كشف التلوث بالسم الفطري المسرطن الباتيولين Patulin في عصير التفاح

د. حسين غانم النصراوي* د. كامل كاظم فهد** د. حميد خلف حسين*
* المعهد التقني /العمارة ** كلية الزراعة– جامعة ذي قار

الخلاصة

الباتيولين Patulin سم فطري مسرطن يفرز بواسطة العديد من السلالات الفطرية كناتج ايض ثانوي عند إصابة ثمار الفواكه وخاصة التفاح بالفطريات المنتجة للباتيولين ويتركز السم في البقع المتعفنة من التفاح وينتقل الى العصير عند صناعته من التفاح المتعفن ويكون تأثيره خطيراً عند استهلاك العصير الحاوي على تركيز من الباتيولين من قبل الأطفال دون سن الثانية من العمر عند قياس التركيز نسبة الى وزن الجسم. تم في هذه الدراسة اختبار عينات من عصير التفاح وظهر أن عدداً من العينات تحتوي على تركيز من الباتيولين تراوح بين 50 مايكروغرام/لتر كحد أعلى و 10 مايكروغرام/لتر كحد أدنى.

المقدمة:

الباتيولين (ولـه اسماء مرادفة Clavacin, Mycoin, Expansin, Penicidin, Terinin) سم فطري يفرز من قبل العديد من الفطريات الملوثة للفواكه ومنتجاتها والخضر والمواد الغذائية كالتفاح والطماطة وخبز الحنطة [20] لذلك اهتم الباحثون بهذا السم خاصة في موضوع الصناعات الغذائية التي تستخدم فيها الفواكه المتعفنة نتيجة اصابتها بالفطريات المنتجة للباتيولين لما له من تاثير على الصحة العامة، وهناك العديد من الدراسات التي تناولت درجات تركيز التلوث بالباتيولين في الفواكه والخضر اذ توصلت الى حقيقة مفادها ان العديد من عينات عصائر الفواكه عثر فيها على تراكيز من الباتيولين تفوق الحدود المسموح بها عالميا في الفواكه والتي حددت بـ0.43 مايكروغرام/كغم [18] .

تتعرض ثمار التفاح في الحقل بفعل العوامل الفيزياوية والميكانيكية وكذلك اثناء الجني ومابعده الى الخدوش والجروح مما يسهل دخول العديد من الفطريات الى داخل الثمرة فتصيبها بالتعفن البني بالاضافة الى قابلية بعض السلالات من هذه الفطريات على انتاج الباتيولين عند توفر الظروف البيئية الملائمة. لقد تأكد ان السلالات الفطرية المعزولة من التفاح وبعض الفواكه والخضر قد انتجت الباتيولين وكانت الانواع الشائعة المنتجة للسم تنتمي الى *Penicillium expansum* (وهو من اكثرها غزارة وشيوعا في انتاج الباتيولين) ، *P.patulum* و *P.byssoclamys* و *Aspergillus clavatus* [21] .

تشير المسوحات العديدة التي اجريت في دول مختلفة في العالم على بعض المواد الغذائية والفواكه والخضر ان التفاح وعصائره هو من اهم المنتجات الغذائية احتواء على السم [3،10،12] .

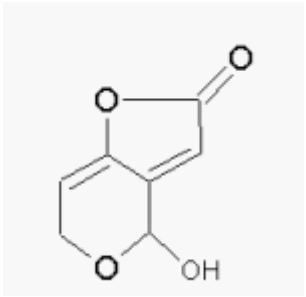
ونظرا للاستيراد العالمي المستمر للفواكه والخضر من مناشيء عالمية تتطلب فترة زمنية لوصولها الى المستهلك ولعدم وجود مخازن مبردة للفواكه وفق القياسات العالمية خاصة في الدول النامية فانه من المتوقع ان تكون الفواكه معرضة لخطر الاصابة بالفطريات المنتجة لسم الباتيولين [16،17] .

اهتمت الدول المتقدمة في السنوات الاخيرة بموضوع وجود الباتيولين في الفواكه وخاصة في العصائر المصنعة من الفاكهة التالفة ، ولما تشكل هذه العصائر الحاوية على الباتيولين من خطورة من خلال احتمالية السم كعامل مسرطن يعرض صحة الاطفال للخطر (خاصة الاطفال دون الخامسة من العمر) بسبب الاستهلاك الكبير للعصائر من قبل الاطفال مما حدى بتلك الدول ايلاء الموضوع اهمية خاصة والتزمت بالمعايير العالمية وفق القياسات النوعية المتبعة عالميا، وفي هذا المجال استخدمت تقنيات حديثة لازالة البقع التالفة من الفواكه المعدة للصناعات الغذائية حيث تعامل البقع المتعفنة بواسطة البخار والماء المغلى اوليا لازالتها تليها معاملات اخرى تؤمن بقاء الانسجة السليمة فقط وابعاد التالف منها ، ومع ذلك فان العديد من الدراسات حذرت واكدت ان الاجزاء السليمة من التفاح قد عثر فيها على تراكيز من الباتيولين بعد ازالة الاجزاء التالفة التي كانت قريبة منها مما يدلل على تسرب الباتيولين من البقع المتعفنة الى انسجة التفاح السليمة [24] .

أصدرت منظمتا الفاو FAO والصحة العالمية WHO عام 1996 دراسة مشتركة عن مخاطر الباتيولين وأعراضه السمية وتأثيراته على الحيوانات المختبرية ، وتناولت دراسات أخرى التأثير المسرطن للباتيولين في الفئران عند إعطاءها جرع مكررة ولفترة طويلة [11] . وحددت منظمة الغذاء والدواء FDA (منظمة عالمية معتمدة في الاشراف والسيطرة على نوعية الغذاء والدواء) عام 2001 الكمية المسموح بها من الباتيولين في عصير التفاح المتناول يوميا بمقدار 0.43 مايكروغرام/كغم من وزن الجسم .

يمتاز الباتيولين بالعديد من الصفات الفيزياوية والكيمياوية المهمة منها أن خطورة هذا السم تأتي من كونه لا يتلف بالحرارة حيث ان درجة انصهاره 111 مْ ويمكن أن يوجد في الأغذية المجمدة [2،23] .

ان شيوع وجود الباتيولين بتراكيز عالية في الفواكه وخاصةً التفاح هو بسبب إن المواد الغذائية الأخرى تحتوي على نسب عالية من المواد التي اعتبرت مثبطة للباتيولين والتي لايحتويها التفاح مثل وجود الاحماض الامينية السستين والكلايسين والميثونين والاسبارجين [4] .



شكل (1)التركيب الكيمياوي للباتيولين

تعتبر عملية التخمر الكحولي للتفاح من اهم العمليات المثبطة لانتاج الباتيولين لذلك تعتبر هذه العملية مهمة جدا في الصناعات الغذائية وخاصة في صناعة العصائر من الفواكه حيث أن تعريض منتجات الفواكة للتخمر يخلصها من تراكيز عالية من الباتيولين عن طريق تحلله بالتخمر . أن استعمال درجة حرارة 15 ْم في المصانع الغذائية المصنعة لعصائر الفواكه يفيد في تقليل كمية الباتيولين الى نسبة 20% تحت ظروف الوسط الحامضي مع ذلك تأكد ان استخدام عامل الحرارة العالية لوحدها من دون توفر الظروف البيئية الاخرى غير كفيلة بتقليل نسبة السم في العصائر .

أجرت احدى الدراسات اختبارا (In vitro) على سلالة بكتيرية تنتمي للنوع *Gluconobacter oxydans* تم عزلها من التفاح المصاب بالفطريات المنتجة بالباتيولين لمعرفة امكانية استخدام هذه البكتريا في المعاملة الحيوية لتثبيط واختزال الباتيولين من التفاح المصاب بالفطريات المنتجة للباتيولين ، فتبين ان هناك تحولا حصل بفعل عملية التحلل الاحيائي Biodegradation التي قامت بها البكتريا ضد مركب الباتيولين السام لتحوله خلال فترة زمنية الى مركب كيمياوي غير سام يدعى الاسكلادول Ascladiol وقد اكدت الدراسة تحلل 96% من الباتيولين الى هذه المادة غير السامة [19] .

من جهة اخرى أثبتت الدراسات في مجال السموم الفطرية تميز السم الفطري الباتيولين patulin بمدى واسع من الفعالية البايولوجية ضد العديد من النباتات والبروتوزوا والحيوانات اذ صنف على انه مضاد حياتي جيد ضد عدد من انواع البكتريا ثبت تاثيره السمي على الانسان عند تناوله منتجات غذائية حاوية على السم من خلال حدوث حالات من اعراض التسمم تمثلت بتقيؤ وغثيان واضطرابات معوية لمرضى ثبت تناولهم لاغذية حاوية على تراكيز من الباتيولين اضافة الى تأكيد العديد من الدراسات على تاثيره المسرطن على الحيوانات المختبرية واعتباره عامل مسرطن carcinogenic ولم يدرس تأثيره المسرطن في جسم الانسان (In vivo) [1،5،6،22] . استهدفت الدراسة الحالية استخلاص السم الفطري الباتيولين من عينات من عصير التفاح المركز المستورد والمحلي والمأخوذة من الاسواق المحلية .

المواد وطرائق العمل:

جمعت عينات عصائر التفاح المحلي في اب عام 2007 من الاسواق المحلية لمدينة بغداد (عصير البستان) وهو عصير عراقي منتج في اذار عام 2007 وتنتهي صلاحيته في اذار 2009 كذلك تم الحصول على عصير التفاح المركز المستورد (عصائر الذهبي) اردني المنشأ من الأسواق المحلية لمدينة بغداد في ايلول عام 2007 وصالح لمدة سنتين.

السم القياسي : تم الحصول عليه من شركة OMEGA(OMA) في بغداد على شكل بلورات بمقدار 10 ملغم .

طريقة العمل:

تم تطبيق الطريقة المستخدمة من قبل ISO [13] وكما يلي:

أ- تحضير محلول الاختبار:

خفف عصير التفاح بالماء (1 جزء عصير تفاح مركز + 5 جزء ماء) تم استخلاص 5 مل من النموذج المخفف باستخدام 50 مل من خليط (Chloroform/ethyl acetate) 2 : 3 لمدة دقيقة واحدة . رشح الخليط خلال قمع زجاجي احتوى على طبقة من كبريتات الصوديوم اللامائية وجمع الراشح في دورق بسعة 250 مل ثم بخر المحلول وخفف الراسب المتبقي بـ 25 مل من ethyl acetate واكمل الى 100 مل بواسطة التولوين.

ب- تم تنقية المستخلص باستخدام عمود الكروماتوكرافي ذو إبعاد 300 ملم × 22 ملم و 250 سم^3 (reservoir) .

ج- الكشف عن الباتيولين بطريقة TLC:

نشطت صفائح الكروموتوكرافي الرقيقة في الفرن تحت درجة حرارة 110 ْم لمدة ساعتين . ثم وضعت قطرة من المستخلص بحجم 20 مايكرولتر بمسافة 2 سم من الحافة اليمنى و2 سم من الحافة العليا (اتجاه رقم 1) ووضعت قطرة بحجم 5 مايكرولتر وقطرة أخرى بحجم 10 مايكرولتر في الاتجاه الثاني كما مبين في شكل رقم (1). ثم رشت الصفيحة بواسطة MBTH hydrochloride solution بعدها جففت الصفيحة لمدة 15 دقيقة في الفرن عند درجة حرارة 130 ْم وتم قياس شدة تألق بقعة المستخلص وقورنت بشدة تألق بقع السم القياسي . وبتطبيق المعادلة التالية تم احتساب تركيز الباتيولين (مايكروغرام في اللتر) :

حيث :

$$Pp = \frac{V_2 \times Pps \times Vo}{50\ V_1}$$

V_o = حجم التخفيف النهائي للمستخلص
V_1 = حجم بقعة المستخلص
V_2 = حجم بقع السم القياسي
Pps = التركيز (مايكروغرام/ملليلتر) للسم القياسي

النتائج والمناقشة:

تم اختبار 10 نماذج من عصير التفاح المركز المستورد وعصير التفاح المحلي وتبين من مجموع (5) نماذج من عصير التفاح المركز المستورد كانت ثلاثة منها ملوثة بتراكيز مختلفة من الباتيولين بينما كانت عينتان من مجموع خمسة من العصير المحلي ملوثة بالسم . ويبين جدول رقم (1) أن أعلى تركيز للسم قد ظهر في نموذج رقم (3) من عصير التفاح المستورد وبلغ 35 مايكروغرام/لتر أما اقل كمية من السم فوجدت في نموذج رقم (2) من عصير التفاح المركز المستورد وبلغ 10 مايكروغرام/لتر أما عصير التفاح المحلي فقد عثر فيه على أعلى كمية من السم بلغت 50 مايكروغرام/لتر في نموذج (5) بينما كان نموذج رقم (4) حاوياً على اقل كمية من السم بلغت 25 مايكروغرام/لتر.

يعتبر الفطر *Penicillium expansum* وسلالات أخرى من الفطريات التي تغزو التفاح مسؤولة عن تكوين التعفن البني بعد دخولها الى التفاح عن طريق الجروح أو الخدوش في جدار الثمرة ويعتبر التفاح من الأوساط الطبيعية الملائمة لنمو هذه الفطريات ووسطاً مشجعاً على إنتاج السم الفطري الباتيولين ، ويتركز السم في المناطق المتعفنة المصابة وعند استخدام التفاح المتعفن في صناعة العصير فان عصير التفاح يكون حاوياً على تراكيز مختلفة من السم . لقد اعتمدت دول عديدة حدوداً عالية للباتيولين في التفاح ومنتجاته من العصير والمربى وقد اتفق عالمياً على 50 مايكروغرام/لتر كحد أعلى إلا أن الاستهلاك الكبير لعصير التفاح من قبل الأطفال جعل من الضرورة مراقبة تراكيز السم في العصائر لان التركيز المؤثر يقاس عادة على مقدار السم نسبة الى وزن الجسم مما يجعل من تناول عصير التفاح من قبل الأطفال من سن الثانية من العمر فما دون أمراً خطيراً على صحتهم . أظهرت الدراسة الحالية أن العصير المركز المستورد يحتوي على اقل مستوى من الباتيولين مقارنة بالعصير المحلي وذلك لان نسبة التفاح التالف المصاب بالفطريات المنتجة للباتيولين والمستخدم في إنتاج العصير المحلي يفوق ما هو مستخدم في إنتاج العصير المستورد بالإضافة الى استخدام تقنيات متقدمة تستخدم فيها المواد الكيمياوية المثبطة لإنتاج الباتيولين والمختزلة لثباتيته في حالة إنتاج العصير المركز المستورد [10] . ان نتائج الدراسة الحالية ومستوى التلوث لعصير التفاح بالباتيولين هو اقل من النتائج التي أعلنت عنها منظمة الفاو عام 1998 والتي بلغ أقصاها 1130 مايكروغرام/كغم في نماذج عصير التفاح في كل من استراليا وبريطانيا وقد يعود سبب انخفاض تركيز السم في العينات الى كون ان التفاح المحلي المستخدم لانتاج العصائر لايتعرض الى فترات طويلة من الحرارة والرطوبة لكون التفاح المحلي يؤخذ مباشرة من الحقل او من الاسواق من دون بقاءه لفترات طويلة من الخزن والشحن كما هو في التفاح المستورد .

جدول رقم (1): تركيز الباتيولين مايكروغرام/لتر في أنواع من عصير التفاح*

1	نموذج (1) مستورد*	25 مايكروغرام/لتر
2	نموذج (2) مستورد	10 مايكروغرام/لتر
3	نموذج (3) مستورد	35 مايكروغرام/لتر
4	نموذج (4) محلي	25 مايكروغرام/لتر
5	نموذج (5) محلي	50 مايكروغرام/لتر

* معدل لثلاث مكررات .

Referenceses:

1-Becci, P. J., Hess, F. G., Johnson, W. D., Gallo, M. A., Babish, J. G., Dailey, R. E., & Parent, R. A. (1981) Long-term carcinogenicity and toxicity studies of patulin in the rat. J. Appl Toxicol 1(5):256-261.

2-Bilai, V. I. (1963). Antibiotic-producing microscope fungi. Elsevier, N. Y. 215 pp.

3-Briane, P. W., G. W. Elson and D. Lowe (1956). Production of patulin in apple fruits. Nature (London), 178 (4527): 263-265.

4-Ciegler, A., R. W. Detroy and E. B. Lillehoj (1971). Patulin and other lactones. In: Microbial Toxins, VI pp, 409-434.

5-Dietz, W.H. and L.Stern (1999) "Expanding your baby's diet."American Academy of Pediatrics, Ch. 2, p 33. Villard Books.

6-Escoula,L., J. More, J.C. Barradat(1977) Acute toxicity of patulin in adult rats and mice ,the toxins of Byssochlamys-nivea. Part I, Ann. Rech. Vet., 8: 41-49.

7-FAO/WHO, (1996). Toxicological evaluation of certain food addition and contaminants in food. WHO. Geneva, 1996.

8-FAO, (1998). Codex committee on food additions and contaminants. Thirtieth session. Position paper on patulin prepared by France. Cx/FAC 98/17.

9-FDA/CFSAN, (2001). Patulin in apple juice, Apple juice concentrates and apple juice products. FAO. Center for food safety and applied nutrition.

10-Frank, H. K. (1977). Occurrence of patulin in fruit and vegetable Ann. Nutr. Aliment. 31 (4-6): 459-465.

11-Frazier, W. C. and D. C. Westhhoff, (1978). Food microbiology. Third edition. New York.

12-Harwig, J. K., K. Chen, B. P. Kennedy and P. M., Scott, (1973). Occurrence of patulin in natural rots of apple in Canada. Can. Inst. Food Sci. Technol. J. 6 (1): 22-25.

13-ISO,(1993). Apple juice,apple juice concentrates and drinks containing apple juice. Part 2 method using TLC. Iso 8128-2.

14-Jackson , L.S.,T.Beacham-Bouden ,S.E.Keller, C.A,dhikari, KT.Tylor,SJ.Chartel,RI,

15-Merker(2003) .Apple quality ,storage and washing treatment affcts patulin levels in apple cider .Journal of Food protection 66:618-624.

16-Marin,S.,H.Morales , AJ, Romas , V.Sanchis(2006).Evaluation of growth quantification methods for modeling of *Penicillium expansum* growth in an apple-based medium .Journal of the science of Food and Agriculture , 86:1468-1474.

17-Morales,M.,S;Marin, A; Rovira, AJ.Romas, and Sanchis.V.(2006a).Patulin acccumulation in apples by *Penicillium expansum* during posharvest stage .letters in Applied Microbiology in a press. (Cited by Marin et al., 2007).

18-Moake,M.M,O.I., Padella-Zakour, RW.Worobo (2005) . Comprehensive review of patulin control methods in food . . Comprehensive review in food science and food safety, 1:8-21

19-Ricelli,A.,F.Baruzzi , M.Solfrizzo , M.Morea , and F.P.Fanizzi (2007) . Biotransformation of Patulin by Gluconobacter oxydans .Applied and Environmental Microbiology3: 785-792

20-Rychlik, M. and P. Schieberle(2001).Model studis on diffusion behave of the mycotoxin patulin in apple ,tomatoes and wheat brad. European Food research and Technology , 212:274 – 278 .

21-Scoot, W. T. and L. B. Bullerman. (1975). Information of carbohydrate and nitrogen source on patulin production by *Penicillium patulum*. Apple. Env. Microbial. 30 (5): 850-845.

22-Steyn,P.S., J. Environ. , (1992), "The biosynthesis of polyketide-derived mycotoxins"Toxic. Cancer, 11, 47-59.

23-Tony, G. S. and E. H. Marth. (1977). Isolation and toxicity of molds from foods stored in homes. J. Foods Prot. 40 (3): 187-190.

Detection of apple Juice contaminated with carcinogenic mycotoxin Patulin

Hussein Al-Nasrawi* Kamel K.Fahad Hameed K. Hussein***
*Amarah Technical Institute ** College of Agriculture – Thi-Qar University

Abstract

Patulin is a secondary metabolite and carcinogenic mycotoxin produce by several fungi. The occurrence of patulin was confirmed in apple and apple juice in the present study .for producing patulin in apple and apple juice. The present study confirmed the occurrence of patulin concentrations in local and imported concentrated apple juice samples, the higher patulin concentration was found in sample of imported concentrates apple juice with 50µg/L, whereas the lowest level of patulin revealed was 10µg/L in local apple juice sample .