تأثیر مراحل مختلف تولید صنعتی لواشک بر میزان کاهش سم پاتولین

محمد هادی اسکندری[۱]، هاشم منتصری[۲]، غلامرضا مصباحی[3*]، علیرضا طاهری یگانه[4]، مهرداد نیاکوثری[5]، سمیه کرمی[6]

۱- دانشیار بخش علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.
۲- استادیار گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.
۳- استادیار بخش علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.
٤- دانش آموخته کارشناسی ارشد بخش علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.
٥- دانشیار بخش علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.
٦- کارشناس آزمایشگاه کنترل غذا و دارو، معاونت غذا و داروی دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.
*نویسنده مسئول مکاتبات: mesbahi@shirazu.ac.ir
(دریافت مقاله: ۹۲/۹/۱۲ پذیرش نهایی: ۹۳/۱۲/٦)

Archive of SID

چکیده

لواشک یکی از محصولات پرمصرف، به‌ویژه بین کودکان ایرانی است. این محصول با استفاده از میوه‌های با کیفیت پایین تهیه می‌شود که اغلب آلوده به کپک و سموم کپکی مانند پاتولین می‌باشد. هدف از این پژوهش، تعیین اثر مراحل اصلی فرایند تولید صنعتی لواشک نظیر پخت مقدماتی، فیلتراسیون، اواپراسیون، فرمولاسیون و پخت نهایی یا خشک کردن روی کاهش مقدار پاتولین است. به منظور اندازه‌گیری پاتولین، نمونه‌های مورد آزمایش قبل و بعد از هر مرحله از فرایند نمونه‌برداری شدند. تعیین پاتولین در نمونه‌ها توسط دستگاه کروماتوگرافی با کارایی بالا (HPLC) انجام شد. نتایج این تحقیق نشان داد که حداکثر کاهش پاتولین به مقدار ۲٤/٦۰ و ۱۸/۲۰ درصد به‌ترتیب در مراحل فرمولاسیون و تغلیظ صورت گرفت، در حالی که بعد از مراحل خشک کردن، فیلتراسیون و پخت مقدماتی، میزان کاهش سم پاتولین به ترتیب ۸/۵۸، ۳/۸۲ و ۲/٤۸ درصد بود. نتایج نشان داد که در محصول نهایی بیش از ٤۰ درصد مقدار اولیه پاتولین باقی می‌ماند. علاوه بر این، مشخص شد که فرایندهای مختلف تولید قادر به کاهش قابل قبول پاتولین موجود در ماده خام اولیه نیستند و نمی‌توانند میزان پاتولین را به کمتر از حد قابل قبول برای محصولات مشابه برسانند.

واژه‌های کلیدی: پاتولین، لواشک، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، مراحل فرایند

www.SID.ir

مقدمه

تهیه لواشک در ایران، با توجه به فراوانی میوه در کشور به‌ویژه در فصول خاص از سابقه دیرین برخوردار است و مصرف آن به‌ویژه توسط کودکان و نوجوانان بالا است. سیب یکی از مهمترین میوه‌هایی است که در ایران برای تولید لواشک استفاده می‌شود. یکی از مشکلات کیفی مورد توجه در صادرات آب میوه و محصولات تغلیظ شده آن‌ها، میزان سم پاتولین حاصل از فعالیت کپک‌ها در آن‌ها می‌باشد. بررسی‌ها نشان داده است که درصد قابل‌توجهی از آب سیب و کنسانتره سیب تولیدی در ایران حاوی مقادیر بیش از حد مجاز پاتولین می‌باشند (Cheraghali *et al*., 2004). پاتولین ماده حاصل از فعالیت برخی از کپک‌ها و یا متابولیت سمی آنها با فرمول مولکولی $C_7H_6O_4$ و نام شیمیایی 4-hydroxy-4H-furo[3,2-c]pyran-2(6H)-one است، گرچه نام‌های دیگری نیز برای آن به‌کار می‌رود. پاتولین خالص یک ماده کریستالی سفید با نقطه ذوب ۱۱۱–۱۱۰درجه سلسیوس و وزن مولکولی ۱۵٤ دالتون می‌باشد. این سم کپکی مقاوم به حرارت بوده و در محیط اسیدی پایداری بیشتری نسبت به محیط قلیایی دارد. همچنین در متانول، اتانول و آب محلول است (Prakash *et al*., 2007; Lingali *et al*., 200; Artik *et al*., 1995).

پاتولین بوسیله ٦۰ گونه مختلف از کپک‌های متعلق به بیش از ۳۰ جنس تولید می‌شود. اکثر این کپک‌ها از جنس آسپرژیلوس مانند *آسپرژیلوس کلاواتوس*، *آسپرژیلوس ژیگانتئوس* و *آسپرژیلوس ترئوس*، و جنس پنی‌سیلیوم مانند *پنی‌سیلیوم اورتیکا* و *پنیسیلیوم اکسپانسوم* و جنس *بیسوکلامیس* مثل *بیسوکلامیس نیوا* می‌باشند که بر روی برخی میوه‌های فاسد به‌ویژه سیب رشد می‌کنند (Prakash *et al*., 2007; Prieta *et al*., 1994).

گزارش‌هایی از سمیت پاتولین در موش‌ها و جوندگان و تأثیر سمی این ماده برسیستم عصبی، ایمنی و ژن‌های آنها و آثار نامطلوب آن بر دستگاه گوارش حیوانات مذکور منتشر شده است. از عوارض حاد این سم در حیوانات آزمایشگاهی می‌توان به احتقان ریوی، فشار خون و خونریزی روده‌ای اشاره کرد. لازم به ذکر است که سم پاتولین در سطح سلولی می‌تواند سبب پارگی غشای پلاسمایی و جلوگیری از ساخت پروتئین‌ها، DNA و RNA شود (Hopkins, 1993). پاتولین دارای خاصیت ایجاد ناهنجاری در جنین و سرطان‌زایی در حیوانات آزمایشگاهی نیز می‌باشد (Lingali *et al*., 2000; Mayer and Legator, 1969). به‌دلیل خطرات احتمالی این مایکوتوکسین بر سلامتی انسان، سازمان غذا و داروی امریکا، حضور این ماده را در آب میوه‌ها و کنسانتره‌ها محدود نموده است و در بسیاری از کشورهای جهان نیز ارزیابی وجود این سم در آب سیب و برخی از فراورده‌های آن صورت می‌گیرد (Hopmans, 1997). سازمان بهداشت جهانی، مقدار مجاز پاتولین در مواد غذایی را حداکثر ۵۰ µg/kg تعیین کرده است، این مقدار در مورد کودکان و نوزادان مطابق مقررات اتحادیه اروپا ۱۰ µg/kg و در فراورده‌های جامد سیب ۲۵ µg/kg می‌باشد (Welke *et al*., 2009; Lingali *et al*., 2000; Artik *et al*., 1995).

سم پاتولین به دلیل pH پایین و وجود مقادیر کم گروه‌های سولفیدریل در آب سیب، دارای پایداری بالایی بوده و در برابر دماهای بالا و حرارت پاستوریزاسیون مقاوم است و از بین رفتن آن محدود

www.SID.ir
Archive of SID

می‌باشد (Lingali *et al*., 2000; Harrison, 1989). در صورت جداسازی قسمت‌های کپک‌زده از میوه قبل از فراوری آن، مقدار پاتولین به طور قابل‌ملاحظه‌ای کاهش می‌یابد و فرایندهای انجام شده بر روی میوه سیب و آب میوه حاصل نیز قادر است تا حدی سبب کاهش مقدار سم پاتولین گردد (Acar *et al*., 1998; Artik *et al*., 1995). از موثرترین راه‌ها برای کاهش پاتولین در محصولات نهایی حاصل از سیب، رعایت رویه‌های مناسب کشاورزی و در پی آن روش‌های مناسب تولید در کارخانه‌ها به‌منظور ممانعت از آلودگی میوه و جلوگیری از فعالیت کپک‌ها است (Shephard and Leggott, 2000). پاتولین بیشتر در سیب و فرآورده‌های آن تولید می‌شود و گاهی نیز در دیگر میوه‌ها مثل گلابی، هلو، زردآلو و انگور دیده می‌شود (فتحی آچاچلوئی و همکاران، ۱۳۸۸؛ رادمرد قدیری و کلباسی اشتری، ۱۳۹۲). پژوهشگران برای کاهش میزان پاتولین در سیب و فرآورده‌های آن مطالعات بسیاری انجام داده‌اند. در سال ۱۹۷۳ لووت و پیلر نشان دادند که پاتولین به تخریب حرارتی در pH بین ۳/۵ الی ۵/۵ تا دمای ۱۲۵ درجه سلسیوس مقاوم است (Lovett and Peeler, 1973).

در تحقیقی دیگر بیان شد که برخی از گونه‌های پنی‌سیلیوم حتی در دمای کمتر از ۵ درجه سلسیوس بر روی میوه رسیده مورد استفاده در فرآیند، قادر به رشد بوده و پاتولین تولید می‌کند (Northold and Bullerman, 1982). محققان دیگری گزارش کردند که پاستوریزاسیون غیرمداوم در دمای ۹۰ درجه سلسیوس و زمان ۱۰ دقیقه تا حدی مقدار پاتولین در نوشیدنی سیب پاستوریزه شده را کاهش می‌دهد، اما به‌طور کامل سبب حذف پاتولین نمی‌شود (Wheeler *et al*., 1987). همچنین در پژوهشی، کاهش متوسط ۲۵ و ۳۹ درصد میزان پاتولین را با فیلتراسیون معمولی و اولترافیلتراسیون گزارش کردند (Acar *et al*., 1998) و محققان دیگری اثر حرارت و صاف کردن با کمک زغال فعال را برکاهش میزان پاتولین در آب سیب تجاری بررسی و کاهش ۱۳/٤درصدی را در اثر فرایند حرارتی و کاهش ۲۲/۹ درصدی را با کاربرد زغال فعال گزارش نمودند (Kadakal *et al*., 2001). به‌علاوه، در تحقیقات دیگری تأثیر مراحل مختلف فراوری کنسانتره آب سیب، روی میزان پاتولین بررسی و مشخص شد که پاستوریزاسیون، آنزیم‌بری، میکروفیلتراسیون و فرایند تغلیظ، به‌ترتیب سبب کاهش میانگین ۳/٦، ۲۸/۳، ۲۰/۱ و ۲٤/٤ درصدی مقدار پاتولین شد (Welke *et al*., 2009).

بخش عمده‌ای از سیب و سایر میوه‌هایی که برای تهیه لواشک به کارخانه‌ها فرستاده می‌شوند، کیفیت بالایی ندارند و جزو میوه‌های درجه دو به حساب می‌آیند، لذا آمادگی زیادی برای فساد دارند و اگر این سیب‌ها به روش درستی به کارخانجات منتقل نشده و در آن‌جا نیز به‌طور مناسب نگه‌داری نشوند، فساد کپکی در آنها پیشرفت کرده و تولید سم پاتولین را به دنبال دارد. متأسفانه در بسیاری از کارخانجات داخلی، سیب‌ها و دیگر میوه‌ها برای مدت طولانی در فضای باز یا انبارهای معمولی نگه‌داری می‌شوند که در نتیجه احتمال شروع و گسترش فساد و تولید سم پاتولین در آنها وجود دارد. تحقیقات صورت گرفته در مورد پاتولین موجود در محصولات آب سیب و کنسانتره سیب تولید شده در کارخانجات ایران، نشان‌دهنده

Archive of SID
www.SID.ir

وجود مقادیر بالاتر از حد مجاز این سم در محصولات بوده که در واقع یکی از معضلات اساسی بر سر راه صادرات این محصولات، خصوصاً به کشورهای اروپایی می‌باشد (فتحی آچاچلوئی و همکاران، ۱۳۸۸؛ Shephard and Leggott, 2000; Artik *et al*., 1995). محققین ایرانی در تحقیقی نشان دادند که ۹۱/٤٪ لواشک‌های تولیدی در ایران بیش از میزان مجاز ۵۰µg/kg به سم پاتولین آلوده هستند (Montaseri *et al*., 2014). از طرفی تا به حال گزارشی از تأثیر مراحل مختلف فرایند تولید لواشک بر روی میزان پاتولین آن در دست نیست. از آن‌جا که در طی مراحل تولید لواشک، فرایندهای مختلف بر میوه اعمال می‌شود، تصور می‌شود که این فرآیندها در کاهش میزان پاتولین مؤثر باشد.

هدف از این پژوهش، بررسی تأثیر هر کدام از فرایندهای مختلف تولید لواشک روی میزان باقی‌مانده سم پاتولین در آن مرحله و در محصول نهایی می باشد.

مواد و روش‌ها

واکنشگرها و مواد شیمیایی مصرفی

اتیل استات، استونیتریل، تتراهیدروفوران، با خلوص بالا از شرکت مرک (Merck, Germany) خریداری شدند و هیدروکسی متیل فورفورال از شرکت سیگما (Sigma, USA)تهیه شد.

آماده‌سازی محلول های استاندارد

از حل کردن ۱۰ میلی‌گرم پودر خالص پاتولین در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول، محلولی با غلظت نهایی 10^3 ppm تهیه شد. استانداردهای کاری با غلظت ppb ۱۰۰۰-۱۰ در آب اسیدی با pH برابر ٤ در هر روز کاری آماده شد.

فرایند تولید لواشک در کارخانه

اغلب فرایند تولید لواشک با عملیات شستشو، سورتینگ، درجه‌بندی، خرد کردن و پاستوریزاسیون در دمای ۹۰ درجه سلسیوس به مدت زمان ۳۰ دقیقه انجام می‌گیرد. سپس با صاف کردن جهت تهیه پالپ و تغلیظ در مبدل حرارتی تحت خلاء با فشار حدود ۳۸۰ میلی‌متر جیوه و دمای ۹۰ درجه سلسیوس در مدت زمان ۲۰ ادامه می‌یابد تا محصولی که محدوده ماده جامد محلول در آب آن ۳۵ باشد، حاصل گردد. جهت تعدیل طعم با افزودن اسید سیتریک، نمک و شکر، فرآورده نهایی جهت پخت وارد دیگ پخت شده و سپس بر روی سینی جهت خشک کردن پخش می‌شود.

به‌منظور بررسی اثر مستقل هر مرحله روی تغییرات میزان پاتولین، برخی از مراحل فرایند (مراحل پخت مقدماتی و فرمولاسیون) در محیط آزمایشگاهی شبیه‌سازی گشت، اما مراحل دیگر که امکان بررسی مستقل اثر فرایند مربوطه در خط تولید فراهم بود، در محل کارخانه و از خط تولید، نمونه گیری شد. جهت بررسی دقیق‌تر موضوع، نمونه‌برداری‌ها در سه نوبت کاری کارخانه، در فاصله زمانی یک ماه انجام شد، زیرا حدس زده می‌شد که به‌دلیل تغییر دمای هوا و متفاوت بودن کیفیت میوه‌های وارده به کارخانه، در زمان‌های مختلف، آلودگی به سم در آن‌ها، یکسان نباشد و تمام آزمون ها در سه تکرار انجام گردید.

نمونه‌برداری در مراحل تولید

جهت انجام آزمایش‌های اندازه‌گیری پاتولین، نمونه‌ها در مراحل مختلف از خط تولید یک کارخانه لواشک سازی واقع در استان فارس برداشته شدند و در مراحلی از تولید نیز که امکان نمونه‌برداری مستقیم از خط تولید فراهم نبود از حالت شبیه‌سازی شده خط تولید، برای

www.SID.ir
Archive of SID

تهیه نمونه استفاده شد. نمونه‌برداری در پنج مرحله انجام شد، قابل ذکر است که نمونه‌برداری مراحل ۱ و ٤ با شبیه‌سازی خط تولید، در آزمایشگاه انجام شد، اما سایر مراحل، مستقیماً از خط تولید کارخانه نمونه‌برداری شدند.

۱- تهیه نمونه قبل و بعد از مرحله پخت مقدماتی

پس از تهیه مقدار مناسب سیب سالم (بیش از ۵ کیلوگرم) و جداسازی پوست و هسته و سایر قسمت-های اضافی آن، مطابق آن‌چه در واحد تولیدی صورت می‌گیرد، آب سیب با بریکس ۱۲ تهیه شد و برای اطمینان از عدم وجود سم پاتولین در هر نمونه، ابتدا با انجام آزمون توسط دستگاه کروماتوگرافی از عدم وجود پاتولین در آن، یقین حاصل شد. به منظور کنترل صحت روش آزمون، نمونه فاقد آلودگی را به میزان مشخصی، به سم آغشته کرده، سپس مراحل اندازه‌گیری توسط دستگاه انجام شد. محلول استاندارد پاتولین، با غلظت ppb ۱۰۰۰ تهیه شد و سپس از این محلول، مقدار مشخصی سم به نمونه جهت رسیدن غلظت نهایی سم در آن به ppb ۲۰۰ پاتولین، اضافه شد. سپس نمونه همانند مرحله پخت مقدماتی در واحد تولیدی، فرایند شد و نمونه‌برداری جهت تزریق به دستگاه کروماتوگرافی صورت گرفت.

۲- تهیه نمونه قبل و بعد از مرحله فیلتراسیون

۳- تهیه نمونه قبل و بعد از مرحله اواپراسیون (تغلیظ)

٤- تهیه نمونه در قبل و بعد از مرحله فرمولاسیون. به‌منظور بررسی اثر مستقل فرایند فرمولاسیون، در این مرحله نمونه‌ای با سطح آلودگی ppb ۲۰۰ پاتولین آماده و فرایندی مشابه فرایند فرمولاسیون کارخانه، روی آن اعمال شد. به این صورت که در واحد تولیدی، مقادیر ۵ درصد اسید سیتریک، ۲ درصد نمک و ۱ درصد شکر به فرآورده افزوده شد و پس از همگن‌سازی در دمای ۹۰ درجه سلسیوس، از فرآورده فرموله شده و همگن، جهت بررسی اثر مرحله فرمولاسیون، نمونه‌برداری انجام و میزان سم آن، قبل و بعد از فرایند مذکور اندازه گیری شد.

۵- تهیه نمونه قبل و بعد از پخت و خشک کردن نهایی

در آخرین مرحله فرایند تولید لواشک، فرآورده به‌مدت طولانی در معرض هوای گرم قرار داده می‌شود تا از رطوبت آن کاسته و خشک شود. جهت بررسی اثر این فرایند بر میزان سم پاتولین، نمونه‌ها در مدت زمان ٤/۵ ساعت در تونل پخت نهایی (خشک کن) با دمای ۹۸ درجه سلسیوس در ۸-٦ متر اول تونل و ۹۰-۸٤ درجه سلسیوس در یک‌سوم دوم تونل و ۷۵-٦۰ درجه سلسیوس در یک‌سوم آخر تونل خشک شدند. طی این مرحله، میزان رطوبت فرآورده از حدود ٦۵-٦۳ به حداکثر ۱۵ درصد کاهش می‌یابد. به‌منظور بررسی مستقل اثر مرحله نهایی بر میزان پاتولین، میزان آن در قبل و پس از مرحله خشک کردن در محصول لواشک اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری پاتولین با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)

دستگاه کروماتوگرافی مجهز به سیستم تزریق خودکار، دتکتور UV با طول موج ۲۷٦ nm، نرم افزار Millenium، ستون جداسازی (۲۵۰ mm × ۵ µm × ٤/٦ mm) C_{18}، بود. فاز متحرک از آب- استونیتریل و تتراهیدروفوران با نسبت ۹۷/۹۵-۱/۲۵-۰/۸۰ ٪ که از فیلتر ۰/٤۵ µm فیلتر و با سرعت جریان ۰/٦۰ ml/min

Archive of SID
www.SID.ir

از ستون عبور داده شد. هیدروکسی متیل فورفورال با غلظت mg/L ۲ در آب اسیدی آماده و به HPLC تزریق شد.

استخراج پاتولین از نمونه‌ها

اندازه‌گیری پاتولین، مطابق با روش ارایه شده در استاندارد ملی ایران به شماره ۷٤۳۸ انجام شد. سم پاتولین با استفاده از حلال اتیل استات از نمونه مورد آزمایش استخراج گردید و پس از گذراندن مراحل خالص‌سازی و تزریق، با مقایسه زمان بازداری کروماتوگرام استاندارد، شناسایی سم پاتولین صورت گرفت. تعیین مقدار سم نیز از طریق مقایسه سطح زیر منحنی‌های استاندارد با نمونه مجهول، با احتساب ضریب رقت و درصد بازیافت صورت گرفت.

به منظور استخراج سم پاتولین از نمونه‌ها، ۱۰ گرم نمونه با ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد (هموژناسیون نمونه در این مرحله با دقت و در دمای ٤۰ **سلسیوس** با همزن مغناطیسی صورت گرفت)، سپس سه مرتبه و هر مرتبه با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر، رقیق‌سازی گردید و ابتدا با همزن برقی به مدت ۲ دقیقه هموژن و با سرعت ٤۰۰۰ دور (rpm) به‌مدت ۲۰ دقیقه، سانتریفوژ شد. آن‌گاه با عبور دادن از کاغذ صافی، صاف گردید و سپس ۱۰ میلی‌لیتر از نمونه صاف شده به قیف جداکننده ۱۰۰ میلی‌لیتری منتقل و ۲۰ میلی‌لیتر اتیل استات به آن اضافه نموده و به‌مدت یک دقیقه با دست تکان داده شد. پس از جدا شدن فازها از هم، به دو ظرف درب‌دار ۱۰۰ میلی‌لیتری جداگانه منتقل نموده و فاز پایینی به همان قیف جداکننده قبلی برگردانیده شد مراحل استخراج سم، سه بار تکرار شد (استاندارد ملی ایران، ۷٤۳۸). پس از تخلیص و جداسازی ترکیبات اسیدی مداخله کننده بر اساس روش استاندارد، نمونه‌ها در دستگاه تبخیر کننده گردان تحت خلاء، در دمای ٤۰ درجه سلسیوس، تغلیظ و خشک شدند. پس از خشک کردن، به بالن ته‌گرد دستگاه، میزان ۱ میلی‌لیتر آب افزوده شده و به مدت ۳۰ ثانیه هم‌زده شد و پس از آن به مدت ۱ دقیقه در دستگاه سونیکاتور قرار داده شد. در مرحله بعد محتوی بالن از صافی سر سرنگی ۰/٤۵ میکرومتری عبور داده شد و در نهایت به درون ویال ۱ میلی‌لیتری منتقل گردید (استاندارد ملی ایران، ۷٤۳۸).

تزریق نمونه‌ها به دستگاه

با تزریق ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه، سطح زیر کروماتوگرام حاصل از نظر زمان بازداری با کروماتوگرام استاندارد مقایسه گردید و میزان سم با استفاده از منحنی کالیبراسیون محاسبه شد. اگر سطح زیر منحنی نمونه مجهول، از محدوده منحنی کالیبراسیون استاندارد خارج شود، نمونه ابتدا رقیق و سپس به دستگاه تزریق می‌شود (استاندارد ملی ایران، ۷٤۳۸). همچنین برای بررسی عدم تداخل کروماتوگرام‌های هیدروکسی متیل فورفورال و پاتولین، نیاز به تزریق مخلوط این دو سم در هر روز کاری بود.

آزمون آماری

برای اطمینان از دقت آزمایش و دستگاه، آزمایش‌ها در هر روز کاری در ۳ بار تکرار انجام شد و سپس میانگین و انحراف معیار نسبی داده‌ها در یک روز کاری بدست آمد. این روند در ۲ روز کاری دیگر هم تکرار شد و انحراف معیار نسبی بین داده‌های ۳ روز متوالی محاسبه شد. جهت مطالعه وجود اختلاف آماری معنی

www.SID.ir

دار بین تیمارها از آزمون T مستقل و نرم افزار SPSS 11.5 استفاده شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از فرایند پخت مقدماتی (در سه روز مختلف) در دمای حدود ۹۰ درجه سلسیوس و مدت ۲۰ دقیقه روی میزان سم پاتولین نمونه‌ها در جدول (۱) آورده شده است. همان‌طور که در این جدول دیده می‌شود، میزان سم پاتولین در نمونه‌ها پس از فرایند، نسبت به پیش از آن به‌طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) کاهش یافت و به‌طور متوسط به ۲/۴۸ درصد رسید.

جدول ۱- اثر فرایند پخت مقدماتی بر کاهش میزان پاتولین*

زمان اندازه‌گیری (روز)	میزان سم در نمونه (ppb)		کاهش مقدار سم (درصد)
	قبل از فرایند	بعد از فرایند	
۱	۱۵۶/۲±۴/۳۲ a	۱۵۲/۲±۴/۱۳ b	۲/۵۷
۱۵	۱۸۲/۸±۴/۹۲ a	۱۷۹/۳±۴/۶۷ b	۲/۴۲
۳۰	۱۸۶±۳/۰۰ a	۱۸۱/۸±۲/۹۶ b	۲/۴۶

*حروف متفاوت در هر ردیف نشانگر تفاوت معنی‌دار داده‌ها در سطح $P < ۰/۰۵$ است.

نتایج اثر فیلتراسیون روی میزان سم پاتولین در جدول (۲) نشان داده شده است. همانند مرحله قبل در این مرحله از فرایند، میزان سم پاتولین به میزان کم ولی به شکلی معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) کاهش پیدا کرده است که به‌طور متوسط میزان کاهش پاتولین در این مرحله به ۳/۸۲ درصد رسید.

جدول (۲)- اثر فرایند فیلتراسیون بر میزان پاتولین*

زمان اندازه‌گیری (روز)	میزان سم (ppb)		کاهش مقدار سم (درصد)
	قبل از فیلتراسیون	بعد از فیلتراسیون	
۱	۲۳۲ ±۱/۴۷ a	۲۲۳/۲ ±۱/۳۰ b	۳/۷۸
۱۵	۳۰۶ ± ۳/۰۵ a	۲۹۴ ± ۲/۴۵ b	۳/۹۱
۳۰	۴۲۵ ± ۵/۰۳ a	۴۰۹ ± ۵/۳۵ b	۳/۷۶

*حروف متفاوت در هر ردیف نشانگر تفاوت معنی‌دار داده‌ها در سطح ($p< ۰/۰۵$) است.

نتایج اثر فرایند اواپراسیون روی میزان سم پاتولین در جدول (۳) آورده شده است. در این مرحله رطوبت محصول از حدود ۸۸-۸۷ درصد به حدود ۶۵-۶۳ کاهش داده شد. قابل ذکر است که به‌منظور امکان

Archive of SID
www.SID.ir

مقایسه میزان سم، در قبل و بعد از فرایند تغلیظ، در ستون سوم از جدول (۳)، تأثیر کاهش رطوبت نمونه‌ها بر مقدار سم در نظر گرفته نشده است. زیرا هدف بررسی تأثیر فرایند بر میزان سم بود. همان‌طور که در جدول (۳) مشاهده می‌شود مرحله تغلیظ، سبب کاهش پاتولین تا حداکثر ۲۳ درصد و متوسط ۱۸/۳ گردید.

جدول ۳ – اثر فرایند اواپراسیون بر میزان پاتولین*

زمان اندازه گیری (روز)	میزان سم قبل از اواپراسیون (ppb)	میزان سم بعد از اواپراسیون (ppb)		کاهش مقدار سم (درصد)
		بدون در نظر گرفتن تغییر رطوبت نمونه‌ها	با در نظر گرفتن تغییر رطوبت نمونه‌ها	
۱	۲۲۳/۲ ±۱/۷۳ [a]	۱۸٤/۵۳ ±۱/۱۵ [b]	۵۵۲ ±۱/۱۵	۱۷/۳
۱۵	۲۹٤ ± ۲/٤٤ [a]	۲۲۵/٤۹ ± ۳/۵۲ [b]	٦٤۳ ± ۳/۵۲	۲۳
۳۰	٤۰۹ ±۵/۳۵ [a]	۳۵۰/۵۱ ± ۳/۱۱ [b]	۱۰۳٤ ± ۳/۱۱	۱٤/۳

*حروف متفاوت در هر ردیف نشانگر تفاوت معنی‌دار داده‌ها در سطح (p< ۰/۰۵) است.

نتایج حاصل از اثر فرایند فرمولاسیون بر میزان پاتولین در نمونه شبیه‌سازی شده آغشته به ppb ۲۰۰ پاتولین، در جدول (٤) نشان داده شده است. همان‌طور که در جدول مشاهده می‌شود، فرایند مذکور سبب کاهش میزان پاتولین به مقدار متوسط ۲٤/٦ درصد شد.

جدول ٤- اثر فرایند فرمولاسیون بر میزان پاتولین*

زمان اندازه‌گیری (روز)	میزان سم (ppb)		کاهش مقدار سم (درصد)
	قبل از فرمولاسیون	بعد از فرمولاسیون	
۱	۱۵٦/۲ ± ٤/۳۲ [a]	۱۱۷ ±۱/۸۳ [b]	۲۵
۱۵	۱۸۲/۸ ± ٤/۹۲ [a]	۱۳٤/۸ ± ٦/۰٤ [b]	۲٦/۳
۳۰	۱۸٦ ± ۳/۰۰ [a]	۱٤٤/۲ ± ۰/٦۱ [b]	۲۲/۵

*حروف متفاوت در هر ردیف نشانگر تفاوت معنی‌دار داده‌ها در سطح (p< ۰/۰۵) است.

نتایج حاصل از مرحله نهایی تولید لواشک، در جدول (۵) نشان داده شده است. همان‌طور که در جدول مشاهده می‌شود. به‌رغم زمان طولانی حرارت‌دهی و خشک کردن فرآورده، متوسط درصد کاهش میزان سم پاتولین در محصول نهایی فقط ۸/۵۸ درصد بود.

www.SID.ir
Archive of SID

جدول ۵- اثر فرایند خشک کردن نهایی بر میزان پاتولین*

زمان اندازه‌گیری (روز)	میزان سم (ppb)			کاهش سم (درصد)
	قبل از مرحله خشک کردن	بعد از خشک کردن		
		بدون لحاظ تغییر رطوبت	با لحاظ تغییر رطوبت	
۱	۵۵۲ ±۱/۱۵ [a]	٤٧٨/٤١ ± ٤/٥٤ [b]	۱۱۸۵/۰۰±٤/٥٤	۱۱/۷۰
۱۵	٦٤٣ ± ۳/۵۲ [a]	٦٠١/٢٠ ± ٨/١٤ [b]	۱٤۰۸/۰۰±۸/۱٤	٦/۵۰
۳۰	۱۰۳٤ ± ۳/۱۱ [a]	٩٥٦/٠٤ ± ٧/٦٨ [b]	۲۲۹٤/٤۰±۷/٦۸	۷/۵٤

*حروف متفاوت در هر ردیف نشانگر تفاوت معنی‌دار داده‌ها در سطح (p< ۰/۰۵) است.

بحث و نتیجه‌گیری

در مرحله پخت مقدماتی سیب، نمونه‌ها به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سلسیوس حرارت دیدند. گرچه میزان سم در نمونه‌ها کاهش معنی‌دار داشت، اما به‌دلیل مقاومت حرارتی سم، این کاهش بسیار کم و تنها در حد ۲/٤۸ درصد بود. به‌عبارت دیگر بخش عمده این سم پس از فرایند پخت مقدماتی در نمونه‌ها باقی می‌ماند. محققانی مانند لووت و پیلر (۱۹۷۳) و کاداکال و همکاران (۲۰۰۱) نیز گزارش کرده‌اند که اعمال حرارت در فرایندها سبب کاهش نسبی پاتولین می‌شود (Lovett and Peeler 1973; Kadakal, *et al.*, 2001). در مرحله فیلتراسیون نیز سم پاتولین کاهش قابل توجهی نشان نداد. بر اساس نتایج جدول (۲)، درصد کاهش مقدار سم پس از فرایند فیلتراسیون، ۳/۸۲ درصد بود که با توجه به کاهش ناچیز مقدار سم در این مرحله می‌توان احتمال داد که به رغم جداسازی پوست و سایر اضافات از بافت میوه، سم به‌داخل آب و پالپ سیب نفوذ کرده و مقدار قابل‌توجهی از آن به‌دلیل محلول بودن، وارد مرحله بعدی فرایند شده است. پژوهش آکار و همکاران (۱۹۹۸) در مورد آب سیب نشان داد که استفاده از نوع خاصی از صافی تحت خلاء در مرحله فیلتراسیون و زلال‌سازی، به‌طور متوسط تا ۳۹ درصد سبب کاهش پاتولین در آب سیب می‌شود، همین محققین، کاهش پاتولین در آب سیب را پس از صاف کردن با الترافیلتراسیون همراه با کاربرد مواد کمک صافی ژلاتین و بنتونیت، در حد ۲۵ درصد گزارش کردند (Acar *et al.*, 1998). همچنین ولک و همکاران تأثیر مراحل مختلف فرآوری کنسانتره آب سیب را بر میزان پاتولین بررسی کرده و گزارش کردند که میکروفیلتراسیون سبب کاهش میانگین ۲۰/۱ درصدی مقدار پاتولین در آب سیب می‌شود (Welke *et al.*, 2009). قابل ذکر است که در تولید آب سیب بر خلاف لواشک، پالپ و ذرات معلق، کاملاً از آن جداسازی می‌شود و از طرف دیگر صافی‌هایی با روزنه‌های بسیار کوچکتر برای صاف کردن آب سیب استفاده می‌شود، لذا دلیل کاهش بیشتر پاتولین در آب سیب، در مقایسه با لواشک، در مرحله فیلتراسیون می‌تواند به‌دلایل ذکر شده باشد.

در فرایند اواپراسیون در مقایسه با فرایندهای پیشین، میزان پاتولین نمونه‌ها به مقدار بیشتری (۱۸/۰۲ درصد) کاهش یافت. نتایج مشابه توسط ولک و همکاران مبنی بر کاهش حداکثر ٢٤/٤ درصد میزان پاتولین در آب سیب در اثر فرایندهای تبخیری و تغلیظ گزارش شده است (Welke *et al.*, 2009)، اما هم در تحقیق حاضر و هم در تحقیق محققان دیگر مشاهده می‌شود که بخش

Archive of SID
www.SID.ir

عمده سم پاتولین به‌دلیل مقاومت حرارتی، مرحله تغلیظ را تحمل کرده و در محصول باقی می‌ماند. قابل ذکر است که انجام عملیات تغلیظ تحت خلاء، نه تنها صدمات حرارتی و تغییر رنگ و از بین رفتن مواد مغذی در محصول را به‌دلیل انجام عملیات در دمای کمتر از ۱۰۰ درجه سلسیوس کاهش می‌دهد، بلکه تجزیه مواد سمی مانند پاتولین را نیز در محصول کم می‌کند. همان‌طور که در نتایج مندرج در ستون سوم جدول ۳ ملاحظه می‌شود، چنانچه تغییرات غلظت سم در اثر تغییرات آب در محصول در نظر گرفته نشود و تنها به اثر فرایند اواپراسیون و حرارت اعمال شده به آن نگاه شود، بیش از ۸۰ درصد سم، پس از عملیات تغلیظ، دست نخورده در محصول، باقی‌مانده است. از طرف دیگر به‌دلیل کاهش رطوبت (افزایش غلظت مواد خشک) در محصول، تجمع و افزایش غلظت سم مشاهده می‌گردد (مقایسه نتایج ستون دوم و چهارم در جدول ۳). در مرحله فرمولاسیون سم پاتولین نمونه‌ها در مقایسه با مرحله پیشین به میزان ۲٤/٦ درصد کاهش یافت. این میزان کاهش، در مقایسه با تأثیر مرحله پخت مقدماتی و فیلتراسیون تا حدودی بیشتر بود و احتمالاً به‌دلیل اثر حرارت مورد استفاده در این مرحله و همچنین حضور مواد جدید در محصول است که درصد وزنی مواد دیگر از جمله سم را نسبت به کل محصول، تا حدی کاهش می دهد.

در آخرین مرحله از فرایند، فرآورده برای مدت طولانی در معرض هوای داغ قرار می‌گیرد تا خشک شود. سم پاتولین در این مرحله تنها به میزان ۸/۵۸ درصد کاهش پیدا کرد. نتایج حاصله حاکی از آن است که حرارت حتی به مدت طولانی و دمای بالا نیز نمی‌تواند سبب کاهش قابل‌ملاحظه و رساندن میزان سم در محصول به محدوده قابل قبول استاندارد جهانی گردد. بنابراین می‌توان گفت که در صورت آلودگی بالای مواد اولیه، حرارت در محدوده مورد استفاده در صنعت تولید لواشک، برای از بین بردن سم پاتولین به تنهایی کافی نمی‌باشد. بررسی تحقیقات سایر محققین نیز مؤید این مسأله است که حرارت در محدوده ۹۰ درجه سلسیوس که در صنعت تولید آب سیب و سایر فرآورده‌های این محصول به‌کار می‌رود، قادر به کاهش چشمگیر میزان پاتولین نمی‌باشد (فتحی آچاچلوئی و همکاران، ۱۳۸۸؛ Harrison, 1989; Moller and Josefsson, 1980; Lovett and Peeler, 1973).

همان طور که در جدول ٦ ملاحظه می‌شود، هر مرحله از تولید لواشک، تأثیر نسبی بر کاهش میزان پاتولین در محصول نهایی دارد، بیشترین کاهش در مرحله فرمولاسیون و اواپراسیون و در مراحل بعدی به‌ترتیب شامل خشک کردن، فیلتراسیون و پخت مقدماتی می‌باشد. به هر حال بیش از ٤٠ درصد از سم در محصول نهایی باقی می‌ماند، به‌عبارت دیگر فرایندهای مذکور قادر به حذف این سم و یا رساندن آن به حد قابل قبول و استاندارد نیستند.

جدول ٦ – مقایسه متوسط درصد کاهش پاتولین در هر مرحله و مجموع کاهش در مراحل فرایند تولید لواشک*

مرحله فرایند	درصد کاهش سم
پخت مقدماتی	۲/٤۸ ^{e}
فیلتراسیون	۳/۸۲ ^{d}
اواپراسیون	۱۸/۰۲ ^{ab}
فرمولاسیون	۲٤/٦۰ ^{a}
خشک کردن	۸/۵۸ ^{c}
مجموع	۵۷/۵۰

*حروف متفاوت در هر ردیف نشانگر تفاوت معنی‌دار داده‌ها در سطح ($p< ۰/۰۵$) است.

www.SID.ir
Archive of SID

اگرچه هر یک از مراحل مختلف در تولید لواشک موجب کاهش کمی در میزان پاتولین می‌شود، اما این کاهش در حدی نیست که مقدار این سم را در محصول نهایی به کمتر از حد استاندارد قابل قبول برساند و به‌ویژه به‌دلیل تغلیظ فرآورده، تجمع این سم در محصول نهایی مشاهده می‌شود. همان‌طور که ذکر شد، مقدار مجاز پاتولین در مواد غذایی حداکثر ۵۰=µg/kg است، این مقدار در مورد کودکان و نوزادان مطابق مقررات اتحادیه اروپا ۱۰ µg/kg و در فرآورده‌های جامد سیب ۲۵ µg/kg می‌باشد (Welke *et al*., 2009; Lingali *et al*., 2000; Artik *et al*., 1995). در این پژوهش، مقدار سم در محصول نهایی بسیار بالاتر از حد استاندارد قابل‌قبول بوده و بی‌گمان سلامتی مصرف‌کنندگان و به‌ویژه کودکان را با خطر مواجه می‌سازد، لذا توصیه می‌شود که از مصرف میوه‌های آلوده به کپک در تولید این محصول خودداری شود و در خط تولید نیز با عدم نگهداری طولانی مدت میوه‌ها و رعایت کامل اصول بهداشتی، امکان ایجاد این سم مضر کاهش یابد.

منابع

- رادمرد قدیری، غلامحسین، کلباسی اشتری، احمد (۱۳۹۰). بررسی ویژگی‌های شیمیایی و میکروبی لواشک سیب. نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران، ۷ (٤): ۳۲٤-۳۲۹.
- فتحی آچاچلوئی، بهرام.، آزاده مرد دمیرچی، صدیف.، حصاری، جواد. نعمتی، محبوب. (۱۳۸۸). مقدار مایکوتوکسین پاتولین در آب میوه‌های تولیدی چند کارخانه آب میوه‌سازی شمال غرب کشور، مجله پژوهش های صنایع غذایی، (۱۹): ۱-٤.
- موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. (۱۳۸۳). تعیین پاتولین در آب سیب و فرآورده‌های آن به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا. چاپ اول، شماره استاندارد ۷٤۳۸ .

- Acar, J., Gökmen, V. and Taydas, E. (1998). The effects of processing technology on the patulin content of juice during commercial apple juice concentrate production. European Food Research and Technology, 207: 328–331.
- Artik, N., Cemeroglu, B., Aydar, G. and Saglam, N. (1995). Use of activated carbon for patulin control in apple juice concentrates. Journal of Agriculture and Forestry, 19(4): 259–265.
- Cheraghali, A., Mohammadi, H., Amirahmadi, M., Yazdanpanah, H., Abouhossain, G., Zamanian, F., *et al*. (2004). Incidence of patulin contamination in apple juice produced in Iran. Journal of Food control, 16:165–167.
- Harrison, M. (1989). Presence and stability of patulin in apple products. A Review. Journal of Food Safety, 9: 147–153.
- Hopkins, J. (1993). The toxicological hazards of patulin. Journal of Food and Chemical Toxicology, 31: 455–456.
- Hopmans, E.C. (1997). Patulin a mycotoxin in apples. Journal of Food Science and Technology, 91: 1–6.

Archive of SID
www.SID.ir

- Kadakal, C., Sebahatllv, N. and poyrazoglu, E. (2001). Effect of commercial processing stages of apple juice on patulin, fumaric acid and hydroxyl methylfurfural levels. Journal of Food Quality, 25: 59–368.
- Linglai, C., You, M. and Yang, C. (2000). Detection of mycotoxin patulin in apple juice. Journal of Food and Drug Analysis, 8: 85–96.
- Lovett, J. and Peeler, J.T. (1973). Effect of pH on the thermal destruction kinetics in aqueous solution. Journal of Food Science, 38: 1094–1095.
- Mayer, V. and Legator, M. (1969). Production of petite Mutants of Saccharomyces cerevisiae by patulin. Journal of Agricultural Food Chemistry, 17: 454–456.
- Moller, T. and Josefsson E. (1980). Rapid high-pressure liquid chromatography of patulin in apple juice. Journal of Association of Analytical Chemistry, 63: 1055–1056.
- Montaseri, H., Eskandari, M.H., Yeganeh, A.T., Karami, S., Javidnia, K., Dehghanzadeh, G.R. and Mesbahi, G.R. (2014). Patulin in apple leather in Iran. Food Additives and Contaminants: Part B, 7: 106-109.
- Northold, M. and Bullerman, L. (1982). Prevention of mold growth and toxic production through control of environmental conditions. Journal of Food Protection, 45: 519–526.
- Prakash, D., Singh, B. and Upadhyay, G. (2007). Antioxidant and free radical scavenging activities of phenols from onion (Allium cepa). Journal of Food Chemistry, 102: 1389–1393.
- Prieta, J., Susanadiaz, M., Suarez, G. and Dominguez, L. (1994). Survey of patulin in apple juice and children's apple food by the diphasic dialysis membrane procedure. Journal of Agriculture Food Chemistry, 42: 1701–1703.
- Shephard, G. and Leggott, N. (2000). Chromatographic determination of the mycotoxin patulin in fruit and fruit juices. Journal of Chromatography A, 882: 17–22.
- Tabatabaie, F., Mortazavi, S., tabatabaee, F. and Ebadi, A. (2010). Reduction of patulin in apple juice after treatment with SO_2 and heat. Journal of Science and Technology, pp. 596–598.
- Welke, J., Hoeltz, M., Dottori, H. and Noll, I. (2009). Effect of processing stages of apple juice concentrate on patulin levels. Journal of Food Control, 20: 48–52.
- Wheeler J., Harrison, M. and Koehler, P. (1987). Presence and stability of patulin in pasteurised apple cider. Journal of Food Science, 52: 479–480.

Archive of SID

www.SID.ir

Effect of different processing stages of commercial fruit leather on patulin reduction

Eskandari, M.H.[1], Montaseri, H.[2], Mesbahi, Gh.[3*], TaheriYaganeh, A.[4], Niakousari, M.[5], Karami, S.[6]

1- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.
2- Assistant Professor, Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.
3- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.
4- Former Msc. Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.
5- Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.
6- Food and Drug Control Laboratory, Deputy for Food and Drug affairs, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.
[*]Corresponding author email: mesbahi@shirazu.ac.ir
(Received: 2013/12/3 Accepted: 2015/2/25)

Archive of SID

Abstract

Fruit leather (Lavashak) is a high consumption food product especially among children in Iran. This product is being manufactured by low quality fruits that usually are contaminated with molds and patulin mycotoxin. The objective of this study was to determine the effect of industrial processing stages of leather production (including pre-heating, filtration, evaporation, formulation and final heat boiling and drying) on reduction of patulin level. Samples were taken for analysis prior and following each processing steps and patulin level was determined using HPLC technique. The results indicated that the maximum reduction of patulin level was ooccurred during formulation and evaporation steps which was estimated at 24.60 and 18.20%, respectively. Meanwhilewhile after drying, filtration, and pre-heating processes, the main loss of patulin was 8.58, 3.82 and 2.48%, respectively. It was concluded that the amount of residual patulin in final product was higher than 40% of its primary concentration. Besides, various processing stages were found insufficient to eliminate all of patulin or to reduce its level to lower than the maximum acceptable limit.

Key words: Patulin, Fruit leather (Lavashak), HPLC, Processing stages

www.SID.ir