## فصل پنجم

# پتولین

### پتولین[1]

### ۱- تاریخچه

پتولین اولین‌بار در دهۀ ۱۹۴۰ از پنی‌سیلیوم کلاوی فورم[2] ایزوله شده است و مشخص شد که دارای خاصیت آنتی‌بیوتیکی است. آزمایشات تجربی نشان داد که می‌تواند در درمان سرماخوردگی در انسان، بسیار مؤثر باشد. شاید یک دلیل مهم برای کشف سریع این مایکوتوکسین مفید بودن آن از نظر پزشکی بوده است.

پتولین به عنوان یک آنتی‌بیوتیک روی طیف وسیعی از میکروارگانیسمها اثر می‌گذارد و در بررسی بیش از ۷۵ گونه باکتری مشخص شده است که هیچکدام در برابر پتولین مقاوم نبوده‌اند. علاوه بر این، قارچها نیز از نظر تحمل پتولین، متفاوتند و در مورد پروتوزوئرها[3]، زمان تماس و غلظت سم، میزان حساسیت در برابر پتولین را مشخص می‌کند.

به دلیل گزارشات متعددی که در رابطه با خاصیت سمی این ماده منتشر شده است، استفاده از آن به عنوان یک آنتی‌بیوتیک و یا دارو ممنوع گردید (۵).

### ۲- تولید پتولین

مایکوتوکسین پتولین بوسیله انواع گونه‌های کپک Penicillium ، Aspergillus و Byssochlamys تولید می‌شود. برای تولید پتولین بوسیله انواع گونه‌های پنی‌سیلیوم و

---

1. Patulin
2. P. claviform
3. Protozoa

آسپرژیلوس از دو محیط کشت سنتتیک Patulin-thom و Czapek-Dox استفاده می‌شود. اضافه کردن عصاره مخمر یا شیره ذرت به محیط کشت Czapek-Dox سبب کاهش تولید پتولین بوسیله گونه‌های پنی‌سیلیوم می‌شود. اما تأثیری روی آسپرژیلوس کلاواتوس[1] ندارد.

تولید پتولین در کشتهای کم‌هوازی تا بیهوازی بیشتر است و دمای ۲۵°C-۲۰ نسبت به ۳۰°C برای تولید سم مطلوبتر می‌باشد و در طی ۱۲-۸روز بعد از تلقیح به حد ما کزیمم می‌رسد. در این رابطه مشخص شده که برخی مواد طبیعی موجب افزایش هرچه بیشتر پتولین می‌شوند، مانند آبجو، ماست، برنج، پوسته گندم، خاک برگ و باقی مانده میوه‌جات. پتولین همچنین بر روی محیط کشت Patato-dextrose Agar نیز بوسیله گونه‌های پنی‌سیلیوم تولید می‌شود.

**جدول ۵-۱ قارچهای تولید کننده مایکوتوکسین پتولین**

| PENICILLIUM | ASPERGILLUS | BYSSOCHLAMYS |
|---|---|---|
| P.claviforme | A.spclavatus | Byssochlamys nivea |
| P.divergens | A.giganteus | |
| P.equinum | A.Terreus | |
| P.expansum | | |
| P.griseofulvum | | |
| P.novae | | |
| P.melinii | | |
| P.patulum (urticae) | | |

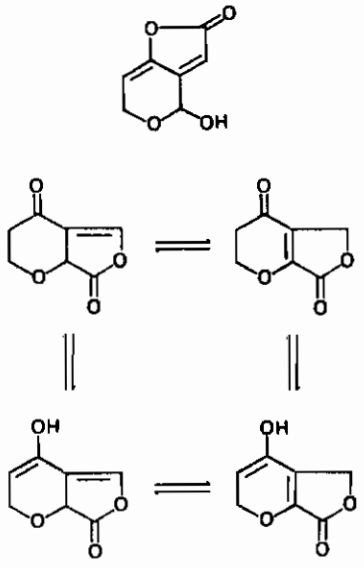
پتولین دارای نامهای مختلفی است مانند:

| | | | |
|---|---|---|---|
| ۱-Clavicin | (کلاوسین) | ۵-Leucopin | (لوکوپین) |
| ۲-Clavaitin | (کلاوی‌تین) | ۶-Mycosin-c | (مایکوزین-سی) |
| ۳-Claviformin | (کلاوی‌فورمین) | ۷-Penicidin | (پنی‌سیدین) |
| ۴-Expansin | (اکسپانسین) | ۸-Tercinin | (ترسی‌نین) |

1. Aspergillus clavatus

## ۳- خصوصیات فیزیکوشیمیایی پتولین

پتولین از دو حلقه کامل لاکتونی غیراشباع تشکیل شده است که ۵ وجهی هستند. در واقع پتولین یک فوروپیران است (۱۱).



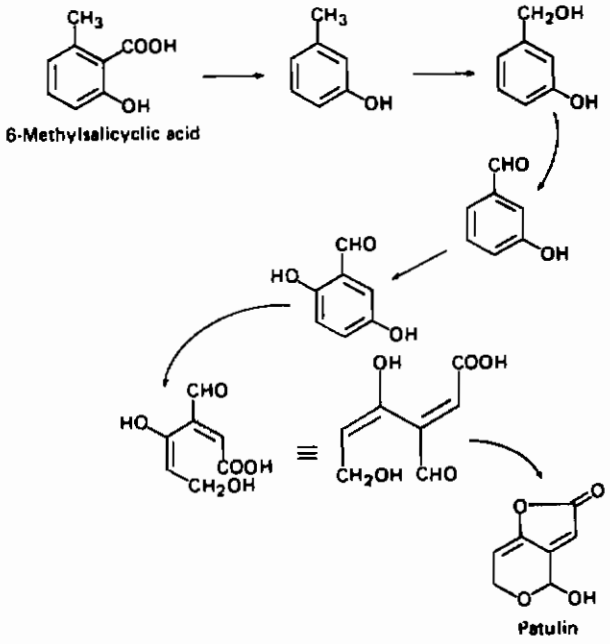
**شکل ۵-۱ اساس ساختمان شیمیایی و فرمهای توتومریک پتولین**

فرمول شیمیایی پتولین ($C_7H_6O_4$) به صورت زیر بیان می‌شوند:

4Hydroxy-4H, Furo - [3, 2, c] pyran, 2[6H] one

بیوسنتز پتولین با استات شروع می‌شود و پیشرفت آن از طریق انواع مواد واسطه آروماتیک مانند ۶- متیل سالسیلیک اسید و ترکیب شیمیایی gentisaladehyde صورت می‌گیرد (۳۲).

خصوصیات فیزیکی و طیف‌جذبی پتولین، با توجه به وزن ملکولی این ماده، در جدول ۵-۲ مشخص شده است.




شکل ۵-۲ مراحل بیوسنتز پتولین

جدول ۵-۲ خصوصیات فیزیکی مایکوتوکسین پتولین

| طیف رزونانس مغناطیسی هسته | طیف مادون قرمز $cm^{-1}$ | طیف UV مقدار نشر | طیف UV NM | وزن مولکولی |
|---|---|---|---|---|
| $CDCL_3$:۵/۹۷ ۳/۴۶d. و ۴/۷۳dd | ۳۳۴۰ و ۳۵۸۰ ۱۷۵۳ و ۱۷۸۲ | ۱۴/۴۵۰ | ۲۷۶ | ۱۵۴/۱۲ |

## ۳- خواص بیولوژیکی پتولین

پتولین دارای خاصیت ایجاد ناهنجاری در جنین [۱]، جهش زایی [۲] و سرطان زایی [۳] می باشد و بدین سبب در کنار تمام بررسیهای سم شناسی، آزمایشاتی در نظر گرفته شده تا مسمومیت زایی

1. Teratogenic 2. Mutagenic 3. Carcinogenic

جنینی، جهش‌زایی و سرطانزایی پتولین را بررسی کنند و چون مایکوتوکسینها به صورت خالص بسیار گرانند، بررسی فقط با مقادیر موثر سم، امکان‌پذیر خواهد بود.

پتولین مانع از رشد و جوانه زدن گیاهان مختلف می‌شود و اثر سمیت شدیدی روی ریشه نباتات نوع Alliumcepar دارد. همچنین زمانی که سلولهای گیاهی در حضور پتولین کشت داده می‌شوند، باعث تشکیل سلولهای دو هسته‌ای و اختلالات کروموزومی می‌شود. همچنین عمل میتوز سلولی را متوقف کرده یا باعث ایجاد اختلال در فرآیند آن می‌شود.

پتولین تنفس سلولهای جوانه سیب و سلولهای سویا را متوقف می‌کند و مانع از فعالیت سیستمهای اکسیدازی سلول می‌شود (۲۸).

پتولین در غلظت ۳/۲μg/ml و در مدت ۲ ساعت باعث شکسته شدن ساختمان دوکی شکل سلولهای کبد جانداران در مرحله تقسیم میتوز می‌شود. در حضور پتولین ساختمان دوکی شکل مرحله میتوز در تخم جاندار شکسته شده و سلولهای $Helas_3$ کبد جاندار بعد از اینکه به مدت ۲ ساعت در معرض ۳/۲μg/ml پتولین قرار گیرند، سنتز RNA و پروتئینها به‌میزان ۸۰٪ در آنها متوقف می‌شود، و زمانی که این غلظت افزایش یابد (حدود ۵۰μg/ml)، سنتز پروتئینها در سلولهای رتیکولوسیت[1] خرگوش کاملاً متوقف می‌شود. در شرایط موجود زنده[2]، تأثیر پتولین بر روی سلولهای مغز استخوان مشخص نموده است که پتولین باعث صدمه به کروموزمهای سلول می‌شود وایجاد انحراف در رشته‌های کروماتید بخصوص در کروموزومهای همولوگ V79-E می‌کند (۸).

تزریق صفاقی ۲mg/kg-۱/۵ پتولین، به مدت ۱۷-۶ روز در دوران حاملگی موش CD-۱ سبب کاهش وزن جنینها و در دوزهای بالاتر موجب ناهنجاری در جنینها می‌شود.

همچنین تزریق صفاقی به میزان ۴mg/kg پتولین به مدت ۹-۸ روز در موشهای CD-۱ ایجاد تغییرات جنینی یا ناهنجاری نداشته است اما دوز ۶mg/kg به مدت ۱۰ روز تأثیر کشنده می‌گذارد.

۲mg/kg پتولین به طور روزانه و دو مرتبه در روز، در موشهای swiss و در دوران حاملگی ۱۹-۱۴ روزگی موجب مرگ و میر جنینها بعد از تولد می‌شود.

---

1. Reticulocyte 2. Invivo

مقدار ۱/۵-۱۵mg/kg پتولین در جیره غذایی روزانهٔ موشهای نر و ماده‌ای که با هم جفت‌گیری کرده بودند، نتایج زیر را بدنبال داشته است:

-گروههایی که دوزهای بالاتر پتولین را مصرف کرده بودند، دچار مرگ و میر بیشتری شدند. و گروههایی که دوزهای پایین‌تر را مصرف کرده بودند، ناهنجاری در جنینهایشان، بوجود آمده بود.

موشهایی که در جیره غذایی آنها ۰/۲mg پتولین بطور روزانه و بمدت ۶ هفته استفاده شده هیچ اثری در آنها مشاهده نگردیده است. زمانی که، به موش نر و ماده، دوزهای مرگ‌آور پتولین یعنی ۱/۵mg/kg را هر روز به صورت خوراکی و به مدت ۱۴-۱۰ هفته تغذیه نمودند حاملگی به صورت طبیعی بود و هیچ ناهنجاری در جنینها مشاهده نشد، بجز اینکه رشد موشها، کاهش یافت. اما زمانی که مقدار ۰/۲mg پتولین به صورت تزریق زیر پوستی و دو بار در هفته برای ۶۴-۶۱ هفته تجدید گردید، تومورهای فیبروزی بدخیم در محلهای تزریق مشاهده گردید که بعداً گسترش پیدا نمود.

در یک بررسی دیگر که از تزریق پتولین به حیوانات آزمایشگاهی استفاده شد، در محلهای تزریق حالت ادم و بی‌رنگی ظاهر گردید، موشها بی‌تاب و بی‌قرار شدند و به‌سختی نفس می‌کشیدند.

تزریق وریدی پتولین، به موشها موجب مرگ آنها می‌شود. مرگ موشها توأم با تشنج می‌باشد، ریه‌ها دچار ادم شده و خونریزی می‌کنند، ششها، کلیه‌ها و طحال احتقان یافته و آب می‌آورند (۷ و ۶).

در موشهای صحرایی، $LD_{50}$ پتولین اندکی بیشتر از موشهای آزمایشگاهی است، علایم ظاهری و پاتولوژیکی تأثیرات پتولین در آنها مشابه موشهای کوچک است بجز اینکه بطور قابل ملاحظه‌ای پتولین اثرات ضد ادراری دارد (۷ و ۶).

تزریق زیرپوستی و داخل صفاقی ۰/۱mg پتولین به مدت بیشتر از ۴ هفته در مرغها موجب، خرابی کبد می‌شود، ولی وقتی مقدار پتولین کم می‌شود و به صورت تزریقی به کار می‌رود در جنین مرغها ایجاد ناهنجاری می‌شود که بصورت انحناء و تغییر شکل پاها و مفاصل، اگزنسفالی[1] و اگزوفتایموس[2] و ... دیده شده است.

---

1. Exencephaly 2. Exophthaimos

$LD_{50}$ پتولین برای هر تخم‌مرغ ۶۸/۷μg و برای جنینهای چهار روزه بسیار کمتر و تقریباً حدود ۲/۳۵μg. است مقدار ۲μg-۱ پتولین در جنینهای چهار روزه ایجاد حالت غیرطبیعی و ناهنجاری، بخصوص در ناحیه پاها کرده است. $LD_{50}$ پتولین در جوجه‌های چهار روزه بمیزان ۲/۴μg به ازای هر تخم‌مرغ خواهد بود.

$LD_{50}$ پتولین در موش متفاوت است. بطوری که برای تزریق زیر پوستی ۱۵mg/kg-۸ تزریق وریدی ۲۵mg/kg-۱۶ و تزریق صفاقی ۳/mg/kg-۶، و در موشهای بزرگ ۲۵mg/kg-۱۵ برای تزریق زیر پوستی و ۵۰ mg/kg-۲۵ تزریق وریدی تعیین شده است.

**جدول ۵-۳ مقادیر $LD_{50}$ پتولین برای جانوران مختلف**
**(میلی‌گرم به ازای کیلوگرم وزن بدن جاندار)**

| گونه | از طریق پوست (S.C) | تزریق داخل وریدی (I.V) | تزریق داخل صفاقی (I.P) |
|---|---|---|---|
| موش | ۱۵-۸ | ۲۵-۱۶ | ۶-۳ |
| موش‌صحرایی | ۱۵ | ۵۰-۲۵ | |

هنوز دقیقاً مشخص نشده است که آیا پتولین می‌تواند در پستانداران، ایجاد ناهنجاریهایی بکند یا خیر، ولی قادر است که درجنین ایجاد مسمومیت نماید، بنابراین بایستی که از تماس و از آلودگیهای مواد غذائی با پتولین پرهیز کنیم یا اینکه مطمئن شویم پتولین نمی‌تواند در جنین انسان ایجاد ناهنجاری کند (۲۷ و ۲۵ و ۲۴ و ۱۶).

در واقع در تستهای متعددی مشخص شده است که مصرف خوراکی پتولین بیشتر از حالت تزریقی آن ایجاد سرطان می‌کند.

در تست Ames که جنبه‌های جهش‌زایی پتولین را بررسی می‌کند، مشخص شده است که پتولین در مقادیر دوز مؤثر باعث افزایش و تولید بیشتر یک ماده جهش‌زای قوی[1] می‌شود که می‌تواند سبب جهش‌ژنهای مختلفی می‌گردد.

1. 8-Azaguanin

در آزمایشات کشت بافت[1]، پتولین مانع تقسیم سلولی در فیبروبلاست موشها شده است. براساس اطلاعات بدست آمده از آزمایش با تخم دوزیستان، پتولین مسئول شکستگی دوک میتوزی می‌باشد، همچنین پتولین مانع تقسیم سلولها می‌شود. این مایکوتوکسین باعث شکستگی کروموزمها در تخم‌های سمندر می‌شود و سلولهای پلی‌پیتیدی لکوسیت‌های[2] کشت داده شده انسانی را می‌شکنند.

شکستگی، هم در رشته‌های تکی و هم در رشته‌های دوتایی DNA مشاهده می‌شود. زمانی که سلولهای $Helas_3$ کلیه، به‌مدت یک ساعت در معرض غلظت ۳۲μg/ml پتولین قرار می‌گیرند تجزیه رشته‌های تکی به صورت قابل ملاحظه‌ای صورت می‌گیرد.

علاوه بر این شکستگی در رشته‌های تکی DNA سلولهای موش Fm3A نیز مشاهده شده است (۲۵ و ۸ و ۷ و ۶).

### ۴-۱- اثر پتولین بر روی سنتز پروتئینها

پتولین به میزان ۸۰٪ مانع سنتز DNA و RNA و پروتئینها می‌شود. در سلولهای کبد، سنتز RNA و پروتئین تا حدود ۶۰-۴۰٪ کاهش می‌یابد زیرا در مجاورت غلظت ۲/۵μg/ml پتولین و به مدت ۴ ساعت از انتقال اسیدهای آمینه به داخل ساختمان پروتئینها تا حدود ۴۰٪ جلوگیری می‌شود.

در بررسیهای آزمایشگاهی انجام گرفته هسته سلول کبد موش، وقتی در معرض ۲۰۰μg/ml پتولین قرار داده شود، سنتز rRNA در آن تاحدود ۷۰٪ کاهش می‌یابد.

پتولین همچنین باعث آسیب به عمل نسخه‌برداری از DNA می‌شود. علاوه بر این مشخص شده است که سنتز پروتئینها در سلولهای رتیکولوسیت خرگوش، کاملاً متوقف می‌شود (۸).

### ۴-۲- اثر پتولین بر روی انتقال مواد در سلول

در بررسیهای آزمایشگاهی روی گلبولهای قرمز حیوانی، زمانی که در مجاورت ۱میلی‌مول پتولین قرار گیرند مشاهده شده است که جذب پتاسیم در آنها متوقف می‌شود. هم

---

1. Tissue Culture. 2. Leukocyte

چنین وجود پتولین در غلظت ۳۰mg/ml در محیط بطور شدیدی از انتقال گلی‌سین به داخل رتیکولوسیتهای خرگوش جلوگیری می‌کند.

عمل انتقال مواد به داخل سلولها که معمولاً بوسیله ATPase غشا با صرف انرژی صورت می‌گیرد اگر تحت تأثیر مایکوتوکسین پتولین قرار گیرد این سم مانع فعالیت ATPase غشا می‌شود. عمل انتقال در سطح سیستم آنتی‌ژنی نوعی پروتوزوئر به نام pavameciumaurda نیز، زمانی که در معرض ۱μg/ml پتولین به مدت ۴۸-۱۶ ساعت قرار گیرد، مختل می‌شود. علاوه بر این، پتولین موجب تغییرات نامطلوب در انتقال آنتی‌ژن D و آنتی‌ژن B در سیستم سرولوژیکی یا ایمنی ارگانیسم می‌شود (۸).

## ۴-۳- اثر پتولین بر روی تنفس سلولی

تنفس سلولی بافتهای حیوانی و گیاهی، تحت تأثیر غلظتهای بالای سم پتولین قرار می‌گیرد، بدین‌صورت که در بافتهای عصبی خوک و بافت کلیه که در معرض ۱۵۰μg/ml پتولین واقع می‌شوند جذب اکسیژن در آنها به ترتیب ۸۰٪ و ۵۰٪ کاهش می‌یابد.

متابولیسم سلولی و فعالیت انتقال غشایی ۳۰ ثانیه بعد از اضافه شدن پتولین متوقف می‌شود. همچنین این سم مانع فعالیت سیستمهای اکسیداتیو در سلول می‌شود (۸).

## ۴-۴- اثر پتولین بر روی فعالیت آنزیمها

پتولین مانع از فعالیت انواع مختلف آنزیمها می‌شود. این آنزیمها، شامل گروههای آنزیمی تیول[۱]، آلدولاز عضلات، لاکتیک دهیدروژناز عضلات[۲] و الکل دهیدروژناز مخمر[۳] است. همچنین اثر بازدارندگی روی فعالیت کربوکسیلازها، اوره‌آزها و اشریشیا کولی پلی‌مرازها دارد. در واقع سیستئین بلوکه شده مانع از فعالیت LDH می‌شود، اما روی آلدولاز و ADH اثر نمی‌گذارد. پتولین مانع فعالیت ATPase می‌شود، اما با کمک ترکیبات سولفوریل‌دار، که عامل SH دارند، این ممانعت از بین می‌رود (۸).

---

1. Thiol. 2. LDH. 3. ADH.

## ۵- متابولیسم و انتشار پتولین

متابولیسم انتشار واستخراج پتولین با کمک کربن ۱۴ قابل پیگیری است. در صورت نشاندار کردن پتولین با کربن ۱۴، متابولیسم و انتشار این سم را در بدن حیوان بعد از مصرف خوراکی طی ۷ روز از طریق میزان رادیواکتیویته، در ادرار، مدفوع و $CO_2$ بازدم اندازه گیری می‌کنند. که به ترتیب ۴۰٪ در ادرار ۵۰٪ در مدفوع و ۲-۱٪ در هوای بازدم از بدن خارج می‌شود.

بدین ترتیب در صورت نشاندار کردن پتولین با مواد رادیواکتیو، قسمت اعظم ماده رادیواکتیو بعد از ۲۴ ساعت در ادرار و بعد از ۴۸ ساعت در مدفوع قابل اندازه گیری است.

فعالیت رادیواکتیویته در بافتها و سلولهای قرمز خون تا ۷ روز بعد از مصرف مشاهده می‌گردد. پتولین در موش خیلی سریع متابولیزه می‌شود.

## ٦- مکانیسم ایجاد سمیت پتولین

امروزه، جهت بررسی مکانیسم اثر سمیت پتولین بر روی سلولها از چند روش B.A.F (Bio Assay Fluorescent) استفاده می‌کنند.

با بکار بردن ۰/۱ میکرومول پتولین، کاهش بسیار معنی‌داری در میزان فلوروسانس منوکلروبیوآمین سلولهای GSH[1] دیده می‌شود، این کار در طی ۱ تا ۲ ساعت اتفاق می‌افتد. شبیه به همین کاهش در سلولهای GSH توسط مایکوتوکسینها بر روی سلولهای کبدی صورت گرفته است. با مجاورت همین مقدار توکسین سلولهای CLC-pk1 کلیه نیز، کاهش خاصیت فلوروسانس را نشان داده‌اند (۲۹).

بررسی پتانسیلهای الکتریکی مشخص کرده است که میزان جداسازی رودآمین ۱۲۳ میتوکندری نیز ارتباط زیادی با غلظت پتولین دارد و این جداسازی زمانی که به مدت یکساعت در معرض ۰/۱ میکرومول پتولین قرار داده شود افزایش می‌یابد (۸).

خاصیت فلوروسانس میتوکندری در دوزهای بالا، کاملاً از بین می‌رود، البته این حالت موقعی که سلولها زمان طولانی‌تری اما در دوزهای پایین‌تر در معرض پتولین قرار بگیرند نیز وجود دارد.

---

1. Reduced Glucathione

پتولین موجب افزایش جهش در سلولهای سوماتیک مگس سرکه می‌شود که در اینصورت بازسازی DNA در این سلولها دیده نمی‌شود.

میزان ATP سلولی، زمانی که سلول در معرض ۰/۵ میلی‌مولار پتولین به مدت ۱۵ دقیقه قرار گیرد، کاهش قابل ملاحظه‌ای نشان می‌دهد، اما حضور یا عدم حضور گلوکز تأثیری در حجم سلول ندارد. اگر سلول به مدت ۳۰ دقیقه در معرض ۰/۱۵ میلی‌مولار پتولین قرار بگیرد، تولید ATP به مقدار زیادی متوقف می‌شود. پتولین مانع از تشکیل تری‌تیوم می‌شود، این ماده پیش‌ساز و واسطه انتقال مواد به داخل زنجیر پروتئینها و RNA می‌باشد و بدین‌طریق در وظایف سلولی ایجاد اختلال می‌کند و وضعی بحرانی و وخیم در آن ایجاد می‌گردد. میانگین حجم سلول بعد از اینکه دو ساعت در معرض ۱ میلی‌مولار پتولین قرار می‌گیرد، افزایش معنی‌داری می‌یابد. معمولاً اثرات پتولین در سنتز پروتئین و RNA به کمک دستگاههای پیشرفته‌ای اندازه گیری می‌شود.

در یک بررسی دیگر اثرات پتولین در جهش‌زایی و ایجاد ناهنجاری در جنینهای موش بررسی شده است. در این خصوص چهار موش ماده بالغ، زایمان نکرده از گونه chavles river CD-1 در یک خانه با یک موش‌نر از همان‌گونه قرار داده شدند. برجستگی واژنیال در روز اول حاملگی ظاهر شد، در روز ۱۷-۱۰ حاملگی، ماده‌ها در ۳ گروه تقسیم‌بندی شدند و به آنها ۱/۵-۲mg/kg پتولین با حجم مساوی از سرم فیزیولوژی خورانده شد، ماده‌ها در روز ۱۹ حاملگی کشته و جنینهای آنها بررسی گردید. نتایج حاصله نشان داد که پتولین به میزان ۱/۵mg/kg در موشها ایجاد ناهنجاری می‌کند. و کاهش وزن جنینهای کامل بعد از دادن پتولین، ناشی از مسمومیت جنینی خواهد بود. بررسی جنینها که مقدار ۲mg/kg پتولین را دریافت داشته‌اند، مشخص کرده که پتولین باعث نابودی جنینها شده است.

تزریق زیرپوستی ۱۵mg/kg پتولین، موشها را دچار درد و بی‌قراری تنفسی می‌کند، بافتهای پوستی ابتدا شروع به قرمز شدن و بعد بادکردگی می‌کنند و سپس مرگ بافت ایجاد می‌شود.

موشهای گونه NMRI نیز بررسی شده‌اند، در شروع آزمایش سن موشها ۱۰-۸ هفته و وزن‌شان حدود ۳۰g بود. بخاطر صرفه‌جویی در زمان بررسی اثرات ناهنجاری‌زایی، آزمایشات به جای روزهای ۱۵-۶ حاملگی در دورهٔ ۱۳-۱۲ حاملگی،انجام شد. به این دلیل در این مدت، استخوان‌بندی ناقص، شکاف در کام، خروج مغز و دنده‌های پهن (عوارض ناهنجاری) کاملاً

ایجاد شده بود. در این بررسی مقادیر ۱/۲۵، ۲/۵، ۳/۷۵ mg/kg پتولین به صورت تزریق صفاقی و ۳/۷۵mg/kg پتولین به صورت تغذیه مستقیم به کار رفته بود. بعد از مصرف خوراکی ۳/۷۵mg/kg پتولین هیچ اثری از مسمومیت جنینی مشاهده نشد ولی افزایش شکاف کام و نقص کلیه‌ها بوجود آمد (۷ و ۶).

تزریق صفاقی این مایکوتوکسین، تأثیر بیشتری در ایجاد ناهنجاری نسبت به مصرف خوراکی آن دارد. پتولین، ایجاد موتاسیون کرده اما این جهش در جهت افزایش ضریب شکنندگی کروموزوم‌ها نمی‌باشد.

شکستگیهای کروموزومی در غلظتهای ۱۰-۲۰ mg/kg مصرف خوراکی پتولین بسیار بالاست. این بررسی بر روی کروموزومهای سلولهای مغز استخوان ران آزمایش شده است.

در بررسی سیتوژنتیک[1] سلولهای مغز استخوان در موجود زنده مشخص شده که هر ۳ نوع مایکوتوکسین (پتولین، آفلاتوکسین $B_1$ و آفلاتوکسین $G_1$) موجب صدمه به کروموزومها و شکستگی کروماتیدها می‌شوند، اما صدمه‌ای که پتولین می‌زند به مراتب بیشتر از دو مایکوتوکسین دیگر است (۲۸، ۲۶ و ۱).

در این آزمایشات سلولهای مغز استخوان، در مرحله متافاز[2] از استخوان ران تهیه شده‌اند. صدمه و تغییرات کروموزومی در مرحله کدبرداری،و به صورت تجزیه کروماتید، تجزیه ایزوکروماتید و جابجایی داخل کروماتیدها بوده است.آزمایشات نشان می‌دهد که پتولین موجب تغییرات زیادی در میزان رطوبت، چربی و ویتامین A تخم‌مرغ و جگر مرغ ایجاد می‌شود . همچنین کلسیم پوسته به مقدار زیاد کاهش یافته و تغییراتی در شکل ظاهری آن در زمان تماس با پتولین ایجاد می‌گردد. این بررسی روی چهار تیمار، که در هر تیمار ۸ عدد تخم از مرغهای تخم‌گذاری که یک عدد خروس داشته‌اند و ۱۰۰۰ ppb پتولین به مدت ۶ هفته در تغذیه روزانه گروههای مختلف آزمایش استفاده شده، انجام گرفته است. علاوه بر این پتولین سبب ایجاد فرورفتگی‌ها و برجستگی‌هایی در پلاسمای غشا شده و حالت طبیعی سلولها را تخریب می‌کند (۱).

---

1. Cytoygenetic 2. Metaphase

## ۷- پتولین و سیستم ایمنی

پتولین مانع تشکیل پادتنها در سیستم ایمنی موجودات زنده می‌شود. این اثرات در بررسیهای آزمایشگاهی به اثبات رسیده است. آزمایشات بیشتر بر روی ماکروفاژ[۱] صورت گرفته است. پتولین همچنین سبب کاهش فعالیت آنزیمهای لیزوزومی[۲] و عمل فاگوسیتوز می‌شود. این اثرات، زمانی که پتولین به مقدار ۰/۱mg/ml در محیط وجود داشته باشد مشاهده می‌شود و در غلظت ۰/۵mg/ml فعالیت آنزیمها راکاملاً متوقف می‌شود.

پتولین مانع فعالیت لنفوسیتها[۳] در غلظتهای بالاتر از $LD_{50}$ خواهد شد. این مسأله در بررسیهای آزمایشگاهی و شرایط ایمونولوژیکی در موشهای نوع Balb/c به اثبات رسیده است. غلظتهای بالای پتولین باعث کاهش حساسیت بعضی از آنتی‌ژنها می‌شود و بدین وسیله این آنتی‌ژنها قادر به فعالیت نخواهند بود.

## ۸- پتولین و متابولیسم کربوهیدراتها

اثر سم پتولین در تمام ارگانهااز جمله کبد، کلیه و زوده حیوانات مورد بررسی واقع شده است و نتایج حاصله نشان می‌دهد که باعث ایجاد اختلال در عمل این ارگانها می‌شود. از مهمترین این تأثیرات، اختلال در متابولیسم کربوهیدراتها است که تحت تأثیر تغییرات غلظت یک تعداد از آنزیمهای مؤثر در متابولیسم کربوهیدراتها انجام می‌شود. آنزیمهایی نظیر هگزوکیناز و آلدولاز بطور معنی‌داری تحت تأثیر پتولین قرارگرفته و مقدار آنها کاهش می‌یابد (۱).

استفاده از مقدار ۲/۵mg/kg پتولین در موش، مرگ‌آور و کشنده خواهد بود. در بررسیهای مصرف کوتاه مدت[۴] پتولین مشخص شده است که پتولین سبب اختلال در سیستم گوارش از جمله تهوع، استفراغ، خونریزی احتقان و ایجاد زخم در این نواحی می‌شود و در مصرف طولانی‌مدت[۵]، سرطانزایی پتولین در موشها محرز شده است. در یک بررسی علمی چهار گروه میمون pig-Tail گونه macaca Nemestrina در گروه دوتایی در مقایسه با یک گروه

---

1. Macrophage
2. Lysosome enzymes
3. Lynphocyte
4. Short term
5. Long term

شاهد نسبت به اثرات سمی پتولین بر روی آنها، مورد آزمایش قرار گرفتند، سایر گروهها و گروه شاهد روزانه دوزهای خوراکی پتولین را در مقادیر ۵، ۵۰، ۵۰۰ μg/kg دریافت داشتند. این مقادیر به همراه قطعات موز، به مدت ۴ هفته و به طور روزانه به جانور داده شد. بعد از پایان مدت آزمایش بررسیهای خون‌شناسی در مورد آنها صورت گرفت و پارامترهایی نظیر پروتئین سرم خون، گلوتامات اکسی‌لاکتات سرم‌خون، ترانس آمیناز، فسفاتازقلیایی، اوره، نیتروژن خون، کلسترول، پروتئین، گلوکز، سدیم و پتاسیم نیز تعیین گردید. نتایج آزمایشات نشان می‌دهد که فقط مصرف خوراکی پتولین اثر معنی‌داری بر روی میزان فسفاتهای قلیایی داشته و هیچ تغییر معنی‌داری در سایر پارامترها ندارد (۱۶ و ۸).

## ۹- آلودگی مواد غذایی به سم پتولین

کپکهایی که قادر به تولید پتولین هستند از انواع فرآورده‌های گیاهی و حیوانی ایزوله شده‌اند. مایکوتوکسین پتولین اصولاً توسط کپکهایی که در میوه‌جات بخصوص سیب، ایجاد فساد می‌کنند، تولید می‌شود. میوه‌هایی نظیر هلو، گلابی، انگور، آلو، خیار، آناناس، شاتوت، گوجه‌فرنگی، گوجه‌سبز، موز و مویز نیز به سادگی بوسیله پتولین آلودگی پیدا می‌کنند (۱۳ و ۲).

تحت شرایط طبیعی، پتولین منحصراً از سیب، آب‌سیب، کره سیب و سایر محصولاتی که از سیب کپک زده تهیه می‌شود، قابل جداسازی است. منبع اصلی پتولین در رژیم غذایی انسان، احتمالاً آب سیبی است که با سیبهای آلوده به پتولین و کپک‌زده تهیه شده است (۲۰ و ۱۷).

پتولین موجود در آب‌سیب، در مقایسه با سایر آب میوه‌ها، پایدارتر است. (حتی برای مدت بیشتر از ۳ هفته)، چون علاوه بر اینکه آب‌سیب دارای pH پائینی است، حاوی گروههای SH یا سولفیدریل کمی نیز است و همین مسأله سبب آلوده شدن این محصول به کپک و تولید پتولین در آن می‌شود (۱۷، ۱۳، ۱۲ و ۲). مراکز بهداشتی در سوئیس، سوئد، بلژیک، بعضی از جمهوریهای تازه استقلال یافته شوروی سابق، و نروژ، توجه ویژه‌ای به مشکل آلودگی پتولین در مواد غذایی و بویژه آب سیب، نشان داده‌اند و ماکزیمم غلظت مجاز (MPC)[1] حضور پتولین در آب سیب را ۵۰μg/lit تعیین کرده‌اند.

1. Maximum Permited Concenteration

جدول ۵-۴ مایکوتوکسین پتولین در مواد غذایی

| مایکوتوکسین | محصول | کشور | نتایج آزمایشات: تعداد نمونه‌های آلوده از کل نمونه‌ها | مقدار μg/kg |
|---|---|---|---|---|
| پتولین | شربت‌سیب | فرانسه | ۹ از ۱۳ | ۱۰۰-۳۰۰ |
| | آب‌سیب | امریکا-کانادا | ۵۳۲ از ۹۹۵ | ۱-۴۵۰۰ |
| | | سوئد | | |
| | | سوئیس | | |
| | | آلمان | | |
| | | انگلستان | | |
| | | فرانسه | | |
| پتولین | آب‌انگور | | ۲۱ از ۵۵ | ۱-۲۳۰ |
| | آب‌سیب | | ۱۰ از ۲۵ | ۵-۵۶ |
| | آب انگور | | ۰ از ۱۳ | |
| | سیب | اسپانیا | ۵۴ از ۱۰۴ | ۱۰۰۰-۲۵۰/۰۰۰ |
| | گلابی | | ۸ از ۲۴ | ۹۰۰-۱۰/۰۰۰ |
| | کنسانتره‌سیب | فرانسه | ۲۷ از ۲۷ | ۵۵-۶۱۰ |
| پتولین | فرآورده‌های‌سیب | آلمان | ۷ از ۱۰۷ | |
| | آب میوه | ایتالیا | ۱۲ از ۵۸ | ۱۱-۵۰ |
| | مربا | ایتالیا | ۱۰ از ۲۰ | ۵-۱۵ |
| | آب‌سیب | فنلاند | ۱۰ از ۵۱ | ۵-۵۰ |
| | | | | ۵-۷۲ |
| پتولین | | | | |
| | آب‌سیب | آلمان | ۴۱ از ۶۶ | ۲-۵۰ |
| | نوشابه‌های سبک | | ۲ از ۲۴ | ۲-۱۰ |
| | مربا | | ۱۵ از ۳۵ | ۲-۲۰ |
| | کمپوت | | ۰ از ۱۲ | |
| | غذای کودک | | ۰ از ۷ | |
| | سوپ‌های معطر | هند | ۱ از ۱۴۷ | |

جدول ۵-۵ پتولین موجود در آب سیب

| محصول | درصد آلودگی | مقدار پتولین μg/kg |
|---|---|---|
| آب میوه کنار خیابانی | ۵۸ | ۱۰-۳۵۰ |
| آبمیوه خانگی | ۴۰ | ۶-۱۶۴۰۰ |
| کنسانتره آبمیوه | ۲۰ | ۵۰-۶۹۰ |
| آبمیوه تجارتی | ۲۷ | ۲۳۹ |
| آبمیوه‌خانگی | ۳۰ | ۲۴۴۴۰۰ |
| کنسانتره | ۳۰ | ۵-۱۴۷۸ |
| آبمیوه | ۳ | ۱۰۶-۲۱۶ژ |
| کنسانتره آبمیوه | ۱۰۰ | ۵۵-۶۱۰ |
| آبمیوه و کنسانتره | ۰ | - |
| آبمیوه | ۲۱ | ۵-۱۵ |
| آبمیوه | ۱۷ | ۱۰-۱۳۰ |
| آبمیوه | ۳۰ | ۲۰۰-۱۲۰۰ |
| آبمیوه | ۴۲ | ۵-۵۶ |
| آبمیوه | ۳۷ | ۴۰-۴۴۰ |
| آبمیوه | ۸۲ | ۲-۷۳ |
| آبمیوه | ۴۰ | ۲۰-۲۰۰ |
| آبمیوه | ۰ | - |
| آبمیوه | ۸۴ | ۲۰-۷۴۰۰ |
| آبمیوه | ۱۰۰ | ۲-۶۰ |
| آبمیوه | ۸۶ | ۲۴۰۲ |
| شربت سیب | ۲۱ | ۲۵۰-۲۰۰۰ |
| شربت سیب | ۶۲ | ۴۴-۳۰۹ |
| شربت سیب | ۱۰۰ | ۲۴۴-۳۹۹۳ |

جدول ۵-۶ پتولین موجود در سایر آب‌میوه‌ها

| محصول | درصد آلودگی | مقدار پتولین برحسب میکروگرم در لیتر |
|---|---|---|
| آب گلابی | ۸۳ | ۲-۲۵ |
| آب گلابی | ۱۰۰ | < ۲۰ |
| کنسانتره آب گلابی | ۰ | - |
| آب گلابی | ۱۰۰ | <۳ |
| کنسانتره آب‌لیمو | ۰ | - |
| آب پرتقال | ۰ | - |
| آب اناناس | ۰ | - |
| آب - آناناس | ۱۰۰ | <۲۵ |
| کنسانتره آب شاتوت | ۱۰۰ | ۱۵ |
| آب انگور سیاه | ۶۶ | ۸-۱۰ |
| کنسانتره آب انگور سیاه | ۱۰۰ | <۵ |
| آب انگور قرمز | ۰ | - |
| کنسانتره آب انگور قرمز | ۱۰۰ | ۵-۳۶۱ |
| آب انگور سبز | ۰ | - |
| آب ریواس | ۰ | - |
| آب هلو | ۳۳ | <۲۵ |
| آب زردآلود | ۳۳ | <۲۵ |
| آب انگور | ۲۲ | <۵۰ |
| آب انگور | ۱۶ | ۵۰-۲۳۰ |
| آب انگور | ۰ | - |
| کنسانتره آب انگور | ۳۳ | ۱۰ |
| آب انگور | ۰ | - |

جدول ۵-۷ پتولین موجود در انواع محصولات کشاورزی در کشورهای مختلف

| مایکوتوکسین | محصول | کشور |
|---|---|---|
| پتولین | سیب | انگلستان |
| پتولین | شربت سیب | فرانسه |
| پتولین | آب‌سیب و هلو | آلمان |
| پتولین | سیب | کانادا |
| پتولین | آب انگور | کانادا |
| پتولین | آب سیب | کانادا |
| پتولین | موز و آناناس | آلمان |
| پتولین | انگور، هلو و زردآلود | آلمان |
| پتولین | آب سیب | سوئد |

جدول ۵-۸ پتولین موجود در آب سیب و محصولات میوه‌ای

| محصول | نمونه‌های موردبررسی | نمونه‌های حاوی پتولین |
|---|---|---|
| اسانس سیب | ۱۴ | ۳ |
| کنسانتره آب‌سیب وارداتی | ۶۴ | ۱۳ |
| کنسانتره سیب فنلاندی | ۷ | ۲ |
| آب سیب تجارتی | ۲۴ | - |
| آب سیب خانگی | ۲۰ | ۸ |
| سیب | ۱۰ | - |
| سیبی که اسپورکپک به آن تلقیح شده | ۱۰ | ۱۰ |
| سیب کپک زده | ۷ | ۲ |
| شربت سیب | ۲ | - |
| سرکه سیب | ۱ | - |
| مربای سیب کپک‌زده | ۲ | ۱ |
| مربای سیب تجارتی | ۲ | - |
| شُس سیب | ۱ | - |
| برگ زردآلو | ۶ | - |
| کنسانتره آب گلابی | ۱ | - |
| مربای ریواس کپک‌زده | ۱ | - |
| شُس گوجه‌فرنگی | ۲ | - |
| جمع | ۱۷۶ | ۳۹ |

کمیته WHO[1] مقدار تحمل جذب (PTWI)[2] هفته‌ای (پتولین را ۷μg/kg وزن بدن تعیین کرده است، تحت عنوان و اغلب چون این محصول بوسیله کودکان به مصرف می‌رسد،محدودیت جذب در مورد کودکان در سطح دنیا وجود دارد و بمقدار ۰/۲۶μg/kg وزن بدن در روز، تعیین شده است (FAO/WHO.1990).

مراکز بهداشتی در استرالیا، قوانینی را در مورد غذاتحت عنوان NHMRC(1987) به تصویب رسانیده‌اند. این قوانین هیچ غلظتی را برای پتولین در هر ماده غذایی مجاز ندانسته است. بررسیهای متعددی طی سالهای گذشته در کشورهای مختلف برای تعیین میزان دقیق پتولین آب‌سیب و فرآورده‌های دیگر سیب انجام شده است. طی سالهای ۷۷-۱۹۷۶ سیبهای ایالت

1. World Health Organization
2. Provisional Tolerable Weekly Intake

ویس‌کانسین، بررسی شدند و از مجموع ۴۰ نمونه آب سیب، ۳۲ نمونه دارای ۱۰-۳۵μg/lit، پتولین بوده‌اند و متوسط آلودگی پتولین در کل نمونه‌ها ۵۰/۷μg/lit گزارش شده است. در سال ۱۹۷۴ سیبهای واشنگتن DC بررسی و متوسط آلودگی آب سیب در این نواحی به ازای هر ۸ تا ۱۳ نمونه ۴۴-۳۰۹μg/lit بوده است.

در سال ۱۹۸۴، آب سیبهای پاستوریزه ایالت جورجیا مورد بررسی قرار گرفتند و مشخص شد که دارای ۲۴۴-۳۹۹۰μg/lit پتولین می‌باشند. متوسط آلودگی ۱۹۰۲μg/lit پتولین بود. در سال ۱۹۸۱ آب‌سیبهای نیوزیلند مورد بررسی قرار گرفت و مشخص گردید که دارای ۱۰۶-۲۱۶μg/lit پتولین بودند. نمونه‌برداری از کنسانتره آب‌سیب ۸ منطقه هلند مشخص کرد که متوسط غلظت پتولین در آنها ۳۰μg/lit بود. ۱۳ مورد نمونه‌برداری از آب‌سیب در سال ۱۹۸۵ مشخص کرد که آلودگی به پتولین نمونه‌های آب‌سیب انگلستان بین ۵-۵۶ μg/lit بوده است.

در یک بررسی که طی اکتبر ۸۸ تا ماه می ۸۹ در دپارتمان بهداشت ویکتوریای نیوزیلند انجام شد مشخص نمود که بیشترین غلظت پتولین در نمونه‌های مورد آزمایش ۶۲۵-۶۲۹ μg/lit بوده و منبع اصلی آلودگی پتولین در نمونه‌های آلوده، سیبهای فاسد و پوسیده‌ایی بودند که بصورت سورت نشده وارد پروسه تهیه آب میوه می‌شدند.

فقط تعداد کمی از تولید کنندگان صنعتی آب سیب در نیوزیلند، محصولشان فاقد پتولین بوده و متوسط آلودگی پتولین ۲۵ μg/lit تعیین شده است. معذالک آب‌سیبهای آلوده بطور متوسط بیشتر از ۲۵۰μg/lit پتولین نداشتند و فرد ۷۰کیلوگرمی که بطور متوسط روزانه یک لیوان ۲۵۰ ml آب‌سیب آلوده را بنوشد، $\frac{1}{3000}$ دوزی را که قادر است اثر سرطانزایی داشته باشد، مصرف می‌کند. عدم دستیابی به اطلاعات کافی در رابطه با سرطانزایی پتولین، شاید به علت فقدان یک فعالیت منظم و دقیق تحقیقاتی در اغلب کشورهاست (۲۰ و ۱۷ و ۱۳).

## ۱۰- تأثیر پارامترهای فیزیکوشیمیایی بر حذف یا غیرفعال کردن مایکوتوکسین پتولین

### ۱۰-۱- حرارت

برای بررسی تأثیر حرارت، ۱۵۰-۲۵۰ ml آب‌سیب نمونه‌های سیب جورجیا که حدود ۲۰μg/lit پتولین داشتند، تحت فرآیند حرارتی پاستوریزاسیون قرار داده شدند. به این منظور تأثیر چهار

تیمار حرارتی مختلف ۶۰، ۷۰، ۸۰ و ۹۰ درجه سانتی‌گراد به روش حرارتی HTST[1] مقایسه شد. دراین آزمایش از لوله‌هایی به طول ۱۶۳/۸cm و قطر ۰/۱۳cm استفاده شد. سرعت جریان ۱۲/۴۲ میلی‌متر در دقیقه و زمان توقف در لوله‌ها، ۱۰ ثانیه می‌بود. در روش HTST با درجه حرارت ۹۰°C زمان توقف نمونه‌ها درلوله متفاوت و شامل ۲۰، ۳۰، ۸۰ و ۱۶۰ ثانیه بود.

استفاده از روش حرارتی متناوب در تخریب توکسین نشان می‌دهد که این فرآیند هم به طور معنی‌داری، سبب کاهش غلظت پتولین می‌شود.

افزایش زمان نگهداری در دامنه ۹۰°C اثر معنی‌داری روی کاهش غلظت پتولین نداشت و اعمال این درجه حرارت ۱۸/۸٪ غلظت پتولین راکاهش داد. در واقع فرآیند حرارتی سبب کاهش سطح پتولین آب سیب می‌شود، اما بطور معمول فرآیندهایی که بکار می‌روند، اغلب ناکافی هستند وبطور کامل موجب تخریب توکسین نخواهند شد.

پتولین در دامنه حرارتی ۸۰°C به مدت ۱۰ تا ۳۰ ثانیه از بین نمی‌رود ولی میزان آن زمانی که آب‌سیب به مدت ۳ هفته در ۲۲°C نگهداری شود، کمی کاهش می‌یابد.

**جدول ۵-۹ اثر فرآیند پاستوریزاسیون بر غلظت پتولین**

| (b)درصدکاهش | (a)میکروگرم در لیتر پتولین شربت‌سیب | پاستوریزاسیون | |
|---|---|---|---|
| | | زمان | درجه حرارت °C |
| ۰ | ۱۱/۵c | ثانیه ۰ | - |
| ۷ | ۱۰/۶cd | ثانیه ۱۰ | ۷۰ |
| ۱۲ | ۱۰/۰d.e | ثانیه ۱۰ | ۶۰ |
| ۱۵ | ۹/۸d.e | دقیقه ۱۰ | ۹۰ |
| ۱۵ | ۹/۷d.c | ثانیه ۱۰ | ۸۰ |
| ۱۹ | ۹/۳e | ثانیه ۱۰ | ۹۰ |

a: میانگین‌های ۶ آزمایش انجام شده روی هر ۳ نمونه‌ها

b: درصد کاهش در مقایسه با نمونه‌های حرارت ندیده

c, de: میانگین‌ها تفاوت معنی‌داری ندارند $P > ۰/۰۵$

1. High Temperature Short Time

میزان سم پتولین در آب سیبهایی که در قوطی بسته‌بندی شده بودند بعد از ۵ هفته نگهداری نیز اندکی کاهش یافت. و آب‌سیبهایی که برای یکماه در ۲۲°C نگهداری شده بودند، پتولین در آنها، به میزان کمی کاهش یافت.

پتولین در برابر تأثیرات مخرب حرارت در دامنه pH = ۳/۵-۵/۵ مقاومت نشان می‌دهد (حتی زمانی که حرارت ۱۲۵°C بکار گرفته شود) بطور کلی نتایج حاصله از بررسی مقاومت حرارتی پتولین مشخص می‌کند که در pH پائین‌تر زمان نابودی سم افزایش می‌یابد و این بخاطر ثبات پتولین در شرایط اسیدی و محلولهای اسیدی است.

۹۰٪ پتولین در محلولهایی اسیدی با pH=۳/۵ و در حرارت ۱۲۵°C و به مدت ۲۶۸ دقیقه از بین می‌رود و ۲۰٪ پتولین زمانی که نمونه حاوی پتولین در حرارت ۱۲۰°C به مدت ۳۰ دقیقه فرآیند می‌شود تخریب می‌گردد، اما سم پتولین ثبات خود را در حرارت ۸۰°C به مدت ۳۰ دقیقه حفظ می‌نماید (۳۵).

بطور کلی استفاده از فرآیند حرارتی روش کاملاً مطمئنی برای از بین بردن سم پتولین نیست.

### pH -۲-۱۰

در یک بررسی علمی اثر pH محیط روی تولید پتولین در آب‌سیب واریته سیبهای دانه‌دار براملی شمال ایرلند، مشخص کرده است که درجه pH این نوع سیبها، به طور معمول ۲/۸-۳/۲ می‌باشد. بعد از آبگیری از این سیبها به کمک پرس هیدرولیک آب‌سیب را صاف می‌کنند و سانتریفوژ می‌شود و سپس تحت شرایط خلاء از فیلتر با روزنه ۰/۲μm عبور داده می‌شود. جهت اطمینان از استریل شدن، نمونه‌ها به مدت ۳ روز در ۲۵°C نگهداری می‌شوند. بعداً نمونه‌ها را به ۷ قسمت تقسیم کرده و به کمک سود ۱ مولار درجه pH نمونه‌ها را بین ۴-۲/۸ تعین می‌کنند. سپس اسپورهای کشت ۶ روزه پنی‌سیلیوم اکسپانسوم که بر روی محیط کشت potato agar dextros (اُکسید) رشد پیدا کرده‌اند با کمک ۱۰۰ml آب پپتونه شستشو می‌شوند. میسلیومها و سایر مواد به کمک صافی با روزنه ۰/۲mm جدا می‌شوند، بعداً اسپورها تا رقت $۵ \times ۱۰^{۴}$ اسپور در هر میلی‌لیتر رقیق شده و به نمونه‌های آب سیب تلقیح می‌شوند.

نمونه‌ها به مدت ۰، ۱۰، ۲۰ و ۳۵ روز نگهداری می‌شوند و بعد از طی زمان مذکور، توده

سلولی را به کمک فیلتر جدا کرده و pH ماده صاف شده را در درجه حرارت اتاق به کمک pH متر اندازه گرفته و سپس پتولین نمونه‌ها را به کمک روشهای رایج اندازه گیری می‌کنند.

غلظت پتولین در نمونه‌های آب‌سیب، رابطه مستقیمی با pH اولیه آب سیب دارد.

**جدول ۵-۱۰ غلظت پتولین و pH اولیه**

لگاریتم غلظت پتولین برحسب میکروگرم در لیتر بعد از گذشت ۰، ۱۰، ۲۰ و ۳۵ روز مشخص شده است.

| مقدار تغییر غلظت پتولین برحسب میکروگرم در لیتر | میانگین | ۳۵ | ۲۰ | ۱۰ | pH اولیه |
|---|---|---|---|---|---|
| ۶۹۸ | ۲/۸۴۴ | ۲/۷۷ | ۳/۴۵ | ۲/۳۰ | ۲/۸ |
| ۲۱۵ | ۲/۳۳۳ | ۲/۱۵ | ۲/۶۵ | ۲/۲۰ | ۳ |
| ۴۵۷ | ۲/۶۶۱ | ۲/۶۰ | ۲/۹۹ | ۲/۳۹ | ۳/۲ |
| ۵۷۶۷۷ | ۴/۷۶۱ | ۴/۷۸ | ۴/۶۰ | ۴/۹۰ | ۳/۴۱ |
| ۳۸۱۰۶ | ۴/۵۸۱ | ۴/۶۰ | ۴/۶۹ | ۴/۴۵ | ۳/۶ |
| ۶۰۵۳۴ | ۴/۷۸۲ | ۴/۷۵ | ۴/۹۰ | ۴/۶۹ | ۳/۸ |
| ۱۷۸۲ | ۳/۲۵۱ | ۳/۳۰ | ۳/۵۰ | ۲/۹۵ | ۴ |

| معنی‌داربودن | مربع خطاها | اثر تیمارها |
|---|---|---|
| ** | ۰/۰۸۰ | زمان |
| *** | ۰/۱۲۳ | pH |
| NS | ۰/۲۱۲۸ | pH و زمان |

نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که پتولین زیادی در pH، ۳/۲، ۳ و ۲/۸ تشکیل نشده است ولی پتولین تولید شده در ۳/۸-۳/۴ = pH بالا بوده است. بررسیهای انجام شده نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری بین میانگین غلظت پتولین در ۳/۸ و ۳/۴ = pH وجود ندارد.

$$(LSD = 0/61 \text{ و } p = 0.05)$$

در ۳/۶ = pH، غلظت پتولین اندکی کاهش می‌یابد. در واقع پتولین در دامنه ۳/۲ < pH < ۴ تولید می‌شود. این توکسین، بوسیله بایسوکلایمس فولوا نیز در انواع آب میوه با

pH مختلف تولید می‌شود. آب‌میوه‌ها از نظر مواد مغذی مختلف‌اند و اینکه پتولین تولید شده آیا می‌تواند تابعی از غلظت مواد تشکیل دهنده باشد، هنوز مشخص نشده است، اما پژوهشگران به این نتیجه رسیدند که pH آب‌سیب یک اثر معنی‌دار روی مقدار پتولین تولید شده دارد و آب‌سیب، دانه‌دار براملی در شمال ایرلند چون pH پایینی دارد، مقدار تولید پتولین در آن بالا می‌باشد (۱۲).

## ۱۰-۳- فرآیند تخمیر

بررسیهای انجام شده نشان می‌دهد که پتولین موجود در آب‌سیب بوسیله فرآیند تخمیر حذف می‌شود و در طی تخمیر باگونه‌های ساکارومایسز طی زمان ۲ هفته مشخص شد که نمونه‌های آزمایشی حاوی پتولین، فاقد پتولین بودند یا پتولین آنها بمیزان قابل توجهی کاهش یافته بود.

در طی فرآیند تخمیر، پتولین موجود در آب سیب به مواد محلول در آب و غیر فرار متابولیزه می‌شود، ولی هنوز این ترکیبات دقیقاً شناسایی نشده‌اند.

## ۱۰-۴- افزودنیهای شیمیایی

### ۱۰-۴-۱- اسیدآسکوربیک:

چنانچه اسیدآسکوربیک به آب‌سیب حاوی پتولین اضافه شود، در طی نگهداری به مدت ۳ هفته پتولین از محیط حذف خواهد شد. ولی نمونه آب‌سیب شاهدی که توکسین پتولین داشته، ولی فاقد اسید آسکوربیک است، فقط ۱۰٪ پتولین آن کاهش خواهد یافت (۳۴ و ۲۴).

### ۱۰-۴-۲- سوربات، بنزوات و $SO_2$

در بررسی که باکپک بایسوکلایمس گونه NRRL-2615 صورت گرفته است، تأثیر این مواد شیمیایی و تولید پتولین و رشد توده سلولی را مشخص کرده‌اند. اساس انتخاب این گونه کپک، قابلیت تولید بالای پتولین در محیط کشت PDA و دمای محیط $4^{\circ}C$ با pH: ۵/۵ می‌باشد.

آب سیب طبیعی واریته Red deheck بدون هیچگونه مواد افزودنی برای آزمایش انتخاب شد.

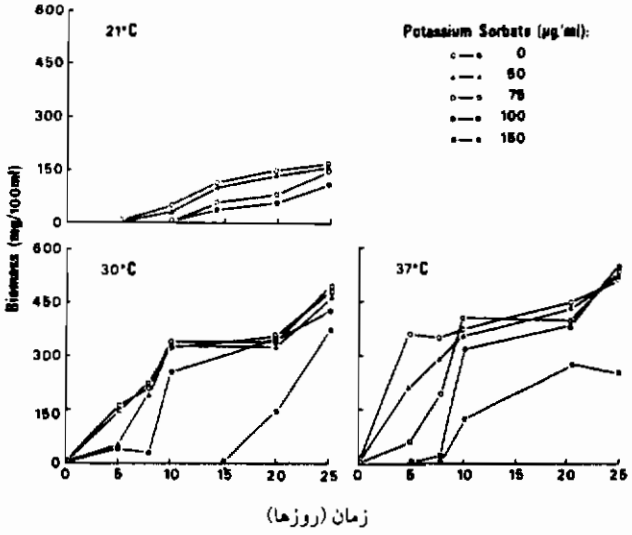
برای تهیه محلولهای خالص سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم ۲gr از آنها را به ۱۰۰ میلی‌لیتر آب فاقد یون اضافه می‌کنیم. و برای تهیه محلول $SO_2$، محلول سدیم متابی‌سولفیت یا پیروسولفیت را به میزان ۲/۹۷gr به ۱۰۰ml آب فاقد یون اضافه می‌کنیم که این معادل با ۲gr $SO_2$ می‌باشد.

در این تحقیق ابتدا غلظتهای معینی از سوربات پتاسیم (۱۵۰ μg/lit و ۱۰۰، ۷۵، ۵۰، ۰) و (۱۰۰ μg/lit و ۵۰ و ۰). و بنزوات سدیم (۵۰۰ μg/lit و ۴۰۰، ۳۰۰، ۲۰۰ و ۰) و (۴۰۰ μg/lit و ۲۰۰ و ۰) و $SO_2$ (۱۰۰ μg/lit و ۷۵ و ۵۰ و ۲۵ و ۰) و (۵۰ μg/lit و ۲۵ و ۰) به نمونه‌های آب سیب طبیعی اضافه شده و بعد از نگهداری به‌مدت ۲۵ روز در دمای ۲۱°C، ۳۰°C و ۳۷°C میزان رشد و ایجاد توده سلولی بوسیله بایسوکلایمس نیوآ و بعد از ۱۵ روز نگهداری در حرارت‌های ۳۰°C و ۳۷°C و ۲۱ روز نگهداری در ۲۱°C روند تولید پتولین در نمونه‌های آب‌سیب اندازه گیری شده است. اولین نشانه‌های رشد در مدت ۹-۸ روز بدست آمد (۳۰).

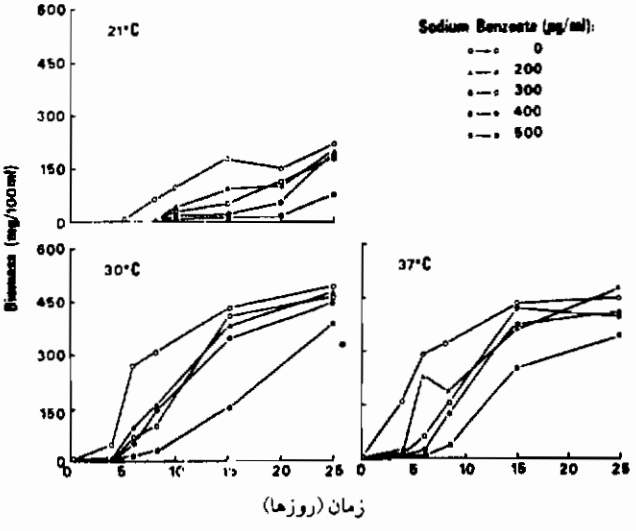
نتایج حاصله حاکی از این بود که آب‌سیبی که دارای سوربات پتاسیم در دامنه ppm(۱۵۰-۰) بود، افزایش درجه حرارت نگهداری موجب افزایش میزان رشد کپک گردید و آب‌سیبی که ppm(۵۰-۰) سوربات داشته و در دمای ۲۱°C اینکوباسیون بود در طول ۵ روز هیچ رشدی در آن بوجود نیامده ولی در دمای ۳۰°C و ۳۷°C در مدت ۵ روز رشد کپک مشاهده شد. در دمای ۲۱°C آب‌سیبی که ppm(۵۰-۰) سوربات پتاسیم داشت در طی ۱۰ روز دوره نگهداری رشد کپک را نشان داد، ولی در غلظت ppm ۱۰۰-۷۵ سوربات پتاسیم حتی در طی ۱۴ روز هم رشدی در آن دیده نشد (نمودار ۵-۳).

همانطور که در نمودار ۵-۴ مشخص شده بنزوات سدیم به‌طور معنی‌داری از رشد توده سلولی در هر غلظتی و در تمام درجات حرارت ممانعت می‌کند (۳۰).

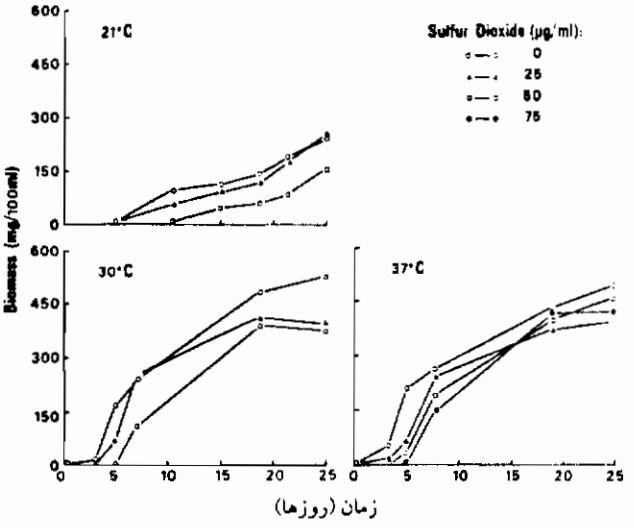
مقادیر غلظت پایین‌تر $SO_2$ در مقایسه با مقادیر غلظت سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم بیشتر سبب کاهش سرعت تولید توده سلولی می‌شود. در ۲۱°C و غلظت ۲۵ppm $SO_2$، سرعت رشد تغییر نمی‌کند، در حالی که در غلظت ۵۰ ppm $SO_2$ رشد توده سلولی متوقف می‌شود. سرعت رشد در غلظت بین ppm(۵۰-۲۵) روند کاهشی دارد. در مقادیر بالاتر $SO_2$ کاهش تولید توده سلولی بیشتر می‌شود. به طور کلی غلظتهای متفاوت $SO_2$ در مقایسه با مقادیر مختلف غلظت سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم کاملاً معنی‌دارتر روی رشد و تولید توده سلولی کپک بایسوکلایمس نیوآ تأثیر می‌گذارد.



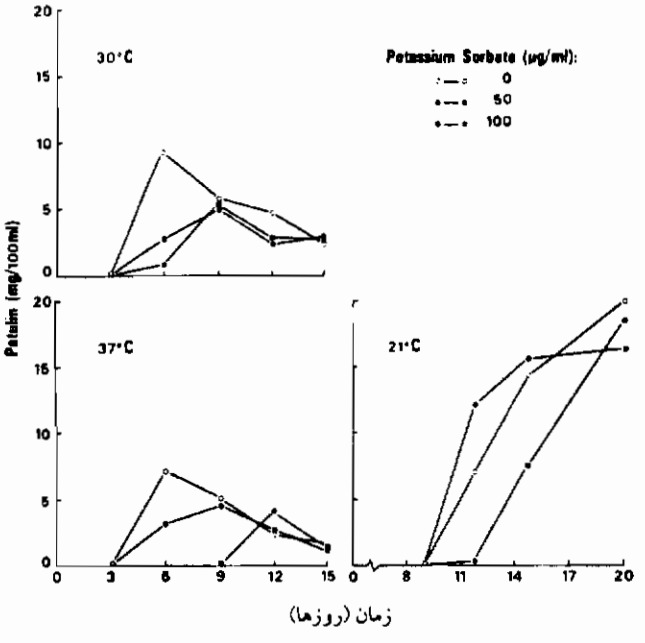

نمودار ۵-۱ اثر غلظتهای مختلف سوربات پتاسیم بر تولید توده سلولی




نمودار ۵-۲ اثر غلظتهای ppm ۴۰۰-۲۰۰ بنزوات سدیم بر رشد کپکها




**نمودار ۵-۳ غلظتهای $SO_2$ در مقایسه با غلظتهای سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم و تأثیر بر روی رشد توده سلولی کپک**

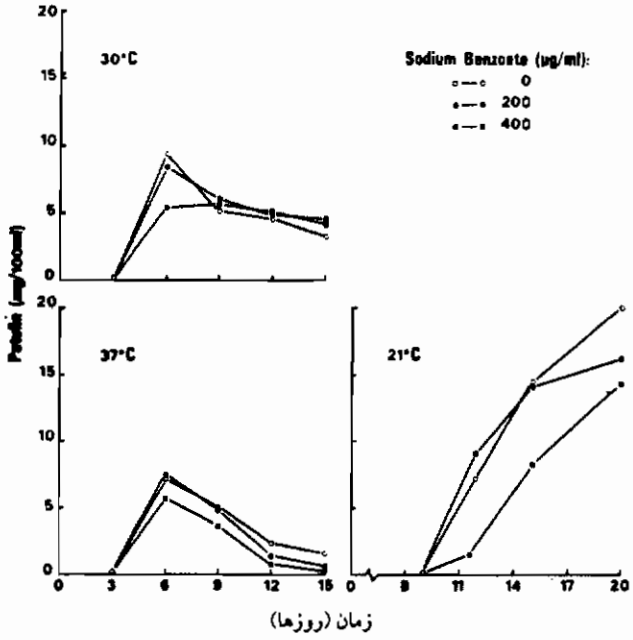



**نمودار ۵-۴ اثر غلظتهای مختلف سوربات پتاسیم بر سرعت تولید پتولین**

مشابه همین بررسیها در مورد تأثیر این مواد بازدارنده بر تولید مایکوتوکسین پتولین نیز صورت پذیرفته است. آزمایش نشان داده که میزان نفوذ پتولین در آب میوه در مقایسه با مقدار آن در میسلیوم ۹۰٪بوده است (۳۰).

در آزمایش دیگری سرعت تولید پتولین تحت تأثیر مقادیر ppm(۱۰۰-۰) سوربات پتاسیم بررسی شده و بیشترین مقدار پتولین در ۲۱°C و بعد از ۲۱ روز کشت تولید شده است. همانطورکه از منحنی ۵-۴ استنباط می‌شود تأخیری ۹ روزه در تولید پتولین وجود دارد و بعد از این ۹ روز یک افزایش قابل ملاحظه در تولید پتولین در آب سیب مشاهده می‌شود (۳۰).

در حضور ppm(۵۰-۰) سوربات پتاسیم و در مراحل نهائی کشت، غلظت پتولین هنوز رو به افزایش است. علاوه بر این، نتایج آزمایشات مشخص می‌کند که در شرایط نگهداری در دمای پایین‌تر پتولین بیشتری نسبت به حرارتهای ۳۷°C و ۳۰°C تولید می‌شود، ولی این مسأله




نمودار ۵-۵ اثر غلظتهای بنزوات سدیم بر سرعت تولید پتولین

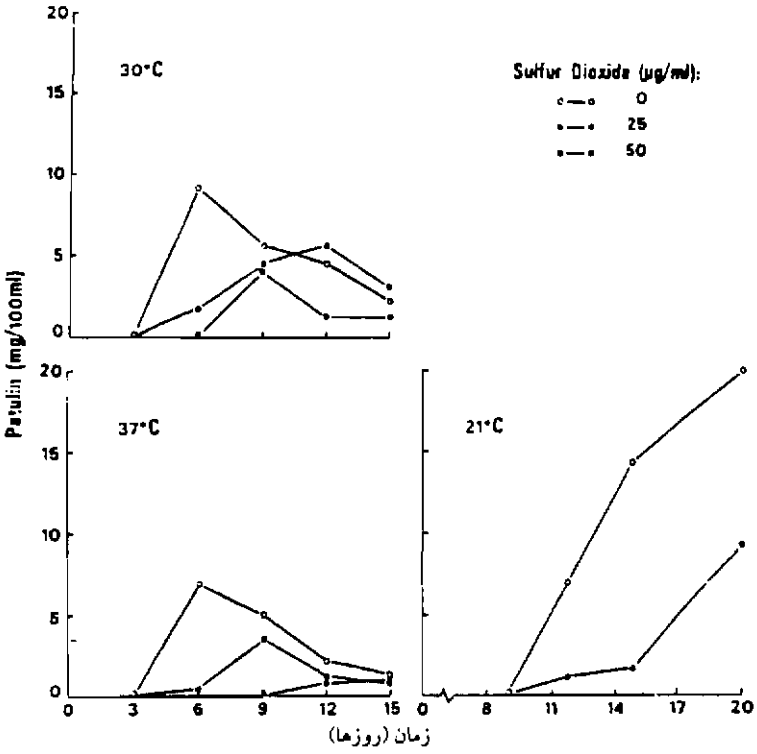
هنوز روشن نیست که چرا تولید پتولین در درجه حرارتهای پایین‌تر از اپیتیمم درجه حرارت کشت بیشتر و بهتر صورت می‌گیرد. پژوهشگران معتقدند که آنزیمهایی با خصوصیات ویژه در سنتز پتولین دخالت دارند که در درجه حرارتهای پایین‌تر فعالیت مناسبتری دارند. تولید پتولین در ۳۷°C بعد از ۶ روز نگهداری اندکی کاهش می‌یابد، مقدار پتولین بعد از اینکه به ماکزیمم رسید کاهش نسبتاً سریعی دارد.

با افزایش غلظت سوربات یعنی در محدوده ۱۵۰۰-۱۰۰۰ ppm تولید پتولین دیده نشده است (۳۰).

تولید پتولین در شرایط نگهداری آب‌سیب آلوده به کپک در ۳۰°C و ۳۷°C در مقایسه با نمونه شاهد آب‌سیب بررسی شده است. در آب‌سیبی که سوربات پتاسیم دارد، مقدار پتولین بعد از رسیدن به مقدار ماکزیمم خیلی سریع نزول می‌کند یعنی در طی ۶ روز دوره نگهداری در دمای ۳۷°C-۳۰ در نمونه‌های شاهد ماکزیمم مقدار پتولین تولید شده در ۲۱°C بعد از ۲۰ روز ۲۰mg در ۱۰۰ml بوده در حالی که آب سیب حاوی نگهدارنده بیشتر از ۱۵mg به ازای هر لیتر آب میوه پتولین داشته است (۳۰).

نمودار ۵-۶ میزان پتولین تولید شده را در غلظتهای در ppm(۳۰ و ۲۵ و ۱۰) $SO_2$ مشخص کرده است. همانطور که نتایج بدست آمده از این آزمایش نشان می‌دهد در غلظت ۲۵ppm $SO_2$ تولید پتولین متوقف شده است، مسیر منحنی میزان افزایش پتولین را در آب‌سیبی که دارای $SO_2$ نمی‌باشد مشخص می‌کند.

در ادامه همین بررسی به نمونه‌هایی از آب‌سیب طبیعی مجدداً غلظتهای معینی از نگهدارنده سوربات پتاسیم (۷۵ μg/lit و ۵۰، ۰)، بنزوات سدیم (۴۰۰ μg/lit، ۳۰۰، ۲۰۰، ۰) و $SO_2$ (۲۵ μg/lit، ۰) اضافه شده و به ترتیب در دمای ۱۲°C به‌مدت ۱۰۳، ۱۰۵ و ۱۰۷ روز نگهداری شدند و بعد از طی این زمانها به ترتیب شرایط pH، تولید توده سلولی به ازای میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی لیتر آب سیب و همچنین میلی‌گرم پتولین تولید شده در ۱۰۰ میلی لیتر آب سیب آزمایشی مشخص گردید، که در جدول ۵-۱۱ نتایج آن ثبت شده است.




نمودار ۵-۶ اثر غلظتهای مختلف $SO_2$ بر سرعت تولید پتولین

جدول ۵-۱۱ اثر نگهدارنده‌ها بر تولید پتولین و رشد کپک بایسوکلایمس نیوآ

| نگهدارنده | غلظت پتولین µg/ml | زمان تلقیح (روز) | pH | توده سلولی mg/l | غلظت پتولین mg/100ml |
|---|---|---|---|---|---|
| سوربات پتاسیم | ۰ | ۱۰۳ | ۳/۴۲ | ۴۵۳ | ۱۶/۰۳ |
| | ۵۰ | ۱۰۳ | ۳/۳۹ | ۳۳۵ | ۱۴/۶۶ |
| | ۷۵ | ۱۰۳ | ۳/۴۱ | ۳۹۵ | ۱۲/۸۴ |
| بنزوات سدیم | ۰ | ۱۰۵ | ۳/۴۱ | ۸۱۵ | ۱۸/۰۵ |
| | ۲۰۰ | ۱۰۵ | ۳/۴۲ | ۷۲۳ | ۱۷/۵۵ |
| | ۳۰۰ | ۱۰۵ | ۳/۳۹ | ۶۶۲ | ۱۷/۴۵ |
| | ۴۰۰ | ۱۰۵ | ۳/۴۰ | ۶۳۶ | ۱۷/۹۰ |
| سولفوردی اکسید | ۰ | ۱۰۷ | ۳/۳۹ | ۶/۵ | ۱۸/۰۴ |
| | ۲۵ | ۱/۷ | ۳/۴۲ | ۴۹۸ | ۱۷/۴۸ |

اطلاعات موجود بر مبنای میانگین دو تکرار در هر تیمار مشخص گردیده است.

**۱۰-۴-۳- ترکیبات سولفیددار[۱]**

اخیراً مشخص شده است که پتولین با گروههای SH ملکول سیستئین تولید اسید می‌کند ولی مکانیسم واکنش هنوز ناشناخته است. این واکنش منجربه کاهش یا عدم سمیت پتولین می‌شود. عدم ثبات پتولین درغلات و فرآورده‌های آن و انواع محصولات گوشتی نظیر سوسیس، ناشی از حضور ترکیبات سولفیدریل‌دار در این فرآورده‌ها است. پتولین محلول در آب است و به آسانی با این گروهها واکنش انجام می‌دهد (۲۴، ۱۰).

پتولین در آب‌سیب بسیار پایدار است. (حتی برای مدت بیشتر از ۳ هفته)، چون آب‌سیب علاوه بر اینکه دارای pH پایینی است، حاوی گروههای SH یا سولفیدریل کمتری نیز در مقایسه با سایر آب‌میوه‌ها نظیر آب پرتقال، می‌باشد و همین مسأله سبب آلوده شدن این محصول به کپک و تولید پتولین در آن می‌شود (۲۴ و ۱۰).

اطلاعات راجع‌به سمیت و ساختمان ترکیبی که حاوی به هم پیوستن پتولین و گروههای سولفیدریل است زیاد نیست. عقیده بر این است که بوسیله اندازه گیری فعالیت بیولوژیکی می‌توان ماهیت این ترکیبات را شناسایی کرد، هرچند که میزان آن تغییر می‌کند (۲۴).

نتایج یک بررسی نشان می‌دهد که چنانچه نمونه‌های حاوی پتولین بیشتر از ۳۰۰ روز نگهداری شوند، ۵۵٪ سَم آنها کاهش می‌یابد، ولی اگر به همین نمونه‌ها ۲۰۰ ppm، $SO_2$ اضافه شود، ۵۰٪ سم در طی ۱۰ روز کاهش می‌یابد و چنانچه مقدار ۱۰۰ ppm $SO_2$ به نمونه‌ها اضافه شود و سپس بمدت ۱۵ دقیقه در ۷۵°C حرارت داده شوند باز هم در طی ۱۰ روز ۵۰٪ سم کم می‌شود، و زمانی که به نمونه ۱۰۰ ppm، $SO_2$ اضافه می‌شود ولی نمونه، حرارت نمی‌بیند برای کاهش ۵۰٪ درمیزان‌سم،زمانی‌معادل ۴۰ روزلازم‌می‌باشد(۲۴)(۱۰).

## ۱۰-۵- پتولین وشرایط اتمسفری محیط

در تحقیقی جهت بررسی نقش اتمسفر کنترل شده[۲] بر میزان تولید پتولین در شرایط اکسیژن ۳٪ و دی‌اکسید کربن ۳-۱٪ و دمای ۳۸°F-۳۲° (معادل ۳/۳°C-۰) و رطوبت نسبی ۹۰٪ گونه‌های پنی‌سیلیوم اکسپانسوم (NRRL(۱۰۷۱ و (NRRL(۹۷۳ انتخاب شدند. نوع سیب،

---

۱. (دارای گروه SH هستند.)

2. Controled atmosphere

میشیگان واریته Red delicious بود که کاملاً بدون عیب بود. سیبها به چهار قسمت مساوی تقسیم شدند، ۲ قسمت باگونه پنی‌سیلیوم NRRL۱۰۷۱ و ۲ قسمت باگونه پنی‌سیلیوم NRRL۹۷۳ تلقیح گردیدند.

سوسپانسیون اسپورها از طریق سوراخ کوچکی، وارد سیب‌ها شدند، بعد یک قسمت تلقیح شده واریته ۱۰۷۱ و یک قسمت تلقیح شده واریته ۹۷۳ در شرایط اتمسفر کنترل شده اینکوباسیون گردیدند و یک قسمت باقی مانده از هر کدام، در هوای معمولی نگهداری شدند.

در پایان اینکوباسیون، قسمتهای فاسد شده از قسمتهای سالم نمونه‌هایی که در حضور هوا نگهداری شده بودند جدا گردیدند، سپس توزین شده و پتولین آنها استخراج و اندازه گیری شد.

سیبهایی که در شرایط اتمسفر کنترل شده نگاهداری شده بودند بعد از ۱۴ هفته بررسی شدند، زیرا هدف اصلی اجازه دادن به کپک برای رشد و تولید سم تا سطح صدمه قارچی ۲۵٪ از کل سیب بود، اما این کار برای سیبهایی که با پنی‌سیلیوم اکسپانسوم NRRL۹۷۳ تلقیح شده بودند، عملی نبود زیرا صدمه این قارچها در اتمسفر کنترل شده محدود می‌باشد (۲۲).

**جدول ۵-۱۲ غلظت پتولین موجود در بافتهای فاسد و سالم سیبهای تلقیح شده با پنی‌سیلیوم اکسپانسوم ۱۰۷۱**

| اتمسفر کنترل شده | | هوای معمولی | | |
|---|---|---|---|---|
| درصد از سیب کامل | غلظت پتولین $\mu g/ml$ | درصد از سیب کامل | غلظت پتولین $\mu g/ml$ | نمونه |
| | | بافت فاسد | | |
| ۳۰ | ۰/۶ | ۴۴ | ۲/۰ | ۱ |
| ۲۲ | ۰/۴ | ۳۳ | ۳/۰ | ۲ |
| ۲۴ | ۰/۴ | ۲۴ | ۲/۰ | ۳ |
| ۲۹ | ۰/۶ | ۳۱ | ۳/۰ | ۴ |
| | | بافت سالم | | |
| ۷۰ | <۰/۱ | ۵۶ | <۰/۱ | ۱ |
| ۷۲ | <۰/۱ | ۵۷ | <۰/۱ | ۲ |
| ۷۵ | <۰/۱ | ۷۶ | <۰/۱ | ۳ |
| ۷۱ | <۰/۱ | ۶۹ | <۰/۱ | ۴ |

* : غلظتهای کوچکتر از ۰/۱$\mu g/ml$ پتولین به عنوان نتایج منفی گزارش شده است.

غلظت پتولین در بافتهای فاسد و در شرایط نگهداری در هوای معمولی در دامنه ۲-۳μg/ml و با میانگین ۲/۵μg/ml بود. و بخشهای فاسد شده ۴۴-۲۴٪ کل وزن را با میانگین ۳۳٪ از کل سیب در برگرفتند. غلظت پتولین در شرایط اتمسفر کنترل شده در دامنه ۰/۴-۰/۶μg/ml (با میانگین ۰/۵μg/ml)بود. بخشهای فاسد ۳۰-۲۴٪ و میانگین ۲۷/۸ کل وزن سیب را شامل می‌شدند (۲۲).

پنی‌سیلیوم اکسپانسوم NRRL۹۷۳ توانایی محدودی در ایجاد فساد سیب دارد. در شرایط نگهداری در اتمسفر کنترل شده شدت فساد در محدوده ۱۵-۵٪ با میانگین ۱۲/۳٪ کل وزن سیب می‌باشد، اما در شرایط هوای معمولی مقادیر خیلی کم پتولین در بافت‌های صدمه دیده و سالمی که تلقیح شده بودند وجود داشت. حدود ۳ میکروگرم در هر لیتر با دامنه ۴-۱ میکروگرم به ازای هر میلی‌لیتر تولید گردیده بود. میانگین درصد وزن کل سیب و اجزای فاسد شده در حدود ۳۲/۸٪ با دامنه ۴۰-۲۵٪ بود. بنابراین هم پنی‌سیلیوم اکسپانسوم NRRL ۹۷۳ و هم واریته

**جدول ۵-۱۳ تولید پتولین در سیبهایی که با پنی‌سیلیوم اکسپانسوم NRRL۹۷۳ تلقیح شده‌بودند.**

| | اتمسفر کنترل شده | | هوای معمولی | | |
|---|---|---|---|---|---|
| درصداز سیب‌کامل | غلظت پتولین μg/ml | درصد ازسیب کامل | غلظت پتولین μg/ml | نمونه |
| | | بافت فاسد | | |
| ۱۴ | <۰/۱ | ۴۰ | ۴/۰ | ۱ |
| ۸ | <۰/۱ | ۳۰ | ۴/۰ | ۲ |
| ۱۲ | <۰/۱ | ۳۱ | ۳/۰ | ۳ |
| ۱۵ | <۰/۱ | ۲۵ | ۱/۰ | ۴ |
| | | بافت سالم | | |
| ۸۵ | <۰/۱ | ۶۸ | <۰/۱ | ۱ |
| ۹۲ | <۰/۱ | ۶۵ | <۰/۱ | ۲ |
| ۹۸ | <۰/۱ | ۶۹ | <۰/۱ | ۳ |
| ۸۵ | <۰/۱ | ۷۵ | <۰/۱ | ۴ |

* : غلظت‌های کوچکتر از ۰/۱μg/ml پتولین به عنوان نتایج منفی گزارش شده است.

NRRL۱۰۷۱، قادر به تولید پتولین در سیبهای نگهداری شده در $۳۲^{\circ}F$ در شرایط هوا معمولی می‌باشند و مقدار قابل ملاحظه پتولین فقط توسط گونه ۱۰۷۱ در چنین شرایطی تولید می‌شود. قابلیت محدودکردن تولید پتولین در شرایط اتمسفر کنترل شده و ایجاد فساد و خرابی بافتهای سیب ۵ برابر شرایط سیب‌هایی بود که در حضور هوای معمولی نگهداری شده‌بودند (۲۲).

### ۱۰-۶- تشعشع

اثر اشعه گاما روی غلظت پتولین و سایر ترکیبات شیمیایی کنسانتره آب سیب ضمن نگهداری در $۴^{\circ}C$ مورد بررسی قرار گرفته و مشخص گردیده است که حذف مایکوتوکسین پتولین تابعی است از دوز جذب شده اشعه. برای مثال دوز ۰/۳۵Gray اشعه گاما، غلظت پتولین را ۵۰٪ نسبت به غلظت اولیه آن، کاهش می‌دهد.

زمان نگهداری، تأثیری در میزان غلظت پتولین کنسانتره اشعه دیده نخواهد داشت، اما مقدار ترکیبات کربونیلی، اسید آسکوربیک آن کاهش می‌یابد. اسیدیته کنسانتره مقدار کمی افزایش می‌یابد و واکنشهای قهوه‌ای شدن آنزیماتیک نیز در ضمن نگهداری کنسانتره اشعه دیده در مقایسه با اشعه ندیده افزایش نشان می‌دهد.

برای تأمین اشعه از منبع کبالت ۶۰ استفاده می‌گردد و بریکس کنسانتره حدود ۷۰-۶۵ می‌باشد. اشعه دادن محلولهای آبکی حاوی پتولین سبب می‌شود که جذب UV پتولین کاهش یابد و علاوه بر آن مقادیر قند و اسیدهای آمینه کنسانتره نیز کم شود (۳۶).

### ۱۰-۷- زغال چوب

بکارگیری فیلتر و صاف کردن آب‌سیب آلوده به پتولین سبب حذف پتولین از فرآورده می‌شود، در واقع فیلتر کردن با زغال چوب و عبور دائم و چرخش آب‌سیب از بستر زغال، سبب حذف پتولین می‌گردد (۳۶، ۳۴ و ۶).

## ۱۱- نفوذپذیری و انتقال پتولین

میزان نفوذپذیری و انتقال پتولین در سیبهای سالمی که باگونه پنی‌سیلیوم تلقیح شده‌بودند، بررسی شده است. بدین‌صورت که پتولین ابتدا استخراج می‌شود و مقدار انتقال و نفوذ آن در هر

سانتی‌متر از هر نقطه تلقیح اندازه گرفته می‌شود.

برای انجام این تحقیق سیبهایی که کاملاً سالم هستند، با آب شسته می‌شوند و بعد با محلول ۱٪ هیپوکلریت سدیم به مدت ۹۰ ثانیه ضد عفونی می‌شوند و بعد هر سیب با کشت ۵ روزه پنی‌سیلیوم اکسپانسوم آلوده می‌شود. در واقع میسلیومهای کپک بر روی محیط کشت potato dextros agar کشت یافته و بعد از ایزوله کردن به داخل سیب تلقیح می‌شوند. عمق تلقیح ۳mm است و سیبها در ۲۵°C نگهداری می‌شوند.

زمانی که قطر محل خرابی و فساد سیب به ۴/۸-۳/۶ سانتی‌متر رسید به کمک کاردکهای مدور ضد زنگ تا قطر ۴/۸-۳/۶ با عمق دقیقی که کپک رشد کرده است، بافت خراب و فاسد از سیب حذف می‌شود، سپس با کمک محلول ۱۲٪ سدیم هیپوکلریت ضدعفونی شده و با آب شستشو می‌شود. طول کاردکها ۱۰cm و قطر داخلی آنها ۴/۸cm-۳/۶ می‌باشد و ضخامت آنها ۱/۵mm است. بخش فاسد به ۶ قسمت با ضخامت ۱cm، تقسیم می‌شود و میزان کپک‌زدگی و بافت صدمه دیده با یک خط کش برحسب cm، اندازه گرفته می‌شود.

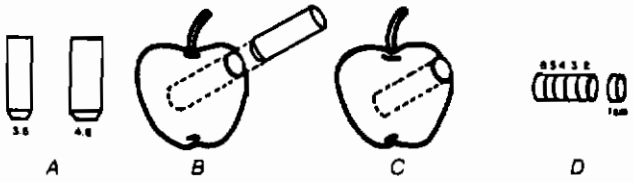
هر قسمت جدا می‌شود و پتولین آن، استخراج و اندازه گیری می‌شود. میزان پتولین بخشهای کپک‌زده در سیبهای تلقیح شده با پنی‌سیلیوم اکسپانسوم، در جدول ۵-۱۴ آمده است.

همانطور که در جدول ۵-۱۴ مشخص شده است، فساد و پوسیدگی ایجاد شده معرف حضور پتولین بیشتر بوده و در بعضی قسمتهای بدون خرابی و فساد و یا یک حالت محدود فساد و خرابی پتولین مقدار کمی حضور داشته است.

بیشترین مقدار پتولین در قسمتی از بافت سیبها مشاهده شده است که در ابتدای ۱cm فساد بوده‌اند و درفاصله یک سانتی‌متر پایین‌تر از آخرین بخش پوسیده پتولین دیده‌نشده‌است.

بنابراین حذف بافت فاسد و خراب سیب تا عمق ۱cm حول و حوش قسمت خرابی کافی است تا کاملاً مطمئن شویم که پتولین وجود ندارد. معمولاً بیش از ۹۳٪ پتولین با حذف بخشهای فاسد و خراب از سیبهای کپک‌زده، کاهش می‌یابد و این مشخص می‌کند که پتولین در بین تمام بافت میوه سیب نفوذ نمی‌کند و حذف کردن بخش فاسد بطور معنی‌داری سبب کاهش پتولین می‌شود.

ضمناً بین وزن قسمت فاسد و غلظت پتولین ارتباط معنی‌داری وجود ندارد ولی حذف و جدا کردن بخشهای فاسد و خراب به معنی حذف کامل همهٔ پتولین نخواهد بود. ساده‌ترین راه




**شکل ۵-۳ حذف بخش صدمه دیده و بررسی میزان نفوذ پتولین در بافت**

**جدول ۵-۱۴ غلظت پتولین در قسمتهای مختلف از یک سیب کامل که عمل تلقیح روی آن صورت گرفته است**

| مقدارپتولین | مساحت قسمت صدمه دیده برحسب سانتیمتر از نقطه‌ای که عمل تلقیح صورت گرفته است | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| μg/kg | ۱ | ۲ | ۳ | ۴ | ۵ | ۶ |
| >۱۰/۰۰۰ | ۲ | - | - | - | - | - |
| ۵۰۰۱-۱۰/۰۰۰ | ۵ | - | - | - | - | - |
| ۱۰۰۱-۵۰۰۰ | ۶ | ۱ | - | - | - | - |
| ۱۰۱-۵۰۰۰ | ۶ | ۶ | ۱ | - | - | - |
| ۶/۵-۱۰۰ | ۳ | ۹ | ۱ | - | - | - |
| <۶/۵ | - | ۶ | ۲۰ | ۲۲ | ۲۲ | ۲۲ |

کل نمونه سیبها ۲۲ عدد بوده است.

برای ممانعت از آلودگی، کنترل کیفیت سیبهای استفاده شده در تولید و تهیه آب میوه است و برحسب اینکه ناحیه فاسد چه اندازه از سیب را در برگرفته باشد، باید بخشهای فاسد را حذف کرد و یا سیبها را بطور کامل دور انداخت (۱۷ و ۲).

## ۱۲- استخراج پتولین

جهت استخراج پتولین، ابتدا غلظت آب سیب را به حد، غلظت مصرفی آن رسانده (BX=۱۲) سپس به آن اتیل‌استات اضافه می‌کنند. محتویات به کمک شیکر به مدت معین کاملاً مخلوط می‌گردد، پس از جدایی کامل دو فاز از یکدیگر، فاز روئی که حاوی پتولین است به کمک پی‌پت سرنگ‌دار به یک لوله آزمایش منتقل می‌شود و به آن کربنات سدیم اضافه می‌کنند. نمونه را برای شفاف شدن، سانتریفوژ کرده و و خشک می‌کنند (سیستم بسته آب ۴۰°C

وگاز نیتروژن). به نمونه آب مقطری که با اسید استیک گلاسیال pH آن به ۴ رسیده است اضافه می‌شود. و دور آن فویل آلومینیومی پیچیده و تا زمان انجام آزمایش، در فریزر قرار داده می‌شود. محلول استاندارد پتولین از کریستالهای خالص تهیه می‌گردد و در نهایت میکروگرم پتولین در هر میلی‌لیتر، به کمک رابطه زیر محاسبه می‌گردد (۱۴):

میکروگرم پتولین در هر میلی‌لیتر = $(a \times m \times 1000 \times cf)/e$

ماکزیمم جذب در طول موج $a = ۲۷۵^{nm}$

(وزن ملکولی پتولین) $m = ۱۵۴g$

(فاکتور تصحیح که طبق روش AOAC بدست می‌آید.) $cf = ۲۶/۰۰۴$

(جذب مولی پتولین) $e = ۱۶۴۰۰$

## ۱۳- اندازه‌گیری پتولین

### ۱۳-۱- روش TLC:

بعد از استخراج پتولین، صفحات کروماتوگرافی لایه نازک را آماده می‌کنیم. این صفحات حاوی ۲۵۰$\mu$m سلیکاژل k5 می‌باشند و ابعاد ۲۰ × ۲۰ دارند.برای انجام کروماتوگرافی ابتدا صفحات را با خطوط ۱cm و ارتفاع ۱۵cm علامت‌گذاری می‌کنیم و نمونه را به میزان ۱$\mu$L در ۱cm از ته صفحات علامت می‌گذاریم. صفحات در تانک شیشه‌ای که حاوی محلول تولوئن اتیل استات ۹۰٪ و اسیدفرمیک است، قرار می‌گیرند، نسبت حجمی محلول تانک به ترتیب ۵:۴:۱ است، سپس صفحات را در در جه حرارت اتاق خشک کرده و بعد بر روی آنها فنیل هیدرازین هیدروکلرید ۴٪ اسپری می‌کنند و در حرارت $۱۱۰^{\circ C}$ به مدت ۲ ساعت قرار می‌دهند. در این صورت پتولین به صورت نقاط زردرنگ در نور مرئی دیده می‌شود. RF استاندارد پتولین 0.44 می‌باشد (۲۶).

### ۱۳-۲- روش GC:

برای تعیین پتولین در نمونه‌ها به روش GC ابتدا پتولین را به صورت مشتقات پتولین در می‌آورند. [Trimethysilyl(Tms)].این ترکیب هم برای mass spectrometry و هم برای

electron capture detection بکار می‌رود.

البته سایر مشتقات پتولین مانند کلرواستات و استات نیز در روش GC بکار می‌روند ولی مشتقات تری فلورواستات و هپتافلوروبوتیرات و تری‌فلورواستیک انهیدرات و هپتافلوروبوتریک انهیدرات، مطلوب نیستند. مشتق سازی بعد از استخراج پتولین انجام می‌شود (۳۳).

**۱۳-۲-۱- روش مشتق‌سازی**

به یک شیشه درب پیچ‌دار حاوی محلول تولوئن - استونیتریل (۹۵:۵) پتولین به میزان ۵۰۰μL اضافه می‌شود. سپس هپتافلوروبوتیریل ایمیدازول[1] به مقدار ۲۵μl افزوده شده و درب شیشه را خوب می‌بندیم و به مدت ۳۰-۲۰ ثانیه آن را خوب تکان می‌دهیم و سپس در اجاق ۶۰°C به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه حرارت داده می‌شود. آنگاه اجازه می‌دهند تا محلول سرد شود و به درجه حرارت اتاق برسد. سپس از محلول ۵٪ کربنات سدیم به میزان ۱ml و تولوئن استونیتریل به میزان ۵۰۰μL دوباره به آن می‌افزائیم و ۶۰-۴۵ ثانیه آن را تکان می‌دهیم. اگر بخش بالایی شفاف نشد، تکان دادن محتویات به مدت ۳۰-۱۵ ثانیه دیگر ضروری است. بعد به کمک یک پی‌پت ۲۵۰μL از فاز بالایی به ۴/۷۵ml محلول هپتان نرمال که دارای ۵۰ نانوگرم هگزا کلروبنزن است، اضافه می‌نماییم. مشتق پتولین در محلول ان‌هپتان به مدت مشخصی، در درجه حرارت اتاق پایدار است. غلظت پتولین در مشتقات هپتافلوروبوتیریل[2] پتولین ۰/۱μgr است که به همراه سایر حجمهای مناسب به دستگاه تزریق می‌شود (۳۳).

## ۱۳-۳- روش HPLC

اندازه گیری پتولین در روش HPLC به دو صورت انجام می‌پذیرد (۱۵).

۱- روش Tanner و Zanier

۲- روش Stray

شماتیک این روشها در زیر مشخص شده است:

---

1. HFBI 2. HFB

نمونه (۵ میلی لیتر)

↓

استخراج با محلول اتیل استات

↓

جداسازی و استخراج با محلول کربنات سدیم

↓

تغلیظ

↓

اندازه گیری با دستگاه HPLC مجهز به ستون ODS

**نمودار ۵-۷ روش Tanner و Zanier**

نمونه (۵۰ میلی لیتر)

↓

استخراج با محلول اتیل استات

↓

تغلیظ

↓

کروماتوگرافی جذبی پتولین بر روی سلیکاژل و محلولهای تولوئن و اتیل استات

↓

به نسبت حجمی (۳:۷)

↓

تغلیظ

↓

اندازه گیری با دستگاه HPLC مجهز به ستون ODS

**نمودار ۵-۸ روش Stray**

یکسری مواد مداخله گر در آب سیب وجود دارند که ضمن آنالیز باید وجود آنها را در نظر گرفت. وجود این مواد باعث می‌شود که نتایج مختلفی از غلظت پتولین بدست آید. از جمله این مواد ۵ - هیدروکسی متیل فورفورال[۱] و اسکوپولتین[۲] گزارش شده‌اند. روش HPLC قادر به جداکردن ۵ - هیدروکسی‌متیل فورفورال از پتولین می‌باشد ولی در سایر روشهای کروماتوگرافی مرسوم امکان جداکردن آنها نیست.

سرعت جریان دستگاه HPLC، ۱/۰ml در دقیقه، تنظیم می‌شود و طول موج دتکتور UV در ۲۵۴nm ثابت نگه داشته می‌شود.

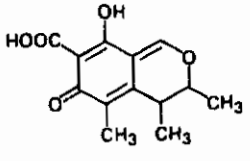
### ۱۳-۴- تستهای بیولوژیکی (Bioassay)

در این روش بوسیله اندازه گیری فعالیت بیولوژیکی میزان سم پتولین را تعیین می‌کنند. زیرا میزان فعالیت و خواص بیولوژیکی تحت تأثیر سم پتولین تغییر می‌یابد. بااین روش می‌توان وجود پتولین را تشخیص، و سپس آن را تعیین مقدار و اندازه گیری نمود (۱۴).

## ۱۴- سیترینین[۳]

این مایکوتوکسین اولین بار در سال ۱۹۳۱ شناسایی گردید. این سم جزو ترکیبات بنزوپیرونی[۴] با فرمول شیمیایی $C_{13}H_{14}O_5$ است. ساختمان شیمیایی این سم در زیر مشخص گردیده‌است (۴).

سیترینین دارای خاصیت آنتی‌بیوتیکی است و می‌تواند به عنوان یک ترکیب ضد باکتریایی




شکل ۵-۴ ساختمان شیمیایی سیترینین

1. 5- Hydroxy Merhyl Forfural
2. Scopoltin
3. Citrinin
4. Benzopyron

یا ضد قارچی عمل کند. اما خاصیت آنتی‌بیوتیکی این توکسین با باز شدن حلقه هتروسیکلیکی آن از بین می‌رود. آنتی‌بیوتیک سیترینین بوسیله قارچهای p.citrinum و p.sartoryi تولید می‌شود، این گونه‌ها علاوه بر سیترینین قادرند پنی‌سیلین و اسید گلوکونیک، اسیدسیتریک و آفلاتوکسین نیز تولید کنند. این کپکها پراکندگی گسترده‌ای در خاک، انواع مواد خوراکی نظیر سبزیجات در حال تجزیه دارند و بیشتر در مناطق گرمسیری رشد می‌کنند.

$LD_{50}$ سیترینین درموش به‌صورت تزریق زیر جلدی ۳۵mg/kg است. مصرف این توکسین تا میزان ۵۰mg/kg در والدین موشها و همچنین خوکهای نوع guinea سبب مرگ می‌شود.

$LD_{50}$ سیترینین در خرگوش به صورت تزریق داخل وریدی ۱۹mg/kg گزارش شده است. بعد از بررسی قدرت سمیت سیترینین مشخص گردیده است که این سم بوسیله اشعه UV غیرفعال می‌شود. سم سیترینین صدمه زیادی به کلیه و کبد می‌زند و اختلالات زیادی را در این نواحی ایجاد می‌کند. همچنین باعث از بین رفتن سلولهای اپی‌تلیوم مجاری کلیه می‌شود و ایجاد ناهنجاری در عملیات نفوذپذیری و ارتباطی این بافت می‌کند.

در بعضی موارد حالت فیبروزه ایجاد می‌کند و باعث می‌شود که دفع ادرار ۲ تا ۲/۵ بار بیشتر از حالت عادی شود.

چنانچه نمک سدیم سیترینین را روی پوست، یا مخاط انسان و حیوان بکار بریم، ایجاد حالت زخم شدن یا خراشیدگی می‌کند. درگیاهان سیترینین باعث اختلال در رشد و نمو می‌شود و در بعضی ازگیاهان نظیر نخود سبز، تأثیر زیادی روی غلظت نیتروژن خواهد داشت.

سیترینین به صورت عصاره الکلی از برنج کپک زده به کمک اتروبنزن استخراج می‌شود.

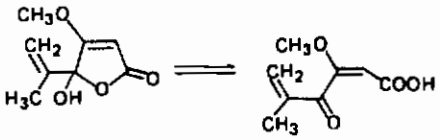
## ۱۵-اسید پنی‌سیلیک [1]

اسید پنی‌سیلیک، بوسیله رشد کپکهایی چون penicillium cyclopium و penicillium paberulum بر روی غلات، آرد و ... ایجاد می‌شود.

فرمول شیمیایی این اسید عبارت است از $C_8H_{10}O_4$ و ساختمان شیمیایی آن در زیر مشخص گردیده است (۳).

اسید پنی‌سیلیک در درجات حرارت پایین حدود(۱۰-۱ °C) تولید می‌شود و در دو فرم یا

1. Penicillic Acid.




شکل ۵-۵ ساختمان شیمیایی اسید پنی‌سیلیک

دو توتومری در محیطهای آبی یافت می‌شود.

این اسید با رشد در روی محیط کشت Roulin-thom تولید می‌شود ولی با پرورش کپک روی محیط کشت czapak-Dox ایجاد نمی‌شود.

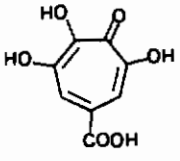
$LD_{50}$ این توکسین در موش در فرم تزریق زیر پوستی به میزان ۱۱۰mg/kg و به صورت تزریق داخل وریدی ۲۵۰mg/kg و داخل صفاقی ۶۰۰mg/kg تعیین شده است. این توکسین دارای خاصیت آنتی‌دیورتیک است و تأثیر آن بر روی قلب شبیه ترکیبات دیژیتالین[1] است.

اسید پنی‌سیلیک سرطانزا است. همچنین قابلیت ایجاد جهش در غلظتهای بالاتر از ۱۰$\mu$g/ml را نیز دارد.

علاوه بر کپکهای فوق‌الذکر، اسید پنی‌سیلیک بوسیله Aspergillus ochraceus، P.mariensir، P.fenelliae، P.divino-vivide و P.palitans تولید می‌شود.

## ۱۶- اسید پابرولیک[2]

اسید پابرولیک متابولیتی است که بوسیله P.puberulum تولید می‌شود. فرمول شیمیایی این اسید $C_8H_7O_7$ می‌باشد و ساختمان شیمیایی آن در شکل زیر مشخص گردیده است (۳).




شکل ۵-۶ ساختمان شیمیایی اسید پابرولیک.

این توکسین سبب مرگ گوسفندان و اسبها می‌شود.

---

1. Digitalin 2. Puberalic Acid

## منابع


1- Abdelhamid, A. M, Dorra, T.M. 1990. Study on offects of feeding laying hens on separate mycotoxins (Aflatoxins, patulin, citrinin) contaminated diet on the egg. Archives of animals nutrition. 40(4). 305-316.

2- Andersson, A; josefsson-E. 19?9. Patulin in fruit, berries and juices. Methods for elimination of patulin. Var-Foeda; 31(6). 365-374.

3- Anon. 1984. The mycotoxin in problem. Lebensmittel-and Biotechnologic; No 2, 49-55.

4- Bassett., E. et Tannenbaum S. 1958.--The metabolic produets of Penicillium Palulum and their probable interrelationship. Experientia, t. XIV, p. 38-40.

5- Bergel, F., Morrison A. L., Moss A. R., KLEIN R., RINDERKNECHT H. et WARD J. L. 1943.-- An antibacterial substance from Aspergillus clavatus and Penicillium claviforme and its probable identity with patulin. Nature, G.B., t. CLIII, p. 750.

6- Battaglia, R. 1972. Application of HPPC. Ernaehrung. 5(2). 57-60.

7- Bourdiol, D. and Escoula, 1. and sulvayre, R. 1990. effects of patulin on microbicidalactivity of mouse peritoneal macrophages food. Food and chemical To-xicology. 23(9). 29-33.

8- Buerger, MG. Brakhage, AA. Creppy. EE. Eirheimer, G. Roeschenthaler, RJ. Chambers, pl. chambers, CM. Eirheimer, G. 1988. Toxicity and Mutagencity of patulin in different test systems. The Target organ and the toxic process, 12. 348-35.

9- Burke, SD. 1991. Synthesis of hormonal, antibiotic and antifungal agents. Crisp Data. Base National Institutes of Health.

10- Burroughs, EF. 1977. Stabilitynof patuin to sulfur dioxide and to yeast fermentation. Journal-of- The- Association- of- official- Analytical- chemists; 60(1). 100-103.

11- Dauben, H. J. et Weisenborn F. L. 1949.--The structure of patulin. J. Am. Chem. Soc., t. LXXI, p. 3853.

12- Damoglou, AP. and Campbell, DS. 1986. effect of PH on production of patulin in apple juice. Letter in applied microbiology. vol (2) 9-11.

13- Egmond, Hpvan., speijers, GJA. wouters, R.B. 1990. Narural toxic substances in foods. 1-Mycotoxins. Voeding 51(4)- 82-86.

14- Ettre, Is. Rohrschneider, l. Schomburg, G 1980. Determination patulin in apple juice. Chromatograph ia vol (13). No(7). 435-26.

15- Forbito, PR. Babsky, N. 1985. Rapid, liquid chromatographic, Deter mination of patulin in apple juice. J. Assoc, off. anal, chem, vol (68) No (5). 950. 951.

16- Garza, He. Ssanson, BG. and Branen, AL. 1977. Toxicological study of patulin in monkeys. journal of food science . V. 142 . N. 5 . 1929-1231.

17- Harrison, MA. 1989. Presence and stability of patulin in apple products , AREview. Journal

of food sefety. vol 9. 147-153.

18- Harwig, J. Scott, P.M; kennedy, BPC;chen, YK.1973. Dis appearance of patulin from apple juice fermented by sacharomyces spp. Canadian-Institute of- food-science-and-Tech nology-journal; 6(1)45-46.

19- Johnson, J. R., Bruce W. F. et Dutcher J. D. 1943.-- Gliotoxin, the antibiotic principle of Gliocladium fimbriatum. I. Production, physical and biological properties. Amer. Chem. Soc. J., t. LXV, p. 2005-2009.

20- Josefsson, E.Andersson, A. 1976. Patulin in apple cider drinks. var - foedo, 28(8) . 189-196.

21- Krishna, Reddy, V. Reddy, SM. 1988. Biochemical changes and patulin and terreic acid production by aspergillus terreus in different cultivars of maize. Journal of food science and technology ,India-vol 25 No, 4 , 247. 248.

22- Lovett, j. Thompson, Rubeng JR. and Breooa, K. Boutin. 1975. patulin production in apple stored in controlled a mosphere. Journal of the AOAC, vol 58, No 5. 912-916.

23- Levenberger, U. Gauch, R. and Baumgarlner E. 1978. patulin in fruit juices by high-pressure lipuid of thin layer chromatography. Journal of chromatography. (161) 303-304.

24- Lindroth, S. von wright A, 1990. Detoxification of patulin by adduct formation with cysteine J Environ pathol Toxicol oncol; vol 10, Iss 4-5, 254-259.

25- Matthiasschk, R. Korte, 1990, Embryotoxicity and mutagencity of mycotoxins, JEPTO. vol (10) No (1-2) p, 1-7.

26- Nowotny, P. Baltes, w. kroenert, w. weder. R. 1983. Thin layer chromatographic method for determination of 22 my cotoxin in mouldy food. chemie mikrobiologie technoligie der lebensmittel, 8(1). 24-28.

27- Reddy, C. Chanping, K. Hayesdwallace, A. 1978. Tratogenicand Dominant lethal studies of patulin in mice. Toxicology vol 11, 219-223.

28- Richard, F. keeler and Anthony, T.T.V.1983 plant and fungal toxins. hand book of natural Toxins. vol 1, 218-329.

29- Riley, RT. and showkej, L. 1991. Mechanism of patulin, s cytotoxicity and the antioxidant activity of indole tetramic acids. Toxicol. Apple. PHARMACOL; VOL 109-No. 1, 108-126.

30- Roland, JO. and Beuchat, LR. 1984. patulin production by Byssochlamys Nivea in apple juice as affected by sorbat, Benzoate, so, and temperature. journal of food science. vol (42) 402-406.

31- Sakthisekaran, D. shanmugasundaram, ER. 1990. Effect of patulin on the kenetic properties of the enzyme aldolase studied in rat liver. Biochem Int; vol 21, Iss1, 117-34.

32- Tannenbaum, S. W. and Basset E. W. 1960.--The biosynthesis of Patulin. I. Related aromatic substances from Penicillium patulum, strain 2159. A. Biochim. Biophys. Acta, t. XXVIII, p. 21-31, 1958 et t. XL, p. 3.

33- Tarter, DE. j. and scott. PM. 1991. Determination of patulin by capillary gas chromatography of the hepta fluro butyrate derivative. journal of chromatography, 538, (441-446).

34- Van-jar., 1989. Removal of patulin from apple juice by charcoal treatment. Dissertation Abstracts- International- B; 49(9), 3527. order No: DA 882-901.

35- Wheeler, JG.Harrison, MA. koehler, PE. 1987. Presence and stability of patulin in pasteurized apple cider, journal of food patulin in pasreurized apple cider, journal of food science, vol 52, No 2. 479-480.

36- Zegota, H. Zegota, A. Bachmann, s. 1988. effect of irradiation and storage of patulin disappearance and some chemical constituents of apple juice concentrate. Zeitschrift- fuer- Lebensmittel- untersuchung- und- forschung, 192(1)- 10.