

السموم الفطرية: الباتولين Patulin وجودة الفواكه (التفاح) المنتجات القائمة عليها

"مراجعة شاملة و محدثة"

صفي الدين عبد الله انبيه¹ جمعة العارف الحاي²
لطفي عبد الحميد المسلاتي³ علي عادل أحمد⁴
قسم علوم الأغذية - كلية الزراعة - جامعة الزيتونة¹.
كلية الطب البيطري - جامعة الزيتونة^{2,3,4}.

الملخص

تعتبر الفواكه "التفاح" والمنتجات القائمة على التفاح من بين الأغذية الأكثر شعبية في جميع أنحاء العالم وذلك لقيمتها الغذائية وفوائدها الصحية لجسم الإنسان. ومع ذلك، تتعرض محاصيل الفواكه "فاكهة التفاح" إما في الحقل/ أو بعد الحصاد، وكذلك أثناء التخزين للغزو الفطري وخاصة بفطريات البنسيليوم *Penicillium spp* نتيجة لحدوث إصابات أو جروح بالطبقة الخارجية، والتي تؤدي إلى تكون ما يعرف التعفن الأزرق للفاكهة. يعتبر الفطر *Penicillium expansum* المسئول الرئيسي عن تعفن ثمار التفاح وكذلك إنتاج ما يعرف بالباتولين عند ظروف بيئية من درجة حرارة ورطوبة. الباتولين هو أحد أنواع السموم الفطرية التي يتم إنتاجها بشكل أساسي كمستقلب ثانوي "نواتج ثمتيل ثانوي" بواسطة الأنواع الفطرية، حيث أشارت العديد من الدراسات إلى وجود هذا السم الفطري في التفاح والمنتجات القائمة على التفاح بتركيزات متفاوتة في التفاح، عصائر التفاح و الأغذية المصنعة. وبالتالي، وجود الباتولين في السلع الغذائية المختلفة يشكل خطراً كبيراً على السلسلة الغذائية ومخاوف صحية خطيرة على صحة الإنسان وكذلك يشكل تهديداً اقتصادياً. لذلك دعت الحاجة إلى اعتماد استراتيجيات فعالة للكشف والتخفيف من الإصابة. حيث يعتبر فهم مصادر المنشأ وآلية التخليق الحيوي ضرورة لتصميم استراتيجية إدارة فعالة ضد هذا التلوث الفطري. تهدف هذه المراجعة إلى تقديم مراجعة شاملة ومحدثة لمصادر حدوث الباتولين في الأطعمة المختلفة وآليات التخليق الحيوي الخاصة بها. كما يوفر معلومات بشأن الآثار

الضارة للباتولين على الإنسان والزراعة بالإضافة إلى استراتيجيات الكشف والتقدير الكمي للباتولين وبالإضافة إلى الإدارة والسيطرة الفعالة.

الكلمات المفتاحية: apples; apple-based products; patulin; Mycotoxins in fruit
blue mold; Penicillium expansum; detoxification

1. المقدمة

فاكهة التفاح (Rosaceae، Malus sp.) هي أحد المصادر الغنية بالمغذيات الضرورية التي يحتاجها جسم الإنسان كالكربوهيدرات والفيتامينات والألياف، حيث يوصى بشدة بتضمينه في النظام الغذائي الصحية لما له من الفوائد الصحية، فهي تساهم في الوقاية من الأمراض المزمنة (Le Gall et al., 2016). وفقاً لتقارير منظمة الأغذية والزراعة (الفاو)، احتل التفاح ومنتجات التفاح (العصائر، المهروس، شراب التفاح، المركبات، إلخ...) المرتبة 17 في قائمة أعلى السلع المنتجة في جميع أنحاء العالم ومع ذلك، فإن فاكهة التفاح كبقية الفواكه الأخرى /أو المحاصيل الزراعية، تتعرض للإصابة أو العدوى بفطريات الفاكهة الموسمية، وإلى حد كبير بأمراض ما بعد الحصاد. حيث أشارت التقارير إلى أن ما يقرب من 25 ٪ و 50 ٪ من خسائر منتجات الفاكهة ناتجة عن مسببات الأمراض الفطرية أثناء تخزين فاكهة التفاح طويل الأجل في البلدان المتقدمة والبلدان النامية، على التوالي (Zhong et al., 2018). فيما يتعلق بالتفاح، فإن أكثر مسببات الأمراض شيوعاً لمحصول التفاح بعد الحصاد هو فطر Penicillium expansum، الذي يؤدي في الغالب لظهور العفن الأزرق ويترتب على ذلك إفراز مستقلب ثانوي "الباتولين" بواسطة الفطر في الفاكهة (Mahato et al., 2021). غالباً ما يوجد الباتولين في أنسجة التفاح المتعفنة، تراكم الباتولين يرتبط بالأعراض الواضحة للعفن الأزرق، نتيجة لغزو جراثيم P. expansum على جروح التفاح الطازج، وإصابات الحشرات، والكدمات أثناء عمليات النقل والتداول في المزارع التفاح، حتى خطوات المعالجة النهائية للمنتجات. بالنسبة للتفاح أو التفاح الناضج بشكل مفرط والذي تم الاحتفاظ به في المخزن لفترة طويلة جداً، فإن العدس المفتوح على الجلد يكون أيضاً عرضة للإصابة ويمكن أن يهاجمها العامل الممرض بسهولة. علاوة على ذلك، فإن استعمار ونمو الفطريات، مثل P. expansum، يتأثران بالظروف البيئية كإنخفاض درجة الحرارة التي تواجهها غرف التخزين التجارية (Tannousa et al., 2018). من جانب آخر، فإن التفاح ذا الدرجة المنخفضة أو غير الصالحة يستخدم عادةً في تصنيع عصائر التفاح حيث يتراكم الباتولين في هذه المنتجات، لذلك

السموم الفطرية: الباتولين Patulin وجودة الفواكه (التفاح) المنتجات القائمة.....(34-63)

فإن إزالة التفاح الفاسد أو التالف قبل العصر موصى به بشدة من قبل منظمة الأغذية والزراعة من أجل تقليل حدوث الباتولين في المنتجات النهائية (Forouzan and Madadlou, 2018). ومع ذلك ، حتى عند استبعاد الثمار الفاسدة بجدية ، فقد تم اكتشاف الباتولين باستمرار في منتجات التفاح المصنوعة من تفاح صحي خارجياً به تعفن داخلي لا يتم إغضاله قبل عصره. يأتي هذا الاضمحلال غير المرئي من استعمار *P. expansum* في أنبوب الكأس المفتوح أثناء ازدهار التفاح (Soliman et al., 2015). بمجرد إنتاج الباتولين ، فإن العمليات التصنيعية كالبسترة التقليدية تقلل بشكل هامشي من الباتولين في عصير التفاح المعبأ. في مثل هذه الحالات، فإن العمل على تطوير استراتيجيات للسيطرة الفعالة على تلوث الباتولين في منتجات التفاح أثناء المعالجة لها أهمية كبيرة. إضافة لذلك، نظراً للاستهلاك الكبير لمنتجات التفاح بين الرضع والأطفال الصغار ، فإن وجود الباتولين في المنتجات القائمة على التفاح يشير مخاوف بشأن سلامة الغذاء في عامة المستهلكين. حيث أصبح حدوث تلوث الباتولين مشكلة عالمية، حيث أجريت العديد من الدراسات في السنوات الأخيرة لكشف وتقدير الباتولين في فاكهة التفاح والمنتجات القائمة عليها (الجدول 1).

بما أن سلامة الأغذية في الآونة الأخيرة أصبحت مصدر قلق مزدهر في جميع أنحاء العالم بسبب الارتفاع المقلق للملوثات الطبيعية الكيميائية والبيولوجية في البيئة. تعتبر السموم الفطرية أحد هذه المخاوف وتمثل فئة من المستقلبات الثانوية عالية السمية التي تنتجها مجموعة معينة من الفطريات. ولذلك ، يُنظر إلى الباتولين على أنه ملوث طبيعي في التفاح، المنتجات القائمة على التفاح، وخاصة عصائر التفاح بأنصافها المختلفة، حيث أعيد تصنيفه على أنه ضمن السموم الفطرية في الستينيات بسبب تأثيرات السمية على الحيوان والإنسان (Zhong et al., 2018). علاوة على ذلك ، كشفت العديد من الدراسات أن التسمم الحاد بالباتولين يؤدي إلى تقرح ، وهياج ، وتشنجات ، ووذمة ، وقيء ، وتلف الحمض النووي في الدماغ والكلية والكبد. ومع ذلك ، فإن تأثير التسمم المزمن في القوارض كان ساماً للمناعة ، وعصبياً ، وسمياً للجينات ، وماسخاً (Vidal et al., 2019). وبناء على ذلك، تم اعتبار كمية الباتولين في منتجات التفاح كمقياس للجودة فيما يتعلق بمعايير / ممارسات سلامة الأغذية في جميع أنحاء العالم. قامت الوكالة الدولية لأبحاث السرطان (IARC) بتصنيف الباتولين ضمن فئة المجموعة 3، لعدم وجود أدلة كافية كمادة مسرطنة . حددت المفوضية الأوروبية (EC) ولجنة الخبراء المشتركة بين منظمة الأغذية والزراعة ومنظمة الصحة العالمية ، وإدارة الغذاء والدواء الأمريكية (FDA, 2005) ، ووزارة الصحة في

السموم الفطرية: الباتولين Patulin وجودة الفواكه (التفاح) المنتجات القائمة.....(34-63)

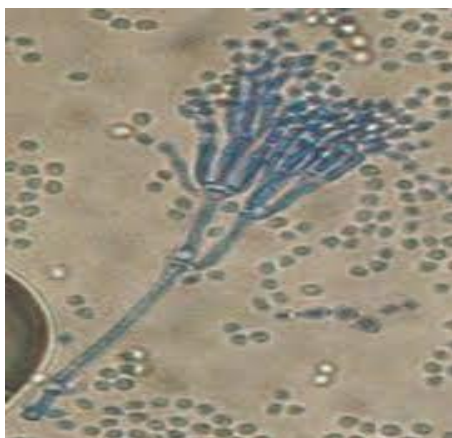
جمهورية الصين الشعبية (MHPRC, 2011)، وزارة الصحة الكندية، بشأن الإضافات الغذائية والملوثات (JECFA) الحدود القصوى المسموح بها واقترحت حداً أقصى مؤقتاً للاستهلاك اليومي المسموح به (PMTDI) يبلغ 0.4 ميكروجرام / كجم من وزن الجسم / يوم من الباتولين (Vidal et al., 2019). تم وضع الحدود القصوى الحرجة للسموم الفطرية من قبل الاتحاد الأوروبي لبعض الفواكه والمنتجات القائمة على الفاكهة وبالنسبة لاستهلاك الرضع، كان الحد 50 و 25 و 10 ميكروجرام من الباتولين / كجم لعصائر الفاكهة ومنتجات التفاح الصلبة والمنتجات القائمة على التفاح، على التوالي.

مع الأخذ في الاعتبار، تميل هذه الورقة لتقديم مراجعة شاملة ورؤى حول المصادر المختلفة وآلية التخليق الحيوي والجينات المسؤولة عن إنتاج الباتولين في الغذاء. كما يوجز تأثيره على المنتجات الزراعية وصحة الإنسان إلى جانب آلية تسممها بإيجاز. بالإضافة إلى ذلك، فإنه يناقش حركية تدهور الباتولين، وتقنيات الكشف واستراتيجيات الإدارة بإيجاز. لذلك، ستناقش هذه المراجعة العوامل والتحديات التي تؤثر على إنتاج الباتولين وإزالته من التفاح، بالإضافة إلى الاستراتيجيات الناشئة في الحد من عدوى مسببات الأمراض وتلوث الباتولين في التفاح من البساتين إلى موائد الطعام، مع التركيز على العمل المنشور في العقد الماضي، بهدف تسليط الضوء على المستقبل المرتقب.

2. المصدر الأساسي للباتولين

الباتولين تنتجه أنواع فطرية مختلفة، من أهمها *Penicillium expansum* (الشكل 1) المعروف بالمنتج الرئيسي في التفاح، منتجات التفاح وأحياناً في بعض الفواكه الأخرى مثل الكمثرى والعنب والبرتقال ومنتجاتها (Saleh and Goktepe, 2019; Vidal et al., 2019)، حيث يلاحظ إصابات الفطر على شكل تعفن بني في الخوخ والموز والمشمش والأناناس. بالإضافة لذلك، لم يقتصر تلوث الباتولين على الفواكه الفاسدة فقط، ولكن تم اكتشافه أيضاً في ثمار فواكه جذابة بصرياً. على سبيل المثال، الفاكهة ذات النواة، تم العثور على *Penicillium expansum* مما أدى إلى تعفن العفن الأزرق، حيث يخترق الغزل الفطري إلى سطح الثمار التالف الذي قد يكون ناتجاً عن إصابة الحشرات والطيور، أو الظروف الجوية السيئة أو الإصابات التي حدثت أثناء الحصاد الميكانيكي وعمليات النقل (Li et al., 2020).

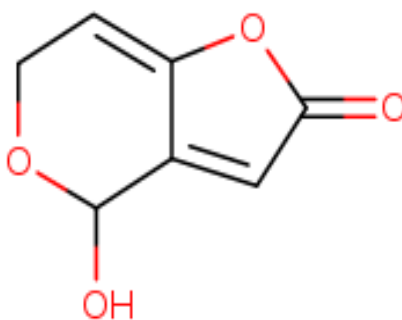
P. Expansum الشكل (1) الشكل المورفولوجي



اكتشافه أيضاً في ثمارفواكه جذابة بصرياً. على سبيل المثال، الفاكهة ذات النواة، تم العثور على *Penicillium expansum* مما أدى إلى تعفن العفن الأزرق، حيث يخترق الغزل الفطري إلى سطح الثمار التالف الذي قد يكون ناتجاً عن إصابة الحشرات والطيور، أو الظروف الجوية السيئة أو الإصابات التي حدثت أثناء الحصاد الميكانيكي وعمليات النقل (Li et al., 2020).

3. الخصائص الكيميائية والتخليق الحيوي للباتولين

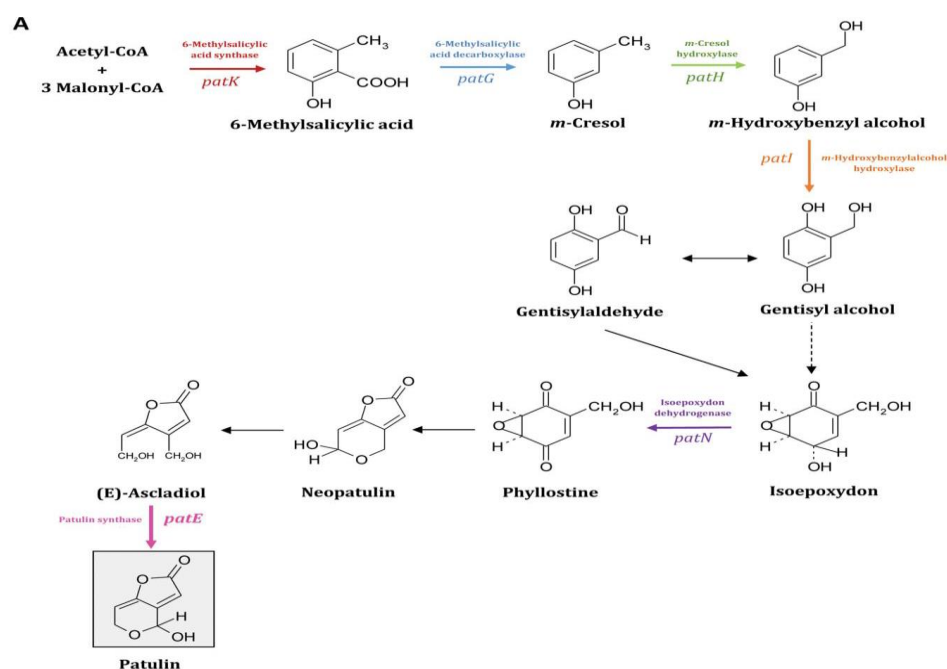
الباتولين اسمه الكيميائي هو 4- hydroxy-4H-furo[3,2-c]pyran-2(6H)-one ، وهو عبارة عن مركب عضوي لاكتوني polyketide lactone (الشكل 2)، مشابه للسموم الفطرية الرئيسية الأخرى مثل الأفلاتوكسينات Aflatoxins، الزيرلينيون Zearalenone، الأوكراتوكسينات Ochrotoxins و الفيومنزينات Fumonisin. الباتولين مقاوم للحرارة ولا يمكن تغيير طبيعته بالحرارة، وزنه الجزيئي 154.12 جم/مول، نقطة الانصهار 110 °م (Mohato et al., 2021).



الشكل (2) : الشكل الكيميائي للباتولين

السموم الفطرية: الباتولين Patulin وجودة الفواكه (التفاح) المنتجات القائمة.....(34-63)

الباتولين مستقر في الوسط المائي بين 105 و 125 درجة مئوية في نطاق الأس الهيدروجيني من 3.5 إلى 5.5 ، في حين أنه يخضع لتدهور تلقائي عند درجة حموضة أكثر قلوية. يتحلل حوالي 50٪ من الباتولين خلال ساعة واحدة عند 100 درجة مئوية في متوسط مائي عند درجة الأس الهيدروجيني 6. يتكون مسار التخليق الحيوي للباتولين من حوالي عشر خطوات ، كما هو مقترح من خلال العديد من الدراسات البيوكيميائية وتحديد الطفرات المختلفة التي تم حظرها في خطوات مختلفة من مسار التخليق الحيوي للباتولين. تتمثل الخطوة الأولى في تكوين حمض 6 -ميثيل الساليسيليك (6-MSA) عن طريق تكثيف acetyl-CoA وثلاث وحدات malonyl-CoA. يتم تحفيز هذا التفاعل بواسطة إنزيم واحد متعدد الوظائف (acetyl and malonyl transferase, ketoacyl synthase, ketoreductase, and dehydratase)، حيث له العديد من الأنشطة الأنزيمية خلال تخليق الباتولين (الشكل 3) (Notardonato et al., 2021).



الشكل (3) : خطوات مسار التخليق الحيوي للباتولين (Tannous et al., 2018)

4. حدوث وتواجد السم الفطري الباتولين في الغذاء

كما أشرنا سابقاً إلى أن الباتولين أحد السموم الفطرية، تم رصد عن حدوث تلوث طبيعي بالباتولين في فاكهة التفاح والمنتجات القائمة على التفاح في السنوات الأخيرة، حيث تم الكشف و

السموم الفطرية: الباتولين Patulin وجودة الفواكه (التفاح) المنتجات القائمة.....(34-63)

التقدير الكمي للباتولين من قبل العديد من الدراسات في العديد من البلدان في جميع أنحاء العالم، والذي يعتبر مصدر قلق كبير لصناعة الأغذية في العالم (جدول 1).

الجدول (1) : حدوث السم الفطري الباتولين في فاكهة التفاح و المنتجات القائمة عليها في بعض الدول حول العالم.

نوع المنتج	الدولة	مدي التركيزات $\mu\text{g kg}^{-1}$	تقنية الكشف والتقدير الكمي
فاكهة التفاح	برازيل	267 – 150	HPLC -DAD
	باكستان	Up to 396	HPLC-UV
	أمريكا	417.6 – 8.8	HPLC
	كندا	565	LC
	الأرجنتين	Up to 19622	HPLC
	برتغال	70.6 – 1.0	GC - MS
عصير التفاح	أسبانيا	170 – 10	LC
	إيران	1000 – 100	HPLC-UV
	السعودية	Up to 152	HPLC-FD
	إيطاليا	Up to 53.4	HPLC
	جنوب أفريقيا	Up to 1650	HPLC-UV
	تركيا	732.8 – 19.1	HPLC-UV
	قطر	82.2 – 5.8	HPLC
	الهند	1839 – 205	HPLC-UV
	تونس	122.3 – 4.0	HPLC-UV
	الصين	90.3 – 1.2	HPLC
	تشيك	28.4 – 3.8	GC-MS
	البرتغال	42.0 – 1.2	HPLC-UV
عصير التفاح المعد للأطفال	أسبانيا	Up to 29.6	GC-MS
عصير التفاح المركز	الباكستان	Up to 328	HPLC-UV
	تونس	889.0 – 4.5	HPLC
	الصين	94.7 – 1.2	HPLC-UV

Mahato et al., 2021; Sadok et al., 2019

5. تأثيرات الباتولين على المنتج الزراعي "الغذاء الزراعي"

وفقاً لبعض الدراسات من قبل الباحثين على أن الفطر المنتج للباتولين يؤثر على العديد من المنتجات

السموم الفطرية: الباتولين Patulin وجودة الفواكه (التفاح) المنتجات القائمة.....(34-63)

الشكل (4): إصابة فاكهة التفاح الغذائية ، فقد لوحظ التأثير السام أكثر شيوعاً وانتشر في التفاح. وجد الباحثون أن الخصائص الفيزيائية والكيميائية للفاكهة له تأثير على نمو الفطر وتراكم الباتولين ، مثل نشاطها المائي ودرجة الأس الهيدروجيني وكذلك توفر المغذيات بالفاكهة ، والتي تحفز نمو *P. expansum* وإنتاج الباتولين (الشكل 4) (Tannous et al., 2016; Mahato et al., 2021). علاوة على ذلك ، فإن الطبيعة الوراثية لمحاصيل الفاكهة، التي تحدد قدرتها على التحمل وقلت قابليتها للإصابة، وهذا يقلل من تراكم الباتولين. حيث وجد أن بعض أصناف التفاح مثل صنف *Malus sieversii* لها خاصية المقاومة للإصابة الفطرية و انخفاض التلوث بالباتولين. من جانب آخر، أن درجة النضج قد تؤثر على الغزو الفطري، أظهرت الثمار الغير ناضجة و المفرطة النضج انخفاضاً في الصلابة وزيادة في فرصة الإصابة للفاكهة (Mahato et al., 2021).



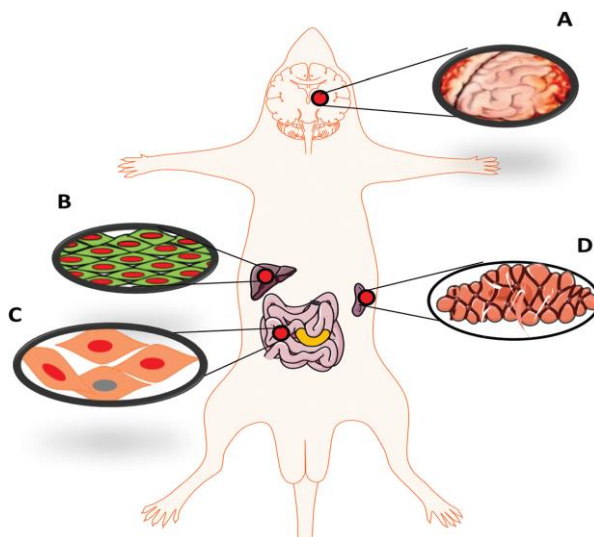
الشكل (4): إصابة فاكهة التفاح

الغذائية ، فقد لوحظ التأثير السام أكثر شيوعاً وانتشر في التفاح. وجد الباحثون أن الخصائص الفيزيائية والكيميائية للفاكهة له تأثير على نمو الفطر وتراكم الباتولين ، مثل نشاطها المائي ودرجة الأس الهيدروجيني وكذلك توفر المغذيات بالفاكهة ، والتي تحفز نمو *P. expansum* وإنتاج الباتولين (الشكل 4) (Tannous et al., 2016; Mahato et al., 2021). علاوة على ذلك ، فإن الطبيعة الوراثية لمحاصيل الفاكهة، التي تحدد قدرتها على التحمل وقلت قابليتها للإصابة، وهذا يقلل من تراكم الباتولين. حيث وجد أن بعض أصناف التفاح مثل صنف *Malus sieversii* لها خاصية المقاومة للإصابة الفطرية و انخفاض التلوث بالباتولين. من جانب آخر، أن درجة النضج قد تؤثر على الغزو الفطري، أظهرت الثمار الغير ناضجة و المفرطة النضج انخفاضاً في الصلابة وزيادة في فرصة الإصابة للفاكهة (Mahato et al., 2021).

6 . تأثيرات السمية والآثار الصحية للباتولين

على الرغم من عدم وجود أدلة كافية للادعاء بأن طبيعة الباتولين مسرطنة، فقد تم العثور على آثار ضارة أخرى مثبتة على الصحة ، بما في ذلك السمية المناعية ،السمية الكبدية ،المشاكل الهضمية والعصبية. ومع ذلك ، بعد تحديد تأثيره السام ، تم تصنيفه ضمن المجموعة 3 من قبل الوكالة الدولية لأبحاث السرطان (International Agency for Research Center IACR) (Vidal et al., 2019). التغيرات الجهازية الناتجة عن التعرض للباتولين. يؤدي التعرض الغذائي للباتولين إلى التسمم الجهازى في نظام الثدييات بعد وصوله إلى الأمعاء على طول الطعام يسبب إصابة معوية ، وقرح معوية ، التهاب ، نزيف ، تحفز الخلايا الكبدية ، الكلى ، الدماغ ، حيث يؤدي إلى تسمم عصبي (الشكل 5) (Pal et al., 2017). وبالتالي ، تأثرت الكلى والجهاز المناعي والأنسجة المعوية. بالإضافة لذلك، سمية الباتولين أنها مسؤولة عن تلف المسار التأكسدي، وهو ينطوي على تكوين مركبات معينة تحتوي على السلفهيدريل ، مما يؤدي إلى زيادة تركيز أنواع الأكسجين التفاعلية (Reaction Oxygen Species ROS) داخل الخلية، حيث يتفاعل مع المركبات النشطة بيولوجياً ويسبب ضرراً مؤكسداً ينتج عنه في النهاية تشوهات وأمراض خلوية (الشكل 5) (Pal et al., 2017).

الشكل (5): تأثيرات السمية للباتولين

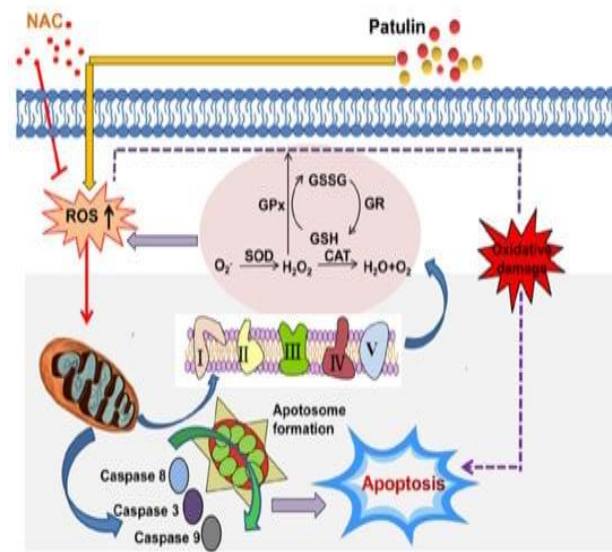


السموم الفطرية: الباتولين Patulin وجودة الفواكه (التفاح) المنتجات القائمة.....(34-63)

يؤدي الضرر التأكسدي الناجم عن الباتولين أيضاً إلى السمية الجينية التي تسبب الطفرات ، وتعديل قواعد الحمض النووي ، والروابط المتشابكة بين الخيوط ، مما يؤدي في النهاية إلى إتلاف DNA ، وكذلك أشارت العديد من الأبحاث إلى حدوث موت الخلايا المبرمج بسبب الإجهاد التأكسدي (الشكل 6) (Liu., 2021).

الشكل (5): تأثيرات السمية للباتولين

الشكل (6): تأثيرات السمية للباتولين



7. تأثير معالجة الأغذية على تراكم الباتولين

نظراً لتأثيرات السامة سائلة الذكر للباتولين، فإن بعض عمليات معالجة الأغذية قد تؤدي إلى انخفاض/ تقليل درجة التلوث بالسموم الفطرية (Ioi et al., 2017). أظهرت بعض تقنيات المعالجة المختلفة مثل التسخين والإشعاع والضغط العالي تأثيراً على مستوى تركيز الباتولين. على سبيل المثال، وجد أن البسترة على 80 م مبدئياً لمدة 20 دقيقة، متبوعاً بالتبريد لمدة 30 دقيقة عند 4 درجات مئوية، ثم بسترة العينات مرة أخرى باستخدام نفس تركيبة درجة الحرارة الزمنية كما في السابق. أظهرت النتائج انخفاضاً معنوياً بأكثر من 60% في حالة العصائر (Raiola et al., 2012). معاملة أخرى تم فيها معالجة عصي التفاح بالأوزون، حيث لوحظ انخفاض أربعة أضعاف في تركيز الباتولين عندما تعرض عصير التفاح لغاز الأوزون لمدة 15 دقيقة (Diao et al., 2019). في حين كان التخزين طويل الأجل لمدة 6 أشهر مع التدفئة والمعالجة بالضغط العالي على منتج

السموم الفطرية: الباتولين Patulin وجودة الفواكه (التفاح) المنتجات القائمة.....(34-63)

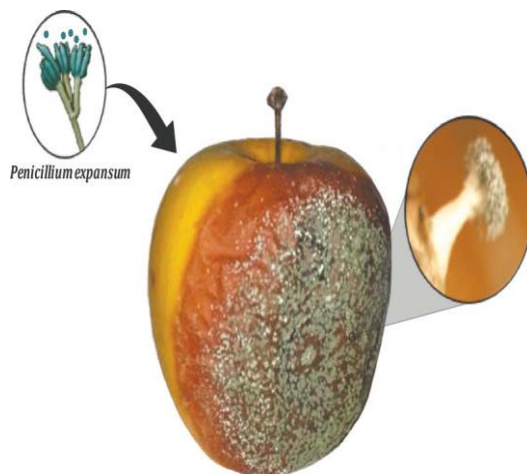
العصير، أدى لإنخفاض كبير في مستوى الباتولين (Scaccabarozzi et al., 2020). طريقة أخرى لتحطيم الباتولين هي استخدام الأشعة فوق البنفسجية، حيث كشفت عن إمكانية خفض مستوى السموم الفطرية دون تغييرات قابلة للقياس في جودة المنتج. يسرد الجدول 2 إمكانات تقنيات المعالجة المختلفة المستخدمة في المنتجات الغذائية لتقليل تركيز الباتولين.

8. العوامل البيئية المحفزة على إنتاج الباتولين

الظروف البيئية التي يحدث نمو للفطريات وإنتاج الباتولين في نطاق درجات حرارة من (0 - 24 م) مع نشاط مائي لا يقل عن (0.99) (Mandappa et al., 2018). حيث وجد تأثير نمو والتشكل مستعمرات فطر *P. expansum* بدرجة الحرارة، وكذلك إنتاج الباتولين. حيث لوحظ أنه يمكن للفطر أن ينمو جيداً عند درجة الصفر مئوي، ولكن يكون النمو أعلى وإنتاج السموم عند درجة حرارة تخزين تتراوح بين 20 - 25 درجة مئوية. ومع ذلك، يمكن للفطر إنتاج الباتولين عند درجة حرارة تتراوح من 1 إلى 20 درجة مئوية (Mahato et al., 2021). تؤثر العوامل البيئية أيضاً، مثل تكوين الغاز ودرجة الحموضة والضغط ونشاط الماء ودرجة الحرارة على سمات التفاح ولها أيضاً تأثير فسيولوجي واضح على الفطريات *P. expansum* التي قد تؤثر بفاعلية على إنتاج الباتولين (Zhong et al., 2018). لوحظت تأثيرات مماثلة عندما تم تخزين التفاح في جو بارد مع غلاف جوي (Coton et al., 2020). لوحظت تأثيرات مماثلة بواسطة Coton et al (2020) عندما تم تخزين التفاح في التخزين البارد والمحيط. كما يؤثر أيضاً الرقم الهيدروجيني على فسيولوجيا وأمراضية الفطريات، فإن إفراز الباتولين بواسطة فطر *P. expansum* يحدث عند درجة أس هيدروجيني 3-5، $PH=$ بينما ارتفاع درجة الحموضة يؤثر سلباً على إنتاج الباتولين. علاوة على ذلك، فقد وجد أن أدنى وأعلى إنتاج للباتولين عند درجة أس هيدروجيني 4 - 2.5، $PH=$ وقد انخفض إنتاج الباتولين عندما زاد درجة أس هيدروجيني 7 - 4، $PH=$ (Tannous et al., 2016). قد يكون السبب هو عدم استقرار الباتولين عند درجة الأس الهيدروجيني المرتفعة بسبب الجين *pepg1* الموجود في *P. expansum* الذي يُظهر تعبيراً خاصاً بالأس الهيدروجيني الحمضي الهيدروجيني 4 (Li et al., 2020).

السموم الفطرية: الباتولين Patulin وجودة الفواكه (التفاح) المنتجات القائمة.....(34-63)

الشكل (7): الغزو الفطري ومستعمرات البنسيليوم



9. اللوائح والتشريعات الدولية بالحدود القصوى للباتولين في الأغذية

تحدد اللائحة EC 466/2001 الحدود القصوى للملوثات المختلفة ، بما في ذلك السموم الفطرية ، بينما تحدد اللائحة CE 1881/2006 الحدود القصوى. تحدد هذه المعايير حدود السموم الفطرية ، ولكن هذه الحدود أقل تقييداً من تلك الواردة في لوائح الاتحاد الأوروبي. يُحظر استخدام الأطعمة غير المتوافقة . يجب احترام الحدود أيضاً مع الأخذ في الاعتبار طريقة أخذ العينات المحددة بواسطة اللائحة CE 401/2006. يوضح الجدول 1 الحد الأقصى للباتولين ، كما ورد في الملحق 2 من اللائحة CE 1881/2006. تهدف حدود الاتحاد الأوروبي إلى تحديد ما إذا كان يمكن تسويق الطعام أم لا. أخيراً ، وفقاً لللائحة CE 882/2004 ، يجب على السلطات المختصة في كل دولة عضو التحقق من احترام هذه الحدود.

الجدول (2) : الحدود القصوى المسموح بها للباتولين من قبل الاتحاد الأوروبي

نوع السلع الغذائية	الحد الأقصى المسموح به $\mu\text{g/kg}$
عصائر الفاكهة وعصائر الفاكهة المركزة كمعاد تكوينها ونكتارات الفاكهة	50
المشروبات الروحية وعصير التفاح وغيرها من المشروبات المخمرة المشتقة من التفاح أو التي تحتوي على عصير التفاح	50
منتجات التفاح الصلبة ، بما في ذلك كومبوت التفاح وهريس التفاح	50

السموم الفطرية: الباتولين Patulin وجودة الفواكه (التفاح) المنتجات القائمة.....(34-63)

المعد للاستهلاك المباشر	
عصير التفاح ومنتجات التفاح الصلبة ، بما في ذلك كومبوت التفاح وهريس التفاح ، للرضع والأطفال الصغار والموسومة والمباعة	10
أغذية الأطفال غير الأطعمة القائمة على الحبوب المصنعة للرضع وصغار الأطفال	10

Notardonato et al., 2021

10. طرق الكشف والتقدير الكمي للباتولين

تظهر الاتجاهات الجديدة والتحسينات المتعلقة بتحديد الباتولين بواسطة الكروماتوغرافيا في السائل LC في سلع الفاكهة في المنشورات الحديثة. لقد تناولوا العديد من القضايا المتعلقة بإعداد العينات والفصل الكروماتوغرافي بهدف زيادة الخصوصية وحدود الكشف / تحديد كمية الباتولين في مصفوفات الفاكهة المعقدة. يؤثر التعقيد العالي "درجة عالية من التعقيد" لبعض مصفوفات الفاكهة على تحليل الباتولين ، أي أنه يزعج فصل LC ، ويقلل من الانتعاش ، وكفاءة التأين للمركبات المستهدفة أثناء تحليل LC-MS. للتغلب على هذه المشاكل ، تم تنفيذ طرق مختلفة للمعالجة المسبقة للعينات لاستخراج الباتولين من مصفوفة الفاكهة. الركائز الرئيسية الثلاثة التي تستند إليها المقاييس هي التحقق من صحة الطرق ، وتقدير الارتياح في القياس وتحديد إمكانية التتبع المتروولوجي. المعايير المرجعية للجودة ، والطرق التي تم التحقق من صحتها ، وممارسات أخذ العينات الموحدة ، وطرق المعايرة المؤكدة والمواد المرجعية هي الأدوات المستخدمة لتحقيق إمكانية مقارنة النتائج التحليلية ، والسماح بالتتبع المتروولوجي واختبار الكفاءة (الجدول 3)

الجدول (3) : معايير الأداء للتحقق من صحة الأساليب التحليلية

المقياس	التعريف والمناقشة
الانتقائية Selectivity	يشير إلى "مدى إمكانية استخدام الطريقة لتحديد تحليلات معينة في الخلائط أو المصفوفات دون تدخل من مكونات أخرى لها خصائص مماثلة". يجب تحديد استرداد المادة (التحليلات) محل الاهتمام ، ويجب الإشارة إلى أي تدخل مشبوه وأي قيود على قابلية تطبيق الطريقة في تقرير التحقق
نطاق العمل والخطية Working range and	يتم تحديدها من خلال فحص العينات التي تحتوي على المادة التحليلية بتركيزات مختلفة وحساب إحصائيات الانحدار من

السموم الفطرية: الباتولين Patulin وجودة الفواكه (التفاح) المنتجات القائمة.....(34-63)

النتائج ، وعادة ما يتم ذلك بطريقة المربعات الصغرى من أجل تحديد النطاق الذي يمكن من خلاله الوصول إلى عدم اليقين المقبول. قبل ذلك ، يجب تحديد وظيفة معايرة للأداة ، لذلك يجب فحص نطاق عمل الطريقة بشكل منفصل عن نطاق الجهاز. لهذا السبب ، قد يكون من المناسب النظر بشكل منفصل في نطاق عمل الطريقة وتلك الخاصة بالأداة.	linearity
هي أقل كمية من المادة التحليلية يمكن اكتشافها بواسطة الطريقة بمستوى ثقة محدد. تختلف قيمتها باختلاف نوع العينة.	حد الكشف Limit of Detection LOD
هو أقل تركيز للتحليل يمكن تحديده بمستوى مقبول من عدم اليقين ويمكن ، بالتالي ، تعيينه بشكل تعسفي باعتباره الطرف الأدنى المطلوب لنطاق عمل الطريقة. قد تختلف تقديرات LOD و LOQ بين المصفوفات المختلفة التي تغطيها نفس الطريقة التحليلية ؛ لهذا السبب ، يجب تحديدها لكل مصفوفة.	حد القياس الكمي Limit of Quantification LOQ
هو مقياس للتوافق بين نتائج القياس المستقلة التي تم الحصول عليها في ظل ظروف محددة. عادة ما يتم التعبير عنها من خلال الانحراف المعياري. التكرار هو نوع من الدقة يمثل أصغر اختلاف في النتائج.	دقة Precision
تعبير عن مدى قرب متوسط عدد لا حصر له من النتائج (التي تنتجها الطريقة) لقيمة مرجعية. نظراً لأنه من غير الممكن إجراء عدد لا حصر له من القياسات ، لا يمكن قياس الصدق ولكن يتم تقديره عموماً على أنه تحيز ، أي خطأ منهجي. تُستخدم ثلاث طرق بشكل شائع أثناء التحقق من صحة تحديد التحيز: تحليل RMs ، وتجارب الاسترداد باستخدام عينات مسننة ، والمقارنة مع النتائج التي تم الحصول عليها باستخدام طريقة أخرى	صدق Trueness
يوفر مؤشراً على موثوقية الطريقة التي لديها القدرة على البقاء دون تغيير من خلال الاختلافات الصغيرة في معلمات الطريقة.	الصلابة (أو المتانة) Ruggedness (or robustness)
يميز نطاق القيم المنسوبة إلى المقياس بمستوى محدد من الثقة. كل نتيجة قياس لها حالة عدم يقين مرتبطة بها ، ناتجة عن الأخطاء	عدم اليقين Uncertainty

الناشئة في المراحل المختلفة لأخذ العينات والتحليل ومن المعرفة غير الكاملة بالعوامل التي تؤثر على النتيجة. بيان عدم اليقين المرتبط ينقل "جودة" النتيجة.	
--	--

Sorbo et al., 2022

10.1 طرق التحليل الباتولين

وفقاً لللائحة CE no. 401/2006 ، والتي تحدد معايير أخذ العينات والطرق التحليلية لتحديد مستويات السموم الفطرية في المواد الغذائية. من وجهة نظر تحليلية ، "حيث لا تتطلب تشريعات الاتحاد الأوروبي طرقاً محددة لتحديد مستويات السموم الفطرية في المواد الغذائية ، يجوز للمختبرات اختيار أي طريقة بشرط أن تلبى الطريقة المختارة "المعايير" وفقاً لللائحة. على سبيل المثال، هناك الطريقة الرسمية منذ عام 2000 الصادرة عن رابطة الكيمائيين التحليليين الرسميين (AOAC) الموصى بها لعصير التفاح وتحضير هريس التفاح لتحليل HPLC-UV . ومع ذلك، ويمكن لكل مختبر أن يطبق منهجيته الخاصة ولكن مع مراعاة بعض المعايير التحليلية المحددة. على وجه الخصوص ، تم الإبلاغ عن هذه مقاييس في (الجدول 3) من لائحة تحليل الباتولين في المواد الغذائية. يجب تحضير العينات ومجانستها بعناية لأن توزيع السموم الفطرية لا تكون متجانسة في العينة. تشير الأساليب التحليلية إلى بعض التعريفات بهدف توحيد استقصاء المختبرات المختلفة :

- $r =$ التكرار (Repeatability)، وهي القيمة التي دونها يُتوقع أن يكمن الفرق المطلق بين نتيجتي اختبار منفردتين تم الحصول عليهما في ظل ظروف التكرار ، أي نفس العينة ، ونفس المشغل ، ونفس الجهاز ، ونفس المختبر ، وفترة زمنية قصيرة ضمن احتمال محدد (عادة 95%) وبالتالي : $r = 2.8$
- $R =$ القابلية للتكرار (Reproducibility)، القيمة التي دونها الفرق المطلق بين نتائج الاختبار الفردي التي تم الحصول عليها في ظل ظروف التكاثر ، أي على مادة متطابقة حصل عليها المشغلون في مختبرات مختلفة ، باستخدام طريقة الاختبار المعيارية قد يُتوقع أن تقع ضمن احتمال معين (نموذجياً) من المتوقع أن تقع ضمن احتمال معين (عادة 95%) $R = 2.8 * S_R$
- S_R أو $S_r =$ الانحراف المعياري (Standard deviation) ، الانحراف المعياري ، محسوباً من النتائج المتولدة في ظل ظروف التكرار (أو التكاثر) ؛
- RSD_r أو $RSD_R =$ الانحراف المعياري النسبي ، المحسوب من النتائج المتولدة في ظل ظروف التكرار (أو التكاثر). تم الإبلاغ عن معايير تحديد الباتولين في الجدول 4.

السموم الفطرية: الباتولين Patulin وجودة الفواكه (التفاح) المنتجات القائمة.....(34-63)

الجدول (4): يبين معايير الطرق التحليلية لتقدير الكمي للباتولين

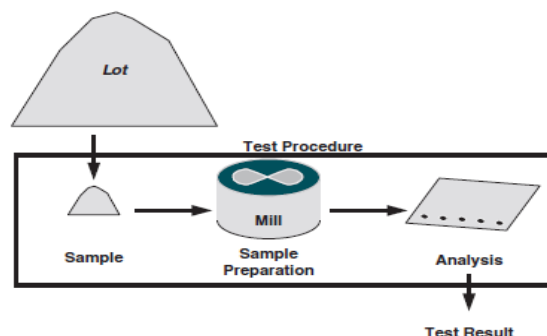
المستوى التركيز µg/kg	RSDr (%)	RSDr (%)	Recovery (%)
أقل من 20	أقل أو يساوي 30	أقل أو يساوي 40	50 – 120
20 – 50	أقل أو يساوي 20	أقل أو يساوي 30	70 – 105
أكبر من 50	أقل أو يساوي 10	أقل أو يساوي 25	75 – 105

Notardonato et al., 2021

10.2 أخذ العينات

من الصعب الحصول على تقديرات دقيقة ودقيقة للتركيز الحقيقي للسموم الفطرية للكمية السائبة عند استخدام خطة أخذ عينات السموم الفطرية التي تقيس التركيز في جزء صغير فقط من الدفعة السائبة (الشكل 8).

الشكل (8): خطوات أخذ العينات وتجهيزها للتحليل



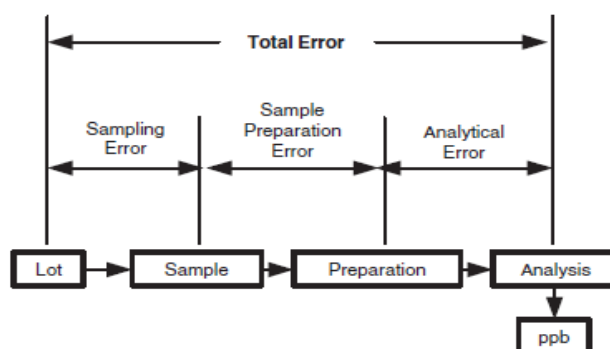
يتم تحديد خطة أخذ عينات السموم الفطرية من خلال إجراء اختبار السموم الفطرية وحدود قبول / رفض محددة. جراء اختبار السموم الفطرية عملية معقدة وتتكون بشكل عام من عدة خطوات: (1) يتم أخذ عينة من حجم معين من الدفعة ، (2) يتم طحن العينة (مطحون) في المطحنة لتقليل حجم الجسيمات ، (3) يتم إزالة عينة فرعية من العينة المطحونة ، و (4) يتم استخراج السموم الفطرية من العينة الفرعية المطحونة وتحديد كمياً. يتضح أن التباين لكل خطوة من خطوات إجراء اختبار السموم الفطرية ، كما تم قياسه بواسطة إحصاء التباين ، يزداد مع تركيز السموم الفطرية. عادة ما يكون أخذ العينات هو أكبر مصدر للتنوع المرتبط بإجراء اختبار السموم الفطرية. تباين أخذ العينات كبير لأن نسبة صغيرة من الحبوب ملوثة ومستوى التلوث على بذرة واحدة يمكن أن يكون كبيراً جداً (Ciasca et al., 2022; Tittlemier et al., 2021). في التحديد التحليلي

السموم الفطرية: الباتولين Patulin وجودة الفواكه (التفاح) المنتجات القائمة.....(34-63)

للباتولين ، يعد أخذ العينات أحد أهم القضايا نظراً لاحتمال توزيعه غير المنتظم ، حتى لو كان هذا السم الفطري موجوداً بشكل أساسي في المنتجات السائلة مثل عصائر الفاكهة (حيث يكون التوزيع أكثر تجانساً من الفواكه) (Notardonato et al., 2021) ، يحدد طرق أخذ العينات والتحليل للتحكم الرسمي في مستويات الباتولين في المنتجات الغذائية (الشكل 9) .

الشكل (9): إجمالي الخطأ في إجراء اختبار السموم الفطرية هو مجموع أخذ العينات ، وإعداد العينة

والأخطاء التحليلية



الجدول (5): الحد الأدنى لعدد العينات الإضافية التي يجب أخذها من الدفعة (للعينات السائلة)

شكل من أشكال التسويق	حجم الكلي (lot) / لتر	الحد الأدنى لعدد العينات الإضافية الواجب أخذها	الحجم الأدنى (L) أو الوزن (كجم) للعينة الكلية
السائبة (عصائر الفاكهة والمشروبات وعصير التفاح)	-	3	1
زجاجات / عبوات (عصير فواكه ومشروبات وعصير التفاح)	أقل أو يساوي 50	3	1
زجاجات / عبوات (عصير فواكه ومشروبات وعصير التفاح)	500 – 50	5	1
زجاجات / عبوات (عصير فواكه ومشروبات وعصير التفاح)	أكثر أو يساوي 500	10	1

Notardonato et al., 2021

في حالة المنتجات السائلة ، يجب خلط الدفعة بطريقة دقيقة بوسائل يدوية أو ميكانيكية قبل أخذ العينات مباشرة. في حالة أن هذا الخلط ممكن ، يمكن افتراض أن الباتولين يتم توزيعه بالتساوي داخل الدفعة. لذلك ، يكفي أخذ ثلاث عينات لتشكيل العينة الكلية ويجب أن يكون الحجم 1 لتر

السموم الفطرية: الباتولين Patulin وجودة الفواكه (التفاح) المنتجات القائمة.....(34-63)

(الجدول 5). بالإضافة إلى ذلك ، فإن طريقة أخذ العينات مطلوبة أيضاً للتحكم الرسمي في المستويات القصوى المسموح بها للباتولين في فاكهة التفاح وعصير التفاح والمنتجات القائمة على التفاح المخصصة للرضع والأطفال. في الحالة المحددة ، يجب أن تزن العينة الإجمالية 1 كجم ، واعتماداً على الدفعة ، يجب سحب أعداد محددة من العينات الأولية (الجدول 6) CE no. 401/2006.

الجدول (6): الحد الأدنى لعدد العينات الإضافية التي يجب أخذها من الدفعة (للعينات الصلبة)

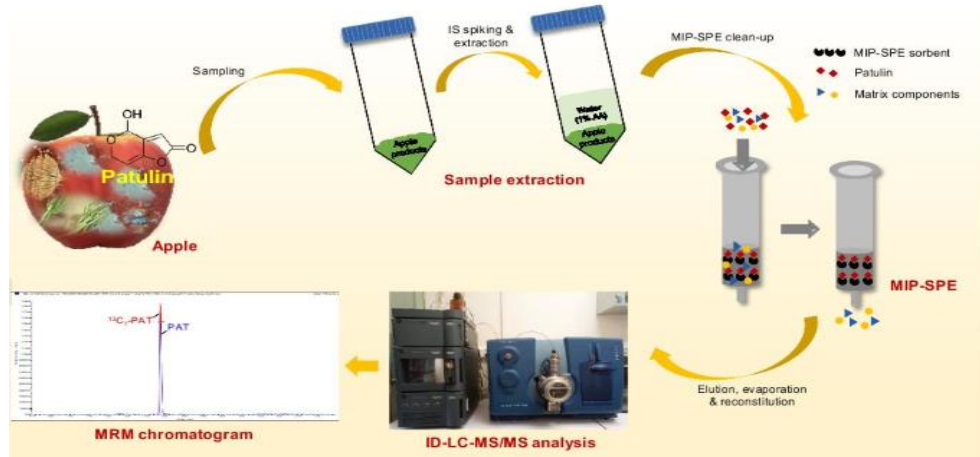
الوزن الكلي (كلجم)	الحد الأدنى لعدد العينات الإضافية الواجب أخذها	وزن العينة الإجمالية (كلجم)
1	13	أقل أو يساوي 50
1	5	50 – 500
1	10	أكثر أو يساوي 500

Notardonato et al., 2021

10.3 عمليات إستخلاص العينات وتنظيفها Sample extraction and clean-up

10.3.1 تحضير الفاكهة والمنتجات المتعلقة بها لقياس الباتولين الكمي Sample Preparation

من المهم التأكيد على أنه في المصفوفات النباتية، لا سيما الفاكهة، خارجياً لجدار الخلية الأولي والثانوي ، يوجد هيكل يسمى الصفیحة الوسطی ، والذي يتكون أساساً من البكتين والأحماض البكتيرية التي تربط الخلايا المجاورة معاً. يرتبط البكتين بشكل جماعي بمجموعة من السكريات غير المتجانسة الموجودة في جدران الخلايا الأولية. كما هو مقترح في البروتوكول الرسمي لجمعية الكيمائيين التحليليين الرسميين (AOAC 2000/02) ، يجب إجراء إذابة البكتين قبل التحليل الكروماتوغرافي للعصائر العكرة والمنتجات الصلبة القائمة على التفاح. ولذلك، عادة ما يتم إجراء إزالة البكتين قبل التحليل الكروماتوغرافي للعصائر الغائمة ومنتجات التفاح الصلبة. يتم إجراء التحلل المائي الأنزيمي للبكتين باستخدام البكتيناز مع أو بدون إضافة الأميليز. يتم تحضير العينات طوال الليل في درجة حرارة الغرفة أو لمدة ساعتين عند 40 درجة مئوية ، بالطرد المركزي ، وتخضع لمزيد من خطوات التحضير مثل الاستخراج والتنقية. سمح هذا النهج بالحصول على نتائج الاسترداد لتحليل الباتولين من عصائر التفاح العكرة التي تتوافق مع معايير الاتحاد الأوروبي (Sadok et al., 2019).



الشكل (10) مخطط عمليات الإستخلاص ، التنقية ، الكشف و التقدير الكمي باستخدام الأجهزة الدقيقة

10.3.2 طريقة إستخلاص السائل السائل الباتولين (LLE) Liquid Liquid Extraction (LLE)

الخطوة الأولى في تحليل الغذاء هي إجراء الاستخراج. يؤثر على تركيز ونقاء المركب المستهدف في العينة المستخلصة. إحدى طرق الاستخراج الشائعة هي الاستخلاص السائل (LLE). في LLE ، يتم فصل نوع واحد أو أكثر بين مذيبات غير قابلة للامتزاج أو غير قابلة للاختلاط جزئياً مع بعضها البعض. وجد هذا النهج العديد من التطبيقات في تحليل العينات المائية ، بما في ذلك الدراسات التي تركز على تحديد السموم الفطرية في مجموعة متنوعة من الأغذية. تعد طريقة LLE التي تستخدم أسيتات الإيثيل متبوعاً بتنظيف كربونات الصوديوم جزءاً من الطريقة الرسمية لعام 2000 الصادرة عن رابطة الكيمائيين التحليليين الرسميين (AOAC) الموصى بها لعصير التفاح وتحضير هريس التفاح لتحليل HPLC-UV في الآونة الأخيرة ، تم تطبيق هذه الطريقة مع أو بدون بعض التعديلات لاستخراج السموم الفطرية من التفاح وعصائر الفاكهة الأخرى. لسوء الحظ ، تزيد كربونات الصوديوم من درجة الحموضة في العينة وتسبب في تدهور الباتولين ، حيث يكون الباتولين أكثر استقراراً في الوسط الحمضي. لتجنب المشكلة ، تم أيضاً استخدام أملاح أخرى مثل كبريتات الصوديوم وكربونات هيدروجين الصوديوم. عيب LLE هو الاستهلاك العالي للمذيبات العضوية ووقت طويل نسبياً لإعداد العينة للتحليل (Notardonato et al., 2021). تم تنفيذ الإجراء النموذجي لاستخراج الباتولين من 10 جم من المنتجات المختلفة القائمة على التفاح (عصائر التفاح ، عصير التفاح المركز ، عصير التفاح المخلوط ، أغذية الأطفال) مع 25 مل من أسيتات الإيثيل. بعد 3 دقائق من الاهتزاز القوي و 5 دقائق من الطرد المركزي ، تمت إعادة

السموم الفطرية: الباتولين Patulin وجودة الفواكه (التفاح) المنتجات القائمة.....(34-63)

استخلاص الطور المائي مرتين باستخدام 20 مل من أسيتات الإيثيل. تم دمج الطبقات العضوية وتنقيتها عن طريق عدة إضافات من كربونات الصوديوم (2×3 مل) وجزء واحد 5 مل من أسيتات الإيثيل ، متبوعاً بالرج. بعد تعديل الأس الهيدروجيني والتبخير للجفاف وإعادة التكوين والترشيح ، خضعت العينات للتحليل الكروماتوغرافي (Sadok et al., 2019).

10.3.3 طريقة إستخلاص من الحالة الصلبة (SPE) Solid Phase Extraction

يعتبر استخراج المرحلة الصلبة (SPE) مثالاً آخر على نهج صديق للبيئة في تحضير العينة للتحليل الكروماتوغرافي. يرتبط الاهتمام المتزايد بتقنيات SPE بمزايا متعددة مقارنة بـ LLE التقليدي ، أي تقليل كمية العينة والمذيبات العضوية المطلوبة للتحليل ، والاسترداد العالي ، والإجراء السريع. يعتمد SPE على إذابة العينة أو تعليقها في مذيب (مثل الأسيتونتريل) وتمرير الخليط خلال مرحلة صلبة. يفصل التحليلات بناءً على الاختلاف في تقارب المركبات مع المادة الماصة. يسمح هذا النهج بالعزل والتركيز وكذلك تنقية الجزيء المستهدف. تم تقدير SPE من قبل الباحثين الذين يدرسون تلوث الباتولين في مجموعة متنوعة من منتجات الفاكهة (العصائر ، المهروس ، المربى) واستخدام بشكل منفصل (Ji et al., 2017) توجد بعض أعمدة SPE المتاحة تجارياً والمخصصة لتحليل الباتولين في الطعام ، أي تم تقييم عمود SPE "MycoSep 228" لتحديد الباتولين في مشروبات التفاح والزعرور المحلية. المحلية (Li et al. 2007a). من أجل تعزيز كفاءة فصل الباتولين عن مكونات مصفوفة الفاكهة الأخرى ، تم تطوير مواد ماصة جديدة كحل بديل لأعمدة SPE المتاحة تجارياً (Notardonato et al., 2021).

10.3.4 طريقة (QuEChERS) Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe

تكتسب هذه الطريقة (اختصار سريع ، سهل ، رخيص ، فعال ، قوي ، وآمن) شعبية كبيرة كأسلوب ما قبل المعالجة للعينة للتحليل الكروماتوغرافي بسبب المزايا المدرجة في اسمه. تقليدياً ، تتضمن منهجية QuEChERS استخراجاً أولياً لـ 10 جم من عينة متجانسة باستخدام 10 مل من الأسيتونتريل متبوعاً بخطوة الفصل بعد إضافة خليط الملح (4 جم من كبريتات المغنيسيوم اللامائية و 1 جم من كلوريد الصوديوم). يخضع مستخلص الأسيتونتريل (1 مل) لمزيد من التنقية عن طريق استخلاص الطور الصلب المشتت dispersive Solid Phase Extraction (dSPE) (Sadok et al., 2019). على الرغم من العديد من المزايا ، يستهلك بروتوكول QuEChERS كمية كبيرة نسبياً من مذيبات الاستخراج مقارنة بالطرق المذكورة أعلاه . علاوة

السموم الفطرية: الباتولين Patulin وجودة الفواكه (التفاح) المنتجات القائمة.....(34-63)

على ذلك ، فإن كفاءة الاستخراج تعتمد بشدة على نوع وكمية الأملاح المستخدمة في خطوة التملح. يتطلب الإجراء خطوة تحسين لتحديد الظروف المثلى التي ستمنع الاستخراج المشترك لبعض المركبات غير المرغوب فيها من مصفوفة العينة (مثل السكريات والأصباغ) . تم تطبيق منهجية QuEChERS مؤخراً لتقدير الباتولين في فواكه مختلفة منها التفاح ومنتجاته (Notardonato et al., 2021).

10.3.5 طريقة قالب تشتت الطور الصلب (MSPE) Matrix Solid Phase Extraction

في حالة تحضير العينة الصلبة وشبه الصلبة للتحليل الكروماتوغرافي ، يبدو أن هناك تقنية أخرى ، وهي تشتت المادة الصلبة في الطور (MSPD) ، تستحق الدراسة. في هذا النهج ، يتم تشتت العينة ميكانيكياً في دعامة صلبة (بشكل أساسي سيليكات مرتبطة بـ C18 أو C8) ، مما يؤدي إلى إنشاء مرحلة ثابتة فريدة يتم تعبئتها بعد ذلك في خرطوشة فارغة. يتم استخلاص العينة المطبقة بمذيب مناسب وتخضع مادة eluent التي تم الحصول عليها لمزيد من الإجراءات (التبخير ، إعادة البناء ، التحليل) (Ji et al., 2017). الميزة الكبرى لهذه التقنية هي الاستخراج والتنظيف المتزامن للمواد المستهدفة. ومع ذلك ، فإن هذا النهج شاق إلى حد ما فيما يتعلق بخلط العينة / المشتت وتعبئة العمود بالمواد التي تم الحصول عليها. علاوة على ذلك ، يتطلب كميات كبيرة نسبياً من المذيبات العضوية لشطف المادة التحليلية (10 - 15 مل لكل عينة). في بعض الحالات ، كما هو الحال أثناء SPE ، يجب غسل العمود قبل شطف العينة (Sadok et al., 2019). تزيد هذه الخطوة الإضافية الوقت الإجمالي لتحضير العينة وكمية المذيبات العضوية. تم اختبار منهجية (MSPD) لاستخراج الباتولين من مركز تفاح التفاح وعصير التفاح ، وكذلك لتحليل السموم الفطرية الأخرى في أغذية الأطفال (Notardonato et al., 2021).

11. التقدير الكمي للسموم الفطرية "الباتولين" باستخدام أجهزة التحليل الكروماتوغرافي

تُستخدم عدة تقنيات كروماتوغرافية لتحليل الباتولين في الطعام. من بين الطرق المطبقة لتحديد السموم الفطرية ، كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) ، والكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) إلى جانب الكاشفات الطيفية ، والكروماتوغرافيا السائلة فائقة الأداء المقترنة بقياس الطيف الكتلي الترادفي (LCMS/MS) ، وكروماتوغرافيا الغاز (GC) في أغلب الأحيان. ومع ذلك ، يتم استخدام HPLC مع كاشفات امتصاص الأشعة فوق البنفسجية وأنظمة LC-MS/MS بشكل متكرر لتقدير كمية الباتولين في سلع الفاكهة ، لذلك قمنا بتلخيص التطورات في هذا

المجال خلال العقد الأخير لما لهم من حساسية عالية في الكشف و التقدير (Tittlemier et al., 2021).

11.1 استخدام جهاز الكروماتوجراف في عالي الأداء HPLC

تعتمد الطريقة الرسمية لتحديد الباتولين في المصفوفات المختلفة مثل الفواكه ومشتقاتها على تحليل كروماتوجراف في سائل عالي الأداء (HPLC). يقدم التحليل باستخدام جهاز HPLC مقترناً بكاشفات الأشعة فوق البنفسجية (Ultra Violet UV) أو كاشف الصمام الثنائي (Diode array detector DAD) أكثر التقنيات اللونية شيوعاً المستخدمة لتحديد الباتولين في الفواكه المختلفة ومنتجاتها. تظهر غالبية المقالات المنشورة في السنوات العشر الأخيرة التي تستخدم HPLC قابلية تطبيق هذه الطريقة لتقدير السموم الفطرية عند حدود تركيزات منخفضة جداً 3.0 ميكروجرام/كيلوجرام و 7.0 ميكروجرام/كيلوجرام والتي تلبي توصيات الاتحاد الأوروبي لأغذية الأطفال. يتم تحقيق فصل HPLC بشكل متكرر باستخدام مرحلة متحركة تتكون من الماء وكمية صغيرة من الأسيتونيتريول (5-10٪، حجم / حجم). نظراً لأن الباتولين أكثر استقراراً في الظروف الحمضية، فإن تحمض الطور المتحرك بحمض البيركلوريك أو حمض الخليك نظراً لامتصاص الجزيء الأقصى عند 276 نانومتر، يتم استخدام هذا الطول الموجي لتحديد الباتولين والغرض الكمي (Notardonato., 2021 Sadok et al., 2019).

11.2 استخدام جهاز الكروماتوجراف في عالي الأداء مع مطياف الكتلة LC-MS

يستخدم التحليل اللوني للسائل - مقياس الطيف الكتلي (LC-MS) بشكل عام في تحليل الغذاء بسبب تعدد استخداماته، وخصوصياته، وانتقائيته. تستخدم غالبية الدراسات التي تركز على الكشف وتقدير الباتولين في الفاكهة على استخدام LC إلى جانب مطياف الكتلة الذي يعمل في وضع الأيونات السالبة. غالباً ما يتم اختيار أيون m/z 153 المقابل لجزيء الباتولين بعد فقد البروتون $[M - H]$ كخاصية أيون سلائف للباتولين. في بعض الأوراق، استخدم المؤلفون استخراج LL مع أسيتات الإيثيل متبوعاً بالتنظيف باستخدام SPE والتقدير الكمي عن طريق طريقة LC-MS / MS لتحديد الباتولين في منتجات التفاح (أي العصائر والمركبات والفاكهة الطازجة المطحونة والمرببات) طور المؤلفون طريقة تعتمد على كروماتوجرافيا السائل المخفف بالنظائر / قياس الطيف الكتلي الترادفي (ID-LC-MS / MS) لتحقيق LODs و LOQs مرضية في النطاق

0.2- 0.7 و 0.8- 2.4 ميكروجرام كجم على التوالي (Sadok et al., 2021 Notardonato., 2019).

12. استراتيجيات الإدارة والمراقبة

يمكن أن يحدث تلوث للسموم الفطرية "الباتولين" في الحقل (قبل الحصاد) / أو خلال الحصاد / أو بعد الحصاد وذلك أثناء القيام بأنشطة التخزين والتعبئة ، لذلك من الضروري تطبيق إجراءات للسيطرة على التلوث أثناء القيام بهذه الأنشطة. ولذلك يمكن تقسيم الوقاية من التلوث باتباع طريقة ما قبل الحصاد إلى استراتيجيات ما قبل الحصاد والحصاد وما بعد الحصاد.

12.1 استراتيجيات قبل الحصاد

تشمل استراتيجيات ما قبل الحصاد الإدارة الممتازة للمزارع ، واستخدام مبيدات الفطريات والمبيدات الحشرية ، واستخدام الأسمدة للحفاظ على التركيب المعدني ، وإدارة الاستزراع لتحسين قوة النبات ، والري ، واختيار الصنف (Mandappa et al., 2018). يؤدي رش الكالسيوم الورقي واستخدام كميات قليلة من النيتروجين خلال موسم النمو إلى تقليل العدوى قبل الحصاد بمسببات الأمراض. كما أنه يقلل من فرص تسوس الثمار بعد الحصاد عن طريق تقليل حجم وعدد الآفات على التفاح الجريح الذي تسببه فطر *P. expansum* (Sarrocco et al., 2018). والأكثر أهمية، تشمل تقنيات ما قبل الحصاد الأخرى تناوب المحاصيل (Crop rotation) ودوران المحاصيل لتقليل التلقيح في الحقل ، وتحليل التربة أثناء التسميد قبل استخدام الأسمدة ، واستخدام الهجين المقاومة لعدوى العفن. والأهم من ذلك ، يجب أن يسترشد المصنعون أيضاً بمبادئ استخدام الممارسات الزراعية الجيدة (Good Agriculture Practice GAP) و الممارسات اfdارة الجيدة (Good management Practice GMP) حتى يتمكنوا من اتخاذ التدابير الوقائية اللازمة لتقليل التلوث إلى أدنى مستوى (Pleadin et al., 2019).

12.2 استراتيجيات خلال الحصاد

أثناء الحصاد والنقل ، هناك فرص لحدوث الضرر الجسدي والجروح الخارجية للفاكهة التي تؤدي تساعد الفطريات مثل فطر *P. expansum* لاختراق الفاكهة و التسبب بالعدوى. وبالتالي، فإن تقليل حدوث الجروح الخارجية يقلل من تراكم الباتولين، مثال ذلك، أدى التحكم في الضرر بنسبة 99 ٪ إلى تقليل 70 ٪ تراكم الباتولين. ومن ثم ، فمن الضروري تقليل الإصابات والأضرار المادية من خلال اتخاذ أقصى قدر من الاحتياطات أثناء النقل والحصاد (Mahato et al., 2021) هناك

السموم الفطرية: الباتولين Patulin وجودة الفواكه (التفاح) المنتجات القائمة.....(34-63)

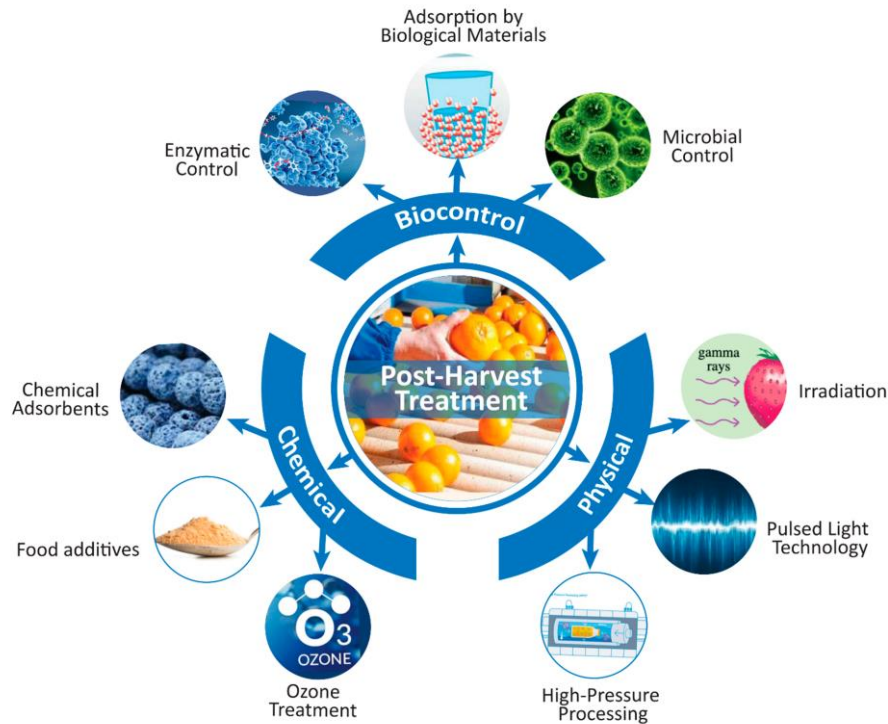
عوامل أخرى يتم أخذها في الاعتبار أثناء الحصاد وهي قطف الثمار في ظروف جافة ، والاحتفاظ بها في صناديق نظيفة ، ونقلها مباشرة إلى المخازن وتخزينها في التخزين البارد عند 1.5 - 4.0 م خلال 18 ساعة من الحصاد لتقليل العدوى (Baert et al., 2012). كما أن فرز الثمار المخزنة في جو خاضع للرقابة عن طريق إزالة التفاح المصاب بالآفات فعال للغاية في تقليل تركيز الباتولين لأن الباتولين قد يصيب الأنسجة والفواكه الأخرى غير المصابة (Mahato et al., 2021).

12.2 استراتيجيات بعد الحصاد

تشمل استراتيجيات مكافحة ما بعد الحصاد العديد من الممارسات التي تستخدم لتقليل من التلوث بالسموم الفطرية (الشكل 8). استخدام مبيدات الفطريات ومبيدات الآفات وعوامل مكافحة الحيوية الأخرى في التخزين البارد ، والحفاظ على نظافة غرفة التخزين إلى جانب التحكم في ظروف الجو. تستخدم مبيدات الفطريات مثل البزيميدازول (Benzimidazole) بعد الحصاد لمنع تعفن الفاكهة في التخزين البارد. إن فوسفيت البوتاسيوم يمنع نمو ثمار التفاح وإنتاج PAT. ومع ذلك ، بسبب الآثار الضارة لهذه المواد الكيميائية في الغذاء وظهور مجموعات مقاومة ، تم تقييد استخدامها (Lai et al 2017). كما تم اقتراح العلاجات البديلة المختلفة مثل أكسيد النيتروز ، وهيبوكلوريت الصوديوم ، وماء أكسدة هيدروجين بيروكسيد الهيدروجين ، وكبريتات النحاس ، وخميرة مكافحة الحيوية (Tannous et al., 2018). في استراتيجيات مكافحة ما بعد الحصاد ، أصبح استخدام عوامل مكافحة الحيوية (Bio Control Agent BCA) مثل الخميرة المضادة شائعاً لأنها تستمر لفترة طويلة بعد العلاج وتحمي الفاكهة من إعادة العدوى . أظهر أن تطبيق عزل خميرة R. BCA آخر يشارك في إدارة ما بعد الحصاد لإنتاج PAT هو استخدام Candida sake و Pantoea agglomerans كان يتحكم بشكل فعال في نمو P. expansum في التفاح أثناء التخزين البارد. إلا أن الاتجاهات الأكثر حداثة هي استخدام المعززات التي يمكن أن تحسن فعالية عامل مكافحة الحيوية ضد P. expansum. حيث اقترح باحثون استخدام بعض المعززات الطبيعية مع عوامل مكافحة الحيوية. على سبيل المثال، انخفض محتوى الباتولين بنسبة وصلت حتى 89.6٪ مقارنةً بالتحكم عند استخدام R. mucilaginosa مع حمض الفيتيك ، وكذلك عند استخدام Pichia anomala بشكل كبير من حدوث مرض العفن الأزرق والتحلل الطبيعي للعنب دون التأثير على جودته مقارنةً بمجموعة التحكم (Godana et al; Mahato et al., 2021, 2020). لذلك ، يمكن استنتاج أن هذه العوامل جنباً إلى جنب مع المعززات فعالة في التخفيف من إنتاج الباتولين.

السموم الفطرية: الباتولين Patulin وجودة الفواكه (التفاح) المنتجات القائمة.....(34-63)

أضافة أخرى، الجو المتحكم فيه (Controlled atmosphere CA) هو البيئة التي ترتفع فيها مستويات ثاني أكسيد الكربون وانخفاض مستويات الأكسجين مقارنة بالهواء العادي. يعمل هذا مع التبريد على إطالة العمر الافتراضي للفاكهة. لقد ثبت أن تركيز O₂ المنخفض لفترة طويلة يضر بالفطر ويشبط عملية التمثيل الغذائي الأولية. أظهر هذا انخفاضاً في تراكم الباتولين ليس فقط في تخزين CA ولكن أيضاً بعد التخزين المحيط لمدة 3 أيام لاحقة. تؤثر الظروف الصحية لغرف التخزين بعد الحصاد أيضاً على جودة الفاكهة ومعدل التلوث. يمكن أن تحدد احتمالية وصول جراثيم الفطريات إلى جرح التفاح، وبدء الاستعمار، وشدة التعفن، كمية لب التفاح التي قد تفقد. بهذه الطريقة، تعد صيانة مرافق التخزين والغرف أمراً ضرورياً كاستراتيجية لمكافحة ما بعد الحصاد.



الشكل (11): مخطط لخفض تركيز الباتولين في المشروبات باستخدام علاجات ما بعد الحصاد (Azam et al., 2021)

13. الاستنتاجات والتوقعات المستقبلية

تلعب ثمار التفاح ومنتجات التفاح، وخاصة عصير التفاح، دوراً رئيسياً في تعرض الإنسان للباتولين. تعد التحقيقات المتعمقة للعوامل والتحديات المرتبطة بتحليل العفن الأزرق في التفاح وتراكم

الباتولين في منتجات التفاح ضرورية لتطوير طرق يمكن أن تقلل أو تزيل الباتولين بشكل فعال من المسار الغذائي للإنسان. تم تعديلها حسب الظروف البيئية ، والتفاعلات بين إمراضية أنواع البنسيليوم وحساسية أصناف التفاح تؤدي إلى اختلافات في شدة تسوس العفن الأزرق ومستويات تراكم الباتولين في التفاح. تعتبر الكثافة العالية لمسببات السمية مثل *P. expansum* في غرف التخزين عنصراً لا غنى عنه لإنتاج الباتولين في التفاح. علاوة على ذلك ، يمكن أن يؤدي وجود مسببات الأمراض atoxigenic أيضاً إلى تسريع تطور العفن الأزرق العفن. على الرغم من أن التفاح المصاب أو المكدم بالكاد يمكن أن يتجنب هجوم العوامل الممرضة ، إلا أن التفاح الذي يحتوي على شخصية أو أكثر مثل التآثم الجروح السريع أو آليات الدفاع ، مثل الثمار الصلبة نسبياً ، وانخفاض مستويات إنتاج الإيثيلين ، والبوليفينول الوفير ، أقل عرضة لتراكم الباتولين. تجعل الخصائص الفيزيوكيميائية للباتولين من السهل على هذا السم أن يعيش في ظروف البرد أو نقص الأكسجة أو الحمضية أو درجات الحرارة المرتفعة. بالإضافة إلى ذلك ، فإن هذه الخصائص إلى جانب مصفوفات الطعام المعقدة تتداخل مع الكشف الدقيق عن بقايا الباتولين في منتجات التفاح. للتخفيف من محتوى الباتولين في منتجات التفاح ، هناك حاجة إلى استراتيجيات مطورة حديثاً تكون أكثر أمناً وفعالية مقارنة باستخدام مبيدات الفطريات الاصطناعية. بشكل عام ، تركز الاستراتيجيات التي تهدف إلى التخفيف من تلوث الباتولين من ما قبل الحصاد إلى ما بعد الحصاد بشكل أساسي على تحسين مقاومة التفاح للأمراض ، أو تقليل محتوى الباتولين بشكل غير مباشر عن طريق التحكم في العفن الأزرق التفاح ، أو بشكل مباشر عن طريق تحطيم السم المتراكم. ومع ذلك ، يستغرق الأمر سنوات أو ما يصل إلى عقود لتربية أصناف تفاح جديدة ، والتي جمعت بين قدرات مقاومة العفن الأزرق ، بالإضافة إلى سمات الجودة الفائقة (على سبيل المثال ، الحجم الأكبر و / أو النكهة الحلوة). يمكن أيضاً تحسين مقاومة التفاح عن طريق استخدام أدوات استنشاق بيولوجية بجرعات محسوبة / معدلة بشكل صحيح. يمكن أن تساعد الممارسات الزراعية الجيدة وإدارة البساتين أيضاً في الحفاظ على جودة تخزين التفاح ، بحيث يكون لها تأثير محدود على تطور المرض. باستثناء الإعدادات الأساسية لدرجة الحرارة المنخفضة والأجواء التي يتم التحكم فيها ، فإن استخدام مثبطات الإيثيلين أو عوامل المكافحة الحيوية على التفاح أثناء التخزين يمكن أن يتحكم بشكل إضافي في تراكم الباتولين عن طريق قمع نمو *P. expansum*. تعتبر ممارسات مثل التخلص من التفاح الفاسد و / أو الغسيل بالماء الساخن قبل عصر العصير بسيطة لكنها وسيلة فعالة موصى بها بشدة.

السموم الفطرية: الباتولين Patulin وجودة الفواكه (التفاح) المنتجات القائمة.....(34-63)

معالجة الأشعة فوق البنفسجية والضغط الهيدروستاتيكي المرتفع هي علاجات غير حرارية لتقليل الباتولين وقد أظهرت نجاحات محدودة لكنها واعدة ، على الأقل داخل إعدادات المختبر . ومع ذلك ، فإن فقدان المغذيات وارتفاع تكلفة الأدوات اللازمة يمكن أن يعرض التطبيقات الصناعية واسعة النطاق للخطر. يمكن أن تساعد إضافة الكواشف الخضراء المضادة للفطريات ، مثل المستخلصات النباتية أو الزيوت الأساسية ، في تقليل محتوى الباتولين في عصير التفاح. يتم إعاقة التطبيق التجاري لهذه المواد الكيميائية الطبيعية في أنابيب إنتاج العصير بسبب التكاليف الاقتصادية لخطوات الاستخراج والتركيز. إلى حد بعيد ، فإن الطريقة الواعدة في تقليل الباتولين هي استخدام عوامل المكافحة البيولوجية التي تتكون من الخميرة المضادة ، والبكتيريا ، والفطريات atoxigenic . يمكن لبعض هذه العوامل أن تحلل الباتولين بشكل كامل وفعال في الجسم الحي أو في المختبر . ومع ذلك ، فإن سمية المنتجات الثانوية لتحلل الباتولين والآلية (الآليات) وراء إزالة سموم الباتولين الخلوية لا تزال غير واضحة ويجب التحقيق فيها بشكل مكثف. بالنظر إلى تخصص الركيزة لإنزيمات إزالة السموم ، قد يكون للإنزيم (الإنزيمات) المهينة للبطولين من السلالات المعادية إمكانات كبيرة لإزالة الباتولين من منتجات التفاح. بشكل جماعي ، لا تزال هناك حاجة إلى بذل جهود لجعل الأطفال والبالغين يشعرون بالأمان أثناء الاستمتاع بالفوائد الصحية لمنتجاتهم المصنوعة من التفاح المعالج ، دون مخاوف فيما يتعلق بتلوث الباتولين.

References

1. Azam, M., Ahmed, S., Islam, M., Maitra, P. and Yu, D., 2021. Critical assessment of mycotoxins in beverages and their control measures. *Toxins*, 13(5), p.323.
2. Baert, K., Devlieghere, F., Amiri, A. and De Meulenaer, B., 2012. Evaluation of strategies for reducing patulin contamination of apple juice using a farm to fork risk assessment model. *International Journal of Food Microbiology*, 154(3), pp.119-129.
3. Commission Regulation (EC). No 466/2001 of 8 March 2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Off J.* 2001; L77:1–13.
4. Commission Regulation (EC). No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Off J.* 2006; L364:5–24.
5. Commission Regulation (EC). No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. *Off J.* 2006; L70:12–34.

6. Coton, M., Bregier, T., Poirier, E., Debaets, S., Arnich, N., Coton, E. and Dantigny, P., 2020. Production and migration of patulin in *Penicillium expansum* molded apples during cold and ambient storage. *International Journal of Food Microbiology*, 313, p.108377.
7. Ciasca, B., De Saeger, S., De Boevre, M., Reichel, M., Pascale, M., Logrieco, A.F. and Lattanzio, V.M., 2022. Mycotoxin Analysis of Grain via Dust Sampling: Review, Recent Advances and the Way Forward: The Contribution of the MycoKey Project. *Toxins*, 14(6), p.381.
8. Diao, E., Wang, J., Li, X., Wang, X., Song, H. and Gao, D., 2019. Effects of ozone processing on patulin, phenolic compounds and organic acids in apple juice. *Journal of food science and technology*, 56(2), pp.957-965.
9. FAO. Code of Practice for the Prevention and Reduction of Patulin Contamination in Apple Juice and Apple Juice Ingredients in Other Beverages; In CAC/RPC; FAO: Rome, Italy, 2003; Volume 50, pp. 1–6.
10. FDA, U. and US Food and Drug Administration, 2005. CPG Sec. 510.150 Apple juice, apple juice concentrates, and apple juice products–adulteration with patulin.
11. Forouzan, S. and Madadlou, V., 2018. Incidence of patulin in apple juices produced in West Azerbaijan Province, Iran.
12. Godana, E.A., Yang, Q., Wang, K., Zhang, H., Zhang, X., Zhao, L., Abdelhai, M.H. and Legrand, N.N.G., 2020. Bio-control activity of *Pichia anomala* supplemented with chitosan against *Penicillium expansum* in postharvest grapes and its possible inhibition mechanism. *LWT*, 124, p.109188.
13. Ji X, Li R, Yang H et al (2017) Occurrence of patulin in various fruit products and dietary exposure assessment for consumers in China. *Food Control* 78:100–107.
14. Lai, T., Wang, Y., Fan, Y., Zhou, Y., Bao, Y. and Zhou, T., 2017. The response of growth and patulin production of postharvest pathogen *Penicillium expansum* to exogenous potassium phosphite treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 244, pp.1-10.
15. Le Gall, S., Even, S. and Lahaye, M., 2016. Fast estimation of dietary fiber content in apple. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(6), pp.1401-1405.
16. Li, B., Chen, Y., Zhang, Z., Qin, G., Chen, T. and Tian, S., 2020. Molecular basis and regulation of pathogenicity and patulin biosynthesis in *Penicillium expansum*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(6), pp.3416-3438.
17. Ioi, J.D., Zhou, T., Tsao, R. and F. Marcone, M., 2017. Mitigation of patulin in fresh and processed foods and beverages. *Toxins*, 9(5), p.157.

18. Liu, J., Liu, Q., Han, J., Feng, J., Guo, T., Li, Z., Min, F., Jin, R. and Peng, X., 2021. N-Acetylcysteine Inhibits Patulin-Induced Apoptosis by Affecting ROS-Mediated Oxidative Damage Pathway. *Toxins*, 13(9), p.595.
19. Mahato, D.K., Kamle, M., Sharma, B., Pandhi, S., Devi, S., Dhawan, K., Selvakumar, R., Mishra, D., Kumar, A., Arora, S. and Singh, N.A., 2021. Patulin in food: A mycotoxin concern for human health and its management strategies. *Toxicon*, 198, pp.12-23.
20. Mandappa, I.M., Basavaraj, K., Manonmani, H.K., 2018. Analysis of Mycotoxins in Fruit Juices, Fruit Juices. Elsevier, pp. 763–777.
21. Ministry of Health of the People's Republic of China. GB 2761-2011 of 20 April 2011 China National Food Safety Standard: Maximum Limit of Mycotoxins in Food; Ministry of Health of the People's Republic of China: Beijing, China, 2014
22. Notardonato, I., Gianfagna, S., Castoria, R., Ianiri, G., De Curtis, F., Russo, M.V. and Avino, P., 2021. Critical review of the analytical methods for determining the mycotoxin patulin in food matrices. *Reviews in Analytical Chemistry*, 40(1), pp.144-160.
23. Official Method of Analysis. 17th ed. Gaithersburg: AOAC International; Method 995.10; AOAC, MD. June 2000.
24. Pal, S., Singh, N. and Ansari, K.M., 2017. Toxicological effects of patulin mycotoxin on the mammalian system: an overview. *Toxicology research*, 6(6), pp.764-771.
25. Pleadin, J., Frece, J. and Markov, K., 2019. Mycotoxins in food and feed. *Advances in food and nutrition research*, 89, pp.297-345.
26. Raiola, A., Meca, G., García-Llatas, G. and Ritieni, A., 2012. Study of thermal resistance and in vitro bio-accessibility of patulin from artificially contaminated apple products. *Food and chemical toxicology*, 50(9), pp.3068-3072.
27. Regulation (EC). No 882/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 on official controls performed to ensure the verification of compliance with feed and food law, animal health and animal welfare rules. *Off J.* 2004; L165:1–141
28. Sadok, I., Stachniuk, A. and Staniszevska, M., 2019. Developments in the monitoring of patulin in fruits using liquid chromatography: An overview. *Food analytical methods*, 12(1), pp.76-93.
29. Scaccabarozzi, B., Brutti, A. and Berni, E., 2020. Effect of long-term storage, heat and high-pressure processing on patulin reduction in tomato products. *Journal of Food Processing & Technology*, 11(829), pp.10-35248.

30. Sarrocco, S. and Vannacci, G., 2018. Preharvest application of beneficial fungi as a strategy to prevent postharvest mycotoxin contamination: A review. *Crop protection*, 110, pp.160-170.
31. Saleh, I. and Goktepe, I., 2019. The characteristics, occurrence, and toxicological effects of patulin. *Food and chemical toxicology*, 129, pp.301-311.
32. Soliman, S., Li, X.Z., Shao, S., Behar, M., Svircev, A.M., Tsao, R. and Zhou, T., 2015. Potential mycotoxin contamination risks of apple products associated with fungal flora of apple core. *Food Control*, 47, pp.585-591.
33. Sorbo, A., Pucci, E., Nobili, C., Taglieri, I., Passeri, D. and Zoani, C., 2022. Food Safety Assessment: Overview of Metrological Issues and Regulatory Aspects in the European Union. *Separations*, 9(2), p.53.
34. Tannous, J., Keller, N.P., Atoui, A., El Khoury, A., Lteif, R., Oswald, I.P. and Puel, O., 2018. Secondary metabolism in *Penicillium expansum*: Emphasis on recent advances in patulin research. *Critical reviews in food science and nutrition*, 58(12), pp.2082-2098.
35. Tannous, J., Atoui, A., El Khoury, A., Francis, Z., Oswald, I.P., Puel, O. and Lteif, R., 2016. A study on the physicochemical parameters for *Penicillium expansum* growth and patulin production: effect of temperature, pH, and water activity. *Food Science & Nutrition*, 4(4), pp.611-622.
36. Tittlemier, S.A., Brunkhorst, J., Cramer, B., DeRosa, M.C., Lattanzio, V.M.T., Malone, R., Maragos, C., Stranska, M. and Sumarah, M.W., 2021. Developments in mycotoxin analysis: an update for 2019-2020. *World Mycotoxin Journal*, 14(1), pp.3-26.
37. Vidal, A., Ouhibi, S., Ghali, R., Hedhili, A., De Saeger, S. and De Boevre, M., 2019. The mycotoxin patulin: An updated short review on occurrence, toxicity and analytical challenges. *Food and Chemical Toxicology*, 129, pp.249-256.
38. Zhong, L., Carere, J., Lu, Z., Lu, F. and Zhou, T., 2018. Patulin in apples and apple-based food products: The burdens and the mitigation strategies. *Toxins*, 10(11), p.475.
39. Zhong, Y., Jin, C., Gan, J., Wang, X., Shi, Z., Xia, X. and Peng, X., 2017. Apigenin attenuates patulin-induced apoptosis in HEK293 cells by modulating ROS-mediated mitochondrial dysfunction and caspase signal pathway. *Toxicon*, 137, pp.106-113.