



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΓΕΝΙΚΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
“ΘΕΤΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΣΤΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑ”
ΚΛΑΔΟΣ ΙΙΙ: ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

“Διερεύνηση των φυσικοχημικών και μικροβιολογικών μεταβολών κατά την επεξεργασία φυσικής μαύρης ελιάς ποικιλίας ‘Κονσερβολιά’.”

Όλγα Α. Χονδροδήμου

Επιβλέπων καθηγητής: Χαρουτουιάν Σέρκος, Καθηγητής Γ.Π.Α.

ΑΘΗΝΑ 2011



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΓΕΝΙΚΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
“ΘΕΤΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΣΤΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑ”
ΚΛΑΔΟΣ ΙΙΙ: ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

“Διερεύνηση των φυσικοχημικών και μικροβιολογικών μεταβολών κατά την επεξεργασία φυσικής μαύρης ελιάς ποικιλίας Κονσερβολιά.”



Όλγα Α. Χονδροδήμου

Επιβλέπων καθηγητής: Χαρουτουνιάν Σέρκος, Καθηγητής Γ.Π.Α.

ΑΘΗΝΑ 2011

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

“Διερεύνηση των φυσικοχημικών και μικροβιολογικών μεταβολών κατά την επεξεργασία φυσικής μαύρης ελιάς ποικιλίας ‘Κονσερβολιά’.”

ΌΛΓΑ Α. ΧΟΝΔΡΟΔΗΜΟΥ

Επιβλέπων καθηγητής: Χαρουτουιάν Σέρκος, Καθηγητής Γ.Π.Α.

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

Επιβλέπων: Χαρουτουιάν Σέρκος, Καθηγητής Γ.Π.Α.

Μέλη Κωνσταντίνου Βιολέτα, Καθηγήτρια Γ.Π.Α

Πανάγου Ευστάθιος, Λέκτορας Γ.Π.Α

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών με τίτλο: "Θετικές Επιστήμες στη Γεωπονία", Κλάδος III: "Μελέτη και Αξιοποίηση Φυσικών Προϊόντων".

Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή κ. Σέρκο Χαρουτουιάν, του Εργαστηρίου Γενικής Χημείας, για την ανάθεση της μελέτης αυτής, την επίβλεψη και τη σημαντική συμβολή του στην ολοκλήρωσή της.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Λέκτορα κ. Ευστάθιο Πανάγου, του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, για το αμέριστο ενδιαφέρον και την καθοδήγηση καθ' όλη την διάρκεια των πειραμάτων και την βοήθειά του σε όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της παρούσας μελέτης.

Ευχαριστώ επίσης την Καθηγήτρια κα. Βιολέτα Κωνσταντίνου, του Εργαστηρίου Γενικής Χημείας για το ενδιαφέρον και τις εύστοχες παρατηρήσεις κατά τη συγγραφή της μελέτης αυτής.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον Καθηγητή κ. Γιώργο-Γιάννη Νυχά, διευθυντή του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων για την δυνατότητα που μου έδωσε να εκτελέσω το πειραματικό κομμάτι της μεταπτυχιακής μου διατριβής στο εργαστήριο του οποίου προΐσταται.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αθανάσιο Μαλούχο Διδάκτορα Γ.Π.Α και τον Βασίλη Ηλιόπουλο Γεωπόνο Γ.Π.Α. για την σημαντική συμβολή τους στην διενέργεια του πειραματικού μέρους για τον προσδιορισμό των πτητικών συστατικών.

Ευχαριστώ επίσης τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Γεώργιο Σταμάτη, του Εργαστηρίου Ορυκτολογίας- Γεωλογίας και την Ευαγγελία Ιωάννου, υποψήφια Διδάκτορα Γ.Π.Α., για τη βοήθειά τους στη διενέργεια του πειραματικού μέρους για τον προσδιορισμό των ιόντων νατρίου, καλίου και ασβεστίου στη σάρκα των ελιών.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης το προσωπικό του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων για την συνεργασία και τη συμπαράστασή τους.

Τέλος ευχαριστώ τους γονείς μου, Λάμπρο και Βάϊα για την αμέριστη ηθική συμπαράστασή τους καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου, την αδελφή μου, Λουκία, για τη συμπαράσταση και βοήθειά της και ιδιαίτερα τον Γιάννη για τη στήριξη, την κατανόηση και την υπομονή που έδειξε έως ότου ολοκληρώσω τις σπουδές μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Όλγα Χονδροδημου

“Διερεύνηση των φυσικοχημικών και μικροβιολογικών μεταβολών κατά την επεξεργασία φυσικής μαύρης ελιάς ποικιλίας ‘Κονσερβολιά’.”

Φεβρουάριος 2011

Οι φυσικές μαύρες ελιές σε άλμη αποτελούν έναν από τους τρεις επικρατέστερους εμπορικούς τύπους επιτραπέζιας ελιάς σε διεθνές επίπεδο. Κυριότερες χώρες παραγωγής είναι η Ελλάδα, η Τουρκία καθώς επίσης και άλλες χώρες στη λεκάνη της Μεσογείου (π.χ. Αίγυπτος, Τυνησία, κλπ). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι το κυριότερο πρόβλημα κατά την επεξεργασία του συγκεκριμένου εμπορικού τύπου ελιάς είναι η χρήση υψηλών συγκεντρώσεων άλατος στην άλμη. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με την τάση που επικρατεί σήμερα διεθνώς για μειωμένη πρόσληψη άλατος μέσω του διαιτολογίου, περιορίζει την κατανάλωση του συγκεκριμένου προϊόντος ιδιαίτερα σε ευπαθείς ομάδες του πληθυσμού (π.χ. υπερτασικά άτομα, εγκύους, κλπ). Συνεπώς είναι αναγκαίο να μελετηθεί η δυνατότητα δημιουργίας προϊόντος που να χαρακτηρίζεται από χαμηλή συγκέντρωση άλατος.

Σκοπός της διατριβής είναι η μελέτη της πλήρους ή μερικής υποκατάστασης του χλωριούχου νατρίου, που χρησιμοποιείται στην άλμη για την επεξεργασία φυσικών μαύρων ελιών της ποικιλίας Κονσερβολιά από χλωριούχα άλατα (KCl , $CaCl_2$), με έμφαση στη δυνατότητα επίτευξης γαλακτικής ζύμωσης του καρπού και δημιουργίας οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του τελικού προϊόντος που θα είναι αποδεκτά από τον καταναλωτή.

Για το λόγο αυτό, ελαιόκαρπος ζυμώθηκε σε άλμες με διαφορετική συγκέντρωση χλωριούχων αλάτων ($NaCl$, KCl , $CaCl_2$) σύμφωνα με την παραδοσιακή αναερόβια μέθοδο. Ο πειραματικός σχεδιασμός βασίστηκε σε πείραμα μίξης με ενισχυμένο διάπλεγμα Simplex 2⁰⁰ βαθμού που περιλάμβανε 14 πειραματικές ζυμώσεις. Η συνολική περιεκτικότητα της άλμης στα τρία άλατα ήταν 8% (w/v). Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης πραγματοποιήθηκαν μικροβιολογικές αναλύσεις για την απαρίθμηση των γαλακτικών βακτηρίων, εντεροβακτηρίων και ζυμών, καθώς επίσης και φυσικοχημικές αναλύσεις στην άλμη για τον προσδιορισμό της τιμής του pH, της ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας, της ενεργότητας ύδατος, των οργανικών οξέων

και πτητικών συστατικών. Παράλληλα, προσδιορίστηκε η περιεκτικότητα του καρπού σε ιόντα Na^+ , Ca^{2+} και K^+ στο τέλος της ζύμωσης. Τέλος, πραγματοποιήθηκε οργανοληπτική δοκιμή ώστε να εξεταστεί η επίδραση των διαφορετικών ζυμώσεων στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι είναι εφικτή η μερική ή ολική υποκατάσταση του χλωριούχου νατρίου με άλλα χλωριούχα άλατα όπως το χλωριούχο κάλιο και το χλωριούχο ασβέστιο. Σε όλους τους συνδυασμούς αλάτων πραγματοποιήθηκε γαλακτική ζύμωση του καρπού με διαμόρφωση επιθυμητών τελικών φυσικοχημικών και μικροβιολογικών χαρακτηριστικών. Θα πρέπει όμως να τονιστεί ότι η χρήση άλλων αλάτων, εκτός χλωριούχου νατρίου, διαφοροποιεί σημαντικά την οργανοληπτική ποιότητα του καρπού προσδίδοντας πικρή/μεταλλική γεύση, μειώνοντας έτσι την τελική αποδοχή του από τον καταναλωτή. Από τα αποτελέσματα της μελέτης προκύπτει ότι είναι δυνατή η υποκατάσταση σε πρώτη φάση του χλωριούχου νατρίου κατά 50% από χλωριούχο κάλιο με πολύ καλή οργανοληπτική αποδοχή του τελικού προϊόντος.

Τα αποτελέσματα της μελέτης αναμένεται να οδηγήσουν στη δημιουργία ενός νέου τροφίμου με βελτιωμένα διατροφικά χαρακτηριστικά, το οποίο θα συμβάλλει στην αύξηση της κατανάλωσης από ειδικές ομάδες του πληθυσμού (π.χ. υπέρτασικά άτομα).

Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

Λέξεις κλειδιά: Κονσερβολία, Φυσικές μαύρες ελιές, Ζύμωση

ABSTRACT

Natural black olives in brine is one of the three main commercial preparations of table olives in the market. Greece and Turkey are the main producers of this kind of product, together with many other countries in the Mediterranean Basin. The major problem during processing of natural black olives is the high concentration of salt in brine. Nowadays, consumers worldwide demand foods low in sodium, which makes necessary to decrease levels of this mineral in the final product.

The aim of the present research was to study the effects of diverse mixtures of chloride salts (NaCl, KCl and CaCl₂) on the microbiological and physicochemical fermentation profiles of *Conservolea* natural black olives. Furthermore, organoleptic characteristics of olives were determined in order to examine the acceptability of the final product by consumers.

Olives were immersed in brine solution with diverse concentrations of NaCl, KCl and CaCl₂. The experimental design was generated using a simplex lattice mixture design with 14 independent treatments. The overall initial concentrations of the salts were constrained to $\text{NaCl} + \text{CaCl}_2 + \text{KCl} = 8\%$ (w/v). During the period of fermentation, brine samples were examined for microbiological (lactic acid bacteria, enterobacteria, and yeasts) and physicochemical attributes (pH, a_w , titratable acidity, organic acids and volatile compounds profile). Moreover, the mineral content of Na⁺, Ca²⁺ and K⁺ was determined and sensory analysis was undertaken at the end of the process.

The results illustrated that the substitution of NaCl with KCl and CaCl₂ is feasible. All salt combinations resulted in lactic acid processes with similar microbiological and physicochemical profiles. However, diverse organoleptic characteristics were observed in each case. Substitution of NaCl by 50% with KCl had the highest acceptability with regard to the organoleptic properties of olives.

The results obtained from the study could lead to the production of a new type of table olive preparation and increase its consumption, even from persons who belong in high risk groups.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1. Η επιτραπέζια ελιά και η σημασία της.....	2
1.2. Οι σημαντικότερες ποικιλίες επιτραπέζιας ελιάς που καλλιεργούνται στην Ελλάδα.....	4
1.3. Ο καρπός της ελιάς	7
1.3.1. Βοτανικά και ανατομικά χαρακτηριστικά.....	7
1.4. Μεταποίηση της επιτραπέζιας ελιάς	9
1.4.1. Ορισμός.....	9
1.4.2. Εμπορικοί τύποι.....	9
1.4.3. Φυσικές μαύρες ελιές σε άλμη.....	11
1.4.4. Μικροβιολογία της ζύμωσης.....	14
1.4.4.1. Προκαταρκτικό στάδιο.....	14
1.4.4.2. Ενδιάμεσο στάδιο.....	14
1.4.4.3. Τελικό στάδιο.....	15
1.4.4.4. Έλεγχος της ζύμωσης.....	16
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	19
2.1. Φυσική ζύμωση ελαιοκάρπου Κονσερβολιάς.....	20
2.1.1. Χειρισμός του καρπού πριν τη ζύμωση.....	20
2.1.2. Ζύμωση.....	20
2.2.Μικροβιολογικές αναλύσεις	22
2.3.Φυσικοχημικές αναλύσεις.....	23
2.3.1. Προσδιορισμός τιμής pH στην άλμη.....	23
2.3.2. Προσδιορισμός ογκομετρούμενης οξύτητας στην άλμη.....	23
2.3.3. Προσδιορισμός ενεργότητας ύδατος της άλμης.....	23
2.3.4. Προσδιορισμός της σάρκας του ελαιοκάρπου σε ιόντα νατρίου, καλίου, ασβεστίου.....	23
2.3.5. Προσδιορισμός οργανικών οξέων.....	24
2.3.6. Προσδιορισμός πτητικών συστατικών.....	25
2.4. Οργανοληπτική αξιολόγηση.....	28
2.5. Στατιστική επεξεργασία των δεδομένων.....	28

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	30
3.1.Μικροβιολογικές αναλύσεις.....	31
3.2. Φυσικοχημικές αναλύσεις.....	38
3.3. Πτητικά συστατικά στην άλμη.....	46
3.4. Τα οργανικά οξέα στην άλμη.....	53
3.5. Οργανοληπτική αξιολόγηση.....	55
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	63
4.1.Συζήτηση-Αποτελέσματα.....	64
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	74
6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	86

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ	ΣΕΛΙΔΑ
1.1. Ελληνικές επιτραπέζιες ελιές χαρακτηρισμένες ως Π.Ο.Π. (ICAP 2005).....	6
1.2. Εμπορικοί τύποι επιτραπέζιων ελιών (IOOC, 2004b).....	9
2.1. Συγκεντρώσεις (%) χλωριούχου νατρίου (NaCl), χλωριούχου καλίου (KCl) και χλωριούχου ασβεστίου (CaCl ₂) που χρησιμοποιήθηκαν στις διαφορετικές ζυμώσεις της φυσικής μαύρης ελιάς που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Η συνολική συγκέντρωση των τριών αλάτων δεν υπερβαίνει το 8% (NaCl + KCl + CaCl ₂ = 8 %), με μέγιστη συγκέντρωση κάθε μεμονωμένου άλατος ≤ 8 %.....	21
2.2. Πρόγραμμα Χώνευσης με Μικροκύματα.....	24
2.3. Εξισώσεις διαπλέγματος Simplex.....	29
3.1. Επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων των αλάτων στην τιμή της ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας για χρονικό διάστημα 60 ημερών από την έναρξη της ζύμωσης.....	40
3.2. Περιεκτικότητα της σάρκας του ελαιοκάρπου (mg/100 g καρπού) σε ιόντα νατρίου, καλίου και ασβεστίου μετά από χρονικό διάστημα 60 ημερών ζύμωσης σε άλμη διαφορετικής συγκέντρωσης σε άλατα NaCl, KCl και CaCl ₂	41
3.3. Παρουσία πτητικών συστατικών στις ζυμώσεις με κωδικό 1,2,3,4,5,6,7,8,9 και 10 μετά από 60 ημέρες ζύμωσης.....	46
3.4. Παρουσία πτητικών συστατικών στις ζυμώσεις φυσικής μαύρης ελιάς μετά από 60 ημέρες επεξεργασίας.....	47
3.5. Αλλαγές στη συγκέντρωση (%) γαλακτικού, κιτρικού, μηλικού, ηλεκτρικού, φορμικού, και οξικού οξέως κατά τη διάρκεια της ζύμωσης σε άλμη διαφορετικής συγκέντρωσης σε άλατα NaCl, KCl και CaCl ₂ (ζυμώσεις No 1-5).....	54
3.6. Αλλαγές στη συγκέντρωση (%) γαλακτικού, κιτρικού, μηλικού, ηλεκτρικού, φορμικού, και οξικού οξέως κατά τη διάρκεια της ζύμωσης σε άλμη διαφορετικής συγκέντρωσης σε άλατα NaCl, KCl και CaCl ₂ (ζυμώσεις No 6-10).....	55

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

ΣΧΗΜΑ

ΣΕΛΙΔΑ

1.1. Διάγραμμα επεξεργασίας πράσινης και φυσικώς ώριμης επιτραπέζιας ελιάς (Μπαλατσούρας 1995, Garrido Fernández και συν. 1997).....	13
2.1: Ενισχυμένο διάπλεγμα Simplex 2 ^{ov} βαθμού που χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη μιγμάτων αλάτων στη ζύμωση της φυσικής μαύρης ελιάς ποικιλίας «Κονσερβολιά».....	21
2.2 Τυπικό διάγραμμα συστήματος GC/MS.....	27
3.1. Μεταβολή του πληθυσμού των γαλακτικών βακτηρίων (◆), των ζυμών (□) και των εντεροβακτηρίων (▲) κατά τη ζύμωση της φυσικής μαύρης ελιάς με αναλογία αλάτων 8 % NaCl – 0 % KCl – 0 % CaCl ₂ στην αρχική άλμη.....	33
3.2. Μεταβολή του πληθυσμού των γαλακτικών βακτηρίων (◆), των ζυμών (□) και των εντεροβακτηρίων (▲) κατά τη ζύμωση της φυσικής μαύρης ελιάς με αναλογία αλάτων 4 % NaCl – 4 % KCl – 0 % CaCl ₂ στην αρχική άλμη.....	33
3.3. Μεταβολή του πληθυσμού των γαλακτικών βακτηρίων (◆), των ζυμών (□) και των εντεροβακτηρίων (▲) κατά τη ζύμωση της φυσικής μαύρης ελιάς με αναλογία αλάτων 4 % NaCl – 0 % KCl – 4 % CaCl ₂ στην αρχική άλμη.....	34
3.4. Μεταβολή του πληθυσμού των γαλακτικών βακτηρίων (◆), των ζυμών (□) και των εντεροβακτηρίων (▲) κατά τη ζύμωση της φυσικής μαύρης ελιάς με αναλογία αλάτων 0 % NaCl – 8 % KCl – 0 % CaCl ₂ στην αρχική άλμη...34	
3.5. Μεταβολή του πληθυσμού των γαλακτικών βακτηρίων (◆), των ζυμών (□) και των εντεροβακτηρίων (▲) κατά τη ζύμωση της φυσικής μαύρης ελιάς με αναλογία αλάτων 0 % NaCl – 4 % KCl – 4 % CaCl ₂ στην αρχική άλμη..35	
3.6. Μεταβολή του πληθυσμού των γαλακτικών βακτηρίων (◆), των ζυμών (□) και των εντεροβακτηρίων (▲) κατά τη ζύμωση της φυσικής μαύρης ελιάς με αναλογία αλάτων 0 % NaCl – 0 % KCl – 8 % CaCl ₂ στην αρχική άλμη.....	35
3.7. Μεταβολή του πληθυσμού των γαλακτικών βακτηρίων (◆), των ζυμών (□) και των εντεροβακτηρίων (▲) κατά τη ζύμωση της φυσικής μαύρης ελιάς με αναλογία αλάτων 2.66 % NaCl – 2.66 % KCl – 2.66 % CaCl ₂ στην αρχική άλμη.....	36
3.8. Μεταβολή του πληθυσμού των γαλακτικών βακτηρίων (◆), των ζυμών (□) και των εντεροβακτηρίων (▲) κατά τη ζύμωση της φυσικής μαύρης ελιάς με αναλογία αλάτων 5.33 % NaCl – 1.33 % KCl – 1.33 % CaCl ₂ στην αρχική άλμη.....	36

- 3.9.** Μεταβολή του πληθυσμού των γαλακτικών βακτηρίων (◆), των ζυμών (□) και των εντεροβακτηρίων (▲) κατά τη ζύμωση της φυσικής μαύρης ελιάς με αναλογία αλάτων 1.33 % NaCl – 5.33 % KCl – 1.33 % CaCl₂ στην αρχική άλμη.....**37**
- 3.10.** Μεταβολή του πληθυσμού των γαλακτικών βακτηρίων (◆), των ζυμών (□) και των εντεροβακτηρίων (▲) κατά τη ζύμωση της φυσικής μαύρης ελιάς με αναλογία αλάτων 1.33 % NaCl – 1.33 % KCl – 5.33 % CaCl₂ στην αρχική άλμη.....**37**
- 3.11.** Επίδραση της διαφορετικής συγκέντρωσης των αλάτων στη μεταβολή της τιμής του pH κατά τη ζύμωση φυσικά ώριμου ελαιοκάρπου ποικιλίας Κονσερβολιά.....**39**
- 3.12.** Ισοϋψείς καμπύλες της αρχικής τιμής ενεργότητας ύδατος στην άλμη σαν συνάρτηση της συγκέντρωσης των αλάτων NaCl, KCl και CaCl₂.....**42**
- 3.13.** Ισοϋψείς καμπύλες της τιμής του pH στην άλμη κατά το τέλος της ζύμωσης (60 ημέρες) σαν συνάρτηση της συγκέντρωσης των αλάτων NaCl, KCl και CaCl₂..... **42**
- 3.14.** Ισοϋψείς καμπύλες των μετασχηματισμένων επιφανειών που εκφράζουν την αύξηση του πληθυσμού των γαλακτικών βακτηρίων κατά τη ζύμωση φυσικά ώριμου ελαιοκάρπου σαν συνάρτηση της συγκέντρωσης των αλάτων NaCl, KCl, CaCl₂.....**45**
- 3.15.** Ισοϋψείς καμπύλες των μετασχηματισμένων επιφανειών που εκφράζουν την αύξηση του πληθυσμού των ζυμών σαν συνάρτηση της συγκέντρωσης των αλάτων NaCl, KCl και CaCl₂.....**45**
- 3.16.** Μεταβολή της συγκέντρωσης των πτητικών συστατικών αιθανόλη και 2-βουτανόνη μεταξύ των διαφόρων ζυμώσεων με διαφορετικές αναλογίες αλάτων: (1) 8-0-0, (2) 4-4-0, (3) 4-0-4, (4) 0-8-0, (5) 0-4 -4, (6) 0-0-8, (7) 2,6-2,6-2,6, (8) 5,33-1,33-1,33, (9) 1,33-5,33-1,33, (10) 1,33-1,33-5,33. Οι αριθμοί αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις (%) NaCl, KCl και CaCl₂ αντίστοιχα.....**48**
- 3.17.** Σημαντικές διαφορές στην συγκέντρωση των πτητικών συστατικών 2-βουτανόλη, αιθυλεστέρα και οξικό οξύ μεταξύ των διαφόρων ζυμώσεων με διαφορετικές αναλογίες αλάτων: (1) 8-0-0, (2) 4-4-0, (3) 4-0-4, (4) 0-8-0, (5) 0-4 -4, (6) 0-0-8, (7) 2,6-2,6-2,6, (8) 5,33-1,33-1,33, (9) 1,33-5,33-1,33, (10) 1,33-1,33-5,33. Οι αριθμοί αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις (%) NaCl, KCl και CaCl₂ αντίστοιχα....**49**

- 3.18.** Σημαντικές διαφορές στην συγκέντρωση των πτητικών συστατικών εξανόλη και cis-3-εξεν-1-όλη μεταξύ των διαφόρων ζυμώσεων με διαφορετικές αναλογίες αλάτων: (1) 8-0-0, (2) 4-4-0, (3) 4-0-4, (4) 0-8-0, (5) 0-4 -4, (6) 0-0-8, (7) 2,6-2,6-2,6, (8) 5,33-1,33-1,33, (9) 1,33-5,33-1,33, (10) 1,33-1,33-5,33. Οι αριθμοί αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις (%) NaCl, KCl και CaCl₂ αντίστοιχα.....**50**
- 3.19 .** Σημαντικές διαφορές στην συγκέντρωση των πτητικών συστατικών εξανόλη και cis-3-εξεν-1-όλη μεταξύ των διαφόρων ζυμώσεων με διαφορετικές αναλογίες αλάτων: (1) 8-0-0, (2) 4-4-0, (3) 4-0-4, (4) 0-8-0, (5) 0-4 -4, (6) 0-0-8, (7) 2,6-2,6-2,6, (8) 5,33-1,33-1,33, (9) 1,33-5,33-1,33, (10) 1,33-1,33-5,33. Οι αριθμοί αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις (%) NaCl, KCl και CaCl₂ αντίστοιχα.....**51**
- 3.20.** Βαθμολογία οργανοληπτικής δοκιμής φυσικής μαύρης επιτραπέζιας ελιάς κατά τη ζύμωση με μίγμα αλάτων 8 % NaCl - 0 % KCl - 0 % CaCl₂.....**57**
- 3.21.** Βαθμολογία οργανοληπτικής δοκιμής φυσικής μαύρης επιτραπέζιας ελιάς κατά τη ζύμωση με μίγμα αλάτων 4 % NaCl - 4 % KCl - 0 % CaCl₂. Το σημείο με αστερίσκο είναι έκτοπο (oulier).....**57**
- 3.22.** Βαθμολογία οργανοληπτικής δοκιμής φυσικής μαύρης επιτραπέζιας ελιάς κατά τη ζύμωση με μίγμα αλάτων 4 % NaCl - 0 % KCl - 4 % CaCl₂.....**58**
- 3.23.** Βαθμολογία οργανοληπτικής δοκιμής φυσικής μαύρης επιτραπέζιας ελιάς κατά τη ζύμωση με μίγμα αλάτων 0 % NaCl - 8 % KCl - 0 % CaCl₂. Το σημείο με αστερίσκο είναι έκτοπο (outlier).....**58**
- 3.24.** Βαθμολογία οργανοληπτικής δοκιμής φυσικής μαύρης επιτραπέζιας ελιάς κατά τη ζύμωση με μίγμα αλάτων 0 % NaCl - 4 % KCl - 4 % CaCl₂.....**59**
- 3.25.** Βαθμολογία οργανοληπτικής δοκιμής φυσικής μαύρης επιτραπέζιας ελιάς κατά τη ζύμωση με μίγμα αλάτων 0 % NaCl - 0 % KCl - 8 % CaCl₂.....**59**
- 3.26.** Βαθμολογία οργανοληπτικής δοκιμής φυσικής μαύρης επιτραπέζιας ελιάς κατά τη ζύμωση με μίγμα αλάτων 2,66 % NaCl – 2,66 % KCl – 2,66 % CaCl₂.....**60**
- 3.27.** Βαθμολογία οργανοληπτικής δοκιμής φυσικής μαύρης επιτραπέζιας ελιάς κατά τη ζύμωση με μίγμα αλάτων 5,33 % NaCl – 1,33 % KCl – 1,33 % CaCl₂.....**60**

3.28. Βαθμολογία οργανοληπτικής δοκιμής φυσικής μαύρης επιτραπέζιας ελιάς κατά τη ζύμωση με μίγμα αλάτων 1,33 % NaCl – 1,33 % KCl – 5,33 % CaCl ₂ . Το σημείο με αστερίσκο είναι έκτοπο (outlier).....	61
3.29. Βαθμολογία οργανοληπτικής δοκιμής φυσικής μαύρης επιτραπέζιας ελιάς κατά τη ζύμωση με μίγμα αλάτων 1,33 % NaCl – 5,33 % KCl – 1,33 % CaCl ₂ . Το σημείο με αστερίσκο είναι έκτοπο (outlier).....	61
3.30. Αραχνοειδές διάγραμμα (spider plot) που δείχνει συγκεντρωτικά τη μεταβολή της διαμέσου όλων των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών στα διάφορα μίγματα αλάτων.....	62
6.1. Χρωματογραφήματα διαχωρισμού οργανικών οξέων με HPLC στην άλμη της ζύμωσης με κωδικό 1 (8 % NaCl - 0 % KCl - 0 % CaCl ₂) για τους χρόνους Α) t=0, Β) t=13και Γ) t=27 ημέρες.....	87
6.2. Χρωματογραφήματα διαχωρισμού οργανικών οξέων με HPLC στην άλμη της ζύμωσης με κωδικό 1 (8 % NaCl - 0 % KCl - 0 % CaCl ₂) για τους χρόνους Α) t=46 και Β) t=53 ημέρες.....	88
6.3. Χρωματογραφήματα διαχωρισμού οργανικών οξέων με HPLC στην άλμη της ζύμωσης με κωδικό 2 (4 % NaCl - 4 % KCl - 0 % CaCl ₂) για τους χρόνους Α) t=0, Β) t=13και Γ) t=27 ημέρες.....	89
6.4. Χρωματογραφήματα διαχωρισμού οργανικών οξέων με HPLC στην άλμη της ζύμωσης με κωδικό 2 (4 % NaCl - 4 % KCl - 0 % CaCl ₂) για τους χρόνους Α) t=46 και Β) t=53 ημέρες.....	90
6.5. Χρωματογραφήματα διαχωρισμού οργανικών οξέων με HPLC στην άλμη της ζύμωσης με κωδικό 3 (4 % NaCl - 0 % KCl - 4 % CaCl ₂) για τους χρόνους Α) t=0, Β) t=13και Γ) t=27 ημέρες.....	91
6.6. Χρωματογραφήματα διαχωρισμού οργανικών οξέων με HPLC στην άλμη της ζύμωσης με κωδικό 3 (4 % NaCl - 0 % KCl - 4 % CaCl ₂) για τους χρόνους Α) t=46 και Β) t=53 ημέρες.....	92
6.7. Χρωματογραφήματα διαχωρισμού οργανικών οξέων με HPLC στην άλμη της ζύμωσης με κωδικό 4 (0 % NaCl - 8 % KCl - 0 % CaCl ₂) για τους χρόνους Α) t=0, Β) t=13και Γ) t=27 ημέρες.....	93

6.8. Χρωματογραφήματα διαχωρισμού οργανικών οξέων με HPLC στην άλμη της ζύμωσης με κωδικό 4 (0 % NaCl - 8 % KCl - 0 % CaCl ₂) για τους χρόνους A) t=46 και B) t=53 ημέρες.....	94
6.9. Χρωματογραφήματα διαχωρισμού οργανικών οξέων με HPLC στην άλμη της ζύμωσης με κωδικό 5 (0 % NaCl - 4 % KCl - 4 % CaCl ₂) για τους χρόνους A) t=0, B) t=13και Γ) t=27 ημέρες.....	95
6.10. Χρωματογραφήματα διαχωρισμού οργανικών οξέων με HPLC στην άλμη της ζύμωσης με κωδικό 5 (0 % NaCl - 4 % KCl - 4 % CaCl ₂) για τους χρόνους A) t=46 και B) t=53 ημέρες.....	96
6.11. Χρωματογραφήματα διαχωρισμού οργανικών οξέων με HPLC στην άλμη της ζύμωσης με κωδικό 6 (0 % NaCl - 0 % KCl - 8 % CaCl ₂) για τους χρόνους A) t=0, B) t=13και Γ) t=27 ημέρες.....	97
6.12. Χρωματογραφήματα διαχωρισμού οργανικών οξέων με HPLC στην άλμη της ζύμωσης με κωδικό 6 (0 % NaCl - 0 % KCl - 8 % CaCl ₂) για τους χρόνους A) t=46 και B) t=53 ημέρες.....	98
6.13. Χρωματογραφήματα διαχωρισμού οργανικών οξέων με HPLC στην άλμη της ζύμωσης με κωδικό 7 (2,66 % NaCl - 2,66 % KCl - 2,66 % CaCl ₂) για τους χρόνους A) t=0, B) t=13και Γ) t=27 ημέρες.....	99
6.14. Χρωματογραφήματα διαχωρισμού οργανικών οξέων με HPLC στην άλμη της ζύμωσης με κωδικό 7 (2,66 % NaCl - 2,66 % KCl - 2,66 % CaCl ₂) για τους χρόνους A) t=46 και B) t=53 ημέρες.....	100
6.15. Χρωματογραφήματα διαχωρισμού οργανικών οξέων με HPLC στην άλμη της ζύμωσης με κωδικό 8 (5,33 % NaCl - 1,33 % KCl - 1,33 % CaCl ₂) για τους χρόνους A) t=0, B) t=13και Γ) t=27 ημέρες.....	101
6.16. Χρωματογραφήματα διαχωρισμού οργανικών οξέων με HPLC στην άλμη της ζύμωσης με κωδικό 8 (5,33 % NaCl - 1,33 % KCl - 1,33 % CaCl ₂) για τους χρόνους A) t=46 και B) t=53 ημέρες.....	102
6.17. Χρωματογραφήματα διαχωρισμού οργανικών οξέων με HPLC στην άλμη της ζύμωσης με κωδικό 9 (1,33 % NaCl - 5,33 % KCl - 1,33 % CaCl ₂) για τους χρόνους A) t=0, B) t=13και Γ) t=27 ημέρες.....	103

- 6.18.** Χρωματογραφήματα διαχωρισμού οργανικών οξέων με HPLC στην άλμη της ζύμωσης με κωδικό 9 (1,33 % NaCl – 5,33 % KCl – 1,33 % CaCl₂) για τους χρόνους A) t=46 και B) t=53 ημέρες.....**104**
- 6.19.** Χρωματογραφήματα διαχωρισμού οργανικών οξέων με HPLC στην άλμη της ζύμωσης με κωδικό 10 (1,33 % NaCl – 1,33 % KCl – 5,33 % CaCl₂) για τους χρόνους A) t=0, B) t=13 και Γ) t=27 ημέρες.....**105**
- 6.20.** Χρωματογραφήματα διαχωρισμού οργανικών οξέων με HPLC στην άλμη της ζύμωσης με κωδικό 10 (1,33 % NaCl – 1,33 % KCl – 5,33 % CaCl₂) για τους χρόνους A) t=46 και B) t=53 ημέρες.....**106**
- 6.21.** Αέρια χρωματογραφήματα για την ανάλυση των πτητικών συστατικών της άλμης της ζύμωσης α) με κωδικό 1 και β) με κωδικό 2 στο τέλος του πειράματος με GC-MS.....**107**
- 6.22.** Αέρια χρωματογραφήματα (GC-MS) για την ανάλυση των πτητικών συστατικών της άλμης της ζύμωσης α) με κωδικό 3 και β) με κωδικό 4, στο τέλος του πειράματος.....**108**
- 6.23.** Αέρια χρωματογραφήματα (GC-MS) για την ανάλυση των πτητικών συστατικών της άλμης της ζύμωσης α) με κωδικό 5 και β) με κωδικό 6, στο τέλος του πειράματος.....**109**
- 6.24.** Αέρια χρωματογραφήματα (GC-MS) για την ανάλυση των πτητικών συστατικών της άλμης της ζύμωσης α) με κωδικό 7 και β) με κωδικό 8, στο τέλος του πειράματος.....**110**
- 6.25.** Αέρια χρωματογραφήματα (GC-MS) για την ανάλυση των πτητικών συστατικών της άλμης της ζύμωσης α) με κωδικό 9 και β) με κωδικό 10, στο τέλος του πειράματος.....**111**

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Επιτραπέζια ελιά.

Η ελιά είναι ένα αιωνόβιο και αειθαλές δένδρο που ανήκει στο γένος *Olea* της οικογένειας των Oleaceae. Είναι το μόνο αιωνόβιο καρποφόρο δένδρο με κύριο χαρακτηριστικό τη διατήρηση της παραγωγικότητάς του για πάρα πολλά χρόνια. Από τα 30 είδη που περιλαμβάνει το γένος *Olea*, οικονομικό ενδιαφέρον παρουσιάζει μόνο το είδος *Olea europaea*, L. (Μπαλατσούρας 1984). Η ελιά καλλιεργείται επιτυχώς σε πολλά μέρη του κόσμου, με πληθώρα εδαφικών και κλιματικών συνθηκών, ιδιότητα που οφείλεται στο μεγάλο αριθμό ποικιλιών που έχει αναπτύξει ανά τους αιώνες. Συγκεκριμένα έχουν περιγραφεί περίπου 600-900 ποικιλίες ελαιοδένδρων ανά την υφήλιο (Fernández-Maculet 1989).

Μια πικρή ουσία που υπάρχει στη σάρκα της ελιάς, η ελευρωπαΐνη και δεν απαντάται σε κανέναν άλλο καρπό του φυτικού βασιλείου, καθιστά τον καρπό μη απευθείας εδώδιμο από το δένδρο, εάν δεν προηγηθεί μια ειδική επεξεργασία για την απομάκρυνσή της. Το πλήθος των ποικιλιών που χαρακτηρίζει το φυτό της επιτραπέζιας ελιάς, οι διάφοροι τρόποι επεξεργασίας του ακέραιου καρπού και η μέθοδοι επεξεργασίας της σάρκας του (δεύτερη επεξεργασία) για την παραγωγή προϊόντων με μεγαλύτερη προστιθέμενη αξία, οδηγούν σε ένα πολύ πλατύ φάσμα προϊόντων ως έκφραση της αγροτικής και διατροφικής κουλτούρας εκάστου λαού.

Η ελαιοκαλλιέργεια διαδραματίζει πρωτεύοντα ρόλο στην οικονομία των χωρών που ευδοκimei, αφού αξιοποιεί εκτάσεις που είναι ακατάλληλες για άλλες καλλιέργειες, συμβάλλοντας και στην προστασία των εδαφών από τις διαβρώσεις. Επιπλέον, αποτελεί ένα υπολογίσιμο κλάσμα του Ακαθάριστου Εθνικού Προϊόντος (Α.Ε.Π.) των χωρών αυτών, των οποίων μέσω των εξαγωγών ελαιολάδου και επιτραπέζιων ελιών τονώνεται το εμπορικό ισοζύγιο (Lombardo 1988). Στην Ελλάδα η καλλιέργεια της ελιάς απασχολεί περίπου 50.000 με 60.000 παραγωγούς, ενώ η επιτραπέζια ελιά καλλιεργείται σε 1,5 εκατομμύριο στρέμματα, με το συνολικό αριθμό των ελαιοδένδρων να κυμαίνεται σε 25 έως 30 εκατομμύρια (Ραναγού και συν. 2008). Η γεωγραφική κατανομή της παραγωγής των επιτραπέζιων ελιών επικεντρώνεται κυρίως στη Στερεά Ελλάδα (56%), Θεσσαλία (12%), Πελοπόννησο (11%), Ήπειρο (10%), Μακεδονία (9%), καθώς και στα Ιόνια νησιά, τη Θράκη, τα νησιά του Αιγαίου και την Κρήτη (Τζουραμάνη και συν 1999).

Σε παγκόσμια κλίμακα η Ευρωπαϊκή Ένωση αποτελεί σήμερα το μεγαλύτερο παραγωγό επιτραπέζιας ελιάς, με 688.000 τόνους (πρόβλεψη περιόδου 2007/08) που αντιστοιχούν στο 40% της παγκόσμιας παραγωγής. Ακολουθούν η Αίγυπτος (10,6 % της παγκόσμιας παραγωγής), η Τουρκία (10,5 %), η Συρία (8,2 %) , οι ΗΠΑ (6,6 %) και το Μαρόκο (5,6 %) (IOOC 2005).

Το 40-45% του συνόλου της παγκόσμιας παραγωγής αντιστοιχεί σε πράσινες ελιές, το 30-35% σε μαύρες ελιές διαφόρων τύπων (φυσικές μαύρες, μαύρες με οξείδωση, ξηράλατες), ενώ το υπόλοιπο καλύπτεται από ελιές στο στάδιο χρώματος στροφής (ξανθες ελιές) (Μπαλατσούρας 1995). Όσον αφορά τις χώρες παραγωγής των διαφόρων τύπων επιτραπέζιας ελιάς, η Ισπανία είναι η κύρια παραγωγός χώρα πράσινων ελιών, η Τουρκία και η Ελλάδα αποτελούν τις κύριες χώρες παραγωγής φυσικά ώριμων (μαύρων) ελιών, ενώ οι ΗΠΑ των ελιών μαυρισμένων με οξείδωση (Garrido Fernández και συν. 1997, Piga και συν. 2001).

Οι χώρες που απορροφούν το 60% της παγκόσμιας παραγωγής είναι η Ισπανία, η Ιταλία, η Ελλάδα, η Τουρκία, η Συρία και οι ΗΠΑ. Η κατανάλωση εντοπίζεται στις Μεσογειακές χώρες και υπολογίζεται κατά μέσο όρο σε 330.000 τόνους, ποσοστό που αντιπροσωπεύει το 35,7% της παγκόσμιας κατανάλωσης. Ακολουθούν οι ΗΠΑ με 180.000 τόνους. Οι καταναλωτές δείχνουν ιδιαίτερη προτίμηση στις τεχνητώς μαύρες ελιές που παράγονται στις ΗΠΑ, και ακολουθούν οι πράσινες που παράγονται στην Ισπανία. Πρώτη σε παγκόσμια κατανάλωση φυσικώς μαύρων ελιών κατατάσσεται η Τουρκία, όπως και στην κατανάλωση μαύρων ξηράλατων ελιών, οι οποίες αποτελούν σημαντικό στοιχείο στη διατροφή και παράδοση της χώρας. Η Ιταλία κατατάσσεται δεύτερη διεθνώς σε κατανάλωση, με ιδιαίτερη προτίμηση στις φυσικές μαύρες ελιές. Την πρώτη θέση στην κατανάλωση πράσινων ελιών έχουν οι ΗΠΑ, τη δεύτερη η Ισπανία, ενώ παράλληλα οι καταναλωτές δείχνουν σημαντική προτίμηση για τις ελιές στο στάδιο αλλαγής χρώματος από τις οποίες παρασκευάζονται και οι τεχνητώς μαύρες ελιές (Garrido Fernández και συν. 1997).

Τη μεγαλύτερη κατά κεφαλήν κατανάλωση επιτραπέζιας ελιάς παρουσιάζουν η Κύπρος με 6,5 κιλά/έτος και η Συρία με 6,3 κιλά/έτος. Τρίτη κατατάσσεται η Ελλάδα με 3,3 κιλά/έτος, με ιδιαίτερη προτίμηση στις φυσικές μαύρες ελιές (2,3 κιλά/έτος). Είναι γεγονός ότι η κατά κεφαλήν κατανάλωση της επιτραπέζιας ελιάς παραμένει χαμηλή -ακόμα και στις ελαιοπαραγωγικές χώρες- και καθορίζεται από τις

διατροφικές συνήθειες, τα ήθη, τα έθιμα και το επίπεδο διαβίωσης των κατοίκων των χωρών αυτών.

Η ετήσια κατανάλωση της επιτραπέζιας ελιάς στην Ελλάδα παρουσιάζεται σταθερή στους 25.000 τόνους κατά μέσο όρο. Κατά κύριο λόγο προτιμώνται οι φυσικές μαύρες επιτραπέζιες ελιές οι οποίες αντιπροσωπεύουν το 73% περίπου της συνολικής κατανάλωσης, ακολουθούν οι πράσινες ελιές με 20% και αυτές στο στάδιο αλλαγής χρώματος με 7% (ICAP 1992).

1.2 Οι σημαντικότερες ποικιλίες επιτραπέζιας ελιάς που καλλιεργούνται στην Ελλάδα.

Τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά που πρέπει να έχει μια ποικιλία για να χαρακτηριστεί ως επιτραπέζια είναι: α) το μεγάλο μέγεθος του καρπού και κυρίως η όσο το δυνατόν μεγαλύτερη σχέση σάρκας προς πυρήνα, β) η μικρότερη κατά το δυνατόν περιεκτικότητα της σάρκας σε ελαιόλαδο, γ) η αυξημένη περιεκτικότητα της σάρκας σε πηκτίνες, κυτταρίνη και λοιπούς πολυσακχαρίτες και κατ' επέκταση η διατήρηση της συνεκτικότητας του καρπού, δ) η όσο το δυνατόν μεγαλύτερη περιεκτικότητα της σάρκας σε ζυμώσιμα συστατικά, ε) ο σχετικά εύκολος αποχωρισμός του πυρήνα από τη σάρκα και στ) η λεπτή ή μετρίου πάχους επιδερμίδα (Μπαλατσούρας 1995).

Η πλέον σημαντική οικονομικά Ελληνική ποικιλία επιτραπέζιας ελιάς που χρησιμοποιείται για την παρασκευή φυσικών μαύρων ελιών, είναι η Κονσερβολιά που αντιπροσωπεύει σχεδόν το 51% της ετήσιας παραγωγής (Ντούτσιας 2000).

Μια επιπλέον ποικιλία επιτραπέζιας ελιάς που καλλιεργείται στη χώρα μας για την παρασκευή φυσικών μαύρων ελιών είναι η ελιά Καλαμών.

Κονσερβολιά (*Olea europea media rotunda*)

Η Κονσερβολιά καλλιεργείται κυρίως στους νομούς Αιτωλοακαρνανίας, Φωκίδας, Άρτας, Φθιώτιδας, Ευβοίας, Μαγνησίας, Λαρίσης και Αχαΐας. Αναπτύσσεται σε δέντρο 6-10 μέτρων. Είναι ποικιλία μεσόκαρπη έως αδρόκαρπη, παραγωγική, με απόδοση σε ελαιόκαρπο από 15 έως 100 κιλά/δέντρο, ανάλογα με την ηλικία του δέντρου, το μέγεθος της κόμης του, τις καλλιεργητικές φροντίδες, κλπ. Το βάρος του

καρπού κυμαίνεται κατά μέσο όρο από 5 έως 8 γραμμάρια και το σχήμα του είναι σφαιρικό ή ωοειδές (Μπαλατσούρας 1995).

Η Κονσερβολιά μοιάζει μορφολογικά με την Ισπανική ποικιλία Manzanilla, η οποία είναι ο κυριότερος ανταγωνιστής της στις διεθνείς αγορές. Ανήκει στις μικροπύρηνες ποικιλίες, με κυλινδρικό πυρήνα, μέσο βάρος 0,51g και φέρει ακλιδα στην κορυφή και επτά βαθιές γλυφές. Η σάρκα είναι συμπαγής, με χαμηλή περιεκτικότητα σε λιπαρές ουσίες (20-25% επί νωπού βάρους) και σε ζυμώσιμα συστατικά (2-3% επί νωπού βάρους). Η σχέση σάρκας/πυρήνα κυμαίνεται από 8:1 έως 10:1. Η επιδερμίδα του καρπού είναι λεπτή και ελαστική παρουσιάζοντας μεγάλη αντοχή στο ζάρωμα, γεγονός που της προσδίδει ανθεκτικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις άλατος κατά τη ζύμωση. Συνήθως ο πράσινος καρπός παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία στη συρρίκνωση σε σύγκριση με των ώριμο. Επομένως, η φυσική ζύμωση της πράσινης ελιάς, δηλαδή η ζύμωση χωρίς προηγούμενη εκκίκραση με εμβάπτιση του καρπού σε διάλυμα καυστικού νατρίου, είναι απαραίτητο να ξεκινά σε χαμηλές συγκεντρώσεις άλατος ώστε να αποφευχθεί το ζάρωμα της επιδερμίδας (π.χ. 4-5%) και σταδιακά να αυξάνει.

Καλαμών (*Olea europea* var. *ceraticarpa*)

Η Καλαμών είναι μια εξαιρετική επιτραπέζια ποικιλία ελιάς, περιορισμένης όμως διάδοσης. Καλλιεργείται κυρίως στους νομούς Μεσσηνίας, Λακωνίας, Αιτωλοακαρνανίας, Φθιώτιδας, Κορινθίας, Αργολίδας και Ηλείας. Το δέντρο φτάνει σε ύψος 7-10 μέτρων. Ο καρπός είναι κυλινδροκωνικός, με κάμψη μονόπλευρη που ομοιάζει με τη ράγα της ποικιλίας του σταφυλιού 'Αετονύχι'. Ο καρπός χρησιμοποιείται για την παραγωγή του εμπορικού τύπου φυσικής μαύρης επιτραπέζιας ελιάς με την ονομασία «χαρακτές ελιές Καλαμών σε οξάλμη». Είναι μεσόκαρπη ποικιλία με βάρος καρπού που κυμαίνεται από 3 έως 6 g. Ο πυρήνας είναι επιμήκης ελλειψοειδής, με 6 γλυφές διακλαδιζόμενες. Η σάρκα είναι συμπαγής με χαμηλή περιεκτικότητα σε λιπαρές ουσίες (25% επί νωπού βάρους) και υψηλή περιεκτικότητα σε ζυμώσιμα συστατικά (3,1-3,5% επί νωπού βάρους). Η σχέση σάρκας/πυρήνα είναι περίπου 8:1. Η επιδερμίδα του καρπού είναι λεπτή και ελαστική και αποκτά βαθύ μαύρο χρώμα στο στάδιο της πλήρους ωριμότητας, γεγονός που την καθιστά ως κατάλληλη ποικιλία για την παραγωγή φυσικώς μαύρων ελιών. Η

συγκομιδή του καρπού γίνεται στο στάδιο της πλήρους ωριμότητας κατά την περίοδο Νοεμβρίου-Δεκεμβρίου.

Η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει επιτρέψει, για λόγους κατοχύρωσης και αναγνώρισης των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών (τοπικών κ.λ.π.) που έχουν ορισμένα αγροτικά προϊόντα και τρόφιμα την επισήμανση ως προστατευόμενες κατηγορίες προϊόντων με τη χρησιμοποιούμενη ένδειξη Π.Ο.Π. (Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης). Για να τύχει της αναγνωριστικής ένδειξης Π.Ο.Π., ένα προϊόν θα πρέπει να παράγεται, να επεξεργάζονται και να μεταποιούνται σε μια οριοθετημένη περιοχή, διαθέτοντας παράλληλα μια αναγνωρισμένη μέθοδο-πρακτική παραγωγής (ICAP, 2005). Οι δεκα τύποι Ελληνικών επιτραπέζιων ελιών που έχουν επίσημα αναγνωρισθεί και κατοχυρωθεί βάσει σχετικών κανονισμών της Ε.Ε. με την ένδειξη Π.Ο.Π., παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.1.

Πίνακας 1.1. Ελληνικές επιτραπέζιες ελιές χαρακτηρισμένες ως Π.Ο.Π. (ICAP 2005).

Ελληνικές επιτραπέζιες ελιές χαρακτηρισμένες ως Π.Ο.Π.
Ελιά Καλαμάτας
Κονσερβολιά Αμφίσσης
Κονσερβολιά Άρτας
Κονσερβολιά Αταλάντης
Κονσερβολιά Ροβίων
Κονσερβολιά Στυλίδας
Κονσερβολιά Πηλίου Βόλου
Θρούμπα Θάσου
Θρούμπα Χίου
Θρούμπα Αμπαδιάς Ρεθύμνης Κρήτης

1.3 Ο καρπός της ελιάς

1.3.1 Βοτανικά και ανατομικά χαρακτηριστικά

Ο καρπός της ελιάς είναι δρύπη, σφαιρικού ή ελλειψοειδούς σχήματος, μήκους 2-3 cm και εγκάρσιας διαμέτρου 1-2 cm, ενώ το βάρος είναι συνήθως μεταξύ 3 και 10 g. Αρχικά ο καρπός έχει χρώμα κιτρινοπράσινο, το οποίο με την πρόοδο της ωρίμανσης γίνεται πορφυρό ή κόκκινο και τέλος μαύρο. Ο ελαιόκαρπος μοιάζει ανατομικά με τις κοινές δρύπες των πυρηνόκαρπων (ροδάκινο, δαμάσκηνο κλπ), αφού τα συστατικά μέρη τους είναι τα ίδια, δηλαδή αποτελούνται από το: i) επικάρπιο ή επιδερμίδα ή φλοιό, ii) μεσοκάρπιο ή σάρκα και iii) ενδοκάρπιο ή πυρήνα ή κουκούτσι (Fernández-Díez 1983).

Το επικάρπιο αποτελεί το 1,5 έως 3% του ολικού βάρους ενός καρπού και η κύρια λειτουργία του αναφέρεται στην προστασία του από εντομολογικές και μικροβιολογικές προσβολές. Αποτελείται από παρεγχυματικά κύτταρα, τα οποία είναι επαλλήλως τοποθετημένα ώστε να μην αφήνουν μεταξύ τους κενά. Η συνέχειά τους διακόπτεται από τα στομάτια, που είναι μικρές οπές μέσω των οποίων γίνεται ανταλλαγή των αερίων (O_2 και CO_2) και της υγρασίας κατά την αναπνοή και διαπνοή του καρπού. Όμως τα στομάτια αποτελούν και πιθανή δίοδο μόλυνσης από κονίδια ή άλλους παθογόνους παράγοντες (Μπαλατσούρας 1995). Όπως αναφέρει ο Durán Grande (1977) κάτω από τα στομάτια υπάρχει ένας μεγάλος μεσοκυττάριος χώρος, ο οποίος καλείται αναπνευστική κοιλότητα η οποία προεκτείνεται μέσα στο μεσοκυττάριο. Το επικάρπιο είναι πλούσιο σε κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, λιγνίνη και πηκτίνη, ενώ το εξωτερικό επίστρωμα αποτελείται από κουτίνη, μια κηρώδη ουσία αδιαπέρατη στο νερό, η οποία αδιαβροχοποιεί την επιδερμίδα.

Το μεσοκάρπιο αποτελεί το 70-90% του βάρους ενός καρπού. Συγκροτείται από παρεγχυματικά κύτταρα μεγάλων διαστάσεων και ο κενός χώρος μεταξύ τους καταλαμβάνεται από O_2 και CO_2 (Μπαλατσούρας 1995, Garrido-Fernandez και συν. 1977). Μεταξύ των παρεγχυματικών κυττάρων παρεμβάλλονται σκληροεγχυματικά κύτταρα, τα οποία καλούνται σκληρεΐδες και διακρίνονται από ένα εξαιρετικά παχύ και αποξυλωμένο τοίχωμα. Οι σκληρεΐδες περιγράφονται γενικά ως νεκρά διαφοροποιημένα μόνιμα κύτταρα που δεν συμμετέχουν στον μεταβολισμό της ελιάς αλλά συνεισφέρουν ως σκελετικά στοιχεία. Στο μέσο των παρεγχυματικών κυττάρων υπάρχει το χυμοτόπιο. Αυτό είναι γεμάτο με κυτταρικό χυμό, στο οποίο είναι

διαλυμένες όλες οι πολικές του ουσίες όπως τα σάκχαρα, τα οργανικά οξέα, οι ταννίνες, οι υδατοδιαλυτές χρωστικές, τα ανόργανα συστατικά κλπ. Το ελαιόλαδο απαντάται επίσης στο χυμοτόπιο υπό μορφή διακριτών σταγονιδίων. Οι πολικές ουσίες ευθύνονται για την οσμωτική πίεση που εξασκείται προς τα έξω και η οποία εξουδετερώνεται από την προς τα έσω πίεση του δύσκαμπτου κυτταρικού τοιχώματος. Στις συνθήκες αυτές τα κύτταρα και κατ' επέκταση ο καρπός, βρίσκονται σε πλήρη σπαργή. Μεταξύ χυμοτοπίου και κυτταρικού τοιχώματος παρεμβάλλεται το πρωτόπλασμα, που αποτελεί πολύπλοκη ενεργεί ανάμειξη πρωτεϊνών, λιπαρών ουσιών και άλλων πολλών ανόργανων και οργανικών συστατικών (Μπαλατσούρας 1995).

Το ενδοκάρπιο αποτελεί το 10-30% του βάρους του καρπού και συγκροτείται από το ξυλώδες περίβλημα το οποίο περιέχει ένα (σπανίως δύο) σπέρματα, τα οποία με τη σειρά τους αποτελούν το 1-3% του βάρους του καρπού (Garrido-Fernández και συν. 1977). Ο πυρήνας εξωτερικά φέρει γλυφές (αυλάκια) που μπορούν να διευκολύνουν τη διάκριση των διαφόρων ποικιλιών. Το σπέρμα αποτελείται από την επιδερμίδα, το ενδοσπέρμιο, τις κοτυληδόνες και το έμβριο.

Θρεπτική και βιολογική αξία έχουν μόνο τα κύτταρα του μεσοκαρπίου, καθώς το επικάρπιο είναι άπεπτο και το ενδοκάρπιο απορρίπτεται κατά τη μάσηση. Όμως έχει αποδειχθεί εργαστηριακά (Fernandez-Diez 1960), ότι το σπέρμα της ελιάς είναι πηγή πρωτεϊνών και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρώτη ύλη για το διαχωρισμό τους υπό καθαρή μορφή. Άλλες έρευνες έδειξαν ότι το ξυλώδες περίβλημα του ενδοκαρπίου περιέχει σάκχαρα (π.χ. γλυκόζη, γαλακτόζη, μαννόζη, ξυλόζη και αραβινόζη), τα οποία μπορούν να αποτελέσουν υπόστρωμα για ζύμωση και παραγωγή αλκοόλης (Heredia-Moreno και συν. 1987). Τα κυριότερα συστατικά από βιολογικής και τεχνολογικής άποψης που υπάρχουν στον ελαιόκαρπο και πλέον συγκεκριμένα στο μεσοκάρπιο, σύμφωνα με τους Garrido-Fernández και συνεργάτες (1997) είναι τα παρακάτω: υγρασία 60-75%, λιπαρές ουσίες 10-25%, σάκχαρα 3,8-7,3%, πρωτεΐνες 1-2%, οργανικά οξέα και άλατα αυτών 0,5-1,0%, φαινολικές ουσίες 2-3%, πηκτίνες $\leq 0,6\%$, λοιπές ενώσεις 3-7%. Η περιεκτικότητα των ελιών σε αυτές τις ουσίες παραλλάσει ανάλογα με την ποικιλία, το βαθμό ωρίμανσης, τις καλλιεργητικές τεχνικές κ.λ.π. (Fernández-Diez 1983).

1.4 Μεταποίηση της επιτραπέζιας ελιάς

1.4.1 Ορισμός

Ως επιτραπέζια ελιά ορίζεται το προϊόν το οποίο λαμβάνεται από υγιείς ώριμους ή επαρκώς ώριμους καρπούς της καλλιεργούμενης ελιάς (*Olea europaea sativa*), οι οποίοι όταν υποστούν την κατάλληλη επεξεργασία σύμφωνα με τα διεθνή πρότυπα δίνουν ένα προϊόν εδώδιμο και καλά συντηρούμενο ώστε να είναι εμπορεύσιμο (Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου, IOOC 1980).

1.4.2 Εμπορικοί τύποι

Ο βασικός σκοπός των παραδοσιακών και σύγχρονων μεθόδων επεξεργασίας των επιτραπέζιων ελιών είναι η βελτίωση της συντήρησης και των οργανοληπτικών ιδιοτήτων του τελικού προϊόντος.

Σύμφωνα με το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου (IOOC 2004b), οι επιτραπέζιες ελιές διαχωρίζονται σε τρεις βασικές κατηγορίες, ανάλογα με το στάδιο ωριμότητάς τους, και σε πέντε κατηγορίες, ανάλογα με την επεξεργασία που έχουν υποστεί (Πίνακας 1.2).

Οι σημαντικότεροι τύποι επεξεργασμένων ελιών στο διεθνές εμπόριο είναι: α) πράσινες ελιές σε άλμη, γνωστές ως Ισπανικού τύπου β) τεχνητώς μαύρες ελιές σε άλμη, τύπου Καλιφόρνιας γ) φυσικές μαύρες ελιές σε άλμη, Ελληνικού τύπου (Fernandez-Diez 1985, Garrido-Fernandez και συν. 1997, Panagou και συν. 2008).

Πίνακας 1.2. Εμπορικοί τύποι επιτραπέζιων ελιών (IOOC, 2004b)

Σύμφωνα με το βαθμό ωριμότητας του καρπού
Πράσινες ελιές (Green olives)
Ελιές στο στάδιο αλλαγής χρώματος (Olives turning colour)
Μαύρες ελιές (Black olives)
Σύμφωνα με τον τρόπο μεταποίησης
Επεξεργασμένες (Treated olives)
Φυσικές (Natural olives)
Αφυδατωμένες και/ή ξεραμμένες (Dehydrated and/or shriveled olives)
Οξειδωμένες (Olives darkened by oxidation)
Ειδικές περιπτώσεις (Specialities)

Σε Εθνικό και τοπικό επίπεδο υπάρχουν πολλές παραλλαγές των βασικών μεθόδων επεξεργασίας για την παρασκευή των διαφόρων τύπων επιτραπέζιων ελιών. Σύμφωνα με το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου (1980) οι διαφορετικές αυτές μέθοδοι ομαδοποιούνται σε διάφορους εμπορικούς τύπους, η ονομασία των οποίων περιλαμβάνει πληροφορίες για την κατάσταση της πρώτης ύλης (π.χ. πράσινος, μαύρος καρπός) και την διαδικασία που ακολουθήθηκε για την εκπίκρυνση του καρπού (επεξεργασία με αλκάλι ή απευθείας εμβάπτιση σε άλμη). Οι κυριότεροι από αυτούς για την Ελλάδα είναι οι εξής :

- Πράσινες ελιές σε άλμη (Πράσινες ελιές Ισπανικού τύπου). Οι καρποί συλλέγονται όταν είναι πράσινοι, έχουν αποκτήσει το κανονικό τους μέγεθος, είναι συνεκτικοί και υγιείς, και υφίστανται εκπίκρυνση με τη χρήση αραιού διαλύματος NaOH (2-3%) έτσι ώστε να γίνει απομάκρυνση των πολυφαινολών και να αυξηθεί η διαπερατότητα του κυτταρικού τοιχώματος. Στην συνέχεια ακολουθεί έκπλυση με νερό για να απομακρυνθεί το αλκάλι και ακολούθως οι καρποί εμβαπτίζονται σε άλμη όπου λαμβάνει χώρα η γαλακτική ζύμωση. Εάν η ζύμωση δεν ολοκληρωθεί, η συντήρηση του προϊόντος γίνεται με θερμική επεξεργασία ή προσθήκη συντηρητικών ουσιών. Το χρώμα του καρπού ποικίλει από φυσικό πράσινο μέχρι κίτρινο.
- Φυσικές πράσινες ελιές σε άλμη. Τοποθετούνται απευθείας σε άλμη όπου λαμβάνει χώρα η γαλακτική ζύμωση (δεν γίνεται εκπίκρυνση με NaOH).
- Φυσικές μαύρες ελιές σε άλμη. Είναι το προϊόν που προέρχεται από συνεκτικούς καρπούς που συλλέγονται στο στάδιο πλήρους ωριμότητας (ή λίγο πριν). Τοποθετούνται απευθείας σε άλμη, όπου και υφίστανται μερική ή ολική γαλακτική ζύμωση. Το τελικό προϊόν έχει χρώμα που ποικίλει από καστανό έως μαύρο.
- Φυσικές μαύρες ελιές τύπου ξηράλατος. Είναι το προϊόν που προέρχεται από καρπούς που συγκομίζονται στο στάδιο της πλήρους ωριμότητας (ή υπερ-ωριμότητας) με αποτέλεσμα να είναι μερικώς αφυδατωμένες, με μεταβολές στην υφή, το χρώμα και τη γεύση. Αρχικά ο καρπός εκπλένεται με νερό υπό πίεση και στη συνέχεια στρωματώνεται απευθείας με χονδρόκοκκο αλάτι υπό μορφή εναλλασσόμενων στρωμάτων. Η ποσότητα αλατιού που προστίθεται ανέρχεται περίπου στο 10-15% του βάρους του καρπού. Το αλάτι ενεργεί ως αφυδατικός παράγοντας και

απομακρύνει από τον ελαιόκαρπο τα υγρά του, με αποτέλεσμα το τελικό προϊόν να είναι συρρικνωμένο, να χάνει την πικρή ουσία του, να είναι αρκετά αλμυρό, να έχει μεγαλύτερη θρεπτική αξία από τον ελαιόκαρπο σε άλμη και να συντηρείται εκτός άλμης. Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος βελτιώνονται με κάλυψη της επιφάνειας του καρπού με ελαιόλαδο στο οποίο είναι δυνατόν να προστίθενται αρωματικά φυτά.

- Γσακιστές ελιές. Είναι το προϊόν που προέρχεται από ολόκληρες ελιές, συνήθως πράσινες ή στο στάδιο αλλαγής του χρώματος. Οι καρποί διαρρηγνύονται χωρίς να σπάσει ο πυρήνας. Στη συνέχεια επεξεργάζονται με ελαφρύ διάλυμα αλκάλειας και εμβαπτίζονται σε άλμη όπου υφίστανται γαλακτική ζύμωση. Οι ελιές αυτές διατηρούνται εντός άλμης και μπορούν να εμπλουτιστούν γευστικά με προσθήκη ξυδιού και διαφόρων αρωματικών φυτών στην άλμη (τεμάχια λεμονιού, ρίγανης, θυμαριού, μάραθου κ.τ.λ.).

- Χαρακτές ελιές. Ο καρπός συλλέγεται πράσινος ή μαύρος, χαράσσεται κατά μήκος του μεγάλου άξονά του, και τοποθετείται σε άλμη όπου υφίσταται γαλακτική ζύμωση. Οι ελιές αυτές διατηρούνται εντός άλμης και εμπλουτίζονται γευστικά με προσθήκη ξυδιού και αρωματικών φυτών.

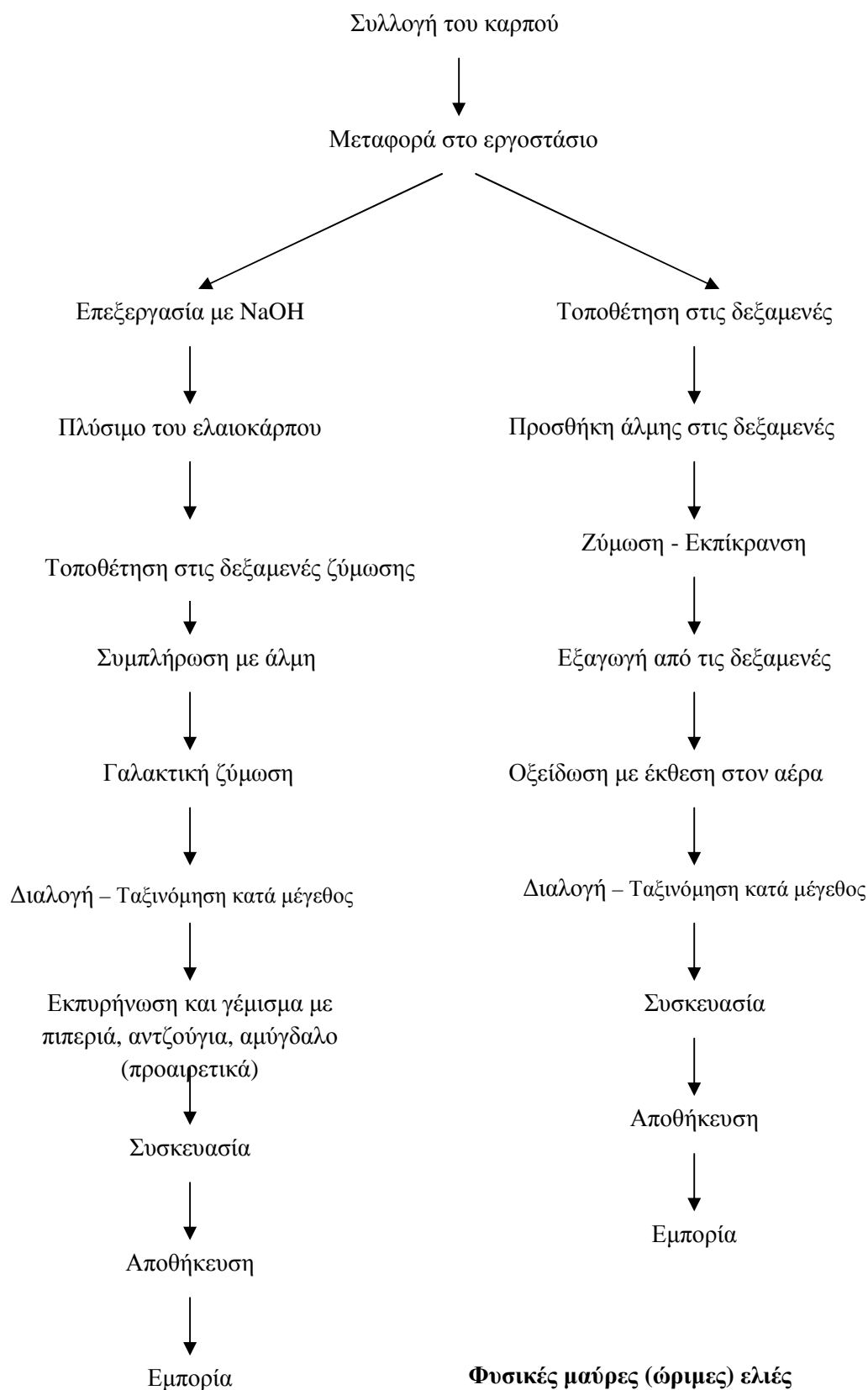
1.4.3 Φυσικές μαύρες ελιές σε άλμη

Οι Ελληνικού τύπου φυσικές μαύρες ελιές σε άλμη (Greek style naturally black olives) υπολογίζεται ότι καταλαμβάνουν το 30% περίπου της παγκόσμιας παραγωγής επιτραπέζιας ελιάς (Piga και συν. 2001). Τα διάφορα στάδια επεξεργασίας παρουσιάζονται στο Σχήμα 1.1.

Ο ελαιόκαρπος συγκομίζεται στο στάδιο της πλήρους ωριμότητας ή λίγο πριν από αυτό, από τα μέσα Οκτωβρίου έως τα τέλη Δεκεμβρίου. 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 εμβαπτίζεται σε άλμη περιεκτικότητας 8-10% (NaCl), όπου υφίσταται ζύμωση από μια μικτή χλωρίδα αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, γαλακτικών βακτηρίων και ζυμών (Balatsouras 1967, 1969, 1990, 1995, Borcakli και συν. 1993, Durán Quintána και Gonzáles Cancho 1973, Gonzáles Cancho και συν. 1975, Fernández Diez και συν. 1985, Nychas και συν. 2002, Tassou και συν. 2002). 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 από 6-7% έως 4-5%, κατά τους χειμερινούς μήνες. Κατά την διάρκεια της ζύμωσης οι συνθήκες που επικρατούν είναι αναερόβιες και εμποδίζουν την ανάπτυξη αερόβιων βακτηρίων, ζυμών και μυκήτων στην επιφάνεια των δεξαμενών. 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) (Aligisakis 1971, Özay και Borcaklı 1996, Tassou και συν. 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, Borcaklı και συν. 1993, Tassou και συν. 2002). Η διαδικασία της ζύμωσης ολοκληρώνεται μέσα σε χρονικό διάστημα 6-9 μηνών.

Στις συνθήκες που επικρατούν στα Ελληνικά εργοστάσια η ζύμωση ολοκληρώνεται κατά τα μέσα Ιουνίου-Ιουλίου. 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 500g μέχρι 2kg. 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).



Πράσινες ελιές Ισπανικού τύπου

Σχήμα 1.1. Διάγραμμα επεξεργασίας πράσινης και φυσικώς ώριμης επιτραπέζιας ελιάς (Μπαλατσούρας 1995, Garrido Fernández και συν. 1997).

1.4.4 Μικροβιολογία της ζύμωσης.

Τα διακριτά στάδια της ζύμωσης της επιτραπέζιας ελιάς είναι τρία : 1) το προκαταρκτικό, 2) το ενδιάμεσο, και 3) το τελικό (Tassou 1993, Garrido Fernández 1997).

1.4.4.1 Προκαταρκτικό στάδιο

Το προκαταρκτικό στάδιο διαρκεί 7–14 μέρες και με επικρατώντες μικροοργανισμούς τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια (*Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp., *Flavobacterium* spp.) και τα εντεροβακτήρια (*Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp.), τα οποία αποτελούν και την κυρίαρχη ενδογενή χλωρίδα του καρπού (González Cancho 1960, Fernández Diez και συν. 1985, Tassou 1993). Όπως έχει προαναφερθεί υπάρχει κίνδυνος εκτροπής της ζύμωσης, εξαιτίας των βακτηρίων αυτών και πρόκληση αεριοπάθησης, μιας σοβαρής ασθένειας που προσδίδει अपαράδεκτα γευστικά χαρακτηριστικά στο προϊόν (Bordolla y Alcalá και συν. 1959, 1960). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η ύπαρξη στο προκαταρκτικό στάδιο ορισμένων θετικών κατά Gram βακτηρίων, όπως το *Clostridium butyricum*, το οποίο μπορεί να προκαλέσει βουτυρική ζύμωση, καθώς επίσης και του *Bacillus* spp. το οποίο σχετίζεται με την παραγωγή των πηκτινολυτικών ενζύμων που ευθύνονται για την υποβάθμιση της υφής του καρπού (Nortje και Vaughn 1953). Όμως μετά την πάροδο των 2-3 πρώτων ημερών, ο πληθυσμός των μικροοργανισμών αυτών παρουσιάζει σταδιακή μείωση, ενώ μετά από 10-14 ημέρες δεν καταμετρούνται πλέον στην άλμη. Μια άλλη ομάδα μικροοργανισμών που κάνει την εμφάνισή της προς το τέλος του προκαταρκτικού σταδίου είναι τα γαλακτικά βακτήρια που ανήκουν κυρίως στα γένη *Leuconostoc*, *Pediococcus*, και *Lactococcus* (González Cancho και Duran Quintána 1981, Harris 1998). Κατά το τέλος του σταδίου αυτού κυριαρχεί ο *Leuconostoc dextranicum* (Vaughn και συν. 1969). Στο στάδιο αυτό αποκαθίσταται σταδιακά το ισοζύγιο κατανομής των συστατικών μεταξύ σάρκας και άλμης.

1.4.4.2 Ενδιάμεσο στάδιο.

Το ενδιάμεσο στάδιο διαρκεί 2-3 εβδομάδες. Εάν η ζύμωση εξελιχθεί φυσιολογικά σε αυτό επικρατούν τα γαλακτικά βακτήρια και ιδιαίτερα οι κόκκοι που ανήκουν στα γένη *Leuconostoc* (ετεροζυμωτικός) και *Pediococcus* (ομοζυμωτικός) (González Cancho και Duran Quintána, 1981). Παρατηρείται μια σταδιακή αύξηση της οξύτητας

της άλμης και μείωση του pH, ώστε να δημιουργηθεί περιβάλλον κατάλληλο για την ανάπτυξη των γαλακτοβακίλλων. Τα γαλακτικά βακτήρια του γένους *Leuconostoc* ελαττώνονται προς το τέλος του ενδιάμεσου σταδίου, ενώ σταδιακά εμφανίζεται ο *Lactobacillus plantarum*. Εάν το στάδιο αυτό διαρκέσει περισσότερες από 20-25 ημέρες υπάρχει μεγάλη πιθανότητα εκτροπής της ζύμωσης (Garrido Fernández και συν. 1997).

1.4.4.3 Τελικό στάδιο.

Ο *Lactobacillus plantarum*, ο *L. brevis*, ο *L. bucheri* και σε μικρότερους πληθυσμούς ο *L. fermentum*, αποτελούν την κυρίαρχη χλωρίδα στο στάδιο αυτό (Tassou 1993). Όταν τα ζυμώσιμα συστατικά στην άλμη εξαντληθούν, το στάδιο αυτό ολοκληρώνεται, η τιμή του pH διαμορφώνεται σε 3,8-3,9 και η ογκομετρούμενη οξύτητα σε 0,8-1% (w/v) ή και περισσότερο. Εκτός από τα γαλακτικά βακτήρια, έχει αναφερθεί και η ύπαρξη ζυμών, οι οποίες ανήκουν στα γένη *Candida*, *Hansenula*, *Pichia*, *Saccharomyces Deharyomyces*, *Rhodotorule*, *Kluyveromyces* (Marquina και συν. 1992, Garrido Fernández και συν. 1997). Μέχρι σήμερα οι πληροφορίες που έχουμε για τον ρόλο των ζυμών στη ζύμωση της επιτραπέζιας ελιάς είναι ανεπαρκής. Σύμφωνα όμως με παλαιότερη έρευνα (Fleming και συν. 1969) πιστεύεται ότι συμβάλουν με την παραγωγή πτητικών ουσιών, κυρίως αιθανόλης και ακεταλδεύδης, στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος και κυρίως την οσμή.

Σε μελέτες Ισπανών ερευνητών (Borbolla y Alcalá και συν. 1975, Rejano-Navarro και συν. 1978, González Cancho και συν. 1980, Garrido Fernández και συν. 1997) αναφέρεται και ένα τέταρτο διακριτό στάδιο που διαρκεί από τη στιγμή που θα ολοκληρωθεί η γαλακτική ζύμωση και για όσο χρόνο παραμείνουν οι ελιές στις δεξαμενές. Στο στάδιο αυτό παρατηρείται μικρή αύξηση του pH της άλμης κατά 0,1-0,2 μονάδες και μείωση της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέος. Στο στάδιο αυτό ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρουσία, εκτός των γαλακτικών βακτηρίων και των ζυμών, των μικροοργανισμών που ανήκουν στο γένος *Propionibacterium*. Ο πληθυσμός τους θα πρέπει να ελεγχθεί έγκαιρα για να αποφευχθεί η προπιονική ζύμωση που μπορεί να προκαλέσει, σε βάρος της γαλακτικής ζύμωσης. Τα τελικά προϊόντα που σχηματίζονται σε αυτή την περίπτωση είναι προπιονικό και οξικό οξύ (Plastourgos και Vaughn 1957), τα οποία υποβαθμίζουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος προσδίδοντας οσμή βουτύρου στις ελιές. Η

ανάπτυξη των εν λόγω βακτηρίων μπορεί να ανασταλεί πλήρως με σταδιακή αύξηση της αλατοπεριεκτικότητας της άλμης στο 8,5-9,5% σε συνδυασμό με τιμές pH στην άλμη μικρότερες από 4.

1.4.4.4 Έλεγχος της ζύμωσης.

Οι σημαντικότεροι παράγοντες που ευθύνονται για την επιτυχία της ζύμωσης των επιτραπέζιων ελιών είναι οι: α) ενδογενείς, όπως το pH, η ενεργότητα του νερού, η διαθεσιμότητα θρεπτικών στοιχείων, τα οργανικά οξέα, η δομή της επιδερμίδας του καρπού, η παρουσία αντιμικροβιακών ουσιών (π.χ. ελευπωπαΐνη) και β) εξωγενείς, όπως η θερμοκρασία της ζύμωσης, η αλατοπεριεκτικότητα, η προσθήκη ζυμώσιμων συστατικών, η χρήση καλλιεργειών εκκίνησης (Bobillo και Marshall 1991, 1992, Garcia Garcia και συν. 1992, Fernández González και συν. 1993, Duran Quintána και συν. 1999, Spyropoulou και Nychas 1999, Spyropoulou και συν. 2001). Ο έλεγχος των παραμέτρων αυτών καθορίζει τη σύνθεση και τον πληθυσμό της μικροβιακής χλωρίδας, επιλέγει τις διαφορετικές ομάδες μικροοργανισμών που κατευθύνουν τη ζύμωση και επηρεάζει τη σύνθεση των μεταβολικών προϊόντων των μικροοργανισμών (Panagou και συν. 2008)

- Ο σημαντικότερος παράγοντας ελέγχου της πορείας της ζύμωσης είναι η διατήρηση της θερμοκρασίας σε επίπεδα στα οποία τα γαλακτικά βακτήρια εμφανίζουν τη μέγιστη δραστηριότητά τους (20-25°C). Ο έλεγχος της θερμοκρασίας δεν αποτελεί ιδιαίτερο πρόβλημα για τις πράσινες ελιές που συγκομίζονται νωρίς το φθινόπωρο και ζυμώνονται σε περίοδο που οι θερμοκρασίες στις περισσότερες περιοχές της Ελλάδας είναι ήδη αρκετά υψηλές (15-20°C). Αντίθετα, η ζύμωση της φυσικής μαύρης ελιάς διακόπτεται από τις χαμηλές θερμοκρασίες του χειμώνα (αφού συγκομίζεται Νοέμβριο-Δεκέμβριο) και αρχίζει εκ νέου την άνοιξη.

- Όπως προαναφέρθηκε, η αλατοπεριεκτικότητα της άλμης που αρχικά κυμαίνεται στο 6-10% μειώνεται σημαντικά, περίπου στο μισό, όταν αποκατασταθεί το ισοζύγιο μεταξύ σάρκας του καρπού και άλμης. Για να αποφευχθεί η εκτροπή της ζύμωσης και η παρεπόμενη δημιουργία ασθενειών από τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια, τα οποία είναι δυνατόν να επικρατήσουν σε χαμηλές συγκεντρώσεις άλατος, είναι απαραίτητη η συμπλήρωση της άλμης σε τακτά χρονικά διαστήματα με χονδρό αλάτι, ώστε

η συγκέντρωση του NaCl να επανέλθει στο αρχικό επίπεδο (Borbolla y Alcalá και συν. 1975, Rejano Navarro και συν. 1978, González Cancho και συν. 1980).

- Ένας τρόπος να παρεμποδιστεί η δράση των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, τα οποία επικρατούν στο προκαταρκτικό στάδιο της ζύμωσης, είναι η μείωση της αρχικής τιμής του pH σε 4,0-4,5 με οξίνιση της άλμης. Η οξίνιση της άλμης γίνεται τη στιγμή που οι ελιές εμβαπτίζονται σε αυτή, με χρήση γαλακτικού οξέως του εμπορίου ή οξικού ή υδροχλωρικού οξέος που είναι κατάλληλα για τρόφιμα. Σκοπός του χειρισμού είναι η μείωση της διάρκειας του προκαταρκτικού σταδίου στο ελάχιστο, δημιουργώντας ευνοϊκό περιβάλλον για την επικράτηση των γαλακτικών βακτηρίων (Duran Quintána και συν. 1991, 1994, García García και συν. 1992, Fernández González και συν. 1993, Garrido Fernández και συν. 1997).

- Ο εμβολιασμός της άλμης με καλλιέργειες εκκινητές 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. Έτσι έχουν προκύψει πολλές δυσκολίες που αναφέρονται στην επιλογή των κατάλληλων στελεχών γαλακτικών βακτηρίων, στην έλλειψη ζυμώσιμων συστατικών, αμινοξέων και βιταμινών, στην αλατοπεριεκτικότητα της άλμης, στη θερμοκρασία της ζύμωσης, στο pH της άλμης, στην παρουσία παρεμποδιστικών ουσιών (π.χ. φαινολικές ουσίες) (Ruiz-Barba και Jiménez-Díaz 1994, Garrido-Fernández και συν. 1997, Montaña και συν. 2000, Fleming και McFeeters 2001). Για το λόγο αυτό δεν εφαρμόζεται ευρύτατα σε βιομηχανική κλίμακα, αλλά παραμένει σε πειραματικό στάδιο (Buckenhüskes 1993, Holzapfel 2001). Ο *Lactobacillus plantarum* και ο *Lactobacillus pentosus* είναι τα γαλακτικά βακτήρια που είναι κυρίως υπεύθυνα για τη ζύμωση της επιτραπέζιας ελιάς και για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται σήμερα για τη δημιουργία καλλιεργειών εκκίνησης (Borbolla y Alcalá & Rejano Navarro 1979, Vaughn 1982, Van den Berg & συν. 1993). Τα στελέχη κυκλοφορούν στο εμπόριο σε λυοφιλωμένη μορφή οπότε 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 και συν. 2001). Ανεξαρτήτως της σύστασης του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας, η προσθήκη σε αυτό αλατιού σε περιεκτικότητα 4,5% είναι απαραίτητη έτσι ώστε η καλλιέργεια εκκίνησης να προσαρμοστεί καλύτερα στο περιβάλλον της άλμης (Garrido Fernández και συν. 1997, Sánchez και συν. 2001). Έως σήμερα η επιλογή των καθαρών καλλιεργειών γαλακτικών βακτηρίων βασιζόταν αποκλειστικά στην παραγωγή γαλακτικού οξέος (Holzapfel 2001, Sánchez και συνεργάτες 2001). Νεώτερες όμως έρευνες έχουν δείξει ότι ορισμένα στελέχη διαθέτουν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά, όπως η ικανότητα διάσπασης της ελευρωπαϊνης (Ciafardini και συν. 1994), η παραγωγή των βακτηριοσινών (Ruiz-Barba και συν. 1994) και η ικανότητα ζύμωσης σε χαμηλές θερμοκρασίες (Duran-Quintana και συν. 1999). Τα χαρακτηριστικά αυτά δημιουργούν νέους ορίζοντες στις βιομηχανίες μεταποίησης της επιτραπέζιας ελιάς και αναμένεται να οδηγήσουν σε ασφαλέστερα, περισσότερο φυσικά και μεγαλύτερης διατροφικής αξίας προϊόντα (Panagou και συν. 2008).

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Φυσική ζύμωση ελαιοκάρπου Κονσερβολιάς

2.1.1 Χειρισμός του καρπού πριν τη ζύμωση

Φυσικές μαύρες ελιές ποικιλίας ‘Κονσερβολιά’, συγκομίστηκαν στην περιοχή της Στυλίδας το πρώτο δεκαπενθήμερο του Νοεμβρίου 2009 και εστάλησαν εντός 24 ωρών στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών μέσα σε πλαστικά δοχεία χωρητικότητας 25 Kg. Μετά την άφιξή τους στο εργαστήριο, ο καρπός πλύθηκε με άφθονο νερό υπό πίεση, προκειμένου να απομακρυνθούν οι ξένες ύλες. Στη συνέχεια ακολούθησε ποιοτική διαλογή των καρπών για να απομακρυνθούν οι ελαττωματικοί, οι μικρού μεγέθους, οι κτυπημένοι και οι προσβεβλημένοι από έντομα.

2.1.2 Ζύμωση

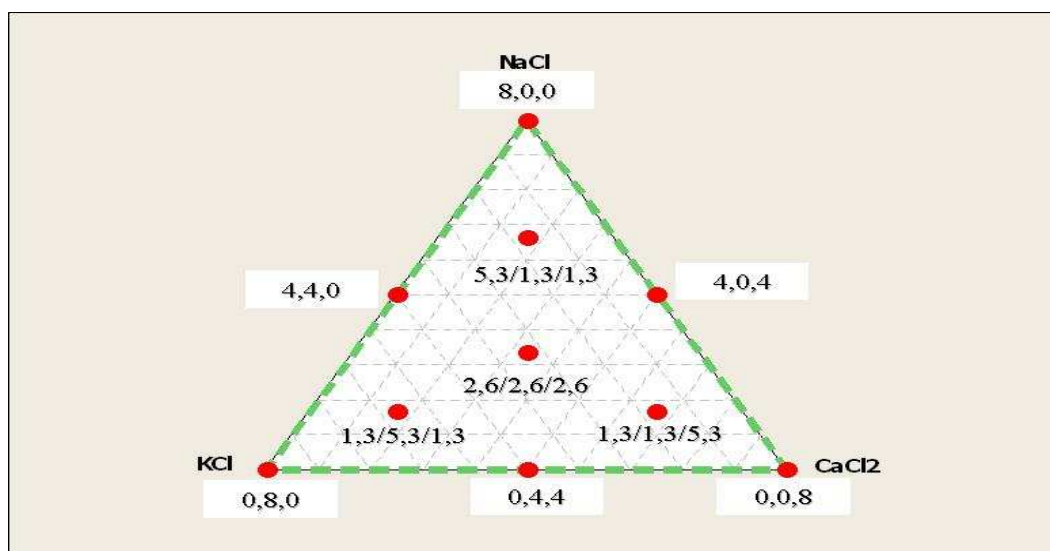
Οι ελιές τοποθετήθηκαν σε πλαστικά δοχεία συνολικής χωρητικότητας 3,0 λίτρων. Κάθε δοχείο περιείχε 2 Kg καρπού και 1 περίπου λίτρο φρέσκιας άλμης. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε οξίνιση της αρχικής άλμης με γαλακτικό οξύ (καθαρότητας 95%) σε αναλογία 2% επί του όγκου της άλμης. Στη συνέχεια, τα δοχεία τοποθετήθηκαν σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας 20 °C όπου παρέμειναν για όλη τη διάρκεια της ενεργού ζύμωσης, δηλαδή ένα χρονικό διάστημα περίπου 60 ημερών. Για να αποφευχθεί η δημιουργία μεμβράνης στην επιφάνεια της άλμης, η οποία οφείλεται στην ανάπτυξη οξειδωτικών μικροοργανισμών (βακτηρίων, ζυμών, μυκήτων), προστέθηκαν επιφανειακά 2-3 cm παραφινέλαιο εσωτερικής χρήσης προκειμένου να εξασφαλιστούν αναερόβιες συνθήκες κατά τη ζύμωση.

Για τη μελέτη της πλήρους ή μερικής υποκατάστασης του χλωριούχου νατρίου από χλωριούχο κάλιο και χλωριούχο ασβέστιο παρασκευάστηκαν διαφορετικές άλμες διαφορετικής συγκέντρωσης στα τρία άλατα, όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.1. Ο πειραματικός σχεδιασμός πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του στατιστικού πακέτου Minitab έκδοση 14.0 και βασίστηκε στο ενισχυμένο διάπλεγμα Simplex 2⁰⁰ βαθμού (augmented Simplex lattice design, Σχήμα 2.1) που περιλάμβανε 14 πειραματικές ζυμώσεις (οι 4 από αυτές ήταν επαναλήψεις κάποιων περιπτώσεων μίξης αλάτων, γι’ αυτό και στην παρούσα μελέτη θα αναφερθούν μόνο οι 10 πειραματικές ζυμώσεις). Η συνολική περιεκτικότητα της άλμης στα τρία άλατα ήταν $\text{NaCl} + \text{KCl} + \text{CaCl}_2 = 8 \%$ (w/v) (που ισοδυναμεί με 80 g/L άλμης). Η συγκέντρωση

αυτή επιλέχθηκε με σκοπό η τελική περιεκτικότητα της άλμης σε άλατα στην ισορροπία να διαμορφωθεί σε 4.0-4.5 % (w/v).

Πίνακας 2.1: Συγκεντρώσεις (%) χλωριούχου νατρίου (NaCl), χλωριούχου καλίου (KCl) και χλωριούχου ασβεστίου (CaCl₂) που χρησιμοποιήθηκαν στις διαφορετικές ζυμώσεις της φυσικής μαύρης ελιάς που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Η συνολική συγκέντρωση των τριών αλάτων δεν υπερβαίνει το 8% (NaCl + KCl + CaCl₂ = 8 %), με μέγιστη συγκέντρωση κάθε μεμονωμένου αλάτος ≤ 8 %.

Αριθμός ζύμωσης	NaCl (%)	KCl (%)	CaCl ₂ (%)
1	8	0	0
2	4	4	0
3	4	0	4
4	0	8	0
5	0	4	4
6	0	0	8
7	2.66	2.66	2.66
8	5.33	1.33	1.33
9	1.33	5.33	1.33
10	1.33	1.33	5.33



Σχήμα 2.1. Ενισχυμένο διάπλεγμα Simplex 2^{ου} βαθμού που χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη μιγμάτων αλάτων στη ζύμωση της φυσικής μαύρης ελιάς ποικιλίας «Κονσερβολιά».

2.2 Μικροβιολογικές αναλύσεις

Η μικροβιολογική ανάλυση των δειγμάτων έγινε με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων. Συγκεκριμένα, ελήφθηκε ασηπτικά 1ml άλμης από κάθε δοχείο ζύμωσης και ακολούθησε η διαδικασία των διαδοχικών αραιώσεων με μεταφορά 1ml δείγματος προηγούμενης αραιώσης σε 9 ml ορρού Ringer. Οι κατάλληλες ανά περίπτωση δεκαδικές αραιώσεις χρησιμοποιούνταν για τον εμβολιασμό μιας τριπλής σειράς τρυβλίων για κάθε χρησιμοποιούμενο μικροβιολογικό υπόστρωμα. Οι κατηγορίες των μικροοργανισμών που προσδιορίστηκαν και ανήκουν στην αυτόχθονη μικροβιακή χλωρίδα ήταν οι ακόλουθες :

- ο **Εντεροβακτήρια** : Ποσότητα 1ml από σειρά διαδοχικών αραιώσεων ομογενοποιημένου δείγματος, εμβολιάστηκε με την τεχνική της ενσωμάτωσης στο επιλεκτικό υπόστρωμα Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA, Biolife). Ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία 37 °C για 24 ώρες και απαρίθμηση όλων των μεγάλων αποικιών (>0,5mm) που παρουσίαζαν ιώδη χρωματισμό.

- ο **Γαλακτικά βακτήρια** : καταμετρήθηκαν με την τεχνική της ενσωμάτωσης στο υπόστρωμα de Man-Rogosa-Sharp (MRS, Biolife), με επώαση σε θερμοκρασία 30 °C για 3 έως 5 ημέρες. Όπως και στην περίπτωση των εντεροβακτηρίων χρησιμοποιήθηκε ποσότητα 1ml από σειρά διαδοχικών αραιώσεων του ομογενοποιημένου δείγματος.

- ο **Ζύμες** : Ποσότητα 0,1 ml από σειρά διαδοχικών αραιώσεων του ομογενοποιημένου δείγματος εμβολιάστηκε με την τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης στο επιλεκτικό υπόστρωμα Rose Bengal Agar (RBC, LAB M) και την προσθήκη του αντιβιοτικού Chloramphenicol (LAB M). Ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία 25 °C για 2 έως 3 ημέρες.

Για τον υπολογισμό του τελικού πληθυσμού των μικροοργανισμών χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος των τριών επαναλήψεων από κάθε αραιώση. Η επιλογή του κατάλληλου τρυβλίου για καταμέτρηση έγινε σύμφωνα με τον αριθμό των αποικιών που αναπτύχθηκαν σε αυτό. Τα τρυβλία που επιλέχθηκαν είχαν περισσότερες από 30 και λιγότερες από 300 αποικίες (Maynel και Meynel 1970).

Στην περίπτωση που δύο αραιώσεις έδιναν κατάλληλο αριθμό αποικιών, τότε επιλέγονταν αυτή με τον μεγαλύτερο αριθμό αποικιών. Για τον υπολογισμό του τελικού πληθυσμού των μικροοργανισμών ανά ml άλμης, ο μέσος όρος του αριθμού των αποικιών πολλαπλασιάστηκε με την αραιώση που χρησιμοποιήθηκε.

2.3 Φυσικοχημικές αναλύσεις

2.3.1 Προσδιορισμός τιμής pH στην άλμη

Η τιμή του pH της άλμης κατά τη διάρκεια της ζύμωσης μετρήθηκε με ψηφιακό πεχάμετρο Orion EA 940 (Orion Research Inc., Boston, USA). Συγκεκριμένα, σε κάθε δειγματοληψία, λαμβάνονταν ο μέσος όρος τριών τιμών pH για κάθε δείγμα άλμης.

2.3.2 Προσδιορισμός ογκομετρούμενης οξύτητας στην άλμη

Ο προσδιορισμός της ογκομετρούμενης οξύτητας έγινε με τιτλοδότηση της άλμης με 0,1 N NaOH χρησιμοποιώντας ως δείκτη φαινολοφθαλείνη 1% (w/v). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε g γαλακτικού οξέος /100 ml άλμης.

2.3.3 Προσδιορισμός ενεργότητας ύδατος της άλμης

Ο προσδιορισμός της ενεργότητας ύδατος της άλμης πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια συσκευής μέτρησης ενεργότητας Hygrolab 3 (Rotronic, Ettlingen, Germany). Οι μετρήσεις ελήφθησαν μετά από την παραμονή του υπό εξέταση δείγματος σε ειδική κυψελίδα της συσκευής, σε σταθερή θερμοκρασία 20°C μέχρι τη σταθεροποίηση της ένδειξης του οργάνου. Για κάθε δείγμα ελήφθη ο μέσος όρος από τρεις επαναλήψεις.

2.3.4 Προσδιορισμός ιόντων νατρίου, καλίου και ασβεστίου στη σάρκα του ελαιοκάρπου

Ο προσδιορισμός των ιόντων νατρίου, καλίου και ασβεστίου στη σάρκα του ελαιοκάρπου έγινε με φλογοφωτόμετρο (Microprocessor flame photometer, Model 1382, Intech), αφού πρώτα πραγματοποιήθηκε η υποβοηθούμενη από μικροκύματα χώνευση των δειγμάτων (MARS). Το πρόγραμμα που ακολουθήθηκε παρουσιάζεται

στον Πίνακα 2.2. Για την προετοιμασία των δειγμάτων ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα. Αρχικά η σάρκα κόπηκε σε μικρά κομμάτια με πλαστικό μαχαίρι, το οποίο πριν τη χρήση του είχε ξεπλυθεί με 15% HNO₃ (Merck, Darmstadt, Germany) και υπερκαθαρό δισαπεσταγμένο νερό. Στη συνέχεια τα κομματάκια της ελιάς συσκευάστηκαν σε περιέκτη πολυπροπυλενίου και αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη σε θερμοκρασία -20°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν. Από κάθε δείγμα 0,5g ζυγίστηκαν σε ζυγό ακριβείας και μεταφέρθηκαν στον ειδικό περιέκτη της συσκευής μικροκυμάτων (x-press vessels) στον οποίο ακολούθως προστέθηκαν 5ml από 65% HNO₃ και 1ml από 30% H₂O₂ (Merck). Μετά τη χώνευση σε μικροκύματα, το περιεχόμενο μεταφέρθηκε ποσοτικά με υπερκαθαρό δισαπεσταγμένο νερό σε δοχείο πολυπροπυλενίου και ο τελικός τους όγκος ρυθμίστηκε στα 25 ml. Όλα τα δείγματα αραιώθηκαν με τον τρόπο αυτό πριν την ανάλυσή τους με φλογοφωτόμετρο (Microprocessor flame photometer, Model 1382, Intech). Πριν τον προσδιορισμό των ιόντων Na⁺, K⁺ και Ca²⁺ έγινε βαθμονόμηση του οργάνου με πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεων 0, 30 και 50 ppm για κάθε ένα από αυτά.

Πίνακας 2.2. Πρόγραμμα Χώνευσης με Μικροκύματα

Step	Power (W)	Ramp (min)	Hold (min)
1	260	1	4
2	0	1	4
3	400	5	7
4	720	1	6
5	360	1	5

Θερμοκρασία: 200°C

Για την αποφυγή επιμόλυνσης των δειγμάτων όλα τα υλικά PTFE (Teflon vessels, πιπέτες, κλπ.) πριν από κάθε χρήση ξεπλένονταν προσεκτικά με φρέσκο διάλυμα 15% HNO₃.

2.3.5 Προσδιορισμός οργανικών οξέων

Η ανάλυση των οργανικών οξέων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης (HPLC). Δείγματα για τις φυσικοχημικές αναλύσεις ελήφθησαν σε όλη τη διάρκεια της ζύμωσης. Συγκεκριμένα, ποσότητα άλμης (1ml) προστέθηκε σε 9ml δισαπεσταγμένο νερό (αραίωση 1:10) και το δείγμα αναδεύτηκε και καθαρίστηκε με τη βοήθεια φίλτρων Millipore διαμέτρου 0,22 μm (Millipore GmbH, Eschborn, Germany). Ο χρωματογράφος αποτελείται από μια

αντλία Jasco PU-980 Intelligent pump (Jasco Corp., Tokyo, Japan) και έναν ανιχνευτή μεταβλητού μήκους κύματος Jasco MD-910 (Jasco Corp., Tokyo, Japan). Η βαλβίδα εισαγωγής του δείγματος ήταν συνδεδεμένη με υποδοχή όγκου 20 μl. Το σύστημα ήταν εφοδιασμένο με κατάλληλο λογισμικό πρόγραμμα σε H/Y που καταγράφει το σήμα από τον ανιχνευτή.

Το δείγμα εκλούστηκε ισοκρατικά σε θερμοκρασία 65°C με διάλυμα 0,009 N H₂SO₄ μέσω στήλης Aminex HPX-87H (300 x 7.8 mm, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA), με ταχύτητα ροής 0,7 ml/min. Για την παρασκευή του διαλύτη έκλουσης χρησιμοποιήθηκε δισαπασταγμένο νερό. Ο ανιχνευτής ήταν ρυθμισμένος και ολοκλήρωνε σε μήκος κύματος 210 nm. Αυτό επιλέχθηκε ως το πλέον καταλληλότερο για τον προσδιορισμό των οργανικών οξέων. Ο συνολικός χρόνος της ανάλυσης ήταν 45 min.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των οργανικών οξέων έγινε με τη μέθοδο των καμπυλών βαθμονόμησης με εξωτερικά πρότυπα. Για τον σκοπό αυτό, ποικίλα διαλύματα οργανικών οξέων αναφοράς (κιτρικό, γαλακτικό, οξικό, μηλικό, ηλεκτρικό, φορμικό) αναλύθηκαν με το ίδιο πρόγραμμα και προσδιορίστηκε ο χρόνος κατακράτησης κάθε οργανικού οξέος μαζί με το εμβαδόν της επιφάνειας που προκύπτει από την ολοκλήρωση της αντίστοιχης κορυφής στο χρωματογράφημα. Για τη δημιουργία των πρότυπων καμπυλών βαθμονόμησης χρησιμοποιήθηκαν πέντε διαλύματα αναφοράς των παραπάνω οξέων σε τελικές συγκεντρώσεις 0,1%, 1% και 10%. Τα αποτελέσματα υποβλήθηκαν σε ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης που περιγράφεται από την εξίσωση: $Y = \alpha + \beta \cdot X$ (όπου Y, η ζητούμενη συγκέντρωση του οξέος, και X, το εμβαδόν της επιφάνειας της εκάστοτε κορυφής που αναλύθηκε στην HPLC). Ο συντελεστής συσχέτισης για κάθε καμπύλη κυμάνθηκε από 0,95-0,99, ενώ η ακρίβεια των αποτελεσμάτων ήταν πάντα καλύτερη από ±5%.

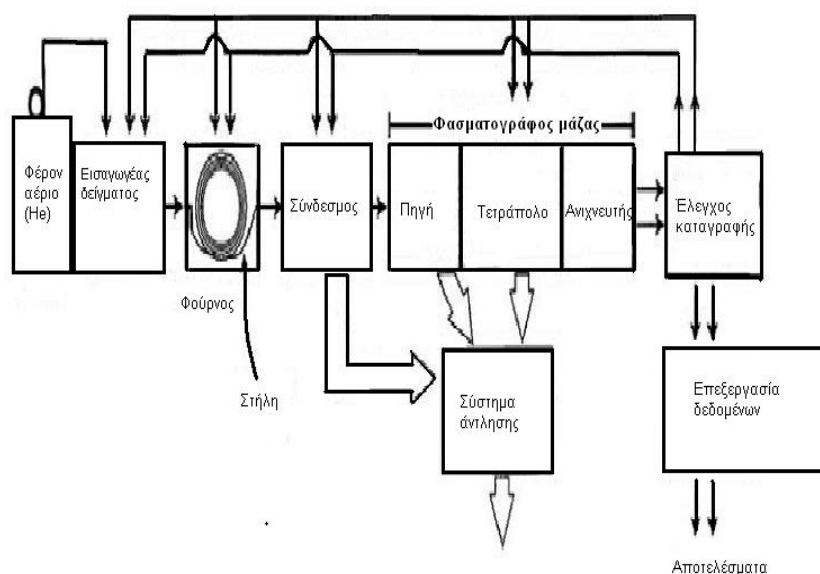
2.3.6 Προσδιορισμός πτητικών συστατικών.

Τα πτητικά συστατικά που δημιουργούνται κατά τη ζύμωση της ελιάς σε άλμη προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της μικροεκχύλισης της στερεάς φάσης από τον υπερκείμενο χώρο του δείγματος. Η ίνα που χρησιμοποιήθηκε για την απορρόφηση των πτητικών ουσιών ήταν DVB/CAR/PDMS – 50/30μm (μήκος βελόνας 1cm, μέγεθος βελόνας 24 ga). Οι συνθήκες της δειγματοληψίας μικροεκχύλισης στερεάς φάσης ήταν οι παρακάτω: 2ml άλμης διαλύθηκαν σε νερό (1/10 σε νερό καθαρότητας

HPLC) και μαζί με 0,5g NaCl μεταφέρθηκαν σε γυάλινο φιαλίδιο των 4ml αφού πρώτα αναμιχθήκαν με 100μl διαλύματος 4-μεθυλ-1-πεντανόλης (τελική συγκέντρωση 100μg/L). Στη συνέχεια προστέθηκε ένας μικρός μαγνήτης, το φιαλίδιο κλείστηκε ερμητικά με ένα PTFE σέπτο και τοποθετήθηκε σε θερμοστατική θήκη σε αναδευτήρα. Το δείγμα αναδευτήκε για 15 min στους 35°C και στη συνέχεια η ίνα εκτέθηκε στον υπερκείμενο χώρο του δείγματος για 30 min στις ίδιες συνθήκες. Το μήκος της ίνας στον υπερκείμενο χώρο του δείγματος και η ανάδευση διατηρήθηκαν σταθερά. Η εκρόφηση των πτητικών έλαβε χώρα στην βαλβίδα εισαγωγής του δείγματος στο GC/MS, ενώ πριν την πρώτη ανάλυση της ημέρας, η ίνα τοποθετείτο για 10 min στη βαλβίδα εισαγωγής σε θερμοκρασία 250 °C, για να γίνει ο καθαρισμός της από προηγούμενα υπολείμματα. Για τις υπόλοιπες αναλύσεις χρησιμοποιήθηκαν ως χρόνος προετοιμασίας τα 5 min εκρόφησης μετά από κάθε εκχύλιση. Μια φορά την ημέρα η ίνα τοποθετούνταν στον εισαγωγέα δείγματος χωρίς προηγουμένως να απορροφήσει πτητικά από κάποιο δείγμα, έτσι ώστε να γίνει έλεγχος της μεταφοράς προσμίξεων. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι στις συνθήκες αυτές ποτέ δεν παρατηρήθηκε μεταφορά προσμίξεων.

Οι πτητικές ουσίες του δείγματος διαχωρίστηκαν με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας σε συσκευή Agilent 7890A GC συνδυασμένη με φασματογράφο μαζών Agilent 5973C MS στον οποίο έγινε ποιοτικός προσδιορισμός των συστατικών του δείγματος. Ένα τυπικό διάγραμμα συστήματος GC/MS παρουσιάζεται στο Σχήμα 2.2. Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε το ήλιο (He) με σταθερή ταχύτητα ροής το 1ml/min. Το σύστημα εισαγωγής δείγματος ήταν εφοδιασμένο με SPME liner διαστάσεων 0.75 mm x 6.35 mm x 78.5 mm. Το δείγμα λειτουργία του έγινε με split mode (με 1/5 split ratio) στους 250 °C, επειδή η εκρόφηση με splitless έχει ως αποτέλεσμα τον κορεσμό/υπερφόρτωση του χρωματογραφήματος πλατειές κορυφές. Ο διαχωρισμός των ουσιών εκτελέστηκε σε στήλη HP-5MS (μήκους 30 m, διαμέτρου 0.25 mm i.d., 0.25μm film thickness, Agilent). Η θερμοκρασία στο φούρνο διατηρήθηκε στους 40 °C για 5 min, προγραμματίστηκε να αυξάνεται 4 °C/min μέχρι τους 150 °C και τότε αυξήθηκε σε 250 °C με ρυθμό 30 °C/min και διατηρήθηκε στη θερμοκρασία αυτή για 5 min. Η θερμοκρασία διασύνδεσης ορίστηκε στους 280°C. Ο τρόπος λειτουργίας του φασματογράφου μάζας ήταν με τη μέθοδο ιονισμού (electron impact) με ενέργεια ηλεκτρονίων ορισμένη στα 70 eV και εύρος σάρωσης μαζών 29–350 m/z (scan rate: 4.37 scans/sec, gain factor: 0.5, resulting EM voltage: 1129V). Η

θερμοκρασία του φασματογράφου μάζας (MS) στην πηγή και στο τετράπολο ορίστηκαν στους 230 and 150 °C αντιστοίχως.



Σχήμα 2.2. Τυπικό διάγραμμα συστήματος GC/MS.

Η ταυτοποίηση και ο ποιοτικός προσδιορισμός των συστατικών έγινε: α) με σύγκριση των δεικτών κατακράτησης (LRI, linear retention indices), για τον υπολογισμό των οποίων χρησιμοποιήθηκαν υδρογονάνθρακες με άρτιο αριθμό ευθείας αλυσίδας ατόμων άνθρακα (C₈-C₂₄, Niles, Illinois, USA) με τους αντίστοιχους δείκτες κατακράτησης πρότυπων ενώσεων (Adams, 2001) και β) με σύγκριση των δεδομένων φασματογραφων μαζών με τα αντίστοιχα πρότυπα ουσιών και με χρήση δεδομένων από τη βιβλιοθήκη NIST (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library with Search Program, data version NIST 05, software version 2.0d). Το λογισμικό Amdis (version 2.62, <http://chemdata.nist.gov/mass-spc/amdis/>) χρησιμοποιήθηκε για την επεξεργασία και ερμηνεία των φασμάτων μάζας και την ταυτοποίηση των επιθυμητών συστατικών. Τα πτητικά συστατικά ημι-ποσοτικοποιήθηκαν διαιρώντας το εμβαδόν της κορυφής των επιθυμητών συστατικών με το εμβαδόν της κορυφής των αντίστοιχων εσωτερικών προτύπων (IS).

2.4 Οργανοληπτική αξιολόγηση

Η οργανοληπτική αξιολόγηση των δειγμάτων έγινε από ομάδα 10 δοκιμαστών του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του ΓΠΑ, οι οποίοι συμπλήρωναν ένα ειδικό έντυπο οργανοληπτικής αξιολόγησης με βάση τον Κανονισμό COI/OT/MO No 1/Rev.1 του Διεθνούς Συμβουλίου Ελαιολάδου για την οργανοληπτική αξιολόγηση της επιτραπέζιας ελιάς. Συνολικά εκτιμήθηκε η συνεκτικότητα της σάρκας, η οσμή, η αλμυρότητα, η πικρή και η όξινη γεύση.

Τα δείγματα βαθμολογήθηκαν συγκριτικά μεταξύ τους, ως προς τα παραπάνω οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, σε μια κλίμακα αρεσκείας από 0 έως 10 ως εξής:

- Συνεκτικότητα σάρκας: 0 = μαλακή, 5 = ενδιάμεση, 10 = συνεκτική.
- Οσμή από μη φυσιολογική ζύμωση: 0 = απουσία, 5 = μέτρια, 10 = ισχυρή.
- Αλμυρότητα: 0 = καθόλου αλμυρή, 5 = μέτρια αλμυρή, 10 = πολύ αλμυρή.
- Πικρή γεύση: 0 = καθόλου πικρή, 5 = μέτρια πικρή, 10 = πολύ πικρή.
- Όξινη γεύση: 0 = καθόλου όξινη, 5 = μέτρια όξινη, 10 = πολύ όξινη.

2.5 Στατιστική επεξεργασία των δεδομένων.

Για την ποσοτική περιγραφή της επίδρασης των τριών αλάτων (NaCl, KCl, CaCl₂) στις μικροβιολογικές και φυσικοχημικές παραμέτρους της ζύμωσης χρησιμοποιήθηκε μια πολλαπλή πολυωνυμική εξίσωση που είχε την εξής μορφή:

$$R = \sum b_i x_i + \sum \sum b_{ij} x_i x_j + \sum b_{ii} x_{ii}^2 + \sum \sum \sum b_{ijk} x_i x_j x_k$$

όπου x_1 , x_2 , x_3 αντιστοιχούν στις παραμέτρους NaCl, KCl, CaCl₂, αντίστοιχα, και R είναι η εξαρτημένη μεταβλητή. Στην παρούσα μελέτη ως εξαρτημένη μεταβλητή χρησιμοποιήθηκε: (i) η αρχική τιμή της ενεργότητας ύδατος (a_w) της άλμης από την παρουσία των αλάτων NaCl, KCl και CaCl₂ σε διαφορετικές αναλογίες, (ii) η τιμή του pH στην άλμη μετά από 60 ημέρες ζύμωσης (τέλος του πειράματος), και (iii) η μεταβολή του πληθυσμού των γαλακτικών βακτηρίων και των ζυμών. Στην περίπτωση (iii), προκειμένου να γίνει ποσοτικοποίηση της επίδρασης της διαφορετικής αναλογίας των αλάτων στη μεταβολή της μικροβιακής χλωρίδας των

γαλακτικών βακτηρίων και ζυμών, έγινε ο υπολογισμός του ολοκληρώματος των καμπυλών αύξησης των γαλακτικών βακτηρίων και των ζυμών. Προκειμένου τα εμβαδά που προκύπτουν να είναι συγκρίσιμα, οι τιμές μετασχηματίστηκαν σε κανονική κατανομή με μέσο όρο 0 και τυπική απόκλιση 1. Τα μετασχηματισμένα εμβαδά χρησιμοποιήθηκαν ως εξαρτημένη μεταβλητή στα πειράματα μείξης προκειμένου να ποσοτικοποιηθεί η επίδραση των τριών αλάτων στη μεταβολή της μικροχλωρίδας των γαλακτικών βακτηρίων και των ζυμών στις διαφορετικές ζυμώσεις. Για τον προσδιορισμό της καταλληλότερης εξίσωσης που ανταποκρίνεται στη μοντελοποίηση κάθε εξαρτημένης μεταβλητής, εφαρμόζονται αρχικά όλες οι πολυωνυμικές εξισώσεις, γραμμική, δευτεροβάθμια, τριτοβάθμια πλήρης και ειδική (Πίνακας 2.3), και προσδιορίζεται για κάθε εξίσωση ο έλεγχος της έλλειψης προσαρμογής (lack of fit). Η εξίσωση εκείνη που παρουσιάζει για πρώτη φορά μη στατιστική σημαντικότητα στην έλλειψη προσαρμογής είναι η καταλληλότερη του πειράματος.

Πίνακας 2.3. Εξισώσεις διαπλέγματος Simplex.

Γραμμική	$y = \sum_{i=1}^n b_i x_i$
Δευτεροβάθμια	$y = \sum_{i=1}^n b_i x_i + \sum_{i<j}^n b_{ij} x_i x_j$
Τριτοβάθμια ή κυβική	$y = \sum_{i=1}^n b_i x_i + \sum_{i<j}^n b_{ij} x_i x_j + \sum_{i<j<k}^n b_{ijk} x_i x_j x_k$
Ειδική κυβική	$y = \sum_{i=1}^n b_i x_i + \sum_{i<j}^n b_{ij} x_i x_j + \sum_{i<j}^n \delta_{ij} x_i x_j (x_i - x_j) + \sum_{i<j<k}^n b_{ijk} x_i x_j x_k$

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Μικροβιολογικές αναλύσεις

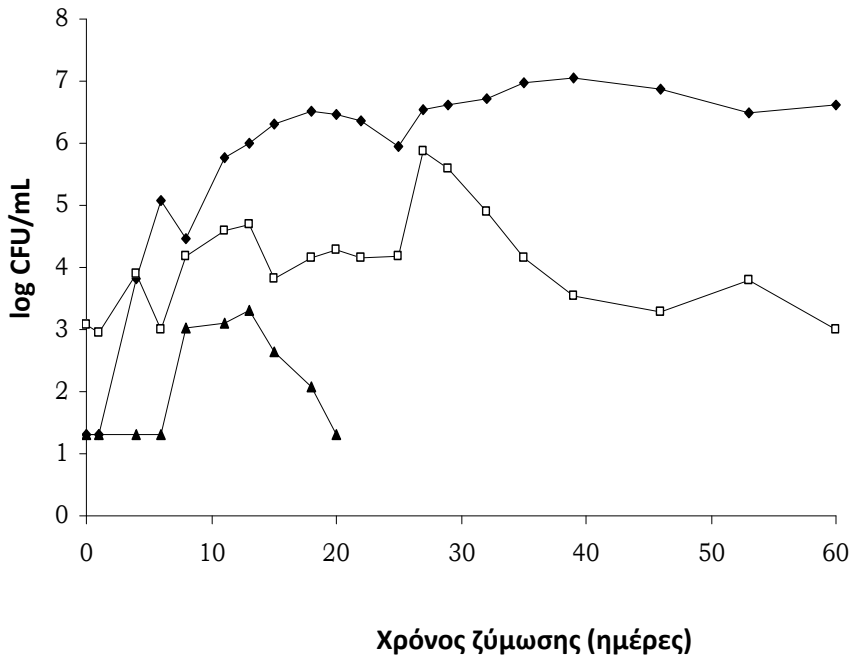
Στο Σχήμα 3.1 παρουσιάζονται οι μεταβολές στον πληθυσμό των ζυμών, των γαλακτικών βακτηρίων και των εντεροβακτηρίων κατά τη διάρκεια μιας τυπικής ζύμωσης της φυσικής μαύρης ελιάς με αρχική συγκέντρωση άλατος (NaCl) 8% (w/v) (ζύμωση Νο 1). Η ζύμωση αυτή αποτέλεσε το μάρτυρα των πειραμάτων, δηλαδή τη ζύμωση με την οποία συγκρίθηκαν όλες οι υπόλοιπες ζυμώσεις. Όπως είναι φανερό από το Σχήμα 3.1 τα γαλακτικά βακτήρια επικράτισαν έναντι των ζυμών και των εντεροβακτηρίων (αρνητικά κατά Gram βακτήρια). Ο πληθυσμός των εντεροβακτηρίων παρουσίασε αύξηση τις πρώτες 10-15 ημέρες της ζύμωσης, έως την τιμή 3,0 log CFU/ml ενώ στη συνέχεια μειώθηκε σταδιακά μέχρι την 20^η ημέρα της ζύμωσης, οπότε ήταν μικρότερος από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου και παρέμεινε σταθερός μέχρι το τέλος της ζύμωσης. Οι ζύμες αποτέλεσαν σημαντικό κλάσμα τις αυτόχθονης μικροχλωρίδας της ζύμωσης και ενώ ο πληθυσμός τους μέχρι την 28^η ημέρα της ζύμωσης παρουσίασε αύξηση μέχρι την τιμή 5,8 log CFU/ml (σύμφωνα με το Σχήμα 3.1) ο τελικός πληθυσμός τους δεν διέφερε από τον αρχικό που ήταν περίπου 3,0 log CFU/ml. Η επικρατούσα ομάδα μικροοργανισμών ήταν τα γαλακτικά βακτήρια. Η αρχική συγκέντρωση άλατος, η οποία κατά την αποκατάσταση του ισοζυγίου διαμορφώθηκε στο 4,0-4,2 % περίπου, ευνόησε την επικράτηση των γαλακτικών βακτηρίων έναντι των ζυμών, συμβάλλοντας έτσι στην πραγματοποίηση γαλακτικής ζύμωσης. Στην αρχή της ζύμωσης ο πληθυσμός των γαλακτικών βακτηρίων παρουσίασε ταχεία αύξηση έως την 20^η ημέρα, οπότε έφτασε στο επίπεδο 6,5 log CFU/ml. Στη συνέχεια δεν παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη μεταβολή του πληθυσμού μέχρι το τέλος της ζύμωσης.

Οι μεταβολές στη σύνθεση της μικροχλωρίδας κατά τη διάρκεια των ζυμώσεων με διαφορετικές αναλογίες αλάτων (NaCl-KCl-CaCl₂) στην άλμη παρουσιάζονται στα Σχήματα 3.2-3.10. Όπως είναι φανερό, σε ζυμώσεις που το χλωριούχο νάτριο υποκαταστάθηκε μερικώς ή πλήρως από από τα υπόλοιπα άλατα (KCl και CaCl₂), η μεταβολή της μικροβιακής χλωρίδας έδειξε αντίστοιχη συμπεριφορά με το μάρτυρα των πειραμάτων, ήτοι τη ζύμωση 1. Σε όλες τις υπόλοιπες περιπτώσεις πραγματοποιήθηκε γαλακτική ζύμωση με επικρατούσα μικροχλωρίδα τα γαλακτικά βακτήρια, ενώ ο πληθυσμός των ζυμών κυμάνθηκε σε χαμηλότερα επίπεδα. Ο πληθυσμός των εντεροβακτηρίων είτε ήταν χαμηλότερος από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου είτε κυμάνθηκε σε χαμηλά επίπεδα (<2,5 log CFU/ml) τις πρώτες ημέρες της

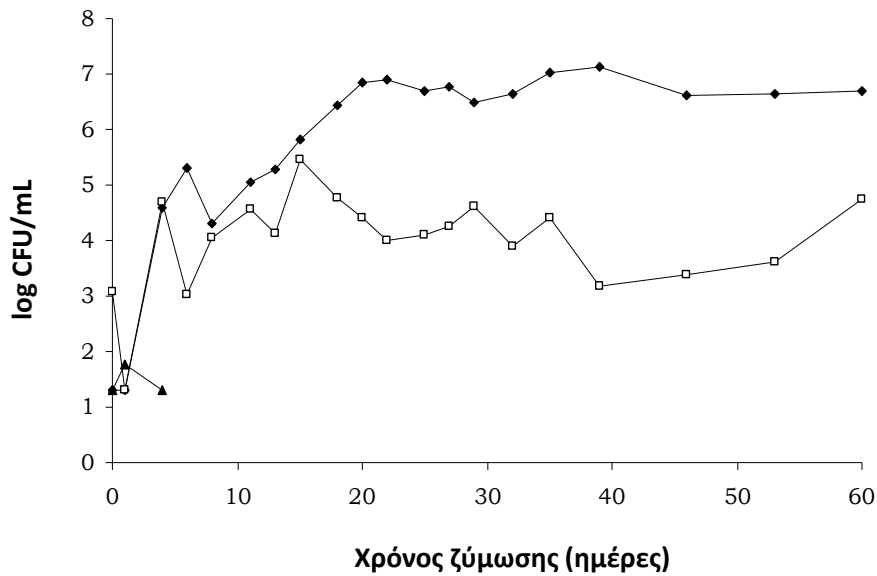
ζύμωσης, γεγονός που ενισχύει την ευεργετική επίδραση της αρχικής οξίνισης της άλμης με γαλακτικό οξύ, αλλά παράλληλα και την παραγωγή περισσότερου γαλακτικού οξέως από τα γαλακτικά βακτήρια κατά τη ζύμωση, όπως προκύπτει και από τις τιμές της ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας (Πίνακας 3.1).

Σε όλες τις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν ο πληθυσμός των γαλακτικών βακτηρίων ενώ ξεκίνησε από πολύ χαμηλά επίπεδα (περίπου 1,5 log CFU/ml), παρουσίασε ταχεία αύξηση και στο τέλος της ζύμωσης κυμάνθηκε μεταξύ 6,0-7,0 log CFU/ml.

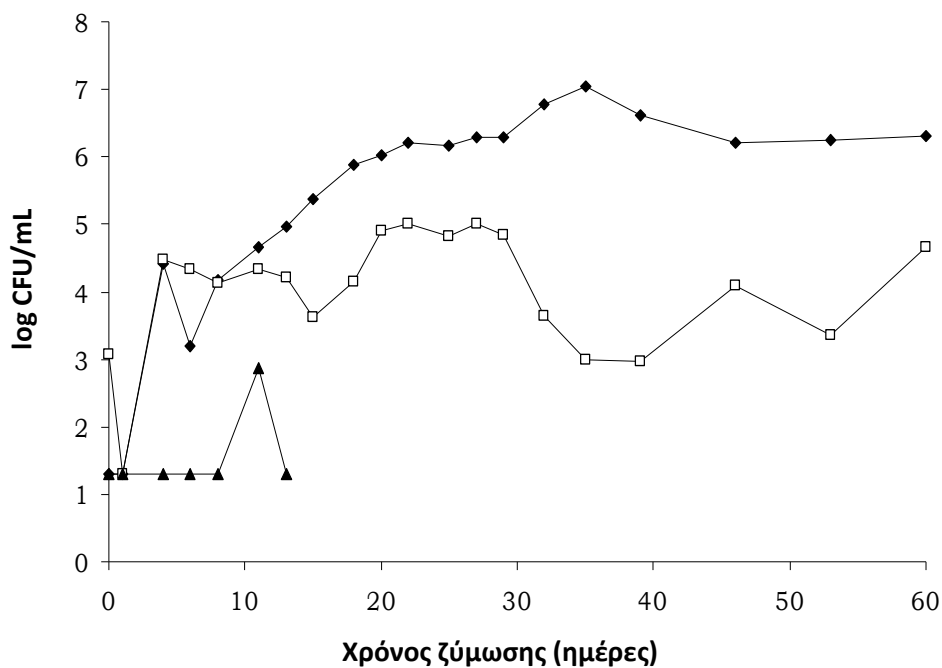
Στις ζυμώσεις με κωδικούς 1,5,6,7 και 10 με συνδιασμό αλάτων 8%-0%-0%, 0%-4%-4%, 0%-0%-8%, 2,66%-2,66%-2,66% και 1,33%-1,33%-5,33% (NaCl- KCl- CaCl₂) αντίστοιχα, ο πληθυσμός των ζυμών κυμάνθηκε σε επίπεδα μικρότερα από 3 log CFU/ml και συγκεκριμένα ο χαμηλότερος παρατηρήθηκε στη ζύμωση 10 (περίπου 1,5 log CFU/ml). Αντίθετα στις ζυμώσεις με κωδικούς 2,3,4,8 και 9 με συνδιασμούς αλάτων 4%-4%-0%, 4%-0%-4%, 0%-8%-0%, 5,33%-1,33%-1,33% και 1,33%-5,33%-1,33% (NaCl- KCl- CaCl₂) αντίστοιχα, ο πληθυσμός των ζυμών κυμάνθηκε μεταξύ 4,0-5,0 log CFU/ml.



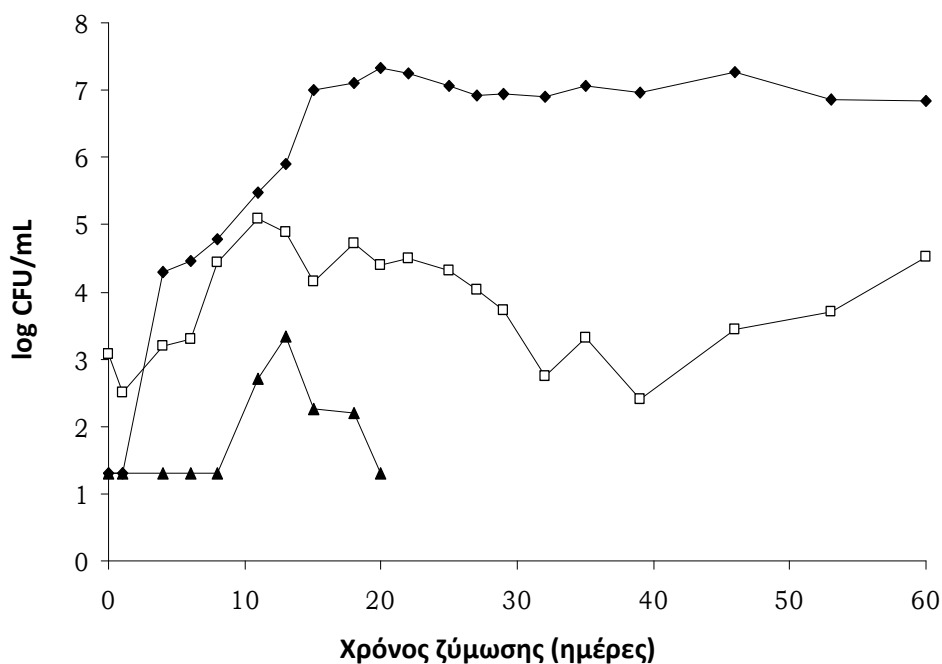
Σχήμα 3.1. Μεταβολή του πληθυσμού των γαλακτικών βακτηρίων (◆), των ζυμών (□) και των εντεροβακτηρίων (▲) κατά τη ζύμωση της φυσικής μαύρης ελιάς με αναλογία αλάτων 8 % NaCl – 0 % KCl – 0 % CaCl₂ στην αρχική άλμη.



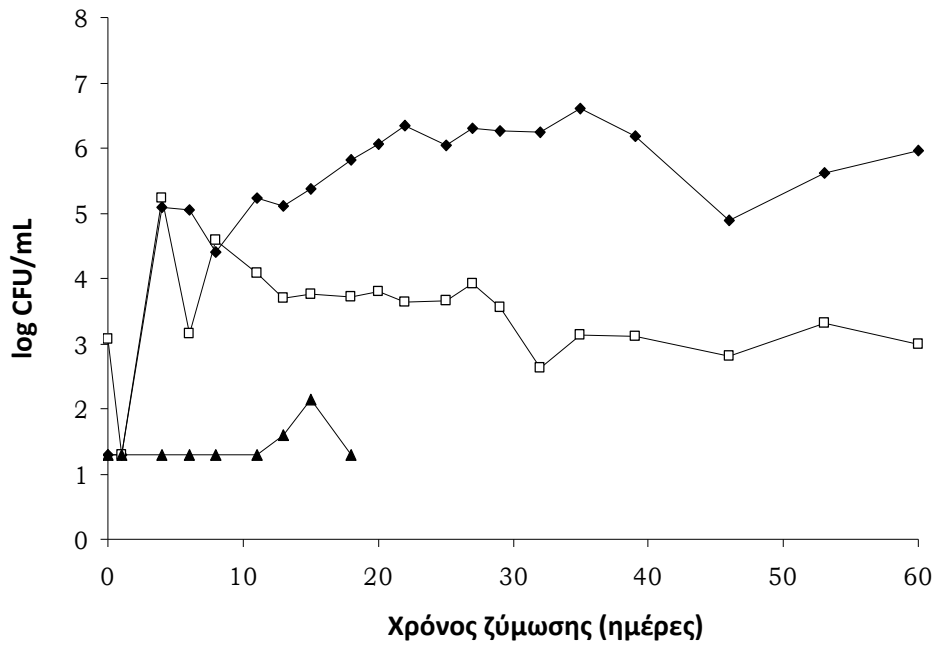
Σχήμα 3.2. Μεταβολή του πληθυσμού των γαλακτικών βακτηρίων (◆), των ζυμών (□) και των εντεροβακτηρίων (▲) κατά τη ζύμωση της φυσικής μαύρης ελιάς με αναλογία αλάτων 4 % NaCl – 4 % KCl – 0 % CaCl₂ στην αρχική άλμη.



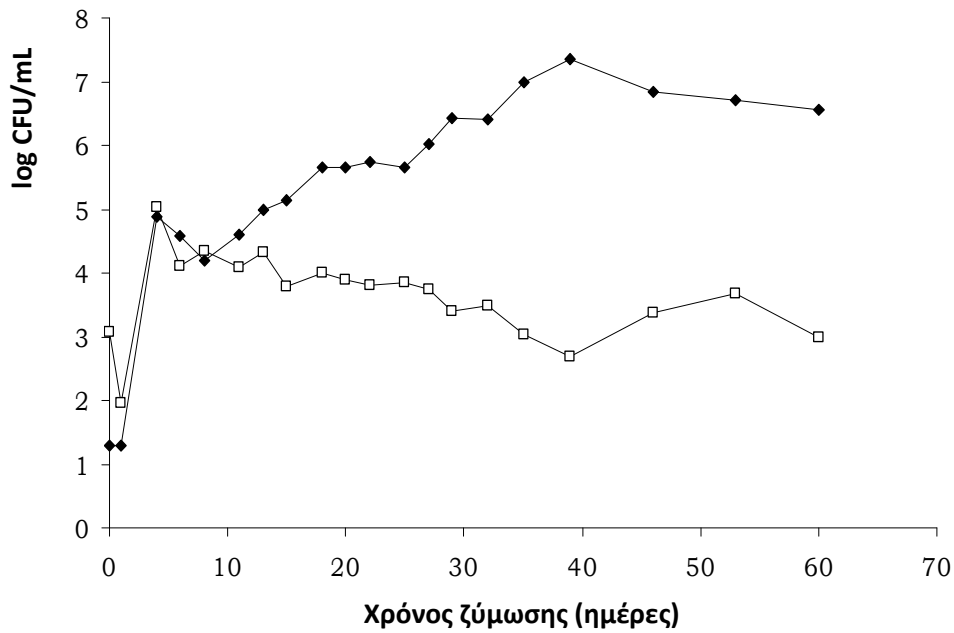
Σχήμα 3.3. Μεταβολή του πληθυσμού των γαλακτικών βακτηρίων (◆), των ζυμών (□) και των εντεροβακτηρίων (▲) κατά τη ζύμωση της φυσικής μαύρης ελιάς με αναλογία αλάτων 4 % NaCl – 0 % KCl – 4 % CaCl₂ στην αρχική άλμη.



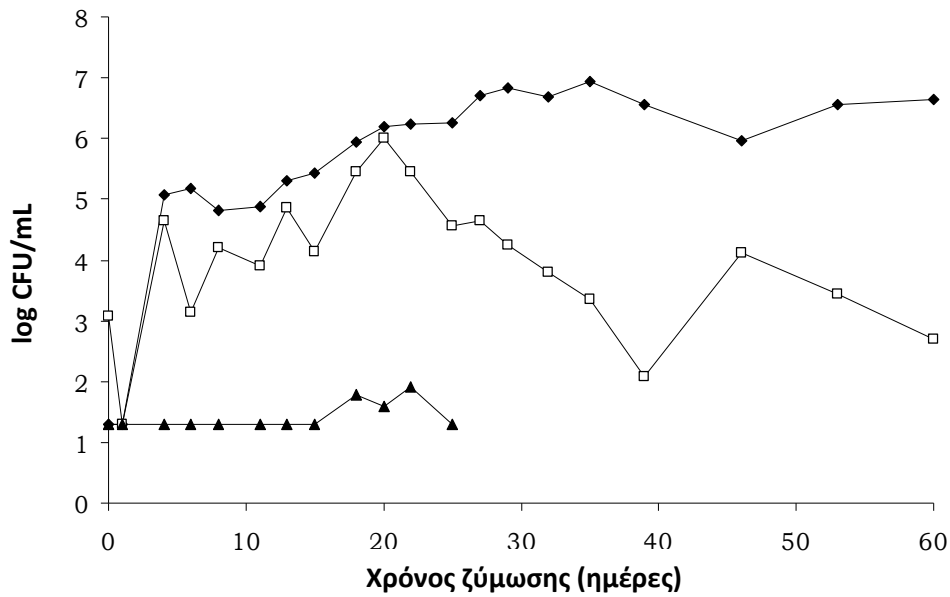
Σχήμα 3.4. Μεταβολή του πληθυσμού των γαλακτικών βακτηρίων (◆), των ζυμών (□) και των εντεροβακτηρίων (▲) κατά τη ζύμωση της φυσικής μαύρης ελιάς με αναλογία αλάτων 0 % NaCl – 8 % KCl – 0 % CaCl₂ στην αρχική άλμη.



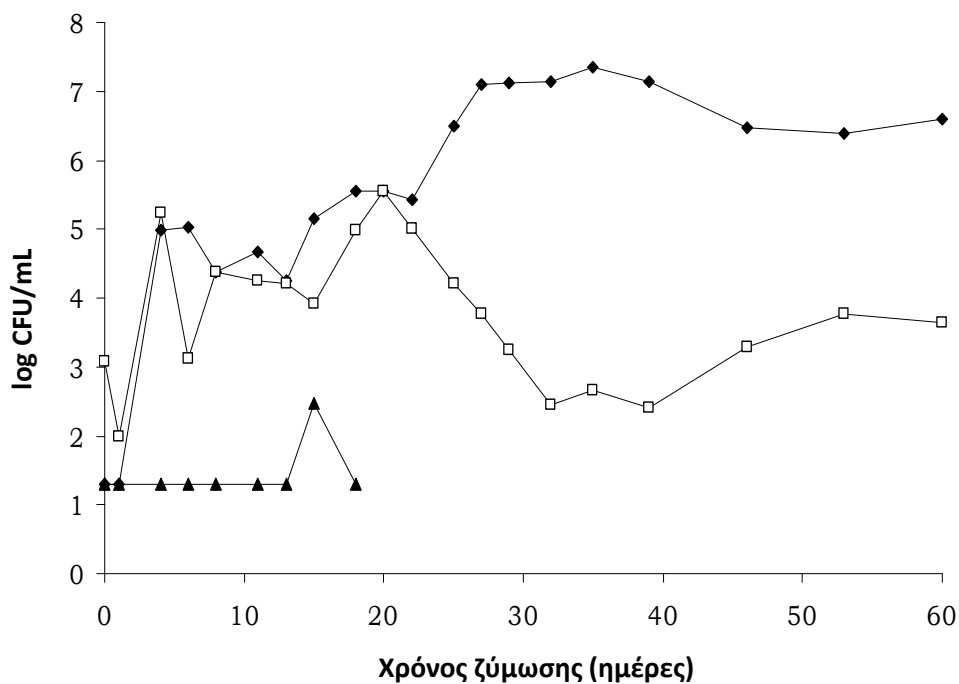
Σχήμα 3.5. Μεταβολή του πληθυσμού των γαλακτικών βακτηρίων (◆), των ζυμών (□) και των εντεροβακτηρίων (▲) κατά τη ζύμωση της φυσικής μαύρης ελιάς με αναλογία αλάτων 0 % NaCl – 4 % KCl – 4 % CaCl₂ στην αρχική άλμη.



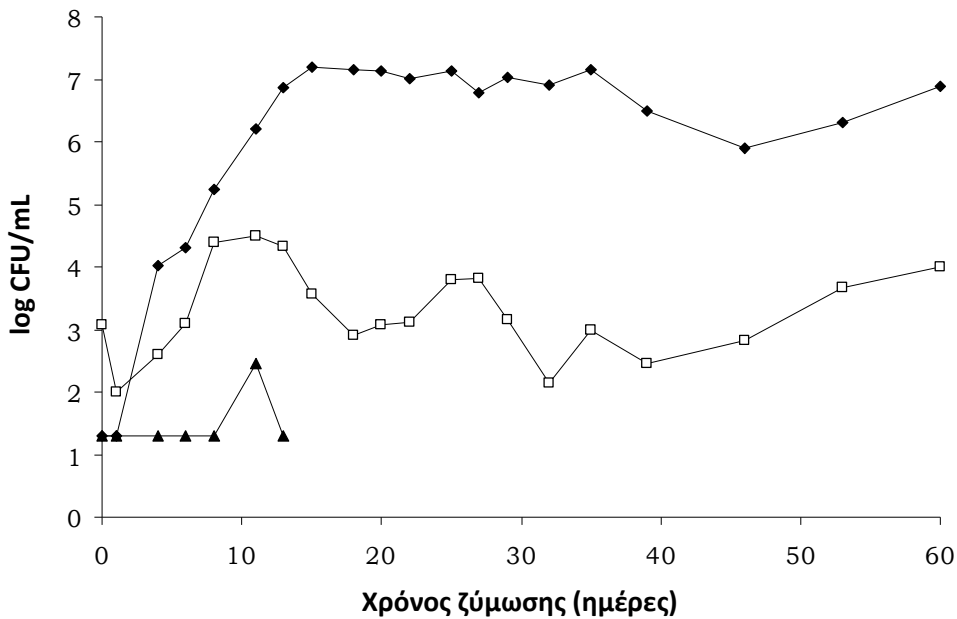
Σχήμα 3.6. Μεταβολή του πληθυσμού των γαλακτικών βακτηρίων (◆), των ζυμών (□) και των εντεροβακτηρίων (▲) κατά τη ζύμωση της φυσικής μαύρης ελιάς με αναλογία αλάτων 0 % NaCl – 0 % KCl – 8 % CaCl₂ στην αρχική άλμη.



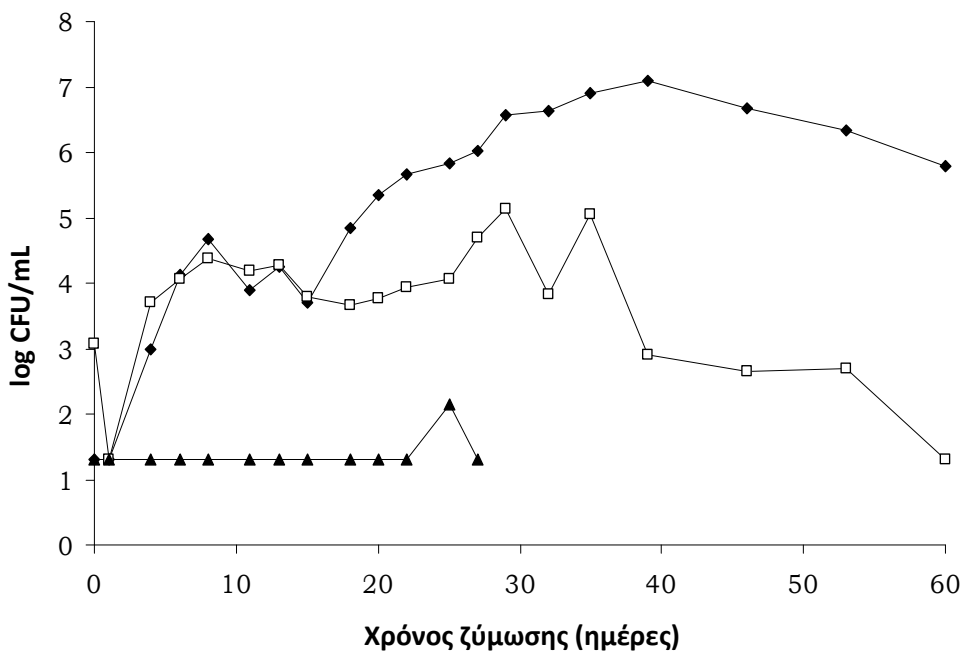
Σχήμα 3.7. Μεταβολή του πληθυσμού των γαλακτικών βακτηρίων (◆), των ζυμών (□) και των εντεροβακτηρίων (▲) κατά τη ζύμωση της φυσικής μαύρης ελιάς με αναλογία αλάτων 2.66 % NaCl – 2.66 % KCl – 2.66 % CaCl₂ στην αρχική άλμη.



Σχήμα 3.8. Μεταβολή του πληθυσμού των γαλακτικών βακτηρίων (◆), των ζυμών (□) και των εντεροβακτηρίων (▲) κατά τη ζύμωση της φυσικής μαύρης ελιάς με αναλογία αλάτων 5.33 % NaCl – 1.33 % KCl – 1.33 % CaCl₂ στην αρχική άλμη.



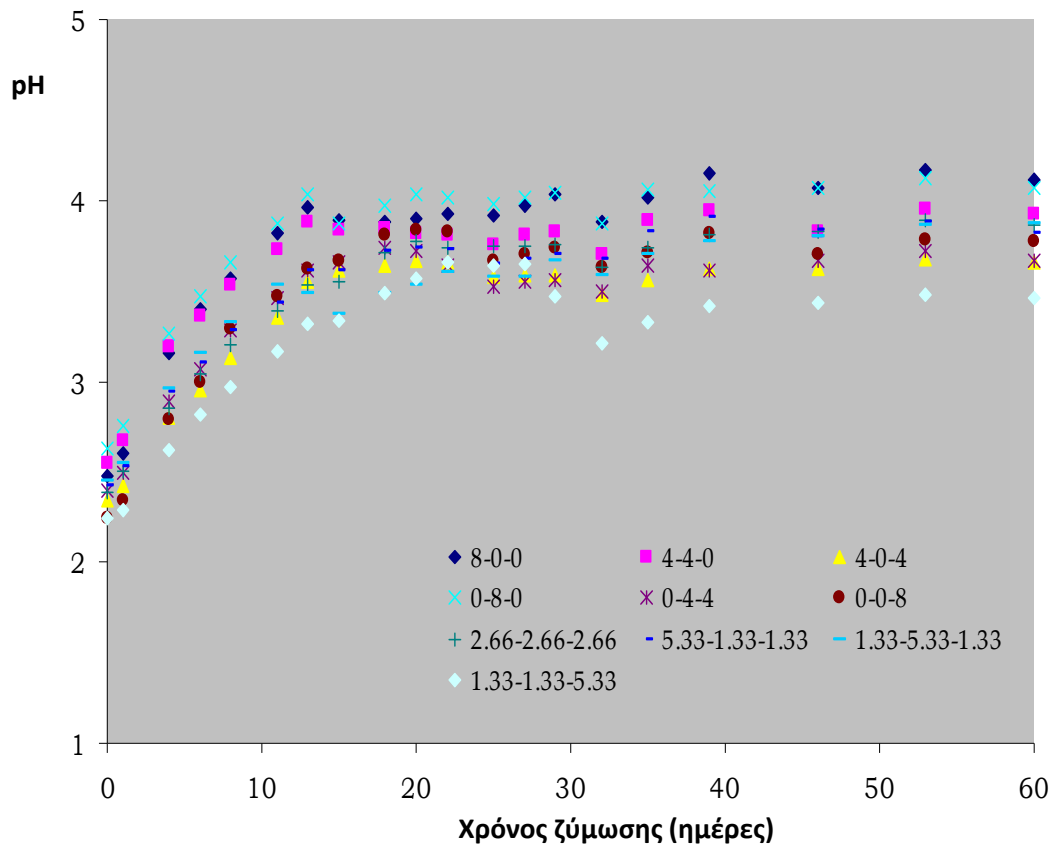
Σχήμα 3.9. Μεταβολή του πληθυσμού των γαλακτικών βακτηρίων (◆), των ζυμών (□) και των εντεροβακτηρίων (▲) κατά τη ζύμωση της φυσικής μαύρης ελιάς με αναλογία αλάτων 1.33 % NaCl – 5.33 % KCl – 1.33 % CaCl₂ στην αρχική άλμη.



Σχήμα 3.10. Μεταβολή του πληθυσμού των γαλακτικών βακτηρίων (◆), των ζυμών (□) και των εντεροβακτηρίων (▲) κατά τη ζύμωση της φυσικής μαύρης ελιάς με αναλογία αλάτων 1.33 % NaCl – 1.33 % KCl – 5.33 % CaCl₂ στην αρχική άλμη.

3.2 Φυσικοχημικές αναλύσεις

Η μεταβολή της τιμής του pH κατά τη διάρκεια των ζυμώσεων με διαφορετικές αναλογίες αλάτων (NaCl-KCl-CaCl₂) στην άλμη παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.11. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.11 και στις δέκα περιπτώσεις ζυμώσεων που μελετήθηκαν, η αρχική τιμή του pH κυμάνθηκε μεταξύ 2,4-2,6. Στη μειωμένη τιμή του pH στην έναρξη της ζύμωσης, συνέβαλε η αρχική οξίνιση της άλμης με γαλακτικό οξύ σε συγκέντρωση 2% επί του όγκου της άλμης. Στη συνέχεια ακολούθησε μια σταδιακή αύξηση της τιμής του pH μέχρι την 15^η ημέρα της ζύμωσης, ενώ στη συνέχεια δεν σημειώθηκαν αξιόλογες μεταβολές έως το τέλος του πειράματος (60 ημέρες). Η μεγαλύτερη τιμή pH που μετρήθηκε ήταν 4,11 στο συνδυασμό 8%-0%-0% (NaCl-KCl-CaCl₂), που αποτελεί το μάρτυρα του πειράματος όπως προαναφέρθηκε. Στο συνδυασμό 0%-8%-0% (NaCl-KCl-CaCl₂) η τιμή του pH μετά από 60 ημέρες διαμορφώθηκε σε 4,07, ενώ στις υπόλοιπες ζυμώσεις η τελική τιμή του pH διαμορφώθηκε κάτω από 4,0 (περίπου 3,8-3,9). Η μικρότερη τιμή pH (3,46) μετά το τέλος του πειράματος παρατηρήθηκε στη ζύμωση της οποίας η αρχική αναλογία αλάτων στην άλμη ήταν 1,33%-1,33%-5,33% (NaCl-KCl-CaCl₂).



Σχήμα 3.11. Επίδραση της διαφορετικής συγκέντρωσης των αλάτων στη μεταβολή της τιμής του pH κατά τη ζύμωση φυσικά ώριμου ελαιοκάρπου ποικιλίας Κονσερβολιά.

Οι τιμές της ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας των ζυμώσεων που μελετήθηκαν υπολογίστηκαν στο ίδιο χρονικό διάστημα για το τέλος του πειράματος. Αυτές παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1, υποδεικνύοντας ότι παρατηρείται μια σημαντική διαφορά στις τιμές της ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας μεταξύ των ζυμώσεων, σε αντίθεση με τις τιμές του pH που δεν διαφοροποιούνται σημαντικά μεταξύ τους. Η εξήγηση του φαινομένου αυτού έγκειται στην ιδιότητα της άλμης να παρουσιάζει τη μέγιστη ρυθμιστική της ικανότητα σε περιοχή pH 3,8-3,9, με αποτέλεσμα οι μεταβολές της τιμής της ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας να μην συνάδουν με τις αντίστοιχες μεταβολές της τιμής του pH. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.1 οι τιμές της οξύτητας των ζυμώσεων κυμάνθησαν σε ποσοστά μεγαλύτερα από 0,6g γαλακτικού οξέος/100 ml άλμης, τιμές που θεωρούνται ως αποδεκτές για μια επιτυχή ζύμωση. Η τιμή της οξύτητας του μάρτυρα ήταν 0,684g γαλακτικού οξέος/100 ml άλμης. Οι συνδυασμοί 4%-0%-4% και 0%-8%-0% (NaCl-KCl-CaCl₂) έδωσαν την ίδια τιμή οξύτητας με τον μάρτυρα, ενώ οι συνδυασμοί 0%-4%-4% και 5,33%-1,33%-1,33%

(NaCl-KCl-CaCl₂) έδωσαν τιμή ογκομετρούμενης οξύτητας μεγαλύτερη από 0,8g γαλακτικού οξέος/100 ml άλμης. Τέλος τη μικρότερη τιμή ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας (0,630g γαλ. οξέως/100 ml άλμης) έδωσε ο συνδυασμός 1,33%-1,33%-5,33% (NaCl-KCl-CaCl₂), ο οποίος όπως προαναφέρθηκε είχε και τη μικρότερη τιμή pH στο τέλος του πειράματος.

Πίνακας 3.1: Επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων των αλάτων στην τιμή της ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας για χρονικό διάστημα 60 ημερών από την έναρξη της ζύμωσης.

Αριθμός ζύμωσης	NaCl (%)- KCl (%)-CaCl ₂ (%)	Οξύτητα (g%)
1	8-0-0	0,684
2	4-4-0	0,639
3	4-0-4	0,684
4	0-8-0	0,685
5	0-4-4	0,828
6	0-0-8	0,792
7	2,66-2.66-2,66	0,756
8	5,33-1.33-1,33	0,810
9	1,33-5.33-1,33	0,792
10	1,33-1.33-5,33	0,630

Η περιεκτικότητα του καρπού σε ιόντα νατρίου (Na⁺), καλίου (K⁺) και ασβεστίου (Ca²⁺) μετά τη ζύμωση προσδιορίστηκε με τη μέθοδο ατομικής απορρόφησης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2. δείχνοντας ότι στην τυπική ζύμωση της φυσικής μαύρης ελιάς σε άλμη με αλατοπερικτικότητα 8% (NaCl, w/v) η συγκέντρωση των ιόντων νατρίου στη σάρκα ήταν 1065,4mg/100g καρπού (ή 10654 mg/ kg καρπού). Η ποσότητα αυτή θεωρείται αρκετά υψηλή, εάν ληφθή υπόψιν ότι η ημερήσια πρόσληψη νατρίου θα πρέπει να περιοριστεί στα 2000mg/ημέρα, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας. Με βάση τη νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης, Κανονισμός ΕΚ Νο 1024/2006 περί «Διατροφικών ισχυρισμών στα τρόφιμα», ορίζονται ως τρόφιμα χαμηλής περιεκτικότητας σε νάτριο/αλάτι εκείνα που περιέχουν έως 0,12g νατρίου/100g τροφίμου ή ισοδύναμο σε αλάτι 0,305g/100g τροφίμου. Όπως φαίνεται στον Πίνακα3.2, στις περιπτώσεις των ζυμώσεων με αναλογία αλάτων στην άλμη 0%-8%-0%, 0%-4%-4% και 0%-0%-8% (NaCl-KCl-

CaCl₂), το τελικό προϊόν είχε πολύ μικρή περιεκτικότητα νατρίου στη σάρκα του καρπού (0,2 mg/100 g καρπού). Σύμφωνα λοιπόν με τα παραπάνω, οι τρεις αυτές ζυμώσεις θα μπορούσαν να χαρακτηρισθούν με βάση τη νομοθεσία ως «low salt olives». Ο χαρακτηρισμός όμως αυτός, αποτελεί διατροφικό ισχυρισμό και θα πρέπει να πιστοποιηθεί – εγκριθεί από την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA).

Πίνακας 3.2: Περιεκτικότητα της σάρκας του ελαιοκάρπου (mg/100 g καρπού) σε ιόντα νατρίου, καλίου και ασβεστίου μετά από χρονικό διάστημα 60 ημερών ζύμωσης σε άλμη διαφορετικής συγκέντρωσης σε άλατα NaCl, KCl και CaCl₂.

a/a	Ζύμωση ^(ω)	Νάτριο (Na)	Κάλιο (K)	Ασβέστιο (Ca)
1	8-0-0	1065,4 ± 45,3	108,7 ± 14,6	229,3 ± 11,9
2	4-4-0	526,7 ± 95,0	539,1 ± 13,6	241,9 ± 9,5
3	4-0-4	559,0 ± 78,0	100,4 ± 8,7	319,2 ± 13,2
4	0-8-0	0,0 ± 0,0	971,0 ± 29,8	156,2 ± 5,1
5	0-4-4	0,2 ± 0,02	491,0 ± 25,1	230,5 ± 15,0
6	0-0-8	0,2 ± 0,03	105,1 ± 3,9	328,8 ± 12,1
7	2,66-2,66-2,66	393,0 ± 12,8	460,9 ± 70,4	299,2 ± 8,7
8	5,33-1,33-1,33	752,0 ± 34,7	252,3 ± 17,8	275,8 ± 8,7
9	1,33-5,33-1,33	116,8 ± 2,8	674,4 ± 48,4	229,9 ± 9,4
10	1,33-1,33-5,33	122,7 ± 5,3	223,1 ± 10,8	274,3 ± 25,6

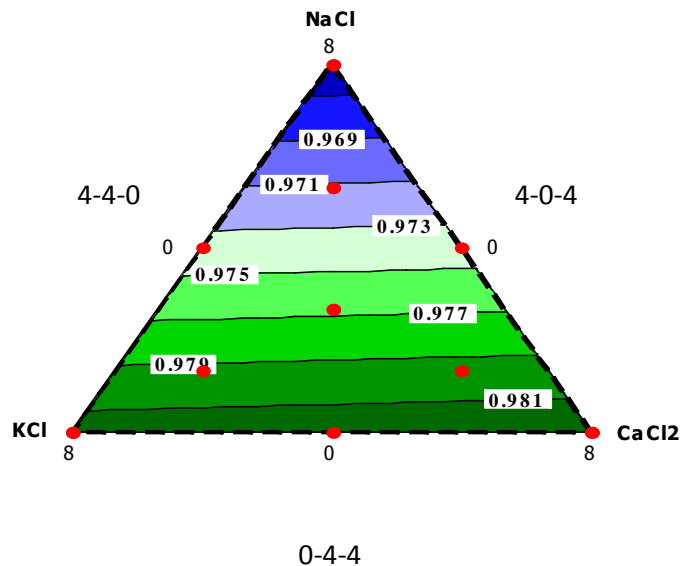
^(ω) Τα νούμερα αντιστοιχούν στις συγκεντρώσεις NaCl, KCl και CaCl₂ αντίστοιχα.

Η μεταβολή της αρχικής τιμής της ενεργότητας του ύδατος στην άλμη ως συνάρτηση των τριών αλάτων που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.12. Στο επίπεδο 8 % αρχικής αλατοπεριεκτικότητας η μικρότερη τιμή ενεργότητας του ύδατος παρατηρήθηκε με τη χρήση NaCl (a_w, 0,966), οποία αυξήθηκε σταδιακά σε 0,982 και 0,980 στην περίπτωση πλήρους αντικατάστασης του NaCl με KCl και CaCl₂, αντίστοιχα. Συνεπώς είναι φανερό ότι η πλήρης αντικατάσταση του NaCl μπορεί να οδηγήσει σε σχετικά αυξημένο μικροβιακό κίνδυνο λόγω της υψηλότερης τιμής ενεργότητας ύδατος στην αρχική άλμη.

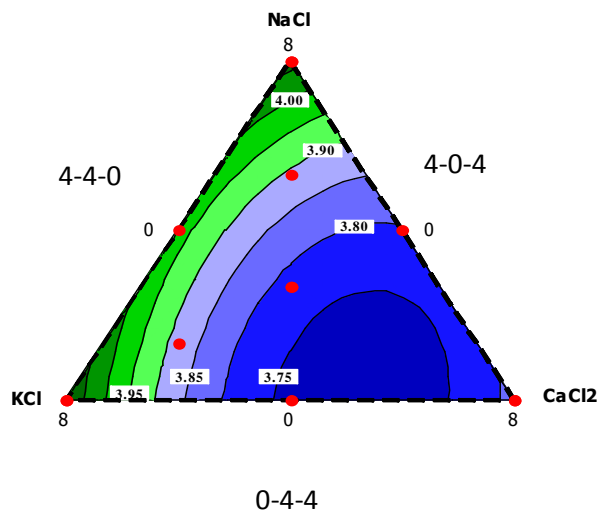
Η ανάλυση της γραμμικής παλινδρόμησης έδειξε ότι το γραμμικό μοντέλο ήταν στατιστικά σημαντικό (P = 0,000) ενώ ταυτόχρονα η έλλειψη προσαρμογής (lack of fit) ήταν μη στατιστικά σημαντική (P = 0,400) και για το λόγο αυτό

επιλέχθηκε προκειμένου να περιγράψει την επίδραση των τριών αλάτων στη διαμόρφωση της αρχικής τιμής ενεργότητας ύδατος στην άλμη. Η πολυωνυμική εξίσωση που προέκυψε είχε τη μορφή:

$$a_w = 0,120 \cdot NaCl + 0,122 \cdot KCl + 0,122 \cdot CaCl_2$$



Σχήμα 3.12. Ισοϋψείς καμπύλες της αρχικής τιμής ενεργότητας ύδατος στην άλμη σαν συνάρτηση της συγκέντρωσης των αλάτων NaCl, KCl και CaCl₂.



Σχήμα 3.13. Ισοϋψείς καμπύλες της τιμής του pH στην άλμη κατά το τέλος της ζύμωσης (60 ημέρες) σαν συνάρτηση της συγκέντρωσης των αλάτων NaCl, KCl και CaCl₂.

Η παραπάνω εξίσωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό της αρχικής τιμής ενεργότητας ύδατος στην άλμη για οποιονδήποτε συνδυασμό των τριών αλάτων, με την προϋπόθεση ότι το άθροισμα των συγκεντρώσεών τους δε θα υπερβαίνει το 8 %. Από την αριθμητική τιμή των συντελεστών της παραπάνω εξίσωσης μπορεί κανείς να συμπεράνει ότι η επίδραση του κάθε άλατος έχει την ίδια βαρύτητα στη διαμόρφωση της τιμής της αρχικής ενεργότητας ύδατος στην άλμη.

Η διαμόρφωση της τελικής τιμής του pH στην άλμη μετά από 60 ημέρες ζύμωση ως συνάρτηση των τριών αλάτων που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα παρουσιάζεται στο Σχήμα 9. Η ανάλυση της γραμμικής παλινδρόμησης έδειξε ότι το πολυωνυμικό μοντέλο δευτέρου βαθμού ήταν στατιστικά σημαντικό ($P = 0,015$) ενώ ταυτόχρονα η έλλειψη προσαρμογής (lack of fit) ήταν μη στατιστικά σημαντική ($P = 0,113$) και συνεπώς το μοντέλο αυτό επιλέχθηκε για να περιγράψει τη μεταβολή της τιμής του pH στο τέλος της ζύμωσης. Η δευτεροβάθμια πολυωνυμική εξίσωση που επιλέχθηκε είχε τη μορφή:

$$pH = 0,508 \cdot NaCl + 0,511 \cdot KCl + 0,477 \cdot CaCl_2 - 0,006 \cdot NaCl \cdot KCl - 0,009 \cdot NaCl \cdot CaCl_2 - 0,013 \cdot KCl \cdot CaCl_2$$

Η παραπάνω εξίσωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό της τιμής του pH για οποιαδήποτε συγκέντρωση των τριών αλάτων, με την προϋπόθεση ότι η συγκέντρωσή τους δεν υπερβαίνει το 8 %. Επίσης παρατηρούμε ότι οι τρεις τελευταίοι όροι της εξίσωσης που εκφράζουν τα διπλά μίγματα αλάτων έχουν αρνητικό πρόσημο. Αυτό σημαίνει ότι η δράση τους είναι ανταγωνιστική, δηλαδή η παρουσία του ενός άλατος μειώνει τη δράση του άλλου. Η επίλυση της παραπάνω εξίσωσης με σκοπό τον προσδιορισμό του συνδυασμού των αλάτων που θα οδηγήσει σε ζύμωση με χαμηλότερη τιμή pH έδειξε ότι ο συνδυασμός 0 % NaCl-2,74 % KCl-5,25 % CaCl₂ οδηγεί σε ζύμωση με τιμή pH 3,71.

Η μεταβολή του πληθυσμού των γαλακτικών βακτηρίων στην άλμη, όπως προκύπτει από την ολοκλήρωση των καμπυλών αύξησης των εν λόγω μικροοργανισμών, ως συνάρτηση των μιγμάτων των τριών αλάτων που χρησιμοποιήθηκαν στη ζύμωση παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.14. Η ανάλυση της γραμμικής παλινδρόμησης έδειξε ότι το πολυωνυμικό μοντέλο δευτέρου βαθμού ήταν στατιστικά σημαντικό ($P = 0,000$) ενώ ταυτόχρονα η έλλειψη προσαρμογής (lack of

fit) ήταν μη στατιστικά σημαντική ($P = 0,286$) και συνεπώς το μοντέλο αυτό επιλέχθηκε για να περιγράψει την μεταβολή του πληθυσμού των γαλακτικών βακτηρίων (LAB). Η δευτεροβάθμια πολυωνυμική εξίσωση που επιλέχθηκε είχε τη μορφή:

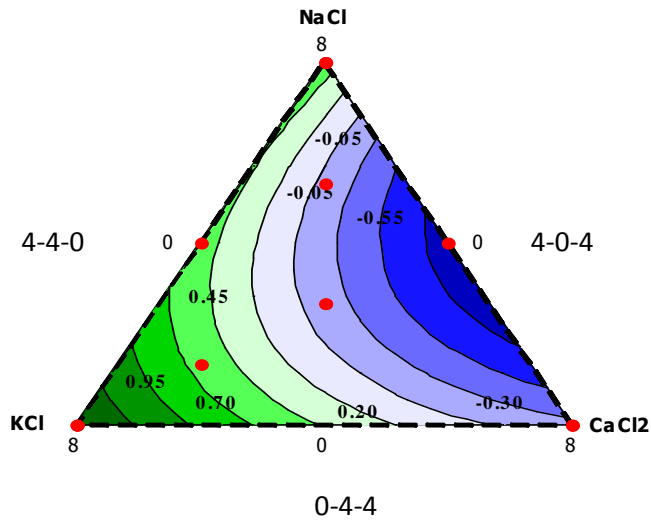
$$LAB = 0,076 \cdot NaCl + 0,183 \cdot KCl - 0,028 \cdot CaCl_2 - 0,029 \cdot NaCl \cdot KCl - 0,069 \cdot NaCl \cdot CaCl_2 - 0,011 \cdot KCl \cdot CaCl_2$$

Η παραπάνω εξίσωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό της επίδρασης οποιασδήποτε συγκέντρωσης των τριών αλάτων στη μεταβολή του πληθυσμού των γαλακτικών βακτηρίων. Από το Σχήμα 3.14 προκύπτει ότι η μεγαλύτερη αύξηση του πληθυσμού των γαλακτικών βακτηρίων παρατηρείται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις KCl, ενώ όσο η συγκέντρωση του άλατος αυτού μειώνεται τόσο μειώνεται και ο πληθυσμός των γαλακτικών βακτηρίων (εκφραζόμενος ως επιφάνεια κάτω από την καμπύλη αύξησης – βλέπε Σχήματα 3.1 έως 3.10-). Είναι χαρακτηριστικό ότι οι τρεις τελευταίοι όροι της εξίσωσης που εκφράζουν τα διπλά μίγματα αλάτων έχουν αρνητικό πρόσημο. Αυτό σημαίνει ότι η δράση τους είναι ανταγωνιστική, δηλαδή η παρουσία του ενός άλατος μειώνει τη δράση του άλλου.

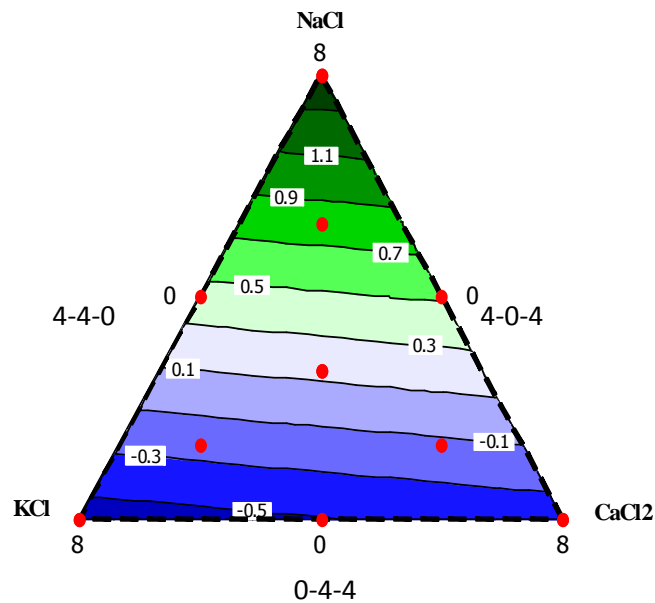
Τέλος, για τον πληθυσμό των ζυμών η ανάλυση της γραμμικής παλινδρόμησης έδειξε ότι το γραμμικό πολυωνυμικό μοντέλο ήταν στατιστικά σημαντικό ($P = 0,017$), ενώ παράλληλα παρουσίασε μη στατιστικά σημαντική ($P = 0,149$) έλλειψη προσαρμογής, και συνεπώς το μοντέλο αυτό επιλέχθηκε για να περιγράψει την μεταβολή του πληθυσμού των ζυμών (Σχήμα 3.15).

$$yeasts = 0,182 \cdot NaCl - 0,075 \cdot KCl - 0,051 \cdot CaCl_2$$

Από τους συντελεστές της παραπάνω εξίσωσης παρατηρούμε ότι η επίδραση του NaCl στη μεταβολή του πληθυσμού των ζυμών ήταν σημαντικότερη από τα άλλα δύο άλατα, των οποίων η δράση ήταν ανταγωνιστική (αρνητικό πρόσημο) όταν βρίσκονταν μαζί με το NaCl.



Σχήμα 3.14. Ισοϋψείς καμπύλες των μετασχηματισμένων επιφανειών που εκφράζουν την αύξηση του πληθυσμού των γαλακτικών βακτηρίων κατά τη ζύμωση φυσικά ώριμου ελαιοκάρπου σαν συνάρτηση της συγκέντρωσης των αλάτων NaCl, KCl, CaCl₂.



Σχήμα 3.15. Ισοϋψείς καμπύλες των μετασχηματισμένων επιφανειών που εκφράζουν την αύξηση του πληθυσμού των ζυμών σαν συνάρτηση της συγκέντρωσης των αλάτων NaCl, KCl και CaCl₂.

3.3 Πτητικά συστατικά στην άλμη

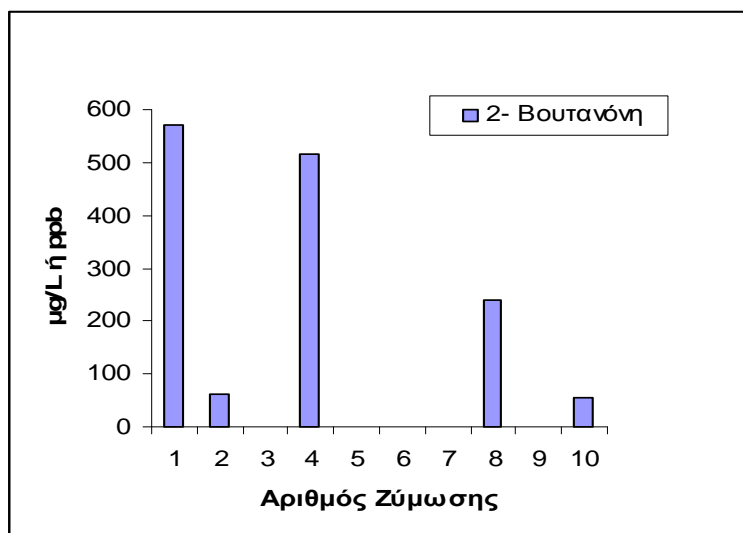
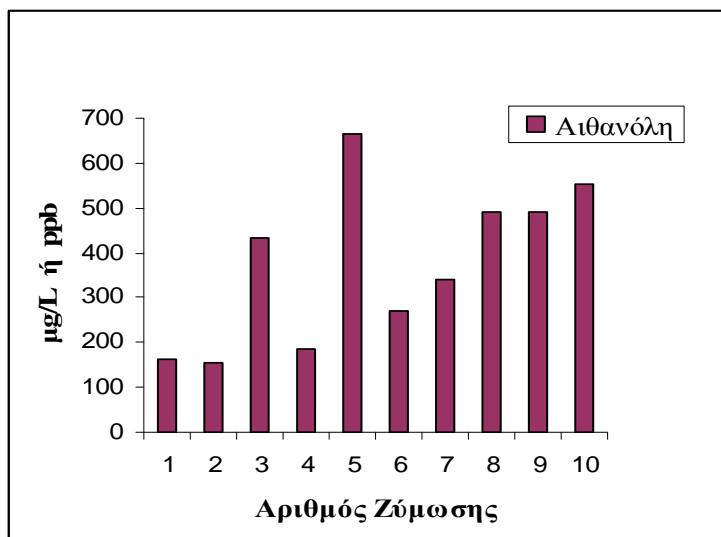
Τα πτητικά συστατικά της άλμης των διαφόρων ζυμώσεων που μελετήθηκαν στο τέλος του πειράματος (60 ημέρες) αναλύθηκαν με αέρια χρωματογραφία – φασματοσκοπία μάζας (GC-MS) και τα κυριότερα από αυτά, που βρέθηκαν σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις παρουσιάζονται στα Σχήματα 3.16-3.19. Οι ουσίες που ανιχνεύθηκαν στις άλμες παρουσιάζονται στους Πίνακες 3.3 και 3.4.

Πίνακας 3.3. Παρουσία πτητικών συστατικών στις ζυμώσεις με κωδικό 1,2,3,4,5,6,7,8,9 και 10 μετά από 60 ημέρες ζύμωσης.

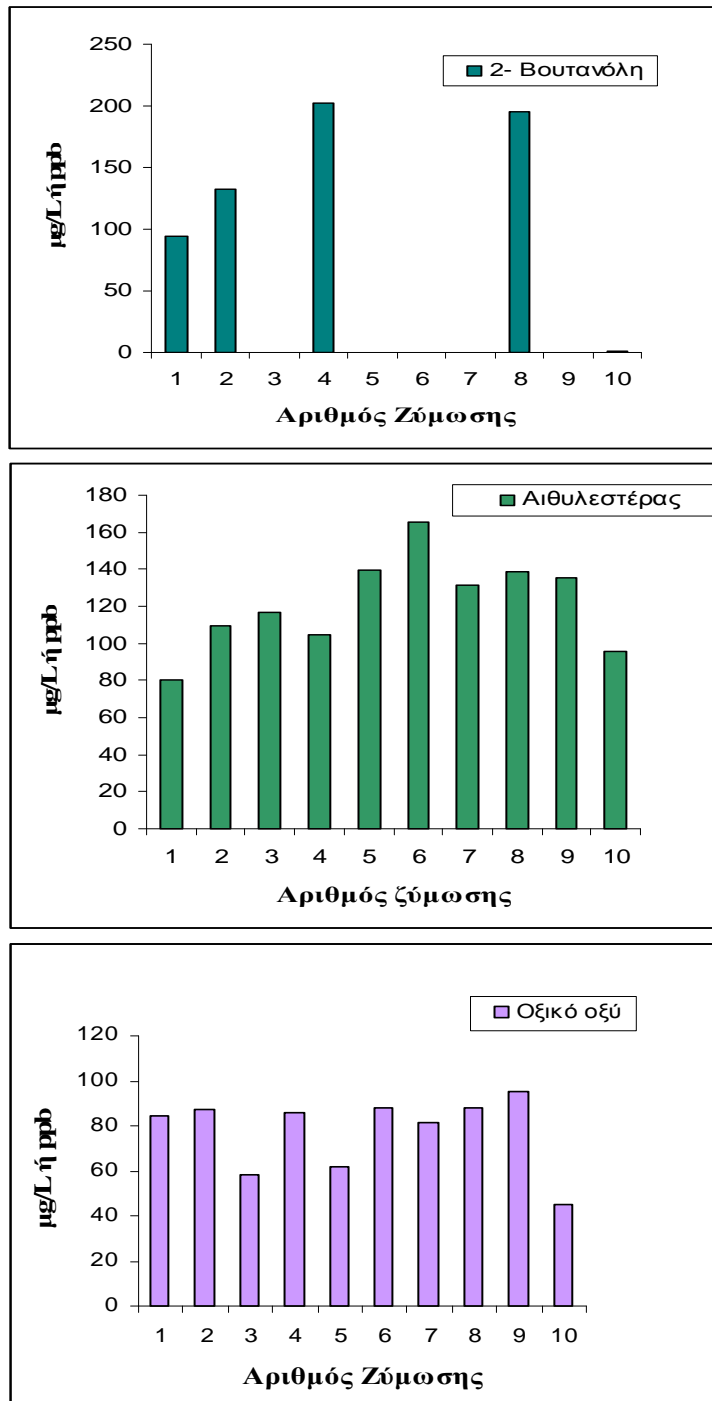
Πτητικά Συστατικά	LRI	Time	Αριθμός ζύμωσης									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Methanol	494	1,477	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acetaldehyde	500	1,515	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ethyl alcohol	511	1,584	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dimethyl sulfide	539	1,759	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Methyl acetate	544	1,791	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Propanol	563,6	1,912	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Diacetyl	589,1	2,071	+	+	+	+		+	+		+	+
Methylethyl ketone(2-	600,7	2,15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-Butanol	600,4	2,144	+	+	+	+	tr	+	+	+	+	+
2-Methyl-3-buten-2-ol	607,1	2,219			+		+	+	+	+	+	+
Ethyl acetate	610,3	2,255	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
isobutyl alcohol	619,1	2,355	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Methyl propionate	621,6	2,383	+	+		+			+	+		+
acetic acid	636,2	2,549	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3-Methylbutyraldehyde;	644,9	2,646	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Butylalcohol	654,8	2,758	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-Methylbutyraldehyde; 2-	655,3	2,764	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-Pentanol	699,6	3,264	+	+		+	+	+	+	+	+	+
3-Pentanol	700,0	3,27	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Propionic acid	707	3,461	+	+			+					+
Ethyl propionate	709,6	3,533	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
n-Propyl acetate	711,3	3,581	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Methyl butyrate	717,1	3,74										
3-Methyl-3-buten-1-ol	723,7	3,922	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3-Hydroxy-2-butanone	710,3	3,553	+		+		+	+	+		+	+
Isoamyl alcohol	726,4	3,995	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-Methyl-1-butanol	729,7	4,087	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1-Methylpropyl acetate	752,6	4,716	+	+		+			+	+		
Amyl alcohol	761	4,939	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Isobutylacetate	770	5,212				+		+	+	+		
3-Methyl-2-buten-1-ol	771,3	5,23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Butyric acid	787,6	5,68	+				+					
2,3-Butanediol	793,6	5,844	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Πίνακας 3.4. Παρουσία πτητικών συστατικών στις ζυμώσεις φυσικής μαύρης ελιάς μετά από 60 ημέρες επεξεργασίας.

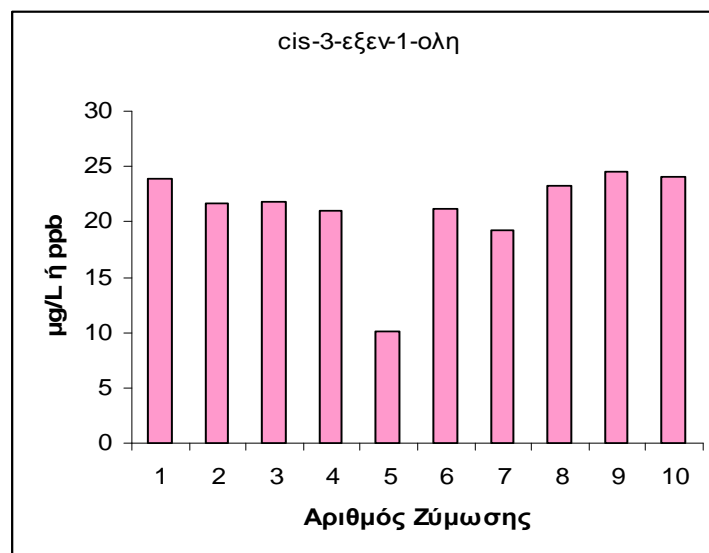
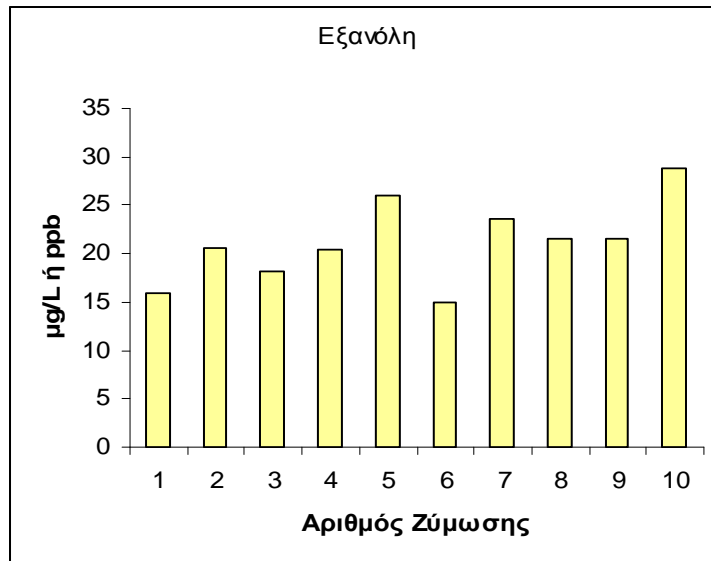
Πτητικά Συστατικά	LRI	Χρόνος	Αριθμός ζύμωσης									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ethyl butyrate	803,4	6,16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hexanal	800,9	6,057	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Propyl propionate	811,4	6,493										
Ethyl lactate	815	6,627	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4-Methyl-1-pentanol	836,4	7,529	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Propanoic acid, 1-	851	8,132										
trans-3-Hexenol (E)	852,9	8,212	+	+		+	+	+	+	+	+	+
cis-3-Hexenol (Z)	855	8,299	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-Hexen-1-ol (trans)	867	8,799	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1-Hexanol	869,4	8,902	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Isoamyl acetate	878,8	9,266	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-Methylbutylacetate	881,2	9,385	tr	+	tr	+	tr	+	tr	+	+	tr
2-Heptanone	891,4	9,81	+		+	+	+	+	+	+	+	
2-Heptanol	901,5	10,233	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Heptanal	901,6	10,235	+	+			+	+				
Benzaldehyde	958,5	12,684	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-Hepten-1-ol (E)	971	13,21	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Heptyl alcohol	971,8	13,26	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Phenol	984,4	13,801	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hexanoic acid	981,6	13,678	+	+	+		+				+	
cis-3-Hexenyl acetate	1008,	14,82	+	+	+	+		+	+	+	+	
Hexyl acetate	1015,	15,113										
Benzyl alcohol	1033,	15,836	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Phenylacetaldehyde	1043,	16,218	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Linaloloxide (cis, isomer)	1072,	17,42	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1-Octanol	1072,	17,42	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Benzaldehyde, 4-methyl	1079,	17,693	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Guaiacol	1088,	18,053	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Phenethyl alcohol	1112,	18,99	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Benzyl acetate	1165	20,98	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4-Ethyl phenol	1167,	21,071	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
alpha-Terpineol	1190,	21,941	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Phenol, 2-methoxy-4-	1192,	22,01	+	+	+		+	+	+	+	+	+
Phenethyl acetate	1257,	24,317	+	+	+	+		+	+	+	+	
Phenol, 4-ethyl-2-methoxy-	1279	25,078	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+



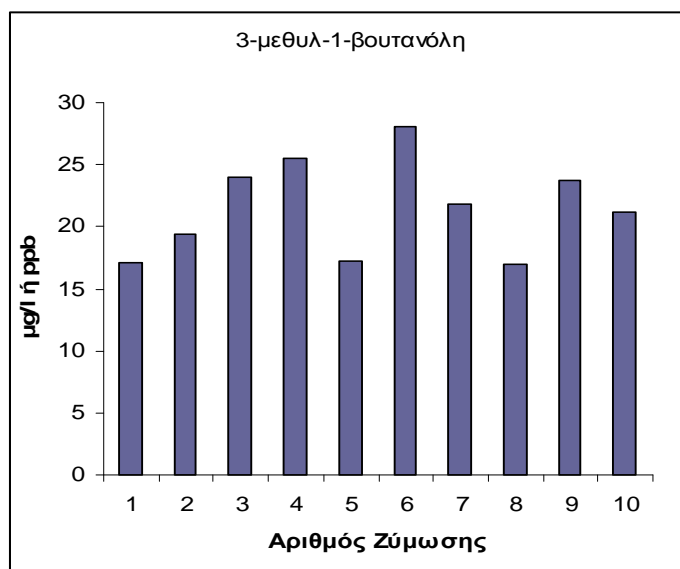
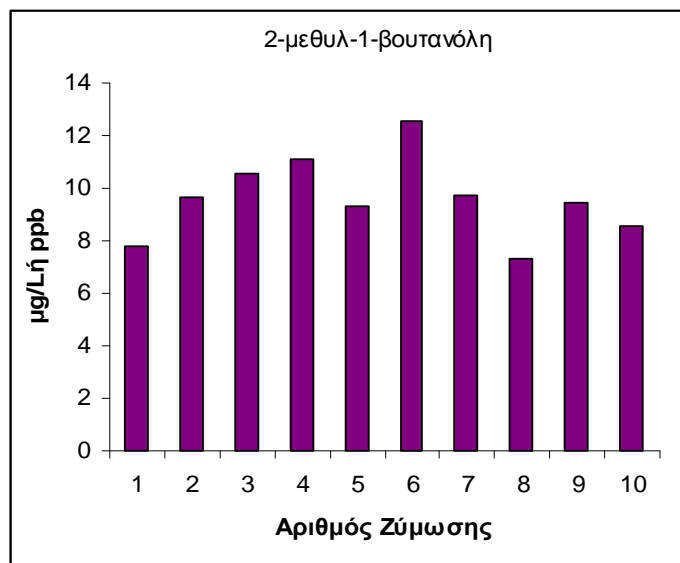
Σχήμα 3.16. Μεταβολή της συγκέντρωσης των πηκτικών συστατικών αιθανόλη και 2-βουτανόνη μεταξύ των διαφόρων ζυμώσεων με διαφορετικές αναλογίες αλάτων: (1) 8-0-0, (2) 4-4-0, (3) 4-0-4, (4) 0-8-0, (5) 0-4 -4, (6) 0-0-8, (7) 2,6-2,6-2,6, (8) 5,33-1,33-1,33, (9) 1,33-5,33-1,33, (10) 1,33-1,33-5,33. Οι αριθμοί αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις (%) NaCl, KCl και CaCl₂ αντίστοιχα.



Σχήμα 3.17. Σημαντικές διαφορές στην συγκέντρωση των πτητικών συστατικών 2-βουτανόλη, αιθυλεστέρας και οξικό οξύ μεταξύ των διαφόρων ζυμώσεων με διαφορετικές αναλογίες αλάτων: (1) 8-0-0, (2) 4-4-0, (3) 4-0-4, (4) 0-8-0, (5) 0-4 -4, (6) 0-0-8, (7) 2,6-2,6-2,6, (8) 5,33-1,33-1,33, (9) 1,33-5,33-1,33, (10) 1,33-1,33-5,33. Οι αριθμοί αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις (%) NaCl, KCl και CaCl₂ αντίστοιχα.



Σχήμα 3.18. Σημαντικές διαφορές στην συγκέντρωση των πτητικών συστατικών εξανόλη και cis-3-εξεν-1-όλη μεταξύ των διαφόρων ζυμώσεων με διαφορετικές αναλογίες αλάτων: (1) 8-0-0, (2) 4-4-0, (3) 4-0-4, (4) 0-8-0, (5) 0-4 -4, (6) 0-0-8, (7) 2,6-2,6-2,6, (8) 5,33-1,33-1,33, (9) 1,33-5,33-1,33, (10) 1,33-1,33-5,33. Οι αριθμοί αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις (%) NaCl, KCl και CaCl₂ αντίστοιχα.



Σχήμα 3.19 . Σημαντικές διαφορές στην συγκέντρωση των πτητικών συστατικών εξανόλη και cis-3-εξεν-1-όλη μεταξύ των διαφόρων ζυμώσεων με διαφορετικές αναλογίες αλάτων: (1) 8-0-0, (2) 4-4-0, (3) 4-0-4, (4) 0-8-0, (5) 0-4-4, (6) 0-0-8, (7) 2,6-2,6-2,6, (8) 5,33-1,33-1,33, (9) 1,33-5,33-1,33, (10) 1,33-1,33-5,33. Οι αριθμοί αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις (%) NaCl, KCl και CaCl₂ αντίστοιχα.

Όπως φαίνεται στα Σχήματα 3.16 και 3.17, υψηλές ποσότητες αιθανόλης, οξικού οξέως και αιθυλ-εστέρα ανιχνεύθηκαν σε όλα τα δείγματα των ζυμώσεων. Συγκεκριμένα τα μεγαλύτερα επίπεδα αιθανόλης εντοπίστηκαν στη ζύμωση με κωδικό 5 όπου το NaCl υποκαταστάθηκε πλήρως από 4% KCl και 4% CaCl₂, ενώ ακολουθεί η ζύμωση με κωδικό 10 (1,33% NaCl -1,33% KCl -5,33% CaCl₂). Το οξικό οξύ βρέθηκε στα ίδια επίπεδα για τις ζυμώσεις 1,2,4,6,8 και 9 (σε μεγαλύτερα επίπεδα βρέθηκε στην περίπτωση με κωδικό 9, 1,33%NaCl-5,33%KCl-1,33%CaCl₂, και ήταν περίπου 95 μg/L) και σε μικρότερα επίπεδα, κατά φθίνουσα σειρά, στις ζυμώσεις με κωδικούς 3,5,7 και 10 (περίπου 45 μg/L). Η ποσότητα του αιθυλεστέρα κυμάνθηκε από 80 μg/L(ζύμωση με κωδικό 1, 8%NaCl-0%KCl-0%CaCl₂) έως 140 μg/L (ζύμωση με κωδικό 6, 0%NaCl-0%KCl-8%CaCl₂) περίπου. Οι πτητικές ουσίες 2-βουτανόλη και 2-βουτανόνη δεν ανιχνεύθηκαν σε σημαντικές ποσότητες σε όλες τις περιπτώσεις των ζυμώσεων. Η 2-βουτανόλη βρέθηκε σε υψηλά επίπεδα στις ζυμώσεις με κωδικό 4 (0%NaCl-8%KCl-0%CaCl₂, 195μg/L) και 8 (5,33%NaCl-1,33%KCl-1,33%CaCl₂, και ακολουθούν οι ζυμώσεις με κωδικό 2 και 1 (95 μg/L περίπου). Στις υπόλοιπες περιπτώσεις ανιχνεύθηκε 2-βουτανόλη αλλά σε ποσότητα μικρότερη από 0,5μg/L. Η 2-βουτανόνη στη ζύμωση με κωδικό 1 βρέθηκε σε ποσότητα 570μg/L περίπου, και ακολουθεί η ζύμωση με κωδικό 4 (515μg/L). Στις ζυμώσεις με κωδικούς 8, 2 και 10 βρέθηκε σε μικρότερα επίπεδα (από 242 έως 56 μg/L), ενώ στις υπόλοιπες περιπτώσεις η ποσότητα της 2-βουτανόνης ήταν μικρότερη από 0,5 μg/L.

Τα πτητικά μόρια εξανόλη, cis-3-εξεν-1-όλη, 2-μεθυλ-1-βουτανόλη και 3-μεθυλ-1-βουτανόλη ανιχνεύθηκαν σε όλες τις περιπτώσεις των ζυμώσεων σε μικρές ποσότητες. Η ποσότητα της εξανόλης στις διάφορες ζυμώσεις κυμάνθηκε από 15 (ζύμωση με κωδικό 6) έως 29 μg/L (ζύμωση με κωδικό 10). Η cis-3-ξεν-1-όλη βρέθηκε σε μικρότερο επίπεδο στη ζύμωση με κωδικό 5 (10 μg/L), ενώ στις υπόλοιπες ζυμώσεις η ποσότητά της κυμαίνονταν από 19,5 έως 25 μg/L). Η 2-μεθυλ-1-βουτανόλη ανιχνεύθηκε σε ποσότητες που κυμαίνονταν από 8 (ζύμωση με κωδικό 8) έως 13 μg/L (ζύμωση με κωδικό 6) περίπου και η 3-μεθυλ-1-βουτανόλη βρέθηκε επίσης σε μεγαλύτερη ποσότητα στη ζύμωση με κωδικό 6 (28 μg/L) και σε μικρότερη στην ζύμωση με κωδικό 8 (17 μg/L) που ήταν στο ίδιο επίπεδο με την ζύμωση με κωδικό 5.

3.4 Τα οργανικά οξέα στην άλμη

Τα οργανικά οξέα που περιέχονταν στην άλμη των υπό μελέτη ελιών προσδιορίστηκαν, όπως προαναφέρθηκε, με τη μέθοδο HPLC. Συγκεκριμένα, η επεξεργασία – ολοκλήρωση των χρωματογραφημάτων των πρότυπων διαλυμάτων του γαλακτικού, κιτρικού, μηλικού, ηλεκτρικού και οξικού οξέος, των κορυφών που αντιστοιχούν στην περιεκτικότητα του κάθε οξέος έδωσε τη σχέση συγκέντρωσης - εμβαδού τους και δημιουργήθηκε πρότυπη καμπύλη αναφοράς σε σύστημα συντεταγμένων με τη συγκέντρωση στον άξονα των χ και το εμβαδόν (επιφάνεια κορυφής) στον άξονα των ψ . Επίσης βρέθηκε η εξίσωση της ευθείας, μέσω της οποίας υπολογίστηκε η συγκέντρωση κάθε οξέος. Στη συνέχεια έγινε επεξεργασία των χρωματογραφημάτων της άλμης των δειγμάτων για τους χρόνους 0, 13, 27, 46 και 53 ημέρες και με τη βοήθεια των πρότυπων καμπυλών των οξέων, βρέθηκαν οι συγκεντρώσεις τους στα δείγματα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους Πίνακες 3.5 και 3.6. Το κύριο μεταβολικό προϊόν, σε όλες τις περιπτώσεις ζύμωσης σε άλμη και διαφορετικές αναλογίες αλάτων (NaCl , KCl και CaCl_2), ήταν το γαλακτικό οξύ. Μετά από 53 ημέρες ζύμωσης στην άλμη της ζύμωση με κωδικό 1 με αναλογία αλάτων 8%-0%-0% (NaCl-KCl-CaCl_2) βρέθηκε 0,91% γαλακτικό οξύ. Στην άλμη των ζυμώσεων με κωδικούς 2, 5, 7, 8 και 10 (βλέπε Πίνακα 2.1) η ποσοστιαία συγκέντρωση του γαλακτικού οξέως ήταν όμοια με αυτή του μάρτυρα (ζύμωση Νο 1). Στη άλμη των ζυμώσεων με κωδικό 3, 4 και 9 η ποσότητα γαλακτικού οξέως που παράχθηκε ήταν περισσότερη από του μάρτυρα. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση μετά από 53 ημέρες ζύμωσης βρέθηκε στην άλμη της ζύμωσης με κωδικό 9, η οποία έχει αναλογία αλάτων 1,33%-5,33%-1,33% (NaCl-KCl-CaCl_2). Στην άλμη της ζύμωσης με κωδικό 6 με αναλογία αλάτων 0%-0%-8% (NaCl-KCl-CaCl_2) φαίνεται ότι παράχθηκε η μικρότερη ποσότητα γαλακτικού οξέως.

Πίνακας 3.5 Αλλαγές στη συγκέντρωση (%) γαλακτικού, κιτρικού, μηλικού, ηλεκτρικού, φορμικού, και οξικού οξέως κατά τη διάρκεια της ζύμωσης σε άλμη διαφορετικής συγκέντρωσης σε άλατα NaCl, KCl και CaCl₂ (ζυμώσεις Νο 1-5).

Αριθμός ζύμωσης	Ημέρες ζύμωσης	Γαλακτικό οξύ%	Κιτρικό οξύ%	Μηλικό οξύ%	Ηλεκτρικό οξύ%	Φορμικό οξύ%	Οξικό οξύ%
1	0	0,273	0,000	0,005	0,071	0,005	0,000
	13	0,354	0,171	0,043	0,071	0,111	0,016
	27	0,768	0,171	0,217	0,306	0,070	0,350
	46	0,505	0,148	0,108	0,157	0,051	0,257
	53	0,910	0,251	0,092	0,149	0,144	0,350
2	0	0,273	0,004	0,005	0,071	0,005	0,000
	13	0,344	0,247	0,087	0,078	0,130	0,016
	27	0,688	0,162	0,173	0,149	0,056	0,288
	46	0,799	0,211	0,184	0,118	0,065	0,366
	53	0,940	0,162	0,005	0,047	0,093	0,257
3	0	0,243	0,000	0,005	0,063	0,000	0,000
	13	0,485	0,139	0,108	0,102	0,148	0,000
	27	0,293	0,076	0,003	0,055	0,116	0,039
	46	0,890	0,180	0,211	0,251	0,079	0,319
	53	1,264	0,395	0,320	0,400	0,190	0,529
4	0	0,283	0,000	0,005	0,071	0,000	0,000
	13	0,495	0,180	0,119	0,125	0,251	0,062
	27	0,536	0,162	0,049	0,086	0,037	0,366
	46	0,829	0,207	0,027	0,071	0,060	0,366
	53	1,213	0,296	0,027	0,086	0,153	0,482
5	0	0,283	0,004	0,005	0,071	0,005	0,000
	13	0,546	0,171	0,136	0,118	0,274	0,000
	27	0,465	0,126	0,103	0,102	0,056	0,202
	46	0,819	0,278	0,190	0,322	0,125	0,405
	53	0,940	0,215	0,211	0,314	0,093	0,420

Πίνακας 3.6 Αλλαγές στη συγκέντρωση (%) γαλακτικού, κιτρικού, μηλικού, ηλεκτρικού, φορμικού, και οξικού οξέως κατά τη διάρκεια της ζύμωσης σε άλμη διαφορετικής συγκέντρωσης σε άλατα NaCl, KCl και CaCl₂ (ζυμώσεις Νο 6-10).

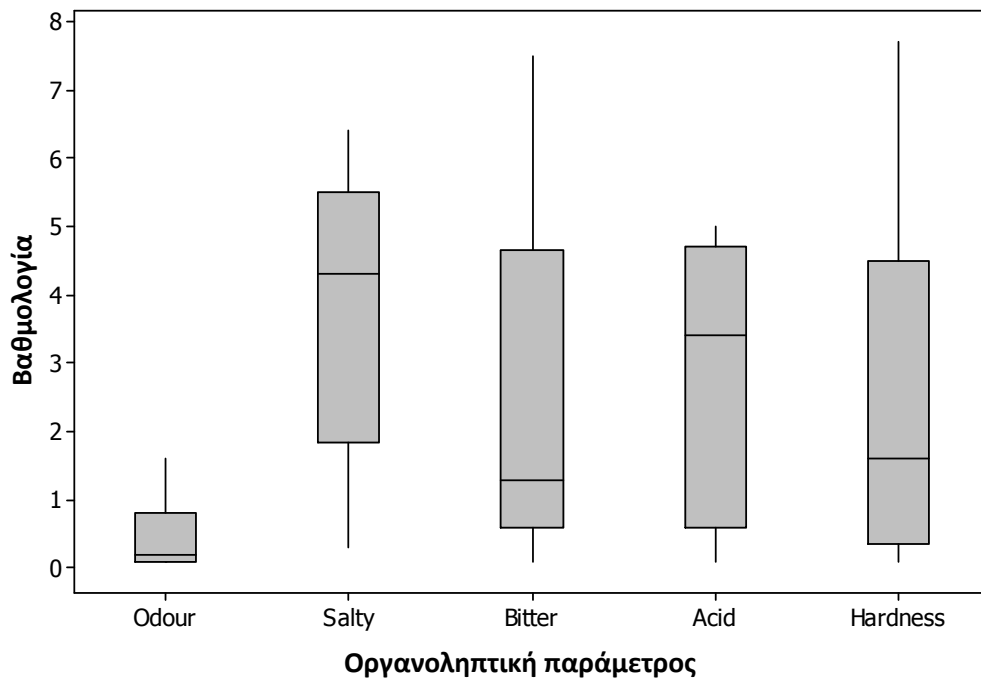
Αριθμός ζύμωσης	Ημέρες ζύμωσης	Γαλακτικό οξύ%	Κιτρικό οξύ%	Μηλικό οξύ%	Ηλεκτρικό οξύ%	Φορμικό οξύ%	Οξικό οξύ%
6	0	0,273	0,004	0,005	0,063	0,005	0,000
	13	0,415	0,135	0,049	0,086	0,251	0,000
	27	0,435	0,153	0,000	0,094	0,278	0,070
	46	0,789	0,323	0,233	0,314	0,135	0,304
	53	0,354	0,103	0,022	0,063	0,046	0,078
7	0	0,283	0,000	0,005	0,063	0,005	0,000
	13	0,475	0,180	0,044	0,071	0,176	0,000
	27	0,506	0,211	0,000	0,180	0,213	0,078
	46	0,768	0,278	0,125	0,086	0,107	0,374
	53	0,991	0,314	0,255	0,235	0,158	0,568
8	0	0,293	0,000	0,005	0,071	0,005	0,000
	13	0,688	0,063	0,136	0,149	0,227	0,000
	27	0,445	0,058	0,065	0,110	0,042	0,101
	46	0,677	0,171	0,060	0,110	0,097	0,257
	53	0,859	0,207	0,065	0,110	0,107	0,280
9	0	0,293	0,004	0,011	0,071	0,000	0,000
	13	0,445	0,090	0,033	0,071	0,144	0,023
	27	0,799	0,157	0,081	0,510	0,070	0,272
	46	1,304	0,395	0,125	0,227	0,158	0,436
	53	2,204	0,687	0,238	0,384	0,320	0,825
10	0	0,334	0,000	0,005	0,078	0,000	0,000
	13	0,333	0,063	0,016	0,047	0,125	0,000
	27	0,597	0,162	0,141	0,125	0,269	0,062
	46	0,758	0,292	0,103	0,141	0,079	0,117
	53	0,829	0,269	0,092	0,165	0,107	0,249

3.5 Οργανοληπτική αξιολόγηση

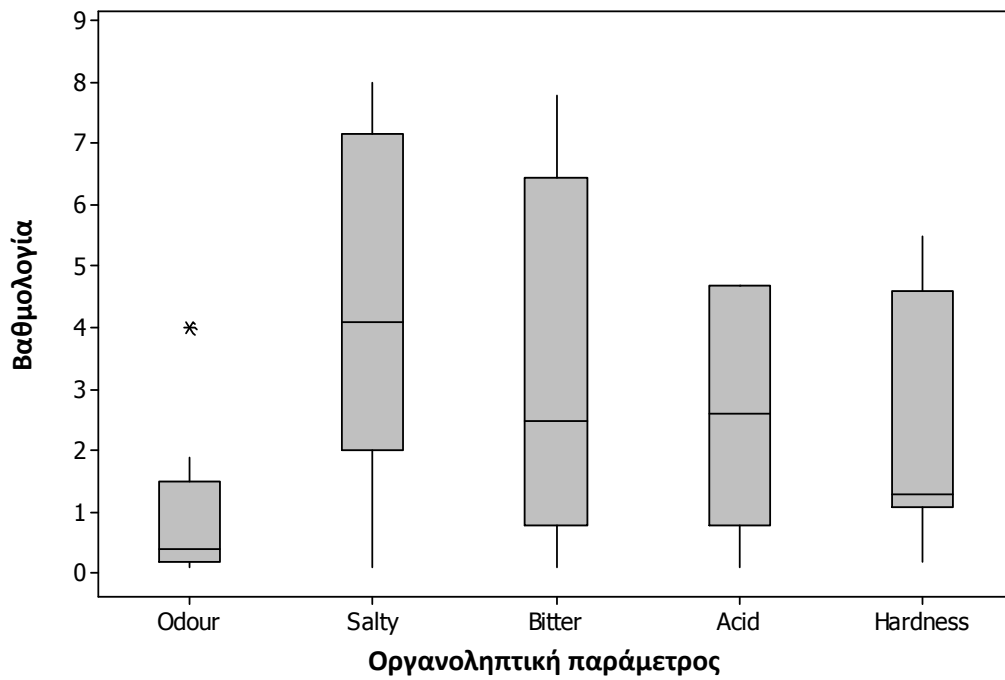
Η οργανοληπτική αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε από ομάδα 10 μη εκπαιδευμένων δοκιμαστών από το προσωπικό του εργαστηρίου. Οι μη εκπαιδευμένοι δοκιμαστές χρησιμοποιήθηκαν περισσότερο με την έννοια των «καταναλωτών» για να αξιολογήσουν εάν θα επέλεγαν για κατανάλωση τα δείγματα ελιάς, παρά με την έννοια των εμπειρογνομόνων στην αξιολόγηση της επιτραπέζιας ελιάς. Για την αξιολόγηση χρησιμοποιήθηκε το σχετικό δελτίο από τον κανονισμό του Διεθνούς Συμβουλίου Ελαιολάδου για την οργανοληπτική αξιολόγηση της επιτραπέζιας ελιάς (κείμενο εργασίας OT/WG 1/Doc. no. 5-3). Από τις τιμές αρεσκείας που δόθηκαν από τους δοκιμαστές υπολογίστηκε η διάμεσος τιμή (median) και στη συνέχεια υπολογίστηκε για κάθε δείγμα γράφημα Box and whiskers

προκειμένου να προσδιοριστούν έκτοπες τιμές (outliers) οι οποίες στη συνέχεια απομακρύνθηκαν. Η τελική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με αραχνοειδές διάγραμμα (spider plot).

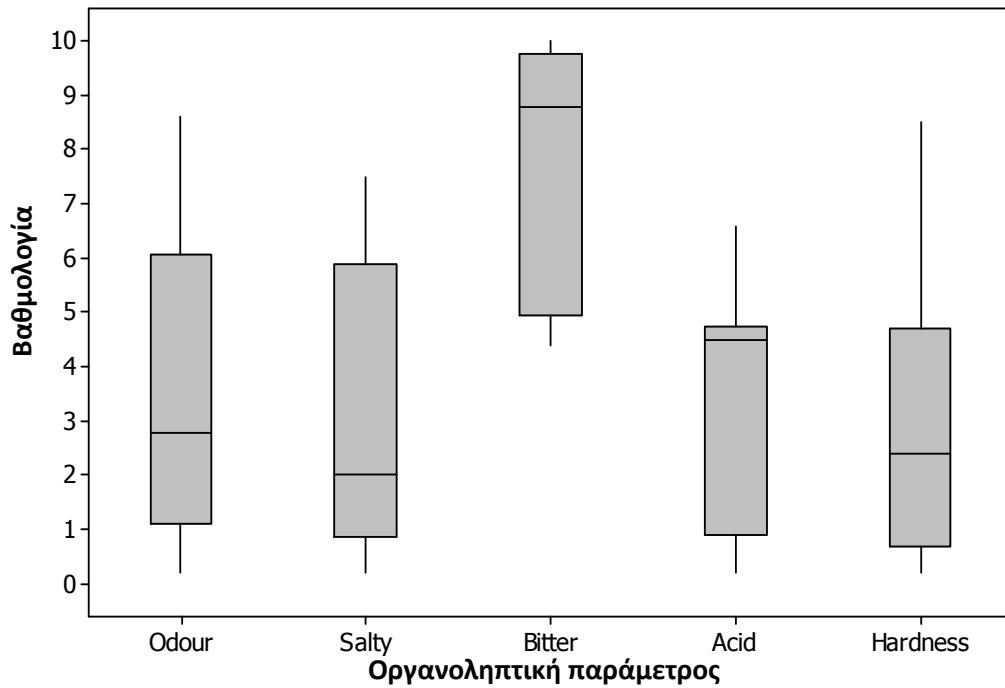
Τα αποτελέσματα της αξιολόγησης (γραφήματα Box and whisker) για τα επιμέρους δείγματα της επιτραπέζιας ελιάς (κωδικοί ζύμωσης 1-10) που αντιστοιχούν στις ζυμώσεις με τα διαφορετικά μίγματα αλάτων παρουσιάζονται στα Σχήματα 3.20-3.29. Παρατηρούμε ότι για κάθε οργανοληπτική παράμετρο υπάρχει μεγάλη διασπορά σημείων, γεγονός που αποδεικνύει τη δυσκολία των μη εξειδικευμένων δοκιμαστών στην αξιολόγηση της επιτραπέζιας ελιάς. Με κατάλληλη εκπαίδευση των δοκιμαστών με χρήση προτύπων δειγμάτων για κάθε οργανοληπτικό χαρακτηριστικό θα μπορούσαν να βελτιωθούν τα αποτελέσματα του οργανοληπτικού ελέγχου. Ωστόσο, μπορεί να εξαχθούν πολύ σημαντικά συμπεράσματα και από τη σύγκριση των γραφημάτων. Η ζύμωση αναφοράς που περιέχει μόνο 8 % NaCl (Σχήμα 3.20) χαρακτηρίζεται από τη μικρότερη πικράδα σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα, ιδιαίτερα εκείνα που περιέχουν υψηλή συγκέντρωση KCl (Σχήματα 3.23, 3.24, 3.26, 3.29). Όπως είναι γνωστό η αντικατάσταση του NaCl από KCl δίνει μεταλλική και πικρή γεύση στον ελαιόκαρπο κατά τη ζύμωση και θα πρέπει να αποφεύγεται, αν και τεχνολογικά η χρήση του συμβάλλει στην επιθυμητή γαλακτική ζύμωση (δηλαδή, επικράτηση των γαλακτικών βακτηρίων έναντι των ζυμών) και στην επίτευξη ικανοποιητικής τελικής τιμής pH και ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας. Πολλά υποσχόμενη φαίνεται να είναι η ζύμωση στην οποία ποσοστό 50% του NaCl έχει αντικατασταθεί από KCl (Σχήμα 3.21). Στην περίπτωση αυτή η πικρή γεύση που προσδίδει το KCl 'καλύπτεται' από το NaCl και δημιουργεί τελικό προϊόν με χαμηλή αλατότητα και πικράδα. Επιπλέον, οι υψηλές συγκεντρώσεις CaCl₂ με/χωρίς την παρουσία KCl προσδίδουν συστηματικά υψηλότερες τιμές πικράδας αν και η αλατότητα είναι ιδιαίτερα χαμηλή (Σχήματα 3.24, 3.25, 3.26, 3.28). Θα πρέπει τέλος να τονίσουμε ότι το δείγμα που περιέχει μόνο 8 % CaCl₂ (Σχήμα 3.25) δίνει καρπό με χαμηλή αλατότητα, υψηλή πικράδα, μέτρια οξύτητα και υψηλότερη σκληρότητα.



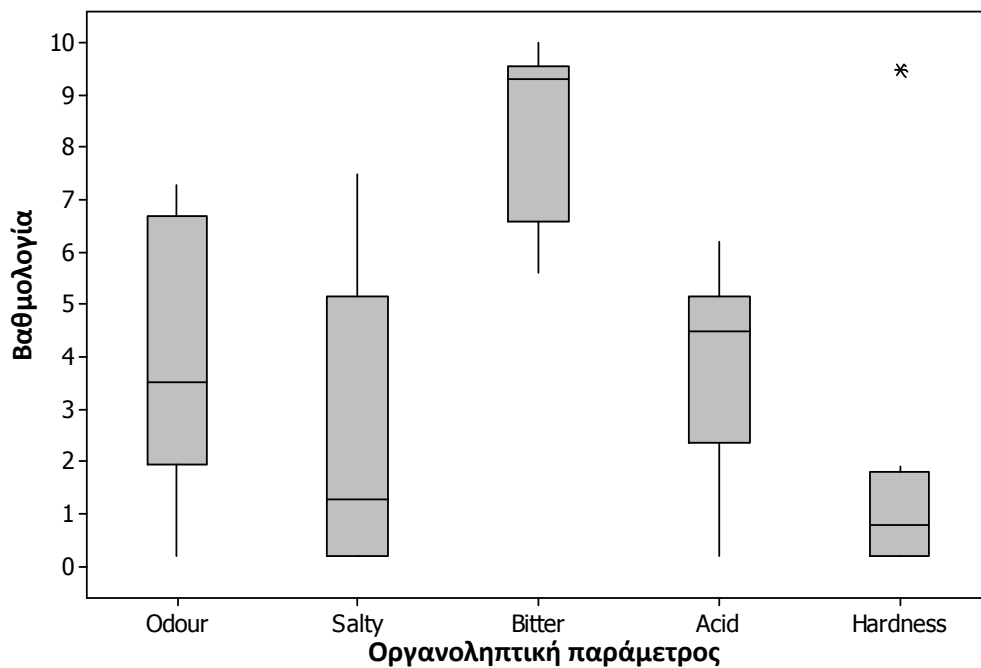
Σχήμα 3.20: Βαθμολογία οργανοληπτικής δοκιμής φυσικής μαύρης επιτραπέζιας ελιάς κατά τη ζύμωση με μίγμα αλάτων 8 % NaCl - 0 % KCl - 0 % CaCl₂.



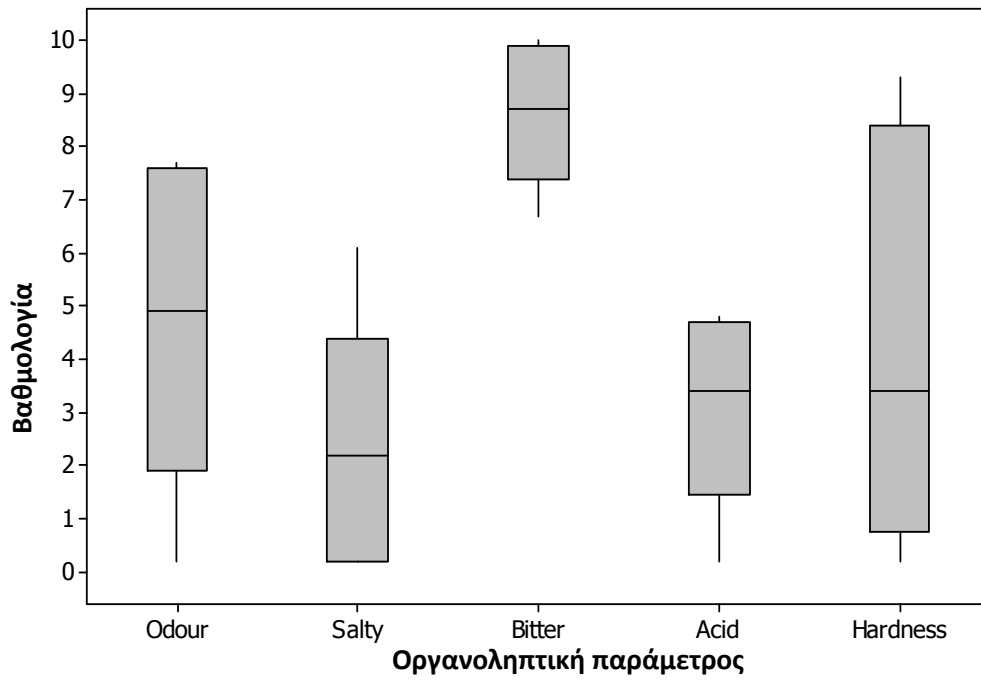
Σχήμα 3.21: Βαθμολογία οργανοληπτικής δοκιμής φυσικής μαύρης επιτραπέζιας ελιάς κατά τη ζύμωση με μίγμα αλάτων 4 % NaCl - 4 % KCl - 0 % CaCl₂. Το σημείο με αστερίσκο είναι έκτοπο (oulier).



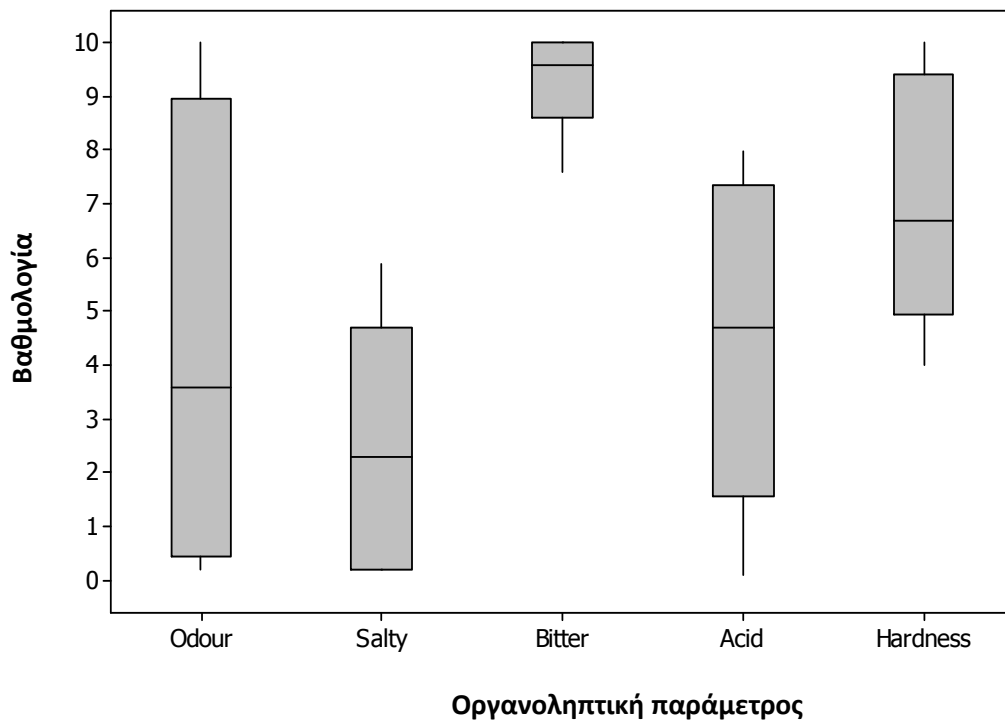
Σχήμα 3.22: Βαθμολογία οργανοληπτικής δοκιμής φυσικής μαύρης επιτραπέζιας ελιάς κατά τη ζύμωση με μίγμα αλάτων 4 % NaCl - 0 % KCl - 4 % CaCl₂.



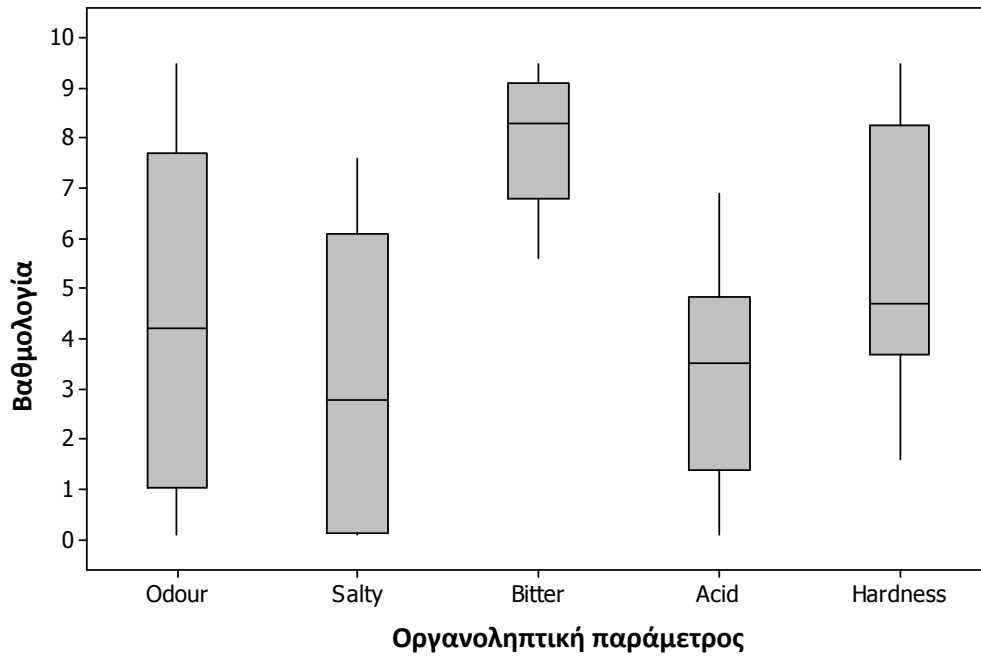
Σχήμα 3.23: Βαθμολογία οργανοληπτικής δοκιμής φυσικής μαύρης επιτραπέζιας ελιάς κατά τη ζύμωση με μίγμα αλάτων 0 % NaCl - 8 % KCl - 0 % CaCl₂. Το σημείο με αστερίσκο είναι έκτοπο (outlier).



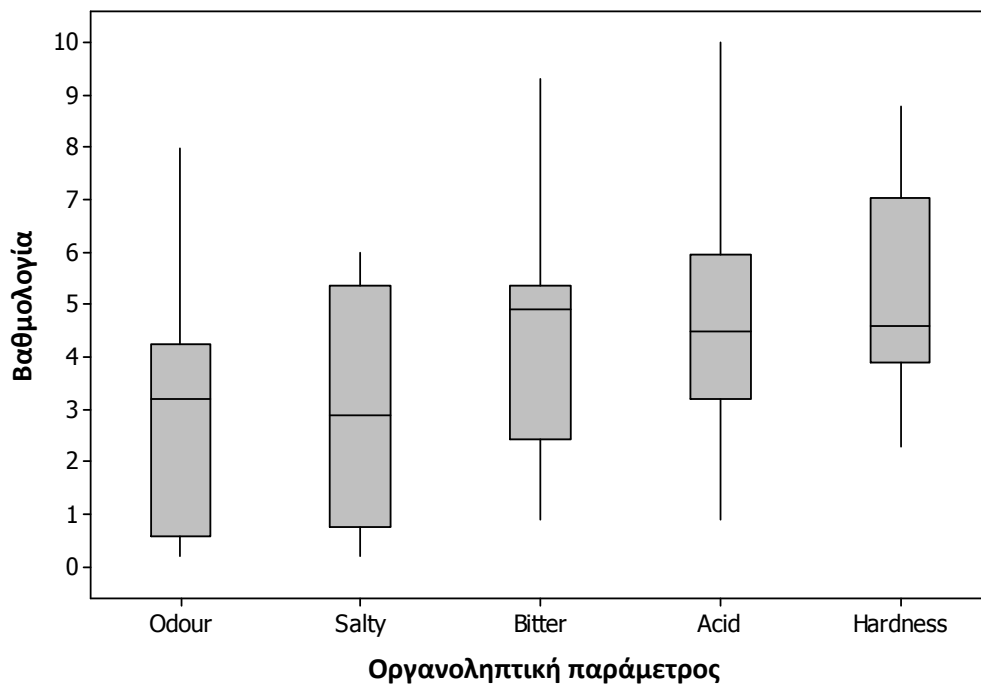
Σχήμα 3.24: Βαθμολογία οργανοληπτικής δοκιμής φυσικής μαύρης επιτραπέζιας ελιάς κατά τη ζύμωση με μίγμα αλάτων 0 % NaCl - 4 % KCl - 4 % CaCl₂.



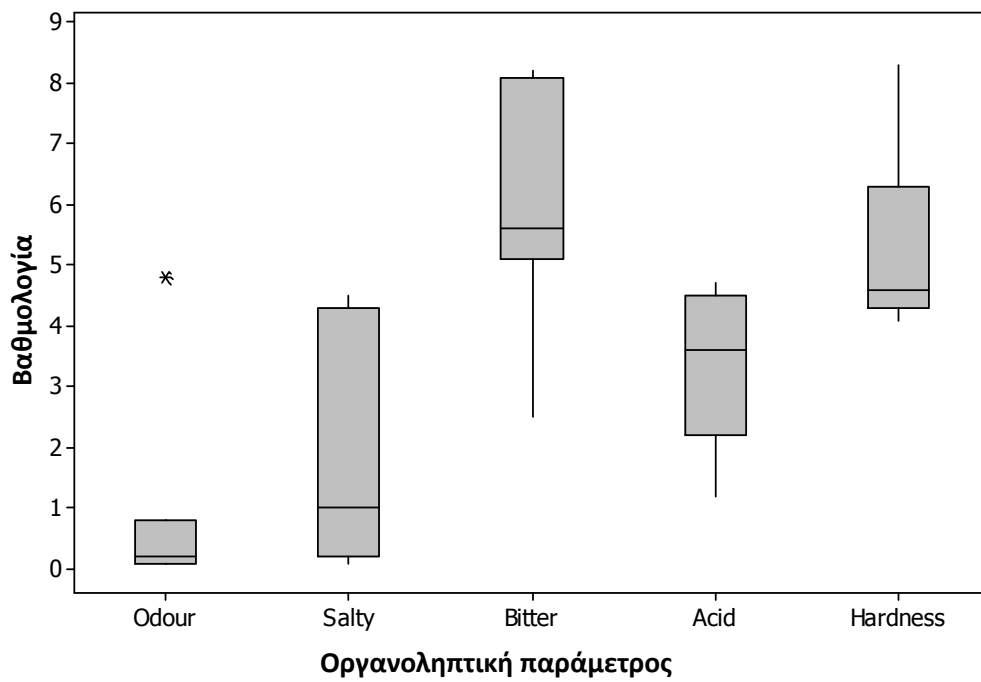
Σχήμα 3.25: Βαθμολογία οργανοληπτικής δοκιμής φυσικής μαύρης επιτραπέζιας ελιάς κατά τη ζύμωση με μίγμα αλάτων 0 % NaCl - 0 % KCl - 8 % CaCl₂.



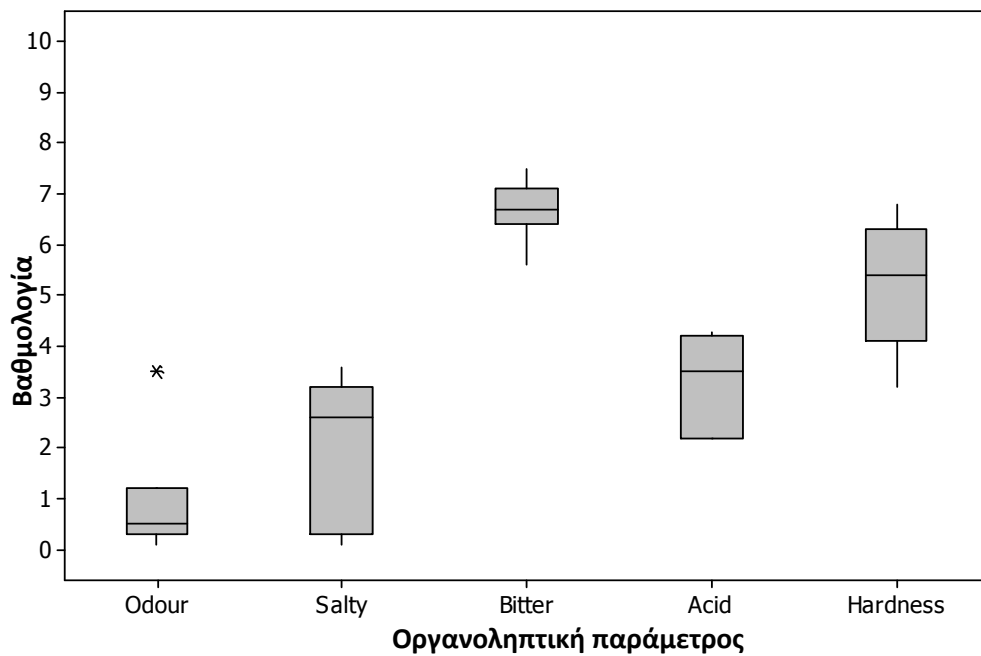
Σχήμα 3.26: Βαθμολογία οργανοληπτικής δοκιμής φυσικής μαύρης επιτραπέζιας ελιάς κατά τη ζύμωση με μίγμα αλάτων 2,66 % NaCl – 2,66 % KCl – 2,66 % CaCl₂.



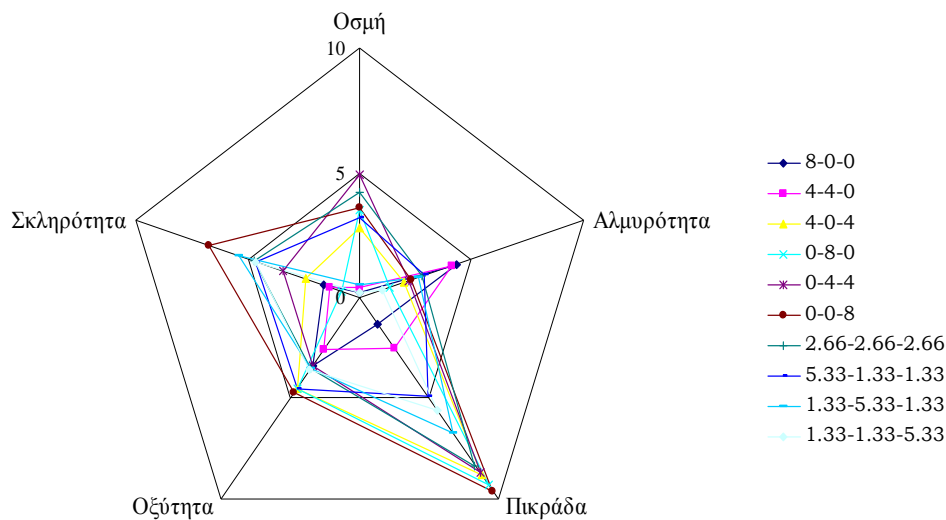
Σχήμα 3.27: Βαθμολογία οργανοληπτικής δοκιμής φυσικής μαύρης επιτραπέζιας ελιάς κατά τη ζύμωση με μίγμα αλάτων 5,33 % NaCl – 1,33 % KCl – 1,33 % CaCl₂.



Σχήμα 3.28: Βαθμολογία οργανοληπτικής δοκιμής φυσικής μαύρης επιτραπέζιας ελιάς κατά τη ζύμωση με μίγμα αλάτων 1,33 % NaCl – 1,33 % KCl – 5,33 % CaCl₂. Το σημείο με αστερίσκο είναι έκτοπο (outlier).



Σχήμα 3.29: Βαθμολογία οργανοληπτικής δοκιμής φυσικής μαύρης επιτραπέζιας ελιάς κατά τη ζύμωση με μίγμα αλάτων 1,33 % NaCl – 5,33 % KCl – 1,33 % CaCl₂. Το σημείο με αστερίσκο είναι έκτοπο (outlier).



Σχήμα 3.30. Αραχνοειδές διάγραμμα (spider plot) που δείχνει συγκεντρωτικά τη μεταβολή της διαμέσου όλων των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών στα διάφορα μίγματα αλάτων.

Η μεταβολή των διαμέσων για όλα τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και δείγματα διαφορετικών συγκεντρώσεων αλάτων παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.26. Όπως είναι φανερό από το σχήμα αυτό ο καρπός που ζυμώθηκε σε 8 % CaCl_2 παρουσίασε αυξημένη σκληρότητα συγκριτικά με τα άλλα μίγματα αλάτων. Επίσης τα δείγματα που ζυμώθηκαν σε μίγματα με υψηλή συγκέντρωση KCl και CaCl_2 είχαν περισσότερο πικρή γεύση από τα υπόλοιπα. Αντίθετα υποκατάσταση του NaCl με 50 % KCl έδωσε πολύ καλά αποτελέσματα όσον αφορά τη μειωμένη πικράδα του καρπού. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι τα δείγματα που ήταν ενισχυμένα με KCl και CaCl_2 έδωσαν χαμηλές τιμές αλατότητας παρά την πικρή γεύση που προσέδωσαν στον καρπό.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4.1 ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η υπερβολική κατανάλωση νατρίου αναφέρεται ως η βασική αιτία της υψηλής αρτηριακής πίεσης (Dickinson και Havas 2007, Karppanen και Mervaala 2006, He και MacGregor 2008), που συντελεί σε καρδιαγγειακά νοσήματα, τα οποία μπορούν να προληφθούν μειώνοντας την πρόσληψη νατρίου στο διαιτολόγιό μας (Cutler και Roccella 2006, Cook και συν. 2007). Το αλάτι (χλωριούχο νάτριο, NaCl) είναι η κύρια πηγή πρόσληψης νατρίου στο ανθρώπινο διαιτολόγιο και προέρχεται από την τροφή και ιδιαίτερα το κρέας, τα ψάρια, τα πουλερικά, τα αυγά, τους καρπούς, κλπ. Η συνιστώμενη ημερήσια πρόσληψη ανέρχεται σε 2.500 mg/ημέρα, αλλά σε προηγούμενη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στις ΗΠΑ, η συνολική πρόσληψη νατρίου του πληθυσμού υπερβαίνει τα 3.174 mg/ημέρα. Εκτιμάται ότι τα επεξεργασμένα τρόφιμα και το φαγητό εστιατορίου συμβάλουν στο 80% της ημερήσιας πρόσληψης νατρίου στις περισσότερες χώρες του Δυτικού κόσμου (Taormina 2010).

Οι Frassetto και συνεργάτες (2008) αναφέρουν ότι η συνηθισμένη κατανάλωση νατρίου στη διατροφή του Δυτικού κόσμου, οδηγεί σε ποσότητες NaCl πολύ μεγαλύτερες από τις συνιστώμενες και ποσότητες καλίου πολύ μικρότερες από το κανονικό. Οδηγεί επίσης σε αύξηση και διατήρηση της οξύτητας των υγρών του σώματος, η οποία συμβάλει στην καθαρή απώλεια ασβεστίου από το σώμα, γεγονός που μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση οστεοπόρωσης, πέτρας στα νεφρά, απώλεια μυϊκής μάζας και νεφρική ανεπάρκεια που σχετίζεται με την ηλικία.

Για λόγους όπως αυτοί που αναφέρονται παραπάνω, οι σύγχρονες διατροφικές τάσεις έχουν αναγάγει τη μείωση της πρόσληψης νατρίου σε μείζον θέμα, ίσης σημασίας με τη μειωμένη πρόσληψη λιπαρών και υδατανθράκων. Συνεπώς, ένα διαιτολόγιο πτωχό σε νάτριο και πλούσιο σε κάλιο και ασβέστιο συνιστάται για χαμηλότερη αρτηριακή πίεση. Επίσης, η πρόσληψη ασβεστίου συμβάλει στην προστασία του οργανισμού από την οστεοπόρωση και τον καρκίνο του παχέως εντέρου. Το ασβέστιο και το κάλιο περιλαμβάνονται στη σχετική Οδηγία της ΕΕ (Directive 2002/46/CE) για τη δημιουργία ενισχυμένων τροφίμων. Συνεπώς, πιθανή αντικατάσταση του νατρίου από ιόντα καλίου και ασβεστίου στις επιτραπέζιες ελιές θα είχε ευεργετική επίδραση στην υγεία. Η χρήση χλωριούχου νατρίου (NaCl) στα τρόφιμα έχει ως στόχο τη βελτίωση των οργανοληπτικών ιδιοτήτων των τροφίμων,

ενώ σε άλλες περιπτώσεις το αλάτι συντελεί στην μικροβιολογική σταθερότητα και ασφάλεια των προϊόντων.

Η βιομηχανική ζύμωση των πράσινων και μαύρων επιτραπέζιων ελιών είναι έως τώρα μια εμπειρική διαδικασία στην Ευρώπη, παρά την οικονομική της σημασία και δίνει προϊόντα χωρίς σταθερά και ομοιόμορφα ποιοτικά χαρακτηριστικά (Spyropoulou και συν. 2001). Για το λόγο αυτό, είναι σημαντικό να μελετηθούν ώστε να γίνουν περισσότερο κατανοητές οι φυσικοχημικές και μικροβιολογικές διεργασίες που ελέγχουν τη ζύμωση για να υπάρξει δυνατότητα δημιουργίας τελικού προϊόντος υψηλών και σταθερών προδιαγραφών. Η θερμοκρασία και το αλάτι είναι οι πλέον σημαντικοί παράμετροι στη διαδικασία της ζύμωσης (Tassou και συν. 2002). Οι δύο αυτοί παράγοντες, με κυρίαρχο τη συγκέντρωση του άλατος στην άλμη, ελέγχουν το μικροβιακό πληθυσμό, επηρεάζουν τη φύση της ζύμωσης με την επιλογή των διαφορετικών μικροβιακών ομάδων που κυριαρχούν σε αυτή και φυσικά επηρεάζουν τις οργανοληπτικές ιδιότητες του τελικού προϊόντος.

Στην παρούσα μελέτη ο πληθυσμός των γαλακτικών βακτηρίων αυξήθηκε μέχρι την 20^η ημέρα της ζύμωσης και στη συνέχεια δεν παρουσίασε σημαντικές αλλαγές, ενώ οι ζύμες παρουσίασαν αύξηση και στη συνέχεια μείωση μέχρι το τέλος του πειράματος. Η βαθμιαία μείωση της συγκέντρωσης του άλατος στην άλμη που έφτασε περίπου στο 4%, επέτρεψε στα γαλακτικά βακτήρια να επικρατήσουν έναντι των ζυμών, όπως έχει ήδη αναφερθεί και σε παλαιότερες μελέτες (Özay και Borcaklı 1996). Επίσης, οι González Cancho και συνεργάτες (1975) ανέφεραν την επικράτηση των γαλακτικών βακτηρίων στην ποικιλία Hojiblanca όταν η συγκέντρωση του αλατιού στην άλμη διατηρούνταν κάτω από 8%, δεδομένου ότι η συγκέντρωση αυτή δεν είναι περιοριστική για την αύξηση των γαλακτικών βακτηρίων (Balatsouras 1985). Σε άλλη μελέτη (Tassou και συν. 2002) ο τελικός πληθυσμός των γαλακτικών βακτηρίων βρέθηκε να μειώνεται βαθμιαία με την αύξηση της συγκέντρωσης του άλατος στις άλμες κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Επιπλέον η ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων επιβραδύνθηκε στις άλμες με συγκέντρωση άλατος 8%, ανεξάρτητα από τη θερμοκρασία της ζύμωσης και ευνοήθηκε η αύξηση και επικράτηση των ανθεκτικών στο αλάτι ζυμών, δίνοντας ένα προϊόν με μικρότερη οξύτητα και υψηλότερο pH. Αντίθετα, στην ίδια μελέτη (Tassou και συν. 2002), μικρότερες συγκεντρώσεις αλάτων (4% και 6%) στις άλμες, σε συνδυασμό με έλεγχο της θερμοκρασίας σε επίπεδο 18°C και 25°C, είχαν ως αποτέλεσμα μια σχετικά

ολοκληρωμένη γαλακτική ζύμωση με υψηλότερη οξύτητα και χαμηλότερο pH σε σύγκριση με τις περιπτώσεις που είχαν συγκέντρωση άλατος 8%. Σε άλλη μελέτη (Panagou και συν. 2008) στην οποία έγινε αυθόρμητη ζύμωση σε φυσικές μαύρες ελιές ποικιλίας Κονσερβολιά, σε σταθερή συγκέντρωση άλατος (6% NaCl) και θερμοκρασία (20°C), επικράτησαν επίσης τα γαλακτικά βακτήρια έναντι των ζυμών και μάλιστα οι πληθυσμοί έφθασαν στο ίδιο επίπεδο με τις περιπτώσεις που οι ζυμώσεις ενισχύθηκαν με καλλιέργειες εκκινητές (*L. plantarum* και *L. pentosus*).

Μέχρι τώρα η ζύμωση των φυσικών μαύρων ελιών εξαρτάται αποκλειστικά από την ενδογενή μικροχλωρίδα του καρπού της ελιάς, η οποία διαφέρει σε συνάρτηση με την ποιότητα της πρώτης ύλης, τις συνθήκες συγκομιδής, και την μεταχείριση μετά τη συγκομιδή, με αποτέλεσμα να υπάρχουν διαφορές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος (Garrido Fernández και συν. 1997).

Ο τελικός πληθυσμός των ζυμών στις ζυμώσεις με κωδικούς 1, 5, 6, 7 και 10 ήταν περίπου 3,0 log CFU/ml ή μικρότερος ενώ στις ζυμώσεις 2, 3, 4, 8 και 9 κυμάνθηκε μεταξύ 4,0-5,0 log CFU/ml. Παρόμοια αποτελέσματα για την ανάπτυξη των ζυμών έχουν αναφερθεί παλαιότερα για ζυμώσεις τόσο μαύρων όσο πράσινων ελιών από Έλληνες και Ισπανούς ερευνητές (Panagou και συν. 2008, Chorianoopoulos και συν. 2005, Panagou και συν. 2003, Castro και συν. 2002, Tassou και συν. 2002, Spyrgoroulou και συν. 2001). Επίσης έχει αναφερθεί η συμβολή των ζυμών στη ζύμωση των φυσικά ώριμων ελιών διάφορων ποικιλιών με υψηλές συγκεντρώσεις άλατος (10-14%, w/v) (Balatsouras 1964, Fernández Díez και Garrido Fernández 1969, Durán Quintana και συν.1971, Borcakli και συν. 1993, Özay και Borcakli 1996). Η ύπαρξη και η κατανομή των ζυμών στις Ελληνικού τύπου φυσικά μαύρες ελιές έχει περιγραφεί λεπτομερώς (Kotzekidou 1997, Psani και Kotzekidou 2006) και θεωρείται ότι η παρουσία τους επιφέρει πλεονεκτήματα στη γεύση του τελικού προϊόντος.

Το pH και η ολική ογκομετρούμενη οξύτητα στην άλμη μπορούν να θεωρηθούν ως δείκτες για την παρακολούθηση της ζύμωσης των φυσικών μαύρων ελιών. Η τιμή του pH στην άλμη στην παρούσα μελέτη στο τέλος του πειράματος για όλες τις περιπτώσεις των ζυμώσεων ήταν μεταξύ 3,8 και 3,9 με εξαίρεση τη ζύμωση με κωδικό 10 (1,33%NaCl-1,33%KCl-5,33%CaCl₂) που η τιμή του pH ήταν μικρότερη. Όμοια αποτελέσματα στις τιμές του pH αναφέρονται και σε άλλες μελέτες (Tassou

και συν. 2002, Panagou και συν. 2008). Η τιμή της οξύτητας στην άλμη στις ζυμώσεις με κωδικούς 1, 2, 3, 4 και 10 ήταν μεταξύ 0,63-0,69 g γαλακτικού οξέως/ 100 ml άλμης, ενώ στις ζυμώσεις με κωδικούς 5, 6, 7, 8 και 9 κυμάνθηκε μεταξύ 0,76 έως 0,83 g γαλακτικού οξέως/ 100 ml άλμης. Σε άλλες μελέτες των Panagou και συνεργατών (2008) και Özay και Borcackli (1996) η τιμή της οξύτητας βρέθηκε ότι ήταν περίπου 0,62 g γαλακτικού οξέως/ 100 ml άλμης και περίπου 0,6 g γαλακτικού οξέως/ 100 ml αντίστοιχα.

Η επιτραπέζια ελιά, όπως τα όσπρια (Iqbal και συν. 2006), τα φρούτα (Sánchez Castillo και συν. 1998) ή άλλα λαχανικά (Guill Guerrero και συν., 1998) είναι πλούσια σε πολύτιμα ανόργανα στοιχεία και μέταλλα, απαραίτητα για την ισορροπομένη διατροφή του ανθρώπου (Biricik και Basoglu 2006). Τα κυριότερα ανόργανα στοιχεία που απαντώνται στον καρπό της ελιάς είναι το κάλιο (K), νάτριο (Na), ασβέστιο (Ca) και μαγνήσιο (Mg) (Fransis 1999, Nergiz και Engez 2000). Κατά καιρούς έχουν γίνει αναλύσεις σε τρόφιμα για να προσδιοριστούν διάφορα ανόργανα στοιχεία με τη χρήση διαφόρων αναλυτικών τεχνικών όπως η φασματομετρία ατομικής εκπομπής (AES), η φασματομετρία ατομικής απορρόφησης (AAS), η επαγωγή συζευγμένου πλάσματος ατομικής εκπομπής (ICP-AES) και επαγωγή συζευγμένου πλάσματος φασματομετρίας μαζών (ICP-MS). Λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών της τεχνικής ICP-MS (χαμηλά όρια ανίχνευσης, ταυτόχρονη πολυστοιχειακή ανάλυση, κλπ) ο αριθμός των επιστημονικών δημοσιεύσεων που αναφέρονται στην ανάλυση δειγμάτων τροφίμων με τη μέθοδο αυτή έχει αυξηθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια (Alam και συν. 2003, Barbaste και συν. 2003, Nikkarinen και Mertanen 2004, Perez-Trujillo και συν. 2002, Roychowdhury και συν. 2003). Παρόλο που υπάρχουν πολλές δημοσιευμένες εργασίες στη βιβλιογραφία για το ελαιόλαδο, εντούτοις για την επιτραπέζια ελιά έχουν πραγματοποιηθεί λίγες μελέτες με χρήση της τεχνικής ICP (Anthemidis και συν. 2005, Angioni και συν. 2006, Jimenez και συν. 2003, Zeiner και συν. 2005). Το περιεχόμενο των επιτραπέζιων ελιών σε μεταλλικά στοιχεία, εξαρτάται κυρίως από την ποικιλία της ελιάς, τον τόπο καλλιέργειας, τις καιρικές συνθήκες, τη μέθοδο επεξεργασίας, το υλικό συσκευασίας και τη χρήση χημικών (Garcia και συν. 2002, Soares και συν. 2006).

Στην παρούσα μελέτη προσδιορίστηκε η περιεκτικότητα σε ιόντα νατρίου, καλίου και ασβεστίου του ελαιόκαρπου με τη μέθοδο της φλογοφωτομετρίας για όλες τις

περιπτώσεις των ζυμώσεων. Στη ζύμωση 1, που αποτελεί και το μάρτυρα τον πειραμάτων (8% NaCl), βρέθηκε η μεγαλύτερη συγκέντρωση Na 10,654 mg/ Kg καρπού, ενώ στις ζυμώσεις 4, 5 και 6 ανιχνεύθηκε σε μικρές συγκεντρώσεις προερχόμενο από τον νωπό καρπό. Στις υπόλοιπες ζυμώσεις προσδιορίστηκε σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 1155 έως 7520 mg/ Kg σάρκας που ήταν ανάλογες με την ποσότητα NaCl που είχε προστεθεί στην αρχική άλμη κάθε ζύμωσης.

Σε μελέτη που έγινε στην Ισπανία (López και συν. 2008) αναφέρεται ότι το νάτριο ήταν σε αφθονία όπως ήταν αναμενόμενο, επειδή οι επιτραπέζιες ελιές είναι τρόφιμο σε άλμη. Το νάτριο είναι το μόνο στοιχείο που συνηθίζεται να προστίθεται κατά την επεξεργασία των επιτραπέζιων ελιών (Garrido Fernández και συν. 1997). Σε πρόσφατη έρευνα που πραγματοποιήθηκε από Ισπανούς ερευνητές (López και συν., 2008) σχετικά με τη συγκέντρωση ανόργανων στοιχείων στο μεσοκάρπιο διαφορετικών εμπορικών τύπων επιτραπέζια ελιάς, παρατηρήθηκαν μεγάλες διαφορές περιεκτικότητας νατρίου ανάμεσα στους διάφορους τύπους ελιών, με μεγαλύτερη στις πράσινες ελιές (5706-18144 mg/ kg).

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι ελιές αποτελούν καλή πηγή ασβεστίου (337-850 mg/ kg) και K (82-1180 mg/ kg) (López και συν. 2008). Γενικά η σάρκα της ελιάς μπορεί να απορροφήσει ασβέστιο και να το διατηρήσει. Το ασβέστιο αυτό δεν αποδεσμεύεται κατά την διάρκεια της επεξεργασίας ή με τα ξεπλύματα με νερό που περιλαμβάνει η διαδικασία παραγωγής των επιτραπέζιων ελιών. Άλλες τιμές για το ασβέστιο στην επιτραπέζια ελιά είναι 422-850 mg/ kg σε πράσινες ελιές Τουρκίας (Biricik και Basoglu 2006), 460-860 mg/ kg σε πράσινες ελιές Ισπανικού τύπου (De Castro Ramos και συν. 1979), 270-450 mg/ kg ή 110-230 mg/ kg για Καλαμάτας ή φυσικά μαύρες ελιές μετά τη ζύμωση αντίστοιχα (Ünal και Nergiz 2003) και 960 mg/ kg σε παστές πράσινες ελιές (Souci και συν. 1994). Στην παρούσα εργασία οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ασβεστίου και καλίου, 329 και 971 mg/ 100g σάρκας αντίστοιχα, προσδιορίστηκαν στις ζυμώσεις 4 (πλήρης υποκατάσταση NaCl από KCl στην άλμη) και 6 (πλήρης υποκατάσταση NaCl από CaCl₂ στην άλμη). Η συγκέντρωση του ασβεστίου στη ζύμωση 1 ήταν 229 mg/ 100g σάρκας, ενώ του καλίου ήταν 108 mg/ 100g σάρκας.

Οι επιτραπέζιες ελιές σερβίρονται ως ορεκτικό ή/και συμπληρωματικό συστατικό

σε σαλάτες, ζυμαρικά, πίτσες και άλλα φαγητά (Marsilio και συν. 2008). Ο κυριότερος λόγος που γίνεται η ζύμωση των επιτραπέζιων ελιών είναι για να βελτιωθούν οι οργανοληπτικές ιδιότητες και η συντήρηση του τελικού προϊόντος (Panagou και Tassou 2006).

Ένα σημαντικό κριτήριο που καθορίζει την αποτελεσματικότητα της ζύμωσης είναι η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος, το οποίο είναι το κύριο προϊόν του μεταβολισμού των γαλακτικών βακτηρίων. Στην παρούσα μελέτη τα οργανικά οξέα προσδιορίστηκαν με την μέθοδο της HPLC και τα αποτελέσματα που ελήφθησαν συμφωνούν με εκείνα που αναφέρονται σε προηγούμενες μελέτες. Οι μεταβολές στη συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος ήταν σε συμφωνία με τα μικροβιολογικά δεδομένα. Καθώς η ζύμωση προχωρούσε παρατηρούνταν αύξηση του πληθυσμού των γαλακτικών βακτηρίων και συνεπώς αύξηση της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέος. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση γαλακτικού οξέος παρατηρήθηκε στο τέλος του πειράματος για όλες τις ζυμώσεις (1-10). Ανάλογα αποτελέσματα αναφέρουν και οι Tassou και συνεργάτες (2002) και οι Panagou και συνεργάτες (2008). Τα δύο κύρια οργανικά οξέα της ελιάς, το μηλικό και το κιτρικό οξύ (Vlahov 1976), αυξάνονταν με το χρόνο κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, όπως όμοια αναφέρουν και οι Tassou και συνεργάτες (2002). Αντίθετα σε άλλη μελέτη (Panagou και συν. 2008), το μηλικό οξύ εντοπίστηκε σε όλες τις περιπτώσεις από την αρχή της επεξεργασίας των ελιών σε μικρές συγκεντρώσεις και μεταβολίστηκε ανεξάρτητα από τον χειρισμό. Είναι χαρακτηριστικό ότι η μείωση του μηλικού οξέος παρατηρήθηκε χρονικά στο τέλος της εκθετικής φάσης της καμπύλης αύξησης των γαλακτικών βακτηρίων. Στην ίδια μελέτη (Panagou και συν. 2008), το κιτρικό οξύ μεταβολίστηκε σε όλες τις περιπτώσεις χωρίς σημαντικές διαφορές μεταξύ των χειρισμών (αυθόρμητη ζύμωση, ελεγχόμενη ζύμωση με καλλιέργειες εκκίνησης *L. pentosus* και *L. plantarum*).

Οι Tassou και συνεργάτες (2002) αναφέρουν επίσης την παρουσία ηλεκτρικού οξέος, η συγκέντρωση των οποίων αυξάνονταν με το χρόνο, όπως και στην παρούσα μελέτη. Αναφέρουν επίσης (Tassou και συν. 2002) ότι το οξικό οξύ υπήρχε σε μικρότερες συγκεντρώσεις ή καθόλου, γεγονός που θα μπορούσε να αποδοθεί στον ετεροζυμωτικό μεταβολισμό των γαλακτικών βακτηρίων. Στην παρούσα εργασία το οξικό οξύ αυξήθηκε με την πάροδο του χρόνου.

Οι Panagou και συνεργάτες (2008) αναφέρουν την ύπαρξη σημαντικής ποσότητας προπιονικού οξέως στην άλμη κατά τη ζύμωση της φυσικής μαύρης ελιάς, σε αντίθεση με την παρούσα εργασία όπου δεν εντοπίστηκε προπιονικό οξύ σε όλα τα

στάδια της ζύμωσης.

Όμως η παραγωγή και άλλων τελικών προϊόντων από το μεταβολισμό των μικροοργανισμών, όπως τα πτητικά συστατικά που υπάρχουν σε μεγάλες ή μικρές συγκεντρώσεις, μπορεί να επηρεάσει τη γεύση και το άρωμα των επιτραπέζιων ελιών (Panagou και Tassou 2006). Η παραγωγή αρωματικών πτητικών συστατικών τείνει να γίνει ο πρώτος προς εξέταση μηχανισμός, για την ανάπτυξη της χαρακτηριστικής γεύσης και του αρώματος ενός συγκεκριμένου ζυμούμενου τροφίμου (McFeeters 2004). Το άρωμα και η γεύση είναι άμεσα συνδεδεμένα με την ποιοτική και ποσοτική σύνθεση των πτητικών συστατικών, τα οποία παίζουν πρωτεύοντα ρόλο στην τελική αποδοχή του προϊόντος από τους καταναλωτές (Koprivnjak και συν. 2002, Sabatini και Marsilio 2008). Αλλαγές στο άρωμα της ελιάς επιτρέπουν στους ερευνητές να συγκρίνουν τις ποικιλίες και τις μεθόδους επεξεργασίας και να παρακολουθήσουν την εξέλιξη της ποιότητάς της κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας. Έτσι είναι σε θέση να διαπιστώσουν εάν χάνεται το άρωμα του προϊόντος κατά την αποθήκευσή του. Τα πτητικά συστατικά δεν παράγονται σε σημαντικές ποσότητες κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των καρπών, αλλά αυξάνονται κατά το κρίσιμο στάδιο της ωρίμανσης και κατά την πορεία της ζύμωσης (Kalua και συν. 2007). Αν και έχουν γίνει πολλές μελέτες σχετικά με τα αρωματικά συστατικά του ελαιολάδου, η ποιοτική και ποσοτική σύνθεση των πτητικών συστατικών των επιτραπέζιων ελιών δεν έχει ερευνηθεί αρκετά.

Ο σχηματισμός των αρωματικών συστατικών των επιτραπέζιων ελιών είναι μια διαδικασία που εξελίσσεται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης από τα γηγενή γαλακτικά βακτήρια, τις ζύμες και τους λοιπούς μικροοργανισμούς που υπάρχουν στις ελιές, τα οποία παράγουν πτητικά συστατικά δια μέσου ποικίλων βιοχημικών μονοπατιών (Sabatini και Marsilio 2008).

Η αιθανόλη είναι ένα σημαντικό συστατικό του τελικού προϊόντος που επηρεάζει τη γεύση του και το πτητικό συστατικό που υπάρχει σε μεγαλύτερες ποσότητες στις επιτραπέζιες ελιές. Η αιθανόλη παράγεται μέσω του γλυκολιτικού μονοπατιού Embden-Meyehof-Pranas, του οποίου κύρια λειτουργία είναι η παραγωγή ενέργειας.

Η βιοσύνθεση αλκοολών θεωρείται ότι συνδέεται με την διαδικασία της απαμίνωσης των αμινοξέων (Herrero και συν. 2006). Το οξικό οξύ παράγεται από βακτήρια όπως είδη του γένους *Acetobacter*, *Clostridium acetobutylicum* και άλλους μικροοργανισμούς, όπως οι ζύμες, με οξείδωση της αιθανόλης. Αυτά τα βακτήρια

συχνά απαντώνται στα τρόφιμα, το νερό αλλά και το έδαφος. Η ακετυλ-ομάδα, που παράγεται από το οξικό οξύ όταν δεσμεύεται στο συνένζυμο- A, κατέχει κεντρικό ρόλο στον μεταβολισμό των υδατανθράκων και των λιπιδίων. Το προπιονικό οξύ παράγεται βιολογικά από είδη του γένους *Propionibacterium* σαν προϊόν του μεταβολισμού αποσύνθεσης των λιπαρών οξέων και/ ή κάποιον αμινοξέων.

Όπως προαναφέρθηκε, στην παρούσα μελέτη η παραλαβή των πτητικών συστατικών έγινε με μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (SPME) ενώ ο προσδιορισμός τους με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μαζών (GC-MS) και προσδιορίστηκαν υψηλές ποσότητες αιθανόλης, οξικού οξέος και οξικού αιθυλεστέρα στα δείγματα όλων των ζυμώσεων και μικρότερες ποσότητες εξανόλης, *cis*-3-εξεν-1-όλης, 2-μεθυλ-1-βουτανόλης, 3-μεθυλ-1-βουτανόλης.

Τα αποτελέσματα μελέτης στην οποία προσδιορίστηκαν πτητικές ουσίες σε επιτραπέζιες ελιές Ισπανικού τύπου, Ελληνικού τύπου και τύπου Castelvetro (Sabatini και συν. 2008) έδειξαν ότι και στα τρία δείγματα έγινε αλκοολική, ετερογαλακτική και προπιονική ζύμωση, οι οποίες οδηγούν σε παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων αιθανόλης, οξικού οξέως, προπιονικού οξέως και άλλων αλκοολών και εστέρων. Μετά από 6 μήνες επεξεργασίας, στις ελιές τύπου Castelvetro βρέθηκαν υψηλά ποσοστά αιθανόλης και μικρότερες ποσότητες οξέως υποδεικνύοντας μια σημαντική αλκοολική ζύμωση, ενώ στις ελιές Ισπανικού τύπου βρέθηκαν να περιέχονται υψηλότερες ποσότητες οξέων, όπως οξικό και προπιονικό υποδεικνύοντας μια πιθανή επικράτηση μικροοργανισμών των γένων *Acetobacter* και *Propionibacterium* στην άλμη. Αυτό αποδείχθηκε επίσης από τις υψηλές ποσότητες προπιονικού και οξικού εστέρα που προσδιορίστηκαν. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα της μελέτης, γεγονός που αποδεικνύεται από τις υψηλές συγκεντρώσεις των ζυμών στα δείγματα του τύπου Castelvetro, σε αντίθεση με του Ισπανικού τύπου που ο πληθυσμός των ζυμών ήταν σε μικρότερα επίπεδα.

Οι πτητικοί εστέρες είναι κύρια συστατικά του αρώματος όλων των φρούτων και πολλές φορές είναι τα συστατικά που ευθύνονται κυρίως για την ωραία γεύση του τελικού προϊόντος που εκτιμάται από τους καταναλωτές (Sanz και συν. 1997, Seimour 1993). Είναι γνωστό ότι οι οξικοί εστέρες συντίθενται από ένα ένζυμο, την αλκοολ-ακυλ-τρανσφεράση (alcohol-acyl- transferase) το οποίο καταλύει την μετατροπή σε εστέρες των πτητικών αλκοολών με μόρια του ακετυλο-συνένζυμου-A,

ώστε να παραχθούν πτητικοί εστέρες και ελεύθερο CoA-SH (Myers και συν. 1970, Salas 2004, Tressl και Drawert 1973). Με τον ίδιο τρόπο μπορούν να συντεθούν προπανοϊκοί εστέρες με τη μετατροπή σε εστέρες των πτητικών αλκοολών με μόρια προπιονυλο-συνένζυμου-A.

Όσον αφορά στην οργανοληπτική αξιολόγηση των επιτραπέζιων ελιών που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη θα πρέπει να σημειωθεί ότι ενώ τεχνολογικά όλα τα μίγματα αλάτων οδήγησαν στη δημιουργία επιτυχούς γαλακτικής ζύμωσης του φυσικά μαύρου ελαιόκαρπου με ικανοποιητικές τιμές pH και ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας, μόνο ελάχιστοι συνδυασμοί μπόρεσαν να δώσουν οργανοληπτικά αποδεκτό προϊόν. Τα αποτελέσματα της οργανοληπτικής αξιολόγησης στην παρούσα εργασία παρουσιάζουν ομοιότητες με αντίστοιχη μελέτη που έκανα Ισπανοί ερευνητές (Bautista-Gallego και συν. 2011, Bautista-Gallego και συν. 2010). Και στις δύο μελέτες η υποκατάσταση του NaCl από 50% περίπου KCl συγκέντρωσε την καλύτερη βαθμολογία μετά τον μάρτυρα (8% NaCl). Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των ελιών που ζυμώθηκαν σε άλμη με 4% NaCl και 4% KCl πλησίαζαν περισσότερο εκείνα της ζύμωσης με κωδικό 1 (8% NaCl) σε σύγκριση με τις υπόλοιπες περιπτώσεις ζυμώσεων, δηλαδή καλά επίπεδα αλατότητας, ωραίο άρωμα, χαμηλά επίπεδα οξύτητας και πικράδας.

Οι Ισπανοί ερευνητές (Bautista-Gallego και συν 2011, Bautista-Gallego και συν. 2010) χρησιμοποίησαν ως μάρτυρα ζύμωση που έγινε σε άλμη με 11% NaCl, η οποία συγκέντρωσε τη μεγαλύτερη βαθμολογία από τους δοκιμαστές. Οι ελιές που ζυμώθηκαν σε μίγμα άλμης με 7,33% NaCl και 3,67% KCl έδωσε το αμέσως καλύτερο προϊόν, που είχε παρόμοια χαρακτηριστικά. Οπότε η χρήση του μίγματος NaCl-KCl μπορεί να οδηγήσει σε προϊόν καλής ποιότητας, καθώς βελτιώνει την θρεπτική αξία του τελικού προϊόντος, γεγονός που έχει σημασία για την αποδοχή του από τους καταναλωτές. Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν από τους Marsilio και συνεργάτες (2002), οι οποίοι παρατήρησαν τα χαμηλότερα επίπεδα πικράδας και τα καλύτερα επίπεδα αλατότητας, αρώματος, οξύτητας και σκληρότητας σε ελιές που ζυμώθηκαν σε άλμη με μίγμα αλάτων 3% NaCl και 3% KCl.

Βέβαια θα πρέπει να σημειωθεί επίσης ότι η αντικατάσταση του NaCl με κάποιο άλλο αλάτι θα οδηγήσει αναπόφευκτα στη δημιουργία τελικού προϊόντος με διαφορετικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά από το συμβατικό προϊόν και φυσικά

διαφορετικό τρόπο συντήρησης (π.χ. συντήρηση και διακίνηση του καρπού υπό ψύξη με ενδεχόμενη χρήση τροποποιημένων ατμοσφαιρών, κλπ). Δεδομένου ότι οι ελιές αυτές ανταποκρίνονται σε μια συγκεκριμένη ομάδα του πληθυσμού (με υψηλή αρτηριακή πίεση) χρειάζεται χρόνος προκειμένου ο καταναλωτής να συνηθίσει στα διαφοροποιημένα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του νέου προϊόντος.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alam, M. G. M., Snow, E. T., & Tanaka, A. (2003) Arsenic and heavy metal contamination of vegetables grown in Samta Village, Bangladesh. *The Science of The Total Environment* **308**, 83–96.
- Aligizakis, E.M. (1971). Fermentation et conservation des olives de table dans des cisternes en beton armé enduites d'un vernis plastique spécial. Congreso Internacional Técnicas Oleícolas, Málaga, Spain.
- Aligizakis, E.M. (1982). Processing of table olives. Athens (in Greek)
- Angioni, A., Cabitza, M., Russo, M. T., and Caboni, P. (2006) Influence of olive cultivars and period of harvest on the contents of Cu, Cd, Pb, and Zn in virgin olive oils. *Food Chemistry* **99**, 525–529.
- Anthemidis, A. N., Arvanitidis, V., and Stratis, J. A. (2005) On-line emulsion formation and multi-element analysis of edible oils by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **537**, 271–278.
- Balatsouras, G.D. (1964). Composition chimique des olives noires de Grèce. Variations de quelques constituants en fonction de la region de production. *Información Oleícola Internacional* **28**, 131-156.
- Balatsouras, G.D. (1967). Processing the naturally ripe (black) olives. *Proceedings of the International Olive Oil Seminar*. Pp. 491-550. Perugia, Italy.
- Balatsouras, G.D. (1969). Traitement des olives noires. *Información Oleícola Internacional* **46**, 65-76.
- Balatsouras, G.D. (1990). Edible olive cultivars, chemical composition of fruit, harvesting, transportation, processing, sorting and packaging, styles of black olives, deterioration, quality standards, chemical analysis, nutritional and biological value of the end product. In: *Olio d'oliva e olive da tavola: tecnologia e qualità*. Istituto Sperimentale per la Elaiotecnica. Pp. 291-330, Pescara, Italy.
- Barbaste, M., Medina, B., and Perez-Trujillo, J. P. (2003) Analysis of arsenic, lead and cadmium in wines from the Canary Islands, Spain, by ICP/MS. *Food Additives and Contaminant* **20**, 141–148.
- Bautista Gallego, J., Arroyo López, F. N., Durán Quintana, M. C., and Garrido Fernández, A. (2010) Fermentation profiles of Manzanilla-Aloreña cracked green table olives in different chloride salt mixtures. *Food Microbiology* **27**, 403-412.

- Bautista Gallego, J., Arroyo López, F. N., López-López, A., and Garrido Fernández, A. (2011) Effect of chloride salt mixtures on selected attributes and mineral content of fermented cracked Aloreña olives. *LWT- Food Science and Technology* **44**, 120-129.
- Biricik , G. F., and Basoglu, F. (2006). Determination of mineral contents in some olives (Samanali, Domat, Manzallina, Ascolana) varieties. *Gida* **3**, 67-75.
- Bobillo, M. and Marshall, V.M. (1991). Effect of salt and culture aeration on lactate and acetate production by *Lactobacillus plantarum*. *Food Microbiology* **8**, 153-160.
- Bobillo, M. and Marshall, V.M. (1992). Effect of acidic pH and salt on acid end-products by *Lactobacillus plantarum* in aerated, glucose limited continuous culture. *Journal of Applied Bacteriology* **73**, 67-70.
- Borbolla y Alcalá, J.M.R., Rejano Navarro, L. and Nosti Vega, M. (1975). La formación de ácido propiónico durante la conservación de las aceitunas verdes de mesa. *Grasas y Aceites* **26**, 153-160.
- Buckenhüskes, H. (1993). Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. *FEMS Microbiological Reviews* **12**, 253-272.
- Borbolla y Alcalá, J.M.R. and Rejano Navarro, L. (1979). Sobre la preparación de la aceituna estilo sevillano. La fermentación. *Grasas y Aceites* **30**, 175-185.
- Borbolla y Alcalá, J.M.R., Fernández Díez, M.J. and González Cancho, F. (1959). Estudios sobre el aderezo de aceitunas verdes. XVI. Experiencias sobre el alambrado. *Grasas y Aceites* **10**, 221-234.
- Borbolla y Alcalá, J.M.R., Fernández Díez, M.J. and González Cancho, F. (1960). Estudios sobre el aderezo de aceitunas verdes. XIX. Nuevas experiencias sobre el alambrado. *Grasas y Aceites* **11**, 256-260.
- Borcakli, M., Özay, G., Alperden, I., Özsan, E. and Erdek, Y. (1993). Changes in chemical and microbiological composition of two varieties of olive during fermentation. *Grasas y Aceites* **44**, 253-258.
- Castro, A., Montaña, A., Casado, F.J., Sánchez, A.H., Rejano, L., (2002) Utilization of *Enterococcus casseliflavus* and *Lactobacillus pentosus* as starter cultures for Spanish-style green olive fermentation. *Food Microbiology* **19**, 637–644.

- Choi, S.Y., Beuchat, L.R., Perkins, L.M., and Nakayama, T. (1994) Fermentation and sensory characteristics of *kimchi* containing potassium chloride as a partial replacement for sodium chloride. *Int. J. Food Microbiol.* **21**(4): 335- 340.
- Ciafardini, G., Marsilio, V., Lanza, B. and Pozzi, N. (1994). Hydrolysis of oleuropein by *Lactobacillus plantarum* strains associated with olive fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 4142-4147.
- Cook, N. R., Cutler, J. A., Obarzanek, E., Buring, J. E., Rexrode, K. M., Kumanyika, S. K., Appel, L. J., and Whelton, P. K. (2007). Long term effects of dietary sodium reduction on cardiovascular disease outcomes: observational follow-up of the trials of hypertension prevention (TOHP). *Brit Med J.* **334**, 885–888.
- Chorianopoulos, N.G., Boziaris, I.S., Stamatiou, A., Nychas, G.-J.N., (2005) Microbial association and acidity development of unheated and pasteurized green table olives fermented using glucose or sucrose supplements at various levels. *Food Microbiology* **22**, 117–124.
- Cutler, J. A., and Roccella, E. J. (2006). Salt reduction for preventing hypertension and cardiovascular disease: a population approach should include children. *Hypertens.* **48**, 818–819.
- De Castro Ramos, R., Nosti Vega, M., and Vázquez Ladrón, R. (1979) Composición y valor nutricional de aceitunas de mesa. I. Aceitunas verdes aderezadas. *Grasas y Aceites* **30**, 83-91.
- Dickinson, B. D., and Havas, S. (2007) Reducing the population burden of cardiovascular disease by reducing sodium intake: a report of the Council on Science and Public Health. *Arch Intern Med.* **167**,1460–1468.
- Durán Grande, M. (1977) Estudio morfológico de los estomas y de las áreas estomáticas del fruto de *Olea europea* L. *Bol. R. Soc. Espanola Hist. Nat.* **75**, 23-41.
- Durán Quintana, M.C. and González Cancho, F. (1973) Estudio microbiológico de la fermentación de aceitunas negras maduras en salmuera. *Microbiología Española* **26**, 149-164.
- Durán Quintana, M.C., García García, P., Brenes Balbuera, M. and Fernández González, M.J. (1991) Aceitunas tipo negras. Estudio comparativo de tres procedimientos para la concervación previa de frutos de la variedad Gordal (*Olea europea regalis*). *Grasas y Aceites* **42**, 106-113.

- Durán Quintana, M.C., García García, P., Brenes Balbuera, M. and Garrido Fernández, A. (1994) Induced lactic acid fermentation during the preservation stage of ripe olives from Hojiblanca cultivar. *Journal of Applied Bacteriology* **76**, 377-382.
- Durán Quintana, M.C., García García, P. and Garrido Fernández, A. (1999) Establishment of conditions for green olive fermentation at low temperature. *International Journal of Food Microbiology* **51**, 133-143.
- Fernández-Díez, M.J. (1960) Las proteínas de la semilla de aceituna. *Grasas y Aceites* (II), 19-25.
- Fernández Díez, M.J. (1983) Olives. In: *Biotechnology* (edited by Rehm, H.J. and Reed, G.). Pp. 379-397. Verlag Chemie, Weinheim.
- Fernández Díez, M.J., Castro Ramos, R., Garrido-Fernández, A., González Cancho, F., González Pellissó, F., Nosti Vega, M., Heredia Moreno, A., Rejano Navarro, L., Durán-Quintana, M.C., García García, P. and Castro Gómez Millán (1985) *Biología de la aceituna de mesa*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Instituto de la Grasa, Madrid, Spain.
- Fernández Díez, M.J. (1991) Processing table olives. In: *Encyclopedia of Food Science and Technology* (edited by Hui, Y.H.). Pp. 1910-1925. Wiley & Sons, New York.
- Fernández González, M.J., García García, P., Garrido Fernández, A., and Durán Quintana, M.C. (1993) Microflora of the aerobic preservation of directly brined green olives from Hojiblanca cultivar. *Journal of Applied Bacteriology* **75**, 226-233.
- Fernández-Maculet, J.C. (1989) Origen y evolución de la familia Oleáceas. *Grasas y Aceites* **40**(1), 57-61.
- Fernández, A., Ocio, M.J., Fernández, P.S., Rodrigo, M. and Martínez, A. (1999) application of nonlinear regression analysis to the estimation of kinetic parameters for two enterotoxigenic strains of *Bacillus cereus* spores. *Food Microbiology* **16**, 607-613.
- Fleming, H.P., Walter, W.M. and Etchells, J.L. (1969) Isolation of a bacterial inhibitor from green olives. *Applied Microbiology* **18**, 856-860.
- Fleming, H.P. and McFeeters, R.F. (2001) Differential glucose and fructose utilization during cucumber fermentation. *Journal of Food Science* **66**, 162-166

- Francis, F.J. (1999) Olives and olive oil. In *Wiley Encyclopedia of Food Science and Technology*, Vol. 3, pp. 1755-1778. New York: John Wiley & Sons
- Frassetto, L. A., Morris, R. C., Jr., Sellmeyer, D. E., and Sebastian, A. (2008) Adverse effects of sodium chloride on bone in the aging human population resulting from habitual consumption of typical american diets. *J Nutr.* **138**, 419S-422.
- García García, P., Durán Quintana, M.C., Brenes Balbuera, M., and Garrido Fernández, A. (1992) Lactic fermentation during the storage of 'Alorena' cultivar untreated green table olives. *Journal of Applied Bacteriology* **73**, 324-330.
- García , P., Romero, C., Brenes, M., and Garrido, A. (2002) Validation of a method for the analysis of iron and manganese in table olives by flame atomic absorption spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 3654–3659.
- Garrido-Fernández, A., Fernández Díez, M.J. and Adams, M.R. (1997) Table olives: Production and Processing. Chapman & Hall, London.
- Garrido-Fernández, A., Gonzalez Pellisso, F., Gonzalez Cancho, F., Sanchez Roldan, F., Rejano Navarro, L., Cordon Casanueva, J.L. and Fernandez Diez, M.J. (1977) Changes in the processing and packing of Spanish-style green table olive to reduce waste waters. *Grasas y Aceites* **28**, 267-285.
- González Cancho, F. (1960) Estudio sobre el aderezo de aceitunas verdes. Bacilos Gram negativos no esporulados en las salmueras de aceitunas. *Grasas y Aceites* **11**, 125-131.
- González Cancho, F. (1960) Estudio sobre el aderezo de aceitunas verdes. Levaduras presentes en la fermentación. *Grasas y Aceites* **11**, 9-14.
- González Cancho, F., Nosti Vega, M., Durán Quintana, M.C., Garrido Fernández, A. and Fernández Díez, M.J. (1975) El proceso de fermentación en las aceitunas negras maduras en salmuera. *Grasas y Aceites* **26**, 297-309.
- González Cancho, F., Rejano Navarro, L. and Borbolla y Alcalá, J.M.R. (1980) La formación de ácido propiónico durante la conservación de las aceitunas verdes de mesa. Microorganismos responsables. *Grasas y Aceites* **31**, 245-250
- González Cancho, F. and Durán Quintana, M.C. (1981) Bacterias cocáceas del ácido láctico en le aderezo de aceitunas verdes. *Grasas y Aceites* **32**, 373-379.
- Guill Guerrero, J. L., Jiménez Martínez, J. J., and Torija Isasa, M. E. (1998) Mineral nutrient composition of edible wild plants, *Journal of Food Composition and Analysis* **11**, 322-328.

- Harris, L.J. (1998) The microbiology of vegetable fermentation. In: *Microbiology of fermented foods* (edited by Wood, B.J.B.). Pp. 45-72. Blackie Academic & Professional, UK.
- He, F. J., and MacGregor, G. A. (2008) A comprehensive review on salt and health and current experience of worldwide salt reduction programmes. *J. Hum Hypertens.* **23**, 363–384.
- Herrero, M., Garcia, L. A., and Diaz, M. (2006) Volatile compounds in cider, Inoculation time and fermentation temperature effects. *Journal of the Institute of Brewing* **112**(3), 210–214.
- Heredia-Moreno, A., Guillen-Bejarano, J., Fernandez-Bolanos, J. and Rivas-Moreno, M. (1987) Olive stones as a source of fermentable sugars. *Biomass* **14**,143-148.
- Holzapfel, W.H. (2001) Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *International Journal of Food Microbiology* **75**, 197-212.
- ICAP (2005) Κλαδική μελέτη. Ελαιόλαδο - Πυρηνέλαιο - Επιτραπέζιες ελιές.
- IOOC, (1980) International Olive Oil Council. Unified qualitative standard applying to table olives in international trade, Madrid, Spain.
- IOOC (2004b) International Olive Oil Council. Trade standard applying to table olives. Madrid, Spain.
- Kalua, C. M., Allen, M. S., Bedgood, D. R., Bishop, A. G., Prenzler, P. D., and Robards, K. (2007) Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: a critical review. *Food Chemistry* **100**(1), 273-286.
- Karppanen, H., and Mervaala, E. (2006) Sodium intake and hypertension. *Prog Cardiovasc Dis.* **49**, 59–75.
- Koprivnjak, O., Conte, L., and Totis, N. (2002). Influence of olive fruit storage in bags on oil quality and composition of volatile compounds. *Food Technology and Biotechnology* **40**, 129-134.
- Kotzekidou, P., (1997) Identification of yeasts from black olives in rapid system microtitre plates. *Food Microbiology* **14** (6), 609–616.
- Lombardo, N. (1988) Cultivation of the Olive: A Typical Tree of the Mediterranean Basin. *Outlook on Agriculture* **17**(4), 183-185.
- López, A., García, P., and Garrido, A. (2008) Multivariate characterization of table olives according to their mineral nutrient composition. *Food Chemistry* **106**, 369-378.

- Marquina, D., Peres, C., Caldas, F.V., Marques, J.F., Peinado, J.M. and I. Spencer-Martins (1992) Characterization of the yeast population in olive brines. *Letters in Applied Microbiology* **14**, 279-283.
- Marsilio, V., Campestre, C., Lanza, B., De Angelis, M., and Russi, F. (2002) Sensory analysis of green table olives fermented in different saline solutions. *Acta Horticulturae* **586**, 617-620.
- Marsilio, V., Russi, F., Iannucci, E., and 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 e Food Science and Technology* **41**(5), 796-802.
- Montaño, A., Sánchez, A.H. and Castro, A. (2000) Changes in the amino acid composition of green olive brine due to fermentation by pure culture of bacteria. *Journal of Food Science* **65**, 1022-1027.
- Μπαλατσούρας, Γ.Δ. (1984) *Το ελαιόδενδρο*. Αθήνα: Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Μπαλατσούρα, Γ. (1995) Η επιτραπέζια ελιά. Ποικιλίες, χημική σύσταση, εμπορικοί τύποι, ποιοτικά χαρακτηριστικά, συσκευασία, εμπορία. Έκδοση Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.
- Myers, M. J., Issenberg, P., & Wick, E. L. (1970) L-leucine as a precursor of isoamyl alcohol and isoamyl acetate, volatile aroma constituents of banana fruit discs. *Phytochemistry* **9**, 1693–1700.
- Nergiz, C. and Engez, Y. (2000) Compositional variation of olive fruit during ripening. *Food Chemistry* **69**, 55-59
- Nikkarinen, M., & Mertanen, E. (2004) Impact of geological origin on trace element composition of edible mushrooms. *Journal of Food Composition and Analyses* **17**, 301–310.
- Nortje, B.K. and Vaughn, R.M. (1953) The pectolytic activity of species of the genus *Bacillus*: Qualitative studies with *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilis* in relation to the softening of olives and pickles. *Food Research* **18**, 57-69.
- Ντούτσιας, Γ. (2000) Η Ελληνική επιτραπέζια ελιά. Προβλήματα και προοπτικές. *Ελιά και ελαιόλαδο* **14**, 29-35.
- Nychas, G.-J.E., Panagou, E.Z., Parker, M.L., Waldron, K.W. and Tassou, C.C. (2002) Microbial colonization of naturally black olives during fermentation and

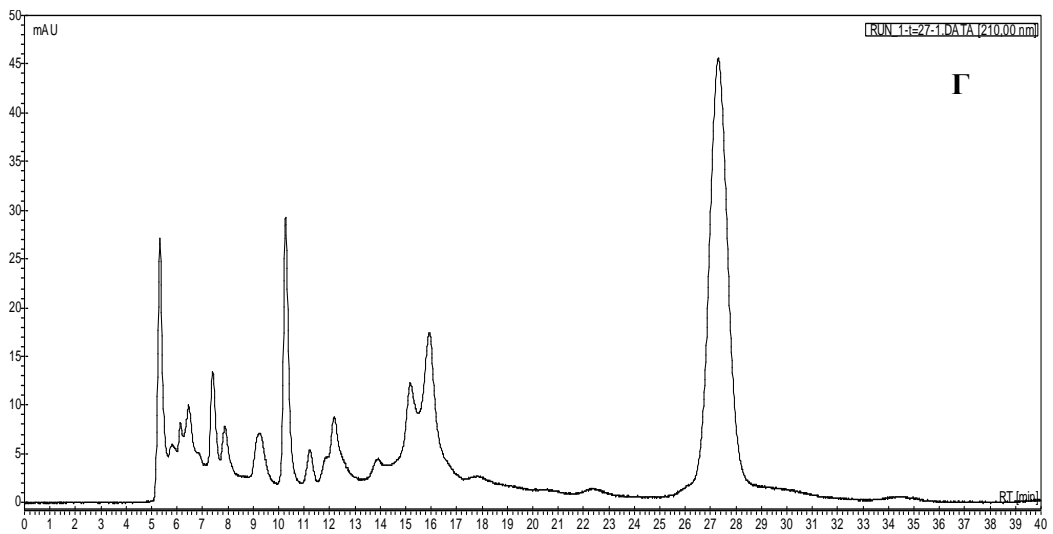
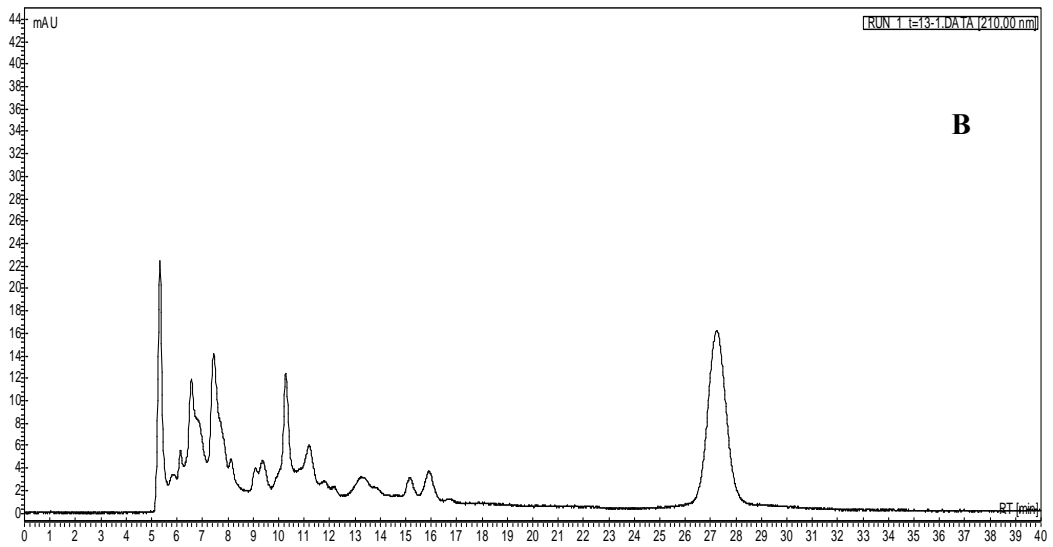
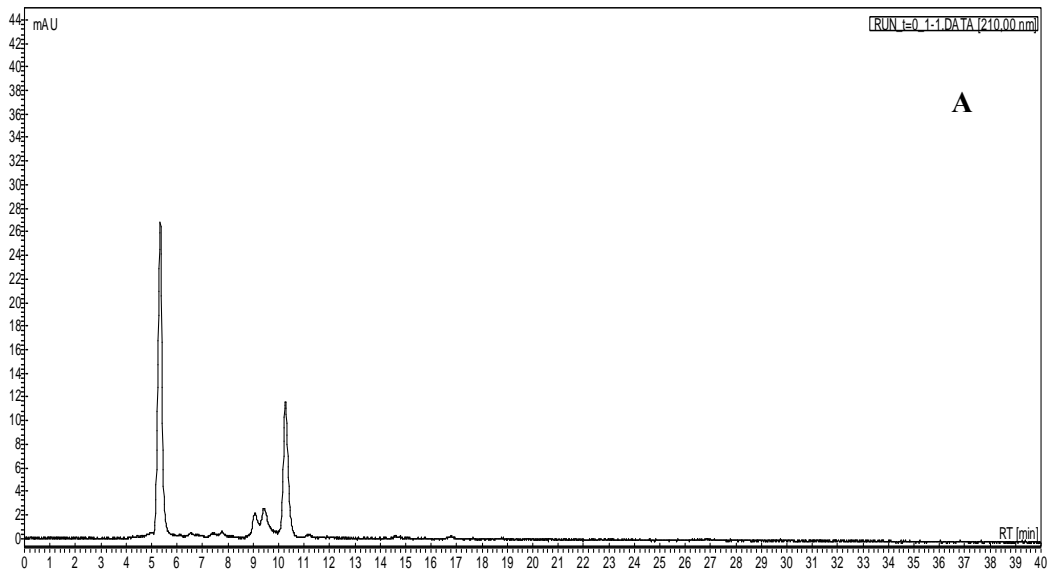
- associated biochemical activities in the cover brine. *Letters in Applied Microbiology* **34**, 173-177.
- Özay, G. and Borcakli, M. (1996) Effect of brine replacement and salt concentration on the fermentation of naturally black olives. *Food Research International* **28**, 553-559.
- Panagou, E. Z., & Tassou, C. C. (2006) Changes in volatile compounds and related biochemical profile during controlled fermentation of cv. Conservolea green olives. *Food Microbiology* **23**, 738-746.
- Panagou, E.Z., Schillinger, U., Franz, C.M.A.P., 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 Microbiology* **25**, 328–358.
- Panagou, E.Z., Skandmis, P.N., Nychas, G.-J.E., (2003) Modeling the combined effect of temperature, pH and aw on the growth rate of *Monascus ruber*, a heat-resistant fungus isolated from green table olives. *Journal of Applied Microbiology* **94**, 146– 156.
- Perez-Trujillo, J. P., Barbaste, M., & Medina, B. (2002) Contents of trace and ultra trace elements in wines from the Canary islands (Spain) as determined by ICP-MS. *Journal of Wine Research* **13**, 243–256.
- Piga, A., Gambella, F., Vacca, V. and Agabbio, M. (2001) Response of three Sardinian olive cultivars to Greek-style processing. *Italian Journal of Food Science* **13**, 29-40.
- Plastourgos, S. and Vaughn, R.H. (1957) Species of *Propionobacterium* associated with zapateria spoilage of olives. *Applied Microbiology* **5**, 267-271.
- Psani, M., Kotzekidou, P., (2006) Technological characteristics of yeast strains and their potential as starter adjuncts in Greek-style black olive fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 1329–1336.
- Rejano Navarro, L., Fernández Villasante, J., Márquez González, J., Albarreal López, J., González Cancho, F. and Fernández Díez, M.J. (1978) Efecto del tiempo de almacenamiento del fruto fresco sobre el proceso de elaboración de aceitunas verdes estilo sevillano. XIV Asamblea Miembros Instituto de la Grasa, Sevilla, Spain.

- Rejano Navarro, L., González Cancho, F. and Borbolla y Alcalá, J.M.R. (1978) La formación de ácido propiónico durante la conservación de las aceitunas verdes de mesa. *Grasas y Aceites* **29**, 203-210.
- Roychowdhury, T., Tokunage, H., & Ando, M. (2003) Survey of arsenic and other heavy metals in food composites and drinking water and estimation of dietary intake by the villages from an arsenic affected area of the west Bengal, India. *The Science of The Total Environment* **308**, 115–135.
- Ruiz-Barba, J.L., Cathcart, D.P., Warner, P.J. and Jiménez-Díaz, R. (1994) Use of *Lactobacillus plantarum* LPCO10, a bacteriocin producer, as a starter culture in Spanish style green olive fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 2059-2064.
- Ruiz-Barba, J.L. and 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.
- Sabatini, N., & Marsilio, V. (2008) Volatile compounds in table olives (Nocellara del Belice cultivar). 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.
- Salas, J. J. (2004) Characterization of alcoholacyltransferase from olive fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 3155–3158.
- Sánchez, A.H., Rejano, L., Montañó, 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 Science and Technology* **67**, 115-122.
- Sánchez Castillo, C. P. Dewey, P. J. S., Aguirre, A., Lara, J. J., Vaca, R., León de la Barra et al. (1998) The mineral content of Mexican fruits and vegetables. *Journal of Food composition and Analysis* **11**, 340-356.
- Sanz, C., Olias, J. M., & Perez, A. G. (1997) Aroma biochemistry of fruits and vegetables. In F. A. Tomas-Barberan & R. J. Robins (Eds.), *Phytochemistry of fruits and vegetables* (pp. 125–155). Oxford: Clarendon Press.
- Seimour, G. B. (1993) Biochemistry of fruit ripening. In J. E. Taylor & G.A. Tucker (Eds.). London, UK: Chapman and Hall.

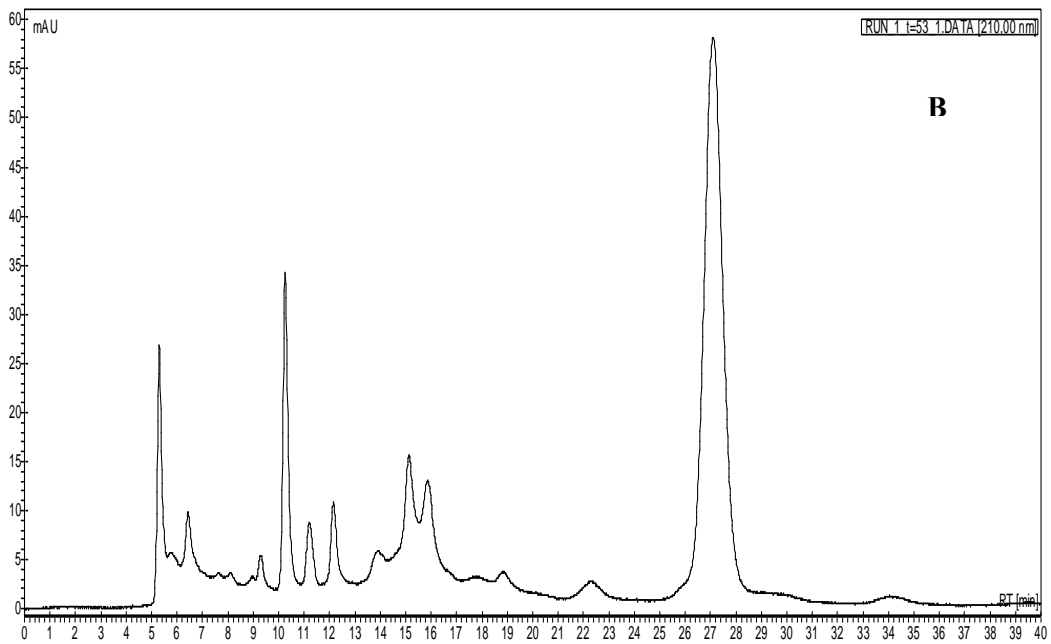
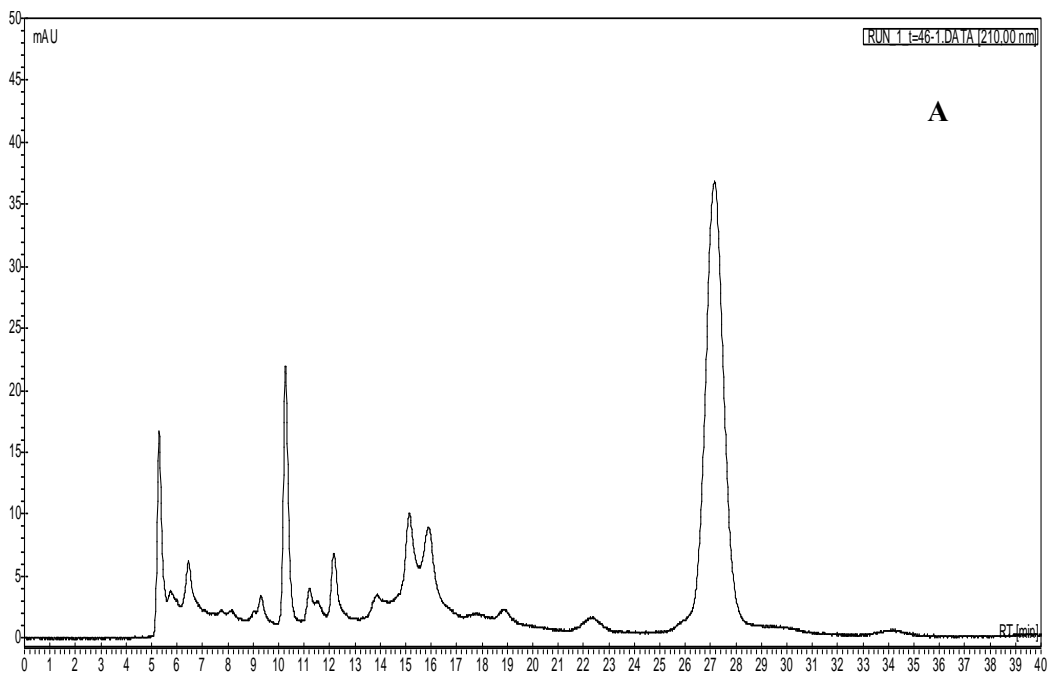
- Soares, M. E., Pereira, J. A., & Bastos, M. L. (2006) Validation of a method to quantify copper and other metals in olive fruit by ETAAS. Application to the residual metal control after olive tree treatments with different copper formulations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 3923–3928.
- Souci, S. w., Fachman, W., & Kraut, H. (1994) *Olive green marinated. Food composition and nutrition tables*. Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers.
- Spyropoulou, K.E. and Nychas, G.-J.E. (1999) Addition of fermentable substrates and thiamine during the fermentation of green olives with or without starter cultures. In: *17th International Symposium of the International Committee on Food Microbiology and Hygiene (ICFMH)* (Edited by Tuijtelaars, A.C.J., Samson, R.A., Rombouts, F.M., Notermans, S.). Pp. 685-689, Veldhoven, The Netherlands.
- Spyropoulou, K.E., Chorianopoulos, N.G., Skandamis, P.N. and Nychas, G.-J.E. (2001) Control of *Escherichia coli* O157:H7 during the fermentation of Spanish-style green table olives (conservolea variety) supplemented with different carbon sources. *International Journal of Food Microbiology* **66**, 3-11.
- Taormina P. J. (2010) Implications of salt and sodium Reduction on Microbial Food Safety. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **50**, 209-227.
- Tassou, C.C. (1993) Microbiology of olives with emphasis on the antimicrobial activity of phenolic compounds. PhD Thesis, University of Bath, UK.
- Tassou, C.C., Panagou, E.Z. and Katsaboxakis, C.Z. (2002) Microbiological and physicochemical changes of naturally fermented black olives at various temperatures and NaCl levels in brines. *International Journal of Food Microbiology* **19**,605-615.
- Tressl, R., & Drawert, F. (1973) Biogenesis of banana volatiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **21**, 560–565.
- Τσέκου, Ι.Β. και Κουκόλη, Ε.Δ. (1982) Βοτανική. Εκδοτικός οίκος Αφών Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη.
- Ünal, K. & Nergiz, C. (2003) The effect of table olive preparing methods and storage on the composition and nutritive value of olives. *Grasas y Aceites* **54**, 71-76.
- Van den Berg, D.J.C., Smits, A., Pot, B., Ledebøer, A.M., Kersters, K., Verbakel, J.M.A. and Verrips, C.T. (1993) Isolation, screening and identification of lactic acid bacteria from traditional food fermentation processes and culture collections. *Food Biotechnology* **7**, 189-205.

- Vaughn, R.H., Jakubczyk, T., MacMillan, J.D., Higgins, T.E., Davé, B.A. and Crampton, V.M. (1969) Some pink yeasts associated with softening of olives. *Applied Microbiology* **18**, 771-775.
- Vaughn, R.H. (1982) The fermentation of olives. In: *Industrial Microbiology* (edited by Reed, G.). Pp. 207-236. AVI Publ., Westport.
- Vlachov, G. (1976) Gli acidi organici delle olive: Il rapporto malico/citrico quelle indice de maturazione. *Annals de l' Instituto Sperimentale per la Elaiotecnica* **II**, 93-112.
- Zeiner, M., Steffan, I., & Cindric, I. J. (2005) Determination of trace elements in olive oil by ICP-AES and ETA-AAS: a pilot study on the geographical characterization. *Microchemical Journal* **81**, 171-176.

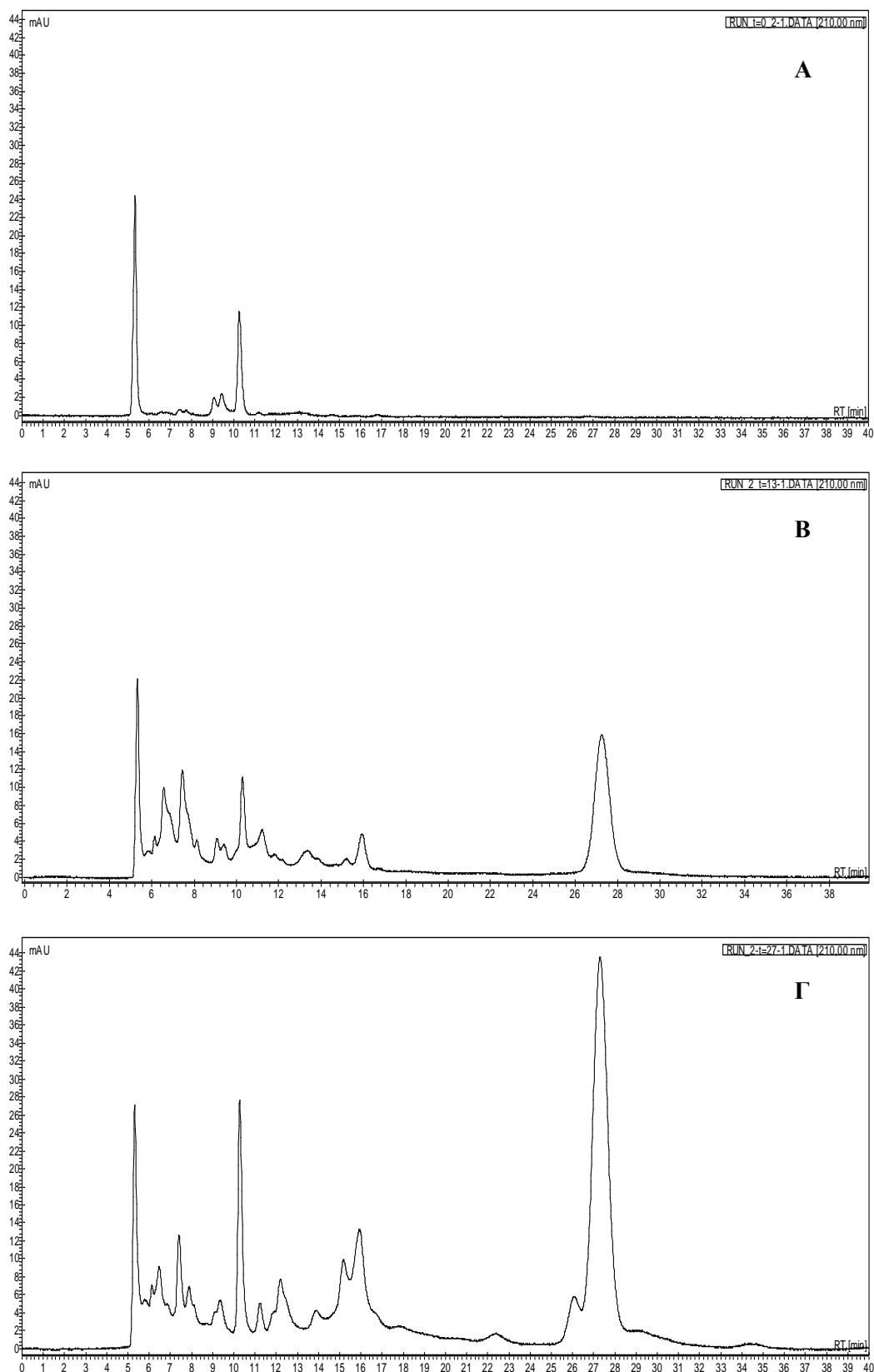
6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



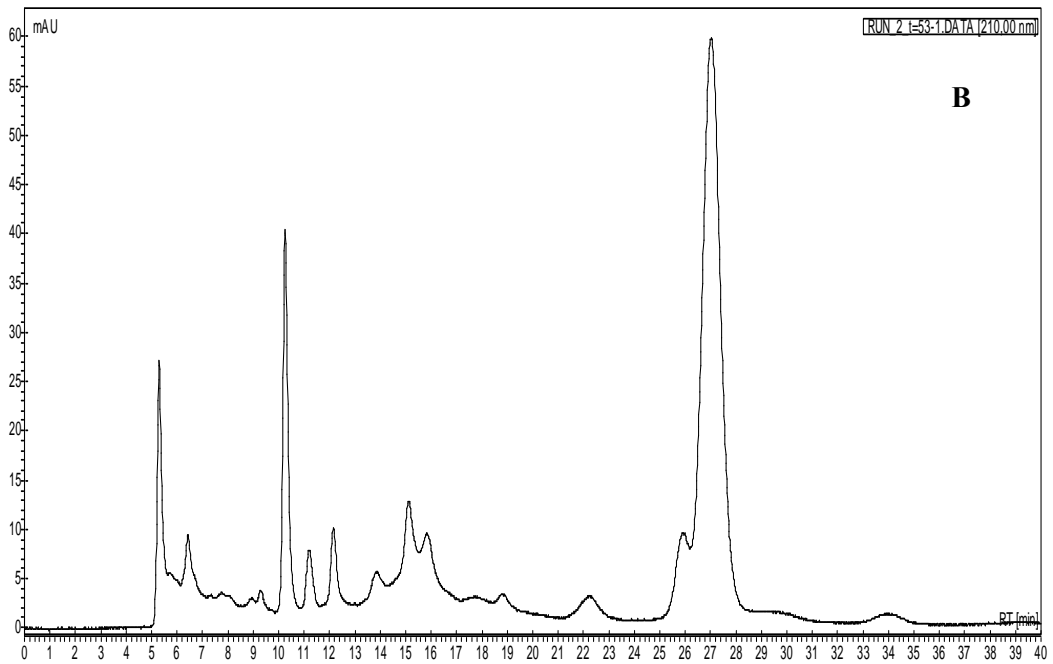
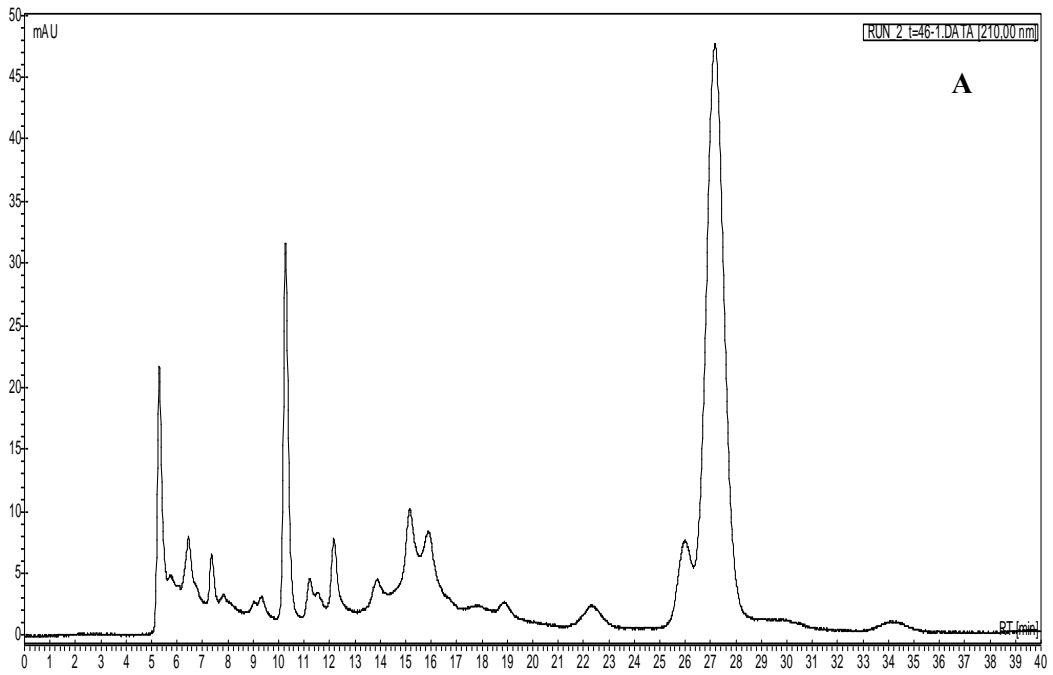
Σχήμα 6.1. Χρωματογραφήματα διαχωρισμού οργανικών οξέων με HPLC στην άλμη της ζύμωσης με κωδικό 1 (8 % NaCl - 0 % KCl - 0 % CaCl₂) για τους χρόνους Α) t=0, Β) t=13και Γ) t=27 ημέρες.



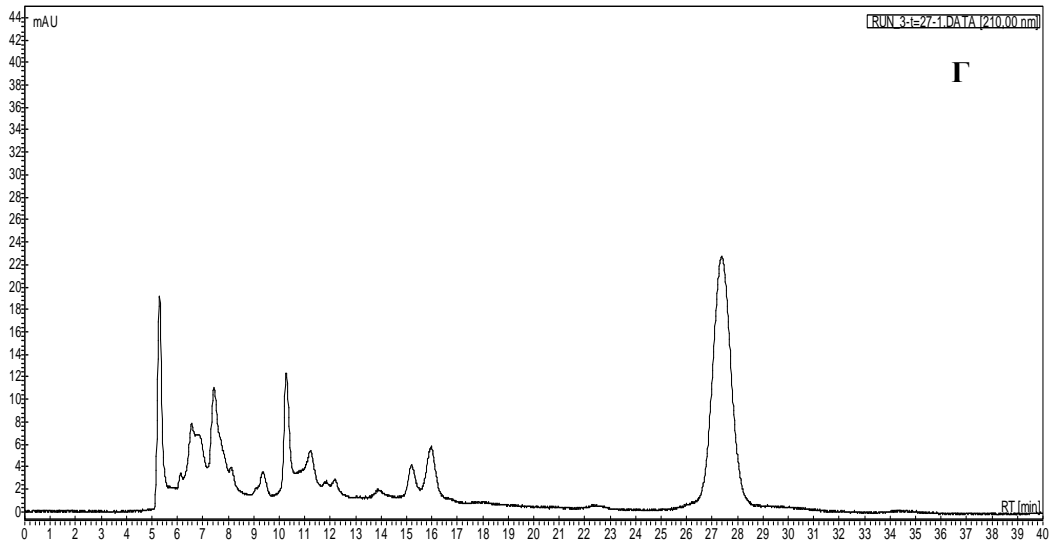
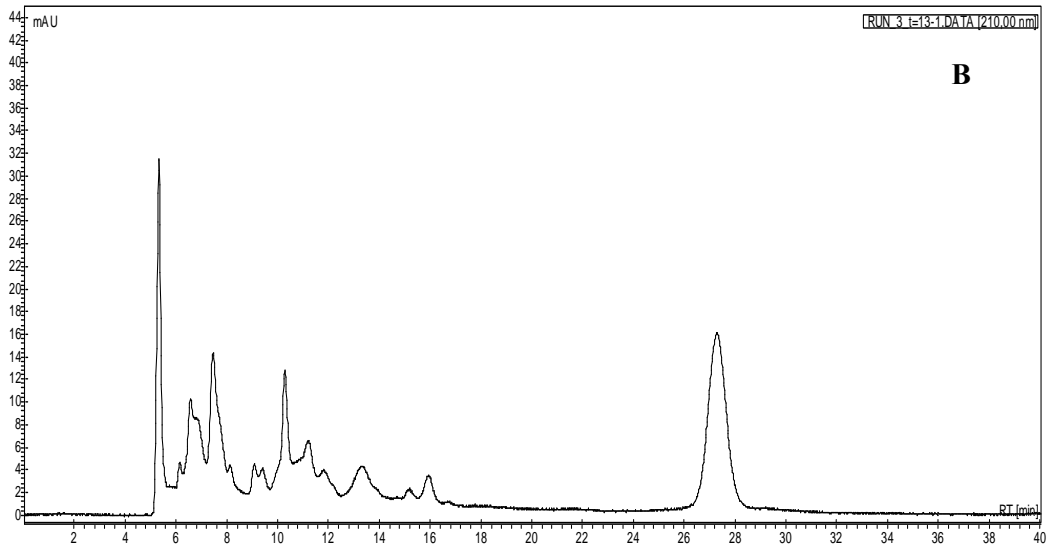
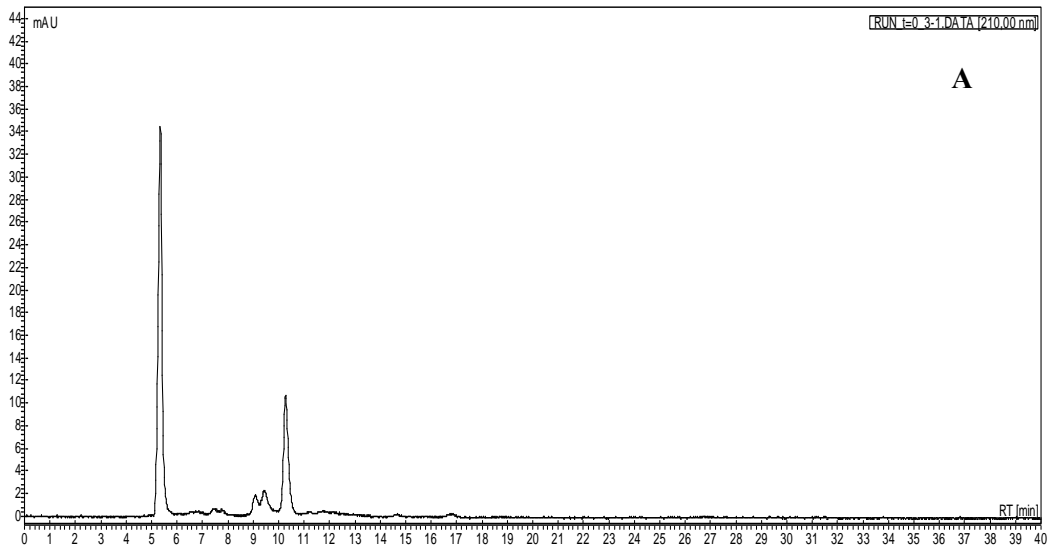
Σχήμα 6.2. Χρωματογραφήματα διαχωρισμού οργανικών οξέων με HPLC στην άλμη της ζύμωσης με κωδικό 1 (8 % NaCl - 0 % KCl - 0 % CaCl₂) για τους χρόνους Α) t=46 και Β) t=53 ημέρες.



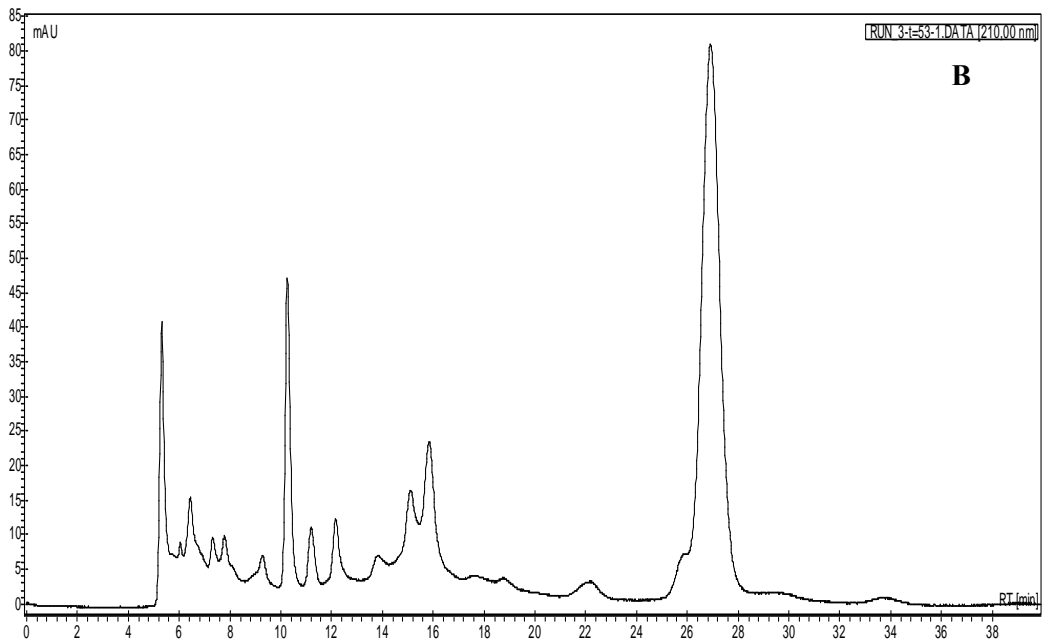
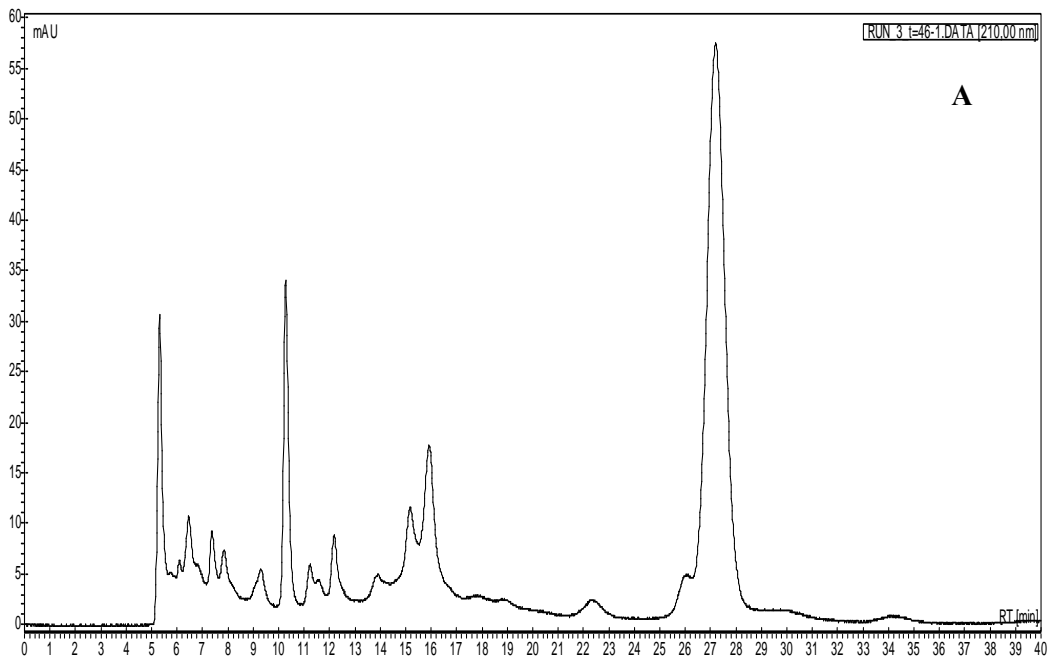
Σχήμα 6.3. Χρωματογραφήματα διαχωρισμού οργανικών οξέων με HPLC στην άλμη της ζύμωσης με κωδικό 2 (4 % NaCl - 4 % KCl - 0 % CaCl₂) για τους χρόνους A) t=0, B) t=13 και Γ) t=27 ημέρες.



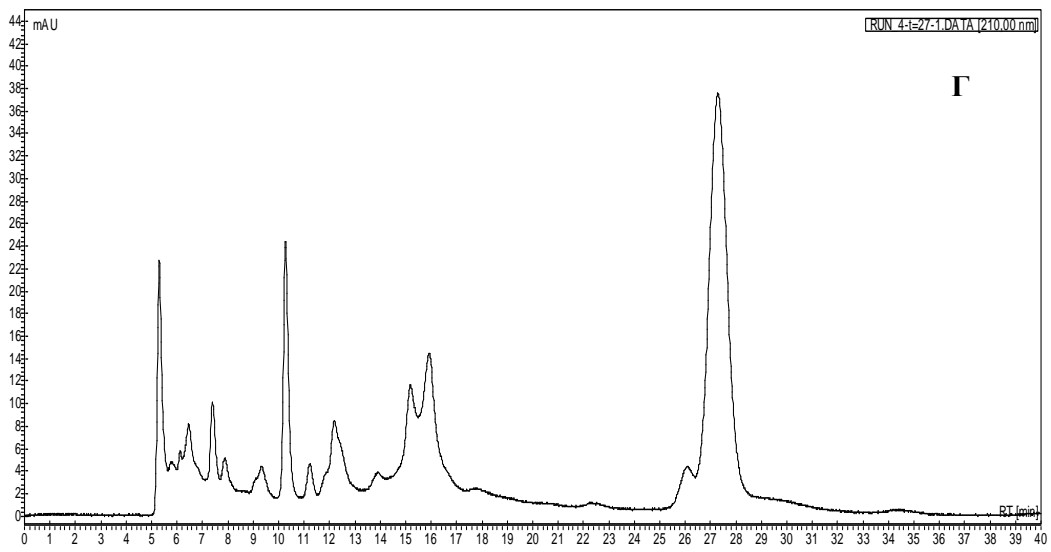
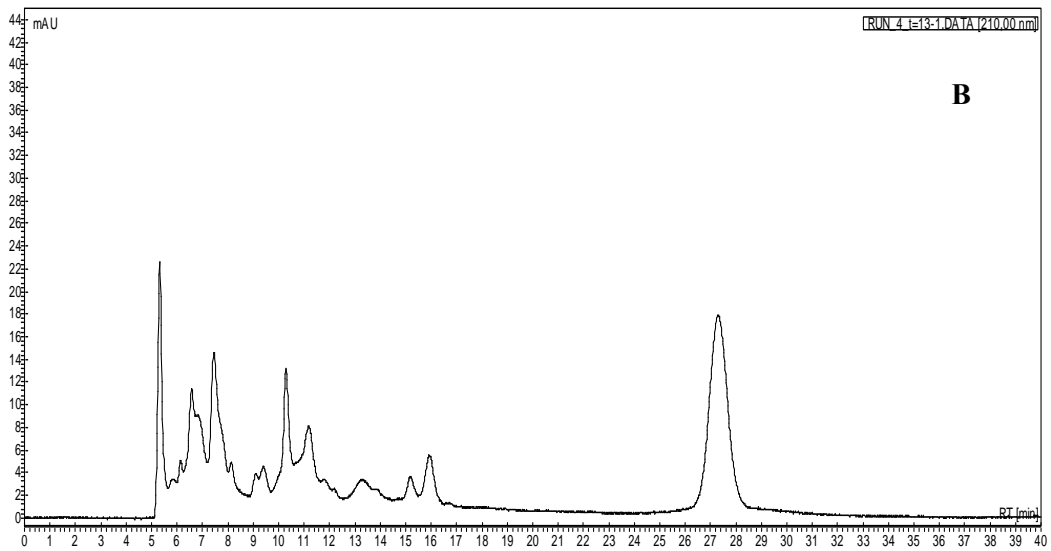
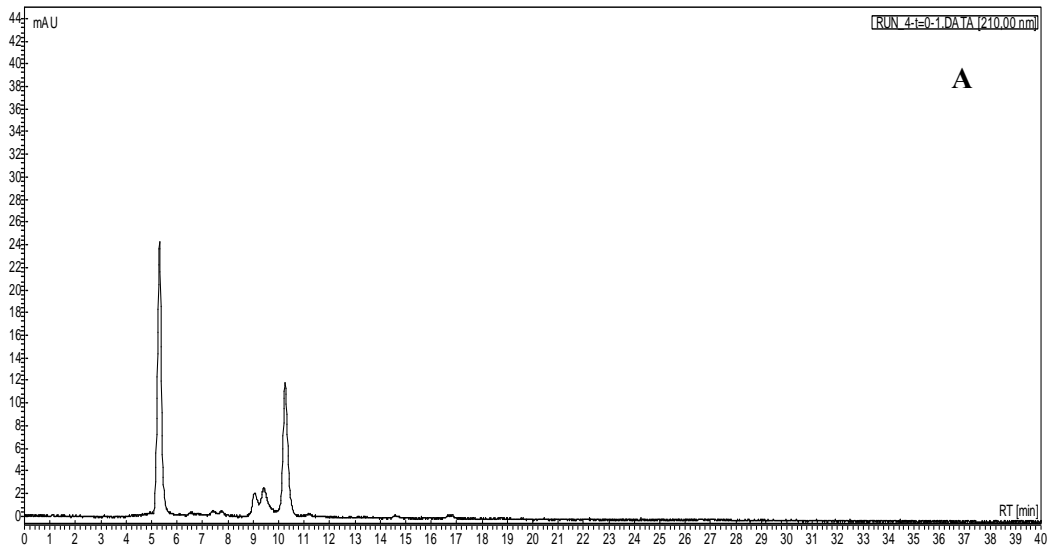
Σχήμα 6.4. Χρωματογραφήματα διαχωρισμού οργανικών οξέων με HPLC στην άλμη της ζύμωσης με κωδικό 2 (4 % NaCl - 4 % KCl - 0 % CaCl₂) για τους χρόνους A) t=46 και B) t=53 ημέρες.



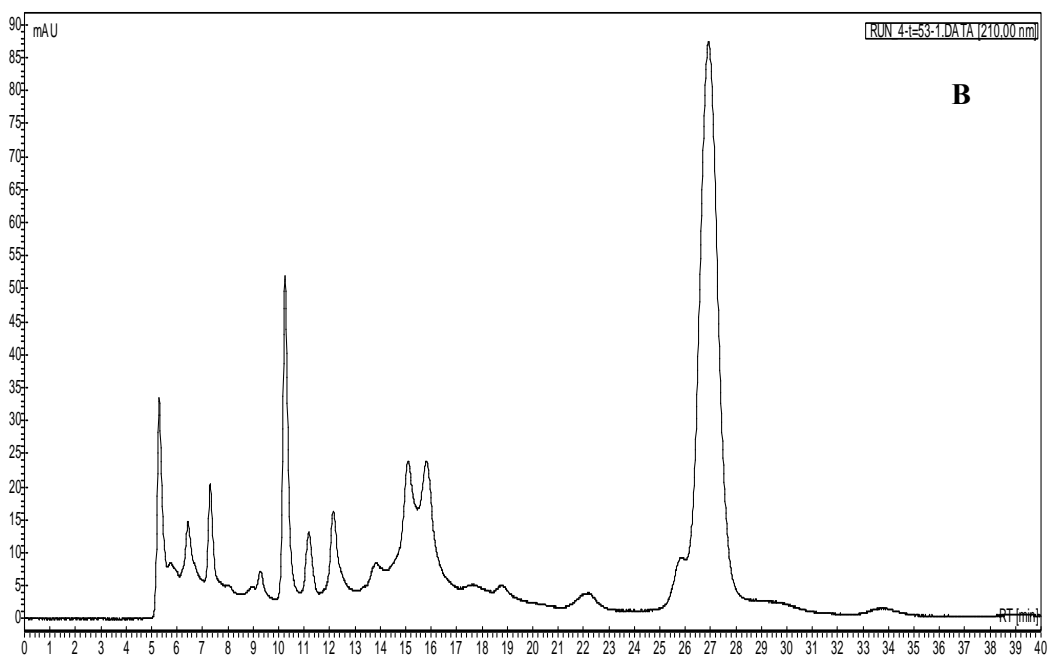
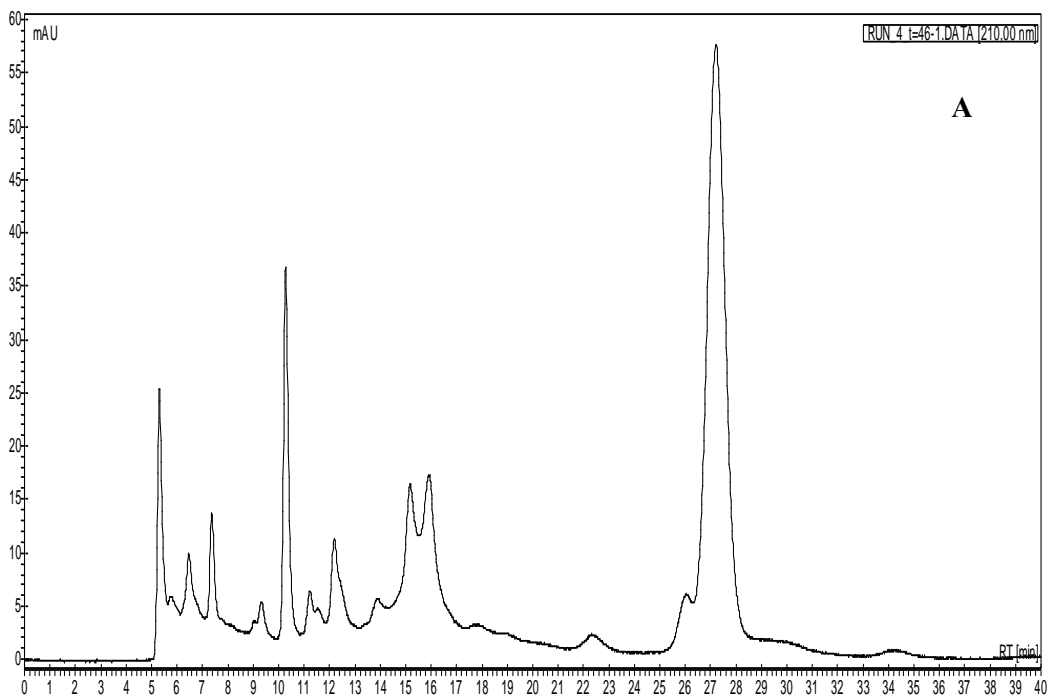
Σχήμα 6.5. Χρωματογραφήματα διαχωρισμού οργανικών οξέων με HPLC στην άλμη της ζύμωσης με κωδικό 3 (4 % NaCl - 0 % KCl - 4 % CaCl₂) για τους χρόνους Α) t=0, Β) t=13 και Γ) t=27 ημέρες.



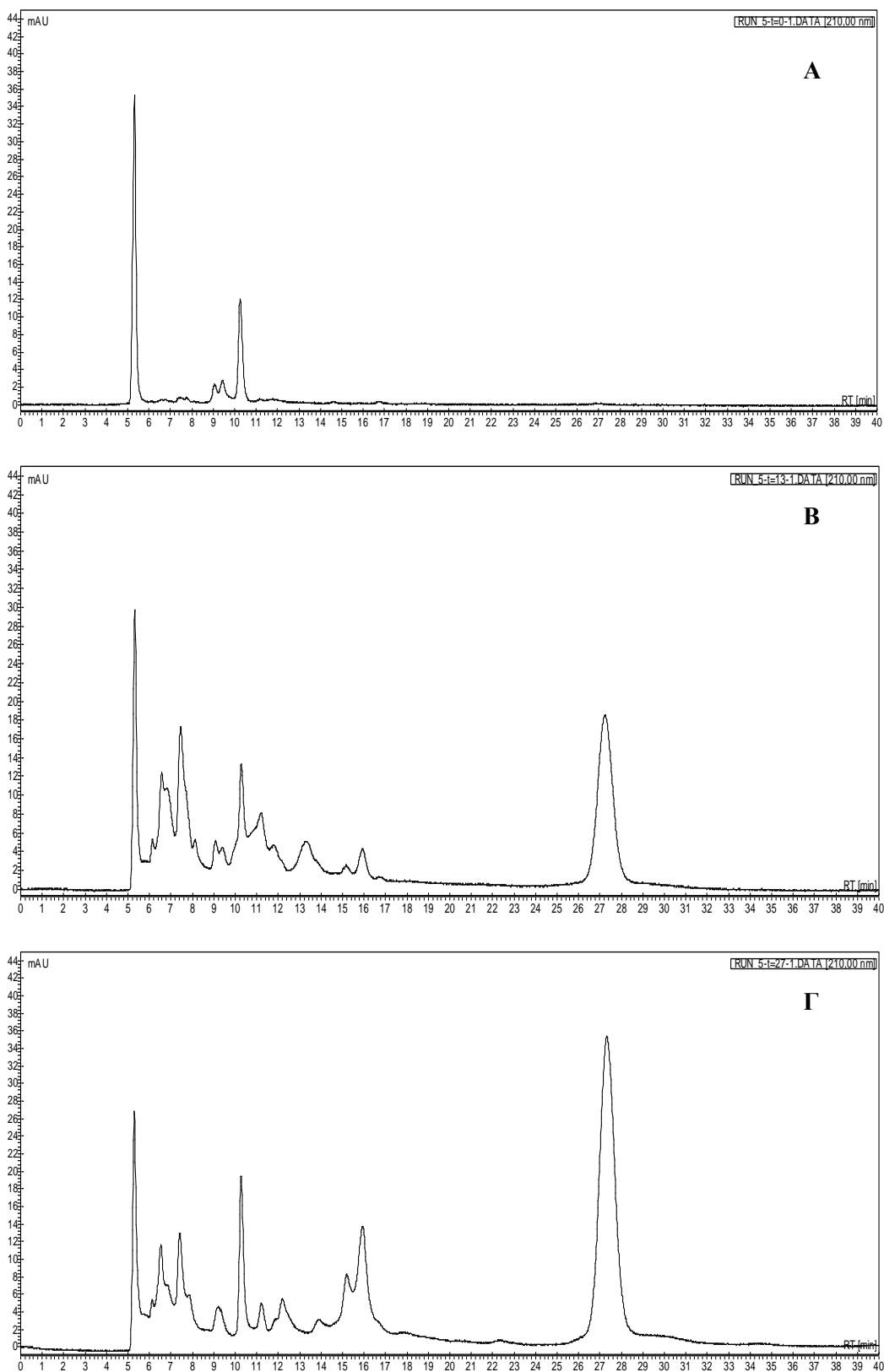
Σχήμα 6.6. Χρωματογραφήματα διαχωρισμού οργανικών οξέων με HPLC στην άλμη της ζύμωσης με κωδικό 3 (4 % NaCl - 0 % KCl - 4 % CaCl₂) για τους χρόνους Α) t=46 και Β) t=53 ημέρες.



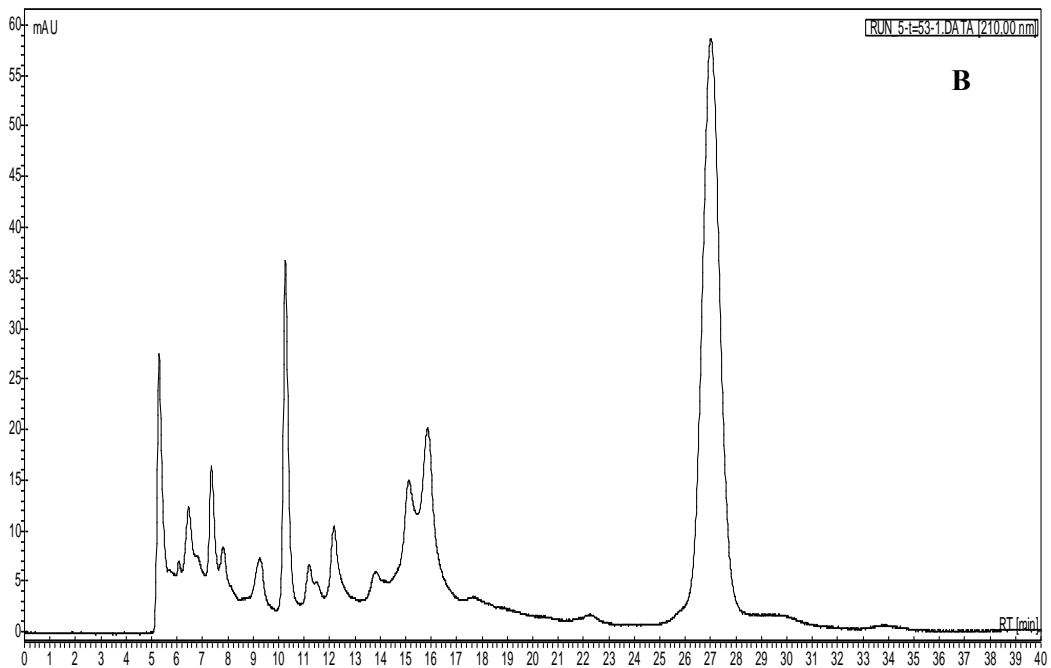
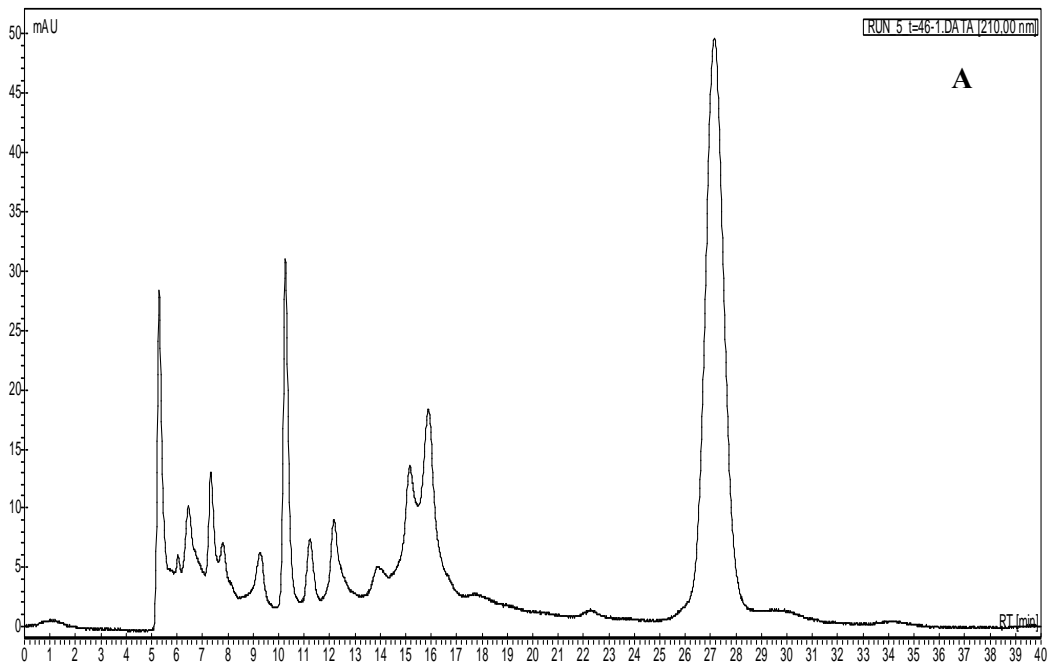
Σχήμα 6.7. Χρωματογραφήματα διαχωρισμού οργανικών οξέων με HPLC στην άλμη της ζύμωσης με κωδικό 4 (0 % NaCl - 8 % KCl - 0 % CaCl₂) για τους χρόνους Α) t=0, Β) t=13και Γ) t=27 ημέρες.



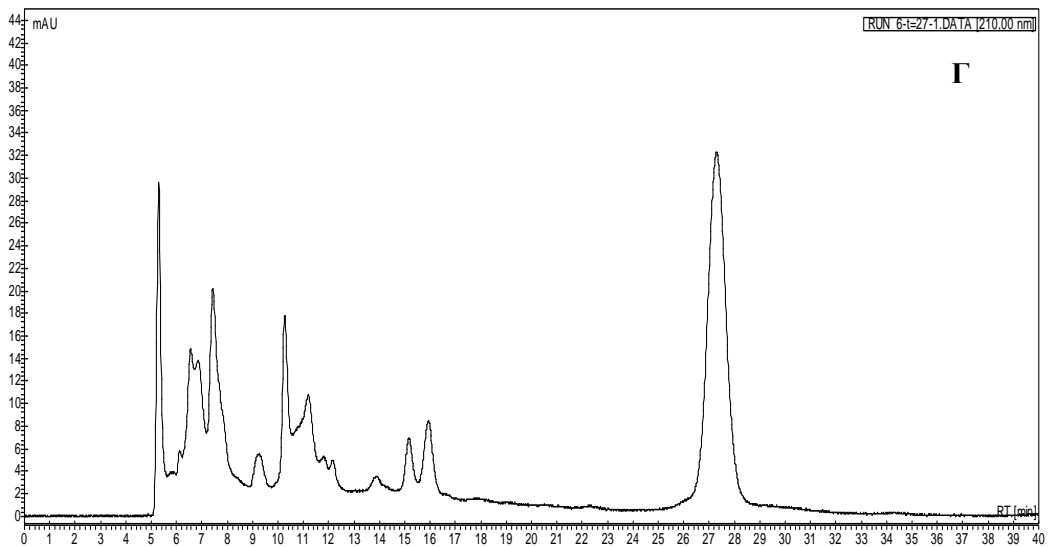
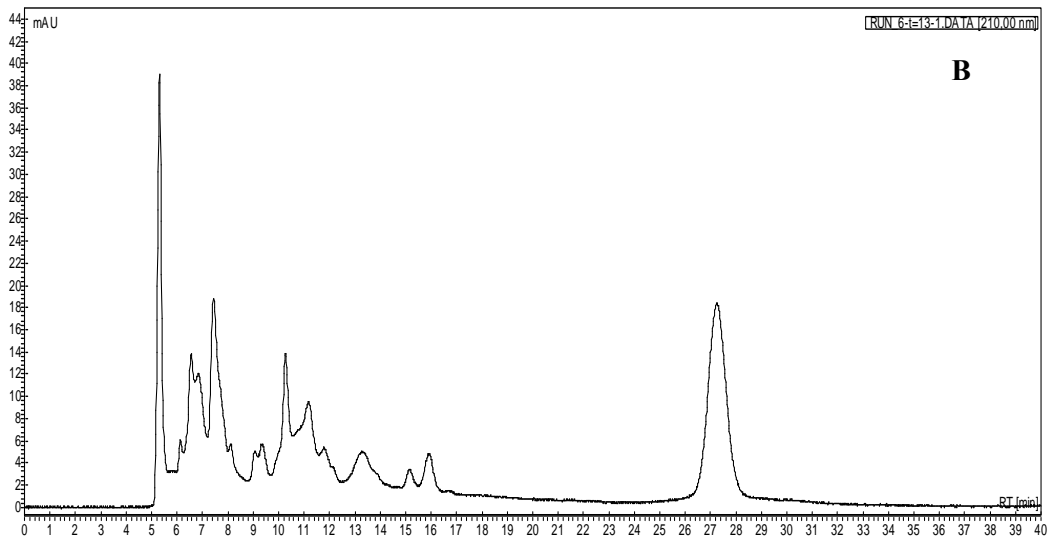
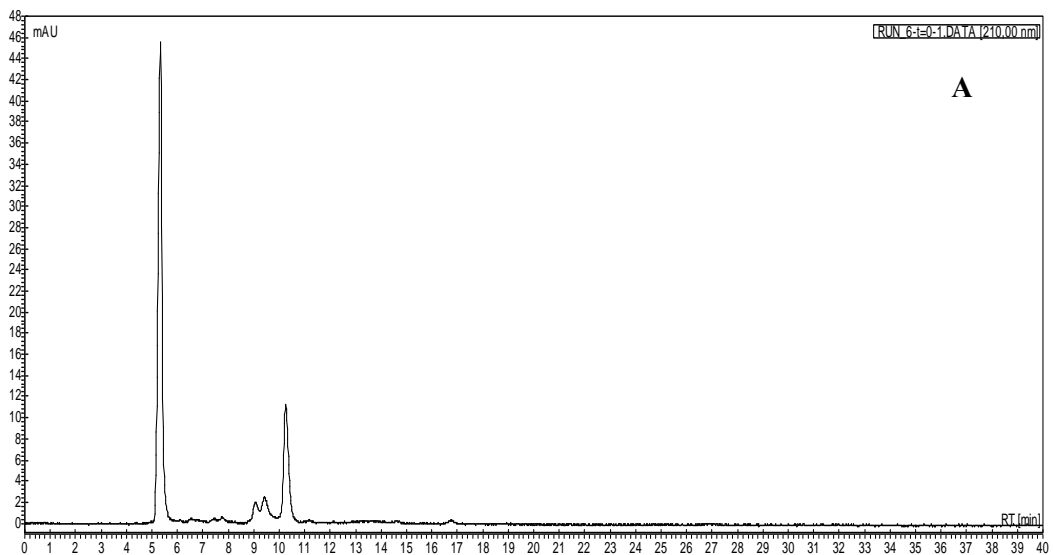
Σχήμα 6.8. Χρωματογραφήματα διαχωρισμού οργανικών οξέων με HPLC στην άλμη της ζύμωσης με κωδικό 4 (0 % NaCl - 8 % KCl - 0 % CaCl₂) για τους χρόνους A) t=46 και B) t=53 ημέρες.



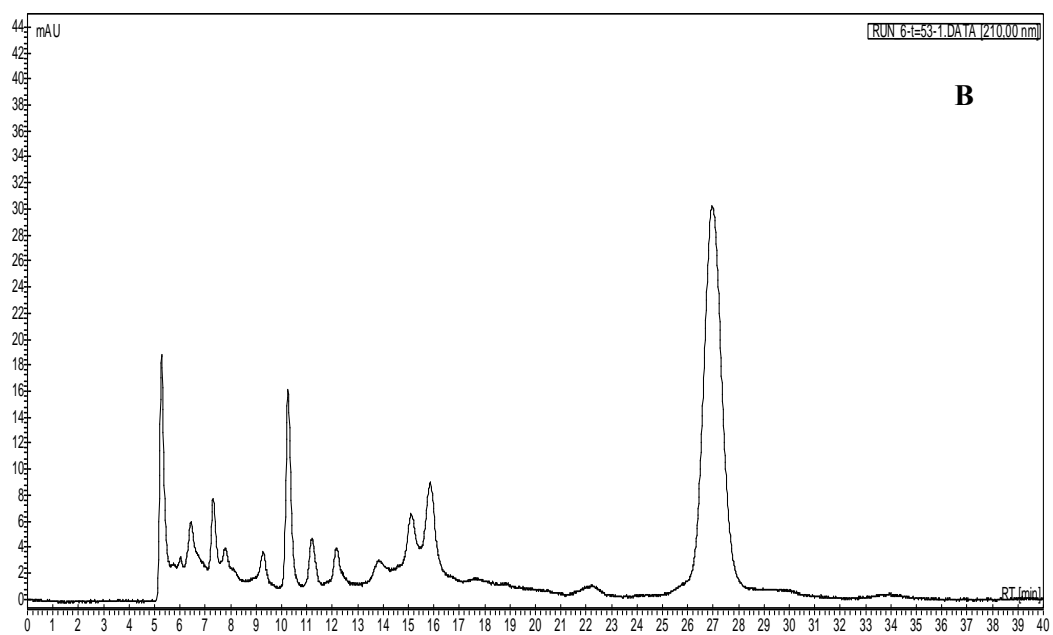
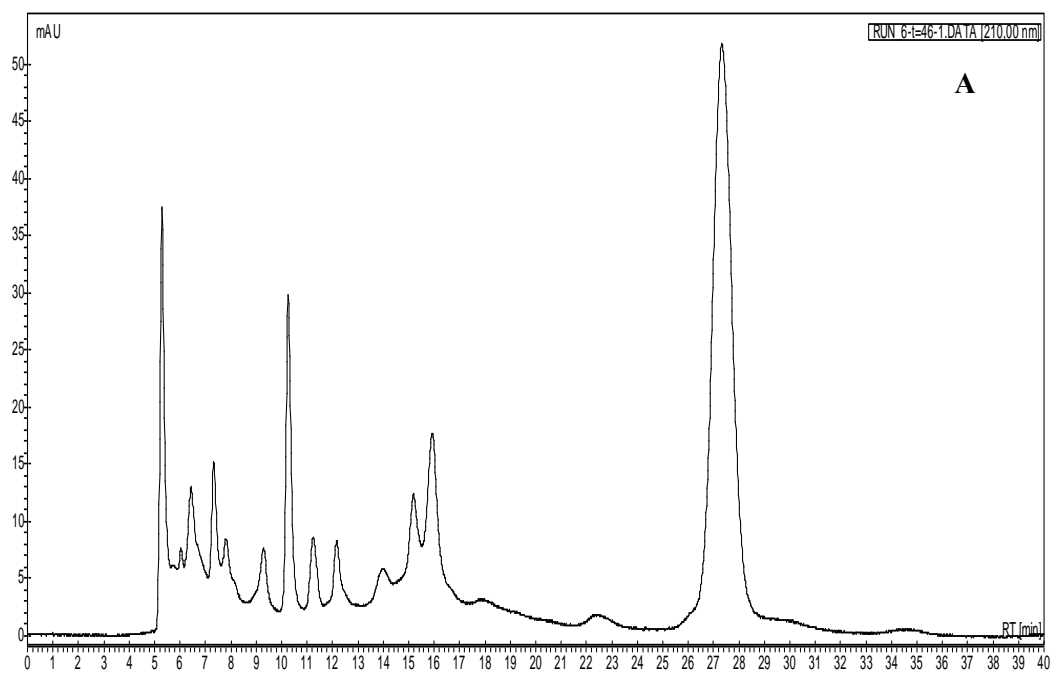
Σχήμα 6.9. Χρωματογραφήματα διαχωρισμού οργανικών οξέων με HPLC στην άλμη της ζύμωσης με κωδικό 5 (0 % NaCl - 4 % KCl - 4 % CaCl₂) για τους χρόνους A) t=0, B) t=13 και Γ) t=27 ημέρες.



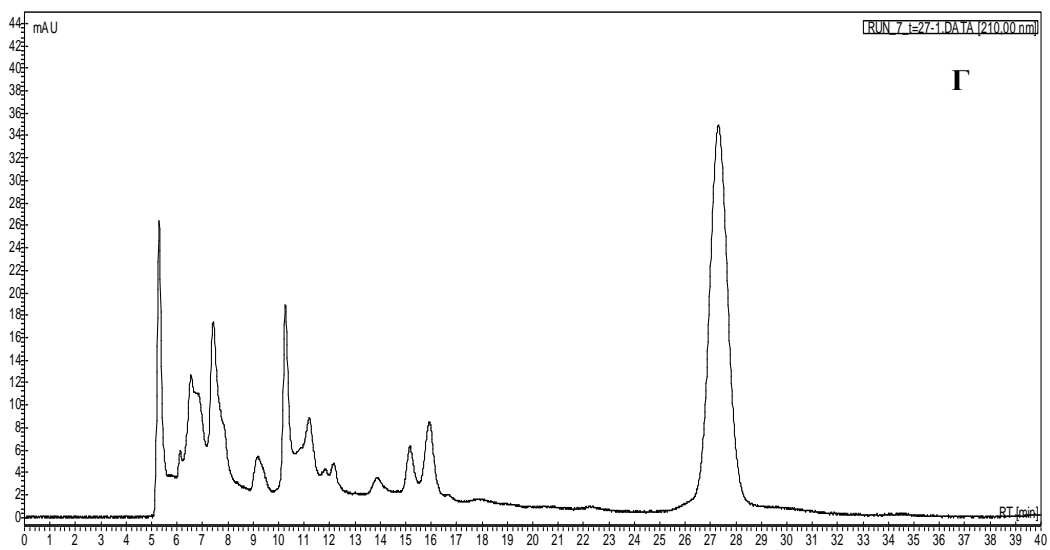
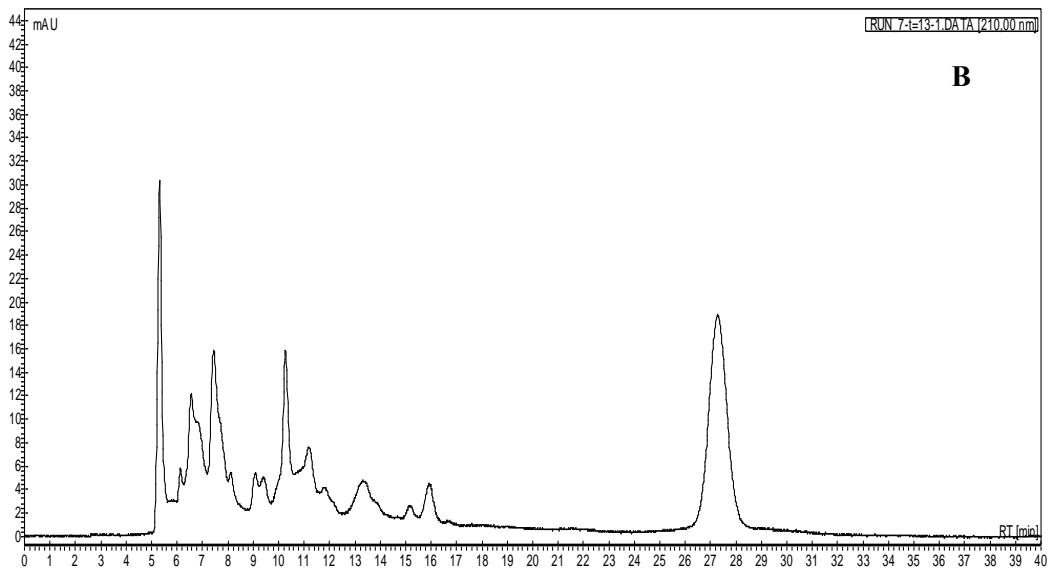
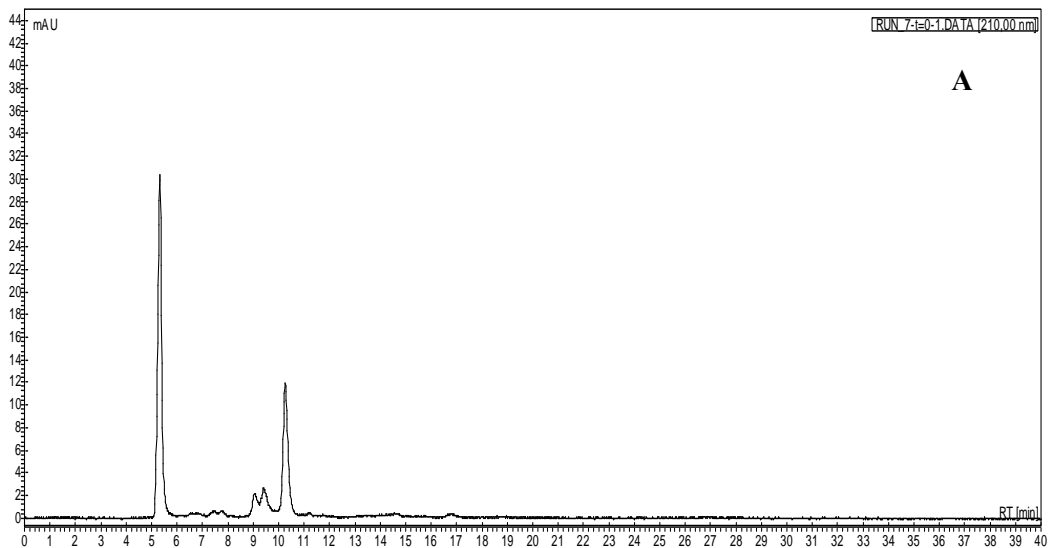
Σχήμα 6.10. Χρωματογραφήματα διαχωρισμού οργανικών οξέων με HPLC στην άλμη της ζύμωσης με κωδικό 5 (0 % NaCl – 4 % KCl - 4 % CaCl₂) για τους χρόνους A) t=46 και B) t=53 ημέρες.



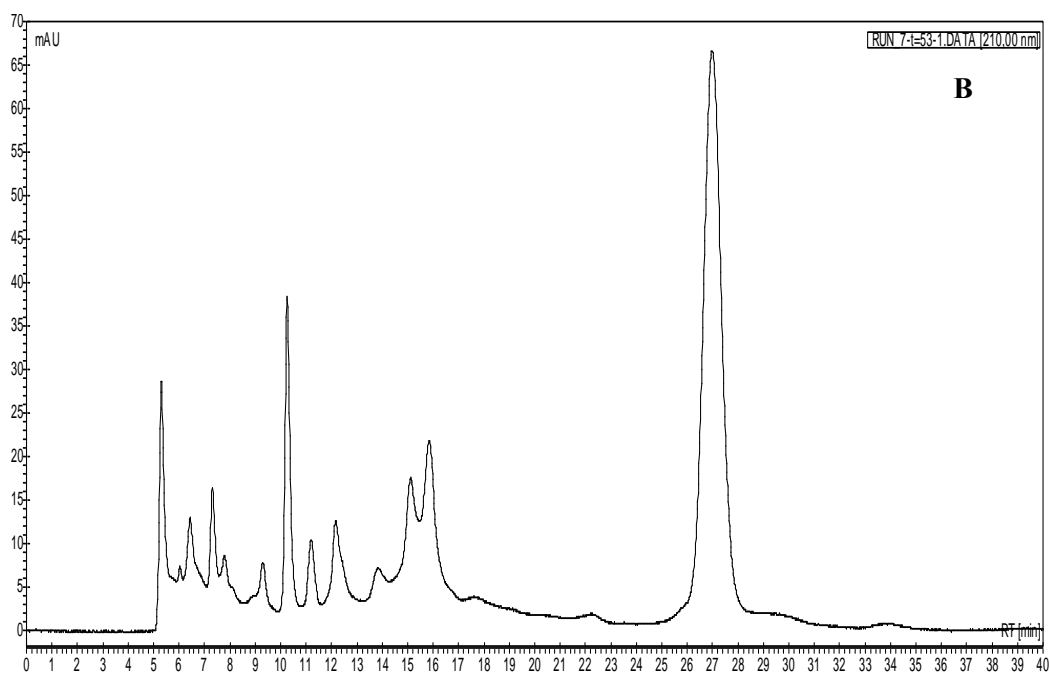
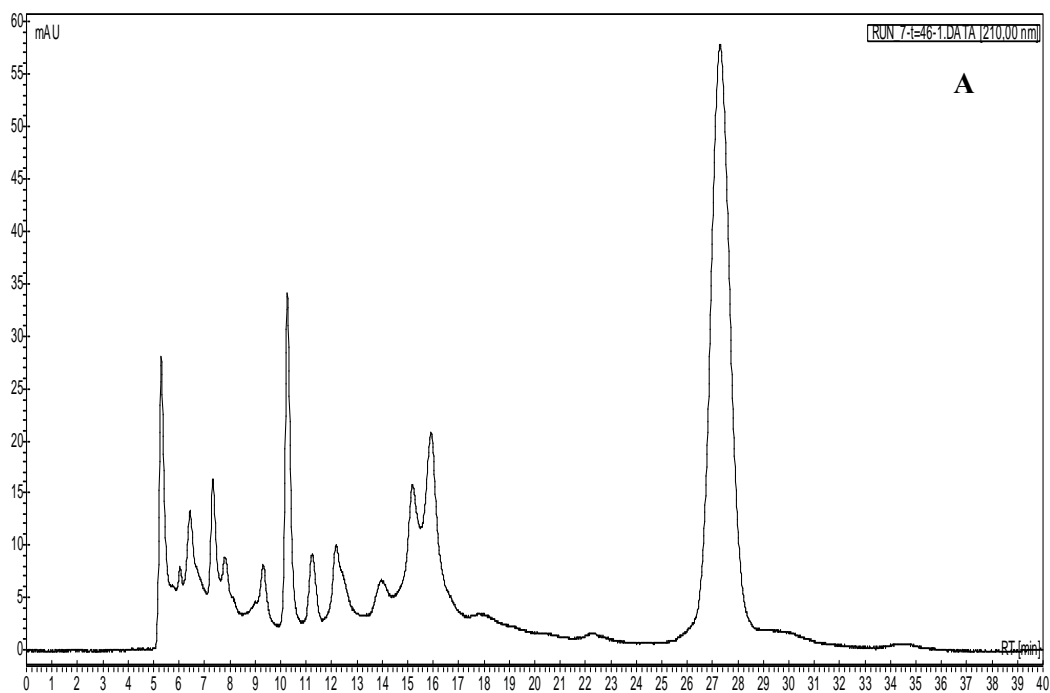
Σχήμα 6.11. Χρωματογραφήματα διαχωρισμού οργανικών οξέων με HPLC στην άλμη της ζύμωσης με κωδικό 6 (0 % NaCl - 0 % KCl - 8 % CaCl₂) για τους χρόνους Α) t=0, Β) t=13και Γ) t=27 ημέρες.



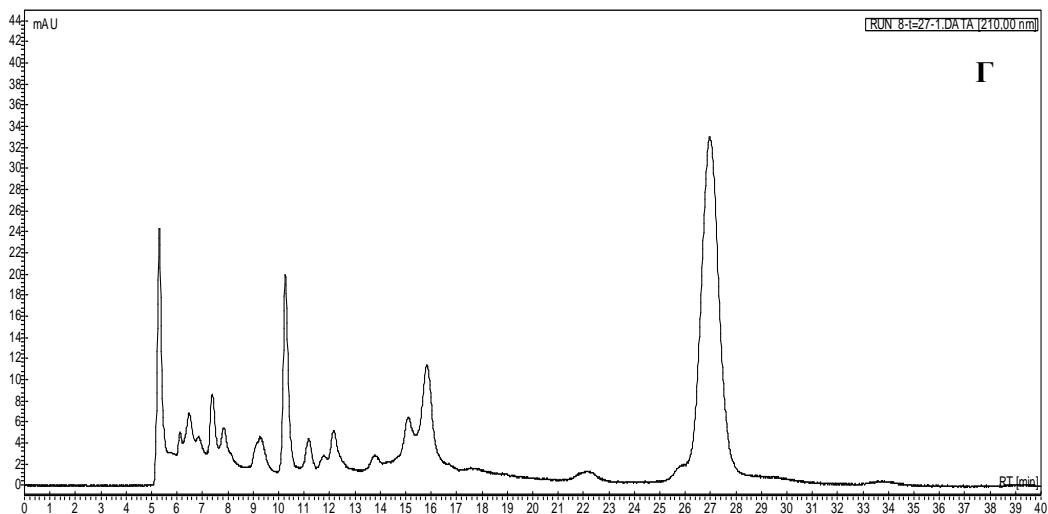
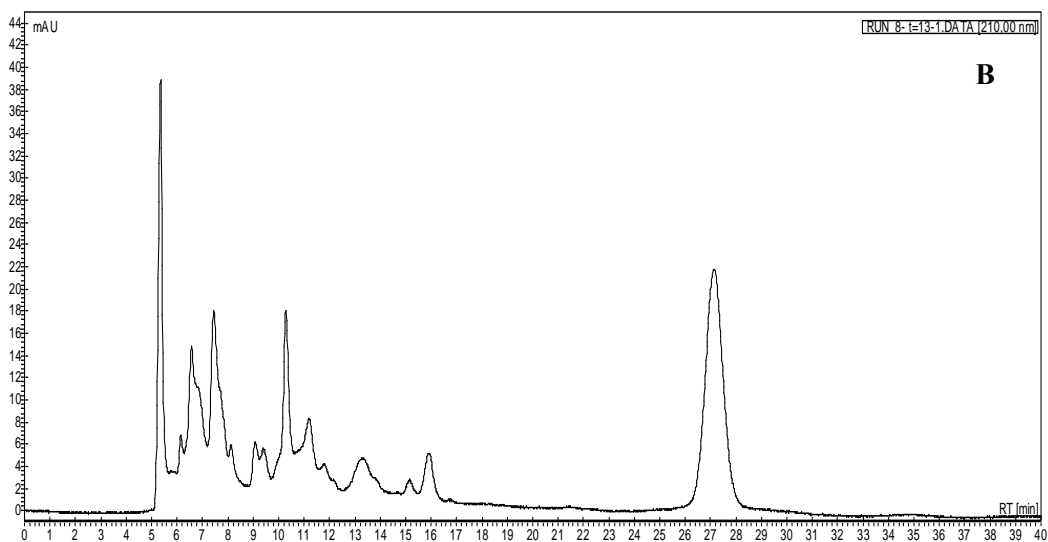
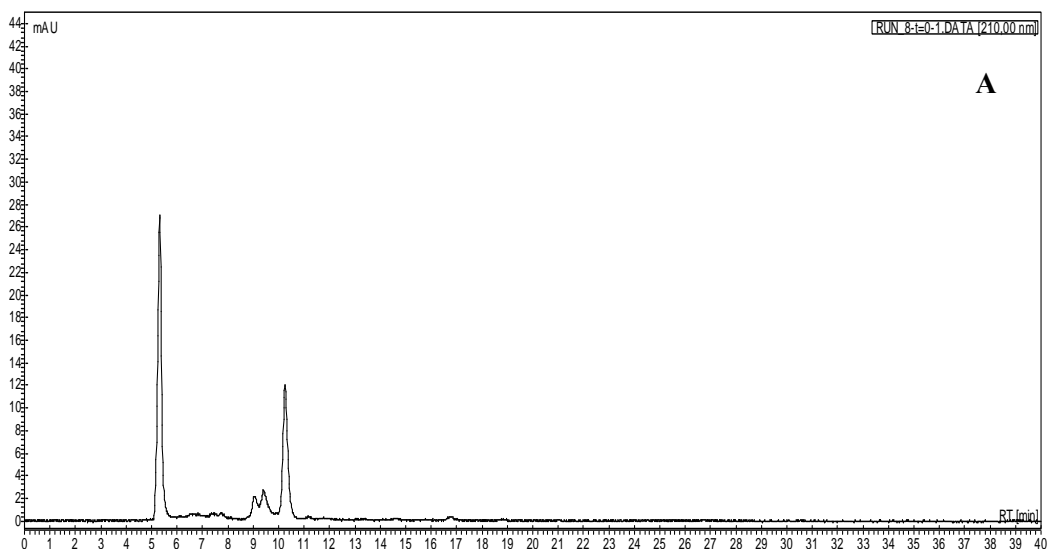
Σχήμα 6.12. Χρωματογραφήματα διαχωρισμού οργανικών οξέων με HPLC στην άλμη της ζύμωσης με κωδικό 6 (0 % NaCl - 0 % KCl - 8 % CaCl₂) για τους χρόνους A) t=46 και B) t=53 ημέρες.



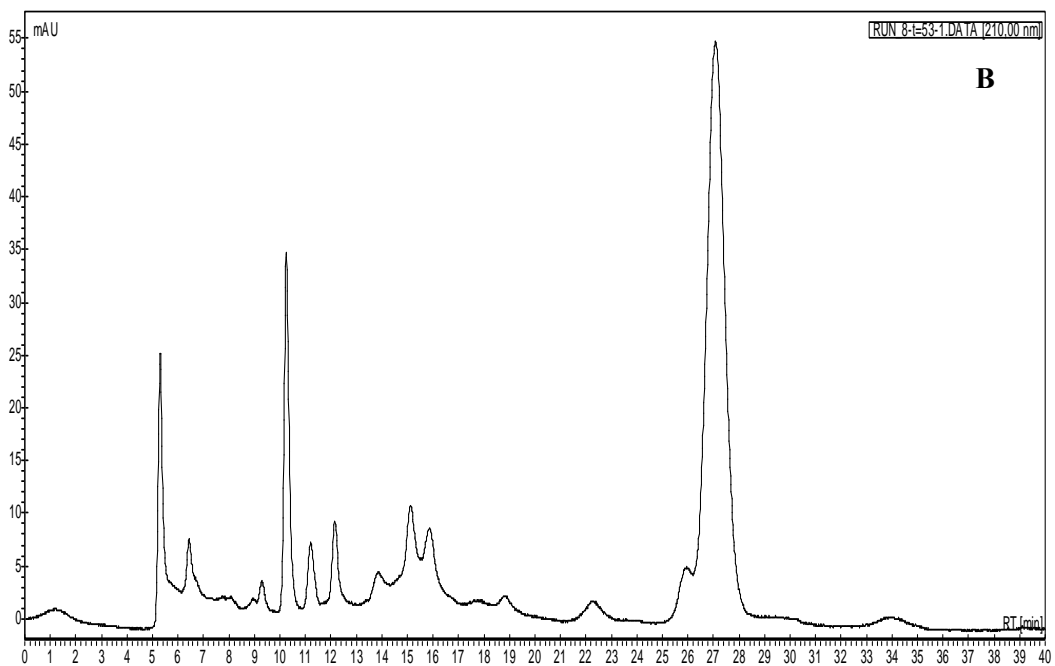
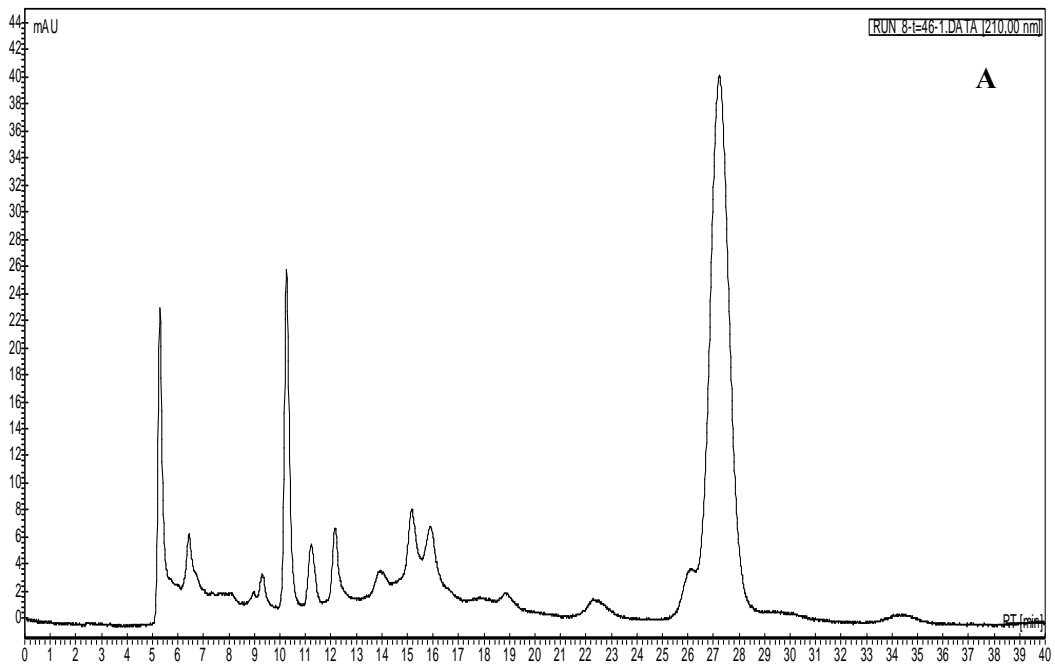
Σχήμα 6.13. Χρωματογραφήματα διαχωρισμού οργανικών οξέων με HPLC στην άλμη της ζύμωσης με κωδικό 7 (2,66 % NaCl – 2,66 % KCl – 2,66 % CaCl₂) για τους χρόνους Α) t=0, Β) t=13 και Γ) t=27 ημέρες.



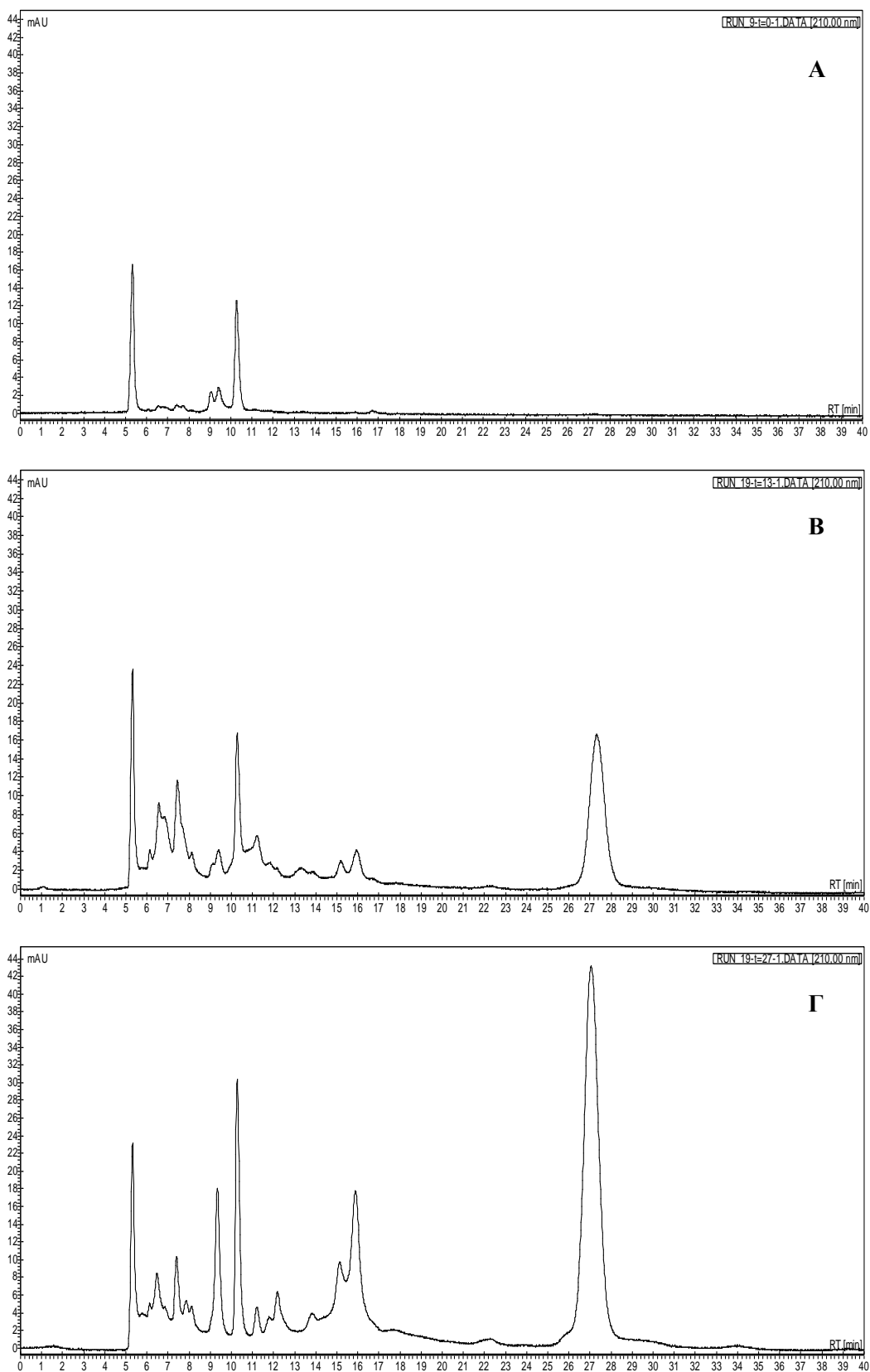
Σχήμα 6.14. Χρωματογραφήματα διαχωρισμού οργανικών οξέων με HPLC στην άλμη της ζύμωσης με κωδικό 7 (2,66 % NaCl – 2,66 % KCl – 2,66 % CaCl₂) για τους χρόνους Α) t=46 και Β) t=53 ημέρες.



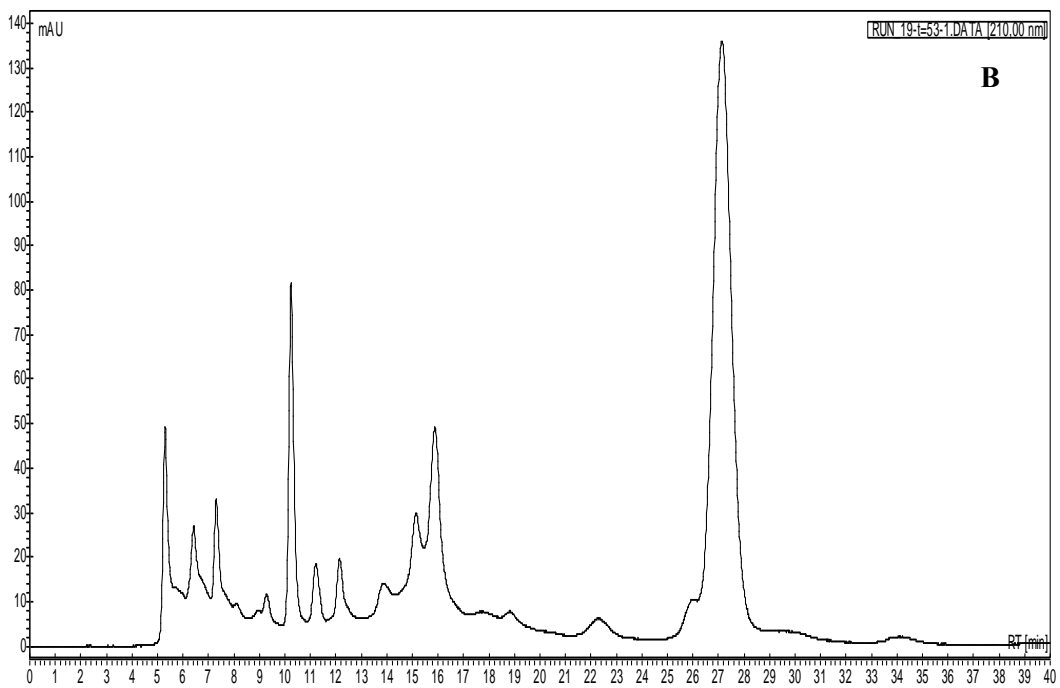
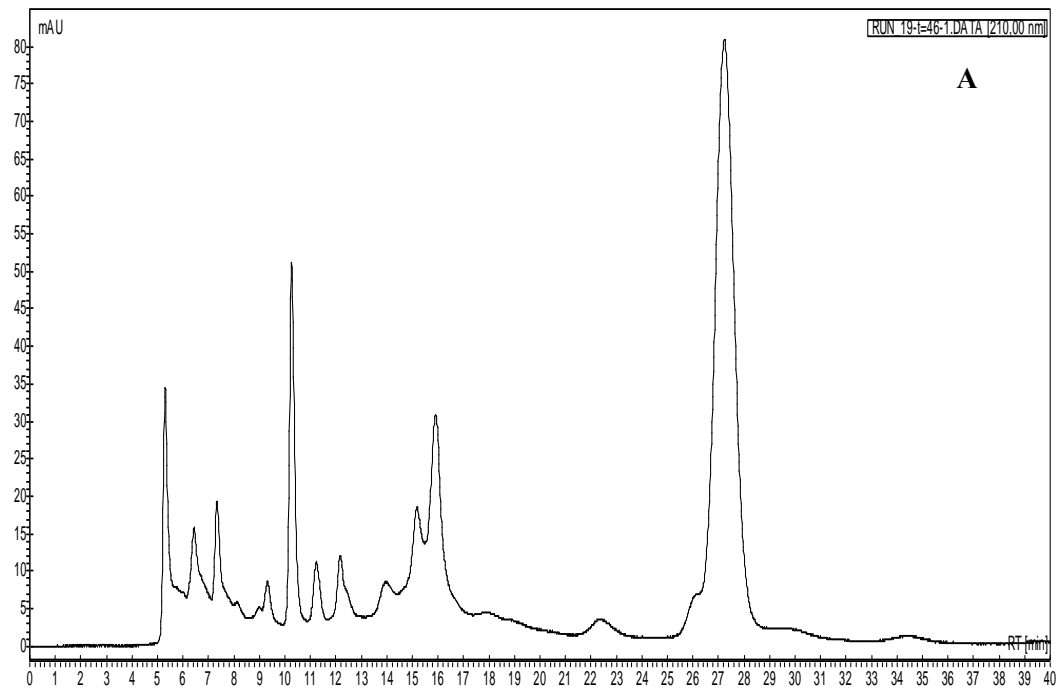
Σχήμα 6.15. Χρωματογραφήματα διαχωρισμού οργανικών οξέων με HPLC στην άλμη της ζύμωσης με κωδικό 8 (5,33 % NaCl – 1,33 % KCl – 1,33 % CaCl₂) για τους χρόνους Α) t=0, Β) t=13 και Γ) t=27 ημέρες.



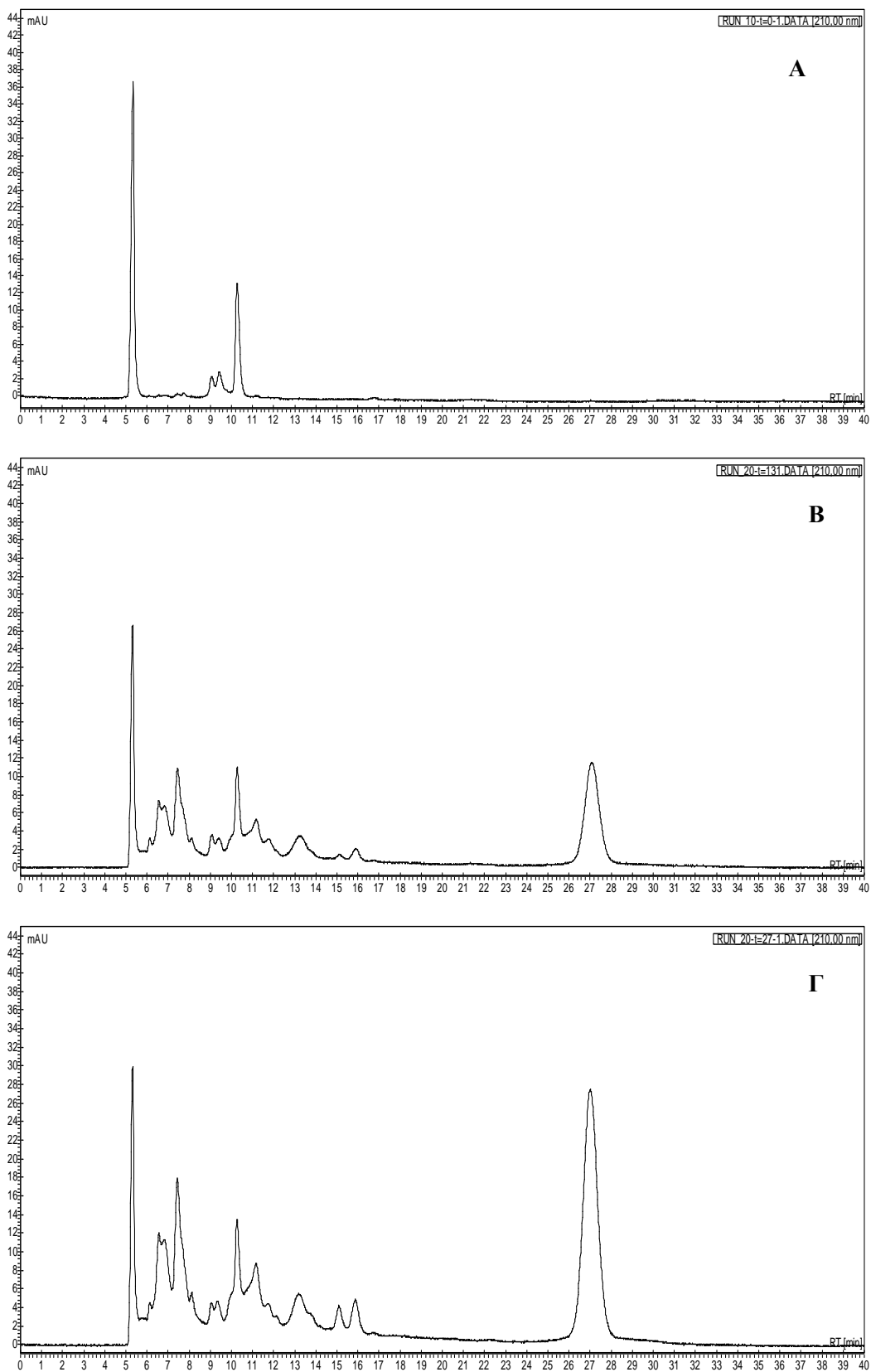
Σχήμα 6.16. Χρωματογραφήματα διαχωρισμού οργανικών οξέων με HPLC στην άλμη της ζύμωσης με κωδικό 8 (5,33 % NaCl – 1,33 % KCl – 1,33 % CaCl₂) για τους χρόνους A) t=46 και B) t=53 ημέρες.



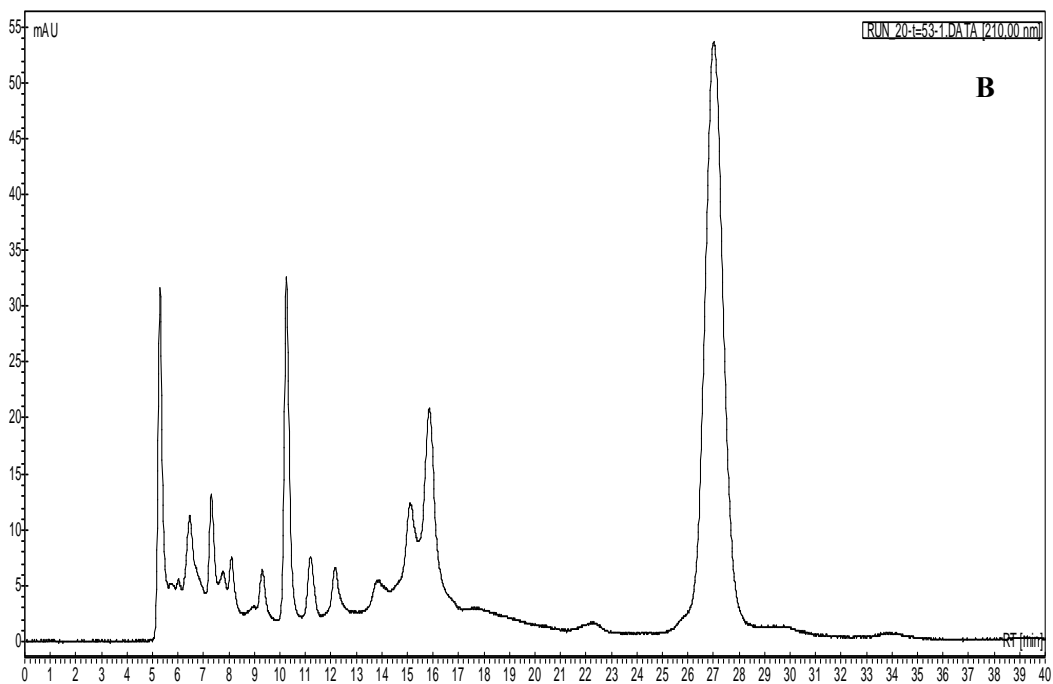
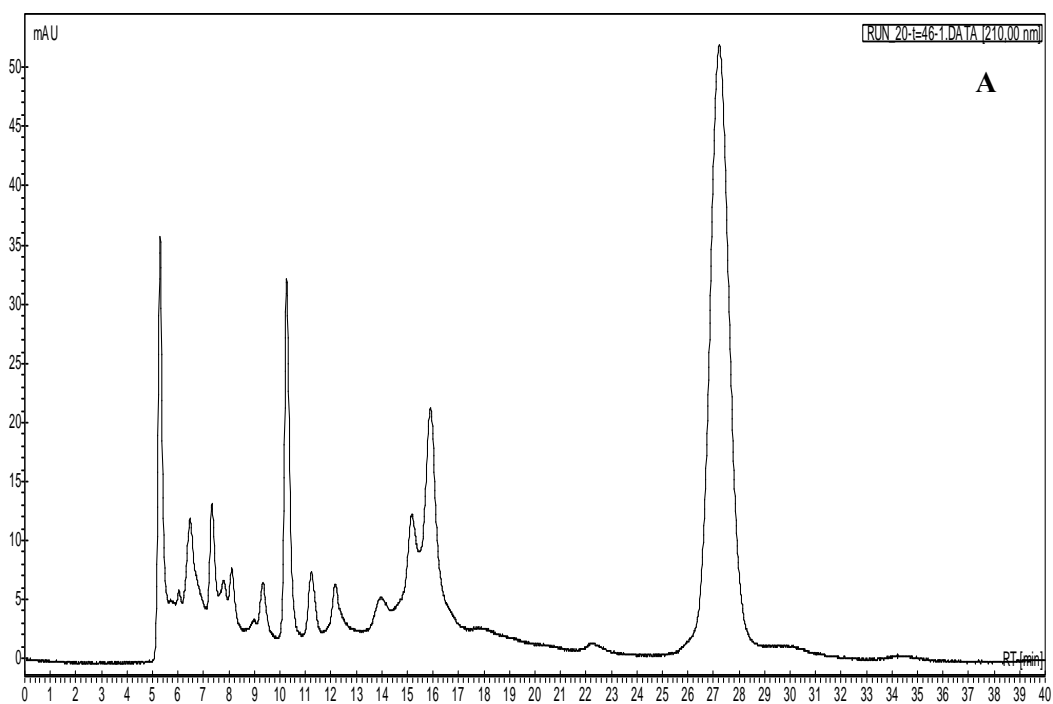
Σχήμα 6.17. Χρωματογραφήματα διαχωρισμού οργανικών οξέων με HPLC στην άλμη της ζύμωσης με κωδικό 9 (1,33 % NaCl – 5,33 % KCl – 1,33 % CaCl₂) για τους χρόνους Α) t=0, Β) t=13 και Γ) t=27 ημέρες.



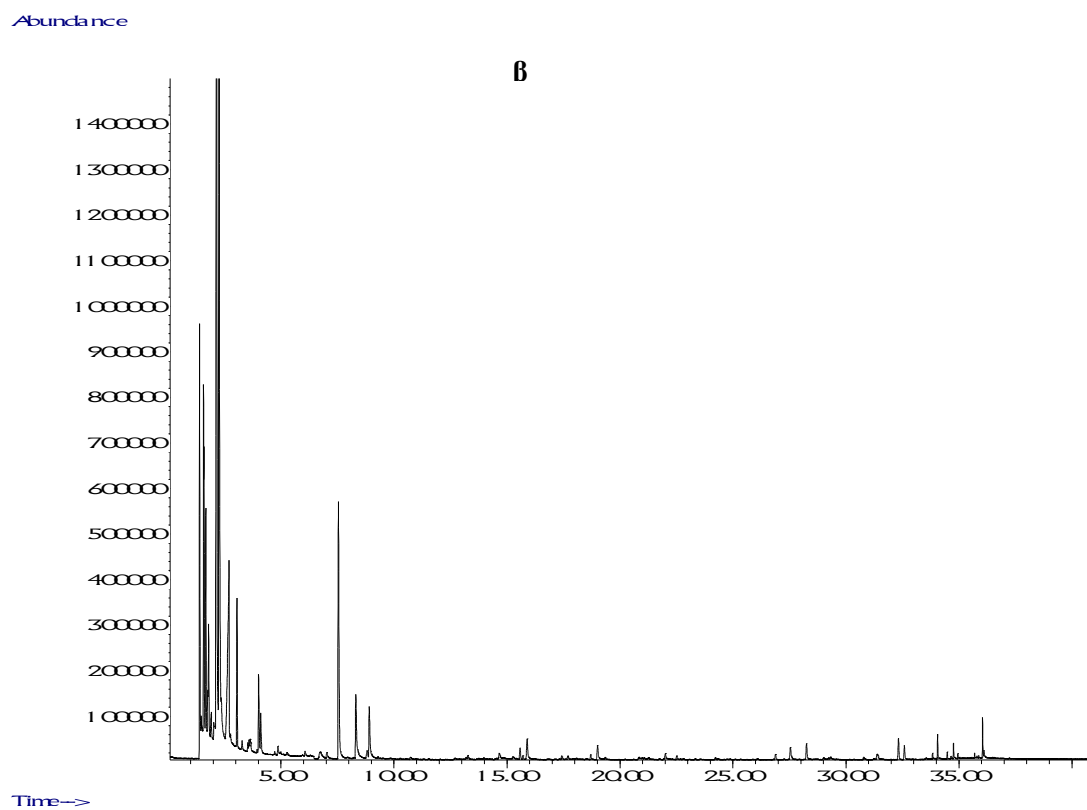
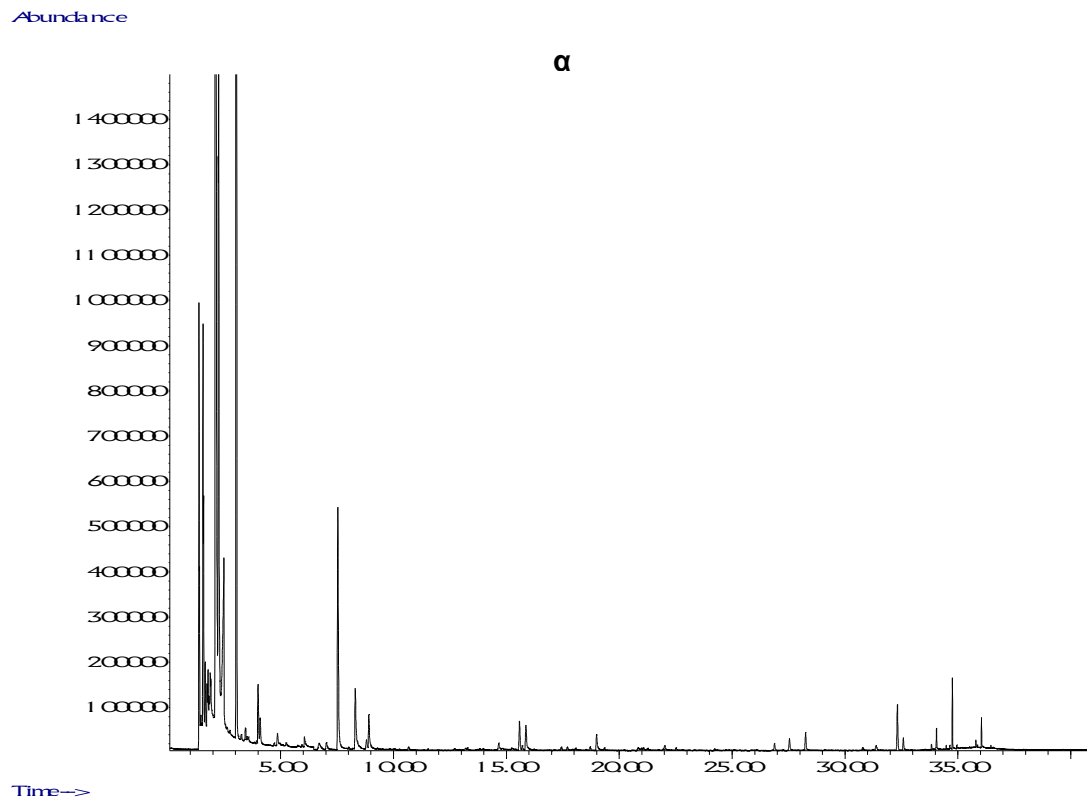
Σχήμα 6.18. Χρωματογραφήματα διαχωρισμού οργανικών οξέων με HPLC στην άλμη της ζύμωσης με κωδικό 9 (1,33 % NaCl – 5,33 % KCl – 1,33 % CaCl₂) για τους χρόνους A) t=46 και B) t=53 ημέρες.



Σχήμα 6.19. Χρωματογραφήματα διαχωρισμού οργανικών οξέων με HPLC στην άλμη της ζύμωσης με κωδικό 10 (1,33 % NaCl – 1,33 % KCl – 5,33 % CaCl₂) για τους χρόνους Α) t=0, Β) t=13 και Γ) t=27 ημέρες.

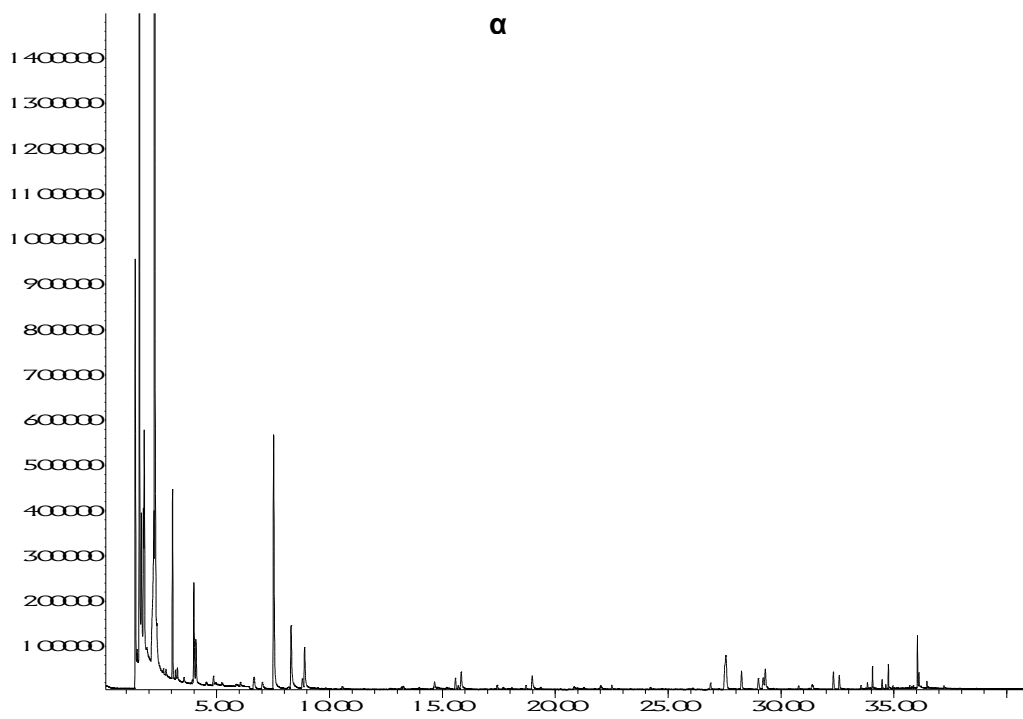


Σχήμα 6.20. Χρωματογραφήματα διαχωρισμού οργανικών οξέων με HPLC στην άλμη της ζύμωσης με κωδικό 10 (1,33 % NaCl – 1,33 % KCl – 5,33 % CaCl₂) για τους χρόνους A) t=46 και B) t=53 ημέρες.



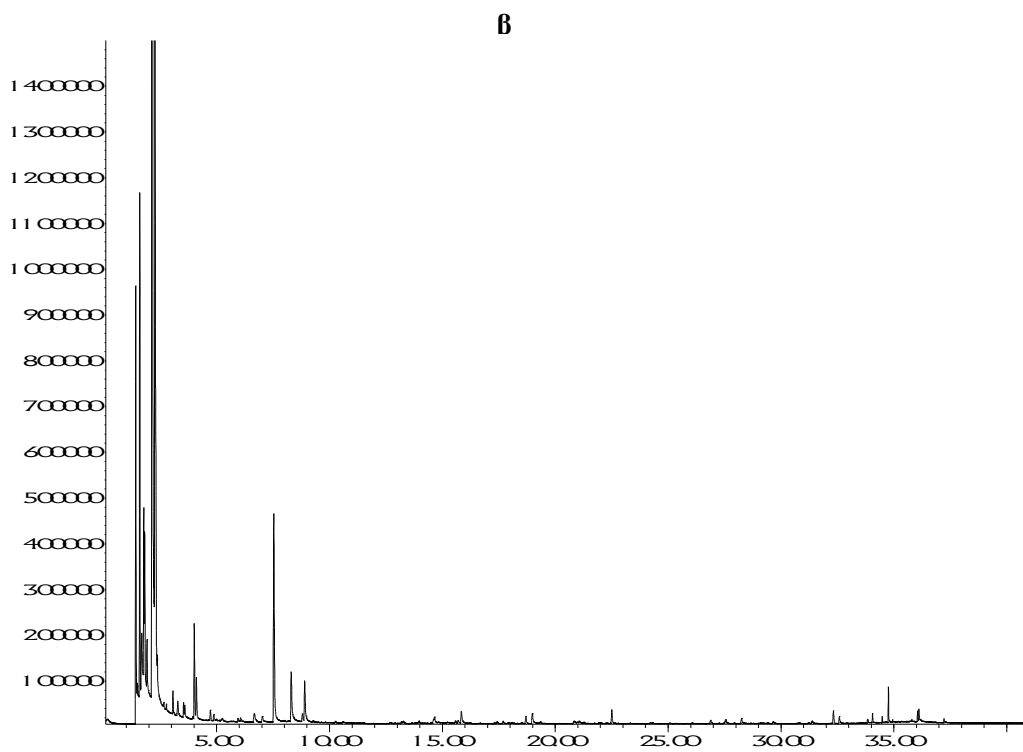
Σχήμα 6.21. Αέρια χρωματογραφήματα για την ανάλυση των πτητικών συστατικών της άλμης της ζύμωσης α) με κωδικό 1 και β) με κωδικό 2 στο τέλος του πειράματος με GC-MS.

Abundance



Time-->

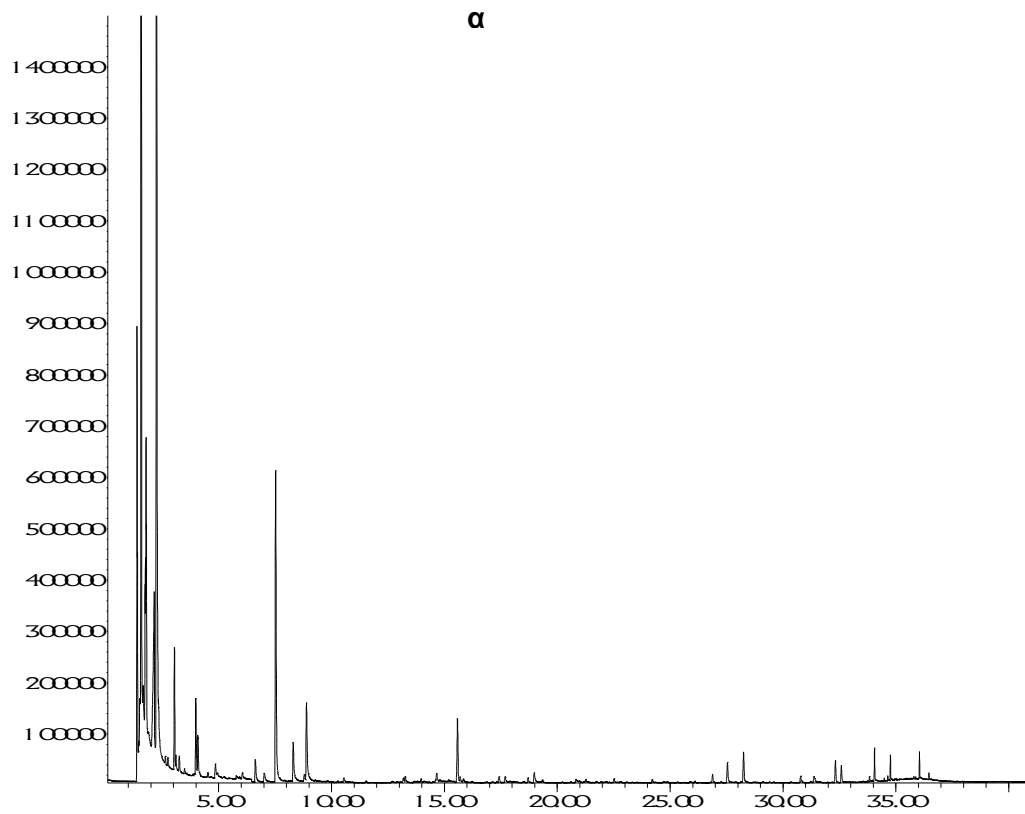
Abundance



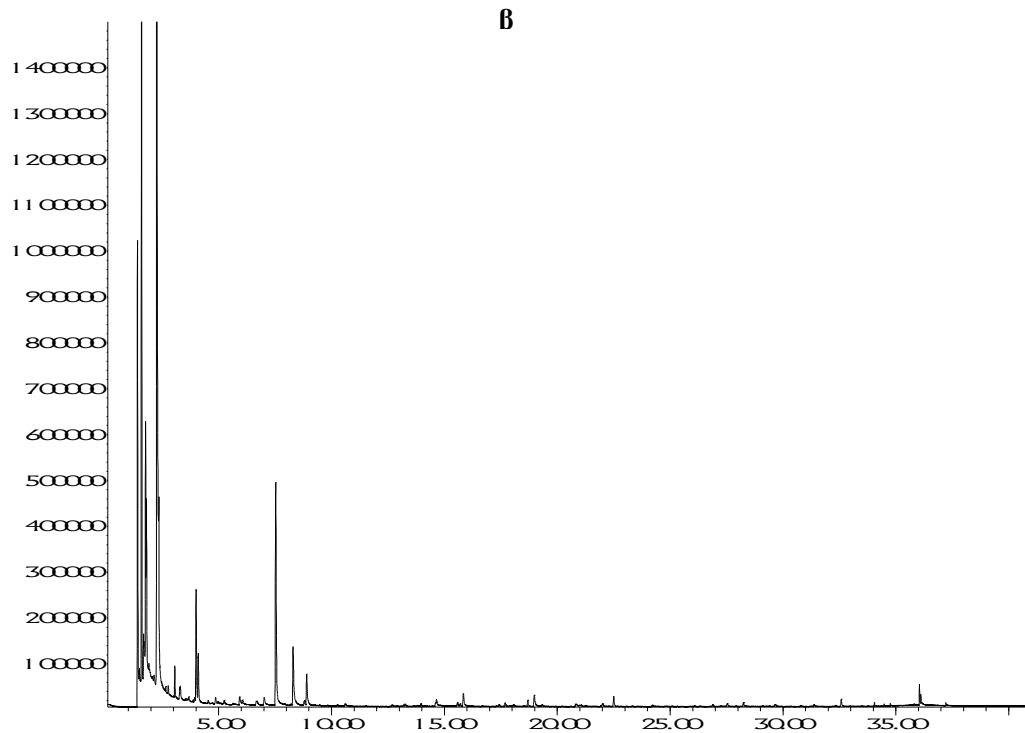
Time-->

Σχήμα 6.22. Αέρια χρωματογραφήματα (GC-MS) για την ανάλυση των πτητικών συστατικών της άλμης της ζύμωσης α) με κωδικό 3 και β) με κωδικό 4, στο τέλος του πειράματος.

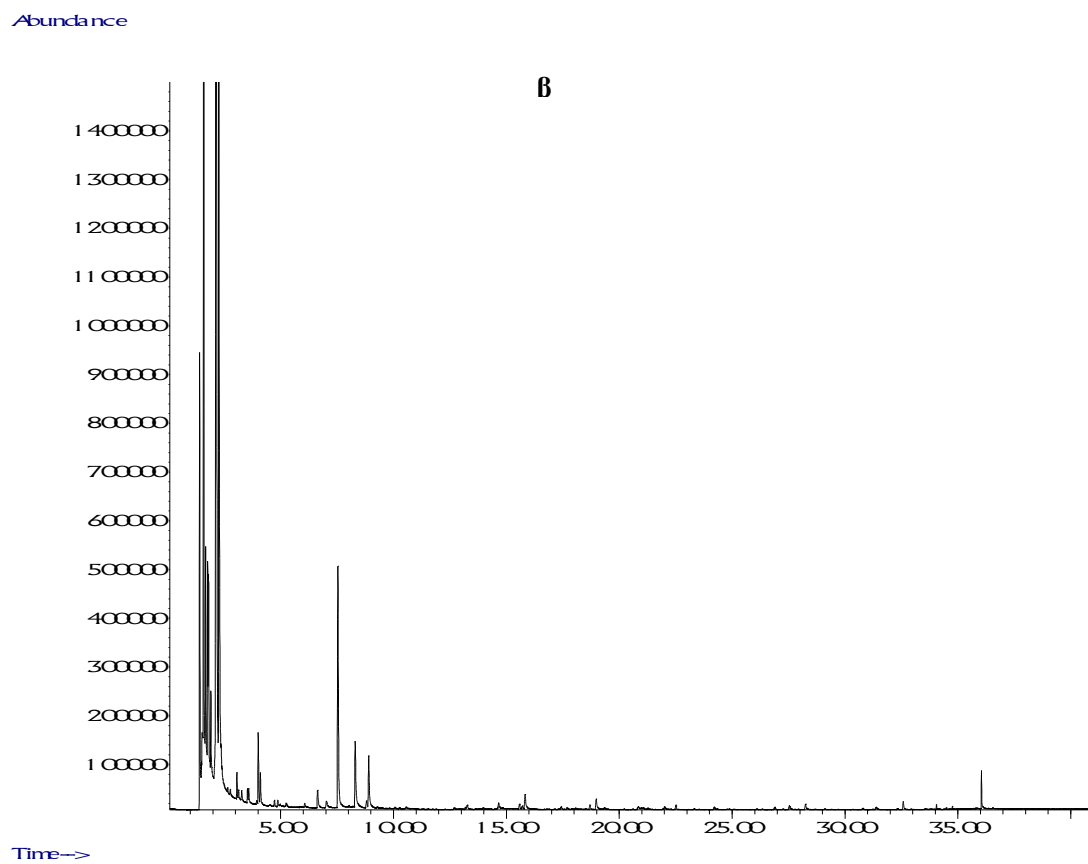
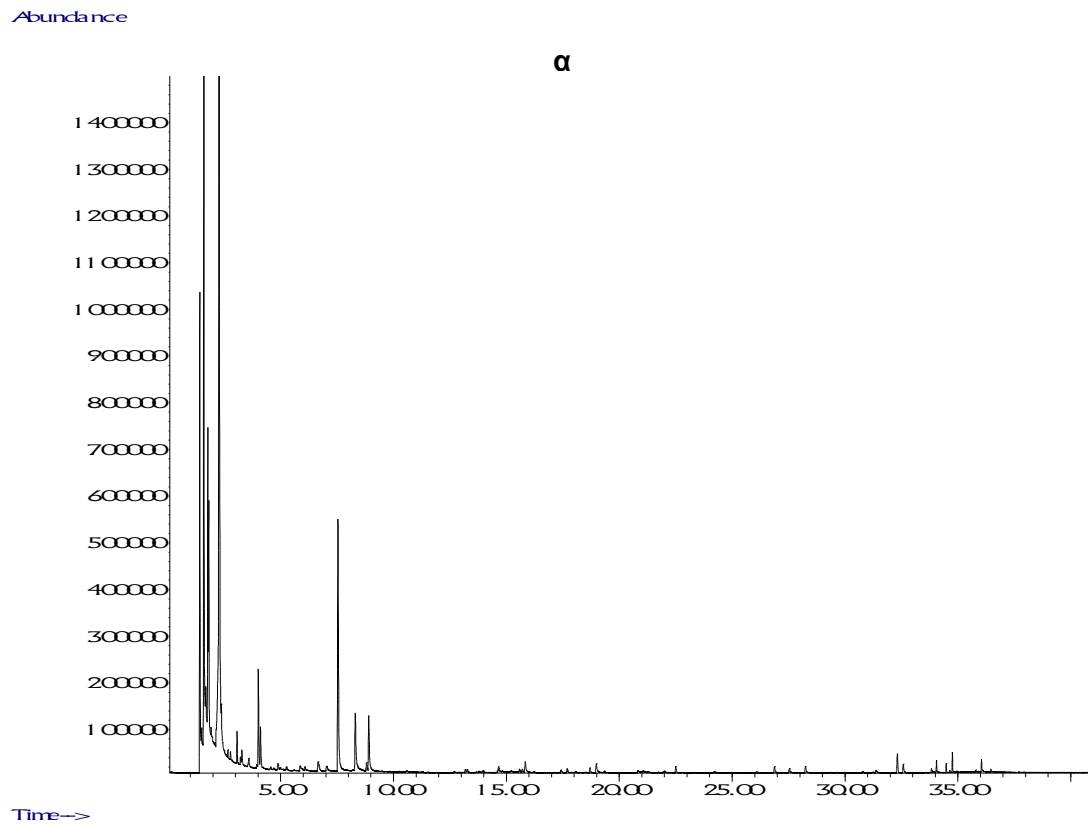
Abundance



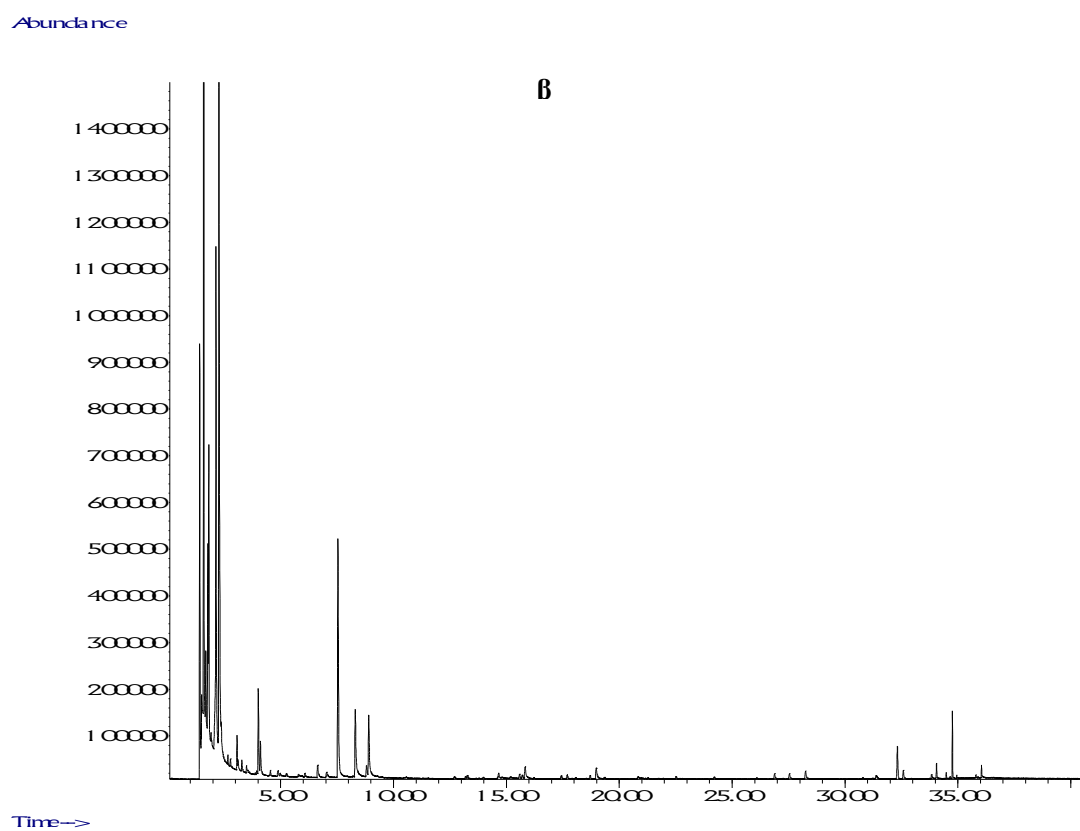
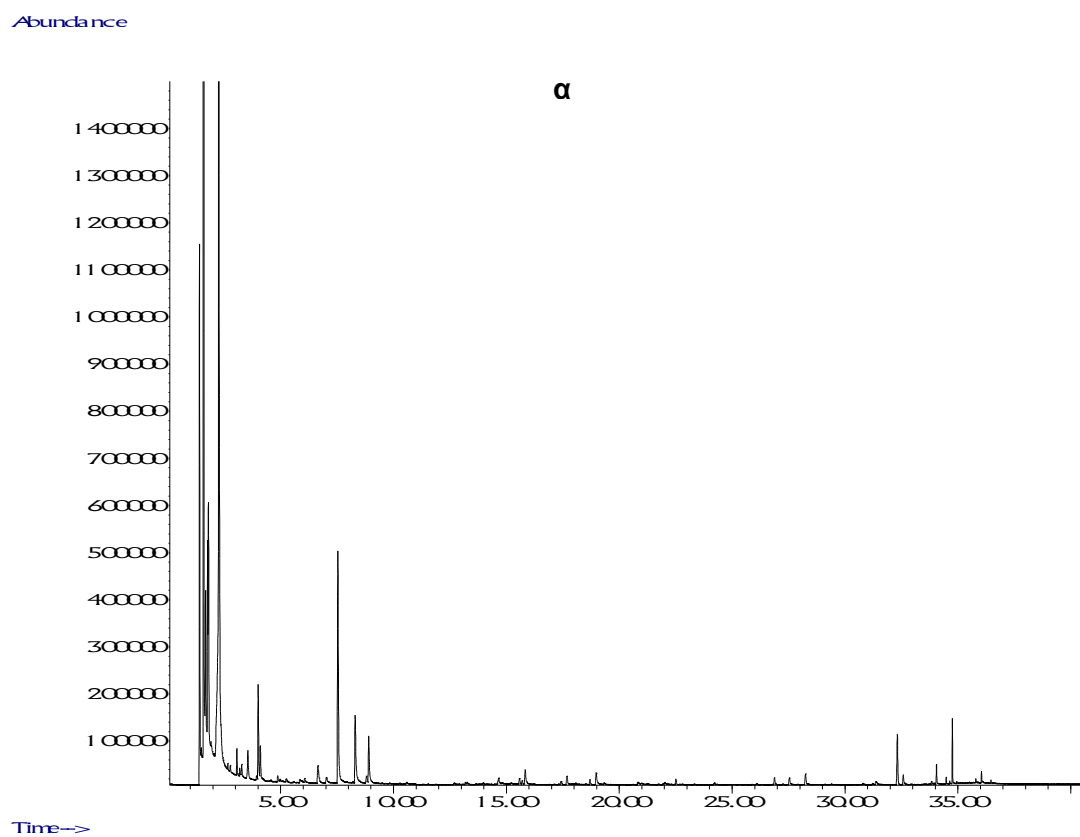
Abundance



Σχήμα 6.23. Αέρια χρωματογραφήματα (GC-MS) για την ανάλυση των πτητικών συστατικών της άλμης της ζύμωσης α) με κωδικό 5 και β) με κωδικό 6, στο τέλος του πειράματος.



Σχήμα 6.24. Αέρια χρωματογραφήματα (GC-MS) για την ανάλυση των πτητικών συστατικών της άλμης της ζύμωσης α) με κωδικό 7 και β) με κωδικό 8, στο τέλος του πειράματος.



Σχήμα 6.25. Αέρια χρωματογραφήματα (GC-MS) για την ανάλυση των πτητικών συστατικών της άλμης της ζύμωσης α) με κωδικό 9 και β) με κωδικό 10, στο τέλος του πειράματος.