



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

## **ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Μέθοδοι ανάλυσης μυκοτοξινών στα σταφύλια και στα  
παραγόμενα προϊόντα τους**

**Χρυσήδα Μπριντζίκη**  
**ΑΜ: 684/19684063**

**Επιβλέπουσα**  
**Ονοματεπώνυμο: Νίκη Μαραγκού**

**ΑΘΗΝΑ, ΙΟΥΛΙΟΣ - 2024**



**UNIVERSITY OF WEST ATTICA**  
**SCHOOL OF FOOD SCIENCE**  
**DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY**

**BACHELOR THESIS**

**Mycotoxin analysis in grapes and derived products**

**Chrissida Brintziki**

**Registration Number: 684/19684063**

**Supervisor**  
**name and surname: Niki Maragou**

**ATHENS, JULY – 2024**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**ΔΗΛΩΣΗ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ**

Οι υπογράφοντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη διπλωματική εργασία με τίτλο:  
**«Μέθοδοι ανάλυσης μυκοτοξινών στα σταφύλια και στα παραγόμενα προϊόντα τους»**  
και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

<b>Ψηφιακή Υπογραφή Επιβλέποντα Καθηγητή (1<sup>ο</sup> Μέλους Επιτροπής)</b>  <b>Νίκη Μαραγκού</b>	
<b>Ψηφιακή Υπογραφή Καθηγητή (2<sup>ο</sup> Μέλους Επιτροπής)</b>  <b>Ειρήνη Στρατή</b>	
<b>Ψηφιακή Υπογραφή Καθηγητή (3<sup>ο</sup> Μέλους Επιτροπής)</b>  <b>Ανθιμία Μπατρίνου</b>	

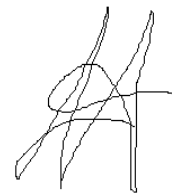
## ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογράφουσα Μπριντζίκη Χρυσήδα του Διονυσίου, με αριθμό μητρώου 684/19684063 φοιτήτρια του **Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων**, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Η Δηλούσα  
Μπριντζίκη Χρυσήδα



## Περίληψη

Οι μυκοτοξίνες είναι δευτερογενείς μεταβολίτες νηματωδών μυκήτων που μπορούν να προκαλέσουν δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία των ανθρώπων και των ζώων. Οι μύκητες που παράγουν μυκοτοξίνες, μαζί με τις μυκοτοξίνες, αποτελούν μία σταθερή και σοβαρή απειλή για τη γεωργία σε πολλά επίπεδα, καθώς μπορούν να προκαλέσουν σημαντικές απώλειες προϊόντων είτε λόγω της μόλυνσης των καλλιεργειών είτε λόγω της αλλοίωσης των παραγόμενων τροφίμων. Επίσης, δημιουργούνται προβλήματα υποσιτισμού, καθώς η ποιότητα των μολυσμένων τροφίμων υποβαθμίζεται. Το σταφύλι αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους γεωργικούς τομείς παγκοσμίως, με αποτέλεσμα η ανίχνευση, ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των μυκοτοξινών να κρίνεται απαραίτητη. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε βιβλιογραφική ανασκόπηση σχετικά με τις σύγχρονες μεθόδους ανάλυσης των μυκοτοξινών που μπορούν να ανιχνευθούν στα σταφύλια και στα παραγόμενα προϊόντα τους, όπως ο οίνος, οι σταφίδες, ο χυμός σταφυλιού και το πετιμέζι. Οι κυριότερες τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των μυκοτοξινών είναι οι χρωματογραφικές τεχνικές, οι ανοσολογικές τεχνικές καθώς και οι βιοσένσορες. Στην παρούσα ανασκόπηση αρχικά γίνεται μία προσπάθεια για την ολοκληρωμένη παρουσίαση των μυκοτοξινών στις οποίες μπορεί να εκτεθεί το σταφύλι και τα παραγόμενα από αυτά προϊόντα. Στη συνέχεια, με βάση τις απαιτήσεις των παγκόσμιων κανονισμών για τις μυκοτοξίνες και σύμφωνα με τη σχετική βιβλιογραφία, παρουσιάζονται ορισμένες μεθολογικές προσεγγίσεις για τον προσδιορισμό της μυκοτοξίνης. Τα ευρήματα πρόσφατων μελετών έδειξαν πως οι μυκοτοξίνες που συνήθως ανιχνεύονται στα προϊόντα σταφυλιού είναι οι ωχρατοξίνες και πιο συγκεκριμένα η ωχρατοξίνη Α (OTA). Η ωχρατοξίνη Α είναι εξαιρετικά τοξική ακόμα και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Κατά συνέπεια είναι σημαντική η ανίχνευσή της αλλά και η πρόληψη ώστε να διασφαλιστεί η ασφάλεια των τροφίμων.

**Λέξεις κλειδιά:** σταφύλι, προϊόντα σταφυλιού, μυκοτοξίνες, ωχρατοξίνη Α, μέθοδοι ανάλυσης, HPLC, GC

## Abstract

Mycotoxins are secondary metabolites of nematode fungi that can cause toxic effects on human and animal health. Mycotoxin-producing fungi, together with mycotoxins, are a constant and serious threat to agriculture on many levels, as they can cause significant product losses either through contamination of crops or spoilage of the food produced. Malnutrition problems also arise, as the quality of contaminated food degrades. Grapes constitute one of the most important agricultural sectors worldwide, as a result of which the detection, identification and quantification of mycotoxins and related productive fungi is considered essential. In the present thesis, a literature review was carried out on the modern methods for the analysis of mycotoxins that can be detected in grapes and their products, such as wine, raisins, grape juice and grape juice. The main techniques identified for the detection and analysis of mycotoxins are divided into chromatographic techniques (HPLC, GC, LC), immunological techniques (ELISA) and biosensors (optical, electrochemical). In this review, an attempt is initially made to provide a comprehensive presentation of the mycotoxins to which grapes and the products produced from them can be exposed. Then, based on the requirements of the global regulations on mycotoxins and according to the relevant literature, some methodological approaches for mycotoxin determination are presented. The findings of recent studies have shown that the mycotoxins that are usually detected in grape products are ochratoxins and more specifically ochratoxin A (OTA). Ochratoxin A is extremely toxic even in very small concentrations. Consequently, its detection and prevention are important to ensure food safety.

**Keywords:** grape, grape products, mycotoxins, ochratoxin A, analysis methods, HPLC, GC

## Πίνακας περιεχομένων

<b>ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ</b>	<b>4</b>
<b>Περίληψη</b>	<b>5</b>
<b>Abstract</b>	<b>6</b>
<b>Πίνακας περιεχομένων</b>	<b>7</b>
<b>Κατάλογος Πινάκων</b>	<b>10</b>
<b>Κατάλογος Σχημάτων</b>	<b>11</b>
<b>Συντμήσεις, ακρωνύμια, σύμβολα και ορισμοί</b>	<b>12</b>
<b>1. Εισαγωγή και σκοπός εργασίας</b>	<b>1</b>
1.1 Σκοπός εργασίας	1
1.2 Δομή εργασίας	1
<b>2. Σταφύλια και παραγόμενα προϊόντα</b>	<b>3</b>
2.1 Ιστορική αναδρομή αμπέλου	3
2.2 Βοτανικά χαρακτηριστικά	4
2.3 Ποικιλίες αμπέλου	5
2.4 Χώρες παραγωγής σταφυλιών και παραγόμενων προϊόντων	5
2.5 Παραγόμενα προϊόντα από σταφύλια	7
2.5.1 Κρασί και αποστάγματα	7
2.5.2 Ξύδι και βαλσάμικο	8
2.5.3 Χυμός σταφυλιού	9
2.5.4 Σταφίδα αποξηραμένη	9
2.5.5 Μαρμελάδες – Ζελέ	9
2.5.6 Πετιμέζι	10
2.6 Σημαντικότητα παραγωγής σταφυλιού για τον άνθρωπο	10
<b>3. Μυκοτοξίνες σε αμπελουργικά προϊόντα</b>	<b>12</b>
3.1 Εισαγωγή	12
3.2 Κυριότερες μυκοτοξίνες και οι μύκητες που τις παράγουν	13
3.2.1 Ωχρατοξίνη	14
3.2.2 Είδη και ιδιότητες ωχρατοξινών	15
3.2.3 Εμφάνιση ωχρατοξίνης Α στους οίνους	16

3.2.3 Εμφάνιση ωχρατοξίνης A στους χυμούς σταφυλιών, στο ξύδι από κρασί και στις σταφίδες	18
<b>3.3 Μέτρα αντιμετώπισης εμφάνισης μυκοτοξινών</b>	<b>19</b>
3.3.1 Ελαχιστοποίηση της μόλυνσης επιτραπέζιων σταφυλιών και σταφίδας από ωχρατοξίνη A	21
3.3.2 Ελαχιστοποίηση της ωχρατοξίνης A κατά την οινοποίηση	21
<b>3.4 Νομοθεσία</b>	<b>23</b>
3.4.1 Ευρωπαϊκή Νομοθεσία	23
<b>4. Μέθοδοι ανάλυσης μυκοτοξινών</b>	<b>26</b>
<b>4.1 Προετοιμασία δείγματος</b>	<b>26</b>
4.1.1 Δειγματοληψία	26
4.1.2 Ομογενοποίηση δείγματος	27
4.1.3 Εκχύλιση και καθαρισμός	27
4.1.3.1 Γενικά	27
4.1.3.2 Υγρή- υγρή εκχύλιση (LLE)	29
4.1.3.3 Εκχύλιση στερεής φάσης (SPE)	29
<b>4.2 Χρωματογραφικές τεχνικές</b>	<b>29</b>
4.2.1 Γενικά	29
4.2.2 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης	31
4.2.2.1 Οργανολογία HPLC	31
4.2.2.2 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης και μυκοτοξίνες	35
4.2.3 Αεριοχρωματογραφία	36
4.2.3.1 Γενικά	36
4.2.3.1 Αεριοχρωματογραφία και μυκοτοξίνες	37
4.3 Ανοσολογικοί προσδιορισμοί	37
4.3.1 Γενικά	37
4.3.2 Ανοσολογικές τεχνικές ανάλυσης στις μυκοτοξίνες	38
4.3.3 Βιοισθητήρες	40
4.3.4 Βιοισθητήρες και μυκοτοξίνες	41
<b>5. Υλικά &amp; Μέθοδοι</b>	<b>42</b>
5.1 Βάση δεδομένων	42
5.2 Λέξεις κλειδιά	42
5.3 Χρονική περίοδος ανασκόπησης	42
<b>6. Αποτελέσματα</b>	<b>43</b>
6.1 Συνολικά αποτελέσματα	43
6.2 Αποτελέσματα σταφυλιού	45



<b>6.3 Αποτελέσματα οίνου</b>	<b>46</b>
<b>6.4 Αποτελέσματα αποξηραμένης σταφίδας</b>	<b>46</b>
<b>6.5 Αποτελέσματα στους κυπριακούς οίνους</b>	<b>47</b>
<b>6.6 Αποτελέσματα για τους οίνους Tokaj</b>	<b>48</b>
<b>7. Συμπεράσματα</b>	<b>49</b>
<b>BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>51</b>

## Κατάλογος Πινάκων

<u>Πίνακας 1: Μυκοτοξίνες και μύκητες που έχουν βρεθεί σε τρόφιμα</u> .....	13
<u>Πίνακας 2: Τρόποι πρόληψης και αντιμετώπισης μυκοτοξινών</u> .....	19
<u>Πίνακας 3: Νομοθετικά όρια μυκοτοξινών στα σταφύλια και τα προϊόντα τους σύμφωνα με την νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης (EU)</u> .....	22
<u>Πίνακας 4: Αποτελέσματα διαφόρων δειγμάτων σύμφωνα με τη βιβλιογραφία</u> .....	39

## Κατάλογος Σχημάτων

<u>Σχήμα 1: Το φυτό της αμπέλου</u> .....	4
<u>Σχήμα 2: Οι μεγαλύτερες χώρες παραγωγί κατά το 2023</u> .....	5
<u>Σχήμα 3: Χώρες παραγωγί σταφυλιών κατά το έτος 2022</u> .....	6
<u>Σχήμα 4: Δομή της Ωχρατοξίνης A</u> .....	14
<u>Σχήμα 5: Στάδια μετατροπής της ωχρατοξίνης</u> .....	15
<u>Σχήμα 6: Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης</u> .....	29

## Συντμήσεις, ακρωνύμια, σύμβολα και ορισμοί

**AFT: Aflatoxin**

**DON: Deoxynivalenol**

**FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations**

**FAOSTAT: FAO Statistics**

**FID: Flame Ionization Detector**

**GC: Gas Chromatography**

**HPLC: High Performance Liquid Chromatography**

**LC-MS: Liquid Chromatography- Mass Spectrometry**

**LLE: Liquid-liquid extraction**

**OIV: Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (Διεθνή Οργανισμού Οίνου και Αμπέλου)**

**OTA: Ωχρατοξίνη A**

**OTB: Ωχρατοξίνη B**

**OTC: Ωχρατοξίνη C**

**SPE: Solid-Phase Extraction**

**SLE: Supported Liquid Extraction**

**TLC: Thin Layer Chromatography**

**UHPLC: Ultra High Performance Liquid Chromatography**

**UPLC: Ultra Performance Liquid Chromatography**

# 1. Εισαγωγή και σκοπός εργασίας

## 1.1 Σκοπός εργασίας

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η βιβλιογραφική ανασκόπηση των μεθόδων ανάλυσης των μυκοτοξινών στα σταφύλια και στα παραγόμενα προϊόντα.

Η άμπελος είναι μία καλλιέργεια πολύ διαδεδομένη σε παγκόσμιο επίπεδο, ο καρπός της οποίας (σταφύλι) άλλοτε καταναλώνεται ως φρέσκο φρούτο και άλλοτε αποτελεί την πρώτη ύλη για την παραγωγή άλλων προϊόντων, όπως κρασί και αποσταγμάτων, ξύδι, πετιμέζι, χυμό σταφύλης, και σταφίδα. Η ανίχνευση μυκοτοξινών ή μυκήτων που παράγουν μυκοτοξίνες είναι απαραίτητη και κρίσιμη διαδικασία. Οι μυκοτοξίνες είναι τοξικές ουσίες και η παρουσία τους σε ένα προϊόν συνεπάγεται υποβάθμισης της ποιότητας του, πιθανή απόρριψη, ενώ ταυτόχρονα αποτελούν απειλή για τη υγεία του καταναλωτή.

Στο σταφύλι και στα προϊόντα του, η μυκοτοξίνη που απαντάται συχνότερα είναι η ωχρατοξίνη Α, η οποία, σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές επιδρά στα νεφρά των ζώων και πιθανότατα προκαλεί καρκινογενέσεις.

Ορισμένες από τις κυριότερες μεθόδους ανάλυσης των μυκοτοξινών που συνηθίζεται να χρησιμοποιούνται είναι η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης – φασματομετρίας μάζας (HPLC-MS), η αέρια χρωματογραφία (GC) και η χρήση βιοαισθητήρων, οι οποίοι αποτελούν ταχείες τεχνικές.

## 1.2 Δομή εργασίας

Η εργασία αποτελείται από 6 κεφάλαια. Στο πρώτο κεφάλαιο παρουσιάζεται ο σκοπός της εργασίας και η δομή του κειμένου.

Στο δεύτερο κεφάλαιο αναφέρονται συνοπτικά ορισμένες πληροφορίες που αφορούν το αμπέλι και το σταφύλι. Γίνεται μία σύντομη αναφορά στην ιστορία της καλλιέργειας της αμπέλου, στα βοτανικά χαρακτηριστικά που παρουσιάζει και στις κυριότερες καλλιεργούμενες ποικιλίες. Επίσης παρουσιάζονται ορισμένα στατιστικά στοιχεία για την καλλιέργεια της αμπέλου, την παραγωγή σταφυλιού και τη διάθεση του σε παγκόσμια κλίμακα, καθώς και τα κυριότερα προϊόντα που παράγονται από σταφύλι, όπως κρασί και αποστάγματα, ξύδι και βαλσάμικο, χυμός σταφυλιού, σταφίδα, πετιμέζι

Στο τρίτο κεφάλαιο, γίνεται μία εισαγωγή στις μυκοτοξίνες των τροφίμων και κυρίως στην ωχρατοξίνες, οι οποίες είναι αυτές που ταυτοποιούνται συχνότερα στο σταφύλι και στα προϊόντα του. Η πιο διαδεδομένη μυκοτοξίνη είναι η ωχρατοξίνη Α. Επίσης, παρουσιάζονται ορισμένα από τα μέτρα που μπορούν να ληφθούν κατά την καλλιέργεια, τη συγκομιδή και την αποθήκευση των σταφυλιών, ώστε να ελαχιστοποιηθεί η ποσότητα ανιχνεύσιμης ωχρατοξίνης.

Στο τέταρτο κεφάλαιο περιγράφεται συνοπτικά η προετοιμασία του δείγματος πριν την ανάλυση (δειγματοληψία, ομογενοποίηση, εκχύλιση) και στη συνέχεια παρουσιάζονται οι κυριότερες μέθοδοι ανάλυσης των μυκοτοξινών. Δίνεται ιδιαίτερα έμφαση στην υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης – φασματομετρίας μάζας (HPLC-MS), στην αέρια χρωματογραφία (GC) και στη χρήση βιοαισθητήρων.

Στο κεφάλαιο 5 γίνεται η περιγραφή των σταδίων της βιβλιογραφικής ανασκόπησης, δηλαδή ποιες βάσεις δεδομένων χρησιμοποιήθηκαν, ποιες ήταν οι λέξεις κλειδιά που εφαρμόστηκαν κατά την αναζήτηση και το χρονικό διάστημα που αφορά η συγκεκριμένη μελέτη.

Στο κεφάλαιο 6 παρουσιάζονται και σχολιάζονται τα αποτελέσματα της βιβλιογραφικής ανασκόπησης για την παρουσία μυκοτοξινών στο σταφύλι και στα προϊόντα αυτού. Τέλος, εξάγονται και αναγράφονται τα συμπεράσματα που προέκυψαν.

## 2. Σταφύλια και παραγόμενα προϊόντα

### 2.1 Ιστορική αναδρομή αμπέλου

Το αμπέλι είναι θαμνώδες και αναρριχώμενο φυτό και ανήκει στην οικογένεια Vitaceae ή Ampelideae. Αρχικά, στην οικογένεια Vitaceae υπήρχαν τρία γένη ενώ ύστερα από διάφορες μελέτες τα γένη ταξινομήθηκαν σε 10 και τελικά σε 14. (Σταυρακάκης, 2019)

Το γένος *Vitis* παρουσιάζει το μεγαλύτερο ενδιαφέρον και ταξινομείται σε δύο υπογένη, το πρώτο ονομάζεται *Euvitis* το οποίο περιέχει είδη αμερικάνικα, ασιατικά και το ευρωπαϊκό *Vitis Vinifera* ή αλλιώς άμπελος ή οινοφόρος και το δεύτερο *Muscadinia*. (Σταυρακάκης, 2019)

Η οινοφόρος άμπελος εντοπίστηκε από τον προϊστορικό άνθρωπο, ως αναρριχώμενος θάμνος σε δασώδεις ή παραποτάμιες περιοχές και ως βασικό στοιχείο στην διατροφή τους υπήρξαν οι μικρές σταφυλές (μικρές, μελανές, υπόξινες ράγες). Η έναρξη της ανάπτυξης καλλιέργειας της άγριας αμπέλου τοποθετείται μεταξύ 8000-6000 π.Χ., ενώ η πρώτη στοιχειώδης οργανωμένη καλλιέργεια χρονολογείται μεταξύ 6000-5000 π.Χ. (Σταυρακάκης, 2019)

Η ανάπτυξη της κεραμικής τέχνης και η πρώτη κατασκευή των πήλινων αγγείων περίπου στο 6000 π.Χ. φαίνεται ότι ήταν η βάση για την πρώτη οινοποίηση. Κατά τη διάρκεια της 6ης και 5ης π.Χ. χιλιετίας, η καλλιέργεια της αμπέλου αναπτύχθηκε αρχικά στις χώρες της Κάτω Μεσοποταμίας και στην Αίγυπτο, ενώ αργότερα εξαπλώθηκε στις παραμεσόγειες χώρες στους πολιτισμούς των Φοινίκων, των Αιγυπτίων, των Μινωιτών και αργότερα των Ελλήνων, των Ρωμαίων και των Ετρούσκων. (Σταυρακάκης, 2019)

Η καλλιέργεια της αμπέλου στον ελλαδικό χώρο ξεκίνησε με την μεταφορά της από την Αίγυπτο στην μινωική Κρήτη (3000-2800 π.Χ.). Στην ελληνική μυθολογία η άμπελος και ο οίνος συνδέονται με τον θεό Διόνυσο, έτσι φαίνεται ότι η καλλιέργεια της αμπέλου στην αρχαία Ελλάδα γνώρισε μεγάλη ανάπτυξη. Πολλοί συγγραφείς και φιλόσοφοι όπως ο Όμηρος, ο Ησίοδος, ο Ηρόδοτος και ο Αριστοτέλης δίδουν πολύ σημαντικές πληροφορίες για το πλήθος και την ποιότητα των ποικιλιών, την τεχνική της καλλιέργειας, την ξήρανση των σταφυλιών, καθώς και την παραγωγή και συντήρηση του οίνου. (Σταυρακάκης, 2019).

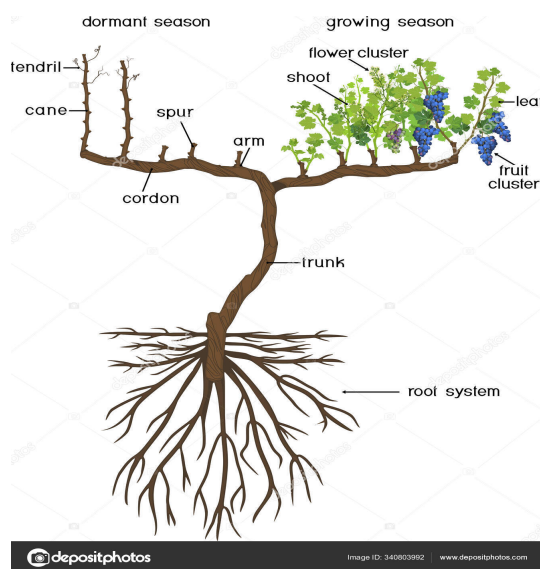
## 2.2 Βοτανικά χαρακτηριστικά

Το φυτό της αμπέλου στην άγρια μορφή του (*Vitis vinifera L. ssp. Silvestris Gmel.*) είναι πολυετής, φυλλοβόλος, αναρριχώμενος θάμνος, το ύψος του οποίου μπορεί να υπερβεί τα δεκαπέντε μέτρα. Στην καλλιεργούμενη μορφή του (*Vitis vinifera L. ssp. Sativa D.C.*), με το κατάλληλο κλάδεμα μόρφωσης και καρποφορίας, ονομάζεται πρέμνο και λαμβάνει σχήματα που επιτρέπουν την παραγωγική εκμετάλλευσή του. (Σταυρακάκης, 2019)

Το πρέμνο (κλήμα, κούρβουλο, κουρμούλα) εσωτερικά του εδάφους αναπτύσσει το ριζικό σύστημα και στο εναέριο περιβάλλον το υπέργειο τμήμα του. Τα δύο αυτά διακριτά τμήματα είναι σημαντικό να διατηρούν ισορροπία, κατά την ανάπτυξη τους, για την παραγωγική επιβίωση των πρέμνων. Το αμπέλι έχει πολύ μεγάλα, παλαμοειδή φύλλα που αναδύονται σε ένα μίσχο από το βλαστό. Το χαρακτηριστικό σχήμα τους ποικίλει ανάλογα με την ποικιλία και το είδος, καθώς και το χρώμα, το χνούδι στην κάτω επιφάνεια και το μέγεθος. (Σταυρακάκης, 2019)

Ο κορμός, οι βραχίονες και το φύλλωμα (βλάστηση) αποτελούν το υπέργειο τμήμα του πρέμνου. Το ύψος του κορμού ποικίλει στα διάφορα συστήματά μόρφωσης. Το σημείο του κορμού που βρίσκεται σε επαφή με το έδαφος ονομάζεται λαιμός, ενώ το ύψος στο οποίο δημιουργούνται τα τμήματα του οριζόντιου κορμού ονομάζεται σταυρός ή σταύρωμα. Οι παραγωγικές μονάδες που αναπτύσσονται κατά το χειμερινό κλάδεμα ονομάζονται λανθάνοντες οφθαλμοί. (Σταυρακάκης, 2019)

Αντίστοιχη είναι η ανάπτυξη του ριζικού συστήματος στο έδαφος, με την διαφορά ότι το μέγεθος του είναι δεκαπλάσιο εκείνου του υπέργειου μέρους. Τη θέση του κορμού έχει η κυρία ρίζα, τη θέση των βραχιόνων έχουν οι διακλαδώσεις πρώτης και δεύτερης τάξης και τη θέση των φύλλων έχουν τα απορροφητικά ριζίδια. (Σταυρακάκης, 2019)



**Σχήμα 1:** Το φυτό της αμπέλου (<https://depositphotos.com/gr/vector/grape-pruning-scheme-spur-pruned-general-view-grape-vine-plant-340803992.html>)



## 2.3 Ποικιλίες αμπέλου

Υπάρχουν πολυάριθμες ποικιλίες αμπέλου, οι οποίες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε γενικές γραμμές ως εξής: για την παραγωγή κρασιού, για την παραγωγή επιτραπέζιων σταφυλιών, για την παραγωγή σταφίδας και, τέλος, αυτές που προορίζονται για την παραγωγή χυμών, κοκτέιλ και κονσέρβας.

Οι κυριότερες ποικιλίες στην Ελλάδα διακρίνονται ως εξής:

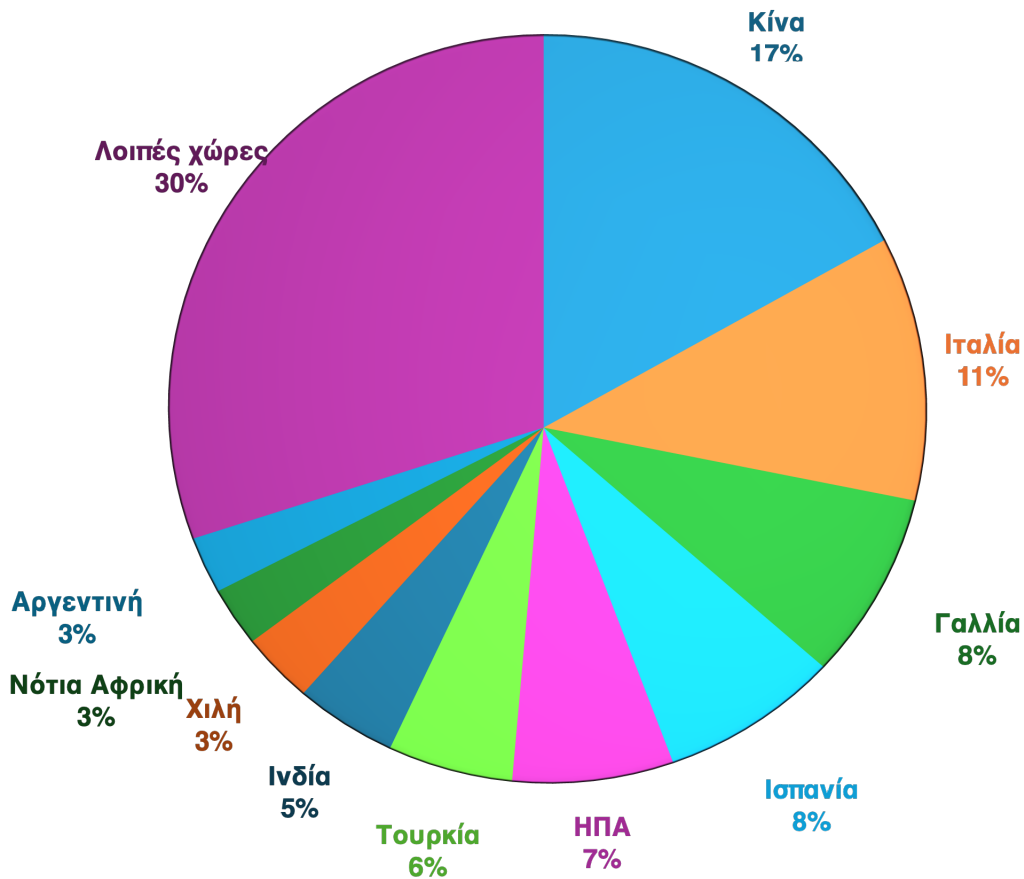
- Λευκό κρασί: Ασύρτικο, Μοσχάτο Σάμου, Ρομπόλα, Σαββατιανό, Ντεμπίνα, Κακοτρύγη, Μαλαγουζιά, Μονεμβασιά, Ροδίτης.
- Κόκκινο κρασί: Φιλέρι, Μαύρο Νεμέας, Καμπερνέ, μαύρο Νάουσας, Λιατικό, Μαυρορωμαίκο, Μαυροδάφη, Μανδηλαριά, Βερτζαμί, κόκκινο Λήμνου, Κοτσιφάλι.
- Επιτραπέζια σταφύλια: Αβγουλάτο, Ροζάκι, Μοσχάτο Αμβούργου, Αετονύχι, επιτραπέζια σταφίδα, Καρντινάλ, Φράουλα.
- Σταφίδες: Σουλτανίνα, Κορινθιακή σταφίδα.

(Σταυρακάκης, 2019)

## 2.4 Χώρες παραγωγής σταφυλιών και παραγόμενων προϊόντων

Σύμφωνα με στοιχεία του Διεθνή Οργανισμού Οίνου και Αμπέλου (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin, OIV), το 2023 η έκταση που καλλιεργείται με αμπέλια σε παγκόσμιο επίπεδο διαμορφώθηκε στα  $7,2 \times 10^6$  εκτάρια, σημειώνοντας μείωση κατά 0,5% συγκριτικά με το 2022. Στο Σχήμα 2, διακρίνονται οι μεγαλύτερες αμπελουργικές χώρες. Οι πέντε πιο μεγάλοι καλλιεργητές αμπελιού κατά το 2023 είναι η Ισπανία, η Γαλλία, η Κίνα, η Ιταλία και η Τουρκία. Η Ελλάδα κατέχει την 20<sup>η</sup> θέση με καλλιεργούμενη έκταση περίπου  $0,108 \times 10^6$  εκτάρια, το οποίο αντιστοιχεί στο 1,3 % του παγκόσμιου αμπελώνα (OIV, 2024).





Σχήμα 3: Χώρες παραγωγοί σταφυλιών κατά το έτος 2022

Πηγή: Βασισμένο σε στοιχεία του FAOSTAT (2024)

## 2.5 Παραγόμενα προϊόντα από σταφύλια

### 2.5.1 Κρασί και αποστάγματα

Σύμφωνα με την ισχύουσα ελληνική νομοθεσία, «οίνος καλείται το ποτό που προέρχεται αποκλειστικά από ολική ή μερική αλκοολική ζύμωση νωπών σταφυλιών ή γλεύκους από νωπά σταφύλια» (Νόμος 396/76, Φ.Ε.Κ. 198/Α/31-7-1976), ενώ στο παράρτημα ΙΙΙ του Κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 491/2009 δίνεται ένας πιο λεπτομερής ορισμός σύμφωνα με τον οποίο «οίνος είναι το προϊόν που παράγεται αποκλειστικά με πλήρη ή μερική αλκοολική ζύμωση νωπών σταφυλιών, είτε αυτά έχουν υποστεί έκθλιψη είτε όχι, ή γλεύκους σταφυλιών». Στον κανονισμό αυτό δίνονται οι ορισμοί για τα νωπά σταφύλια και το γλεύκος σταφυλιών. Τα πρώτα είναι «ο καρπός της αμπέλου που χρησιμοποιείται στην οινοποίηση, ώριμος ή ελαφρώς λιαστός, και ο οποίος μπορεί να υποβληθεί σε έκθλιψη ή πίεση με τα συνήθη μέσα του οινοποιείου και να υποστεί μόνος του αλκοολική ζύμωση» (Παράρτημα Ι), ενώ το δεύτερο είναι «το υγρό προϊόν το οποίο παράγεται φυσικώς ή με φυσικές διεργασίες από νωπά σταφύλια. Αποκτημένος

αλκοολικός τίτλος του γλεύκους σταφυλιών που δεν υπερβαίνει το 1 % vol. είναι αποδεκτός» (Παράρτημα III).

Σύμφωνα με την εθνική και την κοινοτική νομοθεσία, οι ποιοτικές κατηγορίες του οίνου που διατίθενται στην αγορά είναι:

- Οίνοι Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης, Π.Ο.Π: Οίνοι που προέρχονται από νομοθετικά οριοθετημένες αμπελουργικές ζώνες, των οποίων το όνομα φέρουν. Η ποικιλία καθώς και η τεχνολογία παραγωγής είναι συγκεκριμένη και τα ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου εξαρτώνται από το οικοσύστημα της περιοχής.

- Οίνοι Προστατευόμενης Γεωγραφικής Ένδειξης, Π.Γ.Ε.: Οίνοι που προέρχονται από συγκεκριμένες γεωγραφικές περιοχές και η παραγωγή τους διέπεται από ορισμένους όρους παραγωγής που σχετίζονται με τις ποικιλίες, την οινοποίηση και τον αλκοολικό τίτλο. Στη κατηγορία αυτή ανήκουν οι οίνοι «Ονομασία Κατά Παράδοση», τίτλος που χρησιμοποιείται για οίνο που παράγεται αποκλειστικά σε συγκεκριμένη χώρα ή περιοχή. Στην Ελλάδα, «Οίνο Ονομασίας Κατά Παράδοση» αποτελεί η Ρετσίνα και η Βερντέα.

- Ποικιλιακοί Οίνοι: Νέα κατηγορία οίνων στους οποίους εντάσσονται οι επιτραπέζιοι οίνοι οι οποίοι ικανοποιούν τους όρους που ορίζονται στο άρθρο 51 του Κανονισμού (ΕΚ) 33/2019. Στους οίνους αυτούς επιτρέπεται η αναγραφή της χρονιάς εσοδείας και της ποικιλιακής σύστασης, όχι όμως της γεωγραφικής ένδειξης.

- Επιτραπέζιοι Οίνοι: Οίνοι που δεν εντάσσονται στις πιο πάνω κατηγορίες οίνων για τους οποίους δεν παρέχεται η δυνατότητα αναγραφής της χρονιάς εσοδείας και της ποικιλιακής σύστασης.

### 2.5.2 Ξύδι και βαλσάμικο

Σύμφωνα με τον Ν. 4303/2014 «ως ξύδι (ή όζος) νοείται το προϊόν που παράγεται με οξική ζύμωση ή αλκοολική και οξική ζύμωση, κατά περίπτωση, των πρώτων υλών, που καθορίζονται στην υποπαράγραφο 1 της παραγράφου 1 του άρθρου έκτου του Ν. 4330/2014 (Α 231), δηλαδή οίνων, ξηράς σταφίδας, φρούτων και των προϊόντων αλκοολικής ζύμωσης

αυτών, αιθυλικής αλκοόλης, δημητριακών και βύνης δημητριακών, μέλιτος και βρώσιμων υπολειμμάτων μελισσοκομίας, καθώς και ζύθου».

Σύμφωνα με τον Ν. 4303/2014, ως βαλσαμικό ξύδι ορίζεται «το προϊόν που λαμβάνεται είτε με προσθήκη σε ξύδι αμπελοοινικής προέλευσης συμπυκνωμένου γλεύκους σταφυλιών ή/και ανακαθαρισμένου συμπυκνωμένου γλεύκους σταφυλιών, όπως αυτά ορίζονται στον Κανονισμό (ΕΕ) αριθμ. 1308/2013 είτε με μερική αλκοολική ζύμωση και στη συνέχεια με οξική ζύμωση του προϊόντος συμπύκνωσης των υγρών που λαμβάνονται από την εκχύλιση ξηράς σταφίδας». Το βαλσαμικό ξύδι έχει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά, σύμφωνα με την αριθμ. 90/2009 απόφαση του Ανώτατου Χημικού Συμβουλίου (ΑΧΣ), η οποία εγκρίθηκε με την αριθμ. 90/2009/ 17.2.2011 απόφαση του Υφυπουργού Οικονομικών (Β' 270).

### 2.5.3 Χυμός σταφυλιού

Σύμφωνα με τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών (ΚΤΠ, 2015, άρθρο 126) ως χυμός φρούτων ορίζεται «το ζυμώσιμο αλλά μη ζυμωθέν προϊόν που λαμβάνεται από το βρώσιμο τμήμα υγιών και ώριμων φρούτων ενός ή πολλών ειδών, νωπών ή διατηρημένων με ψύξη ή κατάψυξη, και έχει το χρώμα, το άρωμα και τη χαρακτηριστική γεύση των χυμών φρούτων από τα οποία προέρχεται».

### 2.5.4 Σταφίδα αποξηραμένη

Σύμφωνα με τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών (Κ.Τ.Π., 2011, άρθρο 121) «ξηρά σταφίδα ή απλώς σταφίδα χαρακτηρίζεται το προϊόν που παράγεται από τη ξήρανση των ραγών των σταφυλιών, απαλλαγμένων πρακτικά μίσχων των βοτράων (κοτσάνια) καθώς και κάθε άλλου μέρους της αμπέλου, εξαιρουμένου του ειδικού τύπου μεγάλης ραγός σταφίδων, οι οποίες μπορούν να προσφέρονται με τους μίσχους τους».

### 2.5.5 Μαρμελάδες – Ζελέ

Σύμφωνα με τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών (Κ.Τ.Π., 2011) «η μαρμελάδα είναι μείγμα, με την κατάλληλη πηκτωματώδη υφή, σακχάρων, πούλπας ή/και πολτού από ένα ή

περισσότερα είδη φρούτων και νερού. Ωστόσο, η μαρμελάδα από εσπεριδοειδή μπορεί να παρασκευάζεται από ολόκληρα φρούτα, κομμένα σε λωρίδες ή/και σε φέτες».

Σύμφωνα με τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών (Κ.Τ.Π., 2011) «η μαρμελάδα έζτρα είναι μείγμα, με την κατάλληλη πηκτωματώδη υφή, σακχάρων και μη συμπυκνωμένης πούλπας ενός ή περισσότερων ειδών φρούτων και νερού. Ωστόσο, η μαρμελάδα έζτρα από κυνόρροδα καθώς και η μαρμελάδα έζτρα χωρίς κουκούτσια από σμέουρα (φραμπυάζ), μούρα, μαύρα φραγκοστάφυλα, μυρτίδια και κόκκινα φραγκοστάφυλα μπορούν να προέρχονται εξ ολοκλήρου ή εν μέρει από μη συμπυκνωμένο πολτό των φρούτων αυτών. Η μαρμελάδα έζτρα από εσπεριδοειδή μπορεί να παρασκευάζεται από ολόκληρα φρούτα, κομμένα σε λωρίδες ή /και σε φέτες. Τα παρακάτω φρούτα δεν μπορούν να χρησιμοποιούνται σε μείγμα με άλλα φρούτα για την Παρασκευή μαρμελάδας έζτρα: Μήλα, αχλάδια, συμπύρηνα δαμάσκηνα, πεπόνια, καρπούζια, σταφύλια, κολοκύθες, αγγούρια και ντομάτες».

Σύμφωνα με τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών (Κ.Τ.Π., 2011) «το ζελέ είναι ένα επαρκώς πηκτωματώδες μείγμα σακχάρων και χυμού ή/και υδατικού εκχυλίσματος από ένα ή περισσότερα είδη φρούτων».

### 2.5.6 Πετιμέζι

Σύμφωνα με τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών (ΚΤΠ, 2005) «σταφυδόμελι ή πετιμέζι χαρακτηρίζεται το προϊόν που λαμβάνεται με συμπύκνωση του γλεύκους των σταφυλιών, μετά από την απομάκρυνση του μεγαλύτερου ποσού των οξέων, με τρόπο ώστε: α) η ένδειξη του διαθλασιμέτρου στους 20° C να μην είναι κατώτερη από 65%, β) ο αποκτημένος αλκοολικός τίτλος του να μην είναι ανώτερος από 1% vol».

Το προϊόν αυτό δεν επιτρέπεται να χρησιμοποιείται σε χρήσεις του οινικού τομέα.

## 2.6 Σημαντικότητα παραγωγής σταφυλιού για τον άνθρωπο

Η παραγωγή σταφυλιών είναι σημαντική για τον άνθρωπο για ποικίλους λόγους όπως διατροφικούς, οικονομικούς, πολιτισμικούς και κοινωνικούς λόγους. Επίσης η διαχρονική παρουσία της αμπέλου στον ελλαδικό χώρο αποκαλύπτει την συμβολή της στη διαμόρφωση του κάλλους και της αισθητικής του αγροτικού τοπίου των μικρών και μεγάλων νησιών, των ορεινών και των ημιορεινών. (Σταυρακάκης, 2019)

Η άμπελος προσαρμόστηκε και εγκλιματίστηκε καθώς αξιοποίησε με τον καλύτερο τρόπο, σε σύγκριση με αλλά καλλιεργούμενα φυτά, τις ξηροθερμικές νησιωτικές περιοχές και τα ελλιπή εδάφη των ορεινών και των ημιορεινών περιοχών της χώρας. Αυτό σημαίνει ότι ό,που υπάρχουν εδαφοκλιματικά προβλήματα για πολλά καλλιεργούμενα φυτά, η άμπελος όχι μόνο επιβιώνει αλλά και μπορεί να παράγει αμπελουργικά προϊόντα υψηλής ποιότητας (Σταυρακάκης, 2019).

Επιπρόσθετα, η καλλιέργεια των σταφυλιών έχει συνδεθεί με κοινωνικές και θρησκευτικές εκδηλώσεις σε πολλούς πολιτισμούς διότι από αυτό παράγεται το κρασί. Για παράδειγμα στη χριστιανική θρησκεία η άμπελος έχει σημαντική θέση, αφού υπάρχουν αναφορές στην Καινή διαθήκη που ο Ιησούς Χριστός παρομοιάζεται με την άμπελο. (Σταυρακάκης, 2019)

Όσον αφορά την υγεία, τα σταφύλια είναι πλούσια πηγή βιοδραστικών ενώσεων, όπως τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, οι ανθοκυανίνες, και τα στυλβένια. Αυτές οι ενώσεις θεωρείται πως συμβάλλουν στην καλή υγεία. Ειδικότερα, έχει αναφερθεί πως διαθέτουν αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές, αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινογόνες ιδιότητες και έχουν ευρεία εφαρμογή στις βιομηχανίες τροφίμων και θρεπτικών προϊόντων. Η χρήση εκχυλισμάτων σταφυλιών πλούσιων σε αυτές τις βιοδραστικές ενώσεις συνδέεται με μείωση των καρδιαγγειακών παθήσεων και των κύριων παραγόντων κινδύνου τους, συμπεριλαμβανομένης της υπέρτασης (υψηλή αρτηριακή πίεση), μια κλινική κατάσταση που συνδέεται με υψηλή θνησιμότητα παγκοσμίως. Ως εκ τούτου, έχει δοθεί σημαντική προσοχή στα προϊόντα με βάση το σταφύλι για την ανακούφιση και τη θεραπεία της υπέρτασης (Sabra et al., 2021).

## 3. Μυκοτοξίνες σε αμπελουργικά προϊόντα

### 3.1 Εισαγωγή

Ο όρος μυκοτοξίνη προέρχεται από την ελληνική λέξη <<μύκος>>- μύκητας, που σημαίνει μανιτάρι και τη Λατινική <<toxicum>>, που σημαίνει δηλητήριο. Υποδηλώνει δηλαδή τις τοξικές χημικές ενώσεις οι οποίες παράγονται (δευτερογενείς μεταβολίτες) από ορισμένους τύπους μυκήτων και οι οποίοι αναπτύσσονται σε μερικά τρόφιμα. Αυτό βέβαια δεν σημαίνει ότι όλοι οι μύκητες είναι τοξικοί ή δηλητηριώδης. Πολλοί τύποι μυκήτων είναι χρήσιμοι και επιθυμητοί για τα τρόφιμα ή για την παραγωγή αντιβιοτικών. Οι μυκοτοξίνες θεωρούνται ως ο πιο σημαντικός μη- μολυσματικός χρόνιος παράγοντας διατροφικού κινδύνου, υψηλότερος από τα συνθετικά, τις φυτικές τοξίνες, τα πρόσθετα και τα υπολείμματα φυτοπροστατευτικών προϊόντων.(Χούχουλα και Σφλώμος, 2020)

Οι μυκοτοξίνες εμφανίζονται είτε στους αγρούς είτε στους αποθηκευτικούς χώρους. Είναι πιθανό να βρεθούν ακόμα και σε επεξεργασμένα τρόφιμα αφού πρόκειται για αρκετά σταθερές χημικές ενώσεις.

Οι μυκοτοξίνες παρουσιάζονται κυρίως όταν οι καιρικές συνθήκες κατά την ανάπτυξη των καλλιεργειών ή τη συγκομιδή είναι αντίξοες, καθώς επίσης όταν οι συνθήκες αποθήκευσης δεν είναι κατάλληλες με αποτέλεσμα να ευνοείται η ανάπτυξη των επιβλαβών αυτών μυκήτων. Οι συνθήκες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μυκήτων και κατά συνέπεια την παρουσία των μυκοτοξινών είναι η σχετική υγρασία ατμόσφαιρας > 80%, θερμοκρασία περίπου 25 °C, κακός αερισμός, και pH 4 - 4,6. Η ανιχνεύσιμη παρουσία μυκήτων στις τροφές δεν σημαίνει απαραίτητα ότι υπάρχουν μυκοτοξίνες. Αντιθέτως, η απουσία μυκήτων στα τρόφιμα, δεν σημαίνει κατ' ανάγκην την απουσία μυκοτοξινών (Χούχουλα και Σφλώμος, 2020)

Η τοξικότητα των μυκοτοξινών στον άνθρωπο και τα ζώα ποικίλλει. Έχουν αναφερθεί πολλές περιπτώσεις μεταλλαξιογένεσης, καρκινογένεσης, τερατογένεσης και ορμονικές διαταραχές. Αποτελούν σοβαρό κίνδυνο για την υγεία του ανθρώπου και των ζώων, εφόσον εισέρχονται στον οργανισμό με την τροφή του, σε αρκετά μεγάλες ποσότητες. Οι μυκοτοξίνες είναι χημικά σταθερές και ορισμένες αντέχουν και παραμένουν αφού γίνει επεξεργασία στα τρόφιμα, παρόλο που οι μύκητες από τους οποίους προέρχονται μπορεί να έχουν θανατωθεί (Χούχουλα και Σφλώμος, 2020).



### 3.2 Κυριότερες μυκοτοξίνες και οι μύκητες που τις παράγουν

Στον πίνακα 1, παρουσιάζονται οι κυριότερες μυκοτοξίνες που έχουν ταυτοποιηθεί σε τρόφιμα και οι αντίστοιχοι μύκητες που είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή τους.

**Πίνακας 1:** Μυκοτοξίνες και μύκητες που έχουν βρεθεί σε τρόφιμα

Μυκοτοξίνη	Μύκητες
Αφλατοξίνες	<i>Aspergillus flavus</i>
Ζεαραλενόνη	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>fusarium froseum</i>
Στηριγματοκυστίνη	<i>Aspergillus versicolor</i> , <i>Aspergillus nidulans</i>
Ωχρατοξίνες	<i>Penecillium viridicatum</i> , <i>Aspergillus ochraceus</i>
Πατουλίνη	<i>Penecillium patulum</i> , <i>Penecillium expansum</i> , <i>Byssochlamys nivea</i>
Κιτρινίνη	<i>Penecillium citrinum</i> , <i>Penecillium viridicatum</i>
Δεσοξυνιβαλενόλη (DON)	<i>Fusarium graminearium</i>

Πηγή: Χούγουλα & Σφλώμος, 2020

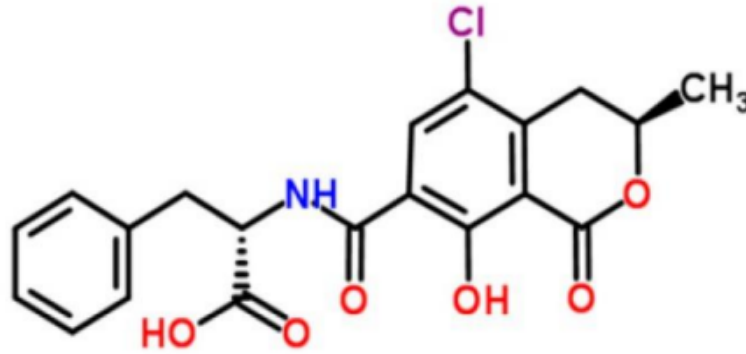
Η ωχρατοξίνη είναι μία από τις πιο συχνά απαντώμενες μυκοτοξίνες στα σταφύλια και τα παραγόμενα προϊόντα. Για το λόγο αυτό περιγράφεται αναλυτικότερα στις επόμενες παραγράφους.

### 3.2.1 Ωχρατοξίνη

Η ωχρατοξίνη Α (ΟΤΑ) η μοριακή δομή της οποίας παρουσιάζεται στο Σχήμα 4 παράγεται από μύκητες του γένους *Aspergillus ochraceus* και *Penicillium viridicatum* και εμφανίζεται σε δημητριακά, σε ξηρά φρούτα (σταφίδες), σε κρασί, σε μπίρα αλλά και σε κόκκους καφέ και κακάο (Χούχουλα και Σφλώμος, 2020).

Η ωχρατοξίνη, ιδίως η ωχρατοξίνη Α, θεωρείται ότι είναι μία από τις πέντε σημαντικότερες μυκοτοξίνες που μολύνουν τα τρόφιμα και τις ζωοτροφές. Οι αναπτυσσόμενες χώρες είναι εκείνες που επηρεάζονται περισσότερο, λόγω των κλιματικών συνθηκών και των φτωχότερων τρόπων παραγωγής που επικρατούν. Οι συνολικές δυσμενείς επιπτώσεις της διατροφικής έκθεσης στην ΟΤΑ στην υγεία του ανθρώπου είναι ακόμη ασαφείς, αν και έχουν αποδειχθεί απειλητικές συσχετίσεις. Τα κενά γνώσεων οδηγούν σε δύσκολες επιστημονικές εκτιμήσεις και σε διαφορετικούς κανονισμούς παγκοσμίως. Ο σχηματισμός μούχλας και συνεπώς και ΟΤΑ ευνοείται από τις υψηλές θερμοκρασίες και την υγρασία (Klingelhöfer et al., 2020).

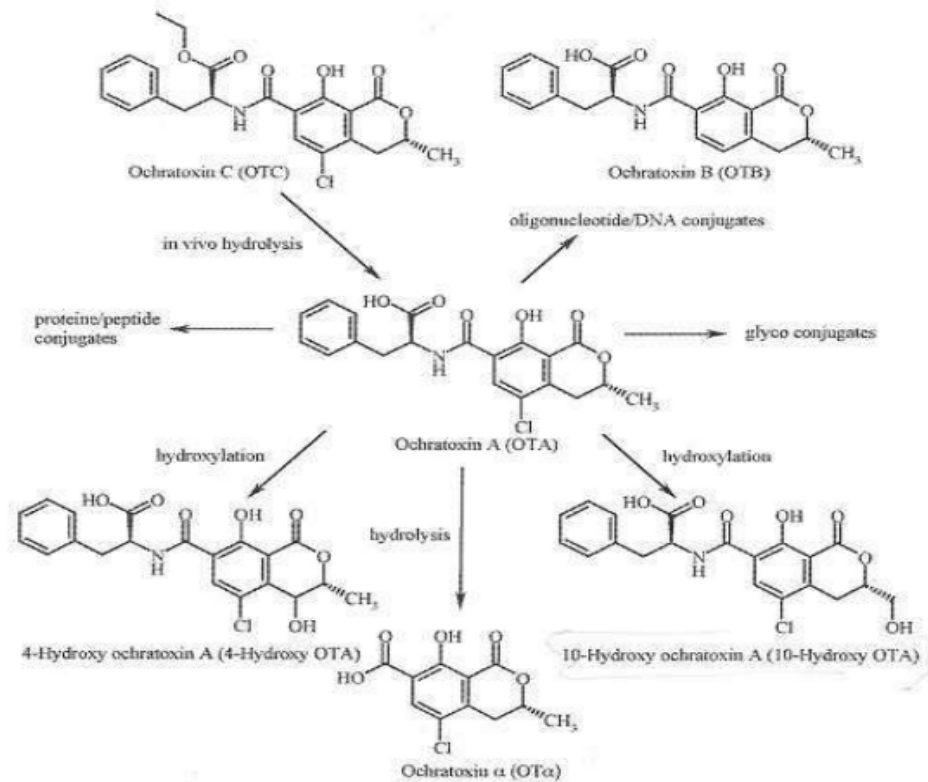
Η ΟΤΑ προκαλεί νεφρική τοξικότητα σε διάφορα είδη ζώων και όγκους στα νεφρά των τρωκτικών. Είναι γενετοξική τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*- ωστόσο, οι μηχανισμοί της γενετοξικότητας δεν είναι σαφείς. Απορροφάται και κατανέμεται ταχέως, αλλά αποβάλλεται και απεκκρίνεται αργά, με αποτέλεσμα να συσσωρεύεται δυνητικά στον οργανισμό, γεγονός που οφείλεται κυρίως στη δέσμευση της από τις πρωτεΐνες του πλάσματος και στο χαμηλό ρυθμό μεταβολισμού. Έτσι η εμφάνιση της ΟΤΑ στα τρόφιμα αποτελεί σοβαρή απειλή για την ανθρώπινη υγεία καθώς και τα ζώα. Ως εκ τούτου, είναι πολύ σημαντικό να αναπτυχθούν προσεγγίσεις για τον έλεγχο ή την αποτοξίνωση της μόλυνσης από ΟΤΑ και, συνεπώς, να διασφαλιστεί η ασφάλεια των τροφίμων (EFSA, 2020)



Σχήμα 4: Μοριακή δομή της Ωχρατοξίνης Α (Alshannaq & Yu, 2017)

### 3.2.2 Είδη και ιδιότητες ωχρατοξινών

Οι ωχρατοξίνες είναι μια ομάδα δομικά συγγενών μυκοτοξινών με παράγωγα ισοκουμαρινών που παράγονται κυρίως από ορισμένους μύκητες των γενών *Aspergillus* και *Penicillium*. Με βάση τη χημική τους δομή, οι ωχρατοξίνες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν κυρίως σε τρεις τύπους, την ωχρατοξίνη Α (OTA), την ωχρατοξίνη Β (OTB) και την ωχρατοξίνη C (OTC) (Wang et al, 2022). Από χημική άποψη, οι ωχρατοξίνες είναι ασθενή οργανικά οξέα που αποτελούνται από μια L-φαινυλαλανίνη και μια διυδροϊσοκουμαρινική ομάδα που συνδέονται με πεπτιδικό δεσμό. Οι δομές των τριών τοξινών διαφέρουν κάπως μεταξύ τους. Οι παραλλαγές αυτές, ωστόσο, έχουν σημαντικό αντίκτυπο στο πόσο τοξικές είναι η καθεμία. Όπως προαναφέρθηκε, η ωχρατοξίνη Α, είναι η πιο κοινή και ιδιαίτερα τοξική από τα τρία είδη. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 5, η ωχρατοξίνη Β (OTB) παράγεται όταν το χλώριο αντικαθίσταται από ένα άτομο υδρογόνου. Είναι 10-20 φορές λιγότερο τοξική από την ωχρατοξίνη Α, τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*. (Muller et al., 2003)



Σχήμα 5. Στάδια μετατροπής της ωχρατοξίνης

### 3.2.3 Εμφάνιση ωχρατοξίνης A στους οίνους

Οι ωχρατοξίνες είναι μυκοτοξίνες που απαντώνται συχνά στους οίνους και η μόλυνσή τους μπορεί να προκύψει κατά τη διάρκεια οποιουδήποτε σταδίου της διαδικασίας οινοποίησης. Η ωχρατοξίνη A (OTA) είναι η πιο ευρέως διαδεδομένη και εμφανίζεται κατά τη διάρκεια οποιουδήποτε σταδίου της διαδικασίας της οινοποίησης. Ωστόσο, η OTA είναι η μόνη της οποίας οι συγκεντρώσεις είναι νομοθετημένες σε αυτό το προϊόν. Η μόλυνση μπορεί να προκύψει από τα πρώτα στάδια του αποικισμού μυκοτοξινογόνων μυκήτων στα σταφύλια έως τα τελευταία στάδια της διαδικασίας συσκευασίας του οίνου. Ωστόσο, η πρωταρχική μόλυνση του τελικού προϊόντος προέρχεται από τη μεταφορά μυκοτοξινών από τα σταφύλια. Επιπλέον, η διαδικασία οινοποίησης επηρεάζει έντονα την περιεκτικότητα σε OTA, δεδομένου ότι έχουν αναφερθεί υψηλότερες συγκεντρώσεις σε ερυθρούς οίνους συγκριτικά με τις συγκεντρώσεις που έχουν βρεθεί σε ροζέ και λευκούς οίνους γενικά (Ortiz-Villeda et al, 2021)

Σε οίνους έχουν αναφερθεί και άλλες ωχρατοξίνες εκτός της OTA, αλλά επειδή παρουσιάζουν διαφορετική πολικότητα και διαλυτότητα, η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός τους με συμβατικές αναλυτικές μεθόδους καθίσταται δύσκολος, οδηγώντας σε υποεκτίμηση των συνολικών επιπέδων μυκοτοξινών. Αν και δεν ρυθμίζονται στον οίνο, η παρουσία τους αποτελεί αναμφίβολα κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία (Ortiz-Villeda et al, 2021).

Σύμφωνα με ορισμένες έρευνες, η μόλυνση με OTA εμφανίζεται όταν τα σταφύλια βρίσκονται ακόμη στο αμπέλι, κατά την περίοδο ωρίμανσης, όταν οι μυκητιακές μολύνσεις είναι πιο ενεργές. Τα είδη *Aspergillus carbonarius*, *A. ochraceus*, *A. niger*, *Penicillium verrucosum* και *P. nordicum* είναι τα κύρια είδη μυκήτων που ευθύνονται για την παραγωγή αυτής της τοξίνης στα σταφύλια, με τα είδη *Aspergillus* να είναι πιο συχνά. Η διαδικασία συγκομιδής των σταφυλιών είναι κρίσιμη όσον αφορά τη μόλυνση με μυκοτοξινογόνους μύκητες, ιδίως εάν υπάρχει έλλειψη καθαριότητας των εργαλείων και των δοχείων που χρησιμοποιούνται. Παρομοίως, η μόλυνση των σταφυλιών μπορεί επίσης να συμβεί κατά τη μεταφορά στο οινοποιείο, κατά την αποθήκευση ή λόγω απρόσεκτου χειρισμού από το προσωπικό, καθώς η φλούδα αυτών των καρπών είναι λεπτή και μπορεί εύκολα να τραυματιστεί, επιτρέποντας τον αποικισμό και την ανάπτυξη μυκοτοξινογόνων ειδών μυκήτων (Ortiz-Villeda et al, 2021).

Για τους ερυθρούς οίνους, ακολουθεί η διαδικασία εκχύλισης. Κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου, μπορεί να υπάρξει αυξημένη περιεκτικότητα σε OTA (περίπου 20%) λόγω της μακράς επαφής μεταξύ των φλοιών των σταφυλιών και του γλεύκους, η οποία ευνοεί τη διαλυτότητα και τη διάχυση αυτής της μυκοτοξίνης από τις μολυσμένες φλούδες. Από την άλλη πλευρά, η απουσία εκχύλισης για τους λευκούς και ροζέ οίνους φαίνεται να είναι ένας κρίσιμος παράγοντας που συμβάλλει στα χαμηλά επίπεδα OTA σε αυτούς τους οίνους.

Μετά την εκχύλιση για τους ερυθρούς οίνους και τη σύνθλιψη για τους λευκούς και ροζέ οίνους, ακολουθεί η αλκοολική ζύμωση, μια διαδικασία κατά την οποία τα σάκχαρα που υπάρχουν στα σταφύλια, χάρη στο μεταβολισμό των ζυμών, μετατρέπονται σε αλκοόλη. Αν και οι μυκοτοξινογόνοι μύκητες μπορούν να συνοδεύουν τα σταφύλια από τη στιγμή που βρίσκονται στο αμπέλι, η διαδικασία της ζύμωσης αναστέλλει την ανάπτυξή τους. Έχει μάλιστα αποδειχθεί ότι τα ζωντανά σπόρια του *A. carbonarius* που απομονώνονται κατά την αλκοολική ζύμωση δεν μπορούν να παράγουν OTA. Παράλληλα, στο τέλος της διαδικασίας

της αλκοολικής ζύμωσης, τα επίπεδα OTA μειώνονται κατά 35 έως 70% (Ortiz-Villeda et al, 2021).

Η παρουσία OTA στο κρασί αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1996 στην Ελβετία. Από την πρώτη αυτή αναφορά, η μυκοτοξίνη αυτή έχει περιγραφεί σε διάφορους οίνους σε διάφορες χώρες παγκοσμίως (Ortiz-Villeda et al, 2021).

### 3.2.3 Εμφάνιση ωχρατοξίνης Α στους χυμούς σταφυλιών, στο ξύδι από κρασί και στις σταφίδες

Ορισμένοι ερευνητές εξέτασαν τους χυμούς σταφυλιών για μόλυνση από OTA, δεδομένου ότι οι χυμοί φρούτων πιστεύεται ότι περιέχουν OTA και τα παιδιά μπορεί να τους καταναλώνουν. Πιο συγκεκριμένα, κάποιες έρευνες έδειξαν πως η αναλογία των δειγμάτων χυμού σταφυλιών που περιείχαν OTA ήταν αρκετά υψηλή, κυρίως για τον κόκκινο χυμό σταφυλιών, ενώ ήταν χαμηλότερη για τα δείγματα λευκού χυμού σταφυλιών (Majerus & Otteneder, 1996; Majerus et al., 2000; Zimmerli & Dick, 1996). Για παράδειγμα σε ένα γερμανικό δείγμα χυμού σταφυλιών, η συγκέντρωση OTA έφτασε τα 5,26  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Miraglia & Brega, 2002). Οι Lacher & Nicolini (2001) ανακάλυψαν ότι κάθε δείγμα συμπυκνωμένου γλεύκους σταφυλιών ήταν μολυσμένο. Επιπλέον, μολυσμένοι χυμοί σταφυλιών και γλεύκη λευκών και κόκκινων σταφυλιών ανακαλύφθηκαν από τους Burdaspal & Legarda (1999). Στην τελευταία περίπτωση, τα μετρούμενα επίπεδα OTA ήταν 0,045  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Δεδομένου ότι τα παιδιά συγκαταλέγονται μεταξύ των βασικών χρηστών και ότι ο χυμός σταφυλιών καταναλώνεται σε μεγαλύτερες ποσότητες συγκριτικά με το κρασί, απαιτούνται πρόσθετες πληροφορίες σχετικά με την επικράτηση της OTA στο υγρό μέρος των σταφυλιών. Στην Τουρκία, ο συμπυκνωμένος χυμός σταφυλιών που έχει βράσει είναι γνωστός ως «rekmez». Πέντε έως έξι φορές μεγαλύτερες ποσότητες OTA ανιχνεύθηκαν στο τελικό προϊόν (10-50  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) όταν για την παρασκευή του χρησιμοποιήθηκαν χυμοί σταφυλιών μολυσμένοι με OTA (Arıcı et al., 2004).

Ωχρατοξίνη έχει επίσης προσδιοριστεί και στο ξύδι (Markaki, et al., 2001; Majerus et al., 2000). Οι Majerus et al., (2000) ανίχνευσαν την OTA σε όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν, με το βαλσάμικο ξύδι να είναι το πιο μολυσμένο (0,17  $\mu\text{g L}^{-1}$  κατά μέσο όρο). Οι Markaki, et al., (2001) προσδιόρισαν την OTA σε 19 από τα 38 αναλυθέντα δείγματα οινικού ξυδιού (0,22  $\mu\text{g L}^{-1}$  κατά μέσο όρο) και σε όλα τα

βαλσάμικα ξύδια (3,11  $\mu\text{g L}^{-1}$  κατά μέσο όρο). Πιο πρόσφατα, στη Γερμανία, δείγματα κόκκινου βαλσαμικού ξύδι, λευκού βαλσάμικου ξύδι και ξύδι από κρασί βρέθηκαν να έχουν 6,4  $\mu\text{g L}^{-1}$ , 3,4  $\mu\text{g L}^{-1}$  και 1.9  $\mu\text{g L}^{-1}$  OTA, αντίστοιχα, από τους Engelhardt & Sparrer (2005). Το ξύδι από λευκό κρασί, το ξύδι από κόκκινο κρασί και το βαλσαμικό ξύδι είχαν μέση τιμή συγκέντρωσης OTA 0,06,  $\mu\text{g L}^{-1}$  0,09  $\mu\text{g L}^{-1}$  και 0,72  $\mu\text{g L}^{-1}$ , αντίστοιχα.

Οι σταφίδες έχουν συνήθως πολύ μεγαλύτερα επίπεδα μόλυνσης από αφλατοξίνες από ό,τι τα κρασιά ή οι χυμοί σταφυλιών (σε ορισμένες έρευνες βρέθηκαν επίπεδα OTA που φτάνουν τα 50-70  $\mu\text{g/kg}$ ) (Miraglia & Brera, 2002). Η περιεκτικότητα των σταφιδών σε OTA έχει διερευνηθεί σε διάφορα ευρωπαϊκά κράτη (Miraglia & Brera, 2002). Σύμφωνα με τους Miraglia & Brera (2002), η μέση συγκέντρωση των αποξηραμένων φρούτων με OTA ήταν 2,3  $\mu\text{g/kg}$ , χωρίς σημαντικές διαφορές μεταξύ των βόρειων και νότιων περιοχών της Ευρώπης. Ο Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας (2001) αναφέρει ότι μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στις ΗΠΑ σχετικά με την περιεκτικότητα σε ωχρατοξίνη αποξηραμένων αμπελοειδών, έδειξαν πως οι μέσες τιμές επιπέδων μόλυνσης με OTA κυμαίνονταν από 0,42  $\mu\text{g/kg}$  έως 1,27  $\mu\text{g/kg}$ .

### 3.3 Μέτρα αντιμετώπισης εμφάνισης μυκοτοξινών

Η εμφάνιση των μυκοτοξινών στα τρόφιμα αποτελεί σοβαρή απειλή για την ανθρώπινη υγεία καθώς και τα ζώα. Ως εκ τούτου, είναι πολύ σημαντικό να αναπτυχθούν προσεγγίσεις για τον έλεγχο ή την απομάκρυνση της μόλυνσης από μυκοτοξίνες και, συνεπώς, να διασφαλιστεί η ασφάλεια των τροφίμων. Στον Πίνακα 2 φαίνονται οι τρόποι αντιμετώπισης και πρόληψης των μυκοτοξινών στις διάφορες περιόδους της καλλιέργειας (Awuchi et al., 2021).

**Πίνακας 2:** Τρόποι πρόληψης και αντιμετώπισης μυκοτοξινών

Κατά την περίοδο της καλλιέργειας	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Αποφυγή μόλυνσης από έντομα και ζιζάνια</li><li>▪ Χρήση φαρμάκων κυρίως μυκητοκτόνων</li><li>▪ Συνθήκες υγρασίας (να μην είναι αυξημένη)</li><li>▪ Ορθή λίπανση και άρδευση</li><li>▪ Χρήση αμειψισποράς</li><li>▪ Χρήση υγείων σπόρων</li><li>▪ Απομάκρυνσης όλης της καλλιέργειας πριν την</li></ul>
Κατά την περίοδο της συγκομιδής	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Αποφυγή των βλαβών με την σωστή συλλογή των καρπών</li><li>▪ Απόρριψη υπερώριμων και αλλοιωμένων καρπών</li><li>▪ Καθαρισμός εξοπλισμού συλλογής των καρπών</li></ul>
Κατά την περίοδο της αποθήκευσης	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας, αέρα και υγρασίας κατά την αποθήκευση</li><li>▪ Καθαριότητα αποθήκευση</li></ul>
Φυσικοί, χημικοί και βιολογικοί τρόποι	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Θερμική επεξεργασία</li><li>▪ Ξεφλούδισμα καρπών</li><li>▪ Αποξήρανση</li><li>▪ Υπεριώδης και γ ακτινοβολία</li><li>▪ Χρήση ενεργού άνθρακα και μπετονίτη, οξειδωτικών παραγόντων, οξέων και βάσεων, μη τοξικογόνων μυκήτων και βακτηρίων</li><li>▪ Χρήση χιτοζάνης (αντιοξειδωτικών) και όζοντος</li><li>▪ Χρήση κρύου πλάσματος (μη θερμική τεχνολογία)</li><li>▪ Χρήση αμμωνίας και ενυδατωμένο οξείδιο</li></ul>



### 3.3.1 Ελαχιστοποίηση της μόλυνσης επιτραπέζιων σταφυλιών και σταφίδας από ωχρατοξίνη A

Δεδομένου ότι η ΟΤΑ συγκεντρώνεται σε μούρα με εμφανείς ζημιές (Guzev et al., 2006; Leong et al., 2007), τα επιτραπέζια σταφύλια θα πρέπει να ελέγχονται προσεκτικά οπτικά για τον εντοπισμό και την εξάλειψη τυχόν αποχρωματισμένων ή μολυσμένων μούρων. Το μαύρο είδος *Aspergillus* ήταν λιγότερο κοινό όταν τα επιτραπέζια σταφύλια αποθηκεύονταν στους 0°C με διοξείδιο του θείου (Lichter et al., 2005).

Επειδή η αναλογία του *A. Carbonarius* προς το *A. Niger* αυξάνεται μετά την ξήρανση, οι σταφίδες είναι πιο ευάλωτες στη μόλυνση με ΟΤΑ σε σχέση με τα οινοποιήσιμα σταφύλια (Valero et al., 2005; Gómez et al., 2006). Ο μύκητας *A. Niger*, ο οποίος σπάνια αναπτύσσει ΟΤΑ, είναι το κυρίαρχο είδος στους αμπελώνες μέχρι τη συγκομιδή (Chulze et al., 2006; Leong et al., 2006a; Varga & Kozakiewicz, 2006). Από την άλλη πλευρά, το *A. Carbonarius* ευδοκίμει όταν τα σταφύλια αποξηραίνονται και σχεδόν όλα τα στελέχη του αναπτύσσουν ΟΤΑ, συχνά με τη δραστικότητα νερού 0,92 (Leong et al., 2006b; Valero et al., 2006; Leong et al., 2007). Η πιθανότητα παραγωγής ΟΤΑ μειώνεται όταν τα σταφύλια ξηραίνονται γρήγορα πάνω από τους 30 °C σε κατάλληλη ενεργότητα νερού, καθώς η παραγωγή τοξίνης προτιμάται σε χαμηλές θερμοκρασίες. Όσον αφορά τα επιτραπέζια σταφύλια, η μόλυνση με ΟΤΑ συνδέεται με τον αποχρωματισμό των καρπών, ο οποίος εμφανίζεται ως αποξηραμένα, πιο σκούρα μούρα. Σύμφωνα με τους Leong et al. (2006a), η διαλογή για τον αποκλεισμό αυτών των μούρων μειώνει τη συνολική μόλυνση από ΟΤΑ.

### 3.3.2 Ελαχιστοποίηση της ωχρατοξίνης A κατά την οινοποίηση

Για την ελαχιστοποίηση της εμφάνισης της ΟΤΑ κατά την οινοποίηση απαιτείται προσοχή στα διαφορετικά στάδια της διαδικασίας όπως για παράδειγμα κατά τη συγκομιδή πρέπει να πραγματοποιείται γρήγορη μετακίνηση των σταφυλιών στο οινοποιείο ώστε να αποφεύγεται η απώλεια χυμού κατά τη μεταφορά, (Rousseau et al., 2005), να εφαρμόζεται ψυχρή αποθήκευση των συγκομισμένων σταφυλιών και να διατηρούνται οι συνθήκες υγιεινής. Με τον τρόπο αυτό τα οινοποιεία μειώνουν την πιθανότητα μόλυνσης από ΟΤΑ μετά τη συγκομιδή (Gambutì et al., 2005). Σύμφωνα με τον Rosset (2003), η σταθεροποίηση του γλεύκους των σταφυλιών με παστερίωση ή προσθήκη θειώδους άλατος στην αρχή της επεξεργασίας σταματά την ανάπτυξη μυκήτων και την επακόλουθη δημιουργία ΟΤΑ.

Στις φάσεις διαχωρισμού στερεού-υγρού της οινοποίησης, αποβάλλεται σημαντική ποσότητα ΟΤΑ. Οι Leong et al., (2006d) και Fernandes et al., (2007) παρατήρησαν ότι το 50-80% της συνολικής περιεκτικότητας σε ΟΤΑ που υπήρχε αρχικά στα θρυμματισμένα σταφύλια συνδέθηκε με τις φλούδες και τους σπόρους που απορρίφθηκαν κατά τη διάρκεια της διαδικασίας έκθλιψης, η οποία χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό του οίνου ή του χυμού από τις φλούδες. Μετά την αρχική αλκοολική ζύμωση των μικτών φλοιών, των σπόρων και του χυμού, πραγματοποιείται η έκθλιψη για την παρασκευή του κόκκινου κρασιού. Στο πλαίσιο αυτό, οι Gambuti et al. (2005) παρατήρησαν ότι η συμπίεση σε μεγαλύτερες πιέσεις για την εξαγωγή περισσότερου οίνου αύξησε επίσης την περιεκτικότητα του οίνου σε ΟΤΑ. Πηκτωματολυτικά ένζυμα μπορούν να προστεθούν στα θρυμματισμένα σταφύλια πριν από την έκθλιψη, προκειμένου να βελτιωθεί η εκχύλιση του χυμού και η επακόλουθη καθίζηση των στερεών σταφυλιών κατά την παρασκευή λευκού οίνου. Σύμφωνα με τους Leong et al., (2006c), τα ένζυμα αυτά δεν φαίνεται να βοηθούν ή να εμποδίζουν την απομάκρυνση της ΟΤΑ κατά τη διάρκεια της έκθλιψης ή της διαύγασης του χυμού. Παρομοίως, η προσθήκη μπεντονίτη, ενός παράγοντα λεπτότητας, στο χυμό λευκών σταφυλιών δεν βελτίωσε την απομάκρυνση της ΟΤΑ.

Κατά την αρχική αλκοολική ζύμωση, οι ζύμες δεν διασπούν την ΟΤΑ (Leong et al., 2006d; Leong, 2007). Αντ' αυτού, οι μαννοπρωτεΐνες των ζυμών, οι οποίες διαφέρουν ως προς την προσροφητική τους ικανότητα, απορροφούν την τοξίνη (Caridi, 2006). Ως εκ τούτου, στελέχη ζύμης που παρουσιάζουν βελτιωμένη δέσμευση ΟΤΑ μπορούν να επιλεγούν για τη ζύμωση ή να εισαχθούν αργότερα για την παρασκευή νεκρών κυττάρων.

Ο πιο αποτελεσματικός τρόπος για την απομάκρυνση της ΟΤΑ από τον οίνο είναι η χρήση βελτιωτικών που περιλαμβάνουν άνθρακα, όπως ο ενεργός άνθρακας, αν και μερικές φορές μπορεί να υποβαθμίσουν την ποιότητα του οίνου (Varga and Kozakiewicz, 2006; Leong, 2007). Η αυγοαλβουμίνη και η ζελατίνη είναι παραδείγματα πρωτεϊνούχων ενώσεων που δεσμεύουν την ΟΤΑ. Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα αυτών των παραγόντων, καθώς και άλλων παραγόντων όπως ο μπεντονίτης και τα κυτταρικά τοιχώματα ζύμης, μπορεί να εξαρτάται από την παρουσία άλλων πρωτεϊνών σταφυλιών. Οι Leong et al., (2006c) πρότειναν ότι οι παράγοντες που

απομακρύνουν πρωτεΐνες, όπως ο μπεντονίτης, μπορεί επίσης να απομακρύνουν την ΟΤΑ που συνδέεται με αυτές τις πρωτεΐνες. Οι διαλυτές πρωτεΐνες των σταφυλιών στον οίνο μπορεί να ανταγωνίζονται τις πρωτεΐνες των λεπτών υλών για τη δέσμευση της ΟΤΑ, περιορίζοντας την αποτελεσματικότητα αυτών των παραγόντων. Αν και οι αναφορές σχετικά με τη σταθερότητα της ΟΤΑ στον τελικό οίνο κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης είναι διάφορες, έχει σημειωθεί ότι η συγκέντρωση της ΟΤΑ μπορεί να μειωθεί έως και 29% κατά τη διάρκεια 10-14 μηνών (Leong, 2007).

## 3.4 Νομοθεσία

### 3.4.1 Ευρωπαϊκή Νομοθεσία

Σύμφωνα με τον Καν. 915/2023 τα μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα για τις μυκοτοξίνες παρουσιάζονται στον πίνακα 3.

**Πίνακας 3.** Μέγιστα επιτρεπτά όρια Ωχρατοξίνης Α στα σταφύλια και τα προϊόντα τους σύμφωνα με την νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης Καν. 915/2023.

Ωχρατοξίνη Α	
Προϊόν	Μέγιστο επιτρεπτό επίπεδο (μg/kg)
Σταφίδες	8,0
Οίνος	2,0
Αρωματισμένοι οίνοι, αρωματισμένα ποτά με βάση τον οίνο και αρωματισμένα κοκτέιλ αμπελοοινικών προϊόντων	2,0
Χυμός σταφυλιών, χυμός σταφυλιών από συμπύκνωμα, συμπυκνωμένος χυμός σταφυλιών, νέκταρ σταφυλιών και συμπυκνωμένο γλεύκος σταφυλιών, που διατίθενται στην αγορά για τον τελικό καταναλωτή	2,0

Η Ευρωπαϊκή Νομοθεσία κατατάσσει τις μυκοτοξίνες στους επιμολυντές των τροφίμων. Σύμφωνα με τις επιπτώσεις που προκαλούν στον άνθρωπο οι μυκοτοξίνες, είναι απαραίτητο να μειωθεί η περιεκτικότητα σε μυκοτοξίνες στα τρόφιμα.

Πολλοί παράγοντες όπως είναι τα τοξικά δεδομένα, ο μεταβολισμός των μυκοτοξινών, η οξεία και η χρόνια τοξικότητα πρέπει να ληφθούν υπόψιν για να οριοθετηθούν τα μέγιστα όρια των μυκοτοξινών που θα πρέπει να υπάρχουν στα τρόφιμα. Για την θέσπιση των ορίων συμμετέχουν πολλοί οργανισμοί (European Commission, 2023)

Τα τρόφιμα που έχουν υποστεί διαλογή ή άλλη φυσική κατεργασία για τη μείωση των επιπέδων επιμόλυνσης μπορούν να διατίθενται στην αγορά υπό τον όρο ότι δεν σημειώνεται

υπέρβαση των μέγιστων επιτρεπτών επιπέδων που καθορίζονται στον παραπάνω πίνακα για τα τρόφιμα που διατίθενται στην αγορά για τον τελικό καταναλωτή ή για χρήση ως συστατικά σε τρόφιμα και ότι δεν προέκυψαν από την κατεργασία άλλα επιβλαβή κατάλοιπα (European Commission, 2023)

Ο κωδικός αναγνώρισης φορτίου/παρτίδας σημειώνεται ανεξίτηλα σε κάθε επιμέρους συσκευασία του φορτίου και στο πρωτότυπο του συνοδευτικού εγγράφου. Η επιχειρηματική δραστηριότητα του παραλήπτη του φορτίου που αναγράφεται στο συνοδευτικό έγγραφο είναι συμβατή με τη χρήση για την οποία προορίζεται (European Commission, 2023).

## 4. Μέθοδοι ανάλυσης μυκοτοξινών

### 4.1 Προετοιμασία δείγματος

Η ανάλυση των ρύπων και των υπολειμμάτων επιμολυντών των τροφίμων όπως οι μυκοτοξίνες γίνεται συχνά μετά την προετοιμασία των δειγμάτων, η οποία περιλαμβάνει: ομογενοποίηση, εκχύλιση, κλασματοποίηση/καθαρισμό, προσυγκέντρωση, και κάποιες φορές απαιτείται παραγωγοποίηση .

Οι νομοθετικοί περιορισμοί όσον αφορά τα ανώτατα επιτρεπτά όρια συγκεντρώσεων για τους επιμολυντές στα τρόφιμα γίνονται όλο και πιο αυστηροί, γεγονός που οδηγεί στην ανάγκη ανάπτυξης μεθόδων ακόμη πιο ευαίσθητων, και αξιόπιστων. Για τον σκοπό αυτό δίνεται ιδιαίτερη έμφαση στην ανάπτυξη κατάλληλων μεθόδων προετοιμασίας δειγμάτων για την απομόνωση και ανάλυση των επιμολυντών.

Παρόλο που η προετοιμασία του δείγματος και η δειγματοληψία είναι χρονοβόρες και απαιτητικές διαδικασίες, είναι απαραίτητο βήμα για τη λήψη χρήσιμων αναλυτικών αποτελεσμάτων. Κατά την δειγματοληψία και την προετοιμασία του δείγματος, υπάρχει σημαντική πιθανότητα λάθους και μόλυνσης, η οποία δεν μπορεί να εξαλειφθεί σε κανένα στάδιο της επακόλουθης ανάλυσης. Κατά συνέπεια, είναι σημαντικό να δημιουργηθεί και να επικυρωθεί ένα επαρκές σχέδιο για τη δειγματοληψία, αποθήκευση και επεξεργασία δειγμάτων με τη χρήση στατιστικής ανάλυσης. Είναι δύσκολο να ληφθεί ένα δείγμα που να αντιπροσωπεύει με ακρίβεια τη συγκέντρωση των χημικών ιχνών σε ένα ποικίλο μείγμα (Nielsen et al., 2010).

#### 4.1.1 Δειγματοληψία

Η ακρίβεια των επιπέδων των μυκοτοξινών, οι οποίες κατανέμονται με ανομοιόμορφο τρόπο σε μία παρτίδα καθορίζεται από την δειγματοληψία. Επομένως, θα πρέπει να καθοριστούν κανόνες για την ορθή μέθοδο δειγματοληψίας. Η δειγματοληψία σχετίζεται με την επιλογή ενός αντιπροσωπευτικού δείγματος από το σύνολο ενός προϊόντος, που θα γίνει η ανάλυση.

Είναι σημαντικό να γίνει σωστά διότι οι μυκοτοξίνες είναι ανομοιόμορφα κατανεμημένες στα τρόφιμα (ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 401/2006). Ένας τρόπος για

να γίνει σωστά μια δειγματοληψία είναι η συλλογή πολλών μικρών δειγμάτων από πολλαπλές διαφορετικές τοποθεσίες, τη δημιουργία ενός ενιαίου δείγματος, την άλεση του σύνθετου δείγματος και στην συνέχεια η εργαστηριακή ανάλυση. Ο αριθμός των συνολικών δειγμάτων που θα χρειαστούν εξαρτώνται από το μέγεθος της παρτίδας (Nielsen et al., 2010).

#### 4.1.2 Ομογενοποίηση δείγματος

Σε πολλές περιπτώσεις, οι επιμολυντές των τροφίμων διασπείρονται άνισα μέσα στην τροφική αλυσίδα. Για παράδειγμα, η πλειονότητα των φυτοφαρμάκων προβλέπεται να βρεθεί στην επιφάνεια των φρέσκων προϊόντων. Επομένως, για μια αξιόπιστη και ακριβή εξέταση απαιτείται ομογενοποίηση και αφαίρεση μη βρώσιμων συστατικών (εξωτερικές φλούδες, στελέχη και πυρήνες), όπου ενδείκνυται. Η άλεση ή ο τεμαχισμός είναι ένας τρόπος για να επιτευχθεί η ομογενοποίηση και η ανάμειξη. Εκτός από την ομογενοποίηση, η άλεση βελτιώνει την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης μειώνοντας τα δομικά χαρακτηριστικά του δείγματος. Είναι προτιμότερο να αποφεύγεται η μόλυνση του δείγματος ή η υποβολή του σε υπερβολική θερμότητα, καθώς οι ενέργειες αυτές μπορεί να οδηγήσουν σε εξάτμιση ή αποικοδόμηση ρύπων ή υπολειμμάτων. Η κρυοαπότριψη μπορεί να είναι η μέθοδος επιλογής για μαλακά δείγματα προκειμένου να αποφευχθεί η θερμική βλάβη (Nielsen et al., 2010).

#### 4.1.3 Εκχύλιση και καθαρισμός

##### 4.1.3.1 Γενικά

Σύμφωνα με τον Καν 401/2006 η εκχύλιση είναι ένα σημαντικό στάδιο για τον προσδιορισμό των μυκοτοξινών στα διαφορά υποστρώματα και προϊόντα.. Δεν υπάρχει μια ενιαία τεχνική που να λειτουργεί για όλα τα δείγματα, καθώς οι μυκοτοξίνες μπορεί να μολύνουν διάφορους τύπους προϊόντων. Μία από τις συχνά χρησιμοποιούμενες μεθόδους για την εκχύλιση μυκοτοξινών σε γεωργικά προϊόντα είναι η εκχύλιση υγρού-στερεού. Η διαδικασία εκχύλισης βασίζεται κυρίως στη διαλυτότητα των μυκοτοξινών σε διάφορους οργανικούς διαλύτες και εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των προϊόντων που έχουν μολυνθεί με μυκοτοξίνη.

Οι μυκοτοξίνες είναι διαλυτές σε ήπια έως μέτρια πολικούς διαλύτες, επομένως για την εκχύλιση χρησιμοποιούνται συνήθως οργανικοί διαλύτες ή

συνδυασμοί οργανικών διαλυτών, όπως η ακετόνη, η μεθανόλη και το χλωροφόρμιο. Επιπλέον, η χρήση μικρών ποσοτήτων νερού με τους διαλύτες που αναφέρονται παραπάνω βελτιώνει την εκχύλιση των μυκοτοξινών με τη διαβροχή του υποστρώματος, η οποία αυξάνει την ποσότητα των οργανικών διαλυτών που διεισδύουν στο δείγμα. Οι πιο δημοφιλείς συνδυασμοί διαλυτών για την απομόνωση μυκοτοξινών από διάφορα τρόφιμα είναι τα μείγματα ακετονιτριλίου-νερού, μεθανόλης-νερού, μεθανόλης-ακετονιτριλίου- νερού και χλωροφορμίου-νερού. Ένα πλεονέκτημα του διαλύτη μεθανόλης-νερού είναι ότι είναι λιγότερο επικίνδυνος από τους συνδυασμούς ακετονιτριλίου (Kizis et al., 2021).

Ένα επίσης πολύ σημαντικό βήμα κατά την προετοιμασία δειγμάτων τροφίμων για τον προσδιορισμό μυκοτοξινών είναι ο καθαρισμός του δείγματος ο οποίος μπορεί να επηρεάσει την ποιότητα των αποτελεσμάτων. Η διαδικασία του καθαρισμού, που συχνά πραγματοποιείται μετά την αρχική εκχύλιση, χρησιμοποιείται στις πιο πολλές μεθόδους που αφορούν την ανάλυση μυκοτοξινών. Τα σκεύη που χρησιμοποιούνται είναι απαραίτητο να είναι αποστειρωμένα χωρίς κανένα ίχνος μυκοτοξίνης. Ο τύπος του ανιχνευτή και η χρωματογραφική τεχνική που χρησιμοποιούνται στη μελέτη θα καθορίσουν το είδος του καθαρισμού που είναι απαραίτητος. Ο καθαρισμός γίνεται με σκοπό τον διαχωρισμό των αναλυτών-στόχων από τα υπόλοιπα συστατικά της μήτρας του δείγματος που έχουν επίσης εκχυλιστεί και που μπορούν να παρεμποδίσουν την ανίχνευσή και την ποσοτικοποίησή τους. Η παρασκευαστική χρωματογραφία είναι μια τεχνική που πραγματοποιείται κάποιες φορές μετά από ένα προκαταρκτικό στάδιο καθαρισμού. (Nielsen et al., 2010). Η πλειονότητα των τεχνικών που χρησιμοποιούνται κυρίως στην ανάλυση μυκοτοξινών βασίζεται σε μια διαδικασία καθαρισμού που εκτελείται μετά την εκχύλιση. Οι κυριότερες τεχνικές εκχύλισης είναι οι παρακάτω (Ταραντίλης & Παππάς, 2015):

1. Εκχύλιση στερεών με υγρό (extraction). Αναφέρεται στη διαλυτοποίηση ενός ή περισσότερων συστατικών μείγματος στερεών σε κατάλληλο διαλύτη.
2. Εκχύλιση υγρού ή στερεού σώματος διαλυμένου σε υγρό από άλλο υγρό (Liquid Liquid Extraction, LLE), δηλαδή η εκχύλιση ενός διαλύματος ουσιών με ένα υγρό.
3. Εκχύλιση στερεής φάσης (Solid Phase Extraction, SPE). Χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό ουσιών από υγρά δείγματα, με διέλευση της υγρής φάσης μέσα από στερεό



προσροφητικό υλικό, οπότε οι προς διαχωρισμό ουσίες προσροφούνται στη στερεή φάση.

#### *4.1.3.2 Υγρή- υγρή εκχύλιση (LLE)*

Κατά την υγρό – υγρό εκχύλιση χρησιμοποιείται η διαφορετική διαλυτότητα της τοξίνης στην υδατική φάση και στην μη αναμίξιμη οργανική φάση. Με τον τρόπο αυτό εκχυλίζεται η ουσία στον έναν από τους δύο διαλύτες ενώ η υπόλοιπη μήτρα του δείγματος παραμένει στον άλλο διαλύτη. Αυτή η μέθοδος λειτουργεί καλά για πολλές τοξίνες. Η απώλεια δείγματος από την προσρόφηση σε γυάλινα σκεύη αποτελεί μειονέκτημα της διαδικασίας. Επίσης, είναι χρονοβόρα τεχνική και εξαρτάται από τη φύση της μήτρας του δείγματος που θα αναλυθεί και τις ενώσεις που είναι προς προσδιορισμό (Turner et al., 2009).

#### *4.1.3.3 Εκχύλιση στερεής φάσης (SPE)*

Η συγκεκριμένη τεχνική γίνεται με γυάλινες ή πλαστικές μικροστήλες με στέρεο προσροφητικό υλικό (συνήθως διοξείδιο του πυριτίου) με χημικά συνδεδεμένες ομάδες, με σκοπό την εξασφάλιση ποικίλων προσροφητικών ιδιοτήτων. Είναι πιθανόν να γίνουν διαφορά είδη εκχυλίσεων όπως πολικές, μη πολικές, ομοιοπολικές κ.α, ανάλογα με τις δραστικές ομάδες. Στις περισσότερες περιπτώσεις οι προσδιοριζόμενες ενώσεις εκλούνται από το προσροφητικό υλικό με έναν διαλύτη υπό συνθήκες χαμηλής πίεσης και στη συνέχεια γίνεται αλλαγή διαλύτη για να ακολουθήσει η κυρίως ανάλυση. (Ταραντίλης & Παππάς, 2015).

## 4.2 Χρωματογραφικές τεχνικές

### 4.2.1 Γενικά

Η χρωματογραφική ανάλυση των μυκοτοξινών είναι μια διαδικασία πολλών βημάτων που περιλαμβάνει την προετοιμασία των δειγμάτων, την εκχύλιση των μυκοτοξινών και στη συνέχεια, την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των αποτελεσμάτων. Ωστόσο, ένας σημαντικός αριθμός παραγόντων, όπως η ποικιλομορφία των μυκοτοξινογόνων μυκήτων, η μεταβλητότητα των χημικών δομών των μυκοτοξινών, η κατανομή των ουσιών

αυτών στα προϊόντα της τροφικής αλυσίδας και η πολυπλοκότητα της μήτρας των τελευταίων, καθιστούν δύσκολη την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των ουσιών αυτών, καθώς και την ανάπτυξη και προσαρμογή μιας τυποποιημένης αναλυτικής τεχνικής. Αξιόπιστα αναλυτικά αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού μυκοτοξινών απαιτούν ένα σχέδιο δειγματοληψίας και προετοιμασίας των δειγμάτων, ιδίως σε περιπτώσεις όπου τα σταφύλια θεωρούνται ενδιάμεσα και πρώτες ύλες που θα υποστούν περαιτέρω επεξεργασία, όπως στην παραγωγή χυμών, κρασιού και αποξηραμένων σταφυλιών. Οι μυκοτοξίνες είναι συχνά ακανόνιστα κατανομημένες στην πρώτη ύλη και μπορεί να παρουσιάζουν πολύ υψηλές συγκεντρώσεις σε περιοχές όπου έχει σημειωθεί ανάπτυξη μυκήτων. Τέλος, πριν από την προετοιμασία για την τελική ανάλυση, το δείγμα πρέπει να έχει ομογενοποιηθεί καλά. Η προετοιμασία του δείγματος περιλαμβάνει την εκχύλιση της τοξίνης από το προϊόν, τον καθαρισμό του εκχυλίσματος για την απαλλαγή από τις προσμίξεις και μερικές φορές την προσυγκέντρωση της επιθυμητής μυκοτοξίνης όταν απαιτείται υψηλό επίπεδο ευαισθησίας στην ανίχνευση (Kizis et al., 2021).

Οι χρωματογραφικές αναλυτικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό των μυκοτοξινών περιλαμβάνουν :

I) χρωματογραφία λεπτού στρώματος (Thin Layer Chromatography, TLC) και χρωματογραφία λεπτού στρώματος υψηλής απόδοσης (High-Performance Thin Layer Chromatography, HPTLC), η οποία αποτελεί μια βελτιωμένη έκδοση για την ενίσχυση της διαχωριστικής ικανότητας και της ακρίβειας.

II) υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC) σε συνδυασμό με ανιχνευτές φθορισμού (FLD), υπεριώδους (UV) ή ανιχνευτών συστοιχίας διόδων (Diode Array Detectors, DAD).

III) υγρή χρωματογραφία υπερυψηλής απόδοσης (Ultra High-Performance Liquid Chromatography, UHPLC).

IV) υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (Liquid Chromatography - Mass Spectrometry, LC -MS) και φασματομετρία μάζας διαδοχικής μάζας (LC -MS/MS)

V) αέριο χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC) σε συνδυασμό με ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD), ιοντισμού φλόγας (FID) ή φασματομετρίας

μάζας (MS) που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση των πτητικών μυκοτοξινών.

Η φασματομετρία μάζας είναι μια τεχνική που έχει τη δυνατότητα της ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης πολλαπλών μυκοτοξινών ταυτόχρονα (πάνω από 100 μυκοτοξίνες σε μία μόνο ανάλυση) σε μια μεγάλη ποικιλία δειγμάτων τροφίμων. Όσον αφορά τη χρήση της φασματομετρίας μάζας σε συνδυασμό με χρωματογραφικές τεχνικές, υπάρχουν διαφορετικοί τρόποι σύζευξης, όπως ο χημικός ιοντισμός ατμοσφαιρικής πίεσης (APCI), ο ιοντισμός ηλεκτροψεκασμού (ESI) και ο φωτοϊοντισμός ατμοσφαιρικής πίεσης (Kizis et al., 2021).

#### 4.2.2 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) είναι μια τεχνική στην αναλυτική χημεία η οποία χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό, την ταυτοποίηση, και τον ποσοτικό προσδιορισμό ενώσεων που περιέχονται σε πολύπλοκα μίγματα. Στην HPLC διακρίνουμε 2 φάσεις :

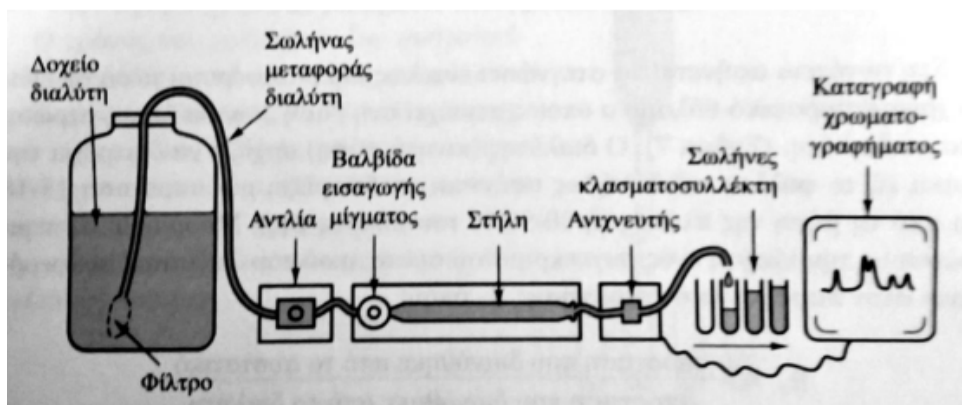
- Τη στατική φάση, η οποία μπορεί να είναι πολική (κανονική φάση) ή άπολη (αντίστροφης φάσης) και αποτελείται από στέρεο πορώδες υλικό, ή υγρό καθηλωμένο σε στέρεο υπόστρωμα πολύς μικρής διαμέτρου, που βρίσκεται μέσα στην στήλη. Οι ενώσεις κατακρατούνται στο υλικό της στήλης με διάφορους μηχανισμούς.
- Την κινητή φάση που ρέει μέσα στο σύστημα ως διαλυτής ή μίγμα διαλυτών και χρησιμοποιούνται είτε μη πολικοί διαλυτές, όπως εξάνιο, ενώ δεν περιέχεται νερό στην περίπτωση της χρωματογραφίας κανονικής φάσης ή πολικοί διαλύτες όπως νερό, μεθανόλη και ακετονιτρίλιο στην περίπτωση της χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης. Η κινητή υγρή φάση περνάει μέσα από μια στήλη που περιέχει τη στατική φάση, υπό την επίδραση ελεγχόμενης πίεσης. Η διαδικασία αυτή γίνεται με τη βοήθεια αντλιών πίεσης και έτσι οι δύσκολοι διαχωρισμοί γίνονται πολύ γρήγορα. (Μπρατάκος, 2021).

##### 4.2.2.1 Οργανολογία HPLC

Τα σπουδαιότερα μέρη ενός συστήματος HPLC είναι τα εξής (Μπρατάκος, 2021):

1. Φιάλη αποθήκευσης διαλυτών
2. Σύστημα της αντλίας

3. Σύστημα εισαγωγής του δείγματος στη στήλη
4. Στήλη HPLC
5. Ανιχνευτής
6. Καταγραφικό/ απόκτηση δεδομένων



**Σχήμα 4:** Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

Πηγή: Γεωργάτσος, 2004

### 1. Φιάλη αποθήκευσης διαλυτών

Οι φιάλες που χρησιμοποιούνται είναι κατασκευασμένες από γυαλί ή από ανοξείδωτο χάλυβα χωρητικότητας 500 ml ή και περισσότερο. Ο διαλυτής ή το μίγμα διαλυτών είναι απαραίτητο να είναι υψηλής καθαρότητας και να απαερώνεται καθόλη την διάρκεια της ανάλυσης. Η διαδικασία της απαέρωσης είναι πολύ σημαντική γιατί γίνεται η απομάκρυνση των διαλυμένων αερίων (φουσαλίδες). Αν δεν γίνει σωστά η απαέρωση στην κινητή φάση και δημιουργηθούν φουσαλίδες οδηγούν σε δημιουργία κοιλιοτήτων και απώλειας ροής του διαλύτη ή ελευθέρωση υψηλής πίεσης με αποτέλεσμα την οξεία διάσπαση του χρωματογραφήματος. Η απαέρωση γίνεται με εφαρμογή θερμότητας κενού ή υπερήχων ή με την διαβίβαση αδρανούς αερίου χαμηλής διαλυτότητας (ήλιο). Οι δυο εφαρμοζόμενες τεχνικές ανάλυσης ανάλογα με το πρόγραμμα χρήσης των διαλυτών είναι (Μπρατάκος, 2021):

- α) η ισοκρατική έκλουση (isocratic elution) όταν χρησιμοποιείται κινητή φάση με σταθερή σύσταση. Η κινητή φάση έχει σταθερή σύσταση σε όλη τη διάρκεια της ανάλυσης.

β) η βαθμιδωτή έκλουση (gradient elution) όταν χρησιμοποιείται σύστημα διαλυτών από δυο οι περισσότερους διαλύτες, οι οποίοι διαφέρουν ως προς την πολικότητα τους. Η κινητή φάση έχει βαθμιαία μεταβαλλόμενη σύσταση ή μεταβάλλεται ανά τακτά χρονικά διαστήματα, ανάλογα με τον προγραμματισμό.

## 2. Σύστημα της αντλίας

Το σύστημα άντλησης HPLC και οι γραμμές σύνδεσης είναι υψηλής πίεσης και για αυτό κατασκευάζεται από ανοξείδωτο χάλυβα ο οποίος αντέχει στις υψηλές πίεσης και στην διάβρωση από τυχόν οξειδωτικούς παράγοντες, οξέα, βάσεις, και οργανικούς διαλύτες. Ο ρόλος της αντλίας στην HPLC είναι η μεταφορά της κινητής φάσης από το δοχείο στη στήλη κάτω υπό υψηλές πιέσεις με ταχύτητα ροής περίπου 1 ml/min και ελεγχόμενο, ακριβή και επαναλήψιμο τρόπο (Μπρατάκος, 2021).

## 3. Σύστημα εισαγωγής του δείγματος στη στήλη

Η εισαγωγή του δείγματος μπορεί να γίνει είτε με μικροσύριγγα, είτε με ειδική βαλβίδα εισαγωγή δείγματος. Η μονάδα εισαγωγής του δείγματος σε ένα σύστημα HPLC βρίσκεται μεταξύ της αντλίας και της χρωματογραφικής στήλης. Ο θάλαμος έγχυσης του δείγματος περιέχει την ειδική βαλβίδα έγχυσης η οποία είναι η πιο χρησιμοποιούμενη μέθοδος και αποτελείται από ένα χαλύβδινο κύλινδρο με έξι διαύλους από τους οποίους ο ένας οδηγεί στη στήλη. Η εισαγωγή του δείγματος γίνεται με ειδική μικροσύριγγα και έχει δυο θέσεις λειτουργίας (Μπρατάκος 2021; Ταραντίλης & Παππάς, 2015):

- Τη θέση πλήρωσης κατά την οποία η κινητή φάση ρέει από την αντλία προς τη στήλη και ο βρόχος μεταξύ της κινητής φάσης και του δείγματος είναι απομονωμένος. Έτσι με την βοήθεια της μικροσύριγγας το δείγμα τοποθετείται στο βρόχο και κατακρατείται εκεί μέρος του δείγματος, ίσο με τον όγκο του, ενώ το υπόλοιπο απορρίπτεται.
- Τη θέση έγχυσης

#### 4. Στήλη HPLC

Οι στήλες ανάλογα με τις διαστάσεις χωρίζονται στις εξής κατηγορίες (Μπρατάκος, 2021; Παπαδογιάννης & Σαμανίδου, 2001):

- Προ στήλες: η στήλη αυτή τοποθετείται μεταξύ του συστήματος εισαγωγής δείγματος και της αναλυτικής στήλης. Οι προ στήλες υπάρχουν με στόχο την προστασία της αναλυτικής στήλης κατά την εισαγωγή επιβαρυσμένων δειγμάτων.
- Αναλυτικές στήλες: είναι η βασική στήλη ενός χρωματογραφικού συστήματος. Πρέπει να είναι υψηλής ποιότητας για να δίνει σωστά και επαναλήψιμα αποτελέσματα.
- Ημι-παρασκευαστικές
- Παρασκευαστικές: είναι στήλες μεγάλης διαστάσεων οι οποίες χρειάζονται για τον διαχωρισμό και την παραλαβή των ενώσεων ενός μίγματος μετρούμενες σε mg.

Οι στήλες στην HPLC είναι κατασκευασμένες από υψηλής ποιότητας ανοξείδωτο χάλυβα, ο οποίος είναι αδρανής και σταθερός κάτω υπό υψηλές πιέσεις. Οι στήλες ανάλογα με την διάμετρο τους χωρίζονται και σε κατηγορίες. Τέλος, στις στήλες χρησιμοποιούνται υλικά πλήρωσης όπως άνθρακας ή διοξείδιο του πυριτίου ή συνηθέστερα δεκαοκτυλιωμένη πυριτία (C18), με σκοπό το σχηματισμό του χρωματογραφικού υποστρώματος και για την στήριξη της στατικής φάσης. Η επιλογή τους καθορίζει το φυσικοχημικό φαινόμενο που λαμβάνει χώρα στους διαχωρισμούς άρα και στο είδος της χρωματογραφίας.

#### 5. Ανιχνευτής

Ο ανιχνευτής στην HPLC τοποθετείται στο τέλος της αναλυτικής στήλης. Οι ανιχνευτές παράγουν ένα ενισχυμένο ηλεκτρικό σήμα ανάλογο της ποσότητας ή της συγκέντρωσης της ουσίας που εκλούεται εκείνη την στιγμή. Υπάρχουν διάφοροι τύποι ανιχνευτών και διακρίνονται σε (Μπρατάκος, 2021; Παπαδογιάννης & Σαμανίδου, 2001):

- α) σε αυτούς που ανταποκρίνονται σε μια κυρία ιδιότητα της κινητής φάσης (γενικοί ανιχνευτές)
- β) σε αυτούς που ανταποκρίνονται σε μια ιδιότητα της εκλούμενης διαλυμένης ουσίας (ειδικούς ανιχνευτές).

Οι ανιχνευτές είναι απαραίτητο να πληρούν ορισμένες προϋποθέσεις, όπως :

- Υψηλή ευαισθησία και μεγάλο εύρος γραμμικής περιοχής
- Χαμηλό όριο θορύβου
- Ανεξαρτησία στις μεταβολές της θερμοκρασίας και της ταχύτητας ροής
- Να μην αποκρίνεται στην κινητή φάση
- Ευκολία χρήσης και αξιοπιστία
- Μη καταστροφή του αναλυόμενου δείγματος
- Μικρό χρόνο απόκρισης
- Δυνατότητα ανίχνευσης διαφορετικών ενώσεων και παροχή στοιχείων για την ταυτοποίησή τους

## 6. Καταγραφικό

Το καταγραφικό είναι το ηλεκτρικό σήμα του ανιχνευτή στο τέλος της ανάλυσης, με την βοήθεια ειδικών σημάτων καταγραφής, καταγράφεται το χρωματογράφημα που αποτελεί ένα σύνολο κορυφών. Το χρωματογράφημα μπορεί να γίνει με έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή και ένα καταγραφικό σύστημα. Τα αποτελέσματα του χρωματογραφήματος περιέχουν το χρόνο κατακράτησης κάθε συστατικού και για κάθε κορυφή το ύψος και το εμβαδόν της, ώστε να είναι εφικτό να πραγματοποιηθεί ο ποσοτικός προσδιορισμός των συστατικών. Με την χρήση ηλεκτρονικού υπολογιστή υπάρχουν ορισμένα πλεονεκτήματα όπως είναι η αποθήκευση των δεδομένων σε αυτόν, η επεξεργασία των αποτελεσμάτων με ταυτόχρονη συλλογή δεδομένων και η δυνατότητα ποσοτικού προσδιορισμού των συστατικών με την κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς (Μπρατάκος, 2021; Παπαδογιάννης & Σαμανίδου, 2001).

### *4.2.2.2 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης και μυκοτοξίνες*

Η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης είναι η πλέον πιο χρησιμοποιούμενη και αποτελεσματική μέθοδος ανάλυσης μυκοτοξινών. Η HPLC χρησιμοποιεί διάφορες προσροφητικές ουσίες ανάλογα με την φυσική και χημική δομή της μυκοτοξίνης. Για να γίνει ο διαχωρισμός και ο καθαρισμός των μυκοτοξινών χρειάζονται στήλες κανονικής και αντιστροφής φάσης ανάλογα με την πολικότητα τους. Για την προ-επεξεργασία του δείγματος χρησιμοποιούνται μικρές στήλες ενώ, μεγάλες στήλες για την παρασκευή προτύπων

διαλυμάτων των μυκοτοξινών (Reinhard & Zimmerli, 1999; Shephard et al., 1990; Giacomelli et al., 1998).

Για τις διάφορες μυκοτοξίνες που υπάρχουν η διαδικασία ανίχνευσης τους με HPLC είναι παρόμοιες. Οι πιο συχνές μέθοδοι ανίχνευσης χρησιμοποιούν ανιχνευτές υπεριώδους ακτινοβολίας ή φθορισμού, που βασίζονται στην παρουσία ενός χρωμοφόρου στα μόρια. Αρκετές τοξίνες έχουν ήδη φυσικό φθορισμό (OTA) και ανιχνεύονται απευθείας, άλλες όμως όχι (Valenta, 1998). Για τις μυκοτοξίνες οι οποίες δεν έχουν φυσικό φθορισμό ο προσδιορισμός τους απαιτεί παραγωγοποίηση (European Mycotoxin Awareness Network, 2003; Shephard, 1998).

Η HPLC είναι το βιομηχανικό πρότυπο για την ανίχνευση μυκοτοξινών και υπάρχουν πολυάριθμα πρωτόκολλα για την ανάλυση OTA (Valenta, 1998). Τα περισσότερα βασίζονται στον καθαρισμό του δείγματος με χρήση SPE και διαχωρισμό με HPLC και ανίχνευση είτε με φθορισμό είτε με MS (Visconti et al., 1999; Brera et al., 2005).

Η HPLC παρουσιάζει κάποια βασικά πλεονεκτήματα έναντι των άλλων τεχνικών ανίχνευσης μυκοτοξινών (υπεριώδους ακτινοβολίας, φθορισμού), όπως η δυνατότητα συνδυασμού πολλαπλών συστημάτων ανίχνευσης. Επίσης υπάρχει δυνατότητα αυτοματοποίησης γεγονός που την καθιστά προτιμότερη από άλλες τεχνικές όπως είναι η TLC και η ELISA (Hurst & Martin, 1998).

### 4.2.3 Αεριοχρωματογραφία

#### 4.2.3.1 Γενικά

Η αέρια χρωματογραφία είναι ένας τύπος χρωματογραφίας που χρησιμοποιείται στην αναλυτική χημεία για τον διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και την ανάλυση ενώσεων που μπορούν να εξατμιστούν χωρίς να προκληθεί αποσύνθεση. Είναι μια τεχνική με την οποία διαχωρίζονται τα συστατικά ενός μείγματος με βάση τις διαφορές που παρουσιάζουν στην κατανομή ή στην προσρόφηση μεταξύ της ρέουσας κινητής φάσης και μια στατικής φάσης. Ειδικότερα, η συγκεκριμένη τεχνική αναλύει μίγματα οργανικών ενώσεων ή ενώσεων που καθίσταται πτητικές με παραγωγοποίηση. Η οργανολογία δεν είναι περίπλοκη και είναι εύκολη στην χρήση της. Ένα βασικό πλεονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι η δυνατότητα ανάλυσης μειγμάτων με πολλά συστατικά, ενώ άλλες τεχνικές προσδιορίζουν μίγματα



αποτελούμενα από πολύ λίγα συστατικά. Επίσης, είναι μέθοδος υψηλής ακρίβειας, μεγάλης ευαισθησίας και χαμηλού κόστους τεχνική (Μπρατάκος, 2021).

#### *4.2.3.1 Αεριοχρωματογραφία και μυκοτοξίνες*

Η αεριοχρωματογραφία δεν χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση μυκοτοξινών, εκτός από την περίπτωση των τριχοθηκενίων. Τα τριχοθηκένια δεν απορροφούν έντονα στην περιοχή UV-Vis και είναι μη φθορίζοντα, επομένως αναπτύχθηκαν μέθοδοι GC για τον προσδιορισμό τους. Η τριχοειδική στήλη GC χρησιμοποιείται συνήθως για ταυτόχρονη ανίχνευση διαφορετικών τριχοθεκενίων όπως της DON, τοξίνη T2 και τοξίνη HT-2, χρησιμοποιώντας παραγωγοποίηση τριφθοροακετυλίου σε συνδυασμό με ανίχνευση δέσμησης ηλεκτρονίων (Nielsen et al., 2010).

Η ωχρατοξίνη A που συνήθως βρίσκετε στο κρασί ή στην μπίρα δεν μπορεί να προσδιοριστεί άμεσα με την αέριο χρωματογραφία αφού δεν είναι πτητική. Η GC σε συνδυασμό με ανιχνευτές σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD), ιοντισμού φλόγας (FID) ή MS χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό ορισμένων πτητικών μυκοτοξινών (π.χ. πατουλίνη) ή για τις μυκοτοξίνες που δεν είναι πτητικές (OTA στο κρασί) μετά από παραγωγοποίηση (Yang et al., 2020; Rahmani et al., 2009).

Παρόλο όμως που έχουν υπάρξει πολλές εφαρμογές επιτυχούς αποτελεσμάτων της GC στην ανάλυση μυκοτοξινών, έχουν σημειωθεί και πολλά μειονεκτήματα. Αρχικά τα δείγματα πρέπει να είναι πτητικά ή αλλιώς να μετατραπούν και αυτό την καθιστά ακριβότερη και χρονοβόρα σε σχέση με άλλες μεθόδους όπως η HPLC. Περαιτέρω, η θερμική σταθερότητα αποτελεί πρόβλημα επειδή η θέρμανση μερικές φορές υποβαθμίζει τα δείγματα. Σε ορισμένες περιπτώσεις η έγχυση του δείγματος έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί πρόβλημα που πρέπει να αντιμετωπιστεί. Αυτό οφείλεται κυρίως στο γεγονός ότι το δείγμα χάνεται όταν έρχεται σε επαφή με τις θερμαινόμενες περιοχές του εγχυτήρα με αποτέλεσμα την απώλεια της εξάτμισης (Turner et al., 2009).

### **4.3 Ανοσολογικοί προσδιορισμοί**

#### *4.3.1 Γενικά*

Οι ανοσολογικοί ή ανοσοχημικοί προσδιορισμοί, όπως υπονοεί και η ονομασία τους, αναφέρονται σε εκείνη την κατηγορία των αναλυτικών μεθόδων που συνδυάζουν τεχνολογίες

χημείας και ανοσολογίας. Πρακτικά αναφέρονται στις μεθόδους που χρησιμοποιούν τουλάχιστον μία φορά αντισώματα. Υπάρχουν δυο είδη ανοσοχημικών τεχνικών, οι ομογενείς και οι ετερογενείς. Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες από αυτές τις δυο τεχνικές είναι οι ετερογενείς και από αυτές ο ενζυματικός ανοσοπροσροφητικός προσδιορισμός (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) ο πιο γνωστός. Στις ετερογενείς μεθόδους τα αντισώματα είναι προσκολλημένα πάνω σε στέρεη επιφάνεια. Στις ομογενείς μεθόδους τα ανοσοσύμπλοκα παραμένουν σε διαλυτή μορφή μέσα στο διάλυμα αντίδρασης. Έχουν εξεταστεί διεξοδικά οι αρχές λειτουργίας των ανοσοχημικών δοκιμών για τις διαφορετικές μορφές τους, τα πλεονεκτήματα και τους περιορισμούς τους για να επικυρωθούν και να καταλήξουν να εφαρμόζονται σε διάφορα τρόφιμα και ζωοτροφές. Έχουν εξετασθεί πιο συγκεκριμένα για την ειδικότητα, την ευαισθησία, την ακρίβεια, το εύρος των μετρήσεων και την διασταυρούμενη αντιδραστικότητα για τα διάφορα δείγματα τροφίμων (Διαμαντής et al., 1987).

#### *4.3.2 Ανοσολογικές τεχνικές ανάλυσης στις μυκοτοξίνες*

Οι ανοσοχημικές μέθοδοι στηρίζονται στην αναγνώριση των μυκοτοξινών που δρουν ως αντιγόνα από ειδικά αντισώματα. Ο εντοπισμός των μυκοτοξινών είναι πιο εύκολος όταν υπάρχει μια ένωση/ δείκτης που αντιδρά με ένα ένζυμο με μη ενζυμικές ενώσεις συζευγμένες με τα αντισώματα, ή χωρίς την χρήση δείκτη με φυσικό φθορισμό για ορισμένες μυκοτοξίνες (Nolan et al., 2019; Maragos, 2016; Meulenberg, 2012; Maragos & Busman, 2010). Ειδικά για τις μυκοτοξίνες οι γνωστές και γρήγοροι μέθοδοι στα εργαστήρια και τις βιομηχανίες είναι η ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία (ELISA) ή ο ανοσοπροσδιορισμός πλευρικής ροής (LFIA) (Lopez- Puertollano et al., 2021). Οι ELISA είναι οι πιο κοινές επικυρωμένες ανοσοχημικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την παρακολούθηση των μυκοτοξινών, με πλεονεκτήματα όσον αφορά την υψηλή ειδικότητα, το σχετικά χαμηλό όριο ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD), την υψηλή απόδοση δείγματος και ορισμένους περιορισμούς που σχετίζονται με την πολυπλοκότητα της φύσης της μήτρας (Rahman et al., 2019). Υπάρχουν διαφορικά κιτ που ειδικεύονται στο προσδιορισμό μυκοτοξινών σε σταφύλια και στα παραγόμενα προϊόντα τους. Τα κιτ ανοσολογικής ανάλυσης είναι εύκολες και γρήγορες δοκιμές που δίνουν αποτελέσματα σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα, δίνοντας την δυνατότητα για επιτόπιες δοκιμές (Kizis et al., 2021). Οι ανοσοπροσδιορισμοί και ειδικά

ο ενζυμοσύνδετος ανοσοπροσροφητικός προσδιορισμός (ELISA) παρουσιάζουν κάποια πλεονεκτήματα σε σύγκριση με τις χρωματογραφικές μεθόδους εξαιτίας της υψηλής απόδοσης τους, της εκλεκτικότητας και της ευαισθησίας τους. Η ELISA είναι πολύ διαδεδομένη για την ανίχνευση της ωχρατοξίνης A και άλλων ουσιών με χαμηλό μοριακό βάρος (Sun et. al. 2019). Τα κιτ που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση ELISA περιλαμβάνουν μια προσαρμοσμένη μορφή ενζυμικά συνδεδεμένης ανοσοπροσροφητικής δοκιμασίας. Για την διαδικασία της ELISA χρειάζονται μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά αντισώματα που πρέπει να εξειδικεύονται στις μυκοτοξίνες και να δεσμεύονται με αυτές όταν παρουσιάζονται σε ένα δείγμα (Pascale 2009; Abedi – Tizaki & Sabbagh, 2012). Πιο συγκεκριμένα η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί ένα ένζυμο που αντιδρά με ένα άχρωμο υπόστρωμα και δίνει ένα έγχρωμο προϊόν (Sun et. al. 2019). Αυτή η τεχνική παρέχει μια γρήγορη, εύκολη και εξειδικευμένη μέθοδο ανάλυσης των μυκοτοξινών στα τρόφιμα, όμως παρουσιάζει και κάποια μειονεκτήματα. Κάποια από αυτά είναι η ανίχνευση μόνο μιας μυκοτοξίνης το οποίο μπορεί να είναι δαπανηρό αν χρειάζεται να γίνει ο έλεγχος σε πολλαπλά μολυσμένα δείγματα. Επίσης κάθε κιτ δοκιμής δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για όλα τα είδη τροφίμων και για όλα τα επίπεδα μόλυνσης (Zheng et al., 2006).

Στο εμπόριο είναι διαθέσιμα πολλά είδη ταινιών ταχείας οπτικής ανοσολογικής ανάλυσης για επιτόπιες δοκιμασίες μυκοτοξινών, συμπεριλαμβανομένης της πλαγιάς ροής (LFD). Η πλειονότητα των κιτ στο εμπόριο είναι της ELISA και του LFD, με τις δυο μορφές να είναι διαθέσιμες για την ίδια μυκοτοξίνη σε πολλές περιπτώσεις. Υπάρχουν ειδικά κιτ για τον εντοπισμό ή τον προσδιορισμό OTA και AFs σε κρασί, ξύδι, χυμό σταφυλιών και άλλα προϊόντα σταφυλιού που έχουν δημιουργηθεί από πολλούς κατασκευαστές ως πιστοποιημένες τεχνικές ανίχνευσης σε αυτά τα προϊόντα. Το LFD είναι μια δοκιμή ενός σταδίου που περιλαμβάνει μια αρνητική γραμμή ελέγχου μαζί με τις γραμμές δειγματοληψίας στην ίδια λωρίδα. Μια τέτοια δοκιμή δίνει τα αποτελέσματα σε λιγότερο από 10 λεπτά και δεν απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό. Η δοκιμή βασίζεται σε μια ανταγωνιστική ανοσοδοκιμασία, όπου ένα επισημασμένο αντίσωμα χρησιμοποιείται ως αντιδραστήριο σήματος. Ωστόσο παρουσιάζει και αρκετά μειονεκτήματα που έχουν να κάνουν με την ευαισθησία, την αξιοπιστία και το υψηλό κόστος (Ahmad Alshannaq & Jae-Hyuk Yu, 2017).

### 4.3.3 Βιοαισθητήρες

Οι βιοαισθητήρες είναι συσκευές ανίχνευσης οι οποίες μετατρέπουν τις πληροφορίες οι οποίες μετρούνται από ένα δείγμα σε ηλεκτρικά σήματα ή άλλες πληροφορίες εξόδου της απαιτούμενης μορφής. Το σύστημα των βιοαισθητήρων αποτελείται από δύο στοιχεία: ένα στοιχείο βιοανιχνευτή και ένα στοιχείο μετατροπέα. Στο πρώτο, κατατάσσονται τα στοιχεία βιοαναγνώρισης, δηλαδή τα αντισώματα, τα αντιγόνα, τα νουκλεϊκά οξέα και τα ένζυμα που εντοπίζουν αλλά και ανιχνεύουν τους αναλυτές – στόχους. Ενώ το στοιχείο μετατροπέα, μετατρέπει σε ανιχνεύσιμο σήμα, το σήμα φυσικής ποσότητας που παράγεται από τα στοιχεία αναγνώρισης. Υπάρχουν πολλών ειδών βιοαισθητήρες με βάση την αρχή μετατροπής του σήματος. Οι βιοαισθητήρες μπορούν να ταξινομηθούν σε ηλεκτροχημικούς, οπτικούς, μαζικά ευαίσθητους και θερμικούς αισθητήρες. Οι βιοαισθητήρες έχουν αποδειχθεί πολύ σημαντικοί στο τομέα των αναλύσεων σε πολλούς κλάδους, όπως τα τρόφιμα, το περιβάλλον και την ιατρική. Συγκεκριμένα οι βιοαισθητήρες έχουν καταστεί πολύ χρήσιμοι για την ενίσχυση της ασφαλείας των τροφίμων από πολύ παλιά έως και σήμερα. Ειδικότερα, για τις μυκοτοξίνες, έχουν χρησιμοποιηθεί ηλεκτροχημικοί και οπτικοί βιοαισθητήρες (Bueno et al., 2015; Evans et al., 1986; Guilbault & Schmid, 1991; Evtugyn & Hianik, 2019).

#### Οπτικοί βιοαισθητήρες

Οι οπτικοί βιοαισθητήρες στηρίζονται στη μετατροπή των οπτικών σημάτων που παράγονται από τον μετατροπέα από γεγονότα μοριακής αναγνώρισης κατά την ανίχνευση. Η συγκεκριμένη τεχνική ανάλυσης είναι πολύ εύκολη στην χρήση της, είναι γρήγορη και ευαίσθητη. Με βάση τα οπτικά σήματα οι οπτικοί βιοαισθητήρες χωρίζονται σε πολλές υποκατηγορίες όπως οι χρωματομετρικοί, οι φθορίζοντες, οι χημειοφωταύγειας και οι επιφανειακοί πλασμονικού συντονισμού. Τέλος οι οπτικοί βιοαισθητήρες δίνουν την δυνατότητα για τον προσδιορισμό πολλών μυκοτοξινών ταυτόχρονα (Chen et al., 2021).

#### Ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες

Οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες βασίζονται στις μεταβολές των εκπεμπόμενων ηλεκτρικών σημάτων που παράγονται από τις χημικές αντιδράσεις μεταξύ των ακινητοποιημένων με ηλεκτρόδιο στοιχείων αναγνώρισης και των αναλυτών-στόχων. Με βάση τους τύπους των ανιχνεύσιμων ηλεκτρικών σημάτων οι

εφαρμοζόμενες μέθοδοι των ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων ταξινομούνται σε αμπερομετρικές, ποτενσιομετρικές, αγωγιμομετρικές, εμπεδημετρικές και βολταμετρικές μεθόδους (Alhamoud et al., 2019; Li et al., 2019). Οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες αποτελούν ιδανική επιλογή διότι μειώνουν το χρόνο ανίχνευσης, βελτιώνουν την σταθερότητα και την ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών στόχων (Reverte et al., 2016).

#### *4.3.4 Βιοαισθητήρες και μυκοτοξίνες*

Υπάρχουν διάφοροι τύποι βιοαισθητήρων διαφορετικών λειτουργιών που έχουν κατασκευασθεί για τον εντοπισμό των μυκοτοξινών σε πολλά τρόφιμα, οι οποίοι παρουσιάζουν διαφορά πλεονεκτήματα αλλά και περιορισμούς που αφορούν την ευαισθησία, την εκλεκτικότητα, την αποδοτικότητα, το κόστος και την ευκολία χρήσης. Για την ανίχνευση της ΟΤΑ ειδικότερα, έχουν εξετασθεί πολλά είδη οίνου με διάφορους τύπους βιοαισθητήρων. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες των μυκήτων, δηλαδή οι μυκοτοξίνες, μπορούν να καθοριστούν με βάση τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες με τη χρήση της τεχνικής electronic nose (e-nose). Αυτή η τεχνική ανήκει στους ηλεκτροχημικούς βιοαισθητήρες και τα όργανα e-nose στηρίζονται στον εντοπισμό πτητικών ενώσεων τα οποία απελευθερώνονται από τα τρόφιμα. Αυτές οι πτητικές ενώσεις έχουν ένα μοναδικό δακτυλικό αποτύπωμα για κάθε τρόφιμο, που σε περίπτωση ύπαρξης μολυσματικών ουσιών τροποποιείται, με αποτέλεσμα μιας εικόνας της μόλυνσης άρα και ένα γρήγορο μέσο προσδιορισμού των μυκοτοξινών. Όταν η τεχνική e-nose συνδυαστεί με μια ισχυρή στατιστική προσέγγιση όπως οι μηχανές διανυσμάτων υποστήριξης (SVM), τότε μπορεί να επιτευχθεί υψηλή ακρίβεια στα αποτελέσματα μιας ανάλυσης (Cabañes et al., 2009).

## 5. Υλικά & Μέθοδοι

### 5.1 Βάση δεδομένων

Για την συγγραφή της εργασίας χρησιμοποιήθηκε το Google Scholar, το Scopus, ο Κώδικας Τροφίμων και Ποτών καθώς και η νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης.

### 5.2 Λέξεις κλειδιά

Μέθοδοι ανάλυσης – Μυκοτοξίνες – Σταφύλι- Παραγόμενα προϊόντα σταφυλιού

Methods of analysis – mycotoxins - grapes – grape products

### 5.3 Χρονική περίοδος ανασκόπησης

Η βιβλιογραφική έρευνα επικεντρώθηκε σε μελέτες της χρονικής περιόδου 2019 – 2024

## 6. Αποτελέσματα

### 6.1 Συνολικά αποτελέσματα

Στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα της βιβλιογραφικής ανασκόπησης των μελετών. Αναφέρεται το δείγμα ή μήτρα, οι μυκοτοξίνες που βρέθηκαν σε αυτά, η μέθοδος προετοιμασίας του δείγματος, η μέθοδος ανίχνευσης των μυκοτοξινών, τα όρια ανίχνευσης (LOD), το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ), η ανάκτηση (%REC), η σχετική τυπική απόκλιση (% RSD), καθώς και οι σχετικές αναφορές. Τα αποτελέσματα είναι τα εξής:

**Πίνακας 4.** Μέθοδοι ανάλυσης μυκοτοξινών και συγκεντρώσεις σε δείγματα σταφυλιού, οίνου και αποξηραμένης σταφίδας

Δείγμα	Μυκοτοξίνες	Μέθοδος προετοιμασίας	Μέθοδος ανίχνευσης	LODs (μg/kg)	LOQs (μg/kg)	% Rec	% RSD	Ευρήματα (μg/kg)	Ευρήματα
Σταφύλι	22*	QuEChERS	UHPLC-Q/Orbitrap HRMS	0,1-5	0,3-10	68,6-109,0	1,28-12,80	3,26 (OTA)	Ca o et al., 2024
Οίνος	17*	QuEChERS	UHPLC-MS/MS	0,05-20	0,05-500	69-119	1-10	LOD<x<6,40(OTA)	H e et al., 2019
Αποξηραμένη Σταφίδα	12*	LLE-SPE	LC-MS/MS	-	-	80-120	<20	X<LOD	Z ha ng et al., 2022
Κυπριακοί Οίνοι	6*	QuEChERS/d-SPE	UPLC-MS/MS	0,03-0,27	0,08-0,81	77-108	1,26-7,35	0,01-0,24 (OTA)	L o u p p i s & Constantinou, 2022.
Γλυκός Οίνος (Tokaj Wines)	OTA	SPE (C18/μPE/MIP)	HPLC-FLD	0,03/0,06/0,3	0,1/0,2/1	87,9-107,4	0,6-7,8	0,3-1,22 (OTA)	Kholová et al., 2021
	OTB			LOD>x					
Γλυκός Οίνος (Tokaj Wines)	OTA	SPE	HPLC-FLD	0,03	0,1	91,69	1,60	0,3-1,2 (OTA)	Kholová et al., 2021
	OTB			0,2	99,07	0,63	0,2 μg L <sup>-1</sup>	LOD>x	

\*22 μυκοτοξίνες: AFT B1, AFT B2, AFT G1, AFT G2, OTA, OTB, OTC, DON, 3-ADON, 15-ADON, FUS-X, DAS, NEO, HT-2, T-2, CtyB (95.9%), CtyC, CtyD, EnnB, EnnB1, EnnA1, and EnnA



\*17 μυκοτοξίνες: Aflatoxin B1, Aflatoxin B2, Aflatoxin G1, Aflatoxin G2, Aflatoxin M1, Citrinin, Deoxynivalenol, Diacetoxyscirpenol, Fumonisin B1, HT-2 toxin, Mycophenolic acid, Neosolaniol, Ochratoxin A, Ochratoxin B, Sterigmatocystin, T-2 toxin, Zearalenone

\*12 μυκοτοξίνες: AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, DON, FB1, FB2, FB3, OTA, T-2, HT-2, ZON

\*6 μυκοτοξίνες: ochratoxin A, aflatoxin B1, B2, G1, G2 and Zearalenone

## 6.2 Αποτελέσματα σταφυλιού

Στην έρευνα των Cao et al., 2024, χρησιμοποιήθηκε μεθοδολογία βασισμένη σε συστήματα υγροχρωματογραφίας συζευγμένα με φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (High Resolution Mass Spectrometry HRMS) για τον εντοπισμό τόσο κοινών όσο και μοναδικών μυκοτοξινών στα σταφύλια. Η τεχνική αυτή διευκολύνει την ακριβή ανάλυση των ενώσεων-στόχων τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά, ιδίως όταν τα πολύπλοκα δείγματα περιέχουν ποικιλία χημικών ουσιών και παρεμβατικών παραγόντων. Η προετοιμασία των δειγμάτων έγινε με τη χρήση του QuEChERS, μιας τεχνικής εκχύλισης στερεάς φάσης. Επιπλέον, ο διαλύτης εκχύλισης που επιλέχθηκε ήταν το ακετονιτρίλιο. Πιο συγκεκριμένα, τα φάσματα μάζας πρώτου επιπέδου πλήρους σάρωσης 22 πρότυπων διαλυμάτων μυκοτοξινών ελήφθησαν με τη χρήση του συστήματος UPLC-Q-Orbitrap HRMS. Η χαμηλότερη συγκέντρωση μάζας με συνεχή ανάκτηση 60-120% χρησιμοποιήθηκε ως LOQ, ενώ η χαμηλότερη συγκέντρωση μάζας που μπορούσε να ταυτοποιηθεί χρησιμοποιήθηκε ως LOD. Η διαδικασία ήταν σύμφωνη με τα πρότυπα που ορίζει η Ευρωπαϊκή Ένωση σχετικά με τα μέγιστα επίπεδα κοινών μυκοτοξινών. Η ανάκτηση και η σχετική απόκλιση υπολογίστηκαν μετά την προετοιμασία των τυφλών δειγμάτων σταφυλιών με την προσθήκη 22 πρότυπων διαλυμάτων μυκοτοξινών σε τρεις συγκεντρώσεις. Η σχετική απόκλιση ήταν 1,28% και η ανάκτηση κυμάνθηκε από 68,6% έως 109,0%. Κατά συνέπεια, η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα έρευνα έδωσε πολύ ακριβή ευρήματα, αποδεικνύοντας την αξία της στην ταυτοποίηση μυκοτοξινών. Δέκα δείγματα που προέρχονταν από την Κίνα αναλύθηκαν με τη χρήση αυτής της προσέγγισης. Η συγκέντρωση OTA που βρέθηκε σε ένα μόνο δείγμα σταφυλιών ήταν 3,26 μg/kg. Η διαδικασία ικανοποιεί τα τρέχοντα κριτήρια ανίχνευσης μυκοτοξινών.

### 6.3 Αποτελέσματα οίνου

Η επικύρωση μιας τεχνικής UHPLC-MS/MS για την ταυτόχρονη ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων και μυκοτοξινών στον οίνο ήταν ο στόχος της μελέτης που διεξήχθη από τους He et al. το 2019. Ως τεχνική παρασκευής χρησιμοποιήθηκε η QuEChERS. Αναλύθηκαν 64 δείγματα κρασιού από διάφορες γαλλικές περιοχές με τη χρήση μιας εύχρηστης, γρήγορης, ακριβούς και φιλικής προς το περιβάλλον προσέγγισης. Επιπλέον, στη διαδικασία εκχύλισης χρησιμοποιήθηκαν ακετονιτρίλιο και μυρμηκικό οξύ. Μέσω της αξιολόγησης τυφλών δειγμάτων που προστέθηκαν σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις, υπολογίστηκαν οι ανακτήσεις και το RSD. Τα πρότυπα προσαρμοσμένα στο δείγμα που χρησιμοποιήθηκαν κυμαίνονταν από 0,05 έως 500 µg/L. Με τη μέτρηση της ακρίβειας αξιολογήθηκε η απόδοση της μεθόδου. Με ακρίβεια  $\leq 20\%$ , οι 65 ενώσεις είχαν μέσες ανακτήσεις στα τρία επίπεδα εμβολιασμού μεταξύ 70-120%. Τα δείγματα κρασιού περιείχαν έξι μυκοτοξίνες, δηλαδή φουμονισίνη B1, HT-2 τοξίνη, ωκρατοξίνη A, διακετοξυσκιρπενόλη, αφλατοξίνη M1 και de- οξυνιβαλενόλη. Από την άλλη πλευρά, το εύρος της OTA σε δείγματα οίνου ήταν 0,76-6,40 µg/kg, με 11 δείγματα να έχουν τιμές υψηλότερες από το όριο που έχουν θέσει η ΕΕ και ο ΟΙΥ.

### 6.4 Αποτελέσματα αποξηραμένης σταφίδας

Η υγροχρωματογραφία – συζευγμένης φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS) έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση πολλών μυκοτοξινών σε αποξηραμένα φρούτα (Zhang et al., 2022). Στη μελέτη αυτή επιλέχθηκαν δείγματα κράνμπερι, σταφίδες, δαμάσκηνα και σύκα για την επέκταση της μήτρας. Χρησιμοποιήθηκε κρυογενική άλεση για την προετοιμασία των δειγμάτων, τα οποία στη συνέχεια εκχυλίστηκαν με 50% ακετονιτρίλιο και χρησιμοποιήθηκαν ισοτοπικά επισημασμένα εσωτερικά πρότυπα για τις 12 μυκοτοξίνες. Χρησιμοποιώντας έναν αναλυτή μεγέθους σωματιδίων με λέιζερ περίθαλψης, αξιολογήθηκε η ομοιογένεια των παραγόμενων δειγμάτων, η οποία ορίστηκε ως μέγεθος σωματιδίων  $D_{v90} < 850 \mu\text{m}$  για τις εξεταζόμενες μήτρες. Για την επίτευξη αυτού του στόχου χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές κρυογονικής άλεσης. Η ωκρατοξίνη A και οι αφλατοξίνες εγχύθηκαν σε 1-100 ng/g, ενώ οι φουμονισίνες, η τοξίνη T-2, η τοξίνη HT-2 και η ζεραλενόνη προστέθηκαν σε 10-1000 ng/g. Το ποσοστό ανάκτησης για αυτές τις τέσσερις μήτρες κυμάνθηκε από 80 έως 120% με σχετικές τυπικές αποκλίσεις (RSD)  $< 20\%$ . Προκειμένου να αυξηθεί η ευαισθησία της

μεθόδου, βελτιστοποιήθηκε η εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE), η εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) και η βαθμιδωτή έκλουση. Η δεοξυνιβαλενόλη (DON) δεν μπορούσε να ανιχνευθεί σε συγκεντρώσεις των 10 και 100 ng/g στα δαμάσκηνα. Επιπλέον, η DON βρέθηκε σε συνδυασμό αποξηραμένων φρούτων, ενώ η OTA βρέθηκε σε δείγμα σύκων. Στα υπόλοιπα δείγματα δεν βρέθηκαν μυκοτοξίνες. Η μελέτη πρόσφερε χρήσιμες μεθόδους για την ανάλυση διαφόρων μυκοτοξινών που βρέθηκαν σε αποξηραμένα φρούτα.

## 6.5 Αποτελέσματα στους κυπριακούς οίνους

Οι Louppis & Constantinou (2022) αναφέρουν ότι η προτεινόμενη αναλυτική προσέγγιση UPLC-MS/MS για τον προσδιορισμό της παρουσίας μυκοτοξινών στον οίνο είναι εύκολη στη χρήση, γρήγορη και φθηνή. Επίσης, δεν χρειάζεται καμία διαδικασία καθαρισμού. Χρησιμοποιώντας τα κυπριακά κρασιά ως αντικείμενο δοκιμής, δημιουργήθηκε στην παρούσα μελέτη μια τεχνική UPLC-MS/MS για τον προσδιορισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό έξι μυκοτοξινών, συμπεριλαμβανομένων της ωχρατοξίνης A, των αφλατοξινών B1, B1, G1 και G2 και της ζεαραλενόνης. Το όριο ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ) και το όριο ανίχνευσης (LOD) αξιολογήθηκαν για την επαλήθευση της διαδικασίας. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε έξι δείγματα σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις για τον προσδιορισμό της ανάκτησης. Διαπιστώθηκε ότι οι μυκοτοξίνες είχαν τιμές LOD και LOQ που κυμαίνονταν από 0,03 έως 0,27 μg/kg και από 0,08 έως 0,81 μg/kg, αντίστοιχα. Η ενδοεργαστηριακή σχετική τυπική απόκλιση χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της ακρίβειας της μεθόδου (RSD). Για την αξιολόγηση της ακρίβειας της μεθόδου εξετάστηκαν δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ως ποιοτικός έλεγχος. Οι τιμές του RSD κυμάνθηκαν από 1,26 έως 7,35%, ενώ οι τιμές ανάκτησης κυμάνθηκαν από 77 έως 108%, όλες σύμφωνα με την απόφαση 2006/401/EK της Επιτροπής της ΕΕ. Η προτεινόμενη τεχνική χρησιμοποιήθηκε για την εξέταση των μυκοτοξινών που υπήρχαν σε 24 δείγματα κυπριακού κρασιού. Τα δείγματα προέρχονταν από εννέα έτη παραγωγής (2006, 2009, 2010, 2012, 2016-2020) διαφόρων ποικιλιών κυπριακών οίνων (λευκών, ροζέ και ερυθρών). Επιπλέον, εξετάστηκαν οίνοι από δύο διαφορετικά δοχεία (γυάλινα και PET) και από τοπικές ποικιλίες σταφυλιών. Δεν βρέθηκαν μυκοτοξίνες στα δείγματα. Επιπλέον, δεν υπήρξε πιθανή συσχέτιση με κανέναν από τους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου του είδους του κρασιού, του έτους παραγωγής, του τύπου του δοχείου ή της συγκέντρωσης αλκοόλ.

## 6.6 Αποτελέσματα για τους οίνους Tokaj

Η πιο δημοφιλής τεχνική για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της ωχρατοξίνης A και B είναι η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας ή ανίχνευση φθορισμού (FD), σύμφωνα με τους Kholová et al., 2020. Στην έρευνά τους περιγράφουν λεπτομερώς τη δημιουργία μιας νέας online τεχνικής SPE-HPLC για την ταυτόχρονη μέτρηση της OTA και της OTB σε οίνους Tokaj. Πιο συγκεκριμένα, μια συλλογή 59 παλαιωμένων σλοβακικών οίνων Tokaj χρησιμοποιήθηκε σε μια έρευνα διαλογής για τον έλεγχο της μόλυνσης από ωχρατοξίνη σε βοτρυχωτούς οίνους. Η ακρίβεια που αντιπροσωπεύεται ως ανάκτηση, τα όρια ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ) και τα όρια ανίχνευσης (LOD) λήφθηκαν υπόψη καθ' όλη τη διάρκεια της επικύρωσης της μεθόδου. Η δοκιμή καταλληλότητας για το σύστημα HPLC αποτέλεσε μέρος της διαδικασίας επικύρωσης. Για την OTB και την OTA, το όριο ποσοτικού προσδιορισμού καθορίστηκε στα χαμηλότερα επίπεδα συγκέντρωσης του εύρους βαθμονόμησης, τα οποία είναι 0,2 και 0,1 μg/L, αντίστοιχα. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν διάφορες αραιώσεις πρότυπων διαλυμάτων για την πειραματική επιβεβαίωση των τιμών LOQ. Έξι δείγματα οίνου εμβολιάστηκαν σε επίπεδο συγκέντρωσης 2 μg/L και για τις δύο ωχρατοξίνες, προκειμένου να αξιολογηθεί η ακρίβεια και η ανάκτηση της προτεινόμενης προσέγγισης, η οποία περιλαμβάνει ένα στάδιο online εκχύλισης. Η συγκέντρωση αυτή αντιστοιχούσε στις υψηλότερες ποσότητες OTA στον οίνο που επιτρέπει η νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Το RSD της μεθόδου διατηρήθηκε εντός του 2%. Για την OTA και την OTB, η υπολογιζόμενη μέση ανάκτηση ήταν 91,7% και 99,1%, αντίστοιχα. Επιπλέον, μόνο τέσσερις από τους πενήντα εννέα παλαιούς οίνους που αξιολογήθηκαν στο πείραμα βρέθηκαν θετικοί για OTA και αρνητικοί για OTB με εύρος συγκέντρωσης 0,3-1,22 μg/L. Επειδή ο οίνος tokaj προέρχεται από βοτρυχωτά μούρα και έχει υψηλότερη περιεκτικότητα σε σάκχαρα από έναν τυπικό ξηρό λευκό οίνο, έχει σίγουρα μια πιο σύνθετη μήτρα. Το αμπέλι προσβάλλεται από το *Botrytis cinerea* και δημιουργεί ευγενή σήψη δηλαδή αναπτύσσεται ευγενής μούχλα που προστατεύει τα σταφύλια από την επίδραση άλλων τοξινογόνων ειδών μούχλα. Έτσι, η ευγενής μούχλα αποτελεί ένα πιθανό λόγο των χαμηλών επιπέδων ωχρατοξινών στα δείγματα.

Στη συγκεκριμένη μελέτη αξιολογήθηκαν τρεις διαφορετικοί τύποι υλικών εκχύλισης στερεάς φάσης για ωχρατοξίνες χρησιμοποιώντας SPE-HPLC on-line (Kholová et al. 2021).

Η μελέτη παρουσιάζει τις επιδόσεις των εμπορικών ΜΙΡ, των ναοϊνών και των σωματιδίων πορώδους κελύφους αντίστροφης φάσης για την εκχύλιση ωχρατοξινών όσον αφορά την ανάκτηση, την αποτελεσματικότητα του καθαρισμού και την εκλεκτικότητα. Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν τη μέτρηση της ωχρατοξίνης στο κρασί Tokaj, ένα πραγματικό προϊόν ευάλωτο στη μόλυνση με ωχρατοξίνη, για να δείξουν τη δυνατότητα εφαρμογής της βελτιωμένης μεθόδου SPE-HPLC υψηλής απόδοσης on-line. Η μελέτη έδειξε πως στην περίπτωση του C18 έλαβαν άριστες εκχυλίσεις, και ο συνολικός χρόνος ανάλυσης ήταν μόνο 6 λεπτά ή και 8 λεπτά ενώ έλαβαν και τα καλύτερα αποτελέσματα επικύρωσης. Η πλειονότητα των εξετασθέντων οίνων παρουσίασε επίπεδα ωχρατοξινών κάτω από το όριο ανίχνευσης. Πολλοί οίνοι βρέθηκαν θετικοί ως προς την παρουσία ΟΤΑ. Όλα τα δείγματα οίνων πληρούσαν την προδιαγραφή του ανώτατου ορίου ωχρατοξίνης 2 μg/L της ΕΕ. Κανένας οίνος δεν περιείχε ΟΤΒ. Η απόδειξη για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των ωχρατοξινών στον οίνο Tokaj με τη χρήση της προσέγγισης on-line SPE-HPLC με βελτιωμένα υλικά εκχύλισης αναμένεται να είναι σημαντική για τον αποτελεσματικό προσδιορισμό υψηλής απόδοσης αυτών των μυκοτοξινών ακόμη και σε άλλες περίπλοκες μήτρες.

## 7. Συμπεράσματα

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφική έρευνα που πραγματοποιήθηκε για τα έτη 2019 – 2024, ορισμένες μυκοτοξίνες (αφλατοξίνες B1, B2, G1) διερευνήθηκαν για την παρουσία τους ανάμεσα στο σταφύλι (Cao et al., 2024), στους γαλλικούς (He et al., 2019) και κυπριακούς (Louppis & Constantinou, 2022) οίνους και στην αποξηραμένη σταφίδα (Zhang et al., 2022). Η ωχρατοξίνη Α ανιχνεύθηκε σε όλα τα εξεταζόμενα ήδη, ενώ η ωχρατοξίνη Β δεν ανιχνεύθηκε στην αποξηραμένη σταφίδα (Zhang et al., 2022) στους κυπριακούς οίνους που εφαρμόστηκε η διαδικασία UPLC-MS/MS (Louppis & Constantinou, 2022) και στον γλυκό οίνο (Tokaj Wines) που προσδιορίστηκε με τη μέθοδο HPLC-FD (Kholová et al., 2020).

Οι μυκοτοξίνες παρουσίασαν όριο ανίχνευσης στο σταφύλι σε συγκεντρώσεις 0,1-5 μg/kg (Cao et al., 2024), στους γαλλικούς οίνους σε συγκεντρώσεις 0,05-20 μg/kg (He et al., 2019), στους κυπριακούς οίνους 0,03 – 0,27 μg/kg (Louppis & Constantinou, 2022) και στον

γλυκό οίνο Tokaj, η ωχρατοξίνη Α έλαβε τιμές 0,03 – 0,3 μg/L και η ωχρατοξίνη Β σε συγκεντρώσεις 0,06 - 1,5 μg/L.

Παρατηρείται ότι τα όρια ανίχνευσης καθώς και ποσοτικοποίησης έχουν μεγαλύτερο εύρος στους οίνους παρά στο σταφύλι. Στο σταφύλι το όριο ανίχνευσης κυμαίνεται από 0,1-5 μg/kg ενώ στους οίνους από 0,05-20 μg/kg. Αυτό συμβαίνει διότι το σταφύλι είναι πιο δύσκολη μήτρα/ δείγμα και χρειάζεται περισσότερη προετοιμασία. Η ανάλυση μυκοτοξινών στα σταφύλια είναι πιο δύσκολη από ότι στο κρασί λόγω της πολύπλοκης σύνθεσης και της ποικιλίας των συστατικών στα σταφύλια, του υψηλού μικροβιακού φορτίου, της παρουσίας φλοιού και σπόρων, της υψηλής υγρασίας και της περιεκτικότητας σε πολυφαινόλες και άλλες φυσικές ενώσεις. Το κρασί, από την άλλη πλευρά, είναι ένα πιο ομοιογενές και σταθερό δείγμα που έχει υποστεί διεργασίες που μειώνουν αυτά τα προβλήματα, καθιστώντας την ανάλυση μυκοτοξινών πιο απλή και αξιόπιστη.

Σαφή συμπεράσματα για το ποια μέθοδος προετοιμασίας ή ποια μέθοδος ανίχνευσης δεν γίνεται να εξαχθούν καθώς έχουν εξετασθεί διαφορετικά είδη δείγματος (σταφύλι, οίνος, σταφίδα). Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης για τα δείγματα των οίνων είναι παρόμοια, έτσι οι μέθοδοι προετοιμασίας (QuEChERS, SPE) και οι μέθοδοι ανίχνευσης παρουσιάζουν την ίδια ευαισθησία.

Τέλος, είναι απαραίτητο να γίνει κατανοητό ότι οι μέθοδοι ανίχνευσης των μυκοτοξινών είναι αναγκαίες, καθώς διαφυλάσσουν την ασφάλεια των συγκεκριμένων προϊόντων και προστατεύουν την υγεία του καταναλωτή. Όσο πιο ευαίσθητη είναι μία μέθοδος, όσο δηλαδή πιο χαμηλό όριο ανίχνευσης παρουσιάζει, τόσο πιο ασφαλή και ποιοτικά θεωρούνται τα προϊόντα που παράγονται από το σταφύλι, αλλά και ο ίδιος ο καρπός της αμπέλου. Στόχος της επιστημονικής κοινότητας θα πρέπει να είναι η ανάπτυξη νέων μεθόδων ανίχνευσης, ταυτοποίησης και ποσοτικοποίησης των μυκοτοξινών, οι οποίες θα χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη ακρίβεια, υψηλότερη ευαισθησία και ταχύτητα και μικρότερου κόστους.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### Ελληνική

- Γεωργάτσος Ι., Κυριακίδης Δ., Γιουψάνης Τ., Χολή-Παπαδοπούλου Θ., Γιαννακούρος Θ., Νικολακάκη Ε., Πανταζάκη Ε., Κοτίνης Κ., Καράγιωργας Α., Ασβεστά Σ. (2004), ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ.
- Διαμαντής, Φ., Σίσκος, Α., Παπαναστασίου-Διαμαντή, Α. (1987) Μαθήματα κλινικής χημείας. Αθήνα: Εκδόσεις Λύχνος.
- Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 401/2006 της 23ης Φεβρουαρίου 2006 για τον καθορισμό μεθόδων δειγματοληψίας και ανάλυσης για τον επίσημο έλεγχο των επιπέδων μυκοτοξινών στα τρόφιμα.
- Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 915/2023 ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ της 25ης Απριλίου 2023, σχετικά με μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα για ορισμένες ουσίες οι οποίες επιμολύνουν τα τρόφιμα και για την κατάργηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1881/2006.
- Κώδικας Τροφίμων και Ποτών (2005). Άρθρο 66. Ζαχαρούχες Γλυκαντικές Ύλες από Σταφίδες, Χαρούπια ή Γάλα
- Κώδικας Τροφίμων και Ποτών (2011). Άρθρο 121 Διατηρημένα με ξήρανση τρόφιμα φυτικής προέλευσης.
- Κώδικας Τροφίμων και Ποτών (2011). Άρθρο 132. Μαρμελάδες-Ζελέ, Μαρμελάδες εσπεριδοειδών- Κρέμα κάστανου
- Κώδικας Τροφίμων και Ποτών (2015). Άρθρο 126 Παράρτημα Ι
- Μπρατάκος, Σ., Μ., (2021). *Ενόργανη Χημική Ανάλυση. Εφαρμογές σε Τρόφιμα και Ποτά*. Εκδόσεις Παπαζήσης, Αθήνα.
- Παπαδογιάννης, Ι. Και Σαμανίδου, Β. (2001). *Ενόργανη Χημική Ανάλυση*. Εκδόσεις Πήγασος, Θεσσαλονίκη.
- Ταραντίλης, Π. και Παππάς, Χ., (2015). *Ενόργανη Χημική Ανάλυση, Πανεπιστημιακές Σημειώσεις*. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Αθήνα.

ΦΕΚ 198/Α/31.7.1976, Νόμος 396/76.

ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 491/2009 ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ της 25ης Μαΐου 2009 σχετικά με την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1234/2007 για τη θέσπιση κοινής οργάνωσης των γεωργικών αγορών και ειδικών διατάξεων για ορισμένα γεωργικά προϊόντα (ενιαίος κανονισμός ΚΟΑ)

ΚΑΤ' ΕΞΟΥΣΙΟΔΟΤΗΣΗ ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΕ) 2019/33 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ της 17ης Οκτωβρίου 2018 για τη συμπλήρωση του κανονισμού (ΕΕ) αριθ. 1308/2013 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου όσον αφορά τις αιτήσεις προστασίας ονομασιών προέλευσης, γεωγραφικών ενδείξεων και παραδοσιακών ενδείξεων στον αμπελοοινικό τομέα, τη διαδικασία ένστασης, τους περιορισμούς στη χρήση, τις τροποποιήσεις των προδιαγραφών προϊόντος, την ανάκληση της προστασίας, καθώς και την επισήμανση και την παρουσίαση

Σταυρακάκης Ν. Μανόλης (2019). *Αμπελουργία*. Εκδόσεις έμβρυο

Χούχουλα Δ. Και Σφάλμος Κ. (2020). *Ασφάλεια και τοξικότητα στην αγροδιατροφική αλυσίδα*. Εκδόσεις Τσότρας Αθήνα.



## Ξένη

- Abedi – Tizaki M., Sabbagh S. K., 2012 Morphological and molecular identification of Fusarium head blight isolates from wheat in north of Iran.
- Ahmad Alshannaq, Jae-Hyuk Yu (2017), Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food.
- Alhamoud Y, Yang D, Fiati Kenston SS, Liu G, Liu L, Zhou H, et al. Advances in biosensors for the detection of ochratoxin a: bio-receptors, nanomaterials, and their applications. Biosens Bioelectron. 2019;141:111418. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111418>.
- Arici, M., Gumus, T., & Kara, F. (2004). The fate of ochratoxin A during the Pekmez production from moldy grapes. Food Control, 15, 597–600.
- Awuchi, C. G., Ondari, E. N., Ogbonna, C. U., Upadhyay, A. K., Baran, K., Okpala, C. O. R., ... & Guiné, R. P. (2021). Mycotoxins affecting animals, foods, humans, and plants: Types, occurrence, toxicities, action mechanisms, prevention, and detoxification strategies—A revisit. Foods, 10(6)
- Brera, C., Soriano, J. M., Debegnach, F., & Miraglia, M. (2005). Title of the Article. Microchemical Journal, 79, 109.
- Bueno D, Istamboulie G, Munoz R, Marty JL. Determination of mycotoxins in food: a review of bioanalytical to analytical methods. Appl Spectrosc Rev. 2015;50(9):728–74. <https://doi.org/10.1080/05704928.2015.1072092>.
- Burdaspal, P. A., & Legarda, T. M. (1999). Ochratoxin A in wines and grape products originating from Spain and other European countries. Alimentaria, 36, 107–113.
- Cabañes, F.J.; Sahgal, N.; Bragulat, M.R.; Magan, N. Early discrimination of fungal species responsible of ochratoxin A contamination of wine and other grape products using an electronic nose. Mycotoxin Res. 2009,25, 187-192.
- Cao, M., Wang, J., Wang, M., Yuan, X., Zhang, X., Ma, J., ... & Li, Q. (2024). Simultaneous detection of 22 mycotoxins in grape by QuEChERS and ultra-high-performance liquid

- chromatography coupled with quadrupole/orbitrap high-resolution mass spectrometry. *Journal of Future Foods*, 4(4), 369-375.
- Caridi, A., 2006. Enological functions of parietal yeast mannoproteins. *Antonie van Leeuwenhoek* 89, 417–422.
- Chen H, Zhang L, Hu Y, Zhou C, Lan W, Fu H, et al. Nanomaterials as optical sensors for application in rapid detection of food contaminants, quality and authenticity. *Sensors Actuators B Chem.* 2021;329:129135. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.129135>.
- Chulze, S.N., Magnoli, C., Dalcero, A., 2006. Occurrence of ochratoxin A in wine and ochratoxigenic mycoflora in grapes and dried vine fruits in South America. *International Journal of Food Microbiology* 111, S5–S9.
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), Schrenk, D., Bodin, L., Chipman, J. K., del Mazo, J., Grasl-Kraupp, B., ... & Bignami, M. (2020). Risk assessment of ochratoxin A in food. *EFSA journal*, 18(5), e06113
- Engelhardt, G., & Sparrer, D. (2005). Ochratoxin A in getranken. [http://www.lgl.bayern.de/de/left/fachinformationen/lebensmittel/ochratoxin\\_getraenke.htm](http://www.lgl.bayern.de/de/left/fachinformationen/lebensmittel/ochratoxin_getraenke.htm)
- European Commission. (2023). *Commission Regulation (EU) 2023/915 of 25 April 2023 laying down maximum levels for certain contaminants in food*. Official Journal of the European Union, L119, 1-37.
- European Mycotoxin Awareness Network. (2003). Coordinated by Leatherhead Food Research Association (UK). Retrieved from <http://www.lfra.co.uk/eman/index.htm>
- Evans GP, Briers MG, Rawson DM. Can biosensors help to protect drinking water. *Biosensors.* 1986;2(5):287–300. [https://doi.org/10.1016/0265-928X\(86\)80008-6](https://doi.org/10.1016/0265-928X(86)80008-6).
- Evtugyn G, Hianik T. Electrochemical immuno- and aptasensors for mycotoxin determination. *Chemosensors.* 2019;7:29.
- Fernandes, A., Ratola, N., Cerdeira, A., Alves, A., Venâncio, A., 2007. Change in ochratoxin A concentration during winemaking. *American Journal of Enology and Viticulture* 58, 92–96.

- Food and Agriculture Organization. (2001). Safety evaluation of certain mycotoxins in food. Food and Nutrition Papers, 74, 281–415.
- Gambutì, A., Strollo, D., Genovese, A., Ugliano, M., Ritieni, A., Moio, L., 2005. Influence of enological practices on ochratoxin A concentration in wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 56, 155–162.
- Giacomelli, L., Boggetti, H., Agnelli, H., Anunziata, J., Silber, J. J., & Cattana, R. (1998). Title of the Article. *Analytica Chimica Acta*, 370, 79.
- Gómez, C., Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Mínguez, S., Cabañes, F.J., 2006. Ochratoxin A producing fungi from grapes intended for liqueur wine production. *Food Microbiology* 23, 541–545.
- Guilbault GG, Schmid RD. Biosensors for the determination of drug substances. *Biotechnol Appl Biochem.* 1991;14(2):133–45.
- Guzev, L., Danshin, A., Ziv, S., Lichter, A., 2006. Occurrence of ochratoxin A producing fungi in wine and table grapes in Israel. *International Journal of Food Microbiology* 111, S67–S71.
- He, J., Zhang, B., Zhang, H., Hao, L. L., Ma, T. Z., Wang, J., & Han, S. Y. (2019). Monitoring of 49 pesticides and 17 mycotoxins in wine by QuEChERS and UHPLC–MS/MS analysis. *Journal of food science*, 84(9), 2688–2697.
- Hurst, W. J., & Martin Jr., R. A. (1998). Title of the Article. *Journal of Chromatography A*, 810(2), 89.
- Klingelhöfer, D., Braun, M., Schöffel, N., Oremek, G. M., Brüggmann, D., & Groneberg, D. A. (2020). Ochratoxin–Characteristics, influences and challenges of global research. *Food Control*, 114, 107230.
- Kholová, A., Lhotská, I., Uhrová, A., Špánik, I., Machyňáková, A., Solich, P., ... & Šatínský, D. (2020). Determination of ochratoxin A and ochratoxin B in archived Tokaj wines (vintage 1959–2017) using on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography. *Toxins*, 12(12), 739.
- Kholová, A., Lhotská, I., Erben, J., Chvojka, J., Švec, F., Solich, P., & Šatínský, D. (2021). Comparison study of nanofibers, composite nano/microfiber materials, molecularly

imprinted polymers, and core-shell sorbents used for on-line extraction-liquid chromatography of ochratoxins in Tokaj wines. *Microchemical Journal*, 170, 106680.

Kizis, D., Vichou, A. E., & Natskoulis, P. I. (2021). Recent advances in mycotoxin analysis and detection of mycotoxigenic fungi in grapes and derived products. *Sustainability*, 13(5), 2537

Larcher, R., & Nicolini, G. (2001). Survey of ochratoxin A in musts, concentrated musts and wines produced or marketed in Trentino (Italy). *Journal of Commodity Sciences*, 40, 69–78.

Leong, S.L., Hocking, A.D., Scott, E.S., 2007. *Aspergillus* species producing ochratoxin A: isolation from vineyard soils and infection of Semillon bunches in Australia. *Journal of Applied Microbiology* 102, 124–133.

Leong, S.L., Hocking, A.D., Pitt, J.I., Kazi, B.A., Emmett, R.W., Scott, E.S., 2006a. Australian research on ochratoxigenic fungi and ochratoxin A. *International Journal of Food Microbiology* 111, S10–S17.

Leong, S.L., Hocking, A.D., Scott, E.S., 2006b. Effect of temperature and water activity on growth and ochratoxin A production by Australian *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates on a simulated grape juice medium. *International Journal of Food Microbiology* 110, 209–216.

Leong, S.L., Hocking, A.D., Scott, E.S., 2006c. The effect of juice clarification, static or rotary fermentation and fining on ochratoxin A in wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 12, 245–251.

Leong, S.L., Hocking, A.D., Varelis, P., Giannikopoulos, C., Scott, E.S., 2006d. Fate of ochratoxin A during vinification of Semillon and Shiraz grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 6460–6464.

Lichter, A., Danshin, A., Zahavi, T., Ovadia, A., Cuzev, L., 2005. Survival of OTA producing fungi during storage of table grapes (abstract). *Ochratoxin A in Grapes and Wine: Prevention and Control*, Sicily, Italy, 20–21 October.

- Li Y, Wang Z, Sun L, Liu L, Xu C, Kuang H. Nanoparticle-based sensors for food contaminants. *TrAC Trend Anal Chem.* 2019;113:74–83. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.01.012>.
- Lopez-Puertollano D., Agullo C., Mercader J., Abad-Somovilla A., Abad-Fuentes A., 2021, Immunoanalytical methods for ochratoxin A monitoring in wine and must based on innovative immunoreagents, *Food Chemistry* 345 (2021) 128828
- Louppis, A. P., & Constantinou, M. S. (2022). Application of a validated method for the identification and quantification of mycotoxins in wines using UPLC-MS/MS. *Separations*, 9(4), 102.
- Majerus, P., & Ottener, H. (1996). Detection and occurrence of ochratoxin A in wine and grape juice. *Deutsche Lebensmittel Rundschau*, 92, 388–390.
- Majerus, P., Bresch, H., & Ottener, H. (2000). Ochratoxin A in wines, fruit juices and seasonings. *Archives für Lebensmittelhygiene*, 51, 95–97.
- Maragos, C.M.; Busman, M. Rapid and advanced tools for mycotoxin analysis: A review. *Food Addit. Contam. Part A* 2010, 27, 688–700.
- Maragos, C.M. Multiplexed Biosensors for Mycotoxins. *J. AOAC Int.* 2016, 99, 849–860.
- Markaki, P., Delpont-Binet, C., Grosso, F., & Dragacci, S. (2001). Determination of ochratoxin A in red wine and vinegar by immunoaffinity high-pressure liquid chromatography. *Journal of Food Protection*, 64, 533–537.
- Meulenbergh, E.P. Immunochemical methods for ochratoxin A detection: A review. *Toxins* 2012, 4, 244–266.
- Miraglia, M., & Brera, C. (2002). Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU member states. Reports on tasks for scientific cooperation. Reports of experts participating in SCOOP Task 3.2.7. Directorate-General Health and Consumer Protection, Rome, Italy.
- Müller, G., Rosner, H., Rohrmann, B., Erler, W., Geschwend, G., Gräfe, U., Burkert, B., Möller, U., Diller, R., Sachse, K., Köhler, H., (2003). Effects of the mycotoxin ochratoxin A and some of its metabolites on the human cell line THP-1. *Toxicology*, 184(1):69-82.

- Nielsen, S. S., Ismail, B., Reuhs, B. L., & Nielsen, S. S. (2010). Analysis of food contaminants, residues, and chemical constituents of concern. *Food analysis*, 317-349.
- Nolan, P.; Auer, S.; Spehar, A.; Elliott, C.T.; Campbell, K. Current trends in rapid tests for mycotoxins. *Food Addit. Contam. Part A* 2019, 36, 800–814.
- Ortiz-Villeda, B., Lobos, O., Aguilar-Zuniga, K., & Carrasco-Sánchez, V. (2021). Ochratoxins in wines: A review of their occurrence in the last decade, toxicity, and exposure risk in humans. *Toxins*, 13(7), 478.
- Pascale 2009, *Detection Methods for Mycotoxins in Cereal Grains and Cereal Products*.
- Rahmani, A.; Jinap, S.; Soleimany, F. Qualitative and Quantitative Analysis of Mycotoxins. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2009, 8, 202–251.
- Rahman, H.U.; Yue, X.; Yu, Q.; Xie, H.; Zhang, W.; Zhang, Q.; Li, P. Specific antigen-based and emerging detection technologies of mycotoxins. *J. Sci. Food Agric.* 2019, 99, 4869–4877.
- Reinhard, H., & Zimmerli, B. (1999). Title of the Article. *Journal of Chromatography A*, 862, 147.
- Reverte L, Prieto SB, Campas M. New advances in electrochemical biosensors for the detection of toxins: nanomaterials, magnetic beads and microfluidics systems. A review. *Anal Chim Acta.* 2016;908:8–21. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.11.050>.
- Roset, M., 2003. Survey on ochratoxin A in grape juice. *Fruit Processing* 13, 167–172.
- Rousseau, J., Blateyron, L., Drouillard, J.B., 2005. Incidence of harvest conditions of grapes on ochratoxin A in wine (abstract). *Ochratoxin A in Grapes and Wine: Prevention and Control*, Sicily, Italy, 20–21 October.
- Sabra, A., Netticadan, T., & Wijekoon, C. (2021). Grape bioactive molecules, and the potential health benefits in reducing the risk of heart diseases. *Food Chemistry: X*, 12, 100149.
- Shephard, G. S. (1998). Title of the Article. *Journal of Chromatography A*, 815, 31.
- Shephard, G. S., Sydenham, E. W., Thiel, P. G., & Gelderblom, C. A. (1990). Title of the Article. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 13(2), 207.

- Turner, N. W., Subrahmanyam, S., & Piletsky, S. A. (2009). Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. *Analytica chimica acta*, 632(2), 168-180.
- Valenta, H. (1998). Title of the Article. *Journal of Chromatography A*, 815, 75.
- Valero, A., Marín, S., Rarnos, A.J., Sanchis, V., 2005. Ochratoxin A-producing species in grapes and sun-dried grapes and their relation to ecophysiological factors. *Letters in Applied Microbiology* 41, 196–201.
- Valero, A., Farré, J.R., Sanchis, V., Ramos, A.J., Marín, S., 2006. Kinetics and spatial distribution of OTA in *Aspergillus carbonarius* cultures. *Food Microbiology* 23, 753–756.
- Visconti, A., Pascale, M., & Centonze, G. (1999). Title of the Article. *Journal of Chromatography A*, 864, 89.
- Varga, J., Kozakiewicz, Z., 2006. Ochratoxin A in grapes and grape-derived products. *Trends in Food Science and Technology* 17, 72–81.
- Yang, Y.; Li, G.; Wu, D.; Liu, J.; Li, X.; Luo, P.; Hu, N.; Wang, H.; Wu, Y. Recent advances on toxicity and determination methods of mycotoxins in foodstuffs. *Trends Food Sci. Technol.* 2020, 96, 233–252.
- Wang, L., Hua, X., Shi, J., Jing, N., Ji, T., Lv, B., ... & Chen, Y. (2022). Ochratoxin A: Occurrence and recent advances in detoxification. *Toxicon*, 210, 11-18.
- Zhang, K., Tan, S., & Xu, D. (2022). Determination of mycotoxins in dried fruits using LC-MS/MS—A sample homogeneity, troubleshooting and confirmation of identity study. *Foods*, 11(6), 894.
- Zheng M.Z., Richard J.L., Binder J.A. (2006), A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins.
- Zimmerli, B., & Dick, R. (1996). Ochratoxin A in table wine and grape-juice: Occurrence and risk assessment. *Food Additives and Contaminants*, 13, 655–668.

## Διαδίκτυο

- FAOSTAT (2023). Data. Crops and livestock products. Grapes. Available online (22/07/2024): <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>
- OIV (2024). State of the World Vine and Wine Sector in 2023. OIV 100. International Year of Vine and Wine 1924-2024. Available online (22/07/2024): [https://www.oiv.int/sites/default/files/2024-04/OIV\\_STATE\\_OF\\_THE\\_WORLD\\_VINE\\_AND\\_WINE\\_SECTOR\\_IN\\_2023.pdf](https://www.oiv.int/sites/default/files/2024-04/OIV_STATE_OF_THE_WORLD_VINE_AND_WINE_SECTOR_IN_2023.pdf)
- *"Isis & Osiris"*. University of Chicago. By Plutarch published in Vol. V of the Loeb Classical Library edition, 1936
- *Congressional Serial Set*. U.S. Government Printing Office. 1903. p. 263. Retrieved 6 May 2024.
- Adams, Fiona (2019). *"New Mexico's Deep Winemaking History"*. Wine Enthusiast. *Archived* from the original on 23 August 2019. Retrieved 6 May 2024.
- California Vineyardists Association; Associated California Fruit Industries (1980). *Wines and Vines*. Haring Company.
- <https://chimikoergastirio.blogspot.com/2009/11/s.html>
- <https://depositphotos.com/gr/vector/grape-pruning-scheme-spur-pruned-general-view-grape-vine-plant-340803992.html>