χρώματος στο τελικό προϊόν γίνεται με προσθήκη διαλυμάτων με άλατα σιδήρου (π.χ. γλυκονικός σίδηρος). Το τελικό προϊόν δεν είναι ζυμωμένο, για το λόγο αυτό αποστειρώνεται, κατά τη συσκευασία του σε μεταλλικούς ή γυάλινους περιέκτες (Harris et al., 1998).

Τα κύρια χαρακτηριστικά της «τεχνητώς μαύρης ελιάς» είναι η συμπαγής υφή της σάρκας, το ομοιόμορφο μαύρο χρώμα, η πλήρης εκπίκρυνση της σάρκας και η παντελής έλλειψη γευστικών και αρωματικών χαρακτηριστικών (Didier et al., 2014).

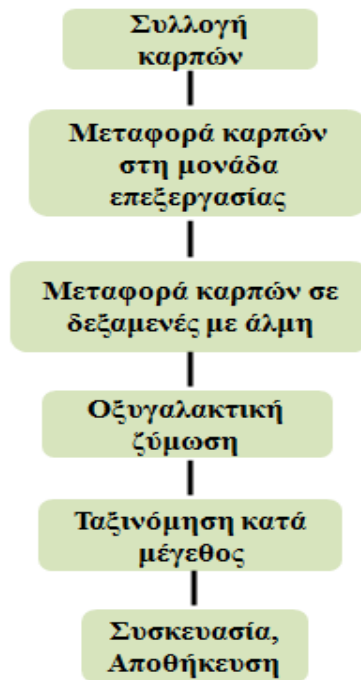


Σχήμα 1.2 Διάγραμμα επεξεργασίας επιτραπέζιας ελιάς τύπου Καλιφόρνιας (Harris et al., 1998)

iii. Φυσιικές μαύρες ελιές σε άλμη, Ελληνικού τύπου

Σύμφωνα με το ΙΟΟC οι ακατέργαστες μαύρες ελιές τοποθετούνται απευθείας σε δοχεία με άλμη (συνήθως περιεκτικότητας σε αλάτι 6-8%) ώστε να πραγματοποιηθεί σταδιακά η απομάκρυνση της πικρής γεύσης και η ζύμωση. Διατηρούν πιο έκδηλη τη γεύση του ελαιοκάρπου από τις πράσινες ελιές σε άλμη, έχουν πιο φρουτώδες άρωμα και διατηρούν μια ελαφρώς πιο πικρή γεύση. Οι ελιές αυτές δεν συλλέγονται από το δένδρο αν δεν εισέλθουν στο στάδιο της πλήρους ωρίμασης. Μετά τη συγκομιδή, οι μαύρες ελιές μεταφέρονται στη μονάδα επεξεργασίας, ταξινομούνται για να διαχωριστούν οι αλλοιωμένοι καρποί και στη συνέχεια πλένονται ώστε να απομακρυνθούν χώμα και διάφορα υπολείμματα από την επιφάνεια των καρπών. Οι ελιές τοποθετούνται σε δεξαμενές και καλύπτονται με άλμη 6-10% NaCl. Η ζύμωση πραγματοποιείται με μικτή χλωρίδα που αποτελείται από αρνητικούς κατά Gram μικροοργανισμούς, ζύμες και *Lactobacillus* spp. Η τελική ολική οξύτητα της άλμης είναι συνήθως μικρότερη από 0,5% με pH 4,3-4,5 (Garrido-Fernández et al., 1995). Ωστόσο, υπό ορισμένες συνθήκες, οι φυσιικές ώριμες μαύρες ελιές υφίστανται πλήρη ζύμωση, αναπτύσσοντας συνολική οξύτητα μέχρι 0,8-1,0%. Εάν κατά τη ζύμωση δεν τηρούνται αναερόβιες συνθήκες, ένα στρώμα από μύκητες, ζύμες και βακτηριακές μορφές αναπτύσσεται πάνω στην επιφάνεια της άλμης, προκαλώντας την κατανάλωση των σακχάρων και των οξέων και την αύξηση του pH. Η αλλοίωση μπορεί να οφείλεται στην ανάπτυξη κλωστριδίων, προπιονικών βακτηρίων και ενδεχομένως μικροοργανισμών που μειώνουν τα θειικά άλατα (αρνητικά κατά Gram κυρίως αναερόβια βακτήρια, *Desulfovibrio aestuarii*) (Levin and Vaughn, 1966, Harris et al., 1998).

Το τελικό προϊόν συντηρείται συνήθως σε άλμη και πιο σπάνια σε συσκευασίες με τροποποιημένη ατμόσφαιρα ή υπό κενό χωρίς άλμη (Garrido-Fernández et al., 1997). Στη χώρα μας είναι ο επικρατέστερος εμπορικά τύπος με το 75% του συνόλου των επιτραπέζιων ελιών να παρασκευάζονται με αυτό τον τρόπο.



Σχήμα 1.3 Διάγραμμα επεξεργασίας επιτραπέζιας ελιάς Ελληνικού τύπου (Harris et al., 1998)

1.3.2 Κονσερβολιά (Αμφίσσης)

Η Κονσερβολιά αποτελεί τη πιο διαδομένη ποικιλία επιτραπέζιας ελιάς στη χώρα μας και αντιπροσωπεύει το 80 με 85% της συνολικής παραγωγής επιτραπέζιας ελιάς στην Ελλάδα. Θεωρείται η καλύτερη ποικιλία για την παρασκευή βρώσιμων ελιών διαφόρων τύπων (μαύρων και πράσινων). Η Κονσερβολιά είναι γνωστή με διάφορα ονόματα όπως Αग्रινίου, Αμφίσσης, Άρτας, Βόλου, Βολιώτικη, Βοϊδολιά, Κορομηλάτη, Μηλολιά, Ξηροχωρίου, Πατρινή, Πηλίου, Στρογγυλολιά και Χονδρολιά. Είναι ένα δένδρο με υψηλή παραγωγή, το οποίο σε γόνιμα, αρδευόμενα εδάφη με καλή αποστράγγιση μπορεί να ξεπεράσει τα 100 κιλά ελαιόκαρπο/δένδρο. Το ύψος του φτάνει τα έξι με δέκα μέτρα και η διάμετρος της κόμης του είναι από πέντε έως οχτώ μέτρα. Ο καρπός της Κονσερβολιάς έχει σχήμα σφαιρικό ή ωοειδές και βάρος πέντε με οχτώ γραμμάρια. Η σχέση σάρκας προς πυρήνα του καρπού είναι 10:1, η επιδερμίδα είναι λεπτή και ελαστική και αλλάζει σταδιακά χρώμα από ζωνηρό πράσινο σε ρόδινο, ερυθροϊώδες και στην πλήρη ωρίμαση ιώδες και μαύρο. Ωριμάζει

από τα μέσα Νοεμβρίου έως τον Φεβρουάριο. Όταν το δένδρο καλλιεργείται υπό ξηρικές συνθήκες η σάρκα είναι πιο σκληρή, ενώ στα γόνιμα και υγρά εδάφη είναι μαλακότερη. Η περιεκτικότητα του καρπού σε λάδι είναι περίπου 16% με μία μικρή διακύμανση ανάλογα με την περιοχή και τις συνθήκες που επικρατούν. Η Κονσερβολιά είναι ιδιαίτερα ανθεκτική στις χαμηλές θερμοκρασίες και ευδοκιμεί μέχρι τα εξακόσια μέτρα υψόμετρο. Βέλτιστη, όμως ποιότητα καρπού (άρωμα, χρώμα, γεύση)



Εικόνα 1.3 Ελαιόκαρπος ποικιλίας Κονσερβολιά

επιτυγχάνεται όταν τα δένδρα καλλιεργούνται σε ημιορεινές περιοχές. Το δένδρο είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο στο βερτισίλιο και πολλές φορές οι ζημιές είναι τόσο εκτεταμένες που ακόμα και ένα δένδρο σε πλήρη παραγωγή ξεραίνεται.

1.4 Ζύμωση

Η ζύμωση των τροφίμων και των ποτών είναι ένας από τους παλαιότερους τρόπους επεξεργασίας τροφίμων. Η συντήρηση των φρούτων και των λαχανικών μέσω της ζύμωσης χάνεται στην αρχαιότητα. Κάθε χώρα στον κόσμο έχει τα δικά της παραδοσιακά ζυμωμένα προϊόντα. Σήμερα μια μεγάλη ποικιλία τροφίμων και αλκοολούχων ποτών παράγονται είτε με φυσική ζύμωση, μέσω αυτοχθόνων μικροβιακών κοινοτήτων ή με τη χρήση καλλιεργειών εκκίνησης. Οι εκτιμήσεις δείχνουν ότι περίπου το 20% των συνολικών τροφίμων που καταναλώνονται παγκοσμίως είναι ζυμωμένα προϊόντα (Varzakas et al., 2017). Σε όλο τον κόσμο τα περισσότερα λαχανικά ζυμώνονται ακόμη σε μικρή κλίμακα είτε στο σπίτι είτε από μονάδες επεξεργασίας. Εξαιρέσεις αποτελούν το λάχανο, το αγγούρι και η ελιά. Τα τρόφιμα αυτά έχουν σημαντική εμπορική σημασία ενώ ταυτόχρονα υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για μια μεγάλη ποικιλία άλλων ζυμωμένων φρούτων και λαχανικών και ζυμωμένων χυμών, ιδίως στην ευρωπαϊκή αγορά (Buchenhtiskes et al., 1990).

Η μικροχλωρίδα των φρέσκων λαχανικών κυριαρχείται συνήθως από Gram αρνητικά αερόβια βακτήρια και ζύμες, ενώ τα οξυγαλακτικά βακτήρια αποτελούν ένα μικρό μέρος του αρχικού πληθυσμού (Mundt, 1970). Ωστόσο η πλειοψηφία των ζυμωμένων λαχανικών θα υποστούν μια αυθόρμητη οξυγαλακτική ζύμωση όταν οι συνθήκες είναι αναερόβιες και τα επίπεδα υγρασίας, η συγκέντρωση άλατος και η θερμοκρασία ρυθμιστούν κατάλληλα έτσι ώστε τα οξυγαλακτικά βακτήρια να έχουν ένα ανταγωνιστικό πλεονέκτημα. Η ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων εξαρτάται από ενδογενείς (θρεπτικά υποστρώματα, συγκέντρωση άλατος, pH) και εξωγενείς παράγοντες (θερμοκρασία, διαθεσιμότητα οξυγόνου). Όσο μεταβάλλονται οι συνθήκες αυτές, κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, τόσο μεταβάλλονται και οι κυρίαρχοι μικροβιακοί πληθυσμοί. Τα αρνητικά κατά Gram βακτηρία καταστέλλονται νωρίς στη ζύμωση με την προσθήκη άλατος και στη συνέχεια με την ταχεία παραγωγή οργανικού οξέος (Harris et al., 1998).

1.4.1 Αυθόρμητη ζύμωση

Η οξυγαλακτική ζύμωση ακολουθεί έναν από τους παρακάτω τύπους:

1. Αυθόρμητη ζύμωση
2. Ελεγχόμενη ζύμωση

Η ζύμωση είναι μια διαδικασία που βασίζεται στη βιολογική δραστηριότητα των μικροοργανισμών με σκοπό την παραγωγή μιας σειράς μεταβολιτών (Ross et al., 2002). Σε πολλές περιπτώσεις η ζύμωση στις επιτραπέζιες ελιές πραγματοποιείται αυθόρμητα χωρίς την προσθήκη κάποιας αρχικής καλλιέργειας. Όπως και στα υπόλοιπα ζυμωμένα προϊόντα η αυθόρμητη ζύμωση που λαμβάνει χώρα στις διαφορετικές διεργασίες επιτραπέζιων ελιών είναι συνήθως το αποτέλεσμα των ανταγωνιστικών δραστηριοτήτων της αυτόχθονης μικροχλωρίδας του προϊόντος μαζί με μια ποικιλία μικροοργανισμών που προέρχονται από τα δοχεία ζύμωσης, τους αγωγούς, τις αντλίες και άλλες συσκευές που έρχονται σε επαφή με τις ελιές και την άλμη (Panagou et al., 2003). Συνεπώς, η ζύμωση των επιτραπέζιων ελιών αποτελεί ένα σύνθετο μικροβιακό οικοσύστημα μέσα στο οποίο οξυγαλακτικά βακτήρια και ζύμες ανταγωνίζονται και συνεργάζονται μέχρι το τέλος της διεργασίας (Argüero-López et al., 2008). Τα οξυγαλακτικά βακτήρια που συμμετέχουν στη ζύμωση των καρπών ελιάς είναι παρόμοια με αυτά που υπάρχουν και σε άλλα ζυμωμένα φρούτα και λαχανικά (Harris et al., 1998). Η συγκέντρωση των οξυγαλακτικών βακτηρίων

στην αυθόρμητη ζύμωση αυξάνεται από 1% αρχικά, στην φρέσκια άλμη, σε 80% του συνολικού πληθυσμού λίγες μέρες αργότερα (Randazzo et al., 2010).

Η αυθόρμητη ζύμωση οδηγεί σε μεταβολές των γευστικών χαρακτηριστικών των προϊόντων, οι οποίες διαφέρουν ανάλογα με την ποιότητα της πρώτης ύλης, τη θερμοκρασία και τις συνθήκες συγκομιδής (Wouters et al., 2013). Τα νωπά φρούτα και λαχανικά συνήθως παρουσιάζουν υψηλά μικροβιακά φορτία (περίπου 10^5 έως 10^7 μικροοργανισμοί/g) μετά τη συγκομιδή, με τους περισσότερους μικροοργανισμούς να είναι Gram αρνητικά βακτήρια, Gram θετικοί βάκιλοι, ζύμες και μύκητες (Montet et al., 2006). Τα οξυγαλακτικά βακτήρια αντιπροσωπεύουν λιγότερο από το 0,1% του αυτόχθονου μικροβιακού πληθυσμού των καρπών ελιάς, καθώς τα βακτήρια αυτά απαιτούν συστατικά υψηλής θρεπτικής αξίας όπως αμινοξέα, λιπαρά οξέα, βιταμίνες και ορισμένα μέταλλα για την ανάπτυξη και το μεταβολισμό τους. Ως εκ τούτου, το περιβάλλον των φρούτων και λαχανικών δεν είναι κατάλληλο για την ανάπτυξή τους, παρ'όλα αυτά μπορεί να εμπλουτιστεί με χλωριούχο νάτριο (NaCl) ή με την προσθήκη ορισμένων πρωτεϊνικών συστατικών προκειμένου να δημιουργηθούν οι κατάλληλες συνθήκες για την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων (Rao et al., 2004).

Στη ζύμωση της επιτραπέζιας ελιάς, η άλμη παρέχει το κατάλληλο περιβάλλον για την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων, με τη γλυκόζη, τη φρουκτόζη και τη μαννιτόλη ως κύριες πηγές ζυμώσιμων υδατανθράκων.

1.4.1.1 Η διαδοχή των μικροοργανισμών στην αυθόρμητη οξυγαλακτική ζύμωση της ελιάς χαρακτηρίζεται από τρεις διακριτές φάσεις.

Το πρώτο στάδιο της ζύμωσης χαρακτηρίζεται από μία μεγάλη ποικιλία μικροοργανισμών. Αυτοί οι οργανισμοί είναι παρόντες στον ελαιόκαρπο καθώς και στα δοχεία ζύμωσης. Η πλειοψηφία τους είναι Gram αρνητικά βακτήρια (*Pseudomonas* spp., *Flavobacterium* spp., *Aeromonas* spp.) καθώς και μερικοί μύκητες, η ανάπτυξη των οποίων θα περιοριστεί δραστικά λόγω των επικρατούντων συνθηκών της αναερόβιας ζύμωσης. Τα βακτήρια *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter* spp., *Klebsiella aerogenes* και *Escherichia coli* είναι επίσης παρόντα σε σχετικά υψηλά επίπεδα κατά τα αρχικά στάδια της ζύμωσης (Aponte et al., 2012). Αυτές οι ομάδες βακτηρίων δεν επιβιώνουν στο τέλος της επεξεργασίας λόγω της οξύτητας και αλατότητας στην άλμη. Τα επίπεδα συγκέντρωσης *Enterobacteriaceae* στην αρχή της

ζύμωσης, σε φρέσκια άλμη που ελήφθη από πράσινες επιτραπέζιες ελιές ελληνικού τύπου, κυμαίνονται από 2,6 έως 3,5 log CFU/mL, ενώ στο τέλος της επεξεργασίας τα επίπεδα του πληθυσμού είναι σχεδόν μηδενικά (<10 CFU/mL) (Alves et al., 2012). Τα είδη των γενών *Clostridium* και *Pseudomonas* μπορούν να βρεθούν επίσης στην αρχή της ζύμωσης, ωστόσο το *Clostridium* δεν μπορεί να επιβιώσει μέχρι το τέλος της επεξεργασίας λόγω του χαμηλού pH που διαμορφώνεται κατά τη ζύμωση. Η μέγιστη τιμή pH καθορίζεται από το IOOC στο 4.1, όταν η ελιά διατηρείται με τα δικά της φυσικοχημικά χαρακτηριστικά ή 4.3 όταν διατηρείται με παστερίωση (Montano et al., 2010). Επιπλέον, η μικροχλωρίδα που απαντάται σε αυτό το στάδιο περιλαμβάνει και έναν μικρό αριθμό θετικών κατά Gram βακτηρίων που ανήκουν στα γένη *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus* και *Bacillus* (Randazzo et al., 2010). Οι ανεπιθύμητοι μικροοργανισμοί κυριαρχούν κυρίως τις πρώτες 2 ημέρες και σταδιακά εξαφανίζονται κατά τη διάρκεια του δεύτερου σταδίου της ζύμωσης. Επειδή τα παραπάνω βακτηρία είναι σχετικά ευαίσθητα στο χαμηλό pH, ο ρυθμός αδρανοποίησης τους ακολουθεί γενικά τη μείωση του pH που οφείλεται στην αύξηση του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Ωστόσο, αν τα αλλοιωγόνα βακτήρια (*Clostridium*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Kosakonia*, *Kluyvera*, *Escherichia coli*) είναι παρόντα σε μεγάλους αριθμούς, μπορούν να υποβαθμίσουν το τελικό προϊόν, εξαιτίας της παραγωγής ανεπιθύμητων οσμών και αεροθυλακίων στην επιφάνεια των ελιών (Panagou et al., 2008). Η συγκέντρωση άλατος και το pH της άλμης είναι οι κύριοι παράγοντες που καθορίζουν την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Επί του παρόντος, οι πιο συνηθισμένες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τη διευκόλυνση της ανάπτυξης των αυτοχθόνων οξυγαλακτικών βακτηρίων περιλαμβάνουν: (1) μείωση του pH της άλμης σε τιμή 4,5 ή μικρότερη, (2) προσθήκη ζυμώσιμων συστατικών (π.χ. γλυκόζης), (3) διατήρηση της συγκέντρωσης άλατος μεταξύ 5-6% κατά τη διάρκεια της ενεργού φάσης της ζύμωσης, (4) αύξηση της συγκέντρωσης άλατος στο 7% μετά το τέλος της ζύμωσης (Randazzo et al., 2010).

Το δεύτερο και σημαντικότερο στάδιο της ζύμωσης χαρακτηρίζεται από αύξηση του πληθυσμού των γενών *Leuconostoc* και *Pediococcus*. Η συγκέντρωση των μυκήτων και των Gram αρνητικών βακτηρίων μειώνεται σημαντικά. Ο χρόνος μεταξύ της πρώτης και της δεύτερης φάσης της ζύμωσης θα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν βραχύτερος (2-3 ημέρες) ώστε να ενισχυθεί η ταχεία κυριαρχία των οξυγαλακτικών βακτηρίων έναντι της αλλοιωγόνου αυτόχθονης μικροβιακής χλωρίδας (Panagou and

Katsaboxakis, 2006). Θεωρητικά αυτή η φάση της ζύμωσης ξεκινάει όταν το pH φθάσει την τιμή 6.0 και συνεχίζει μέχρι την τιμή 4.5, όπου τα Gram αρνητικά βακτήρια δεν έχουν επιβιώσει. Σε αυτό το στάδιο, που μπορεί να διαρκέσει 10-15 ημέρες, παρατηρείται ταχεία αύξηση των γαλακτοβακίλλων και ζυμών ενώ υπεύθυνοι μικροοργανισμοί για τη ζύμωση είναι κυρίως οι *Lactobacillus plantarum* και σε μικρότερο βαθμό το βακτήριο *L. delbrueckii* (Heperkan, 2013). Ο μέγιστος πληθυσμός γαλακτοβακίλλων συνήθως επιτυγχάνεται την έβδομη ή δέκατη ημέρα μετά την τοποθέτηση των καρπών στην άλμη. Ο πληθυσμός στη συνέχεια παραμένει σταθερός ή μειώνεται αργά για τις επόμενες ημέρες ζύμωσης. Με τις σύγχρονες τεχνολογίες ζύμωσης μειώνονται οι αρχικοί μη γαλακτικοί πληθυσμοί και οι *Pediococcus*, *Leuconostoc* και *Lactococcus* spp. μπορούν να απομονωθούν από το πρώτο μισό του δεύτερου σταδίου της ζύμωσης. Οι μικροοργανισμοί αυτοί διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις περιπτώσεις που η συγκέντρωση NaCl είναι μειωμένη (Harris et al., 1998).

Το τρίτο και μεγαλύτερο σε διάρκεια στάδιο της ζύμωσης αρχίζει όταν το pH φθάσει στο 4,5 και διαρκεί μέχρι να εξαντληθούν τα ζυμώσιμα συστατικά. Ο κυρίαρχος βακτηριακός πληθυσμός είναι το *L. plantarum*, ενώ σε χαμηλότερη αφθονία παρατηρείται το *L. delbrueckii*. Η διάρκεια αυτής της φάσης ποικίλλει ανάλογα με τις αρχικές συγκεντρώσεις σακχάρων και αλάτων, τη θερμοκρασία και την κυριαρχία των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης, οι γαλακτοβακίλλοι πολλαπλασιάζονται και εξαπλώνονται. Αυτά είναι και τα βακτήρια, που είναι επί το πλείστον υπεύθυνα για τη γεύση και την υφή των τελικών προϊόντων (Sanchez et al., 2000).

Σε αντίθεση με άλλα λαχανικά, οι ζύμες φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ζύμωση των ελιών. Τα μεταβολικά τους προϊόντα, αλκοόλη, ακεταλδεϋδη και ο οξικός αιθυλεστέρας συμβάλλουν αισθητά στην ιδιαίτερη γεύση του προϊόντος (Hurtado et al., 2012). Επιπλέον, κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου της ζύμωσης οι ζυμωτικές και οξειδωτικές ζύμες βρίσκονται σε υψηλά επίπεδα, όπως αναμένεται. Οι ζυμωτικές ζύμες παράγουν, μεταξύ άλλων, αιθανόλη, οξικό αιθυλεστέρα και ακεταλδεϋδη, τα οποία πιστεύεται ότι συμβάλλουν στην τελική γεύση του προϊόντος. Επιπλέον, παράγουν μια σειρά από βιταμίνες που μπορούν να ενθαρρύνουν την ανάπτυξη του *L. plantarum* (Ruiz-Barba and Jimenez-Diaz, 1995).

Ο πληθυσμός των ζυμών παρουσιάζει μεγαλύτερο εύρος και ποικιλομορφία σε σχέση με αυτόν των βακτηρίων. Οι ζύμες *Hansenula anomala*, *Candida krusei*,

Saccharomyces chevalieri, *Candida parasilopsis* και *Hansenula subpelliculosa* φαίνεται να κυριαρχούν στη πλειοψηφία των ζυμώσεων, σύμφωνα με τους Garrido-Fernández et al. (1995), ενώ σύμφωνα με τους Marquina et al. (1992) οι κυρίαρχοι πληθυσμοί αφορούν διαφορετικά είδη ζυμών όπως *Pichia* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis* και *Rhodotorula mucilaginosa*. Η συμβολή των μεμονωμένων ζυμών στη ζύμωση είναι ασαφής. Ωστόσο, πιστεύεται ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των ελιών που έχουν υποστεί ζύμωση.

Οι οξειδωτικές ζύμες μπορεί να είναι επιβλαβείς επειδή μεταβολίζουν το γαλακτικό οξύ και αυξάνουν την τιμή του pH, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε αλλοίωση των ελιών κατά την επεξεργασία (Harris et al., 1998).

1.4.2 Ελεγχόμενη ζύμωση

Η ελεγχόμενη ζύμωση με καλλιέργεια εκκίνησης πραγματοποιείται με την προσθήκη κατάλληλου εμβολίου με υψηλό πληθυσμό από τους επιθυμητούς μικροοργανισμούς της ζύμωσης. Η προσθήκη αρχικής καλλιέργειας βελτιώνει τη διαδικασία και συμβάλλει στον μεγαλύτερο έλεγχο του αρώματος, της υφής και της γεύσης του τελικού προϊόντος (Aponte et al., 2012). Μέχρι πρόσφατα, η χρήση καθαρών καλλιεργειών εκκίνησης οξυγαλακτικών βακτηρίων στη ζύμωση λαχανικών ήταν σπάνια. Καθώς όμως ο έλεγχος της ποιότητας είναι απαραίτητος για την εκβιομηχάνιση της διαδικασίας ζύμωσης, το ενδιαφέρον για την ανάπτυξη και χρήση καλλιεργειών εκκίνησης στη ζύμωση των επιτραπέζιων ελιών αυξάνεται σταθερά τα τελευταία χρόνια (Ray and Shivkumar, 2009). Για την ελεγχόμενη οξυγαλακτική ζύμωση, απαιτείται να δημιουργηθούν συνθήκες που να ευνοούν την ανάπτυξη συμβιωτικών/συναγωνιστικών και εμβολιασμένων οξυγαλακτικών βακτηρίων και να αποτρέπουν την ανάπτυξη άλλων ανεπιθύμητων μικροοργανισμών (Gardner et al., 2001). Πρόσφατα έχουν δημοσιευθεί εγκεκριμένοι κατάλογοι μικροοργανισμών με πιστοποιημένη χρήση σε ζυμώσεις τροφίμων που καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα τροφίμων και ποτών, συμπεριλαμβανομένων των λαχανικών και των φρούτων. Αυτοί οι κατάλογοι περιέχουν ουσιαστικά πηγές και αναφορές, τις οποίες μπορεί κανείς να συμβουλευθεί για να επιλέξει εκκινητήριες καλλιέργειες για τη ζύμωση ωμών λαχανικών και φρούτων (Bourdichon et al., 2012).

1.4.3 Εκκινητήρες καλλιέργειες για την οξυγαλακτική ζύμωση επιτραπέζιων ελιών

Οι καλλιέργειες εκκίνησης στα ζυμωμένα τρόφιμα προστίθενται με πρωταρχικό στόχο να προσδώσουν στο προϊόν ωφέλιμα για την ανθρώπινη υγεία χαρακτηριστικά καθώς και να βελτιώσουν την ποιότητα του ίδιου του τροφίμου (Corsetti et al., 2012). Σε αυτό το πλαίσιο οι κυρίαρχοι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται ως εμβόλια στη ζύμωση ελιών, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία είναι κυρίως στελέχη των *L. plantarum* και *L. pentosus* (Van Reenen et al., 2003; De Bellis et al., 2010; Argyri et al., 2014). Δυο βασικές στρατηγικές μπορεί να εφαρμοστούν για την ελεγχόμενη οξυγαλακτική ζύμωση λαχανικών και φρούτων που θα περιλαμβάνουν τη χρήση αυτοχθόνων ή αλλοχθόνων εκκινητήριων καλλιεργειών (Di Cagno et al., 2008). Οι περισσότερες εκκινητήριες καλλιέργειες είναι αυτόχθονες, δηλαδή παράγονται από στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων που έχουν απομονωθεί από προηγούμενες ζυμώσεις. Δυστυχώς, οι μεταβολικές δραστηριότητες αυτών των καλλιεργειών εκκίνησης είναι ασυνεπείς και ποικίλλουν ακόμη και μεταξύ των στελεχών. Σε τέτοιου είδους μικτές καλλιέργειες παρατηρούνται διαφορές που αφορούν στη προσαρμοστικότητα των μικροοργανισμών στα διάφορα υποστρώματα, στον ρυθμό ανάπτυξης, τις αντιμικροβιακές ιδιότητες καθώς και την ανταγωνιστική συμπεριφορά (Holzapfel, 1997). Αυτές οι διαφορές ενδέχεται να επηρεάσουν τη γεύση και την ποιότητα των παραγόμενων επιτραπέζιων ελιών. Οι φυσικές μαύρες ελιές παράγονται σχεδόν αποκλειστικά με αυθόρμητη ζύμωση που πραγματοποιείται από την αυτόχθονη μικροχλωρίδα. Υπάρχουν πολύ λίγα διαθέσιμα δεδομένα σχετικά με τη χρήση καλλιεργειών εκκίνησης στη ζύμωση της επιτραπέζιας ελιάς σε βιομηχανική κλίμακα. Ωστόσο, τα βακτήρια *L. plantarum* και *L. pentosus* φαίνεται να είναι οι οργανισμοί που επικρατούν ως εκκινητήριες καλλιέργειες για τη ζύμωση φυσικών μαύρων ελιών (Domínguez-Manzano et al., 2012). Από την άλλη οι αλλόχθονες εκκινητήριες καλλιέργειες απομονώνονται από συγκεκριμένα υποστρώματα αλλά χρησιμοποιούνται για τη ζύμωση διαφόρων προϊόντων. Παρ'όλα αυτά φαίνεται πως η χρήση οποιουδήποτε είδους καλλιέργειας εκκίνησης επηρεάζει την οξύτητα της άλμης, την επιβίωση των Gram αρνητικών βακτηρίων αλλά και βελτιώνει την ποιότητα του τελικού προϊόντος με την επιτάχυνση της μεταβολικής δραστηριότητας (Panagou et al., 2008).

Βακτήρια του γένους *Enterococcus* (*E. faecium* και *E. casseliflavus*) έχουν απομονωθεί από άλμη ζυμωμένων ελιών Ισπανικού τύπου και έχουν χρησιμοποιηθεί

ως εκκινητήρες καλλιέργειες σε μικτό εμβόλιο είτε με τα βακτήρια *L. plantarum* και *E. faecium* (Lavermicocca et al., 1998) είτε με τα βακτήρια *L. pentosus* και *E. casseliflavus* (De Castro et al., 2002). Παρ'όλα αυτά οι εντερόκοκκοι μπορεί να προκαλέσουν λοιμώξεις στους ανθρώπους και οι καθοριστικοί παράγοντες της λοιμογόνου ικανότητάς τους δεν είναι πλήρως κατανοητοί. Ως αποτέλεσμα αυτών των ανησυχιών, η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων δεν κατατάσσει τους εντερόκοκκους στα πιστοποιημένα ασφαλή βακτήρια για ανθρώπινη κατανάλωση (Qualified Presumption of Safety, QPS) (EFSA, 2007).

1.4.3.1. Κριτήρια για την επιλογή οξυγαλακτικών βακτηρίων ως καλλιέργειες εκκίνησης

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια ως εκκινητήριες καλλιέργειες εμφανίζουν σημαντικά πλεονεκτήματα, όπως τα οφέλη στην υγεία του οργανισμού λόγω των προβιοτικών τους χαρακτηριστικών καθώς και τη βελτίωση του αρώματος και της γεύσης του προϊόντος. Εξίσου σημαντική είναι και η ικανότητα τους να συμβάλλουν στη συντήρηση των τροφίμων παρεμποδίζοντας την ανάπτυξη τόσο παθογόνων όσο και αλλοιογόνων μικροοργανισμών. Ιδιαίτερα σημαντικό για την επιλογή των στελεχών εκκίνησης είναι η ανθεκτικότητά τους στην παρουσία των φαινολικών ενώσεων που συναντάμε στον καρπό της ελιάς (Panagou et al., 2003). Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας είναι η αλατότητα της άλμης. Το βακτήριο *L. plantarum*, ως το πιο διαδεδομένο είδος εκκινητήριας καλλιέργειας μπορεί να αναπτυχθεί μέχρι και σε 10% συγκέντρωση NaCl (Tassou et al., 2002). Τα κριτήρια επιλογής παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα 1.1

Πίνακας 1.1. Χαρακτηριστικά για την χρήση στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων ως καλλιέργειες εκκίνησης σε ζύμωση επιτραπέζιων ελιών

Ταχεία αύξηση και επικράτηση
Ομο- και ετεροζυμωτικός μεταβολισμός
Ανθεκτικότητα στο αλάτι (NaCl)
Παραγωγή και ανθεκτικότητα στα οξέα
Αδυναμία μεταβολισμού των οργανικών οξέων
Ικανότητα αύξησης σε χαμηλές θερμοκρασίες
Ανθεκτικότητα στους φαινολικούς γλυκοζίτες
Ικανότητα υδρόλυσης της ελευρωπαΐνης

Ικανότητα μείωσης της συγκέντρωσης των βιογενών αμινών

Σχηματισμός πρόδρομων ουσιών που σχετίζονται με τη βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών

Παραγωγή βακτηριοσινών

Προβιοτική συμπεριφορά

1.4.4 Ωφέλιμες δράσεις οξυγαλακτικών βακτηρίων

Αρχικά η ζύμωση φρούτων και λαχανικών είχε ως κύριο στόχο την συντήρησή τους, όμως σήμερα τα ζυμωμένα τρόφιμα είναι ιδιαιτέρως σημαντικά στη διατροφή του πληθυσμού καθώς προσδίδουν ποικίλα οφέλη στην ανθρώπινη υγεία. Διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παραγωγή υγιεινών θρεπτικών τροφίμων με διαφοροποιημένα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (γεύση, άρωμα, υφή) που εμπλουτίζουν την ανθρώπινη διατροφή, καθιστώντας ταυτόχρονα τα τρόφιμα ασφαλή για κατανάλωση. (Montet et al., 2006).

1.4.4.1 Αντιμικροβιακές ενώσεις

Η χρήση των οξυγαλακτικών βακτηρίων ως καλλιεργειών εκκίνησης στη ζύμωση των επιτραπέζιων ελιών, επιφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα με τα κυριότερα να αφορούν στη συντήρηση του τροφίμου, στην παράταση της διάρκειας ζωής και στη βελτίωση της ποιότητας και της γεύσης (Ray and Sivakumar, 2009). Μία ακόμα από τις πολυάριθμες εφαρμογές των οξυγαλακτικών βακτηρίων αφορά στην ικανότητα τους να παράγουν αντιμικροβιακές ενώσεις, τις βακτηριοσίνες. Πρόκειται για εξωκυτταρικές ενώσεις, ριβωσομικής σύνθεσης μικρού μοριακού βάρους, όπως πεπτίδια ή πρωτεΐνες που απελευθερώνονται από τα βακτήρια και έχουν ένα περιορισμένο φάσμα βακτηριοκτόνου δράσης (Jack et al., 1995). Στο πλαίσιο της ζύμωσης οι βακτηριοσίνες αναστέλλουν τη δράση παθογόνων βακτηρίων και την αλλοίωση των τροφίμων. Συγκεκριμένα στοχεύουν στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των βακτηρίων και είναι δραστικές μόνο απέναντι στα θετικά κατά Gram βακτήρια καθώς τα Gram αρνητικά προστατεύονται από τους λιποπολυσακχαρίτες (LPS) που απαντώνται στην εξωτερική μεμβράνη που περιβάλλει το κυτταρικό τους τοίχωμα (Abee et al., 1995). Τα στελέχη που παράγουν βακτηριοσίνες, τα οποία μπορούν να κυριαρχήσουν έναντι της αυτόχθονης μικροχλωρίδας και να επιβιώσουν μέχρι την ολοκλήρωση της ζύμωσης μπορεί να αποτελέσουν χρήσιμα εργαλεία στην

ανάπτυξη λειτουργικών καλλιεργειών εκκίνησης, εξασφαλίζοντας μεγαλύτερη ομοιομορφία των τελικών προϊόντων (Randazzo et al., 2010).

1.4.4.2 Προβιοτική δράση

Εξίσου σημαντική είναι και η δράση των οξυγαλακτικών βακτηρίων ως προβιοτικών παραγόντων, ενισχύοντας την ανοσοαπόκριση, μειώνοντας τα συμπτώματα δυσανεξίας στη λακτόζη, αυξάνοντας τη βιοδιαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών και μειώνοντας τον επιπολασμό της αλλεργίας σε ευαίσθητα άτομα (Stiles, 1996). Σύμφωνα με τον Διεθνή Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας (FAO) και τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), τα προβιοτικά είναι ζωντανοί μικροοργανισμοί οι οποίοι όταν χορηγούνται σε επαρκή ποσότητα έχουν ωφέλιμο αντίκτυπο στην υγεία του ξενιστή. Οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί συμβάλλουν στην εντερική μικροβιακή ισορροπία, βοηθούν στην καλύτερη απορρόφηση θρεπτικών ουσιών στο έντερο, αναστέλλουν την ανάπτυξη παθογόνων βακτηρίων και αυξάνουν την ανθεκτικότητα του οργανισμού στις διάφορες λοιμώξεις. Τα πιο κοινά οξυγαλακτικά βακτήρια που μελετώνται για την προβιοτική τους δράση στα τρόφιμα είναι *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. και *Streptococcus* spp. (Shah, 2007). Η αποτελεσματικότητα της προβιοτικής δράσης των οξυγαλακτικών βακτηρίων καθορίζεται από την ηλικία του ατόμου, την πληθυσμιακή ομάδα, τις διακυμάνσεις της μικροβιακής χλωρίδας του εντέρου, τις διατροφικές συνήθειες και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ μικροβίων και ξενιστή (FAO/WHO, 2009). Επίσης, οι ωφέλιμες δράσεις των μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται ως προβιοτικά εξαρτώνται από το στέλεχος του εκάστοτε μικροοργανισμού.

Για να εκδηλώσουν την προβιοτική τους δράση τα βακτήρια πρέπει να φτάσουν στον τελικό τους προορισμό, επομένως είναι απαραίτητο να είναι ανθεκτικά στα χολικά άλατα και στο όξινο pH. Η προσκόλληση στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου είναι ιδιαίτερα σημαντική για την επιτυχή αποίκιση των προβιοτικών βακτηρίων, ώστε οι ευεργετικές επιδράσεις τους να διαρκέσουν περισσότερο στο οργανισμό (Ouwehand et al., 1999).

Ορισμένα προβιοτικά βακτήρια ενδέχεται να επηρεάσουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των ζυμωμένων προϊόντων ή να δράσουν ανταγωνιστικά έναντι των καλλιεργειών εκκίνησης (Tamime et al., 2005). Παρά τις αλληλεπιδράσεις αυτές, έχει αποδειχθεί ότι οι μικροοργανισμοί έχουν την ικανότητα να δημιουργούν βιοϋμένια στην επιδερμίδα της ελιάς και επομένως οι επιτραπέζιες ελιές θεωρούνται ένα

κατάλληλο μέσο για την ανάπτυξη προβιοτικών. Συγκεκριμένα το είδος *Lactobacillus paracasei* αποικίζει με επιτυχία τόσο την επιφάνεια της ελιάς όσο και το ανθρώπινο έντερο και τελικά κυριαρχεί επί της αυτόχθονης οξυγαλακτικής μικροχλωρίδας μέσα σε 30 ημέρες (Valerio et al., 2011, Lavermicocca et al., 2005). Το βακτήριο *L. acidophilus* μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως προβιοτικός μικροοργανισμός, ο οποίος κατά την πρόσληψη σε ορισμένες ποσότητες (10^7 - 10^9 CFU/ημέρα) προσδίδει οφέλη στην ανθρωπινή υγεία (Sanders, 1999). Σε άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Montoro et al. (2016) και αφορούσε στην διερεύνηση του προβιοτικού δυναμικού 31 στελεχών *L. pentosus* που απομονώθηκαν από πράσινες επιτραπέζιες ελιές, προέκυψε ότι αρκετά από τα στελέχη αποτελούν σημαντικά εν δυνάμει προβιοτικά, καθώς έδειξαν καλή ικανότητα ανάπτυξης και επιβίωσης σε συνθήκες προσομοίωσης του γαστρεντερικού σωλήνα.

Το βακτήριο *L. plantarum* αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων στη ζύμωση φυτικών προϊόντων. Οι μελέτες για την προβιοτική δράση στελεχών *L. plantarum* στις επιτραπέζιες ελιές δείχνουν ότι πρόκειται για ένα είδος με σημαντική προβιοτική δράση που συμβάλλει στην παραγωγή επιτραπέζιων ελιών με λειτουργικό δυναμικό (Cebeci et al., 2003). Συγκεκριμένα, οι εν λόγω μελέτες επιβεβαιώνουν ότι οι μικροοργανισμοί ήταν σε θέση να επιβιώσουν μέχρι το τέλος της ζύμωσης σε μεγάλους πληθυσμούς, αποδεκτούς για προβιοτική δράση και επιπλέον οι ελιές που παράγονται έχουν υποστεί ζύμωση με αποδεκτά φυσικοχημικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (Bautista-Gallego et al., 2013a; Argyri et al., 2014; Blana et al., 2014).

Ανάλογα με τη γεωγραφική προέλευση και τη διαδικασία παραγωγής των ελιών, διαφορετικά στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων με προβιοτικό δυναμικό μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εκκινητήριες καλλιέργειες. Ωστόσο, η πλειοψηφία τους αποτελείται από στελέχη των *L. plantarum*, *L. pentosus* ή συνδυασμό των δύο (Hurtado et al., 2010). Η επιλογή των προβιοτικών καλλιεργειών εκκίνησης στη ζύμωση επιτραπέζιων ελιών προϋποθέτει την εξασφάλιση ορισμένων τεχνολογικών ιδιοτήτων, όπως είναι η ταχεία ανάπτυξη, η αντιμικροβιακή δράση, η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά, η ανθεκτικότητα στο δυσμενές περιβάλλον του στομάχου και του εντέρου, ο ομοζυμωτικός μεταβολισμός, και η γρήγορη κατανάλωση ζυμώσιμων υποστρωμάτων (Abriouel et al., 2011).

1.4.5 Ζύμωση επιτραπέζιων ελιών με μειωμένα επίπεδα νατρίου

Σήμερα η κατανάλωση ζυμωμένων προϊόντων έχει πλέον αυξηθεί σημαντικά καθώς όπως φαίνεται οι καταναλωτές επιθυμούν πιο υγιεινές επιλογές στη διατροφή τους (IOOC, 2016). Όσον αφορά στη χώρα μας οι επιτραπέζιες ελιές αποτελούν ένα από τα σημαντικότερα εμπορεύσιμα ζυμωμένα προϊόντα. Η ζύμωση και αποθήκευση των ελιών σε άλμη αποτελεί την πιο κοινή μέθοδο για την επεξεργασία των επιτραπέζιων ελιών, καθώς απαιτεί μειωμένη κατανάλωση ενέργειας και χαρακτηρίζεται από χαμηλό λειτουργικό κόστος. Ωστόσο τα τελευταία χρόνια, οι αρχές δημόσιας υγείας συνέστησαν τη μείωση της διατροφικής πρόσληψης νατρίου λόγω της συσχέτισής του με την υπέρταση και τις καρδιαγγειακές παθήσεις (WHO, 2007).

Σύμφωνα με την Ε.Ε. η πρόσληψη 2,0 g νατρίου ημερησίως μειώνει τον κίνδυνο καρδιαγγειακών παθήσεων στον ενήλικο πληθυσμό. Πρόκειται για μία ασφαλή και επαρκή ποσότητα νατρίου για τον γενικό πληθυσμό ενηλίκων της Ε.Ε που συμβάλει στη διατήρηση του ισοζυγίου του νατρίου. Η ίδια τιμή πρόσληψης νατρίου ισχύει για τις έγκυες και τις θηλάζουσες γυναίκες. Η πρόσληψη νατρίου που θεωρείται ασφαλής και επαρκής για τα παιδιά, προσαρμόζεται με την αντίστοιχη ενεργειακή τους απαίτηση και έχει ως εξής: 1,1 g/ημέρα για παιδιά ηλικίας 1-3 ετών, 1,3 g/ημέρα για παιδιά ηλικίας 4-6 ετών, 1,7 g/ημέρα για παιδιά ηλικίας 7-10 ετών και 2,0 g/ημέρα για παιδιά ηλικίας 11-17 ετών, αντίστοιχα. Για τα βρέφη ηλικίας 7-11 μηνών, προτείνεται μέγιστη πρόσληψη 0,2 g/ημέρα (EFSA, 2019). Στις Η.Π.Α., σύμφωνα με τον Code of Federal Regulations (2003) η συνιστώμενη ημερήσια πρόσληψη νατρίου είναι 2,5 g. Ωστόσο σύμφωνα με έρευνες η μέση ποσότητα πρόσληψης νατρίου του γενικού πληθυσμού είναι πολύ υψηλότερη (Berstein and Willet, 2010). Συγκεκριμένα στην Ισπανία, η πρόσληψη NaCl ήταν περίπου 9,8 g/ημέρα/άτομο (Ortega et al., 2011) ενώ στην Πορτογαλία 10 g/ημέρα/άτομο (Graça, 2013).

Τα τελευταία χρόνια, για την μείωση των αρνητικών επιδράσεων από την υψηλή πρόσληψη νατρίου, αρκετές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην μερική ή ολική αντικατάσταση του NaCl με άλλα χλωριούχα άλατα, όπως KCl και CaCl₂, στη ζύμωση των επιτραπέζιων ελιών, τα αποτελέσματα των οποίων ποικίλουν. Όλα όμως καταλήγουν στο κοινό συμπέρασμα ότι οι συνθέσεις άλμης με τα διάφορα μίγματα χλωριούχων αλάτων οδήγησαν σε έντονη οξυγαλακτική ζύμωση και ως εκ τούτου θα

μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά στη διεργασία της ζύμωσης για να υποκαταστήσουν το NaCl. (Panagou et al., 2011; Bautista-Gallego et al., 2013a; Mateus et al., 2016; Zinno et al., 2017). Βέβαια ο αντίκτυπος της ποσότητας νατρίου που λαμβάνεται από την κατανάλωση επιτραπέζιων ελιών συγκριτικά με τη συνολική ημερήσια πρόσληψη αυτού του στοιχείου είναι ιδιαίτερα περιορισμένος, καθώς πρόκειται για ζυμωμένα τρόφιμα που καταναλώνονται σε μικρές ποσότητες. Ωστόσο είναι προφανές ότι μια πιο ισορροπημένη σύνθεση της περιεκτικότητας σε ανόργανα άλατα αυτών των προϊόντων θα μπορούσε να συμβάλει στη βελτίωση της διατροφής του καταναλωτή και στην κατηγοριοποίηση της επιτραπέζιας ελιάς ως ένα υγιεινό τρόφιμο με μειωμένα επίπεδα νατρίου. Επίσης αξίζει να σημειωθεί ότι σύμφωνα με τους Bautista-Gallego et al. (2010) οι παράμετροι ανάπτυξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων που χρησιμοποιούνται ως καλλιέργειες εκκίνησης δεν σχετίζονται με τις αρχικές συνθήκες της ζύμωσης. Επιπλέον παρατήρησαν ότι στις ζυμώσεις με τη μερική υποκατάσταση του NaCl με KCl ή CaCl₂, η έναρξη της αύξησης των οξυγαλακτικών βακτηρίων καθυστερούσε συγκριτικά με τις ζύμες αλλά με την ολοκλήρωση της διεργασίας οι πληθυσμοί των οξυγαλακτικών βακτηρίων υπερίσχυαν των ζυμών σε όλες τις περιπτώσεις. Επομένως, με βάση την παραπάνω μελέτη το NaCl μπορεί να υποκατασταθεί σε ποικίλες αναλογίες με KCl ή CaCl₂ χωρίς ουσιαστικά να διαταραχθεί το αναμενόμενο προφίλ της ζύμωσης.

1.4.6 Οι ζύμες και ο ρόλος τους στη ζύμωση επιτραπέζιων ελιών

Οι ζύμες είναι μονοκύτταροι ευκαριωτικοί μη φωτοσυνθετικοί οργανισμοί, που ανήκουν στο βασίλειο των μυκήτων, με πάνω από 1500 ταυτοποιημένα είδη (Kurtzman and Fell, 2006). Επί το πλείστον οι ζύμες ανήκουν στους μεσόφιλους μικροοργανισμούς με βέλτιστη περιοχή θερμοκρασιών ανάπτυξης 25-28 °C, ωστόσο μερικά είδη επιβιώνουν και σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από 30 °C ή χαμηλότερες από 15 °C. Επιπλέον, ανήκουν στους αερόβιους ή προαιρετικά αναερόβιους οργανισμούς με ιδανικές τιμές pH για την ανάπτυξη τους μεταξύ 4,5-6,5 (Barnett, 2003). Χαρακτηρίζονται από ευρεία διασπορά στη φύση και απομονώνονται συχνότερα από υποστρώματα πλούσια σε σάκχαρα. Παρ'όλα αυτά πολλά είδη έχουν καταφέρει να προσαρμοστούν σε διαφορετικά περιβάλλοντα (Arroyo-López et al., 2008). Οι ζύμες κατέχουν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην βιομηχανία τροφίμων και αλκοολούχων ποτών. Η ζύμωση των σακχάρων από τις ζύμες είναι μια από τις

παλαιότερες τεχνολογίες για τη μετατροπή των υδατανθράκων σε διάφορες ενώσεις όπως το νερό, η αιθανόλη, το διοξείδιο του άνθρακα, κ.α. Αρκετά είδη, κυρίως του γένους *Saccharomyces*, εμπλέκονται στη ζύμωση του κρασιού, της μύρας, του αγγουριού και άλλων λαχανικών. Από την άλλη πλευρά όμως, οι ζύμες μπορεί να προκαλέσουν αλλοίωση στα ζυμωμένα τρόφιμα, όπως οι ελιές, ειδικά σε συνθήκες με χαμηλό pH, υψηλή συγκέντρωση άλατος και χαμηλές θερμοκρασίες. Σε ορισμένες περιπτώσεις η επικράτηση των ζυμών στη ζύμωση της ελιάς θα μπορούσε να συμβάλλει στη δημιουργία τελικών προϊόντων με ηπιότερη γεύση, ενώ ταυτόχρονα θα μπορούσαν να μειώσουν τον χρόνο συντήρησης του τροφίμου. Το πρόβλημα αυτό αναφέρθηκε κατά τη διάρκεια της ζύμωσης των φυσικών μαύρωνελιών σε διαφορετικές συγκεντρώσεις άλατος (NaCl) και θερμοκρασίες. Επιπλέον, οι υψηλές συγκεντρώσεις ζυμών ($> 7 \log \text{CFU/mL}$) θα μπορούσαν να προκαλέσουν έντονη παραγωγή CO_2 , το οποίο εισέρχεται στο εσωτερικό του καρπού και προκαλεί αλλοίωση με τη μορφή αεροθαλάμων (Garrido-Fernández et al., 1995).

Ο πληθυσμός των ζυμών στο οικοσύστημα της ελιάς παρουσιάζει υψηλή ετερογένεια και μεταβάλλεται ανάλογα με την ποικιλία, την περιοχή προέλευσης, τον εμπορικό τύπο, τη συγκέντρωση άλατος, το pH, τα θρεπτικά συστατικά, το οξυγόνο και τις αλληλεπιδράσεις με άλλους μικροοργανισμούς (Corsetti et al., 2012). Οι ζύμες που απαντώνται φυσικά στην επιφάνεια της ελιάς και είναι παρούσες στο πρώτο στάδιο της ζύμωσης ανήκουν κυρίως στα είδη *Candida diddensiae*, *Rhodotorula glutinis* και *Aureobasidium pullulans* (Aponte et al., 2010; Alves et al., 2012). Η ζύμη *C. diddensiae* απαντάται κατά την πρώτη εβδομάδα της ζύμωσης και φαίνεται να είναι υπεύθυνη για τη μείωση του pH στην αρχή της διαδικασίας (Hurtado et al., 2008). Η ζύμη *R. glutinis* και γενικότερα τα είδη του γένους *Rhodotorula* μπορεί να προκαλέσουν υποβάθμιση της υφής (μαλάκωμα) του ελαιοκάρπου εξαιτίας της παραγωγής του ενζύμου πολυγαλακτουρονάση και του σχηματισμού υμενίου (μεμβράνη) στην επιφάνεια της άλμης (Nisiotou et al., 2010). Το είδος *A. pullulans* ανιχνεύθηκε και ταυτοποιήθηκε σε πράσινες στην αρχή της ζύμωσης και χαρακτηρίζεται από εξαιρετική ανθεκτικότητα στο αλάτι (πάνω από 17%, w/v) (Abriouel et al., 2011). Όσον αφορά στη ποικιλία Κονσερβολιά, τα κυρίαρχα είδη ζυμών στην αρχή της ζύμωσης είναι τα *Metschnikowia pulcherrima*, *Debaryomyces hansenii* και *A. pullulans* (Nisiotou et al., 2010).

Στη συνέχεια όσο η ζύμωση εξελίσσεται και ενισχύεται ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων, τα είδη ζυμών που επικρατούν μεταβάλλονται. Τα κυριότερα είδη ζυμών που απαντώνται συνήθως κατά τη ζυμωτική διεργασία είναι *Pichia membranifaciens*, *P. kluyveri*, *Kluyveromyces lactis*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Saccharomyces cerevisiae* και *Issatchenkia orientalis* (Bevilacqua et al., 2009). Το είδος *W. anomalus* προσαρμόζεται με επιτυχία στο περιβάλλον της ζύμωσης και λόγω του ενζύμου β-γλυκοζιδάση που διαθέτει, υδρολύει την ελευρωπαΐνη και άλλες ουσίες που είναι υπεύθυνες για την πικρή γεύση της ελιάς. Επιπλέον στελέχη της ζύμης *W. anomalus* εμφανίζουν υψηλή παραγωγή βιοενεργών αντιοξειδωτικών ουσιών και προστατεύουν τις ελιές από την οξείδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων και το σχηματισμό υπεροξειδίου. Ωστόσο, η ζύμη *W. anomalus* φαίνεται να διαδραματίζει αρνητικό ρόλο στην αλλοίωση των καρπών στο τέλος της ζύμωσης, καθώς ορισμένα στελέχη έχουν την ικανότητα να παράγουν ένζυμα που θα μπορούσαν να προκαλέσουν υποβάθμιση της υφής των καρπών (Bautista-Gallego et al., 2011). Ένα από τα κυρίαρχα είδη ζυμών που συναντάμε στη ζύμωση είναι το *P. kluyveri*, το οποίο είναι ιδιαίτερα επιθυμητό καθώς δεν είναι ικανό να μειώσει το γαλακτικό ή το κιτρικό οξύ και ως εκ τούτου δεν αλλάζει την τελική οξύτητα του προϊόντος. Επιπλέον, τα στελέχη που ανήκουν σε αυτό το είδος έχουν δείξει σημαντική δραστηριότητα β-γλυκοζιδάσης, η οποία είναι εξαιρετικά χρήσιμη για τη μείωση της πικρής γεύσης των μη επεξεργασμένων με καυστικό νάτριο ελιών (Aponte et al., 2010). Όσον αφορά στην Κονσερβολιά, τα κυρίαρχα είδη ζυμών που επικρατούν στη ζύμωση είναι *P. membranifaciens* και *P. anomala* (Doulgeraki et al., 2012).

Αλληλεπίδραση ζυμών και οξυγαλακτικών βακτηρίων κατά τη ζύμωση των επιτραπέζιων ελιών

Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης των επιτραπέζιων ελιών, οι ζύμες έχουν την ικανότητα να συνθέτουν ουσίες όπως βιταμίνες, αμινοξέα και πουρίνες ή σύνθετους υδατάνθρακες που είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων του γένους *Lactobacillus* καθώς χρειάζονται πολλές πηγές θρεπτικών συστατικών για τη βέλτιστη ανάπτυξή τους, ειδικά σε ένα φτωχό υπόστρωμα όπως η άλμη (Arroyo-López et al., 2008). Ο εμβολιασμός ζυμών και οξυγαλακτικών βακτηρίων φαίνεται να οδηγεί σε βελτίωση της ανάπτυξης των γαλακτοβακίλλων και κατά συνέπεια στην παραγωγή γαλακτικού οξέος λόγω της μεγαλύτερης

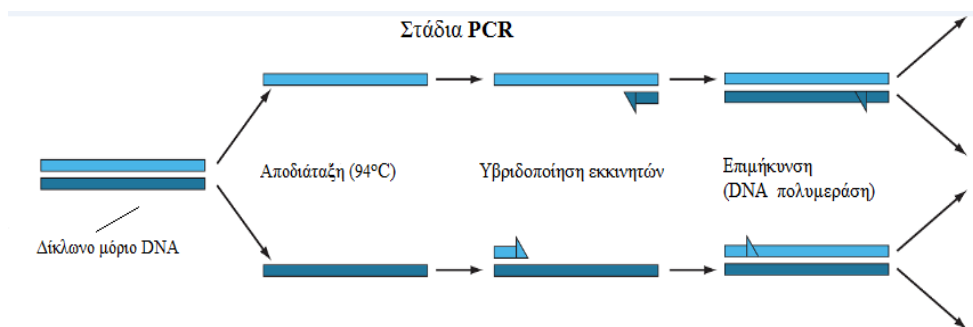
διαθεσιμότητας των προαναφερθέντων θρεπτικών ουσιών (Aponte et al., 2012). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η ανάπτυξη του βακτηρίου *L. plantarum* ενισχύεται λόγω της παρουσίας ζυμών, όπως η *D. hansenii* η οποία προκάλεσε αύξηση του πληθυσμού των βακτηρίων μέσα σε 8 ώρες όταν εμβολιάστηκε σε χυμό ζυμωμένης ελιάς (Tsapatsaris και Kotzekidou, 2004). Επιπλέον, η απόδοση του βακτηρίου *L. pentosus* βελτιώθηκε αισθητά, παρουσία της ζύμης *S. cerevisiae*, με ταυτόχρονη αύξηση της παραγωγής γαλακτικού οξέος σε πράσινες επιτραπέζιες ελιές (Segovia Bravo et al., 2007).

1.5 Μέθοδοι προσδιορισμού της μικροβιακής κοινότητας κατά τη ζύμωση της επιτραπέζιας ελιάς

Η σύγχρονη προσέγγιση στον κλάδο της μικροβιολογίας τροφίμων στρέφεται στις μοριακές μεθόδους για την ανάλυση των μικροβιακών πληθυσμών και της δυναμικής των ζυμωμένων τροφίμων. Οι μοριακές τεχνικές βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR), που επινοήθηκε από τον Kary Mullis στα μέσα της δεκαετίας του 1980 και έφερε επανάσταση στη μοριακή γενετική. Στη PCR χρησιμοποιείται μια DNA πολυμεράση για τη σύνθεση μεγάλου αριθμού αντιγράφων μιας αλληλουχίας DNA που βρίσκεται ανάμεσα στους εκκινητές (ελεύθερα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια), οι οποίοι χρειάζονται για την έναρξη της σύνθεσης. Στην εικόνα 1.4 φαίνονται τα στάδια της αντίδρασης

1.5.1 Εξαρτώμενη από την καλλιέργεια μοριακή τεχνική.

. Στις μοριακές δοκιμές, ο όρος ‘culture-dependent’ αναφέρεται σε μεθόδους στις οποίες τα δείγματα αποκτήθηκαν μέσω παραδοσιακών μικροβιολογικών αναλύσεων και στη συνέχεια αναλύθηκαν μοριακά, με απομόνωση και ενίσχυση του γενετικού υλικού. Οι culture-dependent τεχνικές δεν εφαρμόζονται τόσο στην επιλογή στελεχών εκκίνησης, αλλά κατέχουν σημαντικό ρόλο στην περιγραφή της μικροχλωρίδας ενός τροφίμου, αλλά και στον προσδιορισμό των κύριων μικροβιακών ειδών που εμπλέκονται στη ζύμωση διαφόρων τροφίμων και ποτών.



Εικόνα 1.4 Στάδια της τεχνικής PCR

Μερικά χρόνια αργότερα από την εφαρμογή της τεχνικής PCR, αναπτύσσεται η rep-PCR (Repetitive Sequenced-based PCR), η οποία βασίζεται στη παρουσία συντηρημένων επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών που βρίσκονται διάσπαρτες σε ολόκληρο το γονιδίωμα των αρνητικών και θετικών κατά Gram βακτηρίων αλλά και των μυκήτων. Η μέθοδος αυτή είναι εξαρτώμενη από την καλλιέργεια και ακολουθεί τις κύριες αρχές τις PCR με τη διαφορά ότι γίνεται χρήση ενός εκκινητή με παλίνδρομη αλληλουχία που υβριδίζει σε διακριτές περιοχές του γονιδιώματος. Τα τμήματα του DNA που πολλαπλασιάζονται με αυτή τη τεχνική οδηγούν σε ένα μοναδικό γενωμικό αποτύπωμα, το οποίο χρησιμοποιείται στη διάκριση των μικροοργανισμών σε γένη, είδη και στελέχη.

Τα είδη των οξυγαλακτικών βακτηρίων που απαντώνται συχνότερα στη ζύμωση (*L. plantarum* και *L. pentosus*), έχουν παρόμοιους φαινοτύπους και γενοτυπικά βρίσκονται τόσο κοντά που η αλληλούχιση του γονιδίου 16S δεν είναι διευκρινιστική για τον διαχωρισμό των δύο ειδών (De Bellis et al., 2010). Για το λόγο αυτό, τεχνικές που βασίζονται σε φαινοτυπικά χαρακτηριστικά είναι αποτελεσματικές μόνο για συγκεκριμένα είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων καθώς συχνά αδυνατούν να διαχωρίσουν στελέχη με διαφορετικούς φαινοτύπους ή ακόμα και με ελαφρώς διαφορετικό γενετικό προφίλ (Temmerman et al., 2004). Σε μία πρόσφατη έρευνα που αφορούσε τη ζύμωση σε πράσινες επιτραπέζιες ελιές ισπανικού τύπου, η ταυτοποίηση της αυτόχθονης εκκινητήριας καλλιέργειας πραγματοποιήθηκε συνδυάζοντας δύο culture dependent μοριακές μεθόδους, την rep-PCR και RAPD-PCR (Aponte et al., 2012), οι οποίες αποτελούν τις πιο συνήθεις δοκιμές για την ταυτοποίηση στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων και ζυμών από τη ζύμωση της επιτραπέζιας ελιάς (Bevilacqua et al., 2010). Η rep-PCR χρησιμοποιείται

κυρίως για την αποτύπωση του μικροβιακού δυναμικού και τον έλεγχο της παρουσίας των εμβολιασμένων εκκινητήριων καλλιέργειών. Θα πρέπει, επίσης να σημειωθεί ότι στις περισσότερες περιπτώσεις, όπως και στη παρούσα μελέτη η μοριακή ανάλυση χρησιμοποιείται για την ομαδοποίηση των απομονώσεων από τη ζύμωση, με βάση την γενετική τους ομολογία και στη συνέχεια πραγματοποιείται επιλογή των αντιπροσωπευτικών στελεχών και αλληλούχηση αυτών.(Blaiotta et al., 2008).

1.5.2 Ανεξάρτητη από την καλλιέργεια μοριακή τεχνική

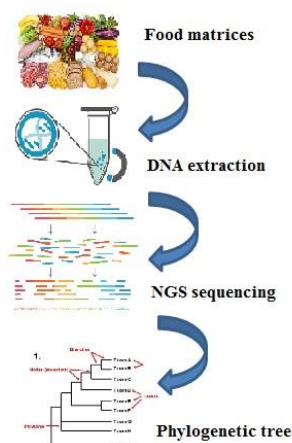
Η εφαρμογή ανεξάρτητων από την καλλιέργεια τεχνικών στον τομέα της ασφάλειας των τροφίμων και της βελτίωσης της ποιότητας είναι ακόμη σε αρχικό στάδιο αλλά αποτελεί σημαντικό εργαλείο για την πρόβλεψη της εμφάνισης παθογόνων και αλλοιογόνων μικροοργανισμών, παρατηρώντας τις μεταβολές στο σύνολο της μικροβιακής κοινότητας (Jagadeesan et al., 2018). Στις ανεξάρτητες από την καλλιέργεια δοκιμές το γενετικό υλικό έχει προέλθει απευθείας από κάποιο περιβαλλοντικό δείγμα, χωρίς να απαιτείται προηγούμενη καλλιέργεια σε μικροβιολογικό υπόστρωμα,. Οι τεχνικές αυτές επιτρέπουν την κατανόηση της πολυπλοκότητας και της εξέλιξης του μικροβιακού οικοσυστήματος της ελιάς κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, καθώς εντοπίζουν όλους τους πληθυσμούς, ακόμα και αυτούς που δεν μπορούν να καλλιεργηθούν. Οι πληθυσμοί που βρίσκονται σε κατάσταση καταπόνησης ή τραυματισμού μπορούν επίσης να εντοπιστούν με τις culture-independent τεχνικές (Cocolin et al., 2011).

1.5.3 Αλληλούχηση Επόμενης Γενιάς (next generation sequencing, NGS)

Την τελευταία δεκαετία οι τεχνολογίες αλληλούχησης επόμενης γενιάς, (Next Generation Sequencing, NGS) έχουν μετατραπεί σε ένα απαραίτητο ερευνητικό εργαλείο που μπορεί να εφαρμοστεί σε πολλούς τομείς, συμπεριλαμβανομένων των διαγνωστικών και επιδημιολογικών ερευνών, της εγκληματολογίας, της αντιμικροβιακής ανθεκτικότητας και της ασφάλειας των τροφίμων. Η τεχνολογία αυτή αναπτύσσεται ταχύτατα, με συνεχή βελτίωση της ποιότητας και μείωση του κόστους, έχοντας πλέον σημαντική επίδραση στη μικροβιολογία τροφίμων (Allard et al., 2017). Η βασική διαφορά των τεχνολογιών νέας γενιάς με την κλασική αλληλούχηση Sanger είναι ο όγκος των ακολουθιών, δηλαδή λαμβάνουν χώρα ταυτόχρονα περισσότερες αντιδράσεις, μεγαλύτερων τμημάτων DNA σε μικρότερο χρονικό διάστημα και με μικρότερο κόστος (Mardis, 2008). Με την μέθοδο Sanger μπορεί να αλληλουχηθεί μόνο ένα θραύσμα DNA κάθε φορά, ενώ οι πλατφόρμες που

αξιοποιούν νέες τεχνολογίες επιτρέπουν τη μαζική παράλληλη αλληλούχιση πολλών γονιδίων καθώς και την αλληλούχιση μεμονωμένων μορίων χωρίς ενίσχυση, αλληλουχώντας ταυτόχρονα εκατομμύρια θραύσματα ανά διαδρομή. Αυτή η διαδικασία υψηλής απόδοσης μεταφράζεται σε αλληλουχία εκατοντάδων έως χιλιάδων γονιδίων ταυτόχρονα (Neil, 2007).

Τα μηχανήματα αλληλούχισης που χρησιμοποιούν NGS τεχνολογία διαθέτουν υψηλό επίπεδο ειδικότητας και ακρίβειας λόγω της ευαισθησίας τους όσον αφορά στην ανίχνευση των πολύ μικρών διαφορών στις φυσικοχημικές ιδιότητες των τεσσάρων βασικών νουκλεοτιδίων. Η αλληλούχιση μπορεί να πραγματοποιηθεί κυρίως από μηχανήματα που δίνουν, είτε μέτριο αριθμό αναγνώσεων μεγάλου μεγέθους με σχετικά υψηλό κόστος, είτε τεράστιο αριθμό αναγνώσεων μικρού μεγέθους με μικρό κόστος ανά Mb αλληλουχίας. Με τις NGS τεχνολογίες το μέγεθος των διαβασμένων τμημάτων και η παραγωγή δεδομένων έχει πλέον αυξηθεί σημαντικά (Loman and Pallen, 2015). Αξίζει ωστόσο να αναφερθεί ότι τα μηχανήματα αλληλούχισης που έχουν δημιουργηθεί μέχρι τώρα δεν διαθέτουν τεχνολογία που να επιτρέπει την πλήρη συνεχή αλληλούχιση ενός γονιδιώματος. Συνεπώς, βιοπληροφορικές προσεγγίσεις συναρμολόγησης των παραγόμενων αλληλουχιών σε ένα συνολικό γονιδίωμα είναι απαραίτητες για την επιτυχή αλληλούχιση γενετικού υλικού.



Εικόνα 1.5 Σχηματική απεικόνιση σχεδιασμού ροής για τη φυλογενετική ανάλυση των μικροοργανισμών ενός οικοσυστήματος με τη χρήση της μεταγενετικής ανάλυσης

Οι NGS τεχνολογίες έχουν ποικιλία εφαρμογών, συμπεριλαμβανομένων της μεταγενετικής ανάλυσης των μικροβιακών κοινοτήτων. Συχνά ο όρος

μεταγονιδιωματική (metagenomics), που αφορά στην ανάλυση ολόκληρων των γονιδιωμάτων ενός δεδομένου οικοσυστήματος ή ομάδας ατόμων γονιδιώματος απομόνωσης, συγγέεται με τον όρο μεταγενετική (metagenetics/metabarcoding) που αφορά στην ενίσχυση και στην αλληλούχιση συγκεκριμένων γονιδίων-δεικτών. Και στις δύο τεχνικές δεν υπάρχει η απαίτηση για απομόνωση μεμονωμένων αποικιών και παρατηρούνται υψηλά ποσοστά επιτυχίας στην ταυτοποίηση και διερεύνηση μικροοργανισμών που δεν μπορούν να καλλιεργηθούν (Eren et al., 2013; Forbes et al., 2017). Ένα από τα πλεονεκτήματα των τεχνικών αυτών, είναι η ικανότητα παρακολούθησης της διαδοχής των μικροβιακών πληθυσμών με την πάροδο του χρόνου σε διάφορα ταξινομικά επίπεδα. Συγκριτικά με τη μεταγονιδιωματική προσέγγιση το metabarcoding παρέχει μια πιο αποδοτική οικονομικά επισκόπηση της ταξινομικής σύνθεσης ενός δείγματος και έχει ήδη εφαρμοστεί σε μια ποικιλία προϊόντων τροφίμων.

Η Miseq Illumina αλληλούχιση αποτελεί μια από τις πιο γνωστές πλατφόρμες που προσφέρουν μεταγενετική ανάλυση. Στην πλατφόρμα αυτή αρχικό βήμα της μεθόδου αποτελεί η δημιουργία βιβλιοθήκης, είτε μέσω multiplex PCR, κατά την οποία ομάδες εκκινητών (primer pools) πολλαπλασιάζουν ταυτόχρονα τα διαφορετικά τμήματα DNA τα οποία θα αλληλουχηθούν, είτε με τυχαία θραυσματοποίηση του DNA. Ακολούθως πραγματοποιείται *in vitro* πρόσδεση της αλληλουχίας προσαρμογέα (adaptor) στα δύο άκρα κάθε πολλαπλασιασμένου τμήματος DNA καθώς και η προσθήκη του κωδικού ιχνηλασιμότητας (barcode) (Machida and Lin, 2014). Ο προσαρμογέας είναι μία γνωστή αλληλουχία DNA, ενώ ο κωδικός ιχνηλασιμότητας είναι μία αλληλουχία διαφορετική για κάθε δείγμα με σκοπό το διαχωρισμό τους. Στη συνέχεια, λαμβάνει χώρα η ενίσχυση των βιβλιοθηκών DNA, μέσω PCR γέφυρας (Bridge PCR). Στη PCR γέφυρα, τα τμήματα DNA τοποθετούνται σε επίπεδο υπόστρωμα και ακολούθως οι συμπληρωματικοί PCR-εκκινητές υβριδοποιούνται στους προσαρμογείς που βρίσκονται στα άκρα των τμημάτων DNA (Adessi, 2000). Στη συνέχεια, ακολουθεί η αλληλούχιση, στην οποία οι εκκινητές συνδέονται στα τμήματα DNA και προστίθενται νουκλεοτίδια σημασμένα με φθορίζουσες ουσίες. Τα νουκλεοτίδια έχουν reversible 3' blockers που αναγκάζουν τους εκκινητές να προσθέτουν μόνο ένα νουκλεοτίδιο κάθε φορά. Μετά από κάθε κύκλο σύνθεσης, μία κάμερα λαμβάνει φωτογραφία. Στη συνέχεια, η φθορίζουσα χρωστική, μαζί με τον τερματικό 3' αναστολέα αφαιρείται χημικά από το

DNA, επιτρέποντας στον επόμενο κύκλο να αρχίσει. Σε κάθε γύρο προστίθεται μόνο ένα είδος dNTP (Kumar et al., 2012). Οι διαφορετικές βάσεις είναι σημασμένες με φθορίζουσες χρωστικές που εκπέμπουν σε διαφορετικό μήκος κύματος. Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων είναι αναγκαίο να γίνει στοίχιση των διαφορετικών τμημάτων και σύγκριση με πρότυπη αλληλουχία (Turcatti et al., 2008).

1.5.4 Δείκτες αλληλούχησης για βακτήρια και ζύμες

Το γονίδιο *gyrB* κωδικοποιεί την πρωτεΐνη υπομονάδας B της γυράσης DNA, μια τοποϊσομεράση DNA τύπου II, η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αντιγραφή του DNA, στη μεταγραφή και τη μετάφραση (Wang et al., 2007). Το *gyrB*, μήκους περίπου 1,2 Kb είναι ένα γονίδιο ενός αντιγράφου που είναι απαραίτητο για τη διατήρηση της βασικής κυτταρικής λειτουργίας και εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα ενός οργανισμού υπό φυσιολογικές συνθήκες (Nochi et al., 2009). Οι αλληλουχίες γονιδίων *gyrB* έχουν χρησιμοποιηθεί σε πολλές φυλογενετικές μελέτες, τα αποτελέσματα των οποίων έδειξαν ότι το *gyrB* είναι ένας κατάλληλος φυλογενετικός δείκτης για τη μελέτη των φυλογενετικών και ταξινομικών σχέσεων σε επίπεδο είδους (Yamamoto and Harayama, 1996; Yamamoto and Harayama, 1998; Yamamoto et al., 1999; Kasai et al., 2000; Niemann et al., 2000; Fukushima et al., 2002; La Duc et al., 2004). Συγκεκριμένα, με βάση την εργασία των Wang et al. (2007) οι ομοιότητες στην ακολουθία του γονιδίου *gyrB* μεταξύ στελεχών του γένους *Bacillus* ήταν 81,6% ενώ οι ομοιότητες του γονιδίου 16S rRNA μεταξύ των ίδιων στελεχών ήταν 98,9%. Από τη συγκριτική ανάλυση αλληλουχίας προέκυψε ότι ο ρυθμός υποκατάστασης βάσεων στην αλληλουχία *gyrB* ήταν πολύ ταχύτερος από αυτόν της αλληλουχίας γονιδίου 16S rRNA. Επιπλέον, σύμφωνα με τους Poirier et al. (2018) το κύριο όφελος της αλληλουχίας *gyrB* είναι η δυνατότητά της να βελτιώνει την ταξινόμηση και να διερευνεί περαιτέρω τον πλούτο των OTUs σε επίπεδο υποείδους, επιτρέποντας έτσι ακριβέστερη διάκριση των δειγμάτων. Η αυξημένη ικανότητα των βασισμένων σε *gyrB* αναλύσεων να παρακολουθούν και να ανιχνεύουν φυλογενετικά διαφορετικές ομάδες στελεχών, συντελεί στη βελτιωμένη ανάλυση και πιο αξιόπιστα αποτελέσματα για μελέτες μικροοργανισμών που εμπλέκονται στην ασφάλεια τροφίμων.

Όσον αφορά στις ζύμες, τα γονίδια που κωδικοποιούν το ριβοσωμικό RNA οργανώνονται σε συστοιχίες που περιέχουν επαναλαμβανόμενες μεταγραφικές

μονάδες (16-18S, 5.5S και 23-28S rRNA, δύο ενδομεταγραφόμενες περιοχές ITS1 και ITS2 και δύο εξωτερικές μεταγραφόμενες περιοχές 5 και 3 'ETS) (Mullineux and Hausner, 2009). Το πυρηνικό γονιδίωμα των ζυμών περιέχει πολλά αντίγραφα ριβοσωμικού DNA (rDNA). Κάθε αντίγραφο rDNA αποτελείται από τα 18S, 5.8S και 25-28S RNAs γονίδια και συχνά αναφέρεται ως rDNA οπερόνιο. Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που βρίσκονται μεταξύ του 18S rRNA και του 5.8S γονιδίου αναφέρονται ως ενδομεταγραφόμενη περιοχή I (Internal Transcribed Spacer I, ITS1), ενώ οι αλληλουχίες DNA που βρίσκονται μεταξύ των 5.8S και 25-28S rRNA γονιδίων αναφέρονται ως ενδομεταγραφόμενη περιοχή II (Internal Transcribed Spacer II, ITS2) του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA. Για την ταυτοποίηση των ζυμών με αλληλούχιση οι πιο κοινοί γενετικοί δείκτες που εφαρμόζονται είναι οι ITS1 και ITS2, 5.8S, 18S και 26S. Η ενίσχυση με PCR και ο προσδιορισμός της αλληλουχίας 26S rRNA και των ενδομεταγραφόμενων περιοχών παρέχει ταχεία και ακριβή αναγνώριση των ζυμομυκήτων. Αυτά τα θραύσματα DNA στόχου περιέχουν αλληλουχίες χρήσιμες για την ταυτοποίηση των ζυμών σε επίπεδο είδους, πλαισιωμένες από συντηρημένες περιοχές που είναι χρήσιμες για το σχεδιασμό εκκινητών PCR ευρείας εμβέλειας (Wang et al., 2014). Σύμφωνα με τους Mbareche et al. (2020) η απόδοση του δείκτη ITS1 όσον αφορά στην αφθονία και την ποικιλότητα των μυκήτων είναι ξεκάθαρα υψηλότερη από αυτή του ITS2. Επιπλέον όσον αφορά στην διάκριση των ειδών, σύμφωνα με τους Wang et al. (2014) ο ITS1 παρουσιάζει υψηλότερη απόδοση από τον ITS2. Επίσης, μικρότερο μήκος προϊόντος ενίσχυσης και χαμηλότερη περιεκτικότητα σε GC φαίνεται ότι είναι δύο άλλα πλεονεκτήματα του ITS1 για αλληλούχιση. Συνοπτικά, το ITS1 αντιπροσωπεύει έναν καλύτερο γραμμικό κώδικα DNA από το ITS2 για ευκαρυωτικά είδη. Ωστόσο σε αντίθεση με τα παραπάνω έρχονται τα αποτελέσματα από σχετική μελέτη των Yang et al. (2018), όπου ο ITS1 φαίνεται να μπορεί να υπερεκτιμήσει την ποικιλία και τον πλούτο των ζυμών/μυκήτων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το ITS2 από μόνο του μπορεί να είναι ένας πιο κατάλληλος δείκτης για τον προσδιορισμό του ταξινομικού πλούτου και των ταξινομητικών χαρακτηριστικών των ζυμών/μυκήτων όταν το πλήρες μήκος ITS δεν είναι διαθέσιμο.

1.6 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής ήταν ο προσδιορισμός της επιβίωσης των εναρκτήριων καλλιεργειών *Lactobacillus plantarum* B380 και *Lactobacillus*

pentosus B363 με προβιοτικό δυναμικό που εμβολιάστηκαν κατά την έναρξης της ζύμωσης της φυσικής μαύρης ελιάς ποικιλίας «Κονσερβολιά» σε άλμη διαφορετικής αλατοπεριεκτικότητας (6% NaCl και 3% NaCl – 3% KCl). Η επιβίωση των επιλεγμένων στελεχών και της κυρίαρχης μικροχλωρίδας ταυτοποιήθηκε με τη χρήση εξαρτημένης από τη καλλιέργεια μοριακής τεχνικής σε δύο χρονικά σημεία, στην αρχή (5 ημέρες) και στο τέλος της ζύμωσης (146 ημέρες). Η τεχνική που εφαρμόστηκε ήταν η rep-PCR (PCR επαναλαμβανόμενων στοιχείων). Επιπλέον, με τη χρήση ανεξάρτητης από την καλλιέργεια μεταγενετικής προσέγγισης, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της μικροβιακής κοινότητας που απαντάται στον καρπό της ελιάς, στο αρχικό (5 ημέρες), στο ενδιάμεσο (75 ημέρες) και στο τελικό (146 ημέρες) στάδιο της ζύμωσης. Για την ταυτοποίηση των ζυμών χρησιμοποιήθηκε ο γενετικός δείκτης ITS2, ενώ για τα βακτήρια ο *gyrB*.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Δείγματα

Σε προηγούμενη πτυχιακή μελέτη πραγματοποιήθηκε ζύμωση της φυσικής μαύρης ελιάς ποικιλίας «Κονσερβολιά» με εφαρμογή καλλιέργειών εκκίνησης οξυγαλακτικών βακτηρίων με προβιοτικό δυναμικό (Καββαθά, 2019). Ο νωπός ελαιόκαρπος συλλέχθηκε σε κατάλληλο στάδιο ωριμότητας, δηλαδή όταν το χρώμα του μεσοκαρπίου ήταν κατά τα $\frac{3}{4}$ μαύρο, στο πρώτο δεκαήμερο του Νοεμβρίου. Η μεταφορά του νωπού ελαιόκαρπου στο εργαστήριο πραγματοποιήθηκε σε πλαστικούς περιέκτες χωρητικότητας 25 kg εντός 24 ωρών από την παραλαβή του καρπού στο εργοστάσιο στην περιοχή της Κατερίνης. Κατά την παραλαβή στο εργαστήριο, ο καρπός πλύθηκε με πόσιμο νερό, ώστε να απομακρυνθούν ξένες ύλες και πραγματοποιήθηκε ποιοτική διαλογή για την απομάκρυνση ελαττωματικών, χτυπημένων και προσβεβλημένων από έντομα καρπών. Στη συνέχεια οι ελιές τοποθετήθηκαν σε δοχεία ζύμωσης χωρητικότητας 20 λίτρων που περιείχαν 12,7 kg καρπού και περίπου 8 λίτρα άλμη, αλατοπεριεκτικότητας 6% σε NaCl. Αντίστοιχα σε άλλα δοχεία τοποθετήθηκαν ελιές που ζυμώθηκαν σε άλμη μειωμένης αλατοπεριεκτικότητας με μερική υποκατάσταση του χλωριούχου νατρίου κατά 50% από χλωριούχο κάλιο (3% NaCl – 3% KCl). Σκοπός του εν λόγω χειρισμού ήταν η δημιουργία ενός προϊόντος με μειωμένη αλατοπεριεκτικότητα το οποίο παράλληλα θα παρουσιάζει από προβιοτικό δυναμικό.

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

- i. φυσική ζύμωση με την ενδογενή μικροχλωρίδα του καρπού (μάρτυρας)
- ii. ζύμωση με προσθήκη καλλιέργειας εκκίνησης *Lactobacillus pentosus* B363
- iii. ζύμωση με προσθήκη καλλιέργειας εκκίνησης *Lactobacillus plantarum* B380

Για κάθε ζύμωση προετοιμάστηκαν δύο δοχεία για κάθε αλατοπεριεκτικότητα τα οποία τοποθετήθηκαν σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας (20-25°C) όπου και παρέμειναν για όλη τη διάρκεια της ζύμωσης (147 ημέρες).

Για τον προσδιορισμό της επιβίωσης των εναρκτήριων καλλιιεργειών και της κυρίαρχης μικροχλωρίδας με τη χρήση εξαρτώμενων από την καλλιέργεια μοριακών τεχνικών, απομονώθηκαν 160 αποικίες από τον ελαιόκαρπο σε δύο χρονικά σημεία της ζύμωσης και συγκεκριμένα στην αρχή (5 ημέρες) και στο τέλος 146 ημέρες. Η απομόνωση των στελεχών πραγματοποιήθηκε από επιλεκτικό για τα οξυγαλακτικά βακτήρια υπόστρωμα MRS agar (de Man Rogosa – Biolife, Italy) με την προσθήκη αντιβιοτικού (0,05%, w/v, cyclohexamide, Sigma, St. Luis Mo). Η προσθήκη του αντιβιοτικού στοχεύει στην παρεμπόδιση της ανάπτυξης των ζυμομυκήτων.

2.2 Καθαρισμός Στελεχών

Οι παραπάνω 160 αποικίες έχουν ήδη απομονωθεί και αποθηκευτεί σε MRS Broth (Biolife, Italy), σε κρυογονικά φιαλίδια στα οποία είχε προστεθεί 20% γλυκερόλη σε θερμοκρασία -80°C. Πρωταρχικός στόχος ήταν η ανανέωση των καλλιιεργειών και ο καθαρισμός τους ώστε τα τελικά βακτηριακά στελέχη να παρουσιάζουν τα ίδια μορφολογικά χαρακτηριστικά. Αρχικά 100 μL από τα βακτηριακά στελέχη εμβολιάστηκαν σε 5 mL υγρού θρεπτικού υποστρώματος MRS Broth (Biolife, Italy) και επώστηκαν σε θερμοκρασία 30 °C για 24 ώρες. Στη συνέχεια οι επιλεγμένες αποικίες, με τη χρήση μικροβιολογικού κρίκου (μεταλλική θηλιά σύρματος νικελίου) εξαπλώθηκαν (streaking) σε τρυβλία επιστρωμένα με MRS Agar (Biolife, Italy). Τα τρυβλία επώστηκαν σε θερμοκρασία 30 °C για 48 ώρες και ακολούθως πραγματοποιήθηκε η μακροσκοπική παρατήρησή τους, με στόχο σε κάθε τρυβλίο να εμφανίζεται μόνο ένα είδος αποικιών, δηλαδή η καλλιέργεια να είναι καθαρή (pure culture). Στις περιπτώσεις όπου στο τρυβλίο παρατηρήθηκε μικτή καλλιέργεια, η διαδικασία του streaking επαναλαμβάνονταν έως ότου οι αποικίες να παρουσιάσουν σταθερή μορφή-καθαρότητα και τότε αποθηκεύονταν σε θερμοκρασία -80 °C σε cryogenic vials των 2 mL με MRS broth και γλυκερόλη 20% (v/v). Όλες οι απομονώσεις υποβλήθηκαν σε χρώση Gram, τεχνική καταλάσης και μικροσκοπική παρατήρηση.

2.3 Μοριακές αναλύσεις εξαρτώμενες από την καλλιέργεια (culture-dependent)

Στη συνέχεια το σύνολο των καθαρών απομονώσεων, όπως επιβεβαιώθηκαν με τις παραπάνω διαδικασίες, υποβλήθηκαν σε περαιτέρω μοριακές αναλύσεις.

2.3.1 Εξαγωγή γενετικού υλικού (DNA) από τις βακτηριακές απομονώσεις

Σκοπός της διαδικασίας αυτής είναι η απομόνωση του ολικού γενωμικού DNA από τα οξυγαλακτικά βακτήρια.

- I. Το πρώτο βήμα για την εξαγωγή του DNA είναι ο καθαρισμός των καλλιιεργειών όπως περιγράφεται παρακάτω:
 - Αρχικά πραγματοποιήθηκε ανανέωση της καθαρής καλλιέργειας με εμβολιασμό σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα MRS broth από τα φιαλίδια με τις καθарές απομονώσεις που βρίσκονται αποθηκευμένα σε θερμοκρασία -80 °C. Οι καλλιέργειες επώαστηκαν σε θερμοκρασία 30 °C για 24 ώρες.
 - Συλλογή των καθαρισμένων καλλιιεργειών σε φιαλίδιο τύπου eppendorf 2mL από σωληνάκι με MRS broth, στο οποίο είχαν εμβολιαστεί και αναπτυχτεί οι βακτηριακές αποικίες.
 - Φυγοκέντριση για 10 λεπτά σε 5000g σε θερμοκρασία 4 °C.
 - Απόχυση υπερκείμενου και επαναιώρηση των κυττάρων σε 1 mL Ringer solution. Έντονη ανάδευση για 5 δευτερόλεπτα.
 - Φυγοκέντριση για 10 λεπτά σε 5000g σε θερμοκρασία 4 °C.
 - Απόχυση του υπερκείμενου υγρού, δυνατότητα αποθήκευσης του ιζήματος των κυττάρων σε θερμοκρασία -20 °C.
- II. Στη συνέχεια για την λύση των κυττάρων πραγματοποιείται επαναδιάλυση της βιομάζας από τους -20 °C σε 0,5 mL διαλύματος λυσοζύμης με τη συγκέντρωση του ενζύμου στα 25 ng/mL.
 - Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία 37 °C για 2 ώρες με περιοδική ήπια ανάδευση κάθε 30 λεπτά και στη συνέχεια έντονη ανάδευση για 30 δευτερόλεπτα.
 - Φυγοκέντριση για 10 λεπτά σε 17000g σε θερμοκρασία 4 °C και απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού.
 - Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 0,5 mL ρυθμιστικού διαλύματος που αποτελείται από 50 mM Tris και 20 mM EDTA, ένα ελαφρά αλκαλικό διάλυμα με pH 7-8. Οι νουκλεάσες θεωρητικά είναι λιγότερο δραστικές σε αυτές τις τιμές pH, αλλά παράλληλα το διάλυμα μπορεί ασφαλώς να χρησιμοποιηθεί για την αποθήκευση του DNA. Το EDTA αδρανοποιεί τις

νουκλεάσες (που διασπούν το DNA), δεσμεύοντας τα μεταλλικά κατιόντα που απαιτούνται για τη δράση αυτών των ενζύμων.

- Προσθήκη 50 μL 10% SDS (Sodium dodecyl sulfate) και επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 65 °C. Το αντιδραστήριο SDS είναι ένα "απορρυπαντικό" που αποικοδομεί δευτεροταγείς και μη-δισουλφιδικά συνδεδεμένες τριτοταγείς πρωτεϊνικές δομές. Οι πρωτεΐνες που έχουν δεσμευτεί με το SDS παύουν να είναι λειτουργικές καθώς χάνουν την τριτοταγή δομή τους.
- Προσθήκη 0,2 mL οξικού καλίου και παραμονή στον πάγο για 30 λεπτά.
- Φυγοκέντριση για 10 λεπτά σε 17000g σε θερμοκρασία 4 °C, μεταφορά υπερκείμενου σε νέο φιαλίδιο τύπου eppendorf και επανάληψη της φυγοκέντρισης στις ίδιες συνθήκες.
- Μεταφορά, ξανά του υπερκείμενου σε νέο φιαλίδιο τύπου eppendorf και προσθήκη 0,7 mL ισοπροπανόλης, που βρίσκεται αποθηκευμένη σε θερμοκρασία -20 °C, παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά, ελαφριά ανάδευση.
- Φυγοκέντριση για 10 λεπτά σε 17000g σε θερμοκρασία 4 °C και απόχυση υπερκείμενου.
- Προσθήκη 0,5 mL αιθανόλης 70% v/v, που βρίσκεται αποθηκευμένη σε θερμοκρασία -20 °C και επανάληψη της φυγοκέντρισης στις ίδιες συνθήκες.
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού, προσθήκη ξανά 0,5 mL αιθανόλης 70% v/v και επανάληψη της φυγοκέντρισης στις ίδιες συνθήκες. Απόχυση υπερκείμενου.
- Αναμονή έως ότου εξατμιστεί πλήρως η αιθανόλη
- Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 50 μL αποστειρωμένο νερό.

2.3.2 Μέτρηση ποσότητας και καθαρότητας DNA στο φασματοφωτόμετρο

Nanophotometer της εταιρείας Implen

Η μέτρηση της ποσότητας και καθαρότητας του εξαχθέντος DNA προσδιορίστηκε με τη χρήση φασματοφωτόμετρου Nanophotometer (Implen, Πόλη, χώρα). Η μέθοδος της φασματοφωτομετρίας βασίζεται στην ιδιότητα των μορίων να απορροφούν εκλεκτικά μέρος της ακτινοβολίας του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Η φασματοφωτομετρία υπεριώδους/ορατού (UV/Vis) είναι η περισσότερο χρησιμοποιούμενη αναλυτική μέθοδος στη βιοχημεία και γενετική. Για κάθε χημική

ένωση υπάρχει ένα χαρακτηριστικό μήκος κύματος ($\lambda_{\max}$) στο οποίο εμφανίζεται η μέγιστη απορρόφηση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Τα νουκλεϊκά οξέα εμφανίζουν το μέγιστο της απορρόφησής τους στα 260 nm, οι πρωτεΐνες στα 280 nm, ενώ στα 230 nm απορροφούν άλλες ουσίες όπως φαινόλες και υδατάνθρακες. Το αποτέλεσμα που λαμβάνουμε από τη μέτρηση στο φωτόμετρο είναι η ποσότητα του νουκλεϊκού οξέος (ng) ανά όγκο διαλύματος (μL). Τα αποτελέσματα της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του δείγματος παρουσιάζονται ως ο λόγος 260/280 nm, με ικανοποιητικές τιμές μεταξύ 1,8 και 2. Τιμές μικρότερες από 1,8 είναι ενδεικτικές της ύπαρξης προσμίξεων, συνήθως πρωτεϊνών ή φαινόλης που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διαδικασία της απομόνωσης. Ως συμπληρωματικό μέτρο της καθαρότητας των νουκλεϊκών οξέων χρησιμοποιείται ο λόγος 260/230. Τιμές του λόγου 260/230 > 2 υποδηλώνουν δείγματα καθαρών νουκλεϊκών οξέων, παράγοντες όμως όπως πρωτεΐνες, άλατα, ουρία, φαινόλη και υδατάνθρακες, απορροφούν στα 230 nm μειώνοντας τον λόγο αυτό. Στο τέλος της φωτομέτρησης, τα δείγματα υποβλήθηκαν σε αραίωση με ddH₂O ώστε να έχουν την επιθυμητή συγκέντρωση για το πρωτόκολλο της rep-PCR που εφαρμόστηκε στη συνέχεια.

2.3.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης επαναλαμβανόμενων στοιχείων (rep-PCR)

Για τη διάκριση των διάφορων γενοτύπων όλα τα διαθέσιμα βακτηριακά στελέχη (160 απομονώσεις) υποβλήθηκαν σε δοκιμές rep-PCR στον θερμικό κυκλοποιητή ProFlex PCR System (applied biosystems), με τη χρήση των εκκινητών BOXAIR και GTG₅.

Εκκινητές:

- BOXAIR: 5'- CTACGGCAAGGCGACGCTGACG -3'
- GTG₅: 5'- GTGGTGGTGGTGGTG -3'

Τα στάδια της rep-PCR με τη χρήση των παραπάνω εκκινητών είχαν ως εξής:

- Αποδιάταξη δίκλωνου μορίου DNA (92-95 °C)
- Ζευγάρωμα των ολιγονουκλεοτιδίων με τα συμπληρωματικά τμήματα του DNA- Υβριδοποίηση εκκινητών (40 °C)
- Επιμήκυνση της αλυσίδας με τη δράση της Taq πολυμεράσης (72 °C)
- Ακολουθεί επανάληψη των σταδίων 1-3 για 30 περίπου κύκλους σύμφωνα με το πρωτόκολλο (Πίνακας 2.3 & 2.4).

Στην rep-PCR χρησιμοποιήθηκαν επίσης:

- ένα ρυθμιστικό διάλυμα (loading buffer) για τη σταθερότητα του ιονικού περιβάλλοντος της αντίδρασης το οποίο περιείχε:
- χλωριούχο μαγνήσιο ($MgCl_2$) για τη ρύθμιση του υβριδισμού των εκκινητών στο υπόστρωμα DNA, αυξάνοντας την εξειδίκευση του υβριδισμού και τριφωσφορικά δεσοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs), τα οποία αποτελούν τα κύρια συστατικά της αλυσίδας DNA που θα συνθέσει η Taq πολυμεράση. (Πίνακας 2.1 & 2.2)

Πίνακας 2.1. Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στις δοκιμές rep-PCR με τη χρήση του εκκινητή BOXAIR

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά αντίδραση
OneTaq-quick load 2x Mastermix with standard buffer (New England Biolands, UK)	12,5 μ L
BOXAIR εκκινητής 7,5 pmol/ μ L	1 μ L
Double distilled water	10,5 μ L
DNA template	30 ng/ μ L
Τελικός όγκος	25 μ L

Πίνακας 2.2. Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στις δοκιμές rep-PCR με τη χρήση του εκκινητή GTG5

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά αντίδραση
OneTaq-quick load 2x Mastermix with standard buffer (New England Biolands, UK)	12,5 μ L
BOXAIR εκκινητής 10Mμ	1 μ L
Double distilled water	10,5 μ L
DNA template	50 ng/ μ L
Τελικός όγκος	25 μ L

Πίνακας 2.3. Διάρκεια και θερμοκρασίες σε κάθε στάδιο της τεχνικής rep-PCR με τη χρήση του εκκινητή BOXAIR

Στάδιο	Θερμοκρασία	Κύκλοι	Διάρκεια
Προαποδιάταξη	92 °C	1	2 min
Αποδιάταξη	92 °C	30	30 sec
Υβριδισμός	40 °C		2 min
Επιμήκυνση	72 °C		3 min
Τελική επιμήκυνση	72 °C	1	15 min
Παραμονή/Αποθήκευση	4 °C	1	-

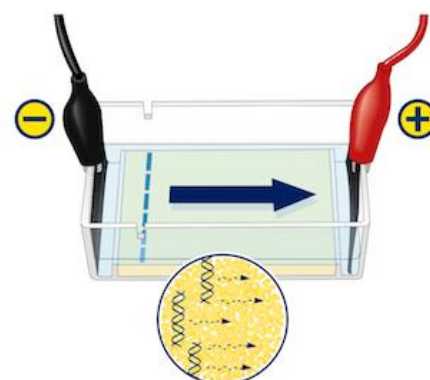
Πίνακας 2.4. Διάρκεια και θερμοκρασίες σε κάθε στάδιο της τεχνικής rep-PCR με τη χρήση του εκκινητή GTG₅

Στάδιο	Θερμοκρασία	Κύκλοι	Διάρκεια
Προαποδιάταξη	95 °C	1	2 min
Αποδιάταξη	94 °C	30	30 sec
Υβριδισμός	40 °C		1 min
Επιμήκυνση	72 °C		4 min
Τελική επιμήκυνση	65 °C	1	8 min
Παραμονή/Αποθήκευση	4 °C	1	-

2.3.4 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης και ανίχνευση των προϊόντων της rep-PCR

Η διαδικασία παρασκευής της πηκτής αгарόζης 1,5% (w/v) ήταν η εξής:

- Ζυγίστηκαν 1,5 g αгарόζης τα οποία προστέθηκαν σε 100 mL διαλύματος TAE.
- Θέρμανση του μίγματος σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρις ότου καταστεί απολύτως διαυγές και ομογενοποιημένο το μίγμα.
- Το μίγμα στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης (Gel Doc XR, Biorad) στην οποία είχε τοποθετηθεί ειδική χτένα.



Εικόνα 2.2. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης. Τα μόρια των νουκλεϊκών οξέων κινούνται προς τον θετικό πόλο

Ακολούθησε στερεοποίηση του μίγματος σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min.

- Απομάκρυνση της ειδικής χτένας και προσθήκη διαλύματος TAE 1 X για την πλήρη κάλυψη της αγαρόζης.

Σε κάθε προϊόν της PCR, προστέθηκαν 3 μL της χρωστικής ουσίας κυανό της βρωμοθυμόλης και στη συνέχεια ποσότητα 8-9 μL από κάθε δείγμα τοποθετήθηκαν στα κενά βοθρία της πηκτής αγαρόζης. Στο πρώτο κενό βοθρίο προστέθηκαν 3,5 μL δείκτη μοριακών βαρών από τον DNA Ladder 1 Kb (Cleaver Scientific Ltd, UK). Ο διαχωρισμός των θραυσμάτων του DNA πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση της πηκτής αγαρόζης στα 100 V για 75 min. Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης ακολούθησε χρώση της πηκτής με βρωμιούχο αιθίδιο για 20 λεπτά.

2.3.5 Φωτογράφιση και έλεγχος της πηκτής αγαρόζης

Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης οπτικοποιούνται με τη βοήθεια συσκευής που εκπέμπει υπεριώδη ακτινοβολία (UV Transilluminator) ώστε να είναι ορατές με ευκρίνεια οι ζώνες που έχουν δημιουργηθεί, από τις ακολουθίες DNA που έχουν ενισχυθεί. Η συσκευή εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας συνδέεται με ειδική ψηφιακή φωτογραφική μηχανή και έτσι οι πηκτές αγαρόζης φωτογραφίζονται άμεσα. Το σύστημα συνδέεται με ηλεκτρονικό υπολογιστή και με τη βοήθεια ενός ειδικού λογισμικού προγράμματος, γίνεται επεξεργασία και αποθήκευση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης. Στόχος η ταυτοποίηση των δειγμάτων σε επίπεδο στελεχών με τη χρήση του αλγορίθμου UPGMA του προγράμματος Bionumerics (Applied Maths, Keistraat, Belgium).

2.3.6 Ομαδοποίηση στελεχών με χρήση του προγράμματος Bionumerics

Η μετατροπή, κανονικοποίηση και περαιτέρω ανάλυση πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τον συντελεστή Dice και ανάλυση συμπλέγματος UPGMA με το λογισμικό πακέτο Bionumerics, έκδοση 6.1 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). Ο αλγόριθμος UPGMA κατασκευάζει ένα δενδρόγραμμα το οποίο αντικατοπτρίζει τις τιμές ομοιότητας κατά ζεύγη, βάσει του συντελεστή ομοιότητας Dice. Κατ' αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται η ομαδοποίηση των στελεχών προς εξαγωγή συμπερασμάτων. Στη συνέχεια, με βάση την ομαδοποίηση που προέκυψε, επιλέχθηκαν αντιπροσωπευτικά στελέχη για ταυτοποίηση μέσω της ενίσχυσης και αλληλούχισης των περιοχών V1-V3 του γονιδίου 16S.

2.3.7 Έλεγχος ποιότητας και ταυτοποίηση των απομονώσεων

Για την ταυτοποίηση των απομονώσεων πραγματοποιήθηκε τεχνική PCR, με στόχο την ενίσχυση των υπερ-μεταβλητών περιοχών V1-V3 του γονιδίου 16S rRNA (ριβοσωμικό RNA), το οποίο αποτελεί ένα συστατικό της υπομονάδας του προκαρυωτικού ριβοσώματος 30S. Η διάρκεια και οι θερμοκρασίες σε κάθε στάδιο της αντίδρασης φαίνονται στον Πίνακα 2,5, ενώ οι ποσότητες αντιδραστηρίων για την τεχνική 16S PCR στον Πίνακα 2,6. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι ακόλουθοι:

- P₁V₁: 5'- GCGGCGTGCCTAATACATGC- 3'
- P₄V₃: 5'- ATCTACGCATTTACCGCTAC- 3'

Πίνακας 2.5. Διάρκεια και θερμοκρασίες σε κάθε στάδιο της αντίδρασης 16S PCR

Στάδιο	Θερμοκρασία	Κύκλοι	Διάρκεια
Προαποδιάταξη	94 °C	1	2 min
Αποδιάταξη	94 °C	30	30 sec
Υβριδισμός	56 °C		30 sec
Επιμήκυνση	72 °C		90 sec
Τελική επιμήκυνση	72 °C	1	15
Παραμονή/Αποθήκευση	4 °C	1	-

Πίνακας 2.6. Ποσότητες αντιδραστηρίων για την τεχνική 16S PCR

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά αντίδραση
Loading Buffer 10x (Kapa Biosystems, USA)	12,5 µL
P1V1 ανοδικός εκκινητής	1 µL
P4V3 καθοδικός εκκινητής	1 µL
10Mm dNTPs (Kapa Biosystems, USA)	1 µL
Taq polymerase (Kapa Biosystems, USA)	2 µL
Double distilled water	39,8 µL

DNA template	30-50 ng/μL
Τελικός όγκος	50 μL

2.3.8 Καθαρισμός των προϊόντων της PCR

Απαραίτητο βήμα πριν σταλούν τα δείγματα για αλληλούχιση είναι ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης στην πηκτή αγαρόζης όπου διαπιστώθηκε η επιμήκυνση των δειγμάτων, ακολουθεί ο καθαρισμός με τη χρήση του NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up της Macherey-Nagel σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας, όπως περιγράφεται παρακάτω.

- Αρχικά προστίθεται στα δείγματα αποστειρωμένο νερό μέχρι να συμπληρωθούν τα 100 μL και ακολούθως 200 μL ρυθμιστικό διάλυμα πρόσδεσης NT1.
- Η στήλη χαλαζία NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up τοποθετείται σε φιαλίδιο 2 mL, τύπου eppendorf. Μέσα στη στήλη φορτώνονται 700 μL δείγματος και στη συνέχεια ακολουθεί φυγοκέντριση για 30 δευτερόλεπτα σε 11.000g. Το υγρό που διαπερνά τη στήλη απορρίπτεται και το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται έως ότου φορτωθεί όλη η ποσότητα του δείγματος.
- Στη στήλη προστίθενται 700 μL διαλύματος έκπλυσης NT3 με αιθανόλη και ακολουθεί φυγοκέντριση για 30 δευτερόλεπτα σε 11.000g. Το υγρό που διαπερνά τη στήλη απορρίπτεται. Αυτό το βήμα έκλουσης επαναλαμβάνεται.
- Φυγοκέντριση για 1 λεπτό σε 11.000g για την πλήρη απομάκρυνση του διαλύματος NT3.
- Τοποθέτηση της στήλης σε νέο φιαλίδιο 1,5 mL, τύπου eppendorf. Προσθήκη 20 μL ελαφρώς αλκαλικού ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης NE.
- Επώση σε θερμοκρασία δωματίου (18-25 °C) για 1 λεπτό.
- Φυγοκέντρωση για 1 λεπτό σε 11.000g.
- Αποθήκευση καθαρού DNA σε θερμοκρασία -20 °C
- Μέτρηση συγκέντρωσης και καθαρότητας DNA στο φασματοφωτόμετρο

2.3.9 Αλληλούχιση

Τελικό στάδιο για την μοριακή ταυτοποίηση των στελεχών είναι η αλληλούχιση, διαδικασία κατά την οποία προσδιορίζεται η πρωτοταγής δομή ενός

μορίου, πιο συγκεκριμένα η σειρά των νουκλεοτιδίων της αλληλουχίας στόχου των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Το DNA που λήφθηκε στάλθηκε στην εταιρεία Cemia (<http://cemia.eu/>) προς αλληλούχιση. Οι αλληλουχήσεις έγιναν και προς τις δύο κατευθύνσεις, χρησιμοποιώντας τον ανοδικό και τον καθοδικό εκκινητή.

2.3.10 Ταυτοποίηση στελεχών

Μετά την αλληλούχιση των απομονώσεων ακολουθεί η ταυτοποίησή τους, με τη χρήση της μηχανής αναζήτησης BLAST (Basic Local Alignment Tool) του NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST/>). Η ταυτοποίηση των στελεχών, μέσω του προγράμματος BLAST, επιτυγχάνεται βάση της ομοιότητάς τους με ταυτοποιημένα στελέχη, που είναι ήδη καταχωρημένα στη βάση δεδομένων. Το πρόγραμμα BLAST αναζητά ομόλογες γονιδιακές αλληλουχίες, ανιχνεύοντας στατιστικά σημαντική ομοιότητα, η οποία αποτελεί ισχυρή απόδειξη ότι οι δύο αλληλουχίες σχετίζονται μεταξύ τους μέσω εξελικτικών μεταβολών από μια κοινή προγονική αλληλουχία (Pearson, 2013). Εκτός από την ομοιότητα της αλληλουχίας, δηλαδή το ποσοστό ταύτισης με τις καταχωρημένες ακολουθίες, λαμβάνεται υπόψη και η τιμή E[expect] value, η οποία αποτελεί το μέτρο ταξινόμησης, και στατιστικά σημαντικές ευθυγραμμίσεις θα πρέπει να είναι κοντά στο μηδέν (Newberg, 2008).

2.4 Μεταγενετική Ανάλυση

2.4.1 Συλλογή δειγμάτων και εξαγωγή DNA

Ελαιόκαρποι από τις ζυμώσεις που αναφέρθηκαν στην παράγραφο 2.1, παραλήφθηκαν μέσω τυχαίας δειγματοληψίας από τα δοχεία σε τρία διαφορετικά χρονικά σημεία της ζύμωσης (0, 75 και 146 ημέρες) και αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία -20 °C. Τα χρονικά σημεία της δειγματοληψίας επιλέχθηκαν προκειμένου να αντιστοιχούν στην έναρξη, στο μέσο και στο τελικό σημείο της ζύμωσης. Τόσο η δειγματοληψία όσο και η αποθήκευσή τους πραγματοποιήθηκε υπό ασηπτικές συνθήκες. Συνολικά 18 δείγματα ελαιόκαρπου από τα τρία διαφορετικά σημεία και τις δύο αλατοπεριεκτικότητες της άλμης (3% NaCl – 3% KCl και 6% NaCl) υποβλήθηκαν σε μεταγενετική ή metabarcoding ανάλυση για τον προσδιορισμό της μικροβιακής κοινότητας του καρπού.

Η απομόνωση του μικροβιακού γενωμικού DNA από τους καρπούς της ελιάς πραγματοποιήθηκε με το DNeasy® PowerSoil® Kit της εταιρείας Qiagen σύμφωνα

με το πρωτόκολλο της εταιρείας. Μετά την εξαγωγή το DNA αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασίες -20 με -80 °C για περαιτέρω αναλύσεις. Η μέτρηση της συγκέντρωσης και της ποιότητας του συνολικού γενωμικού υλικού που απομονώθηκε από τους καρπούς της ελιάς πραγματοποιήθηκε με το φασματοφωτόμετρο NanoPhotometer (Implen) όπως περιγράφεται παραπάνω.

2.4.2 Κατασκευή βιβλιοθηκών και Miseq αλληλούχιση

Η διαδικασία περιλαμβάνει την κατασκευή βιβλιοθηκών DNA μέσω δυο κύκλων PCR. Στην αρχική PCR, η παρουσία των βακτηρίων ταυτοποιήθηκε με ενίσχυση του γονιδίου *gyrB* χρησιμοποιώντας τους εκκινητές F64 (5'-MGNCCNGSNATGTAYATHGG-3') και R353 (5'-CNC CRTGNARDCCDCCNGA-3'). Η περιοχή του γονιδίου *gyrB* που ενισχύθηκε έχει μέγεθος, περίπου 350 ζεύγη βάσεων. Όσον αφορά στις ζύμες, για την ενίσχυση της γονιδιακής περιοχής ITS2 χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές ITS3 (5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3') και ITS4 (5'-TCCTCCGCTTWTGWTGTGC-3'). Το μέγεθος του προϊόντος που παράγεται ποικίλει καθώς οι ζύμες παρουσιάζουν υψηλή ποικιλομορφία. Στα δύο ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση της γονιδιακής περιοχής *gyrB* για τα βακτήρια και ITS για τις ζύμες, υβριδοποιούνται ολιγονουκλεοτίδια (linkers) με ανοδική και καθοδική κατεύθυνση μαρκάροντας την αλληλουχία στόχο. Για την γονιδιακή περιοχή *gyrB* χρησιμοποιήθηκαν οι προσαρμογείς (linkers) 5'-CTTTCCTACAC GACGCTCTTCCGATCT-3' και 5'-GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT-3', ενώ για την ITS οι 5'-CTTTCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-3' και 5'-GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT-3', αντίστοιχα. Στην PCR που πραγματοποιήθηκε για την ταυτοποίηση βακτηρίων και ζυμών χρησιμοποιήθηκε η AccuPrime Taq πολυμεράση (Invitrogen, Carlsbad, USA). Οι συνθήκες στον θερμικό κυκλοποιητή για την αντίδραση PCR που στοχεύει τα γονίδια *gyrB* και ITS παρουσιάζονται στους Πίνακες 2.7 και 2.8, αντίστοιχα, ενώ οι συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στις δοκιμές PCR με τον εκκινητή *gyrB* και ITS παρουσιάζονται στους Πίνακες 2.9 και 2.10, αντίστοιχα.

Πίνακας 2.7. Διάρκεια και θερμοκρασίες σε κάθε στάδιο της τεχνικής PCR με τη χρήση του εκκινητή gylB.

Στάδιο	Θερμοκρασία	Κύκλοι	Διάρκεια
Προαποδιάταξη	94 °C	1	2 min
Αποδιάταξη	94 °C	35	30 sec
Υβριδισμός	55 °C		60 sec
Επιμήκυνση	68 °C		90 sec
Τελική επιμήκυνση	68 °C	1	10 min

Πίνακας 2.8. Διάρκεια και θερμοκρασίες σε κάθε στάδιο της τεχνικής PCR με τη χρήση του εκκινητή ITS.

Στάδιο	Θερμοκρασία	Κύκλοι	Διάρκεια
Προαποδιάταξη	94 °C	1	60 sec
Αποδιάταξη	94 °C	30	60 sec
Υβριδισμός	55 °C		60 sec
Επιμήκυνση	72 °C		60 sec
Τελική επιμήκυνση	72 °C	1	10 min

Πίνακας 2.9. Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στις δοκιμές PCR με τη χρήση του εκκινητή gylB.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά αντίδραση
10x AccuPrime™ PCR Buffer II	5 µL
Forward primer - 64F 20µM	5 µL
Reverse primer – 353R 20µM	5 µL
AccuPrime Taq polymerase	1 µL
Double distilled water	29 µL
DNA template	5 µL (10 ng/µL)
Τελικός όγκος	50 µL

Πίνακας 2.10. Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στις δοκιμές PCR με τη χρήση του εκκινητή ITS.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά αντίδραση
10x AccuPrime™ PCR Buffer II	5 µL
Forward primer – ITS3 10µM	1 µL
Reverse primer – ITS4 10µM	1 µL
AccuPrime Taq polymerase	1 µL
Double distilled water	37 µL
DNA template	5 µL (10 ng/µL)
Τελικός όγκος	50 µL

Τέλος τα PCR-προϊόντα στάλθηκαν για αλληλούχιση στο Εθνικό Ινστιτούτο Αγροτικής Έρευνας της Γαλλίας, (French National Institute for Agricultural Research, INRA Unité FLEC), όπου πραγματοποιήθηκε ο 2^{ος} κύκλος PCR (multiplex Illumina Miseq PCR) στον οποίο προσδένονται στις αλληλουχίες οι κωδικοί ιχνηλασιμότητας, η Miseq αλληλούχιση, όπως επίσης και η αξιολόγηση της ποιότητας των αλληλουχιών.

2.4.3. Ανάλυση δεδομένων

Στην συνέχεια ακολούθησε επεξεργασία των δεδομένων στη πλατφόρμα Galaxy (galaxy.migale.inra.fr) μέσω του εργαλείου FROGS (Find Rapidly OTUs with Galaxy Solution). Αρχικά έλαβε χώρα μια προεργασία κατά την οποία συνήθως απομακρύνονται ακολουθίες με μη αναμενόμενο μήκος, με ασαφείς βάσεις (N) ή διπλές αλληλουχίες (de-replication) και ακολούθως πραγματοποιείται ομαδοποίηση χρησιμοποιώντας την στατιστική μέθοδο SWARM (γρήγορη μέθοδο ομαδοποίησης για μελέτες αλληλούχισης μιας συγκεκριμένης γονιδιακής περιοχής) με απόσταση 3 (aggregation distance). Οι χίμαιρες αφαιρέθηκαν με vsearch. Στην συνέχεια εφαρμόστηκαν φίλτρα για την απομάκρυνση OTUs με μειωμένη αφθονία και χαμηλή συχνότητα. Τα φίλτρα που εφαρμόστηκαν αφορούσαν την αφαίρεση των OTUs που δεν εμφανίζονταν σε τουλάχιστον δύο δείγματα και δεν είχαν τουλάχιστον το 0,05% της σχετικής αφθονίας στο σύνολο των δεδομένων για τις ζύμες και το 0,01% για τα βακτήρια. Η ταξινόμηση των OTUs που αντιστοιχούν στο *gyrB* γονίδιο πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας την βάση δεδομένων αναφοράς *gyrB*, ενώ για την ITS2 γονιδιακή περιοχή των ζυμών χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων ITS

units7.1. Και οι δυο βάσεις δεδομένων έχουν αναπτυχθεί στην πλατφόρμα Galaxy. Επίσης, και στις δυο περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε επιπρόσθετα το Blastn+ algorithm.

Η ποικιλομορφία των βακτηρίων και των ζυμών αναλύθηκε με την χρήση του πακέτου Phyloseq στο στατιστικό πρόγραμμα R version 3.6.1. Η αφθονία των OTUs κανονικοποιήθηκε χρησιμοποιώντας την διάμεσο του βάθους αλληλούχισης των δειγμάτων ελιάς. Η ανάλυση και οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων της μεταγενετικής ανάλυσης στη παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη πραγματοποιήθηκε από την υποψήφια διδάκτορα Ευανθία Μάνθου.

Η κωδικοποίηση των δειγμάτων στα οποία εφαρμόστηκε μεταγενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκε ως εξής: Το πρώτο σύμβολο G ή I αναφέρεται στον γενετικό δείκτη που χρησιμοποιήθηκε, *gyrB* για την ταυτοποίηση των βακτηρίων και ITS2 για τις ζύμες. Ακολούθως, τα επόμενα τρία σύμβολα (000, 075, 146) αφορούν στα τρία διαφορετικά χρονικά σημεία της ζύμωσης (0, 75 και 146 ημέρες). Στη συνέχεια, η ένδειξη ST αφορά στην παρουσία καλλιέργειας εκκίνησης (ST0: ζύμωση με την αυτόχθονη μικροχλωρίδα, ST1: ζύμωση με καλλιέργεια εκκίνησης *L. pentosus* B363, ST2: ζύμωση με καλλιέργεια εκκίνησης *L. plantarum* B380). Τέλος, ο συμβολισμός S αναφέρεται στην αλατοπεριεκτικότητα της άλμης (S3: 3% NaCl – 3% KCl και S6: 6% NaCl).

3. Αποτελέσματα-Συζήτηση

3.1 Αποτελέσματα culture-dependent μοριακής ανάλυσης

Οι 160 καλλιέργειες οξυγαλακτικών βακτηρίων που έχουν ήδη απομονωθεί στο εργαστήριο από δειγματοληψία σε καρπό ελιάς υποβλήθηκαν επιτυχώς σε ανανέωση και καθαρισμό. Η καθαρότητα των καλλιεργειών εξακριβώθηκε με μακροσκοπική παρατήρηση της μορφολογίας των απομονώσεων. Επιπλέον πραγματοποιήθηκε χρώση Gram και τεχνική καταλάσης. Όλα τα βακτήρια βρέθηκαν θετικά κατά Gram και αρνητικά στην τεχνική καταλάσης. Επίσης κατά την μικροσκοπική παρατήρηση της μορφολογίας των βακτηρίων βρέθηκαν βάκιλοι και κόκκοι.



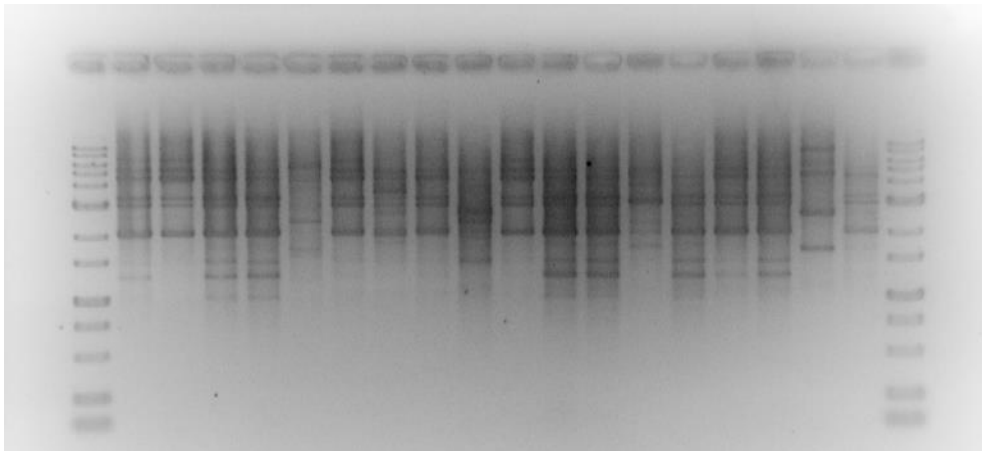
Εικόνα 3.1 Καθαρή καλλιέργεια οξυγαλακτικών βακτηρίων σε τρυβλίο με MRS agar

3.1.1 Ομαδοποίηση με τη μέθοδο rep-PCR

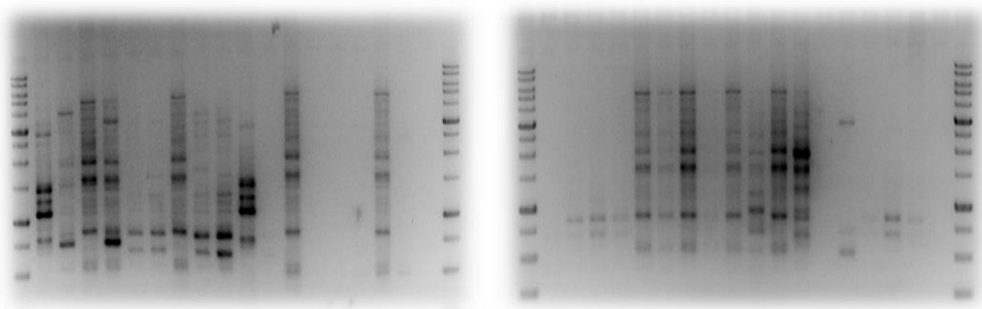
Το πρώτο βήμα για την εξαρτώμενη από την καλλιέργεια μοριακή ανάλυση ήταν η απομόνωση του βακτηριακού γενωμικού υλικού, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην ενότητα 2.5.1, ώστε να εφαρμοστεί η τεχνική rep-PCR για την ενίσχυση συγκεκριμένων τμημάτων του DNA. Στη συνέχεια τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης για να λάβουμε τα αποτυπώματα από τις 160 βακτηριακές απομονώσεις, με τη χρήση των εκκινητών GTG5 και BOXAIR. Οι εικόνες των ηλεκτροφορήσεων αναλύθηκαν με το πρόγραμμα Bionumerics, με το οποίο τα στελέχη ομαδοποιήθηκαν με βάση τα ποσοστά ομοιότητας των ηλεκτροφορητικών τους προφίλ. Λόγω της διαφορετικότητας των αποτυπωμάτων των ζωνών με τη χρήση του εκκινητή GTG5, ο διαχωρισμός μεταξύ των διαφορετικών στελεχών πραγματοποιήθηκε με επιτυχία (Εικ. 3.2).

Όσον αφορά τον εκκινητή BOXAIR αν και ήταν ξεκάθαρα διαφορετικός ο φαινότυπος των ζωνών μεταξύ των δύο εναρκτήριων καλλιεργειών (*L. plantarum* B380 και *L. pentosus* B363) παρουσιάστηκε αδυναμία αποτύπωσης πλούσιου φαινοτύπου σε πληθώρα απομονώσεων, με αποτέλεσμα η σύγκριση των διαφόρων προφίλ με αυτά των καλλιεργειών εκκίνησης να μην είναι αξιόπιστη. Επιπλέον πολλά γενετικά προφίλ απομονώσεων που φαίνονταν όμοια με αυτό του εμβολίου *L.*

pentosus B363, τελικά όπως προέκυψε από την αλληλούχιση του γονιδίου 16S rRNA ανήκαν στο βακτήριο *L. mesenteroides* (Εικ. 3.3).

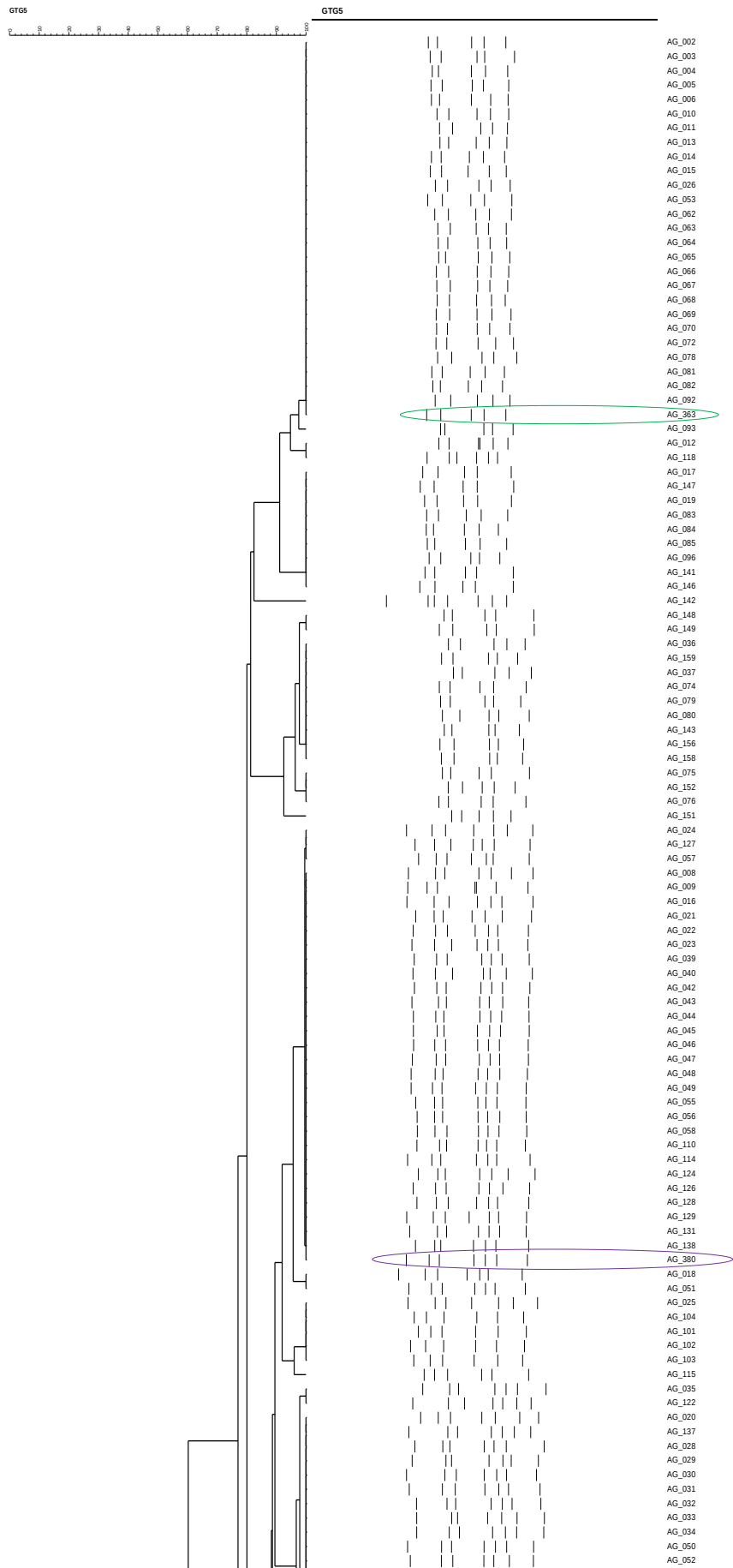


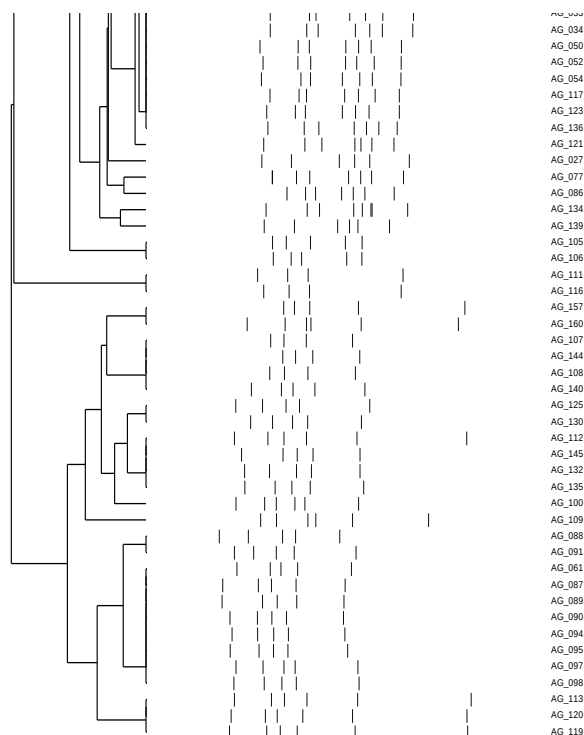
Εικόνα 3.2 Ενδεικτική εικόνα στην οποία φαίνονται προϊόντα από gel ηλεκτροφόρησης rep-PCR με τον εκκινητή GTG5. Στα δύο άκρα της εικόνας βρίσκεται ο μοριακός δείκτης Ladder 1kb.



Εικόνα 3.3 Ενδεικτικές εικόνες στην οποία φαίνονται προϊόντα από gel ηλεκτροφόρησης rep-PCR με τον εκκινητή BOXAIR. Στα δύο άκρα της εικόνας βρίσκεται ο μοριακός δείκτης Ladder 1kb.

Κατά την ομαδοποίηση και την κατασκευή του δενδρογράμματος στο πρόγραμμα Bionumerics, προστέθηκαν και τα γενετικά προφίλ των επιλεγμένων στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων που χρησιμοποιήθηκαν ως καλλιέργειες εκκίνησης (*L. plantarum* B380 και *L. pentosus* B363), καθώς στόχος μας σε αυτό στάδιο ήταν ο προσδιορισμός της επιβίωσης των εναρκτήριων καλλιεργειών. Στην Εικόνα 3.4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ομαδοποίησης από το πρόγραμμα Bionumerics με βάση τα ποσοστά ομοιότητας των ηλεκτροφορητικών προφίλ των βακτηρίων όπως προέκυψαν με τη μέθοδο rep-PCR. Από την culture-dependent μοριακή ανάλυση με τον εκκινητή GTG5, οι 160 βακτηριακές απομονώσεις χωρίστηκαν σε 3 ομάδες με γνώμονα τα γενωμικά αποτυπώματα που προέκυψαν.

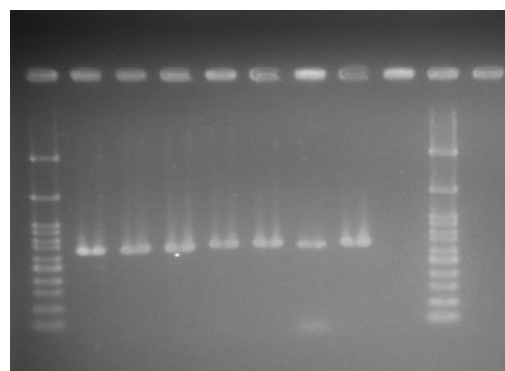




Εικόνα 3.4. Ομαδοποίηση στελεχών με την μέθοδο rep – PCR σύμφωνα με τα αποτελέσματα του προγράμματος Bionumerics

3.1.2 Ταυτοποίηση στελεχών με την αλληλούχιση του γονιδίου 16S rDNA

Μετά την ομαδοποίηση των βακτηριακών απομονώσεων με το πρόγραμμα Bionumerics επιλέχθηκαν αντιπροσωπευτικά στελέχη από κάθε διαφορετικό αποτύπωμα για να σταλούν προς αλληλούχιση. Για την ταυτοποίηση των βακτηρίων ενισχύθηκε το γονίδιο 16S, μέσω της τεχνικής PCR (Εικόνα 3.5). Οι αλληλουχίες DNA των απομονώσεων συγκρίθηκαν με αλληλουχίες που υπάρχουν στη βάση δεδομένων GenBank και οι μικροοργανισμοί ταυτοποιήθηκαν με ομοιότητα ακολουθιών 97% έως 100%. Τα



Εικόνα 3.5 Πηκτή ηλεκτροφόρησης με τα προϊόντα ενίσχυσης του γονιδίου 16s rDNA. Στις ακραίες θέσεις βρίσκεται ο μοριακός δείκτης (100bp DNA ladder)

αποτελέσματα στοιχήθηκαν με τον αλγόριθμο blastn του προγράμματος BLAST Basic Local Alignment SearchTool) του NCBI (National Center for Biotechnology Information) και παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1.

Πίνακας 3.1 Αποτελέσματα ταυτοποίησης στελεχών σε επίπεδο είδους με αλληλούχιση του γονιδίου 16S rRNA

Απομονώσεις	Είδος
<i>Lactobacillus pentosus</i> B363	<i>Lactobacillus pentosus</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i> B380	<i>Lactobacillus plantarum</i>
0 3 S1_9	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
0 6 S1_17	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
0 6 S2_20	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
0 6 S2_18	<i>Lactobacillus plantarum</i>
0 6 S2_10	<i>Lactobacillus plantarum</i>
0 3 S2_15	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
0 6 S2_2	<i>Lactobacillus plantarum</i>
0 6 S2_6	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
0 3 S1_18	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
0 3 S1_14	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
0 6 S1_18	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
0 6 S2_19	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
0 6 S2_13	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
0 6 S1_20	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
0 3 S2_10	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
0 3 S2_14	<i>Lactobacillus plantarum</i>
146 6 S2_11	<i>Lactobacillus plantarum</i>
146 3 S2_7	<i>Lactobacillus plantarum</i>
146 6 S1_11	<i>Lactobacillus pentosus</i>
146 6 S1_1	<i>Lactobacillus plantarum</i>
146 3 S1_6	<i>Lactobacillus plantarum</i>
146 3 S2_8	<i>Lactobacillus plantarum</i>
146 6 S2_13	<i>Lactobacillus plantarum</i>

* 146: 146 ημέρες/τέλος της ζύμωσης, * 0: 5 ημέρες/αρχή της ζύμωσης,

* 6: αλατότητα άλμης 6% NaCl, * 3: αλατότητα άλμης 3% NaCl, 3% KCl

* S1: απομόνωση από ζύμωση με καλλιέργεια εκκίνησης *Lb. pentosus* B363,

* S2: απομόνωση από ζύμωση με καλλιέργεια εκκίνησης *Lb. plantarum* B380

3.2 Συζήτηση αποτελεσμάτων culture-dependent μοριακής ανάλυσης (rep-PCR)

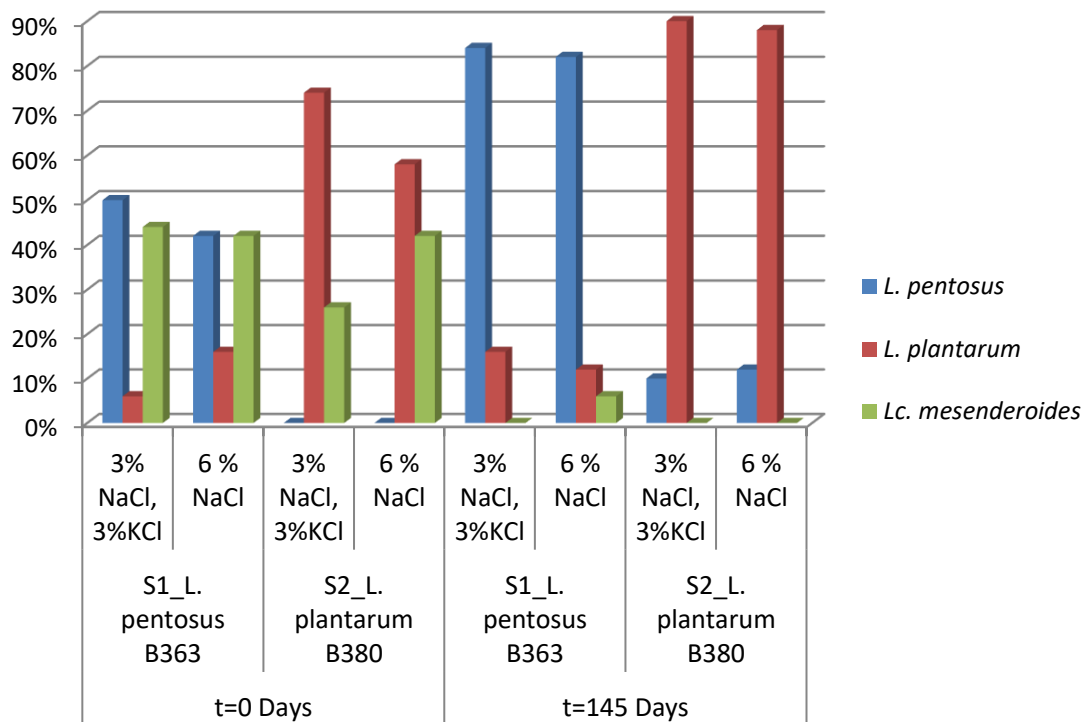
Στην παρούσα μελέτη, σύμφωνα με τη τεχνική rep-PCR, τα στελέχη των οξυγαλακτικών βακτηρίων τα οποία ενοφθαλμίστηκαν στα δοχεία της ζύμωσης, ανιχνεύθηκαν τόσο στη αρχή όσο και στο τέλος της διεργασίας (Πίνακας 3.2). Κατά την ολοκλήρωση της ζύμωσης, τα στελέχη που εμβολιάστηκαν είχαν κυριαρχήσει έναντι των υπόλοιπων οξυγαλακτικών βακτηρίων. Συγκεκριμένα η παρουσία της εναρκτήριας καλλιέργειας *L. plantarum* B380 (κωδικός S2) παρατηρήθηκε στο 89% των βακτηριακών απομονώσεων ενώ το στέλεχος *L. pentosus* B363 (κωδικός S1) στο 83% των απομονώσεων. Όσον αφορά στην αρχή της ζύμωσης, παρατηρείται μειωμένη παρουσία των καλλιιεργειών εκκίνησης. Συγκεκριμένα, το στέλεχος *L. plantarum* B380 επιβεβαιώθηκε στο 66% των βακτηριακών απομονώσεων ενώ το *L. pentosus* B363 μόλις στο 46% των απομονώσεων. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι οι γαλακτοβάκιλλοι που ενοφθαλμίστηκαν χρειάζονται μία μικρή περίοδο προσαρμογής στο περιβάλλον της άλμης (Panagou et al., 2003; De Bellis et al., 2010). Ωστόσο σε μελέτη για τη ζύμωση μαύρων επιτραπέζιων ελιών ελληνικού τύπου, αυτή η συμπεριφορά δεν παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια της ζύμωσης με εναρκτήριες καλλιέργειες διαφορετικών στελεχών *L. pentosus* ή *L. plantarum* (Panagou et al., 2008). Επιπλέον, σε παρόμοια μελέτη που αφορούσε στη ζύμωση μαύρων επιτραπέζιων ελιών με αυτόχθονες καλλιέργειες εκκίνησης (μικτό εμβόλιο από *L. plantarum* και *D. hansenii*), το *L. plantarum* στην αρχή της διεργασίας ήταν μη ανιχνεύσιμα ενώ κατάφεραν να κυριαρχήσουν έναντι του υπόλοιπου μικροβιακού πληθυσμού σε ποσοστό 80% σε χρόνο 90 ημερών μετά την έναρξη της ζύμωσης. Είναι πιθανό τα υψηλά επίπεδα NaCl κατά τη διάρκεια της ζύμωσης να επηρεάζουν την παρουσία των οξυγαλακτικών βακτηρίων και να ευνοούν την ανάπτυξη των ζυμών, όπως φαίνεται και στην μελέτη των Tufariello et al. (2015). Εν κατακλείδι, τα ποσοστά επιβίωσης των καλλιιεργειών εκκίνησης στην αρχή και στο τέλος της ζύμωσης της επιτραπέζιας ελιάς ποικιλίας Κονσερβολιά, που παρατηρήθηκαν στη παρούσα διατριβή έρχονται σε συμφωνία με το μεγαλύτερο μέρος της βιβλιογραφίας (Panagou et al., 2003; De Bellis et al., 2010; Tufariello et al., 2015).

Πίνακας 3.2. Ποσοστά επιβίωσης των καλλιεργειών εκκίνησης *L. pentosus* B363 και *L. plantarum* B380 στο αρχικό (5 ημέρες) και τελικό (146 ημέρες) στάδιο της ζύμωσης της φυσικής μαύρης ελιάς ποικιλίας Κονσερβολιά σε άλμη διαφορετικής αλατότητας.

Χρόνος (ημέρες)	Αλατότητα	<i>L. pentosus</i> B363	<i>L. plantarum</i> B380
t= 5	3% NaCl, 3%KCl	50%	74%
	6 % NaCl	42%	58%
t= 146	3% NaCl, 3%KCl	84%	90%
	6 % NaCl	82%	88%

Όσον αφορά στη ζύμωση των επιτραπέζιων ελιών με μειωμένη αλατοπεριεκτικότητα (υποκατάσταση του χλωριούχου νατρίου κατά 50% από χλωριούχο κάλιο), φαίνεται να μην υπάρχουν σημαντικές διαφορές συγκριτικά με τα είδη που παρατηρούνται στην άλμη με 6% NaCl. Σε όλες τις μελέτες φαίνεται ότι η οξυγαλακτική ζύμωση πραγματοποιήθηκε με επιτυχία και οι μικροοργανισμοί που παρατηρήθηκαν ήταν παρόμοιοι με αυτούς που απαντώνται στη ζύμωση με τα συνήθη επίπεδα συγκέντρωσης NaCl (Romero-Gil et al., 2012; Rodríguez-Gómez et al., 2012; Mateus et al., 2016). Σε έρευνα που αφορούσε στη ζύμωση πράσινων επιτραπέζιων ελιών σε άλμη με μειωμένη αλατοπεριεκτικότητα, προέκυψε ότι οι διάφορες συνθέσεις της άλμης δεν επηρεάζουν την αύξηση και τον πληθυσμό των καλλιεργειών εκκίνησης *L. plantarum* και *L. paracasei*, παρά μόνο σε μικρό βαθμό τα μεταβολικά προϊόντα της ζύμωσης (Pino et al., 2018). Έτσι και στην παρούσα μελέτη προκύπτει ότι η ανάπτυξη των στελεχών εκκίνησης δεν επηρεάζεται τόσο από την αλατοπεριεκτικότητα της άλμης (3% NaCl - 3% KCl και 6% NaCl) όσο από το χρονικό διάστημα της ζύμωσης. Μετά την ολοκλήρωση της ζύμωσης, παρατηρείται ότι το ποσοστό επιβίωσης του *L. plantarum* B380 και *L. pentosus* B363 στους καρπούς της ελιάς που ζυμώθηκαν σε άλμη μειωμένης αλατοπεριεκτικότητας είναι ελαφρώς υψηλότερο (90% και 84% αντίστοιχα για τις δύο καλλιέργειες εκκίνησης), συγκριτικά με τις απομονώσεις που προέρχονται από άλμη με 6% NaCl (88% και 82% αντίστοιχα).

Επιπλέον, εκτός από τον προσδιορισμό επιβίωσης των καλλιεργειών εκκίνησης, κατά την εφαρμογή της culture dependent ανάλυσης ανιχνεύθηκαν συνολικά τρία διαφορετικά είδη βακτηρίων, όπως φαίνεται και από το δενδρόγραμμα που προέκυψε από την αλληλούχιση του γονιδίου 16S ριβοσωμικό RNA αντιπροσωπευτικών απομονώσεων στην αρχή και στο τέλος της ζύμωσης. Αυτά είναι τα *L. pentosus*, *L. plantarum* και *Lc. mesenteroides*. Αξίζει να σημειωθεί ότι η παρουσία του *Lc. mesenteroides* στην αρχή της ζύμωσης ταυτοποιήθηκε σε ποσοστό 38% των δειγμάτων συνολικά, ανεξάρτητα από την σύνθεση της άλμης. Με το πέρας της ζύμωσης οι μικροοργανισμοί αυτοί μειώνονται σημαντικά, καθώς η παρουσία τους επιβεβαιώθηκε σε ποσοστό μόλις 1,5%, με τα είδη *L. plantarum* και *L. pentosus* να κυριαρχούν σε ποσοστό 89% και 83% αντίστοιχα, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.6. Τα δεδομένα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με την υπόλοιπη βιβλιογραφία καθώς το είδος *Lc. mesenteroides* αποτελεί μικροοργανισμό της αυτόχθονης μικροχλωρίδας της ελιάς και σε πολλές φυσικές ζυμώσεις αποτελεί ένα από κυρίαρχα ετεροζυμωτικά οξυγαλακτικά βακτήρια (Campaniello et al., 2005; De Bellis et al., 2010; Franzetti et al., 2011; Doulgeraki et al., 2013; Di Cagno et al. 2013). Επιπλέον, σύμφωνα με παρόμοιες μελέτες το είδος *Lc. mesenteroides* αναπτύσσεται με ταχύτερο ρυθμό στο αρχικό στάδιο της ζύμωσης όπου και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο, ενώ με το πέρας της διεργασίας αντικαθίσταται από είδη του γένους *Lactobacillus*, τα οποία έχουν εμβολιαστεί στην άλμη ως καλλιέργειες εκκίνησης (Bevilacqua et al., 2010; Tao et al., 2012), όπως προέκυψε και στην παρούσα μελέτη.

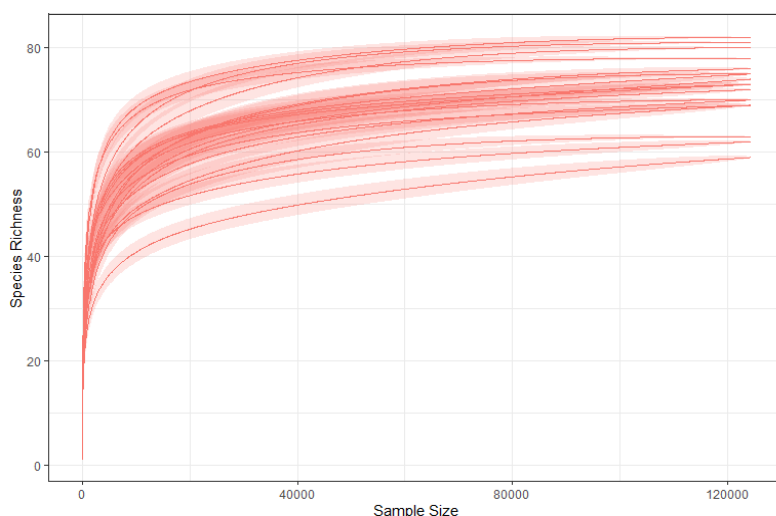


Εικόνα 3.6. Διάγραμμα απεικόνισης ποσοστών ταυτοποίησης οξυγαλακτικών βακτηρίων στις ζυμώσεις με εναρκτήριες καλλιέργειες *L. plantarum* B380 (S2) και *L. pentosus* B363 (S1) στην αρχή (5 ημέρες) και το τέλος (145 ημέρες) της ζύμωσης της φυσικής μούρης ελιάς ποικιλίας Κονσερβολιά σε άλμη διαφορετικής αλατότητας (6% NaCl και 3% KCl – 3% NaCl).

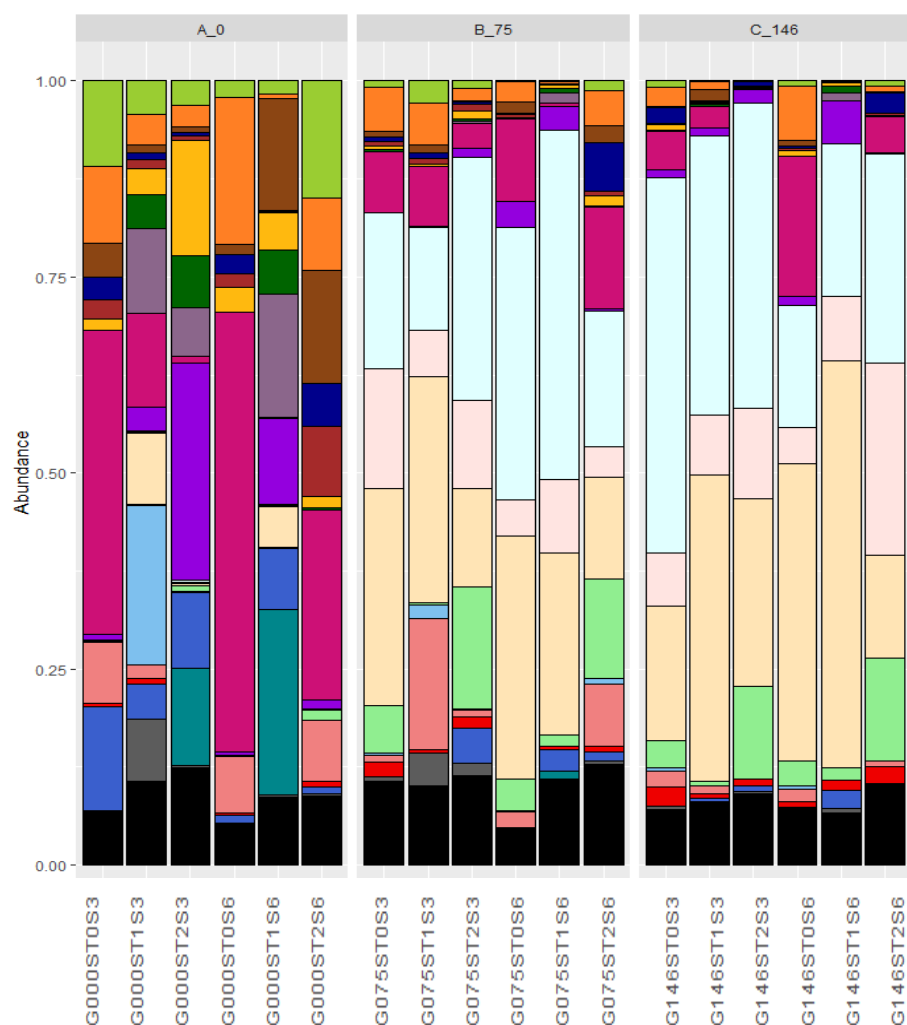
3.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση Μεταγενετικής ανάλυσης

3.3.1 Ταυτοποίηση βακτηρίων

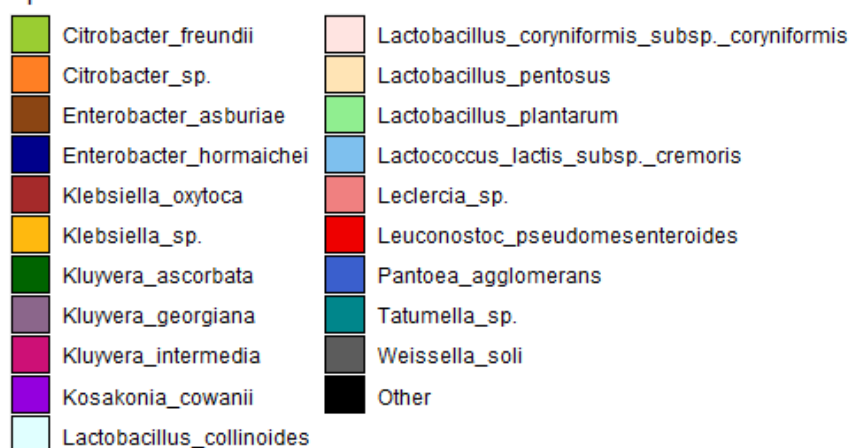
Όσον αφορά στην ταυτοποίηση των βακτηρίων στο οικοσύστημα της ελιάς με βάση το γονίδιο *gyrB*, τα 18 δείγματα αλληλουχήθηκαν με μέσο όρο 124.299 ± 44.100 ακολουθίες. Εντοπίστηκαν συνολικά 139 OTUs που αντιπροσωπεύουν 3 φύλα (Proteobacteria 62%, Firmicutes 36%, Actinobacteria 2%). Σε επίπεδο ειδών εντοπίστηκαν 94 OTUs. Όπως φαίνεται και στην καμπύλη της Εικόνας 3.7, που αντιπροσωπεύει την αφθονία των βακτηριακών ειδών σε συνάρτηση με το μέγεθος του δείγματος (αριθμός αλληλουχιών) - καμπύλη αραιοσύστασης (rarefaction curves), η αλληλούχιση είναι επαρκής για τον προσδιορισμό της βακτηριακής ποικιλότητας των δειγμάτων. Οι καμπύλες για τα δείγματα παρουσιάζουν ένα μέγιστο σημείο και μετά σταθεροποιούνται, γεγονός που υποδηλώνει μια καλή αναπαράσταση της βακτηριακής κοινότητας.



Εικόνα 3.7 Καμπύλη αραιοσύστασης βακτηριακών ειδών στο οικοσύστημα της φυσικής μαύρης ελιάς της ποικιλίας Κονσερβολιά στοχεύοντας το γονίδιο *gyrB*. Ο άξονας x αντιπροσωπεύει το βάθος αλληλούχισης σε αριθμό αναγνώσεων ενώ ο άξονας y αντιπροσωπεύει μια εκτίμηση της αφθονίας των ειδών που εντοπίστηκαν.



Species



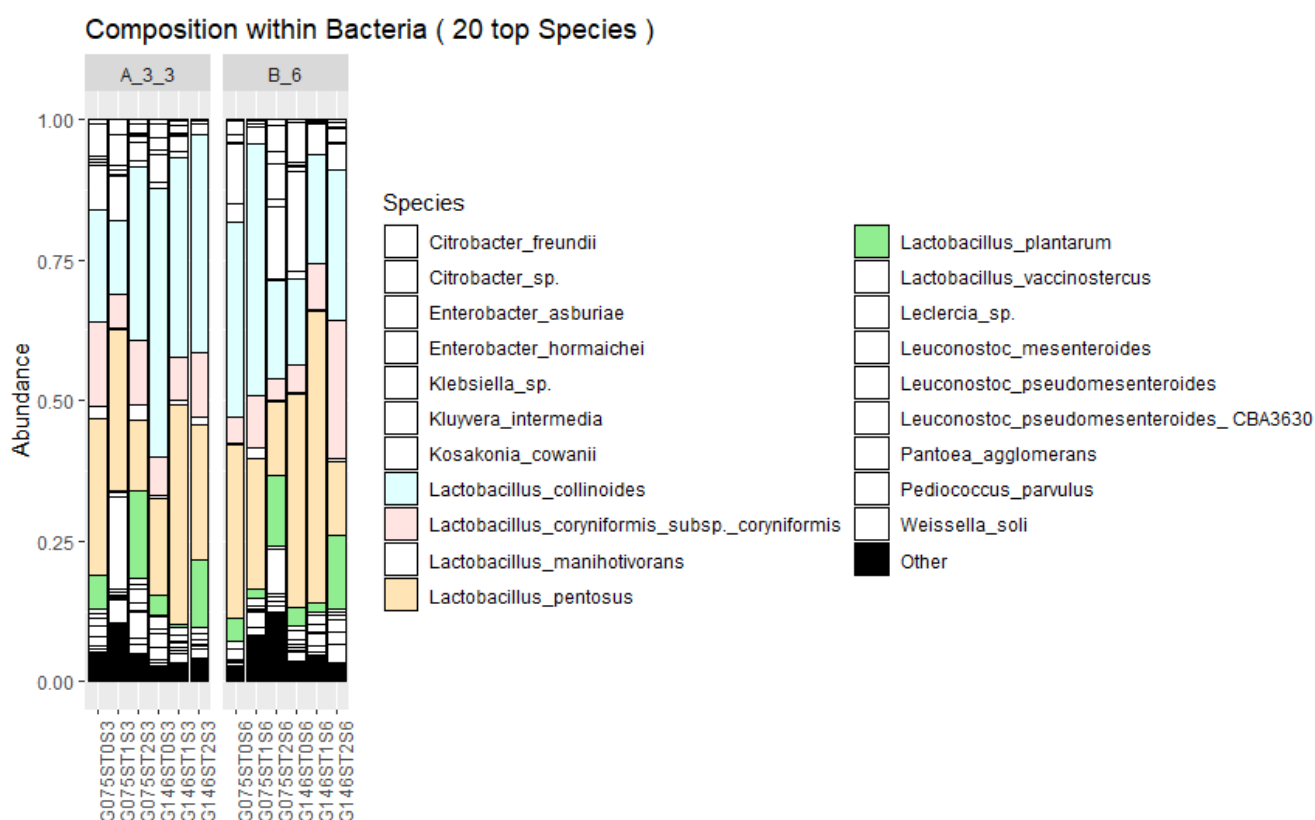
Εικόνα 3.8 Γραφική απεικόνιση σύνθεσης του βακτηριακού πληθυσμού στο οικοσύστημα της φυσικής μαύρης ελιάς της ποικιλίας Κονσερβολιά σε επίπεδο ειδών με βάση το χρονικό σημείο της ζύμωσης (A_0: αρχή της ζύμωσης, B_75: μέσο της ζύμωσης, C_146: τέλος της ζύμωσης).

Όπως είναι εμφανές και στην Εικόνα 3.8, στο αρχικό στάδιο της ζύμωσης η μικροβιακή σύνθεση διαφέρει αρκετά σε σχέση με τα επόμενα στάδια της ζύμωσης. Πιο συγκεκριμένα, στην έναρξη της ζύμωσης (A_0) υπάρχει μεγαλύτερη ποικιλότητα και επικρατούν ξεκάθαρα τα εντεροβακτήρια, ενώ οι γαλακτοβάκιλλοι βρίσκονται σε πολύ μικρά ποσοστά, όπως και αναμένεται με βάση τη βιβλιογραφία (Harris et al., 1998; Alves et al., 2012). Όσο εξελίσσεται η ζύμωση και πλησιάζουμε στο μέσο της διεργασίας, οι γαλακτοβάκιλλοι αναπτύσσονται ταχύτερα ενώ οι πληθυσμοί των Gram-αρνητικών βακτηρίων μειώνονται σταδιακά. Αυτό οφείλεται στις επικρατούντες συνθήκες της ζύμωσης καθώς οι χαμηλές τιμές pH παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των εντεροβακτηρίων (Varzakas et al., 2017). Στο τέλος της ζύμωσης η βακτηριακή σύνθεση δεν διαφέρει από αυτήν στο μέσο της διεργασίας.

Σύμφωνα με την Εικόνα 3.9, η αλατότητα δεν φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά την κοινότητα των βακτηρίων. Οι καλλιέργειες εκκίνησης, επίσης φαίνεται να μην επηρεάζουν σημαντικά τον συνολικό αριθμό και την ποικιλότητα των ειδών του καρπού (Εικόνα 3.11). Η αυθόρμητη καθώς και οι ελεγχόμενες με *L. pentosus* B363 (S1) και με *L. plantarum* B380 (S2) ζυμώσεις χαρακτηρίζονται από πληθώρα βακτηριακών ειδών, με τις ελεγχόμενες να εμφανίζουν μεγαλύτερη ποικιλότητα, κατά την έναρξη της διαδικασίας, συγκριτικά με την αυθόρμητη ζύμωση. Στην έναρξη της αυθόρμητης ζύμωσης, το είδος *Kluyvera intermedia* επικρατεί έναντι των υπολοίπων και στις δύο αλατοπεριεκτικότητες της άλμης, με υψηλότερη κυριαρχία (56%) στη ζύμωση με 6% NaCl. Όσον αφορά στα είδη των βακτηρίων που απαντώνται στην άλμη με 3% NaCl – 3% KCl, φαίνεται να μην υπάρχουν σημαντικές διαφορές συγκριτικά με τα είδη που παρατηρούνται στην άλμη με 6% NaCl. Συγκεκριμένα, και στις δύο περιπτώσεις, φαίνεται να κυριαρχούν τα γένη *Kluyvera*, *Klebsiella*, *Kosakonia* και *Enterobacter*, με ελαφρώς υψηλότερη ποικιλότητα στην άλμη 3% NaCl – 3% KCl, καθώς οι υψηλότερες συγκεντρώσεις NaCl μπορούν να παρεμποδίσουν την ανάπτυξη πολλών βακτηριακών ειδών (Taormina, 2010).

Στο μέσον της ζύμωσης, στην αυθόρμητη ζύμωση με μειωμένη αλατοπεριεκτικότητα κυριαρχεί το είδος *L. pentosus* (28%) ακολουθούμενο από το *L. collinoides* (20%) ενώ στα δείγματα με 6% NaCl τα δύο προαναφερθέντα είδη συγκυριαρχούν. Όσον αφορά στη ζύμωση με καλλιέργεια εκκίνησης *L. pentosus* B363 στην άλμη S3 (3% NaCl – 3% KCl), επικρατεί το είδος *L. pentosus* (29%) ακολουθούμενο από το *L. collinoides* (13%) ενώ στην άλμη S6 (6% NaCl) κυριαρχεί

το *L. collinoides* (45%) και ακολουθεί το *L. pentosus* (23%). Παραμένοντας σε αυτό το χρονικό στάδιο της διεργασίας, όσον αφορά στη ζύμωση με την καλλιέργεια εκκίνησης *L. plantarum* B380 (S2), στην άλμη S3 επικρατεί το είδος *L. collinoides* (31%) ενώ στην άλμη S6 το βακτήριο *L. collinoides* έχει παρόμοια ποσοστά αφθονίας με τα είδη *L. plantarum* και *L. pentosus*, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.9

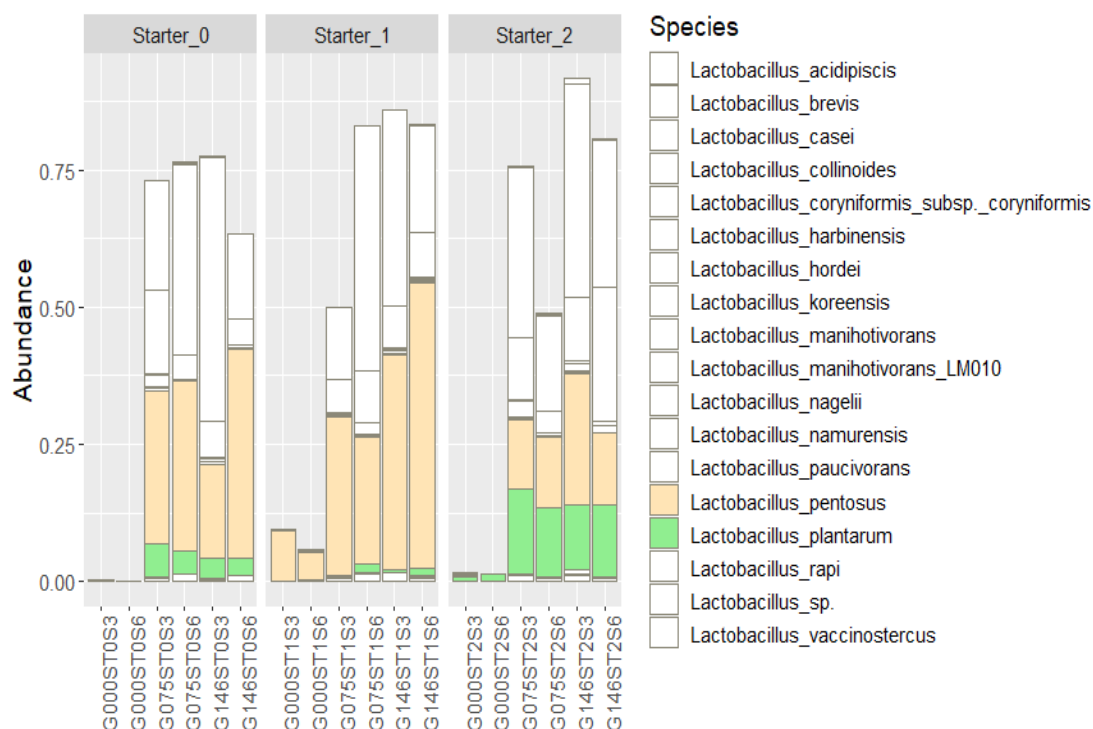


Εικόνα 3.9 Γραφική απεικόνιση σύνθεσης του βακτηριακού πληθυσμού στο οικοσύστημα της ελιάς, ποικιλία Κονσερβολία σε επίπεδο είδους, με βάση την σύνθεση της άλμης. (A_3_3: δείγματα που προέρχονται από άλμη με 3% NaCl και 3% KCl (S3) και B_6: δείγματα που προέρχονται από άλμη με 6% NaCl (S6)).

Κατά την ολοκλήρωση της διεργασίας, στη ζύμωση με καλλιέργεια εκκίνησης *L. pentosus* B363 (S1) και στις δύο συνθέσεις άλμης, επικρατεί το είδος *L. pentosus*, με ποσοστό 39% στην άλμη S3 και 52% στη άλμη S6, ακολουθούμενο από το *L. collinoides* (20% S3 και 36% S6). Στη ζύμωση με την αυτόχθονη μικροχλωρίδα παρατηρείται επίσης κυριαρχία του *L. pentosus* (38%) στην άλμη S6, ακολουθούμενο από το *L. collinoides* (16%) ενώ στην άλμη S3 το *L. pentosus* (17%) έρχεται δεύτερο

σε αφθονία μετά το *L. collinoides* (48%), γεγονός που παρατηρείται και σε σχετικές μελέτες στη βιβλιογραφία (Tassou et al., 2002; Randazzo et al., 2010; Dougleraki et al., 2013). Όσον αφορά στη ζύμωση με καλλιέργεια εκκίνησης *L. plantarum* B380 (S2), ως επικρατέστερο είδος παρατηρείται το *L. collinoides* στην άλμη S3 ενώ το *L. coryniformis* συγκυριαρχεί με το πρώτο στην άλμη S6. .

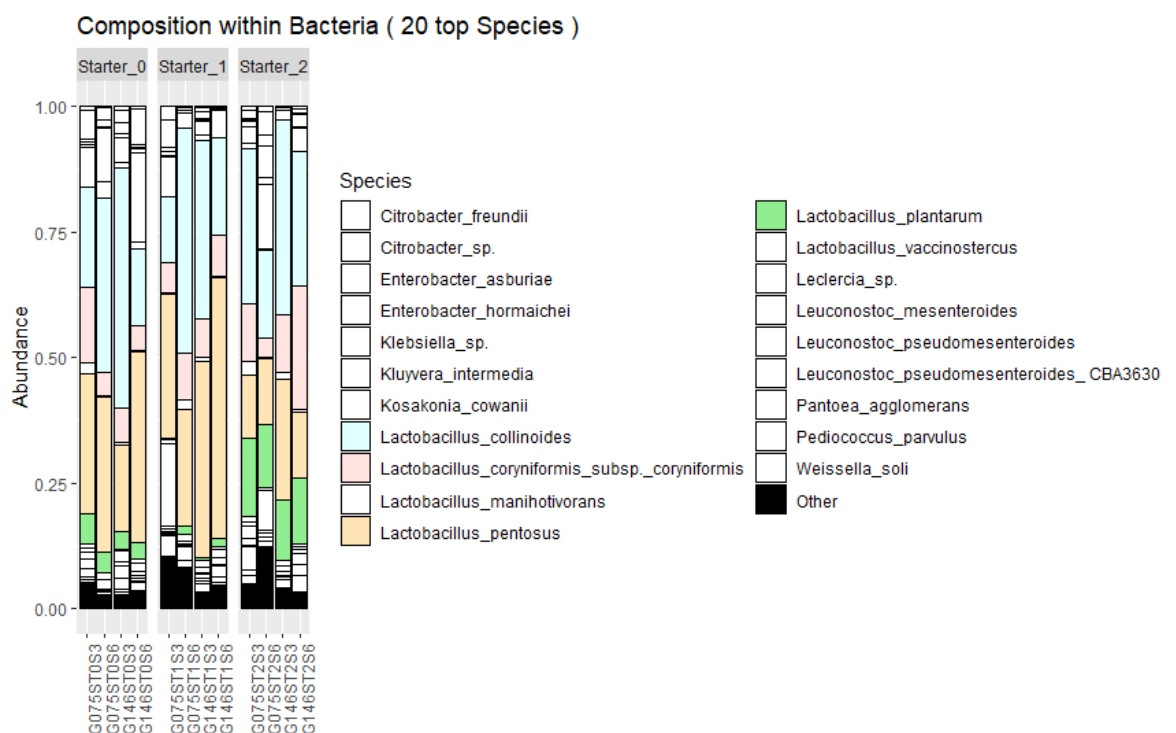
Η μειωμένη επίδραση της διαφορετικής αλατοπεριεκτικότητας της άλμης στο προφίλ της ζύμωσης της φυσικής μαύρης ελιάς, έρχεται σε συμφωνία με σχετικές μελέτες στη βιβλιογραφία (Bautista-Gallego et al., 2009; Panagou et al., 2011; Zinno et al., 2017). Επιπλέον σύμφωνα με τους Bautista-Gallego et al. (2011), η επιλογή του καλίου για την μερική υποκατάσταση του νατρίου στην άλμη, συγκριτικά με άλλα άλατα όπως το ασβέστιο έχει χαμηλή επίδραση στο μικροβιακό δυναμικό της ζύμωσης των επιτραπέζιων ελιών, όπως παρατηρείται και στην παρούσα διατριβή. Αντίθετα, για την οικογένεια *Enterobacteriaceae*, οι Mateus et al. (2016), έδειξαν ότι η παρουσία CaCl_2 και KCl στην άλμη προκάλεσε ταχύτερη μείωση του πληθυσμού τους συγκριτικά με την παραδοσιακή άλμη με χρήση NaCl . Στην παρούσα μελέτη στην άλμη με 6% NaCl από τα μέσα της ζύμωσης και έπειτα δεν παρατηρείται μικρότερη μείωση του πληθυσμού των εντεροβακτηρίων από αυτήν που συναντάται στην άλμη μειωμένης αλατοπεριεκτικότητας.



Εικόνα 3.10 Γραφική απεικόνιση σύνθεσης του βακτηριακού πληθυσμού στο οικοσύστημα της φυσικής μαύρης ελιάς της ποικιλίας Κονσερβολιά σε επίπεδο είδους με βάση τις καλλιέργειες εκκίνησης (Starter_0: φυσική αυθόρμητη ζύμωση ST0, Starter_1: δείγματα που προέρχονται από ελεγχόμενη ζύμωση με εμβόλιο *L. pentosus* B363 ST1, Starter_2: δείγματα με εμβόλιο *L. plantarum* B380 ST2)

Όσον αφορά στην επιβίωση των καλλιεργειών εκκίνησης, στην αυθόρμητη ζύμωση το είδος *L. pentosus* προσδιορίστηκε σε υψηλότερα ποσοστά από το *L. plantarum* καθ'όλη την διάρκεια της ζύμωσης όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.10. Στις περιπτώσεις όπου τα δείγματα εμβολιάστηκαν με μια από τις δυο εκκινητήριες καλλιέργειες παρατηρήθηκε ότι οι σχετικές αφθονίες των ειδών αυτών είναι υψηλότερες από αυτές στις αυθόρμητες ζυμώσεις. Έτσι επιβεβαιώνεται ότι οι καλλιέργειες εκκίνησης επιβίωσαν και έδρασαν μαζί με τα αντίστοιχα αυτόχθονα στελέχη. Επίσης παρατηρήθηκε ότι το είδος *L. pentosus* υπήρχε σε μεγαλύτερο ποσοστό όχι μόνο στην αυθόρμητη ζύμωση αλλά ακόμα και όταν τα δείγματα εμβολιάστηκαν με την *L. plantarum* B380 (S2) καλλιέργεια. Όπως και στην culture-dependent μοριακή τεχνική, στην αρχή της ζύμωσης παρατηρείται μειωμένη παρουσία της καλλιέργειας εκκίνησης *L. pentosus* B363 (S1) αλλά όσο εξελίσσεται η διεργασία ο πληθυσμός του αυξάνεται μέχρις ότου κυριαρχήσει επί των υπολοίπων βακτηρίων. Αυτή η πορεία ανάπτυξης των εναρκτήριων καλλιεργειών είναι αναμενόμενη, λόγω της απαιτούμενης περιόδου προσαρμογής των βακτηρίων στο

περιβάλλον της αλατότητας της άλμης και σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Panagou et al., 2003; Tufariello, et al., 2015). Όσον αφορά στην καλλιέργεια εκκίνησης *L. plantarum* B380 (S2), παρατηρήθηκε αδυναμία επικράτησης έναντι της υπόλοιπης μικροχλωρίδας του καρπού και δεν είναι σαφές αν επηρέασε την πορεία της ζύμωσης, καθώς όπως φαίνεται δεν παρουσίασε καλή δυναμική συγκριτικά με το είδος *L. pentosus*. Αν και το *L. plantarum* αποτελεί τον κύριο υπεύθυνο για τη ζύμωση των επιτραπέζιων ελιών σύμφωνα με τις μικροβιολογικές μελέτες (Campaniello et al., 2005; Bevilacqua et al., 2010), στη παρούσα μελέτη φαίνεται να μην έχει κυριαρχήσει.



Εικόνα 3.11 Γραφική απεικόνιση σύνθεσης του βακτηριακού πληθυσμού στο οικοσύστημα της φυσικής μαύρης ελιάς της ποικιλίας Κονσερβολιά σε επίπεδο είδους με βάση τις καλλιέργειες εκκίνησης (Starter_0: φυσική αυθόρμητη ζύμωση, Starter_1: ελεγχόμενη ζύμωση με εμβόλιο *L. pentosus* B363 (S1), Starter_2: ελεγχόμενη ζύμωση με εμβόλιο *L. plantarum* B380 (S2)).

Τελικά τα βακτήρια *L. pentosus* και *L. collinoides* παρουσιάζουν καλύτερη δυναμική στη ζύμωση της φυσικής μαύρης επιτραπέζιας ελιάς της ποικιλίας Κονσερβολιά, συγκριτικά με το βακτήριο *L. plantarum*. Επίσης, όπως είναι εμφανές το *L. collinoides* αποτελεί ένα βακτηριακό είδος, που ειδικά στο τελικό στάδιο της αυθόρμητης ζύμωσης στην άλμη S3 παρατηρείται σε μεγάλη αφθονία, αλλά αποτελεί και ένα από τα επικρατέστερα οξυγαλακτικά βακτήρια στην ελεγχόμενη ζύμωση με

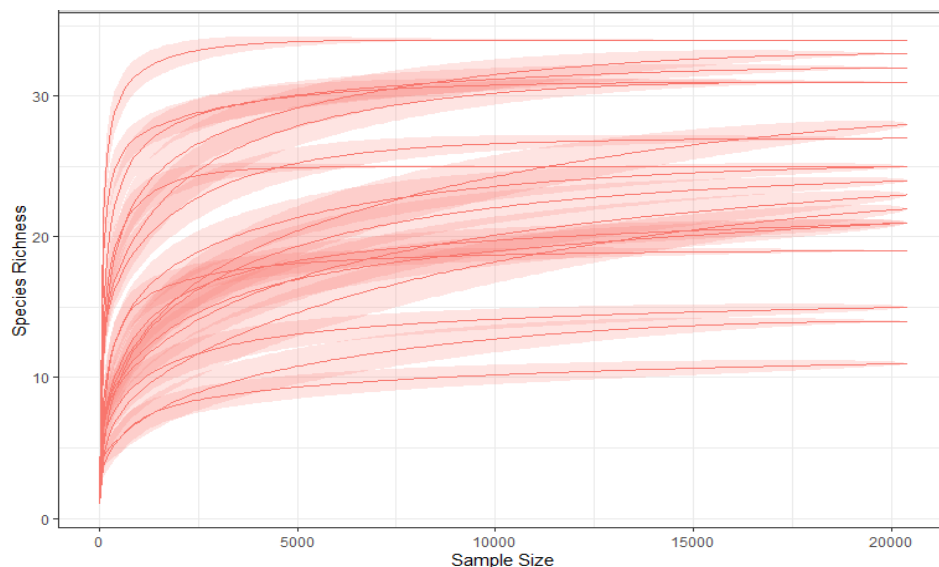
την καλλιέργεια εκκίνησης *L. plantarum* B380 (S2). Τέλος αξίζει να σημειωθεί ότι στην αυθόρμητη ζύμωση (Starter_0) η αφθονία των εντεροβακτηρίων και κυρίως του είδους *K. intermedia* ήταν αυξημένη (18%) αποτελώντας το δεύτερο επικρατέστερο είδος μετά το *L. pentosus* (38%), ακόμη και κατά το τέλος της διεργασίας. Επομένως είναι εμφανές ότι η χρήση εκκινητήριας καλλιέργειας βελτιώνει τη ζυμωτική διεργασία καθώς η αυθόρμητη ζύμωση δεν είναι προβλέψιμη και επηρεάζεται έντονα από τις φυσικοχημικές συνθήκες και από την παρουσία των μικροοργανισμών στην επιφάνεια του καρπού της ελιάς.

Αν συγκρίνουμε σε αυτό το σημείο τα αποτελέσματα των δύο μοριακών τεχνικών παρατηρείται μια πολύ διαφορετική εικόνα όσον αφορά στην επιβίωση των καλλιεργειών εκκίνησης, καθώς από τη culture-dependent μοριακή τεχνική προέκυψε κυριαρχία του είδους *L. plantarum* σε ποσοστό 90% στην άλμη S3 και 88% στην S6, ενώ το είδος *L. pentosus* κυριάρχησε σε ποσοστό 84% στην άλμη S3 και 82% στην S6. Από την άλλη, σύμφωνα με τη μεταγενετική ανάλυση το *L. pentosus* κυριαρχεί σε ποσοστό 39% στην άλμη S3 και 52% στην άλμη S6, ενώ το εμβόλιο *L. plantarum* ταυτοποιήθηκε μόλις σε ποσοστό 12% και 13% αντίστοιχα. Ωστόσο, η αδυναμία ανάπτυξης του *L. plantarum* έχει επίσης παρατηρηθεί σε σχετικές μελέτες ζύμωσης επιτραπέζιων ελιών με εκκινητήριες καλλιέργειες στελέχη των ειδών *L. plantarum* και *L. pentosus*, που ενοφθαλμίστηκαν ως μονοκαλλιέργεια και ως συγκαλλιέργεια (Panagou et al., 2008; Hurtado et al., 2010). Τα διαφορετικά αποτελέσματα της μεταγενετικής ανάλυσης πιθανόν να οφείλονται στο γεγονός ότι με τις κλασσικές μικροβιακές τεχνικές υπάρχει η δυνατότητα απομόνωσης μόνο των μικροοργανισμών που μπορούν να αναπτυχθούν *in vitro* και είναι ζωντανοί και καλλιεργήσιμοι (viable and culturable), ενώ με τη μεταγενετική ανάλυση ανιχνεύονται όλοι οι μικροοργανισμοί ακόμη και τα ζωντανά μη καλλιεργούμενα βακτήρια και ζύμες. Ταυτοποιούνται, επίσης και μικροοργανισμοί που βρίσκονται σε χαμηλή αφθονία, ή είναι καταπονημένοι. Οι τεχνικές που βασίζονται στην καλλιέργεια των μικροοργανισμών μπορούν να εντοπίσουν μόνο το 1-10% της πραγματικής βακτηριακής ποικιλομορφίας μέσα σε ένα περιβάλλον (Hugenholtz et al., 1998) και αυτός είναι πιθανόν ο λόγος που στις μικροβιολογικές αναλύσεις στο τέλος των ζυμώσεων, παρατηρείται απουσία εντεροβακτηρίων ενώ στην πραγματικότητα υπάρχει αδυναμία αποτύπωσής τους λόγω της χαμηλής αφθονίας του πληθυσμού. Επίσης, οι διαφορές πιθανόν να οφείλονται στο γεγονός ότι με την culture-dependent

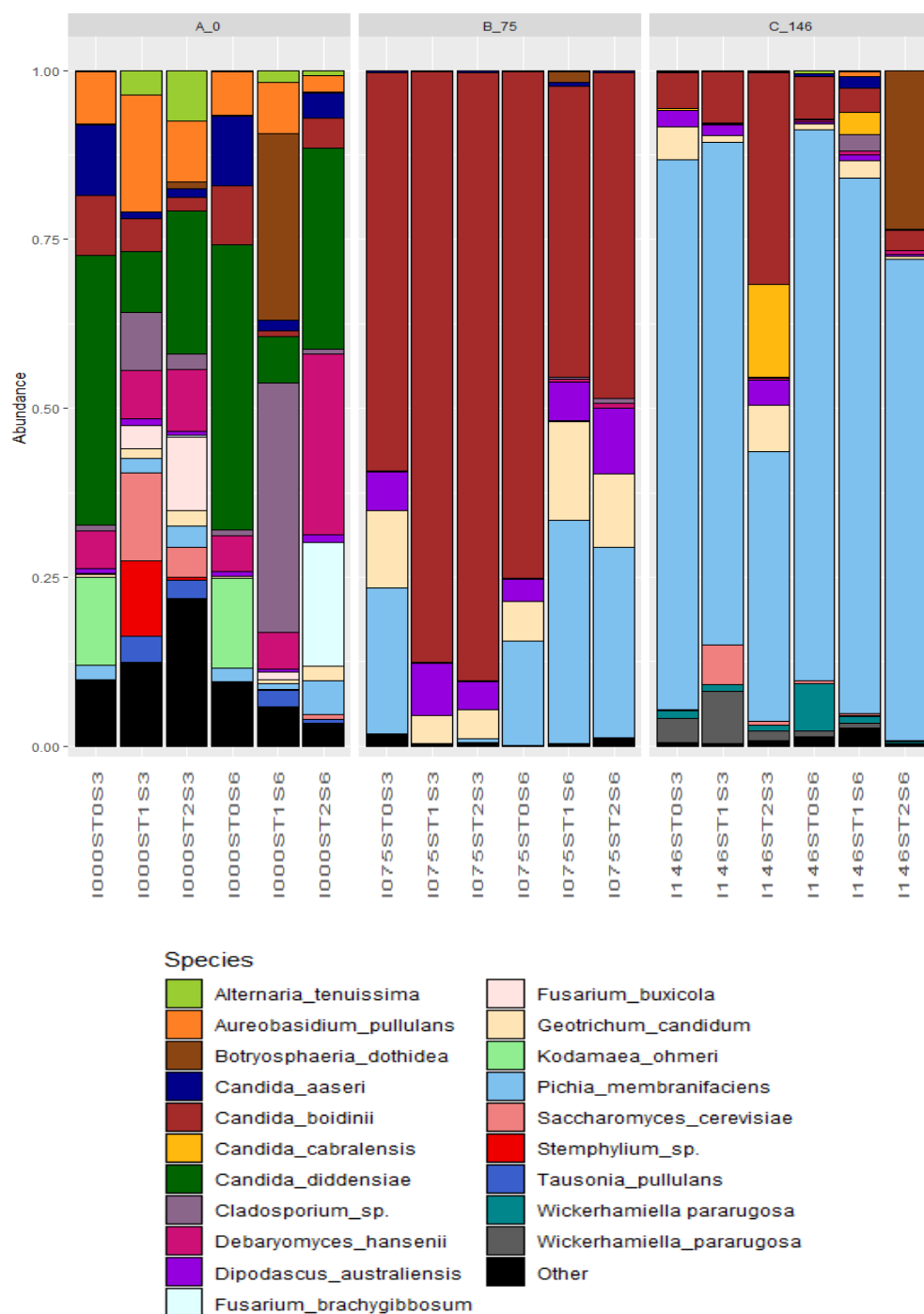
τεχνική η αλληλούχιση έγινε μέσω της ενίσχυσης του γονιδίου 16S rRNA, το οποίο λόγω της υψηλής γονοτυπικής συγγένειας των καλλιεργειών εκκίνησης (*L. plantarum* και *L. pentosus*) δεν αποτελεί αξιόπιστο εργαλείο για τον διαχωρισμό των δύο αυτών βακτηρίων (De Bellis et al., 2010).

3.3.2 Ταυτοποίηση ζυμομυκήτων

Όσον αφορά την ταυτοποίηση των ζυμομυκήτων στο οικοσύστημα της ελιάς με βάση το γονίδιο ITS2, τα 18 δείγματα ελαιόκαρπου αλληλουχήθηκαν με μέσο όρο 20.391 ± 5.027 ακολουθίες. Στα δείγματα της ελιάς ανιχνεύθηκαν συνολικά 50 OTUs που αντιπροσωπεύουν 2 φύλα (Ascomycota 79% και Basidiomycota 21%). Σε επίπεδο ειδών εντοπίστηκαν 45 OTUs. Σύμφωνα με την καμπύλη της Εικόνας 3.12, που αντιπροσωπεύει τον αριθμό των ειδών των ζυμομυκήτων σε συνάρτηση με το μέγεθος των δειγμάτων, το βάθος της αλληλούχισης ήταν επαρκές για όλα τα δείγματα.



Εικόνα 3.12 Καμπύλη αραιοσύστασης ειδών ζυμών-μυκήτων στο οικοσύστημα της φυσικής μαύρης ελιάς της ποικιλίας Κονσερβολιά στοχεύοντας στογονίδιο ITS2. Ο άξονας x αντιπροσωπεύει το βάθος αλληλούχισης σε αριθμό αναγνώσεων ενώ ο άξονας y αντιπροσωπεύει μια εκτίμηση της αφθονίας των ειδών που εντοπίστηκαν.



Εικόνα 3.13 Γραφική απεικόνιση σύνθεσης του πληθυσμού των ζυμομυκήτων στο οικοσύστημα της φυσιικής μαύρης ελιάς της ποικιλιάς Κονσερβολιά σε επίπεδο είδους με βάση το χρονικό σημείο της ζύμωσης (A_0: αρχή της ζύμωσης, B_75: μέσο της ζύμωσης, C_146: τέλος της ζύμωσης).

Όπως φαίνεται ξεκάθαρα στην Εικόνα 3.13, ο πληθυσμός των ζυμομυκήτων μεταβάλλεται σημαντικά συναρτήσει του χρόνου. Στην αρχή της ζύμωσης παρατηρείται μεγαλύτερη ποικιλότητα στον πληθυσμό ενώ με το πέρας της διεργασίας ο αριθμός των ειδών μειώνεται σημαντικά, όπως έχει παρατηρηθεί σε αρκετές σχετικές μελέτες (Arroyo-López et al., 2008; Nisiotou et al., 2010; Alves et al., 2012). Τα είδη που απαντώνται στη αρχή της διαδικασίας, τα οποία προέρχονται σε μεγάλο βαθμό από την φυσική μικροχλωρίδα του ελαιόκαρπου, φαίνεται να μην εμπλέκονται στη ζύμωση καθώς όσο εξελίσσεται η διαδικασία δεν επιβιώνουν. Τα είδη *Candida diddensiae*, *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium* sp. και *Debaryomyces hansenii* έχουν παρατηρηθεί και σε άλλες μελέτες κατά την έναρξη της ζύμωσης (Hurtado et al., 2008; Aponte et al., 2010). Η *C. diddensiae* φαίνεται να είναι υπεύθυνη για τη μείωση της τιμής του pH κατά την έναρξη της ζύμωσης και αποτελεί μία ισχυρή ζυμωτική ζύμη προσαρμοσμένη καλά στο πρώτο στάδιο της ζύμωσης (Hurtado et al., 2008). Όσο η διαδικασία εξελίσσεται ο αριθμός των ειδών μειώνεται σημαντικά με επικρατέστερο το είδος *Candida boidinii*, ακολουθούμενο από το είδος *Pichia membranifaciens* ενώ κατά την ολοκλήρωση της ζύμωσης η κυρίαρχη ζύμη με υψηλά ποσοστά επιβίωσης είναι η *P. membranifaciens*, όπως αναφέρεται και σε αρκετές σχετικές μελέτες (Arroyo-López et al., 2008; Bevilacqua et al., 2009; Aponte et al., 2010; Nisiotou et al., 2010; Bautista-Gallego et al., 2011; Alves et al., 2012). Η ζύμη αυτή παρουσιάζει εξαιρετική ανθεκτικότητα στις χαμηλές τιμές pH και στις υψηλές συγκεντρώσεις NaCl ενώ έχει την ικανότητα να εκκρίνει τοξίνες τύπου killer (killer toxins) ικανές να θανατώσουν ευαίσθητα στελέχη ανεπιθύμητων μικροοργανισμών (Belda et al., 2017).

Όσον αφορά στις δύο διαφορετικές αλατοπεριεκτικότητες της άλμης δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές. Συγκεκριμένα, στην αρχή της ζύμωσης, τα δείγματα με μειωμένη αλατότητα έχουν υψηλότερη ποικιλότητα σε σύγκριση με τα δείγματα αυξημένης αλατότητας στις ελεγχόμενες ζυμώσεις. Αντίθετα, στις αυθόρμητες ζυμώσεις, τα δείγματα έχουν παρόμοια σύνθεση ανεξάρτητα της αλατότητας. Στη μέση της ζύμωσης (75 ημέρες), στις ελεγχόμενες ζυμώσεις παρατηρείται αυξημένη αφθονία της ζύμης *C. boidinii* στην άλμη με μειωμένη περιεκτικότητα NaCl, ενώ στο τελικό στάδιο όπου κυριαρχεί η *P. membranifaciens* η αλατότητα φαίνεται να μην επηρεάζει καθόλου την μικροβιακή κοινότητα. Όπως

αναφέρθηκε παραπάνω, η *P. membranifaciens* είναι ανθεκτική και στις υψηλές συγκεντρώσεις NaCl. Σε σχετική μελέτη για τη ζύμωση πράσινων επιτραπέζιων ελιών, ο πληθυσμός των ζυμών διαφοροποιήθηκε σημειώνοντας αύξηση μόνο παρουσία CaCl₂ (Bautista-Gallego et al., 2009). Επιπλέον, από τη μελέτη των Mateus et al. (2016) σχετικά με τη ζύμωση πράσινων τσακιστών επιτραπέζιων ελιών ποικιλίας Maçanilha Algarvia, προέκυψε ότι ο ρυθμός ανάπτυξης των ζυμών δεν επηρεάζεται από τα διάφορα μίγματα χλωριούχων αλάτων που χρησιμοποιήθηκαν (NaCl, KCl, CaCl₂), αλλά παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στη ποικιλότητα του πληθυσμού σε υψηλές συγκεντρώσεις K και Ca.

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.13 η ανάπτυξη του πληθυσμού των ζυμών δεν επηρεάζεται ιδιαίτερα από την παρουσία των εκκινητήριων καλλιιεργειών. Σε σχετική μελέτη έχει παρατηρηθεί ότι η παρουσία ζυμών, όπως η *D. hansenii* μπορεί να προκαλέσει ανάπτυξη του βακτηρίου *L. plantarum* (Tsapatsaris and Kotzekidou, 2004). Επίσης, η βελτίωση της απόδοσης του είδους *L. pentosus* παρουσία ζυμών έχει επιβεβαιωθεί σε διάφορες μελέτες μέχρι σήμερα. Σύμφωνα με τους Segovia-Bravo et al. (2007) και Hurtado et al. (2010), η παρουσία ζυμών όπως η *S. cerevisiae* μπορεί να συμβάλλει στην ταχύτερη ανάπτυξη του βακτηρίου *L. pentosus* σε πράσινες επιτραπέζιες ελιές ενώ η εφαρμογή καλλιέργειας εκκίνησης *L. pentosus* μαζί με τη ζύμη *C. diddensiae* οδήγησε σε αύξηση της ποικιλότητας των ζυμών με βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών και ενίσχυση του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων.

4. Συμπεράσματα

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η επιβίωση των καλλιεργειών εκκίνησης που εμβολιάστηκαν κατά την έναρξη της ζύμωσης φυσικής μαύρης ελιάς της ποικιλίας Κονσερβολιά σε άλμη διαφορετικής αλατοπεριεκτικότητας. Η μέθοδος που εφαρμόστηκε ήταν η ομαδοποίηση μέσω της culture-dependent μοριακής τεχνικής rep-PCR. Τα αποτελέσματα έδειξαν κυριαρχία των εκκινητήριων καλλιεργειών *L. pentosus* B363 και *L. plantarum* B380 και στα δύο μίγματα άλμης που χρησιμοποιήθηκαν (6% NaCl και 3% NaCl-3% KCl), με ελαφρώς υψηλότερο ποσοστό ανάκτησης και των δύο καλλιεργειών στην άλμη με τη μερική υποκατάσταση του χλωριούχου νατρίου με χλωριούχο κάλιο.

Επιπλέον, μέσω της ενίσχυσης του γονιδίου 16S rRNA, ταυτοποιήθηκαν τρία είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων στην αρχή και στο τέλος της ζύμωσης, τα *L. pentosus*, *L. plantarum* και *Lc. mesenteroides*, η παρουσία των οποίων δεν φάνηκε να επηρεάζεται από τα διαφορετικά μίγματα άλμης.

Επόμενος στόχος της παρούσας διατριβής ήταν ο προσδιορισμός της μικροβιακής κοινότητας που απαντάται στον καρπό της ελιάς, μέσω μεταγενετικής ανάλυσης. Τα αποτελέσματα αποκάλυψαν πληθώρα βακτηρίων και ζυμών στο οικοσύστημα του καρπού. Κατά την έναρξη της ζύμωσης η ποικιλότητα των βακτηρίων και των ζυμών ήταν σαφώς υψηλότερη απ'ότι στα επόμενα στάδια της ζύμωσης. Η παρουσία των εκκινητήριων καλλιεργειών καθώς επίσης και η αλατότητα των δειγμάτων δεν επηρέασαν σημαντικά την ποικιλότητα.

Τα δυο κυρίαρχα είδη των βακτηρίων σε όλες τις περιπτώσεις ήταν τα *L. pentosus* και *L. collinoides*. Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, τα δυο είδη παρουσιάζουν καλύτερη δυναμική και φαίνεται να επηρεάζουν τη ζύμωση της επιτραπέζιας ελιάς, σε αντίθεση με το *L. plantarum* που συνήθως χρησιμοποιείται ως καλλιέργεια εκκίνησης. Όσον αφορά στα είδη των ζυμών που ταυτοποιήθηκαν, η *P. membranifaciens* τελικά κυριάρχησε σε όλες τις ζυμώσεις, ανεξάρτητα από την αλατοπεριεκτικότητα της άλμης, ακολουθούμενη από την *C. boidinii*.

Βιβλιογραφία

- Abee, T., Krockel, L., Hill, C. (1995). Bacteriocins: modes of action and potential in food preservation and control of food poisoning. *International Journal of Food Microbiology* 28, 169–185.
- Abriouel, H., Benomar, N., Lucas, R., Gálvez, A. (2011). Culture-independent study of the diversity of microbial populations in brines during fermentation of naturally fermented Aloreña green table olives. *International Journal of Food Microbiology* 144, 487–496.
- Adessi, C. (2000). Solid phase DNA amplification: characterisation of primer attachment and amplification mechanisms. *Nucleic Acids Research* 28, 87e–87.
- Allard, M.W., Bell, R., Ferreira, C.M., Gonzalez-Escalona, N., Hoffmann, M., Muruvanda, T., Ottesen, A., Ramachandran, P., Reed, E., Sharma, S., Stevens, E., Timme, R., Zheng, J., Brown, E.W. (2017). Genomics of foodborne pathogens for microbial food safety. *Current Opinion in Biotechnology* 49, 224–229.
- Alves, M., Gonçalves, T., Quintas, T. (2012). Microbial quality and yeast population dynamics in cracked green table olives' fermentations. *Food Control* 23, 363–368.
- Amann, R.L., Ludwig, W., Schleifer, K.H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* 59, 143–169.
- Aponte, M., Blaiotta, G., La Croce, F., Mazzaglia, A., Farina, V., Settanni, L. (2012). Use of selected autochthonous lactic acid bacteria for Spanish style table olive fermentation. *Food Microbiology* 30, 8–16.
- Aponte, M., Ventrino, V., Blaiotta, G., Volpe, G., Farina, V., Avellone, G., Lanza, C.M., Moschetti, G. (2010). Study of green Sicilian table olive fermentations through microbiological, chemical and sensory analyses. *Food Microbiology* 27, 162–170.
- Arena, M.E., F.M., Saguir, N.C., Manca de Nadra. (1999). Arginine, citruline and ornithine metabolism by lactic acid bacteria from wine. *International Journal of Food Microbiology* 52, 155–161.
- Arena, M.E., N.C., Manca de Nadra. (2001). Biogenic amine production by *Lactobacillus*. *Journal of Applied Microbiology* 90, 158–162.

- Argyri, A.A., Nisiotou, A.A., Mallouchos, A., Panagou, E.Z., Tassou, C.C. (2014). Performance of two potential probiotic *Lactobacillus* strains from the olive microbiota as starters in the fermentation of heat shocked green olives. *International Journal of Food Microbiology* 171, 68–76.
- Arroyo-López, F.N., Querol, A., Bautista-Gallego, J., Garrido-Fernández, A. (2008). Role of yeasts in table olive production. *International Journal of Food Microbiology* 128, 189–196.
- Balatsouras, G.D. (1995) Table Olives. Agricultural University of Athens, Athens, pp. 40-43
- Barnett, J.A. (2003). Beginnings of microbiology and biochemistry: the contribution of yeast research. *Microbiology* 149(3), 557–567.
- Bautista-Gallego, J., Arroyo-López, F.N., Durán-Quintana, M.C., Garrido-Fernández, A. (2009). Fermentation profiles of Manzanilla-Aloreña cracked green table olives in different chloride salt mixture. *Food Microbiology* 27, 403–412.
- Bautista-Gallego, J., Arroyo-López, F.N., Rantsiou, K., Jiménez-Díaz, R., Garrido-Fernández, A., Cocolin, L. (2013a). Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented table olives with probiotic potential. *Food Research International* 50, 135–142.
- Bautista-Gallego, J., Rantsiou, K., Garrido-Fernández, A., Cocolin, L., Arroyo-López, F.N. (2013b). Salt reduction in vegetable fermentation: reality or desire? *Journal of Food Science* 78, 1095–1100.
- Bautista-Gallego, J., Rodriguez-Gomez, F., Barrio, E., Querol, A., Garrido-Fernandez, A., Arroyo-López, F.N. (2011). Exploring the yeast biodiversity of green table olive industrial fermentations for technological applications. *International Journal of Food Microbiology* 147, 89–96.
- Belda, I., Ruiz, J., Alonso, A., Marquina, D., Santos, A. (2017). The Biology of *Pichia membranifaciens* Killer Toxins. *Toxins* 9(4), 112.
- Benítez-Cabello, A., Calero-Delgado, B., Rodríguez-Gómez, F., Garrido-Fernández, A., Jiménez-Díaz, R., Arroyo-López, F.N. (2019). Biodiversity and multifunctional features of lactic acid bacteria isolated from table olive biofilms. *Frontiers in Microbiology* 10.
- Bernstein, A.M., Willet, W.C. (2010). Trends in 24-h urinary sodium excretion in the United States, 1957e2003: a systematic review. *American Journal of Clinical Nutrition*, 92, 1172e1180.

- Bevilacqua, A., Altieri, C., Corbo, M.R., Sinigaglia, M., Ouoba, L.I.I. (2010). Characterization of lactic acid bacteria isolated from Italian Bella di Cerignola table olives: Selection of potential multifunctional starter cultures. *Journal of Food Science* 75(8), M536–M544.
- Bevilacqua, A., Campaniello, D., Corbo, M.R., Maddalena, L., Sinigaglia, M. (2013). Suitability of *Bifidobacterium* spp. And *Lactobacillus plantarum* as probiotics intended for fruit juices containing citrus extracts. *Journal of Food Science* 78(11).
- Bevilacqua, A., Corbo, M.R., Sinigaglia, M. (2012). Selection of yeasts as starter cultures for table olives: a step-by-step procedure. *Frontiers in Microbiology* 3, 194.
- Bevilacqua, A., Perricone, M., Cannarsi, M., Corbo, M.R., Sinigaglia, M. (2009). Technological and spoiling characteristics of the yeast microflora isolated from Belladi Cerignola table olives. *International Journal of Food Science and Technology* 44, 2198–2207.
- Blaiotta, G., Fusco, V., Ercolini, D., Aponte, M., Pepe, O., Villani, F. (2008). *Lactobacillus* strain diversity based on partial hsp60 gene sequences and design of PCR restriction fragment length polymorphism assays for species identification and differentiation. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 208–215.
- Blana, V.A., Grounta, A., Tassou, C.C., Nychas, G.J.E., Panagou, E.Z. (2014). Inoculated fermentation of green olives with potential probiotic *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus plantarum* starter cultures isolated from industrially fermented olives. *Food Microbiology* 38, 208–218.
- Bleve, G., Tufariello, M., Durante, M., Grieco, F., Ramires, F., A., Mita, G., Logrieco, A.F. (2015). Physico-chemical characterization of natural fermentation process of Conservolea and Kalamàta table olives and development of a protocol for the pre-selection of fermentation starters. *Food Microbiology* 46, 368–382.
- Bobillo, M., Marshall, V.M. (1992). Effect of acid pH and salt on acid endoproducts by *Lactobacillus plantarum* in aerated, glucose-limited continuous culture. *Journal of Applied Microbiology* 73, 67–70.
- Bonghi G, Palliotti A, (1994). Olive. Handbook of Environmental Physiology of Fruit Crops Vol. 1: Temperate Crops. Schaffer, B., Andersen, P. C. (Eds). CRC Press, Florida, U.S.A., 165-188

- Bourdichon, F., S. Casaregola, C. Farrokh, J.C. Frisvad, M.L. Gerds, W.P. Hammes, J., Harnett, G., Huys, S. Laulund, A., Ouwehand, I.B. Powell, J.B. Prajapati, Y. Seto, E. Ter Schure, A. Van Boven, V. Vankerckhoven, A. Zgoda, S. Tuijelaars, Hansen, E.B. (2012). Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. *International Journal of Food Microbiology* 154, 87–97.
- CABI (2016). *Olea europaea* subsp. *europaea* (European olive), Wallingford, UK: CAB International.
- Campaniello, D., Bevilacqua, A., D'Amato, D., Corbo, M.R., Altieri, C., Sinigaglia, M. (2005). Microbial characterization of table olives processed according to Spanish and natural styles. *Food Technology and Biotechnology* 43, 289–294.
- Caplice, E. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology* 50(1-2), 131–149.
- Cebeci, A., Gürakan, C. (2003). Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *Food Microbiology* 20(5), 511–518.
- Cocolin, L., Dolci, P., Rantsiou, K. (2011). Biodiversity and dynamics of meat fermentations: the contribution of molecular methods for a better comprehension of a complex ecosystem. *Meat Science* 89, 296–302.
- Code of Federal Regulations. (2003). Title 21, Part 101.9. Nutrition labeling of foods. Washington: Federal Register Printing Office.
- Corsetti, A., Perpetuini G., Schirone M., Tofalo R., Suzzi G. (2012). Application of starter cultures to table olive fermentation: An overview on the experimental studies. *Frontiers Microbiology* 3, 1-6
- De Bellis, P., Valerio, F., Sisto, A., Lonigro, S.L., Lavermicocca, P. (2010). Probiotic table olives: microbial populations adhering on olive surface in fermentation sets inoculated with the probiotic strain *Lactobacillus paracasei* IMPC2.1 in an industrial plant. *International Journal of Food Microbiology* 140, 6–13.
- De Castro, A., Montañó, A., Casado, F.J., Sánchez, A.H., Rejano, L., (2002). Utilization of *Enterococcus casseliflavus* and *Lactobacillus pentosus* as starter culture for Spanish-style green olive fermentation. *Food Microbiology* 19, 637–644.

- Di Cagno, R., Coda, R., De Angelis, M., Gobbetti, M. (2013). Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiology* 33(1), 1–10.
- Di Cagno, R., R.F., Surico, S., Siragusa, M., De Angelis, A., Paradiso, F., Minervini, L., De Gara M., Gobbetti. (2008). Selection and use of autochthonous mixed starter for lactic acid fermentation of carrots, French beans or marrows. *International Journal of Food Microbiology* 127, 220–228.
- Dijk L. E., Auger H., Jaszczyszyn N., Y., Thermes C. (2014). Ten years of next generation sequencing technology. *Trends in Genetics* 30(9), 418-26
- Domínguez-Manzano, J., Olmo-Ruiz, C., Bautista-Gallego, J., Arroyo- López, F.N., Garrido-Fernández, A., Jiménez-Díaz, R. (2012). Biofilm formation on abiotic and biotic surfaces during Spanish style green table olive fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 157, 230–238.
- Doulgeraki A, Hondrodinou O, Iliopoulus U, Panagou E.Z. (2012). Lactic acid bacteria and yeast heterogeneity during aerobic and modified atmosphere packaging storage of natural black Conservolea olives in polyethylene pouches. *Food Control* 26, 49-57
- Doulgeraki, A.I., Pramateftaki, P., Argyri, A.A., Nychas, G.J.E., Tassou, C.C., Panagou, E.Z. (2013). Molecular characterization of lactic acid bacteria isolated from industrially fermented Greek table olives. *Food Science and Technology* 50, 353–356.
- Duran-Quintana, M.C., P. Garcia Garcia A. Garrido-Fernandez. (1999). Establishment of conditions for green table olive fermentation at low temperature. *International Journal of Food Microbiology* 51, 133–143.
- EFSA, (2007). Qualified presumption of safety. In “The EFSA Journal”. Appendix A: Assessment of gram positive non sporulating bacteria. *The EFSA Journal* 587 pp. 4–6.
- EFSA, (2019). Scientific opinion of the EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens (NDA) on Dietary reference values for sodium. *The EFSA Journal*. Volume 19, Issue 9.
- Eren, A. M., Maignien, L., Sul, W. J., Murphy, L. G., Grim, S. L., Morrison, H. G., Sogin, M. L. (2013). Oligotyping: differentiating between closely related microbial taxa using 16S rRNA gene data. *Methods in Ecology and Evolution* 4(12), 1111–1119.

- FAO/WHO. (2001). Report on Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization.
- FAO/WHO. (2002). Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Ontario, Canada, London. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization.
- FAO/WHO. (2009). Report of a Joint FAO/WHO Expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with lactic acid bacteria (October 2001). Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization.
- Fedeli, E. (1977). Lipids of olives. Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids 15, 57–74.
- Fedeli, E., acini, G. (1971). Lipid composition of vegetable oils. Advances in Lipid Research. Kiritsakis, A., Shahidif. (Eds.) 9, 335–382.
- Ferguson, L., Sibbett, G.S. Martin, G.C. (1994). Olive Production Manual, University of California, Division of Agriculture and Natural Resources, Oakland, CA, Publication 3353.
- Forbes, J., D., Knox, N.C., Ronholm, J., Pagotto, F., Reimer, A., (2017). Metagenomics: The Next Culture-Independent Game Changer. *Frontiers in Microbiology* 8.
- Franzetti, L., Scarpellini, M., Vecchio, A., Planeta, D., (2011). Microbiological and safety evaluation of green table olives marketed in Italy. *Annals of Microbiology* 61, 843–851.
- Fukushima, M., Kakinuma, K., Kawaguchi, R. (2002). Phylogenetic analysis of *Salmonella*, *Shigella*, and *Escherichia coli* strains on the basis of the *gyrB* gene sequence. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 2779–2785.
- García-Ruiz, A., E.M. González-Rompinelli, B. Bartolomé M.V. Moreno-Arribas. (2011). Potential of wine-associated lactic acid bacteria to degrade biogenic amines. *International Journal of Food Microbiology* 148, 115–120.
- García-Ruiz, A., E.M., González-Rompinelli, B., Bartolomé M.V., Moreno-Arribas. (2011). Potential of wine-associated lactic acid bacteria to degrade biogenic amines. *International Journal of Food Microbiology* 148, 115–120.

- Gardner, N.J., T. Savard, P., Obermeier, G., Caldwell, C.P., Champagne. (2001). Selection and characterization of mixed starter cultures for lactic acid fermentation of carrot, cabbage, beet and onion vegetable mixtures. *International Journal of Food Microbiology* 64, 261–275.
- Garrido-Fernández, A., García García, P., Brenes Balbuena, M. (1995). Olive fermentation. *Biotechnology: Enzymes, Biomass, Food and Feed*. Rehm Reed (Eds.), IntechOpen, London, U.K., pp. 593–627.
- Gouvinhas, I., Machado, N., Sobreira, C., Domínguez-Perles, R., Gomes, S., Rosa, E., Barros, A. (2017). Critical Review on the Significance of Olive Phytochemicals in Plant Physiology and Human Health. *Molecules* 22(11), 1986.
- Graça, P. (2013). Estratégias Para a Redução do Consumo de Sal na Alimentação em Portugal. Direção Geral de Saúde (in Portuguese). (<https://www.dgs.pt/documentos-e-publicacoes/estrategia-para-a-reducao-do-consumo-de-sal-na-alimentacao-em-portugal-relatorio-pdf.aspx>).
- Hammes, W. P. (1990). Bacterial starter cultures in food production. *Food Biotechnology* 4(1), 383–397.
- Harris, L.J. (1998). The microbiology of vegetable fermentations. *Microbiology of Fermented Foods*, Wood, B. J. B. (Eds.), Blackie Academic and Professional, London, U.K., pp. 45–72.
- Hashmi, M. A., Khan, A., Hanif, M., Farooq, U., Perveen, S. (2015). Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacology of *Olea europaea* (Olive). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2015, 1–29.
- Heperkan, D. (2013). Microbiota of table olive fermentations and criteria of selection for their use as starters. *Frontiers in Microbiology* 4.
- Hernández, A., Martín, A., Aranda, E., Pérez-Nevado, F., Córdoba, M. G. (2007). Identification and characterization of yeast isolated from the elaboration of seasoned green table olives. *Food microbiology* 24, 346–351.
- Holzapfel, W.H. (1997). Use of starter cultures in fermentation on a household scale. *Food Control* 8, 241–258.
- Hugenholtz, P., Goebel, B.M., Pace N.R. (1998). Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology* 180, 4765–4774.

- Hurtado, A., Reguant, C., Bordons, A., Rozes, N. (2010). Evaluation of a single and combined inoculation of a *Lactobacillus pentosus* starter for processing cv. Arbequina natural green olives. *Food Microbiology* 27, 731–740.
- Hurtado, A., Reguant, C., Bordons, N., and Rozés, N. (2012). Lactic acid bacteria from fermented table olives. *Food Microbiology* 31, 1–8.
- Hurtado, A., Reguant, C., Esteve- Zarzoso, B., Bordons, A., Rozès, N., (2008). Microbial population dynamics during the processing of Arbequina table olives. *Food Research International* 41, 738–744.
- International Olive Council (IOC) (2016). Market Newsletter No 108 – September 2016.
- International Olive Council (IOC) (2019). OLIVE OIL – ESTIMATES 2019/20 CROP YEAR. (<https://www.internationaloliveoil.org/olive-oil-estimates-2019-20-crop-year/>)
- International Olive Oil Council (IOOC) (2004). Trade standard applying to table olives. RES-2/91-IV/04. IOOC, Madrid. <https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2019/11/COI-OT-NC1-2004-Eng.pdf>
- Jack, R.W., Tagg, J.R., Ray, B. (1995). Bacteriocins of gram positive bacteria. *Microbiology Reviews* 59, 171–200.
- Jagadeesan, B., Gerner-Smidt, P., Allard, M. W., Leuillet, S., Winkler, A., Xiao, Y., Grant, K. (2018). The Use of Next Generation Sequencing for Improving Food Safety: Translation into practice. *Food Microbiology*.
- Janick, J., Paull, R. E., (2008). The encyclopedia of fruit and nuts. The encyclopedia of fruit and nuts. Janick, J., Paull R.E., (Eds.), Hawaii, U.S.A., p 954.
- Jimenez, B., Sanchez-Ortiz, A., Lorenzo, M.L., Rivas, A. (2013) Influence of fruit ripening on agronomic parameters, quality indices, sensory attributes and phenolic compounds of Picudo olive oils. *Food Research International* 54, 1860–1867.
- Kasai, H., Ezaki, T., Harayama, S. (2000). Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria by their gyrB sequences. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 301–308.
- Kumar, R., Ichihashi, Y., Kimura, S., Chitwood, D. H., Headland, L. R., Peng, J. Sinha, N. R. (2012). A High-Throughput Method for Illumina RNA-Seq Library Preparation. *Frontiers in Plant Science* 3.

- Kurtzman, C.P., Fell, J.W. (1998). The yeast, a taxonomic study, 4th edition. Elsevier, Amsterdam.
- La Duc, M. T., Satomi, M., Agata, N. Venkateswaran, K. (2004). *gyrB* as a phylogenetic discriminator for members of the *Bacillus anthracis-cereus-thuringiensis* group. *Journal of Microbiological Methods* 56, 383–394.
- Landete, J.M., Curiel, J.A., Rodríguez, H., delas Rivas, B., Muñoz, R. (2008). Study of the inhibitory activity of phenolic compounds found in olive products and their degradation by *Lactobacillus plantarum* strains. *Food Chemistry* 107, 320–326.
- Lanza, B. (2013). Abnormal fermentations in table-olive processing: microbial origin and sensory evaluation. *Frontiers in Microbiology* 4.
- Lanza, B., Di Serio, M.G., Russi, F., Iannucci, E., Giansante, L., Di Loreto, G. Di Giacinto, L. (2014). Evaluation of the nutritional value of oven-dried table olives (cv. Majatica) processed by the Ferrandina style. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* 91, 117–127.
- Lavermicocca, P., F. Valerio, S.L. Longogro, M.D. Angelis, L. Morelli, M.L. Callegari, C.G. Rizzello A. Visconti. (2005). Study of adhesion and survival of lactobacilli and bifidobacteria on table olives with the aim of formulating a new probiotic food. *Applied and Environmental Microbiology* 71(8), 4233–4240.
- Lavermicocca, P., Gobbetti, M., Corsetti, A., Caputo, L. (1998). Characterization of lactic acid bacteria isolated from olive phyllophane and table olive brines. *Italian Journal of Food Science* 10, 27–39.
- Levin, R. E., Vaughn, R. H. (1966). *Desulfovibrio aestuarii*, the causative agent of hydrogen sulfide spoilage of fermenting olive brines. *Journal of Food Science* 31(5), 768–772.
- Loman, N.J, Pallen M.J. (2015). Twenty years of bacterial genome sequencing. *Nature Reviews Microbiology* 13(12), 787–794.
- Machida, R.J. Lin, Y.Y. (2014). Four methods of preparing mRNA 5' end libraries using the Illumina sequencing platform. *PLOS ONE* 9(7), p. e101812.
- Mardis, E.R. (2008). Next-generation DNA sequencing methods. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 9, p. 387-402.
- Marquina, D., Peres, C., Caldas, F.V., Marques, J.F., Peinado, J.M., Spencer-Martins, I. (1992). Characterization of the yeast population in olive brines. *Letters in Applied Microbiology* 14, 279–283.

- Mateus, T., Santo, D., Saúde, C., Pires-Cabral, P., Quintas, C. (2016). The effect of NaCl reduction in the microbiological quality of cracked green table olives of the Maçanilha Algarvia cultivar. *International Journal of Food Microbiology* 218, 57–65
- Mbareche H., Veillette, M., Bilodeau, G., Duchaine C., (2020). Comparison of the performance of ITS1 and ITS2 as barcodes in amplicon-based sequencing of bioaerosols. *PeerJ* 8, e8523.
- Montano, A., Sanchez, A.H. de Castro, A. (1993). Controlled fermentation of Spanish-type green olives. *Journal of Food Science* 58, 842-4, 852.
- Montano, A., Sanchez, A.H., Lopez- Lopez, A., De Castro, A., and Rejano, L. (2010). Chemical composition of fermented green olives: acidity, salt, moisture, fat, protein, ash, fiber, sugar, and polyphenol. V.R., Preedy, and R.R., Watson (Eds.), Academic Press, Singapore, pp. 291–296.
- Montet D., Ramesh C., Zakhia-Rozis N. (2014). Microorganisms and Fermentation of Traditional Fruits, Food biology series. Ramesh C. Ray, Didier Montet, (Eds). CRC Press, Florida, U.S.A., p. 130.
- Montet, D., Loiseau, G., Zakhia-Rozis, N. (2006). Microbial technology of fermented vegetables. Ray R.C., Ward O.P., (Eds.). Microbial biotechnology in horticulture, vol 1. Science Publishers, Enfield . 309–343.
- Montoro, B.P., Benomar, N, Lavilla Lerma, L, Castillo Gutierrez, S., Galvez, A., Abriouel, H. (2016). Fermented Aloreña table olives as a source of potential probiotic *Lactobacillus pentosus* strains. *Frontiers in Microbiology* 7(1583), 1–13
- Mullineux, T., Hausner, G. (2009). Evolution of rDNA ITS1 and ITS2 sequences and RNA secondary structures within members of the fungal genera *Grosmannia* and *Leptographium*. *Fungal Genetics and Biology* 46(11), 855–867.
- Mundt, J.O. (1970). Lactic acid bacteria associated with raw plant food material. *Journal of Milk and Food Technology* 33, 550-3.
- Neil, H. (2007). Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology. *The Journal of Experimental Biology* 209, 1518-1525
- Niemann, S., Harmsen, D., Rusch-Gerdes, S., Richter, E. (2000). Differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by *gyrB* DNA sequence polymorphism analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 3231–3234.

- Nisiotou, A.A., Chorianopoulos, N., Nychas, G.J.E., Panagou, E. Z. (2010). Yeast heterogeneity during spontaneous fermentation of black Conservolea olives in different brine solutions. *Journal of Applied Microbiology* 108, 396–405.
- Nochi, Z., Sahebekhtiari, N., Kharaziha, P., Chiani, M., Motavaze, K., Dabiri, H., Noorinayer, B. (2009). Comparison of 16S rRNA, 23S rRNA and gyrB genes sequences in phylogenetic relationships of Shigella isolates from Iran. *Annals of Microbiology* 59(3), 615–622.
- Ortega, R. M., López Sobaler, A. M., Ballesteros, J. M., Pérez Farinós, N., Rodríguez Rodríguez, E., Aparicio, A. (2011). Estimation of salt intake by 24 h urinary sodium excretion in a representative sample of Spanish adults. *British Journal of Nutrition* 105, 787e794.
- Ouwehand, A.C., Kirjavainen, P.V., Gronlund, M.M., Isolauri, E., Salminen, S.J. (1999). Adhesion of probiotic microorganisms to intestinal mucus. *International Dairy Journal* 9, 623–630.
- Panagou, E.Z., Hondrodinou, O., Mallouchos, A., Nychas, G.J.E. (2011). A study on the implications of NaCl reduction in the fermentation profile of Conservolea natural black olives. *Food Microbiology* 28, 1301–1307.
- Panagou, E.Z., Katsaboxakis, C.Z. (2006). Effect of different brining treatments on the fermentation of cv. Conservolea green olives processed by the Spanish method. *Food Microbiology* 23, 199–204.
- Panagou, E.Z., Schillinger, U., Franz, C. M.A.P., Nychas, G.J.E. (2008). Microbiological and biochemical profile of cv. Conservolea naturally black olives during controlled fermentation with selected strains of lactic acid bacteria. *Food Microbiology* 25, 348–358.
- Panagou, E.Z., Tassou, C.C., Katsaboxakis, C.Z. (2003). Induced lactic acid fermentation of untreated green olives of the Conservolea cultivar by *Lactobacillus pentosus*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83, 667–674.
- Pavan, M. E. (2005). Phylogenetic relationships of the genus Kluyvera: transfer of *Enterobacter intermedius* Izard et al. 1980 to the genus Kluyvera as *Kluyvera intermedia* comb. nov. and reclassification of *Kluyvera cochleae* as a later synonym of *K. intermedia*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55(1), 437–442.

- Pearson, W. R. (2013). An Introduction to Sequence Similarity (“Homology”) Searching. *Current Protocols in Bioinformatics* 42(1), 3.1.1–3.1.8.
- Pino, A., De Angelis, M., Todaro, A., Van Hoorde, K., Randazzo, C. L., Caggia, C. (2018). Fermentation of Nocellara Etnea table olives by functional starter cultures at different low salt concentrations. *Frontiers in Microbiology* 9.
- Poirier, S., Rué, O., Peguilhan, R., Coeuret, G., Zagorec, M., Champomier-Vergès, M.C. Chaillou, S. (2018). Deciphering intra-species bacterial diversity of meat and seafood spoilage microbiota using gyrB amplicon sequencing: A comparative analysis with 16S rDNA V3-V4 amplicon sequencing. *PLOS ONE* 13(9), e0204629.
- Randazzo, C.L., Rajendram, R., Caggia, C. (2010). Lactic Acid Bacteria in Table Olive Fermentation. *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*. Victor R., Preedy, Watson Ronald Ross (Eds.) 369–376.
- Rao, M.S., J. Pintado, W.F. Stevens, Guyot, J.P. (2004). Kinetic growth parameters of different amylolytic and non-amylolytic *Lactobacillus* strains under various salt and pH conditions. *Bioresource Technology* 94(3), 331–337.
- Ray, R.C. P.S. Shivkumar. (2009). Traditional and novel fermented foods and beverages from tropical root and tuber crops: Review. *International Journal of Food Science and Technology* 44, 1073–1087.
- Rodríguez-Gómez, F., Bautista-Gallego, J., Romero-Gil, V., Arroyo-López, F. N., Garrido-Fernández, A., García-García, P. (2012). Effects of salt mixtures on Spanish green table olive fermentation performance. *LWT. Food Science and Technology* 46(1), 56–63.
- Romero-Gil, V., Bautista-Gallego, J., Rodríguez-Gómez, F., García-García, P., Jiménez-Díaz, R., Garrido-Fernández, A., Arroyo-López, F.N. (2012). Evaluating the individual effects of temperature and salt on table olive related microorganisms. *Food Microbiology* 33(2), 178–184.
- Ross, R.P., Morgan, S., Hill, C. (2002). Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology* 79, 3–16.
- Ruiz-Barba, J.L. Jimenez-Diaz, R. (1995). Availability of essential B-group vitamins to *Lactobacillus plantarum* in green olive fermentation brines. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 1294–7.

- Ryan, D., Antolovich, M., Herlt, T., Prenzler, P.D., Lavee, S., Robards, K. (2002). Identification of phenolic compounds in tissues of the novel olive cultivar Hardy's Mammoth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 6716–6724.
- Sanchez, A.H., de Castro, A., Rejano, L., Montaña, A. (2000). Comparative study on chemical changes in olive juice and brine during green olive fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 5975–5980.
- Santos, M. H. S. (1996). Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology* 29, 213–231.
- Segovia-Bravo K, Arroyo-López, F.N., Garcia P, Duran Quintana MC, Garrido-Fernández A. (2007). Treatment of green table olive solutions with ozone. Effect on the polyphenol content on *Lactobacillus pentosus* and *Saccharomyces cerevisiae* growth. *International Journal of Food Microbiology* 114, 60-68
- Servili, M., Settanni, L., Veneziani, G., Esposto, S., Massitti, O., Taticchi, A., Urbani, S., Montedoro, G.F., Corsetti, A. (2006). The use of *Lactobacillus pentosus* 1MO to shorten the debittering process time of black table olives (cv. Itrana and Leccino): apilot-scale application. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 3869–3875.
- Shah, N.P. (2007). Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal* 11, 1262–1277.
- Simopoulos, A.P. (2001). The Mediterranean diets: What is so special about the diet of Greece? *The scientific evidence. Journal of Nutrition* 131, 3065S–3073S.
- Steinkraus, K.H. (2002). Fermentations in world food processing. Comprehensive Reviews. *Food Science and Food Safety* 1, 23–32.
- Stiles, M.E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70, 331–345.
- Tamime, A.Y., Saarela, M., Sondergaard, K., Mistry, V.V., Shah, N.P. (2005). Production and maintenance of viability of probiotic microorganisms in dairy products, Probiotic Dairy Products 2nd Edition Tamime Y., Thomas A. V., Wiley J. (Eds.), John Wiley & Sons Ltd. New Jersey, U.S.A., pp. 39–63.
- Tao, X., Son,g S., Hao, M., Xie, M. (2012). Dynamic changes of lactic acid bacteria flora during Chinese sauerkraut fermentation. *Food Control* 26, 178–181.
- Taormina, P. J. (2010). Implications of Salt and Sodium Reduction on Microbial Food Safety. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 50(3), 209–227.

- Tassou, C. C., Panagou, E. Z., and Nychas, G.J.E. (2010). Microbial colonization of naturally fermented olives, Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention. V. R. Preedy, R. R. Watson (Eds.), Academic Press, Massachusetts, U.S.A., pp. 397–406.
- Tassou, C.C., Panagou, E.Z., Katsaboxakis, K.Z. (2002). Microbiological and physicochemical changes of naturally black olives fermented at different temperatures and NaCl levels in the brines. *Food Microbiology* 19, 605–615.
- Temmerman, R., Huys, G., Swings, J. (2004). Identification of lactic acid bacteria: culture dependent and culture independent methods. *Trends in Food Science and Technology* 15, 348–359.
- The Plant List, 2013. <http://www.theplantlist.org/>
- Torriani, S., Felis, G. E., Dellaglio, F. (2001). Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by recA Gene Sequence Analysis and Multiplex PCR Assay with recA Gene-Derived Primers. *Applied and Environmental Microbiology* 67(8), 3450–3454.
- Tsapatsaris, S. P. Kotzekidou. (2004). Application of central composite design and response surface methodology to the fermentation of olive juice by *Lactobacillus plantarum* and *Debaryomyces hansenii*. *International Journal of Food Microbiology* 95(2), 157–168.
- Tufariello, M., Durante, M., Ramires, F. A., Grieco, F., Tommasi, L., Perbellini, E., Bleve, G. (2015). New process for production of fermented black table olives using selected autochthonous microbial resources. *Frontiers in Microbiology* 6.
- Turcatti, G., Romieu, A., Fedurco, M., Tairi, A.P. (2008). A new class of cleavable fluorescent nucleotides: synthesis and optimization as reversible terminators for DNA sequencing by synthesis. *Nucleic Acids Research* 36(4), e25–e25.
- Valerio, F., de Candida, S., Lonigro, S.L, Russo, F., Riezzo, G., Orlando, A. (2011). Role of the probiotic strain *Lactobacillus paracasei* LMGP22043 carried by artichokes in influencing faecal bacteria and biochemical parameters in human subjects. *Journal of Applied Microbiology* 111, 155–164.
- Van Reenen, C.A., Chikindas, M. L., VanZyl, W.H., Dicks, L. M.T. (2003). Characterization and heterologous expression of a class II bacteriocin, plantaricin 423 from *Lactobacillus plantarum* 423, in *Saccharomyces cerevisiae*.

International Journal of Food Microbiology 81, 29–40.

- Varzakas, T., Zakynthinos, G., Proestos, C., Radwanska, M. (2017). Fermented Vegetables. In: Minimally Processed Refrigerated Fruits and Vegetables. Fatih Yildiz, Robert C. Wiley (Eds.), R.C. Willey, Maryland, U.S.A., pp. 537–584.
- Wang, L.-T., Lee, F.-L., Tai, C.-J., Kasai, H. (2007). Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA–DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57(8), 1846–1850.
- Wang, X.-C., Liu, C., Huang, L., Bengtsson-Palme, J., Chen, H., Zhang, J.-H., Li, J.Q. (2014). ITS1: a DNA barcode better than ITS2 in eukaryotes. *Molecular Ecology Resources* 15(3), 573–586.
- World Health Organization (WHO), (2007). Reducing Salt Intake in Populations. Report of a WHO Forum and Technical Meeting. WHO Document Publication Services, Geneva.
- Wouters, D., N. Bernaert, W. Conjaerts, B. Van Droogenbroeck, M., De Loose, L. De Vuyst. (2013). Species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of spontaneous leek fermentations. *Food Microbiology* 33, 185–196.
- Yamamoto, S. Harayama, S. (1995). PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 1104–1109.
- Yamamoto, S. Harayama, S. (1996). Phylogenetic analysis of *Acinetobacter* strains based on the nucleotide sequences of *gyrB* genes and on the amino acid sequences of their products. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46, 506–511.
- Yamamoto, S. Harayama, S. (1998). Phylogenetic relationships of *Pseudomonas putida* strains deduced from the nucleotide sequences of *gyrB*, *rpoD* and 16S rRNA genes. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48, 813–819.
- Yamamoto, S., Bouvet, P.J. Harayama, S. (1999). Phylogenetic structures of the genus *Acinetobacter* based on *gyrB* sequences: comparison with the grouping by DNA–DNA hybridization *International Journal of Systematic Bacteriology* 49, 87–95.

- Yang, R.H., Su, J.H., Shang, J.J., Wu, Y.Y., Li, Y., Bao, D.P., Yao, Y.J. (2018). Evaluation of the ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS), specifically ITS1 and ITS2, for the analysis of fungal diversity by deep sequencing. *PLOS ONE* 13(10), e0206428.
- Zinno, P., Guantario, B., Perozzi, G., Pastore, G., Devirgiliis, C. (2017). Impact of NaCl reduction on lactic acid bacteria during fermentation of Nocellara del Belice table olives. *Food Microbiology* 63, 239–247.
- Μ. Καββαθά (2019). Ζύμωση φυσικής μαύρης ελιάς ποικιλίας Κονσερβολιά με χρήση καλλιεργειών εκκίνησης με προβιοτικό δυναμικό. Πτυχιακή Μελέτη, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.