



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

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Εφαρμογή φασματοσκοπικών (FT-IR) και μοριακών τεχνικών
(μεταγενετική ανάλυση) στην αξιολόγηση της ποιότητας
συσκευασμένων πράσινων ελιών

Ευφροσύνη Σ. Καραγιάννη

Επιβλέπων καθηγητής:

Ευστάθιος Πανάγου, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ

2021

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

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Εφαρμογή φασματοσκοπικών (FT-IR) και μοριακών τεχνικών
(μεταγενετική ανάλυση) στην αξιολόγηση της ποιότητας
συσκευασμένων πράσινων ελιών

“Application of spectroscopic (FT-IR) and molecular techniques
(metagenetic analysis) in the evaluation of the quality
of packaged green olives”

Ευφροσύνη Σ. Καραγιάννη

Εξεταστική επιτροπή:

Ευστάθιος Πανάγου, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Γεώργιος-Ιωάννης Νυχάς, Καθηγητής ΓΠΑ

Αγάπη Δουλγεράκη, Εντεταλμένη Ερευνήτρια ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ

Εφαρμογή φασματοσκοπικών (FT-IR) και μοριακών τεχνικών (μεταγενετική ανάλυση) στην αξιολόγηση της ποιότητας συσκευασμένων πράσινων ελιών

ΠΜΣ Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία αξιολογήθηκε η ποιότητα συσκευασμένων πράσινων ελιών των ελληνικών ποικιλιών Χαλκιδική και Κονσερβολιά, που είχαν συντηρηθεί σε εύκαμπτους πολυστρωματικούς περιέκτες με τροποποιημένη ατμόσφαιρα (100% N₂) για χρονικό διάστημα 12 μηνών. Αρχικά πραγματοποιήθηκε εφαρμογή φασματοσκοπίας υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR) για τον προσδιορισμό της μεταβολής του συνολικού μεταβολικού αποτυπώματος των δειγμάτων κατά τη δωδεκάμηνη συντήρηση. Στη συνέχεια, τα φασματικά δεδομένα συσχετίστηκαν με τα μικροβιολογικά δεδομένα, καθώς και με την ποικιλία και τη συσκευασία των δειγμάτων, για τη δημιουργία μοντέλων πρόβλεψης. Παράλληλα, εφαρμόστηκε μεταγενετική ανάλυση για τον προσδιορισμό του πληθυσμού των ζυμών-μυκήτων του ελαιοκάρπου. Η ανεξάρτητη από την καλλιέργεια μοριακή τεχνική (Illumina - Mi-Seq) πραγματοποιήθηκε σε τρία χρονικά σημεία κατά τη διάρκεια της συντήρησης: αρχικό (μήνας 0), ενδιάμεσο (μήνας 6) και τελικό (μήνας 12). Για την ταυτοποίηση των ζυμών-μυκήτων χρησιμοποιήθηκε η γενετική περιοχή ITS2.

Το μοντέλο PLS-R που δημιουργήθηκε για την πρόβλεψη του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων παρουσίασε ικανοποιητική επίδοση, με τιμές RMSEC 0,313, RMSECV 0,425 και RMSEP 0,412 log CFU/g και αντίστοιχες τιμές συντελεστών συσχέτισης R²c 0,743, R²cv 0,539 και R²p 0,448. Η επίδοση του μοντέλου PLS-DA για τη διάκριση των δύο ποικιλιών αξιολογήθηκε με βάση τα ποσοστά ακρίβειας (Accuracy, %) τα οποία ήταν 92,2% και 94,7% για την ανάπτυξη και την επικύρωση του μοντέλου αντίστοιχα. Επιπλέον, η ευαισθησία (Sensitivity, %) του μοντέλου κατά την επικύρωση για κάθε μια ποικιλία ξεχωριστά διαμορφώθηκε σε 100% και 90,9% για τις ποικιλίες Χαλκιδική και Κονσερβολιά αντίστοιχα. Λιγότερο ικανοποιητική ήταν η επίδοση του μοντέλου PLS-DA για τη διάκριση των δύο συσκευασιών μεταξύ τους, καθώς η ακρίβεια του μοντέλου ήταν 68,8% κατά την ανάπτυξη του μοντέλου και 57,9% κατά την επικύρωση. Επιπλέον, η ευαισθησία του μοντέλου για κάθε μια συσκευασία ξεχωριστά διαμορφώθηκε σε 63,6% και 50%.

Αναφορικά με την ταυτοποίηση των ζυμών-μυκήτων στο οικοσύστημα της πράσινης ελιάς με βάση τη γενετική περιοχή ITS2, στα 12 δείγματα ελαιοκάρπου ανιχνεύθηκαν συνολικά 35 OTUs που αντιπροσωπεύουν 2 φύλα (Ascomycota και Basidiomycota). Όσον αφορά στη σύνθεση του πληθυσμού των ζυμομυκήτων σε επίπεδο είδους, παρατηρήθηκε ότι στους μήνες 0 και 6 υπερίσχυαν τα είδη *Pichia membranifaciens* και *Pichia manshurica*. Κατά το ενδιάμεσο χρονικό σημείο της συντήρησης, σε κάποια δείγματα παρατηρήθηκαν σχετικά αυξημένοι πληθυσμοί *Saccharomyces cerevisiae* και *Brettanomyces* spp. Στο τέλος της συντήρησης τα δείγματα παρουσίασαν μεγαλύτερη βιοποικιλότητα. Ταυτοποιήθηκαν είδη των γενών *Candida* και *Quambalaria* και είδη όπως τα *Rhodospiridiobolus colostri*, *Yarrowia bubula*, *Alternaria alternata* και *Aspergillus* spp.

Επιστημονική περιοχή: Ποιότητα πράσινων ελιών

Λέξεις κλειδιά: ελιά, ποιότητα, FT-IR, μεταγενετική ανάλυση

Application of spectroscopic (FT-IR) and molecular techniques (metagenetic analysis) in the evaluation of the quality of packaged green olives

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

ABSTRACT

The aim of the present work was to evaluate the quality of packaged Spanish-style green olives of the Greek varieties Halkidiki and Conservolea, which had been preserved in flexible multi-layered pouches under a modified atmosphere (100% N₂) for a period of 12 months. Initially, Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) was performed to determine the change in the overall metabolic fingerprint of the samples during storage. Further on, the spectral data acquired were correlated with the microbiological data, as well as with the variety of olives and type of packaging to develop prediction models. At the same time, metagenetic analysis was applied to identify the olive fungal communities. The culture-independent molecular technique (Illumina - Mi-Seq) was performed at the beginning (0 months), middle (6 months) and final (12 months) stages of storage to elucidate the biodiversity of fungal communities using the ITS2 region.

The PLS-R model developed to predict the population of lactic acid bacteria presented satisfactory performance with root mean squared error (RMSE) values of 0.313, 0.425, and 0.412 log CFU/g for model calibration, cross validation and prediction, respectively. The calculated values of the coefficient of determination (R²) were 0.743, 0.539, 0.448 for model calibration, cross validation and prediction, respectively. The performance of the PLS-DA model for the discrimination of the two varieties presented accuracy of 92.2% and 94.7% for model calibration and prediction, respectively. In addition, the per class accuracy (sensitivity) for the two table olive varieties were 100% and 90.9% for Halkidiki and Conservolea, respectively. Finally, the performance of the PLS-DA model for the discrimination of the two types of pouches was less satisfactory, as the accuracy was 68.8% and 57.9% for model calibration and prediction, respectively. In addition, the per class accuracy (sensitivity) for the two types of pouches were 63.6% and 50%, respectively.

Regarding the identification of fungal communities in the green olive ecosystem based on the ITS2 region, a total of 35 OTUs representing 2 phyla (Ascomycota and Basidiomycota) were detected in 12 olive fruit samples. Regarding the composition of the yeast population at species level it was observed that *Pichia membranifaciens* and *Pichia manshurica* prevailed in 0 and 6 months of storage. In addition, relatively high populations of *Saccharomyces cerevisiae* and *Brettanomyces* spp. were observed in some samples in the 6th month of storage. Finally, at the end of storage the samples presented higher biodiversity. Specifically, *Candida* spp. and *Quambalaria* spp. as well as *Rhodosporiobolus colostri*, *Yarrowia bubula*, *Alternaria alternata* and *Aspergillus* spp. were mostly identified.

Scientific area: Green olives quality

Keywords: olive, quality, FT-IR, metegenetic analysis

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στο πλαίσιο του Π.Μ.Σ. «Επιστήμη & Τεχνολογία Τροφίμων».

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον επιβλέποντα κ. Ευστάθιο Πανάγου, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, για την ανάθεση της διπλωματικής μου διατριβής, καθώς και για την καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές του καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Γ.Ι. Νυχά, Διευθυντή του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων και την Εντεταλμένη Ερευνήτρια κ. Α. Δουλγεράκη, για το χρόνο που αφιέρωσαν στη μελέτη της διατριβής και τη συμμετοχή τους στην εξεταστική επιτροπή.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά την Αικατερίνη Τζαμουράνη η οποία υποστήριξε την προσπάθειά μου αυτή από την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας μέχρι και τη συγγραφή της μελέτης. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ Ευανθία Μάνθου, για την βοήθεια και τις σημαντικές υποδείξεις της στο πλαίσιο της μεταγενετικής ανάλυσης, καθώς και την Δρ Λεμονιά-Χριστίνα Φέγγου, για την καταλυτική συνεισφορά και την καθοδήγηση της κατά την επεξεργασία των φασματοσκοπικών δεδομένων.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Ευγενία Σπυρέλλη για τις συμβουλές και τη βοήθειά της. Τέλος ευχαριστώ όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων για την εξαιρετική συνεργασία.

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	1
1.1.1.Προέλευση και φυσικό περιβάλλον	1
1.1.2.Θρεπτική σύνθεση του ελαιοκάρπου και πλεονεκτήματα στην υγεία	2
1.1.3.Ο καρπός της ελιάς – Μορφολογικά χαρακτηριστικά	2
1.1.4.Επιτραπέζια ελιά	3
1.1.5.Εμπορικοί τύποι επιτραπέζιας ελιάς	5
1.1.6.Κονσερβολιά	8
1.1.7.Χαλκιδικής	8
1.2.Ζύμωση	9
1.2.1.Αυθόρμητη ζύμωση	10
1.2.2.Ελεγχόμενη ζύμωση	11
1.2.3.Μικροοργανισμοί ζύμωσης	12
1.3.Μέθοδοι προσδιορισμού της μικροβιακής κοινότητας κατά τη συντήρηση της επιτραπέζιας ελιάς	15
1.3.1.Τεχνικές εξαρτώμενες από την καλλιέργεια (Culture-dependent)	16
1.3.2.Τεχνικές ανεξάρτητες από την καλλιέργεια (Culture-independent)	17
1.3.3.Τεχνολογίες αλληλούχησης επόμενης γενεάς	18
2. Σκοπός	21
3. Υλικά και μέθοδοι	22
3.1.Προετοιμασία και συνθήκες συντήρησης των δειγμάτων	22
3.2.Μικροβιολογικές αναλύσεις	22
3.3.Φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR)	23
3.4.Ανάλυση φασματικών δεδομένων και συσχέτιση με μικροβιολογικά δεδομένα	24
3.5.Μεταγενετική ανάλυση	26
3.5.1.Εκχύλιση γενετικού υλικού DNA από τρόφιμο	26
3.5.2.Μέτρηση ποσότητας και καθαρότητας DNA	28
3.5.3.Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)	29
3.5.4.Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης και ανίχνευση των προϊόντων της PCR	30
3.5.5.Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης	31
3.5.6.Αυτοματοποιημένο σύστημα ηλεκτροφόρησης	31
3.5.7.Αλληλούχηση	32
3.5.8.Ανάλυση δεδομένων	33
3.5.9.Στατιστική ανάλυση	34

4. Αποτελέσματα και συζήτηση	35
4.1.Μικροβιολογικές αναλύσεις	35
4.2.Φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR)	36
4.3.Μοριακές αναλύσεις	44
5. Συμπεράσματα	57
Βιβλιογραφία	58

1. Εισαγωγή

1.1. Ελιά

1.1.1. Προέλευση και φυσικό περιβάλλον

Το δέντρο της ελιάς (*Olea europaea* L.) προέρχεται πιθανώς από την περιοχή της Ασίας και έχει εξαπλωθεί στην περιοχή της Μεσογείου, όπου έχει δείξει εξαιρετική προσαρμογή (Silva & Schmiele, 2021). Οι ελαιοπαραγωγικές περιοχές του κόσμου εκτείνονται μέχρι την Αυστραλία, τη Νότια Αφρική, τη Χιλή και το Περού. Ωστόσο, σήμερα, το 98% των προϊόντων ελιάς καλλιεργούνται στη λεκάνη της Μεσογείου και αποτελούν σημαντικό μέρος της οικονομίας της περιοχής (Antoniou & Hull, 2021). Άλλωστε, η ελιά είναι πανταχού παρούσα στην περιοχή της Μεσογείου όπου και καλλιεργείται από την Ύστερη Εποχή του Χαλκού (Riley, 2002). Η ελιά έχει μεγάλη αξία στη λεκάνη της Μεσογείου και κρίσιμο ρόλο για τη διατήρηση των μεσογειακών οικοσυστημάτων ως αναπόσπαστο μέρος του τοπίου τους. Επιπλέον, τα ελαιόδεντρα είναι καλά προσαρμοσμένα στην καλλιέργεια σε λιγότερο προσβάσιμες περιοχές (π.χ. επικλινή εδάφη) (Anguita-Maeso et al., 2020). Το είδος *Olea europaea* L. έχει περίπου 1200 ποικιλίες. Ο άγριος τύπος του σχηματίζεται από το *O. europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris* ενώ ο καλλιεργούμενος τύπος του σχηματίζεται από το *O. europaea* subsp. *europaea* var. *europaea* (Galatali et al., 2021).



Εικόνα 1.1.1. Το δέντρο της ελιάς (*Olea europaea* L.)

1.1.2. Θρεπτική σύνθεση του ελαιοκάρπου και πλεονεκτήματα στην υγεία

Η μέση σύνθεση των καρπών της ελιάς περιλαμβάνει νερό (50%), πρωτεΐνη (1,6%), λάδι (22%), υδατάνθρακες (19,1%), κυτταρίνη (5,8%), ανόργανες ουσίες (1,5%) και φαινολικές ενώσεις (1-3%) (Hussain et al., 2021). Τα θρεπτικά οφέλη τους είναι γνωστά και παγκοσμίως αναγνωρισμένα, λόγω της παρουσίας βιταμινών, ανόργανων συστατικών, βιοδραστικών ενώσεων και της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα και δευτερεύουσες ενώσεις, όπως πολυφαινόλες και πτητικές ενώσεις που είναι υπεύθυνες για την οσμή, την πικρή γεύση και τη στυπτικότητα στα ελαιόλαδα (Silva & Schmiele, 2021). Συνεπώς, η αξία της ελιάς, δεν περιορίζεται μόνο στο οικονομικό όφελος, αλλά επεκτείνεται και στις θρεπτικές και φαρμακευτικές της ιδιότητες. Τα προϊόντα της ελιάς έχουν χρησιμοποιηθεί στα παραδοσιακά φάρμακα για τη θεραπεία ποικίλων ασθενειών. Ο ελαιόκαρπος φαίνεται να παρουσιάζει αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή, αντιφλεγμονώδη, αντιδιαβητική, αντιγηραντική και αντικαρκινική δράση (Hussain et al., 2021). Η κατανάλωση των προϊόντων της ελιάς είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τη μεσογειακή διατροφή. Η μεσογειακή διατροφή συνδέεται σταθερά με μειωμένες περιπτώσεις καρκίνου και καρδιαγγειακών παθήσεων (Antonίου & Hull, 2021).

1.1.3. Ο καρπός της ελιάς - Μορφολογικά χαρακτηριστικά

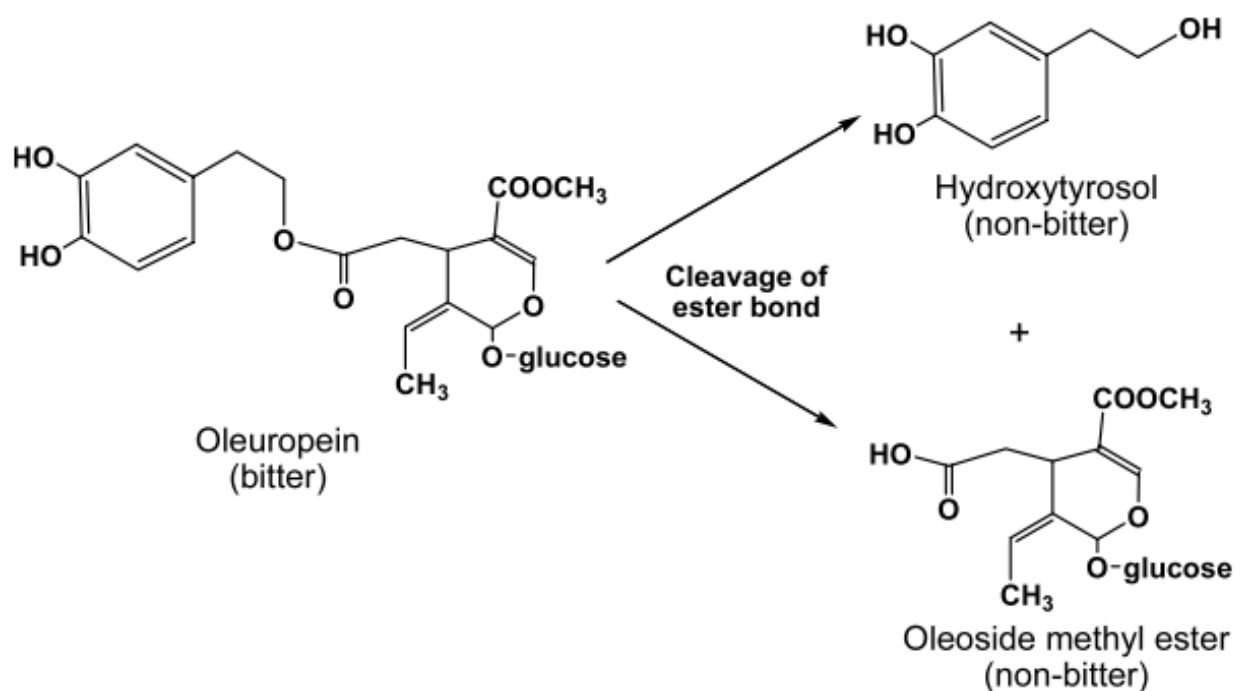
Ο καρπός της ελιάς είναι δρύπη, μονόσπορος με σαρκώδες εξωτερικό στρώμα που μπορεί δομικά να χωριστεί σε τρία διακριτά ανατομικά μέρη: το επικάρπιο (επιδερμίδα), το μεσοκάρπιο (σάρκα) και το ενδοκάρπιο (πυρήνας), που περιέχει το σπόρο. Το επικάρπιο και το μεσοκάρπιο αντιπροσωπεύουν το 70-85% του βάρους του καρπού (Rocha et al., 2020). Παραδοσιακά, για τον προσδιορισμό των ποικιλιών της ελιάς χρησιμοποιούνται μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά (Galatali et al., 2021). Η μορφολογική ταξινόμηση των ελιών



Εικόνα 1.1.3.1. Στάδια δημιουργίας του ελαιοκάρπου

χρησιμοποιείται ευρέως στην έρευνα για την περιγραφή των καρπών και τη διάκριση των ποικιλιών. Το βάρος των ελιών μπορεί να προσδιοριστεί ως χαμηλό (< 2 g), μεσαίο (2-4 g), υψηλό (4-6 g) και πολύ υψηλό (> 6 g), ενώ το σχήμα του καρπού ως αναλογία πλάτους προς μήκος προσδιορίζεται ως σφαιρικό (<1,25), ωοειδές (1,25-1,45) και επίμηκες (> 1,45). Η διάμετρος τους κυμαίνεται μεταξύ 15 και 30 mm και το χρώμα είναι πράσινο το καλοκαίρι και ανοιχτό κόκκινο το φθινόπωρο (Silva & Schmiele, 2021).

Ο καρπός της ελιάς δεν μπορεί να καταναλωθεί απευθείας από το δέντρο λόγω της πικρής γεύσης που οφείλεται στην παρουσία ενός φαινολικού γλυκοζίτη που ονομάζεται ελευρωπαΐνη. Η πικρή γεύση μπορεί να απομακρυνθεί με επεξεργασία του καρπού σε αλκαλικά διαλύματα ή με άλμη/αλάτι, ζύμωση και οξίνιση. Σύμφωνα με το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιοκομίας (IOC), οι κύριοι στόχοι της επεξεργασίας της ελιάς είναι η βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών και η διασφάλιση της μικροβιολογικής σταθερότητας και ασφάλειας στην κατανάλωση (Perpetuini et al., 2020).



Εικόνα 1.1.3.2. Υδρόλυση της ελευρωπαΐνης (Frankel, 2011).

1.1.4. Επιτραπέζια ελιά

Οι καρποί της ελιάς προσφέρουν δύο σημαντικά συστατικά της μεσογειακής διατροφής: το ελαιόλαδο και τις επιτραπέζιες ελιές (Alves et al., 2012). Οι επιτραπέζιες ελιές παρασκευάζονται από ποικιλίες χαμηλής περιεκτικότητας σε λάδι, μεσαίου έως

μεγάλου μεγέθους και κατάλληλου σχήματος, με αναλογίες σάρκας προς πυρήνα μεγαλύτερες από 4:1 και κατάλληλη υφή (ανάλογα με το χρώμα) (Conte et al., 2020). Παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα χρωμάτων, από πράσινο, πρασινοκίτρινο, ιώδες, καστανό ή εντελώς μαύρο (Caroraso & Boskou, 2021). Οι κύριες επιτραπέζιες ποικιλίες ελιάς είναι η Gordal, Manzanilla και Hojiblanca στην Ισπανία, η Aggezi, Shami, Hamed και Toffahi στην Αίγυπτο, η Gemlik, Memecik και Memely στην Τουρκία, η Κονσερβολιά, Χαλκιδικής και Καλαμών στην Ελλάδα και η Azeraj και Sigoise στην Αλγερία (Conte et al., 2020).



Εικόνα 1.1.4. Διαφορετικοί τύποι επιτραπέζιας ελιάς

Η παραγωγή επιτραπέζιων ελιών επηρεάζεται από τη συγκομιδή, την εφαρμογή διαλύματος NaOH, την άλμη, τον έλεγχο της ζύμωσης, τη συσκευασία, την αποθήκευση, την σταθεροποίηση του χρώματος, την κονσερβοποίηση και την αποστείρωση. Οι περισσότερες μέθοδοι επεξεργασίας έχουν σχεδιαστεί για να απομακρύνουν τη φυσική πικρή γεύση που οφείλεται στην ελευρωπαΐνη και άλλες φαινολικές ενώσεις (Frankel, 2011).

Οι επιτραπέζιες ελιές είναι ένα από τα σημαντικότερα αγροτικά προϊόντα που καταναλώνονται κατόπιν ζύμωσης. Ο πρωταρχικός σκοπός της ζύμωσης της επιτραπέζιας ελιάς είναι να εξασφαλίσει τη διατηρησιμότητα του τελικού μεταποιημένου προϊόντος και να βελτιώσει τη γεύση και το άρωμά του. Διάφορες μικροβιακές ομάδες συμμετέχουν στη ζύμωση της ελιάς καθορίζοντας την ποιότητα και

τις οργανοληπτικές ιδιότητες του τελικού προϊόντος (Blana et al., 2014). Η ζύμωση των επιτραπέζιων ελιών αντιπροσωπεύει ένα πολύπλοκο περιβάλλον όπου οι ζύμες και τα οξυγαλακτικά βακτήρια (Lactic Acid Bacteria, LAB) αλληλεπιδρούν και αναπτύσσονται καθ' όλη τη διάρκεια της μεταποίησης (Simões et al., 2021).

Οι ιδιαίτερες οργανοληπτικές ιδιότητες των καρπών της επιτραπέζιας ελιάς οδήγησαν στην ευρεία χρήση τους, ειδικά στην Ευρώπη, ως ορεκτικό ή συστατικό για μαγειρική χρήση (Conte et al., 2020). Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές της πυραμίδας της Μεσογειακής Διατροφής, οι ελιές, οι ξηροί καρποί και οι σπόροι πρέπει να καταναλώνονται καθημερινά σε μέτρια ποσότητα 1-2 μερίδων και αντιπροσωπεύουν μια υγιεινή επιλογή σνακ (Rocha et al., 2020).

1.1.5. Εμπορικοί τύποι επιτραπέζιας ελιάς

Οι επιτραπέζιες ελιές ταξινομούνται σύμφωνα με τη διαδικασία που χρησιμοποιείται για την αποικοδόμηση της ελευρωπαΐνης και περιγράφονται ως επεξεργασμένες (treated) ή μη επεξεργασμένες (untreated). Ο όρος «επεξεργασία» αναφέρεται στη χρήση αραιού διαλύματος καυστικού νατρίου για την εκπίκρυνση του καρπού. Οι ελιές χωρίς επεξεργασία δεν υποβάλλονται σε μεταχείριση με διάλυμα καυστικού νατρίου, αλλά τοποθετούνται απευθείας σε νερό ή διάλυμα άλμης (Colmagro et al., 2001). Υπάρχουν τρεις βασικές εμπορικές προετοιμασίες των επιτραπέζιων ελιών που έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας. Συγκεκριμένα αυτές είναι: (α) οι πράσινες ελιές σε άλμη (Ισπανικού τύπου), (β) οι φυσικές μαύρες ελιές σε άλμη (ελληνικού τύπου) και (γ) οι τεχνητά μαυρισμένες ελιές ή αλλιώς ελιές που μαυρίζουν με οξειδωση σε αλκαλικό περιβάλλον (τύπου Καλιφόρνιας), για τις οποίες οι συνθήκες επεξεργασίας είναι καθιερωμένες στη βιβλιογραφία (Doulgeraki et al., 2013). Οι συγκεκριμένες προετοιμασίες περιγράφονται συνοπτικά παρακάτω:

Πράσινες ελιές σε άλμη – Ισπανικού τύπου

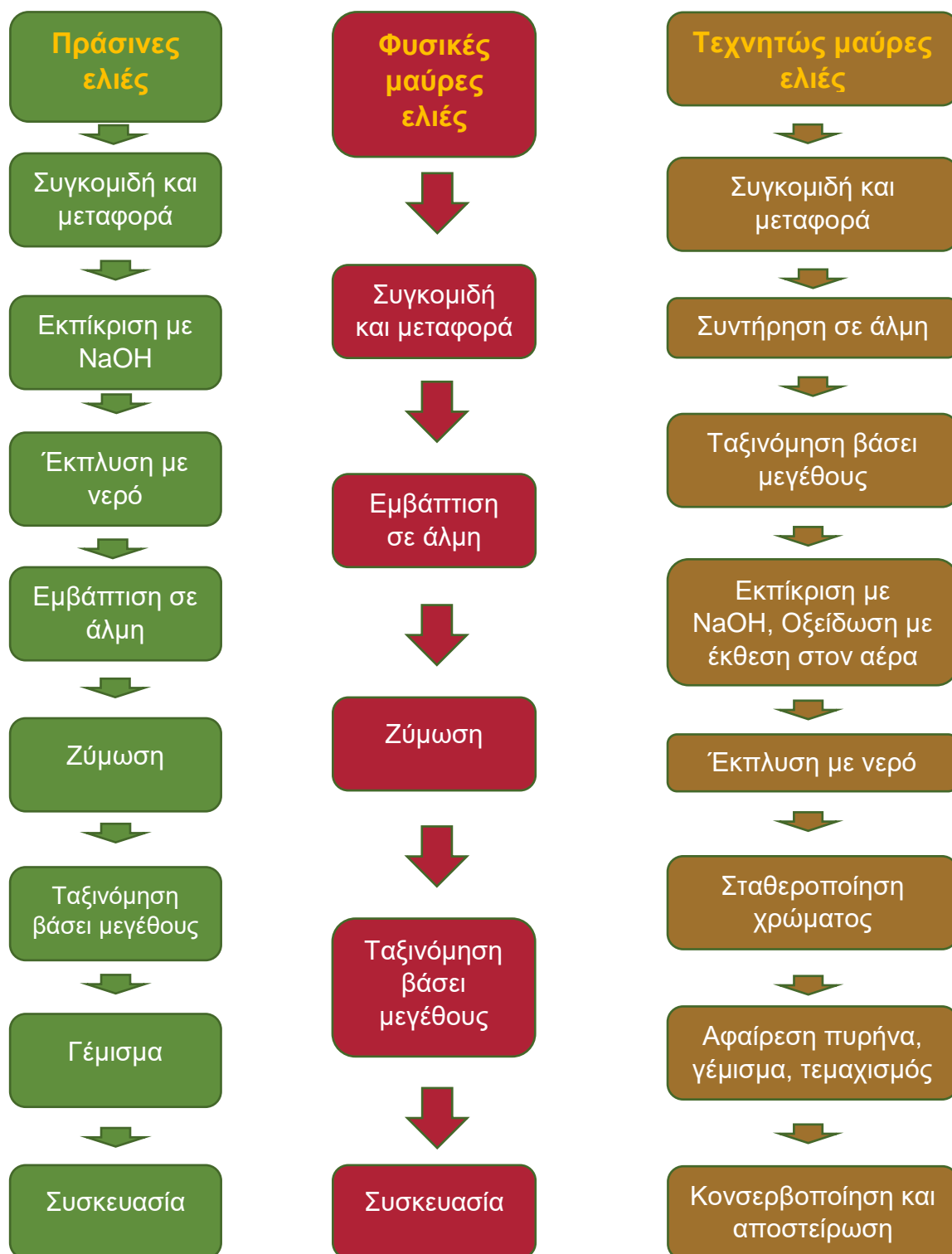
Η πρώτη μέθοδος συνίσταται στην επεξεργασία του καρπού με αραιό διάλυμα NaOH (2-3%) για τη μείωση της πικρής γεύσης, μέσω της διάσπασης της ελευρωπαΐνης και άλλων πολυφαινόλων, αλλά και την αύξηση της διαπερατότητας του περικαρπίου της ελιάς. Ακολουθεί πλύση με νερό για την απομάκρυνση της περίσσειας του αλκαλικού διαλύματος. Στη συνέχεια, οι ελιές τοποθετούνται σε άλμη (αρχική συγκέντρωση 8-12%) όπου υφίστανται οξυγαλακτική ζύμωση (Cocolin et al., 2013).

Φυσικές μαύρες ελιές σε άλμη – Ελληνικού τύπου

Ο συγκεκριμένος εμπορικός τύπος περιλαμβάνει μαύρο ελαιόκαρπο που ωριμάζει φυσικά επάνω στο δένδρο πριν τη συγκομιδή, ο οποίος στη συνέχεια εμβαπτίζεται απευθείας σε διάλυμα άλμης όπου υφίσταται ζύμωση με την αυτόχθονη μικροχλωρίδα. Κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας έχουμε μερική και όχι πλήρη απομάκρυνση της ελευρωπαΐνης, ενώ ταυτόχρονα βελτιώνονται τα φυσικοχημικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του καρπού που εξασφαλίζουν την μικροβιολογική σταθερότητα και την οργανοληπτική αποδοχή του τελικού προϊόντος. Η διάρκεια της ζύμωσης εξαρτάται από πολλές παραμέτρους, όπως η ποικιλία, η περιεκτικότητα της άλμης σε αλάτι και η θερμοκρασία (Cocolin et al., 2013).

Τεχνητός μαύρες ελιές σε άλμη – Τύπου Καλιφόρνιας

Στον τρίτο εμπορικό τύπο, οι καρποί συγκομίζονται τους φθινοπωρινούς μήνες όταν το χρώμα είναι στο στάδιο του πράσινου έως ερυθρού-ιώδους (cherry-red) (Harris, 1998). Υφίστανται επεξεργασία με διάλυμα καυστικού νατρίου για να ξεπικρίσουν και στη συνέχεια αποκτούν μαύρο χρώμα τεχνητά με οξείδωση των πολυφαινολών του καρπού με την εφαρμογή ρεύματος αέρα. Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του συγκεκριμένου εμπορικού τύπου είναι ότι οι ελιές δεν έχουν υποστεί ζύμωση και το προϊόν θα πρέπει να υποβληθεί σε θερμική επεξεργασία (αποστείρωση) προκειμένου να σταθεροποιηθεί μικροβιολογικά και να είναι ασφαλές για κατανάλωση. Οι εκπυρηνωμένες ελιές του συγκεκριμένου εμπορικού τύπου χρησιμοποιούνται ευρέως σε προϊόντα γρήγορου φαγητού όπως οι πίτσες (Colmagro et al., 2001).



Γράφημα 1.1.5. Διάγραμμα επεξεργασίας επιτραπέζιας ελιάς Ισπανικού τύπου, Ελληνικού τύπου και τύπου Καλιφόρνιας (Conte et al., 2020).

1.1.6. Κονσερβολιά

Η ποικιλία Κονσερβολιά, γνωστή επίσης και ως Αμφίσσης, Αγρινίου, Άρτας, Βόλου, Βολιώτικη, Βοϊδολιά, Εμπορεύσιμη, Κορομηλάτη, Μηλολιά, Ξηροχωρίου, Πατρινή, Πηλίου, Στρογγυλολιά και Χονδρολιά, είναι η κύρια επιτραπέζια ποικιλία της χώρας μας και καλλιεργείται κυρίως στους νομούς Αιτωλοακαρνανίας, Φωκίδος, Άρτας, Φθιώτιδος, Ευβοίας, Μαγνησίας, Λαρίσης και Αχαΐας. Το ύψος του δένδρου μπορεί να



Εικόνα 1.1.6. Κονσερβολιά

φτάσει τα 6-10 μέτρα. Τα φύλλα της είναι βαθυπράσινα, μήκους $7,40 \pm 0,75$ cm και πλάτους $1,29 \pm 0,20$ cm. Ο καρπός έχει σχήμα σφαιρικό ή ωειδές και μέσο βάρος 5,7 g. Ο πυρήνας έχει σχήμα κυλινδρικό, μέσο βάρος 0,51 g και φέρει ακίδα στην κορυφή και επτά βαθιές γλυφές. Η σχέση σάρκας προς πυρήνα του καρπού κυμαίνεται από 8 έως 10:1. Η περιεκτικότητα του καρπού σε λάδι κυμαίνεται γύρω στο 16%. Χρησιμοποιείται κυρίως για την παρασκευή πράσινων και μαύρων επιτραπέζιων ελιών εξαιρετικής ποιότητας. Είναι η πιο διαδεδομένη ποικιλία για επιτραπέζια χρήση. Θεωρείται ποικιλία παραγωγική, ανεκτική στο ψύχος αλλά πολύ ευαίσθητη στο βερτισίλιο (Ποντίκης, 2000).

1.1.7. Χαλκιδικής

Η ποικιλία Χαλκιδικής είναι γνωστή επίσης με τις ονομασίες Καρυδολιά, Καρυδοραχάτη, Κολυμπάδα, Κολυμπάτη, Απολυτή και Κωνική. Καλλιεργείται κυρίως στο νομό Χαλκιδικής και σποραδικά στους νομούς Φωκίδος, Φθιώτιδος, Αττικής και Ευβοίας. Αναπτύσσεται σε δένδρο ύψους 5-8 μέτρων. Τα φύλλα της είναι ανοικτοπράσινα, μήκους $6,94 \pm 0,63$ cm και πλάτους $1,40 \pm 0,17$ cm. Ο καρπός έχει σχήμα κυλινδροκωνικό, μέσο βάρος 5,8 g,



Εικόνα 1.1.7. Χαλκιδικής

φέρει θηλή και δύο ράχες αντίθετες σε όλο το μήκος του καρπού. Ο πυρήνας έχει σχήμα κυλινδροκωνικό, με τη μία πλευρά κυρτωμένη, μέσο βάρος 0,7 g, φέρει ακίδα στην κορυφή και δέκα αβαθείς γλυφές. Η σχέση σάρκας προς πυρήνα του καρπού είναι 10:1. Η περιεκτικότητα του καρπού σε λάδι κυμαίνεται γύρω στο 14%. Χρησιμοποιείται κυρίως για την παρασκευή πράσινων ελιών Ισπανικού τύπου και

τεχνητά μαυρισμένων ελιών. Θεωρείται ποικιλία παραγωγική και ανεκτική στο ψύχος (Ποντίκης, 2000).

1.2. Ζύμωση

Περίπου το ένα τρίτο της παγκόσμιας παραγωγής τροφίμων προκύπτει μέσω ζύμωσης. Ενώ τα ζυμωμένα τρόφιμα αποτελούν μέρος της ανθρώπινης διατροφής περίπου από το 10.000 π.Χ., μόνο μετά από την εμφάνιση της Μικροβιολογίας Τροφίμων (δηλαδή μετά τις επιστημονικές εξελίξεις του Παστέρ) γνωρίζουμε τον σημαντικό αντίκτυπο των μικροβιακών καλλιεργειών στη διατροφή μας. Γύρω στο 1877, ο Sir John Lister έδειξε τον ρόλο ενός μόνο βακτηρίου, του *Bacterium lactis* (*Lactococcus lactis*), στο ζυμωμένο γάλα. Ο Λούις Παστέρ όρισε τη ζύμωση, από τη λατινική λέξη *fervere*, ως «La vie sans l'air» (ζωή χωρίς αέρα) (Bourdichon et al., 2018).

Τα ζυμωμένα τρόφιμα σε πολλές χώρες αποτελούν σημαντικό μέρος της ανθρώπινης διατροφής, επειδή η ζύμωση είναι μια τεχνολογία που συντηρεί τα τρόφιμα (σχηματισμός μεταβολιτών με αντιμικροβιακή δράση όπως οργανικά οξέα, αιθανόλη και βακτηριοσίνες), βελτιώνει τη θρεπτική τους αξία και ενισχύει τις γευστικές τους ιδιότητες (Azam et al., 2017; Bourdichon et al., 2018). Η ζύμωση είναι μια από τις παλαιότερες τεχνολογίες επεξεργασίας/συντήρησης των τροφίμων που είναι γνωστή στην ανθρωπότητα και θεωρείται σημαντικός καθοριστικός παράγοντας για τον έλεγχο της μικροβιακής αύξησης στα τρόφιμα και την ενίσχυση της ασφάλειάς τους (Argyri et al., 2014).

Σε παγκόσμιο επίπεδο, τα περισσότερα λαχανικά εξακολουθούν να ζυμώνονται είτε σε μικρή κλίμακα, είτε σε οικιακό επίπεδο, με εξαίρεση το λάχανο τουρσί, τα αγγούρια και τις επιτραπέζιες ελιές που έχουν ιδιαίτερη εμπορική σημασία (Harris, 1998). Οι επιτραπέζιες ελιές είναι από τα πιο δημοφιλή ζυμωμένα τρόφιμα στην περιοχή της Μεσογείου και ένα από τα σημαντικότερα αγροτικά προϊόντα στην Ελλάδα (Panagou et al., 2003). Το μικροβίωμα της ζύμωσης των επιτραπέζιων ελιών είναι ένα πολύπλοκο δυναμικό σύνολο, στο οποίο η συνύπαρξη οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB) και ζυμομυκήτων είναι θεμελιώδους σημασίας για την απόκτηση προϊόντων υψηλής ποιότητας (Kazou et al., 2020).

1.2.1. Αυθόρμητη ζύμωση

Οι αυθόρμητες ζυμώσεις συνήθως προκύπτουν από τις ανταγωνιστικές δραστηριότητες της αυτόχθονης χλωρίδας μαζί με μια ποικιλία μικροοργανισμών που προέρχονται από επιμολύνσεις από τις δεξαμενές ζύμωσης, τις σωληνώσεις και τις αντλίες που χρησιμοποιούνται για την κυκλοφορία των ελιών και της άλμης, καθώς επίσης και από άλλες συσκευές που βρίσκονται σε επαφή με τις ελιές και την άλμη. Οι μικροοργανισμοί που προσαρμόζονται καλύτερα στο φυσικό περιβάλλον της ζύμωσης και στις τεχνικές παραμέτρους της επεξεργασίας, τελικά κυριαρχούν στη διαδικασία (Panagou et al., 2003). Η άλμη παρέχει ένα ευνοϊκό περιβάλλον για την ανάπτυξη οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB), με τη γλυκόζη, τη φρουκτόζη και τη μαννιτόλη ως κύριες πηγές ζυμώσιμων υδατανθράκων. Οι αντιμικροβιακές φαινόλες, συμπεριλαμβανομένης της μη υδρολυμένης και υδρολυμένης ελευρωπαΐνης, υπάρχουν επίσης σε σχετικά υψηλά επίπεδα (τουλάχιστον στο πρώτο στάδιο της ζύμωσης) και μπορεί να διαδραματίσουν ρόλο στον προσδιορισμό του είδους των μικροοργανισμών που κυριαρχούν κατά τη ζύμωση (Harris, 1998).

Η ζύμωση της πράσινης ελιάς αποτελείται από τρία διακριτά στάδια (Garrido Fernandez et al., 1997). Στο αρχικό στάδιο, οι μικροβιακές ομάδες που κυριαρχούν στη διαδικασία της ζύμωσης είναι τα Gram-αρνητικά βακτήρια, που ανήκουν κυρίως στην οικογένεια των *Enterobacteriaceae* (Panagou & Katsaboxakis, 2006). Το πρώτο στάδιο χαρακτηρίζεται, επίσης και από την παρουσία ζυμών, μυκήτων και μικρών αριθμών Gram-θετικών βακτηρίων (Randazzo et al., 2010).

Το δεύτερο και σημαντικότερο στάδιο της ζύμωσης της ελιάς χαρακτηρίζεται από αύξηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων των γενών *Leuconostoc* και *Pediococcus* (Randazzo et al., 2010). Η σταδιακή επικράτηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων και η παραγωγή γαλακτικού οξέος οδηγούν σε μεταβολή του πληθυσμού των εντεροβακτηρίων, καθώς αυτά είναι ευαίσθητα σε χαμηλές τιμές pH (Harris, 1998). Η τιμή του pH μειώνεται από περίπου 6,0 που ήταν στην αρχή του δεύτερου σταδίου σε περίπου 4,5, όπου τα εντεροβακτήρια δεν επιβιώνουν (Sanchez et al., 2000).

Το τρίτο στάδιο της ζύμωσης διαρκεί μέχρι να εξαντληθούν τα ζυμώσιμα συστατικά (Sanchez et al., 2000). Σε αυτό το στάδιο παρατηρείται έντονη ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων, ιδίως του είδους *Lactiplantibacillus plantarum*, που αποτελεί την κυρίαρχη μικροχλωρίδα της ζύμωσης (Panagou & Katsaboxakis, 2006). Σε αρκετά υψηλά επίπεδα βρίσκονται και οι ζύμες, οι οποίες παράγουν ορισμένες

βιταμίνες που μπορεί να ενισχύσουν την ανάπτυξη του *L. plantarum* (Ruiz-Barba & Jimenez-Diaz, 1995).

1.2.2. Ελεγχόμενη ζύμωση

Η ενδογενής μικροχλωρίδα των φυτικών ιστών ποικίλει ως συνάρτηση της ποιότητας της πρώτης ύλης, των συνθηκών συγκομιδής και των μετασυλλεκτικών χειρισμών, συμβάλλοντας στη δημιουργία τελικών προϊόντων με διαφοροποιημένα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Ο εμβολιασμός της άλμης με κατάλληλη καλλιέργεια εκκίνησης οξυγαλακτικών βακτηρίων μειώνει την πιθανότητα αλλοίωσης και βοηθά στην επίτευξη μιας βελτιωμένης και πιο προβλέψιμης διαδικασίας ζύμωσης. Στις περισσότερες περιπτώσεις, προστίθεται άλμη από προηγούμενη επιτυχημένη ζύμωση για να διευκολυνθεί η έναρξη μιας νέας μεταποιητικής διαδικασίας (back-slopping) (Panagou et al., 2003). Με τον τρόπο αυτό, επιτυγχάνεται υψηλότερος αρχικός πληθυσμός ωφέλιμων μικροοργανισμών συγκριτικά με αυτόν που βρίσκεται στην πρώτη ύλη και εξασφαλίζεται γρηγορότερη και πιο αξιόπιστη ζύμωση. Παραδείγματα όπου εφαρμόζεται η τεχνική back-slopping είναι η σπιτική ζύμωση γάλακτος, λαχανικών και δημητριακών (Tamang et al., 2015).

Ωστόσο, οι οξυγαλακτικές καλλιέργειες από προηγούμενες αυθόρμητες ζυμώσεις παρουσιάζουν ποικιλία μεταβολικών δραστηριοτήτων, οι οποίες διαφοροποιούνται ακόμη και μεταξύ των βακτηριακών στελεχών και περιλαμβάνουν διαφορές στον ρυθμό αύξησης, στο βαθμό προσαρμογής σε ένα συγκεκριμένο υπόστρωμα, στην ικανότητα διάσπασης αντιδισαίτητων παραγόντων (π.χ. φαινολικές ενώσεις), στις αντιμικροβιακές ιδιότητες, στη γεύση και στην ποιότητα. Για να αποφευχθούν τα μειονεκτήματα αυτά, μπορεί να προστεθούν καθαρές ή μικτές καλλιέργειες εκκίνησης από επιλεγμένα στελέχη μικροοργανισμών στη άλμη για να αποτελέσουν την επικρατούσα μικροχλωρίδα έναντι της αυτόχθονης χλωρίδας. Οι καθαρές καλλιέργειες επιλέγονται σύμφωνα με κριτήρια που περιλαμβάνουν ομο- και ετεροζυμωτικό μεταβολισμό, παραγωγή γαλακτικού οξέος, ανθεκτικότητα σε άλατα και οξέα, ανάπτυξη επιθυμητών οργανοληπτικών χαρακτηριστικών, αύξηση σε μεγάλο εύρος θερμοκρασίας, ικανότητα διάσπασης της ελευρωπαΐνης και παραγωγή βακτηριοσίνης. Πρόσφατα έχει αναφερθεί η χρήση εμπορικών καλλιεργειών εκκίνησης ειδικά για επιτραπέζιες ελιές και η εφαρμογή τους σε ζυμώσεις πράσινου ελαιοκάρπου με την Ισπανική μέθοδο (Panagou et al., 2003). Η πλειονότητα των εκκινητήριων καλλιεργειών αποτελείται από οξυγαλακτικά βακτήρια και ειδικότερα τα είδη

Lactiplantibacillus plantarum, *Lactiplantibacillus pentosus* ή μεικτή καλλιέργεια και των δύο (Hurtado et al., 2010).

Μεταξύ των παραδοσιακών ζυμωμένων τροφίμων, οι επιτραπέζιες ελιές θα μπορούσαν να αποτελέσουν επίσης ένα προβιοτικό τρόφιμο με τη χρήση καλλιεργειών εκκίνησης που παρουσιάζουν προβιοτικό δυναμικό (Argyri et al., 2013). Μια λειτουργική καλλιέργεια εκκίνησης LAB είναι σε θέση να παράγει αντιμικροβιακές ουσίες, πολυσακχαρίτες, χρήσιμα ένζυμα ή θρεπτικά συστατικά, ενώ τα αποκαλούμενα προβιοτικά στελέχη παρουσιάζουν ιδιότητες ευεργετικές για την υγεία (Tamang et al., 2015). Οι βιολειτουργικές καλλιέργειες εκκίνησης συμβάλλουν στη μικροβιακή ασφάλεια και προσφέρουν οργανοληπτικά, τεχνολογικά, διατροφικά ή άλλα οφέλη στην υγεία.

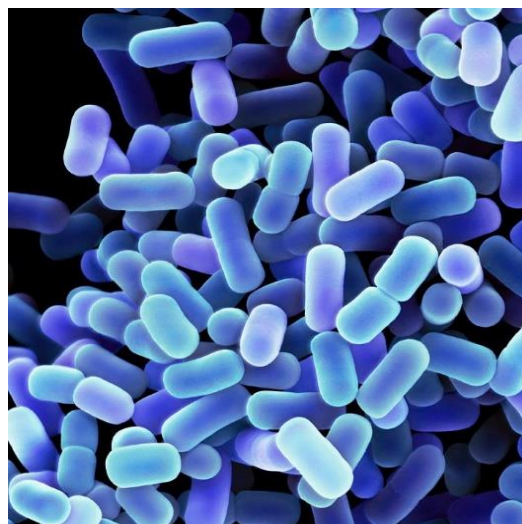
1.2.3. Μικροοργανισμοί ζύμωσης

Γενικά, η ζύμωση της επιτραπέζιας ελιάς οφείλεται στην ανταγωνιστική δραστηριότητα της αυτόχθονης μικροχλωρίδας (οξυγαλακτικά βακτήρια, ζύμες, εντεροβακτήρια) μαζί με μικροοργανισμούς που επιμολύνουν τις ελιές από διαφορετικές πηγές (π.χ. δεξαμενές ζύμωσης, σωληνώσεις και αντλίες μεταφοράς των ελιών ή της άλμης) (Abriouel et al., 2011). Πιο συγκεκριμένα, η ζύμωση με την επεξεργασία Ισπανικού τύπου οφείλεται σε οξυγαλακτικά βακτήρια, ενώ στις Ελληνικού τύπου μαύρες ελιές οι μικροοργανισμοί που είναι υπεύθυνοι για τη ζύμωση είναι οι ζύμες και τα οξυγαλακτικά βακτήρια τα οποία αποτελούν ένα μικρό ποσοστό της συνολικής μικροχλωρίδας (Campaniello et al., 2005).

Οξυγαλακτικά βακτήρια (Lactic Acid Bacteria, LAB)

Τα βακτήρια είναι οι κυρίαρχοι μικροοργανισμοί τόσο στα φυσικά ζυμωμένα τρόφιμα όσο και στα τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση με τη χρήση εκκινητήριων καλλιεργειών. Μεταξύ των βακτηρίων, τα οξυγαλακτικά βακτήρια συνδέονται συνήθως με όξινα ζυμωμένα τρόφιμα, ενώ αυτά που δεν ανήκουν στην κατηγορία των οξυγαλακτικών βακτηρίων συμμετέχουν επίσης στη ζύμωση των τροφίμων, συχνά ως δευτερεύουσες ομάδες, όπως για παράδειγμα είδη των *Brachybacterium* και *Propionibacterium* που απομονώθηκαν από τυρί (Tamang et al., 2015). Τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι θετικά στη χρώση Gram, αρνητικά στη δοκιμή της καταλάσης και παράγουν γαλακτικό οξύ ως τελικό μεταβολικό προϊόν. Οι βακτηριακές

ομάδες που απαρτίζουν τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι από τις πιο γνωστές στους ανθρώπους, λόγω της σχέσης τους με το ανθρώπινο περιβάλλον και με ένα ευρύ φάσμα γαλακτοκομικών προϊόντων που έχουν υποστεί φυσική ζύμωση, καλλιέργειες σιτηρών, λαχανικών, κ.ο.κ. Περιλαμβάνουν 6 οικογένειες με 40 γένη και 380 περίπου είδη, που ανήκουν φυλογενετικά στην τάξη Lactobacillales εντός του φύλου Firmicutes (Stiles & Holzapfel, 1997).



Εικόνα 1.2.3.1. Βακτήρια του είδους *L. plantarum*

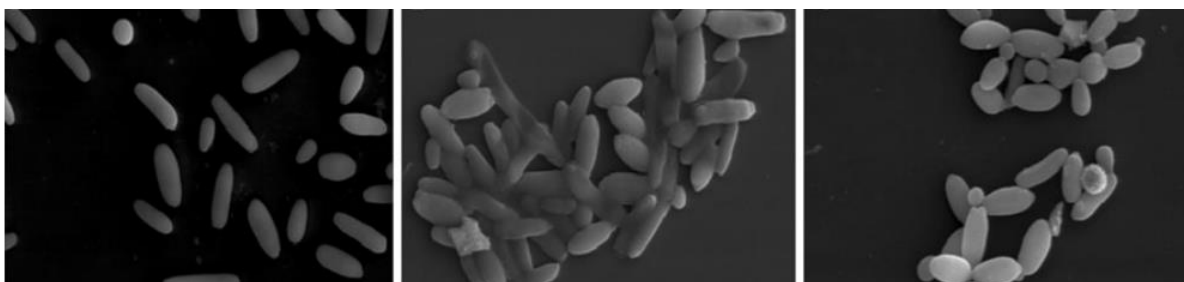
Τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι η πιο σημαντική ομάδα βακτηρίων που συμμετέχει στη ζύμωση της επιτραπέζιας ελιάς. Ομοζυμωτικά οξυγαλακτικά βακτήρια που ανήκουν στα γένη *Lactiplantibacillus*, *Streptococcus* και *Pediococcus* καθώς επίσης και ετεροζυμωτικά όπως το *Leuconostoc* και ορισμένα είδη του γένους *Lactiplantibacillus* ανιχνεύθηκαν σε ζυμωμένες επιτραπέζιες ελιές (Heperkan, 2013).

Όπως περιγράφεται σε πολυάριθμες μελέτες, τα είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων που συναντώνται συχνότερα κατά τη διάρκεια της ζύμωσης της επιτραπέζιας ελιάς είναι *L. plantarum*, *L. pentosus* και σε μικρότερο βαθμό *L. paraplantarum* (Arroyo-López et al., 2008; Botta & Cocolin, 2012; Campaniello et al., 2005; Perpetuini et al., 2020). Τα είδη *L. plantarum* και *L. pentosus* δεν ευθύνονται μόνο για την οξίνιση της άλμης κατά τη ζύμωση αλλά χαρακτηρίζονται και από άλλες τεχνολογικές ιδιότητες. Για παράδειγμα, ορισμένα στελέχη του βακτηρίου *L. pentosus* παρουσιάζουν μια αξιοσημείωτη δραστηριότητα του ενζύμου β-γλυκοζιδάση και συμβάλλουν, μαζί με τις ζύμες, στην ταχύτερη εκπίκρωση της επιτραπέζιας ελιάς με βιολογικό τρόπο (Botta & Cocolin, 2012).

Ζύμες (Yeasts)

Ο πληθυσμός των ζυμών κατά τη ζύμωση της επιτραπέζιας ελιάς παρουσιάζει μεγάλη βιοποικιλότητα. Οι Marquina et al. (1992) ανέφεραν κυριαρχία του γένους *Pichia* spp. καθώς και των ζυμών *Saccharomyces cerevisiae*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis* και *Rhodotorula mucilaginosa*. Οι ζυμομύκητες παρουσιάζουν διπλό ρόλο στην παραγωγή επιτραπέζιων ελιών. Υπάρχουν σε όλη τη διαδικασία της

ζύμωσης και είναι γενικά αποδεκτό ότι μπορούν να παράγουν ενώσεις που επηρεάζουν σημαντικά τις οργανοληπτικές ιδιότητες που καθορίζουν την ποιότητα και τη γεύση του τελικού προϊόντος. Ωστόσο, οι ζύμες μπορεί να λειτουργούν και ως μικροοργανισμοί αλλοίωσης στη ζύμωση και τη συντήρηση της ελιάς (Arroyo-López et al., 2008). Η οικολογία των ζυμών κατά τη μεταποιητική διαδικασία της επιτραπέζιας ελιάς έχει μελετηθεί εκτενώς σε πολλές δημοσιεύσεις που έχουν διερευνήσει ταυτόχρονα τις τεχνολογικές δυνατότητες και τα χαρακτηριστικά αλλοίωσής τους (Botta & Cocolin, 2012).



Εικόνα 1.2.3.2. Σάρωση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου του είδους *Pichia membranifaciens* (Bueno et al., 2012)

Ο ρόλος των ζυμών στη ζύμωση των τροφίμων είναι η ζύμωση των σακχάρων, η παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών και η παρεμπόδιση της ανάπτυξης μυκήτων που παράγουν μυκοτοξίνες. Ακόμη, οι ζύμες συνεισφέρουν στο πτητικό προφίλ των ζυμωμένων τροφίμων με την παραγωγή αρωματικών συστατικών και αλκοολών. (Tamang et al., 2015). Μπορούν επίσης να συνθέσουν έναν αριθμό βιοδραστικών ενώσεων που χρησιμεύουν ως αντιοξειδωτικά. Αρκετά είδη *Candida* και *Saccharomyces* παράγουν ενώσεις όπως καροτενοειδή, κιτρικό οξύ, γλουταθειόνη και τοκοφερόλες με ενδιαφέρουσες αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Ωστόσο, οι ζύμες που υπάρχουν σε συσκευασμένες ελιές μπορούν να παράγουν περίσσεια CO₂ που οδηγεί σε διόγκωση των δοχείων συντήρησης, καθώς και σε δυσάρεστη γεύση και οσμή. Επίσης, δύνανται να παράγουν ένζυμα, που προκαλούν την αποικοδόμηση των πολυσακχαριτών του κυτταρικού τοιχώματος του καρπού της ελιάς, και πολυγαλακτουρονάσες, που προκαλούν μαλάκωμα των ελιών κατά τη συντήρηση (Arroyo-López et al., 2008). 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 (Harris, 1998). Ωστόσο, οι ζύμες μπορούν να χρησιμοποιήσουν το γαλακτικό και το οξικό οξύ ως υπόστρωμα, μόνο σε αερόβιες συνθήκες. Αυτό σημαίνει ότι στις συνήθεις αναερόβιες συνθήκες στις οποίες συσκευάζονται οι ελιές,

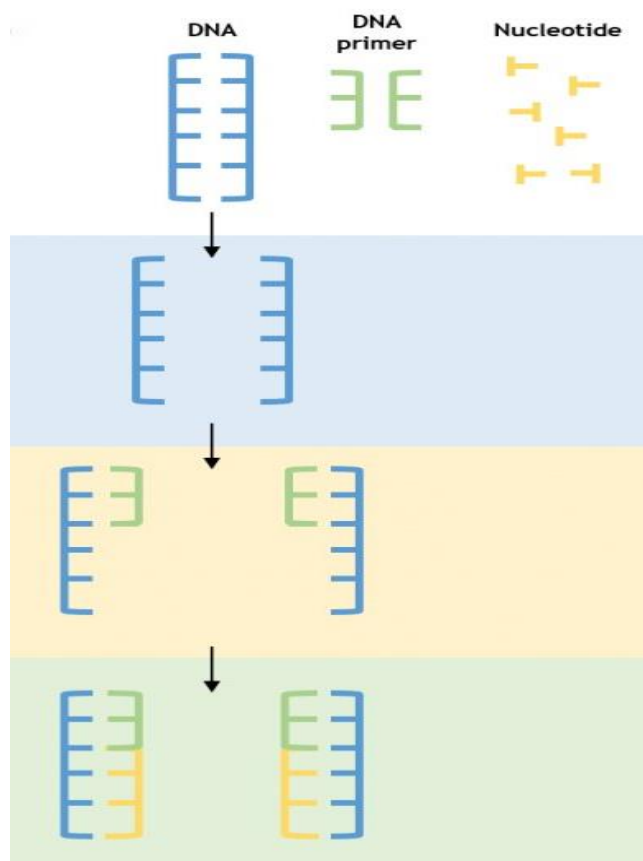
αυτές παραμένουν σταθερές ακόμη και με την παρουσία ενός πληθυσμού ζυμομυκήτων (Arroyo-López et al., 2008).

1.3. Μέθοδοι προσδιορισμού της μικροβιακής κοινότητας κατά τη συντήρηση της επιτραπέζιας ελιάς

Έχει διαπιστωθεί παγκοσμίως από τους ερευνητές ότι οι παραδοσιακές μικροβιολογικές μέθοδοι συχνά αποτυγχάνουν να χαρακτηρίσουν μικρούς πληθυσμούς μικροοργανισμών. Επιπλέον, τα καταπονημένα και τραυματισμένα κύτταρα χρειάζονται ειδικές συνθήκες καλλιέργειας για να ανακάμψουν και να καλλιεργηθούν σε συνθετικά μικροβιολογικά υποστρώματα. Τέλος, οι συμβατικές μικροβιολογικές τεχνικές δεν είναι σε θέση να ανιχνεύσουν ζωντανά αλλά μη καλλιεργήσιμα κύτταρα (VBNC).

(Cocolin & Ercolini, 2008).

Προκύπτει, λοιπόν ότι ο προσδιορισμός των μικροβιακών ειδών με τη χρήση συμβατικών μικροβιολογικών τεχνικών και φαινοτυπικών μεθόδων μπορεί μερικές φορές να είναι αβέβαιος ως προς τα αποτελέσματα που παρέχει, περίπλοκος και χρονοβόρος. Η χρήση μοριακών μεθόδων έχει φέρει επανάσταση στον προσδιορισμό/ταυτοποίηση των μικροοργανισμών, βελτιώνοντας την ποιότητα και την αποτελεσματικότητά του (Blaiotta et al., 2008). Πολλές από τις μεθόδους μοριακής ταυτοποίησης που έχουν αναπτυχθεί βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).



Εικόνα 1.3. Ο κύκλος της PCR. Με μπλε χρώμα απεικονίζονται τα τμήματα του DNA, με πράσινο οι εκκινητές και με κίτρινο τα νουκλεοτίδια. Αρχικά πραγματοποιείται αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου DNA, στη συνέχεια υβριδισμός των εκκινητών και τέλος επιμήκυνση των μορίων DNA.

Η PCR (Εικόνα 1.3.) είναι ένας απλός τρόπος για τη γρήγορη ενίσχυση συγκεκριμένων αλληλουχιών του DNA. Έχουν αναπτυχθεί και προηγμένες τεχνικές PCR, όπως είναι η Real Time – PCR, η οποία βασίζεται στην ικανότητα ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης προϊόντων PCR (amplicons), καθώς προχωρούν οι κύκλοι αντίδρασης, αλλά και η Multiplex PCR που αποτελεί έναν τρόπο ενίσχυσης δύο ή περισσότερων περιοχών σε μία μόνο αντίδραση PCR. Για την εκτέλεση PCR σε οποιαδήποτε μικροβιολογική εφαρμογή, πρέπει να είναι γνωστές οι αλληλουχίες DNA ενός μολυσματικού παράγοντα και οι αλληλουχίες-στόχοι πρέπει να είναι μοναδικές για τον (τους) οργανισμό (ους) που θα ανιχνευθούν (Fairchild et al., 2006).

Τα τελευταία χρόνια, λόγω της χρήσης μοριακών μεθόδων, η γνώση μας για την ποικιλομορφία των μικροβιακών οικοσυστημάτων έχει αυξηθεί σημαντικά. Ειδικότερα, νέες και υψηλής απόδοσης εξαρτώμενες και ανεξάρτητες από την καλλιέργεια μοριακές τεχνικές είναι πλέον διαθέσιμες για τη μελέτη μικροβιακών κοινοτήτων που σχετίζονται με τρόφιμα (Giraffa & Carminati, 2008). Για τις εξαρτώμενες από την καλλιέργεια μοριακές τεχνικές απαιτείται απομόνωση των μικροοργανισμών από το τρόφιμο για να πραγματοποιηθεί η ταυτοποίηση και ο μοριακός χαρακτηρισμός τους. Αντίθετα, στις ανεξάρτητες από την καλλιέργεια μεθόδους επιτυγχάνεται περιγραφή των μικροβιακών κοινοτήτων του τροφίμου, χωρίς την απαίτηση για απομόνωση μικροοργανισμών, αλλά με απομόνωση του DNA κατευθείαν από το τρόφιμο (Cocolin & Ercolini, 2008).

1.3.1. Τεχνικές εξαρτώμενες από την καλλιέργεια (Culture-dependent)

Η ανίχνευση και η ταυτοποίηση των μικροοργανισμών που απομονώνονται από τα τρόφιμα πραγματοποιούνταν, μέχρι πρόσφατα, κυρίως μέσω βιοχημικών και φαινοτυπικών μεθόδων. Αν και η εφαρμογή φαινοτυπικών τεχνικών έχει αποδειχθεί χρήσιμη για ορισμένα είδη, έχει διαπιστωθεί ότι παρόμοιοι φαινότυποι δεν αντιστοιχούν πάντα σε στενά συγγενείς γονότυπους (Temmerman et al., 2004). Επιπλέον, οι παραδοσιακές μέθοδοι είναι συχνά ανεπαρκείς για τον αξιόπιστο προσδιορισμό πολλών ειδών και την παρακολούθηση της ανάπτυξης και της δυναμικής συγκεκριμένων ειδών ή/και στελεχών σε πολύπλοκες μικροβιακές κοινότητες (Giraffa & Carminati, 2008). Οι εξαρτώμενες από την καλλιέργεια μέθοδοι εφαρμόζονται σε καθαρές καλλιέργειες ή αποικίες μικροοργανισμών από όπου γίνεται απομόνωση του DNA. Δηλαδή, οι μικροοργανισμοί απομονώνονται με παραδοσιακές μικροβιολογικές τεχνικές και καλλιεργούνται σε θρεπτικά υποστρώματα. Από μια καθαρή καλλιέργεια

λαμβάνεται το DNA που χρησιμοποιείται για ταυτοποίηση σε επίπεδο γένους, είδους ή στελέχους (Castellucci, 2012).

Ένα παράδειγμα μεθόδου για την ομαδοποίηση σε επίπεδο είδους ή και στελέχους ανάλογα τον υπό ταυτοποίηση μικροοργανισμό είναι η τεχνική RFLP (Restriction fragment length polymorphism) η οποία βασίζεται στην PCR. Η ανάλυση RFLP είναι μία από τις πρώτες τεχνικές που χρησιμοποιήθηκε ευρέως για την ανίχνευση παραλλαγών στην αλληλουχία του DNA. Όπως υποδηλώνει το όνομά της, η τεχνική RFLP βασίζεται στην ανάλυση του μήκους των θραυσμάτων DNA που διαχωρίζονται με συμβατική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (Li et al., 2009). Αντίστοιχα, για να πραγματοποιηθεί ομαδοποίηση σε επίπεδο είδους ή στελέχους, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) και για ομαδοποίηση σε επίπεδο στελέχους η τεχνική PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis). Η τεχνική RAPD είναι ένα εργαλείο το οποίο χρησιμοποιεί ένα μοναδικό εκκινητή συνήθως 20–25 ζευγών βάσεων (bps). Αυτός ο εκκινητής υβριδίζεται τυχαία σε διαφορετικές θέσεις αλληλουχιών χρωμοσωμικού DNA, που δείχνουν ομολογία πλησιέστερη προς αυτή του γονιδιώματος των μικροοργανισμών, για την ανίχνευση πολυμορφισμών. Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης διαχωρίζει τα προϊόντα ενίσχυσης για την ομαδοποίηση και το χαρακτηρισμό των ειδών/στελεχών των μικροοργανισμών (Sharma et al., 2020). Όσον αφορά στη μέθοδο PFGE, έχει κάνει τεράστιο αντίκτυπο στον τομέα της μοριακής βιολογίας καθιστώντας δυνατό τον διαχωρισμό μεγάλων θραυσμάτων DNA. Στη συμβατική ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης, μόρια DNA με μέγεθος μεγαλύτερο από 40 - 50 kb αποτυγχάνουν να μετακινηθούν αποτελεσματικά και εμφανίζονται στην πηκτή ως μια ενιαία μεγάλη διάχυτη ζώνη. Εφαρμόζοντας περιοδικά αλλαγές στην κατεύθυνση του ηλεκτρικού πεδίου στο οποίο αιωρούνται μεγάλα μόρια DNA, η τεχνική PFGE επιτρέπει τον διαχωρισμό μορίων DNA άνω των 1000 kb. Τα τελευταία χρόνια, μοριακές τεχνικές όπως αυτές που αναφέρθηκαν παραπάνω (PFGE, RFLP, RAPD) έχουν αποδειχθεί χρήσιμες μέθοδοι για τη ομαδοποίηση απομονώσεων μικροοργανισμών (Lin et al., 2014).

1.3.2. Τεχνικές ανεξάρτητες από την καλλιέργεια (Culture-independent)

Η αδυναμία των μοριακών τεχνικών που εξαρτώνται από την προηγούμενη καλλιέργεια των μικροοργανισμών σε μικροβιολογικά υποστρώματα, αντιμετωπίστηκε με την ανάπτυξη των λεγόμενων «ανεξάρτητων από την καλλιέργεια» μοριακών

μεθόδων, που έδωσε στους ερευνητές τη δυνατότητα να προσδιορίσουν τη σύνθεση των μικροβιακών κοινοτήτων απευθείας στο τρόφιμο και να εντοπίσουν ακόμη και τους μη καλλιεργήσιμους μικροοργανισμούς (Forney et al., 2004). Οι τεχνικές αυτές δημιουργούν ενδιαφέρουσες προοπτικές σε προβλήματα που σχετίζονται με τη σύνθεση και τη δυναμική των μικροβιακών κοινοτήτων σε διάφορα και περίπλοκα περιβάλλοντα όπως π.χ., χώμα, νερό και τρόφιμα. Στα ζυμωμένα τρόφιμα, η εκτίμηση της πραγματικής μικροβιακής ποικιλότητας είναι συχνά δύσκολη κυρίως λόγω της αδυναμίας καλλιέργειας των περισσότερων ζώντων βακτηρίων σε μικροβιολογικά υποστρώματα. Η αυξανόμενη γνώση των γονιδιακών αλληλουχιών και η ταυτόχρονη ανάπτυξη νέων μοριακών τεχνικών ανεξάρτητων από την καλλιέργεια, παρέχουν νέα και αποτελεσματικά εργαλεία για τη μελέτη της ποικιλότητας των μικροβιακών κοινοτήτων και την παρακολούθηση της δυναμικής τους με την ελάχιστη παρέμβαση στα δείγματα (Giraffa & Neviani, 2001).

1.3.3. Τεχνολογίες αλληλούχησης επόμενης γενιάς

Η παραδοσιακή αλληλούχηση DNA, είναι ιδιαίτερα απαιτητική για την παραγωγή δεδομένων που είναι κατάλληλα για ανάλυση μικροοργανισμών σε μεγάλη κλίμακα (Metzker, 2005). Για δύο δεκαετίες, η αλληλούχηση Sanger ήταν το χρυσό πρότυπο στην αλληλούχηση DNA, αλλά η τεχνολογία αυτή εγγενώς παρεμποδίζεται από περιορισμούς στην ταχύτητα, την απόδοση, την ανάλυση και το σχετικό κόστος (McElhroe et al., 2014). Συγκεκριμένα, η τεχνική Sanger μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αλληλούχηση μόνο ενός θραύσματος DNA κάθε φορά, ενώ με την ανάπτυξη των τεχνολογιών αλληλούχησης επόμενης γενιάς (NGS) μπορεί να επιτευχθεί αλληλούχηση εκατομμυρίων θραυσμάτων ανά μελέτη. Η αύξηση του όγκου των δεδομένων αλληλούχησης επιτυγχάνεται λόγω των αντίστοιχων αυξήσεων που καταγράφονται τόσο στο μήκος των τμημάτων του DNA όσο και στον αριθμό των αντιδράσεων που επιτρέπουν οι πλατφόρμες NGS (Fadiji & Babalola, 2020; Kozich et al., 2013). Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται μεγαλύτερη απόδοση με μειωμένο κόστος (McElhroe et al., 2014).

Διάφορες πλατφόρμες NGS χρησιμοποιούνται επί του παρόντος σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών, συμπεριλαμβανομένης της μεταγενετικής ανάλυσης μικροβιακών κοινοτήτων (McElhroe et al., 2014). Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη πλατφόρμα αλληλούχησης ήταν η Roche 454, ωστόσο, εντείνεται το ενδιαφέρον για τη χρήση των πλατφορμών IonTorrent, PacBio και Illumina (Kozich et al., 2013). Το ενδιαφέρον για

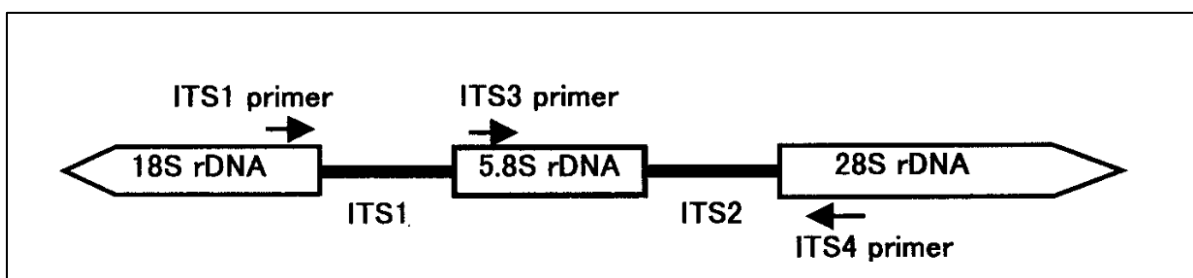
την αλληλούχηση προϊόντων PCR (amplicons) στην Illumina αυξάνεται, σε μεγάλο βαθμό λόγω του χαμηλότερου κόστους ανά αλληλουχία από άλλες πλατφόρμες, δίνοντας τη δυνατότητα για μικροβιακή οικολογία υψηλής απόδοσης στη μεγαλύτερη δυνατή κάλυψη που έχει γίνει μέχρι σήμερα (Caporaso et al., 2012).

Οι διάφορες πλατφόρμες Illumina βασίζονται στην αλληλούχηση κατά σύνθεση (sequencing-by-synthesis). Το πρώτο βήμα περιλαμβάνει την δημιουργία βιβλιοθήκης αλληλουχιών. Σε αυτό το βήμα, μικρά θραύσματα DNA ενισχύονται με την προσθήκη εκκινητών και ακολουθεί η σήμανση των θραυσμάτων και η πρόσδεση προσαρμογέων σε αυτά. Στη συνέχεια, τα ενισχυμένα τμήματα (θραύσματα) DNA ακινητοποιούνται σε ένα κύτταρο ροής και μια επακόλουθη ενίσχυση γέφυρας (Bridge PCR) στερεάς φάσης δημιουργεί έως και 1000 αντίγραφα σε κοντινή απόσταση (δημιουργία συμπλέγματος). Το επόμενο βήμα είναι η αλληλούχηση και βασίζεται στην χρήση dNTPs (δεοξυριβονουκλεοτίδια: A, C, G, T) σημασμένων με φθορίζουσες ουσίες για τον πολυμερισμό. Μόνο μία βάση προστίθεται σε κάθε κύκλο πολυμερισμού λόγω του 3' άκρου του ενσωματωμένου νουκλεοτιδίου. Τα φθοροφόρα ακτινοβολούνται με ένα κόκκινο λέιζερ για τα A και C και ένα πράσινο λέιζερ για τα G και T για την ταυτοποίηση των τεσσάρων διαφορετικών νουκλεοτιδίων στο σύστημα δύο καναλιών της πλατφόρμας Illumina. Οι φθορίζουσες ετικέτες και το 3' άκρο αφαιρούνται στη συνέχεια για να ξεκινήσει ο επόμενος κύκλος πολυμερισμού (Schirmer et al., 2015).

Η MiSeq Illumina αλληλούχηση αποτελεί μια από τις πιο γνωστές πλατφόρμες που προσφέρουν εκτός των άλλων μεταγενετική ανάλυση. Η MiSeq δημιουργεί τις υψηλότερης ποιότητας αναγνώσεις, με σχεδόν απουσία σφαλμάτων εισαγωγής και διαγραφής και χαμηλό ποσοστό σφάλματος υποκατάστασης της τάξεως των 0,1 υποκαταστάσεων ανά 100 βάσεις. Μια άλλη αξιολόγηση απόδοσης διαπίστωσε ότι η MiSeq παρήγαγε τον μεγαλύτερο αριθμό (76,45%) αναγνώσεων χωρίς σφάλματα χωρίς καμία αναντιστοιχία (McElhoo et al., 2014). Με μήκος ανάγνωσης έως και 2 × 300 bp, η MiSeq γίνεται μία από τις πιο χρησιμοποιούμενες πλατφόρμες αλληλούχησης παγκοσμίως. Η πλατφόρμα είναι διαχειρίσιμη και προσιτή ακόμη και για μικρότερα εργαστήρια και βρίσκει χρησιμότητα σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών όπως είναι η στοχευμένη αλληλούχηση γονιδίων, η μεταγονιδιωματική, η αλληλούχηση μικρού γονιδιώματος κ.α. (Schirmer et al., 2015).

Η καινοτομία και η εφαρμογή των μεθόδων αλληλούχησης επόμενης γενιάς έδωσαν ώθηση στην ανάπτυξη νέων πεδίων έρευνας, όπως οι «ομικές μέθοδοι ανάλυσης» (μεταγονιδιωματική, μετα-μεταγραφωματική, μεταπρωτεομική) (Su et al., 2012).

Πρόσφατα, οι μεταγονιδιωματικές και μεταγενετικές προσεγγίσεις στη μελέτη της μικροβιακής οικολογίας των τροφίμων οδήγησαν σε βελτιωμένη κατανόηση των μικροοργανισμών, επιτυγχάνοντας ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους και στελέχους (Manthou et al., 2021). Η μεταγονιδιωματική είναι μία μοριακή τεχνική που χρησιμοποιείται για την ανάλυση του DNA που λαμβάνεται από περιβαλλοντικά δείγματα, προκειμένου να μελετηθεί η μικροβιακή κοινότητα που υπάρχει σε αυτά, χωρίς την ανάγκη απομόνωσης καθαρών καλλιιεργειών (Ghosh et al., 2018). Η μεταγονιδιωματική περιλαμβάνει την αποκρυπτογράφηση πληροφοριών στο DNA ολόκληρης της μικροβιακής κοινότητας. Επιπρόσθετα, η αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος παρέχει πολύ λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με την ποικιλομορφία και τη λειτουργία ενός μικροοργανισμού. Η μεταγενετική, αντίθετα στοχεύει μια συγκεκριμένη περιοχή DNA (γενετικός δείκτης) σε ολόκληρη τη μικροβιακή κοινότητα για τη φυλογενετική χαρτογράφηση των μικροοργανισμών που αποτελούν την εν λόγω κοινότητα. Οι πιο κοινώς χρησιμοποιούμενες περιοχές γενετικών δεικτών περιλαμβάνουν τα γονίδια ριβοσωμικού RNA 16S και 18S. Ένας άλλος δείκτης για μεταγενετική ανάλυση είναι η περιοχή ITS. Υπάρχουν δύο τύποι δεικτών ITS: η περιοχή ITS1 που είναι κατά κύριο λόγο τοποθετημένη μεταξύ 18S και 5,8S-rRNA και η περιοχή ITS2 που βρίσκεται μεταξύ των περιοχών 5,8S-rRNA και 26S (Maghembe et al., 2020). Τα μεγέθη των γονιδίων 18S, 5.8S, and 26S rRNA είναι πανομοιότυπα για όλα τα είδη, ενώ το μήκος των περιοχών ITS, εξαρτάται από το είδος (Fujita et al., 2001).



Εικόνα 1.3.3.2. Σχηματική απεικόνιση του γενετικού δείκτη ITS (Fujita et al., 2001).

Η μεταγενετική ανάλυση έχει αναδειχθεί ως ένα ισχυρό και απλό μέσο για την ανάλυση της αφθονίας, της ποικιλομορφίας και της σύνθεσης των μικροβιακών κοινοτήτων (Bronner et al., 2016). Η εφαρμογή της μπορεί να απλοποιήσει τον προσδιορισμό και την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών σε αυτές (Maghembe et al., 2020).

2. Σκοπός

Σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης ήταν: (α) η αξιολόγηση της ποιότητας συσκευασμένων πράσινων επιτραπέζιων ελιών με την εφαρμογή φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR) και (β) ο προσδιορισμός της μικροβιακής αλληλουχίας των ζυμών-μυκήτων με τη χρήση ανεξάρτητων από την καλλιέργεια μοριακών τεχνικών (μεταγενετική ανάλυση). Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν πράσινες επιτραπέζιες ελιές των ποικιλιών Χαλκιδική και Κονσερβολιά, οι οποίες είχαν προηγουμένως ζυμωθεί με την ισπανική μέθοδο και είχαν συσκευασθεί και συντηρηθεί σε εύκαμπτους πολυστρωματικούς περιέκτες με τροποποιημένη ατμόσφαιρα (100% N₂) για χρονικό διάστημα 12 μηνών.

Κατά τη διάρκεια της συντήρησης συλλέχθηκαν φάσματα FT-IR για τον προσδιορισμό της μεταβολής του συνολικού μεταβολικού αποτυπώματος των δειγμάτων κατά τη δωδεκάμηνη συντήρηση. Στη συνέχεια, τα φασματικά δεδομένα συσχετίστηκαν με τα μικροβιολογικά δεδομένα που αφορούσαν στην μεταβολή του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων, καθώς επίσης και με την ποικιλία της επιτραπέζιας ελιάς και το είδος της συσκευασίας των δειγμάτων για τη δημιουργία μοντέλων πρόβλεψης.

Παράλληλα, εφαρμόστηκε μεταγενετική (metagenetic) ανάλυση για την ταυτοποίηση της μικροβιακής αλληλουχίας των ζυμών-μυκήτων του ελαιοκάρπου σε τρία διακριτά στάδια κατά τη διάρκεια της συντήρησης: αρχικό (μήνας 0), ενδιάμεσο (μήνας 6) και τελικό (μήνας 12).

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1. Προετοιμασία και συνθήκες συντήρησης των δειγμάτων

Οι υπό μελέτη ελαιόκαρποι ανήκουν στην κατηγορία των πράσινων επιτραπέζιων ελιών των ποικιλιών Κονσερβολιά και Χαλκιδική, η ζύμωση των οποίων πραγματοποιήθηκε σε βιομηχανική κλίμακα με την ισπανική μέθοδο. Μετά το πέρας της ζύμωσης, συσκευάστηκαν σε εύκαμπτους πολυστρωματικούς περιέκτες χωρίς άλμη με εφαρμογή τροποποιημένης ατμόσφαιρας (100% N₂). Οι εύκαμπτοι περιέκτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν δύο διαφορετικοί τύποι πολυστρωματικών μεμβρανών συσκευασίας, συγκεκριμένα: (α) διαφανής μεμβράνη metalized πάχους 113 μm (Συσκευασία 1, ρυθμός διαπερατότητας υδρατμών < 0,5 g/m²/24 h, ρυθμός διαπερατότητας O₂ < 1,5 mL/m²/24 h) και (β) αδιαφανής μεμβράνη πάχους 113 μm (Συσκευασία 2, ρυθμός διαπερατότητας υδρατμών < 0,5 g/m²/24 h, ρυθμός διαπερατότητας O₂ < 0,75 mL/m²/24 h).

Κάθε συσκευασία περιείχε 70 g εκπυρηνωμένης ελιάς από κάθε ποικιλία. Συνολικά ετοιμάστηκαν 200 συσκευασίες στις εγκαταστάσεις της μεταποιητικής μονάδας και παραδόθηκαν στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του ΓΠΑ όπου συντηρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για διάστημα 12 μηνών, που συμπίπτει με την εμπορική διάρκεια ζωής των προϊόντων αυτών. Σε τακτά χρονικά διαστήματα και συγκεκριμένα μια φορά ανά μήνα, δύο συσκευασίες από κάθε ποικιλία και τύπο πολυστρωματικής μεμβράνης υποβλήθηκαν σε μικροβιολογικές και φυσικοχημικές αναλύσεις.

3.2. Μικροβιολογικές αναλύσεις

Κατά τη διάρκεια της συντήρησης πραγματοποιήθηκαν μικροβιολογικές αναλύσεις στον ελαιόκαρπο για την απαρίθμηση του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων, των ζυμομυκήτων και των εντεροβακτηρίων. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι μικροβιολογικές και φυσικοχημικές αναλύσεις δεν πραγματοποιήθηκαν στο πλαίσιο της εν λόγω μεταπτυχιακής μελέτης, αλλά τα αποτελέσματα ελήφθησαν από τα παραδοτέα του ερευνητικού έργου «*Βελτίωση της ποιότητας της επιτραπέζιας ελιάς κατά τη συσκευασία σε εύκαμπτους πολυστρωματικούς περιέκτες με χρήση τροποποιημένων ατμοσφαιρών*» (Τ1ΕΔΚ-04110) και χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να συσχετιστούν τα μικροβιολογικά δεδομένα (ειδικότερα ο πληθυσμός των

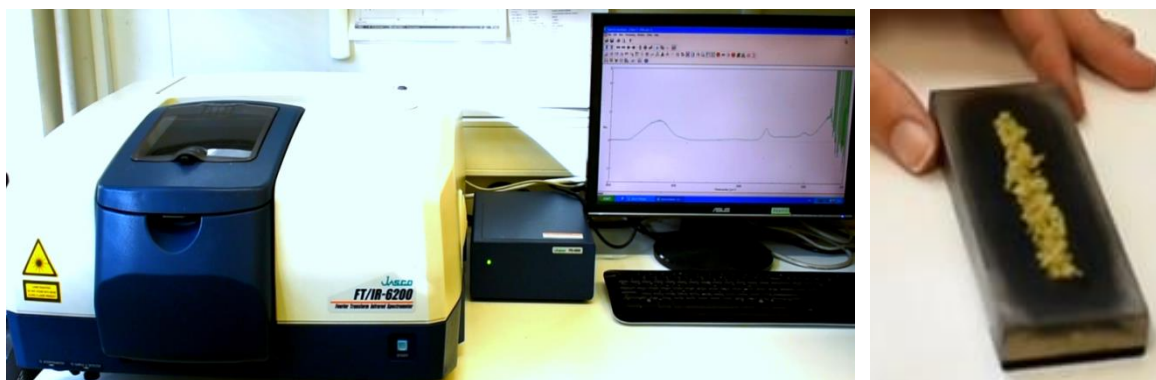
οξυγαλακτικών βακτηρίων), οι ποικιλίες της ελιάς και οι δύο τύποι πολυστρωματικών μεμβρανών με τα φασματοσκοπικά δεδομένα του FT-IR.

3.3. Φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR)

Δειγματοληπτικά 4–5 εκπυρηνωμένοι ελαιόκαρποι από κάθε συσκευασία και ποικιλία μετατράπηκαν σε πάστα ελιάς με την χρήση ομογενοποιητή (blender). Σε τακτά χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια της 12-μηνιαίας συντήρησης (μια φορά ανά μήνα) πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις φασματοσκοπίας FT-IR. Συνολικά αναλύθηκαν 48 διαφορετικά δείγματα που αντιστοιχούν σε 12 μήνες συντήρησης × 2 ποικιλίες ελιάς × 2 είδη συσκευασίας.

Για την φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier χρησιμοποιήθηκε φασματογράφος FTIR-6200 JASCO με οριζόντιο κρύσταλλο ολικής ανάκλασης HATR (Εικόνα 3.3.), ZnSe 45°, με ανακλαστική ικανότητα 2,4 και βάθος διείσδυσης 2,0 μm στα 1000 cm⁻¹. Πριν τις μετρήσεις των δειγμάτων, αλλά και μετά την ανάλυση τεσσάρων δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε βαθμονόμηση (calibration) του οργάνου με τη λήψη φάσματος αναφοράς, χρησιμοποιώντας τον κρύσταλλο κενό, δηλαδή χωρίς την προσθήκη δείγματος. Τα φάσματα συλλέχθηκαν στην περιοχή κυματαριθμών από 4000 έως 400 cm⁻¹ χρησιμοποιώντας το λογισμικό Spectra Manager™ Code of Federal Regulations (CFR) version 2, με χρόνο ανάλυσης 2 min.

Για τη λήψη των φασμάτων, μικρή ποσότητα πάστας ελιάς απλώθηκε σε ολόκληρη την επιφάνεια του κρυστάλλου και ακολούθησε ελαφρά πίεση του δείγματος προκειμένου να έρθει σε στενή επαφή με τον κρύσταλλο. Μετά από κάθε μέτρηση, η επιφάνεια του κρυστάλλου καθαρίστηκε με απορρυπαντικό, στη συνέχεια με απιονισμένο νερό και τέλος με καθαρή ακετόνη. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι κάθε φάσμα ελήφθη εις διπλούν, με αποτέλεσμα να συλλεχθούν συνολικά για περεταίρω ανάλυση 96 φάσματα. Η περιοχή κυματαριθμών που επιλέχθηκε στην ανάλυση ήταν από 2000 έως 900 cm⁻¹.



Εικόνα 3.3. Φασματοφωτόμετρο FTIR-6200 JASCO και κρύσταλλος HATP με δείγμα πάστας ελιάς.

3.4. Ανάλυση φασματικών δεδομένων και συσχέτιση με μικροβιολογικά δεδομένα

Στη συγκεκριμένη μελέτη επιλέχθηκε η μέθοδος παλινδρόμησης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-R), που είναι η πλέον διαδεδομένη για την ανάλυση φασματοσκοπικών δεδομένων στον τομέα των τροφίμων. Η ανάλυση PLS-R είναι μια μέθοδος για τη συσχέτιση δύο πινάκων δεδομένων, των X και Y , μέσω ενός γραμμικού μοντέλου πολλαπλών μεταβλητών. Η χρησιμότητά του έγκειται στην ικανότητά του να αναλύει δεδομένα με πολλές μεταβλητές που έχουν θόρυβο, είναι γραμμικές, ακόμη και ατελείς τόσο στο X όσο και στο Y (Wold et al., 2001).

Η ικανότητα πρόβλεψης του μοντέλου επιτυγχάνεται εξάγοντας από τις ανεξάρτητες μεταβλητές ένα σύνολο συνιστωσών με ορθογώνια διάταξη που ονομάζονται λανθάνουσες μεταβλητές (LVs) που έχουν την καλύτερη προγνωστική δύναμη (Abdi, 2007). Μια προφανής ερώτηση κατά την ανάπτυξη του μοντέλου είναι να βρεθεί ο αριθμός των λανθανουσών μεταβλητών που απαιτούνται για να επιτευχθεί η καλύτερη γενίκευση για την πρόβλεψη νέων παρατηρήσεων. Με πολυάριθμες και συσχετισμένες μεταβλητές X υπάρχει σημαντικός κίνδυνος υπερβολικής προσαρμογής (overfitting), δηλαδή να δημιουργηθεί ένα μοντέλο που να περιγράφει με εξαιρετική ακρίβεια τα πειραματικά δεδομένα, με ελάχιστη ή καθόλου όμως προγνωστική ισχύ. Η διασταυρούμενη επικύρωση (Cross Validation, CV) είναι ένας πρακτικός και αξιόπιστος τρόπος δοκιμής αυτής της προγνωστικής ικανότητας του μοντέλου.

Η διασταυρούμενη επικύρωση είναι μια χρήσιμη τεχνική για τη δοκιμή της ικανότητας ενός μοντέλου να προβλέπει δεδομένα για τα οποία δεν έχει εκπαιδευτεί. Ωστόσο, η πραγματική ικανότητά του να προβλέπει άγνωστα δείγματα πρέπει να αποδεικνύεται χρησιμοποιώντας ένα ανεξάρτητο σύνολο δειγμάτων (εξωτερική

επικύρωση). Μια κοινή στρατηγική που ακολουθείται από πολλές έρευνες είναι ο διαχωρισμός του συνόλου των δεδομένων σε δύο ξεχωριστά υποσύνολα, εκ των οποίων το ένα χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη του μοντέλου (model calibration) και το άλλο για την επικύρωσή του (model prediction ή testing). Η επίδοση των μοντέλων προσδιορίζεται με τη χρήση στατιστικών δεικτών όπως η ρίζα του μέσου τετραγωνικού σφάλματος επικύρωσης (RMSECV) όταν χρησιμοποιείται διασταυρούμενη επικύρωση ή η ρίζα του μέσου τετραγωνικού σφάλματος πρόβλεψης (RMSEP) όταν χρησιμοποιείται εξωτερική επικύρωση. Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιείται επίσης και ο συντελεστής προσδιορισμού (R^2), ο οποίος αντιπροσωπεύει το ποσοστό της εξηγούμενης διακύμανσης της εξαρτημένης μεταβλητής είτε στα σύνολα εκπαίδευσης του μοντέλου, είτε στα σύνολα δοκιμών (Roberts & Cozzolino, 2016).

Η μέθοδος PLS-R χρησιμοποιήθηκε με σκοπό τη δημιουργία μοντέλων πρόβλεψης του μικροβιακού πληθυσμού στην επιφάνεια της ελιάς κατά τη διάρκεια της συντήρησης, συσχετίζοντας τον πληθυσμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων με τα φάσματα που ελήφθησαν από το όργανο FT-IR. Επίσης επιδιώχθηκε η συσχέτιση των φασματοσκοπικών δεδομένων τόσο με την ποικιλία της επιτραπέζιας ελιάς, όσο και με το είδος της συσκευασίας των δειγμάτων (τύπος πολυστρωματικής μεμβράνης). Για να προσδιοριστεί σε ποια κατηγορία ανήκει ένα δείγμα, μεταξύ ενός αριθμού προκαθορισμένων τάξεων, χρησιμοποιούνται οι τεχνικές της διακριτικής ανάλυσης (discriminant analysis). Μια μέθοδος ταξινόμησης που εφαρμόζεται ευρύτατα τα τελευταία χρόνια βασίζεται σε παλινδρόμηση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS) και συνήθως αναφέρεται ως PLS διακριτική ανάλυση (PLS-DA) (Oliveri et al., 2014).

Για την εφαρμογή της μεθόδου μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS), χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πρόγραμμα The Unscrambler ver. 9.7. (CAMO Software AS, Oslo, Norway). Αναπτύχθηκαν μοντέλα PLS-R για την εκτίμηση του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων στην επιφάνεια της ελιάς κατά τη διάρκεια της 12-μηνιαίας συντήρησης. Στα εν λόγω μοντέλα ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων χρησιμοποιήθηκε ως εξαρτημένη μεταβλητή (Y), ενώ ως ανεξάρτητη μεταβλητή (X) ορίστηκαν τα φασματοσκοπικά δεδομένα που συλλέχθηκαν στην περιοχή των κυματαριθμών 2000-900 cm^{-1} . Η προ-επεξεργασία των φασμάτων πραγματοποιήθηκε με τον μετασχηματισμό Savitzky-Golay, με πολυώνυμο μηδενικού βαθμού και 11 σημεία εξομάλυνσης. Για την επικύρωση χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Kennard-Stone με διαχωρισμό των δεδομένων σε αναλογία 80/20, δηλαδή από τα 96

συνολικά φάσματα, 77 χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη του μοντέλου και 19 για την εξωτερική επικύρωση. Επιπλέον, αναπτύχθηκαν μοντέλα PLS-DA σε εύρος κυματαριθμών από 2000 έως 900 cm^{-1} τα οποία επίσης επικυρώθηκαν με τον αλγόριθμο Kennard-Stone. Το πρώτο μοντέλο αφορούσε τη διάκριση μεταξύ των δύο ποικιλιών επιτραπέζιας ελιάς (Χαλκιδική και Κονσερβολιά) χωρίς να προηγηθεί προ-επεξεργασία των φασμάτων FT-IR, ενώ το δεύτερο μοντέλο αφορούσε στη διάκριση μεταξύ των δύο τύπων συσκευασιών και η προ-επεξεργασία των φασμάτων περιελάμβανε multiscatter correction (MSC) και στη συνέχεια μετασχηματισμό Savitzky-Golay (πρώτη παράγωγος, πολυώνυμο δευτέρου βαθμού, 15 σημεία εξομάλυνσης). Η επιλογή της εκάστοτε προ-επεξεργασίας πραγματοποιήθηκε κατόπιν πολλαπλών δοκιμών.

Η επίδοση των μοντέλων PLS-R αξιολογήθηκε με τη χρήση δεικτών όπως η ρίζα του μέσου τετραγωνικού σφάλματος (Root Mean Squared Error, RMSE) καθώς και με τον συντελεστή προσδιορισμού (R^2) για την ανάπτυξη (calibration), την διασταυρούμενη επικύρωση (cross validation) και την πρόβλεψη (prediction) του μοντέλου. Η αξιολόγηση των μοντέλων PLS-DA πραγματοποιήθηκε μέσω του πίνακα ταξινόμησης των παρατηρήσεων (πίνακας σύγχυσης, confusion matrix) καθώς επίσης και με τη χρήση των δεικτών ακρίβειας (Accuracy, %) και ευαισθησίας (Sensitivity, Se, %) (Ropodi et al., 2016).

3.5. Μεταγενετική ανάλυση

Συλλογή δειγμάτων και εξαγωγή DNA

Για τον προσδιορισμό της βιοποικιλότητας των ζυμών-μυκήτων που απαντώνται στον ελαιόκαρπο στο αρχικό (0 μήνες), ενδιάμεσο (6 μήνες) και τελικό (12 μήνες) στάδιο συντήρησης, πραγματοποιήθηκαν μοριακές αναλύσεις ανεξάρτητες από την καλλιέργεια. Τα δείγματα ελιάς, πριν την έναρξη των αναλύσεων, με τη χρήση ιγδίου μετατράπηκαν σε πάστα ελιάς.

3.5.1. Εκχύλιση γενετικού υλικού DNA από τρόφιμο

Έγινε χρήση του DNeasy PowerSoil Kit (QIAGEN) για εξαγωγή του γενετικού υλικού (DNA) από τις ελιές με βάση το παρακάτω πρωτόκολλο:

1. Προσθήκη 0,25 g δείγματος στον παρεχόμενο σωλήνα PowerBead. Απαλή ανάδευση με συσκευή vortex.

2. Προσθήκη 60 μL διαλύματος C1 και αναστροφή αρκετές φορές ή χρήση vortex για λίγο.
3. Ασφάλιση των σωλήνων PowerBead οριζόντια χρησιμοποιώντας έναν προσαρμογέα Vortex για 24 σωλήνες (1,5-2,0 mL)
4. Χρήση vortex στη μέγιστη ταχύτητα για 10 λεπτά.
5. Φυγοκέντρηση των σωλήνων στα 10.000 x g για 30 δευτερόλεπτα.
6. Μεταφορά του υπερκείμενου σε καθαρό σωλήνα συλλογής των 2 mL.
7. Προσθήκη 250 μL διαλύματος C2 και ανάδευση (vortex) για 5 δευτερόλεπτα. Επώαση σε θερμοκρασία 4 °C για 5 λεπτά.
8. Φυγοκέντρηση των σωλήνων για 1 λεπτό σε 10.000 x g .
9. Μεταφορά έως 600 μL υπερκείμενου υγρού σε καθαρό σωλήνα συλλογής των 2 mL.
10. Προσθήκη 200 μL του διαλύματος C3 και σύντομη ανάδευση (vortex). Επώαση σε θερμοκρασία 4 °C για 5 λεπτά.
11. Φυγοκέντρηση των σωλήνων για 1 λεπτό σε 10.000 x g .
12. Μεταφορά έως 750 μL υπερκείμενου υγρού σε καθαρό σωλήνα συλλογής των 2 mL.
13. Ανακίνηση για ανάμιξη του διαλύματος C4 και προσθήκη 1200 μL στο υπερκείμενο. Ανάδευση (vortex) για 5 δευτερόλεπτα.
14. Φόρτωση 675 μL σε στήλη περιστροφής MB και φυγοκέντρηση σε 10.000 x g για 1 λεπτό. Απόρριψη υπερκείμενου.
15. Επανάληψη του βήματος 14 δύο φορές, μέχρι να υποβληθεί σε επεξεργασία όλο το δείγμα.
16. Προσθήκη 500 μL διαλύματος C5. Φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα σε 10.000 x g .
17. Απόρριψη υπερκείμενου. Φυγοκέντρηση ξανά για 1 λεπτό σε 10.000 x g .
18. Προσεκτική τοποθέτηση της στήλης MB Spin σε έναν καθαρό σωλήνα συλλογής των 2 mL.

19. Προσθήκη 100 μL διαλύματος C6 στο κέντρο της μεμβράνης του λευκού φίλτρου. Εναλλακτικά, χρήση αποστειρωμένου νερού PCR χωρίς DNA για αυτό το βήμα.
20. Φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου για 30 δευτερόλεπτα σε 10.000 x *g*. Απόρριψη της στήλης MB Spin. Μετά από αυτό το στάδιο το DNA είναι έτοιμο για περαιτέρω ανάλυση.

3.5.2. Μέτρηση ποσότητας και καθαρότητας DNA

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι ποσοτικοποίησης των νουκλεϊκών οξέων σε ένα διάλυμα, μία εκ των οποίων είναι η φασματοφωτομετρική ανάλυση. Βασίζεται στην ιδιότητα των νουκλεϊκών οξέων να απορροφούν υπεριώδες φως (UV). Η ποσότητα του DNA (ή του RNA) που περιέχεται σε ένα υδατικό διάλυμα μπορεί επομένως να υπολογιστεί με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης (Optical Density, O.D.) σε μήκος κύματος 260 nm (O.D.260), καθώς τα νουκλεϊκά οξέα έχουν μέγιστο της απορρόφησης τους σ' αυτή την περιοχή της υπεριώδους ακτινοβολίας (Γιαννακούρης και άλλοι, 2015). Όσο περισσότερο είναι το φως που απορροφάται από το δείγμα, τόσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση νουκλεϊκού οξέος σε αυτό. Η καθαρότητα του DNA στο παρασκεύασμα προσδιορίζεται από το λόγο $\text{O.D.}_{260 \text{ nm}}/\text{O.D.}_{280 \text{ nm}}$ (Παπαδάκη, 2015). Καθαρά παρασκευάσματα DNA έχουν λόγο $\text{O.D.}_{260 \text{ nm}}/\text{O.D.}_{280 \text{ nm}}=1,8$. Τιμές μικρότερες από 1,8 είναι ενδεικτικές ότι το DNA έχει προσμίξεις με άλλες ουσίες. Οι πρωτεΐνες, για παράδειγμα, απορροφούν και αυτές στο υπεριώδες φως με μέγιστο απορρόφησης στα 280 nm και έτσι ένας μειωμένος λόγος $\text{O.D.}_{260}/\text{O.D.}_{280}$ είναι ένδειξη προσμίξεων από πρωτεΐνες.

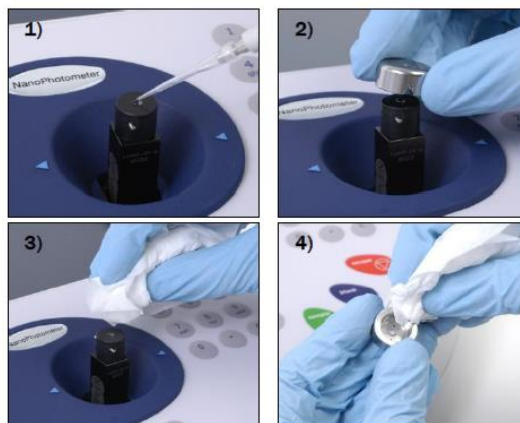
Για τη μέτρηση της ποσότητας και της καθαρότητας του DNA χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο Nanophotometer της εταιρείας Implen. Το Implen NanoPhotometer είναι ένα φασματοφωτόμετρο υπεριώδους/ορατού (UV/Vis). Ο χρόνος ανάλυσης μόνο 3,5 δευτερολέπτων και η χρήση όγκου δείγματος μόλις 5 μL είναι μεγάλα πλεονεκτήματα αυτής της συσκευής (Christoph et al., 2018). Η συσκευή διαθέτει προκαθορισμένες μεθόδους και λειτουργίες για την



Εικόνα 3.5.2.1. Φασματοφωτόμετρο NanoPhotometer Implen

ανάλυση των νουκλεϊκών οξέων. Η μέτρηση όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.5.2.2 πραγματοποιείται ως εξής:

- 1) εφαρμογή 5 μ L δείγματος στο κέντρο του παραθύρου μέτρησης,
- 2) κλείσιμο καλύμματος και λήψη μέτρησης,
- 3) καθαρισμός του παραθύρου μέτρησης με μαλακό πανί και
- 4) αφαίρεση υπολειμμάτων δείγματος από τον καθρέφτη του καλύμματος με μαλακό πανί.



Εικόνα 3.5.2.2. Στάδια πραγματοποίησης μέτρησης

3.5.3. Αλυσιδωτή Αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Για την ενίσχυση της γενετικής περιοχής ITS2 για την ταυτοποίηση των ζυμών-μυκήτων πραγματοποιήθηκε η διαδικασία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης χρησιμοποιώντας τον θερμικό κυκλοποιητή ProFlex™ PCR System (Εικόνα 3.5.3).

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:

- 1) DNA 10 ng/ μ L(5 μ L)
 - 2) Εκκινητές 20 μ M (1 μ L έκαστος)
- ❖ ITS3: 5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3'

Με προσαρμογέα (linker) 5'-CTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-3'

- ❖ ITS4_KYO1: 5'-TCCTCCGCTTWTGWTGTC-3'

Με προσαρμογέα (linker) 5'-GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT-3'

- 3) Ρυθμιστικό διάλυμα 10 X AccuPrime PCR Buffer II (5 μ L)
- 4) Πολυμεράση AccuPrime Taq (1 μ L)
- 5) Υπερ-καθαρό αποστειρωμένο νερό (37 μ L)



Εικόνα 3.5.3. Θερμικός κυκλοποιητής ProFlex™ PCR System.

Ο τελικός όγκος σε κάθε Eppendorf που τοποθετήθηκε στη συσκευή ήταν 50 μL . Το DNA καθώς και όλα τα αντιδραστήρια διατηρούνται σε πάγο πριν την προετοιμασία του μείγματος της PCR. Στη συνέχεια ρυθμίστηκε η συσκευή ώστε να πραγματοποιηθούν τα ακόλουθα στάδια όπως φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

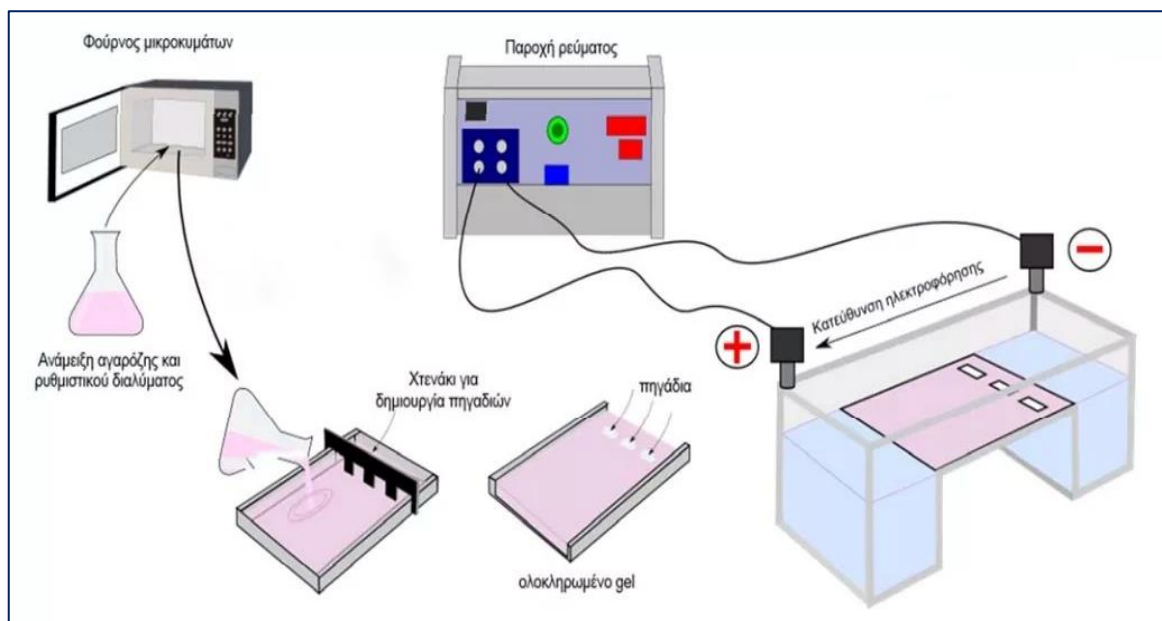
Πίνακας 2.5.3. Στάδια διεξαγωγής PCR

Στάδιο	Θερμοκρασία ($^{\circ}\text{C}$)	Κύκλοι	Διάρκεια (min)
Προαποδιάταξη	94	1	1
Αποδιάταξη	94	30	1
Υβριδισμός	55		1
Επιμήκυνση	72		1
Τελική επιμήκυνση	72	1	8

3.5.4. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης και ανίχνευση των προϊόντων της PCR

Αρχικά παρασκευάστηκε πηκτή αγαρόζης 1,5% (w/v) με προσθήκη 1,5 g αγαρόζης σε 100 mL διαλύματος TAE μέσα σε κωνική φιάλη. Η φιάλη τοποθετήθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων και θερμάνθηκε μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη. Έπειτα μεταγγίσθηκε σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης στην οποία είχε ήδη τοποθετηθεί ειδική υποδοχή (χτένα) για τη δημιουργία των βοθρίων και παρέμεινε για χρονικό διάστημα 30 min μέχρι να στερεοποιηθεί. Στη συνέχεια απομακρύνθηκε η χτένα και στη συσκευή ηλεκτροφόρησης προστέθηκε διάλυμα TAE μέχρι να καλυφθεί πλήρως η πηκτή αγαρόζης.

Πριν μεταφερθεί το DNA στα κενά βοθρία της πηκτής αγαρόζης, προστέθηκαν 3 μL από τη χρωστική ουσία «κυανό της βρωμοθυμόλης» σε 6 μL DNA κάθε δείγματος. Κατόπιν ανάδευσης, ποσότητα 6 μL από κάθε προϊόν με χρωστική προστέθηκε στα βοθρία. Στο πρώτο και στο τελευταίο βοθρίο τοποθετήθηκαν 3,5 μL δείκτη μοριακών βαρών από τον DNA Ladder 1 Kb (Cleaver Scientific Ltd, UK). Το DNA διαχωρίζεται καθώς κινείται στην πηκτή λόγω διαφοράς δυναμικού 100 V για 75 min. Ακολούθησε χρώση της πηκτής αγαρόζης με εναπόθεσή της σε βρωμιούχο αιθίδιο για 20 min.



Εικόνα 3.5.4. Προετοιμασία πηκτής αγαρόζης για ηλεκτροφόρηση DNA

3.5.5. Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης

Η πηκτή τοποθετήθηκε στη συσκευή Universal Hood II (Biorad) που εκπέμπει υπεριώδη ακτινοβολία (UV Transilluminator) ώστε να γίνουν ορατές οι ζώνες που εμφανίζονται. Ειδική ψηφιακή φωτογραφική μηχανή συνδέθηκε με τη συσκευή προκειμένου να οπτικοποιηθεί το αποτέλεσμα. Πραγματοποιήθηκε και σύνδεση με ηλεκτρονικό υπολογιστή στον οποίο με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος Quantity One (Biorad) οι φωτογραφίες των πηκτωμάτων αποτυπώνονται, επεξεργάζονται για την επίτευξη της καλύτερης δυνατής ανάλυσης και αποθηκεύονται.

3.5.6. Αυτοματοποιημένο σύστημα ηλεκτροφόρησης

Μετά την ολοκλήρωση της κλασικής τεχνικής ηλεκτροφόρησης και της απεικόνισης των αποτελεσμάτων της, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση με το αυτοματοποιημένο σύστημα ηλεκτροφόρησης Experion (Biorad). Το σύστημα Experion χρησιμοποιεί μικρο-ρευστή τεχνολογία LabChip για την αυτοματοποίηση της ηλεκτροφόρησης και ανάλυσης ενσωματώνοντας τον διαχωρισμό, την ανίχνευση και την ανάλυση δεδομένων σε μία μόνο πλατφόρμα. Καταναλώνοντας μόνο 1 μ L δείγματος για κάθε ανάλυση, το αυτοματοποιημένο σύστημα Experion μπορεί να αναλύσει 1–11 δείγματα σε ~ 40 λεπτά. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε για περισσότερη ακρίβεια του προσδιορισμού της καθαρότητας των προϊόντων PCR που προορίζονται για αλληλούχηση.



Εικόνα 3.5.6. Το σύστημα Experion. 1) αυτόματος σταθμός ηλεκτροφόρησης, 2) σταθμός εναύσματος, 3) σταθμός ανάδευσης (νοτεχ), 4) λειτουργικό σύστημα και εργαλεία ανάλυσης δεδομένων (λογισμικό), και 5) εργαλεία ανάλυσης τα οποία περιλαμβάνουν (a) τσιπ και (b) αντιδραστήρια αναλύσεων DNA

3.5.7. Αλληλούχηση

Τελικό στάδιο για τη μοριακή ανάλυση είναι η αλληλούχηση, ο προσδιορισμός δηλαδή της αλληλουχίας των νουκλεοτιδικών βάσεων σε κάθε μόριο DNA. Στη συγκεκριμένη μελέτη, η χρησιμότητα της αλληλούχησης του DNA έγκειται στην ταυτοποίηση των ζυμών-μυκήτων που ευρίσκοντο στην επιφάνεια της ελιάς κατά τη διάρκεια



Εικόνα 3.5.7. Συσκευή αλληλούχησης MiSeq - Illumina

της συντήρησης. Το DNA που λήφθηκε στάλθηκε στο Εθνικό Ινστιτούτο Αγροτικής Έρευνας της Γαλλίας, (French National Institute for Agricultural Research, INRA Unité FLEC), όπου πραγματοποιήθηκε ο 2ος κύκλος PCR (multiplex Illumina Miseq PCR), στον οποίο προσδένονται στις αλληλουχίες οι κωδικοί ιχνηλασιμότητας, και η Miseq αλληλούχηση.

3.5.8. Ανάλυση δεδομένων

Η ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της πλατφόρμας Galaxy Migale (galaxy.migale.inra.fr) και πιο συγκεκριμένα του εργαλείου FROGS (Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution). Έχει σχεδιαστεί για να αναλύει μεγάλα σύνολα αλληλουχιών και να παράγει πίνακες αφθονίας των λειτουργικών ταξινομικών μονάδων (Operational Taxonomic Units, OTUs) και της ταξινομικής τους σχέσης (Escudie et al., 2018). Στατιστικά αποτελέσματα και πολλές γραφικές απεικονίσεις προκύπτουν από το εν λόγω εργαλείο. Αρχικά πραγματοποιήθηκε μία προεπεξεργασία με τη βοήθεια του λογισμικού FLASH (fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies). Το FLASH αποτελεί ένα γρήγορο υπολογιστικό εργαλείο για την επέκταση του μήκους των σύντομων αναγνώσεων βρίσκοντας τη σωστή αλληλεπικάλυψη μεταξύ των άκρων (από βιβλιοθήκες θραυσμάτων) και ενώνοντάς τις μεταξύ τους (Magoč & Salzberg, 2011). Επόμενο βήμα είναι η ομαδοποίηση που πραγματοποιείται με έναν γρήγορο, ακριβή, δύο φάσεων, συσσωρευτικό αλγόριθμο, το SWARM, με βάση την ομοιότητα των ειδών. Στόχος αυτής της μεθόδου είναι να παράγει σημαντικές λειτουργικές ταξινομικές μονάδες (OTUs) μειώνοντας την επίδραση των παραμέτρων ομαδοποίησης (Mahé et al., 2014). Στη συνέχεια απομακρύνθηκαν οι χίμαιρες χρησιμοποιώντας το εργαλείο VSEARCH, με συνέπεια τη μείωση των ομάδων που είχαν δημιουργηθεί. Οι χίμαιρες είναι υβριδικά προϊόντα μεταξύ πολλαπλών γονικών αλληλουχιών που μπορούν να ερμηνευτούν ψευδώς ως νέοι οργανισμοί, αυξάνοντας έτσι την φαινομενική ποικιλομορφία (Haas et al., 2011). Σημαντικό, επίσης, στάδιο στην ανάλυση των δεδομένων είναι η εφαρμογή φίλτρων με σκοπό την αφαίρεση των OTUs με μειωμένη αφθονία. Η στρατηγική λειτουργεί σε βάση κάθε νουκλεοτιδίου, περικλύποντας τις αναγνώσεις σε σημείο όπου η ποιότητά τους αρχίζει να μειώνεται. (Bokulich et al., 2013). Οι συγγραφείς αυτού του άρθρου συνιστούν, για τη βαθμονόμηση των βέλτιστων ρυθμίσεων φιλτραρίσματος, να συμπεριληφθεί μια συγκεκριμένη, γνωστή κοινότητα σε κάθε μεμονωμένη αλληλούχηση, ενώ για σύνολα δεδομένων όπου μια γνωστή κοινότητα δεν

περιλαμβάνεται για βαθμονόμηση, προτείνουν ένα συντηρητικό κατώφλι OTU $c = 0,005\%$. Ωστόσο, κατόπιν δοκιμών, τα φίλτρα που εφαρμόστηκαν αφορούσαν στην αφαίρεση των OTUs που δεν περιείχαν τουλάχιστον το $0,00005\%$ της σχετικής αφθονίας. Το τελευταίο βήμα που πραγματοποιήθηκε στην πλατφόρμα ήταν η ταυτοποίηση των μικροοργανισμών με βάση το λογισμικό BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) του NCBI (National Center for Biotechnology Information). Το BLAST είναι ένα πρόγραμμα αναζήτησης ομοιότητας ακολουθίας που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για γρήγορη αναζήτηση μιας βάσης δεδομένων με ακολουθίες προκειμένου να πραγματοποιηθεί αντιστοίχιση (Camacho et al., 2009).

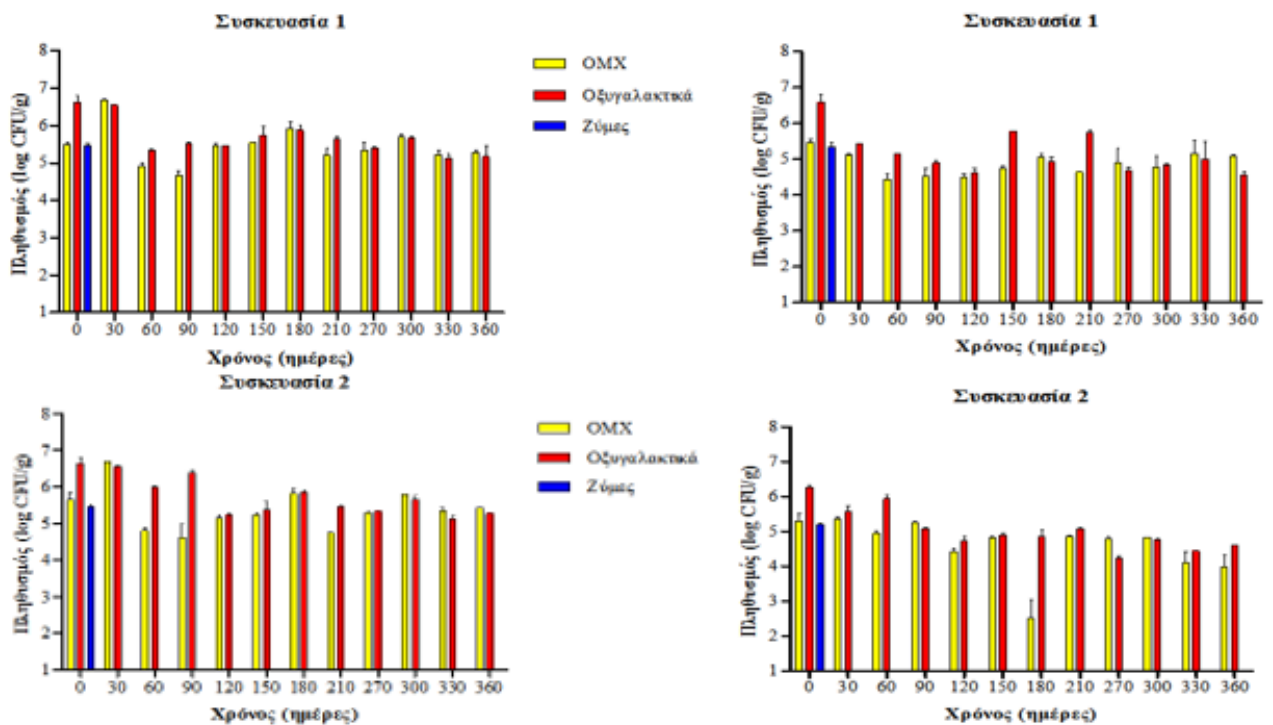
3.5.9. Στατιστική ανάλυση

Τα αρχεία που προέκυψαν από την πλατφόρμα Galaxy Migale καθώς και ορισμένοι επιπλέον πίνακες, τροποποιήθηκαν στην κατάλληλη μορφή ώστε να εισαχθούν για περαιτέρω επεξεργασία στο λογισμικό πρόγραμμα ανοικτής πρόσβασης R version 3.6.2. Στόχος του προγράμματος R είναι η ανάλυση της ποικιλομορφίας των ζυμών-μυκήτων, με την βοήθεια του πακέτου Phyloseq. Η αφθονία των OTUs κανονικοποιήθηκε χρησιμοποιώντας την διάμεσο τιμή του βάθους αλληλούχησης των δειγμάτων της ελιάς. Οι παράμετροι που εξετάστηκαν ήταν ο χρόνος (0, 06, 12 months), η συσκευασία (Container: C1, C2) και η ποικιλία (Conservolea, Halkidiki).

4. Αποτελέσματα και συζήτηση

4.1. Μικροβιολογικές αναλύσεις

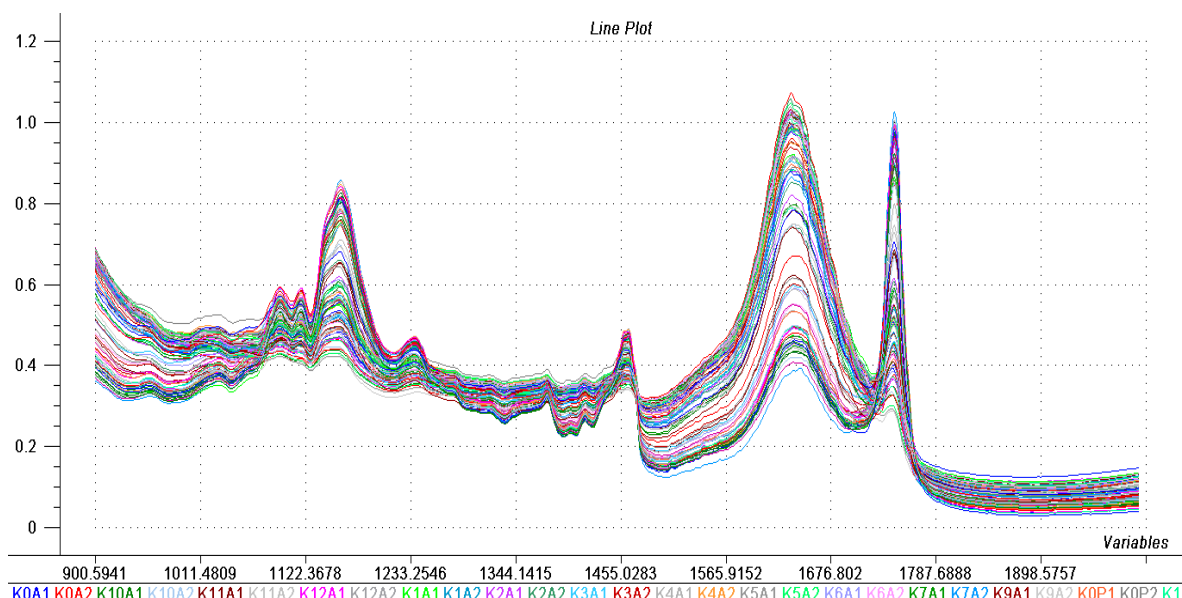
Η μικροχλωρίδα του καρπού των δύο ποικιλιών επιτραπέζιας ελιάς κατά την έναρξη της συντήρησης αποτελείτο από οξυγαλακτικά βακτήρια και ζύμες ενώ δεν απαριθμήθηκαν καθόλου εντεροβακτήρια. Είναι επίσης χαρακτηριστικό ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια απαριθμήθηκαν σε υψηλότερους πληθυσμούς σχετικά με τις ζύμες, γεγονός που οφείλεται στην οξυγαλακτική ζύμωση του καρπού πριν τη συσκευασία. Τόσο στην περίπτωση των δύο συσκευασιών, όσο και στις δύο εξεταζόμενες ποικιλίες δεν ανιχνεύτηκαν με τη μέθοδο των δεκαδικών αραιώσεων ζύμες μετά από 30 ημέρες αλλά και σε όλη τη διάρκεια της 12-μηνιαίας συντήρησης. Οι επιτραπέζιες ελιές αντιπροσωπεύουν ένα περίπλοκο οικοσύστημα όπου τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) και οι ζύμες αλληλεπιδρούν με ανταγωνιστική και σπανίως συνεργιστική δράση σε όλη τη διάρκεια της ζύμωσης (Botta & Cocolin, 2012; Tofalo et al., 2013). Συνεπώς, συνθήκες που ευνοούν την επικράτηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων, συμβάλουν σε μείωση του πληθυσμού των ζυμών. Σε προηγούμενη μελέτη (Mantzouridou & Tsimidou, 2011), αναφορικά με τη συντήρηση της ξηράλατης ελιάς της ποικιλίας Θάσου σε διαφορετικές θερμοκρασίες (4 και 20 °C) υπό αερόβιες συνθήκες και τροποποιημένη ατμόσφαιρα, παρατηρήθηκε ότι οι χαμηλές θερμοκρασίες συντήρησης είχαν αρνητική επίδραση στην ανάπτυξη των βακτηρίων, γεγονός που μπορεί να ευνοήσει την ανάπτυξη των ζυμών. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα αποτελέσματα της παραπάνω εργασίας δεν βρίσκονται σε συμφωνία με την παρούσα μελέτη, δεδομένου ότι στα δείγματα ελιάς που συντηρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου δεν απαριθμήθηκαν ζύμες μετά από 30 ημέρες συντήρησης. Επιπροσθέτως, έχει αναφερθεί ότι η χρήση τροποποιημένης ατμόσφαιρας στη συντήρηση της φυσικής πράσινης ελιάς είναι αποτελεσματική στη μείωση του ρυθμού αύξησης των ζυμών συγκριτικά με τη συσκευασία σε αερόβιες συνθήκες (Panagou et al., 2002). Κατ' αντιστοιχία, στην παρούσα εργασία η συντήρηση της ελιάς έγινε με τη χρήση αδρανούς ατμόσφαιρας (100 N₂), γεγονός που θα μπορούσε να συμβάλει στη σταδιακή μείωση του πληθυσμού των ζυμών, έτσι ώστε μετά τις 30 ημέρες συντήρησης ο πληθυσμός τους να βρίσκεται κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου των δεκαδικών αραιώσεων.



Γράφημα 4.1.1. Μεταβολή του πληθυσμού της ολικής μικροβιακής χλωρίδας (OMX), των οξυγαλακτικών βακτηρίων και των ζυμών κατά τη συντήρηση του πράσινου ελαιοκάρπου ποικιλίας Χαλκιδική (αριστερά) και Κονσερβολιά (δεξιά) σε εύκαμπτους περιέκτες με τροποποιημένη ατμόσφαιρα (100% N₂) σε θερμοκρασία δωματίου για χρονικό διάστημα 12 μηνών.

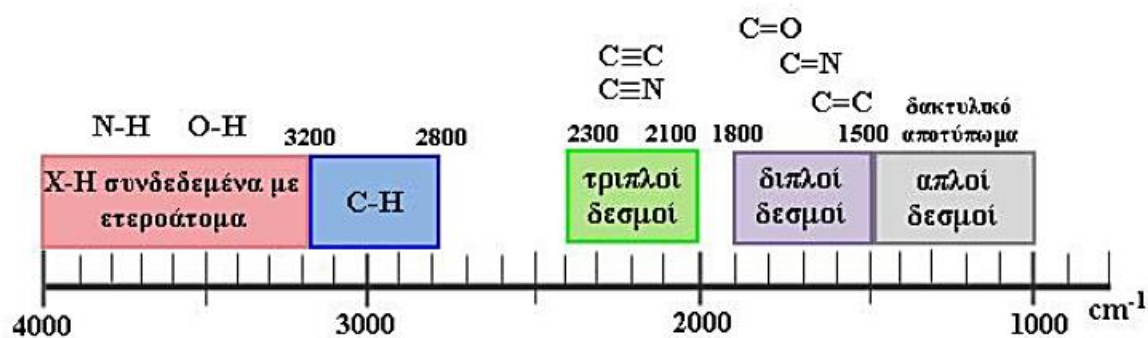
4.2. Φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR)

Το υπέρυθρο φάσμα οποιασδήποτε ένωσης είναι γνωστό ότι εκφράζει ένα μοναδικό «δακτυλικό αποτύπωμα» και αυτό το χαρακτηριστικό επιτρέπει τη χρήση της φασματοσκοπίας υπέρυθρου για την ταξινόμηση διαφορετικών δειγμάτων ή την ταυτοποίηση άγνωστων δειγμάτων (De Luca et al., 2011). Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα φασματοσκοπικά δεδομένα στο εύρος κυματαριθμών μεταξύ 2000 έως 900 cm⁻¹. Τα τυπικά φάσματα των δειγμάτων της επιτραπέζιας ελιάς σε αυτή την περιοχή παρουσιάζονται στο Γράφημα 4.2.1.



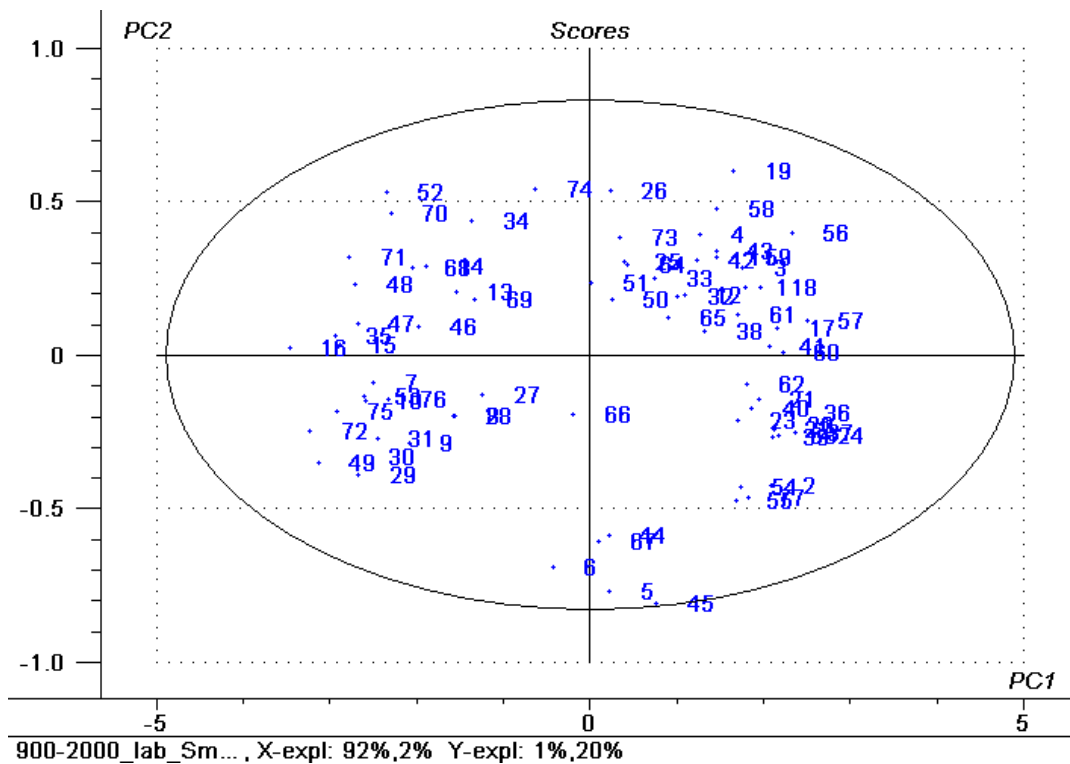
Γράφημα 4.2.1. Φάσματα FT-IR όλων των δειγμάτων στην περιοχή κυματαριθμών 2000-900 cm^{-1} .

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι περιοχές του φάσματος στην περιοχή των κυματαριθμών μεταξύ 4000 έως 3033 cm^{-1} και 2400 έως 2260 cm^{-1} δεν ελήφθησαν υπόψη στην ανάλυση των δεδομένων διότι στην περιοχή αυτή απορροφά το νερό, το οποίο δεν παρέχει χρήσιμες πληροφορίες στην εξέλιξη της συντήρησης της ελιάς, αλλά και εξαιτίας του χαμηλού λόγου σήματος προς θόρυβο (De Luca et al., 2012; Ιῆόν et al., 2003). Η περιοχή του φάσματος από 1775 έως 1000 cm^{-1} αποτελεί το εκτεταμένο εύρος των δακτυλικών αποτυπωμάτων, περιοχή του φάσματος που είναι μοναδική για κάθε ένωση, ενώ η περιοχή 1775-1680 cm^{-1} αντιστοιχεί στην απορρόφηση των οξέων, τόσο σε ελεύθερες όσο και σε εστερικές μορφές (Ιῆόν et al., 2003). Οι απορροφήσεις στους κυματαριθμούς 1711 και 1748 cm^{-1} οφείλονται σε καρβονυλικούς δεσμούς (C = O) σε ακυλογλυκερίδια και ελεύθερα λιπαρά οξέα, αντίστοιχα (Bendini et al., 2007).

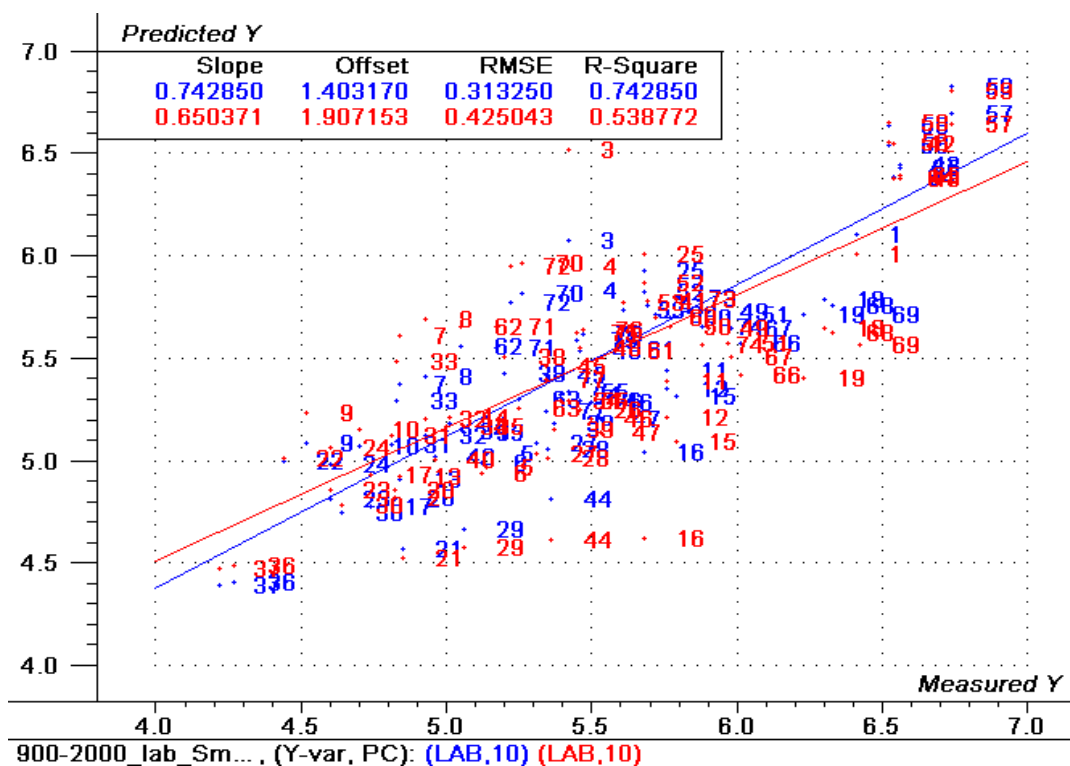


Εικόνα 4.2.1. Διαχωρισμός του IR φάσματος σε επιμέρους περιοχές, όπου εμφανίζονται οι χαρακτηριστικές ομάδες οργανικών ενώσεων. (Κουή και άλλοι, 2015)

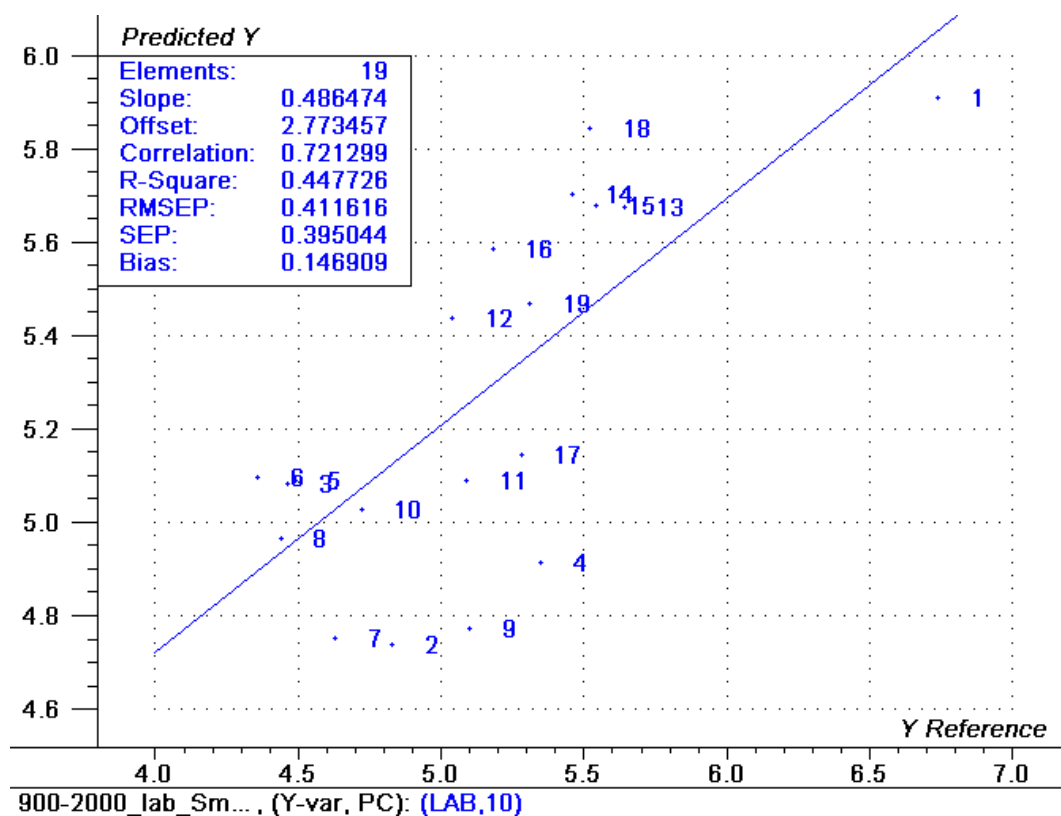
Τα φασματοσκοπικά δεδομένα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό των βιοχημικών αλλαγών που υφίσταται ένα τρόφιμο. Η σημασία της φασματοσκοπίας IR στην ταυτοποίηση μοριακών δομών προκύπτει από το υψηλό περιεχόμενο πληροφοριών ενός φάσματος υπερύθρων και τη δυνατότητα να αποδοθούν συγκεκριμένες ζώνες απορρόφησης σε λειτουργικές ομάδες (Bendini et al., 2007). Η παλινδρόμηση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-R) χρησιμοποιείται συχνά στη φασματοσκοπική ανάλυση για την ανάπτυξη μοντέλων προκειμένου να εκτιμηθεί η ποσότητα διαφόρων ενώσεων σε ένα χημικό δείγμα. Στην παρούσα μελέτη αναπτύχθηκαν διαφορετικά PLS-R μοντέλα χρησιμοποιώντας τέσσερις περιοχές κυματαριθμών ($3400-800\text{ cm}^{-1}$, $3000-800\text{ cm}^{-1}$, $3000-2400\text{ cm}^{-1}$ & $2300-800\text{ cm}^{-1}$ και $2000-900\text{ cm}^{-1}$). Η προ-επεξεργασία των φασμάτων περιελάμβανε διαφορετικές τεχνικές όπως τον μετασχηματισμό πρώτης και δεύτερης παραγώγου, εξομάλυνση (smoothing), καθώς επίσης και μετασχηματισμό SNV (standard normal variate). Το καλύτερο αποτέλεσμα για την εκτίμηση του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB) επιτεύχθηκε κατόπιν προεπεξεργασίας των φασμάτων με εξομάλυνση και περεταίρω επεξεργασία με το μετασχηματισμό Savitzky-Golay, με μηδενική πολυωνυμική σειρά και 11 σημεία εξομάλυνσης. Στο Γράφημα 4.2.2 παρουσιάζεται το διάγραμμα διασποράς (plot of scores) των δειγμάτων της ελιάς στις δύο πρώτες κύριες συνιστώσες (PC1 και PC2) μαζί με το 95% διάστημα εμπιστοσύνης. Παρατηρούμε ότι όλα τα σημεία ευρίσκονται εντός του διαστήματος εμπιστοσύνης και δεν παρατηρούνται έκτοπα σημεία (outliers) τα οποία θα έπρεπε να αφαιρεθούν για να μην επηρεάσουν την επίδοση του μοντέλου.



Γράφημα 4.2.2. Διάγραμμα διασποράς (plot of scores) των δειγμάτων της ελιάς στις δύο πρώτες κύριες συνιστώσες. Η έλλειψη οριοθετεί το 95% διάστημα εμπιστοσύνης.



Γράφημα 4.2.3. Διάγραμμα συσχέτισης των προβλεπόμενων με τις παρατηρούμενες τιμές για τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) κατά την ανάπτυξη (calibration, μπλε γραμμή) και τη δασταυρούμενη επικύρωση (cross validation, κόκκινη γραμμή) του μοντέλου PLS-R.

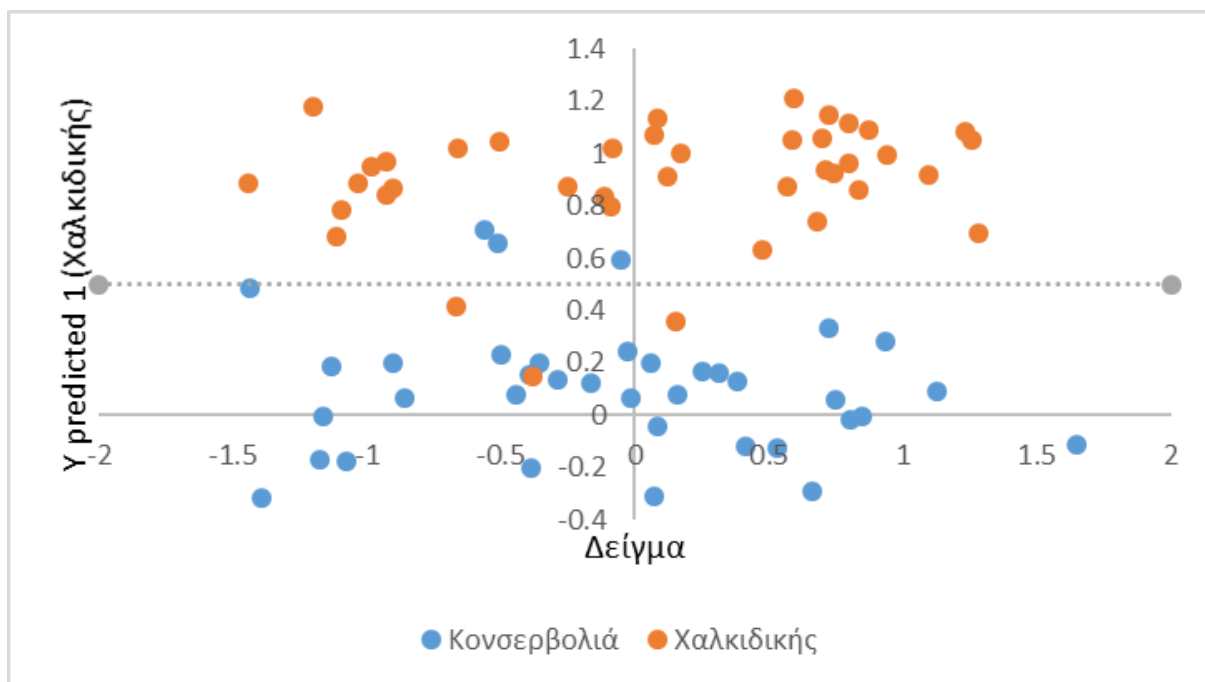


Γράφημα 4.2.4. Διάγραμμα συσχέτισης των προβλεπόμενων με τις παρατηρούμενες τιμές για τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) κατά την πρόβλεψη (prediction) του μοντέλου PLS-R.

Για την αξιολόγηση της επίδοσης του μοντέλου, χρησιμοποιήθηκε η ρίζα του μέσου τετραγωνικού σφάλματος κατά την ανάπτυξη (RMSEC), διασταυρούμενη επικύρωση (RMSECV) και πρόβλεψη (RMSEP) καθώς και οι αντίστοιχοι συντελεστές προσδιορισμού (R^2c , R^2cv και R^2p). Με βάση αυτούς τους δείκτες κρίθηκε ότι το μοντέλο παρουσίασε ικανοποιητική επίδοση στην εκτίμηση του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων με τιμές $RMSEC=0,313$, $RMSECV=0,425$ και $RMSEP=0,412 \log CFU/g$ και τιμές $R^2c=0,743$, $R^2cv=0,539$ και $R^2p=0,448$.

Μία ακόμα ευρέως χρησιμοποιούμενη πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση είναι η διακριτική ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA) στοχεύοντας στο διαχωρισμό δειγμάτων σε επιμέρους κλάσεις. Για την ανάπτυξη του μοντέλου PLS-DA πραγματοποιήθηκαν αντίστοιχες δοκιμές αναφορικά με το εύρος των κυματαριθμών και την προεπεξεργασία, όπως και με το μοντέλο PLS-R. Επιδιώχθηκε διαχωρισμός των δειγμάτων της ελιάς σε δύο κλάσεις, αναφορικά με την ποικιλία και τη συσκευασία των δειγμάτων. Το καλύτερο αποτέλεσμα για το διαχωρισμό των δειγμάτων με βάση την ποικιλία (Κλάση 0:

Κονσερβολιά, Κλάση 1: Χαλκιδική) επιτεύχθηκε χωρίς προεπεξεργασία των φασμάτων.



Γράφημα 4.2.5. Διάγραμμα ταξινόμησης με βάση το μοντέλο PLS-DA για την πρόβλεψη της ποικιλίας Χαλκιδική (●) σε σχέση με την ποικιλία Κονσερβολιά (●). Η διακεκομμένη γραμμή αντιστοιχεί στο όριο ταξινόμησης μεταξύ των δύο ποικιλιών.

Πίνακας 4.2.1. Πίνακας ταξινόμησης των παρατηρήσεων του μοντέλου PLS-DA για την ταξινόμηση των δειγμάτων της ελιάς με βάση την ποικιλία.

Ανάπτυξη του μοντέλου		
	Προβλεπόμενη ποικιλία	
Παρατηρούμενη ποικιλία	<i>Κονσερβολιά</i>	<i>Χαλκιδική</i>
<i>Κονσερβολιά</i>	34	3
<i>Χαλκιδική</i>	3	37
Ακρίβεια (Accuracy, %) = 92,2%		
Επικύρωση του μοντέλου		
	Προβλεπόμενη ποικιλία	
Παρατηρούμενη ποικιλία	<i>Κονσερβολιά</i>	<i>Χαλκιδική</i>
<i>Κονσερβολιά</i>	10	1
<i>Χαλκιδική</i>	0	8
Ακρίβεια (Accuracy, %) = 94,7%		

Πίνακας 4.2.2. Αξιολόγηση της επίδοσης του μοντέλου PLS-DA με βάση τους δείκτες Ακρίβειας (συνολικού ποσοστού ορθών προβλέψεων) (Accuracy, %) και Ευαισθησίας (Sensitivity, Se, %).

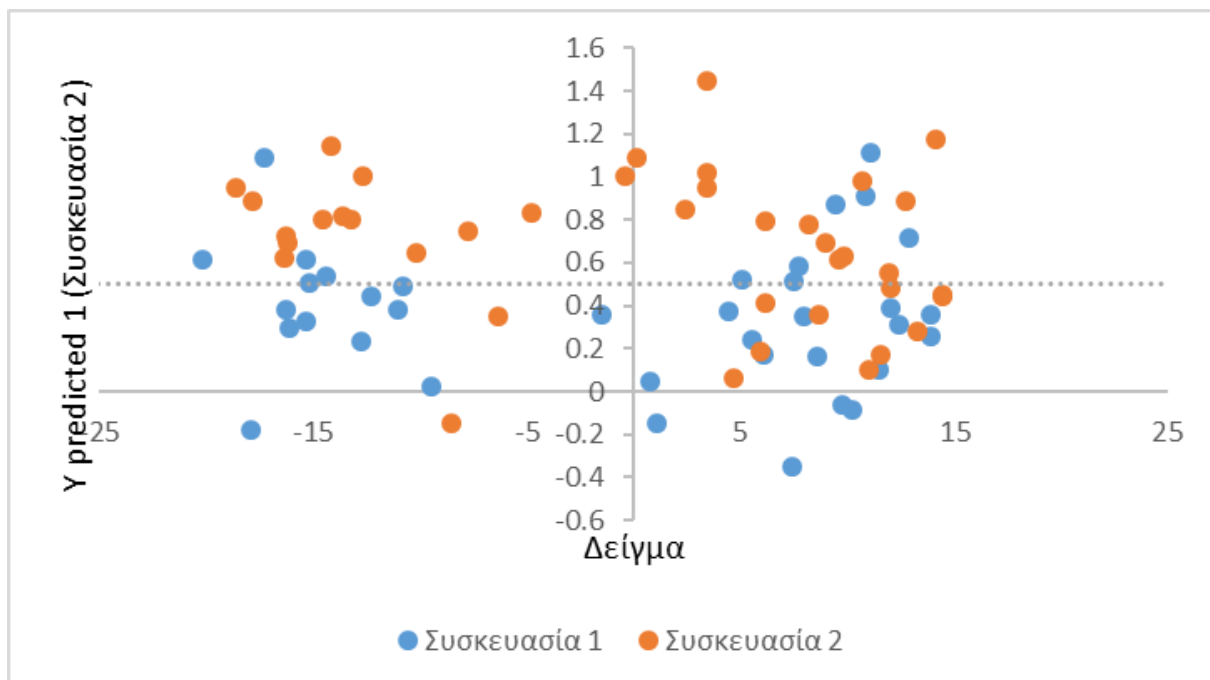
		Χαλκιδική		Κονσερβολιά	
	Τύπος υπολογισμού	Διασταυρούμενη επικύρωση	Επικύρωση	Διασταυρούμενη επικύρωση	Επικύρωση
Ακρίβεια (%)	$\frac{tp + tn}{tp + tn + fp + fn}$	0,922	0,947	0,922	0,947
Ευαισθησία (%)	$\frac{tp}{tp + fn}$	0,925	1,000	0,919	0,909

tp: true positive (αληθώς θετικά), tn: true negative (αληθώς αρνητικά), fp: false positive (ψευδώς θετικά), fn: false negative (ψευδώς αρνητικά)

Η επίδοση του μοντέλου PLS-DA στην ταξινόμηση των δειγμάτων της ελιάς με βάση την ποικιλία παρουσιάζεται στον Πίνακα 4.2.2. Παρατηρούμε ότι το συνολικό ποσοστό σωστών προβλέψεων (Accuracy, %) για τις δύο ποικιλίες ανήλθε σε 92,2% και 94,7% κατά την ανάπτυξη και επικύρωση του μοντέλου αντίστοιχα. Ειδικότερα, κατά την ανάπτυξη του μοντέλου PLS-DA, η ευαισθησία (Sensitivity, Se, %) για τα δείγματα που ανήκαν στις ποικιλίες Κονσερβολιά και Χαλκιδική ήταν 91,9% και 92,5% αντίστοιχα. Στην περίπτωση της επικύρωσης του μοντέλου τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν 90,9% και 100% για τις ποικιλίες Κονσερβολιά και Χαλκιδική.

Αντίστοιχα ποσοστά ταξινόμησης, με ακρίβεια που έφτασε το 92% παρουσίασαν και οι De Luca et al. (2012) στη μελέτη τους για την ταξινόμηση μαροκινών ποικιλιών ελιάς με τη μέθοδο της γραμμικής Διακριτικής Ανάλυσης (Linear Discriminant Analysis, LDA) που εφαρμόστηκε σε φάσματα ATR-FTIR. Σε νεότερη εργασία (Vergara-Barberán et al., 2015) φασματοσκοπικά δεδομένα FT-IR αναλύθηκαν με τη μέθοδο LDA με σκοπό τον διαχωρισμό 17 ποικιλιών ελιάς από την Ισπανία, με ποσοστό επιτυχίας που υπερέβη το 95%. Εκτός από την ελιά, αντίστοιχες έρευνες έχουν διεξαχθεί και σε έλαια. Μια σειρά ελαίων από το Μαρόκο διαχωρίστηκαν σε τέσσερις κατηγορίες με ανάλυση κατά συστάδες (cluster analysis) και εφαρμογή μοντέλου PLS-DA. Η ταξινόμηση χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς για να προβλέψει τη γεωγραφική προέλευση δειγμάτων ελαιολάδου (De Luca et al., 2011). Ως εκ τούτου, η χρήση φασματοσκοπίας FT-IR σε συνδυασμό με χημειομετρικές μεθόδους θα μπορούσε να αποτελέσει ένα αξιόπιστο, χαμηλού κόστους και γρήγορο εναλλακτικό εργαλείο για ταξινόμηση και πρόβλεψη, χωρίς να απαιτείται η χρήση παραδοσιακών χημικών αναλύσεων για διάκριση μεταξύ διαφορετικών κατηγοριών (Hirri et al., 2016).

Όσον αφορά στον διαχωρισμό των δειγμάτων με βάση τη συσκευασία (Κλάση 0: Συσκευασία 1, Κλάση 1: Συσκευασία 2), το καλύτερο αποτέλεσμα επιτεύχθηκε κατόπιν προ-επεξεργασίας των φασμάτων με το μετασχηματισμό SNV.



Γράφημα 4.2.6. Διάγραμμα ταξινόμησης με βάση το μοντέλο PLS-DA για την πρόβλεψη της Συσκευασίας 2 (●) σε σχέση με τη Συσκευασία 1 (●). Η διακεκομμένη γραμμή αντιστοιχεί στο όριο ταξινόμησης μεταξύ των δύο συσκευασιών.

Πίνακας 4.2.3. Πίνακας ταξινόμησης των παρατηρήσεων του μοντέλου PLS-DA για την ταξινόμηση των δειγμάτων της ελιάς με βάση τη συσκευασία.

Ανάπτυξη του μοντέλου		
	Προβλεπόμενη συσκευασία	
Παρατηρούμενη συσκευασία	<i>Συσκευασία 1</i>	<i>Συσκευασία 2</i>
<i>Συσκευασία 1</i>	25	12
<i>Συσκευασία 2</i>	12	28
Ακρίβεια (Accuracy, %) = 68,8%		
Επικύρωση του μοντέλου		
	Προβλεπόμενη συσκευασία	
Παρατηρούμενη συσκευασία	<i>Συσκευασία 1</i>	<i>Συσκευασία 2</i>
<i>Συσκευασία 1</i>	7	4
<i>Συσκευασία 2</i>	4	4
Ακρίβεια (Accuracy, %) = 57,9%		

Πίνακας 4.2.4. Αξιολόγηση της επίδοσης του μοντέλου PLS-DA με βάση τους δείκτες Ακρίβειας (συνολικού ποσοστού ορθών προβλέψεων) (Accuracy, %) και Ευαισθησίας (Sensitivity, Se, %).

		Συσκευασία 2		Συσκευασία 1	
	Τύπος υπολογισμού	Διασταυρούμενη επικύρωση	Επικύρωση	Διασταυρούμενη επικύρωση	Επικύρωση
Ακρίβεια (%)	$\frac{tp + tn}{tp + tn + fp + fn}$	0,688	0,579	0,688	0,579
Ευαισθησία (%)	$\frac{tp}{tp + fn}$	0,700	0,500	0,676	0,636

tp: true positive (αληθώς θετικά), tn: true negative (αληθώς αρνητικά), fp: false positive (ψευδώς θετικά), fn: false negative (ψευδώς αρνητικά)

Η επίδοση του μοντέλου PLS-DA στην ταξινόμηση των δειγμάτων της ελιάς με βάση τη συσκευασία παρουσιάζεται στον Πίνακα 4.2.4. Παρατηρούμε ότι το ποσοστό σωστών προβλέψεων (Accuracy, %) για τις δύο συσκευασίες ανήλθε σε 68,8% και 57,9% κατά την ανάπτυξη και επικύρωση του μοντέλου αντίστοιχα. Ειδικότερα, κατά την ανάπτυξη του μοντέλου PLS-DA οι ορθές προβλέψεις (Sensitivity, Se, %) για τα δείγματα που συσκευάστηκαν με δύο διαφορετικούς τύπους πολυστρωματικής μεμβράνης, τη Συσκευασία 1 και τη Συσκευασία 2, ήταν 67,6% και 70% αντίστοιχα. Στην περίπτωση της επικύρωσης του μοντέλου τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν 63,6% και 50% για τη Συσκευασία 1 και τη Συσκευασία 2.

4.3. Μοριακές Αναλύσεις

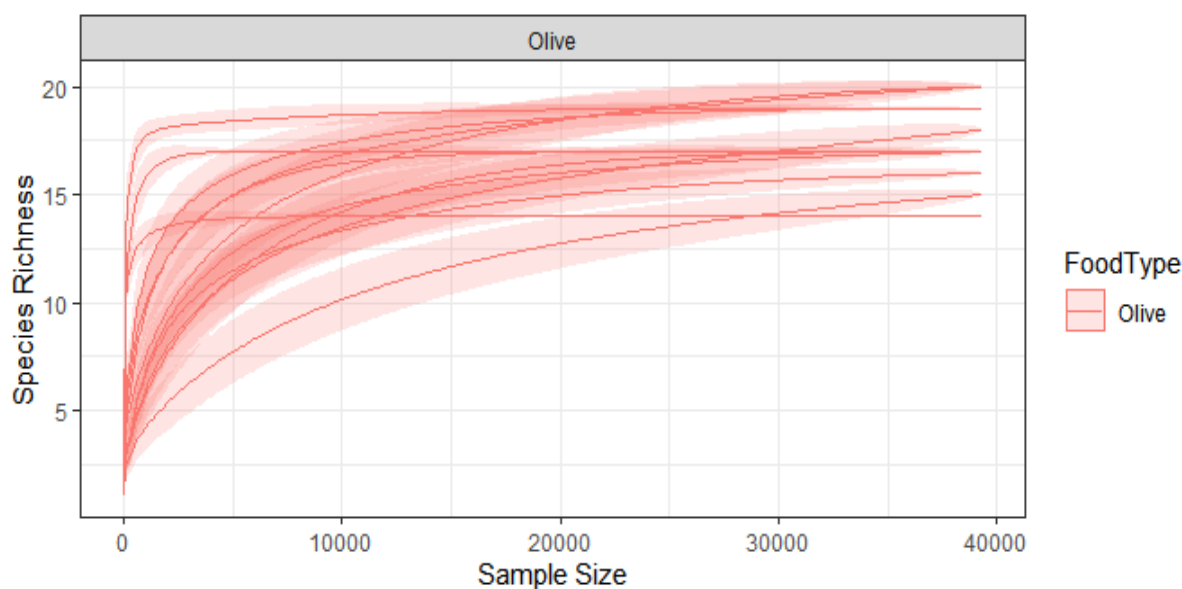
Λαμβάνοντας υπόψη τα δεδομένα των μικροβιολογικών αναλύσεων προκύπτει ότι κατά την έναρξη της συντήρησης των δειγμάτων το μικροβιολογικό οικοσύστημα των επιτραπέζιων ελιών απαρτιζόταν από οξυγαλακτικά βακτήρια και ζύμες. Ωστόσο, στις επόμενες δειγματοληψίες που διενεργήθηκαν σε χρονικό διάστημα 30 ημερών, δεν απαριθμήθηκαν ζύμες σε κανένα από τα δείγματα που αναλύθηκαν. Σύμφωνα με τους (Fadiji & Babalola, 2020), ως αποτέλεσμα των δυσκολιών καλλιέργειας, οι μύκητες μπορεί να είναι πολύ δύσκολο να βρεθούν και τις περισσότερες φορές παραλείπονται σε μελέτες που περιλαμβάνουν μεταγενετική ανάλυση. Ωστόσο, έχουν αναπτυχθεί μοριακές μέθοδοι ανεξάρτητες από την καλλιέργεια για να παρακάμψουν τους περιορισμούς της συμβατικής καλλιέργειας για ανάλυση μικροβιακών κοινοτήτων (Temmerman et al., 2004). Λαμβάνοντας υπόψη, λοιπόν, τη σημασία των ζυμών σε πολλές βιολογικές διαδικασίες και την ανάγκη κατανόησης του ρόλου τους, πολλοί

ερευνητές έχουν στραφεί σε αυτές τις μεθόδους. Η ενίσχυση της περιοχής (internal transcribed spacer 1) ITS1 είναι μια αποτελεσματική μέθοδος για τον χαρακτηρισμό και την ταυτοποίηση των μυκήτων από περιβάλλοντα όπως το έδαφος, το φυτό, το νερό, μεταξύ άλλων (Schoch et al., 2012).

Στις ανεξάρτητες από την καλλιέργεια μοριακές τεχνικές, το DNA ή το RNA απομονώνεται/εκχυλίζεται άμεσα και αναλύεται απευθείας από το τρόφιμο. Η μελέτη του γενετικού υλικού επιτρέπει την ευκολότερη κατανόηση της πολυπλοκότητας και της εξέλιξης της μικροβιακής οικολογίας κατά τη ζύμωση των τροφίμων, καθώς ανιχνεύουν όλους τους πληθυσμούς, ακόμη και τους μη καλλιεργούμενους (VBNC). Μπορούν να εντοπιστούν ακόμα και πληθυσμοί που βρίσκονται σε καταστάσεις στρες ή τραυματισμού (Botta & Cocolin, 2012). Οι (Tofalo et al., 2013) αναφέρουν ότι ο πληθυσμός των ζυμών της ελιάς είναι πολύ ετερογενής και επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως το pH, τα θρεπτικά συστατικά, τη συγκέντρωση οξυγόνου και αλάτων, καθώς και τον τύπο της διαδικασίας ζύμωσης και τις αλληλεπιδράσεις με άλλους μικροοργανισμούς όπως τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB). Μέχρι τώρα, βέβαια, οι έρευνες έχουν εστιάσει στο ρόλο και τη διαδοχική αλλαγή των ζυμομυκήτων κατά τη ζύμωση επιτραπέζιας ελιάς, ενώ οι αποκρίσεις τους στη συσκευασία επιτραπέζιας ελιάς δεν έχουν λάβει το ίδιο επίπεδο προσοχής, ειδικά όταν χρησιμοποιούνται νέες μέθοδοι συσκευασίας από τη βιομηχανία, όπως συσκευασία σε σακούλες με / χωρίς την παρουσία τροποποιημένων ατμοσφαιρών. (Doulgeraki et al., 2012).

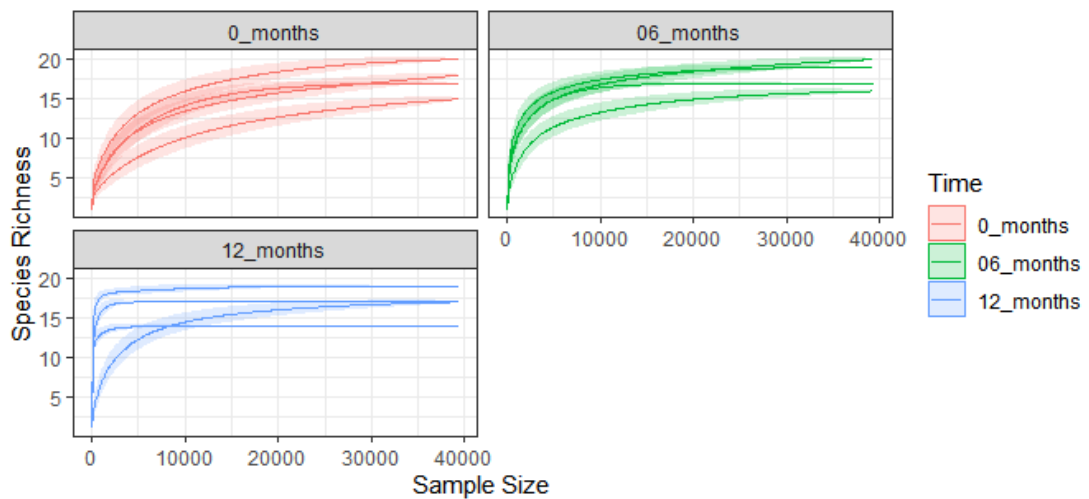
Στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκαν μοριακές τεχνικές ανεξάρτητες από την καλλιέργεια κατά τη συντήρηση των επιτραπέζιων ποικιλιών Κονσερβολιά και Χαλκιδική συσκευασμένων σε δύο διαφορετικούς τύπους εύκαμπτων πολυστρωματικών περιεκτών, τη Συσκευασία 1 (C1) και τη Συσκευασία 2 (C2), χωρίς άλμη με εφαρμογή τροποποιημένης ατμόσφαιρας. Κατόπιν επεξεργασίας των δεδομένων με το στατιστικό πρόγραμμα R version 3.6.2 προέκυψαν τα διαγράμματα που παρουσιάζονται παρακάτω, μέσω των οποίων μπορούμε να διαπιστώσουμε πόσο πλούσια είναι τα δείγματα και ποια είδη μικροοργανισμών εμφανίζονται σε κάθε δείγμα. Ακόμη, δημιουργούνται δένδρογράμματα για φυλογενετική ταξινόμηση των ζυμών-μυκήτων καθώς επίσης και γραφήματα που συγκρίνοντας τις επί μέρους παραμέτρους, δείχνουν εάν τα δείγματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές και αν υπάρχει κάποια κατανομή ώστε να μπορούν να διαχωριστούν τα δείγματα με βάση μία από τις παραμέτρους.

Αναφορικά με την ταυτοποίηση των ζυμών-μυκήτων στο οικοσύστημα της πράσινης ελιάς με βάση τη γενετική περιοχή ITS2, στα 12 δείγματα ελαιόκαρπου ανιχνεύθηκαν συνολικά 35 OTUs που αντιπροσωπεύουν 2 φύλα (Ascomycota και Basidiomycota). Στην υψηλότερη ταξινομική ανάλυση, δηλαδή σε επίπεδο ειδών εντοπίστηκαν 32 OTUs. Σύμφωνα με την καμπύλη αραιοσύστασης (rarefaction curve) που απεικονίζεται στο Γράφημα 4.3.1, η οποία αντιπροσωπεύει τον αριθμό των ειδών των ζυμών-μυκήτων σε συνάρτηση με το μέγεθος του δείγματος, το βάθος της αλληλούχησης ήταν επαρκές για όλα τα δείγματα. Αυτό συμπεραίνεται καθώς οι καμπύλες όλων των δειγμάτων φτάνουν σε ένα μέγιστο σημείο και στη συνέχεια σταθεροποιούνται, συνεπώς έχει αλληλουχηθεί επιτυχώς το μεγαλύτερο μέρος της μικροβιακής κοινότητας των ζυμών-μυκήτων.



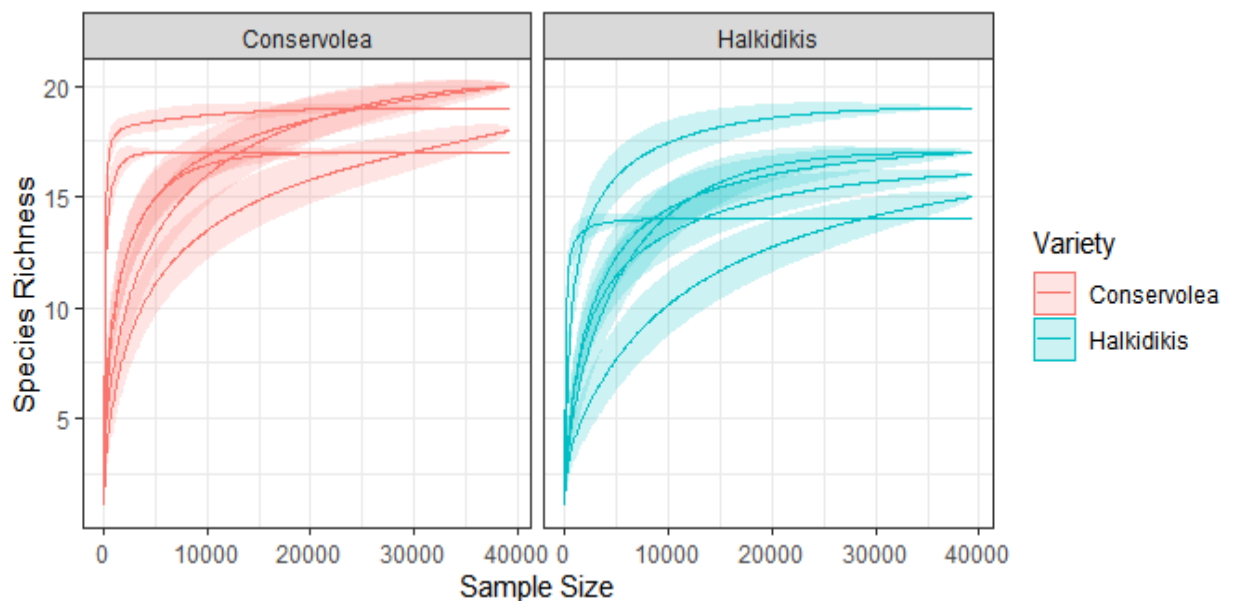
Γράφημα 4.3.1. Καμπύλη αραιοσύστασης ζυμών-μυκήτων στο οικοσύστημα της πράσινης ελιάς στοχεύοντας στη γενετική περιοχή ITS2. Ο άξονας x αντιπροσωπεύει το βάθος αλληλούχησης σε αριθμό αναγνώσεων ενώ ο άξονας y αντιπροσωπεύει την εκτίμηση της αφθονίας των ειδών που εντοπίστηκαν.

Παραθέτοντας τις επί μέρους καμπύλες αραιοσύστασης διαχωρισμένες σύμφωνα με το χρόνο συντήρησης των δειγμάτων (Γράφημα 4.3.2.), διακρίνονται κάποιες αρχικές διαφορές στην αφθονία, δηλαδή τον αριθμό των ειδών που έχει η κάθε ομάδα και τα δείγματα αυτής. Η αφθονία είναι υψηλότερη για τα δείγματα του τέλους (12 μήνες) σε σύγκριση με τη μέση (6 μήνες) και την αρχή (0 μήνες) της συντήρησης.



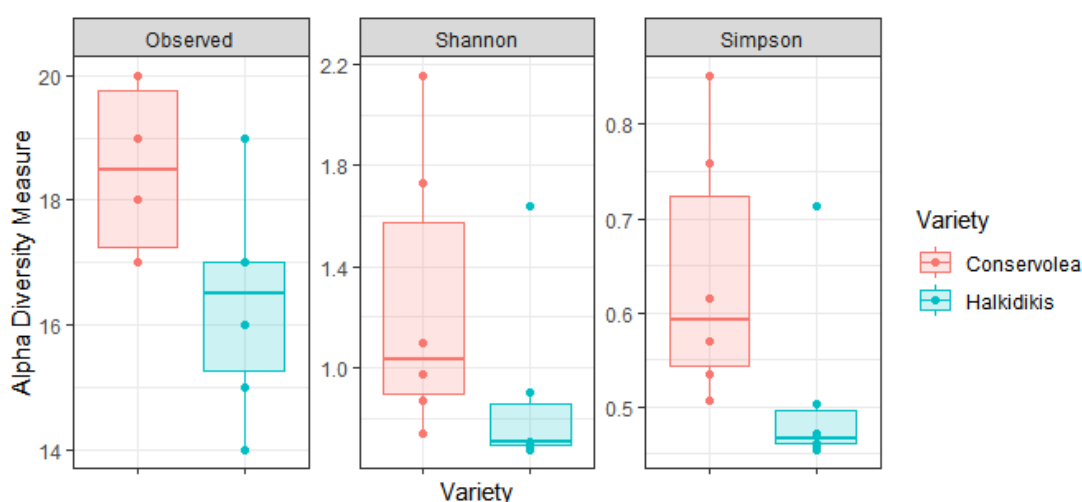
Γράφημα 4.3.2. Καμπύλες αραιοσύστασης ζυμών-μυκήτων στο οικοσύστημα της πράσινης ελιάς κατά την αρχή = 0 μήνες, τη μέση = 6 μήνες και το τέλος = 12 μήνες της συντήρησης, στοχεύοντας στη γενετική περιοχή ITS2.

Επίσης παρουσιάζονται παρακάτω (Γράφημα 4.3.3.) οι καμπύλες αραιοσύστασης με δύο διαφορετικές ομαδοποιήσεις των δειγμάτων με βάση την ποικιλία τους. Συγκρίνοντας τις διαφορετικές ομάδες παρατηρείται υψηλότερη αφθονία στα περισσότερα δείγματα της ποικιλίας Κονσερβολιά σε σύγκριση με τα δείγματα της ποικιλίας Χαλκιδική.



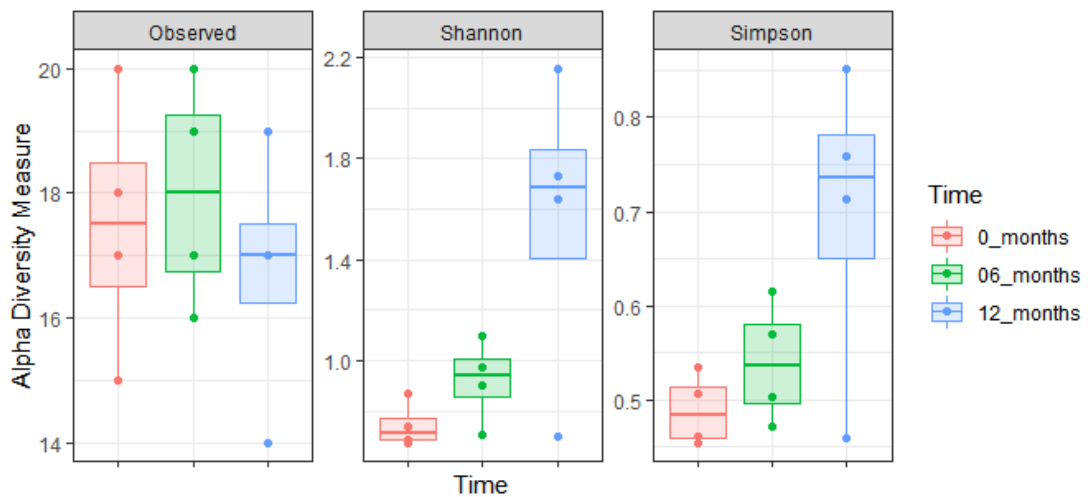
Γράφημα 4.3.3. Καμπύλες αραιοσύστασης ζυμών-μυκήτων στο οικοσύστημα της πράσινης ελιάς των ποικιλιών Κονσερβολιά και Χαλκιδικής, στοχεύοντας στη γενετική περιοχή ITS2.

Μετά τη συγχώνευση των OTU σε επίπεδο είδους, η αφθονία (richness) και η ποικιλομορφία (diversity) των μυκήτων παρουσιάζονται στο Γράφημα 4.3.4 για τη διαφορετική ποικιλία και το Γράφημα 4.3.5 για το διαφορετικό χρόνο συντήρησης. Η επίδραση της διαφορετικής συσκευασίας των δειγμάτων δεν είναι στατιστικά σημαντική στη μικροβιακή κοινότητα. Η αφθονία OTU (Observed) ήταν υψηλότερη στην ποικιλία Κονσερβολιά συγκριτικά με την ποικιλία Χαλκιδικής. Τα αποτελέσματα που προέρχονται από τους δείκτες Shannon και Simpson δεν είναι στατιστικά σημαντικά. Κατά συνέπεια, δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές ως προς την ομοιομορφία κατανομής του δείγματος (evenness).



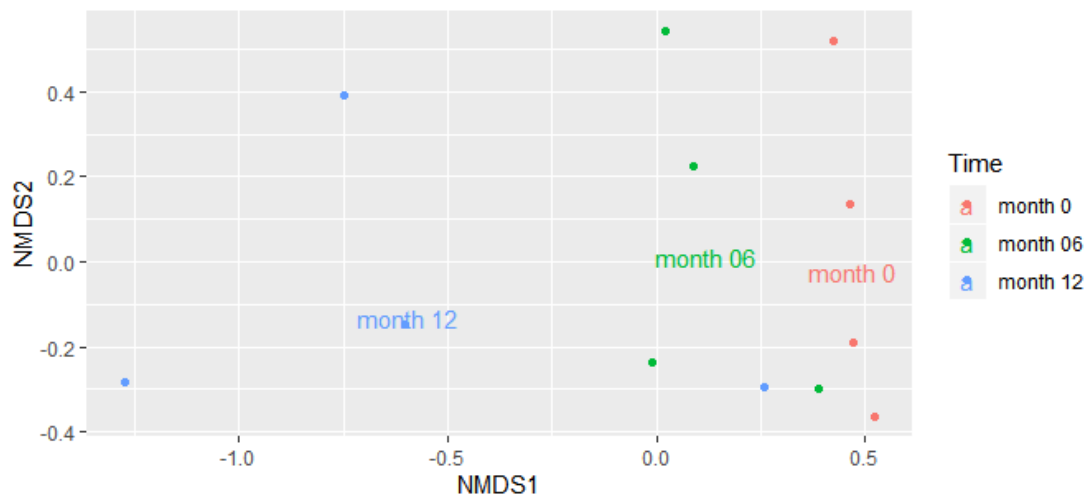
Γράφημα 4.3.4. Box-plots των δεικτών alpha diversity που ονομάζονται Observed, Shannon και Simpson για τις κοινότητες των ζυμών-μυκήτων στις πράσινες ελιές. Τα δείγματα χρωματίζονται σύμφωνα με την ποικιλία, δηλαδή ροζ για την Κονσεβολιά και γαλάζιο για την Χαλκιδικής.

Όσον αφορά στο χρόνο συντήρησης, η αξιολόγηση των δειγμάτων πραγματοποιείται σύμφωνα με το δείκτη Shannon όπου οι διαφορές των δειγμάτων αξιολογούνται ως στατιστικά σημαντικές. Η ποικιλομορφία ήταν υψηλότερη στο τέλος της συντήρησης (12 μήνες), βαίνοντας μειούμενη προς τη μέση (6 μήνες) και την αρχή (0 μήνες).



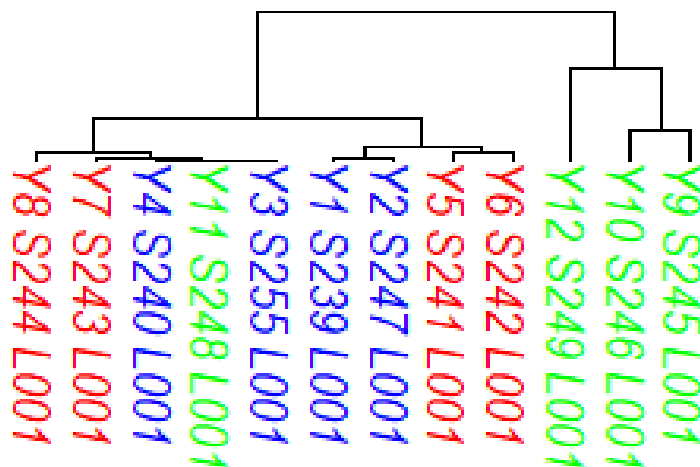
Γράφημα 4.3.5. Box-plots των δεικτών alpha diversity που ονομάζονται Observed, Shannon και Simpson για τις κοινότητες των ζυμών-μυκήτων στις πράσινες ελιές. Τα δείγματα χρωματίζονται σύμφωνα με το χρόνο συντήρησης, δηλαδή ροζ για την αρχή (0 μήνες), πράσινο για τα μέσα (6 μήνες) και γαλάζιο για το τέλος (12 μήνες).

Πραγματοποιήσαμε αναλύσεις κύριων συντεταγμένων (PCoAs) και ιεραρχικής ομαδοποίησης για να συγκρίνουμε στατιστικά την ποικιλομορφία των ζυμών-μυκήτων (φυλογενετικά και ποσοτικά-αφθονία) στα δείγματα διαφορετικών ποικιλιών, συσκευασιών και χρόνου συντήρησης. Οι κοινότητες των διαφορετικών ποικιλιών και συσκευασιών παρουσιάστηκαν συγκεντρωμένες στο επίπεδο του γραφήματος. Ωστόσο, υπήρχε μια διακριτή ομαδοποίηση δειγμάτων των διαφορετικών χρόνων συντήρησης, που παρουσιάζονται στα Γραφήματα 4.3.6 και 4.3.7. Καθώς οι αποστάσεις Bray είναι ευαίσθητες φυλογενετικά, παρατηρούμε ότι η φυλογενετική ποικιλία των δειγμάτων που προέρχονται από την αρχή διαφέρει από εκείνη των δειγμάτων που προέρχονται από τη μέση και το τέλος της συντήρησης.



Γράφημα 4.3.6. Ανάλυση κύριων συντεταγμένων (PCoAs) βασισμένη στις αποστάσεις Bray μεταξύ των κοινοτήτων των διαφορετικών χρόνων συντήρησης. Όλα τα OTU μεταξύ των κοινοτήτων ταυτοποιήθηκαν σε επίπεδο είδους.

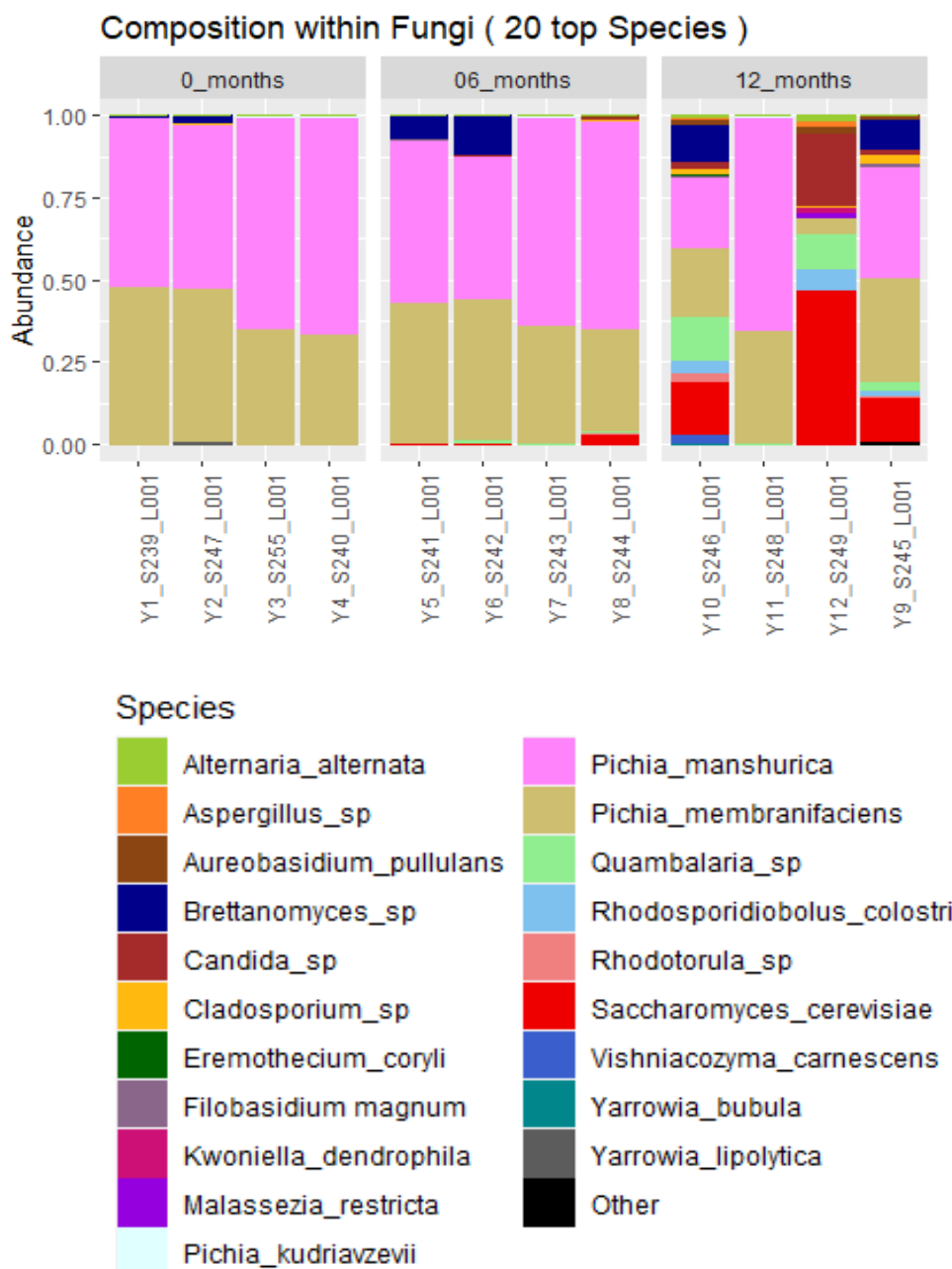
Bray, ward



Γράφημα 4.3.7. Ιεραρχική ομαδοποίηση βασισμένη στις αποστάσεις Bray μεταξύ των κοινοτήτων των διαφορετικών χρόνων συντήρησης (μπλε = 0 μήνες, κόκκινο = 6 μήνες, πράσινο = 12 μήνες). Όλα τα OTU μεταξύ των κοινοτήτων ταυτοποιήθηκαν σε επίπεδο είδους.

Ακολουθώς, παρουσιάζεται το Γράφημα 4.3.8 όπου απεικονίζεται η σύνθεση του πληθυσμού των ζυμών-μυκήτων σε επίπεδο είδους σύμφωνα με το χρόνο συντήρησης. Είναι προφανές ότι τα δείγματα του μήνα 0 έχουν διαφορετική μικροβιακή

σύνθεση από τα δείγματα του μήνα 6 και 12. Ωστόσο, η σύνθεση των δειγμάτων στους μήνες 0 και 6 είναι παρόμοια, καθώς και στις δύο περιπτώσεις, οι ζυμομύκητες που ήταν σε μεγαλύτερη αφθονία ανήκουν στην οικογένεια *Pichiaceae*. Όπως φαίνεται στο γράφημα σε όλα τα δείγματα της αρχής και της μέσης της συντήρησης υπερισχύουν τα είδη των ζυμών *Pichia membranifaciens* και *Pichia manshurica*.



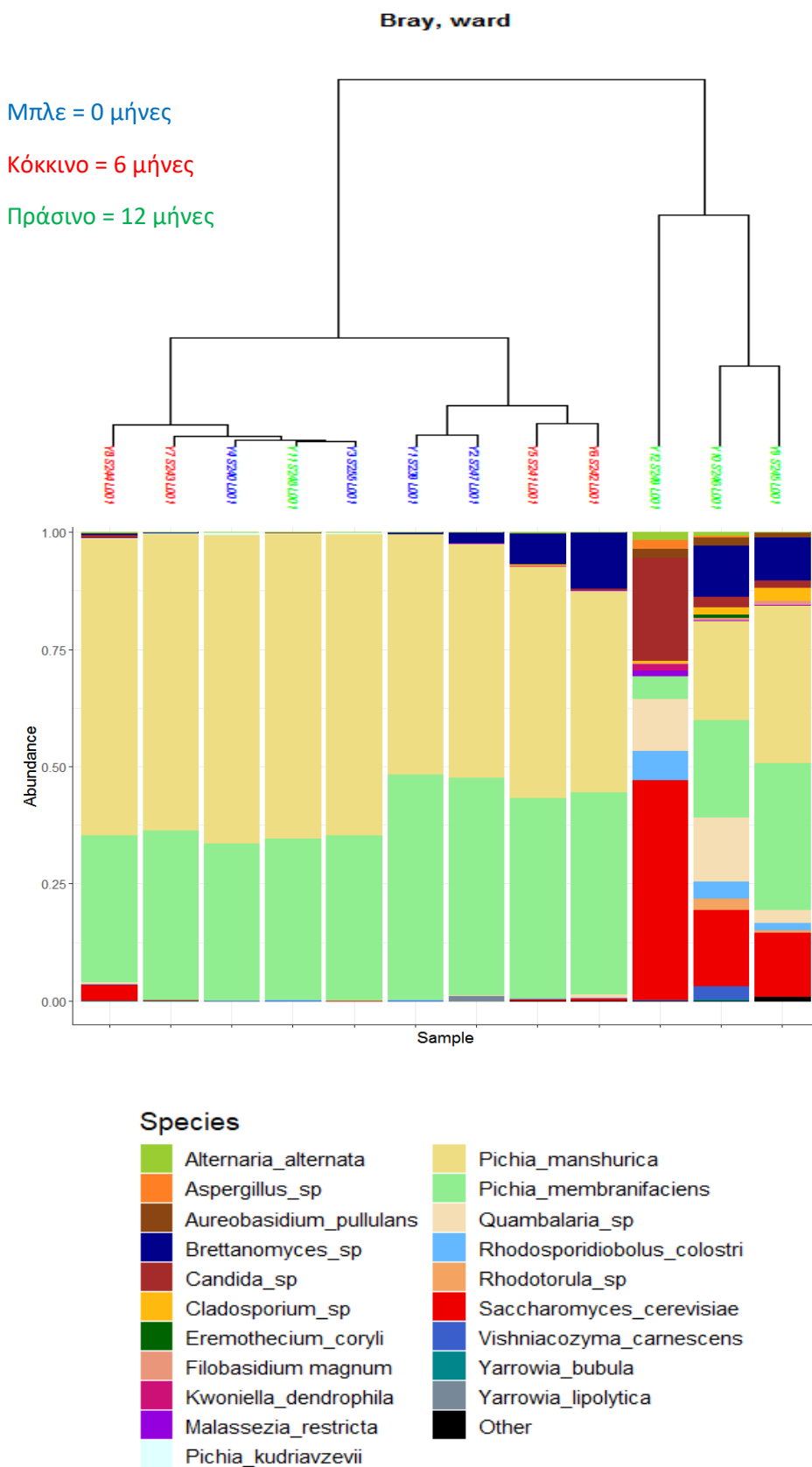
Γράφημα 4.3.8. Γραφική απεικόνιση της σύνθεσης της σχετικής αφθονίας των OTU των ζυμών-μυκήτων σε επίπεδο είδους σύμφωνα με το χρόνο συντήρησης (0 μήνες: αρχή συντήρησης, 6 μήνες: μέσο συντήρησης, 12 μήνες: τέλος συντήρησης).

Η αρχή της συντήρησης ταυτίζεται με το χρόνο που συσκευάστηκαν οι ελιές, μετά από τη διαδικασία της ζύμωσης η οποία έχει περιγραφεί στο άρθρο των Tzamourani et al. (2021). Στην προαναφερθείσα μελέτη έχουν επίσης ταυτοποιηθεί τα δύο συγκεκριμένα είδη ζυμών στο τέλος της ζύμωσης, συνεπώς είναι αναμενόμενο να ανιχνεύονται και στην παρούσα εργασία κατά την έναρξη της συντήρησης (χρόνος 0). Αναφορικά με το είδος *P. membranifaciens*, υποστηρίζεται ότι διατηρεί μια σειρά από επιθυμητές μεταβολικές δραστηριότητες, όπως η σύνθεση βιταμινών του συμπλέγματος Β, αμινοξέων, πουρινών, καθώς επίσης και η διάσπαση σύνθετων υδατανθράκων, που είναι απαραίτητα για την αύξηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων (Arroyo-López et al., 2008). Επίσης, παρουσιάζει μέτρια δραστικότητα καταλάσης και εστεράσης (Doulgeraki et al., 2012). Η δραστικότητα της καταλάσης είναι μια, ευρέως διαδεδομένη, χρήσιμη ιδιότητα των ζυμών που σχετίζονται με τις επιτραπέζιες ελιές που συμβάλλει στην προστασία των ελιών έναντι της οξειδωσης των ακόρεστων λιπαρών οξέων και του σχηματισμού υπεροξειδίων (Tofalo et al., 2013). Συγκεκριμένα, αναφέρεται ότι το είδος *Pichia membranifaciens* έχοντας υψηλά ποσοστά σχετικής αφθονίας, τόσο πριν, όσο και μετά τη συσκευασία (ανεξαρτήτως τροποποίησης ατμοσφαιρών συντήρησης) αποτελούσε την πιο συχνή απομόνωση, με επόμενη κατά σειρά σχετικής αφθονίας τη ζύμη *Saccharomyces* spp. Κάποια είδη όπως το *Saccharomyces cerevisiae* έχουν την ικανότητα να παράγουν θανατηφόρες τοξίνες έναντι των μικροοργανισμών που προκαλούν αλλοίωση στις επιτραπέζιες ελιές, καθώς και να βελτιώνουν την παρουσία του βακτηρίου *Lactiplantibacillus pentosus*. Στην παρούσα μελέτη, κατά τη μέση της συντήρησης, σε κάποια δείγματα παρατηρήθηκαν σχετικά αυξημένοι πληθυσμοί *Saccharomyces cerevisiae* και *Brettanomyces* spp. Αντίστοιχες παρατηρήσεις έχουν πραγματοποιηθεί και από τους Michailidou et al. (2021) σύμφωνα με τους οποίους οι ζύμες του γένους *Brettanomyces* επικράτησαν μετά την κυριαρχία του γένους *Pichia*. Αναφέρεται ωστόσο ότι η παρουσία του συγκεκριμένου γένους είναι ανεπιθύμητη εξαιτίας της δημιουργίας δυσάρεστης οσμής (Michailidou et al., 2021; Muccilli & Restuccia, 2015). Έχει διαπιστωθεί ότι η ζύμη *Brettanomyces* spp. μπορεί να επηρεάσει έντονα το άρωμα των προϊόντων ζύμωσης. Πολλοί διαφορετικοί όροι, μερικοί εκ των οποίων είναι: πικάντικο, καπνιστό, κατσικίσιο, πλαστικό, μεταλλικό, ιδρωμένο, λουλουδάτο, φρουτώδες, μπισκοτένιο, χρησιμοποιούνται για να περιγράψουν το (συχνά οξύ/ δριμύ) προφίλ αρωμάτων, αλλά αυτά συνοψίζονται πιο εύκολα ως «οσμή Brett». Η παρουσία, λοιπόν, του συγκεκριμένου μικροοργανισμού στις ελιές, μπορεί να επιδράσει στη οσμή του προϊόντος με την πάροδο του χρόνου συντήρησης και καθώς αυξάνεται αναλογικά των

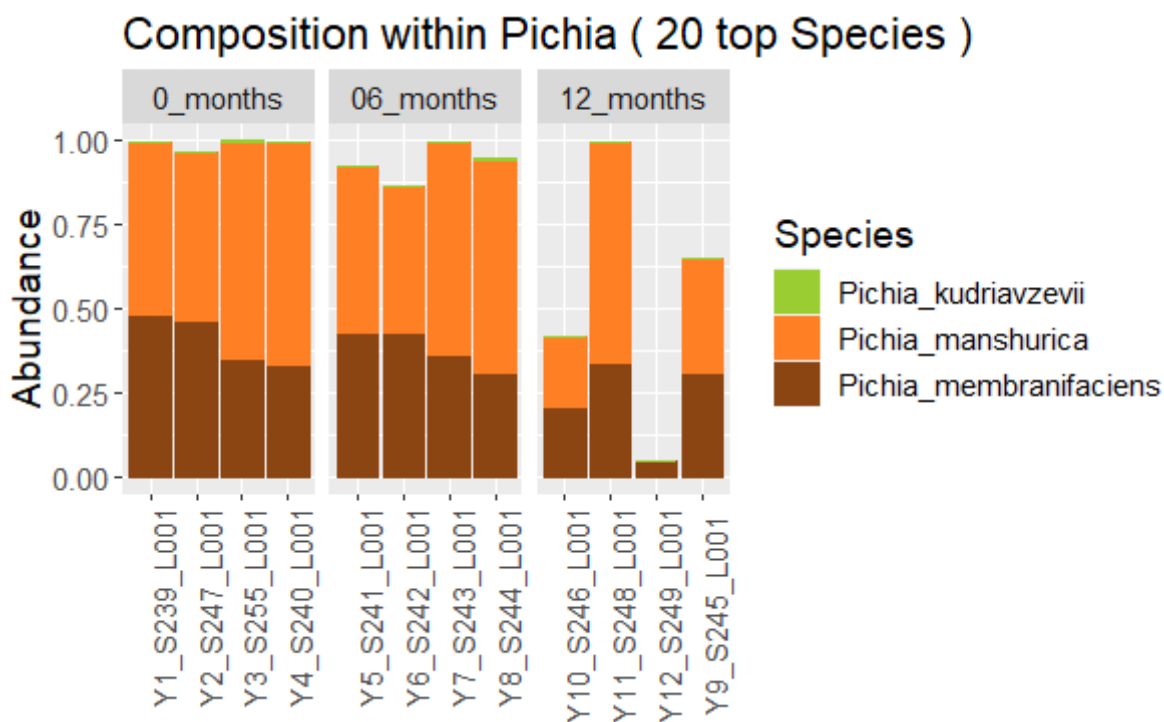
υπολοίπων μικροοργανισμών, επιφέροντας μεταβολές στο επιθυμητό άρωμα. Παρόλο που σήμερα θεωρείται κυρίως ένας οργανισμός αλλοίωσης υπεύθυνος για την παραγωγή ανεπιθύμητου αρώματος σε κρασί, μηλίτη ή γαλακτοκομικά προϊόντα, ένας αυξανόμενος αριθμός συγγραφέων αναφέρει ότι σε ορισμένες περιπτώσεις, αυτές οι ζύμες μπορούν να προσθέσουν επιθυμητά αρώματα που αυξάνουν την πολυπλοκότητα της γεύσης σε ποτά που έχουν υποστεί ζύμωση (Steensels et al., 2015).

Στο τέλος της συντήρησης τα δείγματα ήταν πιο «πλούσια» σε αριθμό ειδών. Συγκεκριμένα, σε σχετικά μεγάλη αφθονία εμφανίστηκαν τα γένη *Candida* και *Quambalaria*. Σε προηγούμενη μελέτη (Botta & Coccolin, 2012) αναφέρθηκε έντονη δραστηριότητα λιπασών από κάποια είδη ζυμών, μεταξύ των οποίων το *Candida boidinii*, η οποία συνεπάγεται μετατροπή των χαρακτηριστικών των λιπαρών οξέων των καρπών και κατά συνέπεια μεταβολή των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών τους. Επίσης, παρατηρήσαμε και είδη όπως το *Rhodosporidiobolus colostri* και *Yarrowia bubula*. Στο τέλος της συντήρησης στα δείγματα της Συσκευασίας 2 προέκυψε και το είδος *Alternaria alternata* και *Aspergillus* spp. Δεν παρουσιάζονται στατιστικά σημαντικές διαφορές βάσει της ποικιλίας των ελαιοκάρπων. Αντιθέτως, ο χρόνος συντήρησης φαίνεται να επηρεάζει τη σύσταση της μικροβιακής κοινότητας των ζυμών-μυκήτων.

Στο Γράφημα 4.3.9 παρουσιάζεται η σχετική σύνθεση των ζυμών-μυκήτων του κάθε δείγματος σε επίπεδο είδους βασισμένη στη ομαδοποίηση Bray.



Γράφημα 4.3.9. Διάγραμμα σύνθεσης της σχετικής αφθονίας των OTU σε επίπεδο είδους, βασισμένο στην ομαδοποίηση Bray.



Γράφημα 4.3.10. Γραφική απεικόνιση της σύνθεσης της σχετικής αφθονίας των OTU των ζυμομυκήτων του γένους *Pichia* σε επίπεδο είδους σύμφωνα με το χρόνο συντήρησης (0 μήνες: αρχή συντήρησης, 6 μήνες: μέσο συντήρησης, 12 μήνες: τέλος συντήρησης).

Στο Γράφημα 4.3.10 απεικονίζεται η σύνθεση του πληθυσμού των ζυμομυκήτων του γένους που είναι σε μεγαλύτερη αφθονία, σε επίπεδο είδους, σύμφωνα με το χρόνο συντήρησης. Σε αυτό το γράφημα είναι εμφανής και η παρουσία του είδους *Pichia kudriavzevii* του οποίου ο πληθυσμός φαίνεται να παραμένει σταθερός καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι η τοξίνη RY55 που παράγει το είδος *P. kudriavzevii* παρουσίασε εξαιρετική αντιβακτηριακή δράση έναντι πολλών παθογόνων βακτηρίων που έχουν σημασία για την ανθρώπινη υγεία, όπως *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* και *Pseudomonas alcaligenes* (Muccilli & Restuccia, 2015). Οι πληθυσμοί των άλλων δύο ειδών φαίνεται να έχουν μία ελαφρώς πτωτική τάση με την πάροδο του χρόνου συντήρησης.

Οι ζυμομύκητες έχουν συσχετιστεί με την αλλοίωση των επιτραπέζιων ελιών, ωστόσο έχει προταθεί ότι ορισμένα στελέχη προσδίδουν ευεργετικές ιδιότητες, όπως παραγωγή πτητικών ενώσεων, σύνθεση αντιοξειδωτικών ενώσεων και αποικοδόμηση πολυφαινολών (Ruiz-Moyano et al., 2019). Τα πιο συχνά απομονωμένα γένη είναι *Candida*, *Pichia* και *Saccharomyces*, με κυριότερα είδη τα *S. cerevisiae*, *C. apicola*

και *P. manshurica*/*P. galeiformis* (Abriouel et al., 2011; Heperkan, 2013). Σε μελέτη που πραγματοποίησαν οι Golomb et al. (2013) κατέληξαν στον εντοπισμό πηκτινολυτικών ζυμομυκήτων (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia manshurica*, *Pichia kudriavzevii* και *Candida boidinii*) σε ζυμώσεις πράσινης ελιάς με τη Σικελική μέθοδο και εξέτασαν την επίδραση αυτών των ζυμών στη μικροβιακή σύνθεση και ποιότητα των ζυμωμένων ελιών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι πηκτινολυτικές ζύμες αποτελούν σημαντικό μέρος της μικροχλωρίδας στη ζύμωση της πράσινης ελιάς και η ζημιά που προκαλείται από αυτές μπορεί να αποφευχθεί από άλλους μικροοργανισμούς των καρπών.

5. Συμπεράσματα

Στην παρούσα διατριβή αξιολογήθηκε η ποιότητα πράσινων επιτραπέζιων ελιών δύο ελληνικών ποικιλιών κατά τη συσκευασία σε εύκαμπτους πολυστρωματικούς περιέκτες με τροποποιημένη ατμόσφαιρα (100 N₂) και περαιτέρω συντήρηση σε θερμοκρασία δωματίου για χρονικό διάστημα 12 μηνών. Η μελέτη αυτή βασίστηκε σε φασματοσκοπικές και μοριακές αναλύσεις επόμενης γενιάς.

Τα αποτελέσματα από την εφαρμογή φασματοσκοπίας υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR) για την εκτίμηση του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB) παρουσίασαν καλή συσχέτιση με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα, με μέση απόκλιση των προβλεπόμενων τιμών από τις παρατηρούμενες ίση με 0,412 log CFU/g, κατά την εξωτερική επικύρωση του μοντέλου PLS-R.

Όσον αφορά στην ταξινόμηση με βάση την ποικιλία της ελιάς και το είδος της συσκευασίας, τα μοντέλα εκτίμησης PLS-DA παρουσίασαν συνολική ακρίβεια πρόβλεψης 94,7% και 57,9% κατά την εξωτερική επικύρωση των μοντέλων, αντίστοιχα. Συνεπώς, ο διαχωρισμός μεταξύ των δύο ποικιλιών επιτραπέζιας ελιάς είναι εφικτός με βάση τα συλλεχθέντα φασματοσκοπικά δεδομένα, σε αντίθεση με το είδος της συσκευασίας που δεν παρουσίασε ικανοποιητικό διαχωρισμό. Ωστόσο, με τη συλλογή περισσότερων φασματοσκοπικών δεδομένων είναι δυνατή η βελτίωση της επίδοσης των παραπάνω μοντέλων.

Επόμενος στόχος της παρούσας μελέτης ήταν ο προσδιορισμός της βιοκοινότητας των ζυμών-μυκήτων που απαντάται στον καρπό της ελιάς κατά τη διάρκεια της συντήρησης, μέσω μεταγενετικής ανάλυσης, εφόσον οι εν λόγω μικροοργανισμοί δεν απαριθμήθηκαν με τις κλασικές μικροβιολογικές τεχνικές. Τα αποτελέσματα αποκάλυψαν μια ιδιαίτερα σημαντική βιοποικιλότητα ζυμών/μυκήτων, ιδιαίτερα προς το τέλος της συντήρησης (12 μήνες).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα είδη *Pichia membranifaciens* και *Pichia manshurica* κυριάρχησαν στο αρχικό και ενδιάμεσο στάδιο της συντήρησης καθώς επίσης και στα περισσότερα δείγματα ελιάς στο τέλος της συντήρησης, ανεξάρτητα από την ποικιλία της ελιάς και το υλικό συσκευασίας του καρπού. Η βιοποικιλότητα των ζυμών αυξήθηκε στο τέλος της συντήρησης με την παρουσία επίσης των ζυμών *Saccharomyces cerevisiae* και *Brettanomyces* spp., ενώ άλλα γένη ζυμών και μυκήτων ανιχνεύθηκαν επίσης σε αυτό το στάδιο με μικρότερη συχνότητα αφθονίας.

Βιβλιογραφία

- Abdi, H. (2007). Partial Least Square Regression PLS-Regression. *Encyclopedia of Measurement and Statistics*, 1–13. https://doi.org/10.1007/978-3-642-40872-4_2000-1
- 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(3), 487–496. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.006>
- Alves, M., Gonçalves, T., & Quintas, C. (2012). Microbial quality and yeast population dynamics in cracked green table olives' fermentations. *Food Control*, 23(2), 363–368. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.07.033>
- Anguita-Maeso, M., Olivares-García, C., Haro, C., Imperial, J., Navas-Cortés, J. A., & Landa, B. B. (2020). Culture-dependent and culture-independent characterization of the olive xylem microbiota: effect of sap extraction methods. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01708>
- Antoniou, C., & Hull, J. (2021). The anti-cancer effect of *Olea europaea* L. products : a review. *Current Nutrition Reports*, 10, 99–124.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.003>
- Argyri, A. A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K. A. G., Tsakalidou, E., Nychas, G. J. E., Panagou, E. Z., & Tassou, C. C. (2013). Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. *Food Microbiology*, 33(2), 282–291. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.10.005>
- Arroyo-López, F. N., Querol, A., Bautista-Gallego, J., & Garrido-Fernández, A. (2008). Role of yeasts in table olive production. *International Journal of Food Microbiology*, 128(2), 189–196. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.08.018>
- Azam, M., Mohsin, M., Ijaz, H., Tulain, U. R., Ashraf, M. A., Fayyaz, A., Abadeen, Z. ul, & Kamran, Q. (2017). Lactic acid bacteria in traditional fermented Asian foods. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 30, 1803–1814.
- Bendini, A., Cerretani, L., Di Virgilio, F., Belloni, P., Bonoli-Carbognin, M., & Lercker, G. (2007). Preliminary evaluation of the application of the ftir spectroscopy to control the geographic origin and quality of virgin olive oils. *Journal of Food Quality*, 30(4), 424–437. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2007.00132.x>
- 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(1), 208–215. <https://doi.org/10.1128/AEM.01711-07>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.09.007>

- Bokulich, N. A., Subramanian, S., Faith, J. J., Gevers, D., Gordon, J. I., Knight, R., Mills, D. A., & Caporaso, J. G. (2013). Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nature Methods*, *10*(1), 57–59. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2276>
- Botta, C., & Cocolin, L. (2012). Microbial dynamics and biodiversity in table olive fermentation: culture-dependent and -independent approaches. *Frontiers in Microbiology*, *3*, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00245>
- Bourdichon, F., Alper, I., Bibiloni, R., Dubois, A., Laulund, S., Miks, M., Morelli, L., Zuliani, V., & Yao, S. (2018). Inventory of microbial food cultures with safety demonstration in fermented food products. *Bulletin of the International Dairy Federation*, *495*, 1–71.
- Bronner, G., Debros, D., Enault, F., Hugoni, M., Jouan-dufournel, I., & Mary, I. (2016). Study of prokaryotes and viruses in aquatic ecosystems by metagenetic and metagenomic approaches. In T. Sime-Ngando, B. Pierre, E. Chapron, D. Jézéquel, & M. Meybeck (Eds.), *Lake Pavin* (pp. 245–254). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-39961-4>
- Bueno, G., Valdivirene, D., Gomes, M., & Zottich, U. (2012). Isolation, characterization and antifungal activity of proteinase inhibitors from *Capsicum chinense* jacq. seeds. *The Protein Journal*, *32*, 15–26. <https://doi.org/10.1007/s10930-012-9456-z>
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. (2009). BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, *10*, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>
- Campaniello, D., Bevilacqua, A., Amato, D. 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*(3), 289–294.
- Caporaso, G. J., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., Owens, S. M., Betley, J., Fraser, L., Bauer, M., Gormley, N., Gilbert, J. A., Smith, G., & Knight, R. (2012). Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME Journal*, *6*(8), 1621–1624. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.8>
- Caporaso, N., & Boskou, D. (2021). Olive (*Olea europaea*). In B. Tanwar & A. Goyal (Eds.), *Oilseeds: Health Attributes and Food Applications* (pp. 211–252).
- Castellucci, F. (2012). Biology molecular tools for identification of grape and wine lactic acid. *Resolution Oiv-Oeno 409-2012*, *409*, 1–13.
- Cocolin, L., Alessandria, V., Botta, C., Gorra, R., De Filippis, F., Ercolini, D., & Rantsiou, K. (2013). NaOH-debittering induces changes in bacterial ecology during table olives fermentation. *PLOS ONE*, *8*(7), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069074>
- Colmagro, S., Collins, G., & Sedgley, M. (2001). Processing technology of the table olive. In J. Janick (Ed.), *Horticultural Reviews* (Vol. 25, pp. 235–260). John Wiley & Sons.
- Conte, P., Fadda, C., Del Caro, A., Urgeghe, P. P., & Piga, A. (2020). Table olives: an overview on effects of processing on nutritional and sensory quality. *Foods*, *9*(1), 1–36.
- De Luca, M., Terouzi, W., Ioele, G., Kzaiber, F., Oussama, A., Oliverio, F., Tauler, R.,

- & Ragno, G. (2011). Derivative FTIR spectroscopy for cluster analysis and classification of morocco olive oils. *Food Chemistry*, 124(3), 1113–1118. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.010>
- De Luca, M., Terouzi, W., Kzaiber, F., Ioele, G., Oussama, A., & Ragno, G. (2012). Classification of moroccan olive cultivars by linear discriminant analysis applied to ATR-FTIR spectra of endocarps. *International Journal of Food Science and Technology*, 47(6), 1286–1292. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.02972.x>
- Doulgeraki, A. I., Hondrodinou, O., Iliopoulos, V., & Panagou, E. Z. (2012). Lactic acid bacteria and yeast heterogeneity during aerobic and modified atmosphere packaging storage of natural black Conservolea olives in polyethylene pouches. *Food Control*, 26(1), 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.01.006>
- 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. *LWT - Food Science and Technology*, 50(1), 353–356. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.07.003>
- Escudié, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., Maman, S., Hernandez-Raquet, G., Combes, S., & Pascal, G. (2018). FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics*, 34(8), 1287–1294. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx791>
- Fadiji, A. E., & Babalola, O. O. (2020). Metagenomics methods for the study of plant-associated microbial communities: a review. *Journal of Microbiological Methods*, 170, 1–53. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105860>
- Fairchild, A., Lee, M. D., & Maurer, J. J. (2006). PCR basics. In J. Maurer (Ed.), *PCR Methods in Foods* (pp. 1–26). Springer. <https://doi.org/10.1007/0-387-31702-3>
- Forney, L. J., Zhou, X., & Brown, C. J. (2004). Molecular microbial ecology : land of the one-eyed king. *Current Opinion in Microbiology*, 7, 210–220. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.04.015>
- Frankel, E. (2011). A critical literature review on the processing of table olives. *Lipid Technology*, 23(10), 223–226. <https://doi.org/10.1002/lite.201100145>
- Fujita, S. I., Senda, Y., Nakaguchi, S., & Hashimoto, T. (2001). Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(10), 3617–3622. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.10.3617-3622.2001>
- Galatali, S., Ghafoor, N. A., & Kaya, E. (2021). Characterization of olive (*Olea europaea* L.) genetic resources via PCR-based molecular marker systems. *European Journal of Biology & Biotechnology*, 2(1), 26–33.
- Garrido Fernandez, A., Fernandez-Diez, M. J., & Adams, M. R. (1997). *Table olives: production and processing*. Chapman & Hall.
- Ghosh, A., Mehta, A., & Khan, A. M. (2018). Metagenomic analysis and its applications. *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20178-7>
- Giraffa, G., & Carminati, D. (2008). Molecular techniques in food fermentation: principles and applications. In L. Cocolin & D. Ercolini (Eds.), *Molecular Techniques in the Microbial Ecology of Fermented Foods* (pp. 1–30). Springer.
- Giraffa, G., & Neviani, E. (2001). DNA-based, culture-independent strategies for

- evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. *International Journal of Food Microbiology*, 67, 19–34.
- Golomb, B. L., Morales, V., Jung, A., Yau, B., Boundy-Mills, K. L., & Marco, M. L. (2013). Effects of pectinolytic yeast on the microbial composition and spoilage of olive fermentations. *Food Microbiology*, 33(1), 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.09.004>
- Haas, B. J., Gevers, D., Earl, A. M., Feldgarden, M., Ward, D. V., Giannoukos, G., Ciulla, D., Tabbaa, D., Highlander, S. K., Sodergren, E., Methé, B., DeSantis, T. Z., Petrosino, J. F., Knight, R., & Birren, B. W. (2011). Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome Research*, 21(3), 494–504. <https://doi.org/10.1101/gr.112730.110>
- Harris, L. J. (1998). The microbiology of vegetable fermentations. In *Microbiology of fermented foods*. Blackie Academic and Professional.
- Hepkan, D. (2013). Microbiota of table olive fermentations and criteria of selection for their use as starters. *Frontiers in Microbiology*, 4, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00143>
- Hirri, A., Bassbasi, M., Platikanov, S., Tauler, R., & Oussama, A. (2016). FTIR spectroscopy and PLS-DA classification and prediction of four commercial grade virgin olive oils from Morocco. *Food Analytical Methods*, 9(4), 974–981. <https://doi.org/10.1007/s12161-015-0255-y>
- Hurtado, A., Reguant, C., Bordons, A., & Rozès, N. (2010). Evaluation of a single and combined inoculation of a *Lactobacillus pentosus* starter for processing cv . Arbequina natural green olives. *Food Microbiology*, 27(6), 731–740. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.03.006>
- Hussain, S. Z., Naseer, B., Qadri, T., Fatima, T., & Bhat, T. A. (2021). Olive (*Olea europaea* L.)—morphology, taxonomy, composition and health benefits. In *Fruits Grown in Highland Regions of the Himalayas* (pp. 117–127). Nutritional and Health Benefits.
- Iñón, F. A., Garrigues, J. M., Garrigues, S., Molina-Díaz, A., & De La Guardia, M. (2003). Selection of calibration set samples in determination of olive oil acidity by partial least squares-attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, 489(1), 59–75. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(03\)00711-6](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(03)00711-6)
- Kazou, M., Tzamourani, A., Panagou, E. Z., & Tsakalidou, E. (2020). Unraveling the microbiota of natural black cv. Kalamata fermented olives through 16S and ITS metataxonomic analysis. *Microorganisms*, 672(8), 1–24.
- Kozich, J. J., Westcott, S. L., Baxter, N. T., Highlander, S. K., & Schloss, P. D. (2013). Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the miseq illumina sequencing platform. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(17), 5112–5120. <https://doi.org/10.1128/AEM.01043-13>
- Li, W., Raoult, D., & Fournier, P. E. (2009). Bacterial strain typing in the genomic era. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(5), 892–916. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00182.x>
- Lin, T., Lin, L., & Zhang, F. (2014). Review on molecular typing methods of pathogens. *Open Journal of Medical Microbiology*, 4(3), 147–152.

<https://doi.org/10.4236/ojmm.2014.43017>

- Maghembe, R., Damian, D., Makaranga, A., Nyandoro, S. S., Lyantagaye, S. L., Kusari, S., & Hatti-kaul, R. (2020). Omics for bioprospecting and drug discovery from bacteria and microalgae. *Antibiotics*, 229(9), 1–26.
- Magoč, T., & Salzberg, S. L. (2011). FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*, 27(21), 2957–2963. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr507>
- Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., de Vargas, C., & Dunthorn, M. (2014). Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ*, 593, 1–13. <https://doi.org/10.7717/peerj.593>
- Manthou, E., Coeuret, G., Chaillou, S., & Nychas, G. E. (2021). Evolution of fungal community associated with ready-to-eat pineapple during storage under different temperature conditions. *Food Microbiology*, 97, 103736. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103736>
- Mantzouridou, F., & Tsimidou, M. Z. (2011). Microbiological quality and biophenol content of hot air-dried Thassos cv. table olives upon storage. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(6), 786–795. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201000453>
- Marquina, D., Peres, C., Caldas, F. V., Marques, J. F., Peinado, J. M., & Sperner-Martins, I. (1992). Characterization of the yeast population in olive brines. *Letters in Applied Microbiology*, 14, 279–283.
- McElhoe, J. A., Holland, M. M., Makova, K. D., Su, M. S. W., Paul, I. M., Baker, C. H., Faith, S. A., & Young, B. (2014). Development and assessment of an optimized next-generation DNA sequencing approach for the mtgenome using the Illumina MiSeq. *Forensic Science International: Genetics*, 13, 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.05.007>
- Metzker, M. L. (2005). Emerging technologies in DNA sequencing. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 15, 1767–1776. <https://doi.org/10.1101/gr.3770505>
- Michailidou, S., Trika, F., Pasentsis, K., Petrovits, G. E., Kyritsi, M., & Argiriou, A. (2021). Insights into the evolution of Greek style table olives microbiome stored under modified atmosphere: biochemical implications on the product quality. *Food Control*, 108286, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108286>
- Muccilli, S., & Restuccia, C. (2015). Bioprotective role of yeasts. *Microorganisms*, 3, 588–611. <https://doi.org/10.3390/microorganisms3040588>
- Oliveri, P., López, M. I., Casolino, M. C., Ruisánchez, I., Callao, M. P., Medini, L., & Lanteri, S. (2014). Partial least squares density modeling (PLS-DM) - A new class-modeling strategy applied to the authentication of olives in brine by near-infrared spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, 851(C), 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.09.013>
- Panagou, E. Z., Tassou, C. C., & Katsaboxakis, K. Z. (2002). Microbiological, physicochemical and organoleptic changes in dry-salted olives of Thassos variety stored under different modified atmospheres at 4 and 20 °C. *International Journal of Food Science and Technology*, 37(6), 635–641. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2002.00590.x>
- Panagou, Efstathios 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(7), 667–674. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1336>
- Panagou, Efstathios 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. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.03.003>
- Perpetuini, G., Prete, R., Garcia-gonzalez, N., Alam, M. K., & Corsetti, A. (2020). Table Olives More than a Fermented Food. *Foods*, 178(9), 1–16.
- Randazzo, C. L., Rajendram, R., & Caggia, C. (2010). Lactic acid bacteria in table olive fermentation. In *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention* (pp. 369–376). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374420-3.00041-3>
- Riley, F. R. (2002). Olive oil production on bronze age crete: Nutritional properties, processing methods and storage life of Minoan olive oil. *Oxford Journal of Archaeology*, 21(1), 63–75. <https://doi.org/10.1111/1468-0092.00149>
- Roberts, J. J., & Cozzolino, D. (2016). An overview on the application of chemometrics in food science and technology—an approach to quantitative data analysis. *Food Analytical Methods*, 9(12), 3258–3267. <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0574-7>
- Rocha, J., Borges, N., & Pinho, O. (2020). Table olives and health: a review. *Journal of Nutritional Science*, 9, 1–16. <https://doi.org/10.1017/jns.2020.50>
- Ropodi, A. I., Panagou, E. Z., & Nychas, G. J. E. (2016). Data mining derived from food analyses using non-invasive/non-destructive analytical techniques; determination of food authenticity, quality & safety in tandem with computer science disciplines. *Trends in Food Science and Technology*, 50, 11–25. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.01.011>
- 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(4), 1294–1297.
- Ruiz-Moyano, S., Esperilla, A., Hernández, A., Benito, M. J., Casquete, R., Martín-Vertedor, D., & Pérez-Nevado, F. (2019). Application of ISSR-PCR as a rapid method for clustering and typing of yeasts isolated from table olives. *LWT - Food Science and Technology*, 109, 250–254. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.04.044>
- Sanchez, A. H., de Castro, A., Rejano, L., & Montano, 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.
- Schirmer, M., Ijaz, U. Z., D'Amore, R., Hall, N., Sloan, W. T., & Quince, C. (2015). Insight into biases and sequencing errors for amplicon sequencing with the Illumina MiSeq platform. *Nucleic Acids Research*, 43(6), 1–16. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1341>
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., & Levesque, C. A. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(16), 6241–6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Sharma, A., Lee, S., & Park, Y. S. (2020). Molecular typing tools for identifying and characterizing lactic acid bacteria: a review. *Food Science and Biotechnology*,

- 29(10), 1301–1318. <https://doi.org/10.1007/s10068-020-00802-x>
- Silva, B. S., & Schmiele, M. (2021). From olive to olive oil: a general approach. *Research, Society and Development*, 10, 1–18.
- Simões, L. A., Cristina de Souza, A., Ferreira, I., Melo, D. S., Lopes, L. A. A., Magnani, M., Schwan, R. F., & Dias, D. R. (2021). Probiotic properties of yeasts isolated from Brazilian fermented table olives. *Journal of Applied Microbiology*, 1–15. <https://doi.org/10.1111/jam.15065>
- Steensels, J., Daenen, L., Malcorps, P., Derdelinckx, G., Verachtert, H., & Verstrepen, K. J. (2015). Brettanomyces yeasts — From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 206, 24–38. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.005>
- Stiles, M. E., & Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36(1), 1–29. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(96\)01233-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(96)01233-0)
- Su, C., Lei, L., Duan, Y., Zhang, K. Q., & Yang, J. (2012). Culture-independent methods for studying environmental microorganisms: Methods, application, and perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(3), 993–1003. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3800-7>
- 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(7–8), 348–359. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.12.007>
- Tofalo, R., Perpetuini, G., Schirone, M., Suzzi, G., & Corsetti, A. (2013). Yeast biota associated to naturally fermented table olives from different Italian cultivars. *International Journal of Food Microbiology*, 161(3), 203–208. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.011>
- Tzamourani, A. P., Di Napoli, E., Paramithiotis, S., Oikonomou-Petrovits, G., Panagiotidis, S., & Panagou, E. Z. (2021). Microbiological and physicochemical characterization of green table olives of Halkidiki and Conservolea varieties processed by the Spanish method on industrial scale. *International Journal of Food Science & Technology*, 1–13. <https://doi.org/10.1111/ijfs.15000>
- Vergara-Barberán, M., Lerma-García, M. J., Herrero-Martínez, J. M., & Simó-Alfonso, E. F. (2015). Cultivar discrimination of Spanish olives by using direct FTIR data combined with linear discriminant analysis. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117(9), 1473–1479. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201400425>
- Wold, S., Sjöström, M., & Eriksson, L. (2001). PLS-regression: A basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 58(2), 109–130. [https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(01\)00155-1](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(01)00155-1)
- Κουή, Μ., Αβδελίδης, Ν., Θεοδωρακέας, Π., & Χειλάκου, Ε. (2015). Φασματοσκοπία Υπερύθρου Μετασχηματισμού Fourier με Αποσβένουσα Ολική Ανάκλαση. In *Μη Καταστρεπτικές Και Φασματοσκοπικές Μέθοδοι Εξέτασης Των Υλικών*. (pp. 191–215). Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών. <http://hdl.handle.net/11419/6175>
- ΠΑΠΑΔΑΚΗ, Α. (2015). *Μελέτη μοριακών μηχανισμών επιβίωσης του παρασίτου Leishmania spp. στα φαγοκύτταρα του τελικού ξενιστή*. <http://marefateadyan.nashriyat.ir/node/150>

Ποντίκης, Κ. Α. (2000). ΕΙΔΙΚΗ ΔΕΝΔΡΟΚΟΜΙΑ Ελαιοκομία (σελ. 106-110). *Εκδόσεις*
Αθ. Σταμούλης