



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ  
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΚΑΙ ΤΡΟΦΙΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΑΣ ΕΛΙΑΣ ΚΑΙ  
ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ

Ανάπτυξη μεθόδων προσδιορισμού μυκοτοξινών στο ελαιόλαδο

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

της

Ιωάννας Κλειδαρά

Που υποβάλλεται στο καθηγητικό σώμα για τη μερική εκπλήρωση των υποχρεώσεων απόκτησης Διπλώματος Μεταπτυχιακών Σπουδών στην «Τεχνολογία και Ποιότητα Επιτραπέζιας Ελιάς και Ελαιολάδου» του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Πανεπιστημίου Πελοποννήσου

Καλαμάτα  
Φεβρουάριος, 2023



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ  
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΚΑΙ ΤΡΟΦΙΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΑΣ ΕΛΙΑΣ ΚΑΙ  
ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ

Ανάπτυξη μεθόδων προσδιορισμού μυκοτοξινών στο ελαιόλαδο

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

της

Ιωάννας Κλειδαρά

Που υποβάλλεται στο καθηγητικό σώμα για τη μερική εκπλήρωση των υποχρεώσεων απόκτησης Διπλώματος Μεταπτυχιακών Σπουδών στην «Τεχνολογία και Ποιότητα Επιτραπέζιας Ελιάς και Ελαιολάδου» του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Πανεπιστημίου Πελοποννήσου

Επιβλέπων: Ιωάννης Καπόλος, Καθηγητής

Καλαμάτα  
Φεβρουάριος, 2023



UNIVERSITY OF THE PELOPONNESE  
SCHOOL OF AGRICULTURE AND FOOD  
DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY

MASTER OF SCIENCE (M.Sc.) IN  
TECHNOLOGY AND QUALITY OF TABLE OLIVES AND OLIVE OIL

Methods' development for the determination of mycotoxins in olive oil

Master Thesis

By

Ioanna Kleidara

Submitted to the faculty for the partial fulfillment of the obligations to obtain a  
Postgraduate Diploma in "Technology and Quality of Table Olives and Olive Oil" of the  
Department of Food Science and Technology of the University of the Peloponnese

Supervisor: Ioannis Kapolos, Professor

Kalamata  
February, 2023

Οι υπογράφωντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία (master thesis) με τίτλο «**Ανάπτυξη μεθόδων προσδιορισμού μυκοτοξινών στο ελαιόλαδο**» που παρουσιάστηκε από την **Κλειδαρά Ιωάννα** και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

The signatories declare that we have examined the postgraduate diploma thesis titled “**Methods’ development for the determination of mycotoxins in olive oil**” presented by **Kleidara Ioanna** and we affirm that it is accepted.

**Όνοματεπώνυμο & Υπογραφή 1<sup>ο</sup> Μέλους Επιτροπής**  
**(Name and Signature of 1<sup>st</sup> Commission Member):**

Ιωάννης Καπόλος, Καθηγητής

**Όνοματεπώνυμο & Υπογραφή 2<sup>ο</sup> Μέλους Επιτροπής**  
**(Name and Signature of 2<sup>nd</sup> Commission Member):**

Ιωακείμ Σπηλιόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής

**Όνοματεπώνυμο & Υπογραφή 3<sup>ο</sup> Μέλους Επιτροπής**  
**(Name and Signature of 3<sup>rd</sup> Commission Member):**

Κωνσταντίνα Ρεκούμη, Λέκτορας

Με την υποβολή αυτής της διατριβής, δηλώνω ότι το σύνολο των εργασιών που περιέχονται σε αυτή είναι το δικό μου, πρωτότυπο έργο, ότι εγώ είμαι ο μοναδικός δημιουργός τους (εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά), ότι η αναπαραγωγή και η δημοσίευσή της από το Πανεπιστήμιο Πελοποννήσου δεν θα παραβιάζει οποιαδήποτε δικαιώματα τρίτων και ότι δεν έχω υποβάλει στο παρελθόν το σύνολο ή μέρος αυτής για την απόκτηση οποιουδήποτε τίτλου.

By submitting this thesis, I declare that the entirety of the work contained therein is my own, original work, that I am the sole author thereof (save to the extent explicitly otherwise stated), that reproduction and publication thereof by the University of the Peloponnese will not infringe any third party rights and that I have not previously in its entirety or in part submitted it for obtaining any qualification.

**Όνοματεπώνυμο & Υπογραφή Υποψηφίου**  
**(Surname and first name of the candidate):**

Ιωάννα Κλειδαρά

Πνευματική ιδιοκτησία ©2023 Πανεπιστήμιο Πελοποννήσου  
Όλα τα δικαιώματα διατηρούνται

Copyright © 2023 University of the Peloponnese  
All rights reserved

**Copyright © Κλειδάρα Ιωάννα , 2023**

**Με επιφύλαξη κάθε δικαιώματος. All rights reserved.**

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για κερδοσκοπικό σκοπό πρέπει να απευθύνονται προς τη συγγραφέα. Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σε αυτό το έγγραφο εκφράζουν τη συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευθεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Γεωπονίας και Τροφίμων του Πανεπιστημίου Πελοποννήσου.

## Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	5
ABSTRACT.....	6
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ .....	7
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ .....	8
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ.....	10
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	11
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 <sup>ο</sup> - ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ ΣΤΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ.....	12
1.1 Γενικά για το ελαιόλαδο.....	12
1.2 Οι μυκοτοξίνες.....	16
1.3 Μυκητολογικές προσβολές στους ελαιόκαρπους.....	23
1.4 Μυκοτοξίνες που απαντώνται στο ελαιόλαδο .....	25
1.4.1 Αφλατοξίνες.....	25
1.4.2 Ωχρατοξίνη Α .....	27
1.4.3 Ζεαραλενόνη .....	29
1.4.4 Μποβερισίνη .....	30
1.4.5 Φουμονισίνες .....	31
1.4.6 Κιτρινίνη .....	32
1.4.7 Πατουλίνη .....	33
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 <sup>ο</sup> - ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΜΕΘΟΔΩΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ .....	35
2.1 Χρωματογραφία .....	35
2.1.1 Βασικές αρχές της χρωματογραφίας.....	35
2.1.1 Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) .....	38
2.1.3 Υγρή χρωματογραφία υψηλής επίδοσης.....	39
2.1.4 Αέρια χρωματογραφία (GC).....	40
2.2 Η φασματομετρία μάζας (MS).....	42

2.2.1 Βασικές αρχές .....	42
2.2.2 Μέθοδοι ιονισμού στην MS.....	43
2.2.3 Tandem MS.....	43
2.3 Τεχνική ELISA .....	44
2.4 Βιοαισθητήρες .....	45
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3ο – ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΣΤΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ .....	48
3.1 Κύρια μέθοδος εκχύλισης (extraction) των μυκοτοξινών απο το ελαιόλαδο ....	48
3.2 Μέθοδοι ανίχνευσης μυκοτοξινών στο ελαιόλαδο .....	49
3.2.1 Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) .....	49
3.2.2 Μέθοδος ELISA και άλλες ανοσολογικές μέθοδοι .....	50
3.2.3 Ηλεκτροχημική τεχνολογία βιοανίχνευσης .....	52
3.2.4 HPLC και LC-MS/MS .....	54
3.2.4 Αέρια χρωματογραφία .....	56
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	57
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	58

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το ελαιόλαδο αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά εμπορικά προϊόντα, τα οποία παράγονται στην Ελλάδα. Ωστόσο, οι ελαιόκαρποι είναι ιδιαίτερα επιρρεπείς στις επομολύνσεις από διαφορετικούς μικροοργανισμούς, μεταξύ των οποίων είναι και οι μύκητες. Ορισμένα από τα είδη των μυκήτων παράγουν τοξίνες, οι οποίες είναι γνωστές ως μυκοτοξίνες. Οι μυκοτοξίνες μπορούν να προκαλέσουν σοβαρά προβλήματα τοξικότητας, στα άτομα που τις καταναλώνουν και αποτελούν έναν σημαντικό παράγοντα, ο οποίος σχετίζεται με την δημόσια υγεία. Διαφορετικά είδη μυκοτοξινών έχουν ανιχνευτεί και στο ελαιόλαδο. Η ανίχνευση των μυκοτοξινών μπορεί να πραγματοποιηθεί με μία ποικιλία αναλυτικών τεχνικών, οι οποίες έχουν διαφορετικές αρχές ανίχνευσης. Οι τεχνικές αυτές μπορεί να βασίζονται στην χρωματογραφία, την ανοσολογική ανίχνευση ή στην χρήση βιοαισθητήρων.

Λέξεις κλειδιά: ελαιόλαδο, μυκοτοξίνες, ανίχνευση, χρωματογραφία, βιοαισθητήρες



## **ABSTRACT**

Olive oil is one of the most important commercial products produced in Greece. However, olive fruits are particularly susceptible to contamination by different microorganisms, including fungi. Some of the fungal species produce toxins, which are known as mycotoxins. Mycotoxins can cause serious toxicity problems in people who consume them and are an important factor related to public health. Different types of mycotoxins have also been detected in olive oil. The detection of mycotoxins can be carried out by a variety of analytical techniques, which have different principles of detection. These techniques may be based on chromatography, immunological detection or the use of biosensors.

Key words: olive oil, mycotoxins, detection, chromatography, biosensors

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Παραδείγματα μυκοτοξινών, οι οποίες απαντώνται στα τρόφιμα καθώς και της τοξικότητας αυτών (Denli, 2015) .....	18
---	----

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Εικόνα 1: Διαδικασία παραγωγής ελαιολάδου ( <a href="https://oliveoilaustralia.com/tree-to-table/olive-oil-production/">https://oliveoilaustralia.com/tree-to-table/olive-oil-production/</a> ) .....	13
Εικόνα 3: Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή και διασπορά των μυκοτοξινών στις τροφές, με τελικό αποδέκτη τον άνθρωπο (Haque et al., 2020).....	22
Εικόνα 4: Επιμόλυνση ελαιόκαρπων από διαφορετικά είδη μυκήτων. Πράσινη μούχλα στην επιφάνεια (A) και στο εσωτερικό του ελαιοκάρπου (B) που προκαλείται από τον μύκητα <i>Aspergillus flavus</i> . Καστανή σήψη στην επιφάνεια (C) και στο εσωτερικό του ελαιοκάρπου (D) που προκαλείται από <i>Cladosporium</i> sp. Σύμπτωμα ανθράκωσης στον ελαιοκάρπο (E)- σχηματιζόμενα ακέρβια <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> στον ελαιοκάρπο (F) (Chliyeh et al., 2014).....	24
Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση των χημικών δομών των αφλατοξινών (Monson et al., 2015) .....	26
Εικόνα 6: Χημικές δομές διαφορετικών ωχρατοξινών .....	28
Εικόνα 7: Τύποι χημικής δομής. (A) ZEA, (B) $\alpha$ -ZOL, (C) $\beta$ -ZOL, (D) 17- $\beta$ -οιστραδιόλη (Han et al, 2022).....	29
Εικόνα 8: Χημική δομή της μποβερισίνης ( <a href="https://www.abcam.com/beauvericin-cyclic-hexadepsipeptide-mycotoxin-ab142403.html">https://www.abcam.com/beauvericin-cyclic-hexadepsipeptide-mycotoxin-ab142403.html</a> ).....	31
Εικόνα 9: Χημικές δομές των διαφορετικών φουμονισινών (Kostić et al., 2019) .....	32
Εικόνα 10: Χημική δομή της κιτρινίνης ( <a href="https://www.mycotoxins.info/mycotoxins/citrinin/">https://www.mycotoxins.info/mycotoxins/citrinin/</a> ) .....	33
Εικόνα 11: Χημική δομή της πατουλίνης (Ioi et al., 2017) .....	34
Εικόνα 12: Βασική αρχή των μεθόδων χρωματογραφίας (Προσαρμοσμένο από Sayed, 2021) .....	36
Εικόνα 13: Κατηγοριοποίηση μεθόδων χρωματογραφίας (Προσαρμοσμένο από <a href="https://psiberg.com/different-types-of-chromatography/">https://psiberg.com/different-types-of-chromatography/</a> ) .....	37
Εικόνα 14: Βήματα πραγματοποίησης της TLC ( <a href="https://microbenotes.com/thin-layer-chromatography/">https://microbenotes.com/thin-layer-chromatography/</a> ).....	39
Εικόνα 15: Διαγραμματική απεικόνιση της διεργασίας της HPLC ( <a href="https://microbenotes.com/high-performance-liquid-chromatography-hplc/">https://microbenotes.com/high-performance-liquid-chromatography-hplc/</a> ).....	39

Εικόνα 16: Σχηματική απεικόνιση συστήματος αέριας χρωματογραφίας ( <a href="https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/gas-chromatography-how-a-gas-chromatography-machine-works-how-to-read-a-chromatograph-and-gcxc-335168">https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/gas-chromatography-how-a-gas-chromatography-machine-works-how-to-read-a-chromatograph-and-gcxc-335168</a> ) .....	42
Εικόνα 17: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας της φασματομετρίας μάζας ( <a href="https://www.khanacademy.org/science/ap-chemistry-beta/x2eef969c74e0d802:atomic-structure-and-properties/x2eef969c74e0d802:mass-spectrometry-of-elements/a/isotopes-and-mass-spectrometry">https://www.khanacademy.org/science/ap-chemistry-beta/x2eef969c74e0d802:atomic-structure-and-properties/x2eef969c74e0d802:mass-spectrometry-of-elements/a/isotopes-and-mass-spectrometry</a> ) .....	43
Εικόνα 18: Οι 4 τύποι της ELISA ( <a href="https://blog.praxilabs.com/2021/09/20/elisa-principle/">https://blog.praxilabs.com/2021/09/20/elisa-principle/</a> ).....	45
Εικόνα 19: Σημαντικά μέρη ενός βιοαισθητήρα ( <a href="https://www.etechnog.com/2019/08/biosensor-applications-uses-examples.html">https://www.etechnog.com/2019/08/biosensor-applications-uses-examples.html</a> ) ...	46
Εικόνα 20: Συστατικά στοιχεία βιοαισθητήρων (Chadha et al., 2022) .....	47

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

AF: Αφλατοξίνες

BEA: Μπροβερισίνη

CIT: Κιτρινίνη

ELISA: Ενζυμικά Συνδεδεμένη Ανοσοδοκιμασία

FB: Φουμονισίνες

GC: Αέρια Χρωματογραφία

HPLC: Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης

IARC: Διεθνής Οργανισμός Έρευνας για τον Καρκίνο

MS: Χρωματογραφία Μάζας

OTA: Ωχρατοξίνη Α

PAT: Πατουλίνη

TLC: Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας

ZEA: Ζεαραλονίνη

ΠΟΥ: Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι μυκοτοξίνες είναι τοξικοί δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται από μύκητες που μολύνουν διάφορα γεωργικά προϊόντα είτε πριν είτε μετά τη συγκομιδή. Τα *Aspergillus*, *Fusarium* και *Penicillium* είναι τα πιο σημαντικά γένη για την παραγωγή τους. Οι μυκοτοξίνες μπορούν να βρεθούν σε μια μεγάλη ποικιλία προϊόντων και η κατανάλωσή τους θα πρέπει να αποφεύγεται, καθώς είναι επικίνδυνες τόσο για την υγεία του ανθρώπου όσο και για την υγεία των ζώων. Ένας από τους σημαντικότερους τρόπους με τους οποίους οι άνθρωποι εκτίθενται στις μυκοτοξίνες είναι μέσω των διαφόρων διατροφικών προϊόντων. Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί οι ακόλουθες μυκοτοξίνες που προκαλούν ιδιαίτερη ανησυχία για την ασφάλεια των τροφίμων και των ζωοτροφών: αφλατοξίνες (B1, B2, G1 και G2), φουμονισίνες (Fbs), ωχρατοξίνη A (ΟΤΑ), πατουλίνη, τριχοθηκίνες (δεοξυνιβαλενόλη και νιβαλενόλη) και ζεαραλενόνη (ZEN).

Το κύριο συστατικό της μεσογειακής διατροφής είναι το ελαιόλαδο, το οποίο έχει πραγματικά ανώτερη διατροφική αξία. Το ελαιόλαδο αποτελούσε ένα από τα βασικά τρόφιμα των ανθρώπων, οι οποίοι ζούσαν στη Μεσόγειο και χαρακτηρίζονταν από ιδιαίτερη μακροζωΐα. Βρίσκεται στη λίστα με τις 10 πιο υγιεινές τροφές στον κόσμο, λόγω του πόσο σημαντική είναι η διατροφική και βιολογική του αξία για τον οργανισμό.

Ωστόσο, τόσο ο ελαιόκαρπος, όσο και το ίδιο το ελαιόλαδο μπορεί να επιμολυνθούν από μύκητες, οι οποίοι παράγουν μυκοτοξίνες. Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η βιβλιογραφική ανασκόπηση των μεθόδων, οι οποίες σχετίζονται με την ανίχνευση των μυκοτοξινών στο ελαιόλαδο.

Η εργασία χωρίζεται σε 3 κεφάλαια:

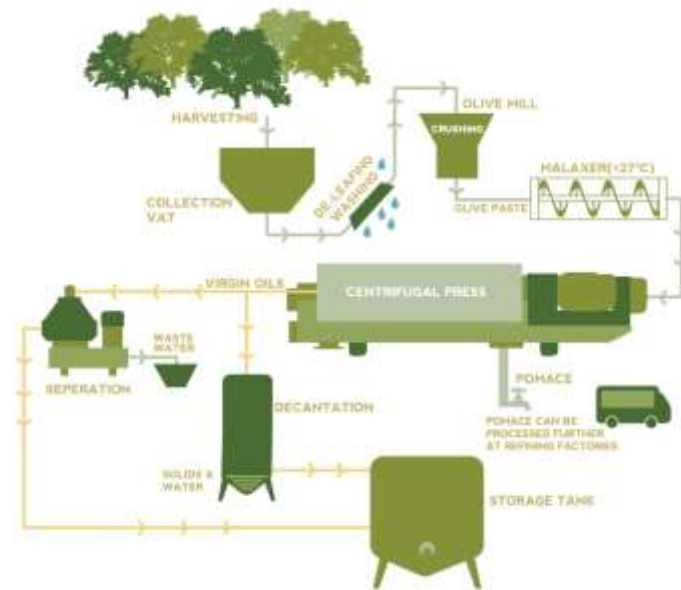
- Στο 1<sup>ο</sup> κεφάλαιο θα παρουσιαστούν ζητήματα τα οποία αφορούν το ελαιόλαδο και τις μυκοτοξίνες που ανιχνεύονται σε αυτό.
- Στο 2<sup>ο</sup> κεφάλαιο θα παρουσιαστούν οι βασικές αρχές των μεθόδων ανίχνευσης
- Στο 3<sup>ο</sup> κεφάλαιο θα παρουσιαστούν ειδικότερα ζητήματα ανίχνευσης μυκοτοξινών στο ελαιόλαδο

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>- ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ ΣΤΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ

### 1.1 Γενικά για το ελαιόλαδο

Το ελαιόλαδο αποτελεί το κλάσμα ελαίου το οποίο προκύπτει από τον καρπό της ελιάς, και πιο συγκεκριμένα, από τον πολτό και τον πυρήνα του. Το κύριο συστατικό του ελαιολάδου είναι οι τριακυλογλυκερόλες (τριγλυκερίδια) με το λιπαρό οξύ, το οποίο απαντάται με μεγαλύτερη συχνότητα να είναι το ελαϊκό οξύ (σε ποσοστό 55-83%). Τα άλλα λιπαρά οξέα τα οποία βρίσκονται σε σημαντικές ποσότητες στο ελαιόλαδο το παλμιτικό οξύ (σε ποσοστό 7,5-20%), το στεατικό οξύ (σε ποσοστό 0,5-5%) και το λινολεϊκό οξύ (σε ποσοστό 3,5-21%). Επιπλέον, στο ελαιόλαδο περιέχονται και ορισμένοι δευτερογενείς μεταβολίτες με τους κυριότερους να είναι οι διάφορες φυτοστερόλες, οι αλειφατικές αλκοόλες, διάφορες χρωστικές ουσίες και μια σειρά από πιο πολικές φαινολικές ενώσεις, στις οποίες περιλαμβάνονται η υδροξυτυροσόλη και η τυροσόλη. Τα ελαιόλαδα, τα οποία έχουν υποστεί επεξεργασία (γνωστά και ως ραφινάρισμα) εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα αυτών των ενώσεων σε μεγάλο βαθμό (Almoselhy, 2020).

Για να πραγματοποιηθεί η εξαγωγή του ελαιόλαδου, οι ελιές θα πρέπει αρχικά να αλεστούν σε μία μορφή πάστας. Η διαδικασία αυτή παραδοσιακά γινόταν με πέτρες, αλλά η πλειοψηφία των σύγχρονων ελαιοτριβείων χρησιμοποιούν σφυρόμυλο. Η πάστα μπορεί να αναδεύεται αργά ή να ζυμώνεται (μάλαξη), ώστε τα σταγονίδια νερού και ελαίου να ενωθούν σε μεγαλύτερα σταγονίδια, διευκολύνοντας το διαχωρισμό των φάσεων νερού και ελαίου. Η πάστα στη συνέχεια στοιβάζεται επάνω σε ειδικές πλάκες, οι οποίες τη συμπιέζουν με αποτέλεσμα να ασκείται πίεση και να γίνεται ο διαχωρισμός του υγρού από το στερεό υλικό. Το προκύπτον θολό ελαιόλαδο μπορεί στη συνέχεια να διαχωριστεί με διαφορετικούς τρόπους, όπως για παράδειγμα με τη βαρύτητα για να δώσει ένα διαυγές προϊόν. Εναλλακτικά, μπορεί να πραγματοποιηθεί η φυγοκέντρωση της πάστας σε συσκευές όπως οριζόντιο φυγοκεντρικό διαχωριστή ή decanter οι οποίες οδηγούν στον διαχωρισμό των στερεών υπολειμμάτων, από το υγρό ελαιόλαδο (Palumbo & Harris, 2011).



Εικόνα 1: Διαδικασία παραγωγής ελαιολάδου (<https://oliveoilaustralia.com/tree-to-table/olive-oil-production/>)

Το ελαιόλαδο αποτελεί αναπόσπαστο στοιχείο της ελληνικής (και της μεσογειακής) διατροφής από την αρχαιότητα και παίζει σημαντικό ρόλο στις πολιτιστικές και θρησκευτικές δραστηριότητες σε όλη την Ελλάδα. Σύμφωνα με έκθεση που πραγματοποιήθηκε από την Ελληνική Στατιστική Αρχή (ΕΛΣΤΑΤ) σε αντιπροσωπευτικό δείγμα πληθυσμού που περιλάμβανε 3.515 ιδιωτικά νοικοκυριά με 7.429 μέλη, η (σταθμισμένη) μέση μηνιαία οικιακή κατανάλωση ελαιόλαδου στην Ελλάδα εκτιμάται σε 3,5 λίτρα, μία από τις υψηλότερες (για την ακρίβεια, η υψηλότερη) στον κόσμο (Kountouri & Prodromidis, 2017).

Το ελαιόλαδο αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά εμπορικά προϊόντα, τα οποία παράγονται στην Ελλάδα. Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με στοιχεία της EUROSTAT, το 2021 παρήχθησαν συνολικά 949,58 τόνοι ελαιόλαδου στην Ελλάδα, γεγονός το οποίο την κατατάσσει τρίτη στην Ευρώπη πίσω από την Ισπανία και την Ιταλία (<https://tradingeconomics.com/greece/olives-for-oil-eurostat-data.html>)

Το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο (EVOO), που θεωρείται το ελαιόλαδο υψηλότερης ποιότητας, εκτιμάται πολύ για τις οργανοληπτικές και διατροφικές του ιδιότητες. Επιπλέον, η κατανάλωσή του έχει αρχίσει να γίνεται όλο και πιο δημοφιλής εκτός της περιοχής της Μεσογείου, όπου αποτελεί την κύρια διατροφική πηγή λίπους. Όλοι οι τύποι ελαιόλαδου παράγονται με εφαρμογή της τεχνολογίας, η οποία αναφέρθηκε παραπάνω. Ωστόσο, τόσο η ακριβής σύνθεση, όσο και οι οργανοληπτικές ιδιότητές του



εμφανίζουν σημαντική διακύμανση. Η διακύμανση αυτή, καθορίζεται από την ποικιλία και το στάδιο ωριμότητα της ελιάς, τις επικρατούσες περιβαλλοντικές συνθήκες και τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται κατά την επεξεργασία, ενώ επηρεάζεται και από τις συνθήκες αποθήκευσης (Boskou, 2006).

Το παρθένο ελαιόλαδο εμφανίζει μεγαλύτερη διάρκεια ζωής σε σύγκριση με τα υπόλοιπα βρώσιμα έλαια. Το γεγονός αυτό οφείλεται στις υψηλές συγκεντρώσεις διαφόρων αντιοξειδωτικών ουσιών μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται οι βιοφαινόλες και η  $\alpha$ -τοκοφερόλη. Επιπροσθέτως, διάφορες ενώσεις μπορεί να επηρεάζονται αρνητικά από τον χρόνο και τις συνθήκες αποθήκευσης. Αυτές είναι τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, οι ακόρεστοι υδρογονάνθρακες, τα ένζυμα, οι χρωστικές ουσίες και τα ίχνη μετάλλων. Η αποθήκευση του ελαιόλαδου υπό συνθήκες πίεσης με χρήση αζώτου σε σκοτεινό χώρο και σε θερμοκρασία 25-30 °C κατ' ελάχιστον μπορεί να αυξήσει τη διάρκεια ζωής του (Ghanbari Shendi et al., 2020).

Η αποθήκευση των ελαιοκάρπων και του ελαιολάδου σε μη ορθά ελεγχόμενες συνθήκες μπορεί να έχει σημαντική επίπτωση στην ποιότητα και τη διάρκεια ζωής του ελαιόλαδου, καθώς μπορεί να παρατηρηθεί αύξηση της οξύτητας και της οξειδωσης του. Εκτός αυτού, έχει διαπιστωθεί σημαντική μείωση της περιεκτικότητας σε πολυφαινόλες και της αντιοξειδωτικής ικανότητας του ελαιολάδου. Η ανάπτυξη μυκήτων στις ελιές οδηγεί σε διατάραξη της διατροφικής ποιότητας των ελαιοκάρπων. Αυτό συμβαίνει καθώς οι μύκητες είναι δυνατό να προκαλέσουν διαταραχές στην σύνθεση των λιπαρών οξέων (El Yamani et al., 2022).

Κάθε στάδιο κατά την επεξεργασία του ελαιολάδου μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (όπως για παράδειγμα τη γεύση και την οσμή) όπως και στην ποιότητα του παραγόμενου ελαιολάδου, με πιο σημαντικές μεταβολές να παρατηρούνται στο παρθένο ελαιόλαδο (VOO) και στο εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο. (EVOO). Πιο συγκεκριμένα, τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και η ποιότητα επηρεάζονται από παράγοντες όπως είναι η ανάπτυξη και η κατάσταση της υγείας των ελαιόδεντρων, οι φυτοϋγειονομικές επεξεργασίες που ακολουθούνται, οι μέθοδοι συγκομιδής μεταφορά και αποθήκευσης ή και οι συνθήκες κατά την παρασκευή της πάστας. Κατά τα στάδια της αποθήκευσης και της μεταφοράς το παρθένο και το εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο επηρεάζονται από παράγοντες, όπως

είναι οι ασταθείς θερμοκρασίες, οι οποίες οδηγούν σε μεταβολή στην ποιότητα του ελαιόλαδου εξαιτίας της υποβάθμισης ορισμένων συστατικών (Escudero et al., 2016).

Ορισμένοι από τους παράγοντες, οι οποίοι μπορεί να οδηγήσουν σε αλλαγές και υποβάθμιση στην ποιότητα του ελαιόλαδου είναι οι παρακάτω:

- Ο καρπός δεν πρέπει να πληγώνεται για τη μεγαλύτερη δυνατή απόδοση. Η υποβάθμιση των καρπών είναι μια συνήθης παρενέργεια των βιομηχανικών μεθόδων μείωσης του κόστους, όπως η απόρριψη των καρπών στο έδαφος (αυξημένη οξύτητα).
- Μόλις φτάσουν στον χώρο, όπου θα πραγματοποιηθεί η άλεση τους, οι ελιές τοποθετούνται σε χαμηλά, αεριζόμενα δοχεία, όπου και αλέθονται αμέσως. Λόγω των διαδικασιών οξείδωσης και ζύμωσης που μειώνουν τη συγκέντρωση των φλαβονοειδών, η παρατεταμένη αποθήκευση μειώνει την ποιότητα του ελαιολάδου.
- Το νερό ενισχύει την παραγωγή λαδιού όταν προστίθεται στην πάστα ελιάς, ωστόσο από ένα σημείο και μετά μειώνει τις οργανοληπτικές ιδιότητες.
- Η επίτευξη υψηλής ποιότητας ελαιολάδου απαιτεί τη διατήρηση του εξοπλισμού σε άριστη και καθαρή κατάσταση.
- Οι υψηλές θερμοκρασίες κατά τη φάση της πάστας ελιάς βελτιώνουν την παραγωγή λαδιού, αλλά αν ξεπεραστεί ένα συγκεκριμένο σημείο (πάνω από 30 °C), υποβαθμίζεται η γεύση και το άρωμα και μειώνεται σημαντικά η αξία του λαδιού ως υγιεινό προϊόν.

Με δεδομένο ότι η παραγωγή του ελαιόλαδου γίνεται εντός ενός σύντομου χρονικού διαστήματος, το προϊόν θα πρέπει να αποθηκεύεται για το υπόλοιπο του έτους μέχρι την επόμενη χρονιά, όπου θα πραγματοποιηθεί η παραγωγή νέου ελαιόλαδου. Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, το ελαιόλαδο μπορεί να υποστεί πολλαπλές διεργασίες, όπως υδρόλυση, οξείδωση, αυτοοξείδωση και πολυμερισμό, οι οποίες έχουν αρνητικές συνέπειες, όπως είναι η υποβάθμιση των συστατικών του, της ποιότητας και των θρεπτικών του αξιών, η μεταβολή της οξειδωτικής του σταθερότητας και η εν τέλει γενικότερη μείωση των ωφελειών του για την υγεία. Το μικροβίωμα του ελαιολάδου περιλαμβάνει ζύμες, βακτήρια και μούχλες. Αρκετές μελέτες που διεξήχθησαν σχετικά με τη μικροβιακή χλωρίδα του ελαιολάδου έδειξαν ότι οι ζύμες είναι ικανές να

επηρεάσουν τα φυσικοχημικά, οργανοληπτικά και υγειονομικά χαρακτηριστικά του ελαιολάδου κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης (Zullo & Ciafardini, 2020).

## 1.2 Οι μυκοτοξίνες

Οι μυκοτοξίνες αποτελούν μία ομάδα από δευτερογενείς μεταβολίτες οι οποίοι παράγονται από νηματοειδείς μύκητες (filamentous fungi) και εμφανίζουν σημαντικά επίπεδα τοξικότητας για τα ζώα ακόμα και σε μικρές ποσότητες όταν προσλαμβάνονται με διάφορους τρόπους, μεταξύ των οποίων είναι και η λήψη τους μέσω των τροφών. Οι μυκοτοξίνες αποτελούν ένα χημικά ετερογενές και τοξινογόνο σύνολο οι οποίες ομαδοποιούνται μαζί, καθώς παράγονται από μύκητες. Αρκετές μυκοτοξίνες παρουσιάζουν αλληλεπικαλυπτόμενες τοξικότητες για τον άνθρωπο, τα ζώα και τα φυτά. Οι μυκοτοξίνες απαντώνται σε πολλά είδη τροφίμων, οι οποίες προορίζονται για κατανάλωση από τον άνθρωπο ή κτηνοτροφικά ζώα. Επιπλέον, εμφανίζουν σημαντική τοξικότητα ακόμα και σε μικρές ποσότητες. Για τον λόγο αυτό αποτελούν σημαντικό κίνδυνο για τη δημόσια υγεία (Zahra et al., 2019). Οι μυκοτοξίνες είναι φυσικά προϊόντα τα οποία παράγονται από μύκητες και όταν εισάγονται ακόμα και σε χαμηλή συγκέντρωση σε ανώτερα σπονδυλωτά και άλλα ζώα μέσω διαφόρων οδών μπορούν να οδηγήσουν σε σημαντικά επίπεδα τοξικότητας (Bennet, 1987).

Ορισμένοι μύκητες παράγουν ένα είδος τοξίνης, ενώ άλλα είδη μπορεί να παράγουν διαφορετικά είδη τοξικών ενώσεων, οι οποίες μπορεί να είναι κοινές σε όλα τα γένη των μυκήτων. Ωστόσο, υπάρχουν και μυκοτοξίνες οι οποίες παράγονται και είναι χαρακτηριστικές για ένα μόνο γένος μύκητα. Τα πέντε πιο σημαντικά γένη μυκήτων δηλαδή *Alternaria*, *Aspergillus Claviceps*, *Fusarium*, *Penicillium* παράγουν πολλαπλές μυκοτοξίνες οι οποίες έχουν ιδιαίτερη σημασία για τη βιομηχανία τροφίμων. Οι μυκοτοξίνες αυτές μπορούν να τοποθετηθούν σε οκτώ ομάδες, οι οποίες είναι οι παρακάτω (Cavaliere et al, 2010):

- Αφλατοξίνες
- Κιτρινίνη
- Φουμονισίνες
- Ωχρατοξίνες
- Πατουλίνη και άλλες μικρές λακτόνες
- Τριχοθηκίνες

- Ρεσοκυκλικές λακτόνες
- Λακτόνες και αλκαλοειδή του ερυσιβόδου

Σχεδόν το 25% των συγκομιζόμενων καλλιεργειών παγκοσμίως αλλοιώνεται από μυκοτοξίνες, γεγονός που προκαλεί ετήσια σημαντικές απώλειες σε δισεκατομμύρια δολάρια στους γεωργικούς και βιομηχανικούς τομείς. Από τις 300 μυκοτοξίνες, οι οποίες είναι γνωστές στη σύγχρονη εποχή, μόνο ορισμένες αποτελούν πραγματική απειλή για την ασφάλεια των καταναλωτών. Η παραγωγή της εκάστοτε ένωσης είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης, η οποία συμβαίνει μεταξύ τριών ξεχωριστών παραγόντων (Agiropoulou et al, 2020):

- Του είδους του μύκητα, από τον οποίο παράγεται η μυκοτοξίνη.
- Του υποστρώματος στο οποίο βρίσκεται ο μύκητας, το οποίο συνήθως είναι κάποιο φυτό ή φυτικά υπολείμματα ή πιθανά προϊόντα ζωικής προέλευσης.
- Του περιβάλλοντος, εντός του οποίου βρίσκονται ο μύκητας και το υπόστρωμα του.

Η παραγωγή κάθε μυκοτοξίνης εξαρτάται από τον τρόπο με τον οποίο τα παραπάνω στοιχεία αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Εξαιτίας αυτού, ακόμη και αν ο κατάλληλος μύκητας έχει προσβάλει το κατάλληλο υπόστρωμα, οι ιδανικές συνθήκες για τη δημιουργία τοξίνης μπορεί να μην έχουν υπάρξει. Επιπλέον, ακόμη και αν εξαλειφθούν με διάφορες διαδικασίες απολύμανσης, τα δηλητηρία τους μπορεί να εξακολουθούν να υπάρχουν στο υπόστρωμά τους και τελικά στο τελικό προϊόν. Ανάλογα με τον τόπο προέλευσής τους, οι μύκητες που δημιουργούν μυκοτοξίνες μπορούν να χωριστούν σε δύο κύριους τύπους. Ο όρος "μύκητες αγρού" αναφέρεται στην πρώτη ομάδα, η οποία λυμαίνεται τα υποστρώματα πριν από τη συγκομιδή τους. Από την κατηγορία αυτή μπορούν να δημιουργηθούν τρεις πιο μικρές υποκατηγορίες (Agiropoulou et al, 2020):

- Μύκητες οι οποίοι προσβάλουν ζωντανά φυτά, γνωστοί και ως φυτοπαθογόνοι μύκητες.
- Μύκητες, οι οποίοι μεγαλώνουν σε νεκρά ή καταπονημένα φυτά.
- Μύκητες, οι οποίοι αν και η αποίκιση στο φυτό συμβαίνει πριν από τη συγκομιδή, η παραγωγή της τοξίνης προκαλείται μετά από αυτή.

Η δεύτερη ομάδα αποτελείται από μύκητες αποθήκευσης, οι οποίοι είναι μύκητες που αναπτύσσονται μόνο σε αντικείμενα μετά τη συγκομιδή τους. Οποιοδήποτε στάδιο μετά τη συγκομιδή, συμπεριλαμβανομένης της αποθήκευσης, της διαμετακόμισης, της συντήρησης, της αποθήκευσης και της συσκευασίας, είναι επιρρεπές σε μόλυνση από αυτούς τους μύκητες (Agiropoulou et al, 2020).

Οι μυκοτοξίνες μπορεί να βρεθούν σε γεωργικά προϊόντα και ζωοτροφές, μεταξύ των οποίων είναι τα φιστίκια, τα σταφύλια και το κρασί, τα δημητριακά, οι ξηροί καρποί, τα αποξηραμένα φρούτα, ο καφές, το κακάο, τα μπαχαρικά, οι ελαιούχοι σπόροι, τα φρούτα και οι χυμοί τους. Μπορεί να παραχθούν τόσο στον αγρό όσο και κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης και της μεταφοράς. Ειδικότερα, σε οποιοδήποτε στάδιο της διαδικασίας παραγωγής τροφίμων (είτε πριν από τη συγκομιδή, είτε κατά τη διάρκεια της συγκομιδής, είτε μετά τη συγκομιδή κατά την ξήρανση και την αποθήκευση), μπορεί να προκύψει σχηματισμός μυκοτοξινών, γεγονός που θέτει τους καταναλωτές σε σοβαρό κίνδυνο τοξικότητας με άμεσο τρόπο μέσω της κατανάλωσης τροφίμων είτε με έμμεσο τρόπο μέσω των ζωοτροφών, τις οποίες καταναλώνουν τα κτηνοτροφικά ζώα (Alshannaq & Yu, 2017). Γενικά, όλα τα προϊόντα, όταν βρίσκονται υπό παρατεταμένες συνθήκες αποθήκευσης και ακραίες θερμοκρασίες σε συνδυασμό με υψηλή υγρασία, μπορούν να αποτελέσουν υπόστρωμα για την ανάπτυξη μυκήτων και επακόλουθης μόλυνσης από μυκοτοξίνες. Ο κίνδυνος παραγωγής μυκοτοξινών αυξάνεται από τις συνθήκες που ευνοούν την ανάπτυξη μυκήτων και ιδιαίτερα όταν εφαρμόζονται κακές πρακτικές καλλιέργειας και συγκομιδής και ακατάλληλες συνθήκες ξήρανσης, χειρισμού, συσκευασίας, αποθήκευσης και μεταφοράς (El-Sayed et al., 2022).

Πίνακας 1: Περιέχονται παραδείγματα μυκοτοξινών, οι μύκητες που τις παράγουν, τα τρόφιμα στα οποία απαντώνται καθώς και η τοξικότητά τους (Denli, 2015)

<b>Μυκοτοξίνες</b>	<b>Μύκητες</b>	<b>Τροφή</b>	<b>Τοξικότητα</b>
Αφλατοξίνες	<i>Aspergillus flavus</i> και <i>A. parasiticus</i>	Σιτηρά (καλαμπόκι), ξηροί καρποί	Ηπατοκαρκινογόνες και τερατογόνες
Ωχρατοξίνες	<i>A. ochraceus</i>	Σιτηρά (καλαμπόκι, σιτάρι,	Νεφροτοξικότητα και ηπατοτοξικότητα

		κριθάρι) και ξηροί καρποί	
T-2 Τοξίνη	<i>Fusarium graminearum</i>	Σιτηρά (καλαμπόκι και σιτάρι)	Κυτταροτοξικότητα
Βομιτοξίνη (Δεοξυνιβαλενόλη)	<i>F. graminearum</i>	Σιτηρά (καλαμπόκι και σιτάρι)	Πρόκληση εμέτων
Ζεαραλενόνη	<i>F. graminearum</i>	Σιτηρά, ρύζι και προϊόντα ενσίρωσης	Οιστρογονικά αποτελέσματα
Φουμονισίνες	<i>F. graminearum,</i> <i>F. moniliforme,</i> <i>F. verticilloides</i>	Σιτηρά (καλαμπόκι και σιτάρι)	Πνευμονικό οίδημα, ηπατοτοξικότητα και λευκοεγκεφαλομαλακία

Υπάρχουν ποικίλοι παράγοντες που μπορεί να οδηγήσουν τόσο στην ανάπτυξη μυκήτων όσο και στην παραγωγή μυκοτοξινών από διαφορετικά γένη μυκήτων. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτών των παραγόντων είναι η θερμοκρασία, η υγρασία, ο τύπος του περιβάλλοντος, το pH, η ενεργότητα του νερού ( $a_w$ ), τα επίπεδα και το είδος των θρεπτικών συστατικών, η αρχική ποσότητα του μύκητα, ο τύπος του υποστρώματος και οι μικροβιακές αλληλεπιδράσεις που επικρατούν. Για το λόγο αυτό είναι δύσκολο να γίνει ακριβής περιγραφή και πρόβλεψη του συνόλου των ιδανικών συνθηκών, οι οποίες είναι αναγκαίες για την ανάπτυξη των μυκήτων και την παραγωγή μυκοτοξινών. Οι βέλτιστες συνθήκες για την ανάπτυξη των περισσότερων μυκήτων περιλαμβάνουν θερμοκρασίες από 10 έως 40 °C, pH 8,4 και ενεργότητα νερού σε επίπεδα άνω του 0,70. Οι μύκητες οι οποίοι αναπτύσσονται στους αγρούς απαιτούν συνήθως σχετική υγρασία από 70% έως 90%, θερμοκρασίες από 20 έως 25 °C, και ενεργότητα νερού μεγαλύτερη από 0,85 για ενεργή ανάπτυξη και 0,99 για βέλτιστη ανάπτυξη. Ως ενεργός ανάπτυξη μπορεί να οριστεί η φάση κατά την οποία ο μύκητας εμφανίζει υψηλό βαθμό ανάπτυξης στο μυκήλιο του. Αντίθετα, οι μύκητες που αναπτύσσονται κατά το στάδιο της αποθήκευσης εμφανίζουν προσαρμογές σε συνθήκες που σχετίζονται με χαμηλότερα επίπεδα υγρασίας και πιο υψηλές θερμοκρασίες. Η πλειοψηφία των ειδών *Aspergillus* και *Penicillium* χρειάζονται

ενεργότητα νερού τουλάχιστον 0,75-0,85 και αναπτύσσονται καλά σε ενεργότητα νερού 0,93-0,98. Τα είδη *Aspergillus* απαιτούν ενεργότητα νερού της τάξης του 0,73 για ενεργή ανάπτυξη, ενώ αντίστοιχα τα είδη *Penicillium* απαιτούν ενεργότητα νερού 0,78-0,80. Επιπλέον, τα είδη *Aspergillus* έχουν προσαρμοστεί ώστε να αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες της τάξης των 30-40 °C, ενώ τα είδη *Penicillium* εμφανίζουν ικανοποιητική ανάπτυξη σε θερμοκρασίες της τάξης των 25-30 °C (Agiropoulou et al, 2020).

Γενικά, οι μυκοτοξίνες προκαλούν σοβαρές καταστάσεις με την πρόσληψη μολυσμένων τροφίμων, την εισπνοή των τοξινών που μεταδίδονται από τους σπόρους και τη δερματική επαφή με μολυσμένα από μουχλιασμένα υποστρώματα. Οι μυκοτοξίνες μπορεί να εμφανίσουν πολλαπλά διαφορετικά είδη τοξικότητας, όπως καρκινογένεσις, μεταλλαξιγένεσις, κυτταροτοξικότητα, νευροτοξικότητα, νεφροτοξικότητα, ανοσοκαταστολή και οιστρογονικές αλλαγές. Το πόσο σοβαρές και εκτεταμένες είναι αυτές οι δράσεις εξαρτάται σημαντικά από τις ποσότητες που έχει προσλάβει το άτομο και από τη χρονική διάρκεια της έκθεσης, ενώ επηρεάζονται και από τις πιθανές τοξικές συνέργειες που μπορεί να προκύψουν όταν λαμβάνονται ταυτόχρονα πολλές διαφορετικές μυκοτοξίνες. Ορισμένες, από τις πιο κοινές επιπτώσεις της κατανάλωσης μυκοτοξινών είναι οι παρακάτω (Abrunhosa et al., 2014):

- Πρόκληση οξείας τοξικότητας που μπορεί να οδηγήσει στο θάνατο των ατόμων (μυκοτοξίκωση). Συμβαίνει όταν καταναλώνονται υψηλές ποσότητες.
- Μείωση του σωματικού βάρους των κτηνοτροφικών ζώων και της παραγωγή προϊόντων, όπως το γάλα και τα αυγά. Συμβαίνει όταν τα επίπεδα που καταναλώνονται είναι πιο χαμηλά από τα ανώτατα ανεκτά όρια.
- Καταστολή στις ανοσοποιητικές λειτουργίες με αποτέλεσμα την μη ορθή πρόληψη και αντιμετώπιση λοιμώξεων. Συμβαίνει όταν καταναλώνονται χαμηλά επίπεδα μυκοτοξινών.
- Ανάπτυξη όγκων και άλλων χρόνιων ασθενειών σε μία πλειάδα ζωτικών οργάνων. Συμβαίνει όταν καταναλώνονται χαμηλά επίπεδα της μυκοτοξίνης για μεγάλα χρονικά διαστήματα.

Το δυναμικό τοξικότητας κάθε μυκοτοξίνης επηρεάζεται από μια ποικιλία μεταβλητών, συμπεριλαμβανομένου του είδους του μύκητα από τον οποίο προέρχεται, της χημικής του σύνθεσης, της ποσότητας που υπάρχει και των χαρακτηριστικών αυτού

που την καταναλώνει, όπως το είδος, το φύλο, το μέγεθος κλπ (Agriopoulou et al, 2020).

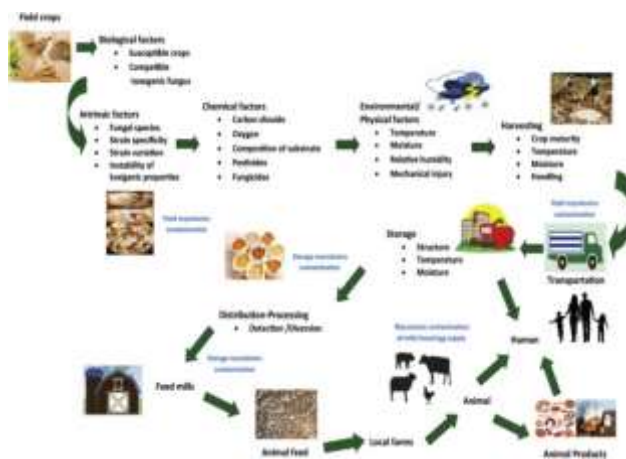
Η πρόληψη της παραγωγής και η αποτοξίνωση αποτελούν τις δυο βασικές στρατηγικές για τον έλεγχο της μόλυνσης των προϊόντων από μυκοτοξίνες. Αν και πολλές μυκοτοξίνες μπορούν να καταστραφούν μέσω των συμβατικών διαδικασιών μαγειρέματος, αυτό δεν είναι δυνατό για το σύνολο των μυκοτοξινών. Για τον λόγο αυτό, για να πραγματοποιηθεί η μερική ή πλήρης εξάλειψη των μυκοτοξινών από τα τρόφιμα, θα πρέπει να εφαρμόζεται η εφαρμογή πολλών μεθόδων επεξεργασίας τροφίμων. Οι μέθοδοι αυτή μπορεί να είναι φυσικές, χημικές και βιολογικές (Agriopoulou et al, 2020).

Αν και υπάρχουν αρκετές εκατοντάδες μυκοτοξίνες, οι οποίες έχουν εντοπιστεί, μόνο 12 θεωρούνται σημαντικός δημόσιος κίνδυνος και έχουν αποτελέσει σημαντικό πεδίο μελέτες. Το γεγονός αυτό οφείλεται στις σοβαρές επιπτώσεις που εμφανίζει η κατανάλωση τους για την υγεία, καθώς και στη συχνή τους παρουσία στα διάφορα τρόφιμα και ζωοτροφές. Σύμφωνα με μία έκθεση της IARC και του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, η οποία δημοσιεύτηκε το 2016, στις αναπτυσσόμενες χώρες περίπου 500 εκατομμύρια άνθρωποι εκτίθενται καθημερινά σε τοξίνες οι οποίες παράγονται από μικροοργανισμούς, μεταξύ των οποίων και οι μυκοτοξίνες. Από αυτούς περίπου τα 160 εκατομμύρια είναι παιδιά κάτω των πέντε ετών. Η πιθανή παρουσία μυκοτοξινών στα τρόφιμα έχει προκαλέσει ανησυχία στο καταναλωτικό κοινό τα τελευταία χρόνια. Αυτό έχει συμβεί μεταξύ άλλων και λόγω της αυξανόμενης ευαισθητοποίησης σχετικά με τις επιπτώσεις που ενέχει η κατανάλωση τους (Omotayo et al, 2019).

Η παγκόσμια κλιματική αλλαγή και η επακόλουθη αυξημένη έκθεση σε μυκοτοξίνες μπορεί να επηρεάσει δυσανάλογα ευάλωτους πληθυσμούς, όπως οι κάτοικοι της υπαίθρου που εξαρτώνται από βασικές καλλιέργειες ευαίσθητες στη μόλυνση από μύκητες και τα οικονομικά μειονεκτούντα άτομα, συμπεριλαμβανομένων των παιδιών, τα οποία μπορεί να αναγκαστούν να καταναλώνουν τρόφιμα χαμηλότερης ποιότητας. Οι μυκοτοξίνες είναι πολύ επιβλαβείς για τα παιδιά. Τα παιδιά χρειάζονται περισσότερη τροφή, νερό και οξυγόνο από ό,τι οι ενήλικες ανά κιλό σωματικού βάρους, γεγονός που αυξάνει άμεσα την έκθεσή τους σε περιβαλλοντικές τοξίνες (Marroquín-Cardona et al., 2014).



Η Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ), ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) των ΗΠΑ και άλλες χώρες έχουν θεσπίσει ρυθμιστικές κατευθυντήριες γραμμές και όρια για τις μυκοτοξίνες τόσο για τις εισαγωγές όσο και για τις εξαγωγές των επηρεαζόμενων προϊόντων.



Εικόνα 2: Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή και διασπορά των μυκοτοξινών στις τροφές, με τελικό αποδέκτη τον άνθρωπο (Haque et al., 2020)

Τα ρυθμιστικά όρια για τα σημαντικά επίπεδα μυκοτοξινών στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές καθορίζονται από διάφορες αρχές παγκοσμίως, όπως η Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) των Ηνωμένων Πολιτειών (ΗΠΑ), ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ), ο Οργανισμός Γεωργίας Τροφίμων (FAO) και η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA). Ορισμένες σημαντικές μυκοτοξίνες κατηγοριοποιούνται από τον Διεθνή Οργανισμό Έρευνας για τον Καρκίνο (IARC) βάσει τοξικολογικών ερευνών που καθορίζουν εάν υπάρχει επαρκής θεμελίωση για καρκινογένεση στον άνθρωπο. Η εβδομαδιαία παρακολούθηση της μόλυνσης των τροφίμων και των ζωοτροφών με μυκοτοξίνες γίνεται από το σύστημα ταχείας προειδοποίησης για τα τρόφιμα και τις ζωοτροφές (RASFF) σε όλη την Ευρώπη. Μέσω του RASFF, όλα τα κράτη μέλη της ΕΕ μπορούν να έχουν πρόσβαση σε ένα σύστημα ανταλλαγής πληροφοριών, να λαμβάνουν ενημερώσεις και να αναλαμβάνουν δράση για την προστασία της ασφάλειας των τροφίμων και των ζωοτροφών. Οι μυκοτοξίνες κατατάσσονται συνήθως μεταξύ των "δέκα κορυφαίων" ανησυχιών που αναφέρονται ετησίως από το RASFF και αποτελούν τη μεγαλύτερη κατηγορία κινδύνου για την ανάπτυξη συναγερμών που σχετίζονται με επιμολυσμένα τρόφιμα (Agriropoulou et al, 2020).

### 1.3 Μυκητολογικές προσβολές στους ελαιόκαρπους

Σε γενικές γραμμές, οι ελιές αποτελούν έναν τύπο τροφίμου, το οποίο εμφανίζει ιδιαίτερη ευαισθησία σε φθορές και αλλοιώσεις οι οποίες προκαλούνται από την παρουσία και τη δραστηριότητα μικροοργανισμών όπως είναι οι μύκητες και τα βακτήρια. Οι ελαιόκαρποι μπορεί να επιμολυνθούν από μία σειρά από διαφορετικούς μύκητες σε ποικίλες διαδικασίες της παραγωγής και αποθήκευσης τους. Οι μολύνσεις αυτές μπορεί να σχετίζονται με την καλλιεργητική συγκομιδή, είτε κατά την πτώση των καρπών στο έδαφος, είτε κατά τις μεταχειρίσεις από τους εργάτες, οι οποίοι τις συγκομίζουν (El Haouhay et al., 2014). Παράλληλα, οι διάφορες μυκητολογικές προσβολές μπορεί να προκληθούν εξαιτίας της προσβολής του ελαιόκαρπου από έντομα, με πιο σημαντικό τον δάκο της ελιάς (*Bactrocera oleae*) (Notario et al, 2022).

Οι ελαιόκαρποι συχνά αποθηκεύονται για σημαντικά χρονικά διαστήματα κάτω από συνθήκες που ευνοούν την ανάπτυξη μυκήτων. Οι συνθήκες αυτές είναι η αποθήκευση σε σακούλες κατασκευασμένες από υλικά όπως η γιούτα, οι οποίες βρίσκονται σε επαφή με το έδαφος και σε χώρους με μη επαρκή αερισμό και υψηλά επίπεδα σχετικής υγρασίας. Η μόλυνση του ελαιόκαρπου από επιβλαβείς μικροοργανισμούς μπορεί επίσης να πραγματοποιηθεί και μέσω της προσβολής από έντομα. Οι συνθήκες αυτές υποβαθμίζουν τη γεύση και εμφάνιση και οδηγούν με τον τρόπο αυτό σε μείωση της αποδεκτής ποιότητας των ελιών και των ελαιολάδων. Οι μη επαρκείς ή ακατάλληλες συνθήκες αποθήκευσης ή ζύμωσης ευνοούν την ανάπτυξη των επιβλαβών αυτών μυκήτων (Bavaro et al., 2017).

Η παραγωγή ελαιολάδου κάτω από τέτοιες δυσμενείς συνθήκες δεν οδηγεί μόνο σε χαμηλή ποιότητα, αλλά μπορεί να θέσει σε κίνδυνο την ανθρώπινη υγεία. Με την επεξεργασία των καρπών με παράγοντες, όπως είναι το σορβικό οξύ, η μεθυλενογλυκόλη και τα αιθέρια έλαια μπαχαρικών -από τα οποία το σορβικό οξύ φαίνεται να είναι το πιο αποτελεσματικό- μπορεί να σταματήσει η ανάπτυξη μούχλας (mold) στις μαύρες επιτραπέζιες ελιές. Πριν από την επεξεργασία, ορισμένα ελαιοτριβεία πλένουν συχνά τις ελιές σε ζεστό νερό, το οποίο αυξάνει σημαντικά τη θερμοκρασία του ελαιόκαρπου, ο οποίος θα αλεστεί. Η θερμοκρασία άλεσης διατηρείται κάτω από τους 27°C, η οποία είναι ζωτικής σημασίας για την ποιότητα του ελαιολάδου. Προκειμένου να προαχθεί η απελευθέρωση του ελαίου από τους καρπούς κατά τη διαδικασία εκχύλισης του ελαίου, προστίθεται περιστασιακά ζεστό νερό στην πάστα ελιάς. Τα πιο πτητικά αρώματα χάνονται και ο ρυθμός οξείδωσης του λαδιού

αυξάνεται εάν η θερμοκρασία είναι υψηλότερη από 27°C, γεγονός που μειώνει την ποιότητα του λαδιού. Το χημικό περιεχόμενο των πολυφαινολών, των αντιοξειδωτικών και των βιταμινών του ελαιολάδου μειώνεται επίσης από τις υψηλότερες θερμοκρασίες, αλλά οι θερμοκρασίες αυτές μπορεί να έχουν το πλεονέκτημα ότι ελέγχουν τις μούχλες που σχετίζονται με τον ελαιόκαρπο (Qaraleh et al., 2015).

Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί διάφορες ομάδες μυκήτων που προκαλούν σήψη των καρπών στην ελιά, συμπεριλαμβανομένων ειδών από διαφορετικές οικογένειες μυκήτων. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι τα παρακάτω (Chliyah et al., 2014):

- Μύκητες της οικογένειας *Botryosphaeriaceae* όπως για παράδειγμα *Botryosphaeria*, *Diplodia*, *Lasiodiplodia*, *Macrophomina*, *Neofusicoccum* και *Camarosporium*
- Μύκητες της οικογένειας *Glomerellaceae* συμπεριλαμβανομένου του *Colletotrichum*
- Μύκητες της οικογένειας *Mycosphaerellaceae* συμπεριλαμβανομένου του *Pseudocercospora*
- Μύκητες με μικρότερη σημασία, οι οποίες ανήκουν σε διαφορετικές οικογένειες, με παραδείγματα όπως *Fusicladium oleagineum*, *Alternaria spp*, *Aureobasidium pullulans*, *Epicoccum nigrum*, *Cladosporium herbarum s.l.*, *Capnodium elaeophilum*, *Truncatella angustata*, *Pilidium concavum* και *Pestalotia fici*.



Εικόνα 3: Επιμόλυνση ελαιόκαρπων από διαφορετικά είδη μυκήτων. Πράσινη μούχλα στην επιφάνεια (A) και στο εσωτερικό του ελαιοκάρπου (B) που προκαλείται από τον μύκητα *Aspergillus flavus*. Καστανή σήψη στην επιφάνεια (C) και στο εσωτερικό του ελαιοκάρπου (D) που προκαλείται από *Cladosporium sp*. Σύμπτωμα ανθράκωσης στον ελαιόκαρπο (E)- σχηματιζόμενα ακέρβια *Colletotrichum gloeosporioides* στον ελαιόκαρπο (F) (Chliyah et al., 2014)

Σύμφωνα με την ερευνητική ομάδα των Roussos et al. (2006), οι ελιές μπορούν να υποστηρίξουν την ανάπτυξη μούχλας και την παραγωγή μίας σειράς διαφορετικών μυκοτοξινών. Ειδικότερα, τα γένη *Aspergillus*, *Penicillium* και *Alternaria* έχουν περιγραφεί ως οι πιο συνηθισμένοι μύκητες στις ελιές και τα ελαιοκομικά προϊόντα, λόγω της ικανότητάς τους να ευδοκιμούν στις ελιές και να δημιουργούν μια ποικιλία μυκοτοξινών. Χαρακτηριστικά παραδείγματα μυκοτοξινών, τα οποία έχουν βρεθεί σε δείγματα ελαιόλαδου ή ελιών και θα αναλυθούν παρακάτω, είναι οι εξής:

- Αφλατοξίνες
- Ωχρατοξίνη A
- Ζεαραλενόνη
- Μπροβερισίνη
- Φουμονισίνες
- Κιτρινίνη
- Πατουλίνη

## **1.4 Μυκοτοξίνες που απαντώνται στο ελαιόλαδο**

### **1.4.1 Αφλατοξίνες**

Οι αφλατοξίνες αποτελούν μία κατηγορία μυκοτοξινών, οι οποίες αποτελούν τοξικούς δευτερογενείς μεταβολίτες που προέρχονται από πολυκετίδια και παράγονται από είδη μυκήτων του γένους *Aspergillus*, με κυριότερα τα *Aspergillus flavus*, ο *A. parasiticus* και ο *A. nomius*. Η μόλυνση των καλλιεργειών με αφλατοξίνες αποτελεί παγκόσμια απειλή που θέτει σε κίνδυνο την ασφάλεια των τροφίμων, των ζωοτροφών και επηρεάζει επίσης τη γεωργική οικονομία και τις βιομηχανίες μικρής κλίμακας που εξαρτώνται από τις καλλιέργειες. Οι καλλιέργειες μπορούν να μολυνθούν σε διαφορετικά στάδια από τους μύκητες αυτούς, όπως για παράδειγμα κατά τη διαδικασία της συγκομιδής, της αποθήκευσης και της μεταφοράς (Kumar et al., 2021).

Η αφλατοξίνη B1 (AFB1), η αφλατοξίνη B2 (AFB2), η αφλατοξίνη G1 (AFG1), η αφλατοξίνη G2 (AFG2), η αφλατοξίνη M1 (AFM1) και η αφλατοξίνη M2 (AFM2) είναι οι έξι κύριες μορφές αφλατοξινών. Μεταξύ αυτών, οι B1, B2, G1 και G2 υπάρχουν σε καλλιέργειες τροφίμων ή παράγωγά τους, ενώ οι M1 (μεταβολίτης της B1) και M2 υπάρχουν σε προϊόντα που προέρχονται από ζώα, όπως τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Το επίπεδο τοξικότητας που συνδέεται με την αφλατοξίνη ποικίλλει ανάλογα

με τους τύπους που υπάρχουν, με τη σειρά τοξικότητας να είναι, από την πιο τοξική προς την λιγότερο τοξική, AFB1 > AFG1 > AFB2 > AFG2 (P. Kumar et al., 2017)



Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση των χημικών δομών των αφλατοξινών (Monson et al., 2015)

Από χημική άποψη, οι αφλατοξίνες είναι διφουρανοκουμαρίνες, οι οποίες έχουν έναν δακτύλιο πεντάνονης συνδεδεμένο με την πλευρά του κουμαρινικού πυρήνα στην περίπτωση των σειρών AFTs και AFTs-B, ή έναν εξαμελή δακτύλιο λακτόνης συνδεδεμένο με την πλευρά της σειράς AFTs-G. Η παραγωγή τοξινών επηρεάζεται από τις φυσικές, βιολογικές και χημικές συνθήκες του είδους *Aspergillus*, το οποίο τις παράγει. Μεταξύ των 20 αναγνωρισμένων αφλατοξινών, οι AFB1 και AFB2 παράγονται από τον *A. flavus*, ενώ οι AFG1 και AFG2 μαζί με τις AFB1 και AFB2 παράγονται από τον *A. parasiticus* (Nakai et al., 2008).

Οι αφλατοξίνες μπορεί να ανιχνευτούν σε ποικίλα προϊόντα, όπως είναι τα δημητριακά, οι ελαιούχοι σπόροι, τα μπαχαρικά και οι ξηροί καρποί. Οι μολύνσεις στο χωράφι καθώς και εκείνες που συμβαίνουν κατά τη συγκομιδή, τη μεταφορά και την αποθήκευση μπορούν να προκληθούν από μύκητες. Σύμφωνα με τους P. Kumar et al. (2017), η έκθεση σε αφλατοξίνες είναι εξαιρετικά επικίνδυνη για την ανθρώπινη υγεία. Η πιο επικίνδυνη αφλατοξίνη, η αφλατοξίνη B1, είναι καρκινογόνος και προκαλεί καρκίνο του ήπατος τόσο στους ανθρώπους όσο και στα ζώα. Η τοξικότητα της συγκεκριμένης μυκοτοξίνης συνδέεται με το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Το ανοσοποιητικό σύστημα τόσο των ανθρώπων όσο και των ζώων καταστέλλεται από τις αφλατοξίνες επειδή παρεμβαίνουν στην ικανότητα των ανοσοενισχυτικών κυττάρων να παραμένουν σταθερά. Η συσσώρευση αφλατοξινών προκαλεί καρκίνο του ήπατος τόσο σε περιπτώσεις υψηλής όσο και σε περιπτώσεις χαμηλής έκθεσης σε αφλατοξίνες. Η υψηλή έκθεση σε αφλατοξίνη προκαλεί ταχεία θνησιμότητα και τραυματισμό, ενώ

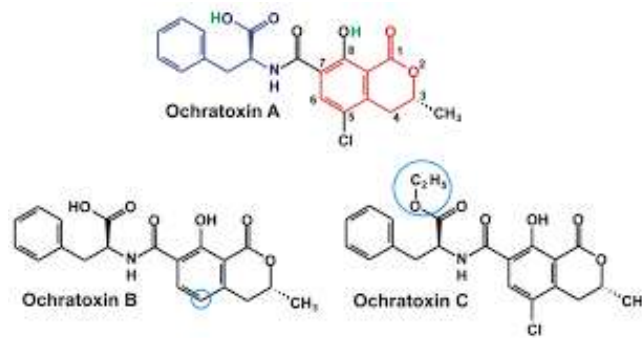
η χαμηλή έκθεση σε αφλατοξίνη με την πάροδο του χρόνου έχει ανοσολογικές ή διατροφικές συνέπειες (Dabuo et al, 2022).

Όσον αφορά την ύπαρξη τους στο ελαιόλαδο, οι αφλατοξίνες, και ιδιαίτερα η αφλατοξίνη B1 αποτελούν ίσως τον πιο καλά μελετημένο τύπο μυκοτοξινών. Σε μία συστηματική ανάλυση της βιβλιογραφίας και μετανάλυση, φάνηκε πως το 32%, των δειγμάτων των ελαιολάδων, τα οποία αναλύθηκαν σε διαφορετικές μελέτες εμφάνιζαν επιμόλυνση από την αφλατοξίνη αυτή (Shavakhi et al., 2022). Επίπεδα αφλατοξίνης B1 έχουν βρεθεί και σε ανεπεξέργαστα δείγματα ελαιόλαδου στο Ιράν, ωστόσο σε δείγματα, τα οποία είχαν υποστεί επεξεργασία δεν εμφάνισαν επίπεδα καμίας αφλατοξίνης (Nabizadeh et al, 2018). Το αποτέλεσμα αυτό δεν προκάλεσε έκπληξη, με δεδομένο πως η μόλυνση από μυκοτοξίνες επηρεάζει κατά κύριο λόγο τα παρθένα ελαιόλαδα, καθώς ότι ο καθαρισμός του λαδιού, και ιδιαίτερα η επεξεργασία του με υδροξείδιο του νατρίου, θα μπορούσε να αφαιρέσει εν μέρει τις αφλατοξίνες (Cavaliere et al, 2010). Παράλληλα, επίπεδα της αφλατοξίνης B2, καθώς και άλλων μυκοτοξινών, έχουν βρεθεί σε δείγματα ελαιολάδου στην περιοχή της Ταϊλάνδης (Junsai et al., 2021).

Επιπροσθέτως, επίπεδα αφλατοξίνης B1 έχουν βρεθεί και σε δείγματα ελαιόλαδου από τη Νότια Ελλάδα, σε μία παλαιότερη μελέτη (Papachristou & Markaki, 2004). Ωστόσο, είναι χαρακτηριστική η απουσία μελετών, οι οποίες να αφορούν την παρουσία των διαφορετικών αφλατοξινών στο ελληνικό ελαιόλαδο

#### **1.4.2 Ωχρατοξίνη A**

Η ωχρατοξίνη A (OTA) είναι μια μυκοτοξίνη που παράγεται από τον δευτερογενή μεταβολισμό πολλών νηματοειδών ειδών που ανήκουν στα γένη *Aspergillus* και *Penicillium*. Η OTA μπορεί να παραχθεί από διάφορους μύκητες του γένους *Aspergillus* σε μεγάλες ποσότητες, ωστόσο το φαινόμενο αυτό φαίνεται πως είναι σχετικά σπάνιο. Από βιοσυνθετική άποψη, η OTA αποτελεί ένα πεντακετίδιο με προέλευση από την οικογένεια των διυδροκουμαρινών τα οποία έχουν συζευχθεί με ένα μόριο β-φαινυλαλανίνης (El Khoury & Atoui, 2010).



Εικόνα 5: Χημικές δομές διαφορετικών ωχρατοξινών

Η ΟΤΑ έχει συσχετιστεί με διαφορετικούς μεταβολίτες. Παραδείγματα αυτών είναι η ωχρατοξίνη Β (ΟΤΒ), το διχλωρο-ανάλογο της ΟΤΑ, η ωχρατοξίνη C (ΟΤC), ο αιθυλεστέρας της, το ισοκουμαρικό παράγωγο της ΟΤΑ, η ωχρατοξίνη α (ΟΤα), και το διχλωρο-ανάλογο της, η ωχρατοξίνη β (Οτβ). Σε σχέση με τα παραπάνω, η ΟΤΑ εμφανίζει υψηλότερη σταθερότητα σε συνθήκες που χαρακτηρίζονται από υψηλή οξύτητα και υψηλές θερμοκρασίες. Για τον λόγο αυτό είναι ιδιαίτερα δύσκολη η απομάκρυνση της από τα πιθανά μολυσμένα τρόφιμα. Η ωχρατοξίνη Α εμφανίζει καρκινογόνες και ηπατοτοξικές δράσεις, ενώ φαίνεται πως η χρόνια δράση της είναι πιο σοβαρή, σε σύγκριση με την οξεία. (El Khoury & Atoui, 2010).

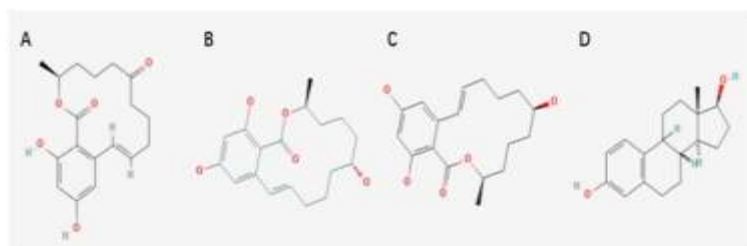
Επειδή ορισμένοι περιβαλλοντικοί παράγοντες ευνοούν τη μόλυνση η ΟΤΑ εμφανίζεται κυρίως σε περιοχές όπου η θερμοκρασία και η υγρασία είναι ευνοϊκές για την ανάπτυξη μούχλας και την παραγωγή αυτής της τοξίνης. Πολυάριθμες άλλες μεταβλητές, όπως οι συνθήκες καταπόνησης ή η ζημία της καλλιέργειας από την ξηρότητα πριν από τη συγκομιδή, η δραστηριότητα των εντόμων, ο τύπος του εδάφους και οι ανεπαρκείς συνθήκες αποθήκευσης, μπορούν να ενισχύσουν την επικράτηση των μυκοτοξινών. (Cavaliere et al, 2010).

Σε γενικές γραμμές, η μελέτη των επιπέδων της ωχρατοξίνης Α στο ελαιόλαδο δεν είναι τόσο διαδεδομένη, όσο η αντίστοιχη των αφλατοξινών. Ωστόσο, στις περιπτώσεις που μελετάται η παρουσία της, έχει παρατηρηθεί πως εμφανίζονται υψηλά επίπεδα της. Μάλιστα, φαίνεται πως η συχνότητα εμφάνισής της είναι μεγαλύτερη σε μη τυποποιημένα προϊόντα σε σύγκριση με τυποποιημένα προϊόντα. Αυτό οφείλεται πιθανώς στο γεγονός πως τα μη τυποποιημένα ελαιόλαδα δεν υπόκεινται στους ίδιους αυστηρούς ελέγχους, στους οποίους μπορεί να υπόκεινται τα τυποποιημένα (Ferracane et al, 2007).

Παράλληλα, και σε Ελληνικά ελαιόλαδα φαίνεται πως μπορεί να υπάρξουν σημαντικά επίπεδα επιμόλυνσης από ωχρατοξίνη Α (Parachristou & Markaki, 2004). Ωστόσο, όπως και στην περίπτωση των αφλατοξινών, είναι χαρακτηριστική η απουσία μελετών, οι οποίες να σχετίζονται με το ζήτημα αυτό.

### 1.4.3 Ζεαραλενόνη

Η ζεαραλενόνη (ZEA), η οποία αναφέρεται εναλλακτικά και ως τοξίνη F-2 αποτελεί έναν από τους πιο κοινούς τύπους μυκοτοξίνης που εμφανίζεται στα τρόφιμα. Πρόκειται για έναν από τους τοξικούς μεταβολίτες που παράγονται από μύκητες του γένους *Fusarium*, όπως το *F. graminearum*, το *F. oxysporum*, το *F. equisetum* και το *F. nivale*. Όλοι αυτοί είναι μύκητες, οι οποίοι απαντώνται στον αγρό και όχι σε χώρους, όπου πραγματοποιείται η αποθήκευση των τροφίμων. Η ζεαραλενόνη είναι μια λακτόνη ρεσοκυκλικού οξέος, η οποία χημικά περιγράφεται ως 6-[10-ύδροξη-6-όξο-trans-1-ανδεκενύλ]-B-ρεσοκυκλική λακτόνη οξέος (Zinedine et al., 2007).



Εικόνα 6: Τύποι χημικής δομής. (A) ZEA, (B)  $\alpha$ -ZOL, (C)  $\beta$ -ZOL, (D) 17- $\beta$ -οιστραδιόλη (Han et al, 2022)

Όταν η τοξίνη προσλαμβάνεται από θηλαστικά, η κετονική ομάδα στη θέση C-8 της ZEA μπορεί να αναχθεί και να μετατραπεί σε  $\alpha$ - και  $\beta$ -ζεαραλενόλη (ζεαραλενόλη, ZOL), οι οποίες έχουν δομές που μοιάζουν με οιστρογονικές ορμόνες και μπορούν να συνδεθούν με τους υποδοχείς οιστραδιόλης. Για το λόγο αυτό ορίζονται ως οιστρογονικές μυκοτοξίνες (Han et al, 2022).

Μία από τις πέντε κορυφαίες μυκοτοξίνες που είναι πιο προβληματικές για τη γεωργία είναι η ζεαραλενόνη. Οι κυριότεροι τρόποι με τους οποίους εκδηλώνεται η τοξικότητά της είναι η πρόκληση καρκίνου, η αναπαραγωγική τοξικότητα, η ηπατοτοξικότητα, η ανοσοτοξικότητα και η γονοτοξικότητα. (Han et al, 2022).



Σε γενικές γραμμές, η έρευνα σχετικά με την εμφάνιση της ζεαραλενόνης σε τρόφιμα δεν έχει εστιαστεί ιδιαίτερα στο ελαιόλαδο. Ωστόσο, σε μία έρευνα από το 2019, ποσότητες ζεαραλενόνης έχουν βρεθεί σε δείγματα διαφορετικών ελαίων σε μεγάλη συχνότητα και πιο συγκεκριμένα στο 25% των δειγμάτων τα οποία είχαν μελετηθεί και σε συγκεντρώσεις έως 25,6 μg/kg. Όσον αφορά στο ελαιόλαδο, στη μελέτη αυτή η ζεαραλενόνη βρέθηκε στο 51% των δειγμάτων ελαιόλαδου, στο 3% των δειγμάτων έξτρα παρθένου ελαιόλαδου, στο 7% ακατέργαστου αγουρέλαιου και στο 7% του κατεργασμένου αγουρέλαιου, τα οποία μελετήθηκαν (Hidalgo-Ruiz et al, 2019). Παράλληλα, ποσότητες ζεαραλενόνης έχουν βρεθεί και σε αναλύσεις ελαιολάδου από την περιοχή της Ταϊλάνδης (Junsai et al., 2021).

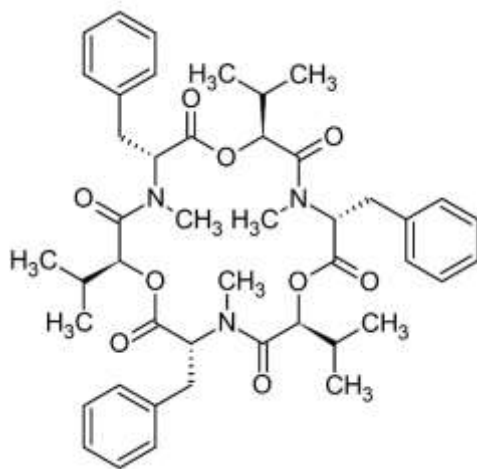
#### **1.4.4 Μποβερισίνη**

Η μποβερισίνη (BEA) είναι μια μυκοτοξίνη που παράγεται από μύκητες που ανήκουν σε διαφορετικά γένη, μεταξύ των οποίων είναι το είδος *Beaveria bassiana* και οι μύκητες του γένους *Fusarium spp.* Πρόκειται για ένα κυκλικό εξαδεξίπεπτιδίο, στο μόριο του οποίου περιέχονται τρία κατάλοιπα D-υδροξυισοβαλερύλικου (D-hydroxy-isovaleryl) και τρία κατάλοιπα N-μεθυλοφαινυλαλανύλιου (N-methyl-phenylalanyl), σε εναλλασσόμενη αλληλουχία μεταξύ τους. Είναι δομικά παρόμοιο με τις εννιατίνες, οι οποίες παράγονται επίσης από ορισμένα είδη *Fusarium*, αλλά η μποβερισίνη διαφέρει ως προς τη φύση του N-μεθυλαμινοξέος (Wang & Xu, 2012).

Η BEA έχει ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δραστηριοτήτων και διακρίνεται από τη διπλή φύση της, η οποία περιλαμβάνει την ικανότητα να έχει κυτταροτοξικές επιδράσεις σε πολυάριθμες κυτταρικές σειρές, καθώς και αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές, αντιβακτηριακές, εντομοκτόνες και νηματωδοκτόνες ικανότητες. Η ευρεία διάδοση αυτής της μυκοτοξίνης, η οποία μπορεί να βρεθεί τόσο στα τρόφιμα όσο και στις ζωοτροφές, τη διακρίνει από άλλες. Η ΣΕΒ είναι κυρίως γνωστή ως επιμόλυνση των δημητριακών και των προϊόντων που προέρχονται από δημητριακά, ενώ υπάρχει και σε άλλα τρόφιμα, συμπεριλαμβανομένων των ξηρών καρπών και του καφέ. (Caloni et al., 2020).

Όσον αφορά τα διάφορα έλαια, στην Κίνα έχουν βρεθεί ποσότητες της BEA σε μία σειρά διαφορετικών ελαίων, όπως για παράδειγμα σογιέλαιο, αραβοσιτέλαιο κλπ (Han et al, 2019). Ειδικότερα, όσον αφορά το ελαιόλαδο, δεν έχουν πραγματοποιηθεί πολλές

σχετικές μελέτες, ωστόσο ποσότητες μβοβερισίνης έχουν βρεθεί σε δείγματα ελαιολάδου από την περιοχή της Ταϊλάνδης (Junsai et al., 2021).



Εικόνα 7: Χημική δομή της μβοβερισίνης (<https://www.abcam.com/beauvericin-cyclic-hexadepsipeptide-mycotoxin-ab142403.html>)

#### 1.4.5 Φουμονισίνες

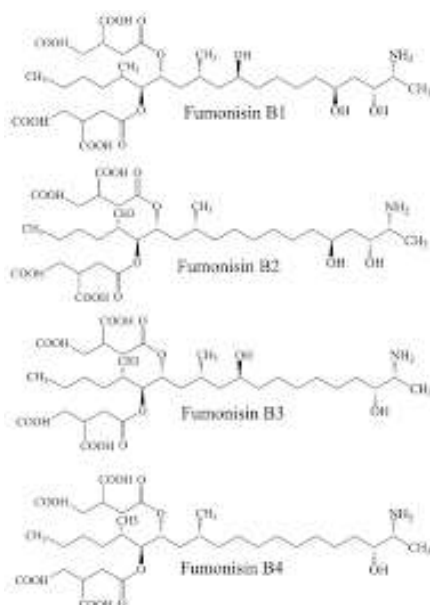
Οι φουμονισίνες είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται στα δημητριακά από παθογόνους μύκητες, συγκεκριμένα τους *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* και συναφή είδη. Επιπλέον, ο μύκητας *Aspergillus niger* παράγει φουμονισίνες σε μία σειρά από καλλιεργούμενα φυτά μεταξύ των οποίων είναι η αραχίδα, ο αραβόσιτος και το σταφύλι (Kamle et al, 2019).

Οι φουμονισίνες A, B, C και P είναι οι ονομασίες που δόθηκαν σε περισσότερες από 15 ομόλογες φουμονισίνες που έχουν ανακαλυφθεί. Επιπλέον, οι τρεις μορφές φουμονισινών B που είναι πιο διαδεδομένες είναι οι FB1, FB2 και FB3, με την FB1 να είναι η πιο δηλητηριώδης μορφή που μπορεί να συνυπάρχει με τις άλλες μορφές φουμονισινών, δηλαδή τις FB2 και FB3. Ο δι-εστέρας του 2-αμινο-12,16-διμεθυλο-3,5,10,14,15-πενταϋδροξυλεϊκοσάνιου (2-amino-12,16-dimethyl-3,5,10,14,15-pentahydroxyleicosane) και του προπανίου-1,2,3 τρι-καρβοξυλικού οξέος (propane-1,2,3-tricarboxylic acid) αποτελεί τον FB1. Οι ομάδες υδροξυλίου (OH-) στις θέσεις C-14 και C-15 αλληλεπιδρούν με τις καρβοξυλικές ομάδες (-COOH) του TCA για τη δημιουργία ενός εστέρα. Ωστόσο, οι FB2 και FB3 είναι στην πραγματικότητα τα C-5 και C-10 δεϋδροξυ ανάλογα του FB1 (Kamle et al, 2019).

Οι τοξίνες συνδέονται με διάφορα προβλήματα υγείας, όπως ο καρκίνος του οισοφάγου. Η φουμονισίνη B1 συσχετίζεται με περιστατικά εμφάνισης

ηπατοκαρκινώματος, πρόκληση διέγερσης και καταστολής του ανοσοποιητικού συστήματος, προβλήματα στην ανάπτυξη του νευρικού σωλήνα, νεφροτοξικότητας, καθώς και άλλων παθήσεων. Έχει βρεθεί πως προάγει την εμφάνιση ηπατοκαρκινώματος, ενώ αλληλοεπιδρά συνεργιστικά με την αφλατοξίνη B1 για την πρόκληση τοξικότητας (Chen et al, 2021).

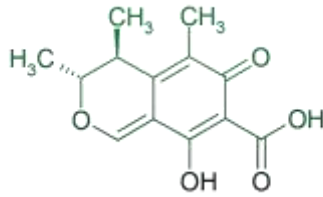
Σε γενικές γραμμές, η παρουσία φουμονισινών στο ελαιόλαδο δεν έχει ερευνηθεί ιδιαίτερα, ωστόσο έχουν βρεθεί ποσότητες της FB1 και της FB2 σε ελαιόλαδο από την Ταϊλάνδη (Junsai et al., 2021).



Εικόνα 8: Χημικές δομές των διαφορετικών φουμονισινών (Kostić et al., 2019)

#### 1.4.6 Κιτρινίνη

Η κιτρινίνη (CIT) είναι ένα μεθύδιο κινόνης με δύο ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου. Πριν από τον Δεύτερο Παγκόσμιο Πόλεμο, το 1931, οι Hetherington και Raistrick απομόνωσαν για πρώτη φορά CIT από καλλιέργεια του *Penicillium citrinum*. Αργότερα, ανακαλύφθηκε σε περισσότερα από δώδεκα είδη *Penicillium*, συμπεριλαμβανομένων των *P. citrinum*, *P. expansum*, *P. radicicola* και *P. verrucosum*, καθώς και σε μερικά στελέχη του *P. camemberti* (χρησιμοποιείται για την παρασκευή τυριού) και σε ορισμένα είδη *Aspergillus*, συμπεριλαμβανομένου του *A. oryzae*, ο οποίος χρησιμοποιείται για την παρασκευή προϊόντων ζύμωσης, όπως σάκε, miso και σάλτσας σόγιας. Επιπλέον, η CIT έχει απομονωθεί από τα βιομηχανικά είδη *Monascus ruber* και *Monascus purpureus*, τα οποία χρησιμοποιούνται για την παρασκευή βαφών σε βιομηχανική κλίμακα (Silva et al, 2021)



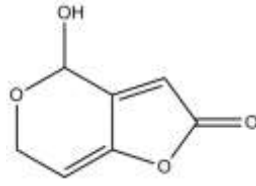
Εικόνα 9: Χημική δομή της κιτρινίνης (<https://www.mycotoxins.info/mycotoxins/citrinin/>)

Η μόλυνση από κιτρινίνη αποτελεί σοβαρό πρόβλημα σε χώρες όπου επικρατούν θερμές κλιματικές συνθήκες που ευνοούν την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών που προκαλούν τροφική δηλητηρίαση. Σύμφωνα με μελέτες τοξικότητας, το κύριο όργανο-στόχος της CIT είναι τα νεφρά. Ωστόσο, η ευπάθεια στην CIT διαφέρει σημαντικά μεταξύ των ειδών. Το οξειδωτικό στρες και η αυξημένη άμυνα των αντιοξειδωτικών ενζύμων θεωρούνται οι βασικοί παράγοντες που συμβάλλουν στην τοξικότητα που προκαλείται από CIT σε συστήματα οργάνων. Η νεφρική ανεπάρκεια έχει συνδεθεί με τη συσσώρευση CIT στα νεφρά τόσο σε ανθρώπους όσο και σε ζώα. Οι επιδράσεις της CIT μπορούν να συνδυαστούν με εκείνες των OTA και PAT, δύο πρόσθετων μυκοτοξινών, για να έχουν ακόμη πιο βλαβερές επιπτώσεις στους ιστούς και τα όργανα. (Zhang et al., 2021).

Η παρουσία της κιτρινίνης σε ελιές, οι οποίες προορίζονται για άμεση κατανάλωση, ή για παραγωγή ελαιόλαδου έχει επιβεβαιωθεί από πολλαπλές μελέτες, ιδιαίτερα σε μαύρες αλλά και σε πράσινες ελιές. Ωστόσο, η ύπαρξή της στο ελαιόλαδο δεν έχει επιβεβαιωθεί άμεσα. Ιδιαίτερα η μόλυνση του τελευταίου εγείρει την πιθανότητα μετάδοσης σε υποπροϊόντα επεξεργασίας του ελαιολάδου, όπως τα στερεά απόβλητα (πχ ο ελαιοπυρήνας). Η ανακάλυψη της OTA και των αφλατοξινών στο ελαιόλαδο ενισχύει την υπόθεση αυτή. Αν και οι αφλατοξίνες συνήθως ανακαλύπτονται μόνο σε ίχνη ή μικρές ποσότητες σε μελέτες, οι πιο ευαίσθητες αναλυτικές τεχνικές με χαμηλό LOD αποκαλύπτουν πολύ περισσότερα θετικά δείγματα. (Khwaldia et al, 2021).

#### 1.4.7 Πατουλίνη

Η πατουλίνη (PAT) (4-υδροξυ-4H-φουρο [3,2-c]πυρο-2(6H)-όνη) αποτελεί έναν τύπο ιδιαίτερα κοινά εμφανιζόμενης μυκοτοξίνης, η οποία παράγεται από τουλάχιστον 60 διαφορετικά είδη μυκήτων, όπως *Penicillium expansum*, *P. crustosum*, *P. ratulum* και *A. clavatus*. Ο *P. expansum* αποτελεί τον πιο σημαντικό οργανισμό που την παράγει. Η PAT θεωρείται ότι μπορεί να έχει μεταλλαξιογόνες, καρκινογόνες και εμβρυοτοξικές επιδράσεις στον άνθρωπο (Vidal et al., 2019)



Εικόνα 10: Χημική δομή της πατουλίνης (Ioi et al., 2017)

Ο *P. expansum* είναι ένας παρασιτικός μύκητας πληγών που εισέρχεται στους καρπούς μέσω τραυματισμών που ενδεχομένως προκαλούνται από ανεπαρκείς συνθήκες πριν από τη συγκομιδή ή από τραχύ χειρισμό συγκομιδής και μεταφοράς. Είναι ένας από τους πιο γνωστούς και πιο μελετημένους μύκητες του γένους *Penicillium*, ο οποίος εμφανίζεται συχνά στα στάδια συγκομιδής ή μετασυλλογής των φρούτων. Ο *P. expansum* μπορεί να μολύνει ένα ευρύ φάσμα τροφίμων, μεταξύ των οποίων είναι τα μήλα, τα αχλάδια, τα κεράσια, τα φουντούκια και οι ελιές. Ορίζεται ως σημαντικός παραγωγός ΡΑΤ και κιτρινίνης και αποτελεί τη σημαντικότερη απειλή μυκοτοξινών στα μήλα και στα προϊόντα που προέρχονται από μήλα, όπως ο χυμός μήλου, ο πουρές, η μαρμελάδα και ο μηλίτης (Vidal et al., 2019).

Ωστόσο, κατά τις τελευταίες δεκαετίες έχουν βρεθεί διάφορα είδη *Penicillium* στις ελιές, συμπεριλαμβανομένων των *P. expansum*, *Penicillium citrinum* και *Penicillium crustosum*. Παράλληλα, έχει φανεί πως ο μύκητας *P. Expansum* όχι απλά μπορεί να αποικίσει τις ελιές αλλά και να παράξει πατουλίνη σε μέσα, τα οποία έχουν ως βάση τους στο ελαιόλαδο (oil-based media) σε πειραματικές συνθήκες, εντός του εργαστηρίου. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει πως ο μύκητας αυτός διαθέτει την ικανότητα να επιμολύνει το ελαιόλαδο με πατουλίνη, γεγονός το οποίο χρήζει περισσότερης διερεύνησης (Hamdi et al., 2021).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup>- ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΜΕΘΟΔΩΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ

### 2.1 Χρωματογραφία

#### 2.1.1 Βασικές αρχές της χρωματογραφίας

Η χρωματογραφία είναι μια μεγάλης σημασίας μέθοδος που επιτρέπει τον καθαρισμό, το διαχωρισμό και την ποιοτική ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση των συστατικών ενός μείγματος. Ο διαχωρισμός των μορίων του μείγματος μπορεί να πραγματοποιηθεί με βάση διαφορετικά χαρακτηριστικά που περιλαμβάνουν το μέγεθος και το σχήμα, το συνολικό φορτίο, την παρουσία υδρόφοβων ομάδων στην επιφάνεια και την ικανότητα προσκόλλησης στη στατική φάση. Οι τεχνικές διαχωρισμού με βάση τα χαρακτηριστικά των μορίων και τον τύπο αλληλεπίδρασης βασίζονται σε μηχανισμούς ιοντοανταλλαγής, επιφανειακής προσρόφησης, κατανομής και αποκλεισμού μεγέθους. Άλλες τεχνικές χρωματογραφίας οι οποίες μπορούν να ομαδοποιηθούν σύμφωνα με τη μορφή της στατικής φάσης, περιλαμβάνουν την χρωματογραφία στήλης, την χρωματογραφία λεπτής στιβάδας και την χρωματογραφία χάρτου (Coskun, 2016).

Η βάση της χρωματογραφίας είναι η ιδέα ότι τα μόρια ενός μείγματος που εφαρμόζεται σε μια επιφάνεια ή στερεή φάση διαχωρίζονται το ένα από το άλλο, ενώ κινούνται με τη βοήθεια μιας κινητής φάσης (στάσιμη φάση). Τα μοριακά χαρακτηριστικά που συνδέονται με την προσρόφηση (υγρό-στερεό), την κατανομή (υγρό-στερεό), τη συγγένεια ή τις μεταβολές στα μοριακά τους βάρη έχουν αντίκτυπο σε αυτή τη διαδικασία διαχωρισμού (Coskun, 2016).

Λόγω αυτών των διακυμάνσεων, ορισμένα συστατικά του μείγματος ρέουν γρήγορα στην κινητή φάση και εξέρχονται από το σύστημα χρωματογραφίας πιο γρήγορα, ενώ άλλα περνούν αργά στη στατική φάση και κινούνται αργά μέσα στο σύστημα χρωματογραφίας. (Coskun, 2016).

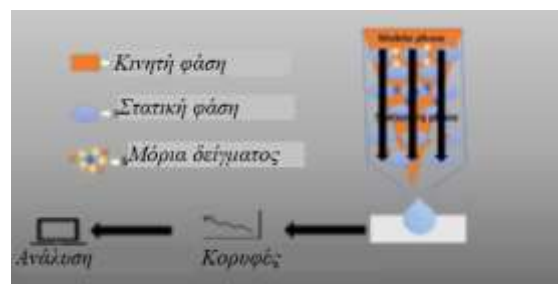
Σύμφωνα με την παραπάνω προσέγγιση, η βάση της τεχνικής της χρωματογραφίας είναι τα 3 παρακάτω στοιχεία (Coskun, 2016):

- Στατική φάση: Αυτή η φάση αποτελείται από μια στερεή φάση ή ένα στρώμα υγρού που προσροφάται στην επιφάνεια ενός στερεού φορέα.
- Κινητή φάση: Μπορεί να είναι υγρής ή αέριας φύσης και κινείται διαμέσου της στερεής φάσης

- Τα προς διαχωρισμό μόρια

Ο διαχωρισμός των υπό μελέτη μορίων του δείγματος, καθορίζεται από το είδος της αλληλεπίδρασης, η οποία συμβαίνει μεταξύ της στατικής, της κινητής φάσης και των υπό διαχωρισμό μορίων (Coskun, 2016).

Στη χρωματογραφία, μια στατική φάση είναι μια στερεή φάση ή μια υγρή φάση που εναποτίθεται πάνω σε μια στερεή φάση. Μια αέρια ή υγρή φάση είναι η κινητή φάση, η οποία κινείται πάνω στη στατική φάση. Είναι γνωστή ως υγρή χρωματογραφία (LC) εάν η κινητή φάση είναι υγρή και ως αέρια χρωματογραφία (GC) εάν είναι αέρια. Για τα αέρια και για πτητικά υλικά χρησιμοποιείται η αέρια χρωματογραφία. Τα περισσότερα δείγματα που είναι θερμικά ασταθή και μη πτητικά εξετάζονται με υγρή χρωματογραφία (Sayed, 2021).



Εικόνα 11: Βασική αρχή των μεθόδων χρωματογραφίας (Προσαρμοσμένο από Sayed, 2021)

Υπάρχουν δύο διαφορετικά είδη υγρής χρωματογραφίας. Το πρώτο είναι η υγρή χρωματογραφία κανονικής φάσης (NP-LC), στο οποίο η κινητή φάση είναι μη πολική και η στατική φάση πολική, ενώ το δεύτερο είναι η υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (RP-LC), όπου η κινητή φάση είναι πολική και η στατική φάση μη πολική. Πρέπει να επιλεγεί η κατάλληλη παράμετρος μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης, προκειμένου να επιτευχθεί ικανοποιητικός διαχωρισμός (Sayed, 2021).



*Εικόνα 12: Κατηγοριοποίηση μεθόδων χρωματογραφίας (Προσαρμοσμένο από <https://psiberg.com/different-types-of-chromatography/>)*

Στην περίπτωση της χρωματογραφίας υγρού-στερεού, το πορώδες προσροφητικό υλικό είναι πολικό και ο διαχωρισμός βασίζεται στις ιδιότητες των ενώσεων - π.χ. αμίνες (αλκαλικές) από αλκοόλες (ουδέτερες) και εστέρες (ουδέτεροι) από οξέα. Παραδοσιακά, η χρωματογραφία υγρού-στερεού χρησιμοποιείται ως συμπλήρωμα της εκχύλισης με διαλύτη για την περαιτέρω κλασματοποίηση των εκχυλισμάτων των δειγμάτων. Δεν περιλαμβάνει κατανομή της διαλυμένης ουσίας του δείγματος στη σταθερή φάση. Αντ' αυτού, οι πολικές ομάδες κάθε οργανικής διαλυμένης ουσίας αλληλεπιδρούν μέσω κυρίως δυνάμεων δεσμού υδρογόνου με τις πολικές θέσεις της στατικής φάσης. Συνεπώς, για τον αναπαραγωγίμο διαχωρισμό απαιτείται προσεκτική ρύθμιση της πολικότητας της κινητής φάσης για σταθερή δραστηριότητα των πολικών θέσεων. Ο όρος χρωματογραφία υγρού-στερεού (LSC) καλύπτει μια σειρά τεχνικών (Snyder & Dolan, 2017):

- χρωματογραφία προσρόφησης, όταν η στατική φάση είναι ένα ενεργό στερεό (π.χ. πυριτία, αλουμίνα ή ένα πολυμερές) και ο διαχωρισμός βασίζεται στις συγγένειες προσρόφησης μεταξύ των μορίων του δείγματος και της επιφάνειας του ενεργού στερεού.



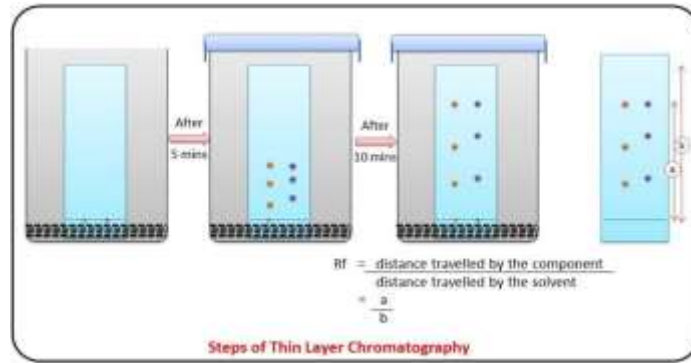
- χρωματογραφία ιόντων, η οποία χρησιμοποιεί μέσο ανταλλαγής ιόντων
- χρωματογραφία αποκλεισμού με χρήση σταθερής φάσης (π.χ. πολυμερούς ή πορώδους πυριτίας) η οποία διαχωρίζει ανάλογα με το μοριακό μέγεθος και το σχήμα
- χρωματογραφία συγγένειας, η οποία χρησιμοποιεί τη μοναδική βιολογική εξειδίκευση της αλληλεπίδρασης του αναλυτή και του συνδέτη με τη στατική φάση

Εκτός από το διαχωρισμό, ο στόχος της χρήσης της χρωματογραφίας ως τεχνικής ανάλυσης είναι να επιτευχθεί επαρκής διαχωρισμός σε εύθετο χρόνο. Για το σκοπό αυτό έχουν αναπτυχθεί πολυάριθμες χρωματογραφικές τεχνικές. Μεταξύ αυτών είναι η χρωματογραφία συγγένειας, η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC), η χρωματογραφία στήλης, η χρωματογραφία χαρτιού, η αέρια χρωματογραφία, η χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων, η χρωματογραφία διαπερατότητας σε πηκτή και η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης. (Patel, 2018).

### **2.1.1 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC)**

Στη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC), η σταθερή φάση αλληλεπιδρά με μεγάλη επιφάνεια για να δημιουργήσει μια προσρόφηση στερεού-υγρού, ενώ η κινητή φάση είναι υγρή. Η κινητή φάση ωθείται υψηλότερα μέσω τριχοειδών δυνάμεων. Η πολικότητα του υλικού, η στερεά φάση και ο διαλύτης έχουν αντίκτυπο σε αυτό το ρυθμό ανοδικής κίνησης. Η διαφορά στην κινητικότητα των προς διαχωρισμό ενώσεων μπορεί να οπτικοποιηθεί με την χρήση διαφορετικών ουσιών. Οι ενώσεις αυτές μπορούν να εμφανιστούν ως ξεχωριστές ζώνες σε ένα χρωματογράφημα. Παραδείγματα μεθόδων εμφάνισης είναι η τεχνική της νινυδρίνης και η οπτικοποίηση με μαύρο φως (Santiago & Strobel, 2013).

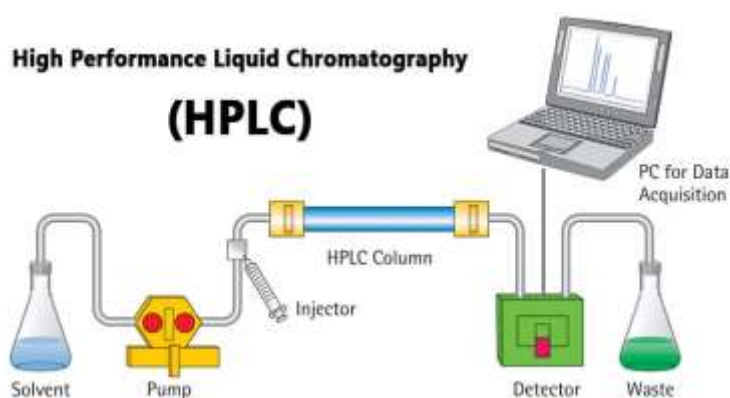
Μερικά από τα βασικά πλεονεκτήματα της TLC σε σύγκριση με τις αναλύσεις με υγρή χρωματογραφία στήλης υψηλής απόδοσης (HPLC) και αέρια χρωματογραφία (GC), αφορούν την απλότητα, την ελάχιστη απαιτούμενη προετοιμασία του δείγματος, τη μικρότερη κατανάλωση διαλυτών και τη δυνατότητα ανάλυσης πολλαπλών δειγμάτων δίπλα-δίπλα σε λιγότερο χρόνο. Πρόκειται για μια από τις παλαιότερες και απλούστερες μεθόδους ελέγχου διαφόρων προσμίξεων σε συστήματα φαρμάκων και τροφίμων (Sherma & Rabel, 2018).



Εικόνα 13: Βήματα πραγματοποίησης της TLC (<https://microbenotes.com/thin-layer-chromatography/>)

### 2.1.3 Υγρή χρωματογραφία υψηλής επίδοσης

Στην υγρή χρωματογραφία υψηλής επίδοσης ή υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης, ή HPLC διερευνώνται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της στατικής φάσης, των μορίων που μελετώνται και του (των) διαλύτη(ων) που χρησιμοποιείται(νται) ελέγχουν την περίοδο κατακράτησης. Στις περισσότερες περιπτώσεις, το δείγμα εισάγεται στο ρεύμα της κινητής φάσης, όπου επιβραδύνεται από χημικές ή φυσικές αλληλεπιδράσεις με τη στατική φάση. Κατά τη διάρκεια της ανάλυσης, η σταδιακή έκλυση τροποποιεί τη χημική σύσταση της κινητής φάσης. Με βάση τη συγγένεια του αναλύτη με την κινητή φάση διαχωρίζονται τα μίγματα των αναλυτών στα συστατικά τους. Η φύση της στατικής φάσης και του δείγματος επηρεάζουν την επιλογή της κινητής φάσης, των πιθανών πρόσθετων ενώσεων (additives) που απαιτούνται και τη διαβάθμιση (gradient) της ροής (Thammana, 2016).



Εικόνα 14: Διαγραμματική απεικόνιση της διεργασίας της HPLC (<https://microbenotes.com/high-performance-liquid-chromatography-hplc/>)

Υπάρχουν πολλοί τύποι HPLC. Μια πολική στατική φάση και μια μη πολική κινητή φάση χρησιμοποιούνται στην HPLC κανονικής φάσης. Ο πολικός αναλύτης

αλληλεπιδρά με την πολική στατική φάση και συγκρατείται από αυτήν. Η αλληλεπίδραση μεταξύ του πολικού αναλύτη και της πολικής στατικής φάσης επιμηκύνει τη διάρκεια έκλουσης ή τον παράγοντα κατακράτησης και οι εντάσεις προσρόφησης αυξάνονται όσο αυξάνεται η πολικότητα του αναλύτη. Αντίθετα, η αντίστροφη HPLC περιέχει μια κινητή φάση που είναι μέτρια πολική και μια μη πολική στατική φάση. Λειτουργεί με βάση τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις - δυνάμεις απόθησης μεταξύ ενός πολικού διαλύτη, ενός σχετικά μη πολικού αναλύτη και μιας μη πολικής σταθερής φάσης - οι οποίες οδηγούν σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Οι τριτοταγείς και τεταρτοταγείς δομές των πρωτεϊνών και των αμινοξέων, καθώς και το μοριακό βάρος των πολυσακχαριτών, μπορούν να προσδιοριστούν με χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους, HPLC ή χρωματογραφία διαπερατότητας πηκτής. Ωστόσο, με τη χρήση της HPLC μπορούν να ελεγχθούν πολλά διαφορετικά μόρια (Abdu Hussen, 2022).

#### **2.1.4 Αέρια χρωματογραφία (GC)**

Ο όρος αέρια χρωματογραφία αναφέρεται σε μια κατηγορία αναλυτικών μεθόδων διαχωρισμού που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση πτητικών ενώσεων στην αέρια φάση. Στην αέρια χρωματογραφία, τα συστατικά ενός δείγματος διαλύονται αρχικά σε έναν διαλύτη και στην συνέχεια εξατμίζονται, ώστε να πραγματοποιηθεί ο διαχωρισμός των ενώσεων. Ένα χημικά αδρανές αέριο, γνωστό ως κινητή φάση, χρησιμοποιείται για τη μετακίνηση των μορίων των αναλυτών κατά μήκος της θερμαινόμενης στήλης. Μια από τις λίγες χρωματογραφικές τεχνικές που συνήθως δεν περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση της κινητής φάσης με τον αναλύτη είναι η αέρια χρωματογραφία. Η χρωματογραφία αερίου-στερεού (GSC), όπου η σταθερή φάση είναι ένα στερεό προσροφητικό υλικό, και η χρωματογραφία αερίου-υγρού (GLC), όπου η σταθερή φάση είναι ένα υγρό σε έναν αδρανή φορέα (Eiceman et al., 2002).

Ένας τυπικός αέριος χρωματογράφος αποτελείται από μια θύρα έγχυσης, μια στήλη, εξοπλισμό ελέγχου της ροής του φέροντος αερίου, φούρνους και θερμοαντήρες για τη διατήρηση των θερμοκρασιών της θύρας έγχυσης και της στήλης, έναν ανιχνευτή και έναν καταγραφέα - ολοκληρωτή (Saeed et al., 2021).

Στη χρωματογραφία αερίου-υγρού, ένα δείγμα διαλύματος που περιέχει τις οργανικές ενώσεις-στόχους τοποθετείται στη θύρα δείγματος, όπου εξατμίζεται, επιτρέποντας το

διαχωρισμό των οργανικών ενώσεων-στόχων. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα αδρανή αέρια είναι το ήλιο ή το άζωτο, τα οποία στη συνέχεια χρησιμοποιούνται για τη μεταφορά των εξατμιζόμενων υλικών που εγχέονται. Αυτό το αδρανές αέριο διέρχεται μέσα από μια στήλη που είναι γεμάτη με πυρίτιο και επικαλυμμένη με υγρό. Σε σύγκριση με τις χημικές ουσίες που είναι περισσότερο διαλυτές στο υγρό, οι λιγότερο διαλυτές ενώσεις κινούνται με διαφορετική ταχύτητα κατά μήκος της στήλης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το διαχωρισμό τους. (Saeed et al., 2021).

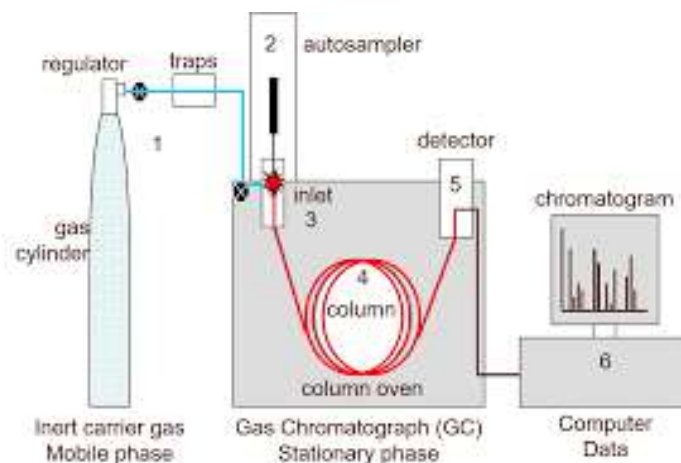
Στην GLC, η υγρή στατική φάση είτε ακινητοποιείται στα τοιχώματα του τριχοειδούς σωλήνα είτε προσροφάται σε μια στερεή αδρανή στήλη. Όταν ο γυάλινος ή μεταλλικός σωλήνας της στήλης είναι γεμάτος με μικροσκοπικά, αδρανή σφαιρίδια, η στήλη λέγεται πακτωμένη. Αυτά τα σφαιρίδια δέχονται μια λεπτή επίστρωση της υγρής φάσης που προσκολλάται στην επιφάνειά τους. Η σταθερή φάση ή ένα στρώμα προσροφητικού υλικού που μπορεί να διατηρήσει την υγρή φάση εναποτίθεται στα τοιχώματα του σωλήνα μιας τριχοειδούς στήλης.

Άλλες μέθοδοι, όπως η τεχνική GSC, εμφανίζουν περιορισμένη χρήση στο εργαστήριο και χρησιμοποιείται σπάνια, καθώς είναι δύσκολη η μεταφορά πολικών μορίων μέσω της στήλης, με αποτέλεσμα την κατακράτησή τους, και οι κορυφές είναι δύσκολο να διαχωριστούν (Saeed et al., 2021).

Ο ανιχνευτής είναι η συσκευή στο κάτω μέρος της στήλης που μετρά ποσοτικά τα συστατικά του μείγματος καθώς αποβάλλονται μαζί με το φέρον αέριο. Θεωρητικά, μια τεχνική ανίχνευσης μπορεί να αξιολογήσει οποιοδήποτε τμήμα του αέριου μίγματος που διαφέρει από τον αέριο φορέα. (Saeed et al., 2021).

Κάθε ανιχνευτής αποτελείται από δύο βασικά εξαρτήματα που, όταν συνδυάζονται, λειτουργούν ως μετατροπείς για να μετατρέψουν τις παρατηρούμενες αλλαγές των ιδιοτήτων σε ηλεκτρικό σήμα που καταγράφεται ως χρωματογράφημα. Ο αισθητήρας, που είναι το αρχικό συστατικό του ανιχνευτή, τοποθετείται όσο το δυνατόν πιο κοντά στην έξοδο της στήλης για να μεγιστοποιηθεί η ανίχνευση. Η δεύτερη είναι η ηλεκτρική συσκευή που απαιτείται για τη μετατροπή του αναλογικού σήματος σε ψηφιακή μορφή, ώστε ένας υπολογιστής να μπορεί να εξετάσει το χρωματογράφημα που έχει αποκτηθεί. Λόγω της εύκολης ευαισθησίας του αναλογικού σήματος σε διάφορα είδη παρεμβολών, ο λόγος σήματος προς θόρυβο αυξάνεται όσο πιο γρήγορα μετατρέπεται το αναλογικό σήμα σε ψηφιακό. (Saeed et al., 2021).

Ένας τέλειος ανιχνευτής GC θα είχε μια σειρά από ιδιότητες. Η πρώτη προϋπόθεση είναι να έχει αρκετή ευαισθησία ώστε να παρέχει σήμα υψηλής ανάλυσης για κάθε συστατικό του μείγματος. Ένα τέτοιο δείγμα θα είχε σχεδόν μηδενικό όγκο και ο ανιχνευτής θα απαιτούσε άπειρη ευαισθησία για να το ανιχνεύσει, επομένως πρόκειται προφανώς για έναν ιδεαλιστικό ισχυρισμό. Η ιδανική στήλη δεν πρέπει να μεταβάλλει το δείγμα με κανέναν τρόπο και να είναι χημικά αδρανής. Το εύρος θερμοκρασιών στο οποίο θα πρέπει να μπορούν να αντέχουν οι βελτιστοποιημένες στήλες είναι από 200 °C έως τουλάχιστον 400 °C. Ένας σύντομος γραμμικός χρόνος αντίδρασης που εκτείνεται σε πολλές τάξεις μεγέθους και είναι ανεξάρτητος από τον ρυθμό ροής θα υπάρχει επίσης σε μια τέτοια στήλη. Ο ανιχνευτής θα πρέπει επίσης να είναι αξιόπιστος και απλός στη χρήση (Saeed et al., 2021).



Εικόνα 15: Σχηματική απεικόνιση συστήματος αέριας χρωματογραφίας

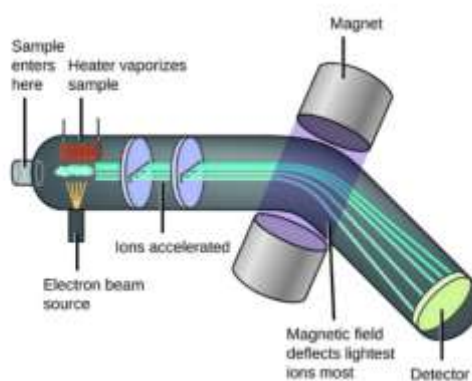
<https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/gas-chromatography-how-a-gas-chromatography-machine-works-how-to-read-a-chromatograph-and-gcxgc-335168>

## 2.2 Η φασματομετρία μάζας (MS)

### 2.2.1 Βασικές αρχές

Η φασματομετρία μάζας (MS) είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική οργάνων, με το πρώτο τέτοιο όργανο, γνωστό ως φασματογράφος παραβολής, να αναφέρεται το 1912. Έκτοτε, πολυάριθμες εξελίξεις και βελτιώσεις στην MS έχουν καταστήσει την τεχνική αυτή βασικό στοιχείο, αρχικά σε εργαστήρια πολλαπλώς ειδικοτήτων (Siegel & Saukko, 2013). Παράλληλα, η φασματομετρία μάζας μπορεί να συνδυαστεί με διαφορετικές τεχνικές διαχωρισμού ενώσεων, όπως για παράδειγμα η υγρή ή η αέρια χρωματογραφία.

Η MS βασίζεται στον ιονισμό και τον κατακερματισμό των μορίων του δείγματος στην αέρια φάση. Με δεδομένο πως κάθε μόριο εμφανίζει διαφορετικό πρότυπο κατακερματισμού, το προκύπτον πρότυπο των ιόντων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απόκτηση πληροφοριών σχετικά με τη δομή ενός συγκεκριμένου μορίου (Siegel & Saukko, 2013).



Εικόνα 16: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας της φασματομετρίας μάζας  
(<https://www.khanacademy.org/science/ap-chemistry-beta/x2eef969c74e0d802:atomic-structure-and-properties/x2eef969c74e0d802:mass-spectrometry-of-elements/a/isotopes-and-mass-spectrometry>)

### 2.2.2 Μέθοδοι ιονισμού στην MS

Υπάρχουν δύο κύριες τεχνικές για τον ιονισμό των βιομορίων: ο ιονισμός με ηλεκτροψεκάσμο (ESI), ο οποίος περιλαμβάνει την έκθεση υδατικών διαλυμάτων πρωτεϊνών σε ισχυρά ηλεκτρικά ρεύματα που εξαναγκάζουν τα υγρά σταγονίδια στην αέρια φάση και στη συνέχεια προκαλούν τη διόγκωση των μορίων και τη συσσώρευση φορτίων στις επιφάνειές τους και ο ιονισμός με λέιζερ υποβοηθούμενη από μήτρα (MALDI), ο οποίος εφαρμόζεται σε δείγματα πρωτεϊνών σε ξηρή κρυσταλλική μήτρα και τα εξατμίζει με τη χρήση παλμών λέιζερ (Olshina & Sharon, 2016).

### 2.2.3 Tandem MS

Η φασματομετρία μάζας tandem (TANDEM MS), κοινώς γνωστή ως MS/MS, είναι μια μέθοδος δύο βημάτων που χρησιμοποιείται για την ανάλυση ενός υλικού χρησιμοποιώντας δύο ή περισσότερους φασματογράφους μάζας συνδεδεμένους μεταξύ τους είτε έναν φασματογράφο μάζας αποτελούμενο από πολλούς αναλυτές διαδοχικά τοποθετημένους. Στη συσκευή TANDEM MS περιλαμβάνονται δύο ή τρία τετράπολα και ένας αναλυτής, ο οποίος υπολογίζει το χρόνο πτήσης (TOF) του ιονισμένου μορίου. Το είδος της ανάλυσης MS/MS που μπορεί να γίνει εξαρτάται από

το φασματόμετρο μάζας που είναι προσαρτημένο στην πηγή MALDI (Barh & Azevedo, 2017).

Για τη διερεύνηση πολύπλοκων μιγμάτων, η MS/MS, η οποία περιλαμβάνει δύο διαδικασίες MS, είναι πολύ χρήσιμη. Ένα προκαθορισμένο σύνολο ιόντων  $m/z$  εξάγεται από τα υπόλοιπα ιόντα από την πηγή ιόντων και κατακερματίζεται με χημική αντίδραση στο πρώτο βήμα του MS/MS. Για τα θραύσματα παράγονται φάσματα μάζας στο δεύτερο στάδιο (Barh & Azevedo, 2017).

### 2.3 Τεχνική ELISA

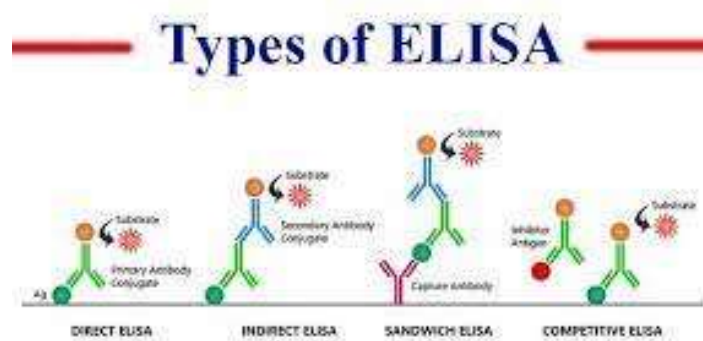
Η ενζυμικά συνδεδεμένη ανοσοδοκιμασία (ELISA) είναι μια ανοσοδοκιμασία με επισήμανση που θεωρείται το χρυσό πρότυπο των ανοσοδοκιμασιών. Αυτός ο ανοσολογικός έλεγχος χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση και τη μέτρηση ενώσεων όπως αντισώματα, αντιγόνα, πρωτεΐνες, γλυκοπρωτεΐνες και ορμόνες. Είναι εξαιρετικά ευαίσθητη. Τα αντισώματα και τα αντιγόνα συμπλέκονται για την ανίχνευση αυτών των ενώσεων και δημιουργούν ένα ποσοτικοποιήσιμο αποτέλεσμα. Το ανοσοποιητικό σύστημα ενός ατόμου δημιουργεί ένα συγκεκριμένο είδος πρωτεΐνης που ονομάζεται αντίσωμα. Αυτό το είδος πρωτεΐνης συνδέεται με αντιγόνα σε συγκεκριμένες θέσεις. Η πρόσδεση ενός αντισώματος σε ένα αντιγόνο, το οποίο μπορεί να είναι μια πρωτεΐνη από ξένη πηγή, πυροδοτεί μια σειρά αντιδράσεων στο ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού. Με μια μικρή μόνο ποσότητα δείγματος εξέτασης, αυτή η αλληλεπίδραση αξιοποιείται στις εξετάσεις ELISA για τον εντοπισμό ορισμένων πρωτεϊνικών αντισωμάτων και αντιγόνων (Alhajj & Farhana, 2022).

Η ELISA αποτελείται από 4 βασικά βήματα, τα οποία είναι τα παρακάτω (Alhajj & Farhana, 2022):

- Επικάλυψη της επιφάνειας, στην οποία θα πραγματοποιηθεί η αντίδραση (είτε με αντιγόνο είτε με αντίσωμα).
- Αποκλεισμός, ο οποίος πραγματοποιείται συνήθως με την προσθήκη αλβουμίνης ορού βοοειδών [BSA].
- Ανίχνευση σήματος.
- Τελική ανάγνωση των αποτελεσμάτων.

Με τη συμπερίληψη ενός υποστρώματος που μπορεί να δημιουργήσει χρώμα, πραγματοποιείται ανίχνευση. Τα υποστρώματα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην ανίχνευση ELISA είναι πολλά. Για την απομάκρυνση του μη δεσμευμένου υλικού, η πλάκα πλένεται με τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος, για παράδειγμα φυσιολογικός ορός ρυθμισμένος με φωσφορικά άλατα (PBS) και μη ιοντικό απορρυπαντικό, μεταξύ κάθε μιας από τις προαναφερθείσες τέσσερις διαδικασίες. Ανάλογα με την ακριβή μεθοδολογία που χρησιμοποιείται, τα φρεάτια καθαρίζονται δύο ή περισσότερες φορές κατά τη διάρκεια κάθε σταδίου πλύσης (Alhajj & Farhana, 2022). Οι 4 κύριοι τύποι της ELISA είναι οι παρακάτω:

- Άμεση ELISA
- Έμμεση ELISA
- ELISA σάντουιτς
- Ανταγωνιστική ELISA



Εικόνα 17: Οι 4 τύποι της ELISA (<https://blog.praxilabs.com/2021/09/20/elisa-principle/>)

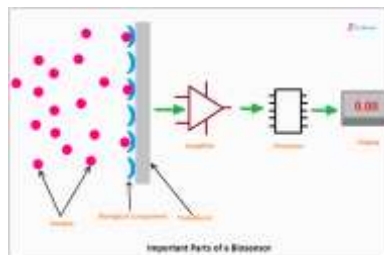
## 2.4 Βιοαισθητήρες

Ο βιοαισθητήρας είναι μια συσκευή που μετρά βιολογικές ή χημικές αντιδράσεις παράγοντας σήματα ανάλογα με τη συγκέντρωση ενός αναλύτη στην αντίδραση. Οι βιοαισθητήρες εμφανίζουν πολλαπλές εφαρμογές σε διαφορετικούς τομείς Ένας τυπικός βιοαισθητήρας αποτελείται από τα ακόλουθα στοιχεία (Bhalla et al, 2016):

- Αναλυτής, ο οποίος αποτελεί την υπό ανίχνευση ουσία. Για παράδειγμα, οι μυκοτοξίνες αποτελούν τον αναλυτή σε έναν βιοαισθητήρα που έχει σχεδιαστεί στοχευμένα για την ανίχνευση τους.

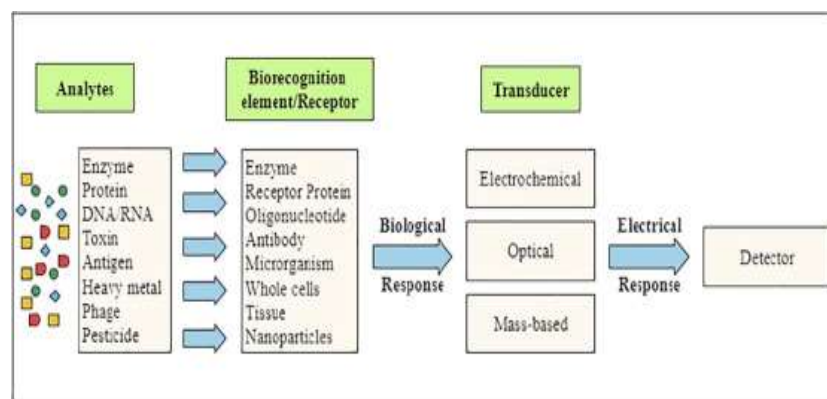


- Ένας βιοϋποδοχέας είναι ένα μόριο που αναγνωρίζει μοναδικά τον αναλύτη. Οι βιοϋποδοχείς περιλαμβάνουν στοιχεία όπως ένζυμα, κύτταρα, απταμερή, δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA) και αντισώματα. Η βιοαναγνώριση είναι η διαδικασία παραγωγής ενός σήματος (με τη μορφή φωτός, θερμότητας, pH, αλλαγής φορτίου ή μάζας κ.λπ.) όταν ο βιοϋποδοχέας αλληλεπιδρά με τον αναλύτη.
- Μετατροπέας: Ένα στοιχείο γνωστό ως μετατροπέας μετατρέπει ένα είδος ενέργειας σε άλλο. Η λειτουργία του μετατροπέα σε έναν βιοαισθητήρα είναι να μετατρέπει ένα γεγονός βιοανίχνευσης σε ποσοτικοποιήσιμο σήμα. Η πράξη της σηματοδότησης είναι η μετατροπή της ενέργειας. Η πλειονότητα των μετατροπέων παράγει οπτικά ή ηλεκτρικά σήματα, τα οποία είναι συνήθως ανάλογα με τον αριθμό των αλληλεπιδράσεων μεταξύ αναλυτή και βιοϋποδοχέα.
- Ηλεκτρονικό τμήμα είναι η περιοχή ενός βιοαισθητήρα που είναι υπεύθυνη για την επεξεργασία του μετατρεπόμενου σήματος και την προετοιμασία του για απεικόνιση. Αποτελείται από περίπλοκα ηλεκτρικά κυκλώματα που επεξεργάζονται τα σήματα ενισχύοντας και μετατρέποντάς τα από αναλογική σε ψηφιακή μορφή. Στη συνέχεια, η μονάδα απεικόνισης του βιοαισθητήρα ποσοτικοποιεί τα σήματα που έχουν υποστεί επεξεργασία.
- Η οθόνη αποτελείται από ένα σύστημα ερμηνείας από τον χρήστη που παράγει κατανοητούς αριθμούς ή καμπύλες, όπως ένας απευθείας εκτυπωτής ή η οθόνη υγρών κρυστάλλων ενός υπολογιστή. Αυτό το στοιχείο αποτελείται συχνά από ένα συνδυασμό υλικού και λογισμικού που παράγει τα αποτελέσματα του βιοαισθητήρα με τρόπο προσιτό. Ανάλογα με τις ανάγκες του τελικού χρήστη, το σήμα εξόδου στην οθόνη μπορεί να είναι αριθμητικό, γραφικό, σε μορφή πίνακα ή εικόνας.



Εικόνα 18: Σημαντικά μέρη ενός βιοαισθητήρα (<https://www.etechnog.com/2019/08/biosensor-applications-uses-examples.html>)

Οι τεχνικές μεταγωγής μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για την κατηγοριοποίηση των βιοαισθητήρων. Ένας μετατροπέας που μετατρέπει τη βιολογική αντίδραση του συνδυασμού αναλυτή-δέκτη σε ηλεκτρική απόκριση αποτελεί το συστατικό βιοαναγνώρισης των βιοαισθητήρων. Με απλά λόγια, οι μετατροπείς μεταβάλλουν την ενέργεια από τη μία μορφή στην άλλη προκειμένου να την καταστήσουν αναγνώσιμη και διδακτική. Τα τρία κύρια είδη μετατροπέων είναι οι οπτικές, οι ηλεκτροχημικές και οι τεχνικές ανίχνευσης με βάση τη μάζα. Αυτές διαχωρίζονται περαιτέρω σε διάφορες τεχνικές μετατροπής για την παρατήρηση των αλληλεπιδράσεων αναλυτή-υποδοχέα. (Chadha et al., 2022).



Εικόνα 19: Συστατικά στοιχεία βιοαισθητήρων (Chadha et al., 2022)

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3ο – ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΣΤΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ

### 3.1 Κύρια μέθοδος εκχύλισης (extraction) των μυκοτοξινών από το ελαιόλαδο

Το ελαιόλαδο αποτελεί ένα εμπορεύσιμο είδος με μία τιμή που διαμορφώνεται σε κάθε περίπτωση από την προσφορά και τη ζήτηση, καθώς επίσης, και από τα διάφορα ποιοτικά του χαρακτηριστικά. Ταυτόχρονα θεωρείται ότι αποτελεί μία πηγή ζωής και υγείας, αποτελώντας ένα πλούσιο φυσικό προϊόν με υψηλή βιολογική και θρεπτική αξία. Το συγκεκριμένο προϊόν μπορεί προσβληθεί από διάφορες επικίνδυνες για την ανθρώπινη υγεία ουσίες αλλά και από διάφορα ξένα σώματα, κατά τα ποικίλα στάδια της παραγωγής, του εξευγενισμού, αλλά και κατά τα στάδια της τυποποίησης και της εμπορίας του (Zinedine et al, 2007).

Κατά συνέπεια το ελαιόλαδο αποτελεί ένα βασικό είδος διατροφής με υψηλή βιολογική αξία και για τον λόγο αυτό οι κίνδυνοι που δημιουργούνται από τις μυκοτοξίνες καθιστούν αναγκαία την ανίχνευση τους στο ελαιόλαδο. Πρέπει να επισημανθεί ότι οι μυκοτοξίνες αποτελούν δευτερογενή μεταβολικά προϊόντα, τα οποία παράγονται από μούχλες και μύκητες με δηλητηριώδη επίδραση στα ζώα και στους ανθρώπους, ακόμη και αν εμφανίζονται σε μικρές ποσότητες. Οι περισσότεροι μελετητές υποστηρίζουν ότι τα πιο πολλά από τα είδη των μυκήτων παράγουν πάρα πολλές μυκοτοξίνες, των οποίων ο προσδιορισμός των χημικών δομών είναι πλήρης. Επίσης θεωρούν ότι οι ιδιότητες δηλητηρίασης των μυκοτοξινών διαφοροποιούνται με βάση τις σωματικές αντιστάσεις και τις λαμβανόμενες δόσεις. Παρόλα αυτά σε μερικές περιπτώσεις το ενδιαφέρον εστιάζεται στον καρκινογόνο χαρακτήρα τους (Zhang et al, 2021).

Στο πλαίσιο αυτό τα τελευταία χρόνια μετά την ανακάλυψη των διαφόρων αφλατοξινών σε αρκετές μελέτες παρουσιάζονται οι μέθοδοι ανάλυσης των μυκοτοξινών, παρόλο που εντοπίζονται αρκετά προβλήματα στη διαδικασία της ανίχνευσης τους. Παράλληλα υποστηρίζεται ότι η χημική δομή των μυκοτοξινών διαφοροποιείται ανάμεσα τους, καθώς εμφανίζουν διαφοροποιημένες χημικές και φυσικές ιδιότητες (Zinedine et al, 2007). Ταυτόχρονα σημαντικός θεωρείται ο σχεδιασμός των κατάλληλων διαδικασιών για την απομόνωση των ποικίλων ιχνών

μυκοτοξίνης στα τρόφιμα και πιο συγκεκριμένα στην περίπτωση του ελαιόλαδου. Αξίζει να σημειωθεί ότι για κάθε ομάδα μυκοτοξίνης αναγκαία είναι η εφαρμογή διαφορετικών διεργασιών εκχύλισης. Επιπλέον μία άλλη σημαντική δυσκολία μπορεί να θεωρηθεί ο ακανόνιστος διασκορπισμός των μυκοτοξινών στο ελαιόλαδο, επηρεάζοντας με τον τρόπο αυτό την ακρίβεια των αναλύσεων και επίσης απαιτώντας μεγάλο αριθμό δοκιμών (Vidal et al, 2019).

Η εκχύλιση και ο καθαρισμός των μυκοτοξινών από το ελαιόλαδο μπορεί να πραγματοποιηθεί με πολλαπλές διαφορετικές μεθόδους. Με τον τρόπο αυτό επιδιώκεται να περιοριστεί η παρεμπόδιση από τα διάφορα συστατικά της μήτρας αλλά ταυτόχρονα και να επιτευχθούν και τα πιο χαμηλά όρια ανίχνευσης. Η πιο σημαντική μέθοδος θεωρείται η εκχύλιση, η οποία αποτελεί μία απλή και παράλληλα φθηνή μέθοδο για την εκχύλιση, η οποία αποτελεί μία φθηνή μέθοδο για τον διαχωρισμό των διαφόρων μυκοτοξινών. Πρόκειται για μία μέθοδο, η οποία βασίζεται στη διαφορά της διαλυτότητας που εμφανίζει η τοξίνη μεταξύ της υδατικής ή της οργανικής φάσης ή στο μείγμα αυτών (Pater, 2018).

## **3.2 Μέθοδοι ανίχνευσης μυκοτοξινών στο ελαιόλαδο**

### **3.2.1 Χρωματογραφία λεπτής στριβάδας (TLC)**

Η πρώτη τεχνική που επιλέχτηκε να χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση των μυκοτοξινών μπορεί να θεωρηθεί η χρωματογραφία λεπτής στριβάδας (TLC). Πρόκειται ουσιαστικά για μία τεχνική, η οποία έχει διαδοθεί ευρέως εξαιτίας του απλού χαρακτήρα της, καθώς επίσης και επειδή με τη συγκεκριμένη τεχνική είναι εύκολος ο διαχωρισμός σχεδόν όλων των μυκοτοξινών (Sherma et al, 2018). Ως μειονέκτημα αυτής της μεθόδου μπορεί να θεωρηθεί ότι τα διάφορα παράγωγα των μυκοτοξινών είναι δύσκολο να διαχωριστούν αλλά παράλληλα και ότι εμφανίζει η μέθοδος αυτή μικρή επαναληψιμότητα κατά συνέπεια χαμηλή ακρίβεια. Η χρωματογραφία TLC αποτελεί ουσιαστικά μια αρκετά απλή μορφή χρωματογραφίας, η οποία μπορεί να θεωρηθεί ανάλογη της χρωματογραφίας χάρτου. Όμως χρησιμοποιείται ουσιαστικά μία λεπτή στριβάδα υλικού, η οποία βασίζεται πάνω σε λεία επιφάνεια, ενώ σημαντική θεωρείται η ικανότητα διαχωρισμού από τη χρωματογραφία χάρτου (Vidal et al, 2019). Αξίζει να σημειωθεί ότι ο λόγος της απόστασης που η κάθε ουσία έχει διανύσει προς τη διανυθείσα απόσταση από τον διαλύτη ( $R_f$ ), για την ύπαρξη κάθε συστήματος

υλικού προσρόφησης διαλύτη-θερμοκρασίας διακρίνεται για τη σταθερή φυσικότητά της (Quaraleh et al, 2015).

Παράλληλα θεωρείται ότι με την ανάπτυξη ενός χρωματογραφήματος, μπορούν να εκτιμηθούν και οι ουσίες, οι οποίες έχουν διαχωριστεί. Προσεγγίζεται πέρα από αυτά και ως ένα σύνθετο φαινόμενο, επειδή στα διάφορα πειράματα διαφοροποιούνται ελάχιστα κάποιες συνθήκες, έχοντας όμως μεγάλη επιρροή στο  $R_f$  και μαζί με το δείγμα εμφανίζονται διάφορες πρότυπες ουσίες. Μετά την ανάπτυξη του χρωματογραφήματος, η μετακίνηση των προς διερεύνηση ουσιών συγκρίνεται με την μετακίνηση ενός προτύπου της συγκεκριμένης ουσίας. Με τον τρόπο αυτό διασφαλίζεται πως η μετακίνηση της ουσίας αυτής δεν έχει επηρεαστεί από τις συγκριμένες συνθήκες, οι οποίες επικρατούν κατά την διάρκεια της μέτρησης και οι τιμές του  $R_f$  είναι συγκρίσιμες μεταξύ τους. (Vidal et al, 2019).

### **3.2.2 Μέθοδος ELISA και άλλες ανοσολογικές μέθοδοι**

Τα τελευταία χρόνια, οι ερευνητές χρησιμοποιούν πολλές φορές διάφορες ανοσοχημικές μεθόδους για τον προσδιορισμό μυκοτοξινών στα τρόφιμα πέρα από την αξιοποίηση παραδοσιακών χρωματογραφικών τεχνικών. Αξίζει να σημειωθεί ότι ως πυρήνας της ανοσοχημείας μπορεί να θεωρηθεί η ειδική αλληλεπίδραση μεταξύ ανοσοσφαιρίνης (Igs) και αντιγόνου (Ag). Επίσης οι ανοσοχημικές μέθοδοι τα τελευταία χρόνια αποτελούν σημαντικό πεδίο μελέτης και εφαρμογής ως προς ανίχνευση μυκοτοξινών σε διαφορετικά βρώσιμα φυτικά έλαια, με πιο χαρακτηριστικές την ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία (ELISA) αλλά και τους βιοαισθητήρες που βασίζονται στην ανοσοδοκιμασία (Pundir et al, 2017).

Στο πλαίσιο αυτό μια τεχνική, η οποία θεωρείται ότι μπορεί να εφαρμοστεί μελλοντικά είναι η ενζυματική ανοσοδιάγνωση (enzyme linked immunoassay, ELISA), η οποία επιλέγεται να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση και στη συνέχεια για τον ποσοτικό προσδιορισμό ποικίλων μυκοτοξινών. Όπως επισημαίνεται, οι ενζυματικές ανοσοδιαγνωστικές τεχνικές μπορούν να διευκολύνουν την υλοποίηση μελετών, οι οποίες αναφέρονται στη δυσκολία απομάκρυνσης των μυκοτοξινών από το σύστημα τους. Πιο συγκεκριμένα η μέθοδος ELISA επιλέγεται να χρησιμοποιηθεί ως ένα διαγνωστικό εργαλείο στον τομέα της ιατρικής και στον τομέα της παθολογίας των φυτών, αλλά σε αρκετές περιπτώσεις και στον τομέα του ποιοτικού ελέγχου σε διάφορες βιομηχανίες. Επιχειρώντας ταυτόχρονα και την ανίχνευση της εμφάνισης του

αντιγόνου, αρχικά ιδιαίτερη αναφορά πρέπει να γίνει στη σύνδεση αντιγόνων από το δείγμα με μία επιφάνεια (Lin & Shen, 2020).

Μετά από αυτή τη διαδικασία ακολουθεί ένα άλλο ειδικό αντίσωμα, το οποίο εφαρμόζεται πάνω στην επιφάνεια, προκειμένου να μπορεί να συσχετισθεί με το αντιγόνο. Το συγκεκριμένο αντίσωμα στη συνέχεια συνδέεται με ένα ένζυμο, και στο τελικό άκρο εμφανής είναι η προσθήκη μίας ουσίας, στην οποία περιέχεται το υπόστρωμα του ενζύμου. Αξίζει να σημειωθεί ότι η επακόλουθη αντίδραση οδηγεί στην παραγωγή ενός ανιχνεύσιμου σήματος και τις περισσότερες φορές σε μία αλλαγή χρώματος στο υπόστρωμα (Wang et al, 2019).

Για να γίνει η ELISA είναι απαραίτητη η χρήση τουλάχιστον ενός αντισώματος το οποίο εμφανίζει εξειδίκευση για ένα συγκεκριμένο αντιγόνο. Σημαντική θεωρείται ταυτόχρονα η ακινητοποίηση του δείγματος με μια άγνωστη ποσότητα αντιγόνου σε ένα στερεό υπόστρωμα, η οποία μπορεί να είναι είτε ειδική είτε μη ειδική. Με την ακινητοποίηση αυτή αυξάνεται η αποτελεσματικότητα και η ειδικότητα της σύνδεσης του αντιγόνου με το αντίσωμα (Monson et al, 2015). Επιπλέον, θα πρέπει να αναφερθεί ότι το αντίσωμα ανίχνευσης μπορεί να συνδεθεί με ομοιοπολικό τρόπο με ένα ένζυμο, ή μπορεί σε ορισμένες περιπτώσεις να συνδεθεί με ένα δευτερεύον αντίσωμα το οποία στην συνέχεια συνδέεται με ένα ένζυμο μέσω βιοσύζευξης. Ανάμεσα σε κάθε στάδιο η πλάκα πλένεται με ένα ήπιο διάλυμα απορρυπαντικού, έτσι ώστε να απομακρυνθούν ενδεχόμενες πρωτεΐνες ή αντισώματα τα οποία δεσμεύονται μη ειδικά στα μόρια στόχους. Στη συνέχεια και μετά το τελικό στάδιο πλύσης, εμφανίζεται η ανάπτυξη της πλάκας από την προσθήκη ενός ενζυματικού υποστρώματος για την παραγωγή ενός ορατού σήματος, μέσω του οποίου υποδεικνύεται η ποσότητα του αντιγόνου στο δείγμα (Wang et al, 2019).

Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική για την ανίχνευση μυκοτοξινών είναι γενικά η ELISA. Η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε εξαιτίας των ιδιαίτερων ανοσολογικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ Igs και Ag με το προς ανίχνευση προϊόν. Για την ανίχνευση των μυκοτοξινών χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο αντισώματα, τα οποία είναι επισημασμένα με διαφορετικά ένζυμα (Monson et al, 2015).

Παρόλο που η ELISA θεωρείται μία καλά ανεπτυγμένη μέθοδος και χρησιμοποιείται ευρέως στους τομείς της ανάλυσης τροφίμων, της κλινικής πρακτικής αλλά και της βιοτεχνολογίας, εξακολουθεί να έχει αρκετές ελλείψεις, όπως η υπερβολική εξάρτηση

από τη μήτρα που προκαλείται από την αλληλεπίδραση μεταξύ του αντιγόνου-στόχου και των συστατικών της μήτρας. Η τυποποιημένη ELISA αποτελείται από τα παρακάτω τέσσερα κύρια μέρη (Wang et al, 2019):

- ανοσοαναγνωριστικό στοιχείο
- απορροφητικό υπόστρωμα
- ενζυμική σήμανση και
- χρωμογόνο αντιδραστήριο

Η απόδοση ενός από τα μέρη της ή της πλήρους ELISA έχει πρόσφατα βελτιωθεί από ερευνητές που χρησιμοποιούν τη διασταυρούμενη συγχώνευση διαφόρων τεχνολογιών, ιδίως όσον αφορά την ευαισθησία, την ακρίβεια και τη σταθερότητα. Θα πρέπει να τονιστεί ότι η επινοηθείσα μέθοδος παρουσιάζει ξεχωριστή ικανότητα ταυτοποίησης και έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στην ανίχνευση μυκοτοξινών λόγω της υψηλής μοναδικότητας της ELISA. Όπως επισημάνθηκε εξαιτίας της ακρίβειας, της ταχύτητας καθώς επίσης και άλλων πλεονεκτημάτων θεωρείται σημαντική η χρήση της. Για την πραγματική ανίχνευση άλλων επιβλαβών ουσιών, όπως AFB1, AFB2, AFG1 και AFG2, σε διάφορα βρώσιμα έλαια, η ELISA έχει εμφανίσει ικανοποιητικά αποτελέσματα και η συγκέντρωση ανίχνευσης βρέθηκε πιο χαμηλή από το νομοθετικό όριο (Kumar et al, 2021).

Στο πλαίσιο αυτό οι ερευνητές ανέπτυξαν έναν εμπορικό μηχανισμό ELISA, που θεωρείται ότι μπορεί να ανιχνεύσει την AFB1, το οποίο μπορεί να εφαρμοστεί σε διάφορα δείγματα, συμπεριλαμβανομένου του βρώσιμου ελαίου. Επιπλέον, αναφέρεται ότι το όριο ανίχνευσης μπορεί να είναι μόνο 3 ppb. Παρόλο που η μέθοδος ELISA που χρησιμοποιείται σήμερα εξακολουθεί να εμφανίζει ορισμένα μειονεκτήματα σε σύγκριση με τις υπόλοιπες μεθόδους ανίχνευσης με τα κυριότερα να είναι το υψηλό κόστος και ο μεγάλος χρόνος επεξεργασίας του δείγματος (Monson et al, 2015).

### **3.2.3 Ηλεκτροχημική τεχνολογία βιοανίχνευσης**

Λόγω της ταχύτητας, του μικρού αποτυπώματος, της ευαισθησίας, της οικονομίας και των μοναδικών δυνατοτήτων, οι συσκευές ηλεκτροχημικής βιοανίχνευσης θεωρούνται ιδιαίτερα σημαντικές στην αξιολόγηση της ποιότητας των τροφίμων, κατά κύριο λόγο, αντικατοπτρίζοντας τα επίπεδα AFB1 σε δείγματα τροφίμων. Ο ηλεκτροχημικός

βιοαισθητήρας AFB1 θεωρείται ότι μπορεί να παράγει διάφορους τύπους αναλυτικών σημάτων, όπως είναι η τάση, το ρεύμα και σε αρκετές περιπτώσεις η σύνθετη αντίσταση. Ως πιο συνηθισμένες μέθοδοι μεταγωγής είναι οι εξής (Pundir et al, 2021):

- η αμπερομετρική
- η ηλεκτροχημική φασματοσκοπία σύνθετης αντίστασης (EIS)
- η βολταμετρία (ποτενσιομετρία)

Ιδιαίτερη αναφορά πρέπει να γίνει στους λεγόμενους αμπερομετρικούς βιοαισθητήρες, οι οποίοι αποτελούν μία ηλεκτροχημική συσκευή. Η συγκεκριμένη συσκευή διακρίνεται για την υψηλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα, λαμβάνοντας τη μεταβολή του ρεύματος μέτρησης ως ένα σήμα ανάλυσης (Kumar et al, 2017).

Επειδή η μεταβολή του ρεύματος μπορεί να συσχετισθεί στενά με τη συγκέντρωση της AFB1 σε δείγματα τροφίμων και παράλληλα η επίτευξη της μεταβολής μπορεί να γίνει με τη διατήρηση ενός σταθερού δυναμικού, υποστηρίζεται ότι η ύπαρξη ενός αμπερομετρικού βιοαισθητήρα μπορεί να θεωρηθεί ότι είναι τέλεια. Σε γενικές γραμμές ένας τυπικός αμπερομετρικός βιοαισθητήρας αποτελείται από δύο ή τρία ηλεκτρόδια συστήματα και στη συνέχεια η αναλυτική απόδοση του τελευταίου εμφανίζεται σημαντικά πιο υψηλή από εκείνη των πρώτων (Wang et al, 2019).

Πιο συγκεκριμένα, το πρόσθετο ηλεκτρόδιο, το οποίο υπάρχει στον αισθητήρα, αυξάνει το εμβαδόν της επιφάνειας ανίχνευσης, με αποτέλεσμα να αυξάνεται τόσο το ρεύμα που ρέει μεταξύ του βοηθητικού και του λειτουργικού ηλεκτροδίου, όσο και το δυναμικό λειτουργίας μεταξύ του λειτουργικού ηλεκτροδίου και του ηλεκτροδίου αναφοράς. Ως αποτέλεσμα της δυναμικής αυτής των ηλεκτροδίων, αυξάνεται η ικανότητα ανίχνευσης των μυκοτοξινών στα τρόφιμα. Εναλλακτικά, το σύστημα διπλού ηλεκτροδίου δεν διαθέτει βοηθητικά ηλεκτρόδια, τα οποία σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να πάψουν να λειτουργούν κατά την έκθεση τους σε υψηλές θερμοκρασίες. Επομένως, φαίνεται ότι για την εξέταση της ποιότητας των δειγμάτων τροφίμων δεν απαιτούνται αμπερομετρικοί βιοαισθητήρες με συστήματα διπλού ηλεκτροδίου (Pundir et al, 2019).

Επιπλέον ενδιαφέρον παρουσιάζει η αξιοποίηση της φασματοσκοπίας σύνθετης αντίστασης (EIS). Ειδικότερα υποστηρίζεται ότι αποτελεί ένα αποτελεσματικό εργαλείο της τεχνολογίας παρακολούθησης για τον εντοπισμό και την παρακολούθηση



των μεταβολών των μυκοτοξινών στη διεπιφάνεια ανάμεσα στις τροποποιήσεις της επιφάνειας του ηλεκτροδίου. Όταν ο αναλύτης-στόχος συνδυάζεται με ένα βιομετρικό στοιχείο, στην περίπτωση αυτή θεωρείται ότι μπορεί να δημιουργηθεί μία ηλεκτροχημική απόκριση μεταβάλλοντας την αγωγιμότητα και τη χωρητικότητα μέσω ενός βιοαισθητήρα σύνθετης αντίστασης (Wang et al, 2019)

Οι συγκεκριμένοι βιοαισθητήρες παρακολουθούν τις μεταβολές της σύνθετης αντίστασης που προκαλούνται από την αλληλεπίδραση ανάμεσα στο αντικείμενο ανίχνευσης στόχου, όπως η AFB1, και του βιομετρικού στοιχείου, το οποίο μπορεί να στερεωθεί στο ηλεκτρόδιο εργασίας, εμφανίζοντας ταυτόχρονα αποτελέσματα ανίχνευσης με τη μορφή αλλαγής ροής ηλεκτρονίων στο ηλεκτρόδιο εργασίας. Επιπλέον, φαίνεται ότι οι τυπικοί ποτενσιομετρικοί αισθητήρες είναι ικανοί να λειτουργήσουν και σε ένα σύστημα τριών ηλεκτροδίων. Για πολλούς ερευνητές που διερευνούν μεθόδους ανίχνευσης μυκοτοξινών η συγκεκριμένη μέθοδος έχει προκαλέσει έντονο επιστημονικό ενδιαφέρον. Ταυτόχρονα οι βιοαισθητήρες σύνθετης αντίστασης σύμφωνα με τη συγκεκριμένη πρακτική έχουν επιτύχει αρκετά ικανοποιητικά αποτελέσματα ως προς την ανίχνευση μυκοτοξινών στα τρόφιμα και έχουν μεγάλες δυνατότητες για πρακτική εφαρμογή στα διάφορα βρώσιμα έλαια (Pundir et al, 2019).

Οι βολταμετρικοί βιοαισθητήρες θεωρούνται σημαντικοί από πολλούς επιστήμονες επειδή μπορούν να αντιμετωπίσουν το πρόβλημα της λήψης αναλυτικών δεδομένων με τη χρήση ιοντοεκλεκτικών ηλεκτροδίων. Η χρήση τους απαιτεί τη χρήση μιας συσκευής δύο ή τριών ηλεκτροδίων, όπως ακριβώς και οι αμπερομετρικοί βιοαισθητήρες. Μπορεί να προσδιορίσει τους αναλυτές-στόχους, όπως το AFB1 σε δείγματα τροφίμων, ενώ το ρεύμα είναι σταθερό, αξιολογώντας τη μετατόπιση του δυναμικού του κυκλώματος μεταξύ του ηλεκτροδίου εργασίας και του ηλεκτροδίου αναφοράς. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι οι βιοαισθητήρες μπορούν να προσδιορίσουν αποτελεσματικά την παρουσία AFB1 σε βρώσιμα έλαια (Wang et al, 2019).

#### **3.2.4 HPLC και LC-MS/MS**

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής επίδοσης είναι μια επίσημη μέθοδος ανίχνευσης μυκοτοξινών. Ένα χαρακτηριστικό της HPLC είναι ότι μπορεί να προσδιορίσει πολλές μυκοτοξίνες με υψηλή ευαισθησία (Turner et al., 2015). Τα τελευταία χρόνια, οι ερευνητές έχουν αναπτύξει νέες διαδικασίες ανίχνευσης που συνδυάζουν την HPLC με

άλλους ανιχνευτές, όπως ο ανιχνευτής φθορισμού (FLD), ο ανιχνευτής υπεριώδους (UV), ο ανιχνευτής με διάταξη συστοιχίας διόδων και η φασματομετρία μάζας (MS). Τεχνικές, όπως είναι η FLD αξιοποιούν την φυσική ιδιότητα που έχουν διαφορετικές μυκοτοξίνες, να φθορίζουν. Ειδικότερα, οι αφλατοξίνες εμφανίζουν μέγιστο απορρόφησης σε μήκος κύματος 360nm (Singh & Mehta, 2020).

Σε σύγκριση με την κλασσική HPLC, αυτό βελτιώνει περαιτέρω την αξιοπιστία, την ευαισθησία και την ακρίβεια προσδιορισμού των αναλυτών-στόχων και χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση επιβλαβών ουσιών στα τρόφιμα. Αυτή η μέθοδος παρουσιάζει μεγάλη ακρίβεια για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό διαφόρων μυκοτοξινών με μεγάλη εκλεκτικότητα και ευαισθησία σε μία μόνο εκτέλεση. Γενικά, η HPLC σε συνδυασμό με FLD θεωρείται η πιο συνηθισμένη τεχνική που χρησιμοποιείται στην ανίχνευση μυκοτοξινών στο ελαιόλαδο (Yin et al., 2022).

Ο συνδυασμός της HPLC με FLD έχει χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά για την ανίχνευση διαφορετικών μυκοτοξινών στο ελαιόλαδο, όπως είναι η OTA (Papachristou & Markaki, 2004), τα διάφορα είδη αφλατοξινών (Afzali et al., 2012), ή η συνδυασμένη παρουσία αυτών στο ελαιόλαδο (Ferracane et al., 2007).

Οι Hidalgo-Ruiz et al (2019) προσδιόρισαν τις μυκοτοξίνες ( $\alpha$ -ζεαραλενόλη και ZEA, AFB1, AFB2, AFG1 και AFG2) σε 194 δείγματα καλαμποκέλαιου, ελαιολάδου, σογιέλαιου και ηλιέλαιου χρησιμοποιώντας UHPLC-QqQ-MS/MS και QuEChERS. Τα αποτελέσματα αποκάλυψαν ότι το όριο ποσοτικού προσδιορισμού ήταν 0,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  για τις AFs και 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  για τη ZEA και την  $\alpha$ -ZEA και οι ανακτήσεις κυμαίνονταν από 80 έως 120% (Hidalgo-Ruiz et al., 2019). Επιπλέον, η μέθοδος αυτή μπορεί να συνδυαστεί και με ανιχνευτές φθορισμού για την ανίχνευση OTA στο ελαιόλαδο, με ελάχιστο όριο τα 0,24 $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Ye et al., 2019).

Τα τελευταία χρόνια, η μέθοδος υγρής χρωματογραφίας-ταυτόχρονης φασματομετρίας μάζας (LC-MS-MS) χρησιμοποιείται σταδιακά για την ανάλυση μυκοτοξινών με εξαιρετική ευαισθησία και εκλεκτικότητα σε διάφορα φυτικά έλαια, μεταξύ των οποίων είναι και το ελαιόλαδο. Η μέθοδος αυτή εμφανίζει θετικά αποτελέσματα στην πλειοψηφία των εδώδιμων ελαίων, δεν απαιτεί περαιτέρω στάδια καθαρισμού και εμφανίζει υψηλή ευαισθησία (Abdolmaleki et al., 2021). Σε σύγκριση με την τεχνική LC-MS/MS η HPLC εμφανίζει μεγαλύτερη ακρίβεια και ευαισθησία ανίχνευσης.

Ωστόσο, εμφανίζει ιδιαίτερα πιο υψηλό κόστος, ενώ απαιτείται και πιο εκταταμένη εκπαίδευση για την λειτουργία της (Nabizadeh et al., 2015).

#### **3.2.4 Αέρια χρωματογραφία**

Η μέθοδος αυτή υποστηρίζεται ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο για μερικές από τις μυκοτοξίνες. Η αεριοχρωματογραφία υποστηρίζεται ότι αποτελεί την τεχνική, η οποία χρησιμοποιείται περισσότερο από οποιαδήποτε άλλη γνωστή τεχνική στην ανάλυση των διαφόρων μιγμάτων πτητικών οργανικών ενώσεων. Σημαντική θεωρείται η χρησιμοποίησή της για τον διαχωρισμό και στη συνέχεια για την ταυτοποίηση και παράλληλα την ανάλυση όλων σχεδόν των αερίων και πτητικών υγρών μιγμάτων. Τέλος θεωρείται ότι η γρήγορη ανάπτυξη της αέριας χρωματογραφίας αποτελεί μία απλή και χαμηλού κόστους τεχνική (Kumar et al, 2017).

Τα κυριότερα προβλήματα που σχετίζονται με την ανάλυση GC για την ανίχνευση μυκοτοξινών είναι τα εξής: μη γραμμικότητα των καμπυλών βαθμονόμησης, ιδιότητες υπενθύμισης από προηγούμενα δείγματα, αποκλίσεις που παρασύρονται, ασθενείς ομάδες φθορισμού και απορρόφησης, μπλοκάρισμα της στήλης και κίνδυνος μόλυνσης σε σύγκριση με τις μεθόδους HPLC και LC. Επιπλέον, διάφορες μυκοτοξίνες δεν είναι πτητικές και συνεπώς δεν μπορούν να αναλυθούν με τη χρήση GC (Singh & Mehta, 2020).

Ωστόσο, έχουν αναπτυχθεί και μέθοδοι ανίχνευσης μυκοτοξινών με την χρήση αέριας χρωματογραφίας και φαρματομετρίας μάζας τριπλού τετράπολου (GC-QqQ MS) σε εδώδιμα έλαια (Quian et al., 2015).

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα εργασία αποτελεί μία ανασκόπηση της βιβλιογραφίας σχετικά με τα ζητήματα, τα οποία σχετίζονται με την ανίχνευση των μυκοτοξινών στο ελαιόλαδο. Το ελαιόλαδο αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά συστατικά της διατροφής των ανθρώπων στην περιοχή της Μεσογείου και εμφανίζει υπέρτερα διατροφικά χαρακτηριστικά και πολλαπλά οφέλη για την υγεία. Οι μυκοτοξίνες αποτελούν μία ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών, οι οποίοι παράγονται από διαφορετικά είδη μυκήτων. Η παρουσία τους σχετίζεται με την εμφάνιση πολλαπλών προβλημάτων υγείας και με έντονη τοξικότητα.

Μεταξύ των τροφίμων στα οποία μπορεί να εμφανιστούν οι μυκοτοξίνες συμπεριλαμβάνεται και το ελαιόλαδο. Η ανίχνευση των μυκοτοξινών στο ελαιόλαδο μπορεί να πραγματοποιηθεί με διαφορετικές αναλυτικές μεθόδους. Οι μέθοδοι αυτοί μπορεί να αφορούν τεχνικές χρωματογραφίας, με κυριότερη την HPLC και διάφορες παραλλαγές της, την ELISA και άλλες ανοσολογικές τεχνικές, καθώς και την χρήση βιοαισθητήρων. Αυτή τη στιγμή, η HPLC και οι ELISA αποτελούν τις δύο πιο κοινές τεχνικές που χρησιμοποιούνται σε εμπορικό και εργαστηριακό επίπεδο. Επιπλέον, ιδιαίτερη εφαρμογή φαίνεται πως μπορεί να βρει και η τεχνική της LC-MS/MS. Ιδιαίτερα κατά την εφαρμογή των τεχνικών χρωματογραφίας, σημαντικός παράγοντας για την ανίχνευση των μυκοτοξινών είναι η ικανότητα φθορισμού που διαθέτουν. Παράλληλα, παραιτείται η συνεχής ανάπτυξη παραλλαγών των υπάρχουσών τεχνικών, οι οποίες μπορούν να ανιχνεύσουν τις μυκοτοξίνες και μεγαλύτερη ακρίβεια και ευαισθησία.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abdolmaleki, K., Khedri, S., Alizadeh, L., Javanmardi, F., De Oliveira, C. a. F., & Bandosz, T. J. (2021). The mycotoxins in edible oils: An overview of prevalence, concentration, toxicity, detection and decontamination techniques. *Trends in Food Science and Technology*, *115*, 500–511. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.06.057>
- Abdu Hussen, A. (2022). High-Performance Liquid Chromatography (HPLC): A review. *Annals of Advances in Chemistry*, *6*(1), 010–020. <https://doi.org/10.29328/journal.aac.1001026>
- Abrunhosa, L., Morales, H., Soares, C., Calado, T., Vila-Chã, A. S., Pereira, M., & Venâncio, A. (2014). A Review of Mycotoxins in Food and Feed Products in Portugal and Estimation of Probable Daily Intakes. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *56*(2), 249–265. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.720619>
- Afzali, D., Ghanbarian, M., Mostafavi, A., Shamspur, T., & Ghaseminezhad, S. M. (2012). A novel method for high preconcentration of ultra trace amounts of B1, B2, G1 and G2 aflatoxins in edible oils by dispersive liquid–liquid microextraction after immunoaffinity column clean-up. *Journal of Chromatography A*, *1247*, 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.05.051>
- Alhaji, M., & Farhana, A. (2022). Enzyme Linked Immunosorbent Assay. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Alshannaq, A., & Yu, J. H. (2017). Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food. *International journal of environmental research and public health*, *14*(6), 632. <https://doi.org/10.3390/ijerph14060632>
- Agriopoulou, S., Stamatelopoulou, E., & Varzakas, T. (2020). Advances in Occurrence, Importance, and Mycotoxin Control Strategies: Prevention and Detoxification in Foods. *Foods (Basel, Switzerland)*, *9*(2), 137. <https://doi.org/10.3390/foods9020137>
- Almoselhy, Rania I.M., A Comprehensive Review of Characterization and Detection of Adulteration of Extra Virgin Olive Oil (2020). American Research Journal of Agriculture, Available at SSRN: <https://ssrn.com/abstract=3908533>

- Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N., & Estrela, P. (2016). Introduction to biosensors. *Essays in biochemistry*, 60(1), 1–8. <https://doi.org/10.1042/EBC20150001>
- Bavaro, S. L., Susca, A., Frisvad, J. C., Tufariello, M., Chytiri, A., Perrone, G., Mita, G., Logrieco, A. F., & Bleve, G. (2017). Isolation, Characterization, and Selection of Molds Associated to Fermented Black Table Olives. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01356>
- Bennett J. W. (1987). Mycotoxins, mycotoxicoses, mycotoxicology and Mycopathologia. *Mycopathologia*, 100(1), 3–5. <https://doi.org/10.1007/BF00769561>
- Boskou D. 2006. Olive oil – Chemistry and technology. AOCS Press. <https://doi.org/10.1159/000097916>
- Buchberger, A. R., DeLaney, K., Johnson, J., & Li, L. (2018). Mass Spectrometry Imaging: A Review of Emerging Advancements and Future Insights. *Analytical chemistry*, 90(1), 240–265. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04733>
- Caloni, F., Fossati, P., Anadón, A., & Bertero, A. (2020). Beauvericin: The beauty and the beast. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 75, 103349. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103349>
- Cavaliere, C., Foglia, P., Samperi, R., & Laganà, A. (2010). *Determination of Aflatoxins and Ochratoxin A in Olive Oil. Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*, 645–652. doi:10.1016/b978-0-12-374420-3.00069-3
- Chadha, U., Bhardwaj, P., Agarwal, R., Rawat, P., Agarwal, R., Gupta, I., Panjwani, M., Singh, S., Ahuja, C., Selvaraj, S. K., Banavoth, M., Sonar, P., Badoni, B., & Chakravorty, A. (2022). Recent progress and growth in biosensors technology: A critical review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 109, 21–51. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2022.02.010>
- Chen, J., Wen, J., Tang, Y., Shi, J., Mu, G., Yan, R., Cai, J., & Long, M. (2021). Research Progress on Fumonisin B1 Contamination and Toxicity: A Review. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(17), 5238. <https://doi.org/10.3390/molecules26175238>
- Chliyeh, M., Achbani, E. H., Rhimini, Y., Selmaoui, K., Filali-Maltouf, A., Modafar, C. E., Moukhli, A., Benkirane, R., Douira, A., De Biotechnologie, L., & Jo, A. (2014).

Pathogenicity of four Fungal Species on Fruits and Leaves of the Olive Tree ( *Olea Europaea* L.). *International Journal of Pure and Applied Bioscience*.

Coskun O. (2016). Separation techniques: Chromatography. *Northern clinics of Istanbul*, 3(2), 156–160. <https://doi.org/10.14744/nci.2016.32757>

Dabuo, B., Wesome Avogo, E., Owusu Koomson, G., Akantibila, M., & Ayendo Gbati, D. (2022). Aflatoxins: Toxicity, Occurrences and Chronic Exposure. Aflatoxins - Occurrence, Detection and Novel Detoxification Strategies. doi: 10.5772/intechopen.105723

Denli M. (2015) Implications Of Mycotoxins In Livestock Feeds, Conference: Agriculture for Life, Life For Agriculture Conference At: Bucharest

El Haouhay, N., Samaniego-Sánchez, C., Asehraou, A., Villalón-Mir, M., & López-García De La Serrana, H. (2014). Microbiological characterization of Picholine variety olives and analysis of olive oil produced in traditional oil mills in Morocco. *CyTA - Journal of Food*, 13(1), 107–115. <https://doi.org/10.1080/19476337.2014.918178>

Eiceman, G. A., Gardea-Torresdey, J., Overton, E., Carney, K., & Dorman, F. (2002). Gas Chromatography. *Analytical Chemistry*, 74(12), 2771–2780. <https://doi.org/10.1021/ac020210p>

El Khoury, A., & Atoui, A. (2010). Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status. *Toxins*, 2(4), 461–493. <https://doi.org/10.3390/toxins2040461>

El-Sayed, R. A., Jebur, A. B., Kang, W., & El-Demerdash, F. M. (2022). An overview on the major mycotoxins in food products: characteristics, toxicity, and analysis. *Journal of Future Foods*, 2(2), 91–102. <https://doi.org/10.1016/j.jfutfo.2022.03.002>

El Yamani, M., Sakar, E. H., Boussakouran, A., & Rharrabti, Y. (2022). Effect of storage time and conditions on the quality characteristics of ‘Moroccan Picholine’ olive oil. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 39, 102244. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102244>

Escudero, A., Ramos, N., La Rubia, M. D., & Pacheco, R. (2016). Influence of Extreme Storage Conditions on Extra Virgin Olive Oil Parameters: Traceability Study. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2016, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2016/7506807>

Ferracane, R., Tafuri, A., Logieco, A., Galvano, F., Balzano, D., & Ritieni, A. (2007). Simultaneous determination of aflatoxin B1 and ochratoxin A and their natural occurrence in Mediterranean virgin olive oil. *Food additives and contaminants*, 24(2), 173–180. <https://doi.org/10.1080/02652030600986040>

Ghanbari Shendi, E., Sivri Ozay, D., Ozkaya, M. T., & Ustunel, N. F. (2020). Determination of chemical parameters and storage stability of extra virgin olive oil extracted by Mobile Olive Oil Processing Unit. *OCL*, 27, 6. <https://doi.org/10.1051/ocl/2020002>

Hamdi, M., Bejaoui, H., Sá-Morais, J., & Rodrigues, P. (2021). Ecophysiology of *Penicillium expansum* and patulin production in synthetic and olive-based media. *Fungal Biology*, 125(2), 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.08.005>

Han, X., Xu, W., Zhang, J., Xu, J., & Li, F. (2019). Co-Occurrence of Beauvericin and Enniatins in Edible Vegetable Oil Samples, China. *Toxins*, 11(2), 100. <https://doi.org/10.3390/toxins11020100>

Haque, M. A., Wang, Y., Shen, Z., Li, X., Saleemi, M. K., & He, C. (2020). Mycotoxin contamination and control strategy in human, domestic animal and poultry: A review. *Microbial Pathogenesis*, 142, 104095. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104095>

Hidalgo-Ruiz, J. L., Romero-González, R., Martínez Vidal, J. L., & Garrido Frenich, A. (2019). A rapid method for the determination of mycotoxins in edible vegetable oils by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 288, 22–28. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.003>

Ioi, J., Zhou, T., Tsao, R., & F. Marcone, M. (2017). Mitigation of Patulin in Fresh and Processed Foods and Beverages. *Toxins*, 9(5), 157. <https://doi.org/10.3390/toxins9050157>

Ioanna Kountouri & Prodromos Prodromidis, 2017. "Estimating Household Demand for Olive Oil in Greece," *South-Eastern Europe Journal of Economics*, Association of Economic Universities of South and Eastern Europe and the Black Sea Region, vol. 15(1), pages 33-45. <https://ideas.repec.org/a/seb/journal/v15y2017i1p33-45.html>

Junsai, T., Poapolathep, S., Sutjarit, S., Giorgi, M., Zhang, Z., Logrieco, A. F., Li, P., & Poapolathep, A. (2021). Determination of Multiple Mycotoxins and Their Natural



Occurrence in Edible Vegetable Oils Using Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Foods*, 10(11), 2795. <https://doi.org/10.3390/foods10112795>

Kamle, M., Mahato, D. K., Devi, S., Lee, K. E., Kang, S. G., & Kumar, P. (2019). Fumonisin: Impact on Agriculture, Food, and Human Health and their Management Strategies. *Toxins*, 11(6), 328. <https://doi.org/10.3390/toxins11060328>

Kostić, A., Milinčić, D., Petrović, T., Krnjaja, V., Stanojević, S., Barać, M., Tešić, I., & Pešić, M. (2019). Mycotoxins and Mycotoxin Producing Fungi in Pollen: Review. *Toxins*, 11(2), 64. <https://doi.org/10.3390/toxins11020064>

Kumar, P., Mahato, D. K., Kamle, M., Mohanta, T. K., & Kang, S. G. (2017). Aflatoxins: A Global Concern for Food Safety, Human Health and Their Management. *Frontiers in Microbiology*, 07. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02170>

Kumar, A., Pathak, H., Bhadauria, S., & Sudan, J. (2021). Aflatoxin contamination in food crops: causes, detection, and management: a review. *Food Production, Processing and Nutrition*, 3(1). <https://doi.org/10.1186/s43014-021-00064-y>

Khwaldia, K., Attour, N., Matthes, J., Beck, L., & Schmid, M. (2022). Olive by-products and their bioactive compounds as a valuable source for food packaging applications. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 21, 1218–1253. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12882>

Lin, T. Shen, Y. Fabricating electrochemical aptasensors for detecting aflatoxin B1 via layer-by-layer self-assembly. *J. Electroanal. Chem.* 2020, 870, 114247

Marroquín-Cardona, A., Johnson, N., Phillips, T., & Hayes, A. (2014). Mycotoxins in a changing global environment – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 69, 220–230. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.04.025>

Nakai, V. K., De Oliveira Rocha, L., Gonçalves, E., Fonseca, H., Ortega, E. M. M., & Corrêa, B. (2008). Distribution of fungi and aflatoxins in a stored peanut variety. *Food Chemistry*, 106(1), 285–290. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.05.087>

Monson, M., Coulombe, R., & Reed, K. (2015). Aflatoxicosis: Lessons from Toxicity and Responses to Aflatoxin B1 in Poultry. *Agriculture*, 5(3), 742–777. <https://doi.org/10.3390/agriculture5030742>

Nabizadeh, S., Shariatifar, N., Shokoohi, E., Shoeibi, S., Gavahian, M., Fakhri, Y., Azari, A., & Mousavi Khaneghah, A. (2018). Prevalence and probabilistic health risk assessment of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, and G<sub>2</sub> in Iranian edible oils. *Environmental science and pollution research international*, 25(35), 35562–35570. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3510-0>

Nabizadeh, S., Shariatifar, N., Shoeibi, S., Jahed-Khaniki, G., Nabizadeh-Nodeh, R., & Shokoohi, E. (2015). Validation of simultaneous analysis method for determination of aflatoxins in olive oil by high performance liquid chromatography fluorescence detector. *Journal of Food Safety and Hygiene*, 1(2), 63–68. <http://jfsh.tums.ac.ir/index.php/jfsh/article/download/17/19>

Notario, A., Sánchez, R., Luaces, P., Sanz, C., & Pérez, A. G. (2022). The Infestation of Olive Fruits by *Bactrocera oleae* (Rossi) Modifies the Expression of Key Genes in the Biosynthesis of Volatile and Phenolic Compounds and Alters the Composition of Virgin Olive Oil. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(5), 1650. <https://doi.org/10.3390/molecules27051650>

Olshina, M. A., & Sharon, M. (2016). Mass Spectrometry: A Technique of Many Faces. *Quarterly reviews of biophysics*, 49, e18. <https://doi.org/10.1017/S0033583516000160>

Omotayo, O. P., Omotayo, A. O., Mwanza, M., & Babalola, O. O. (2019). Prevalence of Mycotoxins and Their Consequences on Human Health. *Toxicological research*, 35(1), 1–7. <https://doi.org/10.5487/TR.2019.35.1.001>

Palumbo M. & Harris L.J., (2011), Microbiological Food Safety of Olive Oil: A Review of the Literature, UC Davis <https://olivecenter.ucdavis.edu/media/files/microbialsafety120511.pdf>

Papachristou, A., & Markaki, P. (2004). Determination of ochratoxin A in virgin olive oils of Greek origin by immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography. *Food additives and contaminants*, 21(1), 85–92. <https://doi.org/10.1080/02652030310001632547>

Pater M. (2018). Review Article: Chromatography Principle and Applications. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Research*, 13(4)

Pundir, C.S. Yadav, N. & Chhillar, A.K. (2019). Occurrence, synthesis, toxicity and detection methods for acrylamide determination in processed foods with special reference to biosensors: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 2019, 85, 211–225

Qaraleh, S. Y., Karajeh, M. R., & Al-Ameiri, N. S. (2015). Molds Associated with Olive Fruits Infested with Olive Fruit Fly ( *Bactrocera Oleae* ) and Their Effects on Oil Quality. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 8(3), 217–220. <https://doi.org/10.12816/0026961>

Qian, M., Zhang, H., Wu, L., Jin, N., Wang, J., & Jiang, K. (2015). Simultaneous determination of zearalenone and its derivatives in edible vegetable oil by gel permeation chromatography and gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *Food chemistry*, 166, 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.133>

Roussos, S., Zaouia, N., Salih, G., Tantaoui-Elaraki, A., Lamrani, K., Cheheb, M., Hassouni, H., Verhé, F., Perraud-Gaime, I., Augur, C., & Ismaili-Alaoui, M. (2006). Characterization of filamentous fungi isolated from Moroccan olive and olive cake: Toxinogenic potential of *Aspergillus* strains. *Molecular Nutrition & Food Research*, 50(6), 500–506. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200600005>

Saeed, I. M., Mazari, S. A., Alaba, P., Ali, B. S., Jan, B. M., Basirun, W. J., Sani, Y. M., Nizzamuddin, S., & Mubarak, N. M. (2021). A review of gas chromatographic techniques for identification of aqueous amine degradation products in carbonated environments. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(6), 6324–6348. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11753-5>

Santiago, M., & Strobel, S. (2013). Thin layer chromatography. *Methods in enzymology*, 533, 303–324. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420067-8.00024-6>

Sayed M.A. (2021) A review of Chromatography: principles, Classification, Applications, 10.13140/RG.2.2.22113.43361

Shavakhi, F., Rahmani, A., & Piravi-Vanak, Z. (2022). A global systematic review and meta-analysis on prevalence of the aflatoxin B1 contamination in olive oil. *Journal of Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1007/s13197-022-05362-y>

Sherma, J., & Rabel, F. (2018). A review of thin layer chromatography methods for determination of authenticity of foods and dietary supplements. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 41(10), 645–657. <https://doi.org/10.1080/10826076.2018.1505637>

Snyder, L. R., & Dolan, J. M. (2017). Liquid-solid chromatography. In *Elsevier eBooks*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-805393-5.00008-7>

Siegel, J. A., & Saukko, P. J. (2013). *Encyclopedia of Forensic Sciences, Second Edition* (2nd ed.). Academic Press.

Silva, L. J. G., Pereira, A. M. P. T., Pena, A., & Lino, C. M. (2020). Citrinin in Foods and Supplements: A Review of Occurrence and Analytical Methodologies. *Foods (Basel, Switzerland)*, 10(1), 14. <https://doi.org/10.3390/foods10010014>

Singh, J. P., & Mehta, A. (2020). Rapid and sensitive detection of mycotoxins by advanced and emerging analytical methods: A review. *Food Science and Nutrition*, 8(5), 2183–2204. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1474>

Thammana, M. (2016). A Review on High Performance Liquid Chromatography (HPLC). *Research & Reviews: Journal of Pharmaceutical Analysis*, 5(2), 1–7.

Turner, N. J., Bramhmbhatt, H., Szabo-Vezse, M., Poma, A., Coker, R. D., & Piletsky, S. A. (2015). Analytical methods for determination of mycotoxins: An update (2009–2014). *Analytica Chimica Acta*, 901, 12–33. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.10.013>

Vidal, A., Ouhibi, S., Ghali, R., Hedhili, A., De Saeger, S., & De Boevre, M. (2019). The mycotoxin patulin: An updated short review on occurrence, toxicity and analytical challenges. *Food and Chemical Toxicology*, 129, 249–256. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.04.048>

Wang, X. Shan, Y. Gong, M. Jin, X. Lv, I. Jiang, M. & Xu, J. (2019), A novel electrochemical sensor for ochratoxin A based on the hairpin aptamer and double report DNA via multiple signal amplification strategy. *Sens. Actuators B* 2019, 281, 595–601

Ye, J., Xuan, Z., Zhang, B., Wu, Y., Li, L., Wang, S., Xie, G., & Wang, S. (2019). Automated analysis of ochratoxin A in cereals and oil by immunoaffinity magnetic beads coupled to UPLC-FLD. *Food Control*, 104, 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.11.006>

Yin, S., Niu, L., & Liu, Y. (2022). Recent Progress on Techniques in the Detection of Aflatoxin B1 in Edible Oil: A Mini Review. *Molecules*, 27(19), 6141. <https://doi.org/10.3390/molecules27196141>

Zahra, N., Saeed, M. K., Sheikh, A., Kalim, I., Ahmad, S. R., & Jamil, N. (2019). A Review of Mycotoxin Types, Occurrence, Toxicity, Detection Methods and Control. *Biological Sciences - PJSIR*, 62(3), 206–218. <https://doi.org/10.52763/pjsir.biol.sci.62.3.2019.206.218>

Zhang, H., Ahima, J., Yang, Q., Zhao, L., Zhang, X., & Zheng, X. (2021). A review on citrinin: Its occurrence, risk implications, analytical techniques, biosynthesis, physiochemical properties and control. *Food Research International*, 141, 110075. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.110075>

Zinedine, A., Soriano, J. M., Moltó, J. C., & Mañes, J. (2007). Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. *Food and Chemical Toxicology*, 45(1), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.07.030>

Zullo, B. A., & Ciafardini, G. (2020). Virgin Olive Oil Quality Is Affected by the Microbiota that Comprise the Biotic Fraction of the Oil. *Microorganisms*, 8(5), 663. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050663>

[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical\\_Chemistry/Supplemental\\_Modules\\_\(Analytical\\_Chemistry\)/Instrumentation\\_and\\_Analysis/Chromatography/Gas\\_Chromatography](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Instrumentation_and_Analysis/Chromatography/Gas_Chromatography)