



الجمهورية العربية السورية
جامعة دمشق
كلية الزراعة
قسم علوم الأغذية

**تقدير كمية الباتولين في ثمار التفاح وبعض منتجاته المصنعة وإجراء
بعض التعديلات على إمكانية خفضه**

**Determination of Patulin Content in Apple Fruits and Some of its Processed
Products and Make some Modifications for the possibility of its reduction**

رسالة أعدت لنيل درجة الماجستير في الهندسة الزراعية (علوم الأغذية)

إعداد المهندسة
تهاني أحمد الحداد

المشرف المشارك
د. فائق حامد

المشرف العلمي
د. هادي حبال

قسم تكنولوجيا الأغذية

مدرس في قسم علوم الأغذية

الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية

قسم علوم الأغذية – جامعة دمشق

عام 1434هـ - 2013م

المحتويات

CONTENTS

فهرس المحتويات

الموضوع	رقم الصفحة
الملخص باللغة العربية	
الملخص باللغة الانكليزية	
1-المقدمة	1
2- الدراسة المرجعية:	
1-2- الخصائص الفيزيا-كيميائية للباتولين	4
2-2- إنتاج الباتولين	4
2-3- التأثيرات الصحية للباتولين	5
2-4- الباتولين في الأغذية	6
2-4-1- العوامل المؤثرة على إنتاج الباتولين في الأغذية	7
2-5- الباتولين في عصير التفاح	7
2-6- ضبط الباتولين في عصير لتفاح	9
2-6-1- ضبط الباتولين قبل التصنيع	9
2-6-2- ضبط الباتولين أثناء التصنيع	9
2-6-2-1- تخزين ثمار التفاح	9
2-6-2-2- الغسيل والفرز	11
2-6-2-3- الترشيح	12
2-6-2-4- المعاملة الأنزيمية	13

14	2-6-5- البسترة
15	2-6-6- تخزين العصير
15	2-7- الإضافات الكيميائية
15	2-7-1- ثاني أكسيد الكبريت
18	2-7-2- السيستين
20	2-7-3- حمض الأسكوربيك
21	2-8-4- الإضافات الأخرى
22	2-8- التعديلات الحيوية
23	2-9- الأشعة الكهرمغناطيسية
24	2-10- الباتولين في المنتج النهائي
25	2-11- طرائق كشف وتقدير الباتولين

3- مواد وطرائق البحث

27	3-1- مواد البحث
27	3-1-1- المواد الكيميائية
27	3-1-2- أجهزة التحليل
27	3-1-3- العينات
28	3-2- طرائق التحليل
28	3-2-1- تعيين الباتولين في عينات التفاح
29	3-2-2- تعيين الباتولين في عينات العصير
30	3-2-3- تعيين الباتولين في عينات أغذية الأطفال
30	3-2-4- المعاملات التصنيعية المطبقة على العصير لخفض محتواه من الباتولين
31	3-2-5- تحضير الطور الحامل
31	3-2-6- تحضير محلول كربونات الصوديوم 4%

31	7-2-3- تقييم طريقة تقدير الباتولين
32	3-7-2-1- تحضير المنحني القياسي للباتولين
32	3-7-2-2- حساب حد الكشف وحد الكشف الكمي
32	3-7-2-3- حساب نسبة الاسترجاع
33	3-8-2- حساب نسب التعرض للباتولين
33	3-3- التحليل الإحصائي

4- النتائج والمناقشة

34	4-1- تقييم طريقة تقدير الباتولين
34	4-1-1- المنحني المعياري
34	4-1-2- حد الكشف وحد الكشف الكمي
35	4-1-3- حساب نسبة الاسترجاع
36	4-2- تركيز الباتولين في عينات التفاح المدروسة
39	4-3- تركيز الباتولين في عينات عصير التفاح المدروسة
42	4-4- تركيز الباتولين في عينات أغذية الأطفال المدروسة
45	4-5- نسب التعرض للباتولين
48	4-6- تأثير خطوات تصنيع عصير التفاح على مستويات الباتولين في المنتج النهائي
50	4-6-1- استقبال الثمار
51	4-6-2- الغسيل والفرز
52	4-6-3- الهرس
52	4-6-4- العصر
52	4-6-5- البسترة
53	4-6-6- المعاملة الأنزيمية
54	4-6-7- الترشيح الدقيق
54	4-6-8- التركيز

55	4-6-9- المنتج النهائي
57	4-7- المعاملات المقترحة لخفض تركيز الباتولين في عصير التفاح المصنع
57	4-7-1- تأثير حمض الأسكوربيك
59	4-7-2- تأثير ثاني أكسيد الكبريت
61	4-7-3- تأثير السيستين
63	4-7-4- تأثير الكويرسيتين
64	4-7-5- تأثير الترشيع بالكربون المنشط

5-الاستنتاجات والتوصيات

67	- الاستنتاجات
68	- التوصيات

6-الملاحق

69	- منحنيات بيانية تبين تركيز الباتولين في بعض العينات المدروسة بواسطة جهاز الـ HPLC
----	--

7-المراجع

73	- المراجع العربية
74	- المراجع الأجنبية

فهرس الجداول

رقم الجدول	الموضوع	الصفحة
1	نسبة الاسترجاع في كل من التفاح وعصيره وأغذية الأطفال	35
2	تركيز الباتولين في عينات التفاح المدروسة (مكغ/ل)	37
3	محتوى عينات عصير التفاح من الباتولين	40
4	تركيز الباتولين في عينات أغذية الأطفال المدروسة	43
5	نسب التعرض للباتولين (مكغ/كغ وزن الجسم/اليوم)	47
6	تركيز الباتولين خلال مراحل تصنيع عصير التفاح صناعياً	51
7	تأثير المعاملات المختلفة على تركيز الباتولين في عصير التفاح	57

فهرس الأشكال

رقم الشكل	الموضوع	الصفحة
1	البنية الكيميائية للباتولين	4
2	آلية تأثير المركبات الكبريتية على الباتولين	16
3	تقنية التفاعل بين الباتولين والمجموعات الوظيفية في البروتين	19
4	المنحنى القياسي للباتولين	34
5	تأثير درجة الإصابة (50% و 25%) في تركيز الباتولين في أصناف التفاح المدروسة	39
6	تركيز الباتولين في عينات عصير التفاح المدروسة (المحلية والمستوردة)	42

44	تركيز الباتولين في عينات أغذية الأطفال المدروسة	7
45	متوسط تركيز الباتولين في العينات المدروسة	8
48	نسب التعرض للباتولين (مكغ/كغ وزن الجسم/اليوم)	9
56	تأثير مراحل التصنيع المختلفة على معدل تراجع الباتولين	10
59	تأثير المعاملة بحمض الأسكوربيك على خفض الباتولين	11
61	تأثير المعاملة بثاني أكسيد الكبريت على خفض الباتولين	12
63	تأثير المعاملة بالسيستين على خفض الباتولين	13
64	تأثير المعاملة بالكويرسيتين على خفض الباتولين	14
65	تأثير المعاملة بالفحم النباتي المنشط على خفض الباتولين	15
66	تأثير المعاملات المقترحة على خفض تركيز الباتولين في عصير التفاح المصنع	16

فهرس المخططات والمنحنيات البيانية

رقم المخطط	الموضوع	الصفحة
1	خط تصنيع عصير التفاح المبستر المدروس	49
2	المخطط الكروماتوغرافي لتركيز الباتولين في عينة الشاهد المحضرة لإجراء المعاملات بواسطة جهاز الـ HPLC	69
3	المخطط الكروماتوغرافي لتركيز الباتولين في عينة عصير التفاح المرشحة باستخدام الفحم المنشط	69
4	المخطط الكروماتوغرافي لتركيز الباتولين في عينة عصير التفاح المعاملة بإضافة تركيز 500 ppm حمض الأسكوربيك	70

70	المخطط الكروماتوغرافي لتركيز الباتولين في عينة عصير التفاح المعاملة بإضافة تركيز 50 ppm سيسيتين	5
71	المخطط الكروماتوغرافي لتركيز الباتولين في عينة عصير التفاح المأخوذة من مرحلة العصر	6
71	المخطط الكروماتوغرافي لتركيز الباتولين في عينة عصير التفاح المأخوذة من مرحلة المعاملة الأنزيمية	7
72	المخطط الكروماتوغرافي لتركيز الباتولين في عينة عصير التفاح المأخوذة من جهاز البسترة	8

ملخص البحث

RESEARCH SUMMARY

ملخص البحث

يعد التفاح والمنتجات المحضرة منه من أهم مصادر التعرض للباتولين، ونظراً لارتفاع معدل استهلاكها في السنوات الأخيرة، فقد هدف هذا البحث إلى دراسة المحتوى من الباتولين في ثمار وعصير التفاح وأغذية الأطفال المصنعة منه والمباعة في مدينة دمشق وريفها، وكذلك دراسة تأثير مراحل تصنيع عصير التفاح وبعض الإضافات الكيميائية (حمض الأسكوربيك، ثاني أكسيد الكبريت، السيستين، الكويرسيتين) والمعاملة بالترشيح بالكربون المنشط على مستوى الباتولين في العصير الناتج.

تناولت الدراسة 20 عينة من ثمار التفاح المختلفة من حيث درجة الجودة والصنف، و20 عينة عصير من ماركات مختلفة، و10 عينات من أغذية الأطفال المحضرة من هريس التفاح دون أو مع إضافات أخرى.

تم تقدير المحتوى من الباتولين باستخدام جهاز (HPLC-UV) وفق الشروط التالية: حرارة العمود 25°م ومعدل التدفق 1 مل/دقيقة وطول الموجة 276 نانومتر. وقد أظهرت النتائج أن نسبة استرجاع الباتولين في الطريقة المتبعة كانت 83.1% و85% و80.3% للثمار والعصير وأغذية الأطفال على التوالي، وكانت الخطية ($r^2 = 0.97$) ضمن التراكيز (50-250) مكغ/ل، وبلغ حد الكشف (LOD) 30 مكغ/ل وحد الكشف الكمي (LOQ) 100 مكغ/ل.

تراوح محتوى الباتولين في عينات التفاح الطازجة من ND (غير مكتشف) إلى 183.2 مكغ/ل، وبمتوسط 48.68 مكغ/ل، وبلغ عدد العينات التي تجاوز تركيز الباتولين فيها الحد المسموح به من قبل WHO (50 مكغ/ل) 10 عينات (50%). أما عينات عصير التفاح فقد تراوح محتواها من الباتولين من ND إلى 820 مكغ/ل، وبمتوسط 211.15 مكغ/ل، وقد تجاوز 70% من العينات المدروسة الحد الأعظمي المسموح به (50 مكغ/ل). كما تراوح محتوى عينات أغذية الأطفال من الباتولين من ND إلى 81.5 مكغ/ل، وكان المتوسط 20.46 مكغ/ل، وبلغت

نسبة العينات التي تجاوز تركيز الباتولين فيها الحد المسموح به في أغذية الأطفال (10 مكغ/ل) 30%.

تناولت المرحلة الثانية من البحث دراسة تأثير مراحل تصنيع عصير التفاح بدءاً من استلام ثمار التفاح وصولاً إلى المنتج النهائي، وأظهرت النتائج أن عملية تصنيع عصير التفاح المتبعة في المصنع المدروس تؤدي إلى خفض محتوى الثمار من الباتولين بمعدل 79.2%، وأن أكثر الخطوات فعالية في إحداث تراجع في تركيز الباتولين وفقاً للنتائج المتحصل عليها هي مرحلة الغسيل والفرز (41.1%) تليها المعاملة الأنزيمية (10.3%) ثم الترشيح الدقيق (7.5%) ثم العصر (6.7%) ثم البسترة (3.4%) ثم الطحن (1.8%).

تناول الجزء الأخير من البحث دراسة تأثير الترشيح بالكربون المنشط وبعض الإضافات الكيميائية في خفض المتبقي من الباتولين في عينة عصير تفاح، وقد أظهرت النتائج أن معاملة عينة عصير تفاح حققت بـ (1500 مكغ/ل) باتولين بالكربون المنشط قد أدت إلى خفض تركيز الباتولين إلى مادون حد الكشف مقارنة مع الشاهد (1225.6 مكغ/ل)، إلا أنه أثر بشكل سلبي على لون ورائحة ونوعية العصير الناتج. في حين تفاوتت الإضافات الكيميائية في قدرتها على تفكيك الباتولين وذلك مقارنة مع الشاهد، فقد أدى إضافة حمض الأسكوربيك بنسبة (100 و 500 ppm) إلى خفض تركيز الباتولين إلى 940.1 مكغ/ل و ND على التوالي، أما إضافة ثاني أكسيد الكبريت SO_2 والسيستين والكويرسيتين بنسبة (50 و 100 ppm) فقد أحدث تراجع في الباتولين إلى 820.7 مكغ/ل و 530.8 مكغ/ل، 975.3 مكغ/ل و 686.9 مكغ/ل، و 1083 مكغ/ل و 850.9 مكغ/ل على التوالي.

أوضحت النتائج أن أفضل معاملة للتخلص من الباتولين في المنتج النهائي من حيث المحافظة على صفات الجودة للعصير الناتج وتدعيم القيمة التغذوية له هي إضافة حمض الأسكوربيك بتركيز 500 ppm أو الكويرسيتين بتركيز 100 ppm. في حين أن إضافة ثاني أكسيد الكبريت كان لها تأثيراً فعالاً بالتراكيز المنخفضة ولكن لم يدرس التأثير على الصفات الحسية للعصير الناتج، يلي ذلك السيستين ثم الكويرسيتين على التوالي من حيث الفعالية في خفض تركيز الباتولين.

Abstract

Apples and its products are the most important sources of patulin exposure, because of the high rate of its consumption in the recent years. This research aimed to survey the content of patulin in apple products (fruit, juice and baby food) which sold in Damascus and Damascus countryside, on the other hand, to study the influence of apple juice processing steps, additives (ascorbic acid, sulfur dioxide, cysteine, quercetin) and carbon filtration on patulin level of juice.

The study examined 20 samples of different apples (different species and quality grade), 20 samples of juice (different bands), and 10 samples of baby food which prepared from apple sauce without or with other additives.

Patulin was analyzed by using (HPLC-UV) with the following conditions: temperature of the column was 25 °C, flow rate was 1 ml/min, wavelength was 276 nm. The results showed that the recovery rate of patulin in the used method was 83.1%, 85%, 80.3% for fruit, juice and baby food respectively, the linearity was ($r^2=0.97$) in concentrations (50-250) µg/l, the limit of detection (LOD) was 30 µg/l, and the limit of quantitative (LOQ) was 100 µg/l.

The content of patulin in samples of fresh apple ranged from ND (Non Detected) to 183.2 µg/l, with average of 48.68 µg/l. The number of samples which patulin exceeded the accepted limit of WHO (50 µg/l) was 10 samples (50%). The patulin content in apple juice samples ranged from ND to 820 µg/l, with an average of 211.15 µg/l, 70% of studied samples exceeded (50 µg/l). The patulin content of baby food samples ranged from ND to 81.5 µg/l, with an average of 20.46 µg/l, 30% of samples were out of allowed limit (10 µg/l).

Results of studying juice processing stages showed that processing reduce the content of patulin from fruit up to 79.2%, and the most

significant stage for the reduction of patulin was washing and sorting (41.1%), followed by the enzymatic treatment (10.3%), microfiltration (7.5%), pressing (6.7%), pasteurization (3.4%), and milling (1.8%).

Filtration of final juice (injected with 1500 $\mu\text{g/l}$ patulin) by activated carbon reduced the concentration of patulin from 1225.6 $\mu\text{g/l}$ to below LOD. This treatment influenced negatively on juice color and smell quality. On the other hand, chemical additives varied in their ability to destroy patulin. Addition of ascorbic acid in concentration of 100 and 500 ppm reduced the concentration of patulin to 940.1 $\mu\text{g/l}$ and ND respectively, meanwhile, the addition of sulfur dioxide, cysteine, and quercetin in concentration 50 and 100 ppm reduced patulin to 820.7 $\mu\text{g/l}$ and 530.8 $\mu\text{g/l}$, 975.3 $\mu\text{g/l}$ and 686.9 $\mu\text{g/l}$, and 1083 $\mu\text{g/l}$ and 850.9 $\mu\text{g/l}$ respectively.

The results showed that the best treatment for reduction of patulin from the final juice product without affecting its quality was the addition of ascorbic acid with concentration 500 ppm or quercetin 100 ppm, followed by cysteine and quercetin. Although the addition of sulfur dioxide was effective in destroy patulin, but it maybe decrease juice quality.

1- المقدمة

1- Introduction

السموم الفطرية Mycotoxins هي نواتج الاستقلاب السامة التي تفرزها الفطريات وتتوضع في المنتجات الزراعية.

يعد الباتولين الناتج الأيضي الثانوي لأنواع مختلفة من الفطريات الهوائية المجهرية وبشكل أساسي: *Aspergillus clavatus* و *Penicillium patulum* و *Penicillium expansum*، والتي تقوم بإنتاجه تحت ظروف خاصة من الرطوبة والحرارة، وينتقل مع العديد من الأغذية إلى الإنسان ولاسيما التفاح والمشمش والدراق والعنب والبازلاء والحبوب والطحين وعلف الشعير وأغذية الأطفال.

عزل الباتولين بصورة رئيسية من التفاح ومنتجاته الملوثة بفطر *Penicillium expansum*، وأكد (Murillo-Arbizu et al., 2009) أن جميع الفطريات المعزولة من ثمار التفاح لها القدرة على إفراز الباتولين بكميات مختلفة تصل إلى 1 غ/كغ ثمار تفاح مصابة بالعفن. تظهر إصابة ثمار التفاح وبخاصة الناضج منها بفطر *Penicillium expansum* بشكل عفن أزرق (Alves et al., 2000)، وتعتبر مرحلة التخزين هي الأهم والأساس في ظهوره.

(Larsen et al., 1998)

يوجد الباتولين أيضاً في منتجات التفاح المصنعة وبشكل خاص العصير العادي والمركز وأغذية الأطفال، كما لوحظ وجوده بنسبة عالية في منتجات التفاح العضوية مقارنة بالتقليدية، وبالتالي يعد تناول عصير ومركز التفاح من أكثر مصادر التعرض للباتولين وخاصة بالنسبة للأطفال واليافعين (Golan & Paster, 2005).

إن الفطور المعزولة من ثمار التفاح لها القدرة على إحداث تغيرات في رائحة وطعم العصير، كما أنها تسبب تراجع في جودة عصائر الفاكهة بالإضافة إلى قدرتها على إفراز مواد سامة (Murillo-Arbizu et al., 2009).

تكمّن خطورة الباتولين في كونه يملك تأثيراً مطفراً ويسبب تسمماً عصبياً ومناعياً وجينياً، كما تسبب الجرعات الزائدة منه أعراضاً تتجلى بالغثيان والتقيؤ واضطرابات هضمية (Welke et al., 2009). ووفقاً لتأثيراته السمية المحتملة فقد حددت كل من منظمة الصحة العالمية (WHO) ومنظمة الغذاء والدواء (FDA) ومنظمة الغذاء والزراعة الدولية (FAO) التركيز الأعظمي للباتولين في عصير التفاح بـ 50 مكغ/ل، في حين حددته هيئة دستور الغذاء (Codex) بـ 25 مكغ/ل، وحددت الولايات المتحدة الحد الأقصى المسموح به للرضع والأطفال اليافعين بـ 10 مكغ/ل، أما الجرعة اليومية فيجب أن لا تزيد عن 0.4 مكغ/ل/وزن الجسم (FAO, 2003; Codex, 2003; FDA, 1994; WHO, 1990).

تساهم مراحل التصنيع المختلفة في التأثير بشكل متفاوت على مستوى الباتولين في المنتج النهائي، وتعد أكثر الخطوات فاعلية في تراجع محتوى العصير من الباتولين كل من عملية الغسيل وعملية الفرز، حيث أنّ إزالة الثمار المتضررة أو الأجزاء المصابة بالعفن تظهر تراجع بما يقارب 99% في مستوى الباتولين (Lovett et al., 1992)، وأيضاً تقلل عملية الترشيح التقليدية باستخدام الفحم النباتي المنشط من محتوى الباتولين في العصير بنسبة 40.9% (Kadikal & Nas, 2002)، أما عمليات الهرس والطحن والمعاملة الأنزيمية والترشيح الدقيق فإنها تملك تأثيراً ضعيفاً في تراجع الباتولين، يضاف إليها عملية البسترة والتي يعزى ضعف تأثيرها إلى الثبات النسبي للباتولين تجاه المعاملة الحرارية.

(Leggott & Shephard, 2001)

تساهم بعض المواد الموجودة طبيعياً في الأغذية في تثبيك الباتولين بشكل فعّال، كالمركبات ذات المحتوى العالي من مجموعات السلفاهيدريل كالسيستين والغلوتاثيون (Lai et al., 2000)، وحمض الأسكوربيك، وكذلك تساهم بعض المواد المضافة كأكسوربات الصوديوم وثاني أكسيد الكبريت (Baert et al., 2006)، والمعاملة بالأوزون وبأشعة غاما (Mckenzie et al., 1997) في تثبيكه.

مبررات البحث:

نظراً لخطورة الباتولين على صحة الفرد وعدم وجود الدراسات الكافية حول مستوياته في ثمار التفاح ومنتجاتها (عصير التفاح- أغذية الأطفال) في سورية، ولارتفاع معدل استهلاك عصير التفاح في السنوات الأخيرة.

فقد هدف هذا البحث إلى:

- 1- تقييم كفاءة طريقة التحليل المتبعة في تقدير المحتوى من الباتولين من قبل الهيئات الرسمية.
- 2- التحري عن مستويات الباتولين الموجودة في ثمار التفاح.
- 3- التحري عن مستويات الباتولين الموجودة في عصير التفاح المبستر.
- 4- التحري عن مستويات الباتولين الموجودة في أغذية الأطفال المصنعة من ثمار التفاح والمباعة في السوق المحلية لمدينة دمشق وريفها.
- 5- دراسة تأثير مراحل التصنيع المختلفة على مستويات الباتولين في خط تصنيع عصير التفاح المبستر.
- 6- إجراء بعض التعديلات بهدف خفض نسبة الباتولين في العصير الناتج.

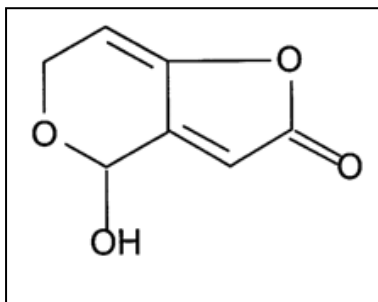
2- الدراسة المرجعية

2-Literature Review

1-2- الخصائص الفيزيا-كيميائية للباتولين:

Physico- Chemical Characteristics of Patulin

يملك الباتولين الصيغة الكيميائية: $C_7H_6O_4$ الموضحة بالشكل (1)
(4-hydroxy-4H-furo[3,2-c]pyran-2(6H)-one)



الشكل (1): البنية الكيميائية للباتولين

الباتولين عبارة عن لاكتون منحل في الماء والإيثانول والأسيتون و الإيثيل أسيتات والإيتر والكلوروفورم ولكنه غير قابل للانحلال في البنزين وإيتر البترولي، ويوجد بصورة صلبة على هيئة بلورات عديمة اللون أو بيضاء، ووزنه الجزيئي 154.1 غ/مول، ودرجة انصهاره (112-114)°م، كما أنّ الباتولين لا يتفكك بالحرارة، ويمتاز بثباته في الأوساط الحامضية وعدم ثباته في الأوساط القلوية بسبب تميّه حلقة اللاكتون (Codex, 1999).

2-2- إنتاج الباتولين: Production of Patulin

أشار (Moss & Long, 2002) إلى أن الباتولين ينتج من قبل مايزيد على 60 نوع من الأعفان متضمنة أكثر من 30 جنس أهمها:

- Penicillium expansum*, *P.leucopus*, *P.patulum*, *P.urticae*, *P.griseofulvum*
- P.crustosum*, *P.roqueforti*, *P.claviforme*.
- Paecilomyces spp.*
- Alternaria alternata*.
- Byssochlamys nivea*, *B.fulva*.
- Aspergillus giganteus*, *A.terreus*, *A.clavatus*.

وقد عزل الباتولين من عدة أصناف من الفاكهة والخضار كالتفاح والعنب والكرز والزعرور والبالزلاء والمشمش والفريز والدراق وتوت العليق والتوت الأسود والتوت الأبيض والخوخ والبندورة والبرقوق الأخضر والموز والعناب والزبيب واللوز والجوز والفول السوداني والبندق (Demirci et al., 2003).

3-2- التأثيرات الصحية للباتولين: The health effects of patulin

السموم الفطرية (Mycotoxins): عبارة عن المواد المفرزة من قبل مجموعة من الفطور، وهذه الإفرازات الفطرية سامة بالنسبة للإنسان والحيوان. حيث يفرز فطر *Penicillium citrinum* سم السيترينين (Citrinine) المسبب للتسمم الكلوي، ويفرز فطر *P. notatum* سم النوتاتين (Notatine) الذي يعرقل عملية نقل الأوكسجين بواسطة الدم، أما فطر *P. expansum* فإنه يفرز سم الباتولين (Patulin) الذي يسبب مجموعة من التأثيرات الصحية (مرعي، 1997).

أشار (Hopkins, 1993) إلى أن الأعراض الحادة للباتولين تتجلى بحدوث اضطراب وتشنج واحتقان واستسقاء رئوي واحتقان بالدم وتضخم المجاري التنفسية ودوران ونزيف معوي وقرحة، وتظهر الأعراض المزمنة بصورة تسمم جيني وتسمم عصبي وضعف في المناعة وحدوث تشوهات خلقية وتأثير مسرطن.

وعلى مستوى الخلية أكد الباحثون (Hopkins, 1993; Wichmann et al., 2002) أن الباتولين يؤدي إلى تمزق الغشاء البلازمي للخلية وتعطيل عملية النسخ والنقل وتنشيط اصطناع البروتين الأولي واصطناع DNA و RNA وإنتاج الإنترفيرون.

لذلك فقد حدد الاتحاد الأوروبي EU التركيز الأعظمي المسموح من الباتولين في الأغذية بـ 50 مكغ/ل، وحددت منظمة الأغذية والأدوية الأمريكية USFDA نسبته في عصائر التفاح ومركزاتها وخل التفاح بـ 50 مكغ/ل (USFDA, 2004)، إلا أن العديد من البلدان خفضت هذه النسبة إلى (25-35) مكغ/ل نظراً لارتفاع معدل استهلاك عصير التفاح.

(Van Egmond, 1989)

كما حددت منظمة الصحة العالمية WHO الجرعة اليومية العظمى بـ 0.4 مكغ/كغ من وزن الجسم/اليوم (WHO, 1995), أما نصف الجرعة السامة (LD₅₀) من الباتولين فهي 17 مغ/كغ للفئران (Moller & Josefsson, 1985).

2-4- الباتولين في الأغذية: Patulin within Foods

بينت منظمة الصحة العالمية (WHO, 1995) أن الاعتقاد السائد في الماضي هو أن وجود الباتولين في الغذاء يقتصر فقط على عصير التفاح وعصير التفاح المتخمر (السيدر), إلا أن الأبحاث أظهرت أن إنتاج الباتولين يحدث أيضاً في العديد من منتجات الفاكهة والخضار وفي مقدماتها: التفاح والعنب والبازلاء والكرز والزبيب والبرتقال والأناناس وعصائر الفاكهة الهشة وخل التفاح المبستر وغير المبستر وهريس التفاح والذرة والفريز ومربي العناب وبعض أغذية الأطفال (Riteni, 2003), وأكثر من ذلك في توت العليق الأحمر والبازلاء والتوت البري والفريز والكرز الأسود والخوخ والتي تكون أيضاً عرضة لنمو الفطر وإنتاج الباتولين من قبل أحد الجنسين: *P.expansum*, *B.fulva* أو كلاهما معاً (Larsen et al., 1998).

بالإضافة إلى منتجات الفاكهة والخضار فقد تم فصل الباتولين من جبن الشيدر, ومنتجات الحبوب كالشعير والقمح المتخمر والأعلاف المتخمرة وبقايا حصاد الحبوب (Pittet, 1998), وقد أظهرت إحدى الدراسات على الخبز ومنتجات الدقيق بأن 23 سلالة من *Penicillium* و *Aspergillus* عزلت من الخبز المتعفن وأن 21 سلالة منها كانت إيجابية لإنتاج الباتولين بكمية تراوحت (27-160) مكغ/كغ, كما سبب وجود الباتولين في الأعلاف المتخمرة موت 100 بقرة غذيت عليها, إضافة إلى إحداث أعراض نزيف وموت في القطيع المغذى على السيلاج, أما منتجات الفاكهة الصناعية فقد وجد بأن منتجات التفاح تكون الأكثر عرضة للتلوث بالباتولين, في حين أن العديد من مصادر الأغذية الأخرى ومنتجاتها وجد أنها تحوي الباتولين المنتج ضمنها أو الذي وصل لها عن طريق التلوث الخارجي (Syrett, 1989).

2-4-1- العوامل المؤثرة على إنتاج الباتولين في الأغذية:

Effective Factors on Patulin Production within Foods

أوضح (McCallum *et al.*, 2002) أنّ إنتاج الباتولين في الفاكهة والخضار وجميع منتجاتها يكون مرتبط بشكل كبير بعدة عوامل:

- 1- النشاط المائي (a_w).
- 2- درجة الحرارة: يتجلى تأثيرها على نمو الكائن الممرض وعلى إنتاج الباتولين أيضاً، حيث تم مراقبة إنتاج الباتولين على مجال درجات حرارة نمو *P.expansum* والذي يشمل المجال (30-30)°م، بينما أظهر *Byssoschlamys nivea* نمو أسرع على درجتي الحرارة (37,30)°م، في حين أنّ أعلى إنتاج للباتولين كان على الدرجة (21)°م.
- 3- pH: يظهر الباتولين عدم ثباتية عند الدرجات العالية من pH.
- 4- عوامل كيميائية أخرى مرتبطة بالفاكهة ذاتها: حيث لوحظ ارتباط بين إنتاج الباتولين من قبل فطر *P.expansum* ونوع الصنف المزروع فأصناف: Jonathan, Goudreinetter, Cox's Orange, Bramley تكون أكثر حساسية للإصابة بهذا الفطر وإنتاج الباتولين، بينما يظهر الصنف Golden Delicious مقاومة أكثر للإصابة (Corbett, 2003).

2-5- الباتولين في عصير التفاح: Patulin in Apple Juice

عند تصنيع عصير التفاح يتم استخدام أصناف خاصة تمتاز بعدم ملائمتها للتجارة والبيع المباشر للمستهلك نظراً لتدني جودتها وانخفاض أسعارها، والتي تكون أكثر تعرضاً للتلوث الفطري وإنتاج الباتولين (Rosenberger, 2003)، حيث أشار الباحثون (Beretta *et al.*, 2000) أنّ التركيز الأعظمي للباتولين في ثمار التفاح المستخدمة في تصنيع العصير في إيطاليا وأستراليا بلغ 1150 مكغ/ل و 646 مكغ/ل على التوالي، كما يعتبر العصير من الأغذية سريعة الفساد بتأثير الأحياء الدقيقة، حيث تقوم الفطور بإفراز السم الفطري الباتولين فيه، كما تقوم بتحويل المركبات السكرية والبروتينية في شروط هوائية مما يسبب تغيرات في الطعم والرائحة ويجعله غير صالح للاستهلاك (طيفور وسفر، 1991).

قام كل من (Brackett & Marth, 1989) بدراسة 40 عينة من عصير التفاح المباع في واشنطن وتبين لهما أن 23 عينة احتوت على الباتولين بتركيز (10-350) مكغ/ل. في حين وجد الباحثون (Ware et al., 1994) أن 8 عينات من أصل 13 عينة عصير تفاح تجارية احتوت تركيز (44-309) مكغ/ل باتولين.

وجد (Gokmen & Acar, 1998) في تركيا أن 215 عينة عصير تفاح احتوت جميعها على الباتولين بتركيز (7-375) مكغ/ل في حين أن 43% منها كان تركيز الباتولين فيها يفوق 50 مكغ/ل. وبينت دراسة أخرى في جنوب إفريقيا أن 5 من أصل 22 عينة عصير كانت ملوثة بالباتولين بتركيز (10-45) مكغ/ل. وقد وجد الباحثون (Jelinek et al., 1989) أن التركيز الأعظمي للباتولين في عينات عصير التفاح المختبرة والمباعة في فرنسا (23 عينة) وصل إلى 610 مكغ/ل.

كما أظهرت نتائج التحري عن وجود الباتولين في عينات عصير مباع في شرق ألمانيا أن 40% من العينات كانت ملوثة بالباتولين بتركيز (20-200) مكغ/ل (Golan & Paster, 2005). وفي دراسة أجريت في إيران بهدف تحديد مستوى الباتولين في 65 عينة (42 عينة عصير تفاح و23 عينة عصير مركز) وُجد بأن 69% و78% من العينات المدروسة على التوالي تجاوز تركيز الباتولين فيها 15 مكغ/ل، في حين أن 33% و56% منها على التوالي تجاوز تركيزه فيها 50 مكغ/ل، وبلغ التركيز الأعظمي فيها 285 مكغ/ل و148 مكغ/ل على التوالي. (Leggott & Shephard, 2001)

أشار (Prieta et al., 1994) في دراسة تناولت مستوى الباتولين في عينات من عصير التفاح المباعة في إسبانيا وأستراليا أن 43% و85% من العينات المدروسة على التوالي محتواها من الباتولين من (10-185) مكغ/ل، أما الباحثون (Yuan et al., 2010) الذين اختبروا 15 عينة عصير تفاح وجدوا أن تركيز الباتولين تراوح في العينات من (1.2-94.7) مكغ/ل.

6-2- ضبط الباتولين في عصير لتفاح: Control Patulin in Apple Juice

2-6-1- ضبط الباتولين قبل التصنيع: Control Patulin before Processing

يعتمد ضبط الباتولين قبل التصنيع على اتباع العديد من الطرائق بهدف منع انتاج السموم الفطرية في عصير التفاح منها:

- 1- التحكم بالرطوبة بشكل صارم أثناء التخزين.
- 2- تطبيق الممارسات التصنيعية الجيدة.
- 3- ارتفاع مواصفات الجودة للثمار المستخدمة.
- 4- تطبيق مبادئ تحليل المخاطر وتحديد النقاط الحرجة HACCP (Park et al., 1999).

تعتبر مرحلة الحصاد الخطوة الأولى في ضبط الباتولين، فالثمار التي يتم جنيها آلياً إضافة إلى الثمار المتساقطة بفعل الرياح والمتضررة بفعل الحشرات تعد المدخل الأساسي لأبواغ *P.expansum* وأنواع أخرى من الفطور المنتجة للباتولين.

حيث أن مواصفات ثمار التفاح النوعية وطرق الحصاد تؤثر في محتوى عصير التفاح من الباتولين، وأنّ تصنيع عصير التفاح من ثمار النقطت يدوياً من الأشجار لم يظهر وجوداً للباتولين، في حين تراوحت كمية الباتولين بين 40.2 مكغ/ل و 374 مكغ/ل عندما تم تصنيع العصير من الثمار المتساقطة على الأرض.

ومن هنا فقد قامت كل من منظمة الصحة العالمية (WHO) ومنظمة الغذاء والدواء (FDA) بالتأكيد على أن خطوة انتقاء الثمار هي الخطوة الأهم في الممارسات التصنيعية لضبط الباتولين في العصير (Jackson et al., 2003).

2-6-2- ضبط الباتولين أثناء التصنيع: Control Patulin during Processing

2-6-2-1- تخزين ثمار التفاح: Storage of Apple Fruits

تعد طريقة تخزين التفاح أحد الخطوات الهامة لضبط نمو الفطريات ومنع التلوث من خلال منع حدوث الإهتراء أو التعفن الطري في الثمار (Sommer et al., 1984).

إنّ طريقة التخزين المتبعة تملك تأثيراً كبيراً في التلوث الباتوليني، فقد بين الباحثون (Moodley et al., 2002) أنّ اتباع طريقة التخزين ضمن طوابق تظهر زيادة شديدة بإنتاج الباتولين، بالمقارنة مع طريقة التخزين ضمن غرف يراعى فيها نوعية مواد التعبئة المستخدمة كالبولي إيثيلين

واستخدام جو غازي معدل, حيث تلعب هذه العوامل دوراً هاماً في تراجع مستوى الباتولين في التفاح.

أشار (Corbett, 2003) إلى أن التخزين يمكن أن يفاقم أي فساد حدث في المراحل التي تسبقه كالحصاد, ولا سيما طول مدة التخزين التي تعد الأساس في زيادة تركيز الباتولين, لاحظ الباحث حدوث زيادة مفاجئة في محتوى عصير التفاح من الباتولين الذي صنع من ثمار مضى على تخزينها ما يقارب العام.

اقتُرحت معاملات مختلفة للحد من الإصابة بالعفن وإنتاج الباتولين خلال التخزين, حيث أشار (Rosenberger, 2003) إلى أن تصنيع العصير في المراحل الأولى من التخزين مع إضافة مادة ثنائي فينيل أمين لمعالجة أعراض سلق الثمار أثناء التخزين يلعب دوراً مضاداً لنمو الفطريات المنتجة للباتولين, وقد وجد بأن المعاملة بالمبيدات الحشرية للتفاح يمكن أن يظهر تراجع بنمو الأعفان المنتجة للباتولين بحدود (85-100)%, إلا أن الشك حول أمان استخدام هذه المبيدات (الفوسفات العضوية) كان موضع جدل.

من جهة أخرى, أشار (Draughon & Ayres, 1980) إلى ما يسمى بالضبط البيولوجي (الحيوي) باستخدام بكتريا مضادة للفطريات مثل *Pseudomonas syringae* والذي يمكن استخدامه بشكل منفرد أو بدمجه مع طرق أخرى بهدف الحد من فرص فساد الثمار في مراحل ما قبل الحصاد. حيث أوضحت الدراسة بأنه عند معاملة ثمار التفاح بكلوريد الكالسيوم 2% إضافة إلى تلقيحها ببكتريا *Ps.syringae* بدون أو مع معاملة حرارية لاحقة تراجع معدل حدوث الفساد بما يقارب 89% و 91% على التوالي.

كما أشار الباحثان إلى تأثير الحرارة على فطر *P.expansum* المنتج للباتولين, فعند تلقيح التفاح بهذا الفطر وإجراء معاملة حرارية على الدرجة 38 °م لمدة 4 أيام لم يحدث فساد وضرر على هذه الثمار بعد تخزينها على الدرجة 4-8 °م (الدرجة المناسبة لتخزين ثمار التفاح) لمدة 6 أشهر.

2-2-6-2- Washing & Sorting: الغسيل والفرز

أشار (Acar *et al.*, 1998) إلى أن عملية الغسيل والفرز تلعب دوراً أساسياً في التحكم بالإصابة الفطرية واحتمال حدوث التلوث، حيث تساهم عملية الغسيل باستخدام ماء تحت ضغط مرتفع بخفض مستوى الباتولين ضمن العصير بمعدل (21-54)%. ووجد الباحثون (Jackson *et al.*, 2003) أن غسيل الثمار التي التقطت عن الأرض يساهم بخفض نسبة الباتولين ما يقارب (10-100)%, وهذا يعتمد على مستوى التلوث الباتوليني الأولي وطريقة الغسيل المعتمدة، كما أن ماء الغسيل نفسه يمكن أن يكون مصدر للتلوث عن طريق تلوث الخزانات وأماكن الخزن والغسيل بالنقع والتنظيف الجاف بعد غسيل الثمار. بين الباحثون (Yuan *et al.*, 2010) أن عملية الغسيل تحت ضغط أدت إلى خفض تركيز الباتولين من 143 مكغ/ل إلى 95 مكغ/ل وكان مقدار التراجع 33.6%, واعتبر الباحثون أن هذه الخطوة هي الخطوة الأكثر فاعلية لخفض الباتولين.

تستخدم ثمار التفاح ذات المواصفات النوعية المنخفضة وغير الملائمة للتسويق المباشر بهدف تصنيع العصير، وأثناء عملية الفرز فإن إزالة الثمار المتضررة أو الأجزاء المصابة بالأعفان (التي يمكن أن تتم باستخدام معدات بسيطة أو يدوياً) يمكن أن يظهر تراجع واضح في مستوى الباتولين في منتجات التفاح (Rosenberger, 2003). حيث أظهرت إحدى الدراسات بأن إزالة الأجزاء المتعفنة تظهر تراجع بما يقارب 99% في مستوى الباتولين، علماً أن الباتولين يمكن أن ينتشر من مناطق التعفن في ثمرة التفاح إلى المناطق السليمة بحدود (1-2) سم من مركز التعفن (Lovett *et al.*, 1985). وهذا ما أكدته دراسة أجراها (Marin *et al.*, 2011) بأن 40 إلى 60% من الباتولين الكلي يوجد في الأجزاء الظاهرية المتضررة من الثمرة والتي يمكن التخلص منها بالمراقبة والفرز اليدوي، وأشار الباحثون (Baert *et al.*, 2007) إلى ضرورة إزالة الأجزاء المتضررة التي تزيد مساحتها عن 10 سم².

3-2-6-2- الترشيح: Filtering

تأتي عملية الترشيح بعد عملية الفرز من حيث القدرة على خفض نسبة الباتولين في العصير الناتج، وقد قامت العديد من الدراسات بالبحث عن طرق لإزالة الباتولين من العصير عن طريق استخدام أساليب مختلفة من الترشيح. أشار (Stray, 1988) إلى أن إنتاج عصير تفاح بالطريقة القياسية يزيل فقط 20% من الباتولين، في حين أكد (Acar et al., 1998) أن استخدام تقنية العصر التقليدية باستخدام التنقية بواسطة البكتين والترشيح باستخدام المرشح الدوار تحت تفريغ أدت إلى تراجع الباتولين بمقدار 39%، في حين أن التنقية باستخدام البكتين ممزوج مع الجيلاتين والبنطونيت ثم الترشيح فوق العالي أدى إلى تخفيض المحتوى من الباتولين بمقدار 25%.

من جهة أخرى، فإن استخدام تقنية الطرد المركزي والتصفية للعصير المصنع من لب الثمرة يؤدي انخفاض محتوى العصير من الباتولين بمعدل 89% و 77% على التوالي.
(Bissessur et al., 2001)

وجد الباحثون (Sands et al., 1990) أن إجراء عملية الترشيح باستخدام 20 مغ/مل كربون نباتي منشط يعقبها ترشيح خلال عمود كربون نباتي يحوي 40 أو 60 ثقب أظهر تراجع بمحلول الباتولين من 30 مكغ/مل إلى ما دون حد الكشف، إلا أن خسارة اللون كانت المشكلة الوحيدة في العصير الناتج.

بين الباحثون (Artik et al., 2001) أن استخدام الفحم النباتي المنشط يؤدي إلى إزالة حوالي 40,9% من الباتولين في عصير التفاح، إلا أنه يحدث تراجعاً واضحاً في لون العصير ومحتواه من المركبات الفينولية. في حين أن بولي ستيرين-ديفينيل بينزين (DVB) ذو المسام الكبيرة أدى إلى تراجع المحتوى من الباتولين بنسبة 11% دون التأثير على المحتوى من الأحماض العضوية.

أشار (Kadakil & Nas, 2002) إلى أن خلط 3 غ/ل من الفحم المنشط مع عصير التفاح لمدة 5 دقائق هو الأكثر كفاءة في إزالة الباتولين من العصير، إلا أن لونه الأساسي قد تراجع كما حدث تراجع قليل في حمض الفوماريك و pH ورقم البيركس للعصير الناتج.

من جهة أخرى طور الباحثون (Huebner *et al.*, 2000) طريقة للترشيح عن طريق ربط الكربون النباتي المنشط العالي الدقة إلى حبيبات زجاجية واستخدامها بترشيح العصير بتركيز 10 مكغ/مل بتدفق 1 مل/دقيقة وكانت النتيجة أن 50% من الباتولين المار خلال الأعمدة تم التخلص منه.

أشار (Leggott *et al.*, 2001) إلى أن طريقة تنشيط الكربون تؤثر في فعاليته بإزالة الباتولين، فالكربون المنشط كيميائياً نوع (NORIT SX 4) أزال 70%، في حين أن الكربون المنشط نوع (NORIT CA1) ساهم بإزالة فقط 45% من الباتولين من المحلول ذاته.

بين الباحثون أيضاً أن زيادة تركيز العصير يساهم في خفض معدل التخلص من الباتولين فعند استخدام الفحم المنشط نوع (NORIT SA4) أزال فقط 20% من الباتولين الموجود في عصير (20° بيركس) بالمقارنة مع إزالته 80% من الباتولين الموجود في عصير (12° بيركس).

إنّ ادمصاص الباتولين إلى مركبات الكربون المنشط مرتبط بدرجة الحرارة فزيادتها تزداد كفاءة إزالة وادمصاص الباتولين (Mutlu *et al.*, 1997)، وعلى الرغم من فعالية الكربون المنشط في إزالة الباتولين إلا أنّ جهود قليلة بذلت لإدخاله في العملية التصنيعية نظراً لكلفته المادية وإنتاج مخلفات لا بد من معالجتها للمحافظة على البيئة (Artik *et al.*, 2001).

وأخيراً فإنّ استخدام الطين (Clays) يشكل مجازفة في إزالته للمركبات الغذائية الهامة من العصير على نحو مشابه لمركبات الكربون المنشط (Huebner *et al.*, 2000).

4-2-6-2- المعاملة الأنزيمية: Enzymatic Treatment

إن معالجة عصير التفاح بأنزيم البكتيناز يؤدي إلى تحطيم الغلاف البكتيني المحيط بجزيئات البروتين، عندها تتجمع وتترسب جزيئات البروتين معاً ويترسب معها جزء من البكتين والجزء الآخر يتحول إلى مادة ذوابة، وبحال التلوث الباتوليني فإن هذا السم الفطري يكون مرتبط بهذا الراسب (مرعي، 1997; Bissessur *et al.*, 2001).

أشار الباحثون (Bissessur *et al.*, 2001) أن إجراء المعاملة الأنزيمية يؤدي إلى تراجع المحتوى من الباتولين بمقدار 73% ضمن العصير نظراً لارتباط الباتولين مع الراسب، ويمتاز الراسب

الناتج في هذه الطرق بكونه عالي السمية وغير مناسب لاستخدامه كعلف للحيوانات مما ينتج عنه خسائر مادية في عائدات تصنيع عصير التفاح.

2-6-5- البسترة: Pasteurization

تأتي عملية البسترة بالمرتبة الثالثة من حيث خفض نسبة الباتولين خلال خط تصنيع عصير التفاح، حيث وُجد بأن الباتولين غير ثابت عند الدرجات العالية من pH إلا أنه يعتبر ثابت نسبياً عند درجات الحرارة المنخفضة في المجال $pH=3.5-5.5$ وتزداد ثباتية الباتولين بانخفاض درجة pH. إن متوسط عمر الباتولين عند الدرجة $25^{\circ}C$ و $pH=6$ و 8 هو ()
55 و 2.6 يوم على التوالي، وأكد (Collin et al., 2008) أن تركيز أعلى من الباتولين يتراجع عند المعاملة الحرارية على درجات أعلى من pH، حيث أظهرت الدراسة أن مقدار التراجع في الباتولين بلغ 50% عند الدرجة $100^{\circ}C$ و $pH=6$ ، بينما وصل إلى 80% عند الدرجة $80^{\circ}C$ و $pH=7$.

بينت إحدى الدراسات أن هـ لم يحدث أي تراجع في نسبة الباتولين خلال عملية التركيز والبسترة (Aytac & Acar, 1994). في حين أظهرت دراسة ثانية أن نسبة التراجع كانت بمقدار 50% للعصير المبستر لمدة 20 دقيقة على الدرجة $80^{\circ}C$ (Scott & Somers, 1985). أوضحت دراسة ثالثة أن البسترة ضمن المجال $(60-90)^{\circ}C$ لمدة 10 ثواني أحدثت تراجع في الباتولين فقط بمقدار 18.8% (Wheeler et al., 1997). وهذا ما أكدته (Kadakal & Nas, 2002) بأن المعاملة الحرارية لعصير التفاح على الدرجة $(90$ و $100)^{\circ}C$ لمدة 2 دقيقة أدت إلى تراجع الباتولين بمقدار $(18.81$ و $25.99)\%$ على التوالي، وعلى الدرجة $(70$ و $80)^{\circ}C$ لمدة 2 دقيقة كان مقدار التراجع $(9.40$ و $14.06)\%$ على التوالي، واستنتج الباحثان بأن المعالجة الحرارية تظهر تراجع ضعيف في تركيز الباتولين.

وأخيراً فإنّ عملية بسترة عصير التفاح إضافة لعدم قدرتها على إحداث تراجع كاف في نسبة الباتولين فإنّها لا تملك المقدرة على إزالة كاملة للفطور المنتجة للباتولين التي تمتاز بمقاومتها للحرارة مثل: *B.nivea*, *B.fulva* مما يتيح الفرصة لها بالاستمرار بإنتاج الباتولين ضمن العصير النهائي (Ough & Corison, 1990; Harrison, 1989).

هذا ويمتاز الباتولين بكونه غير متطاير، وعقب إجراء عملية التقطير بهدف إنتاج نكهة التفاح يبقى الباتولين ضمن العصير المركز (Kryger, 2001).

6-2-6-2 تخزين العصير: Storage of Juice

الخطوة الأخيرة في عملية التصنيع هي التخزين، حيث قامت العديد من الدراسات بفحص مدى تأثير التخزين المبرد على محتوى العصير من الباتولين (Zegota *et al.*, 1988). وجد الباحثان (Brakett & Marth, 2001) أن التخزين لا يملك القدرة على التخلص من الباتولين بالكامل في عصير أو شراب التفاح، كما أظهرت دراسة أخرى قام بها (Scott & Somers, 1985) ثباتية الباتولين خلال التخزين المبرد أو بمعدل تراجع تقريبي 50% بعد 5 أسابيع من التخزين، وأكد الباحثان (Kadakai & Nas, 2002) بأن نسبة الباتولين المتراجعة بلغت 50% بعد التخزين لمدة 4 أشهر في الظلام.

7-2- الإضافات الكيميائية: Chemical Additives

تعد المعاملة الكيميائية من أكثر الطرائق فعالية في ضبط التلوث الباتوليني من حيث ملائمتها صناعياً، إلا أن استخدام إضافات كيميائية للأغذية بهدف خفض نسبة السموم الفطرية غير مسموح بالولايات المتحدة على الرغم من أن استخدامها ينجم عنه تكامل العملية التصنيعية، لكونها تملك تأثير مضاعف من حيث تثبيط الفطر وإبطال سمية السم الفطري الناتج عنه، وهناك العديد من الإضافات الكيميائية المستخدمة بهدف أكسدة الباتولين وتحويله إلى مركبات أقل سمية نذكر منها:

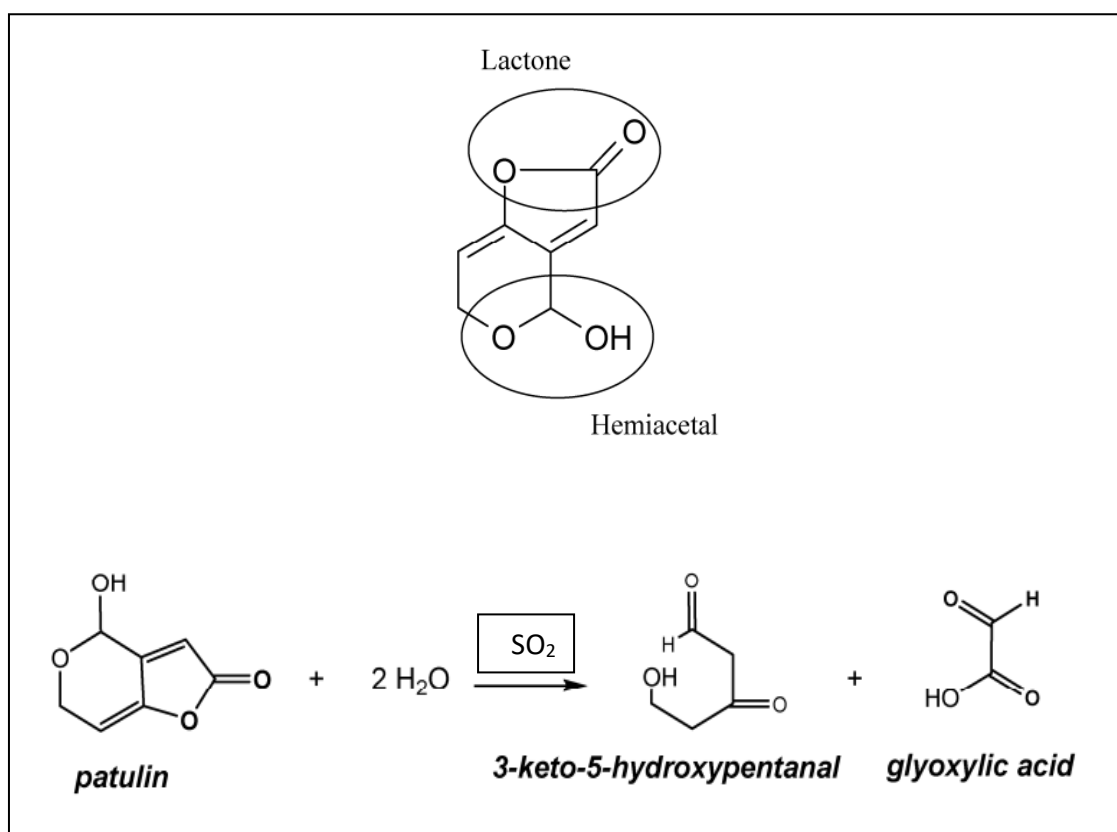
1-7-2 ثاني أوكسيد الكبريت: Sulfur dioxide

شكلت المعاملة بالمركبات الكبريتية المختلفة محور جدل هام، حيث وجد أن المركبات ثنائية الكبريت تملك تأثيرات متداخلة، فمعظم الدراسات تتفق بأن الباتولين غير ثابت بوجود هذه المركبات إلا أنها تختلف بدرجة تأثيرها، فقد بين (Aytac & Acar, 1994) أن استخدام تركيز 100 ppm من SO₂ أظهر تراجع بمستوى الباتولين في عصير التفاح بمقدار 42%. في حين وجد (Steglich *et al.*, 2000) أن مقدار التراجع بلغ 50% عند استخدام التركيز ذاته. من

جهة أخرى بين (Burroughs, 1997) أن زيادة تركيز مركب SO₂ من 200 ppm إلى 2000 ppm أدى إلى زيادة معدل تراجع تركيز الباتولين في العصير من 12% إلى 90%. بين الباحثان (Aytac & Acar, 1994) أن آلية تأثير المركبات الكبريتية في إحداث تراجع في سمية الباتولين يكون وفق التفاعلين التاليين:

الأول: تفاعل عكوس يحدث بشكل طبيعي عند pH حامضي, فإضافة SO₂ إلى الباتولين يتشكل مركب هيدروكسي سلفات الكربونيل المرتبط بحلقة اللاكتون التي تعد الجزء السمي في تركيب الباتولين مما يعطل التأثير السمي له.

الثاني: تفاعل غير عكوس يحدث عند فتح البنية الحلقية للاكتون عند إحدى الطرفين والذي تزداد احتمالية حدوثه بزيادة رقم pH, حيث تتحول حلقة الهيمي أسيتال (الشكل. 2) إلى المركب الكيتوني (3-Keto-5-hydroxy-petalan) قبل إماهة حلقة اللاكتون, والمركب الكيتوني المتشكل نتيجة لهذا التفاعل هو الناتج الأساسي الذي يشير إلى تفكك الباتولين.



الشكل (2): آلية تأثير المركبات الكبريتية على الباتولين

أكد (Tabatabaie *et al.*, 2010) أنّ معاملة عصير التفاح بتركيز 350 ppm من SO₂ وهو الحد الأعظمي المسموح به في عصير التفاح وباستخدام درجات حرارة عالية يؤدي إلى إحداث تراجع كبير في تركيز الباتولين، إلا أنّه بالمقابل يخفض من مواصفات العصير الناتج ولونه ونقاؤه، في حين أنّ استخدام SO₂ بتركيز 350 ppm واستخدام درجة حرارة البسترة 90° م لمدة 30 دقيقة لم تملك تأثير واضح على تراجع الباتولين في عصير التفاح مقارنة مع استخدام الدرجة 125° م لمدة 268 دقيقة التي أدت إلى تراجع الباتولين بمقدار 90%. أكد (Steglich *et al.*, 2000) أن المعاملة الحرارية بدرجة حرارة عالية 125° م لمدة 268 دقيقة بمفردها أو باستخدام SO₂ تؤدي لإحداث تراجع فعّال في تركيز الباتولين (70.8 و 85.5%) على التوالي، وكذلك تؤكد الدراسة على التأثير السلبي للحرارة العالية على المواصفات النوعية للعصير الناتج.

من جهة أخرى تتأثر فعالية ثنائي أوكسيد الكبريت برقم pH، حيث أكدت دراسة أجراها (Steiner *et al.*, 1999) أنّ تأثير SO₂ على الباتولين يكون من خلال تكوين مركب هيدروكسي سلفات الكربونيل أو بفتح البنية الحلقية للاكتون والذي يعتمد بشكل أساسي على رقم pH، وبين (Collin *et al.*, 2008) أنّه عند إضافة 50 ppm من SO₂ إلى عصير التفاح تراجع 50% من الباتولين عند pH=6 خلال 1 ساعة على الدرجة 100° م، في حين أنّه على درجات أقل من pH كانت القدرة على خفض الباتولين أقل أيضاً، وذلك نظراً لثبات الباتولين في الأوساط الحامضية. وهذا ما أكدّه الباحثان (Farkas & Schreiner, 1987) بأنّ SO₂ يملك القدرة على خفض سمية الباتولين خصوصاً عند القيم العالية من pH، حيث وصل تراجع الباتولين إلى درجة كبيرة في الأوساط المرتفعة pH، فكانت النسبة المتراجعة منه 34% و 100% عند pH=5 و 7 على التوالي. بينت دراسة قام بها (Lovett & Peeler, 1989) بأنّ الباتولين يمتاز بثباته على المجال الحراري (105-125)° م وفي مجال pH=(3.5-5.5)، ويزداد تراجع الباتولين بزيادة pH، لذا فإنّ المعاملة الحرارية للأغذية منخفضة الحموضة من الممكن ألا تدمر الباتولين. كما وجد (2001, Brakett & Marth) أنّ حقن تركيز 50 ppm من SO₂ على درجة حرارة الغرفة 25° م عند pH=6 أحدث تراجع بتركيز الباتولين بعد مرور 3 ساعات بنسبة 72% مقارنة مع تراجع الباتولين كلياً عند pH=7، وبحال غياب الكبريت فإنّ الباتولين يبقى كاملاً.

مع الأخذ بعين الاعتبار أنَّ استخدام مركبات الكبريت في أغذية وعصائر الرضع والياfeين يسبب حساسية للبعض (Aytac & Acar, 1994).

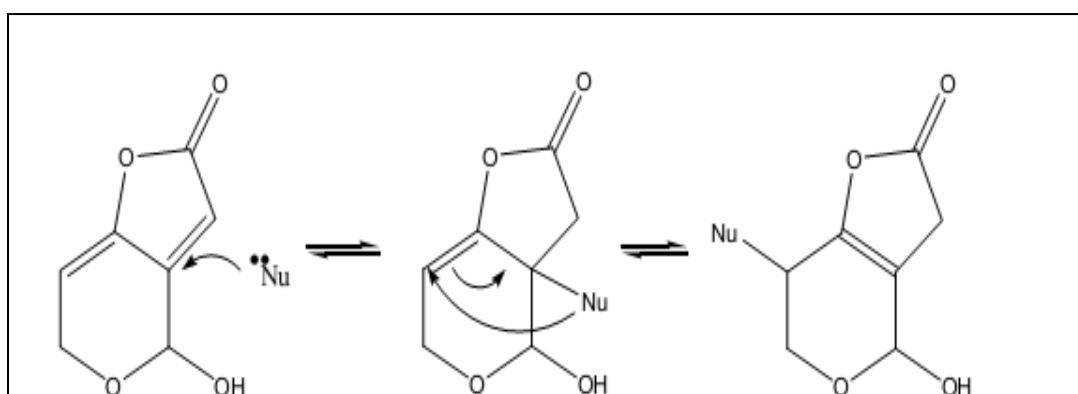
2-7-2- السيستين: Cysteine

يعد الغلوتاثيون والسيستين والثيوغليكولات من أكثر المركبات فعّالية في النظام الحيوي والمقترن عملها أيضاً مع إزالة سمية الباتولين من خلال ارتباطها به.

قام الباحثون (Morgavi *et al.*, 2003) بدراسة تأثير السيستين والغلوتاثيون في إبطال التأثير السمي للباتولين على فئران التجارب، وقارنوا فعاليتها مع المركبات اللاكبريتية مثل حمض الأسكوربيك أو حمض الفيروليك التي لم تعط التأثير ذاته، وبين الباحثون أن ارتباط الباتولين مع السيستين أو الغلوتاثيون أو N-أسيتيل سيستين يؤدي إلى تشكل مركبات تضعف التأثير السمي للباتولين بمقدار 100 مرة .

ومن هنا أتت فكرة تثبيط الباتولين عبر ربطه ببعض المركبات الخلوية النووية التي تملك مجموعات وظيفية كبريتية أو أمينية مثل (السيستين واللايسين والهيستيدين...) أو بالبروتينات المحتوية عليها، حيث يتحد الباتولين معها من خلال ارتباطه مع المجموعات الوظيفية الموجودة فيها مثل (Cys-SH, Lys- εNH₂, His-NH₂....). يمتاز الباتولين بخاصيته المحبة للالكترونات، وتعد الروابط المضاعفة بمثابة المواقع التفاعلية في الباتولين والقادرة على الارتباط مع المجموعات القطبية موجبة الشحنة والتي تحول الباتولين إلى مركب معقد غير فعّال (الشكل 3). (Baert *et al.*, 2007).

أثبت الباحثان (Scott & Somers, 1985) أنَّ المحتوى الكبريتي في مركب السيستين والغلوتاثيون يؤدي إلى تراجع الباتولين الموجود في الأغذية حتى في القيم المنخفضة من pH (2.3 أو 3)، وتمتاز بعض الأغذية مثل (الحبوب واللحم والجبن) بارتفاع محتواها من الأحماض الأمينية والبروتينات الكبريتية، لذلك فإنَّ السيستين في هذه الأغذية يتفاعل مع الباتولين ليحوّله لشكل غير فعّال، وذلك بسبب الخاصية المحبة للالكترونات التي يملكها الباتولين.



الشكل(3): تقنية التفاعل بين الباتولين والمجموعات الوظيفية في البروتين

أشار (Baert *et al.*, 2007) إلى أن تركيز الأحماض الأمينية والبروتينات في عصير التفاح العكر يفوق عشر مرات تركيزه في العصير الرائق، لذلك يكون تفاعل (باتولين-سيستين) أكثر في العصائر العكرة مقارنة بالعصائر الرائقة، كذلك تؤكد الدراسة انخفاض محتوى الأحماض الأمينية الكبريتية المضافة لعصائر التفاح المحتوية على الباتولين وعدم تأثره في تلك الخالية منه نظراً لارتباط جزء من الأحماض الأمينية مع الباتولين، وهذا يفسر الثبات الجزئي للباتولين في عصير التفاح نظراً لانخفاض محتواه من المركبات الكبريتية مقارنة بالعصائر الأخرى مثل عصير البرتقال، علماً بأن التفاعل الحاصل بين الباتولين والأحماض الأمينية الكبريتية يمكن أن يتأثر بالإمالة الحمضية الناتجة عن تحلل الأحماض الأمينية.

وجد (Burroughs, 1997) أنّ إضافة تركيز 100 ppm من السيستين أدى لإزالة 50% من الباتولين من عصير التفاح، وأحدث تركيز 200 ppm من السيستين تراجع بمقدار 70% من الباتولين خلال 2 يوم، كذلك بين الباحثون (Lai *et al.*, 2000) أنّه عند إضافة تركيز (25-50) ppm من السيستين إلى عصير التفاح أحدث تراجع في تركيز الباتولين بحدود (14-30)%.

3-7-2- حمض الأسكوربيك: Ascorbic acid

بين الباحثان (Martell & Kahn, 1987) أن الوقت والتركيز الأولي للباتولين وتركيز حمض الأسكوربيك والظروف المحيطة جميعها عوامل تؤثر على ثباتية الباتولين. ومن هنا فقد تم اختبار تأثير الأحماض العضوية على الباتولين كإضافات غذائية، فُوجد أنه عند إضافة الأسكوروبات وحمض الأسكوربيك إلى محلول الباتولين يحدث تراجع واضح في تركيز الباتولين. ففي إحدى التجارب أضيف 500 مغ حمض الأسكوربيك/كغ عصير تفاح، وكان مقدار التراجع في تركيز الباتولين 50% (Aytac & Acar, 1994). في حين أن تجربة أخرى أظهرت أن مقدار التراجع كان 5% خلال 3 ساعات و36% بعد 44 ساعة عند استخدام الإضافة ذاتها (Freymy *et al.*, 1995).

بين (Brackett & Marth, 2001) أنه يمكن تفكيك الباتولين كلياً خلال 3 أسابيع باستخدام حمض الأسكوربيك، وأن معدل تراجع الباتولين يزداد بزيادة تركيز حمض الأسكوربيك. وتعتمد آلية تحطّم الباتولين على أن أكسدة حمض الأسكوربيك إلى حمض أسكوربيك منزوع الهيدروجين ينتج عنها جذور حرة تحطّم الباتولين، وهذه الأكسدة تتم بسرعة بوجود الأوكسجين والأيونات المعدنية الحرة مما يؤدي إلى تراجع الباتولين، علماً أنه بانتهاء أكسدة حمض الأسكوربيك يتوقف تحطّم الباتولين.

أكدت دراسة قام بها (Drusch *et al.*, 2007) أن أكسدة الأوكسجين لحمض الأسكوربيك بوجود الأيونات المعدنية ينتج عنها جذر حر لمعقد الأسكوروبات المعدني الذي يقوم بدوره على إحداث التراجع الباتوليني، وأثبتت الدراسة أن لظروف التخزين (وجود الضوء والأوكسجين والأيونات المعدنية) تأثير كبير على تراجع الباتولين، حيث أجريت الدراسة عند $pH=4.0$ والتي تمثل رقم حموضة عصير التفاح، ولوحظ عدم وجود اختلاف بين العينات التي خزنت بوجود أو غياب الضوء والأوكسجين والأيونات المعدنية بغياب حمض الأسكوربيك، وعند إضافة حمض الأسكوربيك تراجع الباتولين بسرعة، حيث وصل مقدار التراجع إلى 70% و66% في ظروف غير محمية ومحمية (تخزين بالظلام، نتروجين، خلو من الأيونات المعدنية) على التوالي بعد مرور 34 يوم، وبعد 9 أيام تراجع الباتولين بمقدار 59% و37% في ظروف التخزين غير المحمية والمحمية على التوالي. أكد الباحث (Bischof, 1999) أن حمض الأسكوربيك يتأكسد كلياً بعد 9 أيام من التخزين تحت ظروف غير محمية.

كما وجد (Steiner et al., 1999) أنَّ أكسدة حمض الأسكوربيك كانت منخفضة في العينات المخزنة تحت ظروف محمية، فبعد مرور 34 يوم من التخزين وُجد 65% من حمض الأسكوربيك في العينة، وذلك لعدم حدوث أكسدة معدنية لحمض الأسكوربيك في هذه الظروف. ويعد الضوء الأضعف تأثيراً على تراجع الباتولين مقارنة بالأوكسجين والأيونات المعدنية، حيث بلغ مقدار التراجع في تركيز الباتولين 46% عند التخزين في الظلام لمدة 9 أيام بينما كان تركيز حمض الأسكوربيك أعلى مقارنة مع باقي العينات. علماً أنَّه على درجة الحرارة المحيطة فإنَّ الكمية العظمى من الأوكسجين غير المنحل بالماء تقارب 9 مغ/ل والذي يعد فعّالاً لأكسدة حمض الأسكوربيك وتوليد الجذور الحرة. أكد الباحثان (Aytac & Acar, 1994) أنَّ الاختلاف في درجة تراجع الباتولين يمكن أن يعزى إلى احتواء العينات على الأوكسجين الذي يسرع بدوره أكسدة الباتولين. بما أنَّ تراجع الباتولين ينتهي بعد إتمام أكسدة حمض الأسكوربيك، لذا فإنَّ التركيز الأولي لحمض الأسكوربيك وسرعة تأكسده عاملان أساسيان (Fridovich, 1988).

4-7-2- الإضافات الأخرى: Other Additives

يعد النشادر وبرمنغنات البوتاسيوم الأكثر فعالية في أكسدة الباتولين، حيث وجد أنَّ المعاملة بالنشادر أظهرت تراجع بمستوى الباتولين بمقدار 99.9% في المخلفات المخبرية وبمقدار 99.8% في العصير، إلا أنَّ إحدى الدراسات أوضحت بأنَّ المنتج المعامل بهذه الطريقة غير صالح للاستهلاك. كما أنَّ المعاملة ببرمنغنات البوتاسيوم في وسط حمضي أو قلوي أظهرت تراجع بمقدار 99.99% في المخلفات المخبرية (Freymy et al., 1995).

أثبتت الدراسات بأنَّ المركبات الفينولية تمنع الفطور من تشكيل الأبواغ وبالوقت ذاته تمنع إنتاج السموم الفطرية، وذلك لأنَّ إنتاجها يتم بعد تشكيل الأبواغ (Calvo et al., 2002).

بينما أحدث استخدام مجموعة فيتامينات - ب:

(Pyridoxine hydrochloride, Thiamine hydrochloride, Calcium-d-pantothenate)

تراجع واضح بمستوى الباتولين في عصير التفاح (Morgavi et al., 2003).

كما تم اختبار الأوزون كمعاملة للصناعات الغذائية والذي يمكن اعتماده كبديل لعملية البسترة, فوجد أنه بمعاملة محلول يحوي 32 ميكرومول باتولين باستخدام 10% أوزون لمدة 15 ثانية تراجع الباتولين لما دون حد الكشف, إضافة إلى أن السموم الفطرية (G_2, B_2, G_1, B_1 والزيرونون) تراجعت بشكل واضح باستخدامه (Maeba et al., 1988).

وجد (Mckenzie et al., 1997) أن أشعة غاما تعد طريقة أخرى لإزالة الباتولين من عصير التفاح, فعند استخدام جرعة 2.5 كيلوجري من أشعة غاما أدت إلى إزالة تركيز 2 ppm من الباتولين, علماً أن نسبة الباتولين المتراجع يرتبط بالجرعة المستخدمة من أشعة غاما.

إلا أن تقنية التفاعل لبعض تلك المواد من حيث نواتج التفاعل وآلية تأثيرها لا تزال غير واضحة تماماً, مما يؤكد ضرورة أخذ موافقة تشريعية للسماح باستخدامها بالصناعات الغذائية ولاسيما النشادر وبرمنغنات البوتاسيوم.

8-2- التعديلات الحيوية: Biological Control

وجد بأنّ الضبط الأكبر للباتولين يتم باستخدام التخمرات الميكروبية (الخمائر) والتي تعد من أكثر الطرق وضوحاً مقارنة مع غيرها, حيث تتصف بإزالة ما يقارب 90% من الباتولين (Burroughs, 1997), وأثبتت إحدى الدراسات أن 6 من أصل 8 سلالات من الخميرة أحدثت تراجع بتركيز الباتولين في عصير التفاح لما دون حد الكشف, وأنّ كفاءة خفض نسبة الباتولين قد ارتفعت في العصائر التي خضعت لعملية التخمر ثم رشحت تحت تعقيم لإزالة الخمائر, وأشارت الدراسة إلى أنّ الفعالية في إزالة الباتولين تعتمد على الخمائر النشطة وليس على منتجاتها, حيث وجد أنّ هـ بمعاملة الباتولين لفترة زمنية طويلة بواسطة Cyclohexamide, البروتين المصطنع من قبل الخمائر, يقوم بدوره على منع التأثير السمي للباتولين من خلال التفاعل معه, وذلك بعد مرور 3 ساعات على إضافة الخميرة لمحلول الباتولين حيث يتم تراجعه تدريجياً (Sumbu et al., 1983).

أظهرت دراسة حديثة أنّ 3 سلالات من خميرة *Saccharomyces cerevisiae* أنقصت نسبة الباتولين خلال عملية التخمر اللاهوائي, وذلك بفعل مركبات خاصة تنتجها.

(Moss & Long, 2002)

تقتصر طريقة الضبط الحيوي على المنتجات القابلة للتخمر، وذلك لأن هذه الخمائر تقوم بتخمير السكر الموجود في عصير التفاح وتحوله إلى كحول إيثيلي وغاز CO₂.

(طيفور وسفر، 1991)

تمتاز الخمائر ذاتها بحساسيتها لتركيز الباتولين، حيث وجد أن تراكيز الباتولين الأعلى من 200 مكغ/مل تثبط عمل الخمائر كلياً، وتتوقف بالتالي آلية إبطال السم بطريقة التخمر.

(Sumbu *et al.*, 1983)

بين الباحثان (Moss & Long, 2002) عدم وجود أبحاث تستخدم ميكروبات أخرى لخفض نسبة الباتولين في العصائر مثل بكتريا حمض اللبن، وعدم استخدام الأنزيمات والنواتج الحيوية الأخرى المنتجة من قبل تلك البكتريا، والتي من الممكن أن تحدث تراجع واضح بنسبة الباتولين. كما أن استخدام أنزيمات مشابهة لتلك المنتجة أثناء عملية التخمر بواسطة الخمائر مثل B-Lactamase من الممكن أن يكون قادراً بمفرده على خفض نسبة الباتولين، إلا أن هذا يحتاج إلى مزيد من الدراسات.

2-9- الأشعة الكهرومغناطيسية: Electromagnetic Irradiation

أظهرت الأشعة الكهرومغناطيسية تراجعاً واضحاً بمحتوى العصير من الباتولين وغيره من السموم الفطرية، ففي إحدى الدراسات وُجد أنه عند معاملة العصير بالأشعة المتأينة بجرعة 0.35 كيلوجري تراجع محتواه من الباتولين بمقدار 50%، دون أن يكون ذلك سبباً في تسريع الاسمرار اللاأنزيمي للعصير. كما أن للأشعة فوق البنفسجية تأثير واضح على الأفلاتوكسينات إلا أنه لا توجد أبحاث خاصة حول حساسية الباتولين لها (Valletrisco *et al.*, 1990).

2-10- الباتولين في المنتج النهائي: Patulin in the Final Product

أشار الباحثان (Roland & Beuchat, 1994a) إلى أن العديد من الفطريات المنتجة للباتولين ولاسيما *Aspergillus*, *Byssochlamys spp* تقاوم الحرارة وتستطيع البقاء بعد عملية البسترة المستخدمة في صناعة العصير والخل، وبالتالي فإن العديد منها ينمو وينتج الباتولين خلال

التخزين المبرد على درجة الحرارة 0 °م، مما يجعل كل من العصير والسيدر عرضة لاستمرار إنتاج الباتولين من قبل تلك الفطريات بعد انتهاء عملية التصنيع. وأشار الباحثان إلى أن استخدام معاملة واحدة لضبط الباتولين كالادمصاص الفيزيائي لن تكون كافية للتخلص من الباتولين، بسبب احتمال إنتاجه من قبل فطريات نشطة تم التلوث بها لاحقاً بعد انتهاء عملية التصنيع. وقد قامت العديد من الأبحاث إضافة لما ذكر سابقاً بدراسة تأثير بعض المعاملات المستخدمة لخفض الباتولين عن طريق التأثير في عمر الفطر المنتج له، حيث تم دراسة تأثير المعاملة بثاني أكسيد الكبريت وبنزوات الصوديوم وسوربات البوتاسيوم على نمو فطر *B.nivea* وإنتاجه للباتولين ضمن العصير بالتراكيز التالية: 75 ppm ثاني أكسيد الكبريت و 150 ppm سوربات البوتاسيوم و 500 ppm بنزوات الصوديوم، وأثبتت هذه المعاملات قدرتها على إعاقة نمو الفطر وإنتاجه للباتولين بشكل فعّال (Roland & Beuchat, 1994b). كما أوضحت دراسة ثانية بأنّ معاملة العصير المحتوي على *B.nivea* باستخدام سوربات البوتاسيوم بتركيز 50 مكغ/مل أزال الباتولين كلياً المنتج على درجة الحرارة 37 °م، أما استخدامه بتركيز أعلى (75 أو 100 مكغ/مل فكانت فعاليته لتثبيط نمو الفطر على درجة الحرارة 21 °م، إلا أنه لم يظهر فعالية في تثبيط إنتاج الباتولين (Hasan, 2000). وكان تركيز 0.1 % من سوربات البوتاسيوم فعّال في إزالة الباتولين المنتج من قبل *P.patulum*، إلا أنّه كان ذو تأثير عكسي على الباتولين المنتج من قبل *P.roqueforti*، حيث ساهم في زيادة نسبته في العصير (Bullerman & Olivigni, 1997). كما أظهرت دراسة قام بها (Lennox & McElroy, 1984) أنّ استخدام سوربات البوتاسيوم بتركيز 0.1 M في عصير التفاح أحدث تراجع بنمو *P.expansum* بمعدل 83% و بمعدل 98% في إنتاج الباتولين، بينما استخدام تركيز 0.1 M من بروبيونات الصوديوم أحدث تراجع في نمو الفطر بمعدل 48% وفي إنتاج الباتولين بمعدل 98%.

اختبرت دراسة أخرى تأثير زيت الليمون على إنتاج الباتولين في عصير التفاح، فوجد أنّ استخدام بتركيز 0.2% أحدث تراجع قليل في إنتاج الباتولين، أما مزجه بتركيز 0.05% مع زيت البرتقال بتركيز 0.2% أحدث تراجع في إنتاج الباتولين بمقدار 90%. كما أنّ إضافة حمض الليمون بتركيز 0.5% مع حمض اللبن بتركيز 0.75% لاقت نجاحاً واضحاً في خفض إنتاج الأفلاتوكسينات، إلا أنّها فشلت بالنسبة للباتولين إضافة إلى فشلها في

تنشيط نمو فطر *P.expansum* (Hasan, 2000).

11-2- طرائق كشف وتقدير الباتولين:

Methods of Detection and Quantification of Patulin

نظراً لكون الحد الأعظمي المسموح به من الباتولين في الأغذية هو 50 مكغ/ل، ولأن موضوع سلامة الغذاء يحتل جزءاً كبيراً من اهتمام الناس نتيجة لزيادة الوعي الغذائي، كان لابد من تطوير طرائق تحليل تتميز بالتخصص العالي والسرعة ولها حدود كشف منخفضة .

(حمزاوي, 2006) بين

(Leggott & Shephard, 2001) أن الكروماتوغرافيا الغازية ذات الطبقة الرقيقة والكروماتوغرافيا السائلة قد طورت بشكل كبير لكشف وتقدير الباتولين، وأن الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) باستخدام كاشف (UV) هي الطريقة الأكثر شيوعاً وحداثة لتقدير الباتولين في منتجات الفاكهة، وهي الطريقة الأساسية المعتمدة من قبل (AOAC Intl) ذات الرقم (995.10) لعصير التفاح، ولها حد كشف 50 مكغ/ل.

استخدمت تقنية (HPLC) ذات الطور العكس في تقدير محتوى عصير التفاح من الباتولين وهيدروكسي ميثيل الفورفورال، وقد سجلت هذه الطريقة حد كشف 5 مكغ/ل للباتولين وأقل من 0.01 مكغ/ل لهيدروكسي ميثيل الفورفورال (Gokmen & Acar, 1999).

استخدم كاشف مطياف الكتلة (MS) مع كل من الكروماتوغرافيا السائلة (LC) والغازية (GC) لتحديد كمية الباتولين في العصير بدقة أكبر، مما أتاح تحديد كميته بتركيز تراوح بين 68 و3700 مكغ/ل (Roach et al., 2002; Roach et al., 2000).

طور الباحثون (Sewram et al., 2000) طريقة تدعى (HPLC-MS-MS) للكشف عن الباتولين، وقد سجلت هذه الطريقة حد كشف بلغ 4 مكغ/ل ودون اشتقاق، وذلك بتثبيت كاشف (MS) بعد الجزء المخصص لحدوث التأيين الكيميائي بالضغط الجوي.

كذلك طورت طريقة تدعى (LC/MS) من قبل (Takino et al., 2003) الذين استطاعوا تخفيف ضجيج الجهاز، مما أدى إلى زيادة الحساسية وتقدير الباتولين في عينات عصير التفاح بحدود من 0.2 إلى 100 مكغ/ل وبحد كشف 1 مكغ/ل وبزمن تحليل قدره 10 دقائق.

من جهة أخرى، نجح (Llovera *et al.*, 1999) باستخدام الكروماتوغرافيا الغازية (GC) في تقدير كمية الباتولين بتركيز وصل إلى 4 مكغ/ل.

وفي دراسة أجراها (Sheu & Shyu, 1999) أشار الباحثان إلى أن دمج الاستخلاص الغشائي ثنائي الطور وطريقة (GC-MS) تسمح بالكشف عن الباتولين بحدود تتراوح بين 10 و 250 مكغ/ل.

استخدمت تقنية النظائر المشعة في تقدير الباتولين وذلك عن طريق وسمه بالكربون المشع C13 (Rychlik & Schieberle, 1999).

أشار (McElroy & Weiss, 1993) إلى أن انخفاض الوزن الجزيئي للباتولين كان عائقاً أمام تطوير طرائق تحليل سريعة تعتمد على تقنية التحليل الكيميائي المناعي.

في حين طُور عدد كبير من الطرائق السريعة التي تستخدم تقنية التفاعل التسلسلي للبوليميراز (PCR)، والتي تعتمد على الكشف عن المورثة المسؤولة عن إنتاج الأنزيم Polygalacturonase المميز للباتولين المنتج من قبل فطر *P.expansum* خلال زمن قدره (4-5) ساعات (Marek *et al.*, 2003).

3- المواد وطرائق البحث

3- Materials & Methods of Research

3-1- مواد البحث: Materials of the Research

3-1-1- المواد الكيميائية: Chemicals

- 1- باتولين قياسي (sigma) تركيزه 100 مكغ/مل في الأسيتونتريل.
- 2- أسيتونتريل.
- 3- ماء منزوع الشوارد.
- 4- محلول كربونات الصوديوم 4%.

5- محلول خلات الإيثيل: (Ethyl Acetate Solution M=88.11) كغ/مول وبنقاوة 99.5%.

2-1-3 أجهزة التحليل: Devices of analysis

- 1- جهاز HPLC ماركة Jasco.
- 2- حمام مائي ألماني الصنع لنزع الغازات يعمل بالموجات فوق الصوتية (Ultrasonic) نوع (Transsonic 820 /H) ماركة Elma.
- 3- رجاج أنابيب نوع (unimax2010) ماركة Heidolph.
- 4 - مثقلة ألمانية الصنع ماركة Funke gerber.
- 5- ميزان حساس ألماني الصنع ماركة Sartorius.

3-1-3 العينات: Samples

3-1-3-1- عينات التفاح: تم شراء 20 عينة من ثمار التفاح درجة ثالثة من السوق المحلية لمدينة دمشق وريفها لعام 2011 من مناطق مختلفة وبفترات زمنية متقطعة. تضمنت العينات أربع أصناف من التفاح هي (ستارك ريمسن SR- غولدن ديليشيس GD- غراني سميث GS - غولدن لودي GL), تراوحت درجة الإصابة في العينات من 0 إلى 50%, وسجلت درجة الإصابة لكل عينة بحساب عدد التفاحات المصابة في 1 كغ من العينة الكلية, وحفظت العينات في البراد على الدرجة 4° م لحين الدراسة.

3-1-3-2- عينات العصير: تم أخذ 20 عينة من عصير التفاح المبستر والمباع في السوق المحلية لمدينة دمشق وريفها لعام 2011, وتضمنت عينات من عصير التفاح المصنع محلياً (10) وعينات من عصير التفاح المستورد (10), والمحفوظة بعبوات كرتونية أو زجاجية أو بلاستيكية, وذلك من مناطق مختلفة وبفترات زمنية متقطعة, وكان محتوى العينات من العصير الطبيعي 25%, وكانت العينات مدعمة بفيتامين ث (C), يضاف لها عينة العصير المستخدمة لإجراء التعديلات.

3-1-3-3- عينات أغذية الأطفال: تم شراء 10 عينات من أغذية الأطفال المستوردة والمباعة في الصيدليات المحلية لمدينة دمشق وريفها لعام 2011 وبتواريخ إنتاج مختلفة, وهي عبارة عن خلطات جاهزة من هريس التفاح فقط أو مترافق مع أنواع أخرى من الفاكهة كالتمر والكيوي والموز والإجاص, حيث كانت نسبة التفاح فيها 80% أو 100%, إضافة إلى أن جميع العينات

كانت مدعمة بالفيتامينات ولاسيما ب و ث، وكانت العينات محفوظة بعبوات زجاجية بوزن 130 غ.

3-1-3-4- عينات معمل عصير التفاح: تم أخذ العينات من أحد معامل عصير التفاح المحلي بتاريخ (27-28-29/5/2012)، ومن مراحل التصنيع المختلفة بدءاً من مرحلة استقبال الثمار وصولاً إلى المنتج النهائي، وحفظت العينات في عبوات زجاجية، ونقلت مبردة إلى مخبر البحوث الزراعية - قسم تكنولوجيا الأغذية وخزنت بالتجميد على الدرجة (-20) م لحين موعد التحليل.

2-3- طرائق التحليل : Methods of Analysis

3-1-2- تعيين الباتولين في عينات التفاح:

Determination of patulin in apple samples

تم تحضير عينات التفاح وتحليلها وفقاً للطريقة المذكورة في (AOAC, 2005). باستخدام جهاز (HPLC) وبوجود كاشف (UV) وذلك وفقاً للخطوات التالية: تم وزن 1 كغ تفاح مأخوذ عشوائياً من السوق المحلية، قُطع التفاح دون غسيل إلى أجزاء وعُصر بعصارة نوع (Starmix)، أُخذ 5 مل من العصير الناتج والمجنس بشكل جيد وأُضيف إليه 50 مل من محلول خلات الإيتل مع الرج لمدة 5 دقائق باستخدام رجاج أنابيب، ثم فُصل الطور العضوي المحتوي على الباتولين والموجود في الأسفل باستخدام قمع الفصل وأُضيف إليه 4 مل من محلول كربونات الصوديوم (4%) ورُج المزيج لمدة 5 دقائق ثم فُصل الطور المائي الموجود في الأعلى باستخدام قمع الفصل وبُخر المحلول الناتج باستخدام غاز الأزوت حتى تمام التجفيف وحُفظ بالثلاجة لحين موعد التحليل حيث أُضيف للناتج 1 مل من الطور الحامل أسيتونتريل: ماء (90:10) حجم/حجم، ثم حُقن 20 ميكروليتر بجهاز (HPLC-UV) نوع Jasco وفق الشروط التالية :

- عمود من ستالس ستيل ODS-C18 (250X4.6 mm) صنع شركة (Hichrom Limited).

- حرارة العمود 25 م.

- معدل التدفق: 1 مل/دقيقة.

- طول الموجة: 276 نانومتر.

تم التعبير عن النتيجة ك ميكروغرام/ل من عصير التفاح الناتج (وبمعدل 3 مكررات لكل عينة).

3-2-2-2- تعيين الباتولين في عينات العصير:

Determination of patulin in juice samples

تم تحضير عينات العصير وتحليلها وفقاً للطريقة المذكورة في (AOAC, 2005), باستخدام جهاز (HPLC) وبوجود كاشف (UV) وذلك وفقاً للخطوات التالية: أُخذ 5 مل من العصير المجانس جيداً، وأُضيف إليه 50 مل من محلول خلات الإيتل مع الرج لمدة 5 دقائق باستخدام رجاج الأنابيب، فُصل الطور العضوي المحتوي على الباتولين والموجود في الأسفل باستخدام قمع الفصل، وأُضيف إليه 4 مل من محلول كربونات الصوديوم (4%) ورُج المزيج لمدة 5 دقائق ثم فُصل الطور المائي الموجود في الأعلى باستخدام قمع الفصل، بُخر المحلول الناتج باستخدام غاز الأزوت حتى تمام التجفيف وحُفظ بالثلاجة لحين موعد التحليل، حيث أُضيف للناتج 1 مل من الطور الحامل أسيتونتريل:ماء (90:10) حجم/حجم، ثم حُقن بجهاز (HPLC-UV) وفق الشروط السابقة.

3-2-3-2- تعيين الباتولين في عينات أغذية الأطفال:

Determination of patulin in babies foods samples

تم أخذ 5 غ من عينة أغذية الأطفال المختبرة بعد مزجها جيداً إلى دوق زجاجي، وأُضيف لها مقدار مماثل من الماء، ثم مُزجت حتى تمام المجانسة، وأُضيف بعد ذلك إلى الناتج 12 مل بكتيناز (5 مغ/مل) وتُرك المزيج لمدة 1 ساعة على درجة الحرارة 40° م، تم إزالة البكتين وترشيح المزيج بواسطة المرشح الدوار 6000 دورة/دقيقة لمدة 5 دقائق، وأُخذ الرائق الموجود في أعلى الأنبوب بعدها للتحليل كما ورد سابقاً (MacDonald *et al.*, 2000).

3-2-4-2- المعاملات التصنيعية المطبقة على العصير لخفض محتواه من الباتولين:

Processing treatments on juice to reduce its content of patulin

تم استخدام عينة من عصير التفاح المعبأ بسعة 1 لتر لتحضير المعاملات المختلفة لتخفيض الباتولين في المنتج النهائي وفق مايلي:

1- معاملة الشاهد: تم تحضير الشاهد بحقن عينة عصير تفاح بالباتولين بتركيز (1500 مكغ/ل)، وأخذ 10 مل من العصير الناتج للتحليل بعد مرور 48 ساعة من التخزين في عبوة عاتمة على درجة حرارة الغرفة.

2- معاملة حمض الأسكوربيك: تم تحضير عينات عصير التفاح المعاملة بحمض الأسكوربيك بتركيزين (100 و 500 ppm) وذلك بإضافة 1 و 5 مغ من حمض الأسكوربيك إلى 10 مل من عينة الشاهد على التوالي، وخزنت العينات على درجة حرارة الغرفة في عبوات عاتمة لمدة 48 ساعة ثم أخذت للتحليل.

3- معاملة ثاني أكسيد الكبريت: استخدم ميتا باي سلفيت الصوديوم كمصدر لثاني أكسيد الكبريت، حيث أن كل 190 غ ميتا باي سلفيت الصوديوم تحوي 128 غ من SO_2 وبناءً على ذلك تم تحضير عينات عصير التفاح المعاملة بثاني أكسيد الكبريت بتركيزين (50 و 100 ppm) وذلك بإضافة 0.7 و 1.48 مغ من ميتا باي سلفيت الصوديوم إلى 10 مل من عينة الشاهد على التوالي، وخزنت العينات على درجة حرارة الغرفة في عبوات عاتمة لمدة 48 ساعة ثم أخذت للتحليل.

4- معاملة السيستين: تم تحضير عينات عصير التفاح المعاملة بالسيستين بتركيزين (50 و 100 ppm) وذلك بإضافة 0.5 و 1 مغ من السيستين إلى 10 مل من عينة الشاهد على التوالي، وخزنت العينات على درجة حرارة الغرفة في عبوات عاتمة لمدة 48 ساعة ثم أخذت للتحليل.

5- معاملة الكويرسيتين: تم تحضير عينات عصير التفاح المعاملة بالكويرسيتين بتركيزين (50 و 100 ppm) وذلك بإضافة 0.5 و 1 مغ من الكويرسيتين إلى 10 مل من عينة الشاهد على التوالي، وخزنت العينات على درجة حرارة الغرفة في عبوات عاتمة لمدة 48 ساعة ثم أخذت للتحليل.

6- معاملة الترشيح باستخدام الفحم النباتي المنشط: وضع 10 سم من الفحم ضمن عامود زجاجي مجهز بصبور، ونشط الفحم باستخدام محلول من HCl بتركيز (0.1 ن)، ثم مرر الماء المقطر بهدف إزالة المتبقي من أثر HCl، ومررت بعدها عينة عصير التفاح غير المعاملة بالباتولين، ثم مررت العينة المحتوية على الباتولين، وأخذت الرشاحة للتحليل المباشر.

ملاحظة: تم تحليل العينات بعد مرور 2 يوم على الإضافة, باستثناء الترشيح حيث خللت العينة مباشرة بعد الترشيح, وبمعدل 3 مكررات لكل معاملة.

5-2-3- تحضير الطور الحامل: Preparation of the mobile phase

تم مزج الأسيتونتريل مع ماء منزوع الشوارد بنسبة (90:10) حجم/حجم, ثم تم تخليته من الغازات باستخدام حمام (Ultrasonic) لمدة 30 دقيقة.

6-2-3- تحضير محلول كربونات الصوديوم 4%:

Preparation of 4% sodium carbonate solution

أذيب 4 غ من كربونات الصوديوم في 100 مل من الماء المقطر.

7-2-3- تقييم طريقة تقدير الباتولين: Method Validation of Patulin Analysis

تم تقييم وتوثيق مصداقية طريقة التحليل وفق شروط تشغيل الجهاز والعمل السابقة وفق الخطوات الآتية:

1-7-2-3- تحضير المنحني القياسي للباتولين:

Preparation of patulin standard curve

حضرت سلسلة عيارية من الباتولين باستخدام الأسيتونتريل بالتركيز التالية: (50- 70 -100-250) مكغ/ل, وحفظت بالظلام على الدرجة (-20 °م) لحين موعد الحقن (يجب أن ألا تتجاوز مدة الحفظ 7 أيام), حقنت التركيزات السابقة بجهاز (HPLC) بمقدار 20 ميكروليتر وبمعدل 3 مكررات لكل تركيز وفق الشروط المذكورة في الفقرة (1-2-3).
(Barreira *et al.*, 2010; Lai *et al.* , 2000)

2-7-2-3- حساب حد الكشف وحد الكشف الكمي:

Determining of detection & quantification limits

يعرف حد الكشف: بأنه أقل تركيز من المواد المراد تحديدها والتي يمكن الكشف عنها بمستوى موثوق به, وقد حسبت القيم وفقاً لطريقة (Jorhem & Sundstrom, 1993):
 حد الكشف = أقل إشارة يمكن تمييزها - متوسط قراءة الشاهد / ميل المنحني المعياري.
 أقل إشارة يمكن تمييزها $S_m =$ متوسط قراءة الشاهد (10 عينات) $+ K \times$ الانحراف المعياري للشاهد.

$$S_m = S_{bl} + K \times SD$$

K: ثابت يساوي (3*SD و 10*SD)

3-7-2-3- حساب نسبة الاسترجاع : Determining of recovery rate

وفقاً للطريقة الموصوفة من قبل (Lai et al., 2000) حسبت النسبة المئوية لاسترجاع الباتولين القياسي حيث أضيف 2000 مكغ/ل من الباتولين القياسي إلى 5 مل عينة عصير مجهولة التركيز مأخوذة من عينة تفاح وبالمثل لعينة عصير التفاح المبستر ولعينة أغذية الأطفال, تم تعيين الباتولين في العينات قبل وبعد الإضافة بنفس الطريقة المتبعة لتعيين الباتولين الواردة سابقاً, وحسبت نسبة الاسترجاع وفق القانون التالي:

$$\% \text{ للاسترجاع} = \frac{Pa}{(Pa_1 - Pa_2)}$$

Pa_1 = كمية الباتولين قبل الإضافة.

Pa_2 = كمية الباتولين بعد الإضافة.

Pa = كمية الباتولين المضاف.

3-8-2- حساب نسب التعرض للباتولين: Calculation

of exposure rates of patulin

تم حساب نسب تعرض البالغين والأطفال والرضع للباتولين نتيجة لاستهلاك التفاح وعصيره وأغذية الأطفال باستخدام القانون التالي:

$$\text{نسبة التعرض} = (\text{متوسط تركيز الباتولين} \times \text{الكمية المتناولة يومياً}) / \text{وزن الجسم} \div 1000$$

وتقدر بمكغ/كغ وزن الجسم/اليوم (Lewit & Schuurmann-Baker, 1995).

3-3- التحليل الإحصائي: Statistical Analysis

استخدم برنامج Genstat Release لتحليل النتائج، وفق تصميم القطاعات العشوائية الكاملة Complete Block Design Randomized (RCBD)، حيث تم مقارنة وجود فروق معنوية بين المتوسطات بالاعتماد على قيمة أقل فرق معنوي (L.S.D.)، وتم دراسة علاقات الارتباط بين الاختبارات المختلفة وفق برنامج (SPSS Viewer) مع إظهار المعنوية على المستوى $(0.05 \geq P)$.

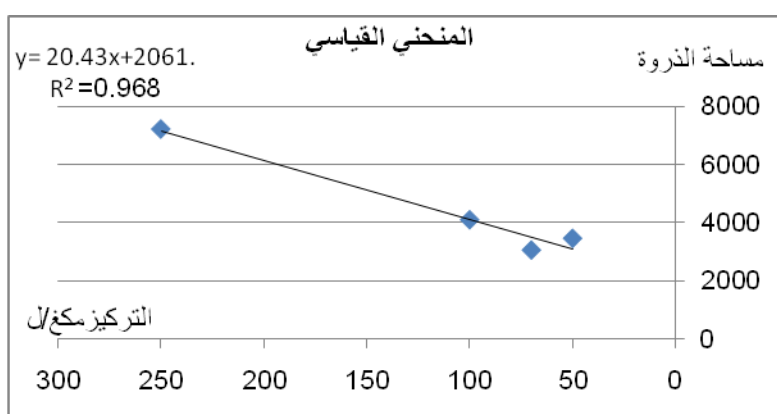
4- النتائج والمناقشة

4- Results & Discussion

1-4- تقييم طريقة تقدير الباتولين : Method validation of patulin analysis

1-1-4 المنحني المعياري: Standard curve

أظهرت نتائج تحليل المنحني المعياري الموضحة بالشكل (4) وجود علاقة خطية جيدة ضمن مجال التراكيز المختارة (50-250) مكغ/ل، حيث كانت قيمة معامل التعيين $r^2=0.97$ والميل 20.43. اتفقت النتائج مع ما توصل إليه (Aktas *et al.*, 2004) بوجود علاقة خطية ضمن المجال (15-200) مكغ/ل وكان $r^2=0.99$.



الشكل (4) : المنحنى القياسي للباتولين

2-1-4- حد الكشف وحد الكشف الكمي:

Detection & quantification limits

بينت النتائج المتحصل عليها أن حد الكشف (LOD) للطريقة المستخدمة كان 30 مكغ/ل وبلغ حد الكشف الكمي (LOQ) مقدار 100 مكغ/ل. وقد اختلف هذا مع ما أشار إليه الباحثين (Yuan *et al.*, 2010) الذين وجدوا أن LOD كان في عصير التفاح 12 مكغ/ل و LOQ كان 38 مكغ/ل، وكذلك اختلف مع الباحثين (Iha & Sabino, 2008) اللذين وجدوا أن LOD 3 مكغ/ل و LOQ 7 مكغ/ل في عصير التفاح واعتبرا أن هذه الحدود كانت منخفضة كفاية لتحقيق هدف الدراسة، ويمكن تفسير ذلك باختلاف شروط عمل الجهاز، حيث أوضح الباحثان أن معدل التدفق المستخدم 0.5 مل/دقيقة، وطول الموجة (220-230) نانومتر، وكان الطور الحامل ماء: إيثانول (30:70) %، والعمود المستخدم ODS-C18 (100 × 4.6 mm).

3-1-4- نسبة الاسترجاع: Recovery rate

حسبت النسبة المئوية المسترجعة لتركيز 2000 مكغ/ل من الباتولين المحقون في التفاح والعصير وأغذية الأطفال وبمعدل ثلاثة مكررات (الجدول 1).

جدول (1): نسبة الاسترجاع في كل من التفاح وعصيره وأغذية الأطفال.

النسبة المئوية المسترجعة %	نوع العينة
0.2±83.1	التفاح
0.4±85	العصير

أغذية الأطفال	0.1±80.3
---------------	----------

توضح النتائج في الجدول (1) أن نسبة الاسترجاع للباتولين كانت أعلى ما يمكن في عصير التفاح حيث بلغت 85%, في حين أنها كانت أقل ما يمكن في أغذية الأطفال 80.3%. وقد كانت نسبة الاسترجاع المتحصل عليها أقل مما وجدته (Yuan *et al.*, 2010) حيث أشارت دراستهم إلى أن نسبة استرجاع الباتولين في ثمار التفاح بلغت 92%. كانت نسبة الاسترجاع المتحصل عليها في عصير التفاح أعلى مما وجدته (Iha & Sabino, 2008) اللذين وجدا أنها بلغت 81.1%, أما في أغذية الأطفال فنسبة الاسترجاع للباتولين كانت أقل مما وجدته (Barreira *et al.*, 2010) والتي بلغت في دراستهم 89%.

4-2- تركيز الباتولين في عينات التفاح المدروسة:

Concentration of patulin in the studied apple samples

صنفت العينات المأخوذة من التفاح إلى 4 أصناف هي: ستارك ريمسن SR وغولدن ديليشس GD وجراني سميث GS وغولدن لودي GL, وحددت درجة إصابة العينات المأخوذة للتحليل وذلك بحساب عدد التفاحات المصابة في 1 كغ من العينة الكلية, والتي تراوحت من 5 إلى 50%.

بينت نتائج تحليل الباتولين في عينات التفاح المدروسة (الجدول. 2 والشكل. 5) أن تركيز الباتولين تراوح من N.D (غير مكتشف) إلى 183.2 مكغ/ل، وبمتوسط 48.68 مكغ/ل. وقد اتفقت هذه النتائج مع نتائج الباحثين (Prieta et al., 1994) الذين بينت الاختبارات التي أجروها على ثمار التفاح في إسبانيا أن تركيز الباتولين تراوح بين (10 - 170) مكغ/ل. كما اتفقت النتائج أيضاً مع ما وجدته (Acar et al., 1998) عند اختبار 215 عينة ثمار تفاح في تركيا والتي بينت دراستهم أن تركيز الباتولين في العينات المختبرة كان ضمن المجال من 7 مكغ/ل إلى 376 مكغ/ل. من جهة أخرى، اختلفت نتائج البحث للعينات المدروسة مع ما توصل إليه الباحثين (Lai et al., 2000) حيث كانت أعلى مما توصلوا إليه، وتراوحت قيم تركيز الباتولين في العصير الناتج عن ثمار التفاح في البحث المذكور من 15.4 مكغ/ل إلى 39.9 مكغ/ل.

أظهرت النتائج الموضحة في الجدول (2) أن الباتولين لم يتم الكشف عنه في جميع عينات التفاح التي بلغت نسبة الإصابة فيها أقل من 15%، في حين أنه عند درجة الإصابة 25% تراوح تركيز الباتولين في عصير التفاح الناتج من 57.4 مكغ/ل في صنف غراني سميث إلى 88.6 مكغ/ل في صنف غولدن ديليشس، أما عند درجة الإصابة 50% فقد تراوح تركيز الباتولين من 117.3% في صنف غولدن لودي إلى 183.2% في صنف غولدن ديليشيس.

جدول (2): تركيز الباتولين في عينات التفاح المدروسة (مكغ/ل)

رقم العينة	نوع العينة	درجة الإصابة %	التركيز (مكغ/ل)
1	SR	0	N.D*
2	SR	0	N.D
3	SR	0	N.D
4	SR	0	N.D
5	SR	5	N.D
6	SR	15	N.D
7	SR	25	4.0±69.8

N.D	0	GD	8
N.D	5	GD	9
0.3±70.5	25	GD	10
0.5±73.7	25	GD	11
0.3±88.6	25	GD	12
0.4±183.2	50	GD	13
0.5±60.9	25	GS	14
0.3±57.4	25	GS	15
0.1±134	50	GS	16
N.D	0	GL	17
N.D	0	GL	18
0.2±118.2	50	GL	19
0.5±117.3	50	GL	20
48.68			المتوسط

*ND: Non Detected

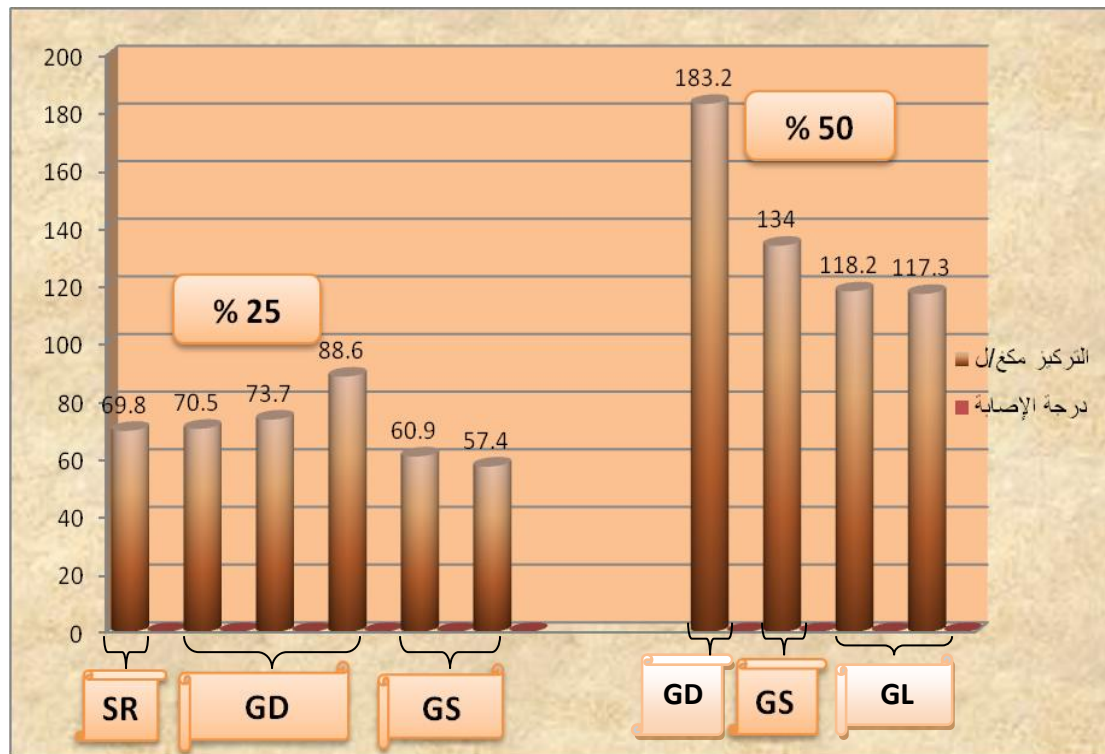
SR: ستارك ريمسن, GD: غولدن ديليشس, GS: غراني سميث, GL: غولدن لودي.

إن الاختلاف في المحتوى من الباتولين في الأصناف المدروسة عند نفس درجة الإصابة يمكن أن يعزى إلى اختلاف الصنف, حيث أكد (Corbett, 2003) أن لاختلاف الصنف تأثير كبير على الإصابة بفطر *P.expansum* وإنتاج الباتولين. فقد كان متوسط تركيز الباتولين لثلاث عينات من صنف ستارك ريمسن 23.3 مكغ/ل مقابل 84.1 مكغ/ل من صنف غراني سميث جدول (2), ويمكن تفسير ذلك وفقاً لما أشار إليه الباحثين (Sanzani et al., 2008) بأن صنف ستارك ريمسن غني بالمركبات الفينولية ولاسيما الكويرسيتين والأمبيليفيرون مقارنة مع صنف غراني سميث والأصناف الأخرى مما يجعله أقل عرضة للإصابات الفطرية وإنتاج الباتولين. كما أن الاختلاف في محتوى الباتولين في الأصناف المدروسة من التفاح يمكن أن يعزى أيضاً إلى الفعالية المائية (a_w) ودرجة pH ونسبة المواد الصلبة, حيث أن بعض عينات ستارك ريمسن المدروسة مأخوذة من مناطق جبلية بعالية مما يجعلها منخفضة الفعالية المائية وهذا غير مناسب لنمو الفطر وإنتاج الباتولين (Drusch & Ragab, 2003). أما الثمار ذات المحتوى العالي من المواد السكرية فهي على العكس أكثر ملائمة لنمو الفطر وإنتاج الباتولين. كذلك فإن البيئة الحامضية تشجع تطور الفطر وإنتاج الباتولين.

(McCallum *et al.*, 2002)

من جهة أخرى يمكن أن يعزى الاختلاف في تركيز الباتولين للعينات المدروسة من ثمار التفاح إلى حجم الإصابة ضمن العينة الشكل (5)، حيث نلاحظ أن هناك توافق كبير بين درجة الإصابة وتركيز الباتولين، لذلك تؤكد الدراسات بأن إزالة الأجزاء المتعفنة من الثمار تظهر تراجع بما يقارب 92% في مستوى الباتولين في العصير الناتج (Lovett *et al.*, 1992).

حددت منظمة الأغذية والزراعة العالمية FAO وهيئة المواصفات الأوروبية EU أن الحد الأعظمي للباتولين المسموح به في العصير الناتج عن ثمار التفاح يجب ألا يتجاوز 50 مكغ/ل (FAO, 2003; EU, 2003). وأظهرت نتائج الدراسة أن 50% (10 عينات) من العينات المدروسة تجاوزت الحد المسموح به وتراوحت قيم الباتولين فيها من 57.4 مكغ/ل إلى 183.2 مكغ/ل، وأن 6 من عينات التفاح التي ظهر فيها الباتولين كانت ضمن المجال (LOQ-LOD)، في حين تجاوزت 4 عينات حد الكشف الكمي LOQ جدول (2). اتفقت نتائج البحث مع ما أشار إليه الباحثين (Beretta *et al.*, 2000) في دراستهم على ثمار التفاح والذين وجدوا أن نسبة العينات التي تجاوز تركيز الباتولين فيها 50 مكغ/ل وصلت إلى (30 - 40) %، وكذلك اتفقت النتائج مع (Acar *et al.*, 1998) اللذين وجدوا أن نسبة التجاوز بلغت 46%، أما نتائج الباحثين (Lai *et al.*, 2000) أظهرت أن تركيز الباتولين في العصير الناتج عن ثمار التفاح كانت في جميع العينات المدروسة أقل من 50 مكغ/ل. كما بينت إحدى الدراسات بأن 20% من الثمار المتاحة للاستهلاك المباشر تحوي على إصابات فطرية زرقاء واضحة للمستهلك (CODEX, 2002).



الشكل (5): تأثير درجة الإصابة (50% و 25%) في تركيز الباتولين في أصناف التفاح المدروسة

3-4- تركيز الباتولين في عينات عصير التفاح المدروسة:

Concentration of patulin in the studied apple juice samples

تناولت الدراسة مجموعة من عينات العصير المستورد (10 عينات) والمحلي (10 عينات) المباعة في السوق المحلية لمدينة دمشق وريفها، ويبين (الجدول. 3 والشكل. 6) متوسط نسب الباتولين لعينات عصير التفاح المدروسة.

تراوح محتوى الباتولين في عينات العصير المدروسة من N.D إلى 820 مكغ/ل، وبلغ متوسط تركيز الباتولين 211.15 مكغ/ل، وبلغت النسبة المئوية للعينات التي كان تركيز الباتولين فيها أقل من حد الكشف 30% (6 عينات) الجدول (3). ويعزى الاختلاف في النتائج إلى اختلاف نوعية ثمار التفاح المستخدمة وخطوات تصنيع وتخزين عصير التفاح، كما عزي (Prado et al., 2000) انخفاض محتوى عينات العصير المدروسة من الباتولين إلى تحضير عصير التفاح من مركّزات تم تعرضها للتسخين والتبخير وهي معاملات قد تخفض نسبة الباتولين، وإلى استخدام ثمار بمواصفات جيدة في تصنيع العصير، أو ربما قد يكون السبب احتواء جميع العينات المدروسة على حمض الاسكوربيك والذي قد يكون له دور في خفض نسبة الباتولين في

العصير، بينما أشار (Lai et al., 2000) إلى عدم وجود اختلاف حقيقي في تركيز الباتولين بين العينات التي احتوت على حمض الاسكوربيك وتلك الخالية منه.

توافقت هذه النتائج مع نتائج الباحث (Burda, 1992) الذي بين أن 50% من عينات عصير التفاح المأخوذة من جنوب إفريقيا وأستراليا كانت ملوثة بالباتولين بتركيز أعظمي وصل إلى 646 مكغ/ل، وكذلك اتفقت النتائج مع (Jelinek et al., 1989) الذين وجدوا أن مستوى الباتولين وصل إلى 610 مكغ/ل في 23 عينة عصير تفاح مباعة في فرنسا، وفي دراسة أجريت من قبل (Gokmen & Acar, 1998) على 215 عينة عصير تفاح في تركيا وجد الباحثان أن العينات جميعها كانت ملوثة بالباتولين بتركيز (7-375) مكغ/ل.

جدول(3): محتوى عينات عصير التفاح من الباتولين

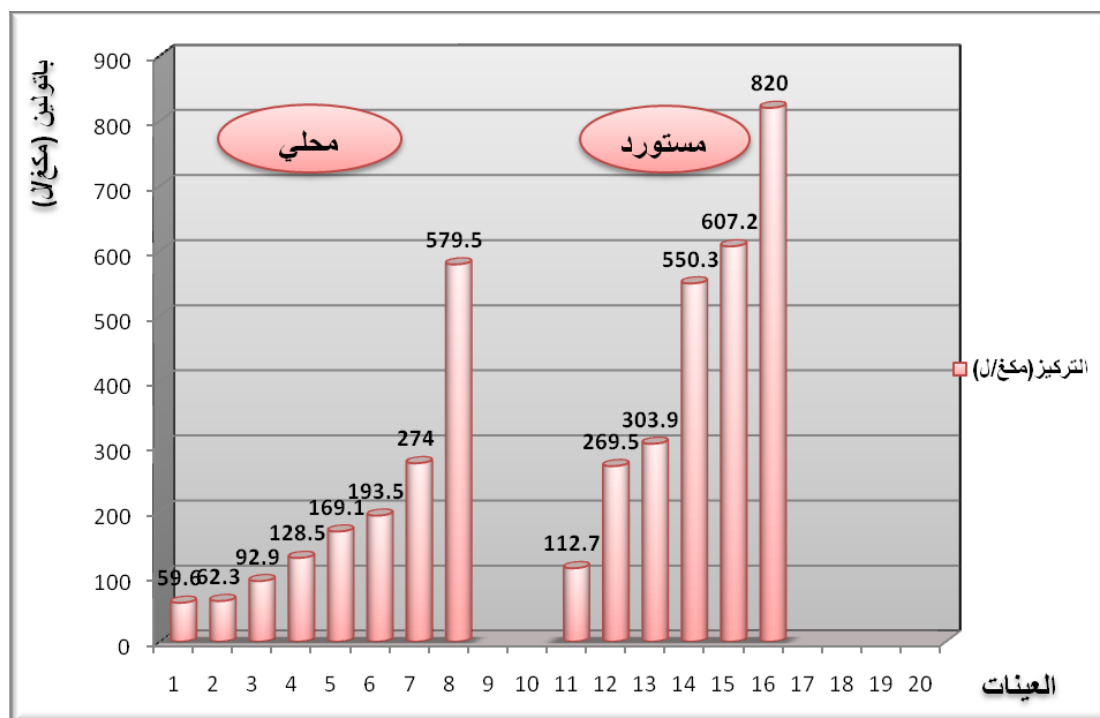
رقم العينة	محلي (مكغ/ل)	مستورد (مكغ/ل)
1	N.D	N.D*
2	N.D	N.D
3	0.5 ± 59.6	N.D
4	2.7 ± 62.3	N.D
5	0.3 ± 92.9	0.3±112.7
6	0.6 ± 128.5	0.6±269.5
7	1.7±169.1	0.1±303.9
8	2.9±193.5	2.2±550.3
9	0.2±274	0.4±607.2
10	0.3±579.5	3.1±820
المتوسط	155.94	266.36
المتوسط العام	211.15	

*ND: Non Detected

وفقاً لما أشارت له منظمة الغذاء والزراعة العالمية FAO ومنظمة الغذاء والدواء FDA بأن الحد الأعظمي المسموح به من الباتولين في عصير التفاح 50 مكغ/ل (FAO, 1994; FDA, 2003)، فإن نسبة العينات التي كان تركيز الباتولين فيها أعلى من الحد المسموح

به بلغت 70% (14 عينة), وكان تركيز الباتولين في (14/3) من العينات المكتشفة ضمن المجال (LOQ-LOD), في حين تجاوز LOQ في (14/11) من العينات المكتشفة جدول (3), وأشار (Burda, 1992) في دراسته إلى أن نسبة التجاوز للحد المسموح به من قبل المنظمة كانت (30-40)%, أما في الدراسة التي أجراها (Sewram et al., 2000) بلغت نسبة المخالفة للمواصفات القياسية 33%, ووجد (Gokmen & Acar, 1998) أن 43% من العينات المختبرة تجاوز تركيز الباتولين فيها 50 مكغ/ل.

يبين الجدول (3) أن تركيز الباتولين في عينات العصير المحلية تراوح من N.D إلى 579.5 مكغ/ل, وبمتوسط بلغ 155.94 مكغ/ل, أما في العينات المستوردة فكانت أقل قيمة N.D وأعلى قيمة 820 مكغ/ل, والمتوسط 266.36 مكغ/ل, وجميع القيم المكتشفة كانت أعلى من الحد المسموح به من قبل FDA, وبالمقارنة بين العينات المحلية والعينات المستوردة (الشكل 6). نلاحظ أن 80% من عينات العصير المحلية الصنع ظهر فيها الباتولين بمستوى أعلى من الحد المسموح به مقابل ظهوره في 60% بالنسبة للعينات المستوردة. من جهة أخرى, كانت القيم المكتشفة من الباتولين في العينات المستوردة أعلى منها في العينات المحلية, ويمكن تفسير ذلك بعدم وجود رقابة على مستويات الباتولين في مستوردات عصائر التفاح أو عدم مراعاة ظروف التخزين الجيدة أثناء النقل, مع الإشارة إلى أن العديد من الفطريات المنتجة للباتولين ولاسيما *Aspergillus*, *Byssochlamys spp* تقاوم الحرارة وتستطيع البقاء بعد عملية البسترة, وبالتالي فإن العديد منها ينمو في المنتج النهائي وينتج الباتولين خلال التخزين المبرد على درجة الحرارة 0°م (Roland & Beuchat, 1994a).



الشكل (6): تركيز الباتولين في عينات عصير التفاح المدروسة (المحلية والمستوردة)

4-4- تركيز الباتولين في عينات أغذية الأطفال المدروسة:

Concentration of patulin in the studied babies foods samples

تم اختبار 4 عينات من أغذية الأطفال المصنعة من هريس ثمار التفاح و6 عينات مصنعة من هريس ثمار التفاح الممزوجة مع أصناف فاكهة أخرى، ويبين الجدول (4) والشكل (7) أن تركيز الباتولين تراوح في عينات أغذية الأطفال المختبرة من N.D إلى 81.5 مكغ/ل، وبمتوسط 20.46 مكغ/ل، وبلغت نسبة العينات التي كان تركيز الباتولين فيها أقل من حد الكشف 70%. وقد توافقت هذه النتائج مع نتائج الباحثين (Yuan et al., 2010) الذين وجدوا في دراسة أجريت على 30 عينة من أغذية الأطفال المصنعة من التفاح أن عدد العينات التي ظهر فيها الباتولين هي 19 عينة (63.3%)، والمتوسط 9.3 مكغ/ل، وأن التركيز الأعظمي للباتولين في العينات المدروسة بلغ 67.3 مكغ/ل، بالمقابل أشار (Spadaro et al., 2007) أن نسبة العينات الإيجابية في اختبار أجري على أغذية الأطفال كانت 47.2%، كذلك وجد الباحثان (Leggott & Shephard, 2001) أن 29% من عينات أغذية الأطفال الرضع المختبرة احتوت على تركيز (20-5) مكغ/ل باتولين.

من جهة أخرى اختلفت نتائج البحث مع ما توصل إليه الباحثين (Barreira et al., 2010), الذين وجدوا في اختبار أجروه على 76 عينة هريس تفاح أن الباتولين تواجد فقط في 5 عينات من الهريس (7%), وعينتان فقط كان محتاهما من الباتولين أعلى من LOQ وبقية عظمى 5.7 مكغ/ل.

أظهرت النتائج المتحصل عليها (جدول 4) أن الباتولين تواجد في عينتان من عينات هريس التفاح مقابل وجوده في عينة واحدة من عينات الهريس المخلوطة وهي عينة هريس (تفاح+إجاص), وبلغ تركيز الباتولين فيها 67.8 مكغ/ل, وقد يعزى اختلاف محتوى عينات أغذية الأطفال المدروسة من الباتولين إلى اختلاف تاريخ إنتاج الدفعة وبالتالي اختلاف مصدر التفاح الداخل في عملية التصنيع ومحتواه من الباتولين وفقاً لدرجة تلوث ثمار التفاح المستخدمة بالتصنيع, وإلى درجة الالتزام بالممارسات التصنيعية الجيدة أثناء العمل, وليس إلى نسبة الخط بكل عينة, حيث تحدد هذه العوامل تركيز الباتولين في المنتج النهائي, كما عزى الباحثان (Drusch & Ragab, 2003) الاختلاف في تركيز الباتولين لعدة عوامل: الظروف المناخية و pH وصنف ونوعية ومرحلة نضج ثمار التفاح المستخدمة في تصنيع أغذية الأطفال.

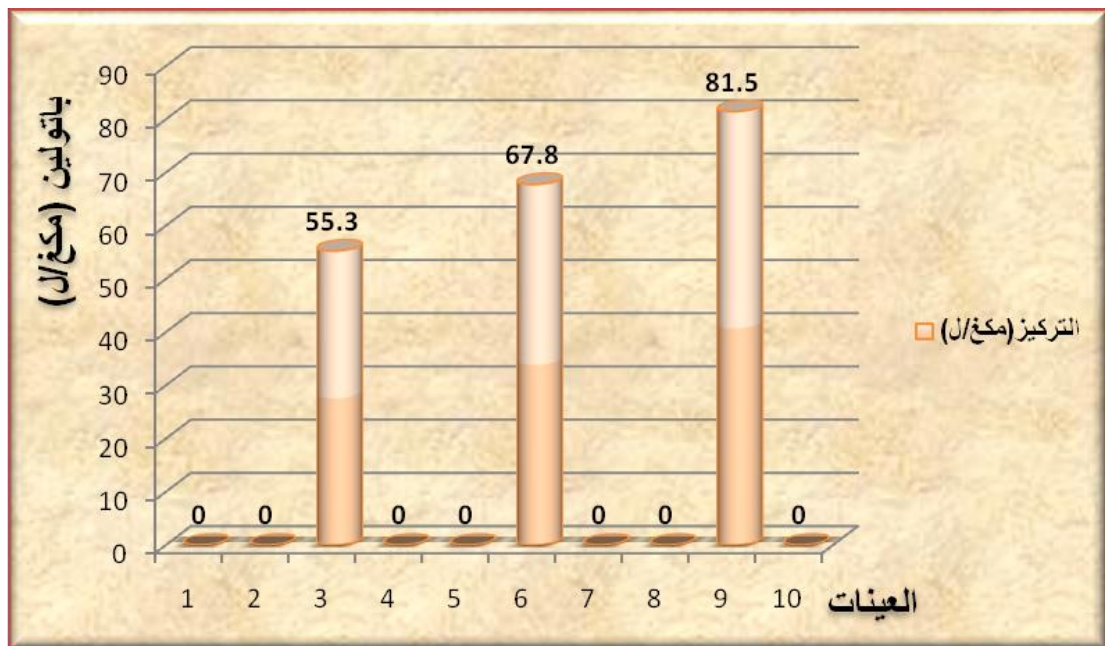
جدول(4): تركيز الباتولين في عينات أغذية الأطفال المدروسة

رقم العينة	مكوناتها	نسبة التفاح %	التركيز (مكغ/ل)
1	تفاح	100	N.D*
2	تفاح	100	N.D
3	تفاح	100	N.D
4	تفاح	100	0.2±81.5
5	تفاح+تمر	80	N.D
6	تفاح+موز	80	0.2±55.3
7	تفاح+موز	80	N.D
8	تفاح+كيوي	80	N.D
9	تفاح+كيوي	80	N.D
10	تفاح+إجاص	80	0.1±67.8
المتوسط			20.46

*ND: Non Detected

حددت هيئة المواصفات الأوروبية EU التركيز الأعظمي المسموح به من الباتولين في أغذية الأطفال 10 مكغ/ل (EU, 2003), ووفقاً لنتائج الدراسة فإن نسبة العينات التي تجاوز تركيز الباتولين فيها الحد المسموح به من قبل EU بلغت 30% (3 عينات), وجميع القيم المتحصل عليها كانت ضمن المجال (LOQ- LOD) جدول (4), وهذا يوافق الباحثين (Yuan *et al.*, 2010) الذين بينوا أن 36.7% من العينات المختبرة (11 عينة أغذية أطفال) تجاوزت الحد المسموح به, من جهة أخرى كانت جميع النسب التي تم الحصول عليها من قبل (Barreira *et al.*, 2010) أقل من الحد المسموح به للرضع والأطفال اليافعين.

ووفقاً للنتائج الموضحة بالجدول (2) فإنه ينصح باستخدام صنف ستارك ريمسن لكونه الأغنى بالمركبات الفينولية والأقل عرضة للتلوث الباتوليني, بحيث لا تتجاوز درجة الإصابة للصنف المستخدم 15%, وكذلك إزالة الجزء الفاسد البني من الثمرة والذي يعد مركز التلوث الباتوليني الأكبر.

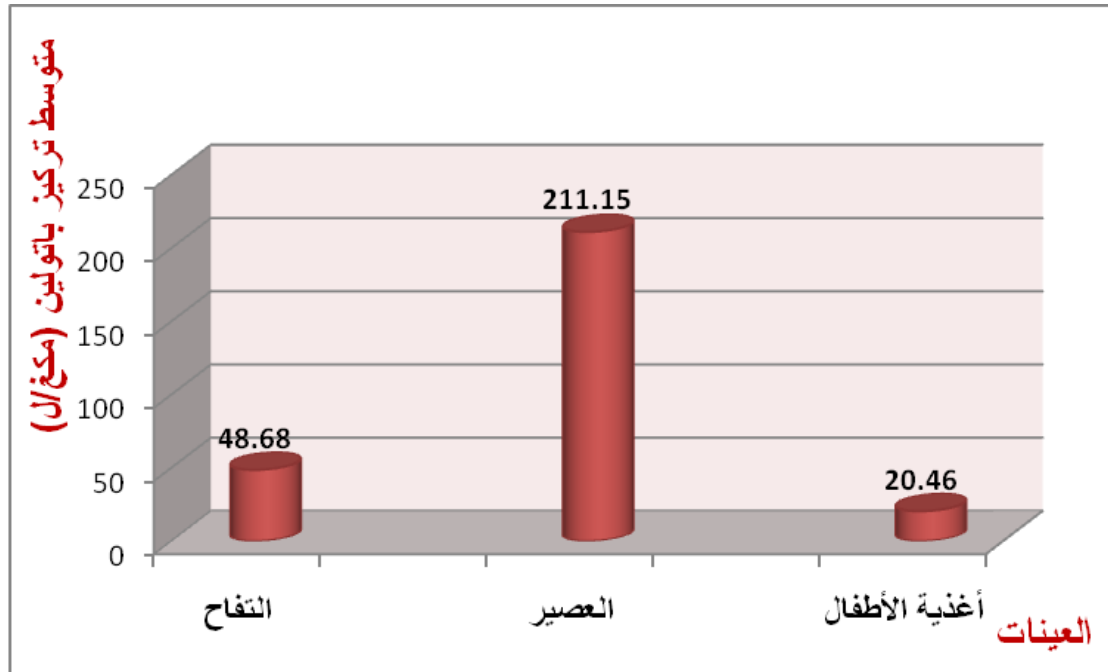


الشكل (7): تركيز الباتولين في عينات أغذية الأطفال المدروسة

5-4- نسب التعرض للباتولين: Exposure rates of patulin

إن استهلاك التفاح ومنتجاته يكون مرتفعاً في السنوات الأولى من العمر، ويحدث تناقص في تركيز الباتولين المتناول بالنسبة لوزن الجسم مع تقدم العمر، لذا عند تناول عصائر التفاح المحتوية على النسبة ذاتها من الباتولين تكون الجرعة اليومية المتناولة أعلى عند الأطفال والرضع منها لدى البالغين نظراً لارتباط ذلك بوزن الجسم، يضاف لذلك قابلية التأثر بالسموم تكون أعلى عند الرضع والأطفال منها عند البالغين.

(Lewit & Schuurmann-Baker, 1995)



الشكل (8): متوسط تركيز الباتولين في العينات المدروسة

تبين النتائج الموضحة بالجدول (2 و 3 و 4) والشكل (8) أن أعلى متوسط لتركيز الباتولين كان في عينات العصير ثم التفاح ثم أغذية الأطفال، وهذا ينعكس بدوره على نسب التعرض للباتولين بالنسبة للبالغين والأطفال والرضع.

إن متوسط تركيز الباتولين في عينات عصير التفاح المدروسة بلغ 211,15 مكغ/ل، وبحساب نسب التعرض للباتولين نجد أنه عند أخذ شرائح تمثل كل من البالغين بوزن 70 كغ والأطفال بوزن 25 كغ والرضع بوزن 10 كغ، وبفرض أن نسبة الاستهلاك اليومي تمثل 200 مل/يوم للبالغين والأطفال و130 مل/يوم للرضع كما أشار إلى ذلك (Murillo-Arbizu et al., 2009)، نجد أن نسب التعرض كانت على التوالي: 603.0 و1.689 و745.2 مكغ/كغ وزن الجسم/اليوم جدول (5).

وبحساب نسب التعرض نتيجة استهلاك التفاح بالنسبة لنفس الشرائح العمرية والأوزان وكمية الاستهلاك اليومي، علماً أن متوسط تركيز الباتولين في عينات التفاح كان 68.48 مكغ/ل نلاحظ أن قيم التعرض هي على التوالي: 0.139 و 0.389 و 0.633 مكغ/كغ وزن الجسم/اليوم جدول (5).

وفيما يتعلق بأغذية الأطفال التي يبدأ استهلاكها من عمر 6 أشهر للرضع بوزن 10 كغ وبمقدار 100 غ/اليوم، فقد وجدنا أن متوسط تركيز الباتولين بلغ فيها 20.46 مكغ/ل لتكون نسبة تعرض الرضع للباتولين 0.205 مكغ/كغ وزن الجسم/اليوم جدول (5).

إن النتائج المتحصل عليها كانت أعلى مما أشار إليه (Lewit & Schuurmann-Baker, 1995) بأن نسب التعرض للباتولين عند استهلاك عصير التفاح في البرتغال (متوسط تركيز الباتولين فيه 19.4 مكغ/ل) كانت على التوالي: 0.055 و 0.155 و 0.252 مكغ/كغ/اليوم للشرائح العمرية المختلفة الثلاث البالغين والأطفال والرضع، وكذلك أعلى مما أشار إليه الباحثون (Murillo-Arbizu et al., 2009) في دراستهم على عصير التفاح في إسبانيا والتي كان متوسط تركيز الباتولين فيها 12.9 مكغ/ل ونسب التعرض 0.037 و 0.103 و 0.168 مكغ/كغ وزن الجسم/اليوم على التوالي، وأشار (Cano-Sancho et al., 2009) في دراستهم بأن متوسط تركيز الباتولين المتناول يومياً نتيجة لاستهلاك عصير التفاح في إسبانيا كان أقل من 0.002 مكغ/كغ/وزن الجسم للأطفال والبالغين وأقل من 0.003 مكغ/كغ/وزن الجسم للرضع، وبالنسبة لأغذية الأطفال فإن متوسط تركيز الباتولين المتناول يومياً عند الأطفال الرضع يقارب 0.012 مكغ/كغ/وزن الجسم، كذلك وجد (Marin et al., 2011) أن كمية الباتولين المتناولة يومياً تتراوح من (0.005-0.055) مكغ/كغ/وزن الجسم للأطفال البالغين و(0.008-0.155) مكغ/كغ/وزن الجسم للأطفال و(0.04-0.252) مكغ/كغ/وزن الجسم للرضع.

حددت منظمة الأغذية والزراعة العالمية (FAO, 2003) بأن قيم التعرض للباتولين (PMTDI; Provisional Maximum Tolerable Daily Intake) الكمية اليومية المحتملة القصوى المتناولة من الباتولين يجب ألا تتجاوز 0.4 مكغ/كغ من وزن الجسم/اليوم.

جدول (5): نسب التعرض للباتولين (مكغ/كغ وزن الجسم/اليوم)

الشرائح العمرية	التفاح	العصير	أغذية الأطفال
الرضع	0.633	2,745	0.205
الأطفال	0.389	1.689	–
البالغين	0.139	0,603	–

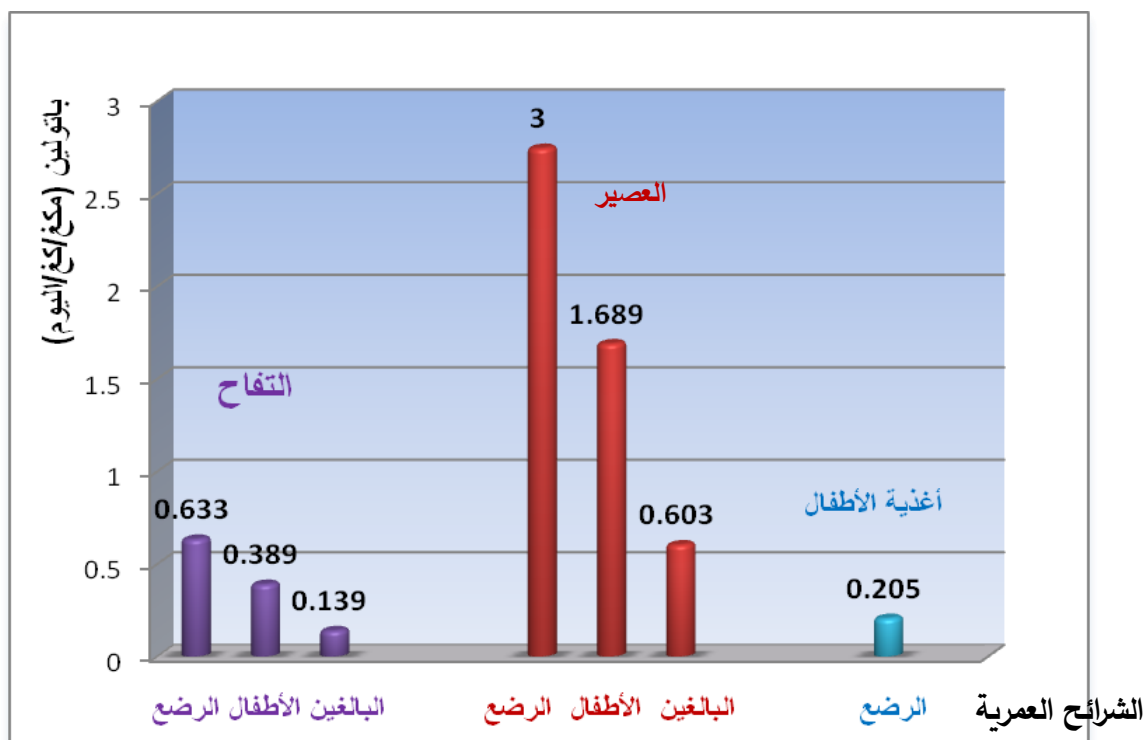
أظهرت النتائج أن قيم تعرض الرضع للباتولين كانت أعلى من PMTDI من خلال استهلاك كل من التفاح والعصير، في حين كانت ضمن الحدود المسموح بها نتيجة استهلاك أغذية الأطفال جدول (5).

ويتعرض الأطفال والبالغين إلى مستويات عالية من الباتولين عن طريق استهلاك العصير، وتكون مستويات التعرض ضمن الحدود المسموح بها من خلال استهلاك التفاح الطازج جدول (5)، ويمكن تخفيض هذه النسبة إلى حدود أقل نتيجة غسل التفاح وتقسيمه (لم تدرس بهذا البحث).

يوضح الشكل (9) أن أعلى نسب تعرض للباتولين بالمقارنة بين التفاح وعصيره وأغذية الأطفال كانت في عصير التفاح (حيث كانت بعض النسب أعلى بمقدار 50% أو أكثر من القيمة المحتملة القصوى من الباتولين PMTDI)، كما أن أكثر الشرائح العمرية تعرضاً للباتولين عند استهلاك عصير التفاح كانت الرضع ثم الأطفال ثم البالغين، وهذا يمثل الترتيب ذاته بالنسبة للتفاح، وبالمقارنة بين نسب تعرض الرضع للباتولين نتيجة لاستهلاك التفاح وعصيره وأغذية الأطفال نجد أن أعلى تعرض يكون من استهلاك عصير التفاح ثم التفاح ثم أغذية الأطفال، وكذلك بالنسبة للأطفال والبالغين يكون أعلى تعرض من استهلاك العصير ثم التفاح.

لذا لابد من خفض تعرض الإنسان لهذه السموم وخفض الجرعة اليومية المتناولة من خلال ضبط خطوات التصنيع لتخفيض نسبة التلوث بهذا السم (Wouters & Speijers, 1995)، كما اقترح (Baert et al, 2006) خفض الحد الأعلى المسموح به إلى 25 مكغ/ل بهدف خفض خطر تعرض الأطفال للباتولين.

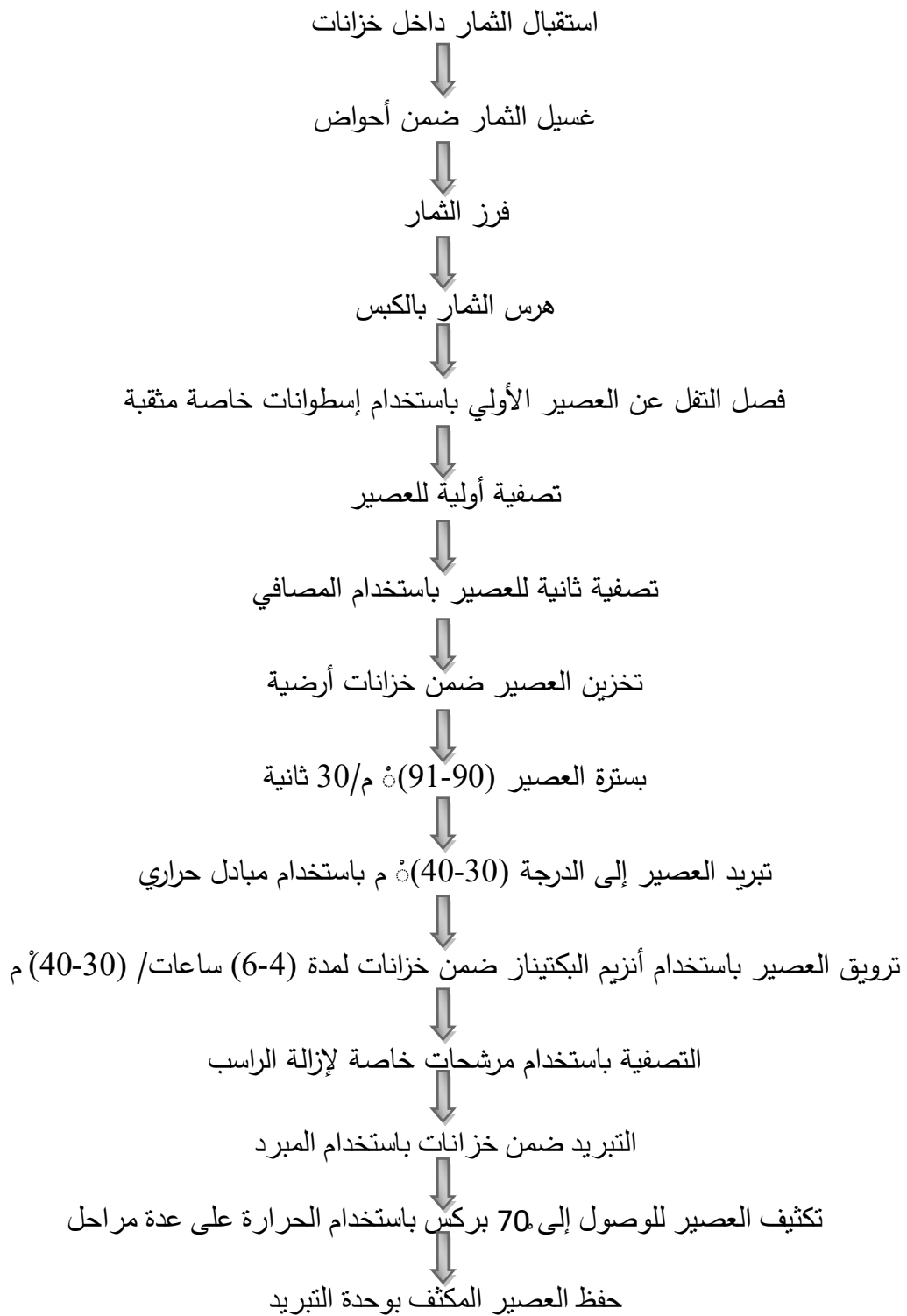
ويضاف لذلك مساهمة الفاكهة والخضار الأخرى بإضافة تراكيز جديدة من الباتولين إلى المقدار المتناول يومياً من قبل الأطفال والرضع، إضافة لوجود سموم فطرية أخرى في التفاح ومنتجاته مثل السيترينين.



الشكل (9): نسب التعرض للباتولين (مكغ/كغ وزن الجسم/اليوم)

6-4- تأثير خطوات تصنيع عصير التفاح على مستويات الباتولين في المنتج النهائي: Effect of processing stages of apple juice on patulin levels in the final product

تتفاوت مراحل التصنيع من حيث فعاليتها على خفض تركيز الباتولين، ويوضح المخطط (1) مراحل تصنيع عصير التفاح في المعمل الذي تمت فيه دراسة تأثير خطوات التصنيع على خفض المحتوى من الباتولين.



مخطط (1): خط تصنيع عصير التفاح المبستر المدروس

ملاحظة: تم تمديد العصير المركز إلى 12% وأخذت عينة منه للتحليل

وقد تمت دراسة التغير في تركيز الباتولين خلال مراحل التصنيع المختلفة بدءاً من مرحلة الثمار المستلمة والمخزنة إلى مرحلة الحصول على عصير التفاح القابل للاستهلاك المباشر، وفيما يلي نتائج كل مرحلة من مراحل التصنيع وتأثيرها في محتوى العصير من الباتولين:

4-6-1- استقبال الثمار: Reception of Fruits

يلاحظ من النتائج الموضحة في (الجدول. 6 والشكل. 10) أن تركيز الباتولين في عينات الثمار المستقبلية بلغ 334.4 مكغ/ل. وهذا يوافق (Sydenham *et al.*, 1995) الذين وجدوا أن مستو عالٍ من الباتولين سجل في ثمار التفاح الأولية 920 مكغ/ل، وقد فُسر هذا الارتفاع بوجود نسبة عالية من الثمار المهترئة، كذلك وجد (Yuan *et al.*, 2010) أن محتوى ثمار التفاح المستقبلية لتصنيع العصير وصل إلى 143 مكغ/ل. إلا أن النتائج اختلفت مع (Marin *et al.*, 2011) الذين وجدوا بأن مستويات منخفضة من الباتولين وجدت في ثمار التفاح المستخدمة لإنتاج العصير.

تعد النسبة المتحصل عليها مرتفعة بالمقارنة مع الحدود المسموح بها من قبل FAO و EU (50 مكغ/ل) (EU, 2003; FAO, 2003)، وقد يعزى ذلك إلى درجة التفاح المستخدم وإلى طريقة التخزين، حيث كانت الثمار متدنية النوعية إضافة إلى وجودها في العراء وتحت أشعة الشمس لفترة طويلة من الزمن وليس ضمن برادات نظراً لعدم توفر الوقود اللازم لعمل الآلات، وكانت بعض الثمار سليمة والبعض متعفنة تقريباً، وتم خلط عدة دفعات معاً نتيجة وصولها في أوقات متفاوتة، كما أن هذه الدفعات تحوي نوعية مختلفة من الثمار، وأكد ذلك (Morales *et al.*, 2007) بأن الاختلاف بالنتائج يتوقف على نوعية الثمار، كما تعد فترة تخزين الثمار على درجة حرارة الغرفة لحين موعد استخلاص العصير الأساس في تحديد تركيز الباتولين في العصير الناتج ومدى تفاقمه.

جدول (6): تركيز الباتولين خلال مراحل تصنيع عصير التفاح صناعياً

خطوات تصنيع العصير	تركيز الباتولين (مكغ/ل)	معدل التراجع %	معدل التراجع الكلي %
استقبال الثمار	2.1±334.4 _h	0	0
الغسيل والفرز	0.5±196.9 _g	41.1	41.1
الطحن	0.8±193.3 _f	1.8	42.2
العصر	1.2±180.4 _e	6.7	46.1
البسترة	0.6±174.3 _d	3.4	47.9
المعاملة الأنزيمية	0.8±156.3 _c	10.3	53.3
الترشيح الدقيق	0.6±144.6 _b	7.5	56.8
التركيز	0.3±372.2 _i	-157.4	-11.3
المنتج النهائي	0.7±69.5 _a	81.3	79.2
1.581= L.S.D		0.5=%CV	

L.S.D: قيمة أقل فرق معنوي عند مستوى معنوية $P \leq 0.05$, CV% : قيمة معامل الثقة.

تشير الأحرف المختلفة ضمن العمود الواحد إلى وجود فروقاً معنوية بين المتوسطات عند مستوى معنوية $P \leq 0.05$.

4-2-6- Washing & Sorting: الغسيل والفرز

يلاحظ من المخطط (1) أن أول مرحلة من مراحل التصنيع لعصير التفاح تتمثل في غسيل وفرز الثمار من خلال نقل الثمار إلى أحواض من الماء وترش عن طريق ضخ المياه بضغط معين ثم ترفع بعدها على سير ناقل شبكي حيث يتم خلال ذلك إزالة الأوراق والأجزاء الغريبة والثمار التالفة بشكل جزئي.

أدت عملية الغسيل والفرز إلى حدوث انخفاض معنوي بتركيز الباتولين وبمعدل 41.1 %، حيث انخفض تركيز الباتولين بعد غسيل الثمار وفرزها يدوياً من 334.4 مكغ/ل إلى 196.9 مكغ/ل (الجدول. 6 والشكل. 10).

اتفقت النتائج مع ما أشار إليه الباحثون (Sydenham et al., 1995) بأن مستوى الباتولين انخفض من 920 مكغ/ل في ثمار التفاح الأولية إلى 190 مكغ/ل بعد المعاملة الأولية بالماء، كما أن إزالة الأجزاء المتعفنة والمتضررة من الثمرة باليد أدى لخفض تركيز الباتولين في العصير إلى 55 مكغ/ل، وكذلك اتفقت مع نتائج الباحثين (Yuan et al., 2010; Acar et al., 1998).

3-6-4- الهرس: Milling

تبين النتائج الموضحة في الجدول (6) أن عملية الهرس الأولية (الطحن) وتكوين الهريس قد أثرت بشكل معنوي في خفض تركيز الباتولين من 196.9 مكغ/ل بعد عملية الغسيل والفرز إلى 193.3 مكغ/ل بعد عملية الهرس، ولكن بمعدل انخفاض أقل بكثير من عملية الغسيل والفرز 1.8% الشكل (10).

يوافق هذا ما أشار إليه الباحثون (Yuan et al., 2010) الذين وجدوا أن عملية الطحن لم تحدث تراجع كبير في تركيز الباتولين في العصير.

4-6-4- العصر: Pressing

أدت عملية العصر وإزالة التفل في التخلص من كميات لا بأس بها من الباتولين، حيث انخفض محتوى العينات معنوياً إلى 180.4 مكغ/ل وبمعدل تراجع 6.7% (الجدول 6 والشكل 10).

اتفقت هذه النتيجة مع ما توصل إليه (Yuan et al., 2010) الذين وجدوا أن عملية العصر كانت ذات تأثير ضعيف على تراجع محتوى الباتولين 2.1%، وإن اختلاف هذه النسبة يعود إلى الاختلاف في المحتوى الأولي لثمار التفاح المستخدمة في تصنيع العصير (143 مقابل 334.4 مكغ/ل).

يعزى الانخفاض الحاصل بتركيز الباتولين إلى فصل التفل عن العصير وبقاء نسبة من الباتولين مع التفل، لأن الباتولين يدمص أكثر على الأجزاء الصلبة مقارنة بالعصير، حيث يتم العصر باستخدام اسطوانات مثقبة ثم يمرر العصير الناتج على مصافي دقيقة تغلو خزانات أرضية والتي يخزن فيها العصير بشكل مؤقت ريثما ينقل إلى مرحلة البسترة.

5-6-4- البسترة: Pasteurization

أدت عملية البسترة للعصير الناتج على الدرجة (90-91)°م ولمدة 30 ثانية ثم تبريده باستخدام مبادل حراري صفائحي إلى الدرجة (30-40)°م إلى خفض المحتوى من الباتولين معنوياً من

180.4 مكغ/ل بعد عملية العصر إلى 174.3 مكغ/ل، وبمعدل تراجع 3.4% (الجدول. 6 والشكل. 10).

توافق هذا مع ما أشار إليه (Yuan *et al.*, 2010) من خلال دراستهم لخط تصنيع عصير التفاح بأن عملية بسترة عصير التفاح على درجة حرارة 90 م لمدة 30 ثانية أدت إلى انخفاض المحتوى من الباتولين بمقدار 2.2%. وكذلك توافقت النتائج المتحصل عليها مع نتائج الباحثين (Leggott & Shephard, 2001) اللذين أكدوا بأن الباتولين الموجود في عصير التفاح لن يفك بعملية البسترة التقليدية.

إن انخفاض معدل تراجع الباتولين نتيجة عملية البسترة يعزى إلى ثبات الباتولين النسبي تجاه المعاملات الحرارية ولاسيما في الأوساط الحامضية، وهذا ما أكدته (Welke *et al.*, 2009) بأن الباتولين يمتاز بثباته في المجال الحراري (105-125) م وفي مجال pH يتراوح من 3.5 إلى 5.5، وكذلك وجد (Mutlu *et al.*, 1997) بأن المعاملة الحرارية المقترنة باسترجاع النكهة لم تملك أي تأثير على محتوى عصير التفاح من الباتولين، حيث وجدت الدراسة بأن الباتولين في عصير ومركز التفاح لا يمكن أن يفك بالمعاملة الحرارية والتخزين وذلك لكون الباتولين يمتاز بثباته في الأوساط الحامضية.

4-6-6- المعاملة الأنزيمية: Enzymatic Treatment

يُنقل العصير بعد عملية البسترة إلى خزان التحليل الأنزيمي للبكتين باستخدام البكتيناز على الدرجة (30-40) م لمدة (4-6) ساعات.

إن خطوة تحليل البكتين أدت إلى حدوث انخفاض معنوي بمحتوى الباتولين من 174.3 مكغ/ل نتيجة عملية البسترة إلى 156.3 مكغ/ل، وبمقدار تراجع 10.3% (الجدول. 6 والشكل. 10).

اتفق هذا مع ما أشار إليه (Yuan *et al.*, 2010) الذين وجدوا بأن المعاملة الأنزيمية أحدثت تراجع بمقدار 9.9%، وكذلك وجد (Bissessur *et al.*, 2001) أن مقدار التراجع كان فقط 4.5%، إلا

أنها اختلفت مع (Welke et al., 2009) الذين وجدوا أن مقدار التراجع الحاصل بهذه الخطوة كان أعلى بكثير بحيث وصل إلى 39.2%.

يعزى الانخفاض الناتج عن خطوة المعاملة الأنزيمية إلى ادمصاص الباتولين مع الراسب المتشكل نتيجة لتحلل البكتين (Bissessur et al., 2001).

4-6-7- الترشيح الدقيق : Microfiltration

أدى الترشيح الدقيق باستخدام مرشحات دقيقة إلى حدوث انخفاض معنوي في المحتوى من الباتولين من 156.3 مكغ/ل نتيجة المعاملة الأنزيمية إلى 144.6 مكغ/ل، وبمعدل تراجع 7.5%، أما نسبة التراجع الكلي في تركيز الباتولين حتى نهاية مرحلة الترشيح الدقيق فوصلت إلى 56.8% (جدول 6).

توافقت النتائج المتحصل عليها مع نتائج الباحثين (Yuan et al., 2010) الذين وجدوا أن مرحلة الترشيح الدقيق أحدثت تراجع في تركيز الباتولين بمقدار 3.7%.

لم يلاحظ في خط التصنيع المدروس وجود خطوة إزالة اللون بعد إجراء عملية الترشيح، والتي تبين الدراسات إلى أن تأثير هذه الخطوة قد يؤدي إلى خفض محتوى الباتولين للعصير الناتج بنسبة مرتفعة، لأن الباتولين يدمص بواسطة الراتنجات، ومن هنا تؤكد الدراسات بأن المعاملة بالراتنج المكثف مباشرة بعد الترشيح الدقيق يحدث تراجع عالٍ في تركيز الباتولين كما يحسن لون ونقاوة العصير الناتج (Morales et al., 2007; Gokmen et al., 2001).

4-6-8- التركيز : Concentration

يركز العصير في هذه المرحلة إلى 70° برقس وذلك باستخدام الحرارة على عدة مراحل. أدت عملية التكتيف إلى زيادة معنوية في تركيز الباتولين من 144.6 مكغ/ل (مرحلة الترشيح الدقيق) إلى 372.2 مكغ/ل (مرحلة التكتيف)، وبمعدل زيادة 157.4% والذي يساوي 2.6 ضعف (الجدول 6 والشكل 10).

اتفقت النتائج مع ما توصل إليه (Morales *et al.*, 2007) الذين وجدوا حدوث زيادة في تركيز الباتولين في العصير بعد إجراء عملية التركيز بمقدار 4 أضعاف، وتراوح محتوى الباتولين في مركّزات التفاح بعد التصنيع من 7.8 مكغ/ل إلى 244.8 مكغ/ل، كذلك اتفقت مع ما أشار إليه (Gokmen *et al.*, 2001) الذين وجدوا أن عملية التركيز أحدثت زيادة في تركيز الباتولين بمقدار تراوح بين (5-9) أضعاف، حيث بينت الدراسة أن عملية التبخير أدت إلى ظهور الباتولين بنسبة مرتفعة (225.6 مكغ/ل) بالرغم من عدم اكتشافه في المراحل التي سبقت هذه العملية،

وهذا ما أكدته مؤسسة الأغذية والزراعة السمكية MAFF (Ministry of Agriculture Fisheries and Food) إلى أن تركيز الباتولين في العصير المصنع من مركّزات التفاح يكون أعلى مما هو عليه في العصير المصنع مباشرة من التفاح الطازج والذي تزايد الطلب عليه حديثاً، وهذا يعود إلى الفترة الزمنية بين الحصاد والتصنيع، واعتبرت المؤسسة أن هذه المشكلة هي من أسوأ المشاكل التي تواجه تصنيع عصير التفاح، حيث تصنع المركّزات من التفاح بعد الحصاد مباشرة ثم تخفف وتعلب وفقاً للطلب في السوق .
(MAFF, 1998)

من جهة أخرى اختلفت النتائج مع توصل إليه الباحثان (Kadikal & Nas, 2002) اللذان وجدا أن التراجع الحاصل بتركيز الباتولين نتيجة لإجراء التبخير للعصير وصل إلى 14.1%.

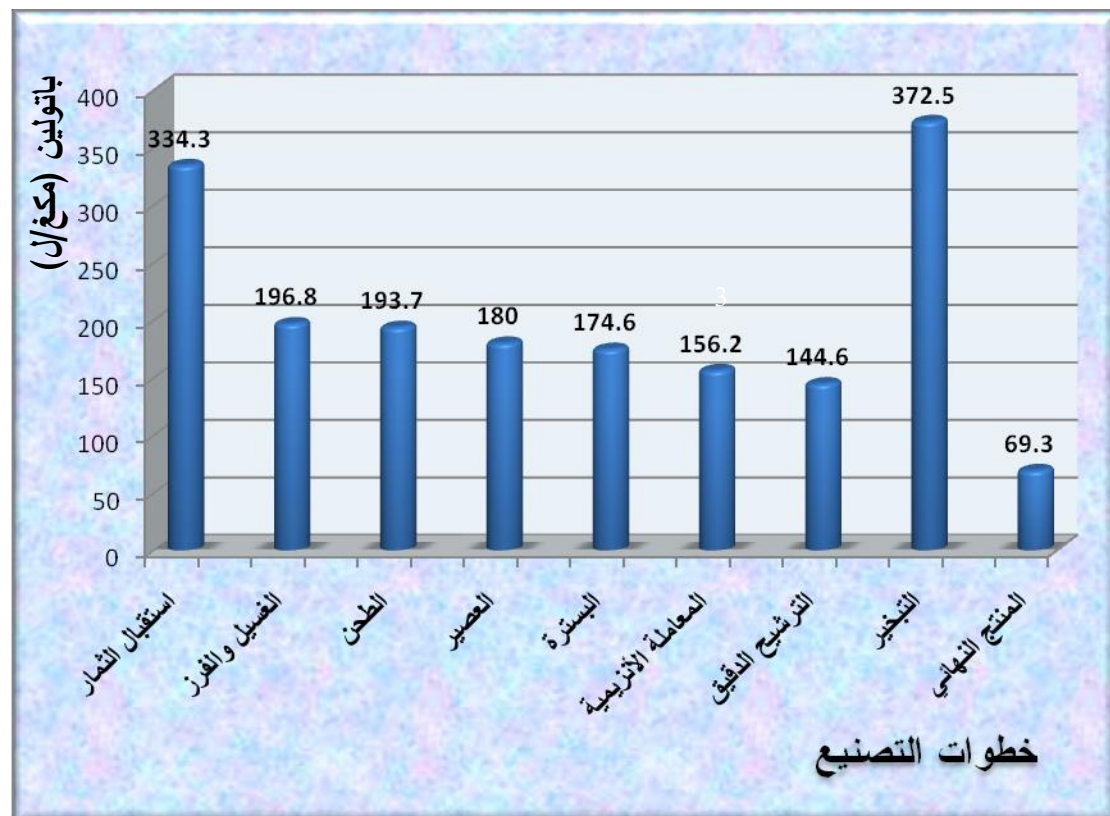
تعزى زيادة تركيز الباتولين نتيجة عملية تكثيف العصير إلى عدم تبخر الباتولين مع المواد المتطايرة بفعل التكثيف نظراً لارتباطه مع المواد الصلبة (Kryger, 2001).

4-6-9- المنتج النهائي: Final Product

أدى تمديد مركز عصير التفاح للحصول على عصير بتركيز (12%) إلى انخفاض تركيز الباتولين معنوياً من 372.2 مكغ/ل بعد عملية التكثيف إلى 69.5 مكغ/ل بعد التمديد، وكان معدل الانخفاض بتركيز الباتولين نتيجة التمديد 81.3% (الجدول 6 والشكل 10). وهذا يوافق ما أكدته لجنة المفوضية الأوروبية رقم (2006/1881) بأن تخفيف المركّزات لتكوين العصير سيخفض تركيز الباتولين (EC, 2006).

إن مقدار التراجع الكلي الحاصل خلال خطوات التصنيع المختلفة لعصير التفاح بدءاً من الاستلام وصولاً إلى المنتج النهائي بلغ 79.2% جدول (6). وهذه النسبة أعلى مقارنة مع (Yuan et al., 2010) الذين وجدوا أن مقدار التراجع الكلي في تركيز الباتولين كان 46.2%. وبالنظر إلى أكثر الخطوات فعالية على إحداث تراجع في تركيز الباتولين نجد وفقاً للنتائج المتحصل عليها بأن الغسيل والفرز هي الخطوة الأكثر فعالية 41.1% تليها المعاملة الأنزيمية 10.3% ثم الترشيح الدقيق 7.5% ثم العصر 6.7% ثم البسترة 3.4% ثم الطحن 1.8% الشكل (10). وهذا ما أكدته (Yuan et al., 2010) بأن الغسيل هي الخطوة الأهم حيث بلغ مقدار التراجع 33.6%.

أوضحت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية بين خطوات التصنيع المشار إليها بالمعاملات في الجدول (6) بين بعضها البعض من جهة وبينها وبين الشاهد (استقبال الثمار من جهة أخرى).



الشكل (10): تأثير مراحل التصنيع المختلفة على معدل تراجع الباتولين

علماً أن قيمة معامل الثقة (CV%) للتجربة كانت 0.5 .

7-4- المعاملات المقترحة لخفض تركيز الباتولين في عصير التفاح المصنع:

Suggesting treatments to reduce patulin concentration in the processed apple juice

نظراً لبقاء نسبة من الفطر ونموه أثناء التخزين في المركبات والذي يؤدي بدوره إلى وجود الباتولين في المنتج النهائي، فقد تم إجراء بعض المعاملات كالترشيح أو إضافة بعض المضافات (حمض الأسكوربيك، ثاني أكسيد الكبريت، السيسيتين، الكويرسيتين) التي يمكن أن تؤثر في مستوى الباتولين في العصير النهائي وكانت النتائج كمايلي:

جدول (7): تأثير المعاملات المختلفة على تركيز الباتولين في عصير التفاح

معدل التراجع %	تركيز الباتولين مكغ/ل	التعديل
-	0.6±1225.6i	الشاهد
23.3	0.8±940.1f	حمض الإسكوربيك 100 ppm
100	N.D a	حمض الإسكوربيك 500 ppm
33	1.1±820.7d	ثاني أكسيد الكبريت 50 ppm
56.7	0.6±530.8b	ثاني أكسيد الكبريت 100 ppm
20.4	0.9±975.3g	سيسيتين 50 ppm
44	1.1±686.9c	سيسيتين 100 ppm
11.6	0.3±1083h	كويرسيتين 50 ppm
30.6	1.1±850.9e	كويرسيتين 100 ppm
100	N.D a	الفحم النباتي المنشط
0.1 = %CV		1.341=L.S.D

L.S.D: قيمة أقل فرق معنوي عند مستوى معنوية $P \leq 0.05$, %CV: قيمة معامل الثقة.

تشير الأحرف المختلفة ضمن العمود الواحد إلى وجود فروقاً معنوية بين المتوسطات عند مستوى معنوية $P \leq 0.05$.

7-4-1- تأثير حمض الأسكوربيك: Effect of ascorbic acid

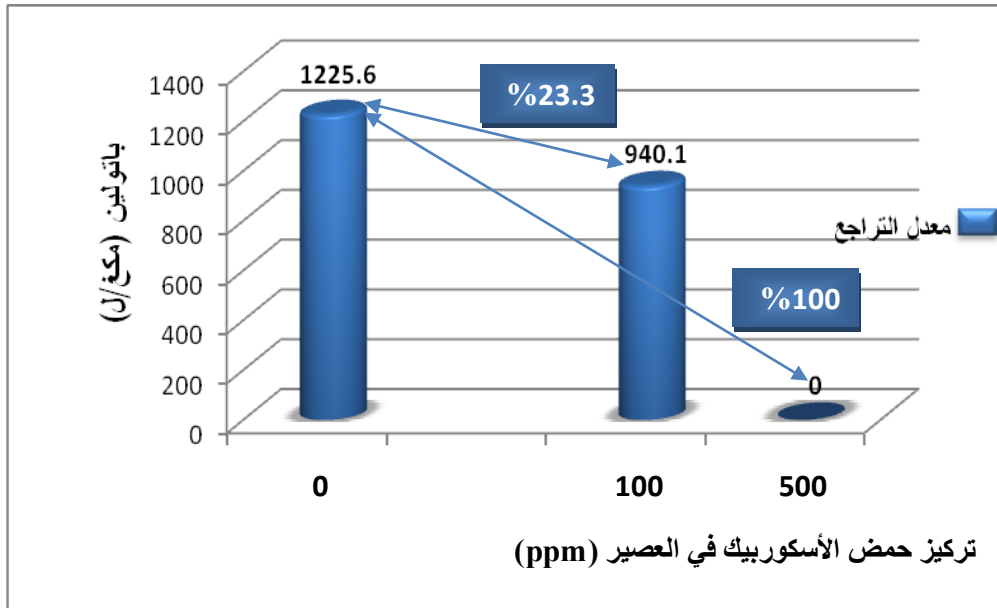
وفقاً للنتائج المتحصل عليها (الجدول. 7 والشكل. 11) كان تركيز 500 ppm من حمض الأسكوربيك فعالاً في خفض تركيز الباتولين معنوياً لما دون حد الكشف في عصير التفاح، في حين أن التركيز 100 ppm أدى إلى خفض تركيز الباتولين معنوياً إلى 940.1 مكغ/ل مقارنة مع الشاهد 1225.6 مكغ/ل، محدثاً تراجع بمقدار 23.3% بعد يومين من التخزين على درجة حرارة الغرفة.

اتفقت النتائج مع ما درسه (Iha & Sabino, 2008) اللذان وجدا أن تراجع الباتولين يمكن أن يكون مرتبطاً بمحتوى عصير التفاح من حمض الأسكوربيك، وهذا ما أكدته دراسة أجراها (Steiner *et al.*, 1999) أنه بزيادة تركيز حمض الأسكوربيك يحدث تراجع بنسبة أعلى من الباتولين، حيث تراجع 64% من الباتولين في عصير التفاح عند إضافة 500 ppm من حمض الأسكوربيك، كذلك وجد (Aytac & Acar, 1994) أنه حدث تراجع تام للباتولين في العصير عند إضافة 500 ppm من حمض الأسكوربيك بعد مرور يومين من التخزين، وأيضاً اتفقت النتائج مع (Brackett & Marth, 2002) والتي أثبتت دراستهم أن إضافة حمض الأسكوربيك يمكن أن تكون فعالة لإزالة التلوث الباتولي من عصير التفاح، كما اتفقت النتائج مع دراسة للباحثين (Drusch *et al.*, 2007) أوضحت بأن حمض الأسكوربيك أحدث تراجع في تركيز الباتولين بمعدل 30% عند إضافته بمقدار 100 ppm، وأشارت الدراسة أنه يمكن تدمير الباتولين كلياً باستخدام حمض الأسكوربيك، حيث أن إضافة 500 ppm من حمض الأسكوربيك أو أسكورات الصوديوم أو كلاهما معاً أدت إلى تراجع الباتولين في عصير التفاح الملوّث بفطر *Penicillium expansum* من 6000 ppm إلى 60 ppm بعد أربعة أشهر من التخزين على درجة حرارة الغرفة.

من جهة أخرى اختلفت النتائج مع دراسة أجراها (Lai *et al.*, 2000) والتي بينت عدم وجود اختلاف حقيقي في تركيز الباتولين بين العينات التي تحوي حمض الأسكوربيك وتلك الخالية منه.

إن آلية تأثير حمض الأسكوربيك على خفض وتفكيك الباتولين تعزى إلى أن أكسدة حمض الأسكوربيك إلى حمض الأسكوربيك منزوع الهيدروجين ينتج عنها جذور حرة قادرة على تحطيم الباتولين من خلال تفكيكها لحلقة اللاكتون (Drusch *et al.*, 2007)، وأوضحت الدراسة أنه بانتهاء أكسدة حمض الأسكوربيك يتوقف تحطم الباتولين غير القابل للعكس. إن معدل تراجع الباتولين يرتبط بالوقت والتركيز الأولي له في العصير وبتكريز حمض الأسكوربيك المضاف والظروف المحيطة من حيث وجود الأوكسجين كعامل أساسي لأكسدة حمض الأسكوربيك وإنتاج الجذور الحرة اللازمة لإحداث تراجع في تركيز الباتولين، وبناءً على هذا فإن وجود القليل من الأوكسجين في الفراغ الرأسي لعبوة المنتجات الغذائية مثل عصير التفاح وإضافة

حمض الأسكوربيك يمكن أن يحدث تراجع فعال في تركيز الباتولين.
(Brackett & Marth, 2002; Drusch *et al.*, 2007)



الشكل (11): تأثير المعاملة بـ حمض الأسكوربيك على خفض الباتولين

2-7-4- تأثير ثاني أكسيد الكبريت: Effect of sulfur dioxide

يبين (الجدول. 7 والشكل. 12) أن معاملة عصير التفاح بثاني أكسيد الكبريت بنسبة (50 و 100) ppm أدت إلى خفض المحتوى من الباتولين معنوياً بعد يومين من التخزين من 1225.6 مكغ/ل إلى 820.7 مكغ/ل و 530.8 مكغ/ل على التوالي، وبمعدل تراجع 33% و 56.7% على التوالي، وتؤكد النتائج بأن هناك علاقة طردية بين تركيز SO_2 المضاف للعصير ومقدار التراجع الحاصل في تركيز الباتولين.

اتفقت هذه النتائج مع ما أشار له (Aytac & Acar, 1994) إلى أن معاملة عصير التفاح بإضافة 100 ppm من SO_2 أدت إلى تقليل الباتولين وانخفاضه بمقدار 42%، وأشار (Tabatabaie *et al.*, 2010) أنه عند استخدام تركيز 350 ppm من SO_2 وهو الحد الأعظمي المسموح به في عصير التفاح تراجع الباتولين بمقدار 85.5%، وبالمقابل وجدت دراسة أجراها (Collin *et al.*, 2008) أن تركيز 50 ppm من SO_2 أحدث تراجع بمقدار 55% في تركيز الباتولين بعد مرور ساعة على الإضافة.

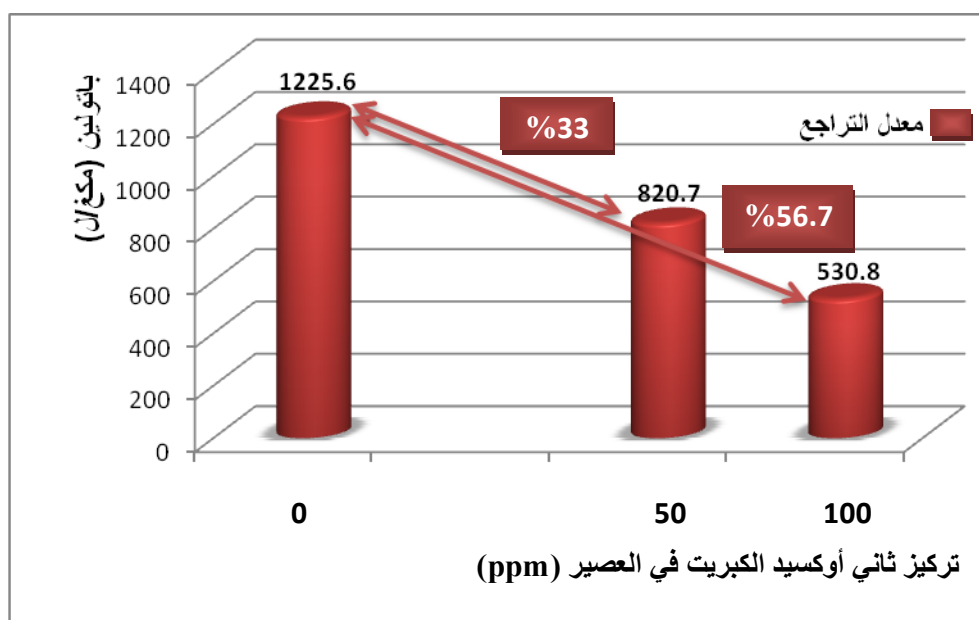
يمكن أن يعزى التراجع في المحتوى من الباتولين إلى حدوث تفاعل بين الباتولين وثاني أكسيد الكبريت، مما يؤدي إلى إحداث تراجع في سمية الباتولين (Scott & Somers, 1985)، ويؤثر في ذلك درجة حموضة الوسط، حيث أشار (Aytac & Acar, 1994) إلى أنه في الوسط الحامضي يحدث تفاعل عكوس يرتبط فيه السلفيت مع حلقة اللاكتون (الجزء السمي في تركيب الباتولين) ويؤدي إلى تشكيل مركب هيدروكسي سلفونات غير السام المرتبط بحلقة اللاكتون، وكذلك يقوم SO_2 بدور العامل المحفز على حدوث إماهة للباتولين بشكل غير عكوس وبفعالية أكبر بزيادة رقم pH، ويتم ذلك بفتح حلقة الهيمي أسيتال (الشكل 2) وتحولها إلى المركب الكيتوني (-3 Keto-5-hydroxy-petanal) يتبع ذلك إماهة حلقة اللاكتون، علماً بأن وجود هذا المركب هو الناتج الأساسي الذي يشير إلى تراجع الباتولين. يوافق هذا الدراسة التي قام بها (Steglich *et al.*, 2000) والتي تشير إلى عدم ثبات الباتولين بوجود SO_2 ، إلا أن الاختلاف بين الدراسات يكون بدرجة تراجع الباتولين بتأثير SO_2 وآلية التراجع وفقاً لحموضة الوسط.

إن انخفاض محتوى عصائر التفاح من الكبريت يزيد من ثباتية الباتولين فيها (Scott & Somers, 1985)، مما يجعل من المهم إيجاد معاملات معينة للتخلص منه كإضافة SO_2 بالحدود المسموح بها بالمواصفة القياسية (يجب ألا تتجاوز الإضافة 350 ppm). (FAO, 2003)

بالمقارنة بين تأثير SO_2 وحمض الأسكوربيك على خفض الباتولين عند مستوى إضافة 100 ppm الشكل (16)، نجد أن حمض الأسكوربيك أحدث تراجع معنوي بمقدار 23.3% مقابل 56.7% نتيجة إضافة SO_2 ، وقد يعود سبب انخفاض تأثير حمض الأسكوربيك مقارنة مع SO_2 إلى أن فعالية حمض الأسكوربيك تتطلب إضافة تركيز أعلى بالمقارنة مع تركيز SO_2 اللازم لإحداث معدل التراجع ذاته، وبمعنى آخر إن قدرة SO_2 على إعطاء الإلكترونات اللازمة لفتح حلقة اللاكتون وتفكيك الباتولين بوحدة الوزن المضافة أعلى مقارنة مع حمض الأسكوربيك.

مع الإشارة إلى أن استخدام SO_2 يمكن أن تكون له تأثيرات حساسية على بعض المستهلكين وتأثيرات على الصفات الحسية للعصير الناتج (الطعم) (Aytac & Acar, 1994)، ونتيجة لاقتران

إضافته مع المعاملة الحرارية بدرجات عالية والتي تحدث انخفاض بجودة عصير التفاح (لونه ونقاؤه ونكهته)، لذا لابد من توصيات لتحسين مواصفات وجودة العصير الناتج بهدف التسويق التجاري (Tabatabaie *et al.*, 2010).



الشكل (12): تأثير المعاملة بثاني أكسيد الكبريت على خفض الباتولين

3-7-4- تأثير السيستين: Effect of cysteine

يظهر الجدول (7) أن المعاملة بتركيز (50 و 100 ppm) من السيستين أدى إلى خفض تركيز الباتولين معنوياً من 1225.6 مكغ/ل إلى 975.3 مكغ/ل و 686.9 مكغ/ل على التوالي، وبمعدل تراجع 20.4% و 44% على التوالي، وتؤكد النتائج أن مقدار التراجع تضاعف بمضاعفة تركيز السيستين المضاف الشكل (13).

اتفقت نتائج الدراسة مع (Lai *et al.*, 2000) الذين وجدوا بأنه عند إضافة تركيز (25-50 ppm) من السيستين أحدث تراجع في تركيز الباتولين بمقدار (14-30)%، وكذلك اتفقت مع (Burroughs, 1997) الذي وجد أن إضافة 100 ppm من السيستين أدت لإزالة 50% من الباتولين من عصير التفاح، كما أن تركيز 200 ppm من السيستين أدت إلى تراجع 70% من الباتولين خلال 2 يوم.

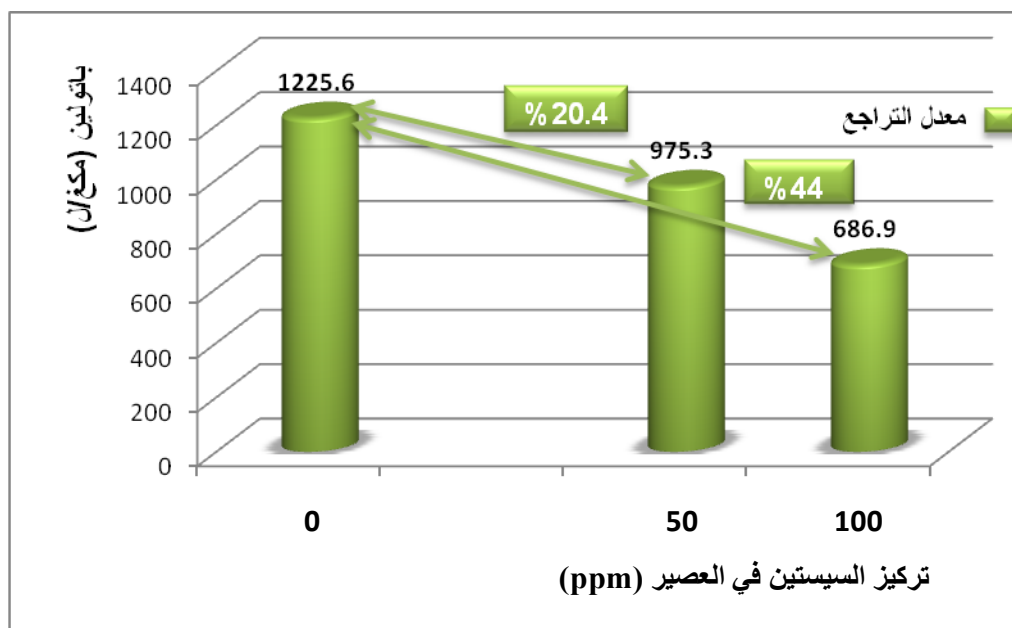
يعزى تأثير السيستين إلى أن الباتولين يتراجع بصورة أسرع بوجود المركبات الكبريتية مثل الأحماض الأمينية الكبريتية (السيستين والغلوتاثيون) والبروتينات المحتوية عليها، حيث

أثبت الباحثان (Scott & Somers, 1985) أن الخاصية المحبة للالكترونات التي يتميز بها الباتولين تدفعه للارتباط مع المجموعات الكبريتية (السلفاهيدريل -SH) مما يؤدي إلى خفض سمية الباتولين حتى في القيم المنخفضة من $pH=2.3$ أو 3). ويتم ذلك وفقاً لما أشار إليه الباحثين (Baert et al., 2007) بتفاعل السيستين مع الباتولين ليحوّله للشكل غير الفعّال من خلال تشكيل مركب معقد (باتولين - سيستين) عديم السمية (الشكل 3).

وبمقارنة تأثير السيستين مع SO_2 عند مستوى إضافة (50 و 100 ppm) الشكل (16)، نلاحظ أنه عند مستوى إضافة 50 ppm أحدث السيستين تراجع معنوي بمعدل 20.4% مقابل 33% بتأثير SO_2 ، وعند مستوى إضافة 100 ppm أحدث السيستين تراجع معنوي بمعدل 44% مقابل 56.7% بتأثير SO_2 ، وقد يعزى انخفاض فعّالية السيستين مقارنة مع SO_2 إلى احتواء SO_2 على نسبة أعلى من الكبريت الفعّال أو القادر على تحطيم الباتولين مقارنة مع السيستين.

وبمقارنة تأثير السيستين مع حمض الأسكوربيك عند مستوى إضافة 100 ppm الشكل (16)، نجد أن السيستين أحدث تراجع معنوي بمقدار 44% مقابل 23.3% بتأثير حمض الأسكوربيك، حيث نلاحظ ارتفاع فعّالية السيستين مقارنة بحمض الأسكوربيك عند مستوى إضافة 100 ppm، ويمكن تعليل ذلك إلى أن فعّالية السيستين بالارتباط مع الباتولين وخفض سميته بتشكيل مركب معقد (باتولين - سيستين) أقوى من فعّالية حمض الأسكوربيك بتحطيم الباتولين من خلال فتح حلقة اللاكتون بالجذور الحرة الناتجة عن أكسدة حمض الأسكوربيك، كما يمكن تفسير ذلك بأن فعّالية حمض الأسكوربيك تتطلب إضافة تركيز أعلى بالمقارنة مع تركيز السيستين اللازم لإحداث مقدار التراجع ذاته.

لذلك يمكن أن يعزى تفاوت الفعّالية بين المركبات المستخدمة لخفض تركيز الباتولين إلى تفاوت كمية الالكترونات المتحررة من إضافة تلك المركبات بوحدة الوزن المضافة إلى عصير التفاح.



الشكل (13): تأثير المعاملة بالسيستين على خفض الباتولين

4-7-4- تأثير الكويرسيتين: Effect of quercetin

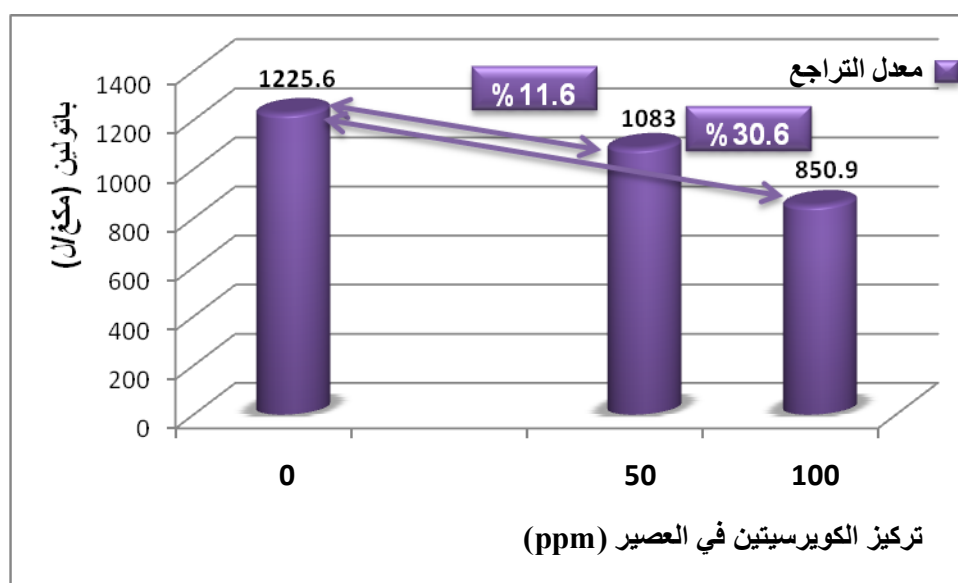
يبين الجدول (7) أن تركيز (50 و 100 ppm) من الكويرسيتين أدى إلى خفض تركيز الباتولين معنوياً من 1225.6 مكغ/ل إلى 1083 مكغ/ل و 850.9 مكغ/ل على التوالي، وبمعدل تراجع 11.6% و 30.6% على التوالي الشكل (14).
اتفقت النتائج مع (Steiner et al., 1999) الذين وجدوا أن إضافة تركيز 100 ppm من الكويرسيتين أدى إلى خفض تركيز الباتولين بمعدل 20%.

تعتمد آلية عمل الكويرسيتين في تحطيم الباتولين على الآلية نفسها لعمل المركبات الفينولية، حيث أن أكسدة المركبات الفينولية ينتج عنها جذور حرة تحطم الباتولين.

(Suárez et al., 2010)

يلاحظ أن تأثير الكويرسيتين كان أقل من تأثير السيستين و SO_2 عند مستوى إضافة (50 و 100 ppm) الشكل (16)، حيث كان معدل التراجع المعنوي عند مستوى إضافة 50 ppm 11.6% و 20.4% و 33% على التوالي، وعند مستوى إضافة 100 ppm بلغ 30.6% و 44% و 56.7% على التوالي، وقد يعزى ذلك إلى انخفاض فعالية الكويرسيتين مقارنة مع السيستين و SO_2 ، كما تزداد فعالية الكويرسيتين بزيادة تركيزه.

بمقارنة فعالية الكويرسيتين مع حمض الأسكوربيك عند مستوى إضافة (100 ppm) الشكل (16)، نلاحظ أن فعالية الكويرسيتين كانت أعلى (30.6% مقابل 23.3%)، وقد يعزى انخفاض فعالية حمض الأسكوربيك إلى أنها تتطلب إضافة تركيز أعلى بالمقارنة مع تركيز الكويرسيتين اللازم لإحداث مقدار التراجع ذاته. وربما يمكن تفسير تفاوت الفعالية بين المركبات المستخدمة بتفاوت كمية الإلكترونات المتحررة من إضافة تلك المركبات بوحدة الوزن المضافة إلى عصير التفاح.



الشكل (14): تأثير المعاملة بالكويرسيتين على خفض الباتولين

4-7-5- تأثير الترشيح بالكربون المنشط:

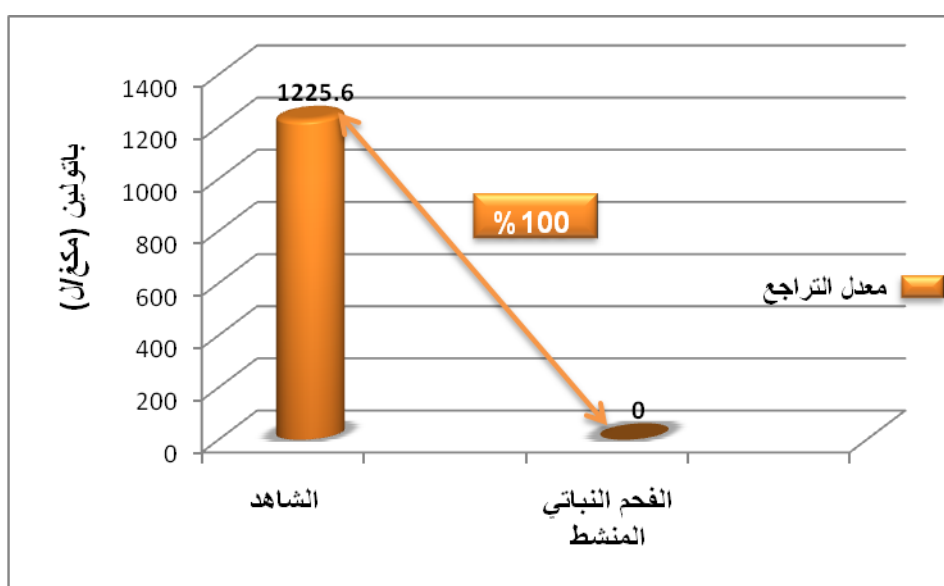
Effect of filtering by activated charcoal

أظهر الترشيح فعالية كبيرة في خفض الباتولين، حيث أحدث تراجع معنوي بمقدار 100% (الجدول 7 والشكل 15).

اتفقت النتائج مع العديد من الدراسات التي أكدت أن الترشيح هو من أكثر الطرق فعالية على خفض الباتولين، حيث أوضح (Sands et al., 1990) بأن استخدام 20 غ/ل كربون نباتي منشط أظهر تراجع بمحلول الباتولين لما دون حد الكشف. كذلك وجد (Kadikal & Nas, 2002) أن الترشيح باستخدام تركيز 3 غ/ل من الكربون المنشط أحدث تراجع في تركيز الباتولين لما دون حد الكشف.

تعتمد فعالية الترشيح بالكربون المنشط على ادمصاص الباتولين على الكربون وبالتالي خفض نسبته في العصير الناتج عن الترشيح (Kadakal & Nas, 2002).

كما أشار (Artik *et al.*, 2001) إلى أن للترشيح تأثيرات سلبية على المنتج النهائي، من حيث محتواه من حمض الفوماريك ولون و pH و بيريكس العصير، حيث يدمص جزء من مركباته على حبيبات الكربون، وهذا ما أكدته (Huebner *et al.*, 2000) بأن استخدام مركبات الكربون المنشط يشكل مجازفة لإزالته للمركبات الغذائية الهامة من العصير.

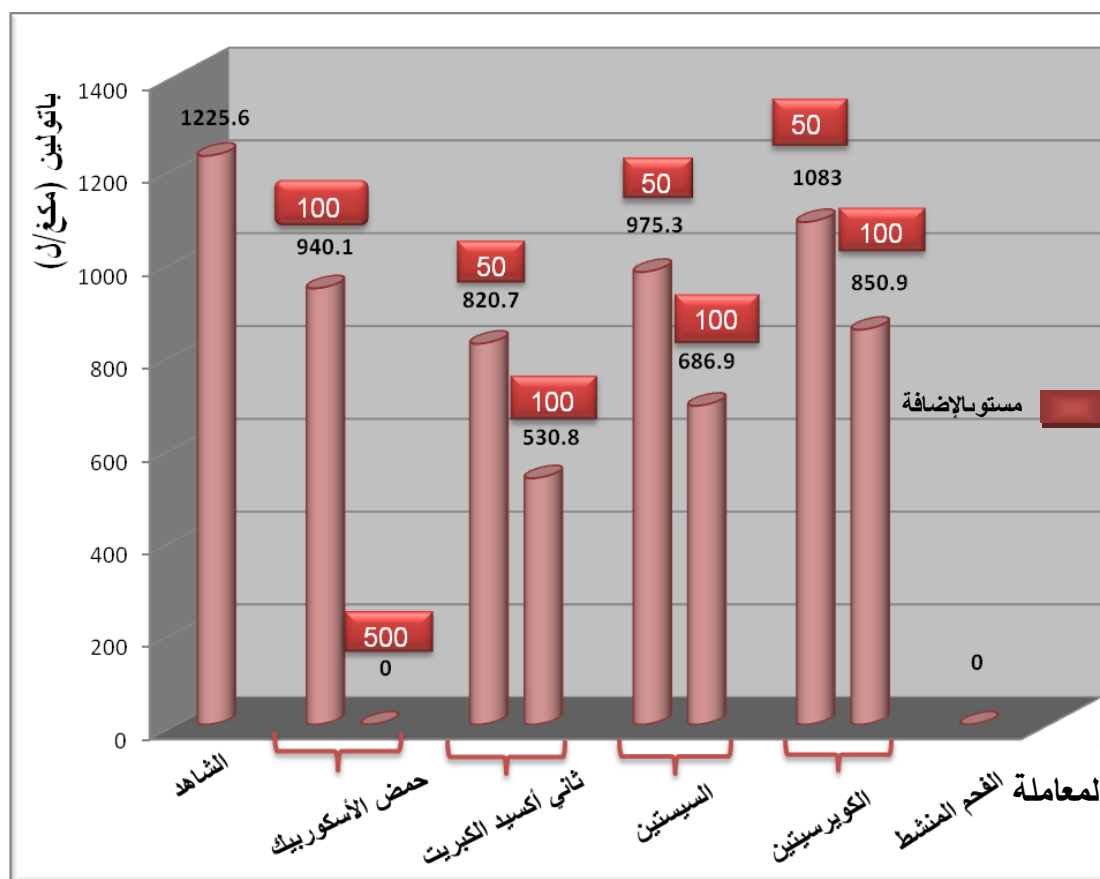


الشكل (15): تأثير المعاملة بالفحم النباتي المنشط على خفض الباتولين

تُظهر النتائج الموضحة بالشكل (16) بأنه عند المقارنة بين فعالية مختلف الطرق السابقة والمستخدمة لخفض الباتولين، نجد أن الترشيح بالكربون المنشط هو من أكثر الطرق فعالية لخفض الباتولين والذي خفض نسبته معنوياً لما دون حد الكشف، إلا أن تأثيره السلبي على المواصفات النوعية والحسية للعصير الناتج يحد من استخدامه، يليه من حيث معدل التراجع حمض الأسكوربيك والذي خفض تركيز الباتولين معنوياً أيضاً لما دون حد الكشف عند إضافته بنسبة 500 مكغ/ل، إلا أن استخدامه بنسبة 100 مكغ/ل يظهر فعالية أقل مقارنة مع SO_2 والسيستين والكويرسيتين، حيث أظهر SO_2 الفعالية الأكبر عند مستوى الإضافة (50 و 100) مكغ/ل ثم السيستين ثم الكويرسيتين مقارنة مع الشاهد، إلا أن الحساسية التي يمكن أن

تسببها المركبات الكبريتية تؤثر على استخدامها, لذلك نجد أن استخدام حمض الأسكوربيك (عند مستوى إضافة 500 مكغ/ل) والكويرسيتين (عند مستوى إضافة 100 مكغ/ل) هي المركبات الأفضل من حيث معدل التراجع ومن حيث المحافظة على القيمة الغذائية والصحية والمراسفات الحسية والنوعية للعصير الناتج.

بينت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية بين الإضافات المشار إليها بالمعاملات في الجدول (7) بين بعضها البعض من جهة وبينها وبين الشاهد من جهة أخرى, وكانت الفروق ظاهرة بين المعاملة بـحمض الأسكوربيك (500 ppm) والمعاملة بالكربون المنشط. علماً أن قيمة معامل الثقة (%CV) للتجربة كانت 0.1 .



الشكل (16): تأثير المعاملات المقترحة على خفض تركيز الباتولين في عصير التفاح المصنع

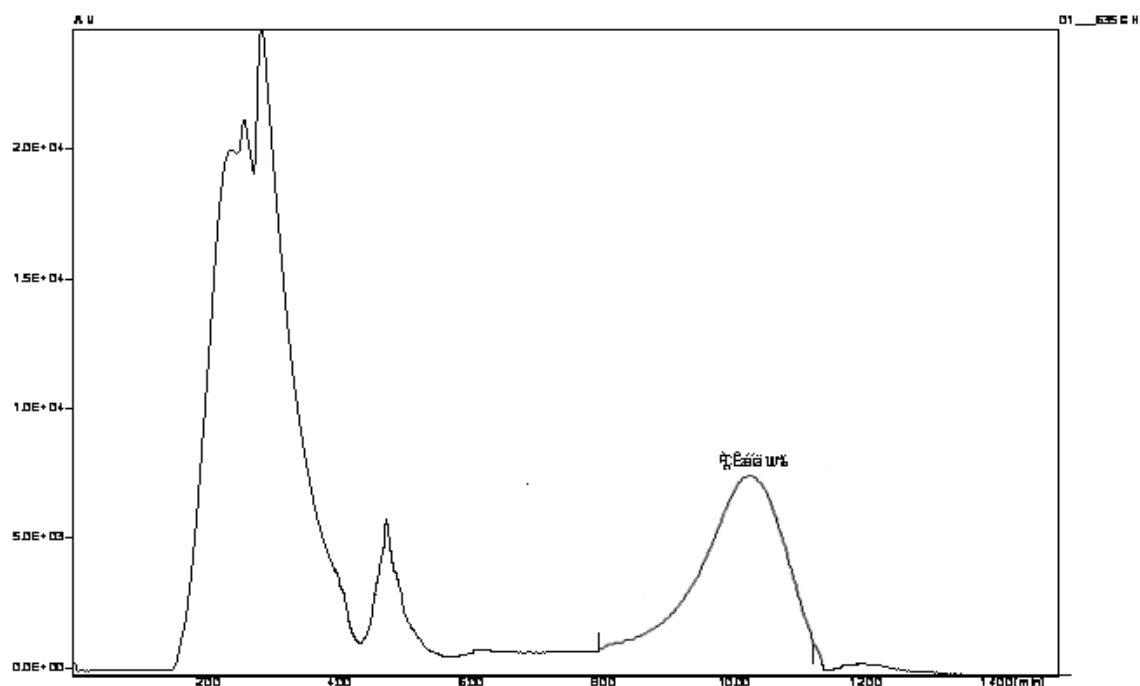
الاستنتاجات

Conclusions

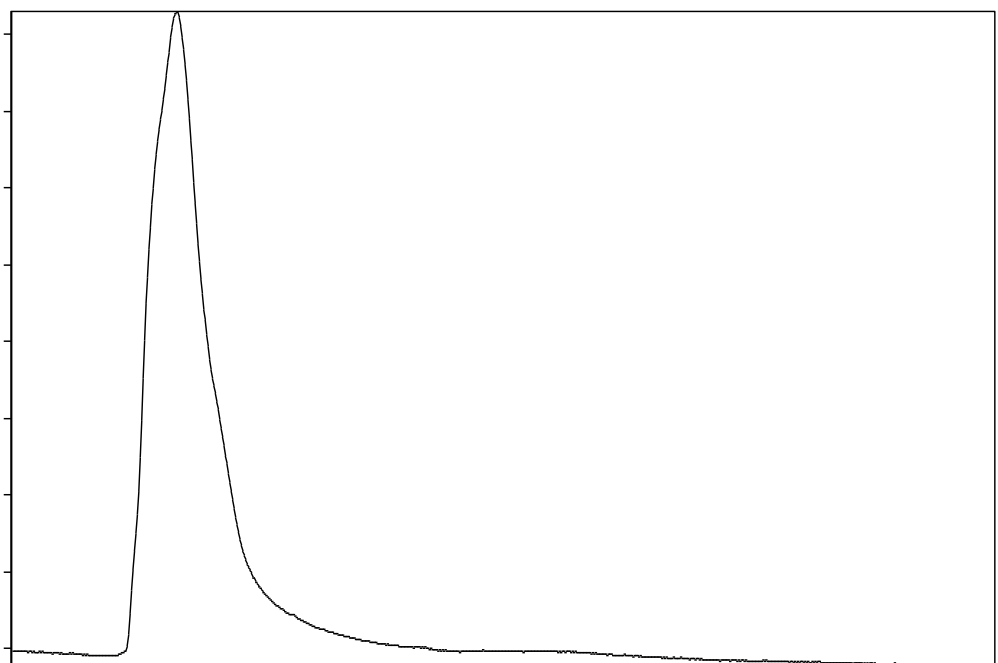
1. ارتفاع حد الكشف وحد الكشف الكمي للطريقة المستخدمة, وبالتالي ضرورة إجراء تعديلات على الطريقة لتخفيضه.
2. أثر صنف التفاح المدروس ودرجة إصابته على محتوى العصير الناتج من الباتولين.
3. ارتفاع محتوى الباتولين في عينات العصير حسب المصدر (محلي ومستورد), وقد يكون هذا عائداً إلى سوء عمليات التخزين وعدم تطبيق الممارسات التصنيعية الجيدة GMP, والذي انعكس بدوره على ارتفاع نسب التعرض للباتولين للشرائح العمرية المختلفة (البالغين والأطفال والرضع).
4. أظهرت الطريقة المستخدمة أنّ النسبة المئوية لعينات أغذية الأطفال المخالفة لحدود المواصفات القياسية كانت أقل منها لعينات العصير, ولكن لم تستطع تحديد العينات التي كان محتواها < 10 مكغ/ل وإنما فقط العينات التي كان محتواها < 50 مكغ/ل وذلك بسبب ارتفاع حد الكشف.
5. أظهرت عملية الغسيل والفرز فعالية عالية لخفض تركيز الباتولين خلال عملية تصنيع العصير, حيث ساهمت بإزالته بمعدل 41.1%.
6. أدى استخدام المرشحات الكربونية إلى تخفيض تركيز الباتولين في العصير النهائي لما دون حد الكشف, إلا أنه أثر في الصفات الحسية للعصير الناتج.
7. أثر حمض الأسكوربيك بتركيز (500 ppm) في خفض تركيز الباتولين لما دون حد الكشف, كما أن إضافة المركبات الفينولية مثل الكويرسيتين خفّض تركيز الباتولين, وتساهم هذه المركبات أيضاً في زيادة النشاط المضاد للأكسدة للعصير.
8. أثرت المركبات الكبريتية كثاني أوكسيد الكبريت والسيستين بتركيزي (50 و 100 ppm) في خفض محتوى العصير من الباتولين بشكل فعال أكثر من المواد ذات التأثير المضاد للأكسدة (حمض الأسكوربيك والكويرسيتين), ولكن لم يدرس تأثيرها على الصفات الحسية.

التوصيات Recommendation

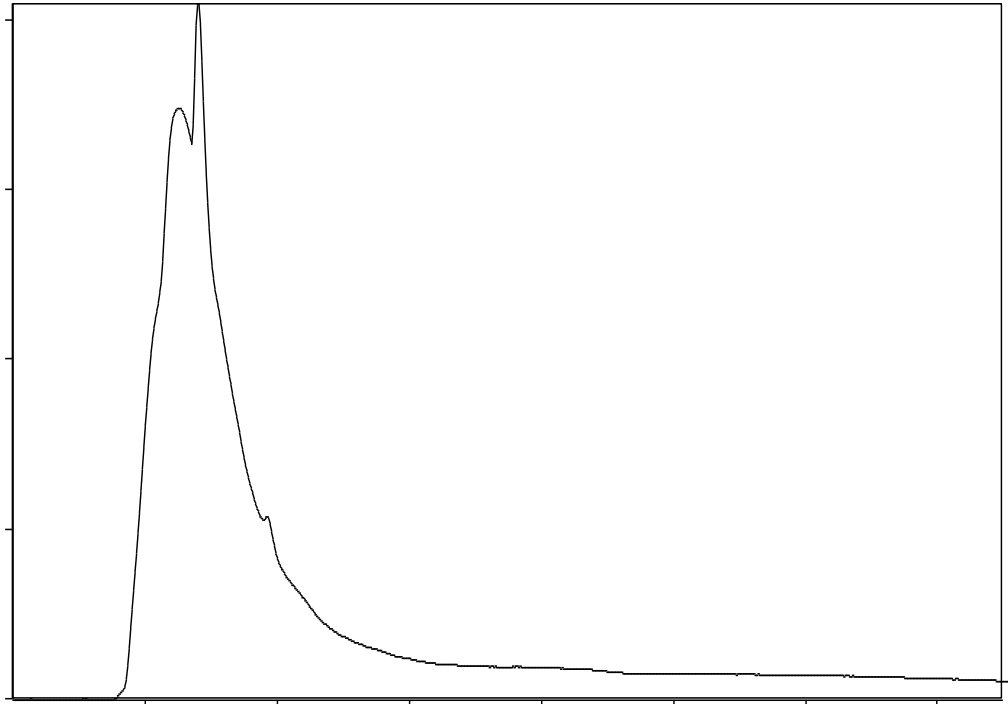
1. تعديل الطريقة المستخدمة للوصول إلى أقل حد كشف ممكن، وزيادة حساسية ودقة التحليل.
2. مراعاة شروط GMP عند تصنيع عصير التفاح، وذلك باستخدام ثمار تفاح ذات محتوى منخفض إلى حد ما من الباتولين، من خلال مراعاة شروط استلام وتخزين الثمار.
3. إضافة حمض الأسكوربيك والكويرسيتين إلى عصير التفاح، مما يزيد من قيمته الغذائية ويساهم في خفض تركيز الباتولين الموجود فيه.
4. دراسة التأثيرات الحسية للإضافات ولاسيما السيستين والكويرسيتين على عصير التفاح.



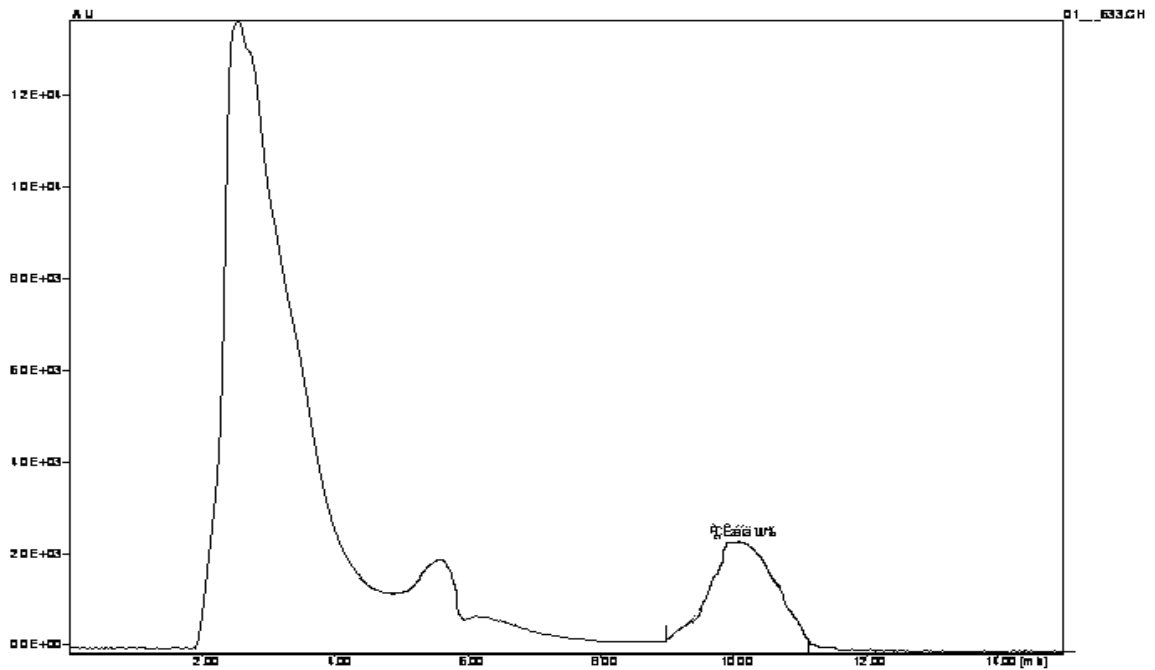
المخطط (2): المخطط الكروماتوغرافي لتركيز الباتولين في عينة الشاهد المحضرة لإجراء المعاملات



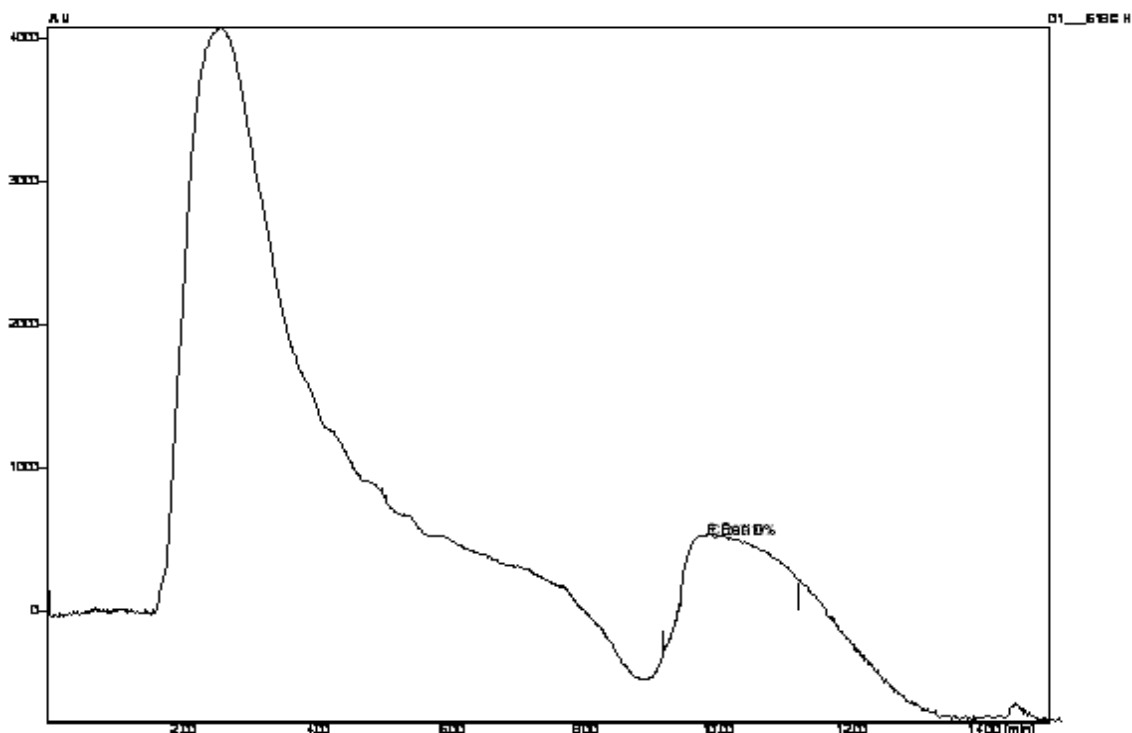
المخطط (3): المخطط الكروماتوغرافي لتركيز الباتولين في عينة عصير التفاح المرشحة باستخدام الفحم المنشط



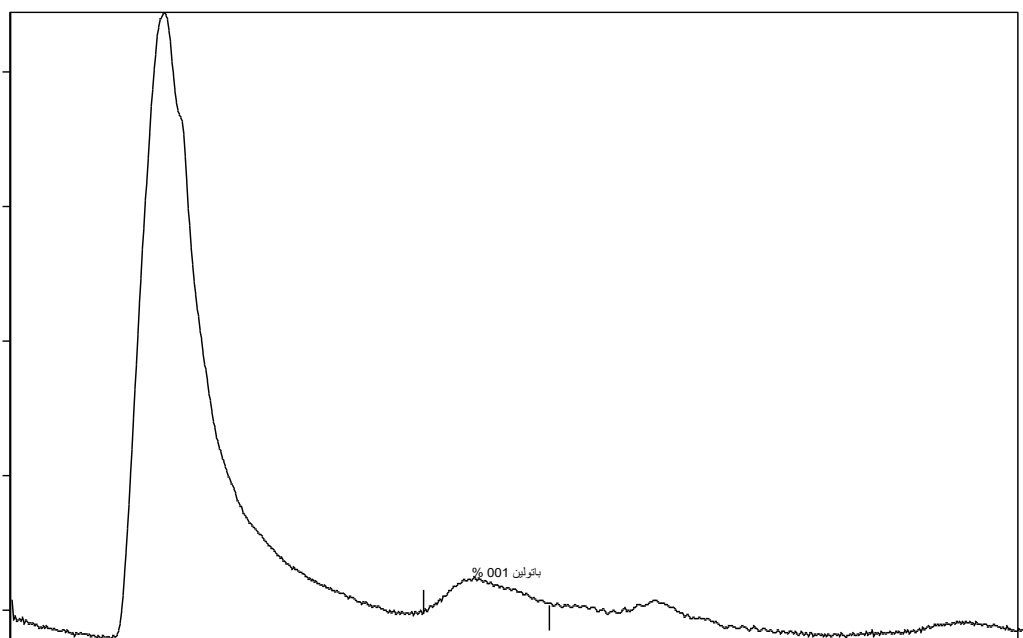
المخطط (4): المخطط الكروماتوغرافي لتركيز الباتولين في عينة عصير التفاح المعاملة بإضافة تركيز 500 ppm حمض الأسكوربيك



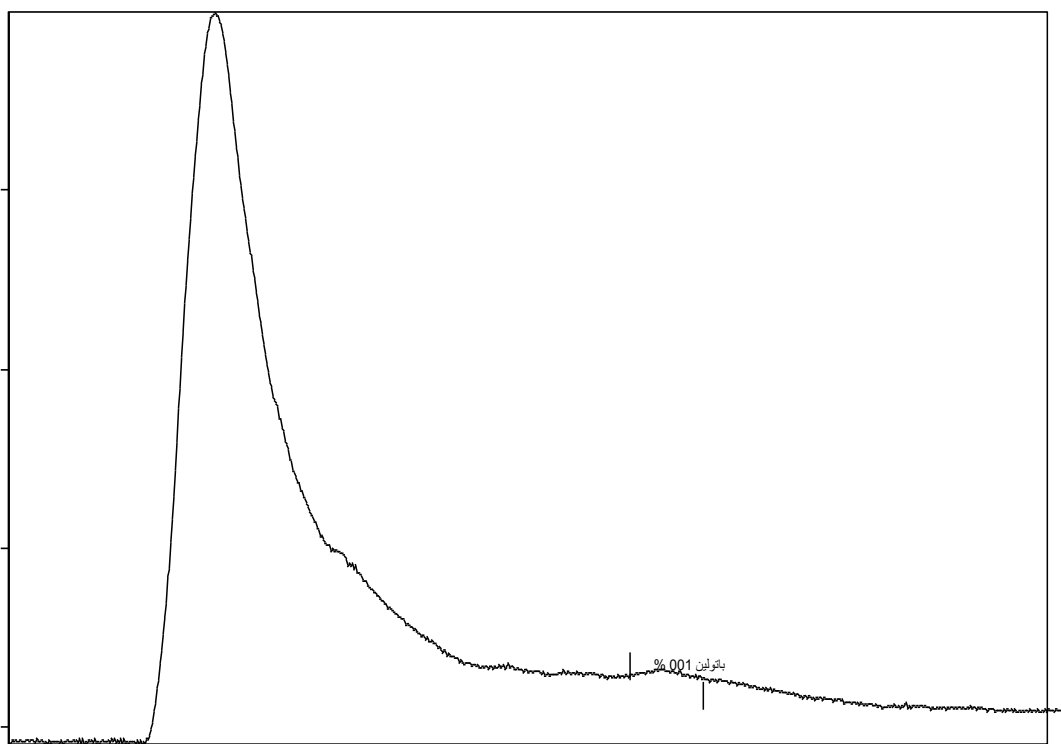
المخطط (5): المخطط الكروماتوغرافي لتركيز الباتولين في عينة عصير التفاح المعاملة بإضافة تركيز 50 ppm سيستين



المخطط (6): المخطط الكروماتوغرافي لتركيز الباتولين في عينة عصير التفاح المأخوذة من مرحلة العصر



المخطط (7): المخطط الكروماتوغرافي لتركيز الباتولين في عينة عصير التفاح المأخوذة من مرحلة المعاملة الأنزيمية



المخطط (8): المخطط الكروماتوغرافي لتركيز الباتولين في عينة عصير التفاح المأخوذة من جهاز البسترة

7- المراجع

7- References

المراجع العربية:

- حمزاوي, لطفي فهمي, 2006. سلامة الغذاء, الهاسب وتحليل المخاطر. دار الكتب العلمية للنشر والتوزيع.

- طيفور, أنطون, سفر, عادل, 1991. ميكروبيولوجيا الأغذية والألبان. كلية الزراعة, جامعة دمشق.

- مرعي, عبد الوهاب, 1997. مخطوطة كتاب فساد الأغذية. كلية الزراعة, جامعة دمشق.

المراجع الأجنبية:

- Acar, J.; Gokmen, V., & Taydas, E.E. 1998. The effects of processing technology on the patulin content of juice during commercial apple juice concentrate production. *J. Z Lebensm Unters Forsch A*. 207, 328–331.
- Aktas, H.A.; Yilmazer, M., & DEM iRCi, A. 2004. Determination of Patulin in Apple Juice Produced in Isparta Turkey by HPLC with Diode Array Detection. *J. Food and Drug Analysis*. 12, 228-231.
- Alves, N.; Oliveira, G.; Laires, A.; Rodrigues, A.S., & Rueff, J. 2000. Induction of micronuclei and chromosomal aberration by the mycotoxin patulin in mammalian cells: role of ascorbic acid as a modulator of patulin clastogenicity. 15, 229-234.
- AOAC International. 2005. AOAC International, AOAC Official Method 995.10 Patulin in apple juice. In: W. Horwitz, Editor, *Official Methods of Analysis of AOAC International* (18th ed.), AOAC International, Gaithersburg, MD, USA (2005).
- Artik, N.; Acar, J.; Kabraman, N., & Poyrazoglu, E. 2001. Effects of various clarification treatments on patulin, phenolic compound, and organic acid compositions of apple juice. *J. Eur Food Res Tech*. 213(3), 194–199.
- Aytac, S.A., & Acar, J. 1994. Einfluss von L-Ascorbinsäure und Schwefeldioxidzusatz auf die Stabilität von Patulin in Apfeläften und Pufferlösungen. *J. Ernährung*. 1, 15–17.
- Baert, K.; De Meulenaer, B.; Kamala, A.; Kasase, C., & Devlieghere, F. 2006. Occurrence of patulin in organic, conventional, and handcrafted apple juices marketed in Belgium. *J. Food Protection*. 69(6), 1371-1378.
- Baert, K.; De Meulenaer, B.; Verdonck, F.; Huybrechts, I.; De Henauw, S., & Vanrolleghem, P.A. 2007. Variability and uncertainty

- assessment of patulin exposure for preschool children in Flandres. *J. Food and Chemical Toxicology*. 45(9), 1745–1751.
- Barreira, M.J.; Alvito, P.C., & Almeida, C.M.M. 2010. Occurrence of patulin in apple-based foods in Portugal. *J. Food Chemistry*. 121, 653-658.
- Beretta, B.; Gaiaschi, A.; Galli, C.L., & Restani, P. 2000. Patulin evaluation in apple-based food: Occurrence and safety evaluation. *J. Food Additives and Contaminants*. 17, 399-406.
- Bischof, M. 1999. Mykotoxine in Getreide unter Berücksichtigung der Ernte 1998. Available from <http://www.vilomix.com/download/mykotox.pdf>.
- Bissessur, J.; Permaul, K., & Odhav, B. 2001. Reduction of patulin during apple juice clarification. *J. Food Prot.* 64(8), 1216–1219.
- Brackett, R.E., & Marth, E.H. 1989. Patulin in apple juice from roadside stands in Wisconsin. *J. Food Prot.* 42(11), 862–863.
- Brackett, R.E., & Marth, E.H. 2001. Stability of patulin at pH 6.0-8.0 and 25 °C. *J. Z Lebensm Unters Forsch.* 169, 92–94.
- Brackett, R.E., & Marth, E.H. 2002. Ascorbic acid and ascorbate cause disappearance of patulin from buffer solutions and apple juice. *J. Food Protection*. 42 (11), 864–866.
- Bullerman, L.B., & Olivigni, F.J. 1997. Mycotoxin producing potential of molds isolated from cheddar cheese. *J. Food Sci.* 39, 1166–1168.
- Burda, K. 1992. Incidence of patulin in apple, pear, and mixed fruit products marketed in New South Wales. *J. Food Protection*. 55, 796-798.
- Burroughs, L.F. 1997. Stability of patulin to sulfur dioxide and to yeast fermentation. *J. AOAC*. 60(1), 100-103.

- Calvo, M.A.; Wilson, A.R., & Keller, P.N. 2002. Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development. *J. Microbiology and Molecular Biology*. 6, 447–459.
- Cano-Sancho, G.; Marin, S.; Ramos, A.J., & Sanchis, V. 2009. Survey of patulin occurrence in apple juice and apple products in Catalonia, Spain, and an estimate of dietary intake. *J. Food Additives and Contaminants: Part B*. 2, 59–65
- Codex alimentarius commission. 1999. Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Codex Committee on Food Additives and Contaminants Thirty-first Session, The Hague, The Netherlands, 22-29 March 1999, Position Paper on Patulin Prepared by France, Agenda Item 14(c), CX/FAC 99/16.
- [CODEX] Committee on Food Additives and Contaminants. 2002. Proposed draft code of practice for the reduction of patulin contamination in apple juice and apple juice ingredients in other beverages (at step 5 of procedure). Geneva, Switzerland. Joint FAO/WHO Food Standards Programme. 1–7.
- Codex Alimentarius. 2003. Code of practice for the prevention and reduction of patulin contamination in apple juice and apple juice ingredients in other beverages. CAC/RCP 50. Codex Alimentarius, Rome, Italy. Available at:
www.codexalimentarius.net/download/standards/405/CXC_050e.pdf.
- Collin, S.; Bodart, E.; Badot, C.; Bouseta, A., & Nizet, S. 2008. Identification of the Main Degradation Products of Patulin Generated Through Heat Detoxication Treatments. *J. Inst Brew*. 114(2), 167–171.
- Corbett, D. 2003. Patulin—U.K. producers perspective In: Patulin technical symposium. February 18–19, 2003; Kissimmee, Fla. National Center for Food safety and Technology. Summit, Ill.
- Demirci, M.; Arici, M., & Gumus, T. 2003. Presence of patulin in fruit and fruit juices produced in Turkey. *J. Ernahrungs-Umschau*. 50(7), 262–263.

- Draughon, F.A., & Ayres, J.C. 1980. Insecticide inhibition of growth and patulin production in *Penicillium expansum*, *Penicillium urticae*, *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus terreus*, and *Byssochlamys nivea*. J. Agric Food Chem. 28, 1115–1117.
- Drusch, S., & Ragab, W. 2003. Mycotoxins in fruits, fruit juices, and dried fruits. J. Food Protection. 66, 1514-1527.
- Drusch, S.; Kopka, S., & Kaeding, J. 2007. Stability of patulin in a juice like aqueous model system in the presence of ascorbic acid. J. Food Chemistry. 100, 192–197.
- European Union (EU). 2003. Commission Regulation No. 1425/ 2003 amending Commission Regulation no. 466/ 2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Official. J. the European Communities. 203, 1-3.
- European Commission (EC). 2006. Commission Regulation No. 1881/ 2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Official. J. the European Communities of 20 December 2006. 364, 5–24.
- Farkas, J., & Schreiner, E. 1987. Presence and inactivation of patulin in food 1987. J. Elelmiszervizsgalati Kozlemenyek. 24, 35-40.
- FDA. 1994. Memorandum " Hazards of Patulin in Apple Juice". May5.
- Food and Agriculture Organisation (FAO). 2003. Manual on the application of the HACCP system in mycotoxin prevention and control. FAO, Rome, Italy. J. FAO Food and Nutrition. 73.
- Fremy, J.M.; Castegnaro, M.J.; Gleizes, E.; De Meo, M., & Laget, M. 1995. Procedures for destruction of patulin in laboratory wastes. J. Food Addit Contam. 12, 864–866.
- Fridovich, I. 1988. Superoxidase dismutases. J. Advances in Enzymology. 41, 35–97.

- Gokmen, V., & Acar, J. 1998. Incidence of patulin in apple juice concentrates produced in Turkey. *J. Chromatography*. 815, 99-102.
- Gokmen, V., & Acar, J. 1999. Simultaneous determination of 5-hydroxymethylfurfural and patulin in apple juice by reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr A*. 847, 69–74.
- Gokmen, V.; Artık, N.; Acar, J.; Kahraman, N., & Poyrazog˘ lu, E. 2001. Effects of various clarification treatments on patulin, phenolic compound and organic acid compositions of apple juice. *J. European Food Research and Technology*. 213, 194–199.
- Golan, B.R., & Paster, N. 2005. Mycotoxins in Fruits and Vegetables. 156, 164-181.
- Harrison, A.M. 1989. Presence and stability of patulin in apple products: a review. *J. Food Safety*. 9, 147-152.
- Hasan, H.A.H. 2000. Patulin and aflatoxin in brown rot lesion of apple fruits and their regulation. *World. J. Microbiol Biotechnol*. 16, 607–612.
- Hopkins, J. 1993. The toxicological hazards of patulin. *J. Br Ind Biol Res Assoc Bull*. 32, 3-4.
- Huebner, H.J.; Mayura, K.; Pallaroni, L.; Ake, C.L.; Lemke, S.L.; Herrero, P., & Phillips, T.D. 2000. Development and characterization of a carbon-based composite material for reducing patulin levels in apple juice. *J. Food Prot*. 63(1), 106–110.
- Iha, M.H., & Sabino, M. 2008. Incidence of patulin in Brazilian apple-based drinks. *J. Food Control*. 19, 417-422.
- Jackson, L.S.; Beacham-Bowden, T.; Keller, S.E.; Adhikari, C.; Taylor, K.T.; Chirtel, S.J., & Merker, R.I. 2003. Apple quality, storage, and washing treatments affect patulin levels in apple cider. *J. Food Prot*. 66(4), 618–624.

- Jelinek, F.F.; Pohland, A.E., & Wood, G.E. 1989. Review of mycotoxin contamination. worldwide occurrence of mycotoxins in foods and feed. an update. J. AOAC. 72, 223–230.
- Jorhem, L., & Sundstrom, B. 1993. Levels of lead, cadmium, zinc, copper, nickel, chromium, manganese and cobalt in foods on the Swedish market, 1983-1990. J. Food Composition and Analysis. 6, 223-241.
- Kadakal, C., & Nas, S. 2002. Effect of activated charcoal on patulin, fumaric acid, and some other properties of apple juice. J. Nahrung/Food. 46(1), 31–33.
- Kryger, R.A. 2001. Volatility of patulin in apple juice. J. Agric Food Chem. 49, 4141–4143.
- Lai, C.L.; Fuh, Y.M.; Yang, D., & Shih, C. 2000. Detection of Mycotoxin Patulin in Apple Juice. J. Food and Drug Analysis. 8(2), 85-96.
- Larsen, T.O.; Frisvad, J.C.; Ravn, G., & Skaaning, T. 1998. Mycotoxin production by *Penicillium expansum* on blackcurrant and cherry juice. J. Food Addit Contam. 15(6), 671–675.
- Leggott, N.L., & Shephard, G.S. 2001. Patulin in South African commercial apple products. J. Food Control. 12, 73–76.
- Leggott, N.L.; Shephard, G.S.; Stockenström, S.; Staal, E., & van Schalkwyk, D.J. 2001. The reduction of patulin in apple juice by three different types of activated carbon. J. Food Addit Contam. 18(9), 825–829.
- Lennox, J.E., & McElroy, L.J. 1984. Inhibition of growth and patulin synthesis in *Penicillium expansum* by potassium sorbate and sodium propionate in culture. J. Appl Environ Microbiol. 48(2), 1031–1033.

- Lewit, E.M., & Schuurmann-Baker, L. 1995. Children's health and the environment. *J. Critical issues for children and youths*. 5, 8–139.
- Llovera, M.; Viladrich, R.; Torres, M., & Canela, R. 1999. Analysis of underivatized patulin by a GC-MS technique. *J. Food Prot.* 62(2), 202–205.
- Lovett, J.; Thompson, R.G., & Boutin, B.K. 1985. Patulin production in apples stored in a controlled atmosphere. *J. AOAC*. 58(5), 912–914.
- Lovett, J., & Peeler, J.T. 1989. Effect of pH on the thermal destruction kinetics in aqueous solution. *J. Food Sci.* 38, 1094-1095.
- Lovett, J.; Thompson, R.G., & Boutin, B.K. 1992. Trimming as a means of removing patulin from fungus rotten apples. *J. AOAC*. 58, 909–911.
- MacDonald, S.; Long, M.; Gilbert, J.; Felgueiras, I.; Brera, C., & Jorgensen, K. 2000. Liquid Chromatographic method for determination of patulin in clear and cloudy apple juices and apple puree: Collaborative study. *J. AOAC International*. 83, 1387-1394.
- Maeba, H.; Takamoto, Y.; Kamimura, M., & Miura, T. 1988. Destruction and detoxification of aflatoxins with ozone. *J. Food Sci.* 53, 667–668.
- Marek, P.; Annamalai, T., & Venkitanarayanan, K. 2003. Detection of *Penicillium expansum* by polymerase chain reaction. *Int. J. Food Microbiol.* 89, 139–144.
- Marín, S.; Mateo, E.M.; Sanchis, V.; Valle-Algarra, F.M.; Ramos, A.J., & Jiménez, M. 2011. Patulin contamination in fruit derivatives, including baby food, from the Spanish market. *J. Food Chemistry*. 124, 563–568.
- Martell, A.E., & Kahn, M.M.T. 1987. Metal ion catalysis of reactions of molecular oxygen. In G. L. Eichorn (Ed.). *J. Inorganic biochemistry*. New York: Elsevier Scientific Publishing Co.

- McCallum, J.L.; Tsao, R., & Zhou, T. 2002. Factors affecting patulin production by *Penicillium expansum*. J. Food Prot. 65(12), 1937–1942.
- McElroy, L.J., & Weiss, C.M. 1993. The production of polyclonal antibodies against the mycotoxin derivative patulin hemiglutarate. Can. J. Microbiol. 39, 861–873.
- McKenzie, K.S.; Sarr, A.B.; Mayura, K.; Bailey, R.H.; Miller, D.R.; Rogers, T.D.; Norred, W.P.; Voss, K.A.; Plattner, R.D.; Kubena, L.F., & Phillips, T.D. 1997. Oxidative degradation and detoxification of mycotoxins using a novel source of ozone. J. Food Chem Toxicol. 35, 807–820.
- Ministry of Agriculture Fisheries and Food (MAFF). 1998. News releases: 1998. MAFF and Industry Work Together on Food Safety.
- Moller, T.E., & Josefsson, E. 1985. Rapid high-pressure liquid Chromatography of patulin in apple cider. J. AOAC. 68, 1055–1059.
- Moodley, R.S.; Govinden, R., & Odhav, B. 2002. The effect of modified atmospheres and packaging on patulin production in apples. J. Food Prot. 65(5), 867–871.
- Morales, H.; Marín, S.; Centelles, X.; Ramos, A.J., & Sanchis, V. 2007. Cold and ambient deck storage prior to processing as a critical control point for patulin accumulation. International. J. Food Microbiology. 116, 260–265.
- Morgavi, D.P.; Boudra, H.; Jouany, J.P., & Graviou, D. 2003. Prevention of patulin toxicity on rumen microbial fermentation by sh-containing reducing agents. J. Agric Food Chem. 51, 6906–6910.
- Moss, M.O., & Long, M.T. 2002. Fate of patulin in the presence of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. J. Food Addit Contam. 19(4), 387–399.
- Murillo-Arbizu, M.; Amezqueta, S.; Gonzalez-Penas, E., & de Cerain, A. L. 2009. Occurrence of patulin and its dietary intake through apple juice consumption by the Spanish population. J. Food Chemistry. 113, 420–423.

- Mutlu, M.; Hizarcioglu, N., & Gokmen, V. 1997. Patulin adsorption kinetics on activated carbon, activation energy, and heat of adsorption. *J. Food Sci.* 62, 128–130.
- Ough, C.S., & Corison, C.A. 1990. Measurement of patulin in grapes and wines. *J. Food Sci.* 45, 476–478.
- Park, D.L.; Njapau, H., & Bontrif, E. 1999. Minimizing risks posed by mycotoxins utilizing the HACCP concept: food, nutrition, and agriculture. 23, 49.
- Pittet, A. 1998. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds—an updated review. In: Bars, J.L., & Galtier, P, editors. *Mycotox 98. Mycotoxin in Food Chain. Processing and Toxicological Aspects.* Toulouse, France: Revue de Medecine Veterinaire. 479–492.
- Prado, G.; Oliveira, M.S.; Cunha, M.R.; Gomides, M.F.; Abrantes, F.M., & Santos, L.G. 2000. Occurrence of patulin in apple juice marketed in Barzil by high-performance liquid chromatography. *Revista do Instituto Adolfo Lutz.* 59, 21-25.
- Prieta, J.; Moreno, M.A.; Diaz, S.; Suarez, G., & Dominguez, L. 1994. Survey of patulin in apple juice and children's apple food by diphasic dialysis membrane procedure. *J. Agric Food Chem.* 42, 1701–1703.
- Riteni, A. 2003. Patulin in Italian commercial apple products. *J. Agricultural and Food Chemistry.* 51(20), 6086-6090.
- Roach, J.A.G.; White, K.D.; Trucksess, M.W., & Thomas, F.S. 2000. Capillary gas chromatography/mass spectrometry with chemical ionization and negative ion detection for confirmation of identity of patulin in apple juice. *J. AOAC Int.* 83(1), 104–112.
- Roach, J.A.G.; Brause, A.R.; Eisele, T.A., & Rupp, H.S. 2002. HPLC determination of patulin in apple juice with GC/MS confirmation of patulin identity. In: Trucksess and others, editors. *Mycotoxins and food safety.* New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 135–140.
- Roland, J.O., & Beuchat, L.R. 1994a. Influence of temperature and water activity on growth and patulin production by *Byssoschlamys nivea* in apple juice. *J. Appl Environ Microbiol.* 47(1), 205–207.

- Roland, J.O., & Beuchat, L.R. 1994b. Biomass and patulin production by *Byssoschlamys nivea* in apple juice as affected by sorbate, benzoate, SO₂, and temperature. J. Food Sci. 49, 402–406.
- Rosenberger, D.A. 2003. Control of *Penicillium expansum* during apple harvest and storage. In: Patulin technical symposium. Feb 18–19, 2003; Kissimmee, Fla. National Center for Food safety and Technology; Summit, Ill.
- Rychlik, M., & Schieberle, P. 1999. Quantification of the mycotoxin patulin by a stable isotope dilution assay. J. Agric Food Chem. 47, 3749–3755.
- Sands, D.C.; McIntyre, J.L., & Walton, G.S. 1990. Use of activated charcoal for the removal of patulin from cider. J. Appl Envir Microbiol. 32, 388–391.
- Sanzani, M.S.; De Girolamo, A.; Schena, L.; Solfrizzo, M., & Ippolito, A. 2008. Control of *Penicillium expansum* and Patulin accumulation on apples by quercetin and umbelliferone. J. Eur Res Technol. 217, 12–16.
- Scott, P.M., & Somers, E. 1985. Stability of patulin and penicillic acid in fruit juices and flour. J. Agric Food Chem. 16, 483–485.
- Sewram, V.; Nair, J.J.; Nieuwoudt, T.W.; Leggott, N.L., & Shephard, G.S. 2000. Determination of patulin in apple juice by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. J. Chromatogr A. 897, 365–374.
- Sheu, F., & Shyu, Y.T. 1999. Analysis of patulin in apple juice by diphasic dialysis extraction with in situ acylation and mass spectrometric determination. J. Agric Food Chem. 47, 2711–2714.
- Sommer, N.F.; Buchanan, J.R., & Fortlage, R.J. 1984. Production of patulin by *Penicillium expansum*. J. Appl Microbiol. 28, 589–593.
- Spadaro, D.; Ciavarella, A.; Frati, S.; Garibaldi, A., & Gullino, M.L. 2007. Incidence and level of patulin contamination in pure and mixed apple juices marketed in Italy. J. Food Control. 18, 1098–1102.
- Steglich, W.; Fugmann, B., & Lang-Fugmann, S. 2000. Research article “Patulin”©Indian Society for Education and Environment (iSee)

- Patulin. ROMPP Encyclopedia of Natural Products. George Thieme Verlag, Stuttgart, Germany. 467.
- Steiner, I.; Werner, D., & Washüttl, J. 1999. Patulin in fruit juices. Part 1. analysis and control in Austrian apple and pear juices. *J. Ernährung Nutr.* 23, 202–208.
- Stray, H. 1988. High pressure liquid chromatographic determination of patulin in apple juice. *J. AOAC.* 61, 1359–1362.
- Suárez, B.; Álvarez, L.A.; García, D.Y.; Barrio, D.G.; Lobo, P.A., & Parra, F. 2010. Phenolic profiles, antioxidant activity and in vitro antiviral properties of apple pomace. *J. Food Chem.* 120, 339–342.
- Sumbu, Z.L.; Thonart, P., & Bechet, J. 1983. Action of patulin on a yeast. *J. Appl Environ Microbiol.* 45(1), 110–115.
- Sydenham, E.W.; Vismer, H.F.; Marasas, W.F.O.; Brown, N.; Schlecter, M.; van Der Weshui-zen, L., & Rheeder, J.P. 1995. Reduction of patulin in apple juice samples—influence of initial processing. *J. Food Control.* 6, 195–200.
- Syrett, R. 1989. Moulds and mycotoxins in animal foodstuffs—Reports of ADAS microbiologists. In: *Proceedings of a Third Meeting on Mycotoxins in Animal Disease*. Pinner, U.K.: Ministry of Agriculture, Fisheries, and Food. Agricultural Development and Advisory Service; 1978 April 17-18; Weybridge, U.K. 4–7.
- Tabatabaie, F.; Mortazavi, A.S.; Tabatabaee, F., & Ebadi, G.A. 2010. Reduction of patulin in apple juice after treatment with SO₂ and heat. *Indian. J. Science and Technology.* 3(5), 0974- 6846.
- Takino, M.; Daishima, S., & Nakahara, T. 2003. Liquid chromatography/ mass spectrometric determination of patulin in apple juice using atmospheric pressure photoion-ization. *Rapid Comm Mass Spec.* 17, 1695–1972.
- [USFDA] U.S. Food and Drug Administration. 2004. Compliance policy guide. Compliance policy guidance for FDA staff. Sec. 510.150. Apple juice, apple juice concentrates, and apple juice products— Adulteration with patulin. Available from: http://www.fda.gov/ora/compliance_ref/cpg/cpgfod/cpg510-150.htm. Accessed March 2, 2004.

- Valletrisco, M.S.; Casadio, S., & Stefanelli, C. 1990. Use of ultraviolet radiation to break down mycotoxins. *J. Industrie Alimentari*. 29(288), 1111–1112.
- Van Egmond, H.P. 1989. Current situation on regulations for mycotoxins. Overview of tolerances and status of standard methods of sampling and analysis. *J. Food Addit Contam.* 6, 138–188.
- Ware, G.M.; Thorpe, C.W., & Pohland, A.E. 1994. Liquid chromatographic method for determination of patulin in apple juice. *J. AOAC*. 57, 111–113.
- Welke, J.E.; Hoeltz, M.; Dottori, H.A., & Noll, I.B. 2009. Effect of Processing stages of apple juice concentrate on patulin levels. *J. Food Control*. 20, 48-52.
- Wheeler, J.L.; Harrison, M.A., & Koehler, P.E. 1997. Presence of patulin in pasteurized apple cider. *J. Food Sci.* 52, 479–480.
- [WHO] World Health Organization. 1990. Evaluation of certain food additives and contaminants. WHO thirty-fifth report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives. Geneva: Technical Report Services. 789, 29–30.
- [WHO] IARC. 1990. Patulin. WHO Food Additives Series. 26, 143-165.
- [WHO] World Health Organization. 1995. Evaluation of certain food additives and contaminants. WHO. Forty-fourth report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives. Geneva: Technical Report Series. 859, 8–36.
- Wichmann, G.; Herbarth, O., & Lehmann, I. 2002. The mycotoxins citrinin, gliotoxin, and patulin affect interferon- rather than interleukin- 4 production in human blood cells. *J. Environ Toxicol.* 17(3), 8–21.
- Wouters, M.F.A., & Speijers, G.J.A. 1995. Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants. Patulin. *J. Food Additives Series* 35. Geneva: World Health Organization. 337–402.
Available at:

<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v35je16.htm>

Yuan, Y.; Zhuang, H.; Zhang, T., & Liu, J. 2010. Patulin content in apple products marketed in Northeast China. *J. Food Control*. 21, 1488-1491.

Zegota, H.; Zegota, A., & Bachmann, S. 1988. Effect of irradiation and storage on patulin disappearance and some chemical constituents of apple juice. *J. Z Lebensm Unters Forsch*. 187, 321–324.