



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΕΙΡΑΙΩΣ  
ΤΜΗΜΑ ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗΣ  
ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ**

**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ  
ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**



**ΔΙΠΛΩΜΑ ΣΤΗ ΒΙΟΟΙΚΟΝΟΜΙΑ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΦΟΡΤΙΟΥ ΚΑΤΑ ΤΗ  
ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΑΣ ΕΛΙΑΣ**

**ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ Δ.ΤΣΙΚΡΙΚΑ**

**Πειραιάς, Μάιος 2020**



**UNIVERSITY OF PIRAEUS  
DEPARTMENT OF ECONOMICS**

**NATIONAL  
AND  
KAPODISTRIAN  
UNIVERSITY  
OF ATHENS  
DEPARTMENT  
OF BIOLOGY**



**M.Sc. in Bioeconomics**

**STUDY OF THE MICROBIAL CHARGE DURING THE  
TABLE OLIVE MATURATION**

**By  
EVANGELIA D.TSIKRIKA**

**Piraeus, Greece, May 2020**

*Στην οικογένειά μου*

## Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μικροβιολογίας του τομέα Βοτανικής του τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών κατά το ακαδημαϊκό έτος 2019-2020 υπό την επίβλεψη του αναπληρωτή καθηγητή κ. Δημητρίου Χατζηνικολάου.

Κατ' αρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή μου κ. Δημήτρη Χατζηνικολάου, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την επιλογή του θέματος, την ηθική συμπαράσταση καθώς και για τις γνώσεις που μου προσέφερε όχι μόνο καθ' όλη τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μελέτης αλλά και καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Ακόμη, επιθυμώ να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής για το χρόνο που αφιέρωσαν να αναγνώσουν την παρούσα μελέτη.

Στο σημείο αυτό, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως την υποψήφια διδάκτορα Ερμιόνη Ραυτοπούλου για τις γνώσεις, τις συμβουλές που μου προσέφερε καθώς και για την υπομονή που επέδειξε. Επίσης, την ευχαριστώ για τη φιλική διάθεση με την οποία με αντιμετώπισε, τη συμπαράσταση αλλά και για τις πάντα σωστές της υποδείξεις στο πειραματικό κομμάτι. Χωρίς τη συμβολή της δε θα ήταν δυνατή η πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης.

Επίσης, ευχαριστώ πολύ τους υποψήφιους διδάκτορες Μαντώ Βαρυμπόπη, Παναγιώτη Γκλέκα για την τεράστια βοήθεια που μου προσέφεραν απλόχερα και για το ευχάριστο κλίμα εργασίας που δημιούργησαν στο εργαστήριο.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να εκφράσω στην οικογένειά μου, στους συγγενείς, στους φίλους μου για την ψυχολογική υποστήριξη.

# ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΦΟΡΤΙΟΥ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΑΣ ΕΛΙΑΣ

**Σημαντικοί όροι:** λακτοβάκιλλοι, επιτραπέζια ελιά, ζύμωση, ωρίμανση, LAB βακτήρια

## Περίληψη

Η πρώτη απόδειξη της καλλιέργειας της ελιάς συνέβη στην Κρήτη κατά τη Νεολιθική περίοδο (6-3 χιλιάδες χρόνια π.Χ.). Η καλλιέργεια της ελιάς περιλαμβάνει περίπου 11.5 εκατομμύρια εκτάρια ελαιόδεντρων, 58 χώρες από τις 5 ηπείρους και τα προϊόντα που προέρχονται από αυτή τη δραστηριότητα δηλαδή το ελαιόλαδο και οι επιτραπέζιες ελιές καταναλώνονται σε 179 χώρες. Στον κόσμο, η καλλιέργεια της ελιάς απασχολεί περισσότερους από 35 εκατομμύρια ανθρώπους, που αντιπροσωπεύουν περίπου το 1.20% του ενεργού πληθυσμού. Το 84 % των επιτραπέζιων ελιών καταναλώνονται στις χώρες παραγωγής. Ο καρπός της ελιάς (*Olea europaea ssp. europaea*) είναι από τα πιο πολύτιμα φρούτα επειδή έχει οικολογική, οικονομική και πολιτιστική σημασία. Υπάρχουν περισσότερα από 900 εκατομμύρια ελαιόδεντρα ανά τον κόσμο: το λεκανοπέδιο της Μεσογείου παραμένει το κυρίαρχο με 95 % της παγκόσμιας παραγωγής ελιών. Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος (LAB) αντιπροσωπεύουν μια σημαντική ομάδα προβιοτικών βακτηρίων συμπεριλαμβανομένου του *Lactobacillus spp.* και *Bifidobacterium spp.*, τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα προβιοτικά εκτός από τις ζύμες. Τα LAB που απομονώνονται από λαχανικά έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν κάτω από ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες όπως οξέα, διακυμάνσεις φυσικών και διατροφικών συνθηκών και υψηλή συγκέντρωση άπεπτων θρεπτικών στοιχείων. Πιο συγκεκριμένα, τα είδη *L. pentosus* και *L. plantarum* έχουν βρεθεί σε μια ποικιλία περιβαλλοντικών θώκων συμπεριλαμβανομένων των ελιών, που είναι φορείς χρήσιμων προβιοτικών μικροοργανισμών ικανών να βελτιώνουν τη μικροβιακή ανισορροπία στο γαστρεντερικό σύστημα. Στη συγκεκριμένη μεταπτυχιακή εργασία έγινε προσπάθεια μελέτης του μικροβιακού φορτίου κατά τη διάρκεια ωρίμανσης της επιτραπέζιας ελιάς. Πιο συγκεκριμένα, έγιναν διαδοχικές αραιώσεις στα 6 δείγματα ελιών, εμβολιασμός σε καινούρια τρυβλία, ανακαλλιέργειες αποικιών, δημιουργία υγρών καλλιιεργειών, αποθέματα γλυκερόλης και δημιουργία στερεών καλλιιεργειών. Ακόμη, πραγματοποιήθηκε πείραμα

ανάπτυξης λακτοβακίλλων με και χωρίς χλωριούχο νάτριο ( NaCl 5 % w/v) σε MRS Broth και τέλος έγινε απομόνωση DNA με τη μέθοδο CTAB. Όσον αφορά τα αποτελέσματα, καταμετρήσαμε αποικίες με και χωρίς αραίωση ,πραγματοποιήσαμε παρατηρήσεις σχετικές με τις αποικίες και εξετάσαμε την ανάπτυξη των λακτοβακίλλων με και χωρίς χλωριούχο νάτριο.Τα βακτήρια δεν μπόρεσαν να αναπτυχθούν επαρκώς στο χλωριούχο νάτριο και η απορρόφησή τους συνεχώς μειωνόταν οπότε μετά τις 22 ώρες σίγουρα τα βακτήρια πέθαναν. Αυτό μπορεί να συμβαίνει επειδή τα βακτήρια βρίσκονταν σε ένα τεχνητό περιβάλλον αλατιού και όχι φυσικά στις ελιές που όπως γνωρίζουμε είναι το ενδιαίτημά τους. Συμπερασματικά, θα θέλαμε να αναφέρουμε πως σε μελλοντικό πείραμα θα μπορούσαμε να τοποθετήσουμε τους γαλακτοβάκιλλους σε διαφορετικές θερμοκρασίες ώστε να δούμε πως αναπτύσσονται και τι απορροφήσεις έχουν. Επίσης θα μπορούσαμε μέσα από την PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης) να ταυτοποιήσουμε τους λακτοβάκιλλους στοχεύοντας στην περιοχή 16s και έτσι να είμαστε σε θέση να γνωρίσουμε σε ποιο γένος και είδος ανήκουν μετά από την αλληλούχιση DNA.

# STUDY OF THE MICROBIAL CHARGE DURING THE TABLE OLIVE MATURATION

**Keywords:** lactobacilli, table olive, fermentation, maturation, LAB bacteria

## Abstract

The first evidence of olive cultivation occurred in Crete during the Neolithic period (6-3 thousand BC). Olive cultivation comprises approximately 11.5 million hectares of olive trees, 58 countries from the 5 continents, and products derived from this activity, namely olive oil and table olives, are consumed in 179 countries. In the world, olive cultivation employs more than 35 million people, representing about 1.20% of the working population. 84% of table olives are consumed in producing countries. Olive fruit (*Olea europaea ssp. europaea*) is one of the most valuable fruits because of its ecological, economic and cultural importance. There are more than 900 million olive trees worldwide: the Mediterranean basin remains dominant with 95% of world production. Lactic acid bacteria (LAB) represent a significant group of probiotic bacteria including *Lactobacillus spp.* and *Bifidobacterium spp.*, the most commonly used probiotics other than yeasts. LABs isolated from vegetables have the ability to survive under extreme environmental conditions such as acids, fluctuations in natural and nutritional conditions, and a high concentration of undigested nutrients. This postgraduate thesis attempted to study the microbial charge during the maturation of the table olive. Specifically, dilutions were performed sequentially on the 6 olive samples, inoculated into new plates, colonies cultured, we created fluid and solid culture and glycerol stocks. In addition, a lactobacillus growth experiment with and without sodium chloride (5% w / v NaCl) was performed and finally DNA was isolated by the CTAB method. As far as results are concerned, we counted colonies with and without dilution, made colony observations, and examined the development of lactobacilli with and without sodium chloride. The bacteria were not able to grow sufficiently in sodium chloride and their absorption is constantly decreasing, so after 22 hours the bacteria must have died. This may have happened because the bacteria were in an artificial salt environment and not naturally in the olives that we know

they are their habitat. In conclusion, we would like to mention that in a future experiment we could place the lactobacilli at different temperatures to see how they develop and what their absorbances are. We would also be able to identify the lactobacilli by targeting the 16s region through PCR (polymerase chain reaction) and get to know in which genus and species they belong to after DNA sequencing.



## Περιεχόμενα

Περίληψη ix

Abstract xi

Κατάλογος Πινάκων xiii

Κατάλογος Διαγραμμάτων xv

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Εισαγωγή

1.1 Σύντομη Ιστορία της ελιάς	2
1.2 Μερικά δεδομένα για την καλλιέργεια της ελιάς	2
1.3 Παγκόσμια παραγωγή της ελιάς	3
1.4 Η ελιά ως ζυμώμενο λαχανικό	3
1.5 Η καλλιέργεια της ελιάς	7
1.6 Ποικιλίες ελιάς και επεξεργασία	8
1.7 Οι ιδιότητες της ελιάς	9
1.8 Η ελιά ως λειτουργικό τρόφιμο	9
1.9 Προβιοτικά	10
1.10 Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος (LAB)	10
1.11 Το γένος <i>Lactobacillus pentosus</i>	13
1.12 Οι εναρκτήριες καλλιέργειες	14

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2**

### **Υλικά και Μέθοδοι**

<b>2.1 Θρεπτικά υποστρώματα</b>	<b>16</b>
<b>2.2 Διαδοχικές αραιώσεις</b>	<b>16</b>
<b>2.3 Εμβολιασμός σε καινούρια τρυβλία</b>	<b>16</b>
<b>2.4 Ανακαλλιέργειες αποικιών</b>	<b>17</b>
<b>2.5 Δημιουργία υγρών καλλιεργειών</b>	<b>17</b>
<b>2.6 Stock γλυκερόλης</b>	<b>17</b>
<b>2.7 Δημιουργία στερεών καλλιεργειών</b>	<b>18</b>
<b>2.8 Πείραμα ανάπτυξης λακτοβακίλλων σε χλωριούχο νάτριο ( NaCl 5 % w/v )και σε MRS Broth</b>	<b>18</b>
<b>2.9 Απομόνωση DNA με τη μέθοδο CTAB</b>	<b>19</b>

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Αποτελέσματα και Συζήτηση**

<b>3.1 Καταμέτρηση αποικιών</b>	<b>23</b>
<b>3.2 Καταμέτρηση αποικιών με αραιώση</b>	<b>25</b>
<b>3.3 Παρατηρήσεις σχετικές με τις αποικίες</b>	<b>26</b>
<b>3.4 Αποτελέσματα από το πείραμα ανάπτυξης λακτοβάκιλλων με και χωρίς χλωριούχο νάτριο</b>	<b>27</b>

<b>3.5 Συζήτηση-Καταμέτρηση αποικιών</b>	<b>31</b>
<b>3.6 Συζήτηση- Καταμέτρηση αποικιών με αραίωση</b>	<b>32</b>
<b>3.7 Συζήτηση -Παρατηρήσεις σχετικές με τις αποικίες</b>	<b>32</b>
<b>3.8 Παρατηρήσεις σχετικές με το πείραμα ανάπτυξης γαλακτοβακίλλων με και χωρίς χλωριούχο νάτριο</b>	<b>33</b>

#### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 : Συμπεράσματα**

<b>4.1 Συμπεράσματα</b>	<b>35</b>
-------------------------	-----------

<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ</b>	<b>22</b>
------------------	-----------

<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>36</b>
---------------------	-----------

#### **Κατάλογος Πινάκων**

3.1 Απορροφήσεις των δειγμάτων Α3Π1 και Α3Π4	27
3.2 Απορροφήσεις των δειγμάτων Α3Π3 και Β4Π2	28
3.3 Απορροφήσεις των δειγμάτων Γ7ΠΑ και Γ7ΠΒ	30

## **Κατάλογος Διαγραμμάτων**

Διάγραμμα 1: Ανάπτυξη λακτοβάκιλλων A3Π1 ΚΑΙ A3Π4 με και χωρίς χλωριούχο νάτριο 28

Διάγραμμα 2: Ανάπτυξη λακτοβάκιλλων A3Π3 και B4Π2 με και χωρίς χλωριούχο νάτριο 29

Διάγραμμα 3: Ανάπτυξη λακτοβάκιλλων Γ7ΠΑ και Γ7ΠΒ με και χωρίς χλωριούχο νάτριο 30

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Σύντομη ιστορία της ελιάς

Η πρώτη απόδειξη της καλλιέργειας της ελιάς συνέβη στην Κρήτη κατά τη Νεολιθική περίοδο (6-3 χιλιάδες χρόνια π.Χ.). Επίσης καλλιεργούνταν στην Αίγυπτο (2400 π.Χ.) χρησιμοποιώντας μια πολύ προηγμένη μέθοδο. Στην Ελλάδα και στη βόρεια Αφρική, υπάρχουν αναφορές καλλιέργειας ελιάς πάνω από 7 χιλιάδες χρόνια στις ακτές που περιτριγυρίζουν τη Μεσόγειο Θάλασσα, όπου εισήχθη από τους Φοίνικες. Τα ελαιόδεντρα έφτασαν στις ακτές της Σικελίας και της Ισπανίας και εξαπλώθηκαν τον 5<sup>ο</sup> αιώνα π.Χ. Μεταξύ του 6ου και του 4ου αιώνα π.Χ., η καλλιέργειά της καθιερώθηκε σε πολλές περιοχές της Ιταλίας και της Ισπανίας από τους Ρωμαίους. Στον πρώτο αιώνα μ.Χ., τα ελαιόδεντρα ήταν μια εμπορική καλλιέργεια για τους Ρωμαίους, που εισήγαγαν ελαιόλαδο από τις πιο απομακρυσμένες αποικίες της αυτοκρατορίας, κυρίως από την Ισπανία και Βόρεια Αφρική. Η παραγωγή της καλλιέργειας μειώθηκε κατά τη διάρκεια του Μεσαίωνα αλλά αυξήθηκε και πάλι μετά τον δέκατο πέμπτο αιώνα, στην σημερινή καλλιεργούμενη περιοχή που καλύπτει σχεδόν ολόκληρη την ακτή της Μεσογείου.

Μετά από πολλές προσπάθειες να εισαχθεί η ελιά στην κεντρική και νότια Αμερική, τον 16<sup>ο</sup> αιώνα, η ελαιοπαραγωγή κατάφερε να σταθεροποιηθεί τον 17<sup>ο</sup> αιώνα σε χώρες όπως το Περού, η Χιλή, η Αργεντινή, η Ουρουγουάη, το Μεξικό και οι Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής τον 18<sup>ο</sup> αιώνα. Πιο πρόσφατα, εξαπλώθηκε σε νέες περιοχές όπως η Νότια Αφρική και η Ωκεανία (19<sup>ος</sup> αιώνας) και η Άπω Ανατολή (Κίνα, Ιαπωνία) στα τέλη του 19<sup>ου</sup> αιώνα (Benitez *et al.*, 2018).



Εικόνα 1: Διαδρομές της διασποράς της ελιάς

Πηγή: [https://www.researchgate.net/publication/326070870\\_INTERNATIONAL\\_OLIVE\\_GROWING](https://www.researchgate.net/publication/326070870_INTERNATIONAL_OLIVE_GROWING)

Η καλλιέργεια της ελιάς περιλαμβάνει περίπου 11.5 εκατομμύρια εκτάρια ελαιόδεντρων, 58 χώρες από τις 5 ηπείρους και τα προϊόντα που προέρχονται από αυτή τη δραστηριότητα δηλαδή το ελαιόλαδο και οι επιτραπέζιες ελιές καταναλώνονται σε 179 χώρες. Στον κόσμο, η καλλιέργεια της ελιάς απασχολεί περισσότερους από 35 εκατομμύρια ανθρώπους, που αντιπροσωπεύουν περίπου το 1.20% του ενεργού πληθυσμού. Το 84 % των επιτραπέζιων ελιών καταναλώνονται στις χώρες παραγωγής (Benitez *et al.*, 2018).

### 2.3 Παγκόσμια παραγωγή της ελιάς

Η διεθνής παραγωγή ελιάς μπορεί να ταξινομηθεί σε τρεις τύπους: παραδοσιακή, εντατική και υπερ-εντατική. Η παραδοσιακή μέθοδος είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη σε παγκόσμιο επίπεδο. Από την άλλη πλευρά, οι έντονες και υπερ-εντατικές καλλιέργειες είναι πολύ μικρότερες από τις παραδοσιακές, δεδομένου ότι αντιπροσωπεύουν μόνο το 26% της

επιφάνειας του κόσμου. Σε αυτούς τους τύπους γεωργικών εκτάσεων, παρατηρείται ότι ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά είναι ότι παράγονται με σύστημα άρδευσης. Έτσι παράγονται μέσες ετήσιες παραγωγές ελιών, φτάνοντας μεταξύ 17 και 22 εκατομμύρια τόνους (Benitez *et al.*,2018).

#### **1.4 Η ελιά ως ζυμώμενο λαχανικό**

Η ελιά είναι από τα αρχαιότερα καλλιεργούμενα δέντρα στη Μεσόγειο και αντιπροσωπεύει το έκτο πιο σημαντικό φρούτο στον κόσμο (Zohary *et al.*,1975,Hatzopoulos *et al.*,2002).Επιπλέον, έχουν μελετηθεί εκτενώς τα ευεργετικά αποτελέσματα των προϊόντων ελιάς (Keys *et al.*,1995,Perez-Jimenez *et al.*,2007).Τις τελευταίες δεκαετίες, η καλλιέργεια της ελιάς γίνεται σε μη παραδοσιακές χώρες,εκτός της περιοχής της Μεσογείου (Rugini *et al.*,2000,Mannina *et al.*,2001). Είναι γνωστό ότι παράγονται παραπάνω από 2.9 10<sup>6</sup> τόνοι την περίοδο 2017-2018, με περισσότερο από 80 % της συνολικής παραγωγής να υπάρχει στις χώρες της Μεσογείου,την Ισπανία,την Αίγυπτο,την Τουρκία,την Αλγερία,την Ιταλία,την Ελλάδα και την Πορτογαλία (IOC,2019).Ωστόσο, η νότια Αμερική,η Αυστραλία και η Μέση Ανατολή αναδύονται επίσης σαν πολλά υποσχόμενοι παραγωγοί (Benitez-Cabello *et al.*,2019).

Ο καρπός της ελιάς (*Olea europaea ssp. europaea*) είναι από τα πιο πολύτιμα φρούτα επειδή έχει οικολογική, οικονομική και πολιτιστική σημασία (Quarnífa *et al.*,2019).Υπάρχουν περισσότερα από 900 εκατομμύρια ελαιόδεντρα ανά τον κόσμο: το λεκανοπέδιο της Μεσογείου παραμένει το κυρίαρχο με 95 % της παγκόσμιας παραγωγής ελιών(Lazzeri *et al.*,2009).

Στη Μεσόγειο, οι επιτραπέζιες ελιές που υφίστανται ζύμωση είναι πολύ σημαντικές στη διατροφή του ανθρώπου.

Οι επιτραπέζιες ελιές επιδρούν στην οικονομία παγκοσμίως. Λόγω της υψηλής διατροφικής τους αξίας και της περιεκτικότητάς τους σε φυτικές ίνες, αμινοξέα, ακόρεστα λιπαρά οξέα, βιταμίνες και αντιοξειδωτικές ενώσεις, θεωρούνται ένα σημαντικό λειτουργικό τρόφιμο. Η διαδικασία ζύμωσης παρέχει βελτιωμένη θρεπτική αξία και τεχνολογικά χαρακτηριστικά, καθώς και οφέλη για την υγεία. Η γνώση της βακτηριακής χλωρίδας που είναι παρούσα στην ζύμωση των ελιών είναι πολύ σημαντική για να προβλέψουμε και να καθαρίσουμε την ποιότητα του τελικού προϊόντος. Η επιλογή των εναρκτήριων καλλιεργειών είναι μια επίπονη διαδικασία και πολλές πτυχές της έχουν ερευνηθεί, όπως προσαρμογή σε ένα συγκεκριμένο υπόστρωμα, δεδομένα ανάπτυξης, ικανότητα οξύτητας, ανοχή σε άλας και pH, εύρος θερμοκρασίας, γέυση και παραγωγή βακτηριοσίνης (Corsetti *et al.*, 2012).

Η διαδικασία και η διατήρηση των επιτραπέζιων ελιών με ζύμωση διεκπεραιώνεται με ένα συνδυασμό κατανάλωσης σακχάρων, φυσικής οξίνισης και αλατίσματος που γίνεται από μικροοργανισμούς, που καθορίζουν τη γέυση, την ασφάλεια και την ποιότητα των τελικών προϊόντων (Arroyo-López *et al.*, 2015).

Τα προϊόντα ζύμωσης φυτικής προέλευσης, όπως οι επιτραπέζιες ελιές, θεωρούνται εξαιρετικές πηγές προβιοτικών βακτηρίων, με πολλές μελέτες να επιβεβαιώνουν το δυναμικό τους.

Μια σειρά δοκιμών *in vitro* θα μπορούσε να γίνει ως ένα πρώτο βήμα προκειμένου να αξιολογηθεί το προβιοτικό δυναμικό αυτών των στελεχών. Τέτοιες δοκιμές θα μπορούσαν να περιλαμβάνουν παραγωγή αντιμικροβιακών ενώσεων, αν και περαιτέρω δοκιμές και κλινικές μελέτες απαιτούνται σε μεταγενέστερο στάδιο (Pavli *et al.*, 2019).

Είναι διαδεδομένο ότι πολλοί παράγοντες επηρεάζουν την διαδικασία της ζύμωσης όπως τα ενδογενή μικρόβια παρόντα στην επιφάνεια της ελιάς, η καλλιεργητική ποικιλία της ελιάς, όπως επίσης και τεχνολογικοί παράγοντες όπως η συγκέντρωση της άλμης, άλλες πρακτικές και η θερμοκρασία της διαδικασίας (Tassou, Panagou, & Katsaboxakis, 2002). Οργανοληπτικά και στοιχεία διατήρησης ενδυναμώνονται από τη διαδικασία της ζύμωσης (Campus *et al.*, 2015). Η ελιά είναι γνωστή για το φαινολικό της περιεχόμενο και την αντιοξειδωτική της δραστηριότητα (Landete, Curiel, Rodríguez, de las Rivas, & Muñoz, 2008). Οι ελιές δεν είναι βρώσιμες αν δεν υποβληθούν σε μια διαδικασία που υδρολύει το



βασικό τους φαινολικό συστατικό: την ελαιοευρωπαϊνή. Η ελαιοευρωπαϊνή είναι ένας β-γλυκοζίτης, που υπάρχει στις πράσινες ελιές με ποσοστό 1-2%, η οποία μειώνεται φυσικά κατά τη διάρκεια του κορεσμού (Romero et al., 2004). Η συνολική ή η μερική ελάττωση της ελαιοευρωπαϊνής είναι θεμελιώδης για να γίνουν οι ελιές κατάλληλες για ανθρώπινη κατανάλωση. Διαφορετικές διαδικασίες έχουν χρησιμοποιηθεί παραδοσιακά για να επιτύχουν το στάδιο αυτό αλλά μόνο τρεις από αυτές χρησιμοποιούνται για να παράγουν οικονομικά σημαντικές επιτραπέζιες ελιές: η Ισπανική μέθοδος για πράσινες ελιές, (Garrido Fernández *et al.*, 1995; Sánchez *et al.*, 2006; Rejano *et al.*, 2010) , η "Μέθοδος της Καλιφόρνιας για μαύρες οξειδωμένες ελιές, και" Ελληνική μέθοδος "για φυσικά μαύρες ελιές. Ωστόσο, έχουν ληφθεί ορισμένα παραδοσιακά πρωτόκολλα ανάλογα με την έκταση της ωρίμανσης της ελιάς (πράσινες ή μαύρες ελιές) και στις συνθήκες ζύμωσης (Unal *et al.*, 2003).

Η ζύμωση των επιτραπέζιων ελιών είναι παρούσα στις χώρες της Μεσογείου για αιώνες σαν ένας τρόπος να γίνουν τα φρούτα βρώσιμα όπως επίσης και να διατηρηθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα. Η Ισπανική μέθοδος όπως προαναφέραμε, είναι μια από τις 3 πιο εμπορικές παγκοσμίως, αντιπροσωπεύοντας έως και 60 % της παραγωγής επιτραπέζιας ελιάς παγκοσμίως (Botta and Cocolin, 2012). Η διαδικασία προσδιορίζεται από μια αρχική κατεργασία με αλκάλιο (1.8–3.5% [w/v] NaOH) των πράσινων φρούτων που ακολουθείται από ένα πλύσιμο και κάλυψη των φρούτων με άλμη (10–12% NaCl) (Rejano *et al.*, 2010). Αυτή η κατεργασία στοχεύει στο να κάνει ουδέτερα τα φαινολικά συστατικά ενώ αφαιρεί την πίκρα και επιτρέπει την φυσική ζύμωση με γαλακτικά οξέα. Αυτή η ζύμωση με γαλακτικά οξέα λαμβάνει χώρα αυθόρμητα και οδηγείται από τα μικρόβια από τα ακατέργαστα υλικά (ελιές, αλάτι, νερό) ή αποκτάται κατά τη διάρκεια της διεργασίας στις εγκαταστάσεις του εργοστασίου. (De Castro *et al.*, 2002; Garrido-Fernandez *et al.*, 1997; Lanza, 2013; Lucena-Padros *et al.*, 2014a)



Εικόνα 2:Ελαιόδεντρα στο νησί της Ζακύνθου

Πηγή:[https://www.123rf.com/photo\\_54993400\\_old-olive-trees-in-zakynthos-island-greece.html](https://www.123rf.com/photo_54993400_old-olive-trees-in-zakynthos-island-greece.html)

## 1.5 Η καλλιέργεια της ελιάς

Έρευνες δείχνουν ότι η ανάπτυξη του ελαιόδενδρου ελέγχεται κυρίως από τη θερμοκρασία και τη διαθεσιμότητα νερού (Abdel-Rahmane and El Sharkawi, 1974; Boulouka, 1986; Proietti and Tombesi, 1996). Υπό υγρές ή αρδευόμενες συνθήκες, οι νέες βλαστοί αυξάνονται γρήγορα κατά την άνοιξη και τις αρχές του καλοκαιριού, ιδιαίτερα σε θερμές περιοχές σε απάντηση στις αυξανόμενες θερμοκρασίες (Cimato και Fiorino, 1986 Cimato κ.ά., 1990). Η θερμοκρασία μπορεί να προκαλέσει επιτάχυνση ή επιβράδυνση των ρυθμών ανάπτυξης σε οποιοδήποτε στάδιο ανάπτυξης που επηρεάζεται ποσοτικά, αλλά δεν τροποποιεί την κυκλική ανάπτυξη της ελιάς (Blumenfeld, 1980). Αρνητικές επιπτώσεις μπορεί να παρατηρούνται όταν η θερμοκρασία υπερβαίνει τους 30 ° C. Η φωτοσύνθεση

γενικά αναστέλλεται σε θερμοκρασίες πάνω από 35 ° C. Ωστόσο, επειδή το ελαιόδεντρο είναι εγκλιματισμένο σε υψηλές θερμοκρασίες, μερικές ποικιλίες όπως η Chemlali της Sfax (νότια Τυνησία) μπορεί να διατηρούν το 70-80% του ρυθμού φωτοσύνθεσης τους ακόμη και στους 40 ° C. Κατά τη διάρκεια των χρόνων, η ανάπτυξη βλαστών μπορεί να μειωθεί σημαντικά ως αποτέλεσμα του ανταγωνισμού μεταξύ των νέων αναπτυσσόμενων βλαστών και φρούτων (Proietti και Tombesi, 1996).

## 1.6 Ποικιλίες ελιάς και επεξεργασία

Το όνομα "Ελληνικές ελιές" συνδέεται συχνότερα με τις μαύρες ελιές Καλαμάτας. Ωστόσο, υπάρχουν αρκετοί διαφορετικοί τύποι ελιών που καλλιεργούνται στην Ελλάδα.

Μεταξύ άλλων, οι πιο δημοφιλείς και οι πιο συνηθισμένες είναι η Λαδολιά, η Μανακί, η Κορωνέικη, η Αθηνολιά (Τσουνατη) κτλ. Κατά τα στάδια της ωριμότητας, τα ελαιόκαρπα αλλάζουν χρώμα από πράσινο σε βιολετί και στη συνέχεια μαύρο.

Οι καρποί μεταφέρονται στα ελαιοτριβεία και τα στάδια επεξεργασίας είναι: καθαρισμός, σπάσιμο, μάλαξη, διαχωρισμός λαδιού. Η απόδοση σε λάδι είναι περίπου 20-25% (1.0-1.25 κιλό λάδι από 5 κιλά ελιές) και εξαρτάται από την ποικιλία, τις καλλιεργητικές φροντίδες, το στάδιο του καρπού κατά τη συγκομιδή και άλλα.



Εικόνα 3: Κορωνέικη ποικιλία ελιάς

Πηγή: <https://cretanolivetreets.gr/koroneiki-elia/>

-

## 1.7 Οι ιδιότητες της ελιάς

Είναι γνωστό ότι η μειωμένη συχνότητα εμφάνισης καρδιαγγειακών επεισοδίων στην περιοχή της Μεσογείου έχει αποδοθεί εν μέρει στην κατανάλωση ελαιοκομικών προϊόντων (Visioli *et al.*,2002). Αυτές οι διατροφικές και φαρμακευτικές ιδιότητες θα μπορούσαν να σχετίζονται με τις φαινολικές ενώσεις, οι οποίες θεωρούνται υπεύθυνες για την παροχή οργανοληπτικών στοιχείων και αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων στα παράγωγα της ελιάς (Caronio *et al.*,1999 ). Το ενδιαφέρον για τις πολυφαινόλες ελιάς οφείλεται στο γεγονός ότι μπορεί να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανθρώπινη διατροφή και την υγεία. Αυτές οι ενώσεις ενεργούν κυρίως ως αντιοξειδωτικά και θα μπορούσαν να χρησιμοποιούνται ως πηγές δυνητικά ασφαλών φυσικών αντιοξειδωτικών για τη βιομηχανία τροφίμων (Moore *et al.*,2001).

## 2.8 Η ελιά ως λειτουργικό τρόφιμο

Είναι γνωστό ότι τα λειτουργικά τρόφιμα δεν έχουν αποδεκτό ορισμό. Ο όρος χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στην Ιαπωνία στη δεκαετία του 1980, όταν το Υπουργείο Υγείας και Πρόνοιας ξεκίνησε ένα ρυθμιστικό σύστημα για να εγκρίνει ορισμένα τρόφιμα με τεκμηριωμένα οφέλη για την υγεία. Λόγω του γεγονότος ότι όλα τα τρόφιμα παρέχουν γεύση, άρωμα και θρεπτική αξία, όλα τα τρόφιμα μπορούν να θεωρηθούν λειτουργικά σε κάποιο βαθμό. Ωστόσο, τα τρόφιμα μελετώνται περαιτέρω για προστιθέμενες φυσιολογικές ευεργετικές ιδιότητες, οι οποίες μπορούν να βελτιστοποιήσουν την υγεία (Hasler *et al.*,2002). Ένας αποδεκτός και συχνά χρησιμοποιούμενος ορισμός είναι ότι ένα λειτουργικό τρόφιμο είναι ένα τρόφιμο που έχει μια επιπλέον λειτουργία συχνά συσχετιζόμενη με την προαγωγή της υγείας ή την πρόληψη των ασθενειών με την προσθήκη περισσότερων συστατικών. Τα ισχυρισμένα οφέλη για την υγεία των ζυμωμένων λειτουργικών τροφίμων εκφράζονται είτε απευθείας μέσω της αλληλεπίδρασης των ζωντανών μικροοργανισμών, βακτηρίων ή ζυμών με τον ξενιστή (προβιοτική επίδραση) ή έμμεσα ως αποτέλεσμα της

κατάποσης μικροβιακών μεταβολιτών που παράγονται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ζύμωσης (βιογενής επίδραση) (Stanton *et al.*,2005).

## 2.9 Προβιοτικά

Ο πιο πρόσφατος ορισμός των προβιοτικών δημιουργήθηκε από διεθνείς επιστήμονες που εργάζονταν εκ μέρους του FAO/WHO (Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας/Οργανισμός Παγκόσμιας Υγείας),και αναφέρεται σε ζωντανούς,μη παθογόνους μικροοργανισμούς (βακτήρια ή/και ζύμες) που όταν καταναλώνονται σε επαρκείς ποσότητες,είναι ικανοί να φτάσουν και να αποικίσουν το γαστρεντερικό σωλήνα και να επιφέρουν οφέλη στον ξενιστή (FAO/WHO,2006).Τα κύρια οφέλη που σχετίζονται με την εισαγωγή προβιοτικών περιλαμβάνουν την στοματική υγεία και τη ρύθμιση του ανοσοποιητικού(Ritchie and Romanuk, 2012; Hill *et al.*, 2014).

## 2.10 Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος (LAB)

Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος (LAB) αντιπροσωπεύουν μια σημαντική ομάδα προβιοτικών βακτηρίων συμπεριλαμβανομένου του *Lactobacillus spp.* και *Bifidobacterium spp.* , τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα προβιοτικά εκτός από τις ζύμες (Nousiainen, Javaninen, Setala, & von Wright, 2004; Saulnier, Spinler,Gibson, & Versalovic, 2009). Τα LAB που απομονώνονται από λαχανικά έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν κάτω από ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες όπως οξέα, διακυμάνσεις φυσικών και διατροφικών συνθηκών και υψηλή συγκέντρωση άπεπτων θρεπτικών στοιχείων (Buckenhüskes, 1997; Rossi *et al.*, 2005). Πιο συγκεκριμένα, τα είδη *L. pentosus* και *L. plantarum* έχουν βρεθεί σε μια ποικιλία περιβαλλοντικών θώκων συμπεριλαμβανομένων τις ελιές, που είναι φορείς χρήσιμων προβιοτικών μικροοργανισμών ικανών να βελτιώνουν τη μικροβιακή ανισορροπία στο γαστρεντερικό σύστημα (Abriouel *et al.*, 2012; Argyri, Panagou, & Tassou, 2016; Bautista-Gallego *et al.*,2013; Pérez Montoro *et al.*, 2016). αλλά σε συνάρτηση με την καλλιέργεια ελιάς,τη μέθοδο της διαδικασίας και την γεωγραφική προέλευση,άλλοι λακτοβάκιλλοι ή γένη μπορούν να κυριαρχήσουν (Hurtado *et al.*, 2012; Heperkan, 2013). Ωστόσο, τα προβιοτικά LAB βακτήρια από μη γαλακτοκομική προέλευση, όπως τα φρούτα και τα λαχανικά, έχουν αυξηθεί τα τελευταία χρόνια λόγω των αυξανόμενων συχνοτήτων δυσανεξίας στη λακτόζη, δυσλιπιδαιμίας, αλλεργίας και χορτοφαγίας μεταξύ των

ανθρώπων(Granato *et al.*,2010,Peres *et al.*,2012,Ranadheera *et al.*, 2010).Επιπλέον, αυτά τα τρόφιμα χαρακτηρίζονται από εγγενείς φυσικοχημικές ιδιότητες που μιμούνται καταστάσεις στο γαστρεντερικό σύστημα επειδή τα προβιοτικά βακτήρια από λαχανικά ή φρούτα διαθέτουν μηχανισμούς για την προσκόλληση σε επιφάνειες όπως και στην εντερική επιφάνεια, μαζί με την ανοχή τους σε οξέα και πολλές άλλες καταπονήσεις. Ως εκ τούτου, αρκετές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην επιλογή νέων προβιοτικών υποψηφίων (Cammarota *et al.*,2009,Chang *et al.*,2010) με συγκέντρωση LAB μεταξύ  $102 \pm 104$  CFU / g για φρούτα και λαχανικά (Spurr *et al.*,1994,Di Cagno *et al.*,2010) και  $106 \pm 108$  CFU / g σε ζυμωμένα τρόφιμα (Bartkiene *et al.*,2013,Swain *et al.*,2012).

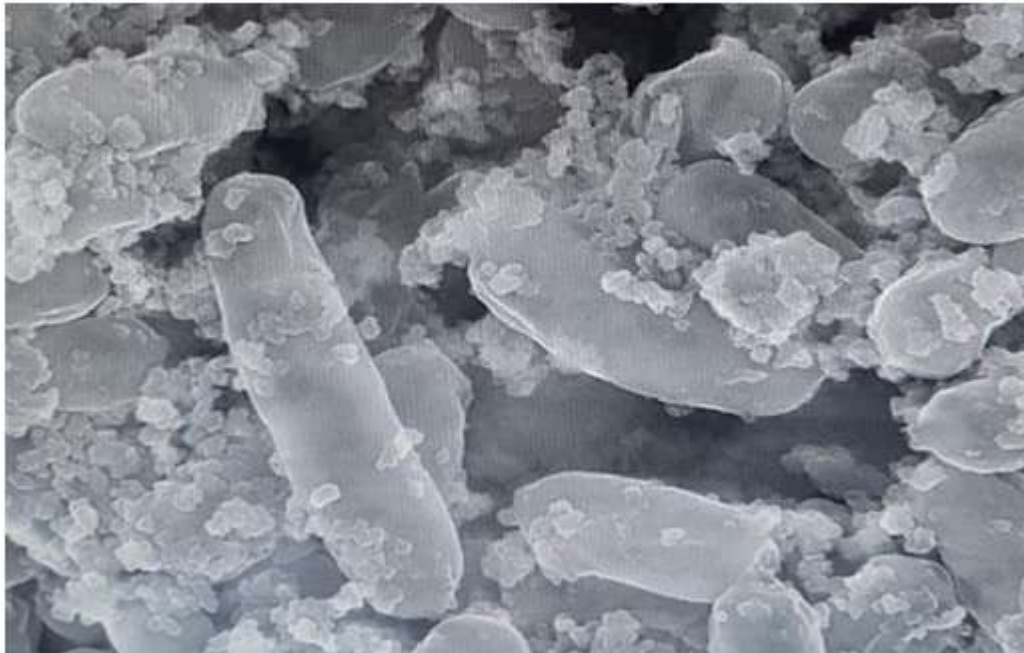
Σύμφωνα με μια πρόσφατη μελέτη (Tufariello *et al.*,2015),η χρήση αυτόχθονων ζυμών και LAB, έδειξε να μειώνει το χρόνο της ζύμωσης, να σταθεροποιεί τη διαδικασία και να βελτιώνει τις οργανοληπτικές και διατροφικές ιδιότητες.

Τα LAB βακτήρια μεταβολίζουν τα σάκχαρα παράγοντας γαλακτικό οξύ κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, κατά συνέπεια μειώνοντας το pH. Επιπλέον, μπορούν να παράγουν βακτηριοσίνες που δρουν ενάντια στα παθογόνα μικρόβια. Τα τελευταία χρόνια, ερευνητές έχουν εστιάσει τις προσπάθειες τους στο να απομονώσουν LAB βακτήρια από τη ζύμωση επιτραπέζιων ελιών με πολλά χαρακτηριστικά (τεχνολογικά-προβιοτικά) για χρήση σαν εναρκτήριες καλλιέργειες. Επίσης,πολλά από αυτά τα στελέχη έχουν δείξει την ικανότητα τους να προσκολλώνται στην επιφάνεια των ελιών κατά τη ζύμωση, σχηματίζοντας βιοφίλμ, μετατρέποντας τις επιτραπέζιες ελιές σαν φορείς ευεργετικών μικροοργανισμών στους καταναλωτές. Η διαδικασία και η διατήρηση των επιτραπέζιων ελιών με ζύμωση διεκπεραιώνεται με ένα συνδυασμό κατανάλωσης σακχάρων, φυσικής οξίνισης και αλατίσματος που γίνεται από μικροοργανισμούς, που καθορίζουν τη γεύση, την ασφάλεια και την ποιότητα των τελικών προϊόντων (Argoyo-López *et al.*, 2015).

Διάφορες δημοσιεύσεις περιγράφουν τις αποκρίσεις των λακτοβάκιλλων σε καταπόνηση όπως ακραία θερμοκρασία, pH ,ωσμωτική πίεση, οξυγόνο και πείνα, που φυσιολογικά επηρεάζει τα κύτταρα. Οι φυσιολογικοί και μοριακοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στην απόκριση του στρες περιλαμβάνουν την επαγωγή συγκεκριμένων πρωτεϊνών που οδηγούν σε πιθανές αυξήσεις σε συγκεκριμένες ή πολλαπλές καταπονήσεις. Ανάμεσα στις υπερ εκφρασμένες πρωτεΐνες στους λακτοβάκιλλους περιλαμβάνονται η DNaK, η GroEL, οι 30S ριβοσωμικές πρωτεΐνες , η ATP συνθάση υπομονάδας βήτα, η MetK, φωσφοπυροσταφιλική

υδρατάση, φωσφογλυκερική κινάση, παράγοντας επιμήκυνσης Tu και άλλες (De Angelis & Gobbetti, 2011).

Από την άλλη μεριά, ερωτήσεις συνήθως προκύπτουν και αφορούν την επίδραση της διαίτας ή των προβιοτικών στη μικροβιακή χλωρίδα του στομάχου: παρόλα αυτά η επίδραση της διαίτας στη λειτουργικότητα των προβιοτικών πρέπει να ληφθεί υπόψιν. Τα προβιοτικά πρέπει να περιλαμβάνουν εξωγενή βακτήρια και επίσης αυτόχθονα ή ενδογενή του στομάχου. Γενικά οι δίαιτες πρέπει να περιέχουν διάφορες ουσίες που ενισχύουν τη δραστηριότητα των προβιοτικών, όπως τα πρεβιοτικά, και συστατικά που μπορούν να παρεμποδίσουν ή να μειώσουν την προβιοτική δραστηριότητα μερικών στελεχών (Markowiak & Śliżewska, 2017; Ranadheera, Baines, & Adams, 2010). Η σταθερότητα των προβιοτικών πρέπει να βελτιωθεί αφού τα προβιοτικά είναι απαιτητικά σε θρεπτικά στοιχεία και ευαίσθητα στο περιβάλλον. Έτσι, τα διαιτητικά συστατικά όπως τα εδάδιμα έλαια μπορούν να παίζουν σημαντικό ρόλο για να αλλάξουν οι δράσεις των προβιοτικών. Σε αυτή την κατεύθυνση διάφορες δημοσιεύσεις περιγράφουν τη χρήση μερικών εδάδιμων ελαίων (για παράδειγμα, έλαιο ψαριού, ελαιόλαδο, έλαιο από πίτουρο ρυζιού και έλαιο σόγιας) σε πρεβιοτικούς σχηματισμούς που παρέχουν προστασία στον οργανισμό και βοηθούν να διατηρούνται οι αποδεδειγμένες προβιοτικές ιδιότητες και να αυξηθεί η ζωή στο ράφι (Baksh, 2014). Τα εδάδιμα έλαια όπως το ελαιόλαδο, το έλαιο ηλιοτροπίου, ο λιναρόσπορος, η σόγια, το καλαμπόκι, το αμύγδαλο και το αργκάν είναι κοινά σε πολλές δίαιτες και εξαρτώνται από τη γεωγραφική περιοχή: παρόλα αυτά παραμένει ένα κενό στη γνώση στην επίδραση των προβιοτικών που προέρχονται από λαχανικά όπως ο *Lactobacillus sp* (Garcia *et al.*, 2019)



Εικόνα 4: Οι λακτοβάκιλλοι στην ελιά

Πηγή: <https://www.oliveoiltimes.com/el/health-news/bacteria-in-table-olives-may-help-eliminate-heavy-metals-during-digestion/74400>

### 2.11 Το γένος *Lactobacillus pentosus*

Το *Lactobacillus pentosus* είναι ένα προβιοτικό LAB που απομονώθηκε από πράσινες επιτραπέζιες ελιές Aloreña. Το βακτήριο αυτό εμπλέκεται σε πληθώρα ζυμώσεων τροφίμων (Abriouel *et al.*, 2011) που έχουν εξαιρετικό οικονομικό ενδιαφέρον στην βιομηχανία τροφίμων. Αυτό είναι αληθές για ζυμώσεις λαχανικών και συγκεκριμένα για επιτραπέζιες



ελιές όπου διαφορετικά στελέχη έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς για να βελτιώσουν την ποιότητα και την ασφάλεια του προϊόντος (Ruiz-Barba *et al.*, 1994; De Castro *et al.*, 2002; Panagou *et al.*, 2008; Hurtado *et al.*, 2010; Peres *et al.*, 2008; Ruiz-Barba and Jiménez-Díaz, 2012).

## 2.12 Οι εναρκτήριες καλλιέργειες

Ο Holzapfel (2002) προσδιόρισε την εναρκτήρια καλλιέργεια σαν μια διεργασία που περιέχει ένα μεγάλο αριθμό βιώσιμων κυττάρων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να βελτιώσουν μια διαδικασία ζύμωσης. Γενικά, στην παραγωγή επιτραπέζιων ελιών είναι σημαντικό η εναρκτήρια καλλιέργεια να έχει γρήγορη ανάπτυξη, ανοχή στο χλωριούχο νάτριο, ικανότητα να μεγαλώνει σε χαμηλές θερμοκρασίες και ικανότητα να κυριαρχεί στους αυτόχθονες μικροβιακούς πληθυσμούς. Επίσης, η εναρκτήρια καλλιέργεια πρέπει να δείχνει μια μεγάλη ικανότητα να αντέχει στο κρύο (Garrido-Fernández *et al.*, 1997).

Γενικά, η ζύμωση διεξάγεται με μια εμπειρική διαδικασία και η χρήση εναρκτήριων καλλιεργειών δεν είναι ακόμη πολύ κοινή, παρόλο που αυτή μπορεί να δημιουργήσει ένα βελτιωμένο προϊόν (Aronte *et al.*, 2012). Για αυτό το σκοπό, πολλές προσπάθειες έχουν γίνει για να απομονωθούν στελέχη *Lactobacillus* που παρουσιάζουν καλό τεχνολογικό δυναμικό στην παραγωγή επιτραπέζιων ελιών (Tofalo *et al.*, 2012).

Τα εναρκτήρια στελέχη μπορεί να επηρεάσουν το άρωμα και τη γεύση των ελιών και να παρεμποδίσουν την ανάπτυξη μικροοργανισμών που ανταγωνίζονται αυτά τα στελέχη, ή παράγοντας συστατικά όπως οι βακτηριοσίνες, έτσι να προκαλέσουν μεγαλύτερη ζωή στο ράφι των προϊόντων (Holzapfel, 2002).

Τα εναρκτήρια στελέχη συνήθως αγοράζονται σε λυοφιλιωμένη μορφή αφού η αποθήκευσή τους σε χαμηλή θερμοκρασία δεν απαιτείται (Alfonzo *et al.*, 2018).

Η επιλογή των εναρκτήριων καλλιιεργειών είναι μια επίπονη διαδικασία και πολλές πτυχές της έχουν ερευνηθεί, όπως προσαρμογή σε ένα συγκεκριμένο υπόστρωμα, δεδομένα ανάπτυξης, ικανότητα οξύτητας, ανοχή σε άλας και pH, εύρος θερμοκρασίας, γέυση και παραγωγή βακτηριοσίνης (Corsetti *et al.*, 2012).

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2**

### **ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

#### **2.1 Θρεπτικά υποστρώματα**

Για τις βακτηριακές καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν 2 θρεπτικά υποστρώματα τα οποία παρουσιάζονται στο παράρτημα. Πριν χρησιμοποιηθούν προηγείται η αποστείρωση όλων των θρεπτικών υποστρωμάτων σε κλίβανο στους 121 °C για 25 λεπτά. Η ανάπτυξη των βακτηριακών καλλιεργειών πραγματοποιείται σε επωαστικούς θαλάμους με σταθερή θερμοκρασία 37°C. Στην περίπτωση των υγρών καλλιεργειών, υπάρχει συνεχής ανακίνηση.

#### **2.2 Διαδοχικές αραιώσεις**

Είχαμε 6 δείγματα A3 πάνω, A3 κάτω, B4 πάνω, B4 κάτω, Γ7 πάνω, Γ7 κάτω. Οι όροι πάνω ή κάτω αναφέρονται στο μέρος της δεξαμενής της ελίας από το οποίο πήραμε το δείγμα, Ο όρος πάνω αναφέρεται επομένως στο εναιώρημα της άλμης με τις ελιές και ο όρος κάτω στον πυθμένα της δεξαμενής. Πραγματοποιήσαμε διαδοχικές αραιώσεις 1:10, 1:10<sup>2</sup>, 1:10<sup>3</sup>, 1:10<sup>4</sup>, 1:10<sup>5</sup>. Μεταφέραμε τα 6 δείγματα σε falcon των 15 ml. Στο 1 ml διαλύματος είχαμε 1000 μl δείγματος άρα στα 100 μl είχαμε 100 μl δείγματος και 900 μl Ringer. Έτσι σε κάθε erpendorf είχαμε 100 μl δείγματος και 900 μl Ringer. Στη συνέχεια διαλέξαμε τις διαδοχικές αραιώσεις 1:10, 1:10<sup>3</sup>, 1:10<sup>5</sup> και από αυτές πήραμε 100 μl και τα ρίξαμε σε σταγόνες πάνω στα τρυβλία. Μετά απλώσαμε με spreader για να πάνε παντού οι σταγόνες.

Πραγματοποιήσαμε την ίδια διαδικασία για τα 6 δείγματα και έτσι είχαμε 18 τρυβλία που έχουν MRS + 1.5% w/v άγαρ και την κάθε αραιώση. Τοποθετήσαμε τα τρυβλία στους 37°C για να αναπτυχθούν οι λακτοβάκιλλοι για 3 μέρες. Τα 6 δείγματα τα τοποθετήσαμε στο ψυγείο.

#### **2.3 Εμβολιασμός σε καινούρια τρυβλία**

Από τα δείγματα Α3 πάνω, Β4 πάνω, Β4 κάτω και Γ7 πάνω, πήραμε με μικροβιολογικό κρίκο μοναδιαίες αποικίες από όλα τα στελέχη που διακρίνουμε και εμβολιάζουμε εκ νέου σε καινούρια τρυβλία. Τοποθετήσαμε τα τρυβλία στους 37°C για να αναπτυχθούν οι λακτοβάκιλλοι για 3 μέρες.

## **2.4 Ανακαλλιέργειες αποικιών**

Τα δείγματα είναι τα εξής: Α3Π1, ΑΕΠ2, Α3Π3, ΑΕΠ4, Β4Π2, Β4Κ1, Γ7ΠΑ και Γ7ΠΒ. Δοκιμάσαμε ξανά την αραιώση 1:10 εις τριπλούν σε 3 διαφορετικά τρυβλία. Πραγματοποιήσαμε ανακαλλιέργειες των αποικιών που απομονώσαμε εκτός από το Α3Π2 που ήταν περιείχε πιθανώς επιμόλυνση και τα τοποθετήσαμε στους 37°C για να αναπτυχθούν οι λακτοβάκιλλοι για 3 μέρες.

## **2.5 Δημιουργία υγρών καλλιεργειών**

Από τις στερεές καλλιέργειες δημιουργήσαμε υγρές. Χρησιμοποιήσαμε κωνικές φιάλες με 20 ml MRS Broth. Η όλη διαδικασία πραγματοποιήθηκε στο θάλαμο νηματικής ροής στον οποίο βάλαμε για 10 λεπτά UV. Από τις στερεές καλλιέργειες πήραμε με πιπέτα και τοποθετήσαμε στις υγρές. Έτσι είχαμε τα δείγματα Γ7ΠΑ, Γ7ΠΒ, Α3Π1, Α3Π3 + μικροοργανισμός, Α3Π3, Β4Π2, Α3Π4 νεφέλωμα. Τα τοποθετήσαμε στους 37°C με συνεχή ανακίνηση για να αναπτυχθούν.

## **2.6 Stock γλυκερόλης**

Από τα δείγματα που έχουμε, τοποθετήσαμε από κάθε υγρή καλλιέργεια 1 ml σε erpendorf, το φυγοκεντρούμε στις 1000 rpm για 3 λεπτά και απορρίψαμε το υπερκείμενο. Επαναλάβαμε

το βήμα για 2 φορές ακόμη. Αυτό που έμεινε από τις υγρές καλλιέργειες το τοποθετούμε σε falcon των 15ml και φυγοκεντρούμε στις 4000 rpm για 10 λεπτά. Στη συνέχεια απορρίψαμε το υπερκείμενο και φυλάξαμε τα pellets στους -20 °C. Επανα Διαλύσαμε το ίζημα από τα erpendorfs με 700 μl γλυκερόλης 50% w/v και αναδεύουμε με vortex για να πετύχουμε καλή διάλυση. Μεταφέραμε τα δείγματα σε cryovials και τα φυλάξαμε στους -20 °C.

## **2.7 Δημιουργία στερεών καλλιεργείων**

Από τα δείγματα που βρίσκονταν μέσα στα cryo vials λάβαμε δείγμα με μικροβιολογικό κρίκο( αφού πρώτα τον είχαμε κάψει και κρυώσει σε τρυβλίο) και πραγματοποιήσαμε επιστροφή σε τρυβλίο. Για κάθε δείγμα δημιουργήσαμε 2 τρυβλία άρα έχουμε συνολικά 14 τρυβλία. Τα τοποθετήσαμε στους 37°C για να αναπτυχθούν.

## **2.8 Πείραμα ανάπτυξης λακτοβακίλλων σε χλωριούχο νάτριο ( NaCl 5 % w/v )και σε MRS Broth**

Προετοιμάζουμε 9 κωνικές φιάλες των 25ml που περιείχαν MRS Broth και MRS Broth και NaCl 5 % w/v. Ρυθμίζουμε το pH των φιαλών με NaCl 5 % w/v στο 7,2 με πεχάμετρο( για να ρυθμίσουμε το pH ρίξαμε 2-3 σταγόνες καυστικό νάτριο NaOH). Χρησιμοποιήσαμε αυτές τις φιάλες και δημιουργήσαμε υγρές καλλιέργειες από τις στερεές που είχαμε στο ψυγείο οι οποίες αφορούσαν τα στελέχη Γ7ΠΑ,Γ7ΠΒ,Α3Π1,Α3Π3,Β4Π2 ,Α3Π4 νεφέλωμα. Πρώτα υπολογίσαμε πόσος όγκος δείγματος θα χρειαστεί να τοποθετήσουμε στις κωνικές φιάλες κατά τον τρόπο που υποδεικνύεται παρακάτω.

Μετρήσαμε την οπτική πυκνότητα των δειγμάτων με αραιώση 1:10 στα 600 nm σε φασματοφωτόμετρο και του MRS Broth 1:10 για να την αφαιρέσουμε από τη μέτρηση μας.

Για να πραγματοποιήσουμε τη μέτρηση πήραμε περίπου 2.5 ml από το MRS Broth και τα τοποθετούμε σε όλα τα τρυβλία. Πήραμε και αφήσαμε με την πιπέτα για να διαλυθούν τα κύτταρα και ύστερα τοποθετήσαμε τα 2,5 ml σε universal.

Η μέτρηση OD στο δείγμα A3Π1 με αραιώση 1:10 βρέθηκε ίση με( 0,987 - 0,010)=0,977x10=9,77 η κανονική. Στο χρόνο 0 η οπτική πυκνότητα σε όλα τα στελέχη ήταν 0,05.Χρησιμοποιήσαμε το νόμο της αραιώσης και έτσι είχαμε για το στέλεχος A3Π1:

$$c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2$$

$$9,77 \times V_1 = 0,05 \times 25\text{ml}$$

$V_1 = 0,127$  ml δηλαδή 127 μl από το A3Π1 για την κάθε μία κωνική φιάλη. Την ίδια διαδικασία πραγματοποιήσαμε για όλα τα δείγματα. Το απόγευμα (18:00) τοποθετούμε τις υγρές καλλιέργειες στο shaker στους 37°C. Την επόμενη μέρα το πρωί, βγάλαμε τις υγρές καλλιέργειες από το shaker και πήραμε 1 ml από κάθε υγρή και τη βάλουμε σε erpendorf. Ακολούθως, πήραμε από κάθε καλλιέργεια 700 μl και τα βάλουμε σε κυψελίδα. Τέλος, μετρήσαμε σε φασματοφωτόμετρο στα 600 nm τις απορροφήσεις. Για κάθε δείγμα, πραγματοποιήσαμε 4 μετρήσεις οι οποίες θα παρουσιαστούν αναλυτικά στα αποτελέσματα.

## 2.9 Απομόνωση DNA με τη μέθοδο CTAB

Πριν ξεκινήσουμε τη διαδικασία ρυθμίσαμε την οπτική πυκνότητα των δειγμάτων στο 1 προσθέτοντας TE Buffer. Μετρήσαμε τις οπτικές πυκνότητες των δειγμάτων σε φασματοφωτόμετρο στα 600 nm και έτσι είχαμε:

OD<sub>A3Π1</sub>:0,998

OD<sub>A3Π3</sub>:0,935

OD<sub>A3Π3+μικροοργανισμός</sub>:0,973

OD<sub>B4Π2</sub>:0,989

OD<sub>Γ7ΠB</sub>:0,977

Τοποθετήσαμε τα δείγματα για φυγοκέντρηση στις 4.000 rpm για 12 λεπτά.

Απορρίψαμε το υπερκείμενο.

Για κάθε δείγμα είχαμε 4 erpendorfs των 1,5 ml. Τοποθετήσαμε 740 μl από το διάλυμα TE Buffer σε κάθε erpendorf. Στη συνέχεια προσθέσαμε 40 μl λυσοζύμη. Επώασαμε για 30 λεπτά στους 37°C. Προσθέσαμε σε κάθε erpendorf 16 μl πρωτεΐνάση K. Τα επώασαμε overnight στους 56 °C.

Την επόμενη μέρα τα δείγματα ήταν διαυγή με καθίζηση των κυττάρων σε pellets. Λόγω του ότι δεν κάναμε ανάδευση στους 56 °C τα δείγματα δεν είχαν αυξημένο ιξώδες το οποίο περιμέναμε οπότε τα κάναμε ένα vortex για 2-3 λεπτά και τα αφήσαμε να επωαστούν με ανάδευση στις 500 rpm στους 56 °C για 1 ώρα περίπου.

Ακολούθως προσθέσαμε σε κάθε δείγμα 100 μl NaCl 5M και αναδεύσαμε με την πιπέτα. Μετά προσθέσαμε 100 μl CTAB/NaCl το οποίο είχαμε θερμάνει στο υδατόλουτρο. Επωάζουμε στους 65 °C για 10 λεπτά. Προσθέσαμε 500 μl χλωροφόρμιο:ισοαμυλική αλκοόλη (24:1) και αναδεύσαμε με την πιπέτα. Φυγοκεντρούμε στις 11.000 rpm για 10 λεπτά. Μεταφέραμε την υδατική φάση σε καινούρια erpendorfs. Προσθέσαμε 500 μl φαινόλη:χλωροφόρμιο:ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1) και αναδεύσαμε με την πιπέτα.

Φυγοκεντρούμε στις 11.000 rpm για 10 λεπτά. Μεταφέραμε την υδατική φάση σε καινούρια erppendorfs. Προσθέσαμε 500 μl γλωροφόρμιο:ισοαμυλική αλκοόλη (24:1) και αναδεύσαμε με την πιπέτα. Μεταφέραμε την υδατική φάση σε καινούρια erppendorfs και προσθέσαμε 0,6 vol ισοπροπανόλη. Τοποθετήσαμε overnight στους -20 °C.

Την επόμενη μέρα, τοποθετήσαμε τα δείγματα στην ψυχόμενη φυγόκεντρο στους 4° C για 15 λεπτά στις 13000 rpm. Τοποθετούμε 1 ml 70% αιθανόλη (βρίσκεται στους -20° C) και τα φυγοκεντρούμε στις 11.000 rpm για 5 λεπτά. Στη συνέχεια απορρίψαμε το υπερκείμενο και τοποθετούμε τα δείγματα ( τα pellets δηλαδή) να στεγνώσουν ανοιχτά στο θάλαμο νηματικής ροής. Επαναδιαλύσαμε τα pellets σε 170 μl DNase free νερό και τα φυλάξαμε στους -80 ° C.

Τοποθετήσαμε σε erppendorfs 170 μl DNA και 3 μl RNase (περιέχει μέσα το Buffer). Ανακινούμε με το δάχτυλο και επώασαμε για 1 ώρα στους 37° C. Θερμαίνεται στους 70 ° C για 15 λεπτά. Τοποθετήσαμε τα δείγματα στον πάγο. Προσθέσαμε 17,3 μl sodium acetate. Προσθέσαμε 2,5 vol 100% αιθανόλη και ανακινούμε με το δάχτυλο. Τοποθετήσαμε στους -80 ° C για 30 λεπτά. Φυγοκεντρούμε τα δείγματα στους 4° C για 20 λεπτά. Απορρίψαμε το υπερκείμενο με πιπέτα πολύ αργά. Τοποθετήσαμε 100 μl 70% αιθανόλη. Φυγοκεντρούμε τα δείγματα στους 4° C για 5 λεπτά. Με πιπέτα αφαιρέσαμε την αιθανόλη. Αφήσαμε να στεγνώσει το pellet στον απαγωγό. Επαναδιαλύσαμε το pellet με 50 μl TE (αφού πρώτα το είχαμε θερμάνει στους 70° C στο heat block). Αποθηκεύσαμε το DNA στους -20°C.



Στο παρακάτω παράρτημα παρουσιάζονται όλα τα θρεπτικά υποστρώματα και διαλύματα που χρησιμοποιήσαμε.

#### ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

MRS Broth	52 gr MRS Broth /1 L	TE Buffer (Tris,EDTA)
MRS+1,5% w/v agar	52 gr MRS Broth /1 L 1,5 gr agar/100 ml	1 mM EDTA
Ringer(mix αλάτων)	NaCl :2,25gr / 1 L KCl :0,105 gr/ 1 L CaCl <sub>2</sub> : 0,12 gr/ 1L NaHCO <sub>3</sub> :0,05 gr/ 1 L	10 mM Tris

Σημείωση: Ρυθμίσαμε με πεχάμετρο το pH στο 7,4 στο Ringer.

Ρυθμίσαμε με πεχάμετρο το pH στο 8 στο TE Buffer.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### Αποτελέσματα και Συζήτηση

#### 3.1 Καταμέτρηση αποικιών

Γ7 κάτω 1 :10 : καμία αποικία

Γ7 κάτω 1 :10<sup>3</sup> : καμία αποικία

Γ7 κάτω 1 :10<sup>5</sup> : καμία αποικία

**Γ7 πάνω 1 :10 : 26 αποικίες**

Γ7 πάνω 1 :10<sup>3</sup> : καμία αποικία

Γ7 πάνω 1 :10<sup>5</sup> : καμία αποικία

**B4 πάνω 1:10 : 38 αποικίες**

B4 πάνω 1 :10<sup>3</sup> : καμία αποικία

B4 πάνω 1 :10<sup>5</sup> : καμία αποικία

**B4 κάτω 1 :10 : 45 αποικίες**

B4 κάτω 1 :10<sup>3</sup> : καμία αποικία

B4 κάτω 1 :10<sup>5</sup> : καμία αποικία

**A3 πάνω 1 :10 : 159 αποικίες**

A3 πάνω 1 :10<sup>3</sup> : 2 αποικίες

A3 πάνω 1 :10<sup>5</sup> : καμία αποικία

A3 κάτω 1 :10 : καμία αποικία

A3 κάτω 1 :10<sup>3</sup> : 1 αποικία

A3 κάτω 1 :10<sup>5</sup> : καμία αποικία

Σημείωση: Από τα παραπάνω δείγματα διαλέξαμε αυτά με τις περισσότερες αποικίες που σημειώνονται με έντονα γράμματα για περαιτέρω επεξεργασία.

### **3.2 Καταμέτρηση αποικιών με αραίωση**

A3 πάνω 1:10 : παρατηρήσαμε πολλές αποικίες

A3 κάτω 1:10 : παρατηρήσαμε 1 αποικία

A3Π3, A3Π2, 1:10 : πιθανή επιμόλυνση ή περιείχε και άλλους μικροοργανισμούς

B4 πάνω 1:10 : παρατηρήσαμε αποικίες

B4 κάτω 1:10 : πιθανή επιμόλυνση

Γ7 κάτω 1 :10 : παρατηρήσαμε μικρές αποικίες

Αφού κάναμε ανακαλλιέργειες των αποικιών που απομονώσαμε καταμετρήσαμε εκ νέου τις αποικίες και τα αποτελέσματα φαίνονται παρακάτω:

A3 πάνω 1:10 : 215 αποικίες

A3 πάνω 1:10 : 171 αποικίες

A3 πάνω 1:10 : 316 αποικίες

A3 κάτω 1:10 :μία αποικία

A3 κάτω 1:10 : καμία αποικία

A3 κάτω 1:10 : μία αποικία

B4 πάνω 1:10 : 121 αποικίες

B4 πάνω 1:10 : 162 αποικίες

B4 πάνω 1:10 : 35 αποικίες

B4 κάτω 1:10 : μία αποικία

B4 κάτω 1:10 : καμία αποικία

B4 κάτω 1:10 : παρατηρήσαμε ένα μικροοργανισμό

Γ7 πάνω 1 : 10 : 30 αποικίες

Γ7 πάνω 1 : 10 : 23 αποικίες και μικροοργανισμοί

Γ7 πάνω 1 : 10 : 26 αποικίες

Γ7 κάτω 1:10 : 69 αποικίες

Γ7 κάτω 1:10 : 1 αποικία

Γ7 κάτω 1:10 : 1 αποικία

### **3.3 Παρατηρήσεις σχετικές με τις αποικίες**

A3Π1 : Παρατηρήσαμε μικρές και μεγάλες αποικίες και έναν επιπλέον μικροοργανισμό (πιθανόν στρεπτομύκητα)

A3Π3 : Παρατηρήσαμε μικρές και μεγάλες αποικίες και έναν επιπλέον μικροοργανισμό (διαφορετικός από το A3Π1).

ΑΕΠ4 : Παρατηρήσαμε πολύ μικρές αποικίες

B4K1 : Δεν παρατηρήσαμε αποικίες ωστόσο σε προηγούμενη καλλιέργεια παρατηρήσαμε μικρές και μεγάλες γαλακτερές αποικίες

B4Π2 : Παρατηρήσαμε πολύ μικρές,μεσαίου και μεγάλου μεγέθους γαλακτερές αποικίες

Γ7ΠΑ : Παρατηρήσαμε μικρού και μεσαίου μεγέθους αποικίες

Γ7ΠΒ : Παρατηρήσαμε πολύ μικρές,μικρές και μεσαίου μεγέθους αποικίες.

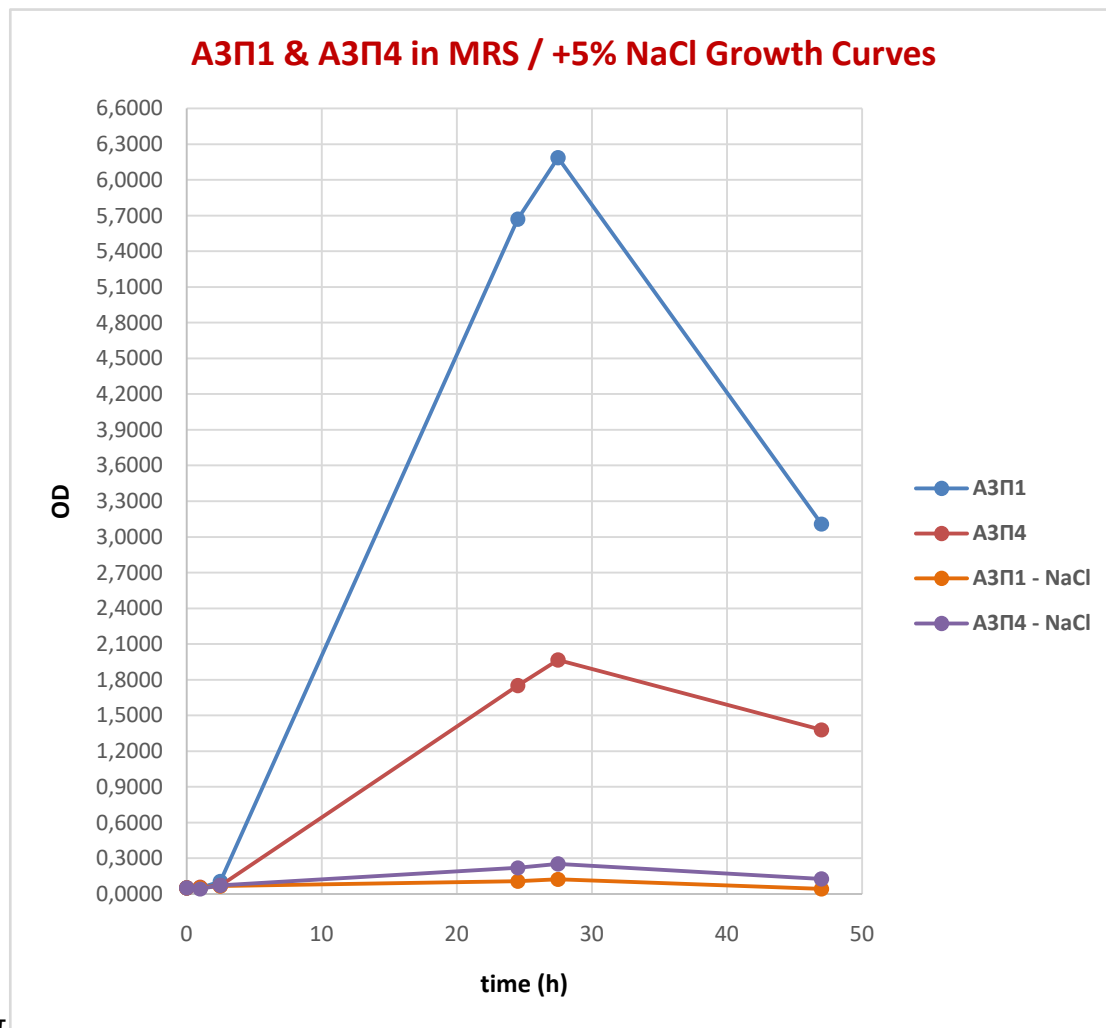
### **3.2 Αποτελέσματα από το πείραμα ανάπτυξης λακτοβάκιλλων με και χωρίς χλωριούχο νάτριο**

Αρχικά εξετάσαμε τα δείγματα A3Π1 και A3Π4.Στον χρόνο 0 τα δείγματα είχαν απορρόφηση 0,05.Δημιουργήσαμε καμπύλες ανάπτυξης για να εξετάσουμε πώς μεγαλώνουν τα βακτήρια με και χωρίς χλωριούχο νάτριο.

Πίνακας 3.1

Απορροφήσεις των δειγμάτων Α3Π1 και Α3Π4

time (h)	MRS broth		MRS + 5% NaCl	
	A3Π1	A3Π4	A3Π1	A3Π4
0	0,0500	0,0500	0,0500	0,0500
1	0,0510	0,0560	0,0505	0,0435
2,5	0,1040	0,0695	0,0670	0,0710
24,5	5,6700	1,7500	0,1085	0,2210
27,5	6,1850	1,9650	0,1240	0,2520
47	3,1100	1,3800	0,0435	0,1255



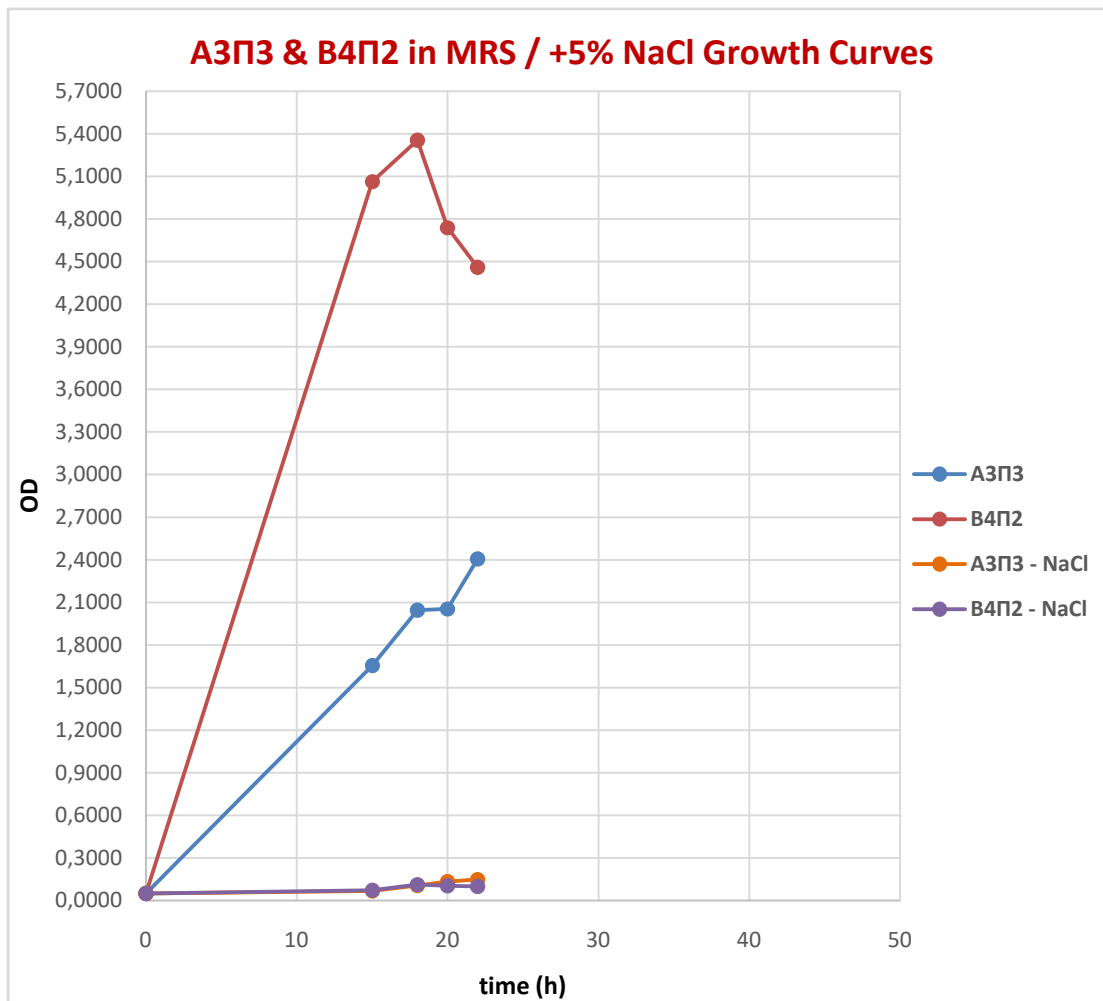
Διάγραμμα 1: Ανάπτυξη λακτοβάκιλλων Α3Π1 ΚΑΙ Α3Π4 με και χωρίς χλωριούχο νάτριο

Στη συνέχεια εξετάσαμε τις απορροφήσεις των δειγμάτων Α3Π3 και Β4Π2. Τα αποτελέσματα ήταν τα εξής:

**Πίνακας 3.2**

**Απορροφήσεις των δειγμάτων Α3Π3 και Β4Π2**

time (h)	MRS broth		MRS + 5% NaCl	
	A3Π3	B4Π2	A3Π3	B4Π2
0	0,0500	0,0500	0,0500	0,0500
15	1,6550	5,0650	0,0685	0,0725
18	2,0450	5,3550	0,1055	0,1140
20	2,0550	4,7400	0,1330	0,1035
22	2,4050	4,4600	0,1500	0,0995



Διάγραμμα 2: Ανάπτυξη λακτοβάκιλλων A3Π3 και B4Π2 με και χωρίς χλωριούχο νάτριο

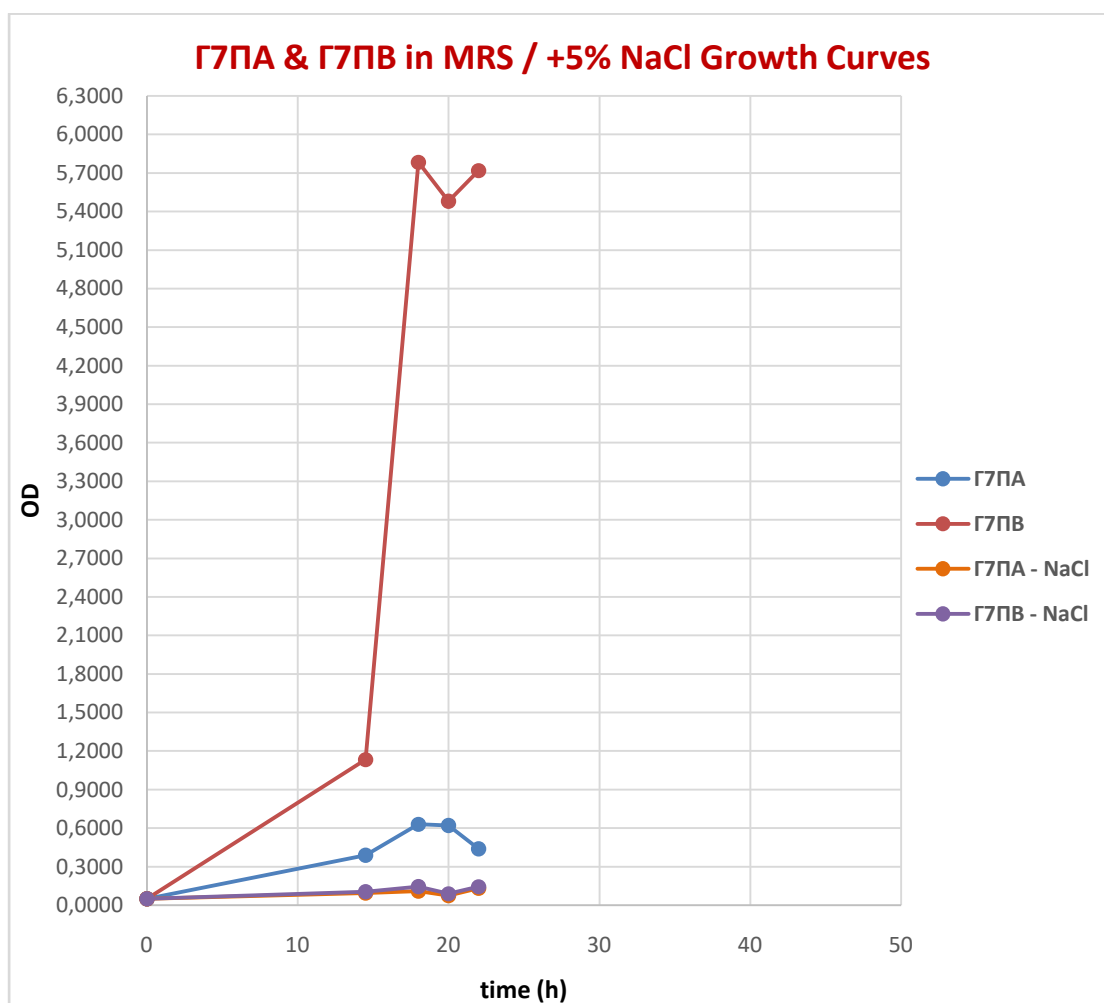
Στη συνέχεια εξετάσαμε τις απορροφήσεις των δειγμάτων Γ7ΠΑ και Γ7ΠΒ. Τα αποτελέσματα ήταν τα εξής:

### Πίνακας 3.3

**Απορροφήσεις των δειγμάτων Γ7ΠΑ και Γ7ΠΒ**



time (h)	MRS broth		MRS + 5% NaCl	
	Γ7ΠΑ	Γ7ΠΒ	Γ7ΠΑ	Γ7ΠΒ
0	0,0500	0,0500	0,0500	0,0500
14,5	0,3895	1,1350	0,0960	0,1040
18	0,6320	5,7850	0,1110	0,1455
20	0,6200	5,4800	0,0760	0,0915
22	0,4390	5,7200	0,1335	0,1460



Διάγραμμα 3: Ανάπτυξη λακτοβάκιλλων Γ7ΠΑ και Γ7ΠΒ με και χωρίς χλωριούχο νάτριο

### **3.3 Συζήτηση- Καταμέτρηση αποικιών**

Σε ορισμένα δείγματα δεν παρατηρήσαμε αποικίες ίσως επειδή τα δείγματα με τα οποία εργαστήκαμε δεν είχαν ικανό αριθμό γαλακτοβάκιλλων ώστε να είμαστε σε θέση να τις απομονώσουμε. Στα δείγματα Γ7 πάνω, Β4 πάνω, Β4 κάτω και Α3 πάνω παρατηρήσαμε ικανό αριθμό αποικιών πράγμα που σημαίνει ότι τα δείγματα περιείχαν σημαντικό αριθμό γαλακτοβάκιλλων και ειδικά στο δείγμα Α3 πάνω καταμετρήσαμε 159 αποικίες. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν πως τα αρχικά δείγματα από τις ελιές περιέχουν γαλακτοβάκιλλους σε ικανό ποσοστό τους οποίους μπορέσαμε και απομονώσαμε ώστε να δούμε αποικίες.

### **3.4 Συζήτηση- Καταμέτρηση αποικιών με αραίωση**

Για να διακρίνουμε καλύτερα τις αποικίες των γαλακτοβακίλλων κάναμε διαδοχικές αραιώσεις και παρατηρήσαμε ότι στο δείγμα Α3 πάνω είχαμε πολλές αποικίες πράγμα που σημαίνει ότι καταφέραμε να απομονώσουμε γαλακτοβάκιλλους από το δείγμα αυτό ενώ στο δείγμα Α3 κάτω παρατηρήσαμε μόνο 1 αποικία δηλαδή δεν καταφέραμε να απομονώσουμε πολλούς λακτοβάκιλλους. Στο δείγμα Β4 κάτω δεν καταφέραμε να απομονώσουμε γαλακτοβάκιλλους και πιθανόν μπορεί να απομονώσαμε κάποιον άλλο μικροοργανισμό. Στα δείγματα Β4 πάνω και Γ7 κάτω παρατηρήσαμε αποικίες άρα είχαμε επιτυχή απομόνωση γαλακτοβακίλλων.

Αφού πραγματοποιήσαμε ανακαλλιέργειες των αποικιών ώστε να καταμετρήσουμε αποικίες παρατηρήσαμε με σιγουριά στο δείγμα Β4 κάτω ότι υπάρχει ένας καινούριος μικροοργανισμός. Στα υπόλοιπα δείγματα καταμετρήσαμε ικανό αριθμό αποικιών. Σε ορισμένα δείγματα είδαμε από 1 έως καμία αποικία. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι μπορεί να μην έγινε σωστά η επίστρωση στα τρυβλία ή μπορεί τα αρχικά δείγματα να μην είχαν πληθώρα γαλακτοβακίλλων. Για παράδειγμα στο δείγμα Α3 κάτω δεν παρατηρήσαμε αποικίες το οποίο δεν σημαίνει πάντα ότι δεν υπήρχαν γαλακτοβάκιλλοι στο συγκεκριμένο δείγμα όπως αναφέραμε και παραπάνω. Τέλος, στο δείγμα Α3 πάνω εντοπίσαμε τις περισσότερες αποικίες (316) πράγμα που σημαίνει ότι υπήρχαν γαλακτοβάκιλλοι στα αρχικά δείγματα.

### **3.5 Συζήτηση- Παρατηρήσεις σχετικές με τις αποικίες**

Όσον αφορά το δείγμα Α3Π1 παρατηρήσαμε μικρές και μεγάλες αποικίες πράγμα που σημαίνει ότι πιθανόν είχαμε δύο διαφορετικά είδη γαλακτοβακίλλων ή και περισσότερα αλλά το ενδιαφέρον είναι ότι απομονώσαμε τυχαία και έναν άλλο μικροοργανισμό( ίσως στρεπτομύκητα) που υπάρχει στο αρχικό δείγμα.Είναι φανερό ότι τα δείγματα από τις ελιές που είχαμε περιέχουν πληθώρα μικροοργανισμών οπότε είναι λογικό να αναπτύσσονται και αυτοί ειδικά αν χρειάζονται παρόμοιο θρεπτικό υπόστρωμα. Τα ίδια αποτελέσματα είχαμε και για το δείγμα Α3Π3 μόνο που δεν μπορέσαμε να ταυτοποιήσουμε τον καινούριο μικροοργανισμό που απομονώσαμε.Στη μορφή του πάντως ήταν διαφορετικός από αυτόν που υπήρχε στο δείγμα Α3Π1. Στο δείγμα Α3Π4 παρατηρήσαμε πολύ μικρές αποικίες.Αυτό μπορεί να συνέβη ίσως επειδή το αρχικό δείγμα δεν περιέχει πολλούς γαλακτοβάκιλλους ή έγινε κάποιο λάθος στην ανακαλλιέργεια. Όσον αφορά το δείγμα Β4Κ1 δεν παρατηρήσαμε αποικίες ωστόσο σε προηγούμενη καλλιέργεια όπως προαναφέραμε υπήρχαν αποικίες. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι μπορεί να μην καταφέραμε με την ανακαλλιέργεια που κάναμε να απομονώσουμε γαλακτοβάκιλλους ή μπορεί να απομονώσαμε αλλά να ήταν σε πολύ μικρή ποσότητα. Τέλος, στα δείγματα Γ7ΠΑ και Γ7ΠΒ παρατηρήσαμε πληθώρα αποικιών μικρού μεγάλου και μεσαίου μεγέθους οπότε έτσι επιβεβαιώνουμε ότι υπάρχουν γαλακτοβάκιλλοι στα αρχικά δείγματα.

### **3.6 Παρατηρήσεις σχετικές με το πείραμα ανάπτυξης γαλακτοβακίλλων με και χωρίς χλωριούχο νάτριο**

Όσον αφορά το δείγμα Α3Π1 παρατηρούμε πως η μεγαλύτερη απορρόφηση άρα και η μεγαλύτερη ανάπτυξη συμβαίνει στις 25 ώρες όπου έχουμε μια απορρόφηση της τάξης του

6,3. Μετά τις 25 ώρες αρχίζει σιγά σιγά να φθίνει η απορρόφηση και πέφτει στις 47 ώρες στο 3. Αυτό είναι φυσιολογικό καθώς τα βακτήρια αρχίζουν να πεθαίνουν μετά τις 25 ώρες. Όσον αφορά το δείγμα A3Π4 παρατηρούμε διαφορετική ανάπτυξη από το προηγούμενο καθώς η απορρόφηση του φτάνει μόνο μέχρι το 1,9 δηλαδή πολύ μικρότερη από το A3Π1. Όπως και το A3Π1 έτσι και αυτό το δείγμα στις 47 ώρες αρχίζει και πεθαίνει οπότε μειώνεται και άλλο η απορρόφηση του.

Αναφορικά με την ανάπτυξη λακτοβακίλλων σε χλωριούχο νάτριο ( NaCl 5 % w/v) και MRS Broth δεν έχουμε καλή ανάπτυξη και των δύο δειγμάτων . Η μεγαλύτερη ανάπτυξη έγινε στις 27,5 ώρες όπου η απορρόφηση είναι 0,124 για το A3Π1 και 0,252 για το A3Π4 και στις 47 ώρες έπεσε στο 0,0435 για το A3Π1 και 0,1255 για το A3Π4. Αυτό είναι κάπως παράδοξο αφού είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε πως τα βακτήρια αυτά υπάρχουν φυσικά στις ελιές και αναπτύσσονται σε αλάτι που βρίσκεται στις ελιές. Ίσως τα βακτήρια που μελετούμε να απαιτούσαν λιγότερη συγκέντρωση άλατος και γι αυτό να μην αναπτύχθηκαν όπως αναμενόταν.

Όσον αφορά το δείγμα A3Π3 παρατηρούμε πως η μεγαλύτερη απορρόφηση άρα και η μεγαλύτερη ανάπτυξη συμβαίνει στις 22 ώρες όπου έχουμε μια απορρόφηση της τάξης του 2,405. Δεν έχουμε δεδομένα για το τι συμβαίνει μετά τις 22 ώρες πάντως αν κρίνουμε από τα προηγούμενα δείγματα η απορρόφηση θα αρχίζει σιγά σιγά να φθίνει. Όσον αφορά το δείγμα B4Π2 παρατηρούμε διαφορετική ανάπτυξη από το προηγούμενο καθώς η απορρόφηση του φτάνει μέχρι το 5,355 στις 18 ώρες δηλαδή πολύ μεγαλύτερη από το A3Π3, όμως στις 22 ώρες μειώνεται στο 4,46, που είναι φυσιολογικό καθώς το βακτήριο αρχίζει να πεθαίνει.

Αναφορικά με την ανάπτυξη λακτοβακίλλων σε χλωριούχο νάτριο ( NaCl 5 % w/v) και MRS Broth δεν έχουμε καλή ανάπτυξη και των δύο δειγμάτων . Η μεγαλύτερη ανάπτυξη έγινε στις 22 ώρες όπου η απορρόφηση είναι 0,15 για το A3Π3 και 0,0995 για το B4Π2, δηλαδή σχεδόν μηδενική ανάπτυξη. Είναι σίγουρο πως μετά τις 20 ώρες τα βακτήρια πέθαναν αφού παρατηρούμε πως δεν έφτασαν σε μεγάλα επίπεδα απορρόφησης σε καμία από τις ώρες που μετρήσαμε. Ίσως τα βακτήρια να μην μπόρεσαν να εγκλιματιστούν γρήγορα με τη συγκέντρωση αλατιού που δημιουργήσαμε και γι αυτό να είχαμε αυτά τα αποτελέσματα.

Όσον αφορά το δείγμα Γ7ΠΑ στις 18 ώρες η απορρόφηση του είναι 0,632, δηλαδή πολύ χαμηλή και όσο περνάει η ώρα φθίνει όλο και περισσότερο και φτάνει το 0,439. Σχετικά με

το δείγμα Γ7ΠΒ η ανάπτυξή του είναι μεγάλη καθώς καταγράφουμε στις 18 ώρες απορρόφηση της τάξης του 5,785. Αυτό ίσως να συμβαίνει γιατί το δείγμα Γ7ΠΒ περιέχει περισσότερους γαλακτοβάκιλλους. Μετά τις 22 ώρες δεν διαθέτουμε δεδομένα αλλά αν κρίνουμε και από τα προηγούμενα συμπεράσματα τα βακτήρια αρχίζουν να πεθαίνουν.

Αναφορικά με την ανάπτυξη λακτοβακίλλων σε χλωριούχο νάτριο ( NaCl 5 % w/v) και MRS Broth τα βακτήρια δεν αναπτύχθηκαν όπως αναμενόταν . Η μεγαλύτερη ανάπτυξη έγινε στις 22 ώρες όπου η απορρόφηση είναι 0,1335 για το Γ7ΠΑ και 0,146 για το Γ7ΠΒ, δηλαδή πολύ χαμηλή απορρόφηση. Τα βακτήρια δεν μπόρεσαν να αναπτυχθούν επαρκώς και η απορρόφηση τους συνεχώς μειώνεται οπότε μετά τις 22 ώρες σίγουρα τα βακτήρια πέθαναν. Αυτό μπορεί να συμβαίνει επειδή τα βακτήρια βρίσκονταν σε ένα τεχνητό περιβάλλον αλατιού και όχι φυσικά στις ελιές που όπως γνωρίζουμε είναι το ενδιαίτημά τους.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### 4.1 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα Διπλωματική Εργασία πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση του μικροβιακού φορτίου σε δείγματα υγρού ωρίμανσης ελαιοκάρπου ( olive brine). Απομονώθηκε ένας σημαντικός αριθμός στελεχών λακτοβακίλλων οι οποίοι λαμβάνουν μέρος στην ωρίμανση του προϊόντος Παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των στελεχών , τόσο όσον αφορά το ρυθμό αύξησης όσο και στην παρουσία ή μη χλωριούχου νατρίου.

Τα στελέχη αυτά μπορούν να αποτελέσουν μέλη καλλιιεργειών εκκίνησης ( starter cultures) που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε διεργασίες τεχνητής ωρίμανσης ελαιοκάρπου. Για την πραγματοποίηση μιας τέτοιας προοπτικής θα πρέπει μελλοντικά να μελετηθεί και η επίδραση επιπλέον φυσικοχημικών παραγόντων στη φυσιολογία των μικροοργανισμών αυτών ( π.χ θερμοκρασία) καθώς και η μοριακή τους ταυτοποίηση μέσω τεχνικών (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης- PCR) .

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abdel - Rahmane A.A., El Shaarkawi H.M., (1974 ).Response of olive and almonds orchards to partial irrigation under dry farming practices in semi-arid regions.Water relations in olive during the growing season. -Plant and Soil, 41: 13 -31.

Abriouel, H., Benomar, N., Cobo, A., Caballero, N., Fernández Fuentes, M.Á., Pérez-Pulido, R., et al. (2012). Characterization of lactic acid bacteria from naturally-fermented Manzanilla Aloreña green table olives. *Food Microbiology*, 32(2), 308–316.

Abriouel, H., Benomar, N., Pulido, R.P., Cañamero, M.M., Gálvez, A., (2011). Annotated genome sequence of *Lactobacillus pentosus* MP-10, which has probiotic potential, from naturally fermented Aloreña green table olives. *J. Bacteriol.* 193, 4559–4560.

Argyri, A. A., Panagou, E. Z., & Tassou, C. C. (2016). Probiotics from the olive microbiota. Probiotics, prebiotics, and synbiotics. In E. R. Farnworth, & C. P. Champagne (Eds.). *Bioactive foods in health promotion* (pp. 371–389). London: Academic Press.

Arroyo-López, F. N., García-García, P., Rodríguez-Gómez, F., and Garrido-Fernández, A. (2015). “Olives: types and consumption,” in *The Encyclopedia of Food and Health*, Vol. 4, eds B. Caballero, P. Finglas, and F. Toldrá (Oxford: Academic Press), 167–170.

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 Microbiol.* **30**, 8–16. [https://doi.org/ 10.1016/j.fm.2011.10.005](https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.10.005)

Baksh, B. (2014). Probiotic and preservative uses of oil-emulsified probiotic encapsulations. Patent No.: US 8,846,082 B2.

Bartkiene E, Vidmantiene D, Juodeikiene G, Viskelis P, Urbonaviciene D.(2013) Lactic acid fermentation of tomato: effects on cis/trans lycopene isomer and  $\beta$ -carotene concentration and formation of L(+) and D

(-)-lactic acid. *Food Techn Biotechnol.*, 51(4): 471-478.

Bautista-Gallego, J., Arroyo-López, F. N., Rantsiou, K., Jiménez-Díaz, R., Garrido-Fernández, A., Cocolin, L., et al. (2013). Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented table olives with probiotic potential. *Food Research International*, 50, 135–142

Benítez-Cabello A, Calero-Delgado B, Rodríguez-Gómez F, Garrido-Fernández A, Jiménez-Díaz R. and Arroyo-López FN (2019). Biodiversity and Multifunctional Features of Lactic Acid Bacteria

Isolated From Table Olive Biofilms. *Front. Microbiol.* 10:836.

doi: 10.3389/fmicb.2019.00836

Boulouha B.,( 1986). Croissance, fructification et leur interaction sur la production chez la Picholine Marocaine. – *Olea*, 17: 41-47.

Botta, C., Cocolin, L., (2012). Microbial dynamics and biodiversity in table olive fermentation: culture-dependent and -independent approaches. *Front. Microbiol.* 3, 245.

Buckenhüskes, H. J. (1997). Fermented vegetables. In M. P. Doyle, L. R. Beuchat, & T. J. Montville (Eds.). *Food microbiology: Fundamentals and frontiers* (pp. 595–609).

Washington: ASM Press.

Cammarota M, De Rosa M, Stellavato A, Lamberti M, Marzaioli I, Giuliano M.(2009). *In vitro* evaluation of *Lactobacillus plantarum* DSMZ 12028 as a probiotic: emphasis on innate immunity. *Int J Food Microbiol.*, 135: 90-98. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.08.022> PMID: 19748696

Caponio, F.; Alloggio, V.; Gomes, T.(1999) Phenolic compounds of virgin olive oil: influence of paste preparation techniques. *Food*



*Chem.* , 64, 203-209.

Campus, M., Cauli, E., Scano, E., Piras, F., Comunian, R., Paba, A., et al. (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.

Chang J-H, Shim YY, Cha S-K, Chee KM.(2010) Probiotic characteristics of lactic acid bacteria isolated from kimchi. *J Appl Microbiol.*, 109: 220-230. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04648.x> PMID: 20102423

Cimato, A.C., Cantini C., Sani G.,(1990) .*Climate - Phenology relationships on olive Cv. Frantoio*. - *Acta Horticulturae*, 286: 171-174.

Cimato A., Fiorino P., (1986 ).Influence of fruit bearing on flower induction and differentiation in olive. - *Olea*, 17: 55-60.

Corsetti A., Perpetuini G., Schirone M., Tofalo R., and Suzzi G.,(2012) “Application of starter cultures to table olive fermentation: an overview on the experimental studies,” *Frontiers in Microbiology*, vol. 3, article 248, pp. 1–6.

De Angelis, M., & Gobbetti, M. (2011). Stress responses of lactobacilli. In E. Tsakalidou, & K. Papadimitriou (Eds.). *Stress responses of lactic acid bacteria* (pp. 219–248). Boston:Springer US.

De Castro, A., Montano, A., Casado, F.-J., Sanchez, A.-H., Rejano, L., (2002). Utilization of *Enterococcus casseliflavus* and *Lactobacillus pentosus* as starter culture for Spanish-style green olive fermentation. *Food Microbiol.* 19, 637–644.

Di Cagno R, Cardinali G, Minervini G, Antonielli L, Rizzello CG, Ricciuti P, et al.(2010) Taxonomic structure of the yeasts and lactic acid bacteria microbiota of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) and use of autochthonous starters for minimally processing. *Food Microbiol.* , 27: 381±389. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.11.012> PMID: 20227603

FAO/WHO (2006). Probiotics in Food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. Available online at: <http://www.fao.org/food/foodsafety-quality/a-z-index/probiotics/en/>

Garcia E.A, Montoro B.P, Benomar N., Castillo-Gutiérrez S., Estudillo-Martínez M. D, Knapp C.W, Abriouel H.(2019).New insights into the molecular effects and probiotic properties of *Lactobacillus pentosus*pre-adapted to edible oils.*Food Science and Technology* 109,153–162

Garrido-Fernandez, A., Fernandez-Diez, M.J., Adams, M.R., (1997). *Table Olives: Production and Processing*. Chapman & Hall, London, pp. 134–197

Granato D, Branco GF, Nazzaro F, Cruz AG, Faria JAF. (2010)Functional foods and non dairy probiotic food development: trends, concepts, and products. *Compr Rev Food Sci Food Saf.*, 9: 292-302.

Hasler, C.M(2002). *Functional Foods: Benefits, Concerns and Challenges—A Position Paper from the American Council on Science and Health*. *Am. Soc. Nutr. Sci.*, 132, 3772–3781.

Hatzopoulos P, Banilas G, Giannoulia K, Gazis F, Nikoloudakis N, Milioni D, et al.(2002) Breeding, molecular markers and molecular biology of the olive tree. *Eur*

J Lipid Sci Technol.104:547–86.

Hernandez Vilar Juan, Benitez Pereira Enrique Jorge, Lopez Urieta Daniel, Sanchez Menor Antonio, Bermúdez Capo Sergio, Pernas Barreal Jesús, Gomez Velasco Maria del Mar, Poyatos Puentes Raquel (2018). International Olive Growing, Worldwide Analysis and Summary. The Edition: Fundación Caja Rural de Jan. 1-153

Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., et al. (2014). Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 11, 506–514. doi: 10.1038/nrgastro.2014.66

Holzappel WH. (2002). Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *Int. J. Food Microbiol.* 75, 197–212. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00707-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00707-3)

Hurtado A, Reguant C, Bordons A, Rozès N. (2012). Lactic acid bacteria from fermented table olives. *Food Microbiol.* 31, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.01.006>

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 Microbiol.* 27, 731–740.

IOC (2019). World Table Olive Figures. Madrid: IOC

Keys A. (1995) Mediterranean diet and public health: personal reflections. *Am J Clin Nutr.* 61:1321S–3S.

Lazzeri Y., (2009) “Les Defis de mondialisation pour l’oléiculture méditerranéenne,” in *Proceedings of the L’olivier En Méditerranée, Conférence Centre Culturel Français de*, pp. 1–24, Tlemcen, Algérie.

Landete, J. M., Curiel, J. A., Rodríguez, H., de las Rivas, B., & Muñoz, R. (2008). Study of the inhibitory activity of phenolic compounds found in olive products and their degradation by *Lactobacillus plantarum* strains. *Food Chemistry*, 107, 320–326

Lanza, B., (2013). Abnormal fermentations in table olive processing: microbial origin and sensory evaluation. *Front. Microbiol.* 4, 91

Lucena-Padros, H., Caballero-Guerrero, B., Maldonado-Barragan, A., Ruiz-Barba, J.L., (2014). Microbial diversity and dynamics of Spanish-style green table-olive fermentations in large manufacturing companies through culture-dependent techniques. *Food Microbiol.* 42, 154–165

Mannina L, Fontanazza G, Patumi M, Ansanelli G, Segre A.(2001) Italian and Argentine olive oils: a NMR and gas chromatographic study. *Grasas Aceites.* 52:380–8.

Moure, A.; Cruz, J. M.; Franco, D.; Dominguez, M.; Sineiro, J.; Dominguez, H.; Nunez, M. J.; Parajo, J. C. (2001) Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem.*, 72, 145-171.

Nousiainen, J., Javaninen, P., Setälä, J., & von Wright, A. (2004). Lactic acid bacteria as animal probiotics. In S. Salminen, A. von Wright, & A. Ouwehand (Eds.). *Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects* (pp. 547–580). (3rd ed.). New York: Marcel Dekker.

Peres, C., Catulo, L., Brito, D., Pintado, C., (2008). *Lactobacillus pentosus* DSM 16366 starter added to brine as freeze-dried and as culture in the nutritive media for Spanish style green olive production. *Grasas Aceites* 59, 234–238.

Pérez-Jiménez F, Ruano J, Perez-Martinez P, Lopez-Segura F, Lopez-Miranda J. (2007) The influence of olive oil on human health: not a question of fat alone. *Mol Nutr Food Res.* 51(10):1199–208.

Peres CM, Hernandez-Mendoza A, Peres C, Malcata FX.(2012) Review on fermented plant materials as carriers and sources of potentially probiotic lactic acid bacteria with an emphasis on table olives. *Trends Food Sci Technol.*, 26(1): 31-42.

Ruiz-Barba, J.L., Cathcart, D.P., Warner, P.J., Jiménez-Díaz, R., (1994). Use of *Lactobacillus plantarum* LPCO10, a bacteriocin producer, as a starter culture in Spanish-style green olive fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2059–2064.

Panagou, E.Z., Schillinger, U., Franz, C.M., Nychas, G.J., (2008). Microbiological and biochemical profile of cv. Conservolea naturally black olives during controlled fermentation with selected strains of lactic acid bacteria. *Food Microbiol.* 25, 348–358

Pavli F., Gkana E., Adebambo O., Karatzas K.A., Panagou E. and Nychas G.J.E (2019). In Vitro Screening of  $\gamma$ -Aminobutyric Acid and Autoinducer-2 Signalling in Lactic Acid Bacteria Exhibiting Probiotic Potential Isolated from Natural Black Conservolea Olives, *Foods* 8, 640; doi:10.3390/foods8120640

Pérez Montoro, B., Benomar, N., Lavilla Lerma, L., Castillo Gutiérrez, S., Gálvez, A., & Abriouel, H. (2016). Fermented Aloreña table olives as a source of potential probiotic *Lactobacillus pentosus* strains. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1583.

Proietti P., Tombesi A., (1996) .Translocation of assimilates and source-sink influences on productive characteristics of the olive tree. - *Adv. Hort. Sci.*, 10 (1): 11-14.

Quarnifa el Samira, El Antari Abderraoufand Hafidi Abdellatif (2019).Effect of Maturity and Environmental Conditions on Chemical Composition of Olive Oils of Introduced Cultivars in Morocco.*Journal of Food Quality*  
Volume 2019, Article ID 1854539, 14 pages ,<https://doi.org/10.1155/2019/1854539>

Ranadheera RDCS, Baines SK, Adams MC.(2010) Importance of food in probiotic efficacy. *Food Res Int.*, 43: 1-7.

Romero C., Brenes M., Yousfi K., Garc'ia P., Garc'ia A., and Garrido A.,(2004) “Effect of cultivar and processing method on the contents of polyphenols in table olives,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 52, no. 3, pp. 479–484.

Rossi, M., Corradini, C., Amaretti, A., Nicolini, M., Pompei, A., Zanoni, S., et al. (2005). Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: A comparative study of pure and fecal cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 71,6150–6158

Ritchie, M. L., and Romanuk, T. N. (2012). A meta-analysis of probiotic efficacy for gastrointestinal diseases. *PLoS ONE* 7:e34938.  
doi: 10.1371/journal.pone.0034938

Rugini E, Biasi R, Muleo R.(2000) Olive (*Olea europaea* L. var. sativa) transformation. In: Moahn JS, Minocha SC, editors. *Molecular biology of woody plants*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. p. 245–79.

Ruiz-Barba, J.L., Cathcart, D.P., Warner, P.J., Jiménez-Díaz, R., (1994). Use of *Lactobacillus plantarum* LPCO10, a bacteriocin producer, as a starter culture in Spanish-style green olive fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2059–2064.

Rejano, L., Montano, A., Casado, F.J., Sanchez, A.H., de Castro, A., (2010). Table olives: varieties and variations. In: Preedy, V.R., Watson, R.R. (Eds.), *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*. Elsevier Inc., Amsterdam, pp. 5–15.

Ruiz-Barba, J.L., Jiménez-Díaz, R.,( 2012). A novel *Lactobacillus pentosus*-paired starter culture for Spanish-style green olive fermentation. *Food Microbiol.* 30, 253–259.

Saulnier, D. M. A., Spinler, J. K., Gibson, G. R., & Versalovic, J. (2009). Mechanisms of probiosis and prebiosis: Considerations for enhanced functional foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 20, 135–141.

Spurr HW.(1994) The microbial ecology of fruit and vegetable surfaces, its relationship to postharvest biocontrol.

In: Wilson C, Wisniewski M, editors. *Biological Control of Postharvest Diseases: Theory and Practice*.

Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 11-23.

Stanton, C.; Ross, R.P.; Fitzgerald, G.F.; Van Sinderen, D.(2005) Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Curr. Opin. Biotech.*, 16, 198–203.

[CrossRef] [PubMed]

Swain MR, Anandharaj M, Ray RC, Rani RP.(2012) Fermented fruits and vegetables of Asia: A potential source of probiotics. *Biotechnol Res Int.*,2014: 250424.

Tassou, C., Panagou, E., & Katsaboxakis, K. (2002). Microbiological and physicochemical changes of naturally black olives fermented at different temperatures and NaCl levels in the brines. *Food Microbiology*, 19, 605–615.

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. *Front. Microbiol.*, 6, 1007–1022. [CrossRef] [PubMed]

Visioli, F.; Poli, A.; Galli, C.(2002) Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Med. Res. ReV.*, 22, 65-75.

Zohary D, Spiegel-Roy P.(1975) Beginnings of fruit growing in the old world. *Science*.187(4174):319–27.

### Διαδικτυακοί τόποι

[https://www.researchgate.net/publication/326070870\\_INTERNATIONAL\\_OLIVE\\_GROWING](https://www.researchgate.net/publication/326070870_INTERNATIONAL_OLIVE_GROWING)

G

[https://www.123rf.com/photo\\_54993400\\_old-olive-trees-in-zakynthos-island-greece.html](https://www.123rf.com/photo_54993400_old-olive-trees-in-zakynthos-island-greece.html)

<https://cretanolivetrees.gr/koroneiki-elia/>

-

<https://www.oliveoiltimes.com/el/health-news/bacteria-in-table-olives-may-help-eliminate-heavy-metals-during-digestion/74400>