



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**«ΠΙΛΟΤΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ ΦΥΣΙΚΩΣ ΩΡΙΜΩΝ ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΩΝ
ΕΛΙΩΝ: ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΑΙ ΧΡΗΣΗ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ΖΥΜΩΣΗΣ ΓΙΑ ΤΗ
ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΤΩΝ ΠΟΙΟΤΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ»**

ΑΓΑΘΗ ΧΥΤΗΡΗ
ΧΗΜΙΚΟΣ MSc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ
2025

“Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το τμήμα Χημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει την αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα. Ν.5343/32,άρθρο 202, παράγραφος 2”

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΧΗΜΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Ημερομηνία 2/6/2025

ΙΩΑΝΝΙΝΑ, 45110

E-mail: mikontomi@uoi.gr

**ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΑΣΗΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΓΙΑ ΤΗ
ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΤΗΣ κας. ΧΥΤΗΡΗ ΑΓ.ΛΩΗΣ**

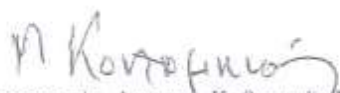
Σήμερα Δευτέρα 2/6/2025 και ώρα 10.00 π.μ. στην αίθουσα τηλεδιάσκεψης (1^η αίθουσα Κέντρου Διαχείρισης Δικτύων) του Παν/μίου Ιωαννίνων, συνεδρίασε η **Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή**, που ορίστηκε με απόφαση της Γ.Σ.Ε.Σ. του Τμήματος Χημείας στη συνεδρία της αρ. 1136/21.3.2025 αποτελούμενη από τους:

1. Μιχαήλ Κοντομηνά, Αφυστηρ. Καθηγητή Τμήματος Χημείας, Παν/μίου Ιωαννίνων (Επιβλέπωντα)
2. Κων/νίνο Σταλίκι, Καθηγητή Τμήματος Χημείας, Παν/μίου Ιωαννίνων, μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής
3. Αναστασία Μιαδέκι, Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας, Παν/μίου Ιωαννίνων, μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής
4. Αργυρώ Μπεκατώρου, Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας, Παν/μίου Πατρών, μέλος Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής
5. Σταύρο Πλέσσα, Καθηγητή Τμήματος Αγροτικής Ανάπτυξης, Δημοκριτείου Πανεπιστημίου Θράκης, μέλος Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής
6. Νικόλαο Κοψαχνίλη, Αναπλωτή Καθηγητή Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Ιονίου Πανεπιστημίου, μέλος Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής
7. Ιωάννα Κοσμά, Επίκουρη Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας, Παν/μίου Ιωαννίνων, μέλος Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής.

Ενώπιον της επιτροπής και του ακροατηρίου η υποψήφια διδάκτωρ κα. Χυτήρη Αγαθή παρουσίασε τη διδακτορική της διατριβή με τίτλο: «**ΠΙΛΟΤΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ ΦΥΣΙΚΩΣ ΩΡΙΜΩΝ ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΩΝ ΕΛΙΩΝ: ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΑΙ ΧΡΗΣΗ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ΖΥΜΩΣΗΣ ΓΙΑ ΤΗ ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΤΩΝ ΠΟΙΟΤΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ**» και δέχτηκε ερωτήσεις από το ακροατήριο και την επταμελή εξεταστική επιτροπή.

Στη συνέχεια και αφού αποχώρησε το ακροατήριο, η Επιτροπή, κατόπιν συζήτησης, έκρινε ότι η εργασία της κ. Χυτήρη είναι πρωτότυπη και αποτελεί συμβολή στην πρόοδο της επιστήμης και αποφάσισε ομόφωνα την έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής με το βαθμό '.

Η Εξεταστική Επιτροπή:



Μ. Κοντομηνάς, Αφυπτηρ, Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Παν/μίου Ιωαννίνων
(Επιβλέπων)



Κ. Σταλίκας, Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Παν/μίου Ιωαννίνων, μέλος Τριμελούς
Συμβουλευτικής Επιτροπής



Α. Μπαδέκα, Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας, Παν/μίου Ιωαννίνων, μέλος Τριμελούς
Συμβουλευτικής Επιτροπής

ARGYRO BEKATOROU
02/06/2025 15:35

Α. Μπεκατώρου, Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας, Παν/μίου Πατρών, μέλος Επταμελούς
Εξεταστικής Επιτροπής

Stavros Plessas

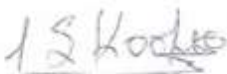
02.06.2025 13:24 UTC

Σ. Πλέσσας, Καθηγητής Τμήματος Αγροτικής Ανάπτυξης, Δημοκριτείου Παν/μίου
Θράκης, μέλος Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής

Nikolaos Kopsahelis

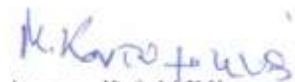
- Digitally signed

Ν. Κοψαχέλης, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας
Τροφίμων, Ιονίου Παν/μίου Πανεπιστημίου, μέλος Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής



Ι. Κοσμά, Επίκουρη Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, μέλος
Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής

Με τιμή,



Αφυπτηρ, Καθ. Μ.Γ. Κοντομηνάς

**Αφιερώνεται στους γονείς μου,
στο σύζυγο μου και τα παιδιά μου....**

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε κατά τη χρονική περίοδο 2012-2015 στο Εργαστήριο Χημείας και Μικροβιολογίας Τροφίμων, του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Μέρος των πειραμάτων αυτής της εργασίας διεξήχθησαν και στο Lecce της Ιταλίας στο ερευνητικό κέντρο CNR-ISPA (Institute of Sciences of Food Production).

Οι οικονομικές απαιτήσεις μεγάλου τμήματος της έρευνας αυτής καλύφθηκαν μέσω της χρηματοδότησης του Προγράμματος Ευρωπαϊκής Εδαφικής Συνεργασίας «Ελλάδα – Ιταλία 2007-2013» στα πλαίσια του έργου «Utilization of biophenols from Olea Europea products - Olives, virgin olive oil and olive mill wastewater (Bio olea)».

Η διδακτορική διατριβή είναι μια μακροχρόνια και επίπονη διαδικασία για την ολοκλήρωση της οποίας η μελέτη, η εργατικότητα και ο ενθουσιασμός δεν επαρκούν. Απαιτείται μεταξύ άλλων στωικότητα, υπομονή και συντονισμός διαφόρων ανθρώπων και παραμέτρων για την ολοκλήρωση της. Για το λόγο αυτό, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε ορισμένους ανθρώπους που στάθηκαν αρωγοί σε αυτή μου την προσπάθεια.

Ευχαριστώ θερμά, την εκλιπούσα Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα. Τασιούλα Μαρία για το θέμα και την επίβλεψη της διατριβής, τη συνεχή επιστημονική καθοδήγηση, την πολύπλευρη συμπαράσταση και το ενδιαφέρον της. Ακόμα, την ευχαριστώ για όλες τις ευκαιρίες που γενναιόδωρα μου προσέφερε και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, με αποτέλεσμα να διευρύνω τις επιστημονικές μου γνώσεις.

Θερμές ευχαριστίες, θα ήθελα να εκφράσω και στον κ. Μιχάλη Κοντομηνά, Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, που δέχτηκε να αναλάβει τη θέση του επιβλέποντα μετά το θάνατο της κα. Τασιούλα Μαρίας. Η κριτική του ματιά και η εμπειρία του με οδήγησε στη σωστή κατεύθυνση και κατ'επέκταση στον τελικό μου στόχο.

Ευχαριστώ τον κ. Κωνσταντίνο Σταλικά, Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων που ήταν πάντοτε πρόθυμος να ακούσει τους προβληματισμούς μου και να με κατευθύνει ως μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής.

Ευχαριστώ επίσης, την αναπληρώτρια καθηγήτρια, κα Μπαδέκα Αναστασία, για τη συμμετοχή της στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή.

Θα ήταν παράλειψή μου να μην ευχαριστήσω θερμά, την επίκουρο καθηγήτρια Βασιλική Κοντογιάννη για τη βοήθειά της στην ανάλυση των φαινολικών ενώσεων με LC-MS, για τη συμπαράσταση και στήριξη της σε όλες τις δύσκολες στιγμές, καθώς και τον Δρ Gianluca Bleve για την ευγενική φιλοξενία στο CNR-ISPA, την καθοδήγηση και την επίβλεψη σε μεγάλο μέρος της διατριβής.

Ευχαριστώ πολύ την οικογένεια μου, για τη διαρκή και πολύπλευρη στήριξη όλα αυτά τα χρόνια, καθώς δε σταμάτησε ποτέ να μου μεταδίδει την εμπιστοσύνη της. Οι αρχές που μου εμφύσησε θα με οδηγούν στη ζωή και θα αποτελούν φωτεινό φάρο στη μελλοντική μου πορεία.

Τέλος, ευχαριστώ τον αγαπημένο σύντροφο της ζωής μου Στέφανο, που βρίσκεται δίπλα μου από την αρχή αυτής της προσπάθειας. Τον ευγνωμονώ μέσα από την καρδιά μου, για την απλόχερη αγάπη και ψυχική γαλήνη που μου προσφέρει.

Χυτήρη Αγάθη

Ιωάννινα 2025

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	12
ABSTRACT	15
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	17
1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	20
1.1 Χημική σύσταση-διατροφική αξία των επιτραπέζιων ελιών	20
1.1.1 Δομή ελαιοκάρπου	20
1.1.2 Το νερό ή υγρασία σάρκας	21
1.1.3 Λιπαρές ουσίες	21
1.1.4 Σάκχαρα (μονο- και ολιγοσακχαρίτες)	22
1.1.5 Υδατάνθρακες - Μη σακχαροειδείς πολυσακχαρίτες	23
1.1.6 Φυτικές ίνες	24
1.1.7 Τα οργανικά οξέα	24
1.1.8 Οι πρωτεΐνες	25
1.1.9 Οι βιταμίνες	26
1.1.10 Ανόργανα συστατικά	26
1.1.11 Φαινολικές ενώσεις	27
1.2 Επιτραπέζια ελιά	28
1.2.1 Ιστορική αναδρομή	28
1.2.2 Η αγορά των επιτραπέζιων ελιών σε διεθνές και εθνικό επίπεδο	28
1.2.3 Ελληνικές ποικιλίες επιτραπέζιων ελιών	29
1.2.4 Επιτραπέζιες ελιές με ΠΟΠ και ΠΓΕ	34
1.2.5 Ποιοτικά χαρακτηριστικά της επιτραπέζιας ελιάς	36
1.2.6 Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της επιτραπέζιας ελιάς	39
1.3 Φυσικές μαύρες ελιές Ελληνικού τύπου σε άλμη: παρασκευή, μικροβιακή ζύμωση και υπεύθυνοι μικροοργανισμοί	45
1.3.1 Παρασκευή φυσικών μαύρων ελιών στην άλμη	46
1.3.2 Η μικροβιακή ζύμωση των μαύρων ελιών και οι υπεύθυνοι μικροοργανισμοί	47
1.3.3 Αλλοιώσεις και ασθένειες κατά τη ζύμωση μαύρων επιτραπέζιων ελιών	50
1.3.4 Βελτίωση λειτουργικών ιδιοτήτων των επιτραπέζιων ελιών με τη χρήση προβιοτικών μικροοργανισμών	55
1.3.5 Εμβολιασμός της άλμης με καλλιέργειες εκκίνησης (starter cultures)	56

1.4 Φαινολικές ενώσεις	60
1.4.1 Οι κύριες φαινολικές ενώσεις στον ελαιοκάρπο	60
1.4.2 Παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοσύνθεση των φαινολικών ενώσεων του καρπού	63
1.4.4 Προσδιορισμός συγκέντρωσης ολικών φαινολικών συστατικών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu	68
1.4.5 Ταυτοποίηση και ποσοτικός προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων	69
1.5 Πτητικές ενώσεις	70
1.5.1 Παράγοντες που επηρεάζουν το αρωματικό προφίλ του ελαιοκάρπου	70
1.5.2 Το αρωματικό προφίλ του ελαιοκάρπου	71
1.5.3 Αναλυτικός προσδιορισμός των πτητικών ενώσεων του ελαιοκάρπου	72
1.6 Μοριακές τεχνικές για την ταυτοποίηση μικροοργανισμών	78
1.6.1 Εισαγωγή	78
1.6.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	79
1.6.3 Τυχαία ενισχυμένα τμήματα πολυμορφικού DNA (RAPD)	84
2. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΕΡΕΥΝΑΣ	85
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	86
3.1 ΜΕΛΕΤΗ ΑΥΘΟΡΜΗΤΗΣ, ΑΕΡΟΒΙΑΣ ΖΥΜΩΣΗΣ ΦΥΣΙΚΩΣ ΩΡΙΜΩΝ ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΩΝ ΕΛΙΩΝ	86
3.1.1 Προετοιμασία δειγμάτων και μέθοδος ζύμωσης	86
3.1.2 Πρότυπα, αντιδραστήρια και διαλύτες	86
3.1.3 Φυσικοχημικές αναλύσεις	87
3.1.4 Μικροβιολογικές αναλύσεις	92
3.1.5 Ταυτοποίηση γαλακτικών βακτηρίων με βιοχημικό έλεγχο	93
3.1.6 Επιλογή βακτηρίων και ζυμών βάσει τεχνολογικών ιδιοτήτων	94
3.1.7 Μοριακές αναλύσεις	96
3.1.8 Στατιστική επεξεργασία	100
3.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΕΝΟΦΘΑΛΙΣΜΟΥ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΖΥΜΩΝ ΚΑΙ ΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ ΖΥΜΩΣΗ ΤΩΝ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΚΟΝΣΕΡΒΟΛΙΑ ΚΑΙ ΚΑΛΑΜΩΝ, ΤΟ ΦΑΙΝΟΛΙΚΟ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ, ΤΗΝ ΥΦΗ ΚΑΙ ΤΑ ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	101
3.2.1 Προετοιμασία δειγμάτων και μέθοδος ζύμωσης	101
3.2.2 Στελέχη και παρασκευή εμβολίου	102
3.2.3 Μικροβιολογικές αναλύσεις	102
3.2.4 Φυσικοχημικές αναλύσεις	104
3.2.5 Ανάλυση υφής	106
3.2.6 Οργανοληπτική αξιολόγηση επιτραπέζιων ελιών	107
3.2.7 Στατιστική επεξεργασία	107

3.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΜΥΚΗΤΩΝ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΙΣ ΜΑΥΡΕΣ ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΕΣ ΕΛΙΕΣ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΥΠΟΣΤΕΙ ΖΥΜΩΣΗ ΣΕ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗ ΚΛΙΜΑΚΑ	108
3.3.1 Δείγματα άλμης	108
3.3.2 Παρασκευή θρεπτικών υλικών	108
3.3.3 Απομόνωση μυκήτων	108
3.3.4 Μοριακή ταυτοποίηση των μυκήτων	108
3.3.5 Βιοχημικές αναλύσεις	111
 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	 116
4.1 ΜΕΛΕΤΗ ΑΥΘΟΡΜΗΤΗΣ, ΑΕΡΟΒΙΑΣ ΖΥΜΩΣΗΣ ΦΥΣΙΚΩΣ ΩΡΙΜΩΝ ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΩΝ ΕΛΙΩΝ	116
4.1.2 Μεταβολή μικροβιακού πληθυσμού κατά την αερόβια ζύμωση	116
4.1.3 Βιοχημικός χαρακτηρισμός των απομονωμένων ζυμών και γαλακτικών βακτηρίων	118
4.1.4 Επιλογή ζυμών ως υποψήφιων εναρκτήριων καλλιιεργειών	118
4.1.5 Επιλογή γαλακτικών βακτηρίων ως υποψήφιων εναρκτήριων καλλιιεργειών	121
4.1.6 Επίδραση αερόβιας ζύμωσης σε φυσικοχημικούς παράγοντες	121
4.1.7 Επίδραση αερισμού στη μεταβολή των αναγόντων σακχάρων του ελαιοκάρπου	123
4.1.8 Προσδιορισμός ολικών φαινολικών στην άλμη και στον καρπό	125
4.1.9 Ποσοτικοποίηση φαινολικών ενώσεων στην άλμη των ζυμούμενων ελιών	126
4.1.10 Επίδραση του αερισμού στα πτητικά συστατικά του καρπού των επεξεργασμένων ελιών	127
 4.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΥ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΖΥΜΩΝ ΚΑΙ ΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ ΖΥΜΩΣΗ ΤΩΝ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΚΟΝΣΕΡΒΟΛΙΑ ΚΑΙ ΚΑΛΑΜΩΝ	 139
4.2.1 Αποτελέσματα μικροβιολογικών αναλύσεων	139
4.2.2 Φυσικοχημικές αναλύσεις σε άλμη κατά τη διάρκεια της ζύμωσης της ελιάς	144
4.2.3 Μελέτη των φαινολικών συστατικών στη άλμη	148
4.2.4 Ποσοτικός προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων στην άλμη	155
4.2.5 Ανάλυση των πτητικών ενώσεων του ελαιοκάρπου	159
4.2.6 Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών	178
4.2.7 Συνεκτικότητα καρπού	180
4.2.8 Οργανοληπτική αξιολόγηση	182
 4.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΜΥΚΗΤΩΝ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΙΣ ΜΑΥΡΕΣ ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΕΣ ΕΛΙΕΣ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΥΠΟΣΤΕΙ ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ ΖΥΜΩΣΗ ΣΕ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗ ΚΛΙΜΑΚΑ	 185
4.3.1 Ταυτοποίηση απομονωμένων μυκήτων	185
4.3.2 Τεχνολογικά και χαρακτηριστικά ασφαλείας μυκήτων	187
4.3.3 Επιλογή υποψήφιων στελεχών μυκήτων για χρήση ως καλλιιεργειών εκκίνησης	189
 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	 191

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	193
ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	199
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	225
ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ	225

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα έρευνα μελετήθηκε η αερόβια αυθόρμητη ζύμωση των επιτραπέζιων ποικιλιών, Καλαμών και Κονσερβολιάς. Οι αερόβιες συνθήκες επιτεύχθηκαν διαβιβάζοντας αέρα στους περιέκτες. Στα δείγματα πραγματοποιήθηκαν φυσικοχημικές αναλύσεις (pH, ογκομετρούμενη οξύτητα, αλατότητα, σάκχαρα, φαινολικές και πτητικές ενώσεις), αλλά και μικροβιολογικές αναλύσεις, ώστε να μελετηθεί η πιθανή μεταβολή της μικροβιακής χλωρίδας κατά τη ζύμωση.

Η επικρατέστερη μικροβιακή ομάδα στις άλμες των δυο ποικιλιών ήταν οι ζύμες. Εξι απομονώσεις από την ποικιλία Κονσερβολιά διέθεταν τη δράση της β-γλυκοσιδάσης, ενώ ταυτόχρονα δεν παρουσίασαν την ικανότητα παραγωγής βιογενών αμινών. Αντίθετα, πέντε απομονώσεις από την ποικιλία Καλαμών παρουσίασαν τη δράση της β-γλυκοσιδάσης, αλλά τα αποτελέσματα έδειξαν ότι διέθεταν την ικανότητα παραγωγής βιογενών αμινών. Το γεγονός αυτό τις καθιστά μη αποδεκτές για χρήση ως εναρκτήριες καλλιέργειες. Τελικά, ταυτοποιήθηκαν δυο γαλακτικά βακτήρια σε επίπεδο γένους (*Lactiplantibacillus*) και τρία είδη ζυμών (*Candida boidinii*, *Zygoascus steatolyticus*, *Candida butyri*), ως πιθανοί εκκινητές σε μελλοντικές ζυμώσεις.

Η γλυκόζη που αποτέλεσε και το κυριότερο σάκχαρο και στις δυο ποικιλίες, καταναλώθηκε μέσα σε 90 ημέρες στις Καλαμών και αρκετά πιο νωρίς, μέσα σε 65 ημέρες στις ελιές Κονσερβολιά.

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν και τα πτητικά συστατικά των ζυμωμένων επιτραπέζιων ελιών των ποικιλιών Καλαμών και Κονσερβολιά μέσω ανάλυσης SPME/GC-MS. Συνολικά, ανιχνεύθηκαν και ημιποσοτικοποιήθηκαν 42 πτητικές ενώσεις στην Κονσερβολιά και 29 στην Καλαμών, ταξινομημένες σε αλδεΐδες, κετόνες, αλκοόλες, λιπαρά οξέα, υδρογονάνθρακες και τερπένια. Η μελέτη αποκάλυψε σημαντικές διαφοροποιήσεις στη συγκέντρωση αυτών των ενώσεων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Η κυρίαρχη ομάδα ενώσεων ήταν οι αλκοόλες με επικρατέστερη την αιθανόλη.

Επιπλέον, μελετήθηκαν τα αποτελέσματα διαφορετικών μεθόδων εμβολιασμού με επιλεγμένα στελέχη, ζυμομυκήτων και βακτηρίων γαλακτικού οξέος (LAB), με σκοπό την αναερόβια ελεγχόμενη ζύμωση δύο ελληνικών ποικιλιών ελιάς,

Κονσερβολιά και Καλαμών. Τα στελέχη LAB που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ο *Leuconostoc mesenteroides* K T5-1 και ο *Lactobacillus plantarum* A 135-5, ενώ οι ζύμες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ο *Saccharomyces cerevisiae* KI 30-16 και ο *Debaryomyces hansenii* A 15-44 για τις ελιές Καλαμών και Κονσερβολιά, αντίστοιχα.

Η διαδικασία της ζύμωσης, και των δυο ποικιλιών, παρακολουθήθηκε με τη διεξαγωγή μικροβιολογικών αναλύσεων, παρακολούθηση μεταβολών του pH, προσδιορισμό ογκομετρούμενης οξύτητας και αλατότητας, προσδιορισμό σακχάρων και πτητικών ενώσεων. Οι ποιοτικές μεταβολές που παρατηρήθηκαν στις φαινολικές ενώσεις της άλμης μελετήθηκαν χρησιμοποιώντας υγρή χρωματογραφία/ με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων λυχνίων και ανιχνευτή μαζών με σύστημα ηλεκτροψεκασμού ιόντος (LC/DAD/ESI-MSⁿ) και ποσοτικοποιήθηκαν μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Οι φαινολικές ενώσεις των επεξεργασμένων ελιών Καλαμών αποτελούνταν από φαινολικά οξέα, βερμπασκοζίτη, καφεοϋλο-6-σεκολογανοζίτη, κομσελογοζίτη και η διαλδεϋδική μορφή του αποκαρβοξυμεθυλ ελενολικού οξέος συνδεδεμένο με υδροξυτυροσόλη, ενώ ο ολεοζίτης και ο ολεοζίτης-11-μεθυλεστέρας ταυτοποιήθηκαν μόνο σε άλμη ελιών Κονσερβολιάς. Το πτητικό προφίλ και η οργανοληπτική αξιολόγηση αποκάλυψαν ότι ο εμβολιασμός «MIX» (συν-εμβολιασμός με στελέχη ζύμης και LAB) οδήγησε στις πιο αρωματικές και αποδεκτές ελιές Καλαμών. Για τις επιτραπέζιες ελιές Κονσερβολιά, η μεταχείριση «YL» (διαδοχικός εμβολιασμός ζύμης και μετά βακτήριο) έδωσε το πιο αρωματικό και γενικά πιο αποδεκτό προϊόν.

Εκτός από τα βακτήρια γαλακτικού οξέος και τους ζυμομύκητες που διεξάγουν κυρίως τη ζύμωση της ελιάς, στην επιφάνεια της άλμης μπορούν να αναπτυχθούν μύκητες, κάτι που μπορεί να έχει είτε αρνητική επίδραση είτε να ωφελήσει τη διαδικασία της ζύμωσης. Όσον αφορά στην ασφάλεια των τροφίμων, οι εμφανιζόμενοι μύκητες θα μπορούσαν να παράγουν μυκοτοξίνες, συνεπώς είναι σημαντικό να παρακολουθείται και να ελέγχεται ο πληθυσμός τους. Έτσι, πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση μυκήτων σε δυο ελληνικές επιτραπέζιες ελιές, την Κονσερβολιά και την Καλαμών. Στην ποικιλία Καλαμών, η ανάλυση αποκάλυψε ένα στέλεχος *Penicillium commune* και ένα στέλεχος *P. crustosum*, ενώ στην ποικιλία Κονσερβολιά ανιχνεύτηκαν δυο στελέχη *P. crustosum* και ένα στέλεχος *P. roqueforti*. Μια ομάδα πέντε επιλεγμένων απομονώσεων υποβλήθηκε σε βιοχημικό έλεγχο (β-γλυκοσιδάση και λιπάσης, δράση πρωτεασών, πηκτινολυτικών και ξυλανολυτικών

δράσεων) και σε αξιολόγηση ασφάλειας (μη παραγωγή βιογενών αμινών). Ο συνδυασμός των παραπάνω αποτελεσμάτων που προέκυψαν, έδωσε τη δυνατότητα να επιλεγθεί ένα ενδιαφέρον στέλεχος, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εκκινητής σε μελλοντικές ζυμώσεις μαζί με ζύμες και βακτήρια γαλακτικού οξέος. Συγκεκριμένα, το στέλεχος *P. roqueforti* ITEM 16754 κρίθηκε κατάλληλο για τη ζύμωση της ποικιλίας Κονσερβολιάς, καθιστώντας το υποψήφιο στέλεχος για μελλοντικές μελέτες ως συννεκινητής μαζί με ζυμομύκητες και βακτήρια γαλακτικού οξέος για την παραγωγή μαύρης επιτραπέζιας ελιάς.

ABSTRACT

In the present study, the aerobic spontaneous fermentation of table olive varieties Kalamon and Conservolea was investigated. Aerobic conditions were achieved by supplying air to the fermentation vessels. Physicochemical analyses (pH, titratable acidity, salinity, sugars, phenolic, and volatile compounds) were performed on the samples, along with microbiological analyses, to study the potential changes in the microbial flora during fermentation.

The predominant microbial group in the brines of both olives was yeasts. Six isolates from the Conservolea variety exhibited β -glucosidase activity, while they did not have the ability to produce biogenic amines. In contrast, five isolates from the Kalamon variety showed β -glucosidase activity, but at the same time were found to have the ability to produce biogenic amines. This fact makes them unsuitable for use as starter cultures. Finally, two lactic acid bacteria (*Lactiplantibacillus*) were identified at genus level and three yeast species (*Candida boidinii*, *Zygoascus steatolyticus*, *Candida butyri*), were isolated as potential starter cultures for future fermentations.

Glucose, the main sugar in both varieties, was completely consumed within 90 days in Kalamon olives and significantly earlier, within 65 days, in Conservolea olives.

In this study, the volatile compounds of fermented table olives from the Kalamon and Conservolea varieties were analyzed using SPME/GC-MS. A total of 42 volatile compounds were detected and semi-quantified in Conservolea and 29 in Kalamon, categorized into aldehydes, ketones, alcohols, fatty acids, hydrocarbons, and terpenes. The study revealed significant variations in the concentration of these compounds throughout fermentation. The dominant group of compounds was alcohols, with ethanol being the most prevalent.

The effect of different inoculation strategies was studied for selected starters yeasts and lactic acid bacteria (LAB) used for the anaerobic fermentation process of the two olive varieties, Conservolea and Kalamon. The LAB strains applied were *Leuconostoc mesenteroides* K T5-1 and *Lactobacillus plantarum* A 135-5; the selected yeast strains were *Saccharomyces cerevisiae* KI 30-16 and *Debaryomyces hansenii* A 15-44 for Kalamon and Conservolea olives, respectively. Table olive

fermentation processes were monitored by performing microbiological analyses, and by monitoring changes in pH, titratable acidity and salinity, sugar consumption, and the evolution of volatile compounds. Structural modifications occurring in phenolic compounds of brine were investigated during the fermentation using liquid chromatography/diode array detection/ electrospray ion trap tandem mass spectrometry (LC/DAD/ESI-MSⁿ) and quantified by high-performance liquid chromatography (HPLC) using a diode array detector. Phenolic compounds in processed Kalamata olive brines consisted of phenolic acids, verbascoside, caffeoyl-6-secologanoside, comselogoside, and the dialdehydic form of decarboxymethylelenolic acid linked to hydroxytyrosol, whereas oleoside and oleoside 11-methyl ester were identified only in Conservolea olive brines. Volatile profile and sensory evaluation revealed that the 'MIX' (co-inoculum of yeast and LAB strain) inoculation strategy led to the most aromatic and acceptable Kalamon olives. For the Conservolea table olives, the 'YL' treatment gave the most aromatic and the overall most acceptable product.

Apart from lactic acid bacteria and yeasts, mainly responsible for the olive fermentation, molds can develop on the brine surface, and can have either deleterious or useful effects on this process. In this respect, identification of molds associated to the two Greek fermented black table olives cultivars, was carried out.

A group of 5 selected isolates was subjected to technological (beta-glucosidase, cellulolytic, ligninolytic, pectolytic, and xylanolytic activities; proteolytic enzymes) and safety (biogenic amines) characterization. Combining both technological (presence of desired and absence of undesirable enzymatic activities) and safety aspects (no or low production of biogenic amines and regulated mycotoxins), it was possible to select one strain with biotechnological interest. This is a putative candidate for future studies as autochthonous co-starters with yeasts and lactic acid bacteria for natural table olive production.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι επιτραπέζιες ελιές είναι προϊόντα ζύμωσης υψηλής διατροφικής αξίας λόγω των συστατικών τους, όπως οι αντιοξειδωτικές ενώσεις και τα ακόρεστα λιπαρά οξέα. Η ζύμωση των επιτραπέζιων ελιών, παρά την οικονομική της σημασία, πραγματοποιείται εμπειρικά από τη βιομηχανία επιτραπέζιας ελιάς. Η διαδικασία πραγματοποιείται αυθόρμητα μέσω της συνεργιστικής δράσης της αυτόχθονης μικροχλωρίδας των ελιών, δηλαδή των βακτηρίων γαλακτικού οξέος (LAB), των ζυμομυκήτων και των Εντεροβακτηρίων (Hurtado et al., 2012). Ωστόσο, το είδος των μικροοργανισμών που θα κυριαρχήσει κατά τη διάρκεια της ζύμωσης εξαρτάται από τις φυσικοχημικές συνθήκες που επικρατούν (Abriouel et al., 2011; Sánchez Gómez et al., 2006; Tassou et al., 2002; Tassou et al., 2007), τη διάχυση των ζυμώσιμων συστατικών προς την άλμη και την παρουσία αντιμικροβιακών ενώσεων (π.χ. φαινολικών ενώσεων), κάτι που καθιστά τη διαδικασία μη επαρκώς ελεγχόμενη.

Μέχρι σήμερα, έχουν διεξαχθεί αρκετές μελέτες σε πειραματικό στάδιο, στις οποίες εφαρμόστηκαν επιτυχώς εναρκτηρίες καλλιέργειες. Το αυξανόμενο ενδιαφέρον για την εφαρμογή νέων καλλιεργειών εκκίνησης στις επιτραπέζιες ελιές αποσκοπεί στον καλύτερο έλεγχο της διαδικασίας ζύμωσης, στον περιορισμό της δραστηριότητας ανεπιθύμητων μικροοργανισμών και στην ενίσχυση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του τελικού προϊόντος.

Στην πλειονότητα των ερευνών αυτών, χρησιμοποιήθηκαν στελέχη βακτηρίων γαλακτικού οξέος ως καλλιέργειες εκκίνησης, είτε μόνα τους είτε σε συνδυασμό με ζύμες. Ο *Lactobacillus pentosus* και ο *Lactobacillus plantarum* είναι τα πιο συχνά απομονωμένα είδη σε επιτραπέζιες ελιές. Τα υπόλοιπα είδη, με ελάχιστες εξαιρέσεις, έχουν χρησιμοποιηθεί είτε μεμονωμένα είτε σε συνδυασμό με τα προαναφερθέντα είδη (Panagou et al., 2008; Sabatini et al., 2008). Επιπλέον, πρόσφατες δημοσιεύσεις τονίζουν τη σημασία της επιλογής ζυμομυκήτων ως καλλιεργειών εκκίνησης κατά τη διάρκεια της ζύμωσης της επιτραπέζιας ελιάς (Bonatsou et al., 2015; Rodríguez-Gómez et al., 2012; Silva et al., 2011).

Τα κύρια εμπορικά προϊόντα επιτραπέζιας ελιάς περιλαμβάνουν τις πράσινες ελιές ισπανικού τύπου, τις τεχνητά μαυρισμένες ελιές με οξείδωση τύπου Καλιφόρνιας και τις φυσικές μαύρες ελιές. Από αυτές, οι φυσικές μαύρες ελιές παράγονται στις περισσότερες μεσογειακές χώρες εδώ και αιώνες. Για την παρασκευή

όλων αυτών των εμπορικών τύπων, η αναερόβια ζύμωση στα βαρέλια, όπου τοποθετείται προς ζύμωση ο νωπός καρπός, κρίνεται απαραίτητη. Ωστόσο, η απουσία αέρα κατά τη ζύμωση έχει ως αποτέλεσμα τον εγκλωβισμό του CO₂ κάτω από την επιδερμίδα του καρπού (δημιουργία πολλές φορές φλυκταινών) (Juarez-Romero et al., 2015). Η αερόβια ζύμωση των φυσικώς ώριμων ελιών της ποικιλίας Hojiblanca μελετήθηκε σε εργαστηριακή κλίμακα πριν από πολλά χρόνια (Garcia et al., 1985), και αυτή η τεχνολογία χρησιμοποιείται επί του παρόντος για την παραγωγή των πράσινων ελιών (De Castro et al., 2007). Πρόσφατα, αναφέρθηκε η βιομηχανική εφαρμογή της αερόβιας ζύμωσης σε φυσικές μαύρες ελιές της ποικιλίας Empeltre (Medina et al., 2020). Γενικότερα, στη βιβλιογραφία υπάρχουν λίγες μελέτες σχετικά με την αερόβια ζύμωση των επιτραπέζιων ελιών και καμία από αυτές δεν αφορά τις ελληνικές ποικιλίες Καλαμών και Κονσερβολιά.

Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης των επιτραπέζιων ελιών, μπορεί να αναπτυχθεί μούχλα στην επιφάνεια της άλμης, σχηματίζοντας ένα λεπτό στρώμα. Κατά τη διατήρηση του προϊόντος στην αγορά, η ανάπτυξη της μούχλας μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ορατών μυκηλίων. Γενικά, οι μύκητες θεωρούνται μικροοργανισμοί αλλοίωσης, προκαλώντας μαλάκωμα της σάρκας και ανάπτυξη μουχλιασμένης γεύσης, οσμής και εμφάνισης. Στις επιτραπέζιες ελιές, τα πιο αντιπροσωπευτικά αναγνωρισμένα γένη μυκήτων είναι το *Aspergillus* και το *Penicillium* (Fernandez, et al., 1997).

Η παρουσία των μυκήτων έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη αποδοχή του προϊόντος από τους καταναλωτές, ενώ παράλληλα μπορεί να επηρεάσει την ασφάλεια του τροφίμου, καθώς οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή μυκοτοξινών. Η εμφάνιση του *Penicillium citrinum* και του *P. verrucosum* κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, ιδιαίτερα στις μαύρες ελιές, συνδέθηκε με την παραγωγή της ωχρατοξίνης Α (OTA) και κιτρινίνης, ενώ η επιμόλυνση με την αφλατοξίνη Β1 (AFB) σχετίζεται κυρίως με τον *Aspergillus flavus* σε αλλοιωμένες ελιές κατά την ξήρανση και την αποθήκευση (El Adlouni et al., 2006; Ghitakou et al., 2006; Heperkan et al., 2006; Heperkan et al., 2009).

Ακόμα κι αν τα επίπεδα μυκοτοξινών στις επιτραπέζιες ελιές είναι χαμηλά για να προκαλέσουν κάποια βλάβη στην υγεία (Medina-Pradas and Arroyo-López, 2015), οι πράσινες και οι μαύρες επιτραπέζιες ελιές θεωρούνται σημαντική πηγή μυκοτοξινών, καθώς η συγκέντρωσή τους μπορεί να αυξηθεί κατά την αποθήκευση των ελιών. Έτσι, έχουν προταθεί ορισμένα μέτρα για τη μείωση της μούχλας και

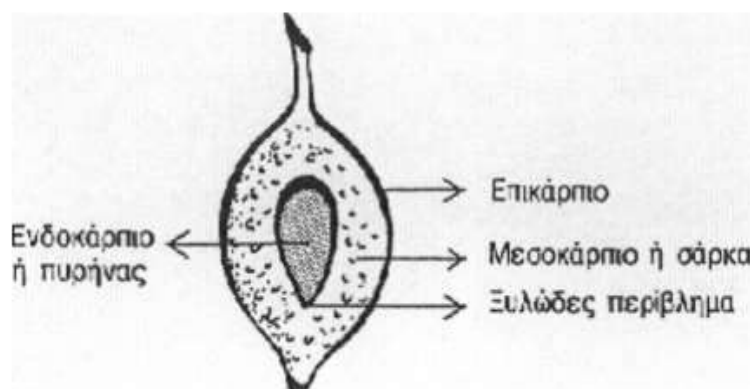
παραγωγής μυκοτοξινών για όλο το μήκος της παραγωγικής αλυσίδας της επιτραπέζιας ελιάς, με το να εφαρμόζεται σωστή πρακτική χειρισμού κατά τη διάρκεια της συγκομιδής και έλεγχος των συνθηκών αποθήκευσης (θερμοκρασία, συσκευασία, αλατότητα).

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Χημική σύσταση-διατροφική αξία των επιτραπέζιων ελιών

1.1.1 Δομή ελαιοκάρπου

Ο καρπός του ελαιοδέντρου είναι δρύπη (Σχήμα 1.1), όμοια με τις κοινές δρύπες των πυρηνοκάρπων, όπως το ροδάκινο, το δαμάσκηνο κ.τ.λ. Ο ελαιοκάρπος αποτελείται από τρία κύρια μέρη τα οποία είναι α) το επικάρπιο ή επιδερμίδα (1,5-3 % του συνολικού βάρους), β) το μεσοκάρπιο ή σάρκα (68-81 % του συνολικού βάρους), και γ) το ενδοκάρπιο ή κουκούτσι (10-30% του συνολικού βάρους). Οι παραπάνω αναλογίες επηρεάζονται από την ποικιλία της ελιάς, τις καλλιεργητικές φροντίδες που εφαρμόζονται, την πορεία των καιρικών συνθηκών, το έδαφος και το στάδιο ωριμότητας του καρπού (Boskou et al., 1996).



Σχήμα 1.1: Ο καρπός της ελιάς σε εγκάρσια τομή

Η ημερήσια ποσότητα κατανάλωσης ελιάς για έναν υγιή ενήλικα είναι περίπου 25 g ελιές την ημέρα ή περίπου 7 καρποί ελιάς. Αυτή η ποσότητα μπορεί να μειωθεί σε παχύσαρκα ή με υψηλή αρτηριακή πίεση άτομα ή να αυξηθεί στην περίπτωση που υπάρχουν υψηλές απαιτήσεις σε ενέργεια και μέταλλα όπως στους αθλητές.

Τα κύρια συστατικά της σάρκας του ελαιοκάρπου είναι τα ακόλουθα: 1) το νερό, 2) οι λιπαρές ουσίες, 3) τα σάκχαρα (μονο- και ολιγο-ζαχαρίτες) συμπεριλαμβανομένης και της μαννιτόλης, 4) άλλοι πολυζαχαρίτες (κυτταρίνες, ημικυτταρίνες, κόμμεα, πεντοζάνες πηκτίνες, κ.τ.λ.), 5) οι πρωτεΐνες, 6) τα οργανικά

οξέα, 7) οι ταννίνες-πολυφαινόλες, 8) οι βιταμίνες, 9) οι χρωστικές (υδατο- και λιποδιαλυτές), 10) τα ανόργανα συστατικά.

Η κατανομή και η δομή των χημικών συστατικών στον καρπό της ελιάς είναι πολύπλοκη και εξαρτάται από παραμέτρους όπως η ποικιλία, οι καλλιεργητικές πρακτικές, η γεωγραφική προέλευση και το επίπεδο ωρίμανσης.

1.1.2 Το νερό ή υγρασία σάρκας

Το νερό είναι το κύριο συστατικό της επιτραπέζιας ελιάς (65-72 %). Η ποσότητα του νερού επηρεάζει σημαντικά το σχήμα του. Το σχήμα του καρπού είναι κανονικό όταν τα κύτταρα βρίσκονται σε πλήρη σπαργή και συρρικνώνεται όταν το ποσοστό του νερού είναι μικρότερο από το κανονικό. Το ποσοστό του νερού που περιέχεται στον ελαιόκαρπο εξαρτάται από το στάδιο ανάπτυξης του, την ποικιλία και τις συνθήκες που επικρατούν κατά την ωρίμανση. Όσο αυξάνεται η ελαιοπεριεκτικότητα, τόσο ελαττώνεται η περιεκτικότητα σε νερό.

Στον κυτταρικό χυμό, συστατικά όπως σάκχαρα, οργανικά οξέα, ταννίνες, ελευρωπαΐνη και άλλα, βρίσκονται διαλυμένα στο νερό (Kiritsakis, 1998).

1.1.3 Λιπαρές ουσίες

Τα λιπίδια είναι το κύριο συστατικό των επιτραπέζιων ελιών, με συνολικό εύρος λιποπεριεκτικότητας 6–30 g/100 g βρώσιμου μέρους (López-López, et al., 2010, Boskou, 2017). Το προφίλ των λιπαρών οξέων παρουσιάζει διαφορές από ποικιλία σε ποικιλία. Οι διαφορές αυτές πιθανώς να οφείλονται στη μεταβολική συμπεριφορά κάθε ποικιλίας σε σχέση με τα γενοτυπικά χαρακτηριστικά (Durante et al., 2018). Ωστόσο, το επικρατέστερο λιπαρό οξύ στις βρώσιμες ελιές είναι το ελαϊκό (περίπου 80 %) και ακολουθούν το παλμιτικό, το λινελαϊκό (ω -3), το στεατικό, το λινολενικό (ω -6) και το παλμιτελαϊκό.

Τα λιπαρά οξέα συνδέονται με το φρουτώδες άρωμα αλλά και τις νότες τυριού, λιπαρού και ταγγού. Όπως έχει αναφερθεί για τα κρασιά, έτσι και για τις επιτραπέζιες ελιές, τα λιπαρά οξέα μπορούν να παίξουν σημαντικό ρόλο στην ισορροπία του αρώματος, ενισχύοντας την πολυπλοκότητα του, μέσω της υδρόλυσης των αντίστοιχων εστέρων (Gil, 2006).

Κατά την επεξεργασία με οποιονδήποτε τρόπο δεν υπάρχουν απώλειες λιπαρών. Τυχόν αύξηση της ελαιοπεριεκτικότητας στον επεξεργασμένο καρπό είναι φαινομενική και οφείλεται στην απώλεια υδατοδιαλυτών συστατικών από τη σάρκα.

1.1.4 Σάκχαρα (μονο- και ολιγοσακχαρίτες)

Η περιεκτικότητα σε σάκχαρα στον ελαιοκάρπο είναι από μόνη της χαμηλότερη από κάθε άλλο βρώσιμο καρπό (Marsilio, 2001). Τα απλά σάκχαρα που απαντώνται στον καρπό της ελιάς είναι η γλυκόζη, η φρουκτόζη, η μανόζη, η γαλακτόζη, η σακχαρόζη και η μαννιτόλη.

Ωστόσο, οι επιτραπέζιες ελιές έχουν ακόμη χαμηλότερες αναλογίες αυτών των ενώσεων, καθώς κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ζύμωσης ή αποθήκευσης του προϊόντος, οι μικροοργανισμοί που υπάρχουν στην άλμη καταναλώνουν τα σάκχαρα.

Τα σάκχαρα του ελαιοκάρπου, ανάλογα με την ακολουθούμενη τεχνική επεξεργασίας του:

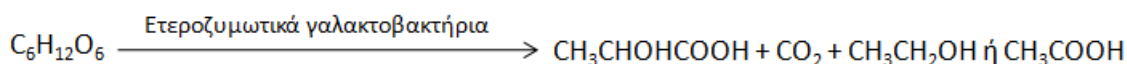
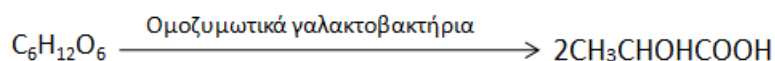
- ζυμώνονται από τα γαλακτικά βακτήρια ή ζύμες,
- οξειδώνονται από τους μύκητες, τα οξειδωτικά βακτήρια και τις οξειδωτικές ζύμες,
- κατανέμονται πρακτικά σε ίσες ποσότητες μεταξύ της σάρκας και της άλμης, μέσα στην οποία είναι εμβαπτισμένος ο καρπός.

Υπό ομαλές συνθήκες αποτελούν υπόστρωμα για τα γαλακτικά βακτήρια, με την δράση των οποίων μετατρέπονται σε γαλακτικό οξύ. Η ζύμωση μπορεί να είναι:

Ομογαλακτική κατά την οποία θεωρητικά όλα τα σάκχαρα μετατρέπονται προς γαλακτικό οξύ.

Ετερογαλακτική κατά την οποία θεωρητικά το ήμισυ των ζυμώσιμων συστατικών μετατρέπεται προς γαλακτικό οξύ και το υπόλοιπο προς διοξείδιο του άνθρακα και οξικό οξύ ή αιθανόλη.

Σχηματικά οι αντιδράσεις είναι οι ακόλουθες:



Η μετατροπή και στη μια και στην άλλη περίπτωση δεν είναι ποτέ 100 % γιατί μέρος των σακχάρων μεταβολίζεται και από άλλους μικροοργανισμούς (οξειδωτικούς), αλλά και από τα ίδια τα γαλακτικά βακτήρια για κυτταροπλασία και

κάλυψη των μεταβολικών τους αναγκών. Στην πραγματικότητα, η ζύμωση γίνεται από μικτό πληθυσμό ομο- και ετεροζυμωτικών γαλακτοβακτηρίων. Ένας συντελεστής 0,85-0,90 έχει εφαρμογή στις προηγούμενες γενικές αντιδράσεις, που δεν είναι στοιχειομετρικές (Μπαλατσούρας, 2004). Θεωρητικά 1 μόριο γλυκόζης δίνει 2 mol γαλακτικού οξέος, όμως στην πραγματικότητα μέρος των σακχάρων καταναλώνεται από τα γαλακτικά βακτήρια (για κυτταροπλασσία και ενδοκυτταρικές διεργασίες), από ετεροζυμωτικά βακτήρια (που δεν παράγουν μόνο γαλακτικό οξύ, αλλά και CO₂, αιθανόλη, οξικό οξύ, κ.λπ.) και άλλα οξειδωτικά βακτήρια και ζύμες.

1.1.5 Υδατάνθρακες - Μη σακχαροειδείς πολυσακχαρίτες

Οι πολυσακχαρίτες που υπάρχουν στον ελαιόκαρπο αποτελούνται από την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη. Η περιεκτικότητα της ημικυτταρίνης στο σάρκωμα και στο φλοιό του ώριμου και νωπού ελαιόκαρπου κυμαίνεται από 1 μέχρι 5 %, ενώ της κυτταρίνης από 3 μέχρι 6 %. Στο ενδοκάρπιο (ή πυρήνας) το περιεχόμενο σε κυτταρίνη ανέρχεται στο 2 % περίπου και στο ξυλώδες μέρος του ενδοκαρπίου φτάνει το 38 % (Αλυγιζάκης, 1982).

Άλλη ομάδα πολυσακχαριτών μεγάλου ενδιαφέροντος είναι οι πηκτίνες. Το ενδιάμεσο τμήμα των κυττάρων στον πράσινο ελαιόκαρπο περιέχει πρωτοπηκτίνες αδιάλυτες στο νερό, που κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης μετατρέπονται σε πηκτίνες και τελικά σε πηκτινικά οξέα κατά την υπερωρίμανση. Οι πηκτίνες, ή μάλλον ο βαθμός μετασχηματισμού τους, επηρεάζουν τη συνεκτικότητα του καρπού, καθώς και άλλες φυσικοχημικές ιδιότητες του σαρκώματος. Η περιεκτικότητα του σαρκώματος του νωπού καρπού σε πηκτίνες κυμαίνεται από 0,3-1,5 % με μοριακό βάρος περίπου 100.000 (Boskou et al., 2015).

Οι Cardoso et al. (2010) μελέτησαν τη μεταβολή των πολυσακχαριτών του κυτταρικού τοιχώματος των ποικιλιών Taggiasca και Κονσερβολιά κατά την ελληνικού τύπου επεξεργασία τους. Η ποσότητα των διαφόρων πολυσακχαριτών που ανακτήθηκε από νωπές και μεταποιημένες ελιές της ποικιλίας Taggiasca δεν μεταβλήθηκε με την επεξεργασία. Ωστόσο, οι πηκτίνες έγιναν πιο διαλυτές στο υδατικό διάλυμα ως αποτέλεσμα της επεξεργασίας. Για τις ελιές ποικιλίας Κονσερβολιά, το σύνολο των ανακτηθέντων πολυσακχαριτών αυξήθηκε ως αποτέλεσμα της επεξεργασίας, και αυτό καθορίστηκε κυρίως από το υψηλότερο ποσοστό σε πολυσακχαρίτες πλούσιους σε γαλακτουρονάνη. Αυτά τα αποτελέσματα

υποδηλώνουν πως η εμφάνιση του ελαιοκάρπου στην άλμη συνέβαλε στην αύξηση της κατακράτησης των πολυσακχαριτών πλούσιων σε γαλακτουρονάνη και/ή στη διέγερση της βιοσύνθεσης νέων πολυσακχαριτών, όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενες έρευνες (Mafra et al., 2006; Mafra et al., 2007).

1.1.6 Φυτικές ίνες

Οι επιτραπέζιες ελιές αποτελούν μια καλή πηγή φυτικών ινών, με υψηλό ποσοστό πεπτικότητας (Jimenez, et al., 2000, López-López, et al., 2007). Έχουν μεγάλη σπουδαιότητα διότι συμβάλλουν στην πραγματοποίηση όλων των λειτουργιών της πέψης και στην πρόληψη του καρκίνου του παχέος εντέρου. Στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Reg. CE 1924/2006 και Reg. UE 116/2010) είναι δυνατόν να αναγράφεται στην ετικέτα η ένδειξη «πηγή ινών» εάν το προϊόν περιέχει τουλάχιστον 3 g ίνας/100 g ελιάς. Εάν το προϊόν περιέχει τουλάχιστον 6 g ίνας/100 g ελιάς (όπως μπορεί να συμβαίνει σε ορισμένες ποικιλίες) θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ο ισχυρισμός «με υψηλή περιεκτικότητα σε ίνες». Τα περισσότερα παρασκευάσματα έχουν περιεκτικότητα σε ίνες ≥ 3 g/100 g ελιάς, επομένως αυτά μπορούν να θεωρηθούν ως πηγή ινών.

1.1.7 Τα οργανικά οξέα

Τα οργανικά οξέα (οξαλικό, ηλεκτρικό, μηλικό, κιτρικό και γαλακτικό) υπάρχουν σε σχετικά χαμηλό ποσοστό στον καρπό, έτσι ώστε να δώσουν στον πολτό ελιάς συνολική οξύτητα μεταξύ 4-10 g/kg (εκφραζόμενη σε κιτρικό οξύ) και pH μεταξύ 3,8 και 5,0. Η περιεκτικότητα σε οξαλικό και μηλικό οξύ μειώνεται κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης και η περιεκτικότητα σε κιτρικό οξύ αυξάνεται, ενώ το ηλεκτρικό οξύ φαίνεται ότι παραμένει σταθερό. Επιπλέον, η αναλογία κιτρικού και μηλικού οξέος μειώνεται κατά την διάρκεια της ωρίμανσης για να φτάσει, κατά τη στιγμή της μέγιστης συσσώρευσης λαδιού τιμές κοντά στο 1 (Garrido et al., 1997).

Κατά τα πρώτα στάδια επεξεργασίας με άλκαλι, στις ισπανικού τύπου και στις τεχνητώς μαύρες ελιές, τα οργανικά οξέα εξουδετερώνονται και γι' αυτό δεν έχουν ιδιαίτερη σημασία. Για τις φυσικώς ώριμες όμως ελιές, τα οργανικά οξέα είναι σημαντικά γιατί μεταφέρονται κατά το ήμισυ στην άλμη που καλύπτει τις ελιές και εξασφαλίζουν στα πρώτα στάδια ελαφρώς όξινο (pH 5,5-6,0) περιβάλλον στο προϊόν.

1.1.8 Οι πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες της σάρκας των ελιών είναι οι αδιάλυτες και οι διαλυτές στο νερό. Οι τελευταίες υπόκεινται σε μερική απώλεια όταν ο καρπός εμβαπτιστεί σε νερό, άλμη, σε διάλυμα καυστικού νατρίου κ.τ.λ. οπότε κατανέμονται εξίσου μεταξύ σάρκας και διαλύματος που καλύπτει τις ελιές.

Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες είναι χαμηλή (1,0-2,0 g), αλλά η διατροφική αξία είναι υψηλή με την παρουσία απαραίτητων αμινοξέων για τους ενήλικες, όπως η θρεονίνη, η βαλίνη, η λευκίνη, η ισολευκίνη, η φαινυλαλανίνη και η λυσίνη (Young, 1994), και για τα παιδιά, η αργινίνη, η ιστιδίνη και η τυροσίνη (Imura & Okada, 1998). Το ασπαραγινικό και το γλουταμινικό οξύ είναι τα πιο αντιπροσωπευτικά αμινοξέα, ωστόσο μετά από την επεξεργασία του καρπού (πράσινες ελιές, τεχνητές μαύρες κ.τ.λ.) η συγκέντρωση των αμινοξέων θρεονίνη, βαλίνη, λευκίνη και αργινίνη είναι >100 mg (Πίνακας 1.1).

Πίνακας 1.1: Αμινοξέα ορισμένων Ιταλικών ποικιλιών (ιχ=ίχνη) (Lanza et al., 2012)

Αμινοξύ (mg/100 g ελιάς)	Επεξεργασμένες πράσινες ελιές Intosso	Ferrandina μαύρες ελιές Majatica	Φυσικές μαύρες ελιές Peranzana
ασπαραγινικό οξύ	150	214	131
θρεονίνη	70	129	80
σερίνη	80	124	74
γλουταμινικό οξύ	150	226	128
προλίνη	50	ιχ	ιχ
γλυκίνη	70	115	65
αλανίνη	80	115	66
βαλίνη	60	104	63
ισολευκίνη	100	86	50
λευκίνη	140	173	98
φαινυλαλανίνη+τυροσίνη	100	168	117
λυσίνη	10	18	ιχ
ιστιδίνη	30	26	28
αργινίνη	70	120	68
Άλλα αμινοξέα	ιχ	ιχ	ιχ

1.1.9 Οι βιταμίνες

Οι επιτραπέζιες ελιές είναι επίσης πλούσιες σε φυσικά αντιοξειδωτικά, όπως ορισμένες βιταμίνες. Παρέχουν μικρές ποσότητες υδατοδιαλυτών βιταμινών της ομάδας Β, καθώς και λιποδιαλυτών βιταμινών, όπως η προβιταμίνη Α και η βιταμίνη Ε, που θεωρείται ότι έχουν ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Η περιεκτικότητα σε βιταμίνη C είναι χαμηλή (<1 mg/kg ελιάς). Ωστόσο, πολλά εμπορικά προϊόντα πράσινης ελιάς περιέχουν ασκορβικό οξύ ως προστιθέμενο αντιοξειδωτικό, το οποίο ενσωματώνεται στα τελικά συστατικά του προϊόντος και αυξάνει την περιεκτικότητά του σε βιταμίνη C. Η συγκέντρωση της συγκεκριμένης βιταμίνης ενδέχεται να μειώνεται προοδευτικά κατά την παραμονή του προϊόντος στο ράφι ωστόσο, ανάλογα με τον χρόνο που έχει μεσολαβήσει από τη συσκευασία, οι επιτραπέζιες ελιές μπορούν τελικά να αποτελέσουν μια ενδιαφέρουσα πηγή βιταμίνης C.

Η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA, 2015) ορίζει την επαρκή πρόσληψη βιταμίνης Ε (μόνο ως α-τοκοφερόλη) στο 11 και 13 mg/μέρα για τις γυναίκες και τους άνδρες, αντίστοιχα.

Με βάση τα στοιχεία που προέκυψαν από αυτή τη μελέτη, μια μερίδα (15 g) επιτραπέζιων ελιών μπορεί να παρέχει από 4,0 % (Καλαμών) έως 8,0 % (Κονσερβολιά) της ημερήσιας συνιστώμενης βιταμίνης Ε για ενήλικες.

1.1.10 Ανόργανα συστατικά

Η συγκέντρωση των ανόργανων στοιχείων στις βρώσιμες ελιές ποικίλει και σχετίζεται άμεσα με το είδος της επεξεργασίας για την παρασκευή του συγκεκριμένου τύπου ελιάς. Γενικά, το αλάτι χρησιμοποιείται πάντα στις βρώσιμες ελιές και επομένως το νάτριο βρίσκεται σε αφθονία σε αυτά τα προϊόντα. Η συγκέντρωση άλλων στοιχείων είναι επίσης σημαντική.

Το κάλιο, που βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα στην πρώτη ύλη, παραμένει στο τελικό προϊόν σε σημαντικά επίπεδα, με μια ιδιαίτερα σημαντική συγκέντρωση στις πράσινες ελιές Ισπανικού τύπου. Το ασβέστιο βρίσκεται επίσης σε υψηλή αναλογία και ενσωματώνεται συχνά στην άλμη της φυσικά μαύρης ελιάς. Η παρουσία του είναι απαραίτητη για την πρόληψη του μαλακώματος (De Castro et al., 2007).

Η χαμηλότερη συγκέντρωση μαγνησίου εμφανίζεται σε φυσικά μαύρες ελιές, γιατί οι πράσινες χρωστικές που περιέχουν μαγνήσιο έχουν αντικατασταθεί από τις πορφυρές ενώσεις ανθοκυάνης.

Ο φώσφορος βρίσκεται σε μεγάλες ποσότητες τόσο στις πράσινες ελιές Ισπανικού τύπου, όσο και στις πράσινες ελιές άμεσα συντηρημένες σε άλμη ελιές. Το ίδιο ισχύει περίπου για το χαλκό και τον ψευδάργυρο. Τα επίπεδα μαγγανίου είναι σχετικά χαμηλά σε όλους τους τύπους βρώσιμη ελιάς.

Ο σίδηρος ιδιαίτερα στις μαυρισμένες με οξείδωση ελιές (Garcia et al., 2001) και ο χαλκός, ο οποίος έχει χαρακτηριστική επίδραση στην απορρόφηση του σιδήρου από τον οργανισμό, βρίσκονται σε αναλογίες υψηλότερες απ' ότι σε οποιοδήποτε άλλο καρπό. Η μέγιστη επιτρεπόμενη συγκέντρωση σιδήρου είναι τα 150 mg/kg (IOOC, 2004). Το ασβέστιο περιέχεται στα χημικά προϊόντα που χρησιμοποιούνται για την καλλιέργεια των ελαιοδέντρων και κατά συνέπεια ένα μέρος από αυτό μπορεί να απορροφηθεί από τον καρπό.

Η συγκέντρωση του ψευδαργύρου είναι χαμηλή και με μη σημαντικές ($p>0,05$) διαφορές μεταξύ των ποικιλιών κατά την επεξεργασία (Antonio Lopez & Pedro Garcia, 2008).

1.1.11 Φαινολικές ενώσεις

Η περιεκτικότητα του καρπού σε φαινολικά συστατικά κυμαίνεται από 1-3 % του νωπού βάρους του καρπού. Οι φαινολικές ενώσεις είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη ενός τουλάχιστον αρωματικού δακτυλίου (C6) με ένα ή περισσότερα υδροξύλια και αποτελούν μια ιδιαίτερα σημαντική κατηγορία φυτικών αντιοξειδωτικών. Οι φαινολικές ενώσεις του καρπού της ελιάς είναι κυρίως γλυκοζίτες σεκοϊριδοειδών ενώσεων (όπως η ελευρωπαΐνη και ο λιγκστροζίτης), φλαβονών (γλυκοζίτης της λουτεολίνης), φλαβονολών (ρουτίνη), ελενολικού οξέος και του βερμπασκοζίτη (παράγωγο του καφεϊκού οξέος) (Petridis et al., 2012; Ryan, et al., 2002). Με την ωρίμανση του καρπού και την αύξηση της υδρολυτικής δράσης, αυξάνονται οι απλές φαινόλες (υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη) καθώς και οι αγλκόνες της ελαιοευρωπαϊνης και του βερμπασκοζίτη (Gómez-Rico et al., 2008). Εκτενής αναφορά των ενώσεων αυτών γίνεται στην Ενότητα 1.4.

Τέλος, πέρα από τη θρεπτική αξία των επιτραπέζιων ελιών, αξίζει να αναφερθεί ότι το προϊόν αυτό, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και ως μέσον για την

ενσωμάτωση προβιοτικών βακτηρίων και μεταφορά βακτηριακών κυττάρων στην ανθρώπινη γαστρεντερική οδό. Οι βιομηχανίες τροφίμων τώρα εστιάζουν στα νέα αυτά τρόφιμα, που αποτελούν μέρος μιας κανονικής διατροφής και μπορούν να συμβάλουν ως προβιοτικά σε λειτουργικά τρόφιμα. Η ενσωμάτωση των βακτηρίων που προάγουν την υγεία στις επιτραπέζιες ελιές θα προσέθετε στα λειτουργικά χαρακτηριστικά των διατροφικών τους ιδιοτήτων.

1.2 Επιτραπέζια ελιά

1.2.1 Ιστορική αναδρομή

Η επεξεργασία του ελαιοκάρπου για την παρασκευή επιτραπέζιων ελιών στη χώρα μας μέχρι και το 1952 γινόταν κατά τρόπο απόλυτα εμπειρικό και αρχέγονο.

Ύστερα από μια περίοδο τριών ετών ερευνών, ιδρύονται το 1955 τα πρώτα πέντε συνεταιριστικά εργοστάσια επεξεργασίας ελιών στα ελαιοκομικά κέντρα Στυλίδας, Άμφισσας, Αγρινίου, Αγριάς Βόλου και στο Πτελιό του δήμου Αλμυρού. Τα εργοστάσια αυτά πλαισιώθηκαν με επιστήμονες χημικούς και άρχισαν να παρασκευάζονται επιτραπέζιες ελιές κάτω από αυστηρό επιστημονικό έλεγχο.

Από τις αρχές της δεκαετίας του 1960 άρχισαν να ιδρύονται πιο σύγχρονα εργοστάσια παρασκευής επιτραπέζιων ελιών, όχι μόνο από τις συνεταιριστικές οργανώσεις, αλλά και με ιδιωτική πρωτοβουλία.

Τέλος, κατά τη δεκαετία του 1970, άρχισαν να κατασκευάζονται οι πολυεστερικές δεξαμενές, που είναι σχήματος κυλινδροσφαιρικού, κλειστές στη κορυφή και που εξασφαλίζουν πλήρη στεγανότητα, αναερόβια ζύμωση και καλή λειτουργικότητα.

1.2.2 Η αγορά των επιτραπέζιων ελιών σε διεθνές και εθνικό επίπεδο

Οι επιτραπέζιες ελιές είναι ο πιο σημαντικός παραδοσιακός ζυμωμένος καρπός ιδιαίτερα στις νοτιοευρωπαϊκές χώρες. Το προϊόν αυτό μαζί με το ελαιόλαδο αποτελούν σημαντικό τρόφιμο της Μεσογειακής διατροφής. Σύμφωνα με τα στοιχεία του Διεθνούς Συμβουλίου Ελαιοκομίας (IOC), η παγκόσμια παραγωγή επιτραπέζιας ελιάς για την ελαιοκομική περίοδο 2024/2025 εκτιμάται σε 3,18 εκατομμύρια τόνους, σημειώνοντας αύξηση 12% σε σχέση με την προηγούμενη περίοδο. Η Ισπανία

διατηρεί την πρωτοκαθεδρία στην παραγωγή, με εκτιμώμενους 794.000 τόνους, αύξηση 15% σε σχέση με την περίοδο 2023/2024.

Η Τουρκία, με εκτιμώμενους 700.000 τόνους, εκτοπίζει την Αίγυπτο από τη δεύτερη θέση, η οποία αναμένεται να παράξει 600.000 τόνους. Η Ελλάδα προβλέπεται να φτάσει τους 238.000 τόνους, υπερδιπλασιάζοντας την παραγωγή της σε σχέση με την προηγούμενη περίοδο. Στην Ελλάδα, οι εξαγωγές επιτραπέζιων ελιών το 2023 ανήλθαν σε 195,5 χιλιάδες τόνους, σημειώνοντας αύξηση 13,1% σε σχέση με το 2022. Αντίθετα, οι ισπανικές εξαγωγές μειώθηκαν κατά 14,6% την ίδια περίοδο.

Στην Ελλάδα, η ελαιοκαλλιέργεια αποτελεί μια από τις πιο παραδοσιακές και περισσότερο διαδεδομένες γεωργικές καλλιέργειες. Αδιαμφισβήτητο το οικολογικό περιβάλλον της χώρας μας είναι άριστο για την καλλιέργεια της ελιάς, ειδικά στις παραθαλάσσιες περιοχές της ηπειρωτικής Ελλάδας και στα νησιά. Στην Ήπειρο σημαντική θέση στη γεωργική δραστηριότητα της κατέχουν η Άρτα, η Πρέβεζα και η Θεσπρωτία. Ωστόσο, η Ήπειρος αν και έχει πολύ μικρή συμμετοχή στο συνολικό δυναμικό της χώρας, η συμμετοχή αυτή είναι κρίσιμη για την τοπική οικονομία και τον παραγωγικό ιστό.

1.2.3 Ελληνικές ποικιλίες επιτραπέζιων ελιών

Στη Ελλάδα, όπως και στις περισσότερες ελαιοπαραγωγικές χώρες, καλλιεργούνται ποικιλίες ελιάς τριών κατηγοριών, οι ελαιοποιήσιμες, οι επιτραπέζιες ή βρώσιμες και οι ποικιλίες διπλής χρήσης.

Η Ελλάδα διαθέτει εξαιρετικές ποικιλίες επιτραπέζιων ελιών, μοναδικές στον κόσμο, με την ποικιλία «Κονσερβολιά» να αναλογεί (περίπου) στο 30 % της εγχώριας παραγωγής, την ποικιλία «Χαλκιδικής» (περίπου) στο 50 % και ποικιλίας «Καλαμών» στο 20 % της παραγωγής καθώς και μικρές ποσότητες Θρούμπας Θάσου και Γαϊδουρελιάς Άστρους (<http://pemetete.gr/elia/i-agora-tis-elia/>).

1.2.3.1 Η Κονσερβολιά

Η ποικιλία Κονσερβολιά είναι μία από τις πιο γνωστές ελληνικές ποικιλίες ελιάς, κυρίως λόγω της χρήσης της για την παραγωγή επιτραπέζιων ελιών. Η Κονσερβολιά καλλιεργείται κυρίως στην Πελοπόννησο και άλλες περιοχές της Ελλάδας.

Μοιάζει με την ισπανική ποικιλία Manzanilla, ποικιλία μεσόκαρπη μέχρι αδρόκαρπη (αρκετά μεγάλος καρπός) μήκους 2-3 εκ. και 2-2,5 εκ. πάχους, μικροπύρηνη με ποσοστό σάρκας γύρω τα 87-90 %. Σχήμα στρογγυλό μέχρι ωοειδές, σάρκα συμπαγή αλλά σχετικά ελλειμματική σε λιπαρές ουσίες και ζυμώσιμα συστατικά, η επιδερμίδα της ελιάς αυτής είναι λεπτή και ελαστική, αλλάζει σταδιακά χρώμα από πράσινο, ρόδινο, ερυθροϊώδες, ιώδες και μαύρο στην υπερωρίμανση της. Η περιεκτικότητα του καρπού σε ελαιόλαδο κυμαίνεται περίπου στο 16 %.

Ωριμάζει από τα μέσα Νοεμβρίου-τέλη Δεκεμβρίου. Όταν προορίζεται για την παραγωγή πράσινης ελιάς ισπανικού τύπου η συλλογή γίνεται δύο μήνες νωρίτερα.

1.2.3.2 Η Νυχάτη Καλαμών (ΠΟΠ)

Η Νυχάτη Καλαμών ή Ελιά Καλαμάτας είναι ίσως η πιο εξαιρετική επιτραπέζια ποικιλία προσαρμοσμένη στο μικροκλίμα και στα εδάφη της Μεσσηνίας απ' όπου διαδόθηκε και στην Λακωνία την Φθιώτιδα και την Αιτωλοακαρνανία. Στη Μεσσηνία και την Αιτωλοακαρνανία πραγματοποιείται και η κυριότερη καλλιέργειά της.

Μεσόκαρπη με κυλινδροκωνικό σχήμα που θυμίζει την ράγα της ποικιλίας του σταφυλιού «Αετονύχι», σάρκα πολύ συμπαγή με περιεκτικότητα λαδιού γύρω τα 25 % και αρκετά ζυμώσιμα συστατικά (3-3,5 % επί υγρής βάσης). Η σχέση σάρκας/πυρήνα είναι 7,5:1 ήτοι 87 % σάρκα. Η επιδερμίδα του ώριμου καρπού αποκτά ένα βαθύ μαύρο χρώμα, η ωρίμανση γίνεται τον Νοέμβρη και παρατείνεται σε περίπτωση υπερπαραγωγής. Ποικιλία αρκετά ανθεκτική στην προσβολή του δάκου.

Το ευνοϊκό κλίμα, η ηλιοφάνεια, ο μικρός κλήρος που επιτρέπει στον παραγωγό να περιποιείται με αγάπη και φροντίδα κάθε δέντρο, είναι στοιχεία που βοηθούν στο να μαζεύεται ο ελαιόκαρπος στο σωστό βαθμό ωρίμανσης, δίνοντας άριστη ποιότητα, όπως σημειώνει το Υπουργείο Γεωργίας, ενώ κάνει λόγο για προϊόν με τεράστια δυναμική.

1.2.3.3 Ελιά Χαλκιδικής ή Γαϊδουρολιά

Ποικιλία διπλής χρήσης αδρόκαρπη, περισσότερο κι από την Κονσερβολιά, με βάρος του καρπού που φτάνει και τα 14 γραμμάρια. Το κιλό απαρτίζεται από 120-140 καρπούς και η σχέση σάρκας/πυρήνα είναι 9:1. Σχήμα κυλινδροκωνικό που

καταλήγει σε θηλή. Η σάρκα δεν είναι πολύ συμπαγής και υστερεί στην περιεκτικότητα ζυμώσιμων συστατικών.

Η ποικιλία αυτή, που καλλιεργείται αποκλειστικά στην Χαλκιδική, μοιάζει αρκετά με την ιταλική *Ascolana tenera*. Κατά την ωρίμανση το χρώμα της επιδερμίδας περνάει διαδοχικά από το πράσινο στο αχυροκίτρινο, στο ρόδινο και τελικά στο ξεθωριασμένο ερυθρόμαυρο, ποτέ μαύρο. Ο προορισμός είναι η παραγωγή πράσινων ελιών ισπανικού τύπου και λαδιού (20 % απόδοση).

1.2.3.4 Μεγαρίτικη

Ποικιλία διπλής χρήσης. Μικρόκαρπη. Η πιο ανθεκτική στην ξηρασία αλλά και με μεγάλη ευαισθησία στην δακοπροσβολή. Καλλιεργείται στην Αττική, τη Βοιωτία, τη Κορινθία, την Ακροναυπλία και την Κυνουρία. Το σχήμα του καρπού είναι κυλινδροκωνικό με μικρή κάμψη. Χρησιμοποιείται για την παραγωγή ελιών «ξηράλατος» και πράσινων τσακιστών σε άλμη.

1.2.3.5 Θρουμπολιά

Ποικιλία μικρόκαρπη διπλής χρήσης, μοναδική για την ιδιότητά της να ξεπικρίζει στο δέντρο με την ωρίμανση κατά την οποία παίρνει χαλκοπράσινο χρώμα. Το τελικό προϊόν είναι γνωστό σαν «ελιά θρούμπα».

Καλλιεργείται στην Αττική, Βοιωτία, Νησιά Αιγαίου και Κρήτη. Το σχήμα του καρπού είναι κυλινδρικό με μικρή κλίση. Παραλλαγή της Θρουμπολιάς καλλιεργείται στην Θάσο αλλά δεν ξεπικρίζει στο δέντρο. Χρησιμοποιείται για την παραγωγή ελιάς «ξηράλατος».

1.2.3.6 Μανάκι - Κοθρέϊκη

Ποικιλία διπλής χρήσης καλλιεργείται κυρίως στην Φωκίδα. Ο καρπός έχει σχήμα σφαιρικό ως ωοειδές, όμοιο με εκείνο της Κονσερβολιάς και ζυγίζει από 2 ως 4 γραμμάρια. Η σάρκα είναι συμπαγής και το χρώμα που αποκτά ο καρπός είναι εντονότερο από εκείνο της Κονσερβολιάς. Μέρος της παραγωγής, με το μεγαλύτερο μέγεθος, αποτελεί αντικείμενο επεξεργασίας και δίνει τελικό προϊόν εξαιρετικό σε ότι αφορά το χρώμα, το συμπαγές της σάρκας και τις οργανοληπτικές ιδιότητες.

1.2.3.7 Καρυδολιά

Καλλιεργείται υπο μορφή διάσπαρτων δέντρων μέσα σε ελαιώνες της ποικιλίας «Κονσερβολιά» κατ' αποκλειστικότητα στην Εύβοια.

1.2.3.8 Ελιά Ηγουμενίτσας

Είναι μάλλον κλώνος της ποικιλίας «Κονσερβολιά» και καλλιεργείται κατ'αποκλειστικότητα στην περιοχή της Ηγουμενίτσας, Πρέβεζας, Παραμυθιάς, Φιλιππιάδας, κ.τ.λ. Το μέσο βάρος του καρπού κυμαίνεται από 3 έως 4,5 γραμμάρια και δεν διαφέρει σημαντικά από τον καρπό της Κονσερβολιάς σε ότι αφορά στα μορφολογικά χαρακτηριστικά, υπολειπόμενος μόνο σε μέγεθος.

1.2.3.4 Μέθοδοι επεξεργασίας του καρπού

Οι μέθοδοι επεξεργασίας ισπανικού, ελληνικού τύπου και Καλιφόρνιας είναι σχεδιασμένοι για την απομάκρυνση της ελευρωπαΐνης, της πικρής φαινολικής ένωσης στον καρπό της ελιάς. Αυτές οι μέθοδοι δεν επηρεάζουν μόνο τα επίπεδα της ελευρωπαΐνης, αλλά επίσης τις συγκεντρώσεις και άλλων φαινολικών που υπάρχουν στο τελικό προϊόν. Το προφίλ των φαινολικών ενώσεων στο τελικό προϊόν διαφέρει σημαντικά μεταξύ των διαφόρων μεθόδων επεξεργασίας. Γενικά, η μέθοδος επεξεργασίας του τύπου Καλιφόρνιας έχει ως αποτέλεσμα να προκύπτουν χαμηλότερες συγκεντρώσεις φαινολικών ενώσεων, ιδιαίτερα της υδροξυτυροσόλης.

1.2.3.5 Μορφές εμπορίας επιτραπέζιων ελιών

Σύμφωνα με το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου (IOOC, 2004), ως επιτραπέζια ελιά ορίζεται ο υγιής καρπός καθορισμένων ποικιλιών του ελαιοδένδρου (*Olea europaea* L.), που επιλέχθηκε για την παραγωγή ελιών των οποίων το μέγεθος, το σχήμα, η αναλογία σάρκα προς κουκούτσι, η λεπτή σάρκα, η γεύση, η συνεκτικότητα και η εύκολη απόσπαση της σάρκας από το κουκούτσι την καθιστούν κατάλληλη προς επεξεργασία.

Σύμφωνα με το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου, οι επιτραπέζιες ελιές διαχωρίζονται σε τρεις βασικές κατηγορίες, ανάλογα με το στάδιο ωρίμανσής τους:

α) Πράσινες ελιές: Οι καρποί συλλέγονται κατά τη διάρκεια της περιόδου ωρίμανσης, πριν την αλλαγή χρώματος και όταν έχουν φτάσει σε ένα κανονικό μέγεθος.

β) Ελιές στο στάδιο αλλαγής χρώματος: Οι καρποί συλλέγονται πριν επιτευχθεί το στάδιο πλήρους ωρίμανσης, στην αλλαγή χρώματος.

γ) Μαύρες ελιές: Οι καρποί συλλέγονται όταν είναι ώριμες ή λίγο πριν την πλήρη ωρίμανση.

Επιπλέον, ανάλογα με την επεξεργασία που έχουν υποστεί διακρίνονται στους παρακάτω εμπορικούς τύπους:

α) Επεξεργασμένες ελιές (treated olives): Πράσινες ελιές, ελιές στο στάδιο αλλαγής χρώματος ή μαύρες ελιές που έχουν υποστεί επεξεργασία με κάποιο άλκαλι, και στη συνέχεια συσκευάζονται στην άλμη όπου ζυμώνονται πλήρως ή μερικώς, και συντηρούνται ή όχι με την προσθήκη κάποιου όξινου μέσου.

β) Φυσικές ελιές: πράσινες ελιές, ελιές στο στάδιο αλλαγής χρώματος σε άλμη ή μαύρες ελιές τοποθετημένες απευθείας στην άλμη στην οποία υπόκεινται σε ζύμωση πλήρως ή μερικώς, και συντηρούνται ή όχι με την προσθήκη κάποιου όξινου μέσου.

β) Αφυδατωμένες και/ή ξηράλατες ελιές: πράσινες ελιές, ελιές στο στάδιο αλλαγής χρώματος σε άλμη ή μαύρες ελιές που είτε έχουν υποστεί είτε όχι ήπια επεξεργασία με αλκαλικό διάλυμα, συντηρούνται σε άλμη ή αφυδατώνονται μερικώς με επίπαση ξηρού αλατιού και/ή θερμού αέρα ή με οποιαδήποτε άλλη τεχνολογική διαδικασία:

δ) Ελιές μαυρισμένες με οξείδωση: πράσινες ελιές, ελιές στο στάδιο αλλαγής χρώματος σε άλμη, ζυμωμένες είτε όχι και μαυρισμένες με οξείδωση με αλκαλικό μέσο είτε όχι. Οι ελιές θα πρέπει να έχουν ενιαίο καφέ προς μαύρο χρώμα. Συντηρούνται σε ερμητικά κλειστούς περιέκτες που έχουν υποστεί θερμική αποστείρωση.

Ωστόσο οι βασικοί εμπορικοί τύποι που παράγονται σήμερα διεθνώς είναι τέσσερις:

1) Οι φυσικές ελιές (natural olives) γνωστές και ως Ελληνικού τύπου. Είναι πράσινες, ξανθές αλλά κυρίως ώριμες μαύρες ελιές που τοποθετούνται απ' ευθείας μέσα σε άλμη όπου ζυμώνονται και ξεπικρίζουν σταδιακά με φυσική ζύμωση.

2) Οι εκπικρισμένες ελιές (treated olives) γνωστές και ως Ισπανικού τύπου. Είναι κυρίως πράσινες ελιές και λιγότερο ξανθές και μαύρες, που αρχικά υφίστανται

εκπίκρυνση με εμβάπτιση σε αραιό διάλυμα NaOH. Ακολουθούν πλυσίματα με νερό για απομάκρυνση του NaOH και στη συνέχεια οι ελιές τοποθετούνται σε άλμη για ζύμωση.

3) Οι τεχνητά μαυρισμένες ελιές με οξείδωση (olives darkened by oxidation) είναι ένας τύπος επιτραπέζιας ελιάς που αναπτύχθηκε αρχικά στην Καλιφόρνια. Είναι συνήθως πράσινες ή ξανθές ελιές φρέσκες ή συντηρημένες σε άλμη, που υποβάλλονται σε μια διαδικασία οξείδωσης με διάλυμα NaOH και έντονο αερισμό. Το τελικό προϊόν υφίσταται θερμική επεξεργασία (παστερίωση) και συντηρείται σε ερμητικά κλειστά δοχεία.

4) Οι ελιές συρρικνωμένης μορφής (dehydrated and/or shriveled olives) είναι ένας τύπος επιτραπέζιας ελιάς με μικρότερη εμπορική σημασία. Πρόκειται για πράσινες, ξανθές και κυρίως μαύρες ελιές που συνήθως παρασκευάζονται με ξηράλατη διαδικασία, δηλαδή με αλάτισμα με χονδρόκοκκο αλάτι σε στρώσεις μέσα σε δεξαμενές ή δοχεία. Με την επίδραση του αλατιού οι ελιές χάνουν υγρά από τη σάρκα τους, συρρικνώνονται σταδιακά και ξεπικρίζουν σχετικά σύντομα (1-2 μήνες).

Αλλά και αυτές υποδιαιρούνται ανάλογα με τον τύπο της ελιάς που τελικά παρασκευάζεται. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι λεπτομέρειες στην επεξεργασία μπορεί να διαφέρουν ακόμη και από εργοστάσιο σε εργοστάσιο.

1.2.4 Επιτραπέζιες ελιές με ΠΟΠ και ΠΓΕ

Η Ευρωπαϊκή Ένωση (Ε.Ε) προκειμένου να στηρίζει τις γεωργικές περιοχές και να ενισχύσει την οικονομία τους, αλλά και για να προωθήσει τα παραδοσιακά προϊόντα θέσπισε από το 1992 τους όρους Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης (ΠΟΠ) και Προστατευόμενη Γεωγραφική Ένδειξη (ΠΓΕ). Τα προϊόντα αυτά έχουν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά λόγω της συγκεκριμένης περιοχής προέλευσης και της διαδικασίας παραγωγής τους και επιτρέπεται να διατίθενται με ειδικό σήμα και να προστατεύονται στην Κοινότητα από τον αθέμητο και συνεχή ανταγωνισμό από άλλα ομοειδή προϊόντα που κυκλοφορούν στην αγορά.

1.2.4.1 Προϋποθέσεις για την κατοχύρωση των όρων ΠΟΠ και ΠΓΕ

Την ένδειξη, προστατευόμενη ονομασία προέλευσης (ΠΟΠ), λαμβάνει:

α) το προϊόν το οποίο κατάγεται από συγκεκριμένο τόπο, περιοχή ή, σε εξαιρετικές περιπτώσεις, χώρα,

β) το προϊόν του οποίου η ποιότητα ή τα χαρακτηριστικά οφείλονται κυρίως ή αποκλειστικά στο ιδιαίτερο γεωγραφικό περιβάλλον που συμπεριλαμβάνει τους εγγενείς φυσικούς και ανθρώπινους παράγοντες και

γ) το προϊόν του οποίου όλα τα στάδια της παραγωγής εκτελούνται εντός της οριοθετημένης γεωγραφικής περιοχής.

Την ένδειξη, προστατευόμενη γεωγραφική ένδειξη (ΠΓΕ) λαμβάνει:

α) το προϊόν το οποίο κατάγεται από συγκεκριμένο τόπο, περιοχή ή χώρα,

β) προϊόν του οποίου ένα συγκεκριμένο ποιοτικό χαρακτηριστικό, η φήμη ή άλλο χαρακτηριστικό μπορεί να αποδοθεί κυρίως στη γεωγραφική του προέλευση και

γ) προϊόν του οποίου ένα τουλάχιστον από τα στάδια της παραγωγής εκτελείται εντός της οριοθετημένης γεωγραφικής περιοχής.

Πίνακας 1.2: Ελληνικές ελιές με Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης (ΠΟΠ) και Προστατευόμενη Γεωγραφική Ένδειξη (ΠΓΕ) (<http://www.minagric.gr/index.php/el/for-farmer-2/2012-02-02-07-52-07>).

Προϊόν/ονομασία	Κατηγορία	
	αναγνώρισης	Όνομα παραγωγών
ΠΟΠ ή ΠΓΕ		
Ελιά Καλαμάτας	ΠΟΠ	ΕΑΣ Μεσσηνίας
Κονσερβολιά Αμφίσσης	ΠΟΠ	ΕΑΣ Φωκίδας
Κονσερβολιά Άρτας	ΠΓΕ	ΕΑΣ Άρτας
Κονσερβολιά Αταλάντης	ΠΟΠ	ΕΑΣ Αταλάντης
Κονσερβολιά Ροβίων	ΠΟΠ	ΑΣ Ροβίων
Κονσερβολιά Στυλίδας	ΠΟΠ	ΕΕΣ Στυλίδας
Θρούμπα Θάσου	ΠΟΠ	ΕΑΣ Καβάλας
Θρούμπα Χίου	ΠΟΠ	ΕΜ Χίου
Θρούμπα Αμπαδιάς	ΠΟΠ	ΕΑΣ Ρεθύμνου
Ρεθύμνης Κρήτης		
Κονσερβολιά Πηλίου	ΠΟΠ	ΕΑΣ Πηλίου
Βόλου		
Πράσινες Ελιές	ΠΟΠ	
Χαλκιδικής		

1.2.5 Ποιοτικά χαρακτηριστικά της επιτραπέζιας ελιάς

1.2.5.1 Εισαγωγή

Η ποιότητα οποιουδήποτε τροφίμου και άρα και της επιτραπέζιας ελιάς είναι η συνισταμένη ορισμένων παραμέτρων και ποιοτικών χαρακτηριστικών μέσω των οποίων προσδιορίζεται ο βαθμός αποδοχής της από το καταναλωτικό κοινό.

Η εκτίμηση ή μέτρηση των ποιοτικών χαρακτηριστικών ενός τροφίμου γίνεται είτε υποκειμενικά από τον ίδιο τον καταναλωτή, οπότε έχει να κάνει με το πώς ανταποκρίνονται οι αισθήσεις του στα χαρακτηριστικά του τροφίμου, είτε αντικειμενικά όταν γίνεται χρήση εργαστηριακών οργάνων και συσκευών με την βοήθεια των οποίων πραγματοποιούνται διάφορες αναλύσεις στα χαρακτηριστικά τροφίμου.

1.2.5.2 Προσδιοριστικοί παράγοντες ποιότητας (ποιοτικά χαρακτηριστικά)

Οι κυριότεροι προσδιοριστικοί παράγοντες της ποιότητας της ελιάς περιγράφονται παρακάτω. Ανάμεσά τους και η θρεπτική-βιολογική αξία, που περιγράφεται στην ενότητα 1.1.

1.2.5.3 Μέγεθος και σχήμα ελαιοκάρπου

Η εκτίμηση του μεγέθους του καρπού πραγματοποιείται με αρκετά καλή ακρίβεια, τόσο μέσω μακροσκοπικής (οπτικής, υποκειμενικής) παρατήρησης όσο και με αντικειμενικές μετρήσεις, όπως η ζύγιση αντιπροσωπευτικού δείγματος ελιών. Το μέγεθος του ελαιοκάρπου είναι ο κύριος προσδιοριστικός παράγοντας ποιότητας και κατά συνέπεια της τιμής πώλησης, όταν βέβαια συνδυάζεται με υψηλή τιμή της αναλογίας σάρκας/ πυρήνα, που πρέπει να είναι ανώτερη του 5.

Το μέγεθος του καρπού είναι διαφορετικό ανά ποικιλία ελιάς. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα, οι ποικιλίες να διαχωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: μικρόκαρπες, μεσόκαρπες και μεγαλόκαρπες. Οι τελευταίες ονομάζονται και αδρόκαρπες και ο καρπός τους σχεδόν πάντα χρησιμοποιείται για επιτραπέζια κατανάλωση ανεξάρτητα από τα υπόλοιπα ποιοτικά χαρακτηριστικά του. Επιτραπέζιες όμως ποικιλίες είναι και πολλές μεσόκαρπες, ενώ είναι ελάχιστες στην κατηγορία των μικρόκαρπων.

1.2.5.4 Μέγεθος του πυρήνα

Πρόκειται για ένα ποιοτικό χαρακτηριστικό με μεγάλη σημασία για την επιτραπέζια ελιά και διαχωρίζει τις ποικιλίες σε τρεις κατηγορίες: τις μακροπύρηνες, τις μεσοπύρηνες και τις μικροπύρηνες. Ένας μικρός πυρήνας σε σχέση με τη συνολική μάζα της ελιάς σημαίνει μεγαλύτερο ποσοστό βρώσιμης σάρκας, κάτι που είναι επιθυμητό για τις επιτραπέζιες ελιές. Οι εμπορικά ποιοτικές ποικιλίες επιτραπέζιων ελιών έχουν αναλογία σάρκας προς πυρήνα μεγαλύτερη από 5:1. Έτσι, οι μακροπύρηνες ποικιλίες δεν έχουν σημασία για τη βιομηχανία, ακόμη και αν είναι αδρόκαρπες (χονδρολιές). Οι μεσαίες είναι αποδεκτές εάν είναι μεσόκαρπες ή αδρόκαρπες και οι τελευταίες είναι ιδεώδεις ειδικά αν είναι αδρόκαρπες. Ο πυρήνας θα πρέπει να είναι εξωτερικά λείος με ελάχιστες και αβαθείς γλυφές να αποχωρίζεται εύκολα από τη σάρκα. Ο πυρήνας του ελαιοκάρπου εκτιμάται κατά προσέγγιση μακροσκοπικά και ακριβώς με ζύγισμα σε ζυγό μέσης ακρίβειας.

1.2.5.5 Σχέση σάρκας προς τον πυρήνα

Είναι ποιοτικό χαρακτηριστικό με μεγάλη σημασία για τον χαρακτηρισμό μιας ποικιλίας ελιάς ως επιτραπέζιας. Όσο μεγαλύτερη είναι η αναλογία σάρκα προς πυρήνα (Σ/Π) (και κυμαινόμενη μεταξύ 5-12:1), τόσο μεγαλύτερη εμπορική αξία έχει ο καρπός.

Ο προσδιορισμός του μεγέθους του καρπού γίνεται με βάση τον αριθμό καρπών που περιλαμβάνονται σε ένα κιλό.

1.2.5.6 Ποιότητα της επιδερμίδας

Η δομή και η σύσταση της επιδερμίδας είναι χαρακτηριστικό με ιδιαίτερη σημασία για την ποιότητα της επιτραπέζιας ελιάς. Η επιδερμίδα είναι εκλεκτή όταν είναι λεπτή και ανθεκτική στις αντίξοες συνθήκες του περιβάλλοντος, όπως είναι οι πρώιμες χαμηλές θερμοκρασίες στο στάδιο της σοδειάς, το αλκαλικό διάλυμα όταν χρησιμοποιείται κατά την επεξεργασία, η θερμοκρασία άνω των 21 °C, η άλμη με περιεκτικότητα σε αλάτι πάνω από μια ορισμένη συγκέντρωση κ.α. Ποικιλίες ελιάς με χοντρή επιδερμίδα είναι μειονεκτικές, πράγμα που διαπιστώνεται στο στάδιο της μάζησης. Η λεπτότητα και η ανθεκτικότητα της επιδερμίδας εκτιμάται και

μακροσκοπικά αλλά και μετά από παρατήρηση στο μικροσκόπιο (Μπαλατσούρας, 1995).

1.2.5.7 Χρώμα της επιδερμίδας

Το χρώμα είναι βασικής σημασίας για την ποιότητα της ελιάς. Στα πρώτα στάδια της επεξεργασίας του ελαιοκάρπου το χρώμα είναι βαθύ πράσινο και μεταπίπτει προοδευτικά σε ανοιχτό πράσινο, κίτρινο-πράσινο, κίτρινο με ρόδινα στίγματα, ρόδινο, ιώδες, μελανό-ιώδες και τελικά μελανό ελαιώδες. Το πράσινο και κίτρινο χρώμα οφείλονται σε λιποδιαλυτές χρωστικές όπως είναι οι χλωροφύλλες, τα καροτένια και άλλες συγγενείς ενώσεις. Ενώ το ρόδινο χρώμα, το ιώδες το μελανό κλπ οφείλονται στις υδατοδιαλυτές ανθοκυάνες (Romani, 2000). Το χρώμα με το οποίο το καταναλωτικό κοινό επιζητεί τον κάθε εμπορικό τύπο ελιάς είναι:

Το βαθύ πράσινο για ελιές πράσινου χρώματος που έχουν εκπικρανθεί με άλκαλι αλλά δεν έχουν υποστεί γαλακτική ζύμωση (*oliva dolcificata*). Στις περιπτώσεις αυτές το χρώμα γίνεται πιο έντονο πράσινο εάν προστεθεί στην άλμη ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C).

Το πράσινο-κίτρινο ως χρυσό-κίτρινο για πράσινες ελιές που έχουν υποστεί πλήρη γαλακτική ζύμωση. Λόγω του όξινου pH αλλά και της δράσης του ενζύμου της χλωροφυλλάσης, αποδομείται το μόριο της χλωροφύλλης και μετατρέπεται σε φαιοφυτίνη και φορφίβια. Ταυτόχρονα αποκαλύπτονται τα καροτένια στα οποία οφείλεται το χρυσό-κίτρινο χρώμα το οποίο είναι επιθυμητό στις πράσινες ελιές γαλακτικής ζύμωσης και στις πράσινες ελιές ισπανικού τύπου.

Το μελανό-ιώδες ή βαθύ μελανό είναι επιθυμητό για τις φυσικώς ώριμες μαύρες ελιές στην άλμη. Οφείλεται σε ανθοκυάνες που συνθέτει ο ελαιοκάρπος στα τελευταία στάδια της ωρίμανσής του (Piga et al., 2005).

1.2.5.8 Υφή της επιδερμίδας

Η συνεκτικότητα της υφής είναι το πρώτο σε σπουδαιότητα χαρακτηριστικό για την ποιότητα της επιτραπέζιας ελιάς, αλλά και κάθε φυτικού τροφίμου. Βρώσιμες ελιές, αλλά και κάθε φυτικό τρόφιμο με υποβαθμισμένη (μαλακή) υφή δεν χάνει απλώς σε ποιότητα, αλλά αχρηστεύεται τελείως. Γενικά, η συνεκτικότητα της σάρκας μειώνεται προοδευτικά κατά την πορεία της ωρίμανσης του καρπού.

Οι παράγοντες που επιδρούν στη συνεκτικότητα της σάρκας είναι βασικά η ποικιλία της ελιάς, η περιεκτικότητα της σάρκας σε λάδι και υγρασία, κυρίως όμως η δομή των ιστών της, που είναι συνάρτηση της περιεκτικότητας σε κυτταρίνες και πηκτίνες κ.τ.λ.

Συνεπώς, η υφή των ελιών είναι εξαιρετική ή καλή όταν η συγκομιδή γίνει στο κατάλληλο στάδιο ωρίμανσης του καρπού, ανάλογα με τον εμπορικό τύπο (πράσινες γαλακτικής ζύμωσης, τεχνητώς μαύρες, φυσικώς ώριμες σε άλμη, μαύρες ξηράλατος κ.τ.λ.) που θα επιλεγθεί για την επεξεργασία του καρπού και όταν ο ίδιος ο καρπός προστατεύεται από φυσικούς και χημικούς παράγοντες που προκαλούν αποδόμηση των συστατικών του (χαμηλές θερμοκρασίες στο στάδιο της σοδειάς, ανάπτυξη οξειδωτικών μικροοργανισμών κ.τ.λ.). Η συνεκτικότητα της σάρκας εκτιμάται υποκειμενικά μέσω της αφής κατά τη συμπίεση της κόντρα στον πυρήνα με τα δύο δάκτυλα, τον δείκτη και τον αντίχειρα. Αντικειμενικά η υφή στα διάφορα οπωροκηπευτικά μετριέται με ειδικά όργανα (πενετρόμετρα). (Bourne, 2002).

1.2.5.9 Η νοθεία

Η νοθεία στην επιτραπέζια ελιά δεν είναι εύκολη, γιατί το μόνο που μπορεί να γίνει είναι ανάμειξη με ελαιόκαρπο κατώτερο, άλλων ποικιλιών. Μια τέτοια, όμως, νόθευση γίνεται εύκολα αντιληπτή μακροσκοπικά, αφού οι διαφορές αφορούν μορφολογικά χαρακτηριστικά, γεύση, άρωμα κ.τ.λ. (Μπαλατσούρας, 1995).

1.2.6 Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της επιτραπέζιας ελιάς

Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά αποτελούν κυρίαρχο παράγοντα επιλογής ενός τροφίμου από τον καταναλωτή. Αυτά βασίζονται στην αξιολόγηση της εμφάνισης, της οσμής, της γεύσης και της υφής μέσω των αισθητηρίων οργάνων. Παρά τις συστηματικές προσπάθειες σε διεθνές επίπεδο, δεν είναι μέχρι στιγμής δυνατός ο προσδιορισμός της οργανοληπτικής ποιότητας ενός τροφίμου με τη χρήση μόνο αναλυτικών οργάνων. Μόνον οι ανθρώπινες αισθήσεις είναι ικανές να περιγράψουν επιτυχώς τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά ενός τροφίμου, με αποτέλεσμα οι μέθοδοι για την οργανοληπτική αξιολόγηση των τροφίμων να παρουσιάζουν σημαντική ανάπτυξη τα τελευταία χρόνια.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι παρά τη συστηματική εξάπλωση και χρήση μεθόδων οργανοληπτικής αξιολόγησης για τον έλεγχο του τελικού προϊόντος, αλλά

και των επιμέρους διεργασιών της παραγωγικής διαδικασίας, λίγες πληροφορίες υπάρχουν για την οργανοληπτική αξιολόγηση της επιτραπέζιας ελιάς, σε σύγκριση με τα διατροφικά χαρακτηριστικά και τη βιολογική αξία που έχουν μελετηθεί σε ικανοποιητικό βαθμό. Προς το παρόν, υπάρχουν αρκετές εμπειρικές μέθοδοι για την αξιολόγηση της επιτραπέζιας ελιάς που συχνά οδηγούν σε διαφορετικά και πολύ συχνά αντικρουόμενα αποτελέσματα. Είναι επομένως σημαντικό να αναπτυχθεί μια κοινά αποδεκτή και αξιόπιστη μεθοδολογία, η οποία μαζί με τα μικροβιολογικά και χημικά χαρακτηριστικά θα αποτελέσει κριτήριο για τον καθορισμό της εμπορικής ποιότητας της επιτραπέζιας ελιάς.

Προς την κατεύθυνση αυτή, το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιοκομίας (ΔΣΕ, IOC) έχει αναπτύξει μια μέθοδο (IOC, 2021) για την οργανοληπτική αξιολόγηση της επιτραπέζιας ελιάς. Σκοπός της μεθόδου είναι η οργανοληπτική ταξινόμηση των επιτραπέζιων ελιών σύμφωνα με το βαθμό έντασης των ελαττωμάτων των καρπών, όπως προσδιορίζονται από μια ομάδα 8-10 κατάλληλα επιλεγμένων και εκπαιδευμένων δοκιμαστών που απαρτίζουν μια ομάδα γευσιγνωσίας.

Η μέθοδος αναφέρει τα απαραίτητα κριτήρια και τη διαδικασία για την οργανοληπτική αξιολόγηση του αρώματος, της γεύσης και της υφής των επιτραπέζιων ελιών και τα συστηματοποιεί με τελικό σκοπό την ποιοτική κατάταξη της ελιάς σε εμπορικές κατηγορίες ποιότητας. Η ταξινόμηση των δειγμάτων, πραγματοποιείται σύμφωνα με την αντιλαμβανόμενη ένταση των αρνητικών και των θετικών οργανοληπτικών ιδιοτήτων της επιτραπέζιας ελιάς (Πίνακες 1.3, 1.4).

Πίνακας 1.3: Ειδικό λεξιλόγιο για την αξιολόγηση των αρνητικών οργανοληπτικών ιδιοτήτων της επιτραπέζιας ελιάς.

Οσφρητικές αρνητικές ιδιότητες του καρπού	
Μη φυσιολογική ζύμωση	<u>Βουτυρική ζύμωση</u> : αίσθηση που θυμίζει βούτυρο ή τυρί. <u>Ζαπατερία</u> : αίσθηση που προκαλείται από το συνδυασμό πτητικών λιπαρών οξέων που θυμίζουν σάπιο δέρμα. <u>Σήψη (δυσοσμία)</u> : αίσθηση που θυμίζει προχωρημένη αποσύνθεση οργανικής ύλης.
Ταγγό	Η οσφρητική αίσθηση που γίνεται αντιληπτή άμεσα, χαρακτηριστικό των ελιών που έχουν υποστεί τάγγισμα.
Μαγειρεμένο (cooking effect)	Η οσφρητική αίσθηση που γίνεται αντιληπτή άμεσα, χαρακτηριστικό των ελιών που έχουν υποστεί υπερβολική θέρμανση κατά τη διάρκεια της παστερίωσης ή αποστείρωσης.

Μεταλλικό	αίσθηση που θυμίζει μέταλλο.
Χώμα	αίσθηση που θυμίζει χώμα ή σκόνη.
Κρασώδες-ξυδάτο	αίσθηση που θυμίζει κρασί ή ξύδι.
Μονχλιασμένο	αίσθηση που γίνεται αντιληπτή άμεσα, χαρακτηριστικό των ελιών που προσβάλλονται από μούχλα.
Σαπωνώδες	αίσθηση που θυμίζει σαπούνι.

Πίνακας 1.4: Ειδικό λεξιλόγιο για την αξιολόγηση των γευστικών και των σχετιζόμενων με την υφή χαρακτηριστικών της επιτραπέζιας ελιάς.

Γευστικά χαρακτηριστικά	Ιδιότητες που σχετίζονται με την υφή
<u>Αλμυρή:</u> Βασική γεύση που παράγεται από υδατικά διαλύματα ουσιών όπως το χλωριούχο νάτριο (αλάτι).	<u>Σκληρότητα:</u> Μηχανικό χαρακτηριστικό υφής που σχετίζεται με την απαιτούμενη δύναμη ώστε να επιτευχθεί παραμόρφωση ενός προϊόντος ή να διαπεραστεί από αιχμηρό αντικείμενο (μαχαίρι, δόντια κλπ). Αξιολογείται με συμπίεση του προϊόντος μεταξύ των δοντιών (στερεά) ή μεταξύ της γλώσσας και του ουρανίσκου (ημι-στερεά).
<u>Πικρή:</u> Βασική γεύση που παράγεται από αραιά υδατικά διαλύματα ουσιών όπως η κινίνη ή η καφεΐνη	<u>Τραγανότητα:</u> Χαρακτηριστικό σχετικά με τον θόρυβο που προκαλείται από τριβή ή σπάσιμο που προκαλείται μεταξύ δύο επιφανειών. Σχετίζεται με τη δύναμη που απαιτείται ώστε να σπάσει ένα προϊόν με τα δόντια και πραγματοποιείται συμπιέζοντας το φρούτο ανάμεσα στους γομφίους.
<u>Οξινή:</u> Βασική γεύση που παράγεται από αραιά υδατικά διαλύματα των περισσότερων οξίνων ουσιών, όπως το τρυγικό οξύ και το κιτρικό οξύ.	<u>Ινώδες:</u> Γεωμετρικό χαρακτηριστικό υφής που σχετίζεται με την αντίληψη του σχήματος και του προσανατολισμού των σωματιδίων σε ένα προϊόν. Αναφέρεται στην επιμήκη μορφή των σωματιδίων, που είναι προσανατολισμένα προς την ίδια κατεύθυνση. Η αξιολόγηση γίνεται αντιληπτή μέσω της γλώσσας και του ουρανίσκου, κατά τη μάσηση του προϊόντος.

1.2.6.1 Οι εγκαταστάσεις και ο απαραίτητος εξοπλισμός για την οργανοληπτική δοκιμή

Η οργανοληπτική δοκιμή γίνεται στις καμπίνες δοκιμών, σε ειδική αίθουσα, η οποία πρέπει να είναι κατάλληλα φωτισμένη και απομονωμένη από το θόρυβο (IOC, 2007). Επιπλέον, θα πρέπει να αερίζεται και να έχει μία σταθερή θερμοκρασία 20°-25°C. Όλες αυτές οι συνθήκες έχουν σκοπό να διευκολύνουν την εργασία των δοκιμαστών και να βελτιώσουν την επαναληψιμότητα και την αναπαραγωγικότητα των αποτελεσμάτων τους.

Το ποτήρια που χρησιμοποιούνται στις δοκιμές έχουν επίσης συγκεκριμένες προδιαγραφές (IOC, 2007), είναι κωδικοποιημένα και καλυμμένα με ύαλο ωρολογίου. Το ποτήρι πρέπει να περιέχει όσες ελιές μπορεί να χωρέσει ο πυθμένας με τρόπο ώστε οι ελιές να τοποθετούνται δίπλα-δίπλα σε ένα μόνο στρώμα. Επιπλέον, οι ελιές πρέπει να καλυφθούν πλήρως από την αντίστοιχη άλμη ζύμωσης (Σχήμα 1.2).

Ο χώρος της δοκιμής πρέπει να είναι εξοπλισμένος ακόμη με πλαστικά ή μεταλλικά οδοντογλυφίδες, πιρούνια, μαχαίρια, κουτάλια ή λαβίδες και ειδικό έντυπο αξιολόγησης χαρακτηριστικών (Σχήμα 1.3), όπου σημειώνεται η ένταση της κάθε αξιολογούμενης αρνητικής και θετικής ιδιότητας σε κλίμακα των 10 cm.



Σχήμα 1.2: Ποτήρι δοκιμών για την οργανοληπτική αξιολόγηση της επιτραπέζιας ελιάς.

1.2.6.2 Προετοιμασία δείγματος, δοκιμή και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων

Η γευσιγνωσία συνιστάται να πραγματοποιείται μεταξύ 10 το πρωί και 12 το μεσημέρι. Οι δοκιμαστές, δεν πρέπει να καπνίσουν ή να πουν καφέ για τουλάχιστον 30 min πριν τη δοκιμή και θα πρέπει να έχουν φάει το λιγότερο μία ώρα πριν. Δεν πρέπει να χρησιμοποιούν κανένα άρωμα, καλλυντικό ή σαπούνι, των οποίων η οσμή θα μπορούσε να διαρκεί μέχρι τη στιγμή της δοκιμής. Επίσης, πρέπει να απέχουν από την γευσιγνωσία και να ενημερώνουν σχετικά τον επικεφαλής του πάνελ σε περίπτωση που αισθάνονται αδιαθεσία και ειδικά όταν επηρεάζονται η αίσθηση της όσφρησης και της γεύσης ή αν αντιμετωπίζουν οποιαδήποτε ψυχολογική κατάσταση που τους αποτρέπει από το να συγκεντρωθούν στην εργασία τους. Σε κάθε γευσιγνωσία θα πρέπει να αναλύονται το πολύ τρία δείγματα και ανάμεσα σε κάθε

δοκιμή οι δοκιμαστές πρέπει να ξεπλένουν το στόμα τους πλήρως με νερό και να κάνουν ένα διάλειμμα τουλάχιστον δεκαπέντε λεπτών.

Κατά τη δοκιμή, ο δοκιμαστής σηκώνει το ποτήρι καλυμμένο με την ύαλο και το αναδεύει με σκοπό να βοηθήσει τα αρώματα του δείγματος να απελευθερωθούν και να αναμειχθούν στον υπερκείμενο χώρο. Ακολούθως η ύαλος αφαιρείται και παίρνοντας αργές βαθιές αναπνοές αξιολογείται το δείγμα. Οι αναπνοές δεν πρέπει να διαρκέσουν περισσότερο από 20 δευτερόλεπτα. Εάν ο δοκιμαστής δεν καταλήξει σε κάποιο συμπέρασμα κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, πρέπει να κάνει μια σύντομη παύση πριν δοκιμάσει ξανά. Στη συνέχεια, τοποθετεί μία από τις ελιές που περιέχονται στο ποτήρι στο στόμα του και τη μασά, αφού αφαιρέσει τον πυρήνα (κουκούτσι), φροντίζοντας να εξαπλωθεί η ελιά σε ολόκληρη την στοματική κοιλότητα.

Για την αξιολόγηση της έντασης της καθεμιάς ιδιότητας, ο δοκιμαστής θα επικεντρωθεί στη σειρά με την οποία τοποθετείται στο έντυπο αξιολόγησης και αναλόγως τοποθετεί την αντίστοιχη ένδειξη στην κλίμακα έντασης του εντύπου γευσιγνωσίας. Στη συνέχεια φτύνει τη μασημένη ελιά, ξεπλένει το στόμα του με νερό και ξαναρχίζει τη διαδικασία. Οι δοκιμαστές ενδέχεται να μην τοποθετήσουν τις ελιές στο στόμα τους όταν παρατηρούν ένα εξαιρετικά έντονο αρνητικό χαρακτηριστικό.

Η ταξινόμηση της ελιάς γίνεται με βάση την τιμή του ελαττώματος που γίνεται αντιληπτό με τη μεγαλύτερη ένταση. Έτσι, εάν για παράδειγμα ένα δείγμα χαρακτηρίζεται από βουτυρική ζύμωση και zapateria ταυτόχρονα, θα πρέπει ο δοκιμαστής να εντοπίσει το ελάττωμα εκείνο με τη μεγαλύτερη ένταση και να βαθμολογήσει σύμφωνα με αυτό.

Ο υπεύθυνος της ομάδας είναι αρμόδιος για την επιλογή, την εκπαίδευση και την παρακολούθηση/αξιολόγηση των δοκιμαστών η οποία γίνεται σύμφωνα με συγκεκριμένο πρότυπο. Επίσης, είναι αρμόδιος για την τήρηση του αρχείου της ομάδας, την παραλαβή και αποθήκευση των δειγμάτων, τη διασφάλιση της ανωνυμίας των δειγμάτων και την κωδικοποίησή τους, τη συγκέντρωση και τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων, την καταγραφή των συσκευών και του εξοπλισμού και εξασφάλιση ότι συμμορφώνονται με τις προδιαγραφές της μεθόδου, καθαρίζονται και συντηρούνται. Τέλος, θα πρέπει να εξασφαλίζει ότι η ομάδα λειτουργεί σωστά.

TABLE OLIVE PROFILE SHEET

	INTENSITY →
PERCEPTION OF NEGATIVE SENSATIONS	
Abnormal fermentation (type)	_____
Other defects (specify)	_____
PERCEPTION OF GUSTATORY SENSATIONS	
Salty	_____
Bitter	_____
Acid	_____
PERCEPTION OF KINAESTHETIC SENSATIONS	
Hardness	_____
Fibrousness	_____
Crunchiness	_____
Sample code:	
Name of taster:	
Date:	

Σχήμα 1.3: Έντυπο αξιολόγησης χαρακτηριστικών της ελιάς σύμφωνα με την επίσημη μέθοδο οργανοληπτικής αξιολόγησης

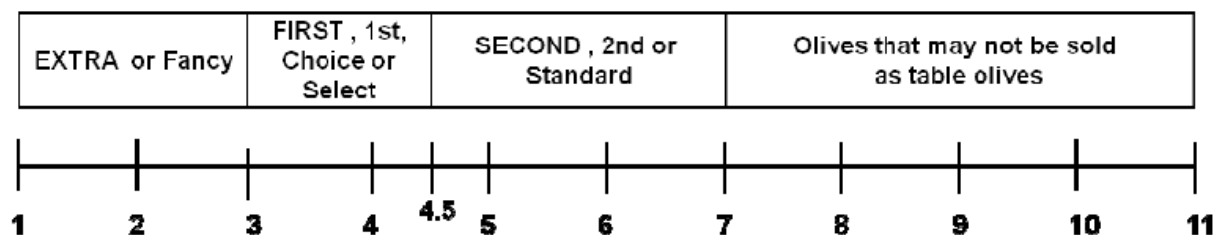
Ωστόσο, θα πρέπει να το καταγράψουν στο έντυπο γευσιγνωσίας στην αντίστοιχη κλίμακα.

Οι δοκιμαστές θα πρέπει να επιλέγονται, εκπαιδεύονται και παρακολουθούνται από τον υπεύθυνο του πάνελ, σύμφωνα με τις ικανότητές τους να διακρίνουν διαφορές μεταξύ παρόμοιων δειγμάτων. Οι δοκιμαστές πρέπει να αξιολογούν τα

δείγματα ανεξάρτητα από τις προσωπικές τους προτιμήσεις, μόνο με τις αισθήσεις που αντιλαμβάνονται.

Ο υπεύθυνος της ομάδας συγκεντρώνει τα έντυπα γευσιγνωσίας που συμπληρώνει ο καθένας από τους δοκιμαστές και ελέγχει τις εντάσεις που καταγράφηκαν από κάθε δοκιμαστή μετρώντας με έναν χάρακα το σημείο που σημείωσε ο δοκιμαστής. Η κλίμακα πρέπει να έχει μήκος 10 cm και η ένταση να κυμαίνεται από 1 έως 11 (Σχήμα 1.4).

Σχήμα 1.4: Κλίμακα μήκος 10 cm όπου σημειώνεται η ένταση από 1 έως 11.



Για την ταξινόμηση των δειγμάτων, ο υπεύθυνος εφαρμόζει τη μέθοδο (Παράρτημα 1, του (IOC, 2021) για τον υπολογισμό της διαμέσου και των διαστημάτων εμπιστοσύνης για κάθε χαρακτηριστικό που αξιολογείται και λαμβάνοντας υπόψη μόνο τα χαρακτηριστικά που έχουν συντελεστή μεταβλητότητας 20% ή λιγότερο, διότι θεωρούνται αρκετά αξιόπιστα.

Η τελική ταξινόμηση περιλαμβάνει τέσσερις κατηγορίες ποιότητας που βρίσκονται σε πλήρη αντιστοιχία με τις κατηγορίες ποιότητας του προτύπου του ΔΣΕ για την εμπορία της επιτραπέζιας ελιάς και είναι:

(α) Extra ή Fancy: $DPP^* \leq 3$

(β) First, Choice ή Select: $3 < DPP \leq 4,5$

(γ) Second ή Standard: $4,5 < DPP \leq 7.0$

(δ) ελιές που δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για κατανάλωση: $DPP > 7,0$

1.3 Φυσικές μαύρες ελιές Ελληνικού τύπου σε άλμη: παρασκευή, μικροβιακή ζύμωση και υπεύθυνοι μικροοργανισμοί

Οι ελληνικού τύπου ελιές είναι γνωστές στην Ελλάδα, την Τουρκία και τη βόρεια Αφρική και είναι το πιο σημαντικό εμπορικό προϊόν ανάμεσα στις μαύρες ελιές, που αντιστοιχούν περίπου στο 33-40 % της παγκόσμιας παραγωγής

επιτραπέζιων ελιών. Τα Ποιοτικά Πρότυπα του Διεθνούς Συμβουλίου Ελαιολάδου τις αποκαλούν ακατέργαστες μαύρες ελιές και τις περιγράφουν ως «τοποθετημένες κατευθείαν σε άλμη». Διαθέτουν φρουτώδη γεύση, που γίνεται πιο έντονα αντιληπτή σε σχέση με τις κατεργασμένες μαύρες ελιές, και συνήθως διατηρούν μία ελαφρά πικρή γεύση. Συντηρούνται με φυσική ζύμωση μέσα στην άλμη (Boskou et al., 2015).

Η κατηγορία των μαύρων ελιών περιλαμβάνει ελιές που το χρώμα τους κυμαίνεται από βαθύ καστανό, ιώδες, μέχρι μελανοϊώδες και η συγκομιδή τους πραγματοποιείται από τα μέσα Οκτωβρίου έως τα τέλη Δεκεμβρίου.

1.3.1 Παρασκευή φυσικών μαύρων ελιών στην άλμη

Ο καρπός μεταφέρεται στις μονάδες επεξεργασίας όπου πραγματοποιείται η ποιοτική διαλογή, η ταξινόμηση κατά μέγεθος και η απόπλυση με υπό πίεση νερό για να απομακρυνθούν από την επιφάνεια του καρπού το χώμα και οι ξένες ύλες. Τέλος, ο καρπός εμβαπτίζεται σε πυκνό διάλυμα άλμης [8-14 % (w/v)]. Η άλμη παίζει σημαντικό ρόλο στη ζύμωση και τη σταθερότητα του τελικού προϊόντος (Balatsouras, 1990). Εκεί παραμένουν μέχρι να ξεπικρίσουν ικανοποιητικά και να καταναλωθούν τα σάκχαρα που εκχυλίζονται από τις ελιές. Το NaCl της άλμης λόγω αρχικά του φαινομένου της όσμωσης και αργότερα της διάχυσης, διαποτίζει τη σάρκα του ελαιοκάρπου με αποτέλεσμα η περιεκτικότητά του σε άλμη να μειώνεται κατά τους χειμερινούς μήνες.

Η διαδικασία της ζύμωσης είναι μακρόχρονη διότι η διάχυση των ζυμώσιμων συστατικών μέσω του φλοιού του καρπού, όταν οι ελιές δεν έχουν επεξεργαστεί πρώτα με κάποιο άλκαλι, είναι αργή (Tassou et al., 2002). Επιπλέον, κάτω από τις επικρατούσες στη χώρα μας κλιματολογικές συνθήκες η ζύμωση των μαύρων ελιών δεν ολοκληρώνεται το φθινόπωρο, γιατί οι θερμοκρασίες είναι χαμηλές. Στην πραγματικότητα η συλλογή των μαύρων ελιών, εκτός ορισμένων εξαιρέσεων, αρχίζει το δεύτερο δεκαπενθήμερο του Οκτώβρη συνεχίζει μέχρι τέλος του φθινοπώρου και πολλές φορές ακόμη και τον χειμώνα.

Οι μεγαλύτερες όμως ποσότητες μαύρων ελιών συλλέγονται το Νοέμβριο και το Δεκέμβριο. Κατά τη διάρκεια του χειμώνα η ζύμωση των μαύρων ελιών σταματά και ξαναρχίζει την άνοιξη με την αύξηση των θερμοκρασιών. Έτσι, η ζύμωση των

μαύρων ελιών στις περισσότερες περιπτώσεις τελειώνει στο τέλος της Άνοιξης ή και λίγο αργότερα στα μέσα του Ιουλίου.

Η ζύμωση των μαύρων ελιών γίνεται κάτω από αναερόβιες συνθήκες όπως γίνεται και η ζύμωση των πράσινων ελιών. Για τον λόγο αυτό μετά την τοποθέτηση του ελαιοκάρπου στα δοχεία ζύμωσης και την πλήρωση με άλμη πρέπει να κλείνονται αεροστεγώς για να αποφεύγεται η ανάπτυξη ανεπιθύμητων μικροοργανισμών που προκαλούν διάφορες αλλοιώσεις στις ελιές.

Μετά τη ζύμωση οι ελιές παραμένουν στις δεξαμενές, ενώ λίγο πριν διοχετευτούν στην αγορά οι μαύρες ελιές ταξινομούνται μηχανικά και τοποθετούνται στον ατμοσφαιρικό αέρα για 24 ώρες έτσι ώστε να βελτιωθεί το χρώμα τους. Η συσκευασία των ελιών γίνεται είτε σε πλαστικά βαρέλια χωρητικότητας 50 kg ή σε πλαστικά ή λευκοσιδηρά δοχεία χωρητικότητας από 3-13 kg ή σε γυάλινα βάζα χωρητικότητας από 350 g μέχρι 2 kg. Αυτά πληρώνονται με νέα άλμη περιεκτικότητας 6-8 %. Το τελικό προϊόν έχει μαύρο χρώμα, ελαφρώς όξινη γεύση και καλά γευστικά και αρωματικά χαρακτηριστικά (Μπαλατσούρας, 1995). Σύμφωνα με το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου (IOC, 2004) το υγρό μέσα στο οποίο θα συσκευαστούν τελικά οι ελιές (εάν δεν είναι ελαιόλαδο) και θα διοχετευτούν στον καταναλωτή πρέπει να έχει τα ακόλουθα χαρακτηριστικά: pH 3,6-4,5, οξύτητα (εκφρασμένη σε % w/v γαλακτικό οξύ) 0,3-1,0 NaCl 8-10 % w/v, εναπομείναντα ανάγοντα σάκχαρα (εκφρασμένα σε % w/v γλυκόζη) 0,2-0,4.

1.3.2 Η μικροβιακή ζύμωση των μαύρων ελιών και οι υπεύθυνοι μικροοργανισμοί

Ο νωπός καρπός μετά τη συγκομιδή παρουσιάζει αναπνευστική δραστηριότητα, όπως όλα τα φρούτα και τα κηπευτικά, και αποδεσμεύει μεγάλα ποσά θερμότητας. Για το λόγο αυτό, η μεταφορά του θα πρέπει να γίνεται όσο το δυνατόν γρηγορότερα στις μονάδες επεξεργασίας, ώστε να οδηγηθεί αμέσως στις δεξαμενές για ζύμωση.

Από τη στιγμή που ο καρπός βρεθεί εμβαπτισμένος στην άλμη και υπό αναερόβιες πρακτικά συνθήκες, αρχίζει αυτόματα η ζύμωση που οφείλεται σε μια μικτή μικροχλωρίδα που ποικίλει κάπως από ποικιλία σε ποικιλία και τον τύπο της επεξεργασίας της ελιάς. Η μικροχλωρίδα περιλαμβάνει μικροοργανισμούς που ανήκουν στην ομάδα των βακτηρίων (γαλακτικών βακτηρίων, *Enterobacteriaceae*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*) και ζυμών, καθώς επίσης και σε κάποιες περιπτώσεις μυκήτων (Botta and Cocolin 2012; Tofalo et al., 2013; Fernandez et al.,

1997). Τα *Enterobacteriaceae*, *Clostridium* και *Pseudomonas* βρίσκονται στον νωπό καρπό και μέχρι το τέλος της ζύμωσης έχουν μηδενιστεί, λόγω της μείωσης του pH.

Οι διάφορες μέθοδοι παρασκευής επιτραπέζιων ελιών μπορούν να επηρεάσουν το μικροβιακό πληθυσμό των νωπών ελιών, καθώς και αυτών που υπάρχουν στην άλμη. Στις μαύρες ελιές, τα βακτήρια που ανήκουν στα γένη *Enterobacteriaceae* (Randazzo et al., 2012), *Kocuria*, *Swaminathania*, *Acetobacter*, και *Pseudomonas* ανιχνεύτηκαν στο αρχικό στάδιο της ζύμωσης με εξαίρεση το γένος *Swaminathania* που ανιχνεύτηκε σε ορισμένες περιπτώσεις και στο τέλος της ζύμωσης (Σχήμα 1.4).

Στο εκλεκτικό περιβάλλον της άλμης ευνοείται η ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων και των ζυμών, οπότε αυτά συνυπάρχουν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και η κατηγορία που επικρατεί καθορίζει τα χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος. Όταν επικρατούν τα γαλακτικά βακτήρια γίνεται γαλακτική ζύμωση, η τιμή του pH του τελικού προϊόντος είναι περίπου 3,8 έως 3,9 και η ογκομετρούμενη οξύτητα μεγαλύτερη από 1 % (w/v εκφρασμένη σε γαλακτικό οξύ) (Ozay and Borcakh 1995; Tassou et al., 2002). Όταν η ζύμωση είναι μικτή (γαλακτική και αλκοολική) τότε η τιμή του pH κυμαίνεται από 4,5-5,5 και η ογκομετρούμενη οξύτητα μεταξύ 0,2-0,5 % (Balatsouras, 1990; Tassou et al., 2002).

Η συγκέντρωση του άλατος παίζει σημαντικό ρόλο, καθορίζοντας το είδος που θα επικρατήσει. Έχει αποδειχθεί ότι σε ζυμώσεις με υψηλές συγκεντρώσεις άλατος στην άλμη (10-14 %) η επικρατούσα μικροβιακή ομάδα είναι οι ζύμες, ενώ σε ζυμώσεις με συγκεντρώσεις άλατος έως 8% ευνοείται η επικράτηση των γαλακτικών βακτηρίων έναντι των ζυμών (Ozay and Borcakh, 1995; Tassou, et al., 2002).

Από την ομάδα των βακτηρίων, τα γαλακτικά βακτήρια (ομο- και ετεροζυμωτικά) είναι αυτά που έχουν μελετηθεί ευρέως, καθώς είναι υπεύθυνα για την παραγωγή αντιμικροβιακών ενώσεων (βακτηριοσίνες) και τη μετατροπή των σακχάρων σε οργανικά οξέα και ιδιαίτερα σε γαλακτικό οξύ. Επίσης, αυτοί οι μικροοργανισμοί μπορούν να αποδομήσουν την ελευρωπαΐνη, με αποτέλεσμα την εκπίκραση των ελιών. Οι Bleve et al., (2014, 2015) ανέφεραν την παρουσία LAB (*Lactobacillus* sp., *L. plantarum*, *L. pentosus*, *Leuconostoc mesenteroides*) που σχετίζονται με το τελικό στάδιο της ζύμωσης (120-180 ημέρες) σε ποικιλίες Leccino και Καλαμών.



Σχήμα 1.4: Βακτήρια και ζύμες που συνδέονται με τα διάφορα στάδια παραγωγής της μαύρης επιτραπέζιας ελιάς (Tufariello, 2010)

Οι ζύμες που ανιχνεύτηκαν σε ελιές ανήκουν στα γένη *Candida*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Issatchenkia*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Torulaspora*, *Wickerhamomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Zygotorulaspora*, με μερικές διαφορές μεταξύ πράσινων και μαύρων ελιών (Σχήμα 1.4). Οι ζυμομύκητες είναι ανιχνεύσιμοι σε όλη τη διαδικασία της ζύμωσης σε όλες τις επιτραπέζιες ελιές. Ο σημαντικός ρόλος των ζυμών κατά την ζύμωση των επιτραπέζιων ελιών έχει αναφερθεί σε προηγούμενες εργασίες (Bevilacqua et al., 2013; Heperkan, 2013). Η ευεργετική τους δράση συνίσταται: στην παραγωγή πτητικών ενώσεων (αιθανόλη, οξικό αιθυλεστέρα, και ακεταλδεΐδη) (Aponte et al., 2012) και μεταβολιτών ικανών να βελτιώσουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος (Garrido et al., 1995), στη δημιουργία θρεπτικών ενώσεων που ενισχύουν την ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων (Arroyo-López et al., 2008; Nisiotou et al., 2010; Bautista-Gallego et al., 2011), στη δράση έναντι ανεπιθύμητων μικροοργανισμών (Psani and Kotzekidou, 2006) και στην αποδόμηση φαινολικών ενώσεων (Ettayebi et al., 2003). Από την άλλη πλευρά, οι ζύμες μπορούν να προκαλέσουν σοβαρά προβλήματα κατά τη διάρκεια της παραγωγής επιτραπέζιων ελιών, όπως σχηματισμό αεροθυλάκων, μαλάκωμα της σάρκας του καρπού, θόλωμα

της άλμης, μείωση κενού στη συσκευασία, διόγκωση της συσκευασίας (package bulging) και παραγωγή ανεπιθύμητων πτητικών ενώσεων (Turantas et al., 1999).

Κατά την ζύμωση των επιτραπέζιων ελιών, οι μύκητες μπορούν να αναπτυχθούν στην επιφάνεια της άλμης και να σχηματίσουν μια παχιά μεμβράνη. Ο ρόλος τους δεν είναι απόλυτα κατανοητός, ωστόσο, θεωρούνται γενικά υπεύθυνοι μικροοργανισμοί για το μαλάκωμα της σάρκας και την ανάπτυξη μούχλας τόσο στη γεύση όσο και στην εμφάνιση, καθώς επίσης και την παραγωγή μυκοτοξινών (Heperkan, 2013). Στις μαύρες «ελληνικού τύπου» επιτραπέζιες ελιές, τα πιο αντιπροσωπευτικά γένη μυκήτων είναι το *Penicillium*, αλλά έχουν απομονωθεί και τα γένη *Aureobasidium*, *Aspergillus* και *Geotrichum* (Fernández et al., 1997).

Κατά την διάρκεια της ζύμωσης οι συνθήκες που επικρατούν είναι αναερόβιες και εμποδίζουν την ανάπτυξη αερόβιων βακτηρίων, ζυμών και μυκήτων στην επιφάνεια των δεξαμενών. Εάν δεν τηρούνται αναερόβιες συνθήκες, ένα στρώμα από μούχλες, ζύμες και βακτήρια πάνω από την επιφάνεια της άλμης, προκαλώντας απομάκρυνση σακχάρων και οξέων, μειώνοντας το pH της άλμης.

1.3.3 Αλλοιώσεις και ασθένειες κατά τη ζύμωση μαύρων επιτραπέζιων ελιών

Οι επιτραπέζιες ελιές είναι ένα ευαίσθητο προϊόν που παρουσιάζει πολλές φορές διάφορες αλλοιώσεις και ασθένειες. Τόσο οι αλλοιώσεις όσο και οι ασθένειες των επιτραπέζιων ελιών παρουσιάζονται σε όλα τα στάδια της επεξεργασίας τους, στο στάδιο της εκπίκρασης, της έκπλυσης, της ζύμωσης, αλλά και μετέπειτα στη συντήρησή τους.

Αλλοιώσεις ονομάζονται όλες οι μεταβολές στη σύνθεση των ελιών και στην άλμη τους, οι οποίες εκδηλώνονται στον καρπό με συρρίκνωση (ζάρωμα) από φυσικά ή χημικά αίτια και με μαλάκωμα των ιστών, που προκαλείται τόσο από χημικούς παράγοντες όσο και από τη δράση ενζύμων. Τα τελευταία είναι εγγενή του καρπού ή εκκρίνονται από πηκτινολυτικούς μικροοργανισμούς.

Ασθένειες καλούνται όλες εκείνες οι επιβλαβείς μεταβολές οι οποίες προκαλούνται από μικροοργανισμούς. Συχνά οι αλλοιώσεις προκύπτουν ως συνέπεια ασθενειών, οι οποίες πάλι μπορούν να εκδηλωθούν εξαιτίας ορισμένων ελαττωμάτων, αλλά μπορεί να συμβεί και το αντίθετο. Οι μικροοργανισμοί οι οποίοι προκαλούν τις ασθένειες των ελιών μπορεί να εισχωρήσουν στο περιβάλλον των ελιών όταν βρουν την κατάλληλη ευκαιρία, κατά την επεξεργασία, τη ζύμωση και τη διατήρησή τους, οι

περισσότεροι όμως βρίσκονται μέσα στο περιβάλλον, γιατί έχουν μεταφερθεί από το νερό τον αέρα και το έδαφος. Για την αποφυγή των ασθενειών πρέπει να τηρούνται με απόλυτη ακρίβεια όλοι οι κανόνες καλής επεξεργασίας, σωστής ζύμωσης και συντήρησης για να μην παρέχεται στους διάφορους αυτούς μικροοργανισμούς ευνοϊκό έδαφος για την ανάπτυξη τους.

1.3.3.1 Αεριοπάθηση ή Κολοβακτηριδίαση ή αεριοβακτηριδίαση (alambrado ή fish eye)

Ένα χαρακτηριστικό σημάδι αυτής της ασθένειας είναι ότι στα αρχικά στάδια της ζύμωσης, η επιφάνεια του καρπού παρουσιάζει μια αυλακωτή όψη, σαν να έχει χαραχθεί με σύρμα. Καθώς η αλλοίωση εξελίσσεται, αρχίζουν να εμφανίζονται εξανθήματα στην επιφάνεια του καρπού που θυμίζουν «μάτι ψαριού», γεγονός που οδήγησε στην ονομασία της αλλοίωσης ως fish-eye στην αγγλική βιβλιογραφία (Lanza, 2013). Παράλληλα, παρατηρούνται ρωγμές (fissures) και φλύκταινες (blisters), οι οποίες σχηματίζονται λόγω της συσσώρευσης διοξειδίου του άνθρακα στο εσωτερικό του καρπού. Σε πιο προχωρημένο στάδιο, οι φλύκταινες αποκτούν τόσο μεγάλο μέγεθος ώστε το ειδικό βάρος των ελιών μειώνεται, με αποτέλεσμα οι προσβεβλημένοι καρποί (floaters) να επιπλέουν στην άλμη. Σε αυτή τη φάση, η υφή των ελιών είναι πλήρως αλλοιωμένη.

Οι υπεύθυνοι για την αεριοπάθηση μικροοργανισμοί είναι αρνητικά κατά Gram βακτήρια που ανήκουν στα γένη *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia* και *Aeromonas*, παρόντες κατά το πρώτο κυρίως στάδιο της ζύμωσης. Οι μικροοργανισμοί καταναλώνουν τα σάκχαρα των καρπών και ελευθερώνουν αέρια (CO_2 και H_2) ως αποτέλεσμα της ζυμωτικής τους δραστηριότητας. Τα αέρια συσσωρεύονται στον καρπό και σχηματίζουν φυσαλίδες αερίου με συνέπεια την καταστροφή του μεσοκαρπίου και το διαχωρισμό του από την επιδερμίδα (Σχήμα 1.5)

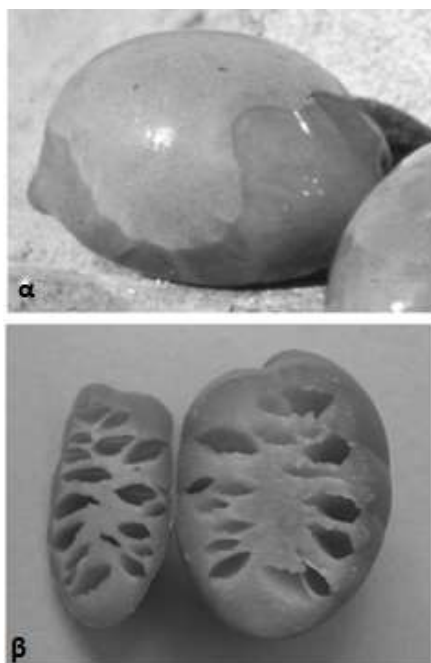
Για να μειωθεί αυτό το φαινόμενο, αρκετοί ερευνητές (Borbolla et al., 1960; Marsilio et al., 2008; Fernandez et al., 1987) ανέπτυξαν ένα σύστημα αερόβιας ζύμωσης, με την εισαγωγή αέρα στους περιέκτες που λαμβάνει χώρα η ζύμωση.

Ο καλύτερος τρόπος να αποφευχθεί αυτή η αλλοίωση είναι η εφαρμογή σωστών μεθόδων χειρισμού των καρπών, ειδικά όσον αφορά στην υγιεινή των εγκαταστάσεων και του προσωπικού που έρχεται σε επαφή με τον ελαιόκαρπο και στη συντήρηση των ελιών σε άλμη που περιέχει 5-7 % μαγειρικό αλάτι. Παράλληλα,

η ανάπτυξη των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων μπορεί να παρεμποδιστεί με έλεγχο της τιμής pH (πρέπει να είναι μικρότερη από 4,5). Η αποτελεσματικότερη μέθοδος αποφυγής της αλλοίωσης είναι η παστερίωση, η οποία αποτρέπει την εμφάνιση και άλλων τύπων αλλοίωσης, όπως είναι η προπιονική ζύμωση.

1.3.3.2 Βουτυρική ζύμωση

Η βουτυρική ζύμωση οφείλεται στην ανάπτυξη σακχαρολυτικών βακτηρίων που ανήκουν στο είδος *Clostridium butyricum* (Anagnostopoulos et al., 2022). Η αλλοίωση εμφανίζεται στο πρώτο στάδιο της ζύμωσης, κυρίως σε άλλους τύπους επιτραπέζιας ελιάς και όχι τόσο στις φυσικώς ώριμες. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι αυξημένα ποσά σακχάρων στην άλμη των φυσικώς ώριμων ελιών δεν ανευρίσκονται ποτέ, διότι η δίοδος των σακχάρων από το μεσοκάρπιο προς την άλμη γίνεται με πολύ βραδύ ρυθμό, διαμέσου της ώσμωσης (οι κυτταροπλασματικές μεμβράνες είναι για πολύ καιρό ζωντανές). Επίσης, η περιεκτικότητα του άλατος συνήθως είναι μεγαλύτερη από 6,5 % και τέλος, κατά τη χειμερινή περίοδο, η θερμοκρασία είναι κάτω από 20 °C.



Σχήμα 1.5: Επιτραπέζιες ελιές που έχουν υποστεί αεριοπάθηση: α) επιδερμίδα και β) μεσοκάρπιο (Lanza, 2013).

Τα κλωστρίδια που παράγουν βουτυρικό οξύ κατά το μεταβολισμό τους, προέρχονται από σπόρια και γι' αυτό είναι ανθεκτικά σε υψηλές θερμοκρασίες και αναπτύσσονται σε αναερόβιες συνθήκες. Η ανάπτυξή τους ελέγχεται από τη συγκέντρωση του χλωριούχου νατρίου στην άλμη και από την τιμή pH. Όταν το νερό που χρησιμοποιείται για το πλύσιμο των ελιών δεν απομακρυνθεί πλήρως, αυξάνεται η τιμή pH στον πυθμένα της δεξαμενής ζύμωσης και δημιουργούνται αναερόβιες συνθήκες. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με τα ζυμώσιμα συστατικά που εκχυλίζονται από τον καρπό στη δεξαμενή, ευνοούν την έναρξη της βουτυρικής ζύμωσης. Έτσι, στο κατώτατο σημείο της δεξαμενής μπορεί να πραγματοποιείται βουτυρική ζύμωση, ενώ στη μέση της δεξαμενής η ζύμωση μπορεί να είναι κανονική.

1.3.3.3 Ασθένεια της δυσσομίας (Zapatera)

Η ασθένεια της Zapatera προσδίδει άσχημη μυρωδιά και γεύση στο τέλος της διαδικασίας ζύμωσης και οφείλεται στη δράση των βακτηρίων του γένους *Clostridium* και *Propionibacterium*, τα οποία αναπτύσσονται σε τιμές pH μεγαλύτερες από το 4,2. Η ζυμωτική δράση αυτών των μικροοργανισμών οδηγεί στο σχηματισμό ασυνήθιστων πτητικών ενώσεων στο τελικό προϊόν και η γεύση που δημιουργείται σε αυτές τις ελιές είναι χαρακτηριστική. Αυτά τα βακτήρια παράγουν κυρίως προπιονικό οξύ και ακολουθούν το βουτυρικό, το ηλεκτρικό, το μυρμηγκικό, το βαλερικό, το καπρονικό και το καπρυλικό οξύ (Sánchez et al., 2002). Η ασθένεια αυτή οφείλεται στη χαμηλή αλατοπεριεκτικότητα της άλμης και του υψηλού pH. Εκδηλώνεται μετά τη γαλακτική ζύμωση και όταν αρχίζει να αυξάνεται η θερμοκρασία του περιβάλλοντος τέλος της άνοιξης-αρχές καλοκαιριού. Μπορεί όμως, να παρουσιαστεί όταν η συντήρηση του προϊόντος δεν είναι σωστή και αναπτύσσονται τα προπιονικά βακτήρια, τα οποία καταναλώνουν το γαλακτικό οξύ με παράλληλη αύξηση της τιμής του pH στην άλμη. Έτσι ο συνδυασμός συγκέντρωσης αλατιού στην άλμη (8 % και άνω) και pH (4-4,5 ή λιγότερο) αποτρέπει την εμφάνιση της ασθένειας.

1.3.3.4 Μαλάκωμα της υφής (softening)

Η σάρκα του ελαιοκάρπου, με την πρόοδο της ωριμάνσης χάνει τη συνεκτικότητα της υφής της. Η απώλεια της συνεκτικότητας που καταλήγει σε

μαλακιά υφή στο στάδιο της υπερωριμάνσης οφείλεται σε δράση εγγενών πηκτινολυτικών και κυτταρολυτικών ενζύμων (κυτασών) (Heredia et al., 1989).

Γενικά, η μαλακιά υφή του ελαιοκάρπου μπορεί να αποφευχθεί με τη συγκομιδή του στο κατάλληλο για τον κάθε εμπορικό τύπο στάδιο ωρίμανσης. Η αδρανοποίηση των ανωτέρω ενζύμων είναι εξασφαλισμένη στις πράσινες ελιές που εκπικρίζονται με άλκαλι, όχι όμως στις φυσικώς ώριμες ελιές, που εμβαπτίζονται σε άλμη. Εκεί, η δράση των ενζύμων παρεμποδίζεται με την αυξημένη αλατοπεριεκτικότητα.

Πηκτινολυτικά ένζυμα εκκρίνουν και πηκτινολυτικοί μικροοργανισμοί, που αναπτύσσονται στην επιφάνεια της άλμης των ελιών. Έχει αποδειχθεί ότι ζύμες με πηκτινολυτική (*Saccharomyces oleaginosus*, *S. kluyveri*, *Hansenula anomala*, *Pichia manshurica*, *Pichia kudriavzevii*, *Candida boidinii*, *Rhodotorulaminuta*, *R. rubra*, *Rhodotorula glutinis*, *Aspergillus niger*, *Penicillium sp.* and *Fusarium sp.*), κυτταρολυτική (*Cellulomonas sp.*) δράση και μούχλες είναι οι υπεύθυνοι μικροοργανισμοί για το μαλάκωμα του καρπού. Αλλά και καλλιέργειες βακτηρίων του γένους *aerobacillus* που έχουν απομονωθεί από πράσινες ελιές έχει βρεθεί ότι προκαλούν μαλάκωμα (Lanza, 2013).

1.3.3.5 Κυάνωση ή γαλάζωμα

Αυτό το είδος αλλοίωσης είναι χαρακτηριστικό στις φυσικές μαύρες ελιές και εκδηλώνεται με την αλλαγή του χρώματος σε κυανό, κυανόγκριζο ή βαθύ κυανό, ανάλογα με το βαθμό προσβολής. Οι μεταβολές στο χρώμα συνοδεύονται με υποβάθμιση της γεύσης και της υφής, ώστε το τελικό προϊόν να είναι ακατάλληλο για κατανάλωση. Το γαλάζιο χρώμα παραμένει σταθερό ακόμα και αν γίνει δραστική επεξεργασία με νιτρικό οξύ ή με άλλους δραστικούς χημικούς παράγοντες.

Οι Αλυγιζάκης και Πάτροκλος (1964) ερεύνησαν τα αίτια εκδήλωσης αυτής της αλλοίωσης στον καρπό και τα κυριότερα συμπεράσματα ήταν τα ακόλουθα:

- Η αλλοίωση εκδηλώνεται με μεγαλύτερη ευκολία και συχνότητα σε ελιές εμβαπτισμένες σε αραιή άλμη με περιεκτικότητα σε αλάτι 6 % ή και λιγότερο.
- Ελιές εμβαπτισμένες σε πυκνή άλμη (11 % αλάτι) μπορούν να εμφανίσουν την αλλοίωση του γαλαζώματος, αν προστεθεί στην άλμη τους 0,3-0,6 % χλωριούχος σίδηρος.

Επίσης, ρόλο στην εκδήλωση αυτής της αλλοίωσης μπορεί να παίζουν οι ανθυγιεινές συνθήκες που επικρατούν στους χώρους που επεξεργάζεται το προϊόν, καθώς και όταν η συγκομιδή γίνει με βροχερό καιρό. Η αλλοίωση εκδηλώνεται αργά την άνοιξη ή κατά το καλοκαίρι στις κάδες, που δεν έχουν την κατάλληλη φροντίδα, συνδυασμένη με ορισμένη τιμή pH (Μπαλατσούρας, 2004).

Έτσι, συνιστάται επεξεργασία σε αναερόβιες συνθήκες και χρήση άλμης 8 % περιεκτικότητας σε αλάτι. Η παστερίωση προλαμβάνει την εμφάνιση του γαλαζώματος, ακόμη και όταν η άλμη είναι αραιή, γεγονός που αποτελεί ένδειξη ότι στην εξέλιξη και εκδήλωση της αλλοίωσης, πιθανώς ευθύνεται και μικροβιακός παράγοντας.

1.3.4 Βελτίωση λειτουργικών ιδιοτήτων των επιτραπέζιων ελιών με τη χρήση προβιοτικών μικροοργανισμών

Τα κηπευτικά που έχουν υποστεί ζύμωση θεωρούνται εξαιρετική πηγή και ένα μέσο για την πρόσληψη των προβιοτικών μικροοργανισμών (Kaltsa et al., 2015; Lavermicocca et al., 2010). Η χρήση επιτραπέζιων ελιών ως πηγή προβιοτικών έχει διερευνηθεί σε αρκετές μελέτες (Abriouel et al., 2014; Argyri et al., 2014; De Bellis et al., 2010; Bautista-Gallego et al., 2013; Bevilacqua et al., 2010; Peres et al., 2014; Blana et al., 2014) κατά τις οποίες, μέσω in vitro μεθόδων, έχουν αξιολογηθεί τα προβιοτικά και τεχνολογικά χαρακτηριστικά των αυτόχθονων LAB που απομονώθηκαν από τη ζύμωση των επιτραπέζιων ελιών.

Σύμφωνα με τον ορισμό του FAO/WHO (FAO/WHO, 2001), τα προβιοτικά είναι «ζωντανοί μικροοργανισμοί που όταν βρίσκονται σε ικανοποιητικούς πληθυσμούς προσφέρουν ευεργετική δράση στην υγεία του καταναλωτή». Η πρόσληψή τους μπορεί να συμβάλει στην ενίσχυση των αντιδράσεων του ανοσοποιητικού συστήματος, τη βελτίωση της ανθεκτικότητας έναντι των λοιμώξεων, στην προστασία από ορισμένα είδη καρκίνου, στη μείωση των επιπέδων της χοληστερόλης και στη μείωση εμφάνισης στεφανιαίας νόσου. Συμμετέχουν επίσης, στην πρόληψη ή τη θεραπεία της νόσου του πεπτικού έλκους, στη θεραπεία της δυσλειτουργικής διάρροιας κατά τη διάρκεια της θεραπείας με αντιβίωση, στη μείωση αλλεργικής φλεγμονής, στην παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών, στη μείωση των συμπτωμάτων δυσανεξίας στη λακτόζη και στη βελτίωση της βιοδιαθεσιμότητας των θρεπτικών ουσιών (Rendueles et al., 2011; Pilavtepe-Çelik et al., 2014).

Για να είναι αποτελεσματικοί για την υγεία οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί, τα τρόφιμα πρέπει να περιέχουν επαρκή πληθυσμό ζώντων βακτηριών (τουλάχιστον 10^6 – 10^7 CFU/g), ενώ η βιωσιμότητά τους πρέπει να παρατείνεται μέχρι το τέλος της ζύμωσης (Blana et al., 2014), αλλά και μετά κατά την αποθήκευση του προϊόντος. Έτσι, τα 80–100 g ελιών πρέπει να περιέχουν $> 10^9$ ζώντα κύτταρα των επιλεγμένων στελεχών για να θεωρηθούν ως προβιοτικά (Lavermicocca et al., 2010).

Όπως προτείνουν διάφοροι συγγραφείς (Bonatsou et al., 2015; Heperkan, 2013; Bevilacqua et al., 2012), οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί, πρέπει να πληρούν τα εξής χαρακτηριστικά: i) αντίσταση και / ή επιβίωση στα χολικά άλατα και στο pH του γαστρικού υγρού, ii) την ικανότητα να προσκολλώνται στο βλεννογόνο του εντέρου και (iii) αντιμικροβιακή δράση κατά των παθογόνων.

1.3.5 Εμβολιασμός της άλμης με καλλιέργειες εκκίνησης (starter cultures)

Η σύνθεση της μικροχλωρίδας και η ανάπτυξή της επηρεάζουν τη διαδικασία ζύμωσης (Botta and Cocolin, 2012) και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος (Hurtado et al., 2010). Είναι γενικά αποδεκτό ότι τα LAB και οι ζύμες είναι οι σημαντικότεροι μικροοργανισμοί που κυριαρχούν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (Hurtado et al., 2012). Ωστόσο, το είδος των μικροοργανισμών που θα κυριαρχήσει εξαρτάται από τις φυσικοχημικές συνθήκες που επικρατούν, τη διάχυση ζυμώσιμων συστατικών στην άλμη και την παρουσία αντιμικροβιακών ενώσεων (π.χ. φαινολικών ενώσεων), καθιστώντας τη διαδικασία μη ελεγχόμενη. Ως εκ τούτου, υπάρχει ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον ως προς την εφαρμογή νέων καλλιεργειών εκκίνησης σε επιτραπέζιες ελιές προκειμένου να επιτευχθεί καλύτερος έλεγχος της διαδικασίας ζύμωσης, καθώς και της δράσης ανεπιθύμητων μικροοργανισμών με τελικό στόχο, να ενισχυθούν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος.

Οι καλλιέργειες εκκίνησης είναι μικροοργανισμοί, ζωντανοί ή αδρανείς, γενικά σε υψηλό αριθμό κυττάρων (πάνω από 10^7 CFU/mL άλμης), οι οποίοι μπορούν να προστεθούν για την ενίσχυση, την επιτάχυνση και τη βελτίωση της διαδικασίας της ζύμωσης μέσω των μεταβολικών τους δραστηριοτήτων.

Σήμερα, αν και οι καλλιέργειες εκκίνησης χρησιμοποιούνται ευρέως στην παραγωγή αλκοολούχων ποτών και γαλακτοκομικών προϊόντων, στον τομέα των

επιτραπέζιων ελιών η πρακτική αυτή, βρίσκεται σε πειραματικό στάδιο και δεν εφαρμόζεται ούτε σε βιομηχανική ούτε σε οικιακή κλίμακα.

Τα γαλακτικά βακτήρια βελτιώνουν το άρωμα και τη γεύση του τελικού προϊόντος (Panagou et al., 2008a) και συμβάλλουν στην καλύτερη διατήρηση των επιτραπέζιων ελιών που οφείλεται στην προοδευτική οξίνιση της άλμης λόγω της παραγωγής γαλακτικού οξέος, καθώς και της παραγωγής αντιμικροβιακών ενώσεων και βακτηριοσινών (Marsilio et al., 2005). Ο εμβολιασμός της άλμης με καλλιέργειες εκκίνησης από επιλεγμένα στελέχη γαλακτικών βακτηρίων που έχουν απομονωθεί από τη φυσική χλωρίδα της ελιάς μπορεί να βοηθήσει σημαντικά στην εξασφάλιση μιας ελεγχόμενης ζύμωσης και στη δημιουργία ενός τελικού προϊόντος με συγκεκριμένα οργανοληπτικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά. Λόγω όμως των δυσκολιών που προκύπτουν από την αλατοπεριεκτικότητα της άλμης, τη θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, την παρουσία παρεμποδιστικών ουσιών (π.χ. φαινολικές ουσίες), την έλλειψη ζυμώσιμων συστατικών, αμινοξέων και βιταμινών (Ruiz-Barba et al., 1993; Garrido Fernández et al., 1997; Montaña et al., 2010), οι καλλιέργειες εκκίνησης δεν εφαρμόζονται ευρέως σε βιομηχανική κλίμακα, αλλά παραμένουν σε πειραματικό στάδιο (Holzapfel, 2002).

Ο *L. plantarum* και ο *L. pentosus* είναι τα γαλακτικά βακτήρια που είναι κυρίως υπεύθυνα για τη φυσική ζύμωση της επιτραπέζιας ελιάς και για τον λόγο αυτό χρησιμοποιούνται σήμερα για τη δημιουργία καλλιεργειών εκκίνησης σε συνδυασμό με άλλα είδη βακτηρίων ή ζυμών (Blana et al., 2014; Bleve et al., 2015; Benítez-Cabello et al., 2019; Paba et al., 2020). Οι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί έχουν χρησιμοποιηθεί σε διαφορετικές μελέτες ως καλλιέργειες εκκίνησης για τον έλεγχο των διαδικασιών της ζύμωσης, υποδεικνύοντας ότι οι μικροοργανισμοί αυτοί έχουν τη δυνατότητα να ελέγξουν μικροβιολογικά τη διαδικασία επικρατώντας έναντι της αυτόχθονης μικροχλωρίδας, να αυξήσουν την απόδοση του γαλακτικού οξέος και να βελτιώσουν την ποιότητα του τελικού προϊόντος (Lamzira et al., 2005; Marsilio et al., 2005; Sabatini et al., 2008; Panagou et al., 2008a; Servili et al., 2006; Bleve et al., 2015). Τα στελέχη κυκλοφορούν στο εμπόριο σε λυοφιλωμένη μορφή και λίγο πριν την προσθήκη τους στην άλμη θα πρέπει να δραστηριοποιούνται σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας, όπως το de Man-Rogosa-Sharp (MRS, Merck 1.10660., Darmstadt, Germany) στο οποίο προστίθεται 4,5 % NaCl (Sánchez et al., 2001). Ανεξαρτήτως της σύστασης του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας, η προσθήκη αλατιού σε περιεκτικότητα 4,5 % είναι απαραίτητη έτσι ώστε η καλλιέργεια εκκίνησης να

προσαρμοστεί καλύτερα στο περιβάλλον της άλμης (Garrido Fernández et al., 1997; Sánchez et al., 2001).

Οι Perpetuini, et al., (2018), χρησιμοποίησαν με επιτυχία για την εκπίκραση (debittering) πράσινων επιτραπέζιων ελιών της ποικιλίας Itrana, μια καλλιέργεια εκκίνησης αποτελούμενη από δύο στελέχη του *L. pentosus*.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η χρήση στελεχών του *L. plantarum* ως καλλιέργειες εκκίνησης έχει μελετηθεί επίσης για την ικανότητά τους να επηρεάζουν θετικά τη διαδικασία ζύμωσης, όσον αφορά τη διατήρηση ποιότητας και σταθερότητας κατά την αποθήκευση. Σύμφωνα με έρευνες, το *L. plantarum* έχει χρησιμοποιηθεί για δεκαετίες για την ενίσχυση της εντερικής βλεννογόνου ανοσίας και τη βελτίωση της ακεραιότητας του δερματικού φραγμού

Η χρήση ζυμών ως καλλιεργειών εκκίνησης προτάθηκε για την παραγωγή επιτραπέζιων ελιών (Arroyo-López et al., 2008; Bevilacqua et al., 2013; Bonatsou et al., 2015; Arroyo-López et al., 2012), καθώς μπορούν να βελτιώσουν τις οργανοληπτικές ιδιότητες (Fernández et al., 2008; Arroyo-López et al., 2008), να ενισχύσουν ανάπτυξη των LAB (Segovia-Bravo et al., 2007; Tsapatsaris and Kotzekidou, 2004) και να αποδομήσουν τις φαινολικές ενώσεις (Ettayebi et al., 2003). Επιπλέον, έχει προταθεί η δυνατότητα χρήσης ταυτόχρονου ή διαδοχικού εμβολιασμού ζυμομυκήτων και LAB σε πράσινες και μαύρες ελιές (Segovia-Bravo et al., 2007; Tufariello et al., 2015; De Angelis et al., 2015; Tsapatsaris and Kotzekidou, 2004; Hurtado et al., 2011). Η παρουσία των ζυμών μαζί με LAB μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική βελτίωση της ποιότητας των ελιών, καθώς επίσης και στην αύξηση της ταχύτητας πολλαπλασιασμού των LAB, στη μείωση των *Enterobacteriaceae* και στην αισθητή μείωση του χρόνου της ζύμωσης.

Το ενδιαφέρον εστιάζεται και στους μύκητες οι οποίοι χρησιμοποιούνται ως καλλιέργειες εκκίνησης στην Ευρώπη για την επεξεργασία κρέατος και τυριού, με σκοπό να βελτιώσουν το άρωμα, τη γεύση και την υφή, να προστατεύσουν το προϊόν από τους ανεπιθύμητους μικροοργανισμούς, να καθυστερήσουν την τάγγιση, να σταθεροποιήσουν το χρώμα, να προσφέρουν προστασία έναντι του οξυγόνου και του φωτός κλπ. Από την άλλη πλευρά, μπορούν να απελευθερώσουν εξαιρετικά τοξικούς δευτερογενείς μεταβολίτες όπως μυκοτοξίνες. Μη τοξινιγόνα και τεχνολογικού δυναμικού στελέχη μυκήτων μπορούν να αξιοποιηθούν για τον έλεγχο της ζύμωσης, εμποδίζοντας την ανάπτυξη ανεπιθύμητων μικροοργανισμών, όπως γίνεται για την

παραγωγή τυριών τύπου blue cheese (όπως Roquefort, Gorgonzola, Stilton, Gammelost, κλπ.) με τη χρήση του στελέχους *P. roqueforti* (Geisen, 1993).

1.3.5.1 Κριτήρια επιλογής αυτόχθονων μικροοργανισμών ως εκκινητών ζύμωσης

Ο όρος αυτόχθονοι εκκινητές χρησιμοποιείται για να περιγράψει τους μικροοργανισμούς που χρησιμοποιούνται ως καλλιέργειες εκκίνησης και οι οποίοι απομονώθηκαν και επαναχρησιμοποιήθηκαν για την ίδια πρώτη ύλη. Η επιλογή των κατάλληλων στελεχών με σκοπό να χρησιμοποιηθούν ως εκκινητές της ζύμωσης είναι μια δύσκολη και περίπλοκη διαδικασία που παίζει σημαντικό ρόλο στην επιτυχία της ζύμωσης. Οι συνθήκες που επικρατούν κατά την διάρκεια της ζύμωσης μπορούν κάποιες φορές να λειτουργήσουν ανασταλτικά ως προς την ανάπτυξη των επιλεγμένων στελεχών. Επιπλέον, η επιλογή μη κατάλληλων στελεχών μπορεί να οδηγήσει σε μη επιθυμητά αποτελέσματα, όπως την παραγωγή ανεπιθύμητων μεταβολιτών. Τα κριτήρια με τα οποία επιλέγονται οι καθαρές μικροβιακές καλλιέργειες LAB και ζυμών συνοψίζονται παρακάτω (Tufariello et al., 2015):

- (i) να μειώνουν το pH της άλμης παράγοντας οργανικά οξέα μέσω της μεταβολικής τους δραστηριότητας (με ομο- ή ετεροζυμωτικό μεταβολισμό για τα LAB, με ζυμωτικό μεταβολισμό για τις ζύμες),
- (ii) να επιβιώνουν και να αναπτύσσονται σε αντίξοες συνθήκες (φτωχή σε θρεπτικά συστατικά άλμη, χαμηλό pH, υψηλό ποσοστό άλατος, παρουσία φαινολικών ενώσεων, μεγάλες μεταβολές θερμοκρασιών),
- (iii) να παράγουν γαλακτικό οξύ και άλλα οργανικά οξέα
- (iv) να υδρολύουν την ελευρωπαΐνη μέσω του ενζύμου της β-γλυκοζιδάσης
- (v) να αναπτύσσουν επιθυμητά αρώματα (πτητικές ενώσεις)
- (vi) να μην παράγουν βιογενείς αμίνες,
- (vii) να μην είναι παθογόνα
- (viii) να έχουν τη δράση της εστεράσης και της λιπάσης, σημαντικά ένζυμα για τη βελτίωση του αρωματικού προφίλ των ελιών που έχουν υποστεί ζύμωση (αυξάνοντας το περιεχόμενο των λιπαρών οξέων).
- (ix) να μην παρουσιάζουν πρωτεολυτική και πηκτινολυτική δραστηριότητα, οι οποίες θα μπορούσαν να έχουν αρνητική επίπτωση στην ποιότητα της ελιάς, δεδομένου ότι σχετίζονται με το μαλάκωμα της,
- (x) να έχουν λειτουργικές ιδιότητες (προβιοτικοί και να προάγουν την υγεία).

Τέλος, η ικανότητά τους να αναπτύσσονται και να επικρατούν έναντι της ενδογενούς μικροχλωρίδας είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την επιλογή τους ως καλλιέργειες εκκίνησης στη ζύμωση των επιτραπέζιων ελιών.

1.4 Φαινολικές ενώσεις

Τα τελευταία χρόνια οι φαινολικές ουσίες έχουν βρεθεί στο επίκεντρο του ερευνητικού ενδιαφέροντος κυρίως λόγω της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας. Ειδικότερα, οι μαύρες επιτραπέζιες ελιές αποτελούν πολύ καλή πηγή φαινολικών ενώσεων, κατατάσσοντας τις στη 19^η και 28^η θέση ανάμεσα στις 100 πλουσιότερες σε πολυφαινόλες τροφές, όσον αφορά στη συγκέντρωση και την περιεκτικότητα ανά μερίδα, αντίστοιχα, αν και έχουν σημειωθεί σημαντικές διακυμάνσεις μεταξύ των ποικιλιών (Amiot et al., 1986; Pérez-Jiménez et al., 2002).

Οι φαινολικές ενώσεις έχουν αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες, και συμβάλλουν στην πρόληψη από την επίθεση στον καρπό της ελιάς του *Dacus olea*. Επίσης, παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη του μαύρου χρώματος στον καρπό μέσω μιας αντίδρασης αμαύρωσης (Ryan, 2001), ενώ ταυτόχρονα συμβάλλουν στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του καρπού (Bianco and Uccella, 2000). Από τις φαινολικές ενώσεις πολύ σημαντικές είναι η ελεωρωπαΐνη και η υδροξυτυροσόλη, καθώς συνδέονται με θετικές επιπτώσεις στην υγεία, όπως η πρόληψη από καρδιαγγειακές παθήσεις, προστασία από εκφυλιστικές ασθένειες, καθώς επίσης, διαθέτουν αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινική δράση λόγω των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων (Shaidi and Ambigaipalan, 2015; Visioli and Bernandini, 2011; Visioli et al., 2002).

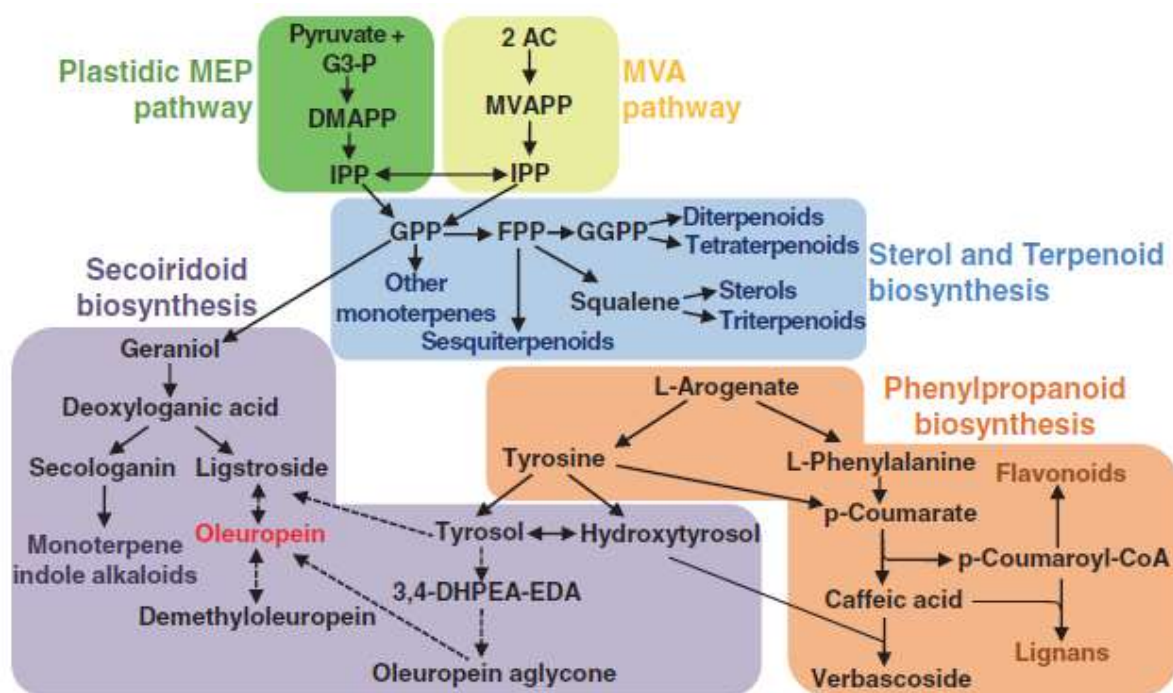
1.4.1 Οι κύριες φαινολικές ενώσεις στον ελαιόκαρπο

Ο όρος «φαινολικές ενώσεις» περικλείει ένα ευρύ φάσμα δευτερογενών μεταβολιτών που παράγονται στα ανώτερα φυτά μέσω της βιοσυνθετικής οδού του σικιμικού οξέος (Σχήμα 1.6). Οι φαινολικές ενώσεις κατηγοριοποιούνται είτε με βάση τον αριθμό ατόμων άνθρακα στο μόριο τους, είτε με βάση τη χημική δομή του μορίου και το είδος του ανθρακικού σκελετού. Επίσης, ένας άλλος τρόπος κατηγοριοποίησης είναι ανάλογα με τον αριθμό των αρωματικών δακτυλίων (Σχήμα 1.7) με αποτέλεσμα

να διακρίνονται σε απλές, με έναν αρωματικό δακτύλιο και πολυφαινόλες, με περισσότερους του ενός δακτυλίου.

Οι πιο σημαντικές ομάδες φαινολικών ενώσεων στον ελαιοκάρπο είναι τα σεκοϊριδοειδή (Σχήμα 1.8), και ακολουθούν τα φαινολικά οξέα, οι φαινολικές αλκοόλες (Σχήμα 1.9), τα φλαβονοειδή (Σχήμα 1.10) και οι λιγνάνες (Oliveras López et al., 2008).

Η βασικότερη κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών, τα σεκοϊριδοειδή, υπάρχουν αποκλειστικά σε φυτά που ανήκουν στην οικογένεια Oleaceae στην οποία ανήκει η *Olea europaea* L. (Servili and Montedoro, 2002). Τα κύρια σεκοϊριδοειδή του καρπού της ελιάς είναι η ελευρωπαΐνη, η διμεθυλοελευρωπαΐνη, ο ολεοσίδης, ο λιγκστροζίτης, ο nuzhenide, και οι αγλυκόνες τους, όπως η διαλδεϋδική μορφή του δεκαρβοξυμεθυλικού ελεονλικού οξέος συνδεδεμένη είτε με 3,4-DHPEA είτε με p-HPEA (αντίστοιχα, 3,4-DHPEA-EDA και p-HPEA-EDA), ένα ισομερές της αγλυκόνης της ελαιοευρωπαΐνης (3,4-DHPEA-EA) και η αγλυκόνη του λιστροζίτη (p-HPEA-EA) (Obied et al., 2008). Τέλος, σε ορισμένες ποικιλίες έχει βρεθεί βερμπασκοζίτης (Servili et al., 2004), το κύριο παράγωγο υδροκινναμωμικού οξέος και σε μικρό ποσοστό ο κομσελογοζίτης (Jerman et al., 2010).



Σχήμα 1.6: Σχηματική αναπαράσταση των πιθανών βιοσυνθετικών οδών των κύριων δευτερογενών ενώσεων του ελαιοκάρπου.

(**G3P**: glyceraldehyde 3-phosphate, **DMAPP**: Dimethylallyl diphosphate, **IPP**: Isopentenyl diphosphate, **AC**: Acetyl-CoA, **MVAPP**: Mevalonate diphosphate, **GPP**: Geranyl diphosphate, **FPP**: Farnesyl diphosphate και **GGPP**: Geranyl geranyl pyrophosphate. Τα διακεκομμένα βέλη δείχνουν πιθανά βιοσυνθετικά μονοπάτια) (Alagna et al., 2012).

Τα φαινολικά οξέα είναι οι πιο απλές μορφές φαινολικών και χαρακτηρίζονται από την παρουσία ενός υδροξυλιωμένου αρωματικού δακτυλίου και μιας καρβοξυλικής ομάδας. Τα επικρατέστερα φαινολικά οξέα στον καρπό της ελιάς είναι το καφεϊκό οξύ, το φερούλικό, βανιλικό, το κουμαρικό και το συριγγικό. Οι φαινολικές αλκοόλες αποτελούνται από έναν φαινολικό δακτύλιο (C6) που περιέχει μία ή περισσότερες υδροξυλομάδες (-OH). Οι κύριες φαινολικές αλκοόλες του καρπού είναι η υδροξυτυροσώλη και η τυροσώλη (Σχήμα 1.9).

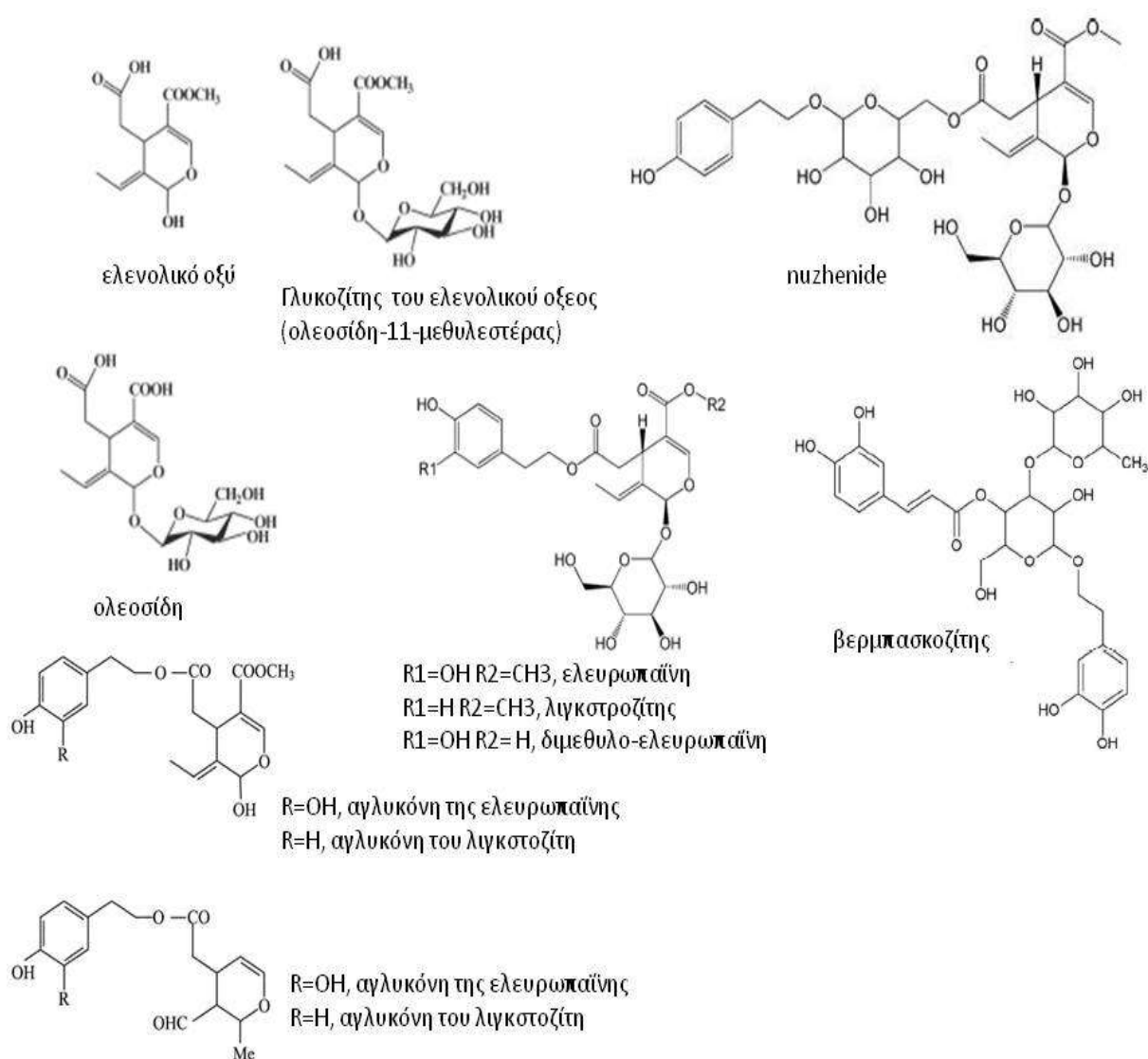
Τα φλαβονοειδή, λουτεολίνη-7-γλυκοσίδη, ρουτίνη και κερκετίνη υπάρχουν αποκλειστικά στο φλοιό του καρπού (Servili, et al., 1999).



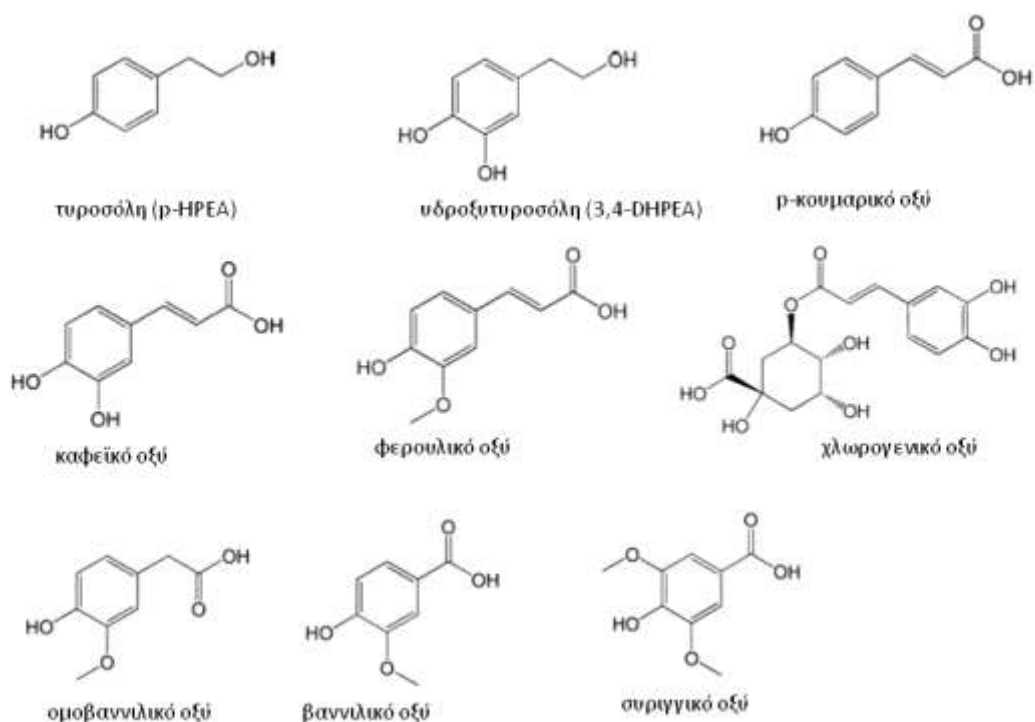
Σχήμα 1.7: Κατηγοριοποίηση φαινολικών ενώσεων ανάλογα με τον αριθμό των φαινολικών δακτυλίων (Robbins, 2003).

1.4.2 Παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοσύνθεση των φαινολικών ενώσεων του καρπού

Το φαινολικό κλάσμα στις επιτραπέζιες ελιές είναι πολύπλοκο και ποικίλει τόσο ποιοτικά όσο και ως προς τη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων, τις μεθόδους επεξεργασίας, την ποικιλία και την ωρίμανση των καρπών. Οι σημαντικότερες μεταβολές στο φαινολικό κλάσμα οφείλονται στην αποικοδόμηση της ελευρωπαΐνης κατά τη συσσώρευση του ελαιολάδου στον καρπό και στην αύξηση της συγκέντρωσης της τυροσόλης και της υδροξυτυροσόλης.



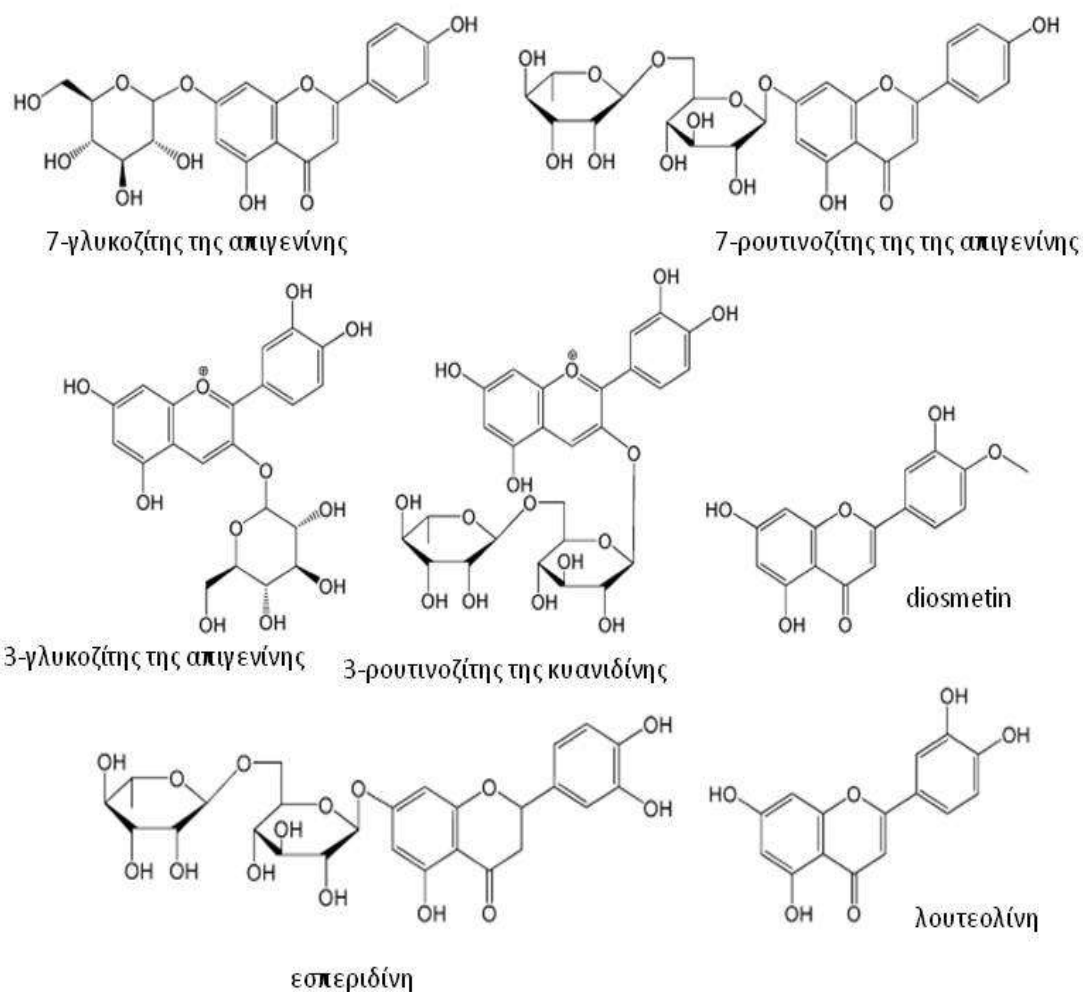
Σχήμα 1.8: Τα κυριότερα σεκοϊριδοειδή, τα παράγωγά τους και ο βερμπασκοζίτης στον ελαιοκάρπο.



Σχήμα 1.9: Τα κυριότερα φαινολικά οξέα και φαινολικές αλκοόλες στον ελαιόκαρπο.

1.4.2.1 Ποικιλία

Το είδος και η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων στον καρπό της ελιάς καθορίζεται κυρίως από γενετικούς παράγοντες και υπάρχουν μεγάλες διαφορές μεταξύ των ποικιλιών. Σε όλες τις ποικιλίες, η ελευρωπαΐνη και η υδροξυτυροσόλη είναι οι κυριότερες φαινολικές ενώσεις του ελαιοκάρπου (Vinha et al., 2005), ωστόσο, οι συγκεντρώσεις τους ποικίλουν σημαντικά μεταξύ των ποικιλιών με παρόμοιο βαθμό ωρίμανσης. Πράγματι, οι Vinha et al., 2005 μελέτησαν διάφορες Πορτογαλικές ποικιλίες (Bical, Bical De Castelo, Borreira, Borrenta, Branco, Madural, Madural Fina, και Madural Negra) και παρατήρησαν ότι ο μέσος όρος της ελευρωπαΐνης ήταν 4,55 g/kg (ξηρό βάρος), ενώ το αντίστοιχο εύρος κυμάνθηκε από 0,39-21,68 g/kg (ξηρό βάρος). Οι Sivakumar et al., (2005) μελετώντας Ιταλικές ποικιλίες (Coratina, Carolea, and Cassanese) διαπίστωσαν ότι η ελευρωπαΐνη και ο λιγκστροζίτης είναι οι κύριες φαινολικές ενώσεις. Οι ελιές της ποικιλίας Coratina περιέχουν τα υψηλότερα ποσοστά ελευρωπαΐνης και λιγκστροζίτη (14,60 και 11,40



Σχήμα 1.10: Τα κυριότερα φλαβονοειδή στον ελαιόκαρπο

g/kg (ξηρό βάρος), αντίστοιχα). Η μέγιστη περιεκτικότητα σε ελευρωπαΐνη των ποικιλιών Carolea και Cassanese ήταν 12,70 και 10,10 g/kg, αντίστοιχα, ενώ τα επίπεδα του λιγκstroζίτη ήταν 11,00 και 9,30 g/kg αντίστοιχα. Για τις Ισπανικές ποικιλίες Gordal, Hojiblanca και Lechin με παρόμοιους βαθμούς ωρίμανσης διαπιστώθηκε ότι ο γλυκοζίτης της 4-β-D-υδροξυτυροσόλης είναι η κυρίαρχη φαινόλη με επίπεδα που κυμαίνονται από 20,54 έως 22,12 g/kg ξηρό βάρος. Τα επίπεδα της ελευρωπαΐνης και της υδροξυτυροσόλης κυμάνθηκαν από 4,32 έως 14,58 g/kg και από 0,62 έως 2,60 g/kg, αντίστοιχα (Romero et al., 2002). Όσον αφορά τις ελληνικές ποικιλίες (Καλαμών, Κοθρέικη, Μαρώνεια, Μεγαρίτικη, Πετρολιά, Πικρολιά, Κερκύρας, Ρωμέικη, Σμερτολιά, Θασίτικη, Θρουμπολιά Αιγαίου και κυμάνθηκαν από 0,25-11,07 mg/g νωπού βάρους. Η υψηλότερη συγκέντρωση 0,39-

21,68 g/kg (ξηρό βάρος). Οι Sivakumar et al., (2005) μελετώντας Ιταλικές ποικιλίες (Coratina, Carolea, and Cassanese) διαπίστωσαν ότι η ελευρωπαΐνη και ο λιγκστροζίτης είναι οι κύριες φαινολικές ενώσεις. Οι ελιές της ποικιλίας Coratina περιέχουν τα υψηλότερα ποσοστά ελευρωπαΐνης και λιγκστροζίτη (14,60 και 11,40 g/kg (ξηρό βάρος), αντίστοιχα). Η μέγιστη περιεκτικότητα σε ελευρωπαΐνη των ποικιλιών Carolea και Cassanese ήταν 12,70 και 10,10 g/kg, αντίστοιχα, ενώ τα επίπεδα του λιγκστροζίτη ήταν 11,00 και 9,30 g/kg αντίστοιχα. Για τις Ισπανικές ποικιλίες Gordal, Hojiblanca και Lechin με παρόμοιους βαθμούς ωρίμανσης διαπιστώθηκε ότι ο γλυκοζίτης της 4-β-D-υδροξυτυροσόλης είναι η κυρίαρχη φαινόλη με επίπεδα που κυμαίνονται από 20,54 έως 22,12 g/kg ξηρό βάρος. Τα επίπεδα της ελευρωπαΐνης και της υδροξυτυροσόλης κυμάνθηκαν από 4,32 έως 14,58 g/kg και από 0,62 έως 2,60 g/kg, αντίστοιχα (Romero et al., 2002). Όσον αφορά τις ελληνικές ποικιλίες (Καλαμών, Κοθρέικη, Μαρώνεια, Μεγαρίτικη, Πετρολιά, Πικρολιά Κέρκυρας, Σμερτολιά, Θασίτικη, Θρουμπολιά Αιγαίου, και Βαλανολιά) οι Petridis, et al., (2012) ανέφεραν ότι τα επίπεδα της ελευρωπαΐνης κυμάνθηκαν από 0,25-11,07 mg/g νωπού βάρους. Η υψηλότερη συγκέντρωση ελευρωπαΐνης παρουσιάστηκε κατά φθίνουσα σειρά στην ποικιλία Πικρολιά Κερκύρας και ακολούθησαν οι Ρωμείκη, Μεγαρίτικη, Κοθρέικη, Καλαμών και Μαρώνεια.

1.4.2.2 Βαθμός ωρίμανσης

Στα αρχικά στάδια της ωρίμανσης, όταν ο καρπός είναι ακόμη πράσινος, η ελευρωπαΐνη είναι η βασική φαινολική ένωση με συγκέντρωση που μπορεί να φτάσει μέχρι και 14% του καθαρού βάρους του καρπού (Amiot et al., 1989). Στη συνέχεια, κατά την ωρίμανση, η συγκέντρωση των σεκοϊριδοειδών μειώνεται και φτάνει στα χαμηλότερα επίπεδα όταν ο καρπός αποκτά σκούρο καφέ χρώμα (Amiot et al., 1986; Amiot et al., 1989; Morelló et al., 2004). Η μείωση αυτή οφείλεται στη δραστηριότητα των ενζύμων της εστεράσης (π.χ. β-γλυκοσιδάση) τα οποία αποδομούν τα σεκοϊριδοειδή προς σχηματισμό άλλων φαινολικών ενώσεων αλλά και μη φαινολικών παραγώγων (Gómez-Rico et al., 2008).

Η αποδόμηση της ελευρωπαΐνης κατά την ωρίμανση συνοδεύεται με αύξηση της απομεθυλιωμένης ελευρωπαΐνης και του γλυκοζίτη του ελενολικού οξέος από τα οποία μόνο το πρώτο είναι φαινολική ένωση. Στους υπερβολικά ώριμους καρπούς η

συγκέντρωση της απομεθυλιωμένης ελευρωπαΐνης μειώνεται επίσης σημαντικά (Servili et al. 1999).

Τέλος, με την ωρίμανση του καρπού παρατηρείται αύξηση των φαινολικών αλκοολών, υδροξυτυροσόλη και τυροσόλη, του βερμπασκοζίτη (το σημαντικότερο υδροξυκιναμικό παράγωγο του καρπού της ελιάς) και των φλαβονοειδών (κυρίως της λουτεολίνης, του γλυκοζίτη της λουτεολίνης και της ρουτίνης) (Artajo et al., 2006; Gómez-Rico et al., 2008), ενώ οι απλές φαινολικές ενώσεις, όπως είναι το βανιλικό οξύ, η βανιλίνη, το *p*-κουμαρικό οξύ και το φερουλικό οξύ, παραμένουν σταθερές (Amiot et al., 1989).

1.4.2.3 Γεωγραφική ζώνη

Η γεωγραφική ζώνη της καλλιέργειας, η οποία σχετίζεται με τις εδαφοκλιματικές συνθήκες, συνεισφέρει επίσης σημαντικά στη χημική σύσταση του καρπού (Arslan et al., 2013; Issaoui et al., 2010).

Όσον αφορά την επίδραση της θερμοκρασίας στις φαινολικές ενώσεις, τα αποτελέσματα των διαφόρων ερευνών φαίνεται να έρχονται σε αντιπαράθεση, αφού ορισμένοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι όσο υψηλότερες είναι οι θερμοκρασίες από την καρπόδεση μέχρι το μάζεμα του καρπού τόσο χαμηλότερη είναι η συγκέντρωση σε φαινολικά, ενώ σε κάποιες ποικιλίες έχει παρατηρηθεί και το αντίθετο (Tura et al., 2008; Ripa et al., 2008).

Η επίδραση του υψομέτρου στις φαινολικές ενώσεις δεν είναι διευκρινισμένη και οι διαφορές που παρατηρούνται στις έρευνες αποδίδονται κυρίως σε γενετικούς, καλλιεργητικούς και κλιματικούς παράγοντες (Aguilera et al., 2005). Κάποιες έρευνες έχουν δείξει ότι οι καρποί που μεγαλώνουν σε χαμηλότερα υψόμετρα έχουν μεγαλύτερη συγκέντρωση σε φαινολικές ενώσεις γεγονός που έχει συσχετιστεί με τις ευνοϊκότερες θερμοκρασίες και την ένταση του φωτός που οδηγεί σε αύξηση της βιοσύνθεσης των πρόδρομων μορίων των φαινολικών ενώσεων (Mohamed Mousa et al., 1996). Σε αντίθεση, ελαιόλαδα της τούρκικης ποικιλίας Sariulak, που βρίσκονται σε μεγαλύτερο υψόμετρο (400 m), φάνηκε να έχουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις σε σχέση με αυτά που προήλθαν από χαμηλό υψόμετρο γεγονός που και σε αυτή την περίπτωση συσχετίστηκε με τα χαμηλότερα επίπεδα βροχοπτώσεων στη τοποθεσία με το μεγαλύτερο υψόμετρο (Arslan et al., 2013).

1.4.3 Εκχύλιση φαινολικών ενώσεων από τον ελαιόκαρπο

Για την απομόνωση του φαινολικού κλάσματος από τον ελαιόκαρπο, χρησιμοποιούνται η εκχύλιση υγρής-υγρής φάσης (LLE), η εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) και η στερεή-υγρή εκχύλιση με τη χρήση διαφορετικών οργανικών διαλυτών και συμβατικών μεθόδων χειροκίνητης ή μηχανικής ανάδευσης. Τα τελευταία χρόνια, οι υπέρηχοι (ultrasound, US) έχουν κερδίσει την προσοχή των μελετητών λόγω των υψηλών αποδόσεων, της χαμηλής κατανάλωσης διαλύτη και της ταχύτερης εκχύλισης.

1.4.4 Προσδιορισμός συγκέντρωσης ολικών φαινολικών συστατικών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

Η μέθοδος Folin-Ciocalteu συγκαταλέγεται στις επίσημες μεθόδους της A.O.A.C. (Association of Official Analytical Chemists). Είναι μια φωτομετρική μέθοδος που βασίζεται στην αναγωγική δράση παρουσία πολυφαινολικών ομάδων και είναι ευρέως χρησιμοποιούμενη λόγω του υποστρώματος και την ταχύτητας της ανάλυσης (Blekas et al., 2002). Επιπλέον, η μέθοδος είναι εξαιρετικά χρήσιμη αφού επιτρέπει την εκτίμηση του συνόλου των πολυφαινολικών συστατικών ενός φυσικού προϊόντος, συμπεριλαμβανομένων και αυτών που δεν έχουν μέχρι σήμερα ταυτοποιηθεί.

Το μεγαλύτερο μειονέκτημα της χρωματομετρικής αυτής δοκιμής είναι η μικρή εξειδίκευση, καθώς η αντίδραση μπορεί να συμβεί με οποιαδήποτε υδροξυλική φαινολική ομάδα που είναι δυνατόν να οξειδωθεί. Επιπλέον, η μέθοδος δεν κάνει διάκριση μεταξύ μεμονωμένων ενώσεων που διαφέρουν ως προς τη μοριακή μάζα (άρα δεν μπορεί να παρέχει ποσοτικοποίηση για τις επιμέρους φαινολικές ενώσεις) και δομή (δηλαδή τον αριθμό των ενεργών ομάδων υδροξυλίου) (Hrnčirik and Fritsche, 2004). Έτσι, δείγματα με συγκρίσιμο ολικό φαινολικό περιεχόμενο, αλλά διαφορετικό προφίλ, μπορεί να δώσουν πολύ διαφορετικό αποτέλεσμα ή και το αντίθετο. Από την άλλη, δεδομένου ότι η απορρόφηση εξαρτάται κυρίως από τον αριθμό των ομάδων υδροξυλίου, η συγκεκριμένη μέτρηση μπορεί να παρέχει άμεσες πληροφορίες σχετικά με τον αριθμό των αντιοξειδωτικών φαινολικών ομάδων.

Βασίζεται στην οξειδοαναγωγική αντίδραση με την οποία προσδιορίζεται η συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών του δείγματος χωρίς διαχωρισμό μεταξύ

μονομερών, διμερών και μεγαλύτερου μοριακού βάρους φαινολικών συστατικών. Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (F.C.) είναι διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφο-μολυβδαινικά και φωσφο-βολφραμικά ετεροπολυμερή οξέα. Τα φαινολικά ιόντα οξειδώνονται σε αλκαλικό περιβάλλον με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων του αντιδραστήριου. Το προϊόν είναι ένα σύμπλοκο μολυβδαινίου-βολφραμίου (Mo-W) χαρακτηριστικής μπλε χρώσης που απορροφά στο ορατό (725 nm) (Folin and Ciocalteu, 1927). Το εξασθενές σύμπλοκο παρουσιάζει τις ακόλουθες δομές:



1.4.5 Ταυτοποίηση και ποσοτικός προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων

Ο διαχωρισμός των επιμέρους φαινολικών ενώσεων πραγματοποιείται συνήθως με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) σε συστήματα ανάστροφης φάσης (RP-LC) και με χρήση πολικών κινητών φάσεων και σε λιγότερες περιπτώσεις με αέρια χρωματογραφία (GC). Η ανίχνευση επιτυγχάνεται με μέτρηση της απορρόφησης στο υπεριώδες, κυρίως με χρήση ανιχνευτή συστοιχίας διόδων (DAD), σε διάφορα μήκη κύματος, ενώ για την ταυτοποίηση είναι απαραίτητη η χρήση και κάποιας μεθόδου ταυτοποίησης όπως είναι η φασματομετρία μαζών (MS) και ο φθορισμός (FLD).

Χρήση ανιχνευτή ορατού-υπεριώδους με συστοιχία διόδων (UV-vis DAD):

Όλες οι φαινολικές ενώσεις εμφανίζουν ισχυρή απορρόφηση στο υπεριώδες (225, 240, 280 και 340 nm) ενώ κάποιες εμφανίζουν μέγιστο απορρόφησης και στο ορατό. Ο ποιοτικός προσδιορισμός των φαινολικών ενώσεων στηρίζεται στη συσχέτιση του χρόνου κατακράτησής τους με τους χρόνους κατακράτησης των πρότυπων ενώσεων. Μειονέκτημα ωστόσο αποτελεί το γεγονός ότι δεν υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμα πρότυπα για όλες τις ενώσεις, κάτι που μπορεί εν μέρει να ξεπεραστεί με την απομόνωση αυτών των ενώσεων με παρασκευαστική HPLC. Ωστόσο, αν και αποτελεί μια καλή χρωματογραφική τεχνική, είναι λιγότερο ευαίσθητη από το MS (Obied et al., 2007) .

Χρήση ανιχνευτή φασματομετρίας μάζας (MS): Η ανάλυση με LC-MS είναι μία από τις πλέον χρησιμοποιούμενες μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση των φαινολικών ενώσεων στον ελαιόκαρπο (Obied et al., 2007;

Savarese et al., 2007; Cardoso et al., 2006; Kanakis et al., 2012). Η τεχνική της φασματομετρίας μαζών υψηλής ανάλυσης (HR-MS) έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση πιο πολύπλοκων δειγμάτων παρέχοντας μεγαλύτερη ακρίβεια μάζας. Ο ανιχνευτής αυτός επιτρέπει την ταυτοποίηση της ένωσης με βάση ακριβείς μετρήσεις μάζας μοριακών ιόντων και θραυσμάτων, τυπικά κάτω από 10 ppm (Fu et al., 2010; Klen et al., 2015).

Φασματομετρία NMR ή 2D NMR: Στις περιπτώσεις όπου τα δεδομένα της φασματομετρίας μαζών δεν επαρκούν για να εξαχθεί συμπέρασμα για τη δομή της ένωσης, χρησιμοποιείται φασματοσκοπία NMR ή 2D NMR ως συμπληρωματική τεχνική. Ωστόσο, τα φάσματα NMR των φαινολικών ενώσεων είναι περίπλοκα και η ταυτοποίηση των ενώσεων είναι ιδιαίτερα δύσκολη όταν δεν υπάρχουν τα κατάλληλα πρότυπα. Από την άλλη πλευρά η 2D NMR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ανάλυση της δομής χωρίς πρότυπες ενώσεις, αλλά η τεχνική αυτή απαιτεί σχετικά μεγάλες ποσότητες των ενώσεων. Στις περισσότερες περιπτώσεις πάντως, ο συνδυασμός των UV, MS, και H-NMR παρέχει επαρκείς πληροφορίες για τη διευκρίνιση της δομής (Hrnčirik and Fritsche, 2004).

1.5 Πτητικές ενώσεις

1.5.1 Παράγοντες που επηρεάζουν το αρωματικό προφίλ του ελαιοκάρπου

Η μοναδική ευχημεία του ελαιοκάρπου είναι άμεσα συνδεδεμένη τόσο με την ποιοτική όσο και με την ποσοτική σύσταση των πτητικών ενώσεων που επηρεάζουν και συμβάλλουν στην ποιότητα των επιτραπέζιων ελιών. Οι πολυάριθμες πτητικές και ημι-πτητικές οργανικές ενώσεις, για την παραγωγή των οποίων είναι κυρίως υπεύθυνα τα LAB και οι ζύμες (Sabatini and Marsilio, 2008), προσδίδουν ένα πολύπλοκο άρωμα στις ελιές που μπορεί να επηρεάσει την προτίμηση του καταναλωτικού κοινού.

Η σύσταση των πτητικών ενώσεων επηρεάζεται επίσης από αγρονομικούς και τεχνολογικούς παράγοντες. Η χρήση τραυματισμένου καρπού, η ποικιλία, το στάδιο ωρίμανσης, οι κλιματικές συνθήκες, η μέθοδος συλλογής και η μέθοδος επεξεργασίας που εφαρμόζεται για τη λήψη βρώσιμων ελιών, όπως επίσης και οι καλλιέργειες εκκίνησης ζύμωσης που χρησιμοποιούνται ορισμένες φορές μπορούν να καθορίσουν το προφίλ των πτητικών ενώσεων (Tura et al., 2008; Corsetti et al., 2012; Kalua et al.,

2007). Η συγκέντρωση των πτητικών ενώσεων μειώνεται κατά την ανάπτυξη του καρπού, αλλά αυξάνεται κατά την ωρίμανση, καθώς επίσης και κατά διάρκεια της ζύμωσης (Kalua et al., 2015).

1.5.2 Το αρωματικό προφίλ του ελαιοκάρπου

Η διάσπαση των ζυμώσιμων συστατικών προς απλούστερες ενώσεις, πραγματοποιείται μέσω πολύπλοκων μηχανισμών και με την παρέμβαση μιας ολόκληρης γκάμας ενζύμων και συνενζύμων (McFeeters, 2004). Το πυροσταφυλικό μεταβολίζεται προς γαλακτικό οξύ στην ομογαλακτική ζύμωση μέσω του μονοπατιού της γλυκόλυσης (Embden–Meyerhof-Parnas), ενώ στην ετερογαλακτική προς γαλακτικό, διοξειδίο του άνθρακα και αιθανόλη, καθώς και άλλα οξέα και αλκοόλες μέσω του μονοπατιού των 6' - φωσφογλυκονικού/ φωσφοκετολάσης.

Η ζύμωση συνήθως ξεκινά με τη δράση των ζυμών, διασπώντας τη γλυκόζη σε αιθανόλη και διοξειδίου του άνθρακα. Ακολούθως, το *Acetobacter* οξειδώνει την αλκοόλη σε οξικό οξύ και νερό (FAO corporate document repository: <http://www.fao.org/docrep/x0560e/x0560e08.htm>). Έτσι, οι πτητικές ενώσεις παράγονται τόσο στην άλμη από τη δράση των μικροοργανισμών όσο και στον καρπό της ελιάς με τη δράση ενδογενών (όπως λιποξυγενάσες) και εξωγενών ενζύμων (που παράγονται από LAB, ζυμομύκητες κλπ.) και από τον μεταβολισμό λιπιδίων, πρωτεϊνών και αμινοξέων. Το κλάσμα των αρωματικών ενώσεων στον καρπό και στην άλμη είναι πολύ διαφορετικό και εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως το μήκος και/ή τη διακλάδωση της ανθρακικής αλυσίδας, τις πολικές ομάδες, τη συγκέντρωση άλατος νατρίου, τη θερμοκρασία κλπ (Sabatini et al., 2009).

Οι πτητικές ενώσεις με την υψηλότερη συγκέντρωση δεν είναι απαραίτητα οι κυρίως υπεύθυνες για την οσμή/άρωμα της ελιάς, καθώς καθοριστικό ρόλο παίζει και το κατώφλι οσμής των πτητικών συστατικών. Το κατώφλι οσμής είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση στην οποία μπορεί να γίνει αντιληπτή οργανοληπτικά μια ένωση. Επίσης, η αντιληπτή οσμή είναι συνήθως αποτέλεσμα της συνεισφοράς και των αλληλεπιδράσεων πολλών ενώσεων και όχι μεμονωμένων.

Η χαρακτηριστική «πράσινη» οσμή των νωπών ελιών συσχετίζεται με την παρουσία πτητικών ενώσεων με 5 και 6 άτομα άνθρακα (αλκοολών, αλδεϋδών και οι αντίστοιχοι εστέρες) που προέρχονται από τη δραστηριότητα της μεταβολικής οδού της λιποξυγενάσης (Angerosa et al., 2004). Η εξανόλη και η 2-εξενάλη είναι οι

κύριοι συντελεστές της χαρακτηριστικής πράσινης οσμής των ελιών και πολλών φρούτων και κηπευτικών που έχουν υποστεί ζύμωση. Στην αυθόρμητη ζύμωση των μαύρων ελιών, το κύριο προϊόν είναι η αιθανόλη που προέρχεται από τη μεταβολική δραστηριότητα διαφορετικών ζυμομυκήτων και ετερο-ζυμωτικών LAB και είναι πολύ σημαντική για τις οργανοληπτικές ιδιότητες του τελικού προϊόντος (Fleming and Etchells, 1969).

Οι C6 αλκοόλες όπως η 1-εξανόλη και η *cis*-3-εξεν-1-όλη, που χαρακτηρίζονται από «ώριμο φρουτώδες» και «απαλό πράσινο» άρωμα, φαίνεται να συνδέονται με το διαφορετικό στέλεχος ζύμης που χρησιμοποιείται (Torrens et al., 2008). Στους οίνους, η σχετική παρουσία του οξικού αιθυλεστέρα στο τέλος της ζύμωσης αυξάνει την πολυπλοκότητα του αρώματος του τελικού προϊόντος (Mallouchos et al., 2003). Το υψηλό επίπεδο ισοαμυλ-αλκοολών (2 και 3 μεθυλο-1-βουτανόλη, εξανόλη και *cis*-3-εξεν-1-όλη) αποδεικνύει τον ρόλο των ζυμών στην καθοδήγηση της πορείας της ζύμωσης. Η παρουσία άλλων ανώτερων αλκοολών (1-προπανόλη και 2-μεθυλο-1-προπανόλη) προέρχεται από την αναγωγή των αλδευδών, αλλά μπορεί επίσης να συνδεθεί με τη μικροβιακή απαμίνωση των αμινοξέων (McFeeters, 2004). Η εξανόλη, η (*Z*)-3-εξενόλη, η εξανόλη, και ο οξικός (*Z*)-3-εξενυλεστέρας σχετίζονται με την πορεία της λιποξυγενάσης (Bleve et al., 2014, 2015; Sabatini and Marsilio, 2008).

1.5.3 Αναλυτικός προσδιορισμός των πτητικών ενώσεων του ελαιοκάρπου

1.5.3.1 Μέθοδοι παραλαβής των πτητικών συστατικών από τα τρόφιμα

Για την επιλογή της μεθόδου, που μπορεί να εξασφαλίσει την παραλαβή του πλέον αντιπροσωπευτικού κλάσματος των πτητικών συστατικών από ένα δείγμα τροφίμου, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ότι:

1. Τα επιμέρους πτητικά συστατικά ενός τροφίμου είναι κατά κανόνα πάρα πολλά και διαφέρουν ως προς τη χημική δομή, το μοριακό βάρος και τη συγκέντρωσή τους στο δείγμα που εξετάζεται.

2. Δεν υπάρχει συνήθως άμεση σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης κάθε πτητικού συστατικού στο τρόφιμο και της συγκέντρωσής του στο πτητικό κλάσμα που παραλαμβάνεται.

3. Είναι απαραίτητος ο εμπλουτισμός του πτητικού κλάσματος όταν για την παραλαβή των πτητικών συστατικών εκχυλίζεται το δείγμα με οργανικό διαλύτη.

4.Είναι αναγκαίο να αποτρέπεται ο σχηματισμός artefacts στη διάρκεια της παραλαβής των πτητικών συστατικών, επειδή αυτός έχει συχνά δυσμενείς επιπτώσεις στα αποτελέσματα της περαιτέρω εξέτασης του πτητικού κλάσματος (Morales and Tsimidou, 2000a).

Στόχος της παραλαβής των πτητικών συστατικών είναι ο περιορισμός των παρεμποδίσεων από άλλα μη πτητικά συστατικά του δείγματος. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται βασίζονται στις τεχνικές της:

1. Εκχύλισης
2. Απόσταξης
3. Εκχύλισης μετά από συγκράτηση σε στερεή φάση (Solid Phase Extraction-SPE)
4. Θερμικής εκρόφησης μετά από συγκράτηση με προσρόφηση σε στερεή φάση (Dynamic Headspace-DHS, Solid Phase Microextraction-SPME)
5. Κατανομής σε αέρια φάση (Static Headspace-SHS)

Για την εξέταση του κλάσματος των πτητικών συστατικών ενός δείγματος τροφίμου είναι απαραίτητη:

1. Η παραλαβή του κλάσματος των πτητικών συστατικών από το δείγμα.
2. Ο εμπλουτισμός του πτητικού κλάσματος, είτε μετά από καθαρισμό είτε μετά από συμπύκνωση.
3. Η κλασμάτωση του πτητικού κλάσματος σε τάξεις συστατικών.
4. Η ταυτοποίηση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των επιμέρους συστατικών.

1.5.3.2 Κατανομή των πτητικών συστατικών στην υπερκείμενη του δείγματος αέρια φάση (SHS)

Η τεχνική βασίζεται στη μεταφορά ποσότητας του προς εξέταση δείγματος σε ειδικό φιαλίδιο, που κλείνει ερμητικώς, και σε εξισορρόπηση της συγκέντρωσης των πτητικών συστατικών που περιέχονται στο δείγμα μεταξύ του εσωτερικού διάκενου και του δείγματος κατόπιν ελαφράς θέρμανσής του. Για τη λήψη ορισμένου όγκου από την υπερκείμενη του δείγματος αέρια φάση του εσωτερικού διάκενου χρησιμοποιείται μια αεροστεγής σύριγγα ή ένας αυτόματος δειγματολήπτης. Επίσης, η δειγματοληψία μπορεί να γίνει και μέσω μιας ειδικής βαλβίδας έξι βημάτων που φέρει σταθερού όγκου βρόγχο. Ακολουθεί ο αεριοχρωματογραφικός διαχωρισμός.

Η τεχνική χρησιμοποιείται για αναλυτικούς σκοπούς, ιδίως για τον ποσοτικό προσδιορισμό πτητικών συστατικών σε υγρά και στερεά δείγματα, αλλά απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή, αφού η εξισορρόπηση των συγκεντρώσεων τους επηρεάζεται όχι μόνον από παραμέτρους όπως η θερμοκρασία, αλλά και από τη φύση του δείγματος.

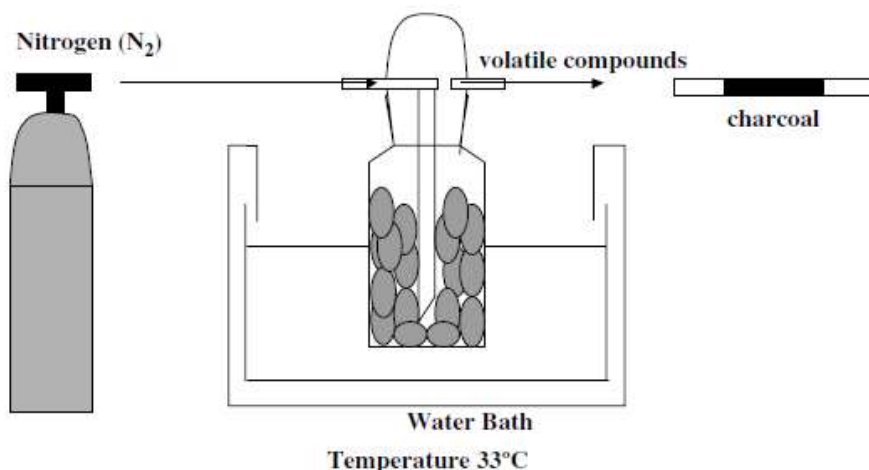
Βασικό πλεονέκτημα της τεχνικής είναι η εύκολη αυτοματοποίηση και συνεπώς το χαμηλό κόστος εξέτασης των επιμέρους δειγμάτων.

1.5.3.3 Θερμική εκρόφηση των πτητικών συστατικών μετά την εκδίωξη τους από το δείγμα και την προσρόφησή τους σε παγίδα (DHS)

Η τεχνική αυτή επιτρέπει την απομάκρυνση από το προς εξέταση δείγμα των πολύ πτητικών οργανικών ενώσεων, αλλά και άλλων πολύ λιγότερο πτητικών οργανικών ενώσεων και την προσρόφησή τους σε ειδική παγίδα από την οποία ανακτώνται με θερμική εκρόφηση για να διαχωρισθούν στη συνέχεια αεριοχρωματογραφικώς (Σχήμα 1.7).

Για την παραλαβή των πτητικών συστατικών από το δείγμα χρησιμοποιείται αδρανές αέριο (άζωτο ή ήλιο). Το φέρον αέριο μαζί με τα πτητικά συστατικά που παρασύρει διέρχεται από μια διάταξη εφοδιασμένη με κατάλληλο προσροφητικό υλικό, για παράδειγμα Tenax, ενεργό άνθρακα, κ.τ.λ, στην οποία προσροφώνται τα πτητικά συστατικά, ιδίως αυτά που εμφανίζουν υψηλή τάση ατμών (Sabatini et al., 2009; Sansone-Land et al., 2014). Στη συνέχεια τα πτητικά συστατικά εκροφώνται από την παγίδα με θέρμανση σε υψηλή θερμοκρασία και με τη βοήθεια του φέροντος αερίου προωθούνται μέσω της διάταξης έγχυσης του αεριοχρωματογράφου στη στήλη.

Στα πλεονεκτήματά της τεχνικής συμπεριλαμβάνεται ο προσδιορισμός πτητικών συστατικών που βρίσκονται σε πολύ μικρή συγκέντρωση στο εξεταζόμενο δείγμα, γεγονός που παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον γιατί κάποιες από αυτές τις ενώσεις μπορεί να έχουν πολύ χαμηλό κατώφλι αναγνώρισης της οσμής με αποτέλεσμα να συνεισφέρουν σημαντικά στο άρωμα (Morales and Rios, 1994; Morales and Tsimidou 2000b). Στην τεχνική αυτή, η θερμοκρασία, το μέγεθος του δείγματος, η ποσότητα του αερίου που χρησιμοποιείται για την εκδίωξη, η γεωμετρία της παγίδας και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των ενώσεων που πρόκειται να αναλυθούν αποτελούν πολύ σημαντικούς παράγοντες που επιδρούν στο αποτέλεσμα (Michel and Buszewski, 2009; Angerosa, 2000; Morales and Tsimidou, 2000b).



Σχήμα 1.7: Περιγραφή της τεχνικής θερμικής εκρόφησης: εκδίωξη με διαβίβαση αδρανούς αερίου.

1.5.3.4 Μικροεκχύλιση στερεής φάσης (SPME)

Στην SPME (Pawliszyn, 1997) χρησιμοποιείται μια ίνα κατασκευασμένη από τηγμένο διοξείδιο του πυριτίου η οποία έχει καλυφθεί με ένα ειδικό πολυμερικό υλικό (στατική φάση). Τα πτητικά συστατικά του δείγματος ή της υπερκείμενης του δείγματος αέριας φάσης αλληλεπιδρούν με το πολυμερικό υλικό. Αυτή η αλληλεπίδραση έχει ως αποτέλεσμα τη συγκράτησή τους με προσρόφηση στην ίνα. Παράμετροι όπως, ο τρόπος ανάδευσης του δείγματος, η θερμοκρασία της δειγματοληψίας, η τιμή του pH του δείγματος και ο όγκος του δείγματος, καθώς και οι συνθήκες προσρόφησης και εκρόφησης των πτητικών συστατικών παίζουν σημαντικό ρόλο και πρέπει να διατηρούνται σταθερές προκειμένου να εξασφαλισθεί η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα των μετρήσεων. Η πολικότητα και η πτητικότητα των συστατικών που πρέπει να παραληφθούν από το δείγμα παίζουν σημαντικό ρόλο στον καθορισμό των συνθηκών στις οποίες θα γίνει η δειγματοληψία τους από την υπερκείμενη του δείγματος αέρια φάση και ο αεριοχρωματογραφικός διαχωρισμός τους. Η απουσία διαλύτη επιτρέπει την εισαγωγή όλης της ποσότητας των πτητικών συστατικών που εκροφώνται από την ίνα στη τριχοειδή στήλη, γεγονός που αυξάνει την ευαισθησία (Vas and Vékey, 2004).

Η συσκευή SPME είναι πάρα πολύ απλή και έχει την εμφάνιση μιας τροποποιημένης σύριγγας που αποτελείται από μια διάταξη συγκράτησης της ίνας και έναν αγωγό εντός του οποίου προστατεύεται η ίνα. Η τελευταία μπορεί με τη βοήθεια

ειδικού ελατηρίου να εξέλθει από τον αγωγό και να έρθει σε άμεση επαφή με το δείγμα ή την υπερκείμενή του αέρια φάση (headspace). Σε δείγματα με πολύπλοκη σύσταση, όπως τα τρόφιμα, είναι αναγκαίο να έχει προηγηθεί η διάχυση των πτητικών συστατικών από τη μήτρα του δείγματος στο εσωτερικό διάκενο του φιαλιδίου εντός του οποίου έχει μεταφερθεί το προς εξέταση δείγμα και να έχει αποκατασταθεί η ισορροπία. Σημαντική βελτίωση της κινητικής της διάχυσης μπορεί να επιτευχθεί με ανάδευση ή με θέρμανση του δείγματος σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες.

Στο εμπόριο είναι διαθέσιμοι 6 τύποι ινών SPME που διαφοροποιούνται ως προς την ποσότητα και ως προς το πάχος του υμενίου του υλικού. Το πολυμερικό υλικό των ινών αυτών είναι είτε καθαρό υγρό πολυμερές, όπως το πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο (PDMS) ή ένας πολυακρυλικός εστέρας (PA), είτε σύνθετα πολυμερή, όπως Carboxen-PDMS, Divinylbenzene (DVB)-PDMS, Carbowax-DVB και DVB-Carbowax-PDMS. Τα σύνθετα πολυμερή, που αποτελούνται από ένα υγρό πολυμερές και ένα πορώδες στερεό υλικό ή μίγματα πορώδων υλικών συνδυάζουν τις ιδιότητες συγκράτησης των πτητικών συστατικών στο υγρό πολυμερές με την ικανότητα προσρόφησης που έχουν τα σωματίδια του πορώδους υλικού. Για την ανάλυση των πτητικών συστατικών στην άλμη και στον καρπό της ελιάς έχουν χρησιμοποιηθεί CAR/PDMS (Tufariello et al., 2015), DVB/PDMS (Malheiro et al., 2011) και DVB/CAR/PDMS (Bleve et al., 2014).

Ο τύπος της ίνας που χρησιμοποιείται κατά την εφαρμογή της τεχνικής SPME επηρεάζει την εκλεκτικότητα της δειγματοληψίας. Οι με πολική στατική φάση ίνες χρησιμοποιούνται για τη συγκράτηση των πολικών πτητικών συστατικών, σε αντίθεση με τις ίνες που φέρουν μη πολική στατική φάση, οι οποίες χρησιμοποιούνται για τη συγκράτηση των μη πολικών πτητικών συστατικών κατ' αναλογία με ότι συμβαίνει κατά τον αεριοχρωματογραφικό διαχωρισμό στις τριχοειδείς στήλες. Οι ίνες χρησιμοποιούνται για εκατοντάδες δειγματοληψιών στην περίπτωση που αυτές γίνονται από την υπερκείμενη του δείγματος αέρια φάση (Vas and Vékey, 2004).

1.5.3.5 Διαχωρισμός και ταυτοποίηση πτητικών συστατικών με Αέρια Χρωματογραφία– Φασματομετρία Μαζών (GC– MS)

Τα πτητικά συστατικά μετά την εκρόφησή τους από την ίνα, διαχωρίζονται σε τριχοειδή στήλη. Τα διαχωρισθέντα συστατικά μεταφέρονται από τον αέριο

χρωματογράφο στο φασματόμετρο μαζών, με τη βοήθεια ενός φέροντος αερίου (συνήθως ήλιο), μέσω μια γραμμής μεταφοράς, η οποία είναι θερμαινόμενη και τα διατηρεί στην αέρια φάση. Στο φασματόμετρο μαζών, κάθε συστατικό ιονίζεται, κυρίως με πρόσπτωση δέσμης ηλεκτρονίων ορισμένης ενέργειας. Τα ιόντα οδηγούνται στον αναλυτή μαζών, όπου και διαχωρίζονται σύμφωνα με το λόγο μάζας προς φορτίο ή m/z .

Η ταυτοποίηση των πτητικών ενώσεων γίνεται με τρεις τρόπους: (α) με χρήση πρότυπων ενώσεων, συγκρίνοντας τους χρόνους κατακράτησης και τα θραύσματα, (β) με υπολογισμό του δείκτη κατακράτησης, γνωστού και ως Kovats Index ή Retention Index (KI ή RI) ο οποίος συσχετίζει τον χρόνο κατακράτησης της αναλυόμενης ένωσης με τους χρόνους κατακράτησης μιας ομόλογης σειράς κανονικών αλκανίων και (γ) με τη χρήση έτοιμων βιβλιοθηκών φασμάτων μαζών (π.χ. Wiley ή NIST).

Ο υπολογισμός του δείκτη κατακράτησης βασίζεται στον υπολογισμό των δεικτών συγκράτησης Kovats από τα χρωματογραφικά δεδομένα του αεριοχρωματογραφικού διαχωρισμού σε δύο τουλάχιστον τριχοειδείς στήλες που φέρουν διαφορετικής πολικότητας στατική φάση. Ο δείκτης συγκράτησης (RI) Kovats υποδηλώνει τη σχετική θέση μιας κορυφής σε ένα αεριοχρωματογράφημα ως προς τις κορυφές που αντιστοιχούν σε δύο διαδοχικά μέλη της ομόλογης σειράς των κανονικών αλκανίων και υπολογίζεται, στην περίπτωση μη ισόθερμου διαχωρισμού, από τη σχέση:

$$RI = 100Z + 100 [(t'_{r(X)} - t'_{r(Z)}) / (t'_{r(Z+1)} - t'_{r(Z)})]$$

Όπου Z είναι ο αριθμός των ατόμων άνθρακα του αλκανίου του οποίου η κορυφή εκκλύεται πριν το πτητικό συστατικό X , $t'_{r(X)}$ είναι ο σχετικός χρόνος συγκράτησης του πτητικού συστατικού X , $t'_{r(Z)}$ ο σχετικός χρόνος συγκράτησης του κ -αλκανίου με (Z) άτομα άνθρακα και $t'_{r(Z+1)}$ είναι ο σχετικός χρόνος συγκράτησης του κ -αλκανίου με $(Z+1)$ άτομα άνθρακα.

Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιείται κυρίως με τη χρήση ενός εσωτερικού προτύπου, με αυτόν τον τρόπο υποτίθεται ότι όλες οι αποκρίσεις για όλες τις ενώσεις είναι ίσες με ένα. Ωστόσο, επειδή αυτό δεν ισχύει στη πράξη, ο προσδιορισμός χαρακτηρίζεται ημιποσοτικός. Έχει βρεθεί ότι η ανάκτηση των πτητικών ενώσεων που παγιδεύονται μέσω DHS, αλλά και μέσω SPME από ποσοτικής άποψης, είναι διαφορετική και σχετίζεται με τον αριθμό των ατόμων άνθρακα, το είδος και τη θέση

της χαρακτηριστικής ομάδας (Angerosa et al., 1997). Επιπλέον, προβλήματα προκύπτουν όταν η SPME πρέπει να εφαρμοστεί σε έρευνες που διαρκούν για μεγάλο χρονικό διάστημα και όπου πρέπει να εξασφαλιστεί ότι η ίνα θα διατηρήσει σταθερή απόκριση και δεν θα χαλάσει. Έχει βρεθεί ότι στις πολυστρωματικές ίνες τέτοιου είδους προβλήματα είναι πολύ πιθανό να προκύψουν δεδομένου ότι οι διάφορες επικαλύψεις μπορεί να μην επιτυγχάνουν ικανοποιητική ανάκτηση. Πιο συγκεκριμένα για την DVB-CAR-PDMS έχει βρεθεί μείωση στην ευαισθησία της ίνας με αύξηση της ανθρακικής αλυσίδας στις αλκοόλες και στα αλκάνια (Kalua, et al., 2006).

Για να ξεπεραστούν τα προβλήματα, που σχετίζονται με τη συμπεριφορά της κάθε πτητικής ένωσης και με τις απώλειες κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας του δείγματος, ώστε να γίνει ακριβής ποσοτικός προσδιορισμός τους, θα πρέπει να κατασκευαστούν μία σειρά από πρότυπες καμπύλες. Η βαθμονόμηση μπορεί να επιτευχθεί με διάφορους τρόπους: με τη χρήση διαφόρων συγκεντρώσεων μιας ένωσης παρόμοιων χαρακτηριστικών με αυτές του δείγματος, με χρήση μίγματος ενώσεων μιας ομόλογης σειράς (π.χ., αλδεΐδες, αλκοόλες κλπ) ή με χρήση μίγματος ενώσεων διαφόρων ομόλογων σειρών η οποία και προτιμάται (Kalua et al., 2006). Τέλος, για τη λύση των προβλημάτων, που προκύπτουν λόγω μη ικανοποιητικής ανάκτησης καθώς και της χρωματογραφικής συμπεριφοράς, έχει προταθεί και η τεχνική προσθήκης σταθερών ισοτόπων των αναλυόμενων ενώσεων (Guth and Grosch, 1991).

1.6 Μοριακές τεχνικές για την ταυτοποίηση μικροοργανισμών

1.6.1 Εισαγωγή

Οι μοριακές διαγνωστικές τεχνικές είναι αρωγοί στην προσπάθεια για την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών, αλλά και την αύξηση της διαγνωστικής ευαισθησίας, ταυτόχρονα με τη συντόμευση της διαγνωστικής πράξης. Με αυτόν τον τρόπο εξασφαλίζεται ταχύτερη και ακριβέστερη αντιμετώπιση των παθογόνων μικροβίων, είτε αυτά έχουν ήδη προσβάλει ανθρώπους, ζώα και φυτά είτε υπάρχουν στα τρόφιμα και στο περιβάλλον των συγκεκριμένων ξενιστών. Η ανάπτυξη τεχνικών βασισμένων στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR, Polymerase Chain Reaction) έχει οδηγήσει σε σημαντική μείωση του χρόνου που απαιτείται για την ταυτοποίηση και χαρακτηρισμό των μικροοργανισμών.

1.6.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης επινοήθηκε από τον Mullis το 1985 και έφερε επανάσταση στη μοριακή γενετική. Η μέθοδος αυτή είναι ευρέως διαδεδομένη με το όνομα PCR από τα αρχικά των λέξεων Polymerase Chain Reaction. Ένα μεγάλο πρόβλημα πριν την ανακάλυψη αυτής της μεθόδου αποτελούσε η ανάλυση και η απομόνωση των γονιδίων λόγω της σπανιότητάς τους μέσα στο γονιδίωμα. Έτσι λοιπόν με την επινοήση της PCR η δυσκολία αυτή ξεπεράστηκε.

Με την τεχνική αυτή αντιγράφεται *in vitro* κατά εκατομμύρια φορές ένα τμήμα γονιδιακού δεσοξυριβοζονουκλεϊνικού οξέος (DNA) οποιασδήποτε προέλευσης, έτσι ώστε να είναι εφικτή η περαιτέρω μελέτη του με διάφορες μεθόδους, όπως η αλληλούχιση, η πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες, η ηλεκτροφόρηση κ.ά.. Η αντίδραση PCR «ενισχύει» μια συγκεκριμένη ακολουθία-στόχο του χρωμοσώματος, τα δύο άκρα της οποίας ορίζονται από δύο μικρά τμήματα DNA, που καλούνται «primers», ένα για κάθε κλώνο. Επειδή η ακολουθία αυτή δεν είναι μοναδική μέσα στο χρωμόσωμα, η αντίδραση PCR ενισχύει όχι μόνο τη στενή ακολουθία-στόχο αλλά και ευρύτερες περιοχές. Με αυτό τον τρόπο παράγονται τεμάχια διαφορετικού μεγέθους, που διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση, δημιουργώντας ένα αποτύπωμα πάνω σε ταινία, το οποίο είναι χαρακτηριστικό για κάθε στέλεχος.

Η ταχύτητα, η ειδικότητα, η μεγάλη ευαισθησία και το χαμηλό της κόστος την έχουν κάνει μια από τις συχνότερα χρησιμοποιούμενες μεθόδους σε ερευνητικό και διαγνωστικό επίπεδο. Η τεχνική αυτή αποτελεί εύχρηστο εργαλείο και βρίσκει ευρεία εφαρμογή στην ιατρική, στη βιολογία, στην ιολογία, στην ιατροδικαστική και σε άλλες επιστήμες (Λύτρας, 1997). Τα συστατικά αυτής είναι τα εξής:

1.6.2.1 Αλληλούχιση γενωμικού DNA

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

1.6.2.2 DNA πολυμεράση

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

1.6.2.3 Εκκινητές (primers)

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

- Το μήκος τους κυμαίνεται από 18 έως 30 ζεύγη βάσεων ενώ όσο μεγαλύτερο είναι το μήκος τους τόσο αυξάνεται η ειδικότητα πρόσδεσής τους με την αλυσίδα μήτρα.
- Η περιεκτικότητα τους σε G-C κυμαίνεται από 40 έως 60% καθώς εκκινητές πλούσιοι σε G-C είναι πιο ανθεκτικοί σε υψηλές θερμοκρασίες υβριδισμού αλλά και πιο επιρρεπείς σε αυτοϋβριδισμό.
- Σχεδιάζονται με τέτοιο τρόπο ώστε να αποφεύγεται ο σχηματισμός ομοδιμερών και ετεροδιμερών μεταξύ τους καθώς και ο σχηματισμός δευτερογενούς δομής.

- Η θερμοκρασία τήξης (melting temperature, T_m) του ενός εκκινητή πρέπει να είναι παραπλήσια με του δεύτερου και να κυμαίνεται μεταξύ 55 °C και 80 °C. Η τιμή T_m εξαρτάται από την ποσοστιαία σύστασή της σε ζεύγη βάσεων κυρίως G-C αλλά και A-T και υπολογίζεται με διάφορους μαθηματικούς τύπους. Καθώς αυξάνεται το μήκος των εκκινητών αυξάνεται και η τιμή της παραμέτρου T_m . Αν η τιμή T_m αυξηθεί υπερβολικά, η θερμοκρασία που θα απαιτείται για την υβριδοποίηση θα είναι μεγαλύτερη από τη θερμοκρασία στην οποία η πολυμεράση καταλύει τη σύνθεση των νέων αλυσίδων.

1.6.2.4 Τριφωσφορικά δεσοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs)

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

1.6.2.5 Ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης (Buffer)

Το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης περιέχει τα εξής συστατικά: Tris HCl (pH=8,3 στους 20 °C) $MgCl_2$, KCl, Tween 20 ή TritonX-100 και ζελατίνη ή βόεια αλβουμίνη. Αυτά τα συστατικά υποβοηθούν τη διαδικασία αντιγραφής. Πιο συγκεκριμένα για την Taq DNA πολυμεράση χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα που περιλαμβάνει 10 mM TrisHCl (pH:8,4), 50mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,01 % gelatine, 0,01 % NP 40, 0,01 % Tween 20. Τα δύο τελευταία αντιδραστήρια αποτελούν μη ιοντικές αμφιφιλικές ενώσεις, η παρουσία των οποίων είναι απαραίτητη για την αύξηση της προοδευτικότητας της πολυμεράσης. Το KCl διευκολύνει την υβριδοποίηση των εκκινητών και ενισχύει την δραστικότητα της πολυμεράσης, ενώ τα ιόντα Mg^{2+} είναι απαραίτητα για τη σταθερότητα του ενζύμου και ταυτόχρονα έχουν σημαντική επίδραση τόσο στην απόδοση όσο και στην εξειδίκευση της αντίδρασης. Επίσης αυτά σχηματίζουν διαλυτά σύμπλοκα με τα dNTPs τα οποία αποτελούν υπόστρωμα του ενζύμου. Χαμηλές συγκεντρώσεις μπορούν να δώσουν λίγο προϊόν σε ποσότητα, ενώ υψηλές αυξάνουν την απόδοση της αντίδρασης αλλά μπορεί να εμφανίσουν μη ειδικά προϊόντα. Το ρυθμιστικό διάλυμα εξασφαλίζει βέλτιστο pH και συνθήκες αλατότητας για την δράση της πολυμεράσης.

1.6.2.6. Νερό (ddH₂O)

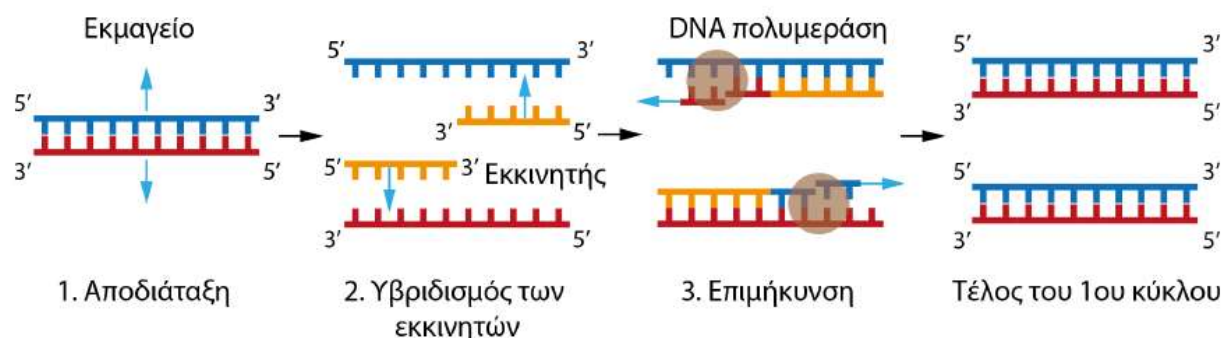
Πρόκειται για διπλά απιονισμένο νερό το οποίο προστίθεται στο μίγμα ύστερα από τον υπολογισμό του όγκου των παραπάνω διαλυμάτων για να συμπληρώσει τον τελικό όγκο της αντίδρασης.

Μία αντίδραση PCR περιλαμβάνει τρία διακριτά στάδια (Σχήμα 1.8):

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

2) Υβριδισμός (annealing): Σε αυτό το στάδιο η θερμοκρασία μειώνεται ώστε να πραγματοποιηθεί ο υβριδισμός των εκκινητών με τις πλέον μονόκλωνες αλυσίδες DNA. Η κατάλληλη θερμοκρασία για το στάδιο αυτό υπολογίζεται βάσει της θερμοκρασίας τήξης των εκκινητών (40 °C-60 °C) καθώς και από το πόσο ειδικοί είναι οι εκκινητές για την ακολουθία που πρόκειται να ενισχυθεί.

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



Σχήμα 1.8: Στάδια αντίδρασης PCR (Παλαιολόγου, 2015).

Όταν ολοκληρώνεται ο πρώτος κύκλος αντίδρασης έχουμε δύο θυγατρικές δίκλωνες αλυσίδες DNA. Τα στάδια επαναλαμβάνονται για 30-35 κύκλους (Σχήμα 1.8) και στο τέλος των n κύκλων η αντίδραση θα έχει δώσει $2n$ δίκλιωνα μόρια DNA αντίγραφα της αρχικής αλληλουχίας που θέλουμε να ενισχύσουμε. Στο τέλος κάθε αντίδρασης για να ολοκληρωθεί η επιμήκυνση σε όλες τις μονόκλωνες περιοχές πραγματοποιείται ένα τελικό βήμα επιμήκυνσης στους 72 °C για 10-15 min. Η PCR εκτελείται στο θερμικό κυκλοποιητή (Thermal cycler), συσκευή που φέρει θερμαινόμενη πλάκα που μπορεί να εναλλάσσει θερμοκρασίες με ταχύτητα και ακρίβεια. Ο θερμικός κυκλοποιητής είναι μια προγραμματιζόμενη συσκευή, στην οποία μπορούμε να ρυθμίσουμε την επιθυμητή θερμοκρασία και τη διάρκεια κάθε σταδίου αλλά και τη διαδοχή τους (Σχήμα 1.9).



Σχήμα 1.9: Θερμικός κυκλοποιητής όπου πραγματοποιείται η κλασική αντίδραση PCR. Στην οθόνη του μηχανήματος απεικονίζεται το πρόγραμμα των διαδοχικών κύκλων για τη διενέργεια της αντίδρασης.

Η αντίδραση PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε σειρά με πολλές μεθόδους ταυτοποίησης όπως είναι η ανάλυση πολυμορφισμού μήκους θραυσμάτων περιορισμού (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism), τα τυχαία

ενισχυμένα τμήματα πολυμορφικού DNA (RAPD, Random Amplified Polymorphic DNA) και η ανάλυση αλληλούχισης (sequencing analysis).

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί τεχνικές που δεν απαιτούν απομόνωση μικροοργανισμών και ονομάζονται μέθοδοι ανεξάρτητης καλλιέργειας (culture independent methods). Τέτοιες τεχνικές είναι ο in situ υβριδισμός φθορισμού (FISH, Fluorescence in situ Hybridisation) και η συζευγμένη με PCR βαθμιδωτή αποδιατακτική ηλεκτροφορηση πηκτής (DGGE, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis).

1.6.3. Τυχαία ενισχυμένα τμήματα πολυμορφικού DNA (RAPD)

Η ανάλυση τυχαία ενισχυμένων τμημάτων πολυμορφικού DNA (RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA) είναι ένας μοριακός δείκτης που βασίζεται στο διαφορικό πολλαπλασιασμό με την βοήθεια της PCR, τυχαίων αλληλουχιών ενός δείγματος DNA με εκκινητές που αποτελούνται από μικρές ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες και χρησιμοποιείται στην παραγωγή αποτυπωμάτων και την περιγραφή της γενετικής παραλλακτικότητας στελεχών. Το πρωτόκολλο για την PCR χρησιμοποιεί ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές μικρού μήκους (συνήθως 10-15 ζεύγη βάσεων) και τυχαίας ακολουθίας, οι οποίοι υβριδίζουν σε τυχαίες θέσεις του γονιδιώματος. Το αποτέλεσμα της αντίδρασης είναι ένα μίγμα ενισχυμένων προϊόντων και τα πρότυπα που προκύπτουν έπειτα από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης παρέχουν μια εικόνα της οργάνωσης του γονιδιώματος. Ως εκ τούτου, μπορούν να ανιχνευθούν διαφορές μεταξύ των γονιδιωμάτων δυο οργανισμών, είτε μέλη του ίδιου ή διαφορετικών ειδών.

2. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΕΡΕΥΝΑΣ

Αρχικά, αντικείμενο της παρούσας διατριβής αποτέλεσε η μελέτη μιας αυθόρμητης αερόβιας ζύμωσης, δυο δημοφιλών για την Ελλάδα τύπων επιτραπέζιας ελιάς, την Καλαμών και την Κονσερβολιά, προκειμένου να αξιολογηθούν οι φυσικοχημικές και μικροβιολογικές μεταβολές, αλλά και να απομονωθούν και να χαρακτηριστούν βακτήρια γαλακτικού οξέος και ζυμομύκητες, κατάλληλοι για χρήση ως καλλιέργειες εκκίνησης σε μελλοντικές ζυμώσεις.

Ακολούθησε μια ελεγχόμενη αναερόβια ζύμωση των παραπάνω ποικιλιών. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν ζύμες ως εκκινητές (*D. hansenii* και *S. cerevisiae*, για Κονσερβολιά και Καλαμάτα, αντίστοιχα) και γαλακτικά βακτήρια (*L. mesenteroides* και *L. plantarum*, για Καλαμάτα και Κονσερβολιά, αντίστοιχα). Για κάθε ποικιλία μελετήθηκαν 4 διαφορετικές μεταχειρίσεις, οι οποίες είχαν ως εξής: δοχείο μάρτυρας (χωρίς προσθήκη καλλιέργειας εκκίνησης), δοχείο το οποίο ενοφθαλμίστηκε με καλλιέργεια βακτήριο και μετά ζύμη, δοχείο το οποίο ενοφθαλμίστηκε με καλλιέργεια ζύμης και μετά βακτήριο, δοχείο το οποίο ενοφθαλμίστηκε με μεικτή καλλιέργεια εκκίνησης, ζύμης και γαλακτικού βακτηρίου. Πραγματοποιήθηκε αναλυτικός χαρακτηρισμός των φαινολικών ενώσεων και μελετήθηκαν οι μεταβολές τους κατά την πορεία της ζύμωσης. Στο τέλος, οι επεξεργασμένες ελιές υποβλήθηκαν σε ανάλυση πτητικών ενώσεων και οργανοληπτική αξιολόγηση ώστε να ληφθούν επιπρόσθετες πληροφορίες σχετικές με τις πιθανές διαφορές που μπορεί να προκάλεσε η κάθε μεταχείριση στο τελικό προϊόν.

Τέλος, λήφθηκαν δείγματα από βιομηχανική αναερόβια ζύμωση των προαναφερθεισών ποικιλιών, με σκοπό την ταυτοποίηση μυκήτων. Η επιλογή των στελεχών αυτών έγινε με εφαρμογή βιοχημικών δοκιμών, ώστε να ταυτοποιηθούν υποψήφια στελέχη μυκήτων και να δοκιμαστούν ως αυτόχθονοι εκκινητές (μαζί με ήδη επιλεγμένα στελέχη ζυμών και γαλακτικών βακτηρίων) για την παραγωγή μαύρων επιτραπέζιων ελιών.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΜΕΛΕΤΗ ΑΥΘΟΡΜΗΤΗΣ, ΑΕΡΟΒΙΑΣ ΖΥΜΩΣΗΣ ΦΥΣΙΚΩΣ ΩΡΙΜΩΝ ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΩΝ ΕΛΙΩΝ

3.1.1 Προετοιμασία δειγμάτων και μέθοδος ζύμωσης

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν δυο ποικιλίες επιτραπέζιων ελιών, Κονσερβολιά Άρτας και Καλαμών, ελαιοκομικής περιόδου 2011-2012. Ο καρπός συλλέχθηκε στο στάδιο ωρίμανσης 5 και παραχωρήθηκε από τον Ελαιοκομικό Συνεταιρισμό Κομποτίου Άρτας τον Ιανουάριο. Κατά την άφιξη του καρπού στο εργαστήριο απομακρύνθηκε ο ελαττωματικός καρπός. Ο υγιής καρπός πλύθηκε με άφθονο νερό βρύσης και τοποθετήθηκε σε πλαστικούς περιέκτες HDPE των 20 kg με 12 kg καρπό. Το αλάτι προστέθηκε σταδιακά, ξεκινώντας με 3 %, 5 % τη δεύτερη εβδομάδα και 8 % (w/v) NaCl την τρίτη εβδομάδα, διατηρώντας την τελευταία περιεκτικότητα σταθερή καθόλη τη διάρκεια της ζύμωσης με συνεχή προσθήκη αλάτος.

Η διαδικασία της ζύμωσης πραγματοποιήθηκε υπό αερόβιες συνθήκες. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε αντλία αέρος διαβιβάζοντας στους περιέκτες αέρα μέσω ενός πλαστικού σωλήνα, ο οποίος τοποθετήθηκε από το άνοιγμα των περιεκτών και έφτανε μέχρι τον πυθμένα τους. Η ροή του αέρα ρυθμίστηκε ώστε να εξέρχεται αέρας 0,3 L/h και κιλά ελιάς, για 5 μέρες την εβδομάδα και 8 h τη μέρα (De Castro et al., 2007) σε συνολικό χρονικό διάστημα 90 ημερών (μέχρι εξαντλήσεως των σακχάρων). Υπό αυτές τις συνθήκες και με θερμοκρασία 10-15 °C, ο καρπός ζυμώθηκε σε εργαστηριακή κλίμακα σύμφωνα με την ελληνικού τύπου επεξεργασία. Για κάθε ποικιλία πραγματοποιήθηκαν δυο ζυμώσεις.

3.1.2 Πρότυπα, αντιδραστήρια και διαλύτες

Η μεθανόλη, το ακετονιτρίλιο, το νερό και ο οξικός αιθυλεστέρας που χρησιμοποιήθηκαν για την εκχύλιση των φαινολικών ενώσεων αλλά και για τον χρωματογραφικό προσδιορισμό ήταν καθαρότητας HPLC από τη Merck (Darmstadt, Γερμανία). Τα πρότυπα που χρησιμοποιήθηκαν για τη ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών ενώσεων ήταν: η υδροξυτυροσώλη, η τυροσώλη, η

ελευρωπαΐνη και ο βερμπαπσκοζίτης από την Extrasynthese (Genay, Γαλλία), p-κουμαρικό και καφεϊκό οξύ από τη Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany).

3.1.3 Φυσικοχημικές αναλύσεις

3.1.3.1 Προσδιορισμός pH στην άλμη

Η μέτρηση του pH έγινε με τη χρήση ψηφιακού πεχαμέτρου (pH Microprocessor pH Meter, Hanna Instruments, Πάντοβα, Ιταλία). Οι μετρήσεις πραγματοποιούνταν σε εβδομαδιαία βάση, λαμβάνοντας το μέσο όρο τριών τιμών κάθε δείγματος.

3.1.3.2 Προσδιορισμός NaCl στην άλμη

Η συγκέντρωση του NaCl παράμεινε σταθερή καθόλη την πορεία της ζύμωσης, προσθέτοντας αλάτι. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιούνταν τακτικοί έλεγχοι (μια φορά την εβδομάδα) της συγκέντρωσης του αλατιού ακολουθώντας την εξής μέθοδο:

1 mL άλμης μεταφέρεται σε κωνική φιάλη των 250 mL και προστίθενται 200 mL απεσταγμένο νερό και 1 mL δείκτη χρωμικού καλίου 1% (κίτρινος χρωματισμός). Το παραπάνω δείγμα ογκομετρείται με διάλυμα νιτρικού αργύρου 0,1 N, ώσπου να σχηματιστεί καστανοκίτρινο χρώμα.

Η ποσότητα του αλατιού υπολογίζεται από τη μαθηματική σχέση:

$$M = V \times C \times Mr$$

Όπου: V=όγκος του διαλύματος AgNO₃ που καταναλώθηκε κατά την τιτλοδότηση (mL),

C = συγκέντρωση του διαλύματος AgNO₃ και

Mr = μοριακό βάρος του αλατιού (Mr_{NaCl}=58,5).

Οπότε η % w/v περιεκτικότητα σε αλάτι δίνεται από τη σχέση

$$\% \text{ περιεκτικότητα άλμης} = m \times 100$$

3.1.3.3 Προσδιορισμός ογκομετρούμενης οξύτητας στην άλμη

Η ογκομετρούμενη οξύτητα προσδιορίστηκε στην άλμη καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης με τιτλοδότηση με NaOH 0,1N. Συγκεκριμένα, 10 mL άλμης προστέθηκαν σε 100 mL απεσταγμένο νερό και στη συνέχεια 2-3 σταγόνες

φαινολοφθαλεΐνης. Ακολούθησε ογκομέτρηση μέχρις ότου εμφανιστεί ρόδινο χρώμα, που μένει σταθερό για 1-2 min. Όταν εξαφανίστηκε το ρόδινο χρώμα προστέθηκαν ακόμη μερικές σταγόνες άλκαλι. Αν το περιεχόμενο διάλυμα της κωνικής είχε έντονο ερυθρό τότε η προηγηθείσα ανάγνωση της προχοΐδας αντιστοιχούσε στο τέλος της αντιδράσεως. Αν όχι, συνεχιζόταν η προσθήκη αλκάλεως μέχρι να επανεμφανιστεί το κόκκινο χρώμα και να παραμείνει για λίγο σταθερό, οπότε η νέα ανάγνωση στην προχοΐδα ήταν η τελική. Η οξύτητα υπολογίστηκε σε % w/v γαλακτικό οξύ από τη σχέση:

$$\text{Οξύτητα (100 mL άλμης)} = V \times N \times G \times 10 \text{ mg γαλακτικού οξέος}$$

Όπου: V = όγκος (mL) δ/ματος NaOH 0,1 N

N = κανονικότητα NaOH, 0,1N

G = ισοδύναμο βάρος γαλακτικού οξέος, ίσο με 90

3.1.3.4 Προσδιορισμός σακχάρων στον καρπό

Για την εκχύλιση των σακχάρων από την ελιά χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των Eris et al., (2007). Συγκεκριμένα, 0,1 g τεμαχισμένης ελιάς τοποθετήθηκαν σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα με 5 mL 80 % (v/v) αιθανόλη και αναδεύτηκαν για 2 min σε Vortex. Ύστερα το μίγμα μεταφέρθηκε σε υδατόλουτρο 85 °C για 1 h. Το αιθανολικό διάλυμα συλλέχθηκε σε σφαιρική φιάλη και η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε άλλες τρεις φορές, για 30 min, 15 min και 15 min αντίστοιχα. Τα αιθανολικά διαλύματα αφού συλλέχθηκαν, εξατμίστηκαν σε περιστροφικό εξατμιστήρα υπό κενό στους 55 °C. Το ξηρό υπόλειμμα διαλύθηκε σε 1 mL αποσταγμένο νερό.

Ο προσδιορισμός των σακχάρων στις άλμες πραγματοποιήθηκε μέσω HPLC-RID. Πριν από την ανάλυση, το εκχυλισμένο δείγμα διηθήθηκε μέσω φίλτρου σύριγγας 0,4 μm (Millex; Millipore Co., Bedford, MA, USA) και στη συνέχεια εγχύθηκε στο χρωματογραφικό σύστημα Shimadzu PROMINENCE (Kyoto, Japan), εξοπλισμένο με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης RID-6A. Ο διαχωρισμός των σακχάρων πραγματοποιήθηκε με στήλη Aminex HPX-87H (300 × 7,8 mm) (Bio-Rad) διατηρημένη σε θερμοστάτη στηλών CTO-10Avr στους 60 °C. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε τρις-απεσταγμένο νερό με ροή 0,8 mL/min. Τα συστατικά ταυτοποιήθηκαν συγκρίνοντας τους χρόνους κατακράτησής τους με εκείνους πρότυπων ενώσεων γλυκόζης και φρουκτόζης. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των

σακχάρων στα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν πρότυπες καμπύλες γλυκόζης, φρουκτόζης και σακχαρόζης με συγκέντρωση 0,1 mg/L, 1,0 mg/L, 2,0 mg/L, 4,0 mg/L και 5,0 mg/L. Όλα τα πρότυπα δείγματα αραιώθηκαν με μείγμα ακετονιτριλίου-νερού (1:1 v/v).

3.1.3.5 Εκχύλιση φαινολικών συστατικών από την άλμη

10 mL άλμης αναμίχθηκαν με 5 mL οξικού αιθυλεστέρα και αναδεύτηκαν για 1 min σε συσκευή Vortex. Η υπερκείμενη φάση συλλέχθηκε σε σφαιρική φιάλη. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε 3 φορές και ο όγκος που συλλέχθηκε εξατμίστηκε σε περιστροφικό εξατμιστήρα υπό κενό στους 45 °C. Το ξηρό υπόλειμμα διαλυτοποιήθηκε σε 5 mL μεθανόλης/H₂O 1:1 (Ruiz-Barba et al., 1993).

3.1.3.6 Προσδιορισμός ολικών φαινολικών στην άλμη με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

0,2 mL από το διάλυμα εκχυλισμένων φαινολικών άλμης μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL, όπου προστέθηκαν 5 mL απιονισμένου νερού και 0,5 mL αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu (Merk, Darmstadt Germany). Το δείγμα ανακινήθηκε καλά και μετά από 3 min προστέθηκε 1mL κορεσμένου διαλύματος (35 % w/v) Na₂CO₃ (Merk, Darmstadt Germany). Προστέθηκε νερό μέχρι τη χαραγή και η ογκομετρική φιάλη ανακινήθηκε ελαφρά. Η απορρόφηση του διαλύματος ελήφθη μετά από μια 1 h στο σκοτάδι στα 725 nm ως προς ένα διάλυμα αναφοράς (τυφλό). Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών παρασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη αναφοράς με διάλυμα γαλλικού οξέος γνωστών συγκεντρώσεων (100-1000 ppm) (Gutfinger, 1981). Ο χρωματομετρικός προσδιορισμός των ολικών φαινολών πραγματοποιήθηκε σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού Ultraspec II της LBK Biochrom (Cambridge, England).

3.1.3.7 Προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων στην άλμη με HPLC-UV

Ο διαχωρισμός των φαινολικών ενώσεων έγινε σε χρωματογράφο υψηλής απόδοσης JASCO PU-980 (Τόκιο, Ιαπωνία) με μία μονάδα μίξης και διανομής των διαλυτών LG-980-02, συνδεδεμένη με ανιχνευτή UV/vis, UV-970. Η εισαγωγή των δειγμάτων έγινε με βαλβίδα εισαγωγής Rheodyne, χωρητικότητας 20 μ L.

Χρησιμοποιήθηκε η στήλη Lichrospher 100RP18 (4,0 mm id × 250 mm, particle size = 5 μm; Merck, Darmstadt Germany). Οι διαλύτες έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 2,5 % οξικό οξύ σε νερό (A) και μεθανόλη/ακετονιτρίλιο, 1/1 v/v (B). Ο ρυθμός ροής των διαλυτών ήταν 1 mL/min, η ανάλυση έγινε σε θερμοκρασία δωματίου και ο όγκος δείγματος που εισήχθη ήταν 20 μL. Το πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης διαμορφώθηκε ως εξής:

Χρόνος (min)	A (%) (2,5 % CH ₃ COOH σε νερό)	B (%) (CH ₃ OH:CH ₃ CN, 1:1 v/v)
0	95	5
20	70	30
25	65	35
50	60	40
55	0	100
65	0	100
80	95	5

Για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών ενώσεων χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά πρότυπα: υδροξυτυροσόλης, τυροσόλης, ελευρωπαΐνης και βερμπασκοζίτη της εταιρείας Extrasynthese (Genay, France), p-κουμαρικό οξύ και καφεϊκό οξύ της εταιρείας Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany).

3.1.3.8 Ημιποσοτικός προσδιορισμός πτητικών ενώσεων στις ελιές με GC-MS

Οι πτητικές ενώσεις στον καρπό απομονώθηκαν με την τεχνική της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (Solid Phase Micro-Extraction) δια υπερκείμενου χώρου και ταυτοποιήθηκαν με Αέρια Χρωματογραφία/Φασματομετρία Μαζών με χρήση της SPME-ίνας CAR/PDMS-75μm (Supelco Ltd., Bellefonte, PA). Η ίνα πριν την χρήση εγκλιματίστηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για την επιλογή των βέλτιστων συνθηκών της SPME δειγματοληψίας έγιναν διάφορες δοκιμές στις οποίες μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας (30 ή 40 °C) και του χρόνου εξισορρόπησης (10, 20 ή 30 min) στον αριθμό των πτητικών συστατικών που διαχωρίζονται και τα εμβαδά των κορυφών τους στο αεριοχρωματογράφημα.

Η προετοιμασία των δειγμάτων του καρπού έγινε ως εξής:

Σε γυάλινο δοχείο των 20 mL μεταφέρθηκαν 2 g ομογενοποιημένου καρπού χωρίς το κουκούτσι, 10 μ L εσωτερικού προτύπου (IS) (4-μέθυλ-2-πεντανόλη 16,2 mg σε 100 mL μεθανόλη) και ένα μαγνητάκι. Το φιαλίδιο σφραγίστηκε αεροστεγώς με ελαστικό πώμα επικαλυμμένο με πολύ-τετραφθορο-αιθυλένιο (PTFE/silicon septum), ενσωματωμένο σε μεταλλικό πώμα (crimp cap). Το φιαλίδιο τοποθετήθηκε σε θερμοστατούμενο υδατόλουτρο στους 40 °C για 40 min υπό συνεχή ανάδευση. Η δειγματοληψία έγινε με έκθεση της ίνας για 30 min στον υπερκείμενο εσωτερικό χώρο του φιαλιδίου.

Χρωματογραφικό σύστημα: Αέριος χρωματογράφος GC-2010 Plus ο οποίος ήταν εφοδιασμένος με ανιχνευτή μάζας GCMS-QP2010 (Shimadzu Co., Kyoto, Ιαπωνία).

Θερμοκρασία εισαγωγέα: 260 °C

Στήλη: DB-5ms, 60m $\times$ 0.25mm $\times$ 1 μ m (J & W Scientific, Folsom, CA, USA)

Θερμοκρασιακό πρόγραμμα: 40 °C για 5 min, άνοδος της θερμοκρασίας 3 °C/min μέχρι τους 160 °C, άνοδος της θερμοκρασίας 10 °C/min μέχρι τους 240 °C, διατήρηση στους 240 °C για 5 min

Φέρον αέριο: ήλιο (He) καθαρότητας 99,999% με ταχύτητα ροής 1,5 mL/min.

Μέθοδος: split με λόγο 2:1

Συνθήκες φασματογράφου μαζών:

Ανιχνευτής: MS Source: 200 °C, MS Quadrapole: 150 °C.

Εύρος μαζών σάρωσης (mass range): m/z= 35-500

Scan/sec: 3

Ενέργεια ιονισμού: 70 eV.

Η SPME ίνα για την εκρόφιση των πτητικών συστατικών παρέμενε στον εγχυτήρα για 10 min στους 260 °C. Πριν από κάθε ημερήσια ανάλυση, η ίνα εγκλιματιζόταν στον εγχυτήρα για 10 min στους 260 °C ώστε να απομακρυνθούν τυχόν πτητικές ενώσεις. Όλα τα δείγματα αναλύθηκαν εις τριπλούν. Οι συγκεντρώσεις εκφράστηκαν ως μ g 4-μέθυλ-2-πεντανόλη ανά kg καρπού (διαιρώντας το εμβαδόν του αναλύτη με το εμβαδόν του IS και πολλαπλασιάζοντας τον λόγο αυτό με την αρχική συγκέντρωση του IS). Η ταυτοποίηση των πτητικών συστατικών πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της βιβλιοθήκης φασμάτων μαζών Nist 11 Mass Spectral Library. Επίσης, για τον προσδιορισμό των δεικτών Kovats (RI), έγινε χρήση

πρότυπων αλκανίων C8-C20 (Supelco Co., Bellefonte, PA, USA) και επτανίου (pro-analysis grade, Merck).

3.1.4 Μικροβιολογικές αναλύσεις

3.1.4.1 Απαρίθμηση και απομόνωση μικροβιακού πληθυσμού στις άλμες

Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης προσδιορίστηκε ο μικροβιακός πληθυσμός (εντεροβακτήρια, ζύμες και γαλακτικά βακτήρια) και πραγματοποιήθηκε απομόνωση ζυμών και γαλακτικών βακτηρίων. Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις άλμης (10^{-1} - 10^{-6}) με διάλυμα αποστειρωμένης πεπτόνης 0,1 % (w/v) και εναιώρημα όγκου 100 μ L επιστρώθηκε εις τριπλούν στα διάφορα επιλεκτικά υποστρώματα. Για την απαρίθμηση και απομόνωση του ολικού πληθυσμού των ζυμών χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υπόστρωμα SAB (Sabouraud Dextrose Agar, Biolife) με χλωραμφενικόλη (20 μ g/mL) και τα τρυβλία επωάστηκαν στους 25 °C για 2-4 μέρες. Για τα γαλακτικά βακτήρια χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υπόστρωμα MRS Agar με κυκλοεξιμίδιο (150 μ g/mL) και τα τρυβλία επωάστηκαν στους 30 °C για 48-72 h. Για τα *Enterobacteriaceae* χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υπόστρωμα Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA, Biolife) και τα τρυβλία επωάστηκαν στους 37 °C για 18-24 h.

Ο τελικός πληθυσμός των μικροοργανισμών υπολογίστηκε λαμβάνοντας υπόψιν το μέσο όρο τριών επαναλήψεων από κάθε αραιώση. Επιλέχθηκαν οι αραιώσεις που περιείχαν περισσότερες από 30 και λιγότερες από 300 αποικίες. Αν δυο αραιώσεις έδιναν αποδεκτό αριθμό αποικιών, τότε επιλέγονταν αυτή με τον μεγαλύτερο αριθμό αποικιών. Ο υπολογισμός του τελικού πληθυσμού των μικροοργανισμών ανά mL άλμης έγινε πολλαπλασιάζοντας τον μέσο όρο του αριθμού των αποικιών με την αραιώση που χρησιμοποιήθηκε.

3.1.4.2 Επιλογή υποψήφιων εκκινητών για τη ζύμωση

Συλλέχθηκαν 10 αποικίες τυχαία από κάθε τρυβλίο, λαμβάνοντας ως κριτήριο το μέγεθος, σχήμα, χρώμα, την υφή (λείες ή όχι) και την αναλογία ως προς τη συχνότητα εμφάνισής τους στο τρυβλίο. Ακολούθησε μεταφορά τους σε YEPD (yeast extract, peptone, dextrose, agar) ή MRS agar για τις ζύμες και τα βακτήρια,

αντίστοιχα και μετά την ανάπτυξή τους στις κατάλληλες συνθήκες, αποθηκεύτηκαν στους -80 °C σε YPD ή MRS broth με γλυκερόλη (τελική συγκέντρωση 20 %).

3.1.5 Ταυτοποίηση γαλακτικών βακτηρίων με βιοχημικό έλεγχο

Οι βιοχημικές αναλύσεις εφαρμόστηκαν σε συνολικά 240 ζύμες και σε 110 βακτήρια που απομονώθηκαν από τις δυο ποικιλίες. Τα απομονωμένα στελέχη υποβλήθηκαν σε βιοχημικές δοκιμές.

3.1.5.1 Χρώση κατά Gram

Η χρώση Gram πραγματοποιήθηκε ως εξής:

1. Στην επιφάνεια αντικειμενοφόρου πλάκας τοποθετήθηκαν τα κύτταρα με απιονισμένο νερό.
2. Τα κύτταρα ακινητοποιήθηκαν στην πλάκα με στιγμιαία θέρμανση του κάτω μέρους της σε λύχνο Bunsen (πέρασμα 2-3 φορές).
3. Χρωματισμός για 30 sec με χρωστική Crystal Violet
4. Προσθήκη ιωδιούχου διαλύματος Lugol και παραμονή για 1 min
5. Έκπλυση με απεσταγμένο νερό.
6. Αποχρωματισμός 3 φορές με αλκοόλη 95 % και νερό εναλλάξ (διάρκεια 30 sec).
7. Έκπλυση με απεσταγμένο νερό.
8. Μεταχρωματισμός για 30 sec με διάλυμα χρωστικής Carbol fuchsin
9. Έκπλυση με απεσταγμένο νερό.
10. Τα κύτταρα αφέθηκαν να στεγνώσουν στον αέρα.
11. Προσθήκη κεδρέλαιου
12. Τέλος, τα παρασκευάσματα παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο με τη βοήθεια ελαιοκαταδυτικού φακού.

Τα θετικά κατά Gram βακτήρια χρωματίζονται μπλε-ιώδη, ενώ τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια χρωματίζονται ερυθρά. Ο τρόπος παρασκευής των διαλυμάτων φαίνεται στο παράρτημα Π.Π 1.

3.1.5.2 Δοκιμή παραγωγής καταλάσης

Κατά τη διάρκεια της αερόβιας αναπνοής οι μικροοργανισμοί παράγουν υπεροξείδιο του υδρογόνου καθώς και άλλα υπεροξειδία τα οποία είναι πολύ τοξικές

ενώσεις. Σκοπός είναι η ανίχνευση του ενζύμου καταλάση που καταλύει τη διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο.

Σε τρυβλίο ή αντικειμενοφόρο πλάκα τοποθετήθηκαν μερικές σταγόνες H_2O_2 10 %. Κάτω από ασηπτικές συνθήκες μεταφέρθηκε ποσότητα κυττάρων. Έκλυση φυσαλίδων οξυγόνου δήλωνε θετική δοκιμή.

3.1.6 Επιλογή βακτηρίων και ζυμών βάσει τεχνολογικών ιδιοτήτων

Η επιλογή αυτόχθονων εκκινητών, ζυμών και βακτηρίων, έγινε μέσω ενός πρωτοκόλλου τριών σταδίων (Bleve et al., 2014) που περιελάμβανε ανάπτυξη σε πρότυπη άλμη (1^ο στάδιο), έλεγχο παρουσίας δράσης β-γλυκοσιδάσης, μη παραγωγής βιογενών αμινών, απουσία παραγωγής εξωκυτταρικής πρωτεάσης, δράση λιπάσης (2^ο στάδιο) και τέλος, ταυτοποίηση σε επίπεδο γένους των επιλεγμένων στελεχών μέσω ανάλυσης PCR της περιοχής του rDNA (3^ο στάδιο).

3.1.6.1 Έλεγχος ικανότητας ανάπτυξης σε πρότυπες άλμες (ΠΑ)

Αρχικά τα απομονωμένα στελέχη εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να αναπτύσσονται σε υπόστρωμα που αποτελούνταν από τις κυριότερες φαινολικές ενώσεις της άλμης. Έτσι, για την επιλογή των ζυμών λήφθηκαν δείγματα άλμης από την 7^η, 21^η, 43^η ημέρα ζύμωσης, καθώς ύστερα από αυτές τις μέρες παρατηρήθηκε αύξηση του πληθυσμού των ζυμών, ενώ για την επιλογή των βακτηρίων λήφθηκαν δείγματα από 64^η, 72^η, 90^η ημέρα ζύμωσης. Τα δείγματα αναλύθηκαν με HPLC-UV για τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών ενώσεων (τυροσόλη, καφεϊκό οξύ, ελευρωπαΐνη, βερμπασκοζίτης). Τέλος, παρασκευάστηκαν 2 διαφορετικές συνθετικές άλμες (πρότυπες άλμες, ΠΑ) σύμφωνα με τους Bleve et al., 2015, η σύσταση των οποίων φαίνεται στον Πίνακα 3.2.

Τα στελέχη που παρουσίασαν το μέγιστο βαθμό ανάπτυξης στις ΠΑ, εξετάστηκαν περαιτέρω ως προς την παρουσία β-γλυκοσιδάσης, τη μη παραγωγή βιογενών αμινών, απουσία παραγωγής εξωκυτταρικής πρωτεάσης και τη δράση λιπάσης.

Πίνακας 3.2: Σύσταση της πρότυπης άλμης για την επιλογή των ζυμών και γαλακτικών βακτηρίων.

Ένωση	Για ζύμες	Για βακτήρια
Τυροσόλη	100 mg/L	100 mg/L
Καφεϊκό οξύ	30 mg/L	15 mg/L
Ελευρωπαΐνη	500 mg/L	100 mg/L
Βερμπασκοζίτης	50 mg/L	50 mg/L
NaCl	8 %	8 %
Γλυκόζη	3 g/L	3 g/L
Yeast extract	0,5 g/L	0,5 g/L
Άγαρ	20 g/L	20 g/L
pH	4,0-4.5	4,2
θερμοκρασία	14 °C	12 °C

3.1.6.2 Δράση της β-γλυκοσιδάσης

Προσδιορίστηκε σε υπόστρωμα το οποίο αποτελούνταν για τις ζύμες από: 0,67 % yeast nitrogen base (YNB), 0,5 % αρβουτίνη, 2 % άγαρ, pH 5,0 και για τα βακτήρια από: MRS medium, 0,5 % αρβουτίνη, 2 % άγαρ, pH 5,0. Πριν την απόχυση σε τρυβλία, προστέθηκαν 2 mL κιτρικό σιδηροαμμώνιο 1 % σε 100 mL του επιλεκτικού μέσου δια αποστειρωμένου φίλτρου. Τα τρυβλία επωάστηκαν για 5 μέρες στους 30 °C. Οι αποικίες που περιβάλλονταν από καφέ χρώμα δήλωναν την ύπαρξη δράσης της β-γλυκοσιδάσης (Bleve et al., 2014).

3.1.6.3 Σχηματισμός βιογενών αμινών

Τα στελέχη ζυμών και βακτηρίων τοποθετήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα YPD ή MRS, αντίστοιχα, που περιείχε μωβ βρωμοκρεσόλη 0,006 % και 1% (w/v) των αμινοξέων: ιστιδίνη, τυροσίνη, φαινυλαλανίνη, θρυπτοφάνη, λυσίνη, λευκίνη και αργινίνη. Τα τρυβλία επωάστηκαν για 3-4 μέρες στους 25 °C, ενώ η ανάπτυξη των αποικιών παρακολουθούνταν καθημερινά. Η εμφάνιση μωβ χρώματος περιμετρικά

της αποικίας δηλώνει την αποκαρβοξυλίωση του αντίστοιχου αμινοξέος (Nikolaou et al., 2006).

3.1.6.4 Παραγωγή εξωκυτταρικής πρωτεΐνης

Μελετήθηκε τόσο για τις ζύμες όσο και για τα βακτήρια σε τρυβλία YPD που περιείχαν, 2% άγαρ, 2% καζεΐνη ή σε MRS τρυβλία που περιείχαν 2% άγαρ, 2% καζεΐνη, αντίστοιχα. Τα τρυβλία επωάστηκαν για 5 μέρες στους 25 °C. Ο αποχρωματισμός του υποστρώματος περιμετρικά της αποικίας δηλώνει τη δράση της πρωτεΐνης.

3.1.6.5 Δράση της λιπάσης

Αποτιμήθηκε σε τρυβλία που περιείχαν 2 % άγαρ, 5 % πεπτόνη, 0,5 % γλυκόζη, 0,1 % NaNO₂, 0,1 % KH₂PO₄, 0,1 % MgSO₄, 2 % Tween 80 και 0,01 % Rhodamine B. Τα τρυβλία επωάστηκαν για 10 μέρες στους 25 °C. Η λιπολυτική δράση διαπιστώθηκε από την εμφάνιση σκουρότερου χρώματος περιμετρικά της αποικίας.

3.1.7 Μοριακές αναλύσεις

3.1.7.1 Απομόνωση γενωμικού DNA από κύτταρα ζύμης

Οι ζύμες που απομονώθηκαν αναπτύχθηκαν σε 5 mL YPD και επωάστηκαν υπό ανάδευση στους 25 °C για μια νύκτα. Για την απομόνωση του DNA (Querol, et al., 1992) ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

1. 5 mL κυτταρικού αιωρήματος φυγοκεντρήθηκαν για 5 min στις 7000 rpm στους 4 °C και το υπερκείμενο υγρό απομακρύνθηκε.
2. Το ίζημα εκπλύθηκε 2 φορές με 1 mL buffer A (3,2 mM Tris-HCl pH 7)
3. Το ίζημα επανασυλλέχθηκε με φυγοκέντρωση στις 4000 rpm για 5 min
4. Στη συνέχεια επαναδιαλύθηκε σε 0,3 mL buffer B (1 mM φαινυλομεθυλο-σουλφονυλοφθορίδιο σε ισοπροπανόλη)
5. Προστέθηκε ίσως όγκος γυάλινων μικροσφαιριδίων (διαμέτρου 0,45 mm)
6. Ακολούθησε ανάδευση σε vortex για 1 min και ψύξη των σωλήνων σε πάγο για 1 min και φυγοκέντρωση στις 4000 rpm και 4 °C για 15 min

7. Το υπερκείμενο υγρό συλλέχθηκε σε νέο σωλήνα με 3 % (w/v) SDS και αφέθηκε για βρασμό για 10 min
8. Τελικά φυγοκεντρήθηκε στις 12000 rpm για 10 min και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 50 μ L διαλύματος Laemmli's buffer (0,035 M Tris/HCl, pH 6,8, 1,5 % SDS, 20 % γλυκερόλη και 3,5 % 2- μερκαπτοαιθανόλη).

3.1.7.2 Έλεγχος συγκέντρωσης και ποιότητας DNA

Η συγκέντρωση του DNA ($\text{ng}/\mu\text{L}$) προσδιορίστηκε σε φασματοφωτόμετρο NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher, Waltham, MA, ΗΠΑ) σε μήκος κύματος 260 nm και ο μηδενισμός της συσκευής έγινε με dH_2O νερό. Με τη μέθοδο αυτή ελέγχεται και η καθαρότητα του DNA που απομονώθηκε, δηλαδή επιτρέπεται ο προσδιορισμός προσμίξεων με RNA ή πρωτεΐνες. Η καθαρότητα του DNA προσδιορίστηκε με μέτρηση της απορρόφησης του ίδιου δείγματος τόσο στα 260 nm όσο και στα 280 nm και μετά υπολογίστηκε ο λόγος $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$. Αν ο λόγος των δυο απορροφήσεων είναι 1,8-2,0, τότε το δείγμα αποτελείται από καθαρό DNA. Αν ο λόγος είναι μεγαλύτερος από 2,0 τότε το δείγμα έχει πρόσμιξη με RNA, δεδομένου ότι και το RNA έχει μέγιστο απορρόφησης στα 260 nm.

3.1.7.3 Ενίσχυση της περιοχής 5.8S ITS rDNA

Για την ενίσχυση της περιοχής 5.8S ITS rDNA χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') και ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White, et al., 1990). Η ενίσχυση πραγματοποιήθηκε μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) σε θερμοκυκλοποιητή Bio-Rad T100 σύμφωνα με το ακόλουθο τροποποιημένο πρόγραμμα των (Esteve-Zarzoso et al., 1999): 94 °C για 5 min και 40 κύκλους στους 94 °C για 30 sec, 52 °C για 30 sec και 72 °C για 1 min, με χρόνο τελικής επιμήκυνσης 10 min στους 72 °C και τελικά ψύξη στους 8 °C.

Τα προϊόντα της αντίδρασης διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης (1 % w/v), με 1X TAE buffer (45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA, pH 8), ενώ η ανίχνευση έγινε έπειτα από χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο (Applichem) και τέλος φωτογραφήθηκαν με συσκευή Gel Doc 1000 apparatus (Bio-Rad, USA).

3.1.7.4 Απομόνωση γενωμικού DNA από κύτταρα βακτηρίων

Τα βακτηριακά κύτταρα αναπτύχθηκαν σε 3 mL MRS broth στους 28 °C για 2-3 μέρες και το ολικό γενωμικό DNA τους εκχυλίστηκε σύμφωνα με τον (Wilson, 2001).

1. 3mL βακτηριακού αιωρήματος φυγοκεντρήθηκαν για 5 min σε 7000 rpm στους 4 °C και το υπερκείμενο υγρό απομακρύνθηκε.
2. Δουλεύοντας σε πάγο, το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 463 μ L TE (tris-EDTA) και 4 μ L λυσοζύμη (stock 50 mg/mL) και αναδεύτηκε σε vortex. Το διάλυμα αφέθηκε για 15 min στους 37 °C σε υδρόλουτρο.
3. Προστέθηκαν 30 μ L SDS 10 % και 10 μ L πρωτεΐνάση K (stock 20 mg/mL)
4. Το διάλυμα αναδεύτηκε σε vortex και αφέθηκε για 30 min στους 37 °C σε υδρόλουτρο.
5. Προστέθηκαν 100 μ L NaCl και αναδεύτηκαν σε vortex για 3 min
6. Προστέθηκαν 80 μ L διαλύματος CTAB/NaCl. Το διάλυμα αναδεύτηκε σε vortex και αφέθηκε για 30 min στους 65 °C σε υδρόλουτρο.
7. Προστέθηκαν 550 μ L φαινόλη/χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη, vortex για 1 min
8. Έγινε φυγοκέντρηση για 10 min σε 13000 rpm στους 4 °C.
9. Η επάνω φάση μεταφέρθηκε με προσοχή σε νέο σωλήνα Eppendorf.
10. Προστέθηκαν 500 μ L φαινόλη/χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη και το Eppendorf αναδεύτηκε, αναποδογυρίζοντας το 10 φορές
11. Έγινε φυγοκέντρηση για 10min σε 13000 rpm στους 4 °C.
12. Η υπερκείμενη φάση απομακρύνθηκε (προσοχή στην κάτω φάση) και μεταφέρθηκε σε ένα νέο Eppendorf.
13. Προστέθηκαν 600 μ L ισοπροπανόλης και πραγματοποιήθηκε ήπια ανάδευση αναποδογυρίζοντας το μερικές φορές
14. Αποθήκευση στους -20 °C για τουλάχιστον 2 h.
15. Φυγοκέντρηση για 10 min σε 14000 rpm στους 4 °C.
16. Έγινε έκπλυση του ιζήματος με 0,5 mL παγωμένης EtOH 70 % χωρίς να αναδευτεί το ίζημα.
17. Φυγοκέντρηση για 5 min σε 14000 rpm στους 4 °C.
18. Απομακρύνθηκε όσο πιο πολύ γίνεται η επάνω φάση της αιθανόλης αφήνοντας ανέπαφο το ίζημα.

19. Αναδεύτηκε το ίζημα με 30-50 μL δις-απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό H_2O .
20. Το DNA καθαρίστηκε μέσω στήλης Sephadex χρησιμοποιώντας 600 μL Sephadex και όλο μαζί φυγοκεντρήθηκαν για 2 min σε 3000 rpm.

3.1.7.5 Ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου

Η ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου πραγματοποιήθηκε με τους Universal 16S εκκινητές forward (5'-GGAGAGTTAGATCTTGGCTCAG-3') και Universal 16S reverse (5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3').

Η ενίσχυση έλαβε χώρα σύμφωνα με το ακόλουθο πρόγραμμα: 94 °C για 2 min και 35 κύκλους στους 94 °C για 30 sec, 55 °C για 30 sec και 72 °C για 1 min, με χρόνο τελικής επιμήκυνσης 5 min στους 72 °C και τελικά ψύξη στους 8 °C. Τα ενισχυμένα (amplified) προϊόντα του DNA γίνονται ορατά με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (1 % w/v), με 1X TAE buffer (45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA, pH 8), ενώ η ανίχνευση έγινε έπειτα από χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο (Applichem, Darmstadt, Γερμανία) και τέλος φωτογραφήθηκαν με συσκευή Gel Doc 1000 apparatus (Bio-Rad, Hercules, USA).

Για την ενίσχυση της PCR το μίγμα της αντίδρασης όγκου 50 μL περιείχε 1 μL DNA 50 ng/ μL και αποτελούνταν από:

	Συγκέντρωση
γενωμικό DNA	50 ng/ μL
PCR Buffer	10×
MgCl_2	2mM
dNip mix (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)	200 μM το καθένα
Πριμοδοτικό μόριο Universal 16S (forward και Reverse)	0,5 μM το καθένα
DNA πολυμεράση	1 U

Όλες οι αλληλουχίες, που αντιστοιχούν σε ζύμες και βακτήρια, ταυτοποιήθηκαν μέσω της βάσης δεδομένων GENBANK χρησιμοποιώντας το λογισμικό BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

3.1.8 Στατιστική επεξεργασία

Οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του στατιστικού πακέτου SPSS 20 (SPSS Inc., Chicago, USA). Τα δεδομένα υποβλήθηκαν σε μονοπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης (two-way ANOVA) και εφαρμόστηκε η μέθοδος Tukey ως post hoc δοκιμή για τον καθορισμό σημαντικών διαφορών μεταξύ των ζυμώνσεων ($p < 0,05$). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ζυμώνσεων ($p < 0,05$).

3.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΕΝΟΦΘΑΛΙΣΜΟΥ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΖΥΜΩΝ ΚΑΙ ΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ ΖΥΜΩΣΗ ΤΩΝ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΚΟΝΣΕΡΒΟΛΙΑ ΚΑΙ ΚΑΛΑΜΩΝ, ΤΟ ΦΑΙΝΟΛΙΚΟ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ, ΤΗΝ ΥΦΗ ΚΑΙ ΤΑ ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

3.2.1 Προετοιμασία δειγμάτων και μέθοδος ζύμωσης

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν δυο ποικιλίες φυτικών μαύρων επιτραπέζιων ελιών, Κονσερβολιά Άρτας και Καλαμών, ελαιοκομικής περιόδου 2013-2014. Ο καρπός παραχωρήθηκε από τον Ελαιοκομικό Συνεταιρισμό Κομποτίου Άρτας. Ο καρπός συλλέχθηκε όταν έφτασε στο στάδιο πλήρους ωρίμανσης και πλύθηκε με νερό βρύσης. Η ζύμωση πραγματοποιήθηκε σε περιέκτες σύμφωνα με τον ελληνική μέθοδο, εμβαπτίζοντας τον καρπό σε 8 % NaCl (w/v). Τα πειράματα διεξήχθησαν ακολουθώντας τέσσερις διαφορετικές διαδικασίες όσον αφορά στον ενοφθαλμισμό των στελεχών: α) διαδοχικός εμβολιασμός με γαλακτικό βακτήριο και ακολούθως με ζύμη (LY), β) διαδοχικός εμβολιασμός με ζύμη και ακολούθως με γαλακτικό βακτήριο (YL) γ) ταυτόχρονος εμβολιασμός ζύμης και γαλακτικού βακτηρίου (MIX) δ) αυθόρμητη ζύμωση (Sp).

Για τον διαδοχικό εμβολιασμό λήφθηκαν υπόψιν συγκεκριμένοι χημικοί δείκτες όπως περιγράφεται από τους Bleve et al., (2015). Έτσι, ο χρόνος προσθήκης της δεύτερης καλλιέργειας (63^η ημέρα μετά τον πρώτο εμβολιασμό) προσδιορίστηκε από την παρουσία συγκεκριμένων ενώσεων σε ελιές (δηλ., ανώτερες αλκοόλες, τερπένια) που δείχνουν το τέλος της ζυμωτικής δράσης των ζυμών. Η διαδικασία της ζύμωσης θεωρήθηκε πλήρης όταν ανιχνεύτηκαν άλλοι συγκεκριμένοι χημικοί δείκτες, αποτελούμενοι από εστέρες και οξικούς εστέρες. Οι περιέκτες τοποθετήθηκαν σε κελάρι για περίοδο μέχρι 105 ημέρες. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου η θερμοκρασία κυμάνθηκε από 12 έως 21 °C. Όλες τα πειράματα διεξήχθησαν εις τριπλούν.

3.2.2 Στελέχη και παρασκευή εμβολίου

Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν παρελήφθησαν από την τράπεζα μικροοργανισμών του εργαστηρίου CNR-ISPA (Ιταλία), αφού είχαν επιλεγθεί σύμφωνα με κλασικές τεχνολογικές παραμέτρους (αντοχή σε υψηλή συγκέντρωση άλατος, αντοχή σε χαμηλή θερμοκρασία και χαμηλό pH, και παραγωγή εξωκυτταρικών υδρολυτικών ενζύμων), ικανότητα ανάπτυξης σε πρότυπες άλμες και δυο επιπλέον σημαντικών ιδιοτήτων: i) παρουσία δράσης β-γλυκοσιδάσης, που απαιτείται για την αποδόμηση της ελευρωπαΐνης, και ii) αδυναμία παραγωγής βιογενών αμινών. Τα επιλεγμένα στελέχη LAB ήταν *L. mesenteroides* K T5-1 που απομονώθηκε από την ποικιλία Καλαμών και *L. plantarum* A 135-5 που απομονώθηκε από την ποικιλία Κονσερβολία, ενώ τα επιλεγμένα στελέχη ζυμών ήταν *S. cerevisiae* KI 30-16 και *Debaryomyces hansenii* A 15-44 από Καλαμών και Κονσερβολία, αντίστοιχα.

Η προετοιμασία του εμβολίου, που χρησιμοποιήθηκε ως καλλιέργεια εκκίνησης, έγινε ως ακολούθως: 10 mL MRS ή YEPD με 2,5 % (w/v) NaCl (για να επιτραπεί ο εγκλιματισμός σε συνθήκες άλατος) ενοφθαλμίστηκαν με 1 mL καλλιέργειας εκκίνησης που αφέθηκε για ανάπτυξη από το προηγούμενο βράδυ. Μετά από επώαση στους 30 °C για 24 h υπό συνεχή ανάδευση, η νέα καλλιέργεια μεταφέρθηκε σε 100 mL MRS ή YEPD με 5 % (w/v) NaCl και παρέμεινε όλη τη νύχτα στους 30 °C υπό συνεχή ανάδευση. Στη συνέχεια, οι καλλιέργειες φυγοκεντρήθηκαν και επαναιωρήθηκαν σε φυσιολογικό ορό 8 % (w/v) NaCl. Ο όγκος του διαλύματος NaCl που προστέθηκε στο τέλος ήταν τέτοιος ώστε να ληφθούν 10⁸ CFU/mL από κάθε στέλεχος. 80 mL αυτού του εναιωρήματος προστέθηκαν στους περιέκτες (8000 mL άλμης, 1 % v/v εμβόλιο).

3.2.3 Μικροβιολογικές αναλύσεις

Τα δείγματα άλμης αναλύθηκαν σε τακτικά χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. 100 μL δείγματος μεταφέρθηκαν ασηπτικά σε 900 μL αποστειρωμένου φυσιολογικού ορού 0,9 % και με κατάλληλες δεκαδικές αραιώσεις έγινε επίστρωση σε υπόστρωμα MRS ή SAB ή VRBGA. Τα υποστρώματα και οι συνθήκες επώασης ήταν ως ακολούθως: MRS Agar με 0,17 g/L κυκλοεξιμιδίου (Sigma) (CMRS), στους 30 °C υπό αναερόβιες συνθήκες για 48 έως 72 h για LAB.

SAB (Sabouraud Dextrose Agar) με χλωραμφενικόλη 0,1 g/L που επωάστηκε στους 25 °C για 2 έως 4 ημέρες για ζυμομύκητες και VRBGA επωάστηκαν στους 37 °C για 18-24 h για τα Enterobacteriaceae.

Είκοσι αποικίες συλλέχθηκαν τυχαία από κάθε τρυβλίο, σύμφωνα με τη μακρομορφολογία και απομονώθηκαν ανάλογα με τις συχνότητές τους. Τα απομονωθέντα στελέχη καθαρίστηκαν με διαδοχικές ραβδώσεις σε YEPD (yeast extract, πεπτόνη, δεξτρόζη, άγαρ) ή MRS άγαρ για τις ζύμες και τα βακτήρια, αντίστοιχα.

3.2.3.1 Έλεγχος επικράτησης καλλιιεργειών εκκίνησης

Για να εξεταστεί ο βαθμός επικράτησης των καλλιιεργειών εκκίνησης ζυμομυκήτων και LAB, λήφθηκαν δείγματα από τις εξής χρονικές περιόδους: για τις συνεμβολιασμένες άλμες (MIX) από τέσσερα διαφορετικά χρονικά σημεία (7, 28, 63, 105 ημέρες ζύμωσης), για τη μέθοδο εμβολιασμού LY, απομονώθηκαν βακτήρια από τέσσερα διαφορετικά χρονικά σημεία (7, 28, 63, 105 ημέρες ζύμωσης) και ζυμομύκητες από το τέλος της ζύμωσης (105^η ημέρα), για τη μέθοδο εμβολιασμού YL, απομονώθηκαν ζυμομύκητες από τέσσερα διαφορετικά χρονικά σημεία (7, 28, 63, 105 ημέρες ζύμωσης) και LAB από το τέλος της διαδικασίας ζύμωσης (105^η ημέρα).

Οι ζυμομύκητες και τα LAB απομονώθηκαν από τρυβλία που είχαν επιστρωθεί με δείγματα άλμης 10 φορές αραιωμένα προκειμένου να ληφθούν 100-200 αποικίες ανά τρυβλίο διαμέτρου 90 mm. Τουλάχιστον 20 αποικίες ζυμών και LAB για κάθε χρόνο δειγματοληψίας, στην ίδια αραιώση, επιλέχθηκαν τυχαία και υποβλήθηκαν σε έλεγχο αποτυπώματος (GTG)(5) -rep-PCR.

3.2.3.2 Απομόνωση DNA και ανάλυση με τη χρήση PCR

Το ολικό DNA των LAB εκχυλίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται από τον Wilson (2001), ενώ το ολικό γενωμικό DNA από τις ζύμες ελήφθη με τη μέθοδο που περιγράφεται από τους Ldoke et al. (2011). Για αμφοτέρους τους μικροοργανισμούς διεξήχθησαν αντιδράσεις ενίσχυσης σε τελικό όγκο 50 µL και εκκινητή (GTG)₅ (Πίνακας 3.3.1).

Πίνακας 3.3.1: Παρασκευή αντιδράσεων PCR

	Συγκέντρωση
γενωμικό DNA	100 ng
Tris HCl	10 mM
KCl	50 mM
MgCl ₂	1,5 mM
dNip mix (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)	2 mM το καθένα
(GTG) ₅	0,8 μM το καθένα
DNA πολυμεράση	1 U

Η ενίσχυση έλαβε χώρα σε θερμοκυκλοποιητή σύμφωνα με το ακόλουθο πρόγραμμα: 40 κύκλους των 30 sec στους 94 °C, 30 sec υβριδοποίηση εκκινήτη στους 42 °C, 2 min στους 72 °C με χρόνο τελικής επιμήκυνσης 10 min στους 72 °C. Τα προϊόντα της αντίδρασης διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση πηκτής αгарόζης (Bleve et al., 2006).

3.2.4 Φυσικοχημικές αναλύσεις

Οι προσδιορισμοί του pH, της αλατότητας και της οξύτητας στην άλμη παρουσιάζονται στην ενότητα 3.1.3.1-3. Τα σάκχαρα προσδιορίστηκαν με HPLC-RID (ενότητα 3.1.3.4) και οι πτητικές ενώσεις ταυτοποιήθηκαν και ημιποσοτικοποιήθηκαν με SPME-GC/MS σύμφωνα με τη μέθοδο των Bleve et al., (2015) (ενότητα 3.1.3.8). Η εκχύλιση φαινολικών από δείγματα άλμης περιγράφεται στην ενότητα 3.1.3.5.

3.2.4.1 Εκχύλιση φαινολικών ενώσεων

10 mL άλμης εκχυλίστηκαν τρεις φορές με 5 mL οξικού αιθυλεστέρα. Μετά από 1 min ανάδευσης σε συσκευή Vortex τα τρία εκχυλίσματα ενώθηκαν και μεταφέρθηκαν σε περιστροφικό εξατμιστήρα στους 45 °C. Το υπόλειμμα διαλύθηκε σε 5 mL MeOH:H₂O 1:1 και διηθήθηκε μέσω φίλτρου πολυτετραφθοροαιθυλενίου (PTFE) 0,45 mm (Whatman Inc., Clinton, NJ, ΗΠΑ) (Ruiz-Barba et al., 1993).

3.2.4.2 Ανάλυση των φαινολικών ενώσεων της άλμης με χρήση LC–MS/MS

Για την ταυτοποίηση των φαινολικών ενώσεων εισήχθησαν στο όργανο 10μL δείγματος, αφού προηγουμένως είχαν διηθηθεί μέσω φίλτρου (0,45 μm). Ο προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε με την τεχνική υγρής χρωματογραφίας σε σύζευξη με φασματομετρία μαζών και ανιχνευτή συστοιχίας διόδων λυχνιών LC/DAD/ESI-MSn σε σύστημα Agilent 1100 Technologies LC/MSD Trap SL, (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) αποτελούμενο από αντλία Agilent G1312A, αυτόματο δειγματολήπτη Agilent G1313A, απαερωτή Agilent G1379A και ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού Agilent G1315B. Το φασματόμετρο μαζών ήταν τύπου παγίδευσης ιόντων Agilent G2445A (LC/MSD Trap SL ion trap mass spectrometer) εφοδιασμένο με σύστημα ηλεκτροψεκασμού ιόντος (ESI). Ο έλεγχος και η επεξεργασία των δεδομένων έγινε μέσω H/Y και του προγράμματος Agilent Chemstation Software 2003. Ο υγροχρωματογραφικός διαχωρισμός των φαινολικών συστατικών πραγματοποιήθηκε σε αναλυτική στήλη Zorbax Eclipse XDB-C18, 25 cm × 4,6 mm i.d., 5 μm της Agilent (Agilent, USA) με ροή 1,0 mL/min και διαλύτη A (νερό/οξικό οξύ, 99,9: 0,1 v/v) και διαλύτη B (ακετονιτρίλιο/ μεθανόλη 1:1). Το πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης είχε ως εξής: 0–20 min, 95–70 % A; 20–25 min, 70–65 % A; 25–45 min, 65–60 % A; 45–60 min, 60–30 % A; 60–65 min, 30–0 % A; 65–75 min, 0 % A; και 75–80 min, 0–95 % A. Η καταγραφή του φάσματος έγινε μεταξύ 200 και 700 nm. Τα μήκη κύματος που επιλέχθηκαν για την παρακολούθηση των χρωματογραφικών προφίλ ήταν τα 240, 280 και 340 nm. Χρησιμοποιήθηκε αέριο άζωτο N₂ ως εκνεφωτής σε πίεση 50 psi και η ροή ρυθμίστηκε στα 11 L/min. Η θερμοκρασία και το δυναμικό του τριχοειδούς ρυθμίστηκαν στους 350 °C και 3,5 kV, αντίστοιχα.

Η λήψη φάσματος μαζών MS τόσο των πρόδρομων όσο και των παράγωγων ιόντων (MS² και MS³) των φαινολικών ενώσεων πραγματοποιήθηκε σε ένα εύρος τιμών 50 έως 1000 m/z σε συνθήκες αρνητικού ιονισμού. Ο μέγιστος χρόνος συλλογής της παγίδευσης ιόντος και του αριθμού επαναλήψεων MS, ώστε να ληφθεί ο μέσος όρος φάσματος, τέθηκε στα 30 και 3 ms, αντίστοιχα. Η ταυτοποίηση των φαινολικών ενώσεων βασίστηκε σε ψευδομοριακά ιόντα [M-H]⁻, διμερή και θραύσματα.

3.2.4.3 Ποσοτικός προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων

Τα μήκη κύματος που χρησιμοποιήθηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών ενώσεων ήταν 280 και 340 nm για τη λουτεολίνη-7-O-ρουτινοζίτη, τον βερμπασκοζίτη και τα παράγωγα κινναμωμικού οξέος. Οι φαινολικές ενώσεις ποσοτικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας καμπύλες βαθμονόμησης αυθεντικών φαινολικών προτύπων (υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη, καφεϊκό οξύ, ρ-κουμαρικό οξύ, ελευρωπαΐνη και βερμπασκοζίτη). Δεδομένου ότι οι ενώσεις αναφοράς δεν ήταν διαθέσιμες για όλες τις ανιχνευθείσες ενώσεις, ο καφεοϋλο-6-σελολογκανοζίτης (SEC) και ο κομσεκολογκανοζίτης (COM) ποσοτικοποιήθηκαν ως προς το καφεϊκό οξύ και κουμαρικό οξύ (στα 340 nm), αντίστοιχα και η ακυκλοδιϋδροελενολική υδροξυτυροσόλη (HT-ac) ως προς την υδροξυτυροσόλη (στα 280 nm) (D'Antuono et al., 2016), η λουτεολίνη-7-O-ρουτινοζίτης ποσοτικοποιήθηκε ως προς λουτεολίνη-7-O-γλυκοζίτης (στα 340 nm), η διαλδεϋδική μορφή αποκαρβοξυμεθυλενολικού οξέος συνδεδεμένου με υδροξυτυροσόλη (DiaDe) ποσοτικοποιήθηκε (στα 280 nm) χρησιμοποιώντας την ελευρωπαΐνη ως αναφορά (Mulinacci et al., 2001). Για την ένωση DiaDe εφαρμόστηκε διόρθωση μοριακού της βάρους πολλαπλασιάζοντας με το συντελεστή 320/540, ενώ για τις ενώσεις SEC και COM χρησιμοποιήθηκαν οι συντελεστές 552/180 και 536/164 αντίστοιχα και για την HT-ac ο συντελεστής 382/154 (Mulinacci et al., 2001).

3.2.5 Ανάλυση υφής

Η συνεκτικότητα (firmness) του καρπού προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας όργανο μέτρησης υφής Instron (Instron Model 4411, Instron Ltd, Bucks, UK). Χρησιμοποιήθηκαν δέκα ελιές από κάθε μέθοδο επεξεργασίας, ενώ κάθε ελαιόκαρπος τρυπήθηκε τρεις φορές με βελόνα που διαθέτει επίπεδη κεφαλή (T372-29) προσαρμοσμένη σε αισθητήρα φορτίου (load cell) μέγιστης αντοχής 5 kN. Η ταχύτητα καθόδου της βελόνας ρυθμίστηκε στα 10,00 mm/min, ενώ η απόσταση διάτρησης ορίστηκε στα 3,5 mm. Η μέγιστη δύναμη (F, σε Newton) που απαιτείται για τη διάτρηση της επιδερμίδας της ελιάς καταγράφηκε και χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης συνεκτικότητας του καρπού (Bourne, 2002).

3.2.6 Οργανοληπτική αξιολόγηση επιτραπέζιων ελιών

Για την αποτίμηση του γευσιγνωστικού αποτελέσματος (δοκιμασία αποδοχής και περιγραφική δοκιμή) χρησιμοποιήθηκαν 51 μη εκπαιδευμένοι και 7 εκπαιδευμένοι δοκιμαστές, αντίστοιχα. Τα δείγματα συλλέχθηκαν την 105^η ημέρα ζύμωσης και διατηρήθηκαν στους 5 °C μέχρι την ημέρα της δοκιμασίας. Ο επεξεργασμένος καρπός εξετάστηκε ως προς τις εξής ιδιότητες: άρωμα, αλμυρό, πικρό, όξινο, συνεκτικότητα επιδερμίδας και σάρκας. Επιπλέον, για τη συνολική εκτίμηση χρησιμοποιήθηκε η ίδια κλίμακα βαθμολογίας. Κάθε χαρακτηριστικό αξιολογήθηκε σε ηδονική κλίμακα (1 έως 10), όπου 1 αντιστοιχεί στο λιγότερο αποδεκτό και 10 στο πλέον αποδεκτό προϊόν.

3.2.7 Στατιστική επεξεργασία

Τα δεδομένα επεξεργάστηκαν με τη χρήση του στατιστικού πακέτου SPSS 20 (SPSS Inc., Chicago, USA). Τα δεδομένα υποβλήθηκαν σε διπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης (two-way ANOVA) και εφαρμόστηκε η μέθοδος Tukey ως post hoc δοκιμή για τον καθορισμό σημαντικών διαφορών μεταξύ των ζυμώσεων ($p < 0,05$).

Η ανάλυση των κύριων συνιστωσών (Principal component analysis) εφαρμόστηκε για να συγκρίνει ομάδες πτητικών ενώσεων στο τέλος της ζύμωσης. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πρόγραμμα XLSTAT (Addinsoft Inc, Long Island City NY, USA).

3.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΜΥΚΗΤΩΝ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΙΣ ΜΑΥΡΕΣ ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΕΣ ΕΛΙΕΣ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΥΠΟΣΤΕΙ ΖΥΜΩΣΗ ΣΕ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗ ΚΛΙΜΑΚΑ

3.3.1 Δείγματα άλμης

Δείγματα άλμης συλλέχθηκαν κατά την περίοδο 2013-2014 από ζυμώσεις των επιτραπέζιων ελιών των ποικιλιών Καλαμών και Κονσερβολιά που πραγματοποιήθηκαν σε μονάδα επεξεργασίας επιτραπέζιων ελιών της Άρτας.

3.3.2 Παρασκευή θρεπτικών υλικών

Η σύσταση των θρεπτικών υλικών που χρησιμοποιήθηκαν φαίνεται στον πίνακα Π.Π 2 του παραρτήματος.

3.3.3 Απομόνωση μυκήτων

Η απομόνωση των μυκήτων από τα δείγματα άλμης πραγματοποιήθηκε με διαδοχικές αραιώσεις με αποστειρωμένο νερό που περιείχε 0,01% Tween 80 (Sigma-Aldrich, Γερμανία). 100 μ L από κάθε αραιώση μεταφέρθηκαν εις τριπλούν στην επιφάνεια τρυβλίων διαμέτρου 90 mm και θρεπτικό υπόστρωμα Dichloran Rose Bengal Chlorotetracycline με αгар (DRBC; Oxoid Ltd., UK) και επώστηκαν στους 25 °C για 5–7 μέρες στο σκοτάδι. Μετά την επώση ακολούθησε απομόνωση μονής αποικίας. Συλλέχθηκαν οι πιο αντιπροσωπευτικές αποικίες βάσει των μορφολογικών τους χαρακτηριστικών (σχήμα, μέγεθος και χρώμα αποικίας) (Crous et al., 2009). Επιπλέον, ως στελέχη αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν αντιπροσωπευτικά στελέχη *Penicillium* υπογένους *Penicillium* που αναφέρθηκαν από τους Frisvad and Samson, (2004) και διατίθενται στη συλλογή ITEM (ITEM collection: <http://www.ispa.cnr.it/Collection/>).

3.3.4 Μοριακή ταυτοποίηση των μυκήτων

3.3.4.1 Προετοιμασία μυκηλίων για απομόνωση DNA

Για τον σκοπό αυτό, τα μυκήλια των μυκήτων που απομονώθηκαν, αναπτύχθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο Wickerham και επώστηκαν σε τροχιακό

αναδευτήρα (150 rpm) για 48 h στους 25 °C. Όλα τα συστατικά του θρεπτικού υποστρώματος Wickerham αγοράστηκαν από την LabM Limited (Lancashire, UK). Μετά την επώαση, τα μυκήλια διηθήθηκαν και λυοφιλοποιήθηκαν για την ολική απομόνωση DNA.

3.3.4.2 Απομόνωση DNA

Για την απομόνωση του DNA των κυττάρων, 10 mg λυοφιλοποιημένου μυκηλίου, αναμίχθηκαν με μεταλλικά σφαιρίδια διαμέτρου 5mm και τοποθετήθηκαν σε συσκευή Mixer Mill MM 400 (Retsch, Γερμανία). Στη συνέχεια, τα δείγματα επεξεργάστηκαν με τη χρήση του κιτ «Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food» (Promega, Madison, WI, ΗΠΑ) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του παρασκευαστή (Π.Π 3).

Η ποιότητα του γενωμικού DNA προσδιορίστηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαροζης 1 % w/v και η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε σε φασματοφωτόμετρο ND1000 (Thermo Fisher, Waltham, MA, ΗΠΑ).

3.3.4.3 Ενίσχυση της περιοχής ITS και β-τουμπουλίνης

Η ενίσχυση της περιοχής ITS, χρησιμοποιείται ευρύτατα για την ταυτοποίηση των μυκήτων και είναι ικανή να διαχωρίσει όλους τους μύκητες τουλάχιστον σε επίπεδο γένους και σε κάποιες περιπτώσεις σε επίπεδο είδους. Επίσης, το γονίδιο της β-τουμπουλίνης παρουσιάζει μεγαλύτερη γενετική παραλλακτικότητα μεταξύ συγγενικών ειδών και βοηθά στον σαφέστερο διαχωρισμό τους.

Τα απομονωμένα στελέχη που ανακτήθηκαν από το θρεπτικό μέσο DRBC με άγαρ αρχικά αναλύθηκαν ως προς την αλληλουχία της ITS περιοχής και μόνο για τα απομονωμένα είδη μυκήτων πραγματοποιήθηκε ενίσχυση του γονιδίου της β-τουμπουλίνης.

Οι αντιδράσεις PCR (Πίνακας 3.3) πραγματοποιήθηκαν σε συσκευή GeneAmp PCR system 9700 (AB Applied Biosystems, CA). Τα ζεύγη των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR ήταν οι ITS4/ITS5 και Bt2a/Bt2, για την περιοχή ITS και το γονίδιο της β-τουμπουλίνης, αντίστοιχα (White et al., 1990; Glass and Donaldson, 1995).

Πίνακας 3.3: Παρασκευή διαλυμάτων PCR

Αντιδραστήρια PCR (αρχική συγκέντρωση)	Όγκος αντιδραστηρίων στην τελική αντίδραση PCR (20 μL)
PCR Buffer	2 μL
ITS4/ITS5 (ή Bt2a/Bt2b)	0,6 μL + 0,6 μL (για κάθε εκκινητή)
dNTP (10mM)	0,4 μL
Taq DNA Polymerase (2,5 U/μL)	0,1 μL
H ₂ O	15,3 μL
γενωμικό DNA (20 ng/μL)	1 μL

Η ενίσχυση έλαβε χώρα σύμφωνα με το ακόλουθο πρόγραμμα: 94 °C για 2 min και 35 κύκλους στους 94 °C για 30 sec, 55 °C για 30 sec και 72 °C για 1 min, με χρόνο τελικής επιμήκυνσης 5 min στους 72 °C και τελικά ψύξη στους 8 °C.

Τα ενισχυμένα (amplified) προϊόντα του DNA αναλύθηκαν με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης (1 % w/v), με 1X TAE buffer (45 mM Tris–borate, 1 mM EDTA, pH 8), ενώ η ανίχνευση έγινε έπειτα από χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο (Applichem, Darmstadt, Γερμανία) και τέλος φωτογραφήθηκαν με συσκευή Gel Doc 1000 apparatus (Bio-Rad, Hercules, USA).

3.3.4.4 Καθαρισμός προϊόντων PCR

Σκοπός του καθαρισμού του DNA είναι η αποτελεσματική αφαίρεση των εκκινητών, dNTPs, ένζυμα και πρωτεΐνες, ώστε να ακολουθήσει η αλληλούχισή του αργότερα. Έτσι, τα προϊόντα της PCR καθαρίστηκαν με τη χρήση του ενζυμικού μείγματος Exo/SAP (Exonuclease I, *Escherichia coli*/Shrimp Alkaline Phosphatase; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Συγκεκριμένα, 5 μL από το προϊόν της PCR αντίδρασης αναμείχθηκαν με 2μL από το αντιδραστήριο ExoSAP. Μετά από επώαση 15 min στους 37 °C για απομάκρυνση των εκκινητών και των νουκλεοτιδίων, το αντιδραστήριο απενεργοποιήθηκε με επώαση στους 80 °C για 15 min. Τα προϊόντα χρησιμοποιήθηκαν απευθείας ή αποθηκεύτηκαν στους -20 °C μέχρι την πραγματοποίηση της ανάλυσης της αλληλουχίας τους.

Η αλληλούχισή των ενισχυμένων προϊόντων της PCR πραγματοποιήθηκε στην Ιταλία στο CNR-ISPA (Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, Lecce, Italy). Η ταυτοποίηση έγινε σε επίπεδο είδους.

3.3.5 Βιοχημικές αναλύσεις

Για την πραγματοποίηση των βιοχημικών αναλύσεων καλλιεργήθηκαν στελέχη του γένους *Penicillium* σε θρεπτικό μέσο basal medium (LBM) και επώαστηκαν στο σκοτάδι στους 25 °C για 5 ημέρες.

Μετά από αυτή την περίοδο, δίσκοι άγαρ (διαμέτρου 6 mm) ενεργών μυκηλίων επιστρώθηκαν στα διάφορα στερεά υποστρώματα για την ανίχνευση της β-γλυκοσιδάσης, των λιπολιπτικών δράσεων, τη δράση της κυτταρινάσης, της λακκάσης, της τυροσινάσης, της ξυλανάσης, και δράσεων τροποποίησης της λιγνίνης, πηκτινολυτικών και πρωτεασών (ζελατίνη και άγαρ γάλακτος). Για όλες τις παραπάνω ενζυμικές δράσεις δόθηκε η εξής βαθμολογία: 3 (έντονο καφέ), 2 (ανοιχτό καφέ), 1 (κίτρινο-γαλακτώδες), 0 (λευκό).

3.3.5.1 Δράση β-γλυκοσιδάσης

Η δράση της β-γλυκοσιδάσης ανιχνεύθηκε με ανάπτυξη του μύκητα σε άγαρ που περιέχει εσκουλίνη (6,7-διυδροξυκομαριν-6-γλυκοσιδάση) ως η μοναδική πηγή άνθρακα. Αναλυτικά, θρεπτικό μέσο Cellulolysis Basal Medium (CBC: $C_4H_{12}N_2O_6$ 5 g, εκχύλισμα ζύμης 0,1 g, KH_3PO_4 1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5 g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,001 g, σε 1 λίτρο απεσταγμένου νερού) συμπληρώθηκε με 0,5 % εσκουλίνη (w/v), 1,8 % (w/v) άγαρ και αποστειρώθηκε. Στη συνέχεια προστέθηκε 1 mL αποστειρωμένου υδατικού διαλύματος θεικού σιδήρου 2 % (w/v) προστέθηκε ασηπτικά για κάθε 100 mL του μέσου επώασης. Το μέσο διανεμήθηκε σε τρυβλία Petri, αφέθηκε να στερεοποιηθεί, εμβολιάστηκε και επώαστηκε στους 25 °C για 7 ημέρες στο σκοτάδι. Μαύρο χρώμα αναπτύχθηκε στο μέσο από τις αποικίες που παράγουν β-γλυκοσιδάση (Pointing et al., 1999).

3.3.5.2 Δράση ξυλανάσης

Για την ανίχνευση του ενζύμου χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υπόστρωμα XBM (Σύσταση: $C_4H_{12}O_6$ 0,5 g, KH_2PO_4 1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5 g, yeast extract 0,1 g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,001 g σε 1L απεσταγμένου ύδατος) με 4 % (w/v) ξυλάνη και 1,6 % (w/v) άγαρ και το διάλυμα αποστειρώθηκε. Το μέσο εμβολιάστηκε με τον υπό εξέταση μύκητα και επώαστηκε στους 22 °C για 7 ημέρες στο σκοτάδι. Τα τρυβλία χρωματίστηκαν με ιώδιο (0,25 % w/v υδατικό διάλυμα I_2 και KI) για 5 λεπτά και με

ήπια ανάδευση. Η αποδόμηση της ξυλάνης γύρω από τις αποικίες εμφανίστηκε ως μια κίτρινη-αδιαφανής περιοχή έναντι του μπλε / βιολετί χρώματος που αντιστοιχεί στη μη αποδομημένη ξυλάνη.

3.3.5.3 Πρωτεολυτική δράση

Οι εξωκυτταρικές πρωτεάσες ανιχνεύθηκαν σε τρυβλία με άγαρ, χρησιμοποιώντας διαφορετικά υποστρώματα: Milk Agar με 0,0015 % πράσινο της βρωμοκρεσόλης (BCG) και MEA με 1 % ζελατίνη (MEAG) στους 25 °C, χωρίς προσθήκη NaCl ή με 2,5 % NaCl. Στο υπόστρωμα με Milk Agar, η ενζυμική δραστηριότητα ανιχνεύθηκε με ανοιχτόχρωμες περιοχές γύρω από την αποικία, υποδεικνύοντας ότι η υδρόλυση του υποστρώματος είχε λάβει χώρα.

Επίσης, αναπτύχθηκε μία μέθοδος για την ανίχνευση πρωτεολυτικής δράσης με τη χρήση MEAG. Σε αυτή την περίπτωση, η ανίχνευση εξωκυτταρικών πρωτεασών πραγματοποιήθηκε με χρώση χρησιμοποιώντας Coomassie Blue (0,25 % w/v) σε μεθανόλη-οξικό οξύ-νερό (5:1:4 v/v/v) για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου και αποχρωματισμό με μεθανόλη-οξικό οξύ. Η δράση του ενζύμου ανιχνεύθηκε με τις ανοιχτόχρωμες περιοχές που περιβάλλουν την αποικία, υποδεικνύοντας την υδρόλυση του υποστρώματος.

3.3.5.4 Πηκτινολυτική δράση

Η εξωκυτταρική πηκτινολυτική δράση εκτιμήθηκε σε θρεπτικό μέσο που περιείχε 500 mL διάλυμα μεταλλικών αλάτων, 1 g yeast extract, 15 g άγαρ, 5 g πηκτίνης και 500 mL απεσταγμένου νερού. Το διάλυμα μεταλλικών αλάτων περιείχε ανά λίτρο:

Διάλυμα μεταλλικών αλάτων	Ποσότητα σε g/L H ₂ O
(NH ₄) ₂ SO ₄	2
KH ₂ PO ₄	4
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,2
CaCl ₂	0,001
H ₃ BO ₃	1
MnSO ₄	1
ZnSO ₄	1
CuSO ₄	1
MoO ₃	1

Το pH του διαλύματος πρέπει να είναι περίπου 7 για την ανίχνευση της παραγωγής της λυάσης του πηκτινικού οξέος. Τα τρυβλία επωάστηκαν για 5-10 ημέρες και έπειτα καλύφθηκαν με 1 % υδατικό διάλυμα βρωμιούχου δεκαεξυλοτριμεθυλαμμωνίου. Με την προσθήκη αυτή επιτυγχάνεται καθίζηση της πηκτίνης οπότε δημιουργείται ένας διαυγής δακτύλιος γύρω από τις αποικίες, ενώ ένας θολός δακτύλιος υποδεικνύει αποδόμηση της πηκτίνης.

3.3.5.5 Δραστικότητα της κυτταρινάσης

Η υδρόλυση της κυτταρίνης προς σάκχαρα διερευνήθηκε χρησιμοποιώντας θρεπτικό υπόστρωμα καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη (CMC). Το μέσο CBM συμπληρώθηκε με 2 % CMC χαμηλού ιξώδους και 1,6 % άγαρ. Τα τρυβλία επωάστηκαν για 5-10 ημέρες στο σκοτάδι στους 25 °C. Όταν η διάμετρος της αποικίας ήταν περίπου 30 mm έγινε χρώση των τρυβλίων με 2 % w/v υδατικό διάλυμα congo red για 15 min. Το διάλυμα της χρώσης απορρίφθηκε και η επιφάνεια εκπλύθηκε με απεσταγμένο νερό. Ακολούθησε προσθήκη 1 M NaCl για αποχρωματισμό, όπου παρέμεινε για 15 min. Στη συνέχεια το NaCl απορρίφθηκε. Η αποδόμηση του CMC γύρω από τις αποικίες εκδηλώνεται ως μια κίτρινη-αδιαφανής περιοχή έναντι του κόκκινου χρώματος που υποδεικνύει μη αποδόμηση της καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης (Pointing et al., 1999).

3.3.5.6 Αποτίμηση ενζυμικής δράσης φαινολοξειδάσης (λακκάσης)

Η δράση της λακκάσης προσδιορίστηκε με 2,2'-αζινο-δι-(3-αιθυλοβενζο-θειαλιοξιν-6-σουλφονικό οξύ) (ABTS) ως υπόστρωμα. Το μέσο LBM ενισχύθηκε με 0,1 % (w/v) γλυκόζη, 1,6 % (w/v) άγαρ και αποστειρώθηκε. Στη συνέχεια προστέθηκε ασηπτικά 1 mL αποστειρωμένου διαλύματος γλυκόζης 20 % σε κάθε 100 mL του προπαρασκευασμένου μέσου ανάπτυξης. Το μέσο ενοφθαλμίστηκε με τον υπό εξέταση μύκητα. Τα τρυβλία επωάστηκαν για 10 ημέρες στο σκοτάδι στους 25 °C. Η παραγωγή λακκάσης ανιχνεύθηκε με το σχηματισμό πράσινου χρώματος στο μέσο ανάπτυξης (Pointing et al., 1999).

3.3.5.7 Δράση της τυροσινάσης

Η παραγωγή τυροσινάσης μπορεί να προσδιοριστεί χρησιμοποιώντας p-κρεσόλη (4-μεθοξυφαινόλη). Το μέσο LBM ενισχύθηκε με 1,6 % (w/v) άγαρ και αποστειρώθηκε. Προστέθηκε ασηπτικά 1 mL αποστειρωμένου υδατικού διαλύματος γλυκόζης 20 % (w/v) ανα 100 mL προπαρασκευασμένου θρεπτικού μέσου. Οι μικροοργανισμοί ενοφθαλμίστηκαν στο παραπάνω θρεπτικό υπόστρωμα και επωάστηκαν στους 25 °C στο σκοτάδι για 5-10 ημέρες. Στη συνέχεια, διεξήχθησαν δοκιμασίες κηλίδας ως εξής: Σχηματίστηκαν βοθρία διαμέτρου των 5 mm περίπου στο μέσο άγαρ και προστέθηκαν λίγες σταγόνες 0,1 % (w/v) p-κρεσόλης σε 0,05 % (w/v) υδατικού διαλύματος γλυκίνης. Παρουσία κόκκινου-καφέ χρώματος γύρω από το βοθρίο έδειξε θετικό αποτέλεσμα (Pointing et al., 1999).

3.3.5.8 Ένζυμα μετατροπής λιγνίνης

Ο αποχρωματισμός του Remazol Brilliant Blue R (RBBR) από μύκητες έχει συσχετιστεί θετικά με την παραγωγή των φαινολοξειδασών, της υπεροξειδάσης της λιγνίνης (LiP), της υπεροξειδάσης του μαγγανίου (Boominathan and Reddy, 1992) και της λακκάσης (Pointing et al., 1999). Στον εν λόγω έλεγχο χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα LBM συμπληρωμένο με 0,05 % (w/v) RBBR και 1,6 % (w/v) άγαρ και το διάλυμα αποστειρώθηκε. Προστέθηκε ασηπτικά 1 mL αποστειρωμένου υδατικού διαλύματος γλυκόζης 20 % (w/v) ανά 100 mL ανάπτυξης. Οι μύκητες εμβολιάστηκαν και επωάστηκαν σε 25 °C στο σκοτάδι. Η ανάπτυξη των αποικιών στα τρυβλία ελέγχονταν καθημερινά για 10 ημέρες.

3.3.5.9 Λιπολυτική δράση

Για να αποτιμηθεί η λιπολυτική δράση χρησιμοποιήθηκε ελαιόλαδο και rhodamine B. Το rhodamine B (1 mg/mL) αναμίχθηκε σε απεσταγμένο νερό και αποστειρώθηκε με χρήση φίλτρου. Το μέσο ανάπτυξης περιείχε ανά λίτρο: 8 g nutrient broth, 4 g χλωριούχο νάτριο, και 10 g αγαρ. Το pH του μίγματος ρυθμίστηκε στο 7,0 και αποστειρώθηκε. Αφού η θερμοκρασία του μίγματος έφτασε στους 60 °C, τότε προστέθηκε το ελαιόλαδο 2,5 % (w/v) και διάλυμα rhodamine B 0,001 % (w/v) υπό ανάδευση για 1 min. Αφού το μέσο αφέθηκε για 10 min στους 60 °C για να μειωθεί ο αφρισμός, μεταφέρθηκαν 20 mL στα τρυβλία. Ακολούθησε μεταφορά των

υπό εξέταση μυκήτων αλλά και του *Penicillium*, που προηγουμένως είχε αναπτυχθεί σε LBM για 5 μέρες, στην επιφάνεια του λιπολυτικού υποστρώματος. Τα τρυβλία αφέθηκαν για επώαση στους 25 °C για 48 h. Η δράση της λιπάσης διαπιστώθηκε ως φθορίζων δακτύλιος περιμετρικά των αποικιών.

3.3.5.8 Παραγωγή Βιογενών Αμινών

Για να εκτιμηθεί η ικανότητα αποκαρβοξυλίωσης των αμινοξέων προς βιογενείς αμίνες, παρασκευάστηκαν τα εξής διαλύματα: περίπου 0,1 g γλυκόζης, 0,06 g μωβ βρωμοκρεσόλης, 1,5 % (w/v) άγαρ και 10 g από κάθε αμινοξύ που θα εξεταστεί και διαλύθηκαν σε 900 mL απεσταγμένου νερού. Μετά από αποστείρωση προστέθηκαν 100 mL Yeast Nitrogen Base (Difco Laboratories, Franklin Lakes NJ, USA) (6,7 % w/v), που προηγουμένως είχαν αποστειρωθεί με φίλτρο. Το τελικό pH ρυθμίστηκε στο 5,3 χρησιμοποιώντας HCl. Τα αμινοξέα που ελέγχθηκαν ήταν ιστιδίνη, φαινυλαλανίνη, τυροσίνη, ορνιθίνη και λυσίνη (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany). Οι αποικίες επιστρώθηκαν στην επιφάνεια των τρυβλίων και έπειτα επώαστηκαν στους 25 °C για 4 ημέρες. Στο pH των τρυβλίων η χρωστική είναι κίτρινη. Με μικρή αύξηση του pH το χρώμα μετατρέπεται σε μωβ. Η αντίδραση θεωρήθηκε θετική εάν γύρω από αποικία εμφανιστεί ένα μωβ χρώμα (Gardini et al., 2006).

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

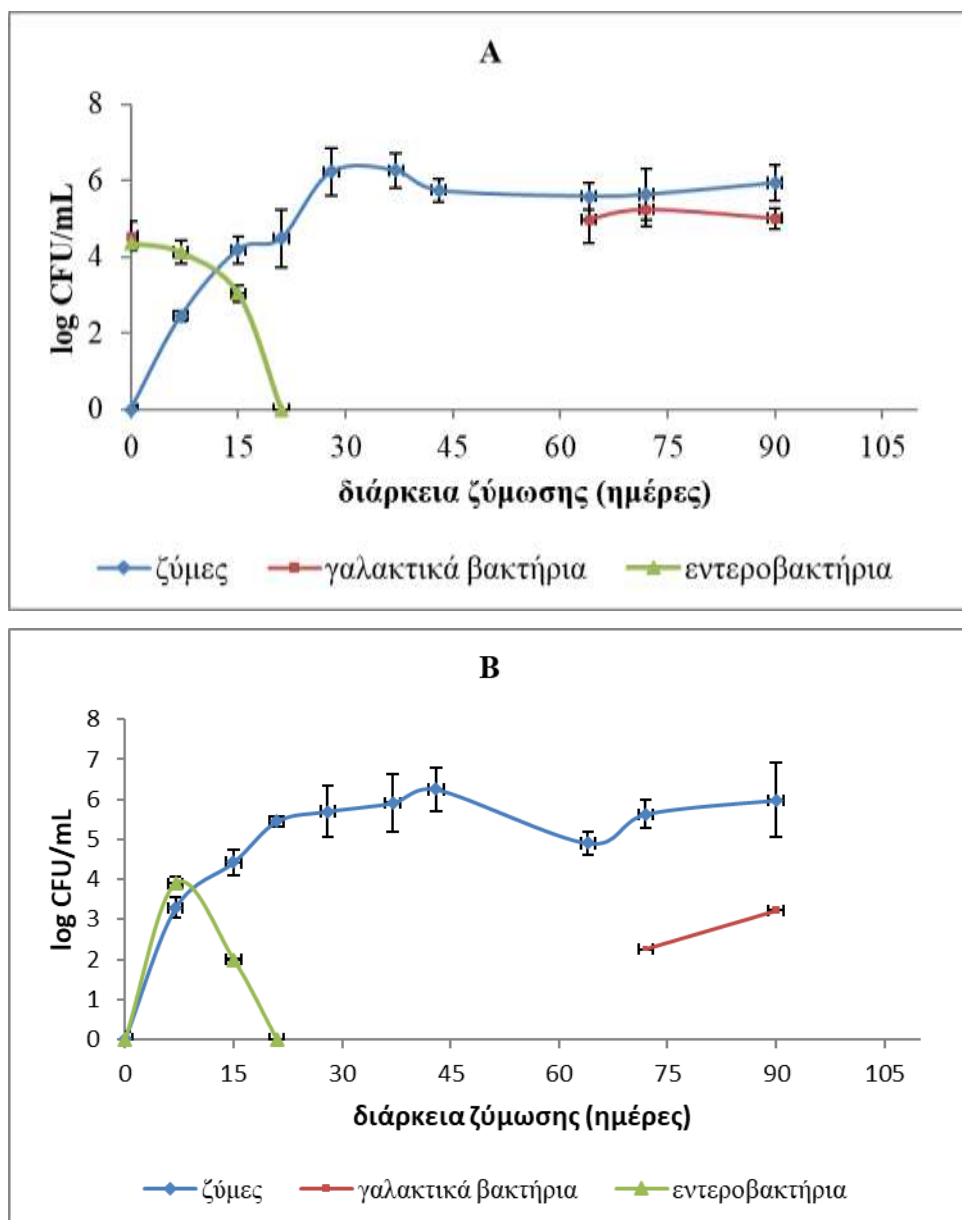
4.1 ΜΕΛΕΤΗ ΑΥΘΟΡΜΗΤΗΣ, ΑΕΡΟΒΙΑΣ ΖΥΜΩΣΗΣ ΦΥΣΙΚΩΣ ΩΡΙΜΩΝ ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΩΝ ΕΛΙΩΝ

4.1.2 Μεταβολή μικροβιακού πληθυσμού κατά την αερόβια ζύμωση

Η μεταβολή του πληθυσμού των ζυμών, γαλακτικών βακτηρίων και εντεροβακτηρίων, κατά τη διάρκεια αυθόρμητης, αερόβιας ζύμωσης, των δύο ποικιλιών ελιάς, Καλαμών και Κονσερβολιάς παρουσιάζεται στο Σχήμα 4.1.1. Οι ζύμες ήταν ανιχνεύσιμες και στις δυο ποικιλίες, καθόλη τη διάρκεια της αερόβιας ζύμωσης και μάλιστα ήταν και η επικρατέστερη μικροβιακή ομάδα, φτάνοντας σε πληθυσμό περίπου $6,5 \log \text{ CFU/mL}$. Η διαπίστωση αυτή συνάδει με προηγούμενες μελέτες κατά την αερόβια ζύμωση των ποικιλιών Sevillana (Koc et al., 2013) και Empeltre (Medina et al., 2020).

Γαλακτικά βακτήρια ανιχνεύτηκαν επίσης και στις δυο ποικιλίες. Στην ποικιλία Κονσερβολιά ανιχνεύτηκαν στην αρχή και μετά τις 65 ημέρες ζύμωσης, φτάνοντας περίπου τα $5 \log \text{ CFU/mL}$ μέχρι το τέλος της επεξεργασίας (90 ημέρες). Στην ποικιλία Καλαμών, τα γαλακτικά βακτήρια δεν ανιχνεύτηκαν τους δυο πρώτους μήνες, αλλά εμφανίστηκαν την 72^η ημέρα και έφτασαν μέχρι το τέλος (90^η ημέρα) τα $3 \log \text{ CFU/mL}$. Τέλος, τα εντεροβακτήρια ήταν ανιχνεύσιμα για περίπου 20 ημέρες και ο πληθυσμός τους κυμάνθηκε στα $4 \log \text{ CFU/mL}$ και στις δυο ποικιλίες.

Η περιεκτικότητα του αλατιού αποτελεί περιοριστικό παράγοντα για την ανάπτυξη των LAB γεγονός, που δικαιολογεί το μικρό πληθυσμό ή και την απουσία τους. Οι Tassou et al., 2002., 2007 διαπίστωσαν ότι τα LAB αναπτύχθηκαν σε φυσικώς μαύρες ελιές με περιεκτικότητα άλμης κάτω από 6 % (w/v) NaCl, αντιθέτως, η άλμη περιεκτικότητας 8 % (w/v), παρατήρησαν ότι αναστέλλει την ανάπτυξή τους. Στην παρούσα διατριβή, στα πειράματα εργαστηριακής κλίμακας που πραγματοποιήθηκαν, το αλάτι προστέθηκε σταδιακά, ξεκινώντας με 3 %, 5 % τη δεύτερη εβδομάδα και 8 % (w/v) την τρίτη εβδομάδα, όπου διατηρήθηκε και σταθερή



Σχήμα 4.1.1: Μεταβολή μικροβιακού πληθυσμού κατά την αερόβια ζύμωση των ποικιλιών Κονσερβολιά (Α) και Καλαμών (Β).

καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης με συνεχή προσθήκη άλατος. Ανασταλτικός παράγοντας για την ανάπτυξη των LAB μπορεί να αποτελέσει και η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων (Grounta et al., 2015), οι οποίες θα συζητηθούν εκτενέστερα παρακάτω.

4.1.3 Βιοχημικός χαρακτηρισμός των απομονωμένων ζυμών και γαλακτικών βακτηρίων

Ένας από τους στόχους της έρευνας αυτής αποτέλεσε η απομόνωση γαλακτικών βακτηρίων και ζυμών κατά τη διάρκεια αερόβιας ζύμωσης που πραγματοποιήθηκε σε εργαστηριακή κλίμακα στις ποικιλίες Κονσερβολιά και Καλαμών. Συνολικά απομονώθηκαν 240 ζύμες και 110 βακτήρια και από τις δυο ποικιλίες, βάσει των μορφολογικών τους χαρακτηριστικών (μέγεθος, σχήμα, χρώμα, υφή αποικίας). Οι ζύμες, για τις οποίες έγινε λόγος και παραπάνω (υποενότητα 4.1.2) επικράτησαν καθόλη τη διάρκεια της ζύμωσης, ενώ τα γαλακτικά βακτήρια ανιχνεύτηκαν σε μικρότερο πληθυσμό προς το τέλος της επεξεργασίας.

Κατά την ανανέωση των μικροοργανισμών, κάποιοι δεν κατάφεραν να αναπτυχθούν και συνεπώς δεν μελετήθηκαν περαιτέρω. Όσα βακτήρια εξετάστηκαν ήταν θετικά κατά Gram και αρνητικά στη δοκιμή καταλάσης, ενώ για τις ζύμες η δοκιμή στην καταλάση έδειξε θετικό αποτέλεσμα.

4.1.4 Επιλογή ζυμών ως υποψήφιων εναρκτηρίων καλλιέργειών

Στη συνέχεια, βάσει του πρωτοκόλλου που αναπτύχθηκε από τους Bleve et al. (2014), πραγματοποιήθηκε ο χαρακτηρισμός 116 ζυμών και 57 βακτηρίων (Π.Π 4, που απομονώθηκαν και εξετάστηκαν παραπάνω, ώστε να χρησιμοποιηθούν ως καλλιέργειες εκκίνησης σε άλλες ζυμώσεις.

Το πρωτόκολλο αποτελούνταν από τρία βήματα:

1. Επιλογή απομονωμένων ζυμομυκήτων και βακτηρίων μετά από ανάπτυξη τους σε τρυβλία με πρότυπη άλμη (ΠΑ).
2. Τα στελέχη που αναπτύχθηκαν στο πρώτο βήμα εξετάστηκαν ως προς της παρουσία β-γλυκοσιδάσης και τη μη παραγωγή βιογενών αμινών.
3. Πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση σε μοριακό επίπεδο των απομονώσεων που έλαβαν τη μεγαλύτερη βαθμολογία στο 2^ο βήμα.

Αναλυτικότερα, η ανάπτυξη των ζυμών σε τρυβλία με ΠΑ παρακολουθήθηκε για 15 ημέρες στους 14 °C. Μετά την ανάπτυξη τους, οι αποικίες των ζυμών που κατάφεραν να επιβιώσουν, έλαβαν βαθμολογία από 0-3, όπου το 3 αναφερόταν στην υψηλότερη ανάπτυξη και το 0 στην ανικανότητα ανάπτυξης. Τελικά, στις ΠΑ

αναπτύχθηκαν 33 ζύμες από την ποικιλία Κονσερβολιά και 23 ζύμες από την ποικιλία Καλαμών (Π.Π 4).

Σε δεύτερο στάδιο, οι μικροοργανισμοί αξιολογήθηκαν ως προς τη δράση της β-γλυκοσιδάσης και ως προς την αδυναμία τους να παράγουν βιογενείς αμίνες. Στην πρώτη περίπτωση ορίστηκε βαθμολογία από 0-3: 3 (έντονο καφέ), 2 (ανοιχτό καφέ), 1 (κίτρινο-γαλακτώδες), 0 (λευκό), ενώ στη δεύτερη περίπτωση, για την δράση της αποκαρβοξυλίωσης των αμινοξέων η βαθμολογία είχε ως εξής: τιμή 3 για αποικίες που περιβάλλονταν από ένα έντονο μωβ δακτύλιο, τιμή 2 για απομονώσεις που περιβάλλονταν από έντονο μπλε δακτύλιο, τιμή 1 για απομονώσεις που περιβάλλονταν από ελαφρώς μπλε δακτύλιο και η τιμή 0 για αποικίες γύρω από τις οποίες το υπόστρωμα παρέμενε λευκό.

Ο Πίνακας 4.1.1 παρουσιάζει τα αποτελέσματα των βιοχημικών δοκιμών που πραγματοποιήθηκαν στις απομονώσεις και των δύο ποικιλιών, οι οποίες έλαβαν βαθμολογία 3 για τη δράση της β-γλυκοσιδάσης. Συγκεκριμένα, έξι απομονώσεις από την ποικιλία Κονσερβολιά έλαβαν βαθμολογία 3 για τη δράση της β-γλυκοσιδάσης, ενώ ταυτόχρονα δεν παρουσίασαν την ικανότητα παραγωγής βιογενών αμινών. Αντίθετα, πέντε απομονώσεις από την ποικιλία Καλαμών παρουσίασαν τη δράση της β-γλυκοσιδάσης, αλλά παράλληλα βρέθηκε ότι διέθεταν και την ικανότητα παραγωγής βιογενών αμινών. Το γεγονός αυτό τις καθιστά μη αποδεκτές για χρήση ως εναρκτήριες καλλιέργειες.

Στη συνέχεια οι 6 απομονώσεις της ποικιλίας Κονσερβολιά ελέγχθηκαν ως προς την παρουσία των δράσεων λιπάσης και πρωτεάσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι κανένα από τα παραπάνω στελέχη δεν παρουσίασαν τις δράσεις αυτές. Θετική ένδειξη η απουσία της δραστηριότητας της πρωτεάσης, καθώς σχετίζεται με το μαλάκωμα της ελιάς (Arroyo-López et al., 2008). Παρόλο που δεν παρουσίασαν τη δράση της λιπάσης, απαραίτητη για τη βελτίωση του αρωματικού προφίλ των ελιών αυξάνοντας την περιεκτικότητα τους σε ελεύθερα λιπαρά οξέα (Rodríguez-Gómez et al., 2012), κρίθηκε ενδιαφέρον να πραγματοποιηθεί μοριακή ταυτοποίηση σε όλα τα απόμονωμένα στελέχη.

Σε ένα τρίτο στάδιο, τα παραπάνω επιλεγμένα στελέχη ταυτοποιήθηκαν σε μοριακό επίπεδο. Τα είδη που ταυτοποιήθηκαν στην ποικιλία Κονσερβολιά είναι *C. boidinii* (Accession number JF901806.1), *Z. steatolyticus* (AY447032.1) και *C. butyri* (AJ539378.1). Αντίστοιχα, στην ποικιλία Καλαμών ταυτοποιήθηκαν τα είδη *Candida* sp. CLIB 1303 (HE574641.1) και *C. boidinii* (Accession number JF901806.1).

Πίνακας 4.1.1: Αποτελέσματα βιοχημικών δοκιμών και ταυτοποίησης ζυμών (σε παρένθεση αναφέρεται ο αριθμός των απομονώσεων).

	Ανάπτυξη σε ΠΑ	δράση β- γλυκοσιδάσης	Παραγωγή βιογενών αμινών	Δράση λιπάσης και πρωτεάσης	Ταυτοποιημένα είδη
Κονσερβολιά	(33)	(6)	-	-	<i>C. boidinii</i> <i>Z. steatolyticus</i> <i>C. butyri</i>
Καλαμών	(23)	(3)	+		<i>Candida sp</i> <i>C. boidinii</i>

Οι ζύμες διαδραματίζουν ζωτικό ρόλο κατά τη διαδικασία της ζύμωσης των επιτραπέζιων ελιών, κυρίως για την ασφάλεια, την ποιότητα και τη γεύση του τελικού προϊόντος (Arroyo-López et al., 2008). Από τη μια πλευρά, οι ζύμες, λόγω της συνεχούς παρουσίας τους στην άλμη καθόλη τη διάρκεια της ζύμωσης ευθύνονται για την ομαλή έκβαση της ζύμωσης. Ως γνωστόν, μπορούν να παράγουν ενώσεις με επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, που καθορίζουν την ποιότητα και τη γεύση του τελικού προϊόντος (Arroyo-López et al., 2012). Οι τεχνολογικές εφαρμογές και οι λειτουργικές ιδιότητες των ζυμομυκήτων έχουν εξεταστεί εκτενώς (Bevilacqua et al., 2012; Silva et al., 2011; Rodríguez-Gómez et al., 2013).

Το μικροβιολογικό προφίλ τόσο των πράσινων όσο και των μαύρων ελιών έχει μελετηθεί εκτενώς (Heperkan, 2013). Ωστόσο, δεν έχουν αναφερθεί μελέτες που να αφορούν το μικροβιολογικό προφίλ αερόβιων ζυμώσεων. Σε προηγούμενη εργασία των Grounta et al. (2015), βρέθηκε ότι τα επικρατέστερα είδη που ανακτήθηκαν από την επιφάνεια των περιεκτών κατά τη ζύμωση πράσινων επιτραπέζιων ελιών ανήκουν στο γένος *Candida*. Το είδος *Z. steatolyticus* είχε επίσης αναφερθεί από τους Grounta et al. (2015) κατά τη μελέτη της πράσινης ελιάς Χαλκιδικής.

Εν κατακλείδι, για τις ζύμες που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν, δεν υπάρχουν επαρκείς πληροφορίες που να υποδεικνύουν ότι τα συγκεκριμένα είδη έχουν χαρακτηριστεί ως GRAS (Generally Recognized As Safe). Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η απουσία του χαρακτηρισμού GRAS δεν σημαίνει απαραίτητα ότι ένας μικροοργανισμός είναι επικίνδυνος· απλώς, μπορεί να μην έχει αξιολογηθεί ή εγκριθεί για συγκεκριμένες χρήσεις από τις αρμόδιες αρχές. Συνεπώς, για τα

συγκεκριμένα στελέχη είναι απαραίτητο να διεξαχθούν περαιτέρω μελέτες πριν χρησιμοποιηθούν ως καλλιέργειες εκκίνησης.

4.1.5 Επιλογή γαλακτικών βακτηρίων ως υποψήφιων εναρκτήριων καλλιιεργειών

Τα βακτήρια αφέθηκαν για επώαση για 15 μέρες στους 12 °C. Τελικά, από τα βακτήρια ικανοποιητική ανάπτυξη, με βαθμολογία 3, έλαβαν 2 στελέχη, απομονωμένα την 72^η ημέρα της ζύμωσης, ένα από κάθε ποικιλία. Τα υπόλοιπα βακτήρια δεν αναπτύχθηκαν καθόλου.

Τα βακτήρια που αναπτύχθηκαν στα τρυβλία ΠΑ, έλαβαν βαθμολογία 3 για τη δράση της β-γλυκοσιδάσης, δεν παρουσίασαν τη δράση της πρωτεάσης και λιπάσης, ούτε την ικανότητα να παράγουν βιογενείς αμίνες.

Στην περίπτωση και των δύο βακτηρίων, το ποσοστό ταυτοποίησης της αναλυμένης αλληλουχίας είναι μικρότερο από 99 %. Επομένως, η ταυτοποίηση των απομονώσεων μπορεί να γίνει με ασφάλεια σε επίπεδο γένους, ενώ η ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους απαιτεί επιπλέον μοριακή ή βιοχημική ανάλυση.

Βάσει της αλληλούχισης του γονιδίου 16S rRNA, βρέθηκε ότι ανήκουν στο γένος *Lactobacillus*, με επίπεδο ομοιότητας 94,90 % και 93,43 % για το στελέχος που απομονώθηκε από την ποικιλία Κονσερβολιά και Καλαμών, αντίστοιχα (Π.Π 5). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Hurtado et al., 2012), τα στελέχη αυτά είναι από τα πιο σημαντικά είδη γαλακτικών βακτηρίων στη ζύμωση των επιτραπέζιων ελιών.

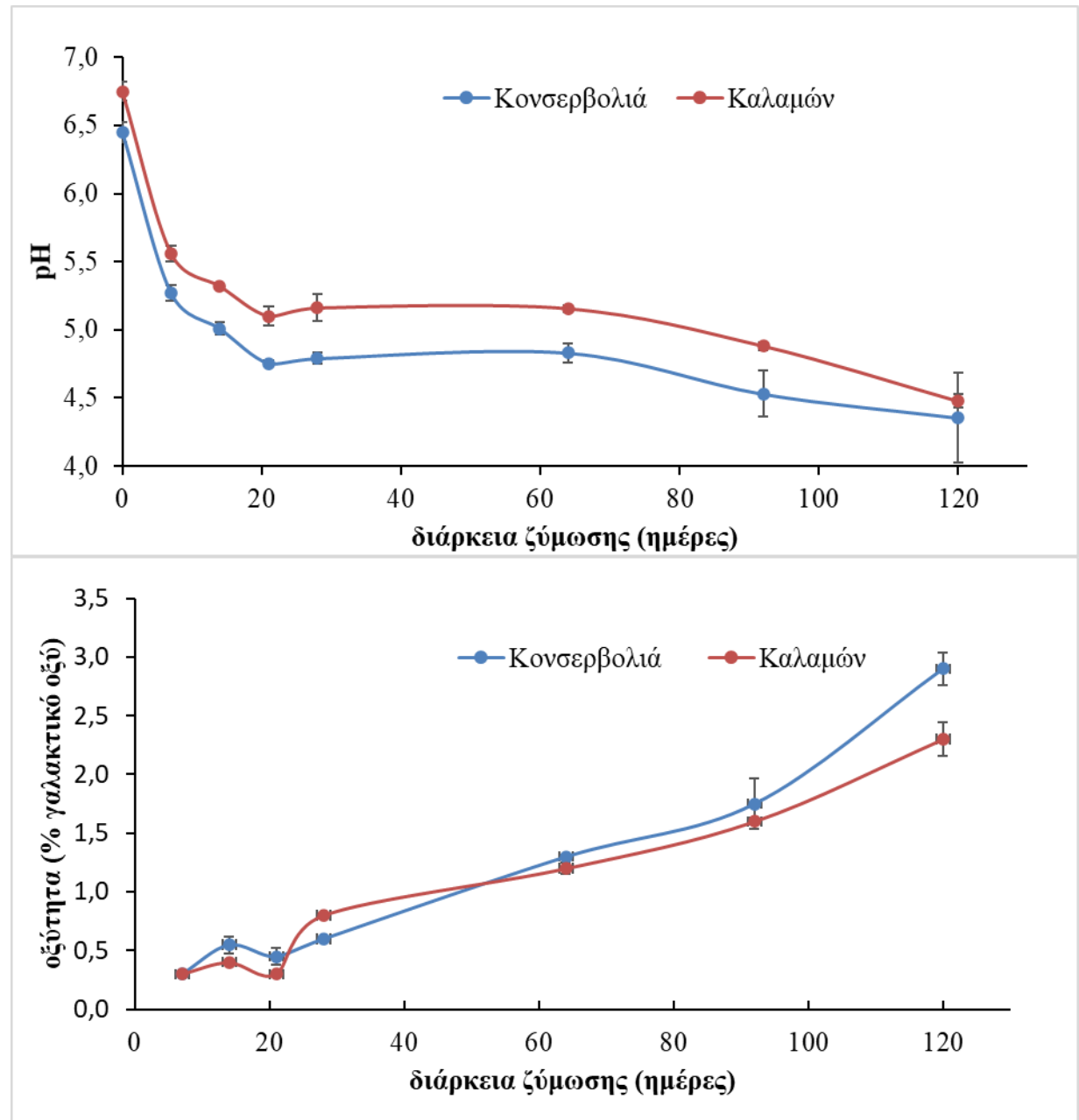
O. L. plantarum κυριαρχεί κατά το μέσο και τελικό στάδιο της ζύμωσης, αφού αντέχει σε χαμηλά pH και υψηλές συγκεντρώσεις NaCl (Corsetti et al., 2012). Επίσης, έχει χρησιμοποιηθεί ως καλλιέργεια εκκίνησης, βελτιώνοντας την τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος και μειώνοντας τον κίνδυνο αλλοίωσης (Arroyo-López et al., 2014).

Ο *L. pentosus* συχνά συνυπάρχει με τον *L. plantarum*, αλλά σε μερικές ζυμώσεις μπορεί να υπάρξει ως το κυρίαρχο είδος (Hurtado et al., 2010). Επιπλέον, μπορεί να είναι πιο ανθεκτικό στο NaCl και να επιβιώνει σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αλατιού (πάνω από 10 %) (Ruiz-Barba et al., 2010).

4.1.6 Επίδραση αερόβιας ζύμωσης σε φυσικοχημικούς παράγοντες

Στο Σχήμα 4.1.2 παρουσιάζεται η μεταβολή του pH και της οξύτητας κατά τη διάρκεια της ζύμωσης των ποικιλιών Κονσερβολιά και Καλαμών. Όσον αφορά στο

pH, παρατηρήθηκε ταχεία πτώση της αρχικής τιμής του τις 20 πρώτες ημέρες της ζύμωσης, μέχρι να φτάσει τελικές τιμές 4,88 και 4,53, για την Καλαμών και την Κονσερβολιά, αντίστοιχα.



Σχήμα 4.1.2: Μεταβολή pH και ογκομετρούμενης οξύτητας στις άλμη κατά την αερόβια ζύμωση των ποικιλιών Κονσερβολιά και Καλαμών.

Αξίζει να σημειωθεί ότι το τελικό pH στις ελιές ήταν ελαφρώς πάνω από το pH που έχει θεσμοθετηθεί ως ανώτατο όριο για τις επιτραπέζιες ελιές (δηλαδή, $\text{pH} < 4,3$ σύμφωνα με το IOOC, 2004). Ένα ασφαλές και σταθερό προϊόν πρέπει να έχει

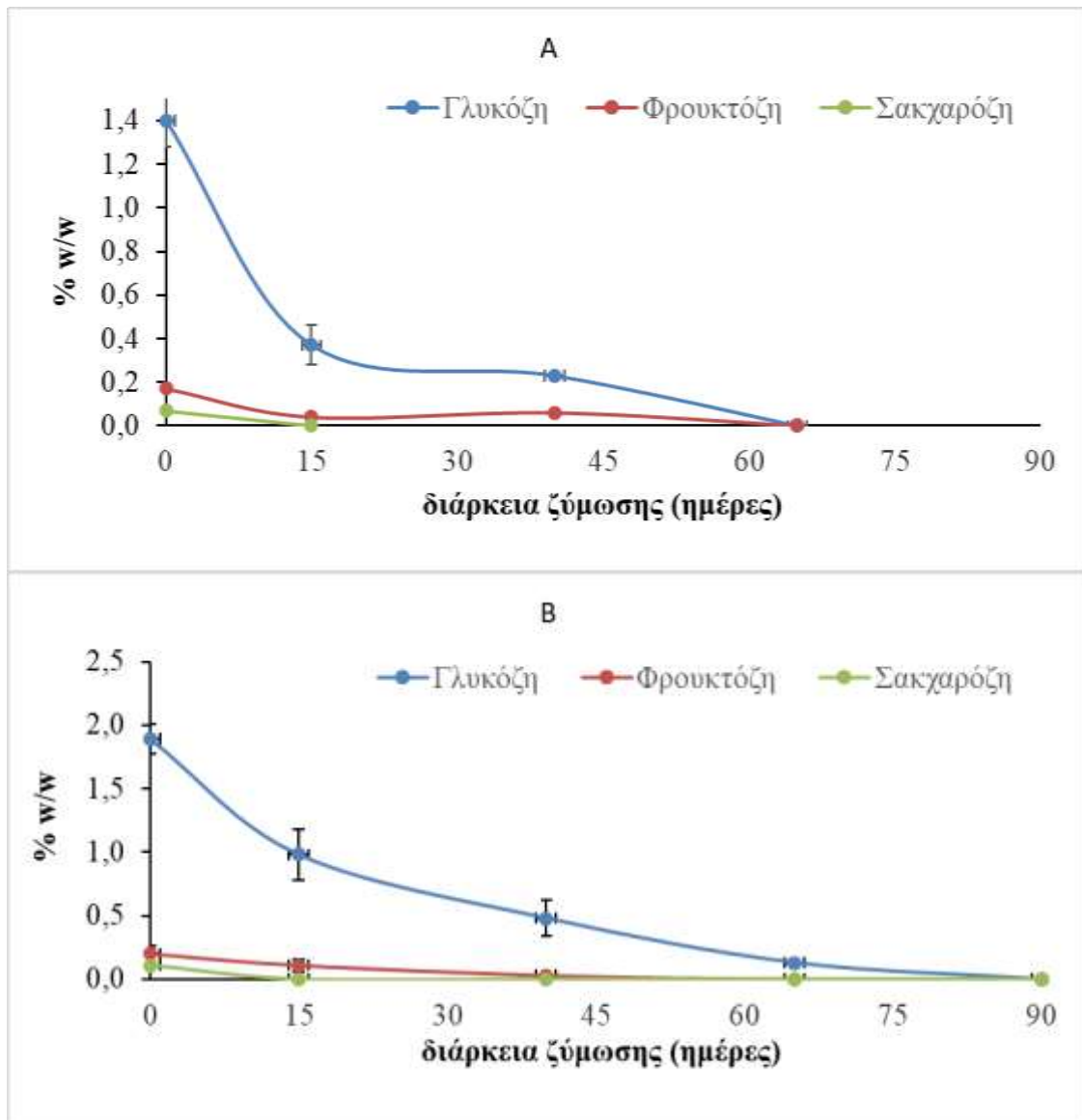
χαμηλό pH, διαφορετικά μπορεί να προκληθεί βλάστηση των σπορίων του *Clostridium botulinum* και ανάπτυξη *Enterobacteriaceae* (Fernandez et al., 1997). Επομένως, προκειμένου να βελτιωθεί η ασφάλεια του τελικού προϊόντος πρέπει να επιτευχθεί τιμή $\text{pH} < 4,3$. Η προσθήκη γαλακτικού οξέος στην αρχική άλμη ή στην άλμη στην αρχή της ζύμωσης θα ήταν μια ενδεδειγμένη ενέργεια.

Σε αυτό το σημείο πρέπει να τονιστεί ότι δεν υπάρχει γραμμική σχέση μεταξύ της ογκομετρούμενης οξύτητας και του pH, καθώς τα οξέα που παράγονται κατά τη ζύμωση είναι ασθενή και δε διίστανται πλήρως. Έτσι, το pH της άλμης θα εξαρτηθεί από το είδος των οργανικών οξέων (γαλακτικό, οξικό, κιτρικό, κλπ) και τη συγκέντρωση του καθενός απ' αυτά.

Η ογκομετρούμενη οξύτητα (εκφρασμένη σε γαλακτικό οξύ) φαίνεται ότι αυξήθηκε πάνω από την αναμενόμενη οξύτητα των επιτραπέζιων ελιών Καλαμών και Κονσερβολιά. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μια σημαντική αύξηση στην ογκομετρούμενη οξύτητα (από 0,8 και 0,7 για την Κονσερβολιά και την Καλαμών, αντίστοιχα) μεταξύ της 42^{ης} και 92^{ης} ημέρας ζύμωσης, φτάνοντας τελικές τιμές 1,75 και 1,60 για την Κονσερβολιά και την Καλαμών αντίστοιχα. Η αύξηση αυτή μπορεί να αποδοθεί στον σχηματισμό των οργανικών οξέων και του CO₂ λόγω του μεταβολισμού των ζυμών (Ruiz-Barba et al., 2023).

4.1.7 Επίδραση αερισμού στη μεταβολή των αναγόντων σακχάρων του ελαιοκάρπου

Στην παρούσα εργασία ήταν σημαντικό να μελετηθεί ο ρυθμός με τον οποίο μεταβολίζονται τα σάκχαρα (γλυκόζη, φρουκτόζη, σακχαρόζη) στον καρπό κατά τη διάρκεια της ζύμωσης των ποικιλιών, Καλαμών και Κονσερβολιά, παρουσία διαβιβαζόμενου αέρα (Σχήμα 4.1.3). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν ύστερα από την ανάλυση με HPLC-RID, έδειξαν ότι η γλυκόζη που αποτέλεσε και το κυριότερο σάκχαρο και στις δυο ποικιλίες, καταναλώθηκε μέσα σε 90 ημέρες στις Καλαμών και αρκετά πιο νωρίς, μέσα σε 65 ημέρες στις ελιές Κονσερβολιάς. Τα επίπεδα της φρουκτόζης μειωνόταν συνεχώς καθόλη τη διάρκεια της ζύμωσης έως ότου καταναλώθηκε πλήρως μέσα σε 65 και για τις δύο ποικιλίες. Η σακχαρόζη που ανιχνεύτηκε σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με τη γλυκόζη και τη φρουκτόζη, καταναλώθηκε από τους μικροοργανισμούς μέσα σε 15 ημέρες σε όλα τα δείγματα.



Σχήμα 4.1.3: Μεταβολή της συγκέντρωσης των επιμέρους σακχάρων (γλυκόζης, φρουκτόζης, σακχαρόζης) στον καρπό κατά τη διάρκεια της αερόβιας ζύμωσης των ποικιλιών Κονσερβολιά (Α) και Καλαμών (Β).

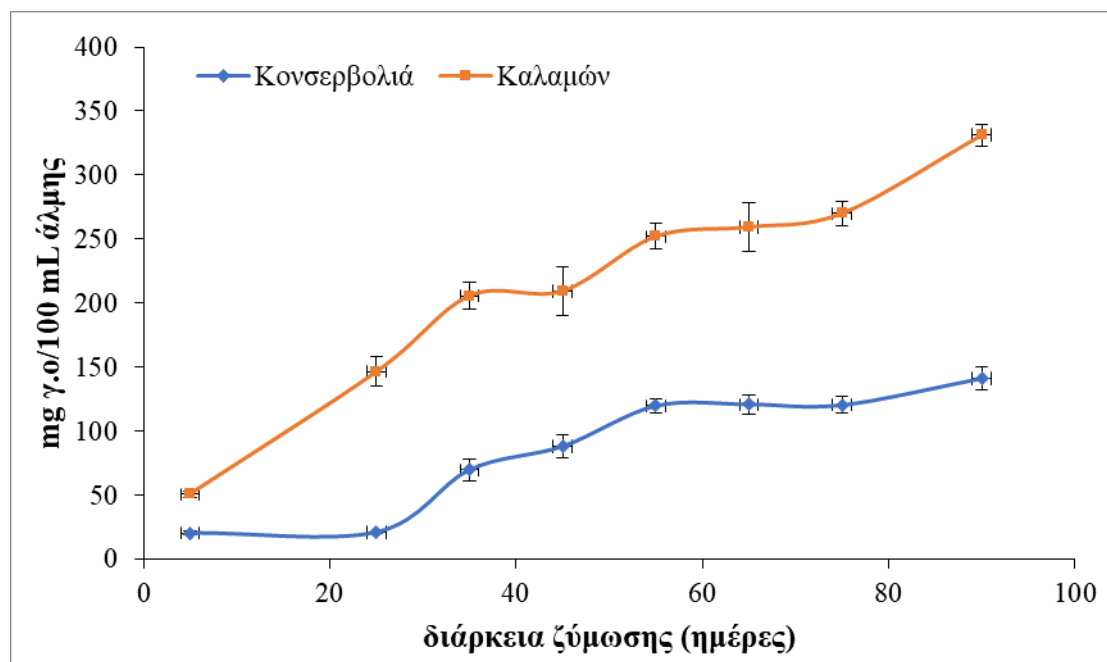
Ο αερισμός κατά τη ζύμωση έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί ταχεία διάχυση των σακχάρων (Koc et al., 2013) και των πικρών ενώσεων προς την άλμη, επιταχύνοντας τη διαδικασία της ζύμωσης και λαμβάνοντας ένα προϊόν με επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, διαθέσιμο για κατανάλωση σε μόλις 3 μήνες (Garrido et al., 1985).

Ο προσδιορισμός των σακχάρων έχει ιδιαίτερη σημασία και στο στάδιο της τελικής συσκευασίας, διότι η άλμη και κατ' επέκταση οι ελιές θα πρέπει να είναι τελείως εξαντλημένες σε ζυμώσιμα συστατικά, διαφορετικά δημιουργείται πρόσφορο

έδαφος σε δευτερογενείς ζυμώσεις, οι οποίες θα οδηγήσουν σε ένα υποβαθμισμένο προϊόν.

4.1.8 Προσδιορισμός ολικών φαινολικών στην άλμη και στον καρπό

Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, υπάρχει σημαντική αύξηση των φαινολικών ενώσεων στην άλμη λόγω διάχυσης. Στο Σχήμα 4.1.4 παρουσιάζεται η περιεκτικότητα σε ολικές φαινολικές ενώσεις στην άλμη κατά τη διάρκεια της αερόβιας ζύμωσης των ποικιλιών Κονσερβολιά και Καλαμών. Η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών αυξήθηκε προοδευτικά και στις δυο ποικιλίες, φτάνοντας τελικές συγκεντρώσεις 141,3 και 331,3 mg γαλλικού οξέος (γ.ο.)/100 mL άλμης για την Κονσερβολιά και Καλαμών, αντίστοιχα. Ο ρυθμός αύξησης των ολικών φαινολικών ενώσεων φαίνεται να είναι μεγαλύτερος στην ποικιλία Καλαμών σε αντίθεση με την ποικιλία Κονσερβολιά.



Σχήμα 4.1.4: Προσδιορισμός της ολικής περιεκτικότητας των φαινολικών ενώσεων στην άλμη των ζυμώσιμων ποικιλιών Κονσερβολιάς και Καλαμών.

Αντίθετα με την άλμη, στον καρπό υπάρχει μια σημαντική απώλεια φαινολικών ενώσεων, λόγω της διάχυσης αυτών στο υδατικό περιβάλλον, με αποτέλεσμα η συγκέντρωσή τους να φτάνει μέσα σε 90 ημέρες ζύμωσης από το 6,78 στο 3,48 g γ.ο./kg καρπού για την Καλαμών και από το 3,90 στο 3,25 g γ.ο./kg καρπού, για την

Κονσερβολιά (Πίνακας 4.1.2). Συνολικά, πραγματοποιήθηκε σημαντική μείωση των ολικών φαινολικών για την ελιά Καλαμών της τάξεως του 48,7 %, ενώ για την Κονσερβολιά κυμάνθηκε στο 16,7 %.

Πίνακας 4.1.2: Ολικές φαινολικές ενώσεις που ποσοτικοποιήθηκαν με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu στον καρπό πριν τη ζύμωση και στο τέλος της ζύμωσης.

Χρόνος ζύμωσης (ημέρες)	Καλαμών (g γαλλικού οξέος/kg καρπού)	Κονσερβολιά (g γαλλικού οξέος/kg καρπού)
T0	6,78±0,06 ^a	3,90±0,01 ^a
T90	3,48±0,01 ^b	3,25±0,02 ^b

Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$), μεταξύ των μετρήσεων στην κάθε ποικιλία, υποδεικνύονται με διαφορετικό γράμμα.

Κατά τη ζύμωση της ελιάς υπάρχει μια ανταλλαγή συστατικών λόγω της όσμωσης μεταξύ καρπού και άλμης (Gandul-Rojas and Mínguez-Mosquera, 2006) με τις μέγιστες μεταβολές να παρατηρούνται στα διαλυτά σάκχαρα, στο προστιθέμενο αλάτι (NaCl) και στις φαινολικές ενώσεις. Αυτές οι μεταβολές οφείλονται στη διάχυση των συστατικών από τον καρπό της ελιάς προς τον περιβάλλοντα χώρο (Bianchi, 2003), αλλά και στην παρουσία της ενδογενούς μικροχλωρίδας η οποία μπορεί να καταναλώσει και να μεταβάλει την ποιοτική και την ποσοτική σύσταση των φαινολικών ουσιών.

4.1.9 Ποσοτικοποίηση φαινολικών ενώσεων στην άλμη των ζυμούμενων ελιών

Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (90 ημέρες) ποσοτικοποιήθηκαν στην άλμη των δύο ποικιλιών μέσω HPLC/UV, Καλαμών και Κονσερβολιά, η υδροξυτυροσόλη, η τυροσόλη, η ελευρωπαΐνη, ο βερμπασκοζίτης, η διαλδεϋδική μορφή του αποκαρβοξυμεθυλ ελενολικού οξέος συνδεδεμένου με υδροξυτυροσόλη (DiaDe), το καφεϊκό και το κουμαρικό οξύ. Οι μεταβολές των παραπάνω ενώσεων σε σχέση με το χρόνο παρουσιάζονται στο Πίνακα 4.1.3.

Η υδροξυτυροσόλη ήταν η κυριότερη φαινολική ένωση που ταυτοποιήθηκε καθόλη τη διάρκεια της ζύμωσης και για τις δυο ποικιλίες, δείχνοντας μια αυξητική τάση και φτάνοντας μέγιστες τιμές συγκέντρωσης τα 907,42 και 596,52 mg/L για την Καλαμών και την Κονσερβολιά, αντίστοιχα. Υψηλή ήταν επίσης, η συγκέντρωση της

τυροσόλης για τις δυο ποικιλίες, φτάνοντας μέγιστες τιμές τα 320,28 και 93,21 mg/L, για την Καλαμών και την Κονσερβολιά, αντίστοιχα.

Πίνακας 4.1.3: Φαινολικές ενώσεις που ποσοτικοποιήθηκαν μέσω HPLC/UV στην άλμη κατά τη διάρκεια της αερόβιας ζύμωσης των ποικιλιών Καλαμών και Κονσερβολιά.

Φαινολικές ενώσεις	Καλαμών				Κονσερβολιά			
	15	30	60	90	15	30	60	90
Υδροξυτυροσόλη	97,06 ±21,04 ^a	693,20 ±88,07 ^b	782,81 ±103,81 ^{b,c}	907,42 ±82,02 ^c	54,27 ±4,35 ^a	319,57 ±34,17 ^b	381,46 ±66,11 ^{b,c}	596,52 ±42,63 ^c
Τυροσόλη	19,27 ±2,19 ^a	205,43 ±10,80 ^b	225,76 ±31,55 ^b	320,28 ±25,41 ^c	15,36 ±0,98 ^a	42,11 ±2,28 ^b	70,94 9,35 ^c	93,21 5,82 ^d
Καφεϊκό οξύ	6,32 ±0,36 ^a	20,51 ±2,14 ^b	39,96 ±5,36 ^c	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α
Κουμαρικό οξύ	5,79 ±0,15 ^a	6,48 ±0,85 ^a	8,82 ±0,36 ^b	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α
DiaDe	20,57 ±1,40 ^a	33,14 ±3,44 ^b	39,05 ±6,85 ^b	42,70 ±6,32 ^b	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α
Ελευρωπαΐνη	8,19 ±0,54 ^a	14,18 ±1,50 ^b	29,02 ±7,97 ^c	δ.α	7,22 ±0,23	δ.α	δ.α	δ.α
Βερμπασκοζίτης	6,44 ±0,06 ^a	9,41 ±0,96 ^b	25,21 ±4,25 ^c	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α

Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$), μεταξύ των μετρήσεων στην κάθε ποικιλία, υποδεικνύονται με διαφορετικό γράμμα (^{a, b, ...}).

δ.α: δεν ανιχνεύτηκε

DiaDe: η διαλδεϋδική μορφή του αποκαρβοξυμεθυλ ελενολικού οξέος συνδεδεμένου με υδροξυτυροσόλη

4.1.10 Επίδραση του αερισμού στα πτητικά συστατικά του καρπού των επεξεργασμένων ελιών

Στην παρούσα εργασία, η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των πτητικών συστατικών του ζυμωμένου καρπού πραγματοποιήθηκε μέσω ανάλυσης SPME/GC-MS. Συνολικά ανιχνεύτηκαν 42 πτητικές ενώσεις στην ποικιλία Κονσερβολιά και 29 στην ποικιλία Καλαμών (Πίνακες 4.1.4 και 4.1.5). Οι πτητικές ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν ομαδοποιήθηκαν σε κατηγορίες συμπεριλαμβανομένων των αλδεϋδών και κετονών, εστέρων, αλειφατικών αλκοολών, οξέων, υδρογονανθράκων, τερπενίων και αρωματικών πτητικών ενώσεων. Τα βιβλιογραφικά δεδομένα που αφορούν στα πτητικά συστατικά ζυμούμενων ελιών είναι ποικίλα, ωστόσο μετά από

βιβλιογραφική έρευνα, δε βρέθηκαν δεδομένα που να αφορούν σε αερόβιες ζυμώσεις επιτραπέζιων ελιών είτε ελληνικού τύπου είτε ισπανικού τύπου.

Πίνακας 4.1.4: Ημιποσοτικοποίηση πτητικών ενώσεων στον καρπό της ποικιλίας Κονσερβολιά κατά τη διάρκεια της ζύμωσης μέσω SPME/GC-MS. Τα δεδομένα παρουσιάζουν τη συγκέντρωση ($\mu\text{g/kg}$) $\pm$ τυπική απόκλιση. Η συγκέντρωση εκφράζεται ως ο μέσος όρος 3 επαναλήψεων.

	30 ημέρες	60 ημέρες	90 ημέρες
Αλδεΐδες-κετόνες			
2-μεθυλ-βουτανάλη	26,31 $\pm$ 3,58 ^b	19,71 $\pm$ 0,85 ^a	16,44 $\pm$ 2,97 ^a
3-μεθυλ-βουτανάλη	28,89 $\pm$ 3,21 ^b	16,23 $\pm$ 4,11 ^a	17,58 $\pm$ 3,03 ^a
εξανάλη	25,63 $\pm$ 2,87 ^b	13,13 $\pm$ 4,15 ^a	9,01 $\pm$ 2,54 ^a
(Z)-2-επτενάλη	33,02 $\pm$ 2,14 ^b	13,53 $\pm$ 2,2 ^a	δ.α
2,6-διμεθυλ-4-επτανόνη	18,53 $\pm$ 2,97	δ.α	δ.α
6-μεθυλ-5επτε-2-όνη	7,45 $\pm$ 0,85	δ.α	δ.α
εννεάλη	42,70 $\pm$ 1,26 ^b	21,19 $\pm$ 2,05 ^a	19,05 $\pm$ 0,96 ^a
(Z)-2-δεκενάλη	91,35 $\pm$ 5,06 ^c	72,03 $\pm$ 4,42 ^b	39,12 $\pm$ 3,35 ^a
Σύνολο	274$\pm$25^c	156$\pm$23^b	101$\pm$11^a
Εστέρες			
οξικός μεθυλεστέρας	13,42 $\pm$ 1,25 ^b	8,32 $\pm$ 0,98 ^a	11,47 $\pm$ 2,47 ^{a,b}
οξικός αιθυλεστέρας	17,62 $\pm$ 2,34 ^a	19,75 $\pm$ 2,18 ^a	27,70 $\pm$ 3,26 ^b
προπανικός μεθυλεστέρας	δ.α	30,03 $\pm$ 4,01 ^b	17,34 $\pm$ 5,26 ^a
προπανικός αιθυλεστέρας	30,50 $\pm$ 4,14 ^b	15,58 $\pm$ 5,57 ^a	50,43 $\pm$ 9,71 ^c
οξικός προπυλεστέρας	11,41 $\pm$ 1,14 ^a	38,19 $\pm$ 4,63 ^b	δ.α
οξικός-2-βουτυλεστέρας	35,01 $\pm$ 4,32 ^a	42,34 $\pm$ 6,68 ^a	δ.α
γαλακτικός αιθυλεστέρας	10,53 $\pm$ 0,96 ^a	13,18 $\pm$ 2,14 ^a	δ.α
2-μεθυλο-βουτανικός αιθυλεστέρας	14,73 $\pm$ 1,96 ^a	25,49 $\pm$ 2,47 ^b	24,12 $\pm$ 1,11 ^b
3-μεθυλο-βουτανικός αιθυλεστέρας	7,67 $\pm$ 0,68 ^a	16,03 $\pm$ 1,21 ^c	9,59 $\pm$ 0,98 ^b
οξικός 3-μεθυλ-βουτυλεστέρας	35,89 $\pm$ 9,24 ^a	90,64 $\pm$ 5,20 ^b	88,31 $\pm$ 8,92 ^b

εξανικός μεθυλεστέρας	20,89±3,61 ^a	27,19±2,84 ^a	24,96±4,22 ^a
εξανικός αιθυλεστέρας	28,64±3,18 ^a	41,39±6,21 ^b	45,87±8,07 ^b
οξικός (Z)-3- εξενυλεστέρας	15,78±2,63 ^a	18,62±3,46 ^a	δ.α
επτανικός αιθυλεστέρας	δ.α	δ.α	3,33±0,47
οκτανικός αιθυλεστέρας	δ.α	δ.α	9,46±0,81
Σύνολο	242±10^a	387±21^c	313±25^b
Αλειφατικές αλκοόλες			
αιθανόλη	923±74 ^a	1116±74 ^b	2006±215 ^c
2-μεθυλ-1- προπανόλη	23,59±4,11 ^b	12,07±3,15 ^a	13,44±5,18 ^a
3-μεθυλ-1- βουτανόλη	83,92±11,13 ^a	88,13±5,49 ^a	149,18±12,26 ^b
2-μεθυλ-1- βουτανόλη	40,31±11,13 ^b	23,27±4,13 ^a	56,83±12,74 ^b
εξανόλη	96,62±2,08 ^b	64,18±6,36 ^a	56,21±9,21 ^a
(Z)-3-εξενόλη	73,90±15,47 ^b	42,95±9,17 ^a	45,89±8,51 ^a
επτανόλη	δ.α	12,40±2,65 ^b	8,47±0,30 ^a
οκτανόλη	20,31±2,38 ^b	14,15±2,59 ^a	16,47±2,79 ^{a,b}
εννεανόλη	20,10±3,23 ^c	12,89±1,19 ^b	8,14±0,76 ^a
Σύνολο	1282±310^a	1386±362^{a,b}	2361±656^b
Υδρογονάνθρακες			
διμεθυλοσουλφίδιο	35,89±3,85 ^a	31,20±3,78 ^a	38,64±5,12 ^a
1-οκτένιο	δ.α	12,25±2,13	δ.α
1,3,5,7- κυκλοδεκατετραένιο	98,92±8,47 ^a	159,48±31,16 ^b	90,14±6,18 ^a
δεκάνιο	68,39±6,13 ^c	30,74±3,16 ^b	23,12±4,19 ^a
Σύνολο	203±32^b	234±68^b	152±35^a
Οξέα			
οξικό οξύ	9,37±0,78 ^a	13,08±1,33 ^b	19,31±4,21 ^c
Τερπένια			
α-φαρνεσένιο	209,6±57,41 ^b	139,76±44,41 ^{a,b}	118,08±18,14 ^a
3,7-διμεθυλ-1,3,7- οκτατριένιο	63,95±6,23 ^c	39,42±7,57 ^b	28,14±2,17 ^a
λιμονένιο	δ.α	9,50±0,68	δ.α
Σύνολο	274±103^b	189±68^{a,b}	146±64^a
Αρωματικές πτητικές ενώσεις			
φαινυλική αλκοόλη	141,21±38,93 ^a	101,67±19,16 ^a	115,85±18,75 ^a

κρεσόλη	δ.α	40,02±4,38 ^a	52,69±4,13 ^b
Σύνολο	141±39^a	142±44^a	169±45^a
Σύνολο πτητικών	2.425±16^a	2.506±14^b	3.261±37^c

Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$), μεταξύ των μετρήσεων, υποδεικνύονται με διαφορετικό γράμμα (^{a,b,...}).

Πίνακας 4.1.5: Ημιποσοτικοποίηση πτητικών ενώσεων στον καρπό της ποικιλίας Καλαμών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης μέσω SPME/GC-MS. Τα δεδομένα παρουσιάζουν τη συγκέντρωση (μg/kg) ± τυπική απόκλιση. Η συγκέντρωση εκφράζεται ως ο μέσος όρος 3 επαναλήψεων.

	30 ημέρες	60 ημέρες	90 ημέρες
Αλδεΐδες-κετόνες			
2-μεθυλ-προπανάλη	32,56±4,19 ^b	16,16±2,24 ^a	17,48±3,06 ^a
2-μεθυλ-βουτανάλη	55,22±4,89 ^c	46,72±3,12 ^b	35,66±4,62 ^a
3-μεθυλ-βουτανάλη	58,69±4,14 ^c	47,58±3,16 ^b	29,11±4,25 ^a
εξανάλη	24,23±2,56 ^b	11,16±1,02 ^a	δ.α
2,6-διμεθυλ-4-επτανόνη	9,77±1,87	δ.α	δ.α
6-μεθυλ-5επτε-2-όνη	25,41±3,14 ^b	6,90±0,49 ^a	δ.α
εννεάλη	16,13±2,64 ^a	35,22±4,44 ^b	29,05±3,16 ^b
(Z)-2-δεκενάλη	8,18±0,78	δ.α	δ.α
Σύνολο	230±1^c	164±5,79^b	111±7^a
Εστέρες			
οξικός μεθυλεστέρας	347,45±63,74 ^c	31,53±5,26 ^b	14,55±3,23 ^a
οξικός αιθυλεστέρας	293,97±2,04 ^b	21,32±3,82 ^a	25,50±4,18 ^a
2-μεθυλο-βουτανικός αιθυλεστέρας	2,46±0,26 ^a	δ.α	21,43±3,09 ^b
Οξικός 3-μεθυλ-βουτυλεστέρας	8,21±0,96 ^b	5,24±0,44 ^a	7,21±1,11 ^b
Οξικός 2-μεθυλ-βουτυλεστέρας	4,37±0,30 ^b	2,42±0,15 ^a	9,73±1,24 ^c
εξανικός μεθυλεστέρας	6,94±1,22 ^b	1,55±0,03 ^a	δ.α
εξανικός αιθυλεστέρας	δ.α	δ.α	14,27±3,19
οκτανικός αιθυλεστέρας	δ.α	δ.α	3,00±0,34
Σύνολο	663±164^c	62±20^a	96±9^b

Αλειφατικές αλκοόλες

αιθανόλη	261±32 ^a	587±23 ^b	974±28 ^c
2-μεθυλ-1- προπανόλη	9,34±0,3 ^a	8,16±0,85 ^a	7,27±0,94 ^a
3-μεθυλ-1- βουτανόλη	31,91±6,12 ^a	187,68±33,51 ^b	192,80±14,11 ^b
2-μεθυλ-1- βουτανόλη	15,36±2,47 ^a	94,28±13,71 ^b	102,41±9,74 ^b
εξανόλη	45,38±3,69 ^a	49,16±3,71 ^a	43,70±8,38 ^a
(Z)-3-εξενόλη	1,75±0,06 ^a	15,71±2,53 ^c	7,21±0,04 ^b
εννεανόλη	10,81±1,17 ^a	18,76±1,29 ^b	24,62±4,98 ^b
Σύνολο	376±98^a	961±208^b	1352±351^c

Υδρογονάνθρακες

1-οκτένιο	δ.α	1,35±0,07	δ.α
-----------	-----	-----------	-----

Οξέα

οξικό οξύ	108±32 ^c	57±12 ^b	26±4 ^a
-----------	---------------------	--------------------	-------------------

Τερπένια

α-φαρνεσένιο	13,56±3,31 ^a	14,90±2,25 ^a	12,53±3,46 ^a
3,7-διμεθυλ-1,3,7- οκτατριένιο	51,11±9,27 ^b	56,94±7,66 ^b	26,35±6,37 ^a
Σύνολο	65±13^{a,b}	72±10^b	39±10^a

Αρωματικές

πτητικές ενώσεις

βενζυλική αλκοόλη	28,19±5,21 ^a	δ.α	27,11±2,23 ^a
φαινυλική αλκοόλη	δ.α	21,46±2,22 ^a	17,94±3,18 ^a
Σύνολο	28±5^a	21±2^a	45±6^b

Σύνολο πτητικών **1.471±63^{a,b}** **1.339±75^a** **1.669±130^b**

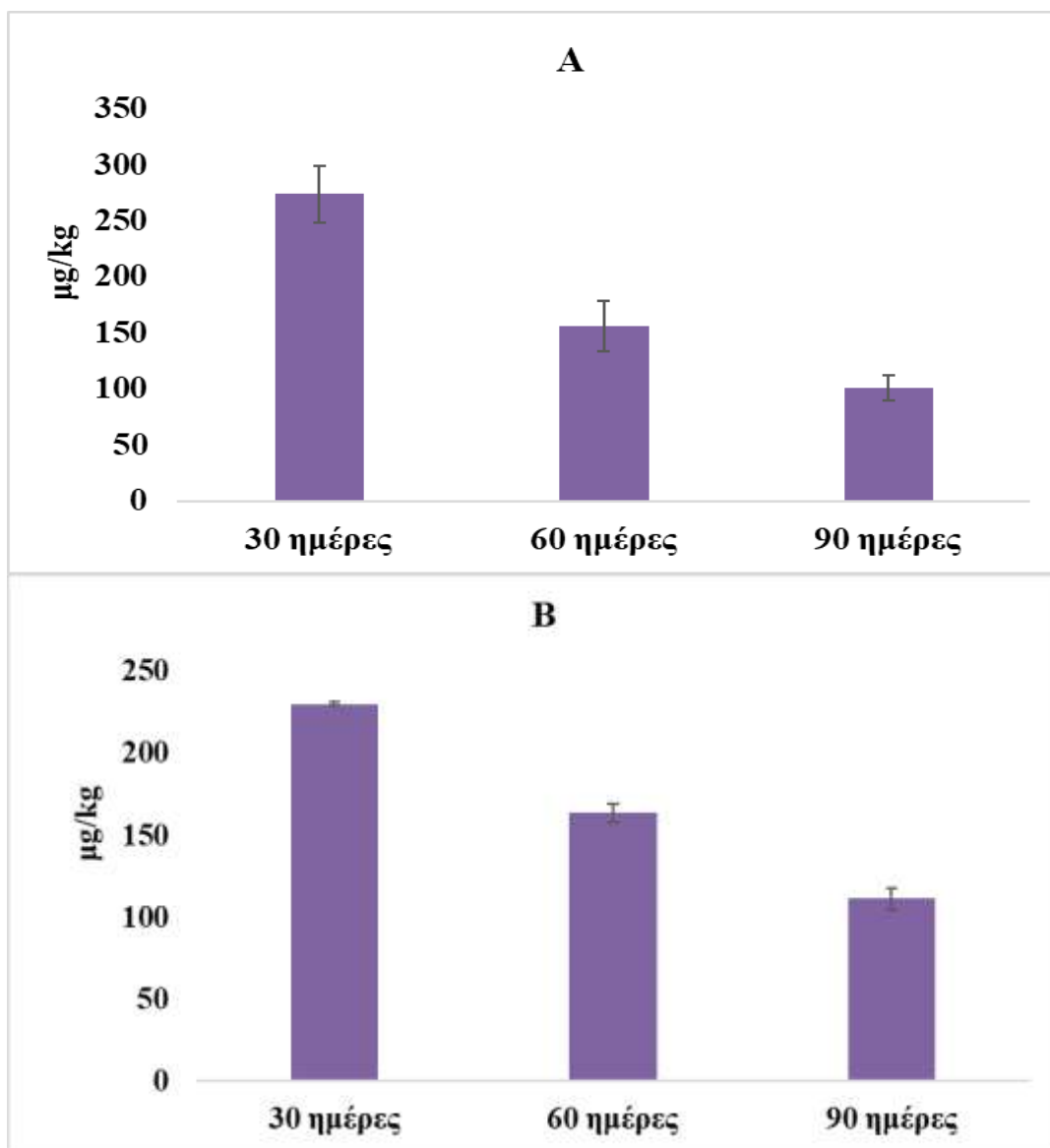
Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$), μεταξύ των μετρήσεων, υποδεικνύονται με διαφορετικό γράμμα (^{a,b,...}).

Η σύσταση του αρωματικού κλάσματος στις ελιές επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, όπως η ποικιλία, ο βαθμός ωρίμανσης του καρπού το είδος της επεξεργασίας κ.τ.λ. Επίσης, οι ενζυμικές δραστηριότητες των γηγενών μικροοργανισμών θα καθορίσουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος. Οι ζύμες, διαθέτουν κυρίως λιπολυτική δράση και τη δράση της β-γλυκοσιδάσης (Bevilacqua et al., 2012). Η πρώτη περίπτωση σχετίζεται με την παρουσία εστερασών και λιπασών, οι οποίες παράγουν πτητικές οργανικές ενώσεις (όπως αιθανόλη, ανώτερες αλκοόλες και εστέρες) μέσω του καταβολισμού των ελεύθερων λιπαρών οξέων (Hernández et al., 2007). Αντίθετα, η δεύτερη συνδέεται με την αποικοδόμηση της ελευρωπαΐνης σε μη πικρές ενώσεις, όπως η υδροξυτυροσώλη (Penland et al., 2020).

Αλδεΐδες: Οι αλδεΐδες υφίστανται μια σειρά ενζυματικών μετασχηματισμών που προκαλούνται από μικροβιακές ισομεράσες και αλκοολικές αφυδρογονάσες, οδηγώντας σε αλκοόλες C6 (Cavalli et al., 2004). Στην ποικιλία Καλαμών, η ομάδα των αλδεϋδών (Σχήμα 4.1.5) αποτέλεσε τη δεύτερη επικρατέστερη ομάδα πτητικών ενώσεων στο τέλος της ζύμωσης, με τη συγκέντρωσή τους να μειώνεται ($p < 0,05$) κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας (από 195 $\mu\text{g/kg}$ σε 111 $\mu\text{g/kg}$). Στην ποικιλία Κονσερβολιά παρουσιάστηκε η ίδια τάση, με τη συγκέντρωση των αλδεϋδών να κυμαίνεται από 248 σε 101 $\mu\text{g/kg}$ μέχρι το τέλος της ζύμωσης (90 ημέρες). Κυριότερη αλδεΐδη και στις τρεις δειγματοληπτικές περιόδους (30, 60, 90 ημέρες) για την Κονσερβολιά ήταν η 2-δεκενάλη, ενώ για την Καλαμών οι 2 και 3 μεθυλ-βουτανάλη. Η εννεάλη που ανιχνεύτηκε μόνο στις ελιές Καλαμών ήταν η μόνη αλδεΐδη που παρουσίασε αύξηση ($p < 0,05$) μετά από το πρώτο στάδιο (30 ημέρες) της ζύμωσης με μέγιστη τιμή στις 60 ημέρες.

Κετόνες: Η 2,6-διμεθυλ-4-επτανόνη και η 6- μεθυλ-5-επτε-2-όνη ήταν οι μόνες κετόνες που ανιχνεύτηκαν και στις δυο ποικιλίες στα πρώτα στάδια της ζύμωσης (30 ημέρες), με την 6- μεθυλ-5-επτε-2-όνη να ανιχνεύεται μέχρι τις 60 ημέρες στην Καλαμών.

Αλειφατικές αλκοόλες: Οι αλκοόλες (Σχήμα 4.1.6) ήταν η επικρατέστερη ομάδα ενώσεων και στις δυο ποικιλίες με την αιθανόλη να εμφανίζει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση. Αυτή η χημική ομάδα παρουσίασε αύξηση της συγκέντρωσής της και στις δυο ποικιλίες. Συγκεκριμένα, στην Κονσερβολιά κατά τη ζύμωση μεταβλήθηκε από 1282 $\mu\text{g/kg}$ σε 2361 $\mu\text{g/kg}$ και στην Καλαμών από 404 $\mu\text{g/kg}$ σε 1379 $\mu\text{g/kg}$. Μετά την αιθανόλη σε σχετικά υψηλά επίπεδα ακολουθούν οι ισοαμυλικές αλκοόλες, 2-μεθυλ-1-βουτανόλη και 3-μεθυλ-1-βουτανόλη. Η παρουσία της αιθανόλης καταδεικνύει τη δράση ζυμών και ετεροζυμωτικών LAB και είναι εξαιρετικής σημασίας όσον αφορά τη συνεισφορά της στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των φυσικώς μαύρων επιτραπέζιων ελιών (Bleve et al., 2015; Ruiz-Barba et al., 2023).

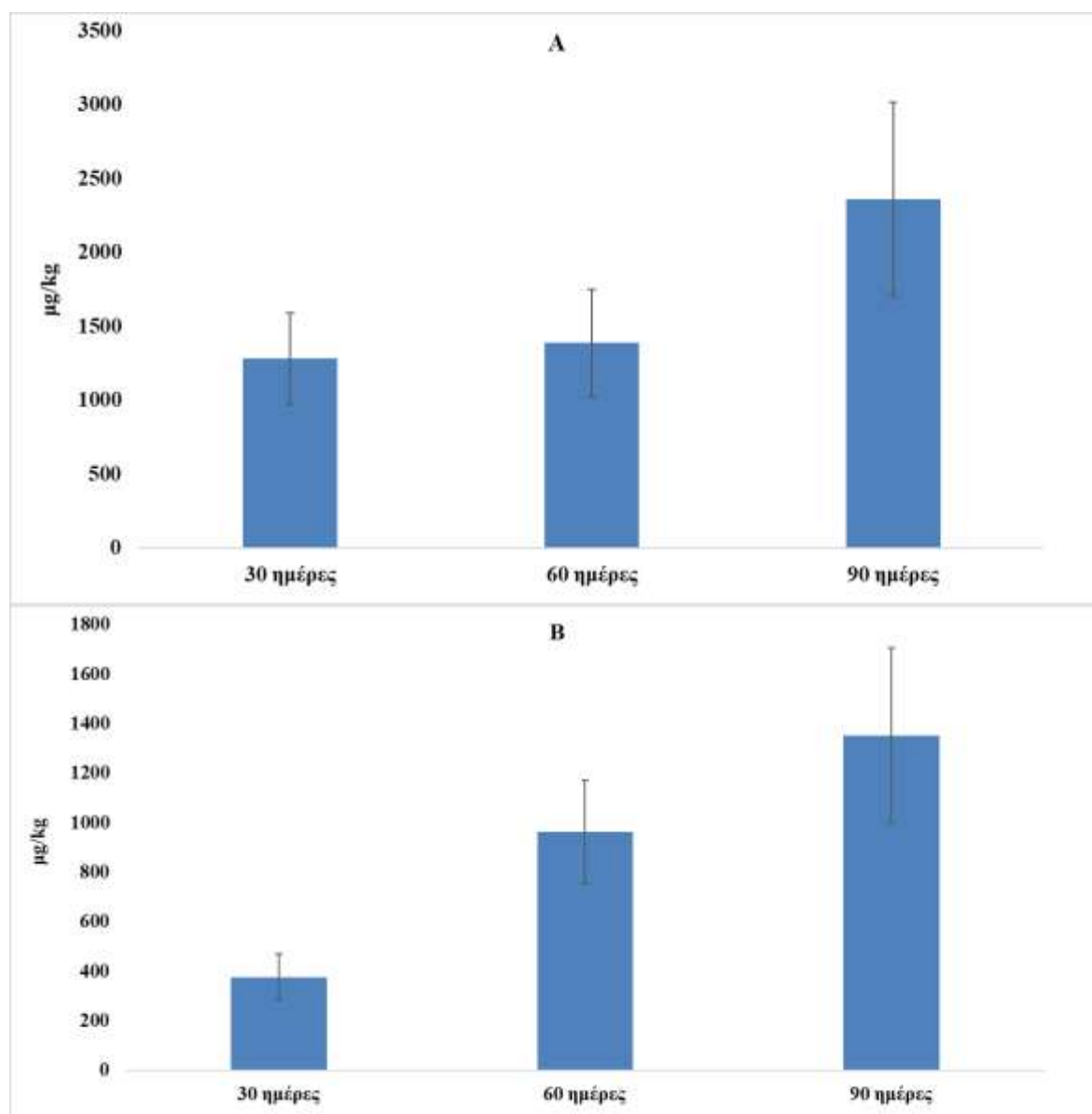


Σχήμα 4.1.5: Ημιποσοτικοποίηση αλδευδών και κετονών μέσω ανάλυσης με SPME/GC-MS στον καρπό των ποικιλιών Κονσερβολιά (A) και Καλαμών (B).

Κατά τη ζύμωση των ποικιλιών Κονσερβολιά και Καλαμών, σύμφωνα με την ελληνικού τύπου επεξεργασία οι Bleve et al., 2015 διαπίστωσαν ότι το πρώτο στάδιο της ζύμωσης των ελιών αυτών συνδέεται με την παρουσία αλδευδών όπως 2 και 3 μεθυλοβουτανάλης, εξανάλης, 2 και 3-μεθυλοπροπανάλης και εννεανάλης.

Οι αλκοόλες είναι οι κύριες ενώσεις αρώματος που σχετίζονται με τη ζύμωση, λόγω του μεταβολισμού των ζυμών και η παρουσία τους στις επιτραπέζιες ελιές έχει αναφερθεί σε πολλές μελέτες (Maicas, 2020; Sabatini et al., 2009; Sabatini και Marsilio, 2008). Σύμφωνα με τα δεδομένα της παρούσας έρευνας, φάνηκε ότι όσο προχωρούσε η ζύμωση, οι αλκοόλες αυξάνονταν, όπως επιβεβαιώνεται από τους

(Ruiz-Barba et al., 2023) όπου διαπίστωσαν σταδιακή αύξηση των αλκοολών στη ζύμωση φυτικών ελιών (Traina et al., 2024).



Σχήμα 4.1.6: Ημιποσοτικοποίηση αλειφατικών αλκοολών, μέσω ανάλυσης με SPME/GC-MS στον καρπό των ποικιλιών Κονσερβολιά (A) και Καλαμών (B).

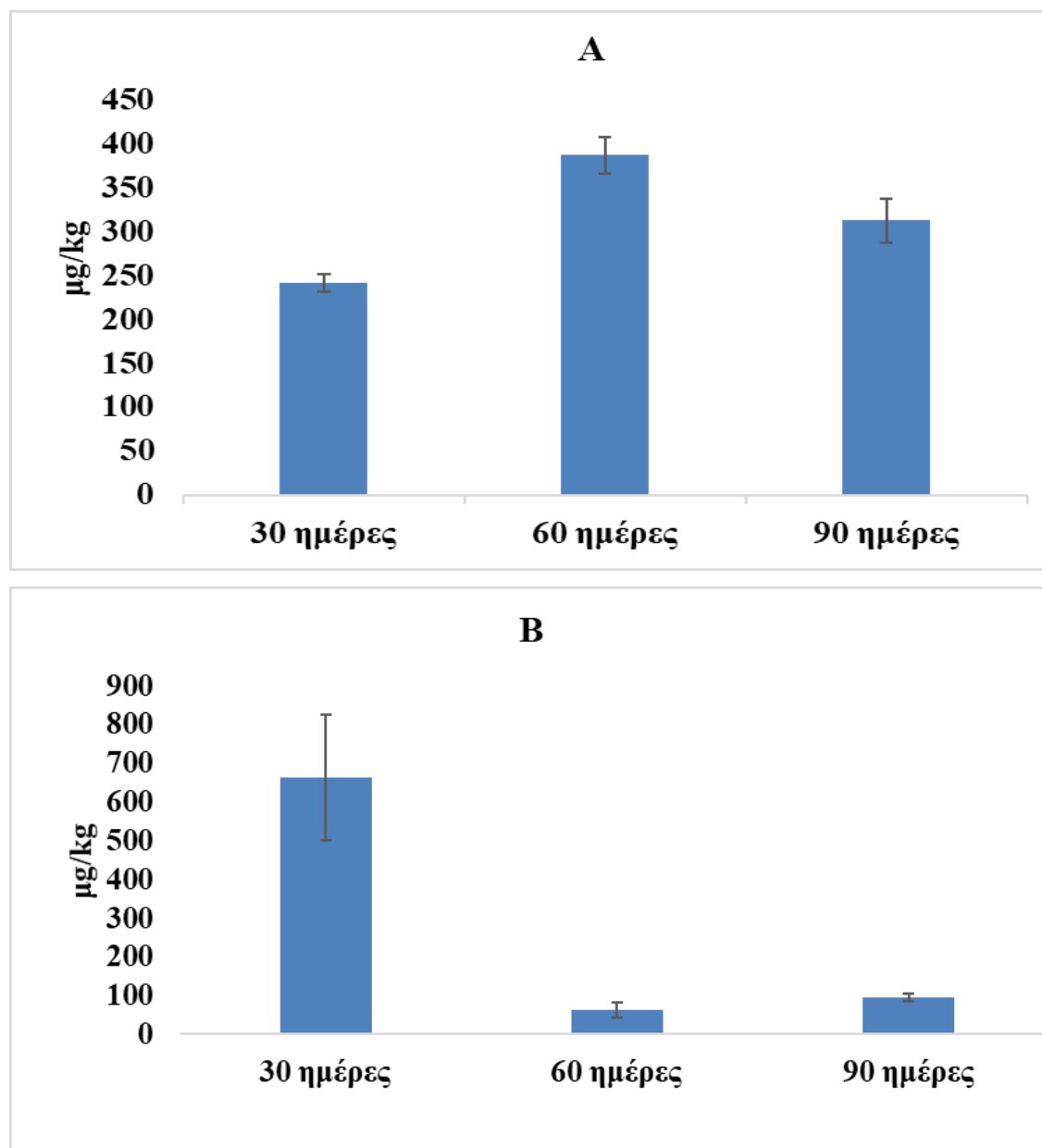
Εστέρες: Οι εστέρες αποτελούν σημαντικές πτητικές ενώσεις που συμβάλλουν στο αρωματικό προφίλ των επιτραπέζιων ελιών και σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης μέσω μικροβιακών και ενζυμικών διεργασιών. Το ένζυμο αλκοολική ακετυλο-τρανσφεράση καταλύει την εστεροποίηση των πτητικών αλκοολών με μόρια ακετυλο-CoA. Οι εστέρες που προκύπτουν από την ανωτέρω πορεία είναι ο οξικός εξυλεστέρας και ο οξικός (Z)-εξενυλεστέρας. Με τον ίδιο τρόπο οι προπανικοί

εστέρες συντίθενται με εστεροποίηση πτητικών αλκοολών με μόρια προπιονυλ CoA. Στην ποικιλία Κονσερβολιά, οι εστέρες αυξήθηκαν από 242 $\mu\text{g/kg}$ (30 ημέρες) σε 387 $\mu\text{g/kg}$ (60 ημέρες), ενώ μειώθηκαν στα 313 $\mu\text{g/kg}$ στις 90 ημέρες. Από την άλλη πλευρά, στην ποικιλία Καλαμών οι εστέρες με αρχική συγκέντρωση 663 $\mu\text{g/kg}$ (30 ημέρες) μειώθηκαν ($p<0,05$) δέκα φορές περίπου στα 62 $\mu\text{g/kg}$ (60 ημέρες) και τελικά αυξήθηκαν ($p<0,05$) στα 96 $\mu\text{g/kg}$ (90 ημέρες). Στο τέλος της επεξεργασίας, στην Κονσερβολιά, ο επικρατέστερος εστέρας ήταν ο οξικός ισοαμυλεστέρας, ενώ ακολούθησε ο προπανικός αιθυλεστέρας και ο εξανικός αιθυλεστέρας. Αναφορικά με την ποικιλία Καλαμών, εκεί επικράτησε ο οξικός αιθυλεστέρας και ο 2-μεθυλοβουτανικός αιθυλεστέρας.

Ως προς τους εστέρες (Σχήμα 4.1.7) που ημιποσοτικοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, τα αποτελέσματα είναι διφορούμενα, καθώς οι δυο ποικιλίες παρουσίασαν διαφορετική συμπεριφορά με τον εφαρμοζόμενο αερισμό. Οι Traina et al. (2024), κατά τη μελέτη της επιτραπέζιας ποικιλίας Taggiasca, στην οποία κυριάρχησαν οι ζύμες, διαπίστωσαν ότι οι περισσότεροι εστέρες σχηματίζονται κυρίως στα αρχικά στάδια της διαδικασίας. Το συμπέρασμα αυτό δε συμφωνεί με τα ευρήματα των Penland et al. (2020) και των Ruiz-Barba et al. (2023).

Οξέα: Το μόνο οξύ (Σχήμα 4.1.8) που ανιχνεύτηκε μέσω της SPME/GC-MS και στις δυο ποικιλίες ήταν το οξικό οξύ. Μάλιστα, παρατηρήθηκαν διαφορετικές τάσεις στις δυο ποικιλίες. Η συγκέντρωση του οξικού οξέος στην ποικιλία Κονσερβολιά αυξήθηκε ($p<0,05$) από 9,37 $\mu\text{g/kg}$ (30 ημέρες) σε 13,08 $\mu\text{g/kg}$ (60 ημέρες), ενώ στην Καλαμών μειώθηκε ($p<0,05$) από 108 $\mu\text{g/kg}$ (30 ημέρες) σε 57 $\mu\text{g/kg}$ (60 ημέρες). Μέχρι το τελικό στάδιο, η συγκέντρωση του οξικού οξέος στην Κονσερβολιά αυξήθηκε (19,31 $\mu\text{g/kg}$), ενώ στην Καλαμών μειώθηκε σημαντικά ($p<0,05$) στα 26,14 $\mu\text{g/kg}$. Το οξικό οξύ παράγεται από βακτήρια όπως το *Acetobacter* species, το *Clostridium acetobutylicum* και άλλους μικροοργανισμούς, π.χ. ζυμομύκητες, με οξείδωση της αιθανόλης. Από ό,τι φαίνεται, το pH της άλμης των δύο ποικιλιών επηρέασε τη συγκέντρωση του οξικού οξέος στον καρπό. Συγκεκριμένα, το pH στις άλμες των ποικιλιών Κονσερβολιά και Καλαμών υπολογίστηκε στα 4,53 και 4,88, αντίστοιχα. Στην πρώτη περίπτωση, η τιμή είναι μικρότερη από το pK_a του οξικού οξέος (4,74), ενώ στη δεύτερη περίπτωση είναι μεγαλύτερη. Έτσι, στην άλμη της ποικιλίας Κονσερβολιά, το οξικό οξύ βρίσκεται κυρίως στην ουδέτερη μορφή του (CH_3COOH), γεγονός που μειώνει τη διαλυτότητα

του σε αυτό το υδατικό περιβάλλον, οδηγώντας το προς τη λιπόφιλη φύση του καρπού.



Σχήμα 4.1.7: Ημιποσοτικοποίηση εστέρων μέσω ανάλυσης με SPME/GC-MS στον καρπό των ποικιλιών Κονσερβολιά (A) και Καλαμών (B).

Το αντίστροφο φαινόμενο παρατηρείται στην ποικιλία Καλαμών, όπου το οξικό οξύ (CH_3COOH) βρίσκεται κυρίως στην ιονισμένη του μορφή στην άλμη. Συνεπώς, η συγκέντρωση του οξικού οξέος στον καρπό Καλαμών, στο τέλος της ζύμωσης, φαίνεται να είναι μειωμένη.

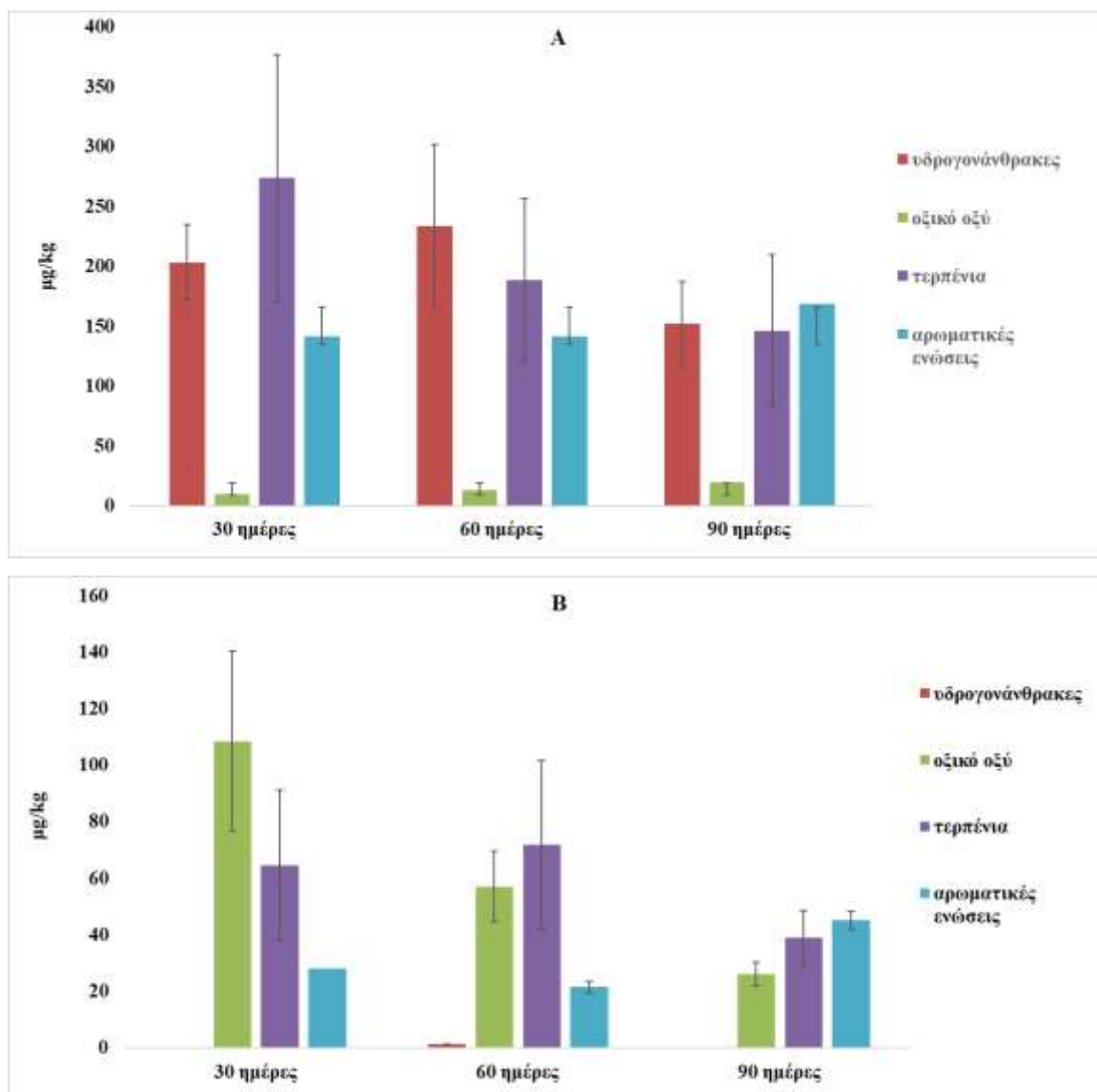
Υδρογονάνθρακες: Σχετικά με τους υδρογονάνθρακες (Σχήμα 4.1.8), και στις δυο ποικιλίες βρέθηκαν ποιοτικές και ποσοτικές διαφορές. Η Κονσερβολιά εμφάνισε

μεγαλύτερη ($p < 0,05$) συγκέντρωση υδρογονανθράκων καθ'όλη τη διάρκεια της ζύμωσης, ενώ στην Καλαμών ανιχνεύτηκε μόνο οκτένιο ($1,35 \mu\text{g/kg}$) στις 60 ημέρες ζύμωσης. Γενικά, αλκάνια και αλκένια θεωρούνται δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης λιπαρών οξέων (Sánchez et al., 2018). Στην ποικιλία Κονσερβολιά ο επικρατέστερος υδρογονάνθρακας ήταν το 1,3,5,7-κυκλοτετραένιο (Stinson et al., 2003).

Τερπένια: Γενικά, τα τερπενοειδή μπορούν να θεωρηθούν ως ενώσεις προερχόμενες από την ελιά, που απελευθερώνονται κατά τη ζύμωση από μη πτητικές πρόδρομες ουσίες με τη δράση των μικροβιακών γλυκοσιδασών υπό όξινο περιβάλλον (De Castro, et al., 2019). Επίσης, τα σεσκιτερπένια έχουν ήδη προταθεί ως πιθανοί βιοδείκτες για τη διαπίστωση της αυθεντικότητας στις επιτραπέζιες ελιές (Cortés-Delgado et al., 2016) και του ελαιολάδου (Damascelli and Palmisano, 2013). Τα τερπένια (Σχήμα 4.1.8), στην παρούσα εργασία ήταν υψηλότερα ($p < 0,05$) στις ελιές Κονσερβολιάς σε σύγκριση με τις ελιές Καλαμών. Η αρχική (30 ημέρες) ποσότητα τερπενίων μειώθηκε ($p < 0,05$) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και στις δυο ποικιλίες. Τα αποτελέσματα αυτά δεν φαίνονται να έρχονται σε συμφωνία με τους (Dabbou et al., 2012) σύμφωνα με τους οποίους παρουσιάστηκε αύξηση των τερπενίων κατά τη ζύμωση. Στον ζυμωμένο καρπό, τα τερπένια που ανιχνεύτηκαν ήταν το α -φαρνεσένιο και το 3,7-διμεθυλ-1,3,7-οκτατριένιο, με το πρώτο να επικρατεί στην Κονσερβολιά και το δεύτερο στην Καλαμών.

Αρωματικές πτητικές ενώσεις: Ο σχηματισμός των πτητικών φαινολών οφείλεται στη δράση των μικροοργανισμών κατά την εξέλιξη της ζύμωσης (Cortés-Delgado et al., 2016) μέσω της αποκαρβοξυλίωσης των φαινολικών οξέων (Rodríguez et al., 2009). Η φαινυλική αλκοόλη και η κρεσόλη ανιχνεύτηκαν στην ποικιλία Κονσερβολιά, ενώ μόνο η πρώτη ανιχνεύτηκε στην ποικιλία Καλαμών.

Σε αντίθεση με προηγούμενη αναφορά των Mikrou et al. (2021) που συνδέουν την αλκαλική επεξεργασία (ισπανικού τύπου) ελιών Χαλκιδικής με αυξημένο σχηματισμό πτητικών φαινολών, στην παρούσα μελέτη η ποικιλία Κονσερβολιά εμφάνισε σαφώς υψηλότερη συγκέντρωση αυτών των ενώσεων συγκριτικά με την Καλαμών. Το εύρημα αυτό πιθανώς συνδέεται με τη διαφορετική σύσταση σε



Σχήμα 4.1.8: Ημιποσοτικοποίηση υδρογονανθράκων, οξικού οξέος, τερπενίων, αρωματικών πτητικών ενώσεων μέσω ανάλυσης με SPME/GC-MS στον καρπό των ποικιλιών Κονσερβολιά (Α) και Καλαμών (Β).

πρόδρομες φαινολικές ενώσεις και τη δυναμική της μικροβιακής ζύμωσης, που φαίνεται να επηρεάζουν αποφασιστικά τον σχηματισμό των πτητικών φαινολών.

4.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΥ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΖΥΜΩΝ ΚΑΙ ΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ ΖΥΜΩΣΗ ΤΩΝ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΚΟΝΣΕΡΒΟΛΙΑ ΚΑΙ ΚΑΛΑΜΩΝ

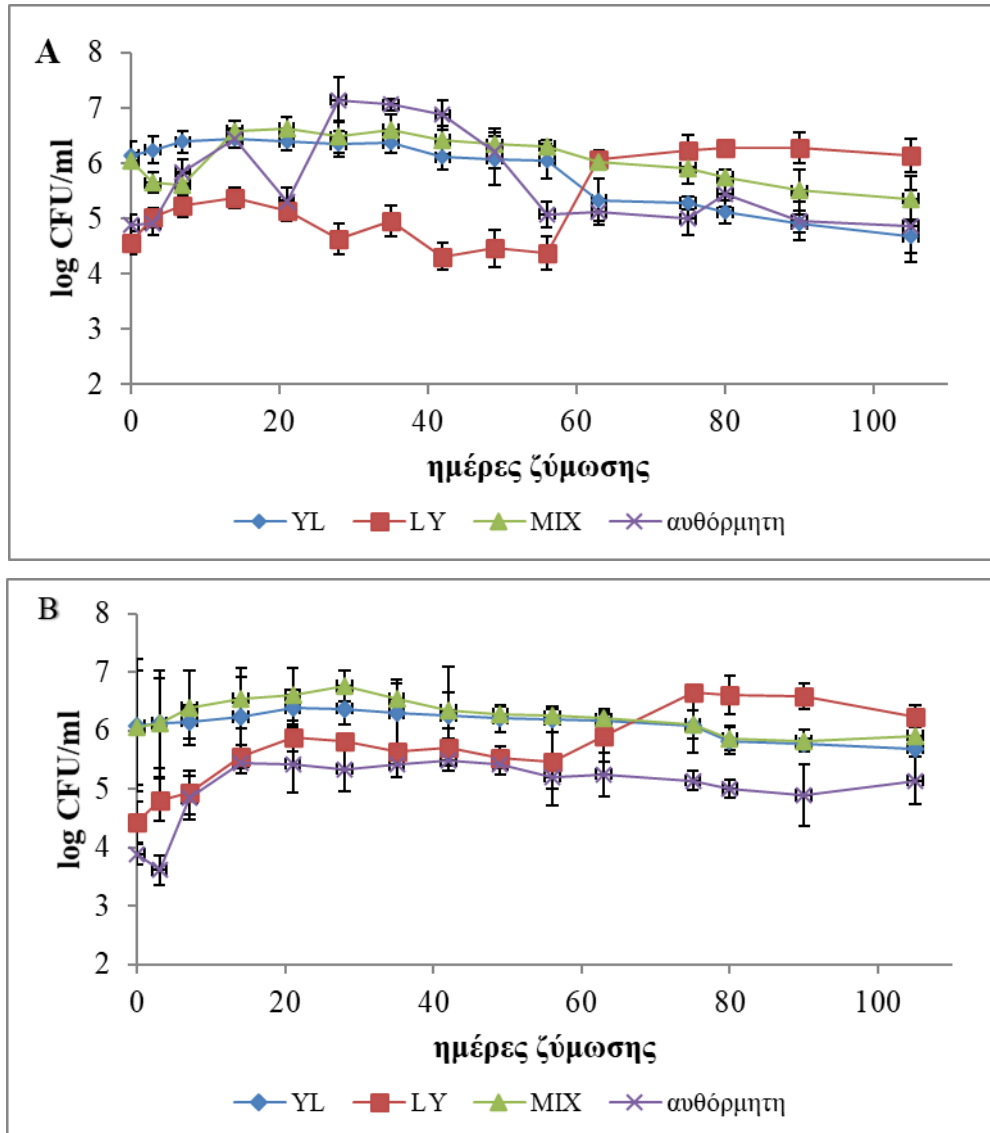
4.2.1 Αποτελέσματα μικροβιολογικών αναλύσεων

Η μεταβολή του πληθυσμού τόσο των ζυμών όσο και των γαλακτικών βακτηρίων, κατά τη διάρκεια των ελεγχόμενων αλλά και των αυθόρμητων ζυμώσεων των δύο ποικιλιών ελιάς, Καλαμών και Κονσερβολιάς παρουσιάζεται στα Σχήμα 4.2.1 και 4.2.2 αντίστοιχα.

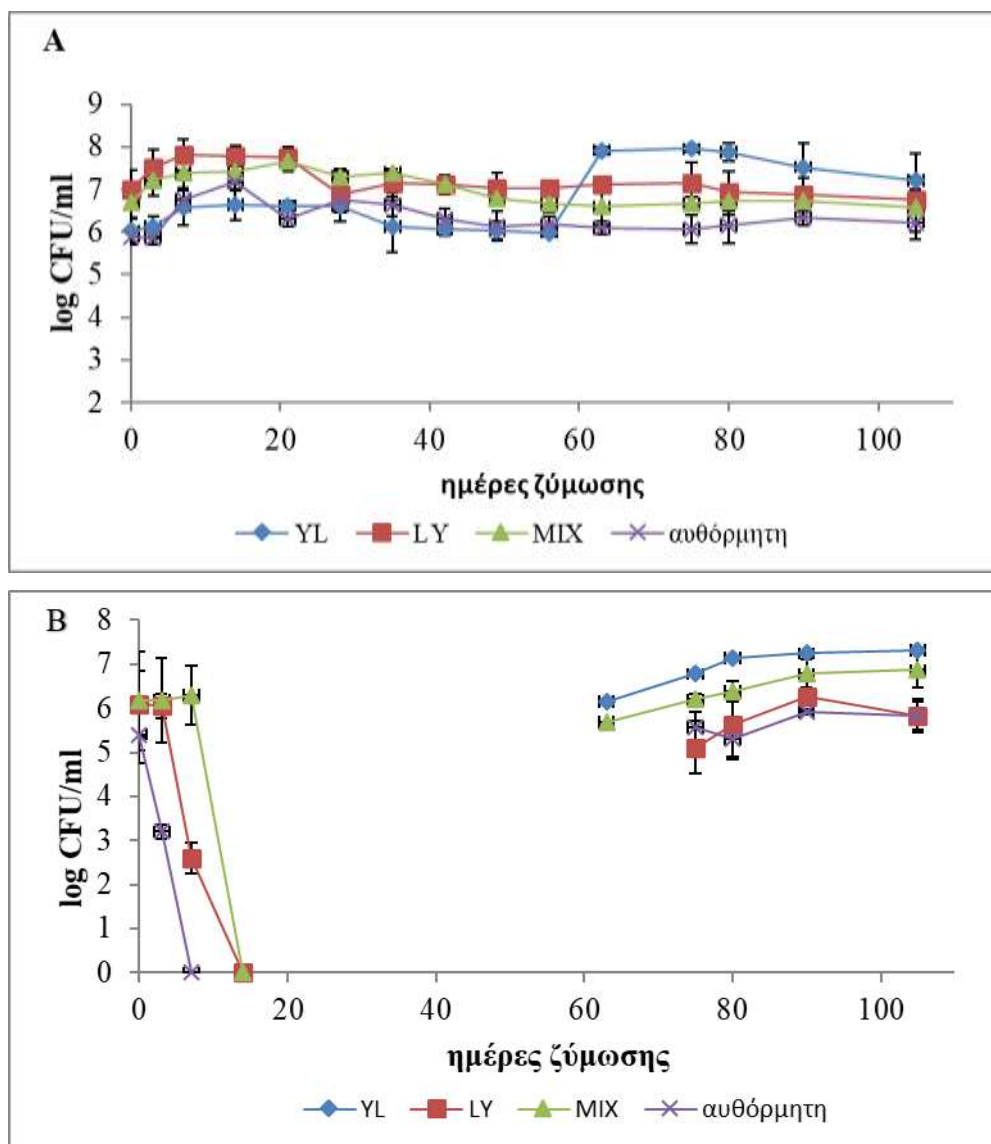
Ο αρχικός πληθυσμός των ζυμομυκήτων στις YL και MIX άλμες οι οποίες εμβολιάστηκαν με τις ζύμες *S. cerevisiae* (Καλαμών) ή *D. hansenii* (Κονσερβολιά) ήταν περίπου 6 log CFU/mL, ενώ παρατηρήθηκε χαμηλότερος αριθμός ζυμομυκήτων (περίπου 4,5 log CFU/mL) στις άλμες LY και Sp (περίπου 4 log CFU/mL). Πρέπει να σημειωθεί ότι η προσθήκη *S. cerevisiae* είτε μεμονωμένα είτε με συν-εμβολιασμό με τον *L. mesenteroides* είχε ως αποτέλεσμα να διατηρηθεί ο πληθυσμός στα 10⁶ CFU/mL κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της ζύμωσης για τις ελιές Καλαμών, ενώ στην Κονσερβολιά παρατηρήθηκε μια διαφορά στον πληθυσμό των ζυμών της τάξης 0,5 ή 1 λογαριθμικής μονάδας, όταν ο *D. hansenii* προστέθηκε μεμονωμένα ή συν-εμβολιάστηκε.

Τα βακτήρια γαλακτικού οξέος (LAB) δεν ήταν ανιχνεύσιμα καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης των ελιών Καλαμών. Συγκεκριμένα, κατά την αυθόρμητη ζύμωση, τα LAB ήταν ανιχνεύσιμα κατά τις πρώτες 3 ημέρες, φτάνοντας σε πληθυσμό τα 5,4 log CFU/mL. Με την προσθήκη του στελεχούς *L. mesenteroides*, είτε μεμονωμένα είτε ως μικτή καλλιέργεια με τον *S. cerevisiae*, ο αρχικός πληθυσμός βακτηρίων ήταν περίπου 6 log CFU/mL, όπως αναμενόταν, αλλά και στις δύο περιπτώσεις, ήταν μόνο ανιχνεύσιμα την πρώτη εβδομάδα της ζύμωσης. Οι φαινολικές ενώσεις και η περιεκτικότητά τους στην άλμη μαζί με την υψηλή συγκέντρωση αλατιού μπορεί να επηρεάσει ή ακόμη και να αναστείλει την ανάπτυξη του LAB κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (Tassou et al., 2002). Ωστόσο, η συνύπαρξη των στελεχών *L. mesenteroides* και *S. cerevisiae* (MIX) είχε ως αποτέλεσμα να διατηρήσει σταθερό τον πληθυσμό των LAB κατά την πρώτη εβδομάδα σε αντίθεση

με τη μονή καλλιέργεια του *L. mesenteroides*, η προσθήκη του οποίου οδήγησε στο να διατηρηθεί ο πληθυσμός των LAB σταθερός μόνο για τις 3 πρώτες μέρες στη ζύμωση της ποικιλίας Καλαμών.



Σχήμα 4.2.1: Μεταβολή του πληθυσμού των ζυμών που καταμετρήθηκαν στην άλμη κατά τη διάρκεια καθοδηγούμενων και αυθόρμητων ζυμώσεων των ποικιλιών Κονσερβολιά (A) και Καλαμών (B). LY: διαδοχικός εμβολιασμός με βακτήριο και μετά ζύμη, YL: διαδοχικός εμβολιασμός με ζύμη και μετά βακτήριο, MIX: ταυτόχρονος εμβολιασμός με ζύμη και βακτήριο.



Σχήμα 4.2.2: Μεταβολή του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων που καταμετρήθηκαν στην άλμη κατά τη διάρκεια καθοδηγούμενων και αυθόρμητων ζυμώσεων των ποικιλιών Κονσερβολιά (Α) και Καλαμών (Β). LY: διαδοχικός εμβολιασμός με βακτήριο και μετά ζύμη, YL: διαδοχικός εμβολιασμός με ζύμη και μετά βακτήριο, MIX: ταυτόχρονος εμβολιασμός με ζύμη και βακτήριο.

Αρκετοί συγγραφείς έχουν αποδείξει πειραματικά ότι η ανάπτυξη των LAB ευνοείται από την παρουσία ορισμένων ζυμών, όπως ο *S. cerevisiae* και ο *D. Hansenii* (Abbas, 2006; Segovia Bravo et al., 2007; Tsapatsaris & Kotzekidou, 2004). Αποικίες των LAB ανιχνεύθηκαν ξανά μετά από 75 ημέρες για τις επεξεργασίες Sp και LY, ενώ μετά από 63 ημέρες επεξεργασίας για τις μεταχειρίσεις MIX και YL. Στην επιτραπέζια ελιά Κονσερβολιά, τα δείγματα άλμης που προερχόταν από τις μεταχειρίσεις MIX και LY παρουσίασαν μια τάση στον πληθυσμό των LAB

παρόμοια με αυτή της αυθόρμητης ζύμωσης, αν και ο πληθυσμός ήταν ελαφρώς υψηλότερος στις καθοδηγούμενες παρά στην αυθόρμητη ζύμωση. Τέλος, η μεταχείριση YL έδειξε τάση παρόμοια με αυτή της αυθόρμητης ζύμωσης μέχρι την 56^η ημέρα και στη συνέχεια καταγράφηκε μια σημαντική αύξηση στον πληθυσμό των LAB από 6 σε 8 log CFU/mL. Η ημέρα 56 της ζύμωσης αντιστοιχεί στο χρονικό σημείο όπου η δραστηριότητα των ζυμών αρχίζει να μειώνεται, ευνοώντας την ανάπτυξη των LAB.

Ανάπτυξη των *Enterobacteriaceae* δεν παρατηρήθηκε στις άλμες κατά τη διάρκεια όλων των αυθόρμητων και καθοδηγούμενων διαδικασιών ζύμωσης.

Τα ποσοστά επιβίωσης των εκκινητών (ζυμών και βακτηρίων), που χρησιμοποιήθηκαν, καθ' όλη τη διάρκεια των ζυμώνσεων παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.2.1. Για τα δείγματα Καλαμών, το στέλεχος ζύμης KI 30–16 την ημέρα 63 (που αντιστοιχεί στο τέλος της δράσης των ζυμών) κατάφερε να επιζήσει σε ποσοστό που κυμαίνεται μεταξύ 60 % και 70 % του συνολικού πληθυσμού των ζυμομυκήτων και ήταν ανιχνεύσιμο μέχρι το τέλος της επεξεργασίας για τις μεταχειρίσεις MIX και YL, ενώ κυριάρχησε με ποσοστό 100 % στο δείγμα LY (105^η ημέρα). Το βακτηριακό στέλεχος KT5-1 ανιχνεύθηκε σε ποσοστό που κυμαίνεται από 70 % έως 100 % την 7^η ημέρα για τις μεταχειρίσεις MIX και LY, έκτοτε η παρουσία του δεν ήταν ανιχνεύσιμη μέχρι την 63^η ημέρα, όπου ανακτήθηκε σε ποσοστό 50 % στα δείγματα MIX και σε ποσοστό 20 % στο δείγμα LY.

Όσον αφορά στην αυθόρμητη ζύμωση της ποικιλίας Καλαμών, κατά τη χρονική διάρκεια μεταξύ 7^{ης} και 63^{ης} ημέρας, η ανάπτυξη του LAB πιθανώς αναστέλλεται λόγω της παρουσίας υψηλής συγκέντρωσης φαινολικών ενώσεων. Στο τέλος της ζύμωσης, το βακτηριακό στέλεχος KT5-1 εντοπίστηκε σε ποσοστό 40 % και 10 % στα δείγματα MIX και LY, αντίστοιχα. Τέλος, στο δείγμα YL, αυτό το στέλεχος ανιχνεύτηκε σε ποσοστό 50 % στο τέλος της ζύμωσης.

Στην ποικιλία Κονσερβολιά, το βακτηριακό στέλεχος A 135–5 έδειξε ποσοστό επιβίωσης 50 % και 70 % κατά τις πρώτες 28 ημέρες της ζύμωσης με τις μεταχειρίσεις MIX και LY, αντίστοιχα, ενώ το ποσοστό αυτό μειώθηκε στο 30 % και 40 % σε όλα τα δείγματα στο τέλος της επεξεργασίας. Η παρουσία της ζύμης A 15–44 επιβεβαιώθηκε καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης στα δείγματα MIX και YL, επικρατώντας μέχρι την 63^η ημέρα στο δείγμα MIX και έως την 28^η ημέρα στο δείγμα YL. Αυτό το στέλεχος κατάφερε να επιβιώσει κατά την επεξεργασία στο δείγμα LY, διατηρώντας την παρουσία του σε ποσοστό 50 % μέχρι το τέλος της ζύμωσης.

Πίνακας 4.2.1: Ανάκτηση των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια των ζυμώσεων χρησιμοποιώντας τρεις διαφορετικές στρατηγικές εμβολιασμού (δ.α=δεν ανιχνεύτηκε).

Μέθοδος εμβολιασμού	Ημέρες ζύμωσης	Καλαμών		Κονσερβολιά	
		Ανάκτηση του στελέχους <i>Lc. mesenteroides</i> KT5-1 (%)	Ανάκτηση του στελέχους <i>S. cerevisiae</i> KI 30–16 (%)	Ανάκτηση του στελέχους <i>L. plantarum</i> A 135–5 (%)	Ανάκτηση του στελέχους <i>D. hansenii</i> A 15–44 (%)
MIX	7	70	80	70	70
	28	60	80	50	80
	63	50	60	30	50
	105	40	50	30	30
LY	7	100	δ.α	100	δ.α
	28	δ.α	δ.α	70	δ.α
	63	20	δ.α	40	δ.α
	105	10	100	40	50
YL	7	δ.α	70	δ.α	70
	28	δ.α	100	δ.α	60
	63	δ.α	70	δ.α	40
	105	50	40	40	30

Ο βαθμός ανάκτησης των LAB και των ζυμών στο τέλος της ζύμωσης και για τις τρεις διαφορετικές στρατηγικές εμβολιασμού δεν επαρκούσε για να διαπιστωθεί εάν ήταν σε θέση να κυριαρχήσουν κατά τη διάρκεια όλης της επεξεργασίας έναντι του υπόλοιπου μικροβιακού πληθυσμού. Ωστόσο, η παρουσία τους μπορεί να επιβεβαιωθεί από άλλες μελέτες για την ποικιλία Κονσερβολιά (Grounta et al., 2016)) ή για άλλες επιτραπέζιες ποικιλίες που παράγονται με την ελληνική μέθοδο (De Angelis et al., 2015; Randazzo et al., 2017). Οι εν λόγω, συγγραφείς απέδειξαν ότι η χρήση καλλιεργειών εκκίνησης μπορεί να προκαλέσει αξιοσημείωτες μεταβολές στη μικροχλωρίδα της άλμης από την αρχή της διαδικασίας της ζύμωσης, απλοποιώντας σημαντικά τη μικροβιακή ποικιλομορφία στην άλμη. Η αδυναμία των επιλεγμένων στελεχών να κυριαρχήσουν πλήρως στη διαδικασία, μπορεί να αποδοθεί στον ανταγωνισμό με τον ήδη εγκατεστημένο πληθυσμό των LAB και των ζυμών.

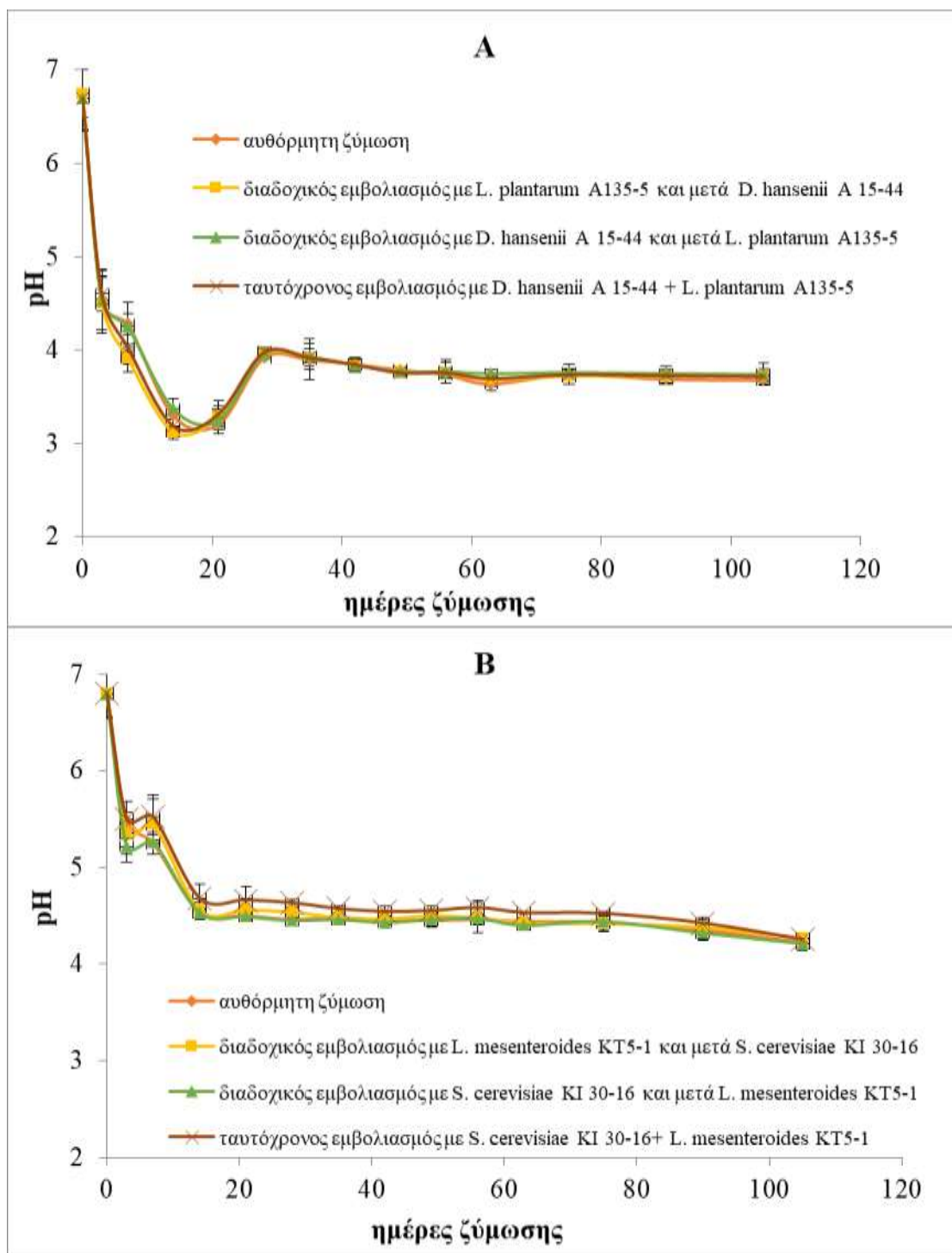
Επιπλέον, το διαφορετικό αρχικό μικροβιακό φορτίο στις ελιές Κονσερβολιά και Καλαμών που παρατηρήθηκε σε αυτή την εργασία, σε σύγκριση με τα αποτελέσματα που ελήφθησαν σε άλλες μελέτες (Tufariello et al., 2015; Grounta et al., 2016) αποκάλυψε πως η πρώτη ύλη (ελιές) και οι διαδικασίες προεπεξεργασίας που εφαρμόζονται πριν από τη διαδικασία της ζύμωσης, μπορεί να επηρεάσει

σημαντικά την επικράτηση των καλλιεργειών εκκίνησης και τον έλεγχο της διαδικασίας.

Μεγάλο εύρος θερμοκρασιών κατά τη διαδικασία της ζύμωσης (12–21 °C) μπορεί να προκαλέσει παρατεταμένες λογαριθμικές φάσεις ή κόλλημα της ζύμωσης (stuck fermentation), με αποτέλεσμα την απώλεια προϊόντος ή την ανάπτυξη ανεπιθύμητων μικροοργανισμών ιδιαίτερα στην αυθόρμητη διαδικασία ζύμωσης. Ακόμα και αν αυτές οι συνθήκες περιορίζουν την ανάπτυξη και τον μεταβολισμό των επιλεγμένων ζυμών και LAB, η χρήση των τελευταίων μπορεί να βοηθήσει στον έλεγχο της ζύμωσης, μειώνοντας την ανάπτυξη μικροοργανισμών που προκαλούν αλλοίωση και ως εκ τούτου συμβάλλουν στη βελτίωση της ποιότητας και των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του τελικού προϊόντος.

4.2.2 Φυσικοχημικές αναλύσεις σε άλμη κατά τη διάρκεια της ζύμωσης της ελιάς

Τα Σχήματα 4.2.3 και 4.2.4 απεικονίζουν τις αλλαγές στο pH και την ογκομετρούμενη οξύτητα κατά τη διάρκεια της ζύμωσης των επιτραπέζιων ποικιλιών ελιάς, Καλαμών και Κονσερβολιά, που πραγματοποιήθηκε με τέσσερις διαφορετικές μεταχειρίσεις. Οι τιμές pH που φαίνονται στο Σχήμα 4.3.3 είναι πολύ κοντά για όλες τις μεταχειρίσεις που εφαρμόστηκαν. Συγκεκριμένα, οι διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων μειώθηκαν ($p < 0,05$) μετά τις 14 ημέρες ζύμωσης. Παρόμοια συμπεριφορά έχει αναφερθεί σε άλλες ερευνητικές εργασίες (Sánchez Gómez et al., 2006; Panagou et al., 2008). Η αρχική τιμή pH σε όλα τα δείγματα άλμης ήταν περίπου 6,8, φθάνοντας σε τιμές που κυμάνθηκαν από 4,21 έως 4,27 για την Καλαμών, και από 3,68 έως 3,74 για την Κονσερβολιά μετά από 105 ημέρες ζύμωσης. Γενικότερα, το pH μειώθηκε γρήγορα λαμβάνοντας τιμές κάτω από 4,5 εντός 7 ημερών για όλες τις μεταχειρίσεις, αποτρέποντας έτσι την ανάπτυξη μικροοργανισμών που προκαλούν αλλοίωση (Lanza, 2013).

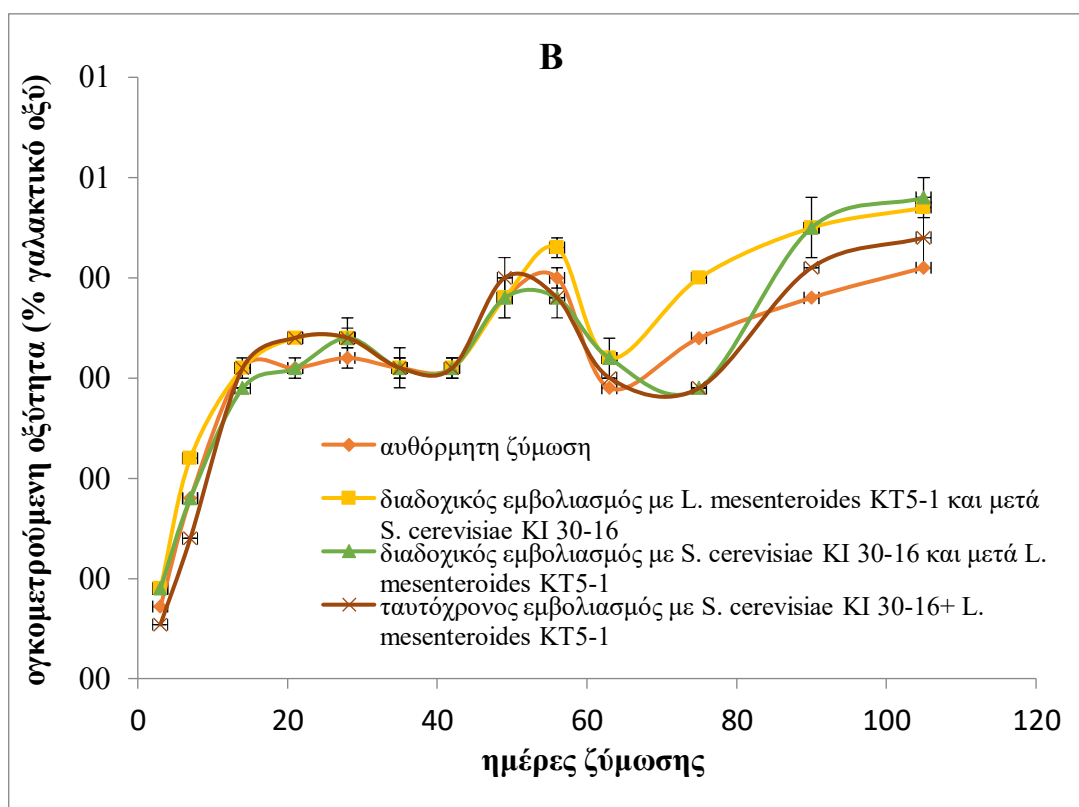
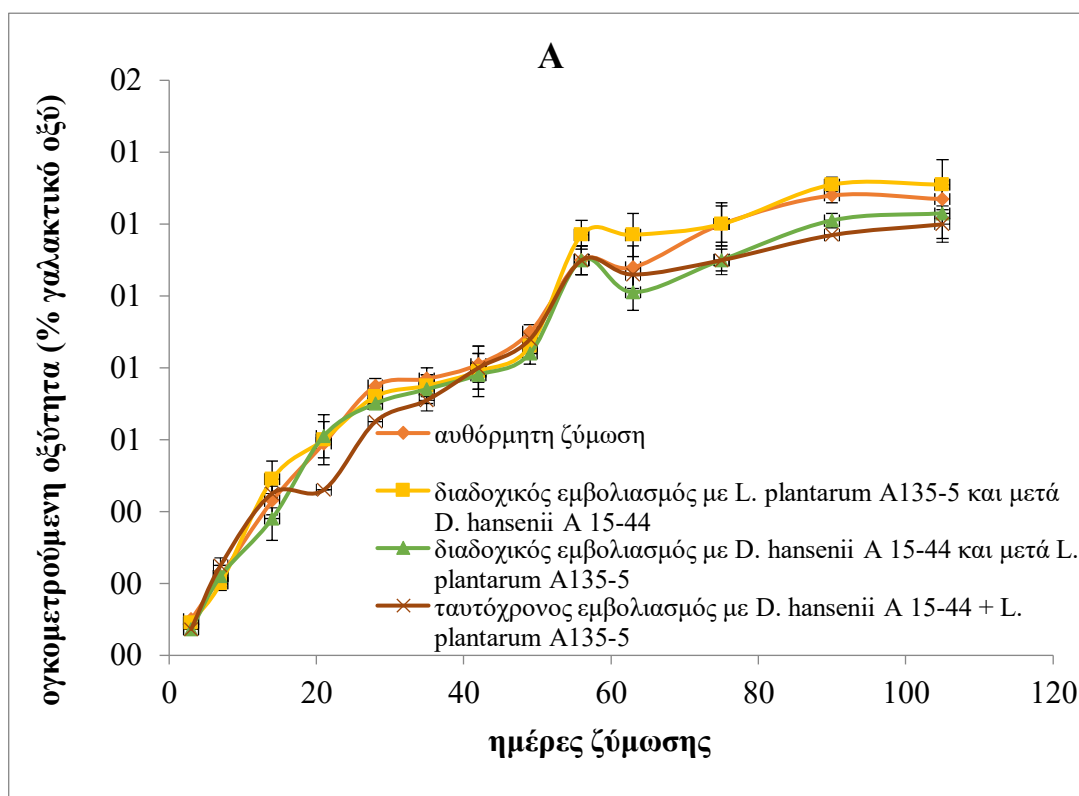


Σχήμα 4.2.3: Μεταβολές στο pH της άλμης κατά τη ζύμωση των ποικιλιών Κονσερβολιά (A) και Καλαμών (B): (◇) αυθόρμητη διαδικασία, (□) διαδοχικός εμβολιασμός με LAB ακολουθούμενος από εμβολιασμό (την 70^η ημέρα) με ζυμομύκητα, (Δ) διαδοχικός εμβολιασμός με ζυμομύκητα ακολουθούμενος από εμβολιασμό (70^η ημέρα) με LAB, (×) συν-εμβολιασμός με μικτή καλλιέργεια ζυμομυκήτα και LAB.

Η ογκομετρούμενη οξύτητα (Σχήμα 4.2.4) κυμάνθηκε από 1,17 έως 1,31 (% γαλακτικό οξύ) και από 0,41 έως 0,48, για την Κονσερβολιά και την Καλαμών, αντίστοιχα. Αρχικά, καταγράφηκε συνεχής αύξηση κατά τις πρώτες 56 ημέρες της ζύμωσης στην άλμη όλων των δειγμάτων και για τις δύο ποικιλίες, με μικρές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων. Οι διαφορές αυξήθηκαν μετά από 75 και 63 ημέρες ζύμωσης για την Καλαμών και την Κονσερβολιά, αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, ωφέλιμος αποδείχτηκε ο διαδοχικός εμβολιασμός με τον ζυμομύκητα (μεταχείριση LY) και για τις δύο ποικιλίες. Ωστόσο, μεγαλύτερη αύξηση καταγράφηκε στην Καλαμών εντός 12 ημερών μετά το διαδοχικό εμβολιασμό με *S. cerevisiae* KI 30–16 σε σύγκριση με την Κονσερβολιά. Αν και στο τέλος της ζύμωσης, τα δείγματα των εμβολιασμένων δοχείων, παρουσίασαν μικρή διαφορά ή καμία διαφορά σε ογκομετρούμενη οξύτητα και pH, αυτό το εύρημα δεν είναι σημαντικό από πρακτική άποψη. Οι συνθήκες που επικρατούν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (π.χ. θερμοκρασία 12–21 °C, συγκέντρωση αλατιού κάτω από 80 g/L) πιθανώς ευνόησε την ταχεία έναρξη της γαλακτικής ζύμωσης στα τυφλά δείγματα άλμης (μη εμβολιασμένα δείγματα), μειώνοντας έτσι τα οφέλη των καλλιιεργειών εκκίνησης. Επιπλέον, παρότι τα LAB δεν ήταν ανιχνεύσιμα σε όλη τη διάρκεια της ζύμωσης στις άλμες των ελιών Καλαμών, ώστε να συμβάλλουν στη μείωση του pH, άλλα φαινόμενα, όπως η διάχυση ορισμένων φαινολικών οξέων, η υδρόλυση της ελευρωπαΐνης με επακόλουθη παραγωγή ελενολικού οξέος, καθώς και το παραγόμενο οξικό οξύ, ενδέχεται να συνέβαλαν στη μείωση του pH και στην αύξηση της ογκομετρούμενης οξύτητας (Kiai and Hafidi, 2014).

Τέλος, η αρχική συγκέντρωση NaCl (80 g/L NaCl) μεταβλήθηκε, φτάνοντας στο τέλος της διαδικασίας τιμές που κυμάνθηκαν στα 67-68 g/L για την Καλαμών και στα 71-73 g/L για την Κονσερβολιά.

Τόσο στην άλμη Κονσερβολιάς όσο και στην Καλαμών, η γλυκόζη και η φρουκτόζη αυξήθηκαν μέχρι την 63^η ημέρα και στη συνέχεια καταναλώθηκαν εντελώς μέχρι το τέλος της διαδικασίας (Πίνακας 4.2.2). Το γεγονός αυτό, και συνάμα η μείωση του pH και η αύξηση της ογκομετρούμενης οξύτητας, επιβεβαιώνουν την εξέλιξη της πορείας της ζύμωσης.



Σχήμα 4.2.4: Μεταβολές στην οξύτητα της άλμης κατά τη ζύμωση των ποικιλιών Κονσερβολιά (A) και Καλαμών (B): (Δ) αυθόρμητη διαδικασία, (□) διαδοχικός εμβολιασμός με LAB ακολουθούμενος από εμβολιασμό (την 70^η ημέρα) με ζυμομύκητα, (Δ) διαδοχικός εμβολιασμός με ζυμομύκητα ακολουθούμενος από

εμβολιασμό (70^η ημέρα) με LAB, (×) συν-εμβολιασμός με μικτή καλλιέργεια ζυμομυκήτα και LAB.

Πίνακας 4.2.2: Μεταβολές γλυκόζης και φρουκτόζης κατά τη διάρκεια αυθόρμητης (S) ζύμωσης και ελεγχόμενων ζυμώσεων των ποικιλιών Καλαμών και Κονσερβολιά.

		Ημέρες ζύμωσης	Μεταχειρίσεις			
			S	YL	LY	MIX
Καλαμών	Γλυκόζη (g/L)	0	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α
		63	4,70±0,02 ^d	4,25±0,02 ^c	3,38±0,01 ^b	3,09±0,01 ^a
		90	0,23±0,02 ^c	0,21±0,03 ^c	0,11±0,02 ^b	0,05±0,01 ^a
		120	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α
	Φρουκτόζη (g/L)	0	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α
		63	2,15±0,03 ^b	2,09±0,01 ^a	2,12±0,01 ^b	2,08±0,01 ^a
		90	0,14±0,01 ^c	0,12±0,01 ^b	0,15±0,01 ^c	0,04±0,01 ^a
		120	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α
	Γλυκόζη(g/L)	0	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α
		63	2,60±0,04 ^c	2,70±0,02 ^d	2,10±0,02 ^b	1,80±0,02 ^a
		90	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α
		120	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α
Κονσερβολιά	Φρουκτόζη (g/L)	0	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α
		63	4,80±0,05 ^d	4,40±0,03 ^c	3,90±0,02 ^a	4,00±0,03 ^b
		90	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α
		120	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α

Τα δεδομένα παρουσιάζουν τη συγκέντρωση (g/L) ± τυπική απόκλιση. Η συγκέντρωση εκφράζεται ως ο μέσος όρος 3 επαναλήψεων.

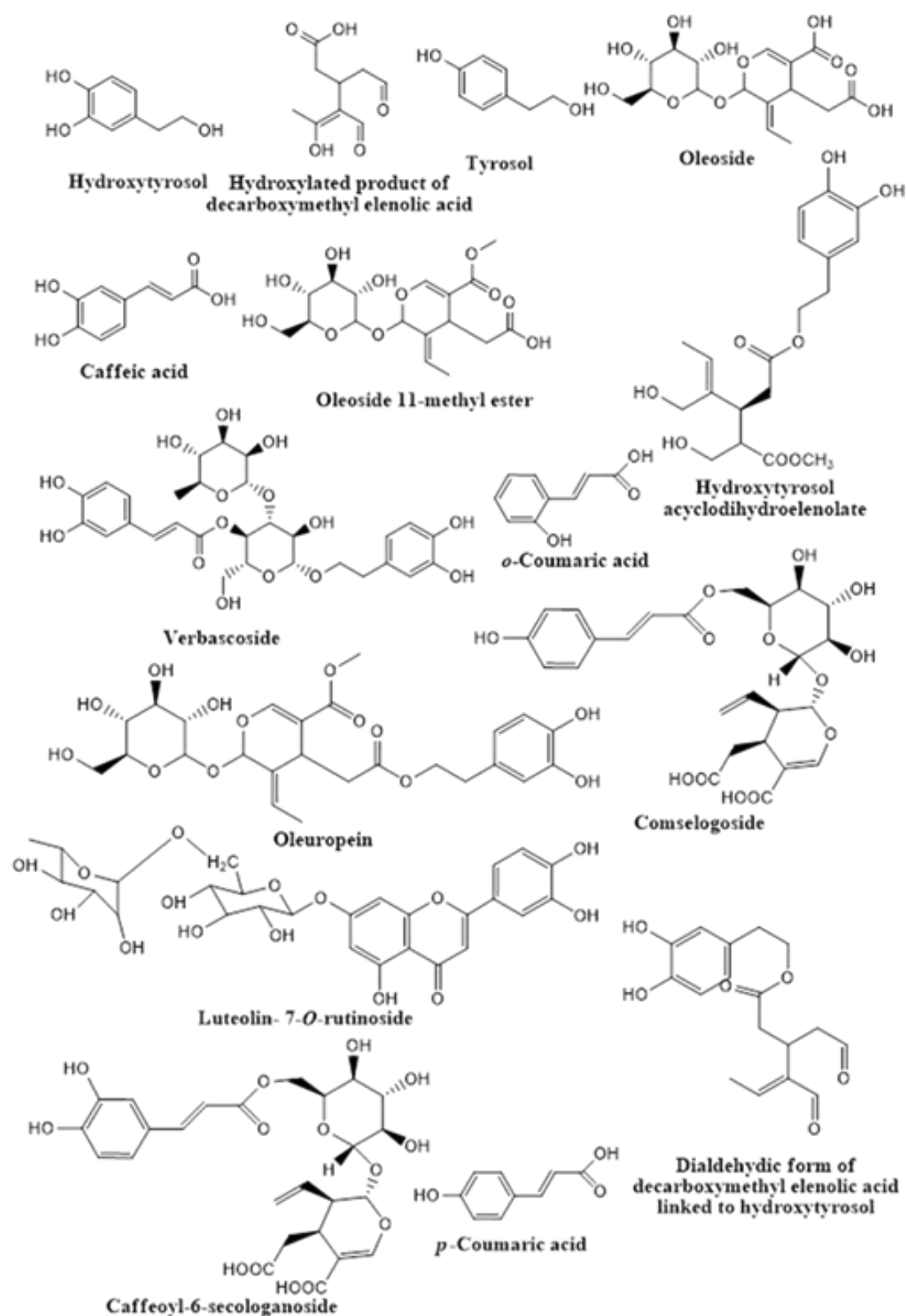
δ.α= δεν ανιχνεύτηκε

4.2.3 Μελέτη των φαινολικών συστατικών στη άλμη

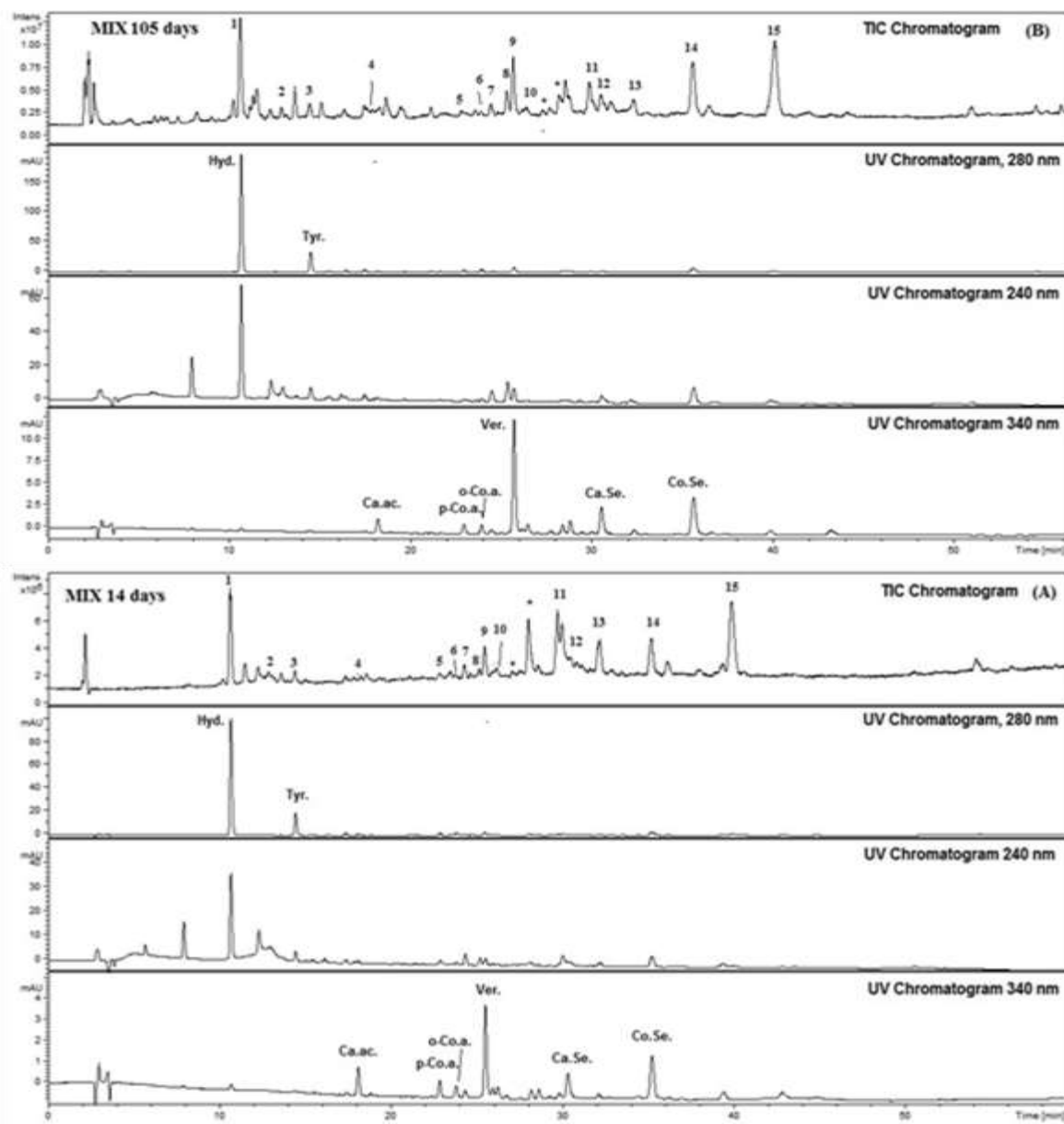
Η ανάλυση των φαινολικών ενώσεων, που βρίσκονται στις άλμες των δυο μελετούμενων ποικιλιών, πραγματοποιήθηκε με LC/DAD/ESI-MSⁿ, μετά από 14, 63 και 105 ημέρες ζύμωσης και διαπιστώθηκε ότι ανήκουν στις ακόλουθες κατηγορίες: σεκοϊριδοειδή και τα παράγωγά τους, φαινολικές αλκοόλες, φαινολικά οξέα και τα παράγωγά τους, καθώς και φλαβονοειδή. Οι χημικές δομές τους δίνονται στο Σχήμα 4.2.5. Η ταυτοποίηση βασίστηκε στην ακριβή μέτρηση μάζας των ψευδομοριακών ιόντων [M-H]⁻ και των θραυσμάτων τους, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία. Στο Σχήμα 4.2.6, παρουσιάζεται το συνολικό φάσμα μαζών (Total Ion Current-TIC chromatogram) και το χρωματογραφικό προφίλ στα 280, 240 και 340 nm

αντιπροσωπευτικού δείγματος άλμης Καλαμών. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, μελετήθηκαν οι ποιοτικές μεταβολές των φαινολικών ενώσεων. Οι κορυφές που αντιστοιχούν στις ενώσεις: υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη, ελευρωπαΐνη, βερμπασκοζίτη, καφεϊκό οξύ και π-κουμαρικό οξύ ταυτοποιήθηκαν με απευθείας σύγκριση των χρόνων κατακράτησης τους και των φασμάτων τους με πρότυπες ενώσεις, καθώς επίσης και με τα φάσματα MS, MS² και MS³. Στο Σχήμα 4.2.7 παρουσιάζονται τα φάσματα MS και τα θραύσματα MS² και MS³ των κύριων ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στα δείγματα.

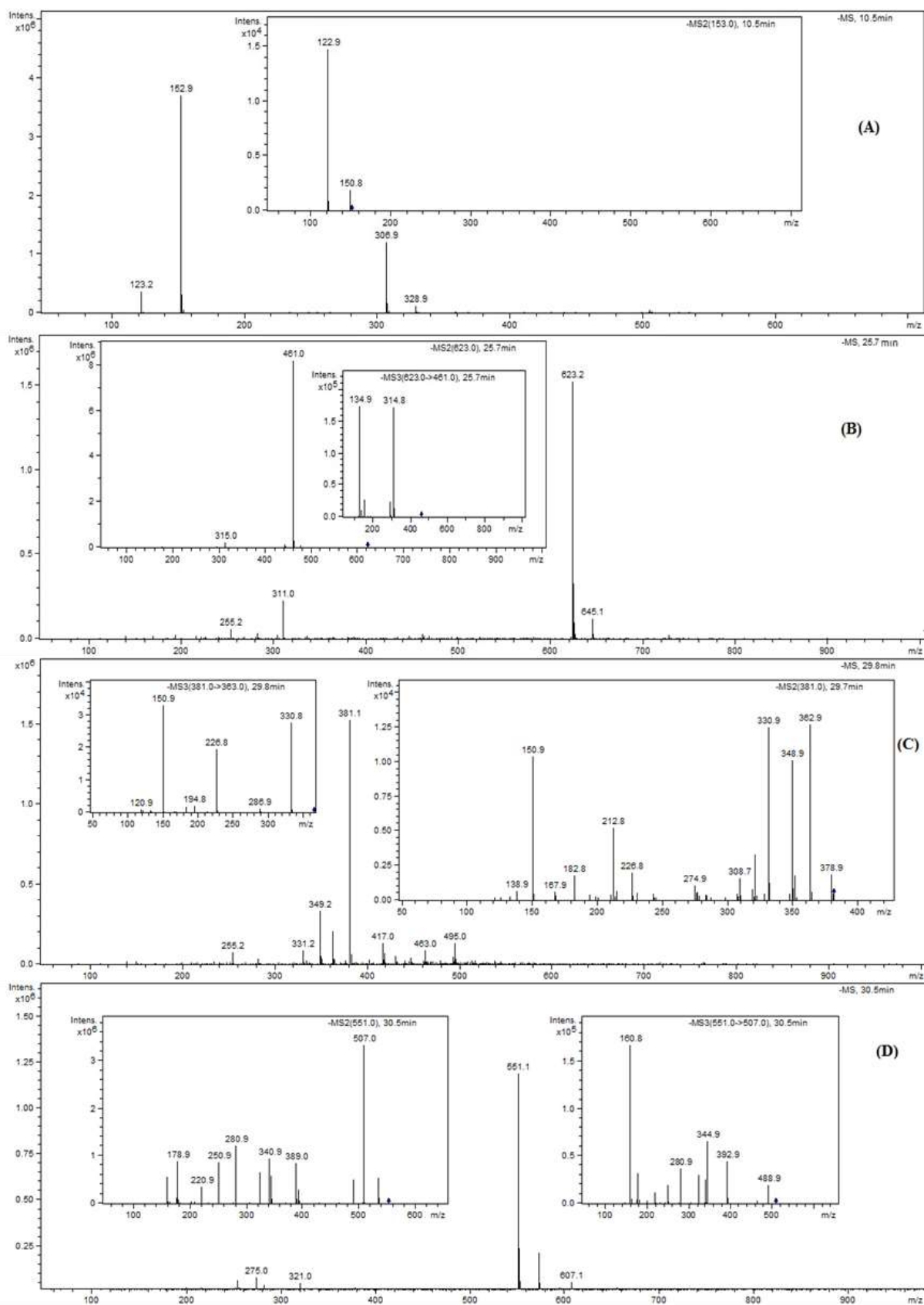
Διαφορές παρατηρήθηκαν όχι μόνο ως προς την κάθε ποικιλία που μελετήθηκε αλλά και ως προς τη στρατηγική εμβολιασμού που εφαρμόστηκε. Συγκεκριμένα, στις άλμες Κονσερβολιάς, η παρουσία του ολεοζίτη καταγράφηκε μόνο σε άλμη MIX και LY μετά από 14 και 63 ημέρες ζύμωσης, αντίστοιχα. Η ένωση που εκλούστηκε στα 17,7 min στα δείγματα άλμης Κονσερβολιάς, που στη βιβλιογραφία αναφέρεται ως ολεοζίτης-11-μεθυλεστέρας (γλυκοζίτης του ελενολικού οξέος) (Peralbo-Molina et al., 2012), ταυτοποιήθηκε σε όλα τα δείγματα της συγκεκριμένης ποικιλίας και σε όλες μεταχειρίσεις μετά από 14 ημέρες ζύμωσης και ήταν ανιχνεύσιμη μόνο στο άλμη LY μέχρι την ημέρα 63 της ζύμωσης. Ο ολεοζίτης, το υδροξυλιωμένο προϊόν του αποκαρβοξυμεθυλ ελενολικού οξέος, η ακυκλοδιϋδροελενολική υδροξυτυροσόλη, ο καφεοϋλο-6-σεκολογανοζίτης και ο 6'-ρ-κουμαροϋλ σεκολογανοζίτης (κομσελογοζίτης) ταυτοποιήθηκαν στα απόβλητα ελαιοτριβείων σε παλιότερη έρευνα, όπου δίνονται τα θραύσματα αυτών των ενώσεων (D'Antuono et al., 2014). Επιπλέον, ο καφεοϋλο-6-σεκολογανοζίτης, ο κομσελογοζίτης και η διαλδεϋδική μορφή του αποκαρβοξυμεθυλ ελενολικού οξέος που συνδέεται με υδροξυτυροσόλη (DiaDe) βρέθηκαν στις άλμες Καλαμών καθόλη τη διάρκεια της ζύμωσης ανεξάρτητα από τη μέθοδο εμβολιασμού. Συνολικά ταυτοποιήθηκαν δέκα φαινολικές ενώσεις στα δείγματα άλμης Κονσερβολιάς και δεκαπέντε φαινολικές ενώσεις στα δείγματα άλμης Καλαμών (Πίνακας 4.2.3). Τέλος, η ακυκλοδιϋδροελενολική υδροξυτυροσόλη, η οποία σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, δεν έχει περιγραφεί προηγουμένως σε άλμη επιτραπέζιων ελιών, ανιχνεύτηκε και στις δυο μελετούμενες ποικιλίες.

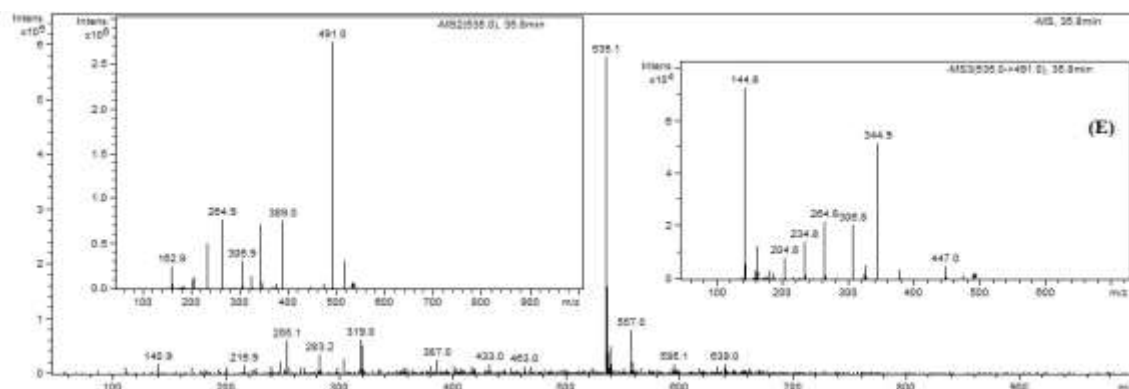


Σχήμα 4.2.5: Χημικές δομές των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν σε δείγματα άλμης ελιάς.



Σχήμα 4.2.6: SM1: συνολικό φάσμα μαζών και χρωματογραφήματα UV στα 280, 240 και 340 nm δείγματος άλμης Καλαμών διαχείρισης MIX μετά από (A) 14 (αραίωση 1:2) και (B) 105 μέρες ζύμωσης (αραίωση 1:10). Οι κυριότερες ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν: 1: υδροξυτυροσώλη, 2: υδροξυλιωμένο προϊόν του αποκαρβοξυμεθυλ ελενολικού οξέος 3: τυροσώλη, 4: καφεϊκό οξύ, 5: p-κουμαρικό οξύ, 6: o-κουμαρικό οξύ, 7 & 8: παράγωγα ελενολικού οξέος, 9: βερμπασκοζίτης, 10: ρουτινοζίτης της λουτεολίνης, 11: ακυκλοδιϋδροελενολική υδροξυτυροσώλη, 12: καφεοϋλο-6-σεκολογανοζίτης, 13: ελευρωπαίνη, 14: κομσελογοζίτης, 15: διαλδεϋδική μορφή του αποκαρβοξυμεθυλ ελενολικού οξέος που συνδέεται με υδροξυτυροσώλη





Σχήμα 4.2.7: SM2: Φάσμα MS των κυριότερων ενώσεων και των θραυσμάτων τους MS² και MS³ (A: υδροξυτυροσόλη, B: βερμπασκοζίτης, C: ακυκλοδιϋδροελενολική υδροξυτυροσόλη, D: καφεούλο-6-σεκολογανοζίτης και E: κομσελογοζίτης).

Με χρόνους κατακράτησης 24.1 και 25.0 min, εκλούστηκαν δύο ενώσεις των οποίων τα φάσματα ESI-MS χαρακτηρίστηκαν από μια ισχυρή φασματική γραμμή με m/z 243. Αυτές οι ενώσεις προσδιορίστηκαν αρχικά ως παράγωγα ελενολικού οξέος, δεδομένου ότι αυτές οι ενώσεις μπορούν να ανιχνευτούν μόνο στα 240 nm στην ανάλυση με HPLC–UV. Η κορυφή στα 26.5 min υποδεικνύει την παρουσία του 7-ρουτινοζίτη της λουτεολίνης, που είχε ανιχνευθεί προηγουμένως σε εκχυλίσματα φύλλων ελιάς (Kontogianni et al., 2013). Ακολουθώντας, με χρόνο κατακράτησης 40.4 min, το πρόδρομο ιόν με m/z 319 συσχετίστηκε με τη διαλδεϋδική μορφή του αποκαρβοξυμεθυλ ελενολικού οξέος συνδεδεμένου με υδροξυτυροσόλη (3,4-DHPEA-EDA).

Η εμφάνιση των παραπάνω ενώσεων σε δείγματα άλμης έχει αναφερθεί από αρκετούς συγγραφείς (Benincasa et al., 2015; Kumral et al., 2013; Medina et al., 2007). Στα δείγματα άλμης εντοπίστηκαν και άλλες, απλές φαινολικές ενώσεις, όπως το βανιλικό οξύ, το φερουλικό οξύ (Durante et al., 2017), το γαλλικό οξύ, το πρωτοκατεχικό οξύ, το p-υδροξυβενζοϊκό οξύ, το συριγγικό οξύ και η βανιλίνη (Benincasa et al., 2015b). Επιπλέον, σε προηγούμενες έρευνες που αφορούν στην άλμη επιτραπέζιων ελιών, έχουν περιγραφεί η υδροξυτυροσόλη και η τυροσόλη, η διαλδεϋδική μορφή του αποκαρβοξυμεθυλο ελενολικού οξέος (EDA) (Kumral et al., 2013; Medina et al., 2007), η σεκοξυλογανίνη και ο σεκολογανοζίτης, τα ισομερή του ολεοζίτη-11-μεθυλεστέρα και ο ολεοζίτης (Medina et al., 2007). Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, ήρθαν και οι Durante et al. (2017) οι οποίοι εντόπισαν υδροξυτυροσόλη και βερμπασκοζίτη στις επιτραπέζιες ελιές Κονσερβολιά

και Καλαμών που υποβλήθηκαν σε ζύμωση με τα ίδια στελέχη, με μια διαδοχική μέθοδο εμβολιασμού. Αν και οι εν λόγω συγγραφείς ανέφεραν επίσης την παρουσία ανιχνεύσιμων συγκεντρώσεων πυροκατεχόλης μόνο στις ελιές Κονσερβολιά, ενώ τυροσόλης και ισοβερβασκοζίτη μόνο στις ελιές Καλαμών, κρίθηκε απαραίτητη μια εκτενέστερη μελέτη για την ταυτοποίηση των φαινολικών ενώσεων που σχετίζονται με την άλμη των επιτραπέζιων ελιών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Η ανάλυση με LC/DAD/ESI-MSⁿ βοήθησε όχι μόνο στην παραπάνω μελέτη αλλά οδήγησε και στη διαφοροποίηση μεταξύ των δύο μελετούμενων ποικιλιών.

Πίνακας 4.2.3: Φαινολικές ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν με HPLC-DAD-MSⁿ στην άλμη κατά τη ζύμωση επιτραπέζιων ελιών Κονσερβολιά και Καλαμών σε διαφορετικά εμβόλια εκκίνησης.

R _t (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	-MS ² [M-H] ⁻ (m/z) (%)	-MS ³ [base peak] ⁻ (m/z) (%)	Ενώσεις	Ποικιλία
10.4	153 (100)	123 (100)	-	Υδροξυτυροσόλη	Ko, Ka
12.9	199 (100)	-	-	Υδροξυλιωμένο προϊόν του αποκαρβοξυμεθυλ ελενολικού οξέος	Ka
14.4	137 (100)	-	-	Τυροσόλη	Ko, Ka
16.3	389 (100)	345 (100), 209 (47), 165 (26)	-	Ολεοζίτης	Ko
17.7	403 (100)			Ολεοζίτης-11-μεθυλεστέρας	Ko
18.1	179 (100)	135 (100)	-	Καφεϊκό οξύ	Ka
22.8	163	119 (100)	-	p-κουμαρικό οξύ	Ka
23.7	163	119 (100)	-	o-κουμαρικό οξύ	Ka
24.1	243 (100), 211(31), 325(35)			Παράγωγα ελενολικού οξέος	Ko, Ka
25.0	243 (100), 485 (58)			Παράγωγα ελενολικού οξέος	Ko, Ka
25.7	623 (100)	461 (100)	135(100), 315(92), 297(16), 161(16)	Βερμπασκοζίτης	Ko, Ka
26.5	593 (100)			Ρουτινοζίτης της λουτεολίνης	Ko, Ka
27.1	543 (100)			Άγνωστη	Ko, Ka
27.9	323 (100)			Άγνωστη	Ko, Ka
29.6	381 (100)	331 (100), 349 (96), 363 (92), 151 (44)	151 (100), 195 (9), 287 (8)	Ακυκλοδιϋδροελενολικ ή υδροξυτυροσόλη	Ko, Ka
30.8	551 (100)			Καφεοϋλο-6-σεκολογανοζίτης	Ka
32.1	539 (100)	275 (100), 307	139 (100), 95	Ελευρωπαΐνη	Ko, Ka

		(95), 377 (68)	(68), 245 (11)		
36.0	535 (100)	507 (100), 281 (36), 179 (26), 389 (25)	161 (100), 345 (44), 393 (25), 281 (20)	Κομσελογοζίτης	Κα
40.4	319 (100), 639(80)	491 (100), 265 (28), 389 (27)	145 (100), 345 (77), 265 (36), 307 (26)	DiaDe*	Κα

DiaDe: η διαλδεϋδική μορφή του αποκαρβοξυμεθυλ ελενολικού οξέος που συνδέεται με υδροξυτυροσόλη

Ko: Κονσερβολία, Κα: Καλαμών

4.2.4 Ποσοτικός προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων στην άλμη

Στον Πίνακα 4.2.4 παρουσιάζονται οι ποσοτικές μεταβολές στη σύσταση του φαινολικού κλάσματος της άλμης λόγω διάχυσης από τον καρπό της ελιάς προς την άλμη. Η υδροξυτυροσόλη ήταν η κύρια απλή φαινολική ένωση που εντοπίστηκε στην άλμη. Σε δείγματα άλμης των ποικιλιών Κονσερβολία και Καλαμών, η συγκέντρωση της υδροξυτυροσόλης αυξανόταν καθ' όλη τη διάρκεια της επεξεργασίας φτάνοντας τα ~330 και 730 mg/L αντίστοιχα έως το τέλος της ζύμωσης (105 ημέρες) αλλά χωρίς στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p>0,05$) μεταξύ των εμβολιασμένων και των μη εμβολιασμένων δειγμάτων. Τα αποτελέσματά της παρούσας διατριβής συμφωνούν με προηγούμενες εργασίες (Benincasa et al., 2015a; Pistarino et al., 2013; Ben Othman et al., 2009) όπου διαπιστώθηκε ότι η υδροξυτυροσόλη ήταν η κύρια απλή φαινολική ένωση σε δείγματα άλμης διαφορετικών ποικιλιών, δείχνοντας μια σταθερή αυξητική τάση κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.

Πίνακας 4.2.4: Φαινολικές ενώσεις στην άλμη κατά την ελεγχόμενη αναερόβια ζύμωση των επιτραπέζιων ελιών Κονσερβολιάς (η κάθε τιμή είναι μέσος όρος $\pm$ SD τριών επαναλήψεων).

Χρόνος (ημέρες)	Μεταχείριση	Φαινολικές ενώσεις (mg/L)										
		HT	TY	CA	CU	VE	Lu-R	HT-ac	OLE	DiaDe	SEC	COM
14	αυθόρμητη	55,97 ±3,17 ^a	6,01 ± 0,34 ^{a, b}	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α	8,53 ±0,48 ^a	11,56 ±0,65 ^a	δ.α	δ.α	δ.α
	MIX	49,73 ±2,81 ^a	4,91 ±0,28 ^a	δ.α	δ.α	2,12 ±0,12 ^a	2,10 ±0,12 ^a	8,53 ±1,45 ^a	21,95 ±1,24 ^b	δ.α	δ.α	δ.α
	LY	51,36 ±2,91 ^a	5,23 ±0,30 ^{a, b}	δ.α	δ.α	2,54 ±0,14 ^b	2,86 ±0,16 ^b	16,75 ±0,95 ^b	23,49 ±1,33 ^b	δ.α	δ.α	δ.α
	YL	54,62 ±3,09 ^a	6,25 ±0,35 ^b	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α	18,05 ±1,02 ^b	24,63 ±1,39 ^b	δ.α	δ.α	δ.α
63	αυθόρμητη	231,58 ±13,10 ^a	28,42 ±1,61 ^a	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α	32,22 ±1,82 ^a	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α
	MIX	202,56 ±11,46 ^a	24,75 ±1,40 ^a	δ.α	δ.α	δ.α	2,34 ±0,13 ^a	35,87 ±2,03 ^a	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α
	LY	215,42 ±12,19 ^a	24,38 ±1,38 ^a	δ.α	δ.α	δ.α	3,05 ±0,17 ^b	39.51 ±224 ^a	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α
	YL	225,70 ±12,77 ^a	28,05 ±1,59 ^a	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α	40,43 ±2,29 ^a	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α
105	αυθόρμητη	308,73 ±17,46 ^a	35,77 ±2,02 ^a	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α	22,20 ±1,26 ^a	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α
	MIX	276,03 ±15,61 ^a	32,46 ±1,84 ^a	δ.α	δ.α	δ.α	3,28 ±0,19 ^a	18,55 ±1,05 ^a	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α
	LY	296,24 ±16,76 ^a	33,56 ±1,90 ^a	δ.α	δ.α	3,17 ±0,18 ^a	3,52 ±0,20 ^a	22,20 ±1,26 ^a	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α
	YL	331,51 ±13,09 ^a	38,71 ±1,35 ^b	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α	20,38 ±1,02 ^b	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α

(συνεχίζεται) Φαινολικές ενώσεις στην άλμη κατά την ελεγχόμενη ζύμωση των επιτραπέζιων ελιών Καλαμών (η κάθε τιμή είναι μέσος όρος $\pm$ SD τριών επαναλήψεων).

Χρόνος (ημέρες)	Μεταχείριση	Φαινολικές ενώσεις (mg/L)										
		HT	TY	CA	CU	VE	Lu-R	HT-ac	OLE	DiaDe	SEC	COM
14	αυθόρμητη	79.34 $\pm 4.49^a$	14.75 $\pm 0.83^a$	2.75 $\pm 0.60^a$	4.44 $\pm 0.13^a$	3.46 $\pm 0.20^{a,b}$	1.06 $\pm 0.06^a$	2.70 $\pm 0.15^b$	5.74 $\pm 0.32^b$	14.48 $\pm 0.82^b$	8.54 $\pm 0.48^a$	9.32 $\pm 0.53^a$
	MIX	65.38 $\pm 3.70^a$	13.28 $\pm 0.75^a$	2.62 $\pm 0.15^a$	4.41 $\pm 0.25^b$	3.17 $\pm 0.18^a$	1.15 $\pm 0.07^a$	1.61 $\pm 0.09^a$	8.65 $\pm 0.49^a$	7.34 $\pm 0.42^a$	8.34 $\pm 0.47^a$	9.51 $\pm 0.54^a$
	LY	75.36 $\pm 4.26^a$	14.03 $\pm 0.79^a$	2.63 $\pm 0.15^a$	8.80 $\pm 0.50^c$	3.31 $\pm 0.19^a$	1.06 $\pm 0.06^a$	2.50 $\pm 0.14^b$	5.69 $\pm 0.32^b$	14.50 $\pm 0.82^b$	8.58 $\pm 0.49^a$	9.28 $\pm 0.52^a$
	YL	76.14 $\pm 4.31^a$	15.22 $\pm 0.86^a$	2.89 $\pm 0.16^a$	8.96 $\pm 0.51^c$	4.12 $\pm 0.23^b$	1.19 $\pm 0.07^a$	2.83 $\pm 0.16^b$	5.63 $\pm 0.32^b$	15.41 $\pm 0.87^b$	8.94 $\pm 0.51^a$	10.33 $\pm 0.58^a$
63	αυθόρμητη	560.31 $\pm 31.70^a$	101.53 $\pm 5.74^{a,b}$	5.72 $\pm 0.32^{a,b}$	6.50 $\pm 0.37^a$	30.54 $\pm 1.73^a$	2.01 $\pm 0.11^a$	14.36 $\pm 0.81^a$	30.26 $\pm 1.71^{a,b}$	34.92 $\pm 1.98^b$	22.95 $\pm 1.30^a$	32.41 $\pm 1.83^{a,b}$
	MIX	496.46 $\pm 28.08^a$	93.08 $\pm 5.27^a$	4.95 $\pm 0.28^a$	6.65 $\pm 0.38^a$	30.68 $\pm 1.74^a$	2.10 $\pm 0.12^a$	18.56 $\pm 1.05^{a,b}$	24.03 $\pm 1.36^a$	57.34 $\pm 3.24^a$	18.05 $\pm 1.02^b$	27.47 $\pm 1.55^a$
	LY	585.95 $\pm 33.15^a$	107.48 $\pm 6.08^{a,b}$	6.08 $\pm 0.34^{a,b}$	6.77 $\pm 0.38^a$	43.72 $\pm 2.47^b$	2.72 $\pm 0.15^b$	20.38 $\pm 1.15^b$	33.59 $\pm 1.90^b$	39.85 $\pm 2.25^b$	24.03 $\pm 1.36^a$	36.96 $\pm 2.09^b$
	YL	603.41 $\pm 34.13^a$	121.75 $\pm 6.89^b$	6.32 $\pm 0.36^b$	6.96 $\pm 0.39^a$	45.24 $\pm 2.56^b$	3.05 $\pm 0.17^b$	25.78 $\pm 1.46^c$	36.11 $\pm 2.04^b$	40.75 $\pm 2.31^b$	27.95 $\pm 1.58^a$	37.21 $\pm 2.10^b$
105	αυθόρμητη	680.88 $\pm 38.52^a$	112.92 $\pm 6.39^a$	$\delta. \alpha$	$\delta. \alpha$	$\delta. \alpha$	$\delta. \alpha$	7.62 $\pm 0.43^a$	$\delta. \alpha$	35.17 $\pm 1.99^a$	12.17 $\pm 0.69^a$	14.17 $\pm 0.80^a$
	MIX	633.49 $\pm 35.84^a$	112.92 $\pm 6.39^a$	4.61 $\pm 0.26^a$	7.08 $\pm 0.40^a$	47.25 $\pm 2.67^a$	3.05 $\pm 0.17^a$	10.36 $\pm 0.59^b$	30.26 $\pm 1.71^a$	38.86 $\pm 2.20^a$	26.38 $\pm 1.49^b$	39.34 $\pm 2.23^b$
	LY	598.96 $\pm 33.88^a$	103.73 $\pm 5.87^a$	5.09 $\pm 0.29^a$	6.35 $\pm 0.36^a$	43.02 $\pm 2.43^a$	2.34 $\pm 0.13^b$	$\delta. \alpha$	$\delta. \alpha$	57.34 $\pm 3.24^b$	23.92 $\pm 1.35^b$	36.02 $\pm 2.04^b$
	YL	733.78 $\pm 41.51^a$	125.41 $\pm 7.09^a$	$\delta. \alpha$	$\delta. \alpha$	50.07 $\pm 2.83^a$	1.86 $\pm 0.11^c$	13.09 $\pm 0.74^c$	15.71 $\pm 0.89^b$	37.64 $\pm 2.13^a$	22.46 $\pm 1.27^b$	28.42 $\pm 1.61^c$

HT= υδροξυτυροσόλη, **TY**= τυροσόλη, **CA**= καφεϊκό οξύ, **CU**= κουμαρικό οξύ (p-κουμαρικό και ισομερές), **VE**= βερμπασκοζίτης, **Lu-R**= Ρουτινοζίτης της λουτεολίνης, **HT-ac**= Ακυκλοδιϋδροελενολική υδροξυτυροσόλη, **OLE**= ελευρωπαΐνη, **DiaDe**= διαλδεϋδική μορφή του αποκαρβοξυμεθυλ ελενολικού οξέος που συνδέεται με υδροξυτυροσόλη, **SEC**= καφεοϋλο-6-σεκολογανοζίτης; **COM**= κομσεκολογανोजίτης;

Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$), μεταξύ των μεταχειρίσεων στην κάθε ποικιλία, υποδεικνύονται με διαφορετικό γράμμα ^(a, b, ...).

δ.α= δεν ανιχνεύτηκε

Η συγκέντρωση της τυροσόλης αυξήθηκε ($p < 0,05$) επίσης στις άλμες κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, ανεξάρτητα από τον εμβολιασμό. Η αύξηση της συγκέντρωσης της τυροσόλης, ως παράγωγο υδρόλυσης του σαλιδροζίτη, κατά τη διάρκεια της ζύμωσης παρατηρήθηκε επίσης από τους Pistarino et al., 2013. Η ελευρωπαΐνη δεν ανιχνεύθηκε μετά από 63 ημέρες ζύμωσης στα δείγματα Κονσερβολιάς. Στην περίπτωση των δειγμάτων της ποικιλίας Καλαμών, το ποσοστό της ελευρωπαΐνης στα δείγματα αυξήθηκε από τη 14^η έως την 63^η ημέρα, και τελικά γίνεται μη ανιχνεύσιμη την 105^η μέρα. Παρόμοια συμπεριφορά έχει αναφερθεί και από τους Bleve et al. (2015). Ο βερμπασκοζίτης ήταν σχεδόν μη ανιχνεύσιμος καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης στις περισσότερες μεταχειρίσεις που αφορούν την ποικιλία Κονσερβολιά, ενώ το ποσοστό του αυξήθηκε μόνο στους εμβολιασμένους περιέκτες της ποικιλίας Καλαμών, μέχρι το τέλος της δειγματοληψίας (μετά από 105 ημέρες). Οι Bleve et al. (2015) διαπίστωσαν ότι το ποσοστό του βερμπασκοζίτη αυξήθηκε στις άλμες και των δύο ποικιλιών κατά τις πρώτες 90 ημέρες της ζύμωσης. Οι Benincasa et al. (2015) τόνισαν ότι το ποσοστό του βερμπασκοζίτη αυξήθηκε στην άλμη στο τέλος της δειγματοληψίας.

Άλλες φαινολικές ενώσεις που εντοπίστηκαν στην άλμη Καλαμών ήταν ο καφεοϋλο-6-σεκολογκανοζίτης, ο κομσεκολογκανοζίτης και η διαλδεϋδική μορφή του αποκαρβοξυμεθυλο ελενολικού οξέος συνδεδεμένου με υδροξυτυροσόλη. Αναφορικά με αυτές τις τρεις ενώσεις, η ποσότητά τους αυξήθηκε έως την 63^η ημέρα ζύμωσης, ενώ η συγκέντρωσή τους παρουσίασε διάφορες μεταβολές έως την 105^η ημέρα ζύμωσης εξαρτώμενη από το είδος της μεταχείρισης, πιθανώς λόγω ενζυμικών ή οξειδωτικών αντιδράσεων. Η ίδια τάση παρατηρήθηκε και για τον ακυκλοδιϋδροελενολικό μεθυλεστέρα της υδροξυτυροσόλης, τόσο στην άλμη

Καλαμών όσο και στην άλμη Κονσερβολιάς. Επιπλέον, ανιχνεύτηκε καφεϊκό και κουμαρικό οξύ μόνο στις άλμες Καλαμών.

Οι άλμες στο τέλος της ζύμωσης και για τις δύο ποικιλίες αποδείχθηκαν ότι είναι μια πλούσια πηγή υδροξυτυροσόλης και τυροσόλης. Επίσης, οι άλμες Καλαμών στο τέλος της ζύμωσης παρουσίασαν υψηλές συγκεντρώσεις κομσεκολογκανοζίτη (COM) και σεκολογκανοζίτη (SEC), ενώσεις που εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση συγκρίσιμη με άλλες βιοδραστικές ενώσεις όπως η HT και η ελευρωπαΐνη (Obied et al., 2007). Ακόμη, οι άλμες της Κονσερβολιάς βρέθηκαν να περιέχουν υψηλή συγκέντρωση HT-ac την 63^η ημέρα της ζύμωσης, μια ένωση η οποία έχει αποδειχτεί ότι έχει επίσης και βιολογική δράση. Συγκεκριμένα, η HT-ac δρα παρόμοια με το ακετυλοσαλικυλικό οξύ αναστέλλοντας τη συσσώρευση αιμοπεταλίων σε αρουραίους (González-Correa et al., 2008). Κατά συνέπεια, θα ήταν ενδιαφέρον να χρησιμοποιηθούν άλμες και ιδιαίτερα αυτές των ελιών Καλαμών, ως πηγή βιοδραστικών ενώσεων.

Η αύξηση της συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων που βρίσκονται στις άλμες των δύο ποικιλιών, μπορεί να αποδοθεί στην ικανότητα των ζυμών και των LAB να υδρολύουν ενώσεις όπως η ελευρωπαΐνη μέσω της β-γλυκοσιδάσης (Servili, et al., 2006). Όπως αναμενόταν, μετά τη διαδικασία της ζύμωσης, η συγκέντρωση του πικρού γλυκοζίτη της ελευρωπαΐνης μειώθηκε στην άλμη. Παράλληλα, οι συγκεντρώσεις των μονοφαινολικών ενώσεων όπως η υδροξυτυροσόλη και η τυροσόλη αυξήθηκαν ($p < 0,05$) κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της ζύμωσης και στις δύο ποικιλίες.

4.2.5 Ανάλυση των πτητικών ενώσεων του ελαιοκάρπου

Για την ταυτοποίηση και την ημι-ποσοτικοποίηση των πτητικών ενώσεων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της SPME-GC/MS. Έτσι, ταυτοποιήθηκαν και ημιποσοτικοποιήθηκαν 56 πτητικές ενώσεις για την Κονσερβολιά και 66 ενώσεις για την Καλαμών (Πίνακας 4.2.5 και 4.2.6). Οι πτητικές ενώσεις ομαδοποιήθηκαν σε διαφορετικές κατηγορίες συμπεριλαμβανομένων των αλδεϋδών, εστέρων, αλκοολών, κετονών, οξέων, υδρογονανθράκων και τερπενίων.

Πίνακας 4.2.5: Ημιποσοτικοποίηση πτητικών ενώσεων στον καρπό της ποικιλίας Κονσερβολιά κατά τη διάρκεια της αναερόβιας ζύμωσης μέσω SPME/GC-MS. Τα δεδομένα παρουσιάζουν τη συγκέντρωση (μg/kg) ± τυπική απόκλιση. Η συγκέντρωση εκφράζεται ως ο μέσος όρος 3 επαναλήψεων.

	αυθόρμητη			YL			LY			MIX		
	30 ημέρες	63 ημέρες	105 ημέρες	30 ημέρες	63 ημέρες	105 ημέρες	30 ημέρες	63 ημέρες	105 ημέρες	30 ημέρες	63 ημέρες	105 ημέρες
Αλδεϋδες												
2-μεθυλ-προπανάλη	δ.α	17,97 ±3,76 ^a	17,55 ±1,16 ^a	46,82 ±4,11 ^b	18,43 ±3,44 ^a	36,02 ±7,60 ^b	22,07 ±2,85 ^a	δ.α	18,93 ±2,88 ^a	20,16 ±4,63 ^c	11,21 ±1,12 ^b	6,38 ±0,85 ^a
3-μεθυλ-βουτανάλη	87,67 ±8,01 ^c	18,22 ±5,28 ^b	8,99 ±1,10 ^a	92,10 ±9,12 ^c	29,07 ±3,76 ^b	10,29 ±2,10 ^a	85,66 ±6,77 ^c	14,56 ±2,95 ^b	8,91 ±2,11 ^a	87,09 ±6,44 ^c	13,53 ±3,19 ^b	3,24 ±0,59 ^a
2-μεθυλ-βουτανάλη	45,83 ±4,36 ^b	8,84 ±0,74 ^a	δ.α	51,33 ±3,23 ^b	12,19 ±1,96 ^a	δ.α	38,01 ±4,44 ^b	4,95 ±0,52 ^a	δ.α	50,52 ±6,02 ^b	6,32 ±0,48 ^a	δ.α
(Z)-2-επτενάλη	33,02 ±7,11 ^b	13,53 ±2,24 ^a	δ.α	26,61 ±2,69 ^a	21,42 ±5,48 ^a	δ.α	δ.α	9,79 ±0,27	δ.α	28,68 ±7,12	δ.α	δ.α
εννεάλη	106,36 ±11,54 ^b	66,30 ±9,09 ^a	55,37 ±9,05 ^a	77,20 ±6,70 ^b	104,18 ±15,78 ^c	54,21 ±4,09 ^a	100,24 ±4,59 ^c	29,03 ±5,15 ^a	73,27 ±9,42 ^b	83,40 ±9,52 ^c	32,77 ±7,14 ^b	19,26 ±1,97 ^a
2-δεκενάλη	91,35 ±11,06 ^c	72,03 ±7,35 ^b	40,12 ±4,21 ^a	43,14 ±7,56 ^a	84,54 ±9,63 ^b	80,11 ±8,81 ^b	141,20 ±9,98 ^b	39,21 ±4,21 ^a	40,50 ±6,23 ^a	50,36 ±5,68 ^b	47,30 ±5,91 ^b	17,32 ±4,13 ^a
Σύνολο	364 ±32 ^c	197 ±28 ^b	122 ±21 ^a	337 ±24 ^c	270 ±39 ^{b,c}	181 ±29 ^a	388 ±48 ^c	98 ±14 ^a	142 ±29 ^b	320 ±27 ^c	111 ±17 ^b	46 ±8 ^a
Κετόνες												
2-βουτανόνη	330 ±77 ^a	δ.α	1480 ±187 ^b	δ.α	243 ±36 ^a	1256 ±137 ^b	δ.α	81 ±20 ^a	367 ±56 ^b	δ.α	40 ±2 ^a	60 ±2 ^b
2,6-διμεθυλ-4-επτανόνη	166,27 ±28,13	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α	190,92 ±25,69	δ.α	δ.α	142,28 ±21,05	δ.α	δ.α
6-μεθυλ-5-επτεν-2-όνη	25,92 ±6,24	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α	31,50 ±4,95	δ.α	δ.α	54,41 ±11,12	δ.α	δ.α
Σύνολο	523 ±111 ^a		1480 ±187 ^b		243 ±35 ^a	1256 ±137 ^b	222 ±31 ^b	81 ±20 ^a	367 ±56 ^c	197 ±32 ^c	40,38 ±1,96 ^a	60 ±2 ^b

Αλκοόλες												
αιθανόλη	876 ±115 ^a	2418 ±506 ^b	1976 ±72 ^b	584 ±86 ^a	2317 ±453 ^b	2277 ±564 ^b	1345 ±188 ^a	2654 ±408 ^b	2113 ±336 ^b	1022 ±152 ^a	2004 ±109 ^b	2011 ±135 ^b
2-βουτανόλη	370,73 ±65,08 ^a	671,33 ±84,97 ^b	816,92 ±33,91 ^c	δ.α	196,66 ±25,20 ^a	188,22 ±35,22 ^a	δ.α	64,53 ±13,25 ^a	61,97 ±14,59 ^a	δ.α	62,24 ±4,32 ^b	35,72 ±3,35 ^a
2-μεθυλ-1- προπανόλη	44,59 ±12,11 ^b	26,41 ±7,14 ^b	8,82 ±0,45 ^a	39,25 ±5,14 ^b	27,27 ±5,38 ^a	δ.α	48,07 ±2,36 ^b	δ.α	38,77 ±4,48 ^a	δ.α	18,39 ±4,12 ^a	17,35 ±5,56 ^a
3-μεθυλ-1- βουτανόλη	148,50 ±33,57 ^a	156,92 ±49,76 ^a	148,65 ±11,70 ^a	270,98 ±30,13 ^b	186,01 ±23,88 ^a	215,23 ±38,07 ^{a,b}	205,60 ±44,15 ^a	163,45 ±24,90 ^a	215,47 ±52,96 ^a	246,05 ±27,49 ^a	172,69 ±28,74 ^a	258,63 ±60,25 ^a
2-μεθυλ-1- βουτανόλη	71,34 ±21,22 ^a	62,62 ±10,32 ^a	51,14 ±3,34 ^a	104,75 ±28,36 ^b	59,21 ±11,54 ^a	62,17 ±14,01 ^a	122,48 ±19,21 ^b	69,09 ±13,08 ^a	98,73 ±24,72 ^{a,b}	67,63 ±15,84 ^a	57,06 ±11,86 ^a	79,96 ±15,51 ^a
(Ζ)-3-εξενόλη	130,82 ±45,87 ^a	92,12 ±22,77 ^a	79,71 ±5,98 ^a	124,87 ±10,25 ^b	68,11 ±13,78 ^a	84,93 ±18,24 ^a	107,55 ±15,41 ^b	69,64 ±10,38 ^a	88,71 ±16,17 ^{a,b}	91,40 ±19,26 ^b	42,54 ±6,41 ^a	70,88 ±6,07 ^b
εξανόλη	171,01 ±39,14 ^b	134,95 ±30,21 ^a	99,24 ±7,79 ^a	166,73 ±23,54 ^b	113,21 ±21,96 ^a	120,68 ±20,30 ^a	189,43 ±25,23 ^b	130,67 ±21,80 ^a	133,47 ±33,50 ^{a,b}	161,93 ±13,13 ^b	88,58 ±13,57 ^a	107,36 ±18,76 ^a
επτανόλη	δ.α	33,98 ±16,99 ^a	32,06 ±1,74 ^a	45,84 ±6,70 ^b	27,22 ±4,60 ^a	69,06 ±14,58 ^c	δ.α	24,33 ±6,48 ^a	37,58 ±2,97 ^b	δ.α	32,20 ±11,26 ^a	45,79 ±8,01 ^a
βενζυλική αλκοόλη	68,95 ±17,48 ^a	50,02 ±11,71 ^a	59,40 ±9,17 ^a	88,80 ±10,26 ^b	48,72 ±8,47 ^a	60,73 ±13,30 ^a	58,59 ±9,22 ^b	24,98 ±4,60 ^a	65,19 ±14,32 ^b	22,36 ±2,31 ^b	17,25 ±1,86 ^a	46,99 ±4,55 ^c
οκτανόλη	35,96 ±3,67 ^b	27,88 ±4,01 ^a	24,52 ±3,80 ^a	32,47 ±3,17 ^a	26,20 ±6,92 ^a	29,11 ±1,82 ^a	38,49 ±4,14 ^c	17,52 ±2,22 ^a	28,01 ±3,20 ^b	31,93 ±2,67 ^c	14,73 ±2,39 ^a	21,82 ±3,49 ^b
φαινυλοαιθανόλη	249,94 ±67,65 ^a	206,62 ±37,70 ^a	221,33 ±23,43 ^a	358,77 ±80,65 ^b	191,42 ±40,87 ^a	227,33 ±49,21 ^a	317,13 ±80,16 ^b	131,47 ±17,37 ^a	255,73 ±86,19 ^b	170,01 ±11,21 ^b	100,30 ±12,35 ^a	200,48 ±17,88 ^c
1-εννεανόλη	35,57 ±9,96 ^b	25,57 ±3,89 ^b	14,07 ±1,29 ^a	25,58 ±4,19 ^b	14,43 ±3,90 ^a	14,36 ±3,25 ^a	22,03 ±3,44 ^a	δ.α	18,93 ±3,21 ^a	27,72 ±3,44 ^b	δ.α	10,50 ±0,13 ^a
κρεοσόλη	δ.α	44,45 ±6,26 ^a	97,51 ±15,88 ^b	δ.α	37,59 ±6,21 ^a	93,73 ±14,29 ^b	δ.α	25,55 ±0,93 ^a	98,32 ±10,77 ^b	δ.α	14,48 ±1,72 ^a	58,81 ±7,32 ^b
Σύνολο	2204 ±431^a	3951 ±792^b	3629 ±190^b	1842 ±288^a	3313 ±626^b	3442 ±786^b	2455 ±391^a	3376 ±523^b	3254 ±603^b	1841 ±247^a	2624 ±207^b	2965 ±286^b

Εστέρες												
οξικός μεθυλεστέρας	1010 ±204 ^c	221 ±51 ^b	126 ±28 ^a	880 ±190 ^c	240 ±26 ^b	135 ±19 ^a	1475 ±149 ^b	160 ±41 ^a	167 ±9 ^a	971 ±89 ^b	131 ±25 ^a	124 ±23 ^a
οξικός αιθυλεστέρας	7113 ±682 ^c	5394 ±237 ^b	2402 ±162 ^a	7679 ±634 ^c	4086 ±317 ^b	2860 ±429 ^a	16781 ±214 ^c	4118 ±705 ^b	2491 ±399 ^a	6627 ±876 ^c	2845 ±426 ^b	1995 ±408 ^a
προπανικός μεθυλεστέρας	δ.α	53,16 ±4,09 ^b	27,07 ±6,20 ^a	δ.α	δ.α	47,03 ±4,78	δ.α	35,96 ±5,31 ^b	20,42 ±4,02 ^a	δ.α	δ.α	24,93 ±9,51
προπανικός αιθυλεστέρας	53,99 ±4,73 ^b	27,57 ±3,84 ^a	83,87 ±8,01 ^c	51,53 ±5,86 ^a	61,96 ±9,98 ^a	240,15 ±32,06 ^b	20,47 ±5,56 ^a	26,22 ±5,66 ^a	71,03 ±21,60 ^b	δ.α	19,06 ±1,82 ^a	128,65 ±26,19 ^b
οξικός προπυλεστέρας	20,24 ±3,22 ^a	67,59 ±16,08 ^b	48,87 ±1,71 ^b	30,82 ±4,24 ^a	39,54 ±4,13 ^b	106,20 ±17,85 ^c	δ.α	20,75 ±4,15 ^a	35,16 ±14,36 ^a	δ.α	12,49 ±1,24 ^a	38,13 ±8,70 ^b
βουτανικός μεθυλεστέρας	δ.α	3,71 ±0,52 ^a	8,26 ±0,98 ^b	δ.α	12,52 ±0,36	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α
sec-οξικός βουτυλεστέρας	61,97 ±6,20 ^a	74,95 ±17,00 ^a	66,08 ±4,58 ^a	63,91 ±5,92 ^b	39,30 ±7,37 ^a	65,98 ±11,01 ^b	δ.α	18,71 ±4,60 ^a	46,87 ±13,20 ^b	δ.α	δ.α	δ.α
οξικός ισοβουτυλεστέρας	δ.α	13,15 ±1,59	δ.α	δ.α	18,32 ±2,59 ^a	14,51 ±5,97 ^a	22,35 ±7,23 ^a	18,45 ±2,33 ^a	17,58 ±2,40 ^a	δ.α	14,17 ±1,22	δ.α
2-υδροξυ- προπανικός αιθυλεστέρας	229,53 ±30,40 ^a	287,33 ±79,82 ^{a,b}	336,33 ±30,59 ^b	δ.α	165,05 ±48,58 ^a	310,50 ±107,57 ^b	326,36 ±80,13 ^a	269,84 ±77,60 ^a	402,81 ±97,58 ^a	167,71 ±56,75 ^a	187,26 ±32,40 ^a	275,60 ±53,48 ^a
2-μεθυλο- βουτανικός αιθυλεστέρας	14,44 ±1,13 ^a	25,49 ±5,10 ^b	23,54 ±2,90 ^b	251,23 ±14,59 ^c	17,34 ±2,25 ^a	29,14 ±4,47 ^b	25,18 ±4,29 ^a	21,19 ±3,48 ^a	25,98 ±3,46 ^a	12,45 ±3,54 ^a	17,99 ±3,17 ^{a,b}	22,50 ±3,82 ^b
3-μεθυλο- βουτανικός αιθυλεστέρας	15,88 ±1,25 ^a	28,38 ±8,02 ^b	31,79 ±2,32 ^b	24,47 ±9,23 ^a	24,06 ±6,12 ^a	41,92 ±6,85 ^b	22,69 ±3,13 ^a	21,99 ±2,99 ^a	34,03 ±4,65 ^b	14,37 ±3,15 ^a	22,11 ±2,51 ^b	29,48 ±4,20 ^c
οξικός ισοαμυλεστέρας	63,53 ±2,10 ^a	160,45 ±38,56 ^b	156,14 ±8,63 ^b	23,49 ±7,25 ^a	170,52 ±33,19 ^b	228,79 ±39,59 ^b	152,07 ±36,35 ^a	159,36 ±21,14 ^a	213,96 ±58,69 ^a	82,37 ±24,59 ^a	178,54 ±22,14 ^b	235,04 ±39,70 ^b
1-βουτανόλη, 2- οξικός μεθυλεστέρας	28,60 ±1,65 ^a	47,71 ±8,72 ^b	36,10 ±4,29 ^b	147,47 ±26,30 ^b	41,57 ±11,55 ^a	49,19 ±8,32 ^a	91,69 ±14,99 ^b	53,12 ±7,54 ^a	60,10 ±21,72 ^{a,b}	60,04 ±7,46 ^a	46,86 ±8,62 ^a	57,89 ±11,50 ^a
εξανικός μεθυλεστέρας	36,98 ±5,12 ^a	48,12 ±6,10 ^a	37,33 ±7,78 ^a	65,32 ±11,82 ^a	46,33 ±10,39 ^a	49,08 ±6,46 ^a	74,81 ±9,56 ^b	33,19 ±7,99 ^a	39,54 ±5,52 ^a	57,93 ±7,09 ^b	29,98 ±6,09 ^a	32,17 ±3,79 ^a
εξανικός αιθυλεστέρας	52,43 ±5,98 ^a	76,80 ±18,39 ^b	84,76 ±6,95 ^b	58,64 ±5,44 ^a	73,87 ±20,27 ^a	113,87 ±19,80 ^b	82,34 ±7,54 ^b	48,71 ±6,29 ^a	74,32 ±11,39 ^b	63,67 ±6,47 ^{a,b}	64,40 ±9,47 ^a	99,87 ±16,24 ^b
οξικός (E)-	31,48	36,51	27,82	97,94	33,16	32,26	43,67	27,49	29,45	18,34	16,06	23,10

εξενυλεστέρας	±4,03 ^a	±6,37 ^a	±2,27 ^a	±15,03 ^b	±7,36 ^a	±4,70 ^a	±4,56 ^b	±4,25 ^a	±2,52 ^a	±4,82 ^{a,b}	±1,31 ^a	±3,36 ^b
οξικός εξυλεστέρας	30,88 ±2,36 ^a	54,90 ±11,73 ^c	38,10 ±3,73 ^b	25,03 ±9,65 ^a	33,93 ±7,69 ^{a,b}	45,71 ±8,91 ^b	67,59 ±6,54 ^b	42,70 ±6,03 ^a	47,00 ±10,72 ^a	18,88 ±3,69 ^a	29,76 ±4,19 ^b	36,03 ±5,71 ^b
οκτανικός μεθυλεστέρας	δ.α	δ.α	δ.α	37,67 ±4,34 ^b	8,21 ±0,25 ^a	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α	17,29 ±2,62 ^b	9,01 ±0,86 ^a	10,84 ±3,44 ^a
οκτανικός αιθυλεστέρας	15,24 ±1,99 ^a	δ.α	15,28 ±1,50 ^a	δ.α	60,90 ±16,29 ^a	45,44 ±6,65 ^a	21,51 ±4,59 ^a	δ.α	17,36 ±2,38 ^a	65,69 ±5,75 ^a	54,71 ±9,97 ^a	81,61 ±8,99 ^b
σαλικυλικός μεθυλεστέρας	δ.α	9,85 ±1,20 ^a	19,08 ±2,26 ^b	60,80 ±8,76 ^b	14,42 ±3,03 ^a	15,98 ±2,41 ^a	δ.α	δ.α	23,75 ±3,07	δ.α	δ.α	13,35 ±1,68
οξικός, 2- φαινυλεστέρας	δ.α	13,53 ±3,38 ^a	17,33 ±5,88 ^a	δ.α	18,52 ±6,33 ^a	15,09 ±3,16 ^a	32,26 ±2,78 ^b	δ.α	17,78 ±1,88 ^a	δ.α	δ.α	9,96 ±0,72
αιθυλεστέρας βενζολοπροπανικού οξέος	δ.α	10,33 ±2,08 ^a	19,04 ±0,97 ^b	δ.α	10,33 ±1,19 ^a	11,88 ±2,98 ^a	δ.α	δ.α	16,51 ±1,31	δ.α	δ.α	δ.α
Σύνολο	8778 ±956^c	6655 ±520^b	3605 ±292^a	9497 ±952^b	5216 ±542^a	4458 ±742^a	19239 ±550^b	5075 ±906^a	3852 ±688^a	8177 ±1092^b	3678 ±556^a	3238 ±632^a

Οξέα

Οξικό οξύ	δ.α	295 ±35,24 ^a	1803 ±99 ^b	δ.α	1226 ±39 ^b	1093 ±38 ^a	2912 ±139 ^b	1179 ±132 ^a	1357 ±112 ^a	1609 ±114 ^c	955 ±85 ^a	1249 ±156 ^b
-----------	-----	----------------------------	--------------------------	-----	--------------------------	--------------------------	---------------------------	---------------------------	---------------------------	---------------------------	-------------------------	---------------------------

Υδρογονάνθρακες

διμεθυλοσουλφίδιο	63,53 ±13,26 ^{a,b}	55,23 ±4,07 ^a	73,35 ±5,72 ^b	65,40 ±13,21 ^a	53,78 ±5,20 ^a	85,72 ±5,23 ^b	43,58 ±10,45 ^a	53,82 ±11,97 ^a	76,71 ±6,69 ^b	32,05 ±2,41 ^b	19,04 ±4,88 ^a	62,92 ±12,65 ^c
επτάνιο	δ.α	17,23 ±6,94	δ.α	101,02 ±24,35 ^b	9,55 ±1,32 ^a	11,63 ±1,40 ^a	40,48 ±11,58 ^b	11,31 ±2,08 ^a	8,60 ±2,91 ^a	119,18 ±9,36 ^b	5,66 ±0,35 ^a	δ.α
1-οκτένιο	δ.α	21,69 ±5,42	δ.α	δ.α	14,15 ±4,96 ^a	34,34 ±5,49 ^b	δ.α	11,39 ±2,10 ^a	14,50 ±4,42 ^a	δ.α	12,29 ±2,88 ^a	12,31 ±2,16 ^a
οκτάνιο	412,66 ±34,14 ^a	765,17 ±98,10 ^b	483,54 ±77,75 ^a	432,99 ±37,84 ^a	557,15 ±86,48 ^b	713,85 ±14,11 ^c	434,23 ±80,41 ^a	652,48 ±83,57 ^b	608,08 ±108,69 ^b	264,18 ±14,28 ^a	423,76 ±89,70 ^b	402,59 ±94,24 ^b
1,3,5,7-κυκλο- οκτατετραένιο	175,09 ±26,18 ^b	282,28 ±76,89 ^c	119,24 ±8,00 ^a	1034,11 ±24,55 ^c	735,93 ±89,63 ^b	513,97 ±86,93 ^a	73,01 ±13,74 ^a	134,15 ±21,94 ^b	201,49 ±65,12 ^b	900,14 ±88,54 ^b	593,33 ±61,09 ^a	860,44 ±130,78 ^b
εννένιο	34,84 ±1,09 ^b	21,92 ±7,22 ^a	28,53 ±4,42 ^a	26,94 ±3,45 ^b	34,17 ±6,75 ^b	18,29 ±2,09 ^a	45,90 ±11,43 ^b	19,76 ±10,01 ^a	25,56 ±5,63 ^a	67,90 ±7,14 ^c	25,46 ±2,85 ^b	16,35 ±2,53 ^a
1,2,4-τριμεθυλο- βενζόλιο	155,92 ±24,87	δ.α	δ.α	35,50 ±6,26	δ.α	δ.α	220,85 ±50,82	δ.α	δ.α	188,77 ±9,17	δ.α	δ.α
δεκάνιο	121,05 ±11,36 ^b	52,42 ±5,48 ^a	37,65 ±17,75 ^a	71,30 ±17,24 ^b	40,57 ±11,59 ^a	24,95 ±5,76 ^a	182,91 ±38,95 ^b	31,38 ±5,51 ^a	45,08 ±14,13 ^a	168,13 ±11,03 ^c	21,01 ±0,63 ^a	54,65 ±6,20 ^b
Σύνολο	963	1216	742	1767	1445	1403	1041	914	980	1740	1101	1409

	±111 ^b	±204 ^b	±114 ^a	±127 ^b	±206 ^{a,b}	±121 ^a	±217 ^a	±137 ^a	±208 ^a	±142 ^b	±162 ^a	±249 ^{a,b}
Τερπένια												
α-οκιμένιο	113,15 ±26,23 ^c	69,77 ±13,97 ^b	40,90 ±6,08 ^a	119,02 ±13,11 ^b	71,49 ±20,32 ^a	47,22 ±6,35 ^a	δ.α	45,23 ±6,16 ^a	51,50 ±8,11 ^a	118,67 ±34,13 ^c	45,55 ±4,95 ^a	76,85 ±12,66 ^b
dl-λεμονένιο	δ.α	16,81 ±1,18	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α	196,47 ±7,45	δ.α	δ.α	12,50 ±1,98
α-φαρνεσένιο	371,00 ±57,84 ^c	247,37 ±14,67 ^b	182,49 ±11,79 ^a	344,13 ±64,52 ^b	226,50 ±46,38 ^a	207,76 ±28,03 ^a	521,61 ±89,25 ^b	180,23 ±20,86 ^a	217,64 ±34,72 ^a	315,21 ±66,12 ^b	162,24 ±24,62 ^a	166,82 ±12,63 ^a
Σύνολο	484 ±84^c	334 ±30^b	223 ±18^a	463 ±78^b	298 ±67^a	255 ±34^a	522 ±89^c	225 ±27^a	466 ±50^b	434 ±100^b	208 ±30^a	256 ±27^a

Πίνακας 4.2.6: Ημιποσοτικοποίηση πτητικών ενώσεων στον καρπό της ποικιλίας Καλαμών κατά τη διάρκεια της αναερόβιας ζύμωσης μέσω SPME/GC-MS. Τα δεδομένα παρουσιάζουν τη συγκέντρωση (μg/kg) ± τυπική απόκλιση. Η συγκέντρωση εκφράζεται ως ο μέσος όρος 3 επαναλήψεων.

	S			YL			LY			MIX		
	30 ημέρες	63 ημέρες	105 μέρες	30 ημέρες	63 ημέρες	105 ημέρες	30 ημέρες	63 ημέρες	105 ημέρες	30 ημέρες	63 ημέρες	105 ημέρες
Αλδεΐδες												
2-μεθυλ-προπανάλη	37,94 ±4,24 ^b	16,16 ±3,57 ^a	17,48 ±1,65 ^a	53,70 ±8,44 ^b	11,88 ±5,67 ^a	12,04 ±1,88 ^a	50,33 ±6,24 ^c	6,45 ±0,45 ^a	10,42 ±1,83 ^b	89,13 ±19,32 ^b	17,01 ±3,27 ^a	13,70 ±2,90 ^a
3-μεθυλ-βουτανάλη	111,31 ±20,16 ^b	67,58 ±12,93 ^a	28,72 ±3,23 ^a	161,29 ±23,66 ^b	50,28 ±14,99 ^a	25,73 ±5,97 ^a	174,05 ±30,32 ^b	26,71 ±2,31 ^a	16,49 ±3,64 ^a	269,01 ±44,58 ^c	55,28 ±9,38 ^b	30,57 ±5,52 ^a
2-μεθυλ-βουτανάλη	115,16 ±22,71 ^b	66,72 ±13,43 ^a	32,58 ±1,75 ^a	139,86 ±21,55 ^c	55,91 ±8,82 ^b	28,87 ±7,72 ^a	188,54 ±37,24 ^c	28,17 ±2,20 ^b	12,17 ±2,29 ^a	280,33 ±56,90 ^c	53,70 ±9,69 ^b	30,06 ±9,84 ^a
πεντανάλη	δ.α	δ.α	9,71 ±0,68	δ.α	δ.α	13,12 ±1,43	δ.α	δ.α	14,67 ±1,19	δ.α	δ.α	13,44 ±4,41
εξανάλη	557,39 ±31,22 ^b	28,85 ±6,32 ^a	δ.α	424,32 ±19,26	δ.α	δ.α	316,40 ±66,12	δ.α	δ.α	402,31 ±83,26	δ.α	δ.α
επτανάλη	94,14 ±12,66 ^c	45,48 ±4,44 ^b	15,82 ±7,68 ^a	61,75 ±14,05 ^b	11,44 ±3,01 ^a	12,46 ±2,78 ^a	88,75 ±11,28 ^c	11,43 ±0,15 ^a	16,46 ±0,94 ^b	68,96 ±12,12 ^c	9,93 ±1,16 ^a	22,97 ±6,10 ^b
(Z)-2-επτενάλη	89,51 ±9,56	δ.α	δ.α	67,64 ±9,33	δ.α	δ.α	31,20 ±5,12 ^b	δ.α	10,21 ±1,77 ^a	34,70 ±9,14	δ.α	δ.α
οκτανάλη	21,97 ±3,25 ^b	57,36 ±5,58 ^c	13,32 ±1,90 ^a	16,29 ±4,12 ^c	9,12 ±0,01 ^a	10,44 ±0,26 ^b	21,52 ±3,21 ^c	7,06 ±0,28 ^b	6,27 ±0,25 ^a	δ.α	15,45 ±3,83	δ.α
(E)-2-οκτενάλη	97,07 ±12,03 ^c	11,47 ±1,23 ^b	9,58 ±0,83 ^a	78,59 ±6,21 ^b	δ.α	8,85 ±0,19 ^a	47,73 ±6,24 ^b	δ.α	14,86 ±2,79 ^a	44,73 ±8,41 ^b	δ.α	10,79 ±1,18 ^a

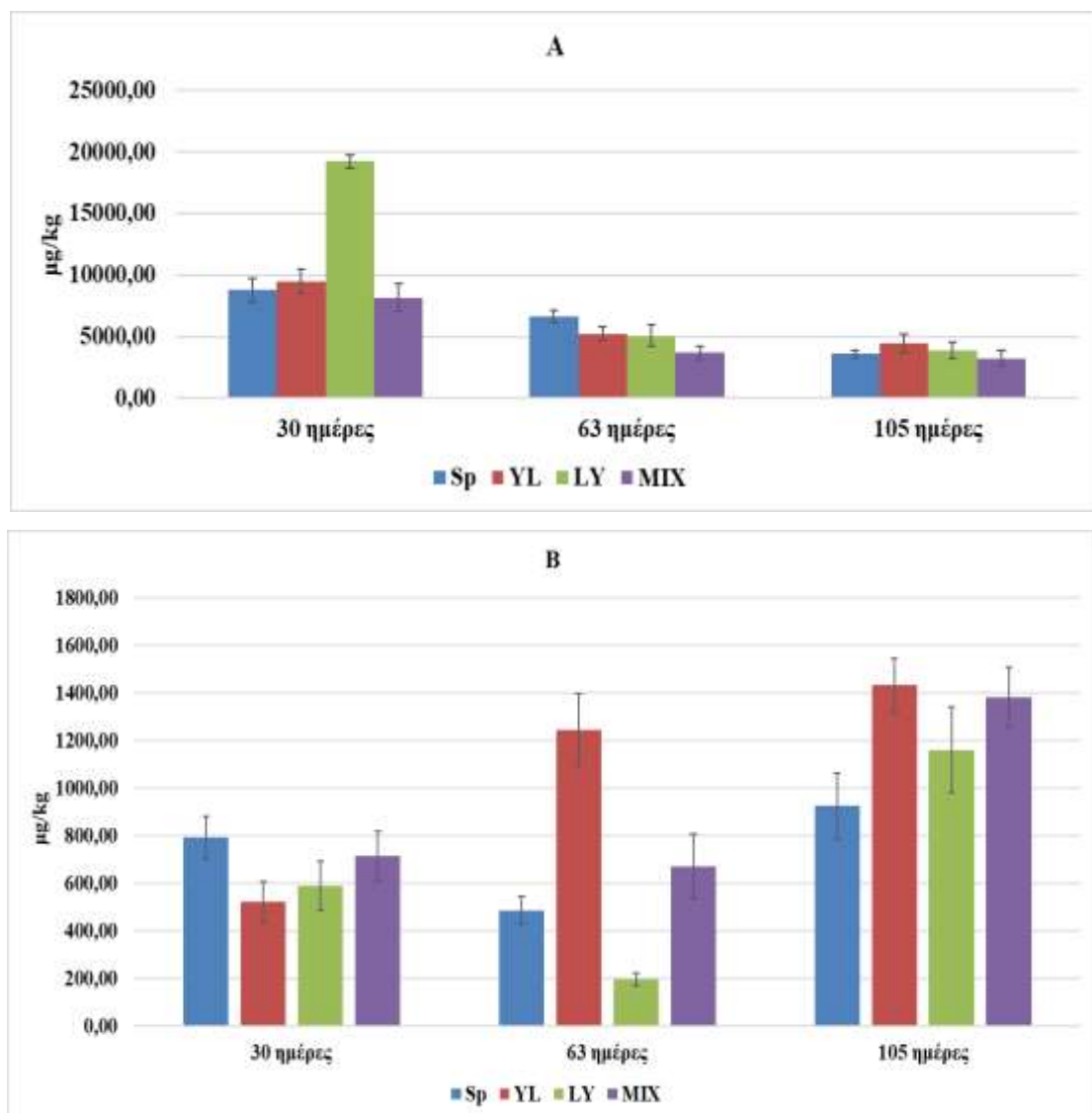
εννεάλη	104,15 ±16,24 ^b	122,53 ±25,84 ^b	41,29 ±2,02 ^a	111,11 ±19,23 ^c	70,00 ±7,96 ^b	40,99 ±6,71 ^a	118,20 ±25,41 ^c	44,27 ±3,82 ^b	31,76 ±0,99 ^a	149,29 ±41,48 ^b	54,40 ±11,68 ^a	41,91 ±3,41 ^a
2-δεκενάλη	8,18 ±0,32 ^b	416,15 ±18,61 ^c	9,52 ±0,74 ^a	δ.α	δ.α	41,91 ±9,99	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α	27,97 ±3,27	δ.α
Σύνολο	1237 ±153^c	832 ±126^b	178 ±12^a	1115 ±121^b	209 ±27^a	194 ±13^a	1037 ±97^b	124 ±15^a	133 ±7^a	1338 ±135^b	234 ±20^a	163 ±11^a
Κετόνες												
2-βουτανόνη	21,11 ±6,35 ^a	δ.α	112,74 ±21,92 ^b	δ.α	δ.α	58,36 ±15,76	5,65 ±0,67 ^a	δ.α	71,57 ±3,21 ^b	δ.α	δ.α	78,95 ±9,40
3-μεθυλ-2-πεντανόνη	δ.α	39,77 ±13,16	δ.α	12,61 ±2,12	δ.α	δ.α	δ.α	29,12 ±6,23	δ.α	55,10 ±6,21	δ.α	δ.α
1-πεντεν-3-όνη	99,14 ±12,12 ^b	δ.α	21,90 ±0,68 ^a	42,14 ±9,82 ^a	δ.α	38,73 ±2,59 ^a	35,98 ±4,11 ^a	δ.α	29,43 ±5,65 ^a	δ.α	δ.α	35,25 ±9,65
3-πεντανόνη	23,04 ±2,50 ^b	20,82 ±1,48 ^b	11,83 ±3,44 ^a	δ.α	19,37 ±3,16 ^a	15,13 ±2,63 ^a	δ.α	15,28 ±1,15 ^a	20,19 ±4,12 ^a	7,92 ±0,65 ^a	10,80 ±1,56 ^b	17,32 ±4,44 ^c
4-μεθυλ-3-πεντεν-2-όνη	14,91 ±2,82	δ.α	δ.α	14,80 ±4,16	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α	11,02 ±1,21	δ.α	δ.α
4-μεθυλ-2-εξανόνη	12,86 ±3,25	δ.α	δ.α	3,45 ±0,05	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α
2-επτανόνη	δ.α	22,31 ±0,94 ^b	8,16 ±0,06 ^a	δ.α	32,70 ±5,45 ^b	18,33 ±4,23 ^a	δ.α	23,32 ±3,41 ^a	32,76 ±5,21 ^b	δ.α	20,95 ±3,65 ^a	69,75 ±7,60 ^b
2,6-διμεθυλ-4-επτανόνη	236,35 ±30,09	δ.α	δ.α	150,19 ±23,19	δ.α	δ.α	127,87 ±18,56	δ.α	δ.α	208,20 ±46,24	δ.α	δ.α
6-μεθυλ-5-επτεν-2-όνη	114,21 ±32,11 ^b	22,84 ±3,88 ^a	δ.α	36,41 ±4,58	δ.α	δ.α	64,44 ±7,02 ^b	24,66 ±4,15 ^a	δ.α	36,09 ±11,02	δ.α	δ.α
Σύνολο	521,61 ±89,24^c	105,74 ±19,47^a	154,63 ±26,10^b	259,60 ±43,92^c	52,07 ±8,61^a	130,55 ±25,20^b	233,94 ±30,36^c	92,37 ±14,94^a	153,94 ±18,19^b	318,33 ±65,33^c	31,76 ±5,21^a	201,27 ±31,09^b
Αλκοόλες												
αιθανόλη	549,33 ±13,44 ^a	638,46 ±116,47 ^b	914,86 ±125,35 ^c	512,26 ±62,50 ^a	2096,79 ±342,52 ^c	1098,69 ±141,28 ^b	17,34 ±5,17 ^a	849,25 ±130,28 ^b	1150,61 ±98,26 ^c	700,21 ±58,40 ^a	2379,33 ±224,95 ^b	1902,91 ±226,54 ^b
2-βουτανόλη	30,97 ±3,16 ^a	30,53 ±2,16 ^a	57,38 ±4,61 ^b	δ.α	107,48 ±21,77 ^b	40,76 ±8,47 ^a	δ.α	7,73 ±0,09 ^a	28,65 ±7,07 ^b	δ.α	10,17 ±0,85 ^a	33,38 ±6,05 ^b
2-μεθυλ-1-προπανόλη	66,97 ±7,52 ^b	57,73 ±12,16 ^b	24,31 ±3,27 ^a	27,75 ±2,21 ^a	54,66 ±6,64 ^b	30,85 ±8,35 ^a	δ.α	55,54 ±4,79 ^b	43,27 ±2,57 ^a	74,68 ±12,23 ^a	58,15 ±6,31 ^a	56,38 ±17,11 ^a
1-πεντεν-3-όλη	27,76 ±2,03 ^b	δ.α	8,28 ±1,11 ^a	13,20 ±0,18	δ.α	δ.α	10,26 ±2,41 ^a	δ.α	8,14 ±0,76 ^a	δ.α	δ.α	δ.α
3-μεθυλ-1-βουτανόλη	55,38 ±14,11 ^a	471,63 ±65,34 ^c	310,37 ±59,12 ^b	47,81 ±5,80 ^a	517,79 ±49,90 ^c	358,20 ±20,14 ^b	49,52 ±8,91 ^a	329,48 ±23,81 ^b	369,97 ±61,15 ^b	89,80 ±15,80 ^a	602,30 ±70,78 ^b	688,56 ±48,99 ^b
2-μεθυλ-1-βουτανόλη	22,18 ±7,00 ^a	193,99 ±25,94 ^c	127,90 ±31,54 ^b	17,35 ±3,50 ^a	195,53 ±24,86 ^b	144,47 ±37,65 ^b	34,72 ±9,32 ^a	147,91 ±7,83 ^b	147,01 ±24,25 ^b	30,72 ±8,97 ^a	195,34 ±14,31 ^b	252,74 ±47,86 ^b
(Ζ)-3-εξενόλη	2,84	17,22	21,01	4,62	25,61	22,09	5,42	8,72	16,97	5,26	15,28	21,09

	±0,03 ^a	±1,42 ^b	±3,11 ^b	±0,58 ^a	±2,49 ^b	±4,60 ^b	±0,61 ^a	±0,52 ^b	±4,35 ^c	±0,54 ^a	±1,66 ^b	±6,37 ^b
εξανόλη	5,45 ±0,93 ^a	56,12 ±9,08 ^b	45,84 ±4,25 ^b	7,43 ±0,64 ^a	75,88 ±16,02 ^b	55,69 ±12,28 ^b	7,48 ±0,70 ^a	24,36 ±2,66 ^b	60,30 ±9,87 ^c	10,06 ±0,53 ^a	48,25 ±5,08 ^b	67,95 ±8,40 ^c
2,6-διμεθυλ-6- επτεν-2-όλη	96,62 ±10,29	δ.α	δ.α	41,69 ±12,54	δ.α	δ.α	11,99 ±1,38	δ.α	δ.α	24,73 ±5,44	δ.α	δ.α
επτανόλη	δ.α	25,89 ±6,80 ^a	19,16 ±4,16 ^a	δ.α	26,51 ±6,63 ^a	20,06 ±5,51 ^a	δ.α	4,83 ±0,88 ^a	20,23 ±3,77 ^b	δ.α	24,48 ±1,19 ^a	22,21 ±6,43 ^a
2-αιθυλ-, 1-εξανόλη	δ.α	25,04 ±3,54 ^b	10,96 ±1,75 ^a	δ.α	17,36 ±4,05 ^b	10,88 ±0,86 ^a	δ.α	9,54 ±0,32 ^b	7,70 ±0,56 ^a	δ.α	19,85 ±2,33 ^b	11,45 ±2,63 ^a
βενζυλική αλκοόλη	40,31 ±5,18 ^b	δ.α	28,95 ±6,45 ^a	44,29 ±11,32 ^a	δ.α	30,18 ±9,23 ^a	46,31 ±7,78	δ.α	δ.α	39,48 ±9,26 ^b	δ.α	18,76 ±5,58 ^a
οκτανόλη	48,05 ±8,32 ^c	16,66 ±2,70 ^b	11,94 ±2,47 ^a	δ.α	17,76 ±4,33 ^a	15,92 ±3,81 ^a	15,03 ±1,14 ^b	δ.α	10,24 ±1,65 ^a	δ.α	10,76 ±1,45 ^a	15,71 ±0,17 ^b
φαινυλοαιθανόλη	33,22 ±4,17 ^a	135,83 ±8,10 ^c	102,09 ±12,03 ^b	142,22 ±20,02 ^b	90,42 ±21,60 ^a	109,59 ±24,75 ^b	263,80 ±21,66 ^c	50,71 ±4,98 ^a	71,30 ±6,85 ^b	207,20 ±78,45 ^b	94,40 ±18,95 ^a	108,69 ±26,57 ^a
1-εννεανόλη	173,06 ±19,63 ^c	20,31 ±3,05 ^b	11,58 ±2,04 ^a	δ.α	23,93 ±5,10 ^b	14,62 ±1,56 ^a	35,22 ±4,85 ^c	7,14 ±1,05 ^a	10,44 ±0,51 ^b	40,38 ±6,51 ^b	12,83 ±3,80 ^a	14,42 ±2,97 ^a
κρεοσόλη	δ.α	δ.α	124,64 ±13,50	19,24 ±2,16 ^a	δ.α	86,81 ±8,65 ^b	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α
Σύνολο	1152 ±96^a	1690 ±257^b	1819 ±275^b	878 ±121^a	3250 ±506^c	2039 ±287^b	497 ±64^a	1495 ±177^b	1945 ±222^c	1223 ±196^a	3471 ±352^b	3214 ±406^b

Εστέρες												
οξικός μεθυλεστέρας	100,07 ±11,10 ^a	201,20 ±12,82 ^b	106,32 ±21,69 ^a	78,85 ±21,00 ^a	200,70 ±50,93 ^b	265,47 ±29,12 ^b	83,51 ±8,64 ^a	74,32 ±11,85 ^a	122,88 ±21,18 ^b	95,46 ±8,82 ^a	127,56 ±24,65 ^b	244,94 ±27,75 ^c
οξικός αιθυλεστέρας	187,55 ±11,50 ^b	136,01 ±22,14 ^a	321,54 ±58,24 ^c	92,47 ±21,14 ^a	720,21 ±56,03 ^b	763,93 ±42,56 ^b	131,71 ±33,95 ^b	42,71 ±9,04 ^a	654,16 ±97,39 ^c	107,54 ±10,65 ^a	315,97 ±78,11 ^b	693,95 ±27,06 ^c
προπανικός μεθυλεστέρας	δ.α	10,10 ±0,56 ^a	35,08 ±3,89 ^b	14,20 ±2,89 ^a	δ.α	20,59 ±2,35 ^a	δ.α	δ.α	21,96 ±3,07	δ.α	δ.α	20,97 ±4,52
προπανικός αιθυλεστέρας	19,67 ±4,25 ^a	δ.α	59,28 ±10,11 ^b	δ.α	16,57 ±1,68 ^a	24,56 ±4,01 ^b	δ.α	δ.α	29,32 ±5,44	δ.α	δ.α	30,58 ±6,65
οξικός προπυλεστέρας	δ.α	δ.α	12,09 ±0,63	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α
βουτανικός μεθυλεστέρας	δ.α	δ.α		δ.α	δ.α	6,09 ±0,56	δ.α	7,14 ±0,29	δ.α	δ.α	δ.α	3,05 ±0,43
sec-οξικός βουτυλεστέρας	δ.α	δ.α	12,33 ±1,21	δ.α	15,42 ±3,88 ^a	20,80 ±2,38 ^a	δ.α	16,16 ±0,38 ^a	30,85 ±8,54 ^b	δ.α	δ.α	25,70 ±7,91
οξικός ισοβουτυλεστέρας	δ.α	δ.α	10,96 ±0,56	δ.α	δ.α	6,27 ±0,78	δ.α	δ.α	8,03 ±0,13	δ.α	δ.α	5,97 ±0,32
2-υδροξυ- προπανικός αιθυλεστέρας	97,53 ±13,58 ^b	δ.α	23,19 ±3,85 ^a	68,63 ±6,26 ^c	21,88 ±2,12 ^b	13,77 ±1,43 ^a	26,29 ±2,36 ^a	δ.α	26,76 ±6,95 ^a	51,80 ±3,02	δ.α	δ.α
2-μεθυλο- βουτανικός αιθυλεστέρας	15,07 ±2,45 ^a	δ.α	13,16 ±1,65 ^a	13,65 ±3,18 ^a	13,49 ±1,88 ^a	12,91 ±1,77 ^a	δ.α	δ.α	12,26 ±1,74	28,92 ±3,45 ^c	11,71 ±0,93 ^a	18,11 ±5,71 ^b
3-μεθυλο- βουτανικός αιθυλεστέρας	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α	10,36 ±1,53 ^b	2,15 ±0,01 ^a	δ.α	δ.α	5,94 ±0,70
οξικός ισοαμυλεστέρας	64,52 ±5,66 ^b	33,42 ±4,61 ^a	143,06 ±11,32 ^c	46,29 ±4,98 ^a	82,03 ±5,59 ^b	105,96 ±9,95 ^c	16,21 ±2,14 ^b	5,20 ±0,03 ^a	103,80 ±18,57 ^c	41,19 ±6,36 ^a	45,25 ±6,97 ^a	100,30 ±14,37 ^b
1-βουτανόλη, 2- οξικός μεθυλεστέρας	28,97 ±6,13 ^b	14,97 ±2,84 ^a	70,88 ±6,42 ^c	δ.α	33,86 ±2,46 ^a	54,49 ±4,24 ^b	δ.α	δ.α	44,73 ±5,91	δ.α	17,36 ±4,93 ^a	46,96 ±6,93 ^b
εξανικός μεθυλεστέρας	44,25 ±8,56 ^c	9,86 ±0,65 ^a	13,49 ±1,75 ^b	45,68 ±7,23 ^b	13,39 ±2,23 ^a	11,01 ±0,37 ^a	42,36 ±6,25 ^b	δ.α	16,22 ±0,78 ^a	57,07 ±14,25 ^b	12,93 ±2,18 ^a	20,24 ±7,67 ^a
εξανικός αιθυλεστέρας	106,49 ±13,25 ^c	10,25 ±2,44 ^a	34,28 ±8,88 ^b	78,58 ±4,11 ^b	38,18 ±7,12 ^a	33,99 ±4,30 ^a	124,33 ±31,87 ^b	δ.α	31,00 ±4,47 ^a	119,62 ±15,98 ^b	42,10 ±6,76 ^a	46,09 ±1,26 ^a
οκτανικός μεθυλεστέρας	32,48 ±3,87 ^c	22,94 ±3,46 ^b	13,60 ±2,45 ^a	23,28 ±1,78 ^b	20,71 ±2,09 ^{a,b}	17,66 ±1,39 ^a	51,45 ±4,09 ^b	13,46 ±1,13 ^a	14,82 ±1,59 ^a	55,92 ±10,22 ^b	21,17 ±4,02 ^a	27,02 ±4,71 ^a
οκτανικός αιθυλεστέρας	96,79 ±8,30 ^b	47,84 ±7,66 ^a	56,32 ±7,41 ^a	60,26 ±14,87 ^a	70,04 ±13,16 ^a	75,19 ±8,76 ^a	113,74 ±15,22 ^c	29,08 ±1,36 ^a	42,93 ±3,21 ^b	156,48 ±32,08 ^b	78,38 ±7,32 ^a	93,26 ±10,37 ^a
Σύνολο	793 ±89^b	487 ±57^a	926 ±140^b	522 ±87^a	1246 ±149^b	1433 ±114^b	590 ±105^b	198 ±26^a	1162 ±179^c	714 ±105^b	672 ±136^a	1383 ±126^c

Οξέα												
οξικό οξύ	71,56 ±11,79 ^a	361,12 ±57,89 ^b	487,60 ±33,01 ^c	62,89 ±4,80 ^a	213,48 ±31,14 ^b	504,61 ±42,63 ^c	62,94 ±8,70 ^a	85,84 ±21,35 ^a	434,98 ±55,44 ^b	53,34 ±9,73 ^a	283,73 ±16,29 ^b	368,85 ±18,23 ^c
εξανικό οξύ	29,60 ±0,54	δ.α	δ.α	15,88 ±3,22	δ.α	δ.α	20,57 ±3,41	δ.α	δ.α	24,10 ±6,78	δ.α	δ.α
Σύνολο	101,16 ±12,33^a	361,12 ±57,89^b	487,60 ±33,01^c	78,77 ±8,02^a	213,48 ±31,14^b	504,61 ±42,63^c	83,51 ±12,11^a	85,84 ±21,35^a	434,98 ±55,44^b	77,44 ±16,51^a	283,73 ±16,29^b	368,85 ±18,23^c
Υδρογονάνθρακες												
διμεθυλοσουλφίδιο	50,12 ±6,98 ^a	51,90 ±9,57 ^a	81,24 ±6,17 ^b	51,82 ±16,24 ^a	80,51 ±18,01 ^a	78,10 ±17,45 ^a	84,07 ±12,23 ^c	24,63 ±1,52 ^a	50,79 ±11,18 ^b	132,88 ±38,14 ^b	57,39 ±5,87 ^a	63,42 ±19,48 ^a
επτάνιο	520,07 ±44,45 ^b	12,80 ±1,53 ^a	δ.α	147,25 ±32,89 ^b	19,22 ±2,86 ^a	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α	520,39 ±99,16	δ.α	δ.α
(Z)-2-εξένιο	192,02 ±26,05	δ.α	δ.α	159,20 ±44,02	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α
1-οκτένιο	δ.α	8,42 ±0,45	δ.α	δ.α	12,35 ±1,11 ^a	11,80 ±3,49 ^a	δ.α	δ.α	5,28 ±0,57	δ.α	10,74 ±2,46	δ.α
οκτάνιο	δ.α	83,99 ±8,93 ^a	123,88 ±13,51 ^b	δ.α	201,84 ±46,53 ^a	572,11 ±42,77 ^b	δ.α	98,24 ±4,50 ^a	159,63 ±26,23 ^b	δ.α	281,41 ±41,38 ^b	134,17 ±12,66 ^a
1,3,5,7-κυκλο- οκτατετραένιο	1872,71 ±101,96 ^c	1385,50 ±167,81 ^b	867,24 ±132,51 ^a	892,60 ±75,56 ^a	1098,72 ±118,00 ^b	974,05 ±55,47 ^a	1948,69 ±125,65 ^b	803,73 ±15,59 ^a	788,49 ±144,89 ^a	3964,17 ±324,11 ^c	1555,69 ±176,19 ^a	1881,01 ±44,73 ^b
εννεάνιο	115,66 ±32,25 ^b	33,83 ±3,44 ^a	30,57 ±2,15 ^a	73,09 ±11,01 ^b	34,21 ±9,51 ^a	44,14 ±12,21 ^a	106,45 ±44,85 ^c	40,44 ±4,06 ^b	12,11 ±2,92 ^a	83,78 ±12,06 ^b	δ.α	49,56 ±1,24 ^a
1,2,4- τριμεθυλοβενζόλιο	306,28 ±58,69	δ.α	δ.α	181,03 ±44,84	δ.α	δ.α	150,19 54	δ.α	δ.α	274,83 ±45,45	δ.α	δ.α
δεκάνιο	200,28 ±26,32 ^c	25,15 ±2,19 ^a	41,86 ±9,48 ^b	84,89 ±12,85 ^c	21,95 ±3,12 ^a	38,28 ±11,40 ^b	139,84 ±43,47 ^c	37,68 ±4,65 ^b	22,73 ±0,31 ^a	324,01 ±58,66 ^c	11,97 ±0,35 ^a	54,04 ±4,19 ^b
Σύνολο	3257 ±297^c	1602 ±194^b	1145 ±164^a	1590 ±237^a	1469 ±199^a	1718 ±143^a	2429 ±280^b	1005 ±30^a	1039 ±186^a	5300 ±578^b	1917 ±226^a	2182 ±82^a
Τερπένια												
α-οκιμένιο	32,35 ±8,16 ^a	370,51 ±15,13 ^c	186,44 ±8,70 ^b	15,90 ±3,32 ^a	625,76 ±47,54 ^c	322,00 ±28,19 ^b	49,61 ±8,54 ^a	140,87 ±28,16 ^b	376,85 ±36,23 ^c	55,05 ±9,38 ^a	534,21 ±91,34 ^c	296,41 ±24,75 ^b
α-φαρνεσένιο	8,59 ±0,34 ^a	94,30 ±3,19 ^c	79,08 ±3,10 ^b	8,67 ±0,86 ^a	80,99 ±13,02 ^b	66,87 ±8,24 ^b	16,08 ±3,22 ^a	50,67 ±11,54 ^b	59,69 ±7,11 ^b	31,64 ±8,56 ^a	128,44 ±10,92 ^c	94,42 ±7,35 ^b
Σύνολο	40,94 ±8,50^a	464,81 ±18,32^c	265,52 ±11,80^b	24,56 ±4,18^a	706,76 ±60,56^c	388,87 ±36,43^b	65,70 ±11,76^a	191,54 ±39,70^b	436,55 ±43,34^c	86,69 ±17,94^a	662,65 ±102,26^c	390,83 ±32,10^b

Οι εστέρες ευθύγραμμης αλυσίδας συντίθενται από λιπίδια μεμβρανών. Τα υδροϋπεροξείδια που προκύπτουν από αυτές τις αντιδράσεις μετατρέπονται σε αλδεΐδες, μετά σε αλκοόλες και τέλος σε εστέρες. Οι οξικοί εστέρες και τα οξέα παράγονται επίσης μέσω των διαφορετικών μονοπατιών για τα οποία είναι υπεύθυνα τα ένζυμα των LAB (Tufariello et al., 2015). Οι εστέρες, που γενικά χαρακτηρίζονται από φρουτώδεις νότες, βρέθηκαν σε συγκέντρωση 10 φορές μεγαλύτερη στις ελιές Κονσερβολιά σε σύγκριση με τις ελιές Καλαμών. Ο οξικός αιθυλεστέρας ήταν ο επικρατέστερος εστέρας σε όλα τα στάδια ζύμωσης και για όλες τις μεταχειρίσεις των δύο ποικιλιών.



Σχήμα 4.2.8: Ημιοποτικοποίηση εστέρων μέσω ανάλυσης με SPME/GC-MS στον καρπό των ποικιλιών Κονσερβολιά (Α) και Καλαμών (Β). LY: διαδοχικός εμβολιασμός με γαλακτικό βακτήριο και ακολούθως με ζύμη, YL: διαδοχικός

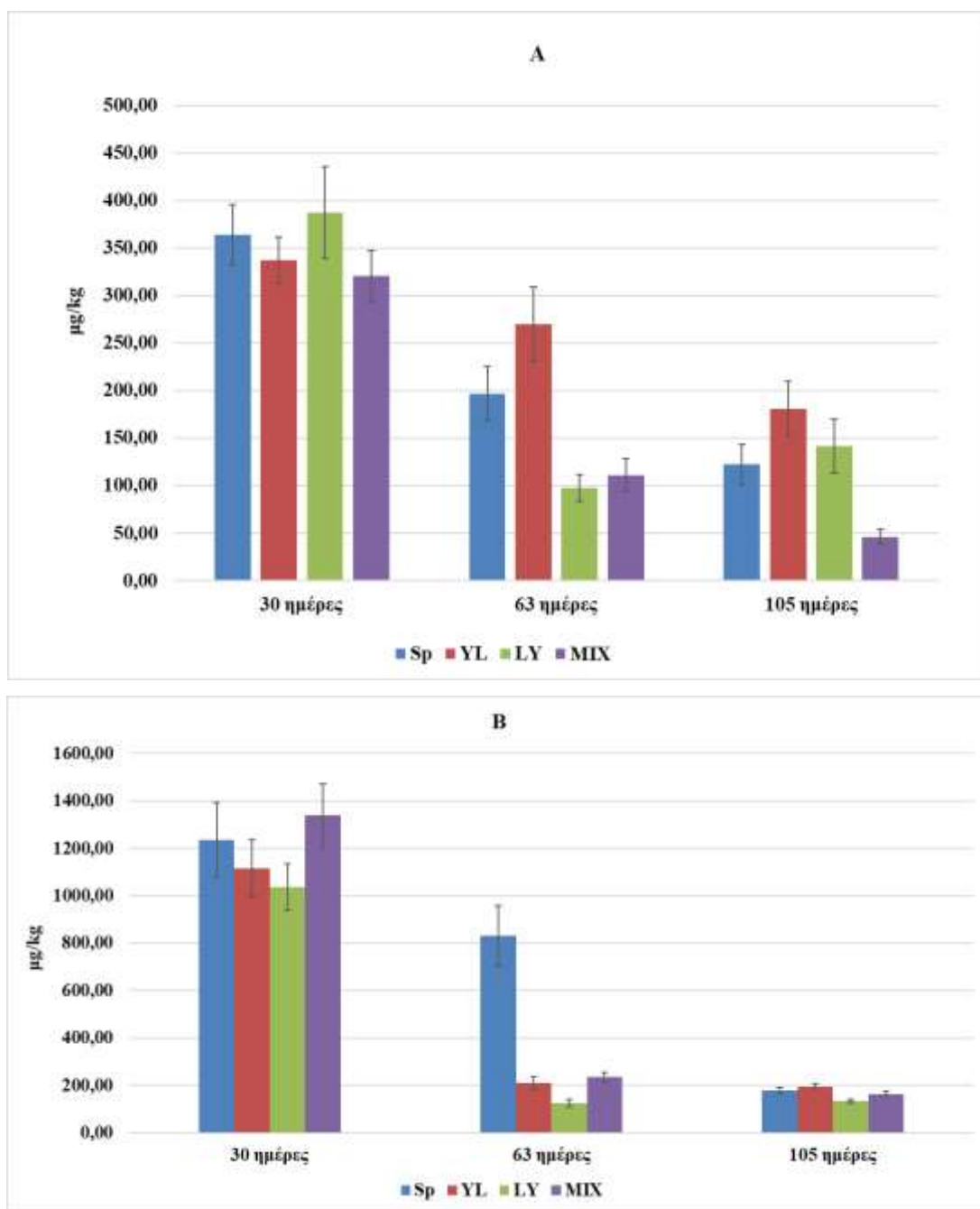
εμβολιασμός με ζύμη και ακολούθως με γαλακτικό βακτήριο, MIX: ταυτόχρονος εμβολιασμός ζύμης και γαλακτικού βακτηρίου, Sp: αυθόρμητη ζύμωση.

Η αρχική (στις 30 ημέρες) ποσότητα των εστέρων (Σχήμα 4.2.8) μειώθηκε ($p < 0,05$) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και για τις δυο ποικιλίες ελιάς όλων των μεταχειρίσεων.

Προς το τέλος της ζύμωσης (105^η ημέρα), οι μεταχειρίσεις YL οδήγησαν σε υψηλότερη ($p < 0,05$) ποσότητα εστέρων σε σύγκριση με εκείνες των υπόλοιπων διεργασιών (Sp, LY και MIX) για την Κονσερβολιά. Οι ποσότητες των αντίστοιχων εστέρων για τις ελιές Καλαμών ήταν υψηλότερες ($p < 0,05$) στις μεταχειρίσεις YL και MIX. Οι οξικοί εστέρες των ανώτερων αλκοολών κυριάρχησαν έναντι των αιθυλεστέρων των λιπαρών οξέων και στις δύο ποικιλίες. Ο οξικός αιθυλεστέρας, ο κύριος εστέρας που εντοπίζεται και στις δύο ποικιλίες σχετίζεται με γλυκές, αρωματικές νότες.

Οι αλδεϋδες είναι πολύ σημαντικές ενώσεις στα φρούτα και στα κηπευτικά και συμβάλλουν στη χαρακτηριστική φυλλώδη γεύση και άρωμα του προϊόντος. Η εξανάλη, μια χαρακτηριστική αλδεϋδη, σχηματίζεται κατά την ανάπτυξη του καρπού της ελιάς μέσω του μονοπατιού της λιποξυγενάσης (Malheiro et al., 2011). Οι αλδεϋδες (Σχήμα 4.2.9) βρέθηκαν σε υψηλότερες ποσότητες ($p < 0,05$) στις ελιές Καλαμών σε σύγκριση με τις ελιές Κονσερβολιάς. Η αρχική (30 ημέρες) ποσότητα των αλδεϋδών μειώθηκε ($p < 0,05$) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης τόσο και για τις δυο ποικιλίες όσο και για τις εφαρμοζόμενες μεταχειρίσεις. Προς το τέλος της ζύμωσης (105^η ημέρα), η συνολική ποσότητα αλδεϋδών ήταν χαμηλότερη ($p < 0,05$) στα δείγματα YL, LY και MIX σε σύγκριση με την αυθόρμητη ζύμωση. Οι αλδεϋδες έχουν συσχετιστεί με τα πρώιμα στάδια της διαδικασίας της ζύμωσης για τις ποικιλίες Κονσερβολιά και Καλαμών (Bleve et al., 2015).

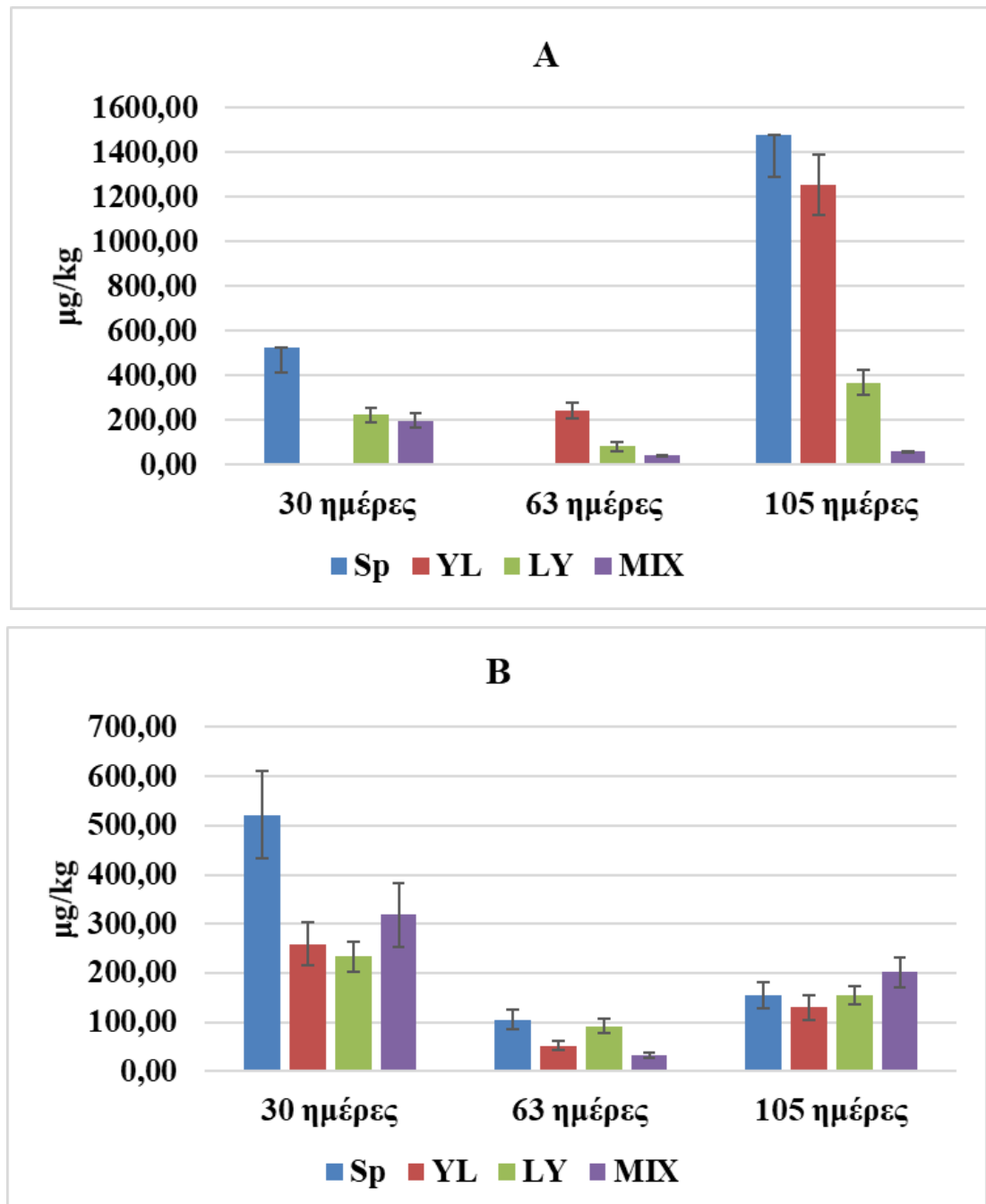
Οι κετόνες είναι γνωστές ως δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης της αποδόμησης των λιπαρών οξέων και τον σχηματισμό υδροϋπεροξειδίων οδηγώντας στην ανάπτυξη δυσάρεστων γεύσεων και οσμών (Richards et al., 2005). Ο σχηματισμός των κετονών ποικίλει ανάλογα με την ποικιλία ελιάς, το στάδιο της ζύμωσης και την ειδική επεξεργασία, χωρίς να έχει καταγραφεί κάποια συγκεκριμένη τάση. Προς το τέλος της ζύμωσης (105^η ημέρα) στις μεταχειρίσεις Sp και YL βρέθηκε η υψηλότερη ποσότητα κετονών (Σχήμα 4.2.10) στην Κονσερβολιά. Αναφορικά με την ποικιλία Καλαμών, η συγκέντρωση των κετονών ήταν παρόμοια για όλες τις μεταχειρίσεις.



Σχήμα 4.2.9: Ημιποσοτικοποίηση αλδεϋδών μέσω ανάλυσης με SPME/GC-MS στον καρπό των ποικιλιών Κονσερβολιά (Α) και Καλαμών (Β). LY: διαδοχικός εμβολιασμός με γαλακτικό βακτήριο και ακολούθως με ζύμη, YL: διαδοχικός εμβολιασμός με ζύμη και ακολούθως με γαλακτικό βακτήριο, MIX: ταυτόχρονος εμβολιασμός ζύμης και γαλακτικού βακτηρίου, Sp: αυθόρμητη ζύμωση.

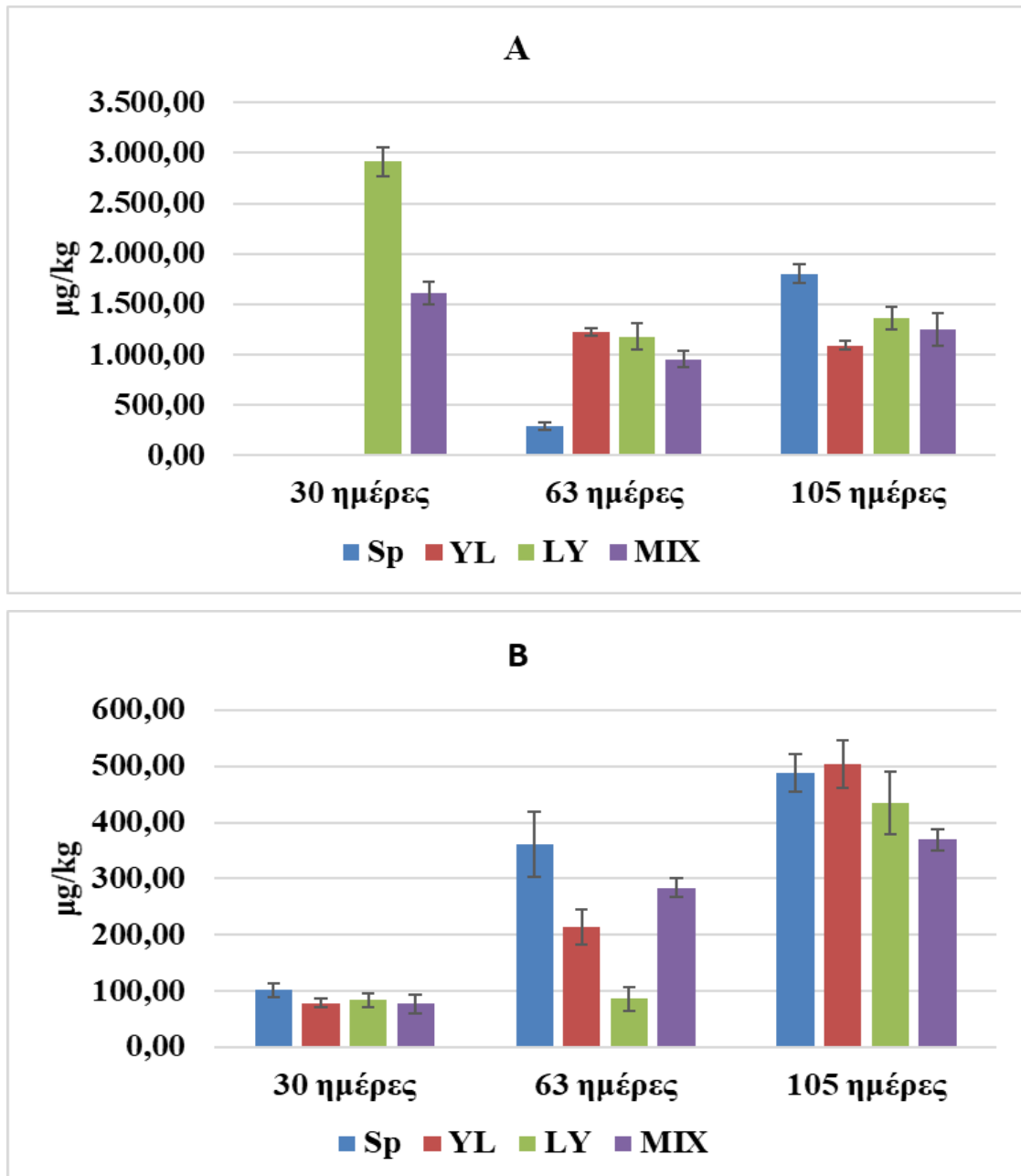
Τα οξέα (με κυριότερο το οξικό οξύ) και οι αλκοόλες είναι σημαντικά πτητικά προϊόντα των εμπορικών επιτραπέζιων ελιών που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης από βακτήρια γαλακτικού οξέος και ζυμομύκητες. Τέτοιες ενώσεις

παράγονται μέσω διαφόρων βιοχημικών οδών. Τα οξέα (Σχήμα 4.2.11) της παρούσας μελέτης ανιχνεύτηκαν σε σημαντικά υψηλότερα ποσοστά ($p<0.05$) στις ελιές Κονσερβολιά σε σύγκριση με τις ελιές Καλαμών. Το οξικό οξύ ήταν το επικρατέστερο οξύ σε όλα τα στάδια της ζύμωσης για όλες τις μεταχειρίσεις και στις δύο ποικιλίες.



Σχήμα 4.2.10: Ημιοσοτικοποίηση κετονών μέσω ανάλυσης με SPME/GC-MS στον καρπό των ποικιλιών Κονσερβολιά (A) και Καλαμών (B). LY: διαδοχικός εμβολιασμός με γαλακτικό βακτήριο και ακολούθως με ζύμη, YL: διαδοχικός εμβολιασμός με ζύμη και ακολούθως με γαλακτικό βακτήριο, MIX: ταυτόχρονος εμβολιασμός ζύμης και γαλακτικού βακτηρίου, Sp: αυθόρμητη ζύμωση.

Η αρχική (30 ημέρες) ποσότητα οξικού οξέος αυξήθηκε ($p<0,05$) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης σε σχέση με την ποικιλία αλλά και σε σχέση με τη μεταχείριση. Προς το τέλος της ζύμωσης (105^η ημέρα) της ποικιλίας Κονσερβολιάς, η αυθόρμητη ζύμωση επέδειξε την υψηλότερη ($p<0,05$) ποσότητα οξικού οξέος σε σύγκριση με τις μεταχειρίσεις (YL, LY και MIX). Οι αντίστοιχες ποσότητες οξικού οξέος στην ποικιλία Καλαμών ήταν παρόμοιες για όλες τις μεταχειρίσεις.



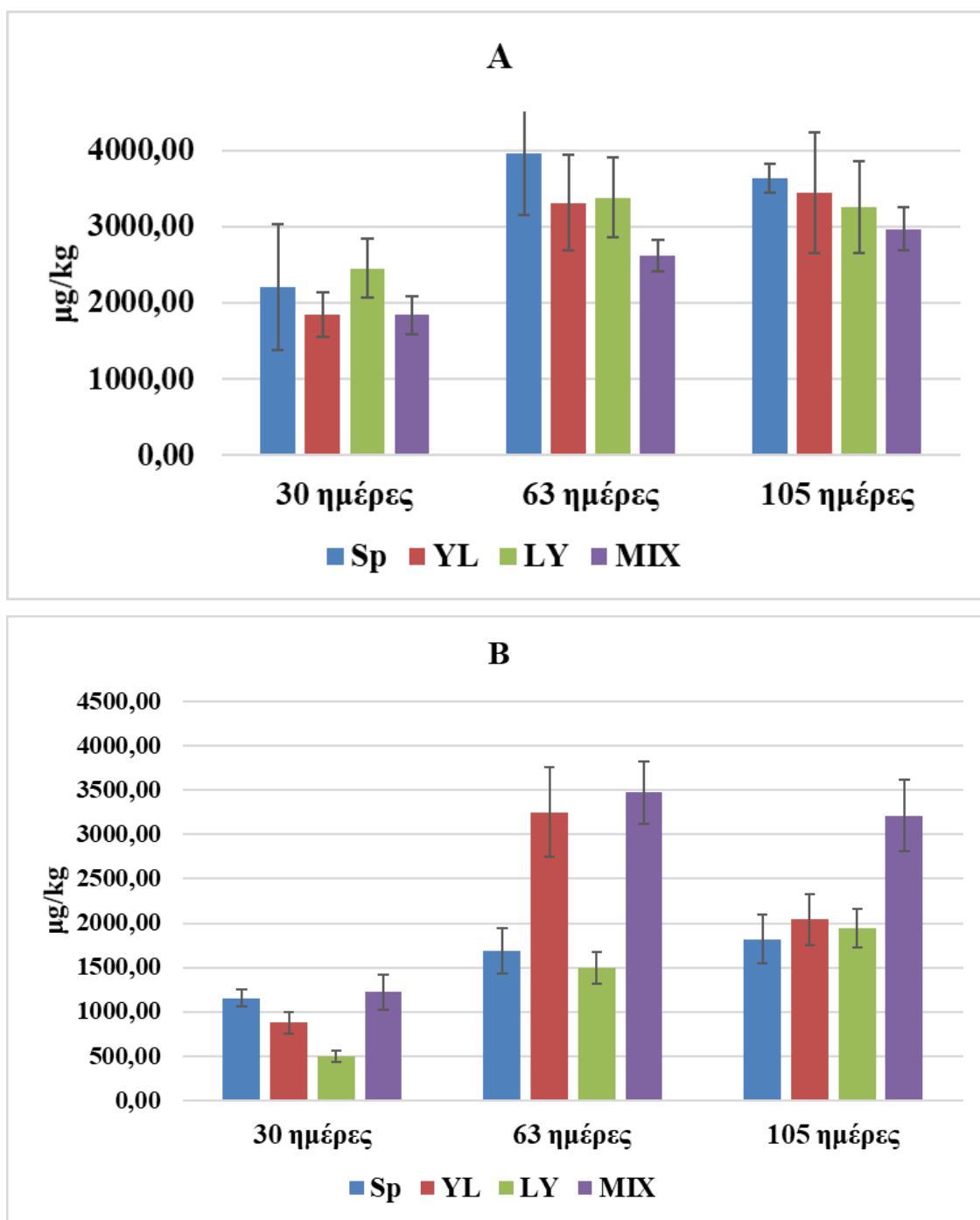
Σχήμα 4.2.11: Ημιποσοτικοποίηση οξέων μέσω ανάλυσης με SPME/GC-MS στον καρπό των ποικιλιών Κονσερβολιά (A) και Καλαμών (B). LY: διαδοχικός εμβολιασμός με γαλακτικό βακτήριο και ακολούθως με ζύμη, YL: διαδοχικός

εμβολιασμός με ζύμη και ακολούθως με γαλακτικό βακτήριο, MIX: ταυτόχρονος εμβολιασμός ζύμης και γαλακτικού βακτηρίου, Sp: αυθόρμητη ζύμωση.

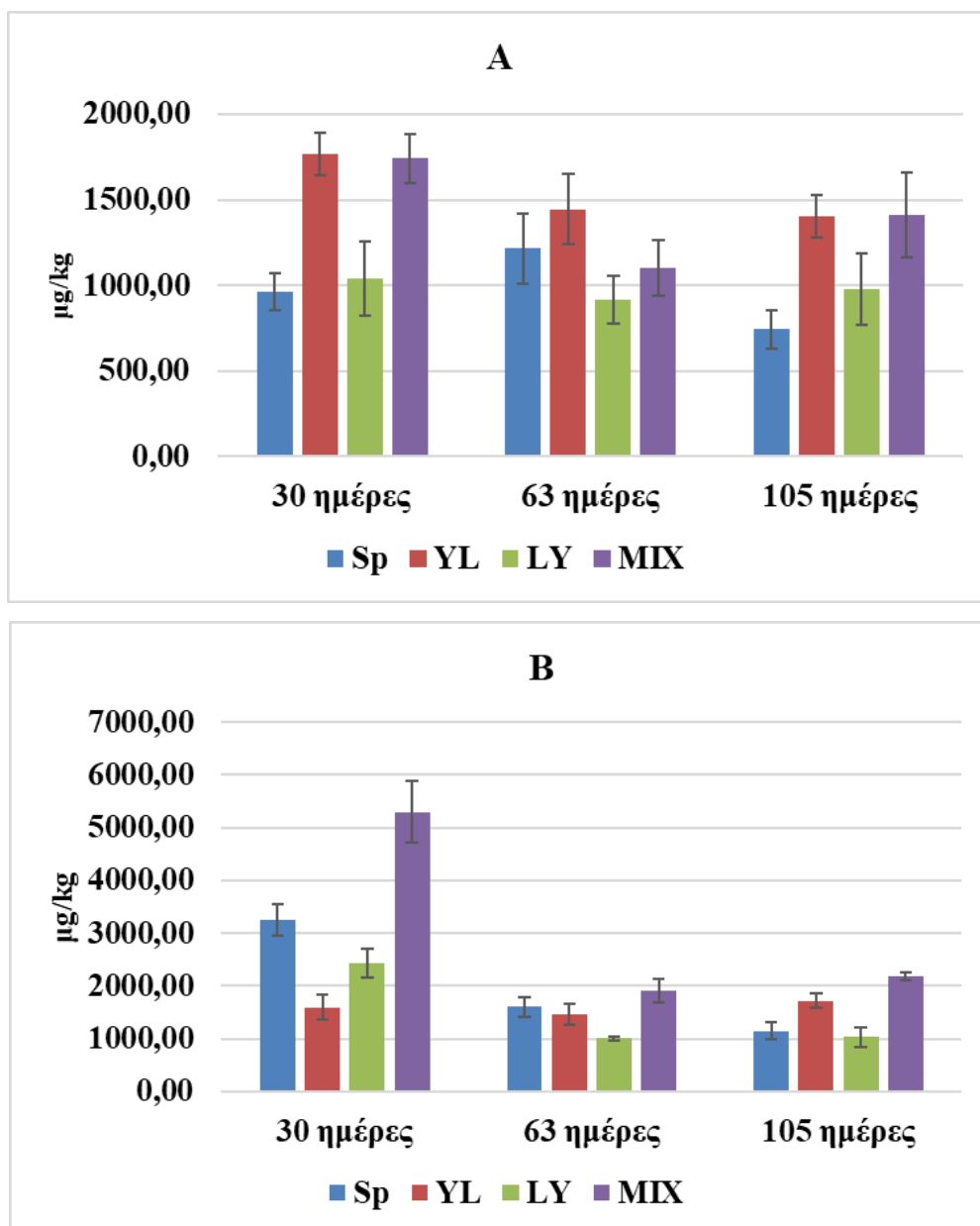
Οι αλκοόλες είναι υποπροϊόντα πολλών διαφορετικών μονοπατιών, όπου εμπλέκονται οι αλδεΐδες. Μόλις σχηματιστούν, οι αλδεΐδες υφίστανται μια σειρά ενζυμικών μετασχηματισμών που καταλύονται από τις ισομεράσες και τις αλκοολικές αφυδρογονάσες, σχηματίζοντας C6 αλκοόλες (Malheiro et al., 2011). Οι ανώτερες αλκοόλες συνδέονται γενικά με τις γλυκές κρασώδεις νότες. Στην Κονσερβολία, οι αλκοόλες (Σχήμα 4.2.12) ήταν περισσότερες ($p < 0,05$) σε σύγκριση με τις ελιές Καλαμών. Η αρχική (30 ημέρες) ποσότητα αλκοολών αυξήθηκε ($p < 0,05$) κατά τη ζύμωση και για τις δυο ποικιλίες. Η αιθανόλη ήταν η επικρατέστερη αλκοόλη σε όλες τις μεταχειρίσεις και των δύο ποικιλιών.

Προς το τέλος της ζύμωσης (105η ημέρα) της ποικιλίας Κονσερβολία, σε όλες τις μεταχειρίσεις ανιχνεύτηκε παρόμοια ποσότητα αλκοολών. Από την άλλη πλευρά, στην ποικιλία Καλαμών οι αλκοόλες ήταν υψηλότερες ($p < 0,05$) στη μεταχείριση με MIX, σε σύγκριση με όλες τις άλλες μεταχειρίσεις, οι οποίες εξέφρασαν παρόμοιες χαμηλές τιμές. Σε μια μελέτη, που πραγματοποιήθηκε από τους Sabatini et al. (2008), σε ποικιλίες επιτραπέζιων ελιών Moresca και Καλαμών, που έχουν υποστεί ζύμωση με *L. plantarum*, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τόσο τα εμβολιασμένα όσο και τα μη εμβολιασμένα δείγματα υπέστησαν μικτή ζύμωση (ετερογαλακτική και αλκοολική) που οδήγησε στην παραγωγή υψηλών ποσοτήτων αιθανόλης, οξικού οξέος, αλλά και άλλων αλκοολών και εστέρων (Sabatini et al., 2008).

Στην Καλαμών βρέθηκαν μεγαλύτερες ποσότητες υδρογονανθράκων ($p < 0,05$) (Σχήμα 4.2.13) σε σύγκριση με την Κονσερβολία. Το οκτάνιο και το 1,3,5,7-κυκλοοκτατετραένιο ήταν οι επικρατέστεροι υδρογονάνθρακες για την Κονσερβολία και την Καλαμών, αντίστοιχα. Το n-οκτάνιο παράγεται από την αποδόμηση του 10-υδροϋπεροξειδίου του ελαϊκού οξέος και πιθανώς από την ισοαμυλική αλκοόλη που σχηματίστηκε κατά τη ζύμωση (Vossen, 2007). Η αρχική (30 ημέρες) ποσότητα των υδρογονανθράκων μειώθηκε ($p < 0,05$) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης τόσο σε σχέση με την ποικιλία της ελιάς όσο και σε σχέση με τη μεταχείριση, με εξαίρεση τη μεταχείριση YL, που παρουσίαζε σταθερή περιεκτικότητα σε υδρογονάνθρακες καθόλη την επεξεργασία.



Σχήμα 4.2.12: Ημιποσοτικοποίηση αλκοολών μέσω ανάλυσης με SPME/GC-MS στον καρπό των ποικιλιών Κονσερβολιά (Α) και Καλαμών (Β). LY: διαδοχικός εμβολιασμός με γαλακτικό βακτήριο και ακολούθως με ζύμη, YL: διαδοχικός εμβολιασμός με ζύμη και ακολούθως με γαλακτικό βακτήριο, MIX: ταυτόχρονος εμβολιασμός ζύμης και γαλακτικού βακτηρίου, Sp: αυθόρμητη ζύμωση.



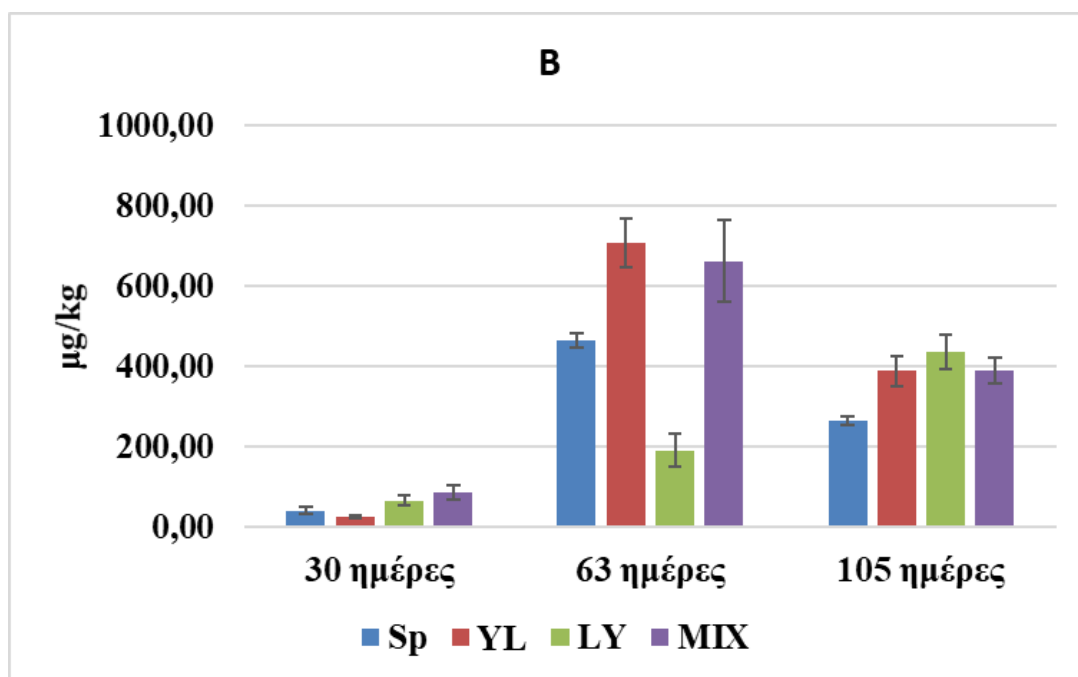
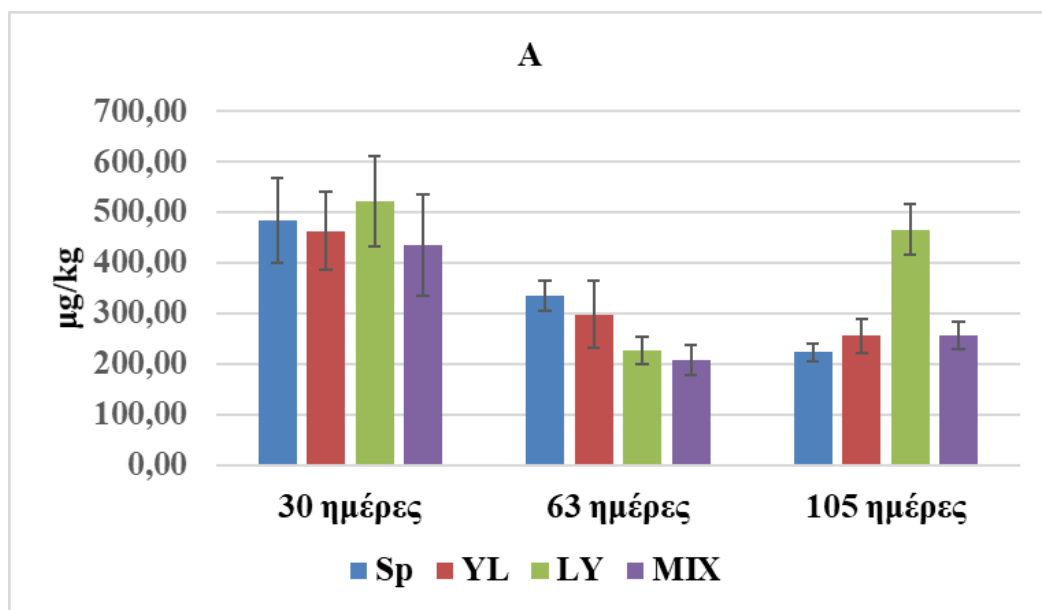
Σχήμα 4.2.13: Ημιποσοτικοποίηση υδρογονανθράκων μέσω ανάλυσης με SPME/GC-MS στον καρπό των ποικιλιών Κονσερβολιά (A) και Καλαμών (B). LY: διαδοχικός εμβολιασμός με γαλακτικό βακτήριο και ακολούθως με ζύμη, YL: διαδοχικός εμβολιασμός με ζύμη και ακολούθως με γαλακτικό βακτήριο, MIX: ταυτόχρονος εμβολιασμός ζύμης και γαλακτικού βακτηρίου, Sp: αυθόρμητη ζύμωση.

Τέλος, τα τερπένια ταξινομούνται ως δευτερογενείς μεταβολίτες, των οποίων οι λειτουργίες μπορεί να είναι οικολογικές, παρέχοντας άμυνα έναντι των φυτοφάγων ζώων ή παθογόνων, προσελκύοντας ζώα που διασκορπίζουν τη γύρη και τους σπόρους ή αναστέλλοντας τη βλάστηση γειτονικών φυτών. Σχετίζονται στενά με την ποικιλία, τη γεωγραφική περιοχή, τις κλιματικές συνθήκες και τον πολλαπλασιασμό συγκεκριμένων παρασίτων και μικροοργανισμών (Boskou and Clodoveo. 2016). Τα

τερπένια προέρχονται κυρίως από τον καρπό της ελιάς και σχηματίζονται είτε μέσω του μονοπατιού του μεβαλονικού οξέος (mevalonic acid - MVA pathway) είτε μέσω του μονοπατιού της φωσφορικής μεθυλ-ερυθριτόλης (2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate/1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate pathway -MEP/DOXP pathway). Επίσης, μικρές ποσότητες τερπενίων μπορούν να σχηματιστούν μέσω της ζύμωσης των ζυμομυκήτων. Τα τερπένια συνδέονται με νότες ανθέων σε φρούτα και λαχανικά. Τα τερπένια (Σχήμα 4.2.14) στην παρούσα εργασία ήταν υψηλότερα ($p < 0,05$) στις ελιές Κονσερβολιάς σε σύγκριση με τις ελιές Καλαμών. Η αρχική (30 ημέρες) ποσότητα τερπενίων μειώθηκε ($p < 0,05$) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης στις ελιές Κονσερβολιάς σε όλες τις μεταχειρίσεις, ενώ στις ελιές Καλαμών παρατηρήθηκε μια αντίθετη τάση (Tufariello et al., 2019).

Πτητικές ενώσεις, όπως η 2-μεθυλοβουτανάλη, η 3-μεθυλοβουτανάλη, η εξανάλη, η εξανόλη, η εννεανάλη και η 2-μεθυλ προπανάλη, μπορεί να συνδέονται με το πρώτο και το μεσαίο στάδιο της ζύμωσης (30–60 ημέρες), περίοδος όπου επικρατούν οι ζυμομύκητες. Οι εστέρες, τα οξικά και τα λιπαρά οξέα συνδέονται στενά με το τελικό στάδιο της ζύμωσης (105 ημέρες), περίοδος που επικρατούν τα γαλακτικά βακτήρια (Sabatini et al., 2008). Οι ομάδες των πτητικών ενώσεων που ανιχνεύτηκαν υποδηλώνουν την αλληλεπίδραση των δύο κυρίαρχων μικροβιακών μεταβολισμών, των ζυμομυκήτων και των βακτηρίων. Ο διαδοχικός εμβολιασμός τους επηρέασε το πτητικό προφίλ του προϊόντος και δημιούργησε ένα πιο πολύπλοκο άρωμα. Όσον αφορά το ρόλο και των δύο καλλιιεργειών εκκίνησης και των διαφορετικών μεθόδων εμβολιασμού που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη, τα δείγματα YL και LY της Κονσερβολιάς, στο τέλος της επεξεργασίας, έδειξαν επίπεδα εστέρων παρόμοια ή υψηλότερα από αυτά της αυθόρμητης ζύμωσης. Η ίδια συμπεριφορά καταγράφηκε και για τις αλκοόλες.

Στις ελιές Καλαμών, στο τέλος της ζύμωσης, τα MIX δείγματα παρουσίασαν επίπεδα εστέρων, αλκοολών, υδρογονανθράκων και τερπενίων, που ήταν υψηλότερα από ό,τι στην αυθόρμητη ζύμωση, υποδεικνύοντας έτσι, ότι οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν σε θέση να βελτιώσουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος.



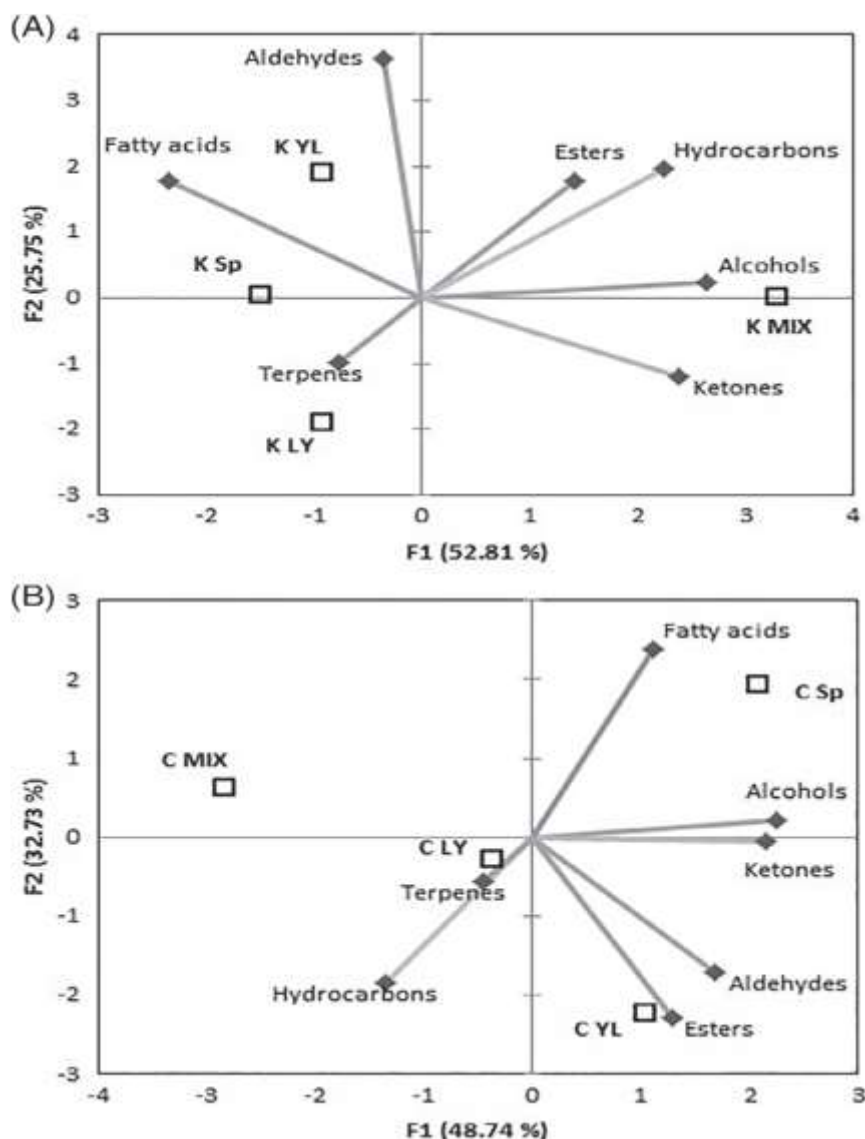
Σχήμα 4.2.14: Ημιποσοτικοποίηση τερπενίων μέσω ανάλυσης με SPME/GC-MS στον καρπό των ποικιλιών Κονσερβολιά (A) και Καλαμών (B). LY: διαδοχικός εμβολιασμός με γαλακτικό βακτήριο και ακολούθως με ζύμη, YL: διαδοχικός εμβολιασμός με ζύμη και ακολούθως με γαλακτικό βακτήριο, MIX: ταυτόχρονος εμβολιασμός ζύμης και γαλακτικού βακτηρίου, Sp: αυθόρμητη ζύμωση.

4.2.6 Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών

Η ανάλυση των κύριων συνιστωσών εφαρμόστηκε στις πτητικές ενώσεις που παρήχθησαν στο τέλος των διαφόρων μεταχειρίσεων και για τις δύο ποικιλίες ελιάς. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης απεικονίζονται γραφικά στα Σχήματα 4.2.15 (A, B). Το Σχήμα A είναι τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την αυθόρμητη και τα

εμβολιασμένα δοχεία και αφορά τις ελιές Καλαμών. Στην περίπτωση αυτή, οι 2 κύριες συνιστώσες (PC) εξηγούν το 78,56 % της διακύμανσης. Το δείγμα που υποβλήθηκε σε επεξεργασία με τη μικτή καλλιέργεια ζυμών και γαλακτικών βακτηρίων (K MIX) εντοπίστηκε στο τμήμα της γραφικής παράστασης που χαρακτηρίζεται από την παρουσία εστέρων, κετονών, αλκοολών και υδρογονανθράκων. Το δείγμα K LY συσχετίστηκε κυρίως με τερπένια, ενώ το δείγμα K YL δεν ήταν δυνατόν να διαχωριστεί από το δείγμα της αυθόρμητης ζύμωσης, που χαρακτηρίζεται κυρίως από λιπαρά οξέα και αλδεΐδες.

Η συνολική διακύμανση των δύο κύριων συνιστωσών για τα δείγματα Κονσερβολιάς ήταν 81,47 % (Σχημα 4.2.15 (B)). Το δείγμα που προέρχεται από διαδοχικό εμβολιασμό πρώτα ζύμης, και στη συνέχεια με LAB (C YL), συσχετίστηκε με μεγαλύτερη παραγωγή εστέρων, κετονών και αλδεϋδών. Τα άλλα δείγματα, C LY (εμβολιασμός πρώτα με LAB και μετά με ζύμη) και το αυθόρμητο (C Sp) χαρακτηρίζονταν κυρίως από τερπένια και υδρογονάνθρακες, και από λιπαρά οξέα και αλκοόλες, αντίστοιχα. Το δείγμα MIX (C MIX) δεν συσχετίστηκε με κάποια συγκεκριμένη κατηγορία πτητικών.

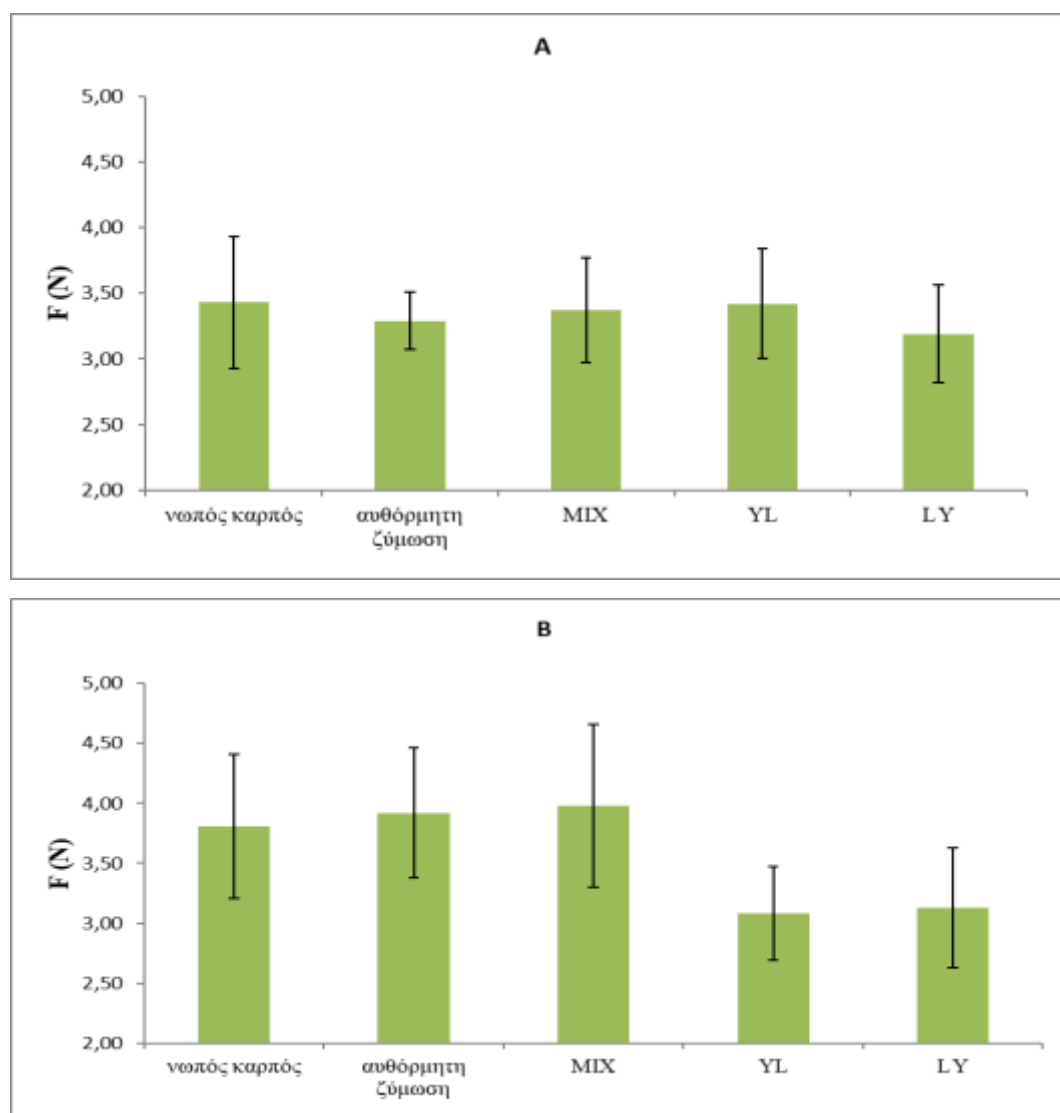


Σχήμα 4.2.15 Γραφική απεικόνιση των πτητικών ενώσεων με ανάλυση κύριων συνιστωσών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε δυο διαστάσεις (PC1-PC2). (A) Καλαμών και (B) Κονσερβολιά. (C: Κονσερβολιά, K: Καλαμών, Sp: αυθόρμητη). LY: διαδοχικός εμβολιασμός με γαλακτικό βακτήριο και ακολούθως με ζύμη, YL: διαδοχικός εμβολιασμός με ζύμη και ακολούθως με γαλακτικό βακτήριο, MIX: ταυτόχρονος εμβολιασμός ζύμης και γαλακτικού βακτηρίου, Sp: αυθόρμητη ζύμωση.

4.2.7 Συνεκτικότητα καρπού

Η επίδραση των διάφορων μεταχειρίσεων στη συνεκτικότητα του καρπού της ελιάς στο τέλος της ζύμωσης φαίνεται στο Σχήμα 4.2.16. Οι τιμές της συνεκτικότητας για τις ελιές Καλαμών και Κονσερβολιά δεν εμφάνισαν σημαντικές διαφορές ($p > 0,05$) μεταξύ των δειγμάτων. Προηγούμενες μελέτες ανέφεραν ότι η επεξεργασία των ελιών μπορεί να επηρεάσει τους πολυσακχαρίτες του κυτταρικού τοιχώματος και ειδικότερα, η χρησιμοποιούμενη άλμη μπορεί να συμβάλλει θετικά στη

σταθεροποίηση και τη βιοσύνθεσή τους (Mafra et al., 2006). Από την άλλη πλευρά, η αλκαλική επεξεργασία του καρπού είναι δυνατόν να προκαλέσει υποβάθμιση των κυτταρικών τοιχωμάτων λόγω της γενικευμένης απώλειας πηκτικών και ημικυτταρινικών πολυσακχαριτών και της κυτταρίνης, λόγω διάσπασης των εστερικών δεσμών και των δεσμών υδρογόνου, διευκολύνοντας έτσι τον διαχωρισμό του κυτταρικού τοιχώματος και το μαλάκωμα (Mafra et al., 2007).



Σχήμα 4.2.16: Επίδραση των εμβολίων (105^η ημέρα) στη συνεκτικότητα του καρπού των επιτραπέζιων ελιών Κονσερβολιά (A) και Καλαμών (B). Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως τη μέγιστη δύναμη (F, σε Newton) που απαιτείται για τη διάτρηση της επιδερμίδας του καρπού και τυπική απόκλιση (SD). LY: διαδοχικός εμβολιασμός με γαλακτικό βακτήριο και ακολούθως με ζύμη, YL: διαδοχικός εμβολιασμός με ζύμη και ακολούθως με γαλακτικό βακτήριο, MIX: ταυτόχρονος εμβολιασμός ζύμης και γαλακτικού βακτηρίου, Sp: αυθόρμητη ζύμωση.

Σχετικά με την επίδραση της καλλιέργειας εκκίνησης στη συνεκτικότητα, οι (Marsilio et al., 2006) ανέφεραν ότι οι άλμες που εμβολιάστηκαν με *L. plantarum* δεν υπέστησαν κάποια μεταβολή στα χαρακτηριστικά της υφής του τελικού προϊόντος σε σύγκριση με τις μη εμβολιασμένες ελιές. Αντιθέτως, πιο συνεκτικές και ελαστικές ελιές περιγράφηκαν από το (Campus et al., 2015) χρησιμοποιώντας ως καλλιέργεια εκκίνησης ένα μείγμα στελεχών που ανήκουν στο είδος *L. pentosus*.

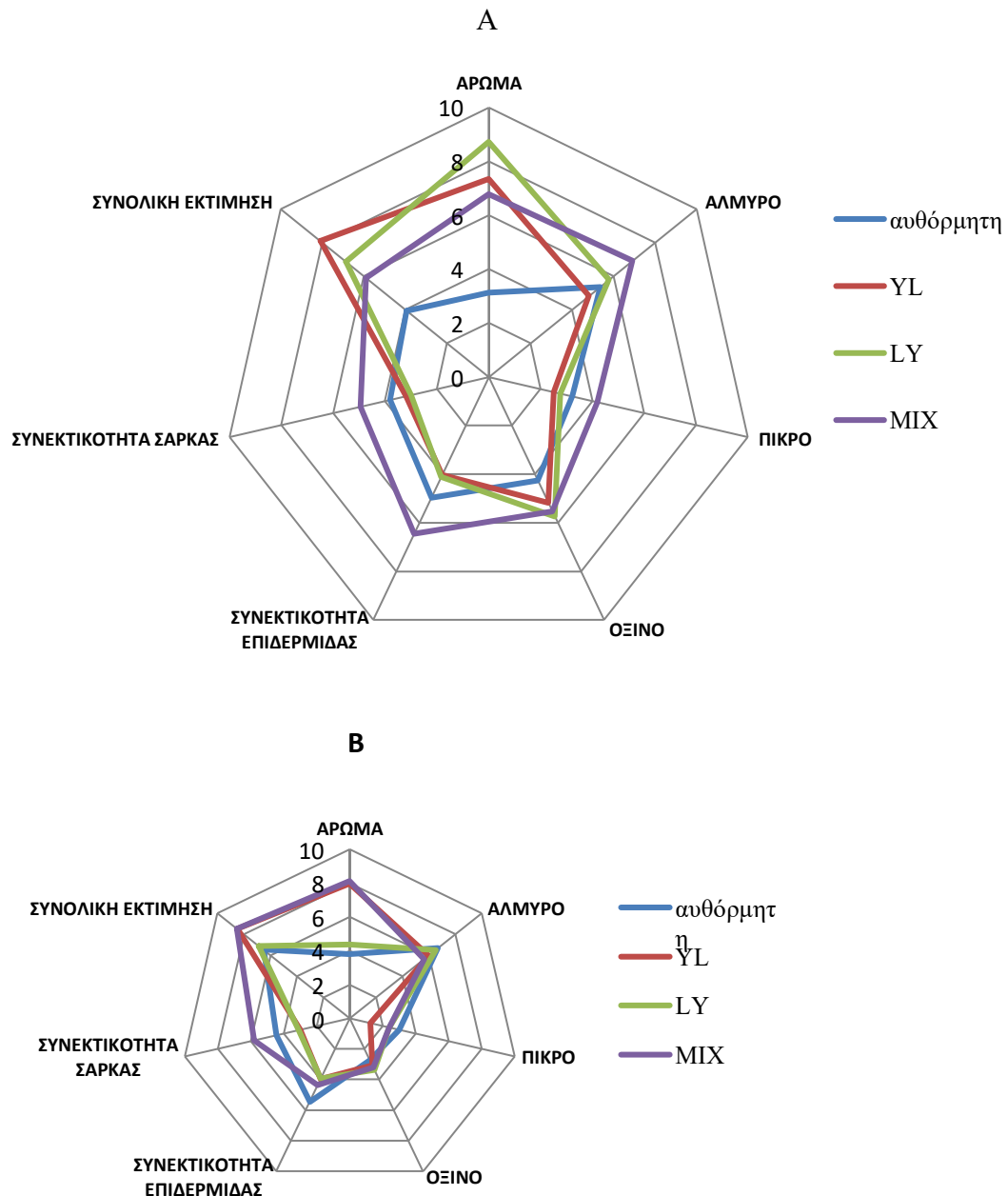
4.2.8 Οργανοληπτική αξιολόγηση

Τα αποτελέσματα της οργανοληπτικής αξιολόγησης όλων των δειγμάτων μετά από 105 ημέρες ζύμωσης παρουσιάζονται στο Σχήμα 4.2.17. Στο τέλος της δειγματοληψίας, όλες οι επιτραπέζιες ελιές είχαν εκπικρανθεί πλήρως και συνεπώς ήταν βρώσιμες. Ωστόσο, έλαβαν βαθμολογίες από τους δοκιμαστές που είχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές από το δείγμα της αυθόρμητης ζύμωσης, το οποίο χαρακτηρίστηκε ως το πιο πικρό και για τις δύο ποικιλίες.

Μεταξύ των δειγμάτων της ποικιλίας Καλαμών, η μεταχείριση YL και MIX οδήγησε στο πιο αρωματικό και πιο αποδεκτό προϊόν, ενώ το πιο αρωματικό προϊόν της ποικιλίας Κονσερβολιά ελήφθη με τη μεταχείριση LY ενώ μεγαλύτερη βαθμολογία όσον αφορά στη γενική εκτίμηση έλαβε το δείγμα YL. Τα δείγματα δεν παρουσίασαν διαφορές που αφορούσαν στην αλατότητα, επειδή οι ελιές βυθίστηκαν στο ίδιο διάλυμα άλμης. Όσον αφορά στην ογκομετρούμενη οξύτητα, και για τις δύο ποικιλίες, οι εμβολιασμένες ελιές παρουσίασαν σημαντικές ($p < 0,05$) διαφορές σε σύγκριση με τα μη εμβολιασμένα δείγματα, τα οποία ήταν γενικά πιο όξινα. Τέλος, η περιγραφή της σκληρότητας έλαβε τη χαμηλότερη βαθμολογία για τα δείγματα στα οποία πραγματοποιήθηκαν διαδοχικοί εμβολιασμοί (YL και LY).

Συνολικά, οι εκκινητές κατάφεραν να επιδράσουν στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των επιτραπέζιων ελιών και να βελτιώσουν την ποιότητα του τελικού προϊόντος, δεδομένου ότι στις περισσότερες περιπτώσεις, η βαθμολογία των εμβολιασμένων δειγμάτων ήταν σημαντικά υψηλότερη από αυτή των μη εμβολιασμένων. Ειδικότερα, ο διαδοχικός εμβολιασμός με τον *S. cerevisiae* KI 30–16 ακολουθούμενο από τον *L. mesenteroides* K T5-1 αλλά και η μικτή καλλιέργεια αυτών, οδήγησε στο πιο αρωματικό και πιο αποδεκτό προϊόν ελιάς Καλαμών, ενώ οι πιο αρωματικές ελιές Κονσερβολιάς ελήφθησαν με τη μεταχείριση LY. Οι ελιές που έλαβαν μεγαλύτερη βαθμολογία ως προς τη γενική εκτίμηση ήταν οι ελιές YL. Οι

Hurtado et al., (2010) παρατήρησαν ότι μεταξύ της χρήσης μεμονωμένων στελεχών *L. pentosus* ή σε συνδυασμό με τον *C. diddensiae* για την παραγωγή επιτραπέζιων ελιών Arbequina, οι συμμετέχοντες του πάνελ προτίμησαν τις ελιές που ζυμώθηκαν από το στέλεχος LAB, ενώ δεν ήταν σαφές εάν η παρουσία του *C. diddensiae* μπορούσε να βελτιώσει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά αυτή της ποικιλίας.



Σχήμα 4.2.17: Αραχνοδιάγραμμα οργανοληπτικής αξιολόγησης για τις διαφορετικές

μεταχειρίσεις που εφαρμόστηκαν στις επιτραπέζιες ελιές Κονσερβολιά (α) και Καλαμών (β) την 105^η ημέρα της ζύμωσης. LY: διαδοχικός εμβολιασμός με γαλακτικό βακτήριο και ακολούθως με ζύμη, YL: διαδοχικός εμβολιασμός με ζύμη και ακολούθως με γαλακτικό βακτήριο, MIX: ταυτόχρονος εμβολιασμός ζύμης και γαλακτικού βακτηρίου.

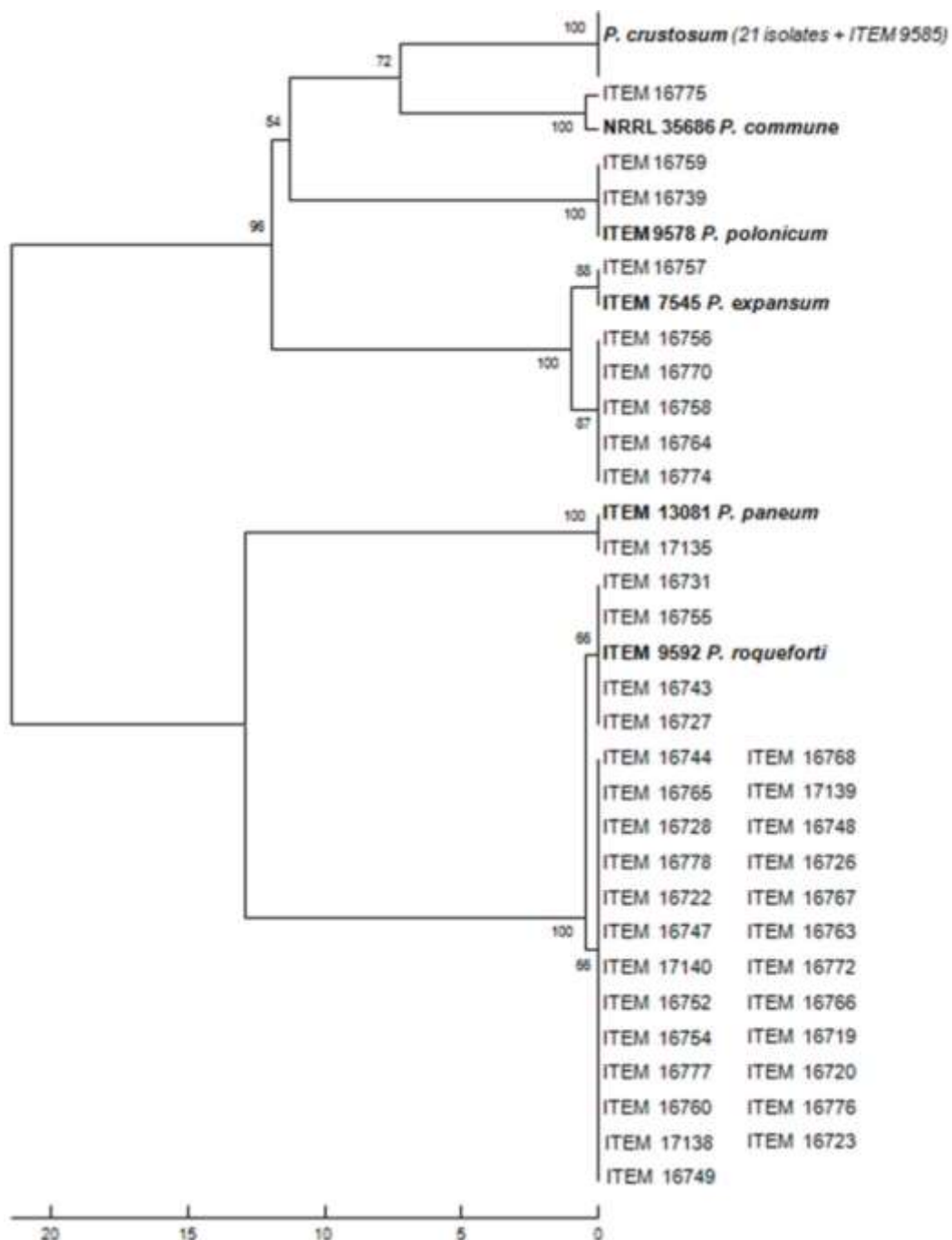
4.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΜΥΚΗΤΩΝ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΙΣ ΜΑΥΡΕΣ ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΕΣ ΕΛΙΕΣ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΥΠΟΣΤΕΙ ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ ΖΥΜΩΣΗ ΣΕ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗ ΚΛΙΜΑΚΑ

4.3.1 Ταυτοποίηση απομονωμένων μυκήτων

Στην παρούσα εργασία απομονώθηκαν μύκητες κατά τη διάρκεια αναερόβιας ζύμωσης των ποικιλιών Καλαμών και Κονσερβολιάς, που πραγματοποιήθηκε σε βιομηχανική κλίμακα. Συνολικά, απομονώθηκαν 20 στελέχη από θρεπτικό υπόστρωμα DRBC. Η μοριακή ταυτοποίηση των στελεχών έγινε σε επίπεδο είδους με αλληλούχιση του γονιδίου ITS και της β-τουμπουλίνης. Τα είδη ταυτοποιήθηκαν με τη χρήση του λογισμικού BLAST στην ιστοσελίδα NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) και μέσω σύγκρισης με την αλληλουχία της βάσης δεδομένων του στελέχους *Penicillium* (ISPA-CNR) (Σχήμα 4.3.1). Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.3.1, στην ποικιλία Καλαμών, η ανάλυση αποκάλυψε ένα στέλεχος *P. commune* (100 % ομοιότητα με το στέλεχος EF198566) και ένα στέλεχος *P. crustosum* (>99% ομοιότητα με το στέλεχος KJ410745.1), ενώ στην ποικιλία Κονσερβολιά ανιχνεύτηκαν δυο στελέχη *P. crustosum* και ένα στέλεχος *P. roqueforti* (>99% ομοιότητα με το στέλεχος AY674382.1).

Οι μύκητες που ανήκουν στο γένος *Penicillium* αλλά και σε άλλα γένη μυκήτων (*Aureobasidium*, *Aspergillus*, *Geotrichum*) σχετίζονται συχνά με τις μαύρες επιτραπέζιες ελιές «ελληνικού τύπου». Ο ρόλος τους στην παραγωγή επιτραπέζιων ελιών δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητός. Προς το παρόν, θεωρούνται ως μολυσματικοί μικροοργανισμοί, υπεύθυνοι για αλλοιώσεις (μαλάκωμα υφής, παραγωγή μουχλιασμένης οσμής και γεύσης) και πιθανώς τοξικοί (Heperkan, 2013).

Το ενδιαφέρον για τους μύκητες που σχετίζονται με τις επιτραπέζιες ελιές ξεκίνησε από το γεγονός ότι οι μικροοργανισμοί αυτοί χρησιμοποιούνται ως δευτερεύουσες καλλιέργειες εκκίνησης στην Ευρώπη για την επεξεργασία προϊόντων κρέατος και τυριού, επηρεάζοντας θετικά το άρωμα, τη γεύση, την υφή, προσφέροντας προστασία από ανεπιθύμητους μικροοργανισμούς, ενώ συμβάλλουν στην καθυστέρηση της τάγγισης, στη σταθεροποίηση του χρώματος και του οξυγόνου



Σχήμα 4.3.1: Δενδρόγραμμα σχέσης μεταξύ 60 απομονωμένων μυκήτων από ελιές ποικιλιών Leccino, Cellina, di Nardo, Καλαμών και Κονσερβολιά και 6 στελεχών αναφοράς.

και στην προστασία από το φως κλπ. Από την άλλη πλευρά, μπορούν επίσης να απελευθερώσουν υψηλής τοξικότητας δευτερογενείς μεταβολίτες όπως οι μυκοτοξίνες. Παραδείγματα της χρήσης μυκήτων για την παραγωγή τροφίμων είναι ο *P. roqueforti* για την παραγωγή μπλε τυριών (Roquefort, Gorgonzola, Stilton, Gammelost κ.λπ.), ο *P. camemberti* για την παραγωγή λευκών τυριών (Brie and

Camembert) (Geisen, 1993) και οι *P. nalgiovense*, *P. chrysogenum*, και *P. salami* (Sunesen and Stahnke, 2003; Delgado et al., 2016; Magistà, et al., 2016) για την παραγωγή αποξηραμένων κρεάτων.

4.3.2 Τεχνολογικά και χαρακτηριστικά ασφαλείας μυκήτων

Με σκοπό να μελετηθούν τα τεχνολογικά χαρακτηριστικά και τα χαρακτηριστικά ασφαλείας των 20 απομονωμένων μυκήτων δημιουργήθηκε μια υποομάδα 5 στελεχών (Πίνακας 4.3.1). Το υποσύνολο αυτό περιλάμβανε αντιπροσωπευτικές απομονώσεις τόσο για κάθε ποικιλία επιτραπέζιας ελιάς όσο και για κάθε μορφότυπο εντός του ίδιου είδους και υποβλήθηκε σε:

α) τεχνολογικές δοκιμές: i) για έλεγχο παρουσίας δράσης β-γλυκοσιδάσης, που απαιτείται για την αποικοδόμηση της ελευρωπαΐνης και έλεγχο των λιπολυτικής δράσης, που εμπλέκεται στο σχηματισμό πολλών πτητικών ενώσεων ικανών να βελτιώσουν τη γεύση των ελιών (Savitha et al., 2007; Rodríguez-Gómez et al., 2012), ii) έλεγχος για απουσία ενζυμικών δράσεων (ένζυμα πρωτεάσης, κυτταρολυτικές, λιγνινολυτικές, πηκτολυτικές και ξυλανολυτικές δράσεις) με πιθανή αρνητική επίδραση στην υφή και την ποιότητα του καρπού.

β) αξιολόγηση ασφάλειας για την παραγωγή βιογενών αμινών.

Πίνακας 4.3.1: Απομονωμένα στελέχη μυκήτων

Κωδικός απομόνωσης	Δείγμα	Ταυτοποιημένο είδος (β-τουμπουλίνη)
16775	Καλαμών	<i>Penicillium commune</i>
16741	Κονσερβολιά A3 P2	<i>Penicillium crustosum</i>
16753	Κονσερβολιά A5 P2	<i>Penicillium crustosum</i>
16740	Καλαμών K3 P1	<i>Penicillium crustosum</i>
16754	Κονσερβολιά A5 P2	<i>Penicillium roqueforti</i>

Τα αποτελέσματα των βιοχημικών δοκιμών παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.3.2. Οι 5 επιλεγμένες αποικίες έδειξαν ότι διαθέτουν το ένζυμο της β-γλυκοσιδάσης και λιπολυτική δράση λαμβάνοντας βαθμολογία 1.

Αν και καμιά από τις απομονώσεις δε βρέθηκε να αποικοδομεί το milk agar, το στέλεχος 16753 κατάφερε να αποικοδομήσει τη ζελατίνη λαμβάνοντας βαθμολογία 2.

Στην παρούσα μελέτη, ακολουθώντας την προσέγγιση που χρησιμοποιήθηκε και σε παλαιότερες εργασίες για ζυμομύκητες και LAB (Arroyo-López et al., 2012b; Bleve et al., 2014, 2015; Bevilacqua et al., 2013). Η παρουσία πρωτεολυτικής δράσης, θεωρήθηκε ως αρνητικό χαρακτηριστικό, καθώς ευθύνεται για την απελευθέρωση των αμινοξέων και του αμμωνιακού αζώτου που προκαλεί με τη σειρά του αύξηση του pH, αυξάνοντας συνεπώς τον κίνδυνο για τη δημιουργία μη ασφαλούς προϊόντος (Ledenbach and Marshall, 2009; Tosi et al., 2008). Επιπλέον, η πρωτεολυτική δράση θα μπορούσε να είναι υπεύθυνη για ανεπιθύμητες επιπτώσεις στην ποιότητα του καρπού προκαλώντας το μαλάκωμά του.

Ωστόσο, λαμβάνοντας υπόψη τα διαθέσιμα βιβλιογραφικά δεδομένα, δεν είναι δυνατόν να καθοριστεί με βεβαιότητα ο πραγματικός αντίκτυπος αυτών των ενζυμικών δραστηριοτήτων στην ποιότητα των επιτραπέζιων ελιών.

Επιπλέον, τη μέγιστη πηκτινολυτική δράση διέθετε το στέλεχος 16775, ενώ τα υπόλοιπα έλαβαν βαθμολογία 2. Η ικανότητα να αποικοδόμησης της ξυλάνης ήταν απύσχα από τα στελέχη 16754 και 16775. Όσον αφορά στα τροποποιητικά ένζυμα της λιγνίνης, μόνο το στέλεχος 16741 φάνηκε να διαθέτει αυτή την ικανότητα αλλά σε χαμηλά επίπεδα. Οι απομονώσεις 16740 και 16741 δεν παρουσίασαν κυτταρολυτική δράση, ενώ η δράση λακκάσης και τυροσινάσης ήταν απύσχα από όλους τους μύκητες.

Στις ζύμες, οι δράσεις της λακκάσης, της κυτταρινάσης, της ξυλανάσης και της πηκτινάσης θεωρούνται μη επιθυμητές, ωστόσο για τους μύκητες πρέπει να επιβεβαιωθούν όταν εμβολιάζονται στις επιτραπέζιες ελιές. Επιπλέον, λίγες είναι οι πληροφορίες σχετικά με τις ενώσεις και τα ένζυμα που παράγονται από τους μύκητες κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, καθώς και για τη συγκέντρωσή τους στις συσκευασμένες ελιές. Οι μύκητες που είναι σε θέση να εκκρίνουν αυτά τα ένζυμα στις επιτραπέζιες ελιές θα μπορούσαν να αλλάξουν κατά μη προβλέψιμο τρόπο τη θρεπτική σύσταση και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των επιτραπέζιων ελιών.

Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι όσες απομονώσεις παρουσίασαν τη δράση β-γλυκοσιδάσης, κυτταρινάσης, ξυλανάσης, πηκτινάσης, τροποποίηση της λιγνίνης, λιπολυτικές και πρωτεολυτικές ενζυμικές δράσεις μπορεί να έχουν ενδιαφέρον για πολλές βιομηχανικές εφαρμογές. Πιθανές βιοτεχνολογικές χρήσεις των *Penicillia*, που απομονώθηκαν από φρέσκες ελιές, είναι η πάστα ελιάς και το πυρηνέλαιο, που προτάθηκε από τους (Baffi et al., 2012). Ανάλογα με όσα περιέγραψαν για τους ζυμομύκητες οι Bleve et al. (2011), οι απομονωμένοι μύκητες (ως ολόκληρα κύτταρα

σε ελεύθερη ή ακινητοποιημένη μορφή) ή ένζυμα από διαφορετικά είδη μυκήτων μπορεί να είναι χρήσιμα για την επεξεργασία ή/και βιομετατροπή παραπροϊόντων αγροδιατροφής, όπως λύματα που προέρχονται από το ελαιόλαδο και τη βιομηχανία επιτραπέζιων ελιών.

Για να αξιολογηθεί ο βαθμός της αποκαρβοξυλίωσης των αμινοξέων, χρησιμοποιήθηκε η τιμή 0 για απομονωμένα στελέχη που παρέμειναν λευκά. Απομονωμένα στελέχη που περιβάλλονταν από έντονο μωβ δακτύλιο έλαβαν τιμή 3, απομονωμένα στελέχη που παρήγαγαν έντονο μπλε δακτύλιο έλαβαν τιμή 2 και τέλος, αυτά που παρήγαγαν ανοικτό μπλε δακτύλιο την τιμή 1 (Πίνακας 4.3.2). Κανένα από τα απομονωμένα στελέχη δεν ήταν σε θέση να αποκαρβοξυλιώσει την ιστιδίνη, την τυροσίνη και την φαινυλαλανίνη, προς ισταμίνη, τυραμίνη και 2-φαινυλαιθυλαμίνη, αντίστοιχα. Αντίθετα, τα περισσότερα στελέχη εκτός από το 16754 κατάφεραν να αποκαρβοξυλιώσουν την αργινίνη.

Στην κατηγορία των ζυμωμένων τροφίμων, οι επιτραπέζιες ελιές κατέχουν την πρώτη θέση όσον αφορά στην επιμόλυνση από βιογενείς αμίνες (πουτρεσκίνη, καδαβερίνη, τυραμίνη) και έχουν ανιχνευτεί σε αλλοιωμένες ελιές «Zapatera» (Hornero-Mendez and Garrido-Fernandez, 1994) και σε επιτραπέζιες ελιές που έχουν υποστεί φυσική ζύμωση (ελληνικού τύπου) (Tofalo et al., 2012).

4.3.3 Επιλογή υποψήφιων στελεχών μυκήτων για χρήση ως καλλιεργειών εκκίνησης

Στη ζύμωση των επιτραπέζιων ελιών μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα είδη *P. roqueforti* και *P. paneum*, καθώς είναι τα μόνα *Penicillia*, που αντέχουν σε υψηλές συγκεντρώσεις οξικού και γαλακτικού οξέος που προέρχονται από τα γαλακτικά βακτήρια (Frisvad et al., 2004; Houbraken, et al., 2010).

Σε άλλα τρόφιμα και ζωοτροφές όπως το κακάο, το ενσίρωμα, το ψωμί σίκαλης, ξινολάχανο κ.α, που περιέχουν γαλακτικό και οξικό οξύ, τα είδη *Roquefortorum* είναι επίσης τα κυρίαρχα *Penicillia* (O'Brien et al., 2006; Copetti et al., 2011; Gallo et al., 2015), καθώς η συγκέντρωση του οξικού οξέος που περιέχουν είναι αρκετά υψηλή.

Πίνακας 4.3.2: Ενζυμικές δράσεις επιλεγμένων μυκήτων και οι αντίστοιχες βαθμολογίες.

	β- γλυκοσιδάση	Λυπολυτική δράση	Κυτταρολυτική δράση	Λακκάση	Τυροσινάση	Τροποποιημένα λιγνίνης	Δράση πρωτεΐνης (milk agar)	Δράση πρωτεΐνης	Πηκτινολυτική δράση	Ξυλανολυτική δράση	Αποκαρβοξυλίωση αμινοξέων			
											Αργινίνη	Φαινυλαλανίνη	Τυροσίνη	Ιστιδίνη
16740	3	1	-	-	-	-	-	-	2	3	2	-	-	-
16741	3	1	-	-	-	1	-	-	2	2	2	-	-	-
16753	2	1	1	-	-	-	-	2	2	3	2	-	-	-
16754	1	1	1	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-
16775	2	1	1	-	-	-	-	-	3	-	1	-	-	-

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την παρούσα διδακτορική διατριβή, στην οποία μελετήθηκαν οι ποικιλίες Κονσερβολιά και Καλαμών, υπό το πρίσμα μιας αερόβιας αυθόρμητης ζύμωσης και μιας αναερόβιας ελεγχόμενης ζύμωσης, προέκυψαν ποικίλα συμπεράσματα.

Σχετικά με την αερόβια αυθόρμητη ζύμωση τα συμπεράσματα είναι τα ακόλουθα:

- ❖ οι ζύμες διαδραματίζουν πρωταγωνιστικό ρόλο στην αερόβια ζύμωση των επιτραπέζιων ελιών, ενώ τα γαλακτικά βακτήρια εμφανίζουν διαφορετική δυναμική ανάλογα με την ποικιλία. Η παροδική παρουσία των εντεροβακτηρίων περιορίζεται στις πρώτες ημέρες,

- ❖ η ταυτοποίηση των μικροοργανισμών ανέδειξε την παρουσία ειδών του γένους *Candida* και *Zygoascus steatolyticus*. Ωστόσο, δεν υπάρχουν επαρκείς πληροφορίες που να υποδεικνύουν ότι αυτά τα είδη φέρουν την ταξινόμηση GRAS (Generally Recognized As Safe). Παρότι η έλλειψη της ταξινόμησης δεν υποδηλώνει απαραίτητα κίνδυνο, απαιτείται περαιτέρω έρευνα και ασφάλεια αξιολόγησης πριν από τη χρήση τους ως εναρκτήριων καλλιεργειών στη ζύμωση επιτραπέζιων ελιών,

- ❖ ταυτοποιήθηκαν δυο γαλακτικά βακτήρια του γένους *Lactiplantibacillus*,

- ❖ κατά την αερόβια ζύμωση αποκαλύφθηκαν σημαντικές διαφοροποιήσεις στη συγκέντρωση των πτητικών ενώσεων. Η κυρίαρχη ομάδα ενώσεων ήταν οι αλκοόλες με επικρατέστερη την αιθανόλη,

- ❖ η υδροξυτυροσόλη ήταν η κυριότερη φαινολική ένωση που ταυτοποιήθηκε καθόλη τη διάρκεια της ζύμωσης και για τις δυο ποικιλίες,

- ❖ η γλυκόζη που αποτέλεσε και το κυριότερο σάκχαρο και στις δυο ποικιλίες, καταναλώθηκε μέσα σε 90 ημέρες στις Καλαμών και αρκετά πιο νωρίς, μέσα σε 65 ημέρες στις ελιές Κονσερβολιάς. Τα επίπεδα της φρουκτόζης μειώνονταν συνεχώς καθόλη τη διάρκεια της ζύμωσης έως ότου καταναλώθηκε πλήρως μέσα σε 65 και για τις δύο ποικιλίες.

Σχετικά με την αναερόβια ελεγχόμενη ζύμωση τα συμπεράσματα είναι τα ακόλουθα:

- ❖ πιθανώς, η υψηλή περιεκτικότητα σε ολικές φαινολικές ενώσεις στην ποικιλία Καλαμών δεν επέτρεψε στον *L. mesenteroides* K T5-1 να ελέγξει την αναερόβια ζύμωση όταν εμβολιάστηκε στο αρχικό στάδιο της, καθιστώντας το διαδοχικό

εμβολιασμό με *L. mesenteroides* KT5-1 ακολουθούμενο από *S. cerevisiae* KI 30–16, μη αποτελεσματικό,

- ❖ ο εμβολιασμός MIX αποτέλεσε μια αποτελεσματική μέθοδο για ζύμωση των επιτραπέζιων ελιών Καλαμών, οδηγώντας σε ένα βελτιωμένο προϊόν ως προς τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά,

- ❖ στην περίπτωση της ποικιλίας Κονσερβολιά, η μεταχείριση με YL βελτίωσε το τελικό προϊόν ως προς τη γεύση, σε σύγκριση με αυτό που προέκυψε από αυθόρμητη ζύμωση,

- ❖ οι άλμες στο τέλος της ζύμωσης των δύο ποικιλιών αποτέλεσαν πλούσια πηγή υδροξυτυροσόλης και τυροσόλης. Και οι δυο ποικιλίες όταν επεξεργάστηκαν με YL είχαν την υψηλότερη συγκέντρωση υδροξυτυροσόλης, αποδεικνύοντας το σημαντικό ρόλο των ζυμών στην αρχή της ζύμωσης, ακολουθούμενη από LAB, για την παραγωγή επιτραπέζιων ελιών με σημαντικό αντιοξειδωτικό περιεχόμενο.

Σχετικά με την απομόνωση και τον χαρακτηρισμό μυκήτων που σχετίζονται με τις μαύρες επιτραπέζιες ελιές που έχουν υποστεί ζύμωση σε βιομηχανική κλίμακα:

- ❖ το στέλεχος *P. roqueforti* ITEM 16754 κρίθηκε κατάλληλο για τη ζύμωση της ποικιλίας Κονσερβολιάς. Ωστόσο, είναι σημαντικό το ότι το εν λόγω στέλεχος πρέπει να εξεταστεί σε ζυμώσεις επιτραπέζιων ελιών σε πραγματικές συνθήκες,

- ❖ τοξικά είδη όπως *P. crustosum*, *P. commune* και *P. expansum* μπορούν να αναπτυχθούν. Αυτοί οι τοξικοί μύκητες βρέθηκαν στις ελιές στην παρούσα μελέτη, συνεπώς, συνιστάται να εξασφαλιστεί η υψηλή συγκέντρωση οξικού και γαλακτικού οξέος που περιέχονται στις επιτραπέζιες ελιές.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Π.Π 1: Παρασκευή διαλυμάτων για τη χρώση Gram

Διάλυμα crystal violet-οξαλικού αμμωνίου	0,5 g Crystal Violet 100 mL αποσταγμένο νερό Η χρωστική διαλύθηκε καλά στο νερό, διηθήθηκε και διατηρήθηκε σε σκουρόχρωμη φιάλη.
Διάλυμα χρωστικής Φουξίνη	1 g Βασική φουξίνη 10 g Αιθανόλη 100 mL διάλυμα φαινόλης (1:20) Αρχικά διαλύθηκε η φουξίνη στην αιθανόλη και σιγά - σιγά προστέθηκε το διάλυμα της φαινόλης. Το διάλυμα της χρωστικής διηθήθηκε και φυλάχθηκε σε σκουρόχρωμη φιάλη. Για τη χρήση αυτού του διαλύματος αραιώθηκαν 10 mL διαλύματος φουξίνης σε 90 mL νερό.
Ιωδιούχο διάλυμα Lugol	1 g Ιώδιο 2 g Ιωδιούχο κάλιο 100 mL Αποσταγμένο νερό Ζυγίστηκε το ιώδιο και το ιωδιούχο κάλιο σε κάψα και διαλύθηκαν σταδιακά προσθέτοντας μικρές ποσότητες νερού. Προστέθηκε και το υπόλοιπο νερό. Ακολούθησε καλή ανάδευση και διήθηση.

Π.Π 2: Η σύσταση των θρεπτικών υλικών που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση και τον χαρακτηρισμό των μυκήτων.

Υπόστρωμα	Σύσταση (ανά λίτρο νερού)
DRBCA (Dichloran Rose Bengal Chlorotetracycline, Agar)	DRBCA, 1,6 % (w/v) άγαρ
Wickerham	40 g γλυκόζη, 5 g πεπτόνη, 3 g yeast extract, 3 g malt extract
Basal medium	1 g KH_2PO_4 , 0,5 g τρυγικό αμμώνιο, 0,01 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,001 g yeast extract 0,001 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,001 g $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 0,001 g MnSO_4
CBM (Cellulolysis Basal Medium)	$\text{C}_4\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_6$ 5 g, yeast extract 0,1 g, KH_3PO_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,001 g,
XBM A	$\text{C}_4\text{H}_{12}\text{O}_6$ 0,5 g, KH_2PO_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g,

	yeast extract, 0,1 g, CaCl ₂ 2H ₂ O 0,001 g σε 1L απεσταγμένου ύδατος, 1,6 % (w/v) άγαρ
Milk Agar	θρυπτόνη 5 g, yeast extract 2,5 g, δεξτρόζη 1,0 g, σκόνη Skim milk 1 g, 1,5 % άγαρ)
Malt Extract Agar (MEAG)	Malt Extract Agar με 1 % ζελατίνη
CMCA (carboxymethylcellulose Agar)	

Όλα τα αντιδραστήρια για τις βιοχημικές αναλύσεις αγοράστηκαν από την Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany).

II.Π 3 Πρωτόκολλο απομόνωσης γενωμικού DNA με χρήση κιτ «Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food»

1. Προσθήκη 10 mg λυοφιλοποιημένου δείγματος σε αποστειρωμένα Eppendorf των 2 mL.
2. Προσθήκη 500 µL διαλύματος λύσης (Lysis Buffer A) και 5 µl RNase A. Καλή ανάδευση σε αναδευτήρα Vortex.
3. Προσθήκη 250 µL διαλύματος λύσης (Lysis Buffer B). Ανάδευση σε Vortex για 10-15 sec. Επώαση στους 25 °C για 10 min.
4. Προσθήκη 750 µL διαλύματος κατακρήμνισης πρωτεϊνών (Precipitation Solution) και γρήγορη ανάδευση για 20 δευτερόλεπτα σε αναδευτήρα Vortex
5. Φυγοκέντρωση στα 13000 ×g για 10 min.
6. Μεταφορά του υπερκείμενου σε αποστειρωμένα Eppendorf των 2 mL
7. Ανάδευση του δοχείου MagneSil™ PMPs για 30 sec.
8. Προσθήκη 50 µL MagneSil™ PMPs στο υπερκείμενο και Vortex.
9. Προσθήκη 600 µL ισοπροπανόλης και ανάδευση με το χέρι 15 φορές.
10. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min και ανάδευση ανά διαστήματα. Απομάκρυνση της υδατικής φάσης.
11. Προσθήκη 250 µL διαλύματος λύσης (Lysis Buffer B) και ήπια ανάδευση με το χέρι. Αφήνεται το διάλυμα να ηρεμήσει 1 min και απομακρύνεται την υδατική φάση.
12. Προσθήκη 1 mL 70 % αιθανόλης και αναμονή 1 min. Η υδατική φάση απομακρύνεται. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε άλλες δύο φορές. Πρέπει να απομακρυνθεί όσο περισσότερο υγρό γίνεται.
13. Στέγνωμα πελέτας με φυσική εξάτμιση για 15-30 min σε θερμοκρασία δωματίου
14. Προσθήκη 100 µL Nuclease-Free Water, Vortex και επώαση στους 65 °C για 5 min. Απομάκρυνση του υγρού σε έναν καθαρό σωλήνα
15. Διατήρηση στους -20 °C.

Π.Π 4: Αποτελέσματα βιοχημικών δοκιμών και μοριακή ταυτοποίηση των απομονωμένων ζυμών από τις ποικιλίες Καλαμών και Κονσερβολιά κατά την αερόβια ζύμωση.

Κωδικός Απομόνωσης	Ανάπτυξη σε πρότυπη άλμη (ΠΑ)	Λιπάση	Πρωτεάση	β- γλυκοσιδάσ η	Ανάπτυξη σε His	Ανάπτυξη σε Tyr	Accession Number seq	% ταυτοποί ηση
A* 100	+	-	-	-	-	-	JF901806.1 Candida boidinii	97%
A 105	+	-	-	-	-	-	JF901806.1 Candida boidinii	98%
A 13	+	-	-	-	-	-	AY447032.1 Zygoascus steatolyticus	98%
A 14	+	-	-	-	-	-	AY447032.1 Zygoascus steatolyticus	98%
A 15	+	-	-	-	-	-	AY447032.1 Zygoascus steatolyticus	98%
A 16	+	-	+	-	+	+		
A 19	+	-	-	-	-	-	AY447032.1 Zygoascus steatolyticus	98%
A 20	+	-	-	-	-	-	AY447032.1 Zygoascus steatolyticus	98%
A 21	+	-	-	-	-	-	AY447032.1 Zygoascus steatolyticus	98%
A 28	+	-	+	-	-	-		
A 29	+	-	-	+	-	-	AY447032.1 Zygoascus steatolyticus	98%
A 30	+	-	-	+	-	-	AJ539378.1 Candida butyri	99%
A 31	+	-	-	+	-	-	JF901806.1 Candida boidinii	99%
A 33	+	-	+	+	+	+		
A 37	+	-	-	+	-	-	JF901806.1 Candida boidinii	98%
A 38	+	-	-	-	-	-	JF901806.1 Candida boidinii	99%

A 47	+	-	-	-	-	+		
A 49	+	-	-	-	-	-	JF901806.1 Candida boidinii	98%
A 50	+	-	-	-	-	-	JF901806.1 Candida boidinii	99%
A 52	+	-	-	-	-	-	JF901806.1 Candida boidinii	98%
A 53	+	-	-	-	-	+		
A 55	+	+	+	-	+	+		
A 56	+	-	-	+	-	-	JF901806.1 Candida boidinii	98%
A 58	+	-	-	-	-	-	JF901806.1 Candida boidinii	99%
A 66	+	-	-	+	-	-	JF901806.1 Candida boidinii	99%
A 67	+	-	-	-	-	+	JF901806.1 Candida boidinii	97%
A 79	+	-	-	-	-	-	JF901806.1 Candida boidinii	99%
A 80	+	-	-	-	-	-	JF901806.1 Candida boidinii	99%
A 85	+	-	-	-	-	-	JF901806.1 Candida boidinii	98%
A 91	+	-	-	-	-	-	JF901806.1 Candida boidinii	98%
A 96	+	-	-	-	-	-	JF901806.1 Candida boidinii	97%
A 97	+	-	+	-				
A 98	+	-	-	-	-	-	JF901806.1 Candida boidinii	98%
K* 101	+	-	-	-	-	-	JF901806.1 Candida boidinii	98%
K 107	+	-	-	-	-	-	JF901806.1 Candida boidinii	97%
K 11	+	-	+	+	-	+		
K 25	+	-	-	+	-	+	HE574641.1 Candida sp. CLIB 1303	99%
K 41	+	-	-	-	-	-	JF901806.1 Candida boidinii	99%
K 57	+	-	-	-	-	-	JF901806.1 Candida	98%

							boidinii	
K 59	+	—	—	-	-	-	JF901806.1 Candida boidinii	99%
K 6	+	-	+	-	-	+		
K 60	+	—	—	-	-	-	JF901806.1 Candida boidinii	97%
K 61	+	—	—	-	-	-	JF901806.1 Candida boidinii	99%
K 62	+	—	—	-	-	-	JF901806.1 Candida boidinii	98%
K 64	+	—	—	-	-	-	JF901806.1 Candida boidinii	99%
K 71	+	—	—	-	-	-	JF901806.1 Candida boidinii	98%
K 72	+	—	—	-	-	-	JF901806.1 Candida boidinii	99%
K 76	+	—	—	-	-	-	JF901806.1 Candida boidinii	99%
K 78	+	—	—	-	-	-	JF901806.1 Candida boidinii	99%
K 81	+	—	—	-	-	-	JF901806.1 Candida boidinii	98%
K 82	+	—	—	-	-	-	JF901806.1 Candida boidinii	98%
K 84	+	—	—	-	-	-	JF901806.1 Candida boidinii	98%
K 86	+	+	+	-	-	+		
K 87	+	—	—	-	-	-	JF901806.1 Candida boidinii	98%
K 93	+	+	+	-	-	+		
K 95	+	—	—	-	-	-	JF901806.1 Candida boidinii	99%

*Α: δείγμα που προέρχεται από την ποικιλία Κονσερβολιά

Κ: δείγμα που προέρχεται από την ποικιλία Καλαμών

Π.Π 5: Αποτελέσματα βιοχημικών δοκιμών και μοριακή ταυτοποίηση των απομονωμένων βακτηρίων από τις ποικιλίες Καλαμών και Κονσερβολιά, κατά την αερόβια ζύμωση.

Κωδικός Απομόνωσης	Ανάπτυξη σε πρότυπη άλμη (ΠΑ)	Λιπάση	Πρωτεάση	β-γλυκοσιδάση	Παραγωγή βιογενών αμινών	Accession Number seq	% ταυτοποίηση
TE4	+	-	-	+	-	NR_104573.1 (<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> strain CIP 103151) NR_042394.1 (<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> strain NRRL B-14768)	94,90 %
BL1	+	-	-	+	-	NR_104573.1 <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> strain CIP 103151 NR_029133.1 (<i>Lactiplantibacillus pentosus</i> strain 124-2) NR_042394.1 (<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> strain NRRL B-14768)	93,43 %

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abbas, C.A. (2006). Production of Antioxidants, Aromas, Colours, Flavours, and Vitamins by Yeasts. In: Querol, A., Fleet, G. (eds) *Yeasts in Food and Beverages*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 285-334.
- Abriouel, H., Benomar, N., Gálvez, A., Pulido, R., R. (2014). Preservation of Manzanilla Aloreña cracked green table olives by high hydrostatic pressure treatments singly or in combination with natural antimicrobials. *LWT-Food Science and Technology*, 56: 427–431.
- Abriouel, H., Benomar, N., Lucas, R., & Gálvez, A. (2011). Culture-independent study of the diversity of microbial populations in brines during fermentation of naturally-fermented Aloreña green table olives. *International Journal of Food Microbiology*, 144: 487–496.
- Aguilera, M. P., Beltrán, G., Ortega, D., Fernández, A., Jiménez, A., & Uceda, M. (2005). Characterisation of virgin olive oil of Italian olive cultivars: 'Frantoio' and 'Leccino', grown in Andalusia. *Food Chemistry*, 89:387–391.
- Alagna, F., Mariotti, R., Panara, F., Caporali, S., Urbani, S., Veneziani, G., Esposto, S., Taticchi, A., Rosati, A., Rao, R., Perrotta, G., Servili, M., & Baldoni, L. (2012). Olive phenolic compounds: metabolic and transcriptional profiling during fruit development. *BMC Plant Biology*, 12: 1.
- Amiot, M. J., Fleuriet, A. y Macheix, J. J. (1986). Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34: 823-826.
- Amiot, M.-J., Fleuriet, A., Macheix, J.-J. (1989). Accumulation of oleuropein derivatives during olive maturation. *Phytochemistry*, 28: 67–69.
- Anagnostopoulos, D., A., Tsaltas, D. (2022). Current Status, Recent Advances, and Main Challenges on Table Olive Fermentation: The Present Meets the Future. *Frontiers in Microbiology*, 12:797295.
- Angerosa, F., Di Giacinto, L., & d'Alessandro, N. (1997). Quantitation of some flavor

- components responsible for the “green” attributes in virgin olive oils. *Journal of High Resolution Chromatography*, 20: 507–510.
- Angerosa, F., Servili, M., Selvaggini, R., Taticchi, A., Esposto, S. and Montedoro, G.F. (2004) Volatile Compounds in Virgin Olive Oil: Occurrence and Their Relationship with the Quality. *Journal of Chromatography A*, 1054: 17-31.
- Angerosa, F. (2000) Sensory Quality of Olive Oils. In: Harwood, J. and Aparicio, R. Eds., *Handbook of Olive Oil, Analysis and Properties*, Aspen Publications, Inc., Gaithersburg, 355-392.
- Aponte, M., Blaiotta, G., La Croce, F., Mazzaglia, A., Farina, V., Settanni, L., & Moschetti, G. (2012). Use of selected autochthonous lactic acid bacteria for Spanish-style table olive fermentation. *Food Microbiology*, 30: 8–16.
- Argyri A., A., Panagou, E., Z., Nychas, G., J., Tassou, C., C. (2014). Nonthermal pasteurization of fermented green table olives by means of high hydrostatic pressure processing. *BioMed Research International*, 515623.
- Arroyo-López, F., N., Querol, A., Bautista-Gallego, J., & Garrido-Fernández, A. (2008). Role of yeasts in table olive production. *International Journal of Food Microbiology*, 128: 189–196.
- Arroyo-López, F. N., Romero-Gil, V., Bautista-Gallego, J., Rodríguez-Gómez, F., Jiménez-Díaz, R., García-García, P., Querol, A., & Garrido-Fernández, A. (2012a). Potential benefits of the application of yeast starters in table olive processing. *Frontiers in Microbiology*, 3: 1–4.
- Arroyo-López, F., N., Romero-Gil, V., Bautista-Gallego, J., Rodríguez-Gómez, F., Jiménez-Díaz, R., García-García, P., Querol, A., & Garrido-Fernández, A. (2012b). Yeasts in table olive processing: Desirable or spoilage microorganisms? *International Journal of Food Microbiology*, 160: 42–49.
- Arslan, D., Karabekir, Y., & Schreiner, M. (2013). Variations of phenolic compounds, fatty acids and some qualitative characteristics of Sariulak olive oil as induced by growing area. *Food Research International*, 54: 1897–1906.
- Artajo, L., S., Romero, M., P., & Motilva, M., J. (2006). Transfer of phenolic

- compounds during olive oil extraction in relation to ripening stage of the fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86: 518–527.
- Baffi, M., A., Romo-Sanchez, S., Ubeda-Iranzo, J., and Briones-Perez, A. I. (2012). Fungi isolated from olive ecosystems and screening of their potential biotechnological use. *New Biotechnology*, 29: 451–456.
- Balatsouras G., D. (1990). Edible olive cultivars, chemical composition of fruit, harvesting, transportation, processing, sorting and packaging, styles of black olives, deteriorations, quality standards, chemical analysis, nutritional and biological value of the end product. *Seminario Internazionale Olio d' Oliva Da Tavola: Tecnologia e Qualita*, 291–330.
- Bautista-Gallego, J., Arroyo-López, F., Rantsiou, K., Jiménez-Díaz, R., Garrido Fernández, & Cocolin, L. (2013). Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented table olives with probiotic potential. *Food Research International*, 50: 135–142.
- Bautista-Gallego, J., Rodríguez-Gómez, F., Barrio, E., Querol, A., Garrido-Fernández, A., & Arroyo-López, F. N. (2011). Exploring the yeast biodiversity of green table olive industrial fermentations for technological applications. *International Journal of Food Microbiology*, 147: 89–96.
- Ben Othman, N., Roblain, D., Chammen, N., Thonart, P., & Hamdi, M. (2009). Antioxidant phenolic compounds loss during the fermentation of Chétoui olives. *Food Chemistry*, 116: 662–669.
- Benincasa, C., Muccilli, S., Amenta, M., Perri, E., & Romeo, F. V. (2015). Phenolic trend and hygienic quality of green table olives fermented with *Lactobacillus plantarum* starter culture. *Food Chemistry*, 186: 271–276.
- Benítez-Cabello, A., Rodríguez-Gómez, F., Morales, M., L., Garrido-Fernández, A., Jiménez-Díaz, R., Arroyo-López, F.N. (2019). Lactic Acid Bacteria and Yeast Inocula Modulate the Volatile Profile of Spanish-Style Green Table Olive Fermentations. *Foods*, 8: 280.
- Bevilacqua, A., Corbo, M., R., Sinigaglia, M. (2012). Selection of yeasts as starter

- cultures for table olives: a step-by-step procedure. *Frontiers in Microbiology*, 3: 194–202.
- Bevilacqua, A., Altieri, C., Corbo, M., R., Sinigaglia, M., Ouoba, L., I. (2010). Characterization of lactic acid bacteria isolated from Italian Bella di Cerignola table olives: selection of potential multifunctional starter cultures. *Journal of Food Science*, 75: 536–544.
- Bevilacqua, A., Beneduce, L., Sinigaglia, M., Corbo, M., R. (2013). Selection of yeasts as starter cultures for table olives. *Journal of Food Science*, 78: 742–751.
- Bianchi, G. (2003). Lipids and phenols in table olives. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 105: 229–242.
- Bianco, A., and Uccella, N. (2000). Biophenolic components of olives. *Food Research International*, 33: 475–485.
- Blana, V., A., Grounta, A., Tassou, C., C., Nychas, G., J., Panagou, E. (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.
- Blekas, G., Psomiadou, E., Tsimidou, M., & Boskou, D. (2002). On the importance of total polar phenols to monitor the stability of Greek virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104: 340–346.
- Bleve, G., Grieco, F., Cozzi, G., Logrieco, A., Visconti, A. (2006). Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* on grape. *International Journal of Food Microbiology*, 108: 204–209.
- Bleve, G., Tufariello, M., Durante, M., Grieco, F., Ramires, F. A., Mita, G., Tasioula-Margari, M., & Logrieco, A. F. (2015). Physico-chemical characterization of natural fermentation process of Conservolea and Kalamàta table olives and development of a protocol for the pre-selection of fermentation starters. *Food Microbiology*, 46: 368–382.
- Bleve, G., Tufariello, M., Durante, M., Perbellini, E., Ramires, F. A., Grieco, F., Cappello, M. S., de Domenico, S., Mita, G., Tasioula-Margari, M., & Logrieco,

- A. F. (2014). Physico-chemical and microbiological characterization of spontaneous fermentation of Cellina di Nardo and Leccino table olives. *Frontiers in Microbiology*, 5: 1–18.
- Bonatsou, S., Benítez, A., Rodríguez-Gómez, F., Panagou, E. Z., & Arroyo-López, F. N. (2015). Selection of yeasts with multifunctional features for application as starters in natural black table olive processing. *Food Microbiology*, 46: 66–73.
- Boominathan, K., and Reddy, C., A. (1992). Fungal degradation of lignin: biotechnological applications. *Handbook of Applied Mycology*, 4: 763–822.
- Borbolla y Alcalá, J., M., R., Fernández Díez, M.J., and Gonzalez Cancho, F. (1960). Estudios sobre el aderezo de aceitunas verdes. XIX. Nuevas experiencias sobre el alambrado. *Grasas Aceites*, 11: 256–260.
- Boskou, D., Camposeo, S., Clodoveo, M., L. (2015). Table olives as sources of bioactive compounds. In *Olive and Olive Oil Bioactive Constituents*, pp. 217–259 [D Boskou Ed.,]. Italy: AOCS Press.
- Boskou, D., and Clodoveo, M. (2016). Products from olive tree (p. 243). Intechopen Publ.
- Boskou, D. (2017). Table olives: a vehicle for the delivery of bioactive compounds. *J Exp Food Chem* 3: 1–7.
- Boskou, D., Blekas, G., Tsimidou, M. (1996). History and characteristics of the olive tree. In *Olive Oil Chemistry and Technology*; Boskou, D., Ed.; AOCS Press: Champaign IL, USA.
- Botta, C., and Cocolin, L. (2012). Microbial dynamics and biodiversity in table olive fermentation: Culture-dependent and -independent approaches. *Frontiers in Microbiology*, 3: 1–10.
- Bourne, M. (2002). *Food Texture and Viscosity: Concept and Measurement*. 2nd ed. New York: Academic Press.
- Campus, M., Sedda, P., Cauli, E., Piras, F., Comunian, R., Paba, Daga, A., Schirru, S., Angioni, A., Zurru, R., Bandino, G. (2015). Evaluation of a single strain starter

- culture, a selected inoculum enrichment, and natural microflora in the processing of Tonda di Cagliari natural table olives: impact on chemical, microbiological, sensory and texture quality. *LWT-Food Science and Technology*, 64: 671–677.
- Campus, M., Değirmencioglu, N., Comunian, R. (2018). Technologies and Trends to Improve Table Olive Quality and Safety. *Frontiers in Microbiology*, 9:617.
- Cardoso, S., M., Guyot, S., Marnet, N., Lopes-Da-Silva, J., A., Silva, M., S., A., Renard, C., M., G., C., Coimbra, M., A. (2006). Identification of oleuropein oligomers in olive pulp and pomace. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86: 1495–1502.
- Cardoso, S., M., Mafra, I., Reis, A., Nunes, C., Saraiva, J. A., & Coimbra, M. A. (2010). Naturally fermented black olives: Effect on cell wall polysaccharides and on enzyme activities of Taggiasca and Conservolea varieties. *LWT - Food Science and Technology*, 43:153–160.
- Cavalli, J. F., Fernández, X., Lizzani-Cuvelier, L., and Loiseau, A. M. (2004). Characterization of volatile compounds of French and Spanish virgin olive oils by HS-SPME: identification of quality-freshness markers. *Food Chemistry*, 88: 151–157.
- Ciafardini, G., Marsilio, A., Lanza, B., & Pozzi, N. (1994). Hydrolysis of oleuropein by *Lactobacillus plantarum* strains associated with olive fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 4142–4147.
- Copetti, M. V., Iamanaka, B. T., Frisvad, J. C., Pereira, J. L., Fungaro, M. H., & Taniwaki, A. (2011). Mycobiota of cacao. From farm to chocolate. *Food Microbiology*, 28: 1499–1504.
- Corsetti, A., Perpetuini, G., Schirone, M., Tofalo, R., & Suzzi, G. (2012). Application of starter cultures to table olive fermentation: An overview on the experimental studies. *Frontiers in Microbiology*, 3: 1–6.
- Cortés-Delgado, A., Sánchez, A.H., de Castro, A., López-López, A., Beato, V.M., Montaña, A. (2016). Volatile Profile of Spanish-Style Green Table Olives Prepared from Different Cultivars Grown at Different Locations. *Food Research*

International, 83: 131–142.

- Crous, P. W., Verkley, G. J. M., Groenewald, J. Z., and Samson, R. A. (2009). Fungal Biodiversity. [CBS Laboratory Manual Series no.1.]. Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre.
- 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: 514.
- D’Antuono, I., Kontogianni, V. G., Kotsiou, K., Linsalata, V., Logrieco, A. F., Tasioula-Margari, M., & Cardinali, A. (2014). Polyphenolic characterization of olive mill wastewaters, coming from Italian and Greek olive cultivars, after membrane technology. *Food Research International*, 65: 301–310.
- D’Antuono, I., Garbetta, A., Ciasca, B., Linsalata, V., Minervini, F., Lattanzio, V. M. T., Logrieco, A. F., & Cardinali, A. (2016). Biophenols from Table Olive cv Bella di Cerignola: Chemical Characterization, Bioaccessibility, and Intestinal Absorption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64: 5671–5678.
- Dabbou, S., Issaoui, M., Brahmi, F., Nakbi, A., Chehab, H., Mechri, B., & Hammami, M. (2012). Changes in volatile compounds during processing of Tunisian-style table olives. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists’ Society*, 89: 347–354.
- Damascelli, A., Palmisano, F. (2013). Sesquiterpene Fingerprinting by Headspace SPME–GC–MS: Preliminary Study for a Simple and Powerful Analytical Tool for Traceability of Olive Oils. *Food Analytical Methods*, 6: 900–905.
- De Angelis, M., Campanella, D., Cosmai, L., Summo, C., Rizzello, C. G., & Caponio, F. (2015). Microbiota and metabolome of un-started and started Greek-type fermentation of Bella di Cerignola table olives. *Food Microbiology*, 52: 18–30.
- De Bellis P., Valerio F., Sisto A., Lonigro S., L, L. P. (2010). Probiotic table olives: microbial populations adhering on the olive surface in fermentation sets inoculated with the probiotic strains *Lactobacillus paracasei* IMPC2. *International Journal of Food Microbiology*, 140: 6–13.

- De Castro, A., Garcia, P., Romero, C., Brenes, M., & Garrido, A. (2007). Industrial implementation of black ripe olive storage under acid conditions. *Journal of Food Engineering*, 80: 1206–1212.
- De Castro, A., Sánchez, A.H., Cortés-Delgado, A., López-López, A., Montaña, A. (2019). Effect of Spanish-Style Processing Steps and Inoculation with *Lactobacillus Pentosus* Starter Culture on the Volatile Composition of Cv. Manzanilla Green Olives. *Food Chemistry*, 271: 543–549.
- Delgado, J., Peromingo, B., Núñez, F., and Asensio, M. A. (2016). Use of moulds and their antifungal proteins for biocontrol of toxigenic moulds on dry-ripened cheese and meats. *Current Opinion In Food Science*, 11: 40–45.
- Durante, M., Tufariello, M., Tommasi, L., Lenucci, M. S., & Mita, G. (2017). Evaluation of bioactive compounds in black table olives fermented with selected microbial starters. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98: 96–103.
- EFSA (European Food Safety Authority), (2015). Parma, Italy, Scientific Opinion on Dietary Reference Values for vitamin E as α -tocopherol. *EFSA J*, 13: 4149.
- El Adlouni, C., Tozlovanu, M., Naman, F., Faid, M., and Pfohl-Leszkowicz, A. (2006). Preliminary data on the presence of mycotoxins (ochratoxin A, citrinin and aflatoxin B1) in black table olives “Greek style” of Moroccan origin. *Molecular Nutrition & Food Research*, 50: 507–512.
- Eris, A., Hatice, G., Barut, E., & Cansev, A. (2007). Annual patterns of total soluble sugars and proteins related to cold- hardiness in olive (*Olea europaea* L. ‘Gemlik’). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 82: 597–604.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., and Querol, A. (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49: 329–337.
- Ettayebi, K., Errachidi, F., Jamaï, L., Tahri-Jouti, M. A., Sendide, K., & Ettayebi, M. (2003). Biodegradation of polyphenols with immobilized *Candida tropicalis* under metabolic induction. *FEMS Microbiology Letters*, 223: 215–219.

- Fernandez, G., A., Adams, M., R., Diez, M., J., F. (1997). Table olives: production and processing, 1st ed. Chapman & Hall, London.
- Fernández, A., G., García, P., G., & Balbuena, M., B. (2008). Olive Fermentations. In Biotechnology Set.
- Fleming, H., P., Etchells, J., L., B. T. (1969). Vapor analysis of fermented Spanish-type green olives by gas chromatography. *Journal of Food Science*, 34: 419–422.
- Folin, O., and Ciocalteu, V. (1927). On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 73: 627–650.
- Frisvad, J. C., and Samson, R. A. (2004). *Emericella venezuelensis*, a new species with stellate ascospores producing sterigmatocystin and aflatoxin B1. *Systematic and Applied Microbiology*, 27: 672–680.
- Frisvad, J. C., Smedsgaard, J., Larsen, T. O., Samson, R. A., and Robert, A. (2004). Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus. *Penicillium*. *Studies in Mycology*, 49: 201–241.
- Fu, S., Segura-Carretero, A., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., M. J. A., & Menéndez-Gutiérrez M.P., Micol V., F.-G. A. (2010). Qualitative screening of phenolic compounds in olive leaf extracts by hyphenated liquid chromatography and preliminary evaluation of cytotoxic activity against human breast cancer cells. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397: 643–654.
- Gallo, A., Giuberti, G., Frisvad, J. C., Bertuzzi, T., and Nielsen, K. F. (2015). Review on mycotoxin issues in ruminants: occurrence in forages, effects of mycotoxin ingestion on health status and animal performance and practical strategies to counteract their negative effect. *Toxins*, 7: 3057–3111.
- Gandul-Rojas, B., & Mínguez-Mosquera, M. I. (2006). Handbook of fruits and fruit processing (& N. S. Y. H. Hui, J. Barta, M. P. Cano, T. Gusek, J. S. Sidhu (Ed.); p. Vol. 26, pp: 491–517). Blackwell publishing.
- Garcia, P., Duran, M.C. & Garrido, A. (1985). Aerobic fermentation of natural black olives in brine. *Grasas y Aceites*, 36: 14–20.

- Garcia, P., Brenes, M., Romero, C., & Garrido, A. (2001). Colour fixation in ripe olives. Effects of types of iron salt and other processing factors. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 81: 1364–1370.
- Gardini, F., Tofalo, R., Belletti, N., Iucci, L., Suzzi, G., & Torriani, S. (2006). Characterization of yeasts involved in the ripening of Pecorino Crotonese cheese. 23: 641–648.
- Garrido A, García, P., y Durán, M., C. (1985). Conservación de aceitunas negras naturales procedentes de fermentación aeróbica. *Grasas y Aceites*, 36: 313-316.
- Garrido Fernandez, A., Duran Quintana, M.C., and Garcia Garcia, P. (1987). Fermentacion en medio aerobico de aceitunas negrasal natural en salmuera. Efecto de algunas variables sobre la formacion de “alambrado”. *Grasas Aceites*, 38: 27–32.
- Garrido Fernández, A., Fernandez Diez, M.J. & Adams, M. R. (1997). *Table Olives. Production and processing*. Chapman & Hall.
- Garrido Fernandez, A., Garcia, P. and Brenes, M. (1995). Olive fermentations. In G. W. Rem, H.-J. and Reed (Ed.), *Biotechnology* (pp: 539–627). Weinheim: VCH Press.
- Geisen, R. (1993). Fungal starter cultures for fermented foods: molecular aspects. *Trends in Food Science & Technology*, 4: 251–255.
- Ghitakou, S., Koutras, K., Kanellou, E., and Markaki, P. (2006). Study of aflatoxin B1 and ochratoxin A production by natural microflora and *Aspergillus parasiticus* in black and green olives of Greek origin. *Food Microbiology*, 23: 612–621.
- Gil, M., Cabellos, J.M., Arroyo, T., Prodanov, M. (2006). Characterization of the volatile fraction of young wines from the denomination of origin “Vinos de Madrid” (Spain). *Analytica Chimica Acta*, 563: 145–153.
- Glass, N., L., and Donaldson, G., C. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 1323–1330.

- Gómez-Rico, A., Fregapane, G., & Salvador, M., D. (2008). Effect of cultivar and ripening on minor components in Spanish olive fruits and their corresponding virgin olive oils. *Food Research International*, 41: 433–440.
- González-Correa, J., A., Navas, M., D., Muñoz-Marín, J., Trujillo, M., Fernández-Bolaños, J., de la Cruz, J., P. (2008). Effects of hydroxytyrosol and hydroxytyrosol acetate administration to rats on platelet function compared to acetylsalicylic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 7872–7876.
- Grounta, A., Doulgeraki, A., I., Nychas, G., J., Panagou, E., Z. (2016). Biofilm formation on *Conservolea* natural black olives during single and combined inoculation with a functional *Lactobacillus pentosus* starter culture. *Food Microbiology*, 56: 35–44.
- Grounta, A., Doulgeraki, A. I., & Panagou, E. Z. (2015). Quantification and characterization of microbial biofilm community attached on the surface of fermentation vessels used in green table olive processing. *International Journal of Food Microbiology*, 203: 41–48.
- Gutfinger, T. (1981). Polyphenols in olive oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 58: 966–968.
- Guth, H., and Grosch, W. (1991). A Comparative Study of the Potent Odorants of Different Virgin Olive Oils. *Lipid / Fett*, 93: 335–339.
- Heperkan, D., Meric, B., E., Sismanoglu, G., Dalkiliç, G., Güler, F., K. (2006). Mycobiota, mycotoxigenic fungi, and citrinin production in black olives. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 571: 203–210.
- Heperkan, D. (2013). Microbiota of table olive fermentations and criteria of selection for their use as starters. *Frontiers in Microbiology*, 4: 1–11.
- Hernandez, A., Martín, A., Aranda, E., Perez-Nevado, F., Cordoba, M.G. (2007). Identification and characterization of yeast isolated from the elaboration of seasoned green table olives. *Food Microbiology*. 24: 346–351.
- Holzapfel, W., H. (2002). Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *International Journal of Food*

Microbiology, 75: 197–212.

Hornero-Mendez, D., and Garrido-Fernandez, A. (1994). Biogenic- amines in table olives analysis by high-performance liquid- chromatography. *Analyst*, 119: 2037–2041.

Houbraken, J., Frisvad, J., C., and Samson, R., A. (2010). Sex in *Penicillium* series *Roqueforti*. *IMA Fungus*, 1: 171–180.

Hrncirik, K., & Fritsche, S. (2004). Comparability and reliability of different techniques for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 106: 540–549.

Hurtado, A., Ben Othman, N., Chammem, N., Hamdi, M., Ferrer, S., Reguant, C., Bordons, A., & Rozès, N. (2011). Characterization of *Lactobacillus* isolates from fermented olives and their bacteriocin gene profiles. *Food Microbiology*, 28: 1514–1518.

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: 731–740.

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

Imura, K. & Okada, A. (1998). Amino acid metabolism in pediatric patients. *Nutrition*, 14: 143–148.

Issaoui, M., Flamini, G., Brahmi, F., Dabbou, S., Ben Hassine, K., Taamali, A., Chehab, H., Ellouz, M. and Zarrouk, M. (2010). Effect of the growing area conditions on differentiation between Chemlali and Chétoui olive oils. 119(1), *Food Chemistry*, 119: 220–225.

Jerman, T., Trebše, P., Vodopivec, B., M. (2010). Ultrasound-assisted solid liquid extraction (USLE) of olive fruit (*Olea europaea*) phenolic compounds. *Food Chemistry*, 123: 175–182.

Jimenez, A., Rodriguez, R., Fernandez-Caro, I., Guillen, R., Fernandez-Bolanos, J. &

- Heredia, A. (2000). Dietary fibre content of table olives processed under different European styles: study of physico-chemical characteristics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 1903–1908.
- Juarez-Romero, J., A., Denoya, G. & Polenta, G. (2015). Influence of alternating air injection on the color and “alambrado” of natural black olives cv. Arauco, as compared with the traditional Argentine method. *Grasas y Aceites*, 66, e070.
- Kaltsa, A., Papaliaga, D., Papaioannou, E, Kotzekidou, P. (2015). Characteristics of oleuropeinolytic strains of *Lactobacillus plantarum* group and influence on phenolic compounds in table olives elaborated under reduced salt conditions. *Food Microbiology*, 48: 58–62.
- Kalua, C., M., Bedgood Jr, D. R., & Prenzler, P. D. (2006). Development of a headspace solid phase microextraction-gas chromatography method for monitoring volatile compounds in extended time-course experiments of olive oil. *Analytica Chimica Acta*, 556: 407–414.
- Kalua C., M., Allen, M., S., Bedgood, D., R., Bishop, A., G., Prenzler, P., Robards K. (2007). Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: A critical review. *Food Chemistry*, 100: 273–286.
- Kanakis, P., Termentzi, A., Michel, T., Gikas, E., Halabalaki, M., & Skaltsounis, A. (2013). From Olive Drupes to Olive Oil. An HPLC-Orbitrap-based Qualitative and Quantitative Exploration of Olive Key Metabolites. *Planta Medica*, 79: 1576 - 1587.
- Kiai, H., & Hafidi, A. (2014). Chemical composition changes in four green olive cultivars during spontaneous fermentation. *LWT- Food Science and Technology*, 57: 663–670.
- Kiritsakis, A., K. (1998). Flavor components of olive oil—A review. *Journal of the American Oil Chemists’ Society*, 75: 673–681.
- Klen, J. T., Wondra, A. G., Vrhovšek, U., & Vodopivec, B., M. (2015). Phenolic Profiling of Olives and Olive Oil Process-Derived Matrices Using UPLC-DAD-ESI-QTOF-HRMS Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63:

- Koc, C., Garragat Rospigliosi, W., Gallegos Arata, M., Lanchipa Sepúlveda, P. and Villalobos Ochoa, C. (2013). Aeration and Sodium chloride in the develop of microflora and phycochemical parameters on the *Olea europaea* L. cv Sevillana fermentation at the natural black style in La Yarada zone-Tacna. *Grasas y Aceites*. 64: 320–327.
- Kontogianni, V. G., Charisiadis, P., Margianni, E., Lamari, F. N., Gerothanassis, I. P., & Tzakos, A. G. (2013). Olive Leaf Extracts Are a Natural Source of Advanced Glycation End Product Inhibitors. *Journal of Medicinal Food*, 16: 817–822.
- Kumral, A., Korukluoglu, M., Romero, C., de Castro, A., Ruiz-Barba, J. L., & Brenes, M. (2013). Phenolic inhibitors involved in the natural fermentation of Gemlik cultivar black olives. *European Food Research and Technology*, 236: 101–107.
- Lamzira, Z., Asehraou, A., Brito, D., Oliveira, M., Faïd, M., A., & C. (2005). Bioter spoilage of green olives. *Food Technology and Biotechnology*, 43: 373–377.
- Lanza, B. (2012). Nutritional and Sensory Quality of Table Olives. Ch. 16. In “Olive Germplasm – The Olive Cultivation, Table Olive and Olive Oil Industry in Italy”. I. Muzzalupo (Ed.), p: 343. InTech.
- Lanza, B. (2013). Abnormal fermentations in table-olive processing: Microbial origin and sensory evaluation. *Frontiers in Microbiology*, 4: 1–7.
- Lavermicocca, P., Rossi, M., Russo, F., S. R. (2010). Table olives: a carrier for delivering probiotic bacteria to humans. In W. R. Preedy VR (Ed.), *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention* (pp: 735–743). Oxford: Academic Press.
- Ledenbach, L. H., and Marshall, R. T. (2009). Microbiological spoilage of dairy products. In *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages, Food Microbiology and Food Safety* (pp: 41–67). Doyle, W. H. Sperber and M. P.
- Lõoke, M., Kristjuhan, K., A. (2011). Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *Biotechniques*., 50; 325–328.

- López-López, A., Jiménez-Araujo, A., García-García, P. & Garrido-Fernández, A. (2007). Multivariate analysis for the evaluation of fiber, sugars, and organic acids in commercial presentations of table olives. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55: 10803–10811.
- López-López, A., Montaña, A., Garrido-Fernández, A. (2010). Chapter 75 – nutrient profiles of commercial table olives: fatty acids, sterols, and fatty alcohols In *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*, pp: 715–724 [Preedy VR and Watson RR, editors]. San Diego: Academic Press.
- Mafra, I., Barros, A. S., & Coimbra, M. A. (2006). Effect of black oxidising table olive process on the cell wall polysaccharides of olive pulp (*Olea europaea* L. var. Negrinha do Douro). *Carbohydrate Polymers*, 65: 1–8.
- Mafra, I., Barros, A. S., & Coimbra, M. A. (2007). The combined effects of black oxidising table olive process and ripening on the cell wall polysaccharides of olive pulp. *Carbohydrate Polymers*, 68: 647–657.
- Magistà, D., Ferrara, M., Del Nobile, M. A., Gammariello, D., Conte, A., A., & Perrone, G. (2016). *Penicillium salamii* strain ITEM 15302: a new promising fungal starter for salami production. *International Journal of Food Microbiology*, 231: 33–41.
- Maicas, S. (2020). The role of yeasts in fermentation processes. *Microorganisms*, 8: 1142.
- Malheiro, R., De Pinho, P., G., Casal, S., Bento, A., & Pereira, J. A. (2011). Determination of the volatile profile of stoned table olives from different varieties by using HS-SPME and GC/IT-MS. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91: 1693–1701.
- Mallouchos, A., Skandamis, P., Loukatos, P., Komaitis, M., Koutinas, A. K. M. (2003). Volatile compounds of wines produced by cells immobilized on grape skins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 3060–3066.
- Marsilio, V., Campestre, C., Lanza, B. & De Angelis, M. (2001). Sugar and polyol compositions of some European olive fruit varieties (*Olea europaea* L.) suitable

- for table olive purposes. *Food Chemistry*, 72: 485–490.
- Marsilio, V., Seghetti, L., Iannucci, E., Russi, F., Lanza, B., A., & M. (2005). Use of a lactic acid bacteria starter culture during green olive (*Olea europaea* L cv Ascolana tenera) processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85: 1084–1090.
- Marsilio, V., D'Andria, R., Lanza, B., Russi, F., Iannucci, E., Lavini, A., & Morelli, G. (2006). Effect of irrigation and lactic acid bacteria inoculants on the phenolic fraction, fermentation and sensory characteristics of olive (*Olea europaea* L. cv. Ascolana tenera) fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86: 1005–1013.
- Marsilio, V., Lanza, B., Russi, F., & Iannucci, E. (2008). Processing-induced changes in microstructural and textural characteristics during green olive fermentation. *Acta Horticulturae*, 791 PART 2, 677–683.
- Marsilio, V., Russi, F., Iannucci, E., & Sabatini, N. (2008). Effects of alkali neutralization with CO₂ on fermentation, chemical parameters and sensory characteristics in Spanish-style green olives (*Olea europaea* L.). *LWT - Food Science and Technology*, 41: 796–802.
- McFeeters, R., F. (2004). Fermentation microorganisms and flavour changes in fermented foods. *Journal of Food Science*, 69: 35–37.
- Medina-Pradas, E., and Arroyo-López, F. N. (2015). Presence of toxic microbial metabolites in table olives. *Frontiers in Microbiology*, 6: 873.
- Medina, E., Brenes, M., Romero, C., García, A., & De Castro, A. (2007). Main antimicrobial compounds in table olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 9817–9823.
- Medina, E., García-García, P., Romero, C., de Castro, A., & Brenes, M. (2020). Aerobic industrial processing of Empeltre cv. natural black olives and product characterisation. *International Journal of Food Science and Technology*, 55: 534–541.
- Michel, M., & Buszewski, B. (2009). Porous graphitic carbon sorbents in biomedical

- and environmental applications. *Adsorption*, 15: 193–202.
- Mikrou, T., Kasimati, K., Doufexi, I., Kapsokefalou, M., Gardeli, C., Mallouchos, A. (2021). Volatile Composition of Industrially Fermented Table Olives from Greece. *Foods*, 10:1000.
- Mohamed Mousa, Y., Gerasopoulos, D., Metzidakis, I., & Kiritsakis, A. (1996). Effect of Altitude on Fruit and Oil Quality Characteristics of ‘Mastoides’ Olives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 71:, 345–350.
- Montaño, A., Sánchez, A. H., López-López, A., De Castro, A., & Rejano, L. (2010). Chemical Composition of Fermented Green Olives: Acidity, Salt, Moisture, Fat, Protein, Ash, Fiber, Sugar, and Polyphenol. In *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*. Academic Press, pp: 291-297,
- Morales, M. T., & Tsimidou, M. (2000a). Handbook of olive oil: Analysis and properties. In J. Harwood & R. Aparicio (Eds.), *Handbook of olive oil: Analysis and properties* (pp: 381–441). Springer.
- Morales, M. T., & Tsimidou, M. (2000b). The role of volatile compounds and polyphenols in olive oil. In J. Harwood & R. Aparicio (Eds.), *Handbook of olive oil: Analysis and properties* (pp: 393–458). Gaithersburg, MD: Aspen Publishers.
- Morales, M. T., Aparicio, R., & Rios, J., J. (1994). Dynamic headspace gas chromatographic method for determining volatiles in virgin olive oil. *Journal of Chromatography A*, 668: 455–462.
- Morelló, J.-R., Romero, M.-P., & Motilva, M.-J. (2004). Effect of the Maturation Process of the Olive Fruit on the Phenolic Fraction of Drupes and Oils from Arbequina, Farga, and Morrut Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 6002–6009.
- Mulinacci, N., Romani, A., Galardi, C., Pinelli, P., Giaccherini, C., & Vincieri, F. F. (2001). Polyphenolic content in olive oil waste waters and related olive samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 3509–3514.
- Nikolaou, E., Soufleros, E., H., Bouloumpasi, E., and Tzanetakisa, N. (2006). Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains according to their oeno

- logical characteristics and vinification results. *Food Microbiology*, 23: 205–211.
- Nisiotou, A., A., Chorianopoulos, N., Nychas, G. J. E., & Panagou, E. Z. (2010). Yeast heterogeneity during spontaneous fermentation of black *Conservolea* olives in different brine solutions. *Journal of Applied Microbiology*, 108: 396–405.
- O'Brien, M., Nielsen, K. F., O'Kiely, P., Forristal, P. D., Fuller, H. T., A., & Frisvad, J. C. (2006). Mycotoxins and other secondary metabolites produced in vitro by *Penicillium paneum* Frisvad and *Penicillium roqueforti* Thom isolated from baled grass silage in Ireland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 9268–9276.
- Obied, H., K., Karuso, P., Prenzler, P. D., & Robards, K. (2007). Novel secoiridoids with antioxidant activity from Australian olive mill waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 2848–2853.
- Obied, H., K., Bedgood, D., R., Jr, Prenzler, PD, Robards, K. (2007). Chemical screening of olive biophenol extracts by hyphenated liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*. 603:176-89.
- Obied, H., K., Prenzler, P., D., Ryan, D., Servili, M., Taticchi, A., Esposto, S, R. K. (2008). Biosynthesis and biotransformations of phenol-conjugated oleosidic secoiridoids from *Olea europaea* L. *Natural Product Reports*, 25: 1167–1179.
- Oliveras López, M., J., Innocenti M., Ieri, F., Giaccherini, C, Romani, A, M. N. (2008). HPLC/DAD/ESI/MS detection of lignans from Spanish and Italian *Olea europaea* L. fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21: 62–70.
- Ozay, G., and Borcakh, M. (1995). Effect of brine replacement and salt concentration on the fermentation of naturally black olives,. *Food Research International*, 28: 553–559.
- Paba, A., Chessa, L., Daga, E., Campus, M., Bulla, M., Angioni, A., Sedda, P., Comunian, R. (2020). Do Best-Selected Strains Perform Table Olive Fermentation Better than Undefined Biodiverse Starters? A Comparative Study. *Foods*, 9: 135.

- Panagou, E. Z., Schillinger, U., Franz, C. M. A. P., & Nychas, G. J. E. (2008). Microbiological and biochemical profile of cv. Conservolea naturally black olives during controlled fermentation with selected strains of lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, 25: 348–358.
- Pawliszyn, J. (1997). *Solid-phase microextraction: Theory and practice*. New York, NY: VCH Publishers.
- Penland, M., Deutsch, S.M., Falentin, H., Pawtowski, A., Poirier, E., Visenti, G., Le Meur, C., Maillard, M.B., Thierry, A., Mounier, J., Coton, M. (2020). Deciphering microbial community dynamics and biochemical changes during Nyons black olive natural fermentations. *Front. Microbiology*, 11: 586614.
- Peralbo-Molina, A., Priego-Capote, F., & Luque de Castro, M. D. (2012). Tentative identification of phenolic compounds in olive pomace extracts using liquid chromatography-tandem mass spectrometry with a quadrupole-quadrupole-time-of-flight mass detector. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 11542–11550.
- Peres, C., M., Alves, M., Hernandez-Mendoza, A., Moreira, L., Silva, S., Bronze, M., R., Malcata, & FX. (2014). Novel isolates of lactobacilli from fermented Portuguese olive as potential probiotics. *LWT-Food Science and Technology*, 59: 234–246.
- Pérez-Jiménez, F., López-Miranda, J., M. P. (2002). Protective effect of dietary monounsaturated fat on arteriosclerosis: beyond cholesterol. *Atherosclerosis*, 163: 385–398.
- Perpetuini, G., Caruso, G., Urbani, S., Schirone, M., Esposto, S., Ciarrocchi, A., Prete, R., Garcia-Gonzalez, N., Battistelli, N., Gucci, R., et al. (2018). Changes in polyphenolic concentrations of table olives (cv. Itrana) produced under different irrigation regimes during spontaneous or inoculated fermentation. *Frontiers in Microbiology*, 1287.
- Petridis, A., Therios, I., & Samouris, G. (2012). Genotypic variation of total phenol and Oleuropein concentration and antioxidant activity of 11 Greek olive cultivars (*Olea Europaea* L.). *HortScience*, 47: 339–342.

- Piga, A., & Del Caro, A., Pinna, I., Agabbio, M. (2005). Anthocyanin and colour evolution in naturally black table olives during anaerobic processing. *LWT - Food Science and Technology*, 38: 425-429.
- Pilavtepe-Çelik, M., Balaban, M., O., Alpas, H., Yousef, A. (2008). Image analysis based quantification of bacterial volume change with high hydrostatic pressure. *Journal of Food Science*, 73: 423–429.
- Pistarino, E., Aliakbarian, B., Casazza, A. A., Paini, M., Cosulich, M. E., & Perego, P. (2013). Combined effect of starter culture and temperature on phenolic compounds during fermentation of Taggiasca black olives. *Food Chemistry*, 138: 2043–2049.
- Pointing, S., B., Vrijmoed, L., L., P., and Jones, E. B. G. (1999). Laccase is produced as the sole lignin modifying enzyme in submerged liquid culture by the white-rot fungus *Pycnoporus sanguineus*. *Mycologia*, 91: 345–349.
- Psani, M., & Kotzekidou, P. (2006). Technological characteristics of yeast strains and their potential as starter adjuncts in Greek-style black olive fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22: 1329–1336.
- Querol, A., Barrio, E., and Ramón, D. (1992). A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Systematic and Applied Microbiology*, 15: 439–446.
- Randazzo, C., L., Ribbera, A., Pitino, I., Romeo, F. V., & Caggia, C. (2012). Diversity of bacterial population of table olives assessed by PCR-DGGE analysis. *Food Microbiology*, 32: 87–96.
- Randazzo, C., L., Todaro, A., Pino, A., Pitino, I., Corona, O, C. C. (2017). Microbiota and metabolome during controlled and spontaneous fermentation of *Nocellara Etnea* table olives. *Food Microbiology*, 65: 136–148.
- Rendueles, E., Omer, M., K., Alvseike, O., Alonso-Calleja, C., Capita, R, P. M. (2011). Microbiological food safety assessment of high hydrostatic pressure processing: a review. *LWT-Food Science and Technology*, 44: 1251–1260.
- Richards, A., & Wijesundera, C. (2005). Evaluation of oxidative stability of canola

- oils by headspace analysis. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 82: 869–874.
- Ripa, V., De Rose, F., Caravita, M. A., Parise, M. R., Perri, E., Rosati, A., et al. (2008). Qualitative evaluation of olive oils from new olive selections and effects of genotype and environment on oil quality. *Advances in Horticultural Science*, 22: 95–103.
- Robbins, R., J. (2003). Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 2866–2887.
- Rodríguez-Gómez, F., Bautista-Gallego, J., Romero-Gil, V., Arroyo-López, F., N., & Garrido-Fernández, A. (2013). Influence of yeasts on the oil quality indexes of table olives. *Journal of Food Science*, 78(8).
- Rodríguez-Gómez, F., Romero-Gil, V., Bautista-Gallego, J., Garrido-Fernández, A., & Arroyo-López, F. N. (2012). Multivariate analysis to discriminate yeast strains with technological applications in table olive processing. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28: 1761–1770.
- Rodríguez, H., Curiel, J. A., Landete, J. M., de las Rivas, B., de Felipe, F. L., Gómez-Cordovés, C., Mancheño, J. M., & Muñoz, R. (2009). Food phenolics and lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 132: 79–90.
- Romani A., Minunni M., Pinelli P., Vincieri F.F., De Carlo M., M., & M. (2000). Comparison among Differential Pulse Voltametry, Amperometric Biosensor and HPLC/DAD Analysis for Polyphenol Determination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 1197–1203.
- Romero, C., García, P., Brenes, M., García, A., & Garrido, A. (2002). Phenolic compounds in natural black Spanish olive varieties. *European Food Research and Technology*, 215: 489–496.
- Ruiz-Barba J., L., Jiménez-Díaz, R. (1994). Vitamin and amino acid requirements of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from green olive fermentations. *Journal of Applied Bacteriology*, 76: 350–355.
- Ruiz-Barba, J., L., Brenes-Balbuena, M., Jiménez-Díaz, R., García-García, P., &

- Garrido-Fernández, A. (1993). Inhibition of *Lactobacillus plantarum* by polyphenols extracted from two different kinds of olive brine. *Journal of Applied Bacteriology*, 74: 15–19.
- Ruiz-Barba, J., L., Sánchez, A., H., López-López, A., Cortés-Delgado, A., & Montaña, A. (2023). Microbial community and volatilome changes in brines along the spontaneous fermentation of Spanish-style and natural-style green table olives (Manzanilla cultivar). *Food Microbiology*, 113: 104145.
- Ryan, D., Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K., & Lavee, S. (2002). Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L. *Scientia Horticulturae*, 92: 147–176.
- Ryan, D., Robards, K., & Lavee, S. (1999). Changes in phenolic content of olive during maturation. *International Journal of Food Science and Technology*, 34: 265-274.
- Sabatini, N., & Marsilio, V. (2008). Volatile compounds in table olives (*Olea Europaea* L., Nocellara del Belice cultivar). *Food Chemistry*, 107: 1522–1528.
- Sabatini, N., Mucciarella, M. R., & Marsilio, V. (2008). Volatile compounds in uninoculated and inoculated table olives with *Lactobacillus plantarum* (*Olea europaea* L., cv. Moresca and Kalamata). *LWT - Food Science and Technology*, 41: 2017–2022.
- Sabatini, N., Perri, E., & Marsilio, V. (2009). An investigation on molecular partition of aroma compounds in fruit matrix and brine medium of fermented table olives. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10: 621–626.
- Sánchez, R., Boselli, E., Fernández, A., Arroyo, P., Lozano, J., & Martín-Vertedor, D. (2022). Determination of the Masking Effect of the ‘Zapateria’ Defect in Flavoured Stuffed Olives Using E-Nose. *Molecules*, 27: 4300.
- Sánchez, A., H., Rejano, L., Montano, A. and de Castro, A. (2001). Utilization at high pH of starter cultures of lactobacilli for Spanish-style green olive fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 67: 115–122.
- Sánchez, A., H., López-López, A., Cortés-Delgado, A., Beato, V. M., Medina, E., de

- Castro, A., & Montaña, A. (2018). Effect of post-fermentation and packing stages on the volatile composition of Spanish-style green table olives. *Food Chemistry*, 240: 1071–1079.
- Sánchez Gómez, A., H., García García, P., & Rejano Navarro, L. (2006). Elaboration of table olives. *Grasas y Aceites*, 57: 86–94.
- Sansone-Land, A., Takeoka, G., R., & Shoemaker, C., F. (2014). Volatile constituents of commercial imported and domestic black-ripe table olives (*Olea europaea*). *Food Chemistry*, 149: 285–295.
- Savarese, M., De Marco, E., & Sacchi, R. (2007). Characterization of phenolic extracts from olives (*Olea europaea* cv. Pisciottana) by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry*, 105: 761–770.
- Savitha, J., Srividya, S., Jagat, R., Payal, P., Priyanki, S., Rashmi, G.W., et al. (2007). Identification of potential fungal strain(s) for the production of inducible, extracellular and alkalophilic lipase. *African Journal of Biotechnology*, 6: 564–568.
- Segovia Bravo, K. A., Arroyo López, F. N., García García, P., Durán Quintana, M. C., & Garrido Fernández, A. (2007). Treatment of green table olive solutions with ozone. Effect on their polyphenol content and on *Lactobacillus pentosus* and *Saccharomyces cerevisiae* growth. *International Journal of Food Microbiology*, 114: 60–68.
- Servili, M., Settanni, L., Veneziani, G., Esposto, S., Massitti, O., Taticchi, A., Urbani, S., Montedoro, G.F., A., & Corsetti, A. (2006). The use of *Lactobacillus pentosus* IMO to shorten the debittering process time of black table olives (Cv. Itrana and Leccino): a pilot-scale application. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 3869–3875.
- Servili M, Baldioli M, Selvaggini R, Macchioni A, M. G. (1999). Phenolic compounds of olive fruit: one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance characterization of Nuzhenide and its distribution in the constitutive parts of fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 12–18.

- Servili, M., Selvaggini, R., Esposto, S., Taticchi, A., Montedoro, G, M. G. (2004). Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *Journal of Chromatography A*, 1054: 113–127.
- Servili, M., & Montedoro, G. (2002). Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104: 602–613.
- Shaidi, F., and Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods A, beverages and spices: antioxidant activity and health effects. *Journal of Functional Foods*, 18: 820–897.
- Silva, T., Reto, M., Sol, M., Peito, A., Peres, C. M., Peres, C., & Malcata, F. X. (2011). Characterization of yeasts from Portuguese brined olives, with a focus on their potentially probiotic behavior. *LWT - Food Science and Technology*, 44: 1349–1354.
- Sivakumar, G., Briccoli Bati, C., & Uccella, N. (2005). HPLC-MS screening of the antioxidant profile of Italian olive cultivars. *Chemistry of Natural Compounds*, 41: 588–591.
- Stinson, M., Ezra, D., Hess, W. M., Sears, J., & Strobel, G. (2003). An endophytic *Gliocladium* sp. of *Eucryphia cordifolia* producing selective volatile antimicrobial compounds. *Plant Science*, 165: 913–922.
- Sunesen, L., O., Stahnke, L., H. (2003). Mould starter cultures for dry sausages-selection, application and effects. *Meat Science*, 65: 935-948.
- Tassou, C., C., Katsaboxakis, C., Z., Georget, D., M. R., Parker, M., L., Waldron, K., W., Smith, A., C., & Panagou, E., Z. (2007). Effect of calcium chloride on mechanical properties and microbiological characteristics of cv. Conservolea naturally black olives fermented at different sodium chloride levels. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87:1123–1131.
- Tassou, C., C., Panagou, E., Z., & Katsaboxakis, K., Z. (2002). Microbiological and physicochemical changes of naturally black olives fermented at different

- temperatures and NaCl levels in the brines. *Food Microbiology*, 19: 605–615.
- Tofalo, R., Schirone, M., Perpetuini, G., Angelozzi, G., Suzzi, G., and C., & A. (2012). Microbiological and chemical profiles of naturally fermented table olives and brines from different Italian cultivars. *Antonie van Leeuwenhoek*, 102: 121–131.
- 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: 203–208.
- Torrens, J., Urpi, P., Montserrat, R., A., Vichi, S., López-Tamames, E, B., S. (2008). Different commercial yeast strains affecting the volatile and sensory profile of cava base wine. *International Journal of Food Microbiology*, 124: 48–57.
- Torriani, S., Zapparoli, G., Suzzi, G. (1999) Genetic and phenotypic diversity of *Saccharomyces sensu stricto* strains isolated from Amarone wine. Diversity of *Saccharomyces* strains from Amarone wine. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 3: 207–215.
- Tosi, F., Sandri, S., Tedeschi, G., Malacarne, M., and Fossa, E. (2008). Variazioni di composizione e proprietà fisico-chimiche del parmigiano-reggiano durante la maturazione e in differenti zone della forma. *Scienza e Tecnica Lattiero Casearia*, 59: 507–528.
- Traina, C., Ferrocino, I., Bonciolini, A., Cardenia, V., Lin, X., Rantsiou, K., & Cocolin, L. (2024). Monitoring the yeasts ecology and volatiles profile throughout the spontaneous fermentation of Taggiasca cv. table olives through culture-dependent and independent methods. *International Journal of Food Microbiology*, 417: 417:110688.
- Tsapatsaris, S., & Kotzekidou, P. (2004). Application of central composite design and response surface methodology to the fermentation of olive juice by *Lactobacillus plantarum* and *Debaryomyces hansenii*. *International Journal of Food Microbiology*, 95: 157–168.
- Tufariello, M., Durante, M., Ramires, F. A., Grieco, F., Tommasi, L., Perbellini, E.,

- Falco, V., Tasioula-Margari, M., Logrieco, A. F., Mita, G., & Bleve, G. (2015). New process for production of fermented black table olives using selected autochthonous microbial resources. *Frontiers in Microbiology*, 6: 1–15.
- Tufariello, M., Durante, M., Veneziani, G., Taticchi, A., Servili, M., Bleve, G., & Mita, G. (2019). Patè olive cake: Possible exploitation of a by-product for food applications. *Frontiers in Nutrition*, 6: 1–13.
- Tufariello, M., Mita, G., & Bleve, G. (2016). Biotechnology can improve a traditional product as table olives. In D. Boskou & M. L. Clodoveo (Eds.), *Products from olive tree* (pp. 235–260). IntechOpen.
- Tura, D., Failla, O., Pedò, S., Gigliotti, C., Bassi, D., & Serraiocco, A. (2008). Effects of seasonal weather variability on olive oil composition in northern Italy. *Acta Horticulturae*, 791: 769–776.
- Tura, D., Failla, O., Bassi, D., Pedò, S., & Serraiocco, A. (2008). Cultivar influence on virgin olive (*Olea europea* L.) oil flavor based on aromatic compounds and sensorial profile. *Scientia Horticulturae*, 118: 139–148.
- Turantaş, F., Göksungur, Y., Dinçer, A. H., Ünlütürk, A., Güvenç, U., & Zorlu, N. (1999). Effect of potassium sorbate and sodium benzoate on microbial population and fermentation of black olives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79: 1197–1202.
- Vas, G., & Vékey, K. (2004). Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *Journal of Mass Spectrometry*, 39: 233–254.
- Vinha, A., F., Ferreres, F., Silva, B. M., Valentão, P., Gonçalves, A., Pereira, J. A., Oliveira, M. B., Seabra, R. M., & Andrade, P. B. (2005). Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (*Olea europaea* L.): Influences of cultivar and geographical origin. *Food Chemistry*, 89: 561–568.
- Visioli, F., Poli, A., G. C. (2002). Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Medicinal Research Reviews*, 22: 65–75.
- Visioli, F., Bernardini, E. (2011). Extra virgin olive oil's polyphenols: biological

activities. *Current Pharmaceutical Design*, 17: 786-804.

Vossen, P. (2007). *Organic Production Manual*. University of California Agric and natural resources, Publication 3505, CA. pp: 22.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. (1990). "Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics," in *PCR Protocols*, eds M.A. Innis, D.H. Gelf and, J.J. Sninsky, and T.J. White (San Diego, CA: Academic Press), pp: 315–322.

Wilson, K. (2001), *Preparation of Genomic DNA from Bacteria*. *Current Protocols in Molecular Biology*, 56: 2.4.1-2.4.5.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Αλυγιάκη, Ε. (1964). Η κύανωση (γαλάζωμα) των μαύρων ελιών. Στα *Χημικά Χρονικά*, 26Α σελ. 127–129.

Αλυγιάκης, Μ. (1982). *Επεξεργασία και Κονσερβοποίηση της Επιτραπέζιας Ελιάς*, Ν.Μαυρομάτης & ΣΙΑ ΕΠΕ, Αθήνα.

Μπαλατσούρας, Γ. Δ. (2004). *Η επιτραπέζια ελιά. Σύγχρονη Ελαιοκομία III*. Ιδιωτική Έκδοση. Αθήνα.

Παλαιολόγου, Δ., Κατσαρέλη, Ε., & Παπανικολάου, Γ. (2015). Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Στο Γ. Παπανικολάου, Δ. Παλαιολόγου, Ε. Κατσαρέλη, Θ. Κατσίλα, Χ. Τσαρουχά, Μ. Τζέτη, Κ. Λιλάκος, & Λ. Δούκισσας (Επιμ.), *Εργαστηριακές Ασκήσεις Γενετικής του Ανθρώπου* (σελ. 129–152). Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις.

Μπαλατσούρας, Γ. (1995). Δομή και χημική σύσταση του ελαιοκάρπου. Στο Γ. Μπαλατσούρας (Επιμ.), *Η Επιτραπέζια Ελιά (Β΄, σελ. 86–89)*. Εκδόσεις Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.

ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ

- <http://www.minagric.gr/index.php/el/for-farmer-2/2012-02-02-07-52-07>.

- <http://www.fao.org/docrep/x0560e/x0560e08.htm>).
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.
- ITEM collection: <http://www.ispa.cnr.it/Collection/>).
- International Olive Oil Council (IOOC), Trade standard applying to table olives, https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2021/07/COI-OT-MO-1-Rev.3-2021_ENG.pdf, June 2021.
- International Olive Oil Council (IOOC), Method sensory analysis of table olives, https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2021/07/COI-OT-MO-1-Rev.3-2021_ENG.pdf, June 2021.
- International Olive Oil Council (IOOC), International Olive Council: Sensory Analysis of Olive Oil: Glass for oil Tasting. (Issue COI/T.20/Doc. N° 5/Rev. 1).