

# הגנת הצומח: Ochratoxin, רעלן הנוצר על ידי פטריות *Aspergillus* ונמצא בענבים ומוצריהם

נחמן פסטר / המחלקה למדעי המזון, מרכז וולקני,  
מינהל המחקר החקלאי  
רבקה ברקאי-גולן / גימלאית, המחלקה לחקר תוצרת  
חקלאית לאחר קטיף, מרכז וולקני, מינהל המחקר  
החקלאי



תמונת ארכיון

הדבקת הענבים מתחילה בעיקר בהדבקת פצעים הנגרמים לעינב בשל פעילות חרקים או עקב טיפול בלתי זהיר בפרי. ככל שהפירות נשארים תקופה ממושכת יותר על הגפן עולה מספר הפטריות שעלולות ליצור אוכרטוקסין, ובמקביל עולה גם רמת האוכרטוקסין בפרי. גם בארץ הוכח כי ענבים נתקפים במיני *Aspergillus* היוצרים אוכרטוקסין. רמת הסף המותרת להימצאות אוכרטוקסין ביין במדינות הקהילה האירופית היא 2 מ"ג/ליטר בלבד. מאחר שהטוקסין נמצא בעיקר בענבים נגועים, סילוק ענבים אלה עשוי לתרום להורדת רמת הטוקסין במוצר הסופי. במהלך הכנת היין נספח האוכרטוקסין לדפנות השמרים המשמשים לתסיסה, לחלקיקי ענבים, לחומרים הנמצאים ביין כגון פוליפנולים ולחומרים המשמשים להצללה או לארומה. בכל מקרה אין הרחקה מוחלטת של הטוקסין, ולפיכך הוא יימצא במוצר הסופי, יין או מיצי ענבים, ויש לבדוק את נוכחותו במוצרים המשווקים לציבור. הפחתה של רמת האוכרטוקסין בענבים או ביין קשורה בראש ובראשונה בהדברת מיני האספרגילוס השחורים בפרי. בחינת יעילותם של פונגיצידיים בדיכוי צמיחת הפטריה *Aspergillus carbonarius*, ויצירת האוכרטוקסין בתרבית, הראתה שלא כל

**W**  
יכוטוקסינים, רעלני פטריות, הם מטבוליטים משניים הנוצרים על ידי מינים רבים של פטריות המתפתחות על תוצרת חקלאית בשדה או במהלך האחסון. המיכוטוקסינים תוקפים מגוון אברים ורקמות בבעלי חיים ובבני אדם וגורמים לנזק בריאותי קשה. רעלנים אלה נוצרים בעיקר על ידי מינים של אספרגילוס (*Aspergillus*) ותוקפים בעיקר כליות וכבד. ב-1996 נמצא, כי אוכרטוקסין עלול להימצא בענבים, וכמויות ניכרות של הרעלן נמצאו גם ביין ובמיצי ענבים. מאמר זה מסכם את מכלול הגורמים המשפיעים על יצירת הרעלן בענבים, ומתאר אמצעים להפחתתו.

מיני האספרגילוס השחורים, ובעיקר *Aspergillus carbonarius*, הם האחראים העיקריים ליצירת אוכרטוקסין בענבים והצטברותו ביין.

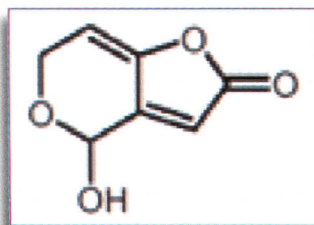
בתמונה למעלה: *Aspergillus carbonarius* בענבים



להיות מקומיים - באיבר מסוים, כגון בכבד, או ברמת התא, כגון פגיעה בחומר הגנטי שבו, או מערכתיים - פגיעה במערכת הדם, העצבים, הרבייה ועוד. חדירת המיכטוקסינים לגוף נעשית דרך מערכת העיכול, הנשימה או ספיגתם דרך העור, והם עלולים בין היתר להשרות גידולים סרטניים, להשרות מוטציות ולדכא את המערכת החיסונית. מיכטוקסינים המזהמים תוצרת חקלאית גורמים להפסדים כלכליים גדולים הן בגין נזקים ישירים - פסילת תוצרת המכילה רעלנים, והן בשל נזקים עקיפים למשק החי - ירידה במשקל גוף, פחיתה בתנובת חלב ותמותה. על המיכטוקסינים המסוכנים והנפוצים בטבע נמנים אלה מקבוצת האפלטוקסינים (aflatoxins), הידועים כגורמים לסרטן בכבד, אוכרטוקסינים (ochratoxins) התוקפים כליות וכבד ועלולים לגרום בהם לגידולים סרטניים, טריכוטצנים (trichothecens) הפוגעים בעור ומשרים גידולים שונים ופיומוניזינים (fumonisins), התוקפים מערכת עצבים.

פגיעתם של מיכטוקסינים רבים בבני אדם הוכחה במספר רב של מקרים ובעיקר בגרימת סרטן הכבד, כתוצאה מצריכת מזון המכיל רעלנים מקבוצת האפלטוקסינים. מאחר שהרעלנים מוכרים כגורמי נזק בריאותי חמור, קיימות כיום במרבית מדינות העולם רמות סף מותרות להימצאות רעלנים בתוצרת חקלאית ובמזון. גם בארץ קיימות תקנות המגדירות את רמות הסף להימצאות רעלנים בסוגי מזון שונים המיועדים לצריכת אדם ובעלי חיים.

עד 1996 נחשבו הענבים למוצר בטוח מבחינת נוכחות מיכטוקסינים בהם. בעקבות מחקרם של זימרלי ודיק באותה שנה, שהצביע על נוכחותן של רמות ניכרות של אוכרטוקסין בין ובמיצי ענבים, הלכה וגברה ההתעניינות ברמתו במוצרי ענבים ברחבי העולם ובפטריות האחראיות ליצירתו. מחקרים שנערכו במדינות רבות הצביעו על מיני האספרגילוס השחורים ובעיקר על *Aspergillus carbonarius*, *A. tubingensis* ואספרגילוס מקבוצת *niger*, כפטריות האחראיות ליצירת האוכרטוקסין בענבים והצטברותו במוצרי ענבים שונים. נביג הפטריות הללו נפוצים על פני פירות שונים באזור הים התיכון ובאזורים טרופיים וסובטרופיים. למרות שהאחריות של *A. carbonarius* ליצירת האוכרטוקסין בענבים הוכרה רק לאחרונה, פטריה זו נחשבת היום למקור החשוב ביותר של אוכרטוקסין בין, במיץ ענבים ובצימוקים למיניהם.

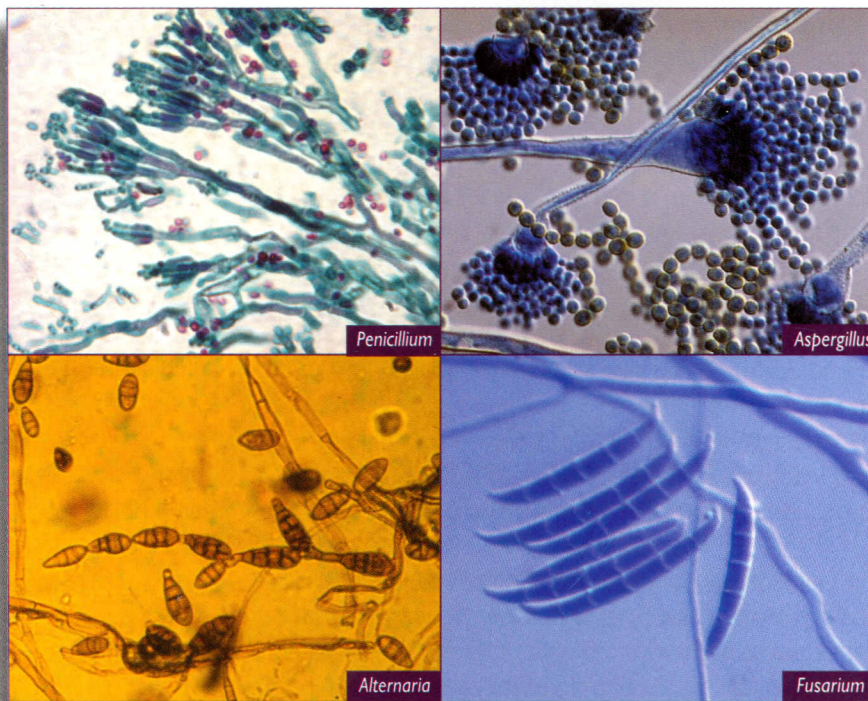


**אוכרטוקסין**  
המבנה הכימי של אוכרטוקסין מוצג באיור:

הפונגיצידיים המעכבים את צמיחת הפטריה מפחיתים את יצירת הרעלן. בניגוד לפונגיצידיים המכילים גופרית, פונגיצידיים המכילים נחושת או סטרובילורינים מפחיתים הן את צמיחת הפטריה והן את יצירת האוכרטוקסין.

## מבוא

מיכטוקסינים (Mycotoxins), רעלני פטריות, הם מטבוליטים משניים הנוצרים על ידי פטריות אגב התפתחותם על מצע מזון סינתטי, כמו גם על מגוון תוצרת חקלאית כגון גרעינים, פירות וירקות. המיכטוקסינים עלולים להיווצר בשלבים השונים של התפתחות התוצרת לפני הקטיף (preharvest) או אחריו (postharvest). יצירת הרעלנים אופיינית בעיקר למינים השייכים לסוגים אספרגילוס (*Aspergillus*), פניציליום (*Penicillium*), פוזריום (*Fusarium*) ואלטרנריה (*Alternaria*). למרבית המיכטוקסינים מבנה כימי ייחודי, אך את



חלקם ניתן לסווג לקבוצות, באשר הם בעלי שלד מולקולרי זהה שעליו מותמרות קבוצות שונות. לא כל הפטריות יוצרות רעלנים ברמה דומה. כמות הרעלן הנוצרת על ידי תבדיד מסוים של פטריה תלויה בתנאי הגידול (טמפרטורה, לחות), בסוג התוצרת ובתחרות עם מינים אחרים הנמצאים בסביבת הגידול. ידועים כיום למעלה מ-100 מיכטוקסינים שונים בעלי תפוצה שונה בטבע. המיכטוקסינים תוקפים מגוון אברים ורקמות בבעלי חיים ובבני אדם וגורמים לקבוצת מחלות הנקראות מיכטוקסיקוזות (Mycotoxicoses). הנזקים עלולים להיות כרוניים - עקב צריכת מנות קטנות של רעלן במשך תקופה ממושכת, או אקוטיים - עקב ספיגה של כמות גדולה של רעלן באופן חד פעמי. הנזקים עלולים



גורמי שדה המשפיעים על רמות האוכרטוקסין בענבים ומוצריהם כוללים את האזור בו מצוי הכרם, האקלים, זן הענבים והטיפול בכרם. ענבים מאזורים הנמצאים בקו רוחב קרוב לקו המשווה, בו האקלים חם יותר, מכילים ריכוזים גבוהים יותר של אוכרטוקסין בהשוואה לפירות מאזורים הנמצאים בקו רוחב הרחוק מקו המשווה, בהם האקלים קריר יותר. באופן כללי ניתן לומר, שהפטריות היוצרות אוכרטוקסין מעדיפות אקלים חם על פני אקלים ממוזג או קר. בסקר שבוצע בארץ במשך שלוש שנים במספר זני ענבים, נמצא כי הענבים מאלחים בפטריות היוצרות אוכרטוקסין, ומכאן, שגם בישראל קיימת סכנה להימצאות הטוקסין ביין ובמיצי ענבים למיניהם.

הדבקה בענבים מתחילה בעיקר בפצעים המצויים בעינב הבשל. הפצעים יכולים להיגרם על ידי חרקים, השקיה מוגברת, גשם עז או טיפול בלתי זהיר בפרי. שיעור צמיחת הפטריות יוצרות האוכרטוקסין תלוי במיני האספרגילוס ולעתים אף בתבדילים השונים של אותו מין, ובמצבו של העינב. ענבים שניזוקו בכרם על ידי חרקים, השקיה רבה מדי או גשם עלולים להיתקף על נקלה על ידי הפטריות ולהכיל רמות גבוהות של אוכרטוקסין.

גם פירות שניזוקו במהלך הקטיף או אחריו עלולים להיתקף על ידי פטריות היוצרות אוכרטוקסין ולהכיל רמות ניכרות של רעלן זה. מחקרים אחדים הראו, כי משך הזמן בו נשארים הענבים בכרם לפני הבציר משפיע אף הוא על רמת האוכרטוקסין בהם: ככל שהפירות נשארים תקופה ממושכת יותר על הגפן עולה מספר הפטריות האחראיות ליצירת אוכרטוקסין, ובמקביל עולה גם רמת האוכרטוקסין בפרי.

העובדה שיינות אדומים נוטים להכיל במקרים רבים יותר אוכרטוקסין מאשר יינות לבנים הביאה למחשבה, שתהליכי הייבוש השונים בשני טיפוסים היין הללו, או משך הזמן הארוך יותר שבו על היין האדום לעבור בעת הייבוש בהשוואה ליין הלבן, יכולים להביא לידי התרבות גדולה יותר של מיני האספרגילוס והעלאה ברמת האוכרטוקסין.

לייבוש הענבים לשם הכנת צימוקים או פירות מיובשים אחרים יש השפעה בסיסית על רמות האוכרטוקסין במוצרים הסופיים המגיעים לצרכן. פירות המיועדים לייבוש חייבים להיות במצב טוב ביותר ותהליך הייבוש חייב להתחיל מיד לאחר הקטיף. ענבים העוברים ייבוש בשמש למשך שבעה עד 14 ימים נבחנים בדרך כלל בהתאם לדרגת הלחות שבהם. במהלכה של תקופה זו עולה ריכוז הסוכרים בפרי ורקמותיו הופכות למצע מתאים ביותר לצמיחת מיני האספרגילוס השחורים. גשם במהלך הייבוש גורם לייבוש בלתי אחיד ומגביר את הסכנה לזיהום באוכרטוקסין. משום כך כל תהליך הייבוש חייב להיעשות מהר ככל האפשר, ועל אריזת המוצרים ואחסונם להיעשות רק לאחר השגת רמה נאותה של לחות.

## דיכוי הריקבון והפחתה של רמת האוכרטוקסין בפרי ובמוצרי

המידע על התנאים הדרושים להתפתחות הפטריה חשוב לשם מניעה של יצירת האוכרטוקסין בפרי או הפחתתו. הטיפול המונע

אוכרטוקסינים הם קבוצת מטבוליטים משניים הרעילים לאדם ולבעלי חיים. ידועים כיום מספר אוכרטוקסינים, כגון A, B ו-C, אך הרעיל והנפוץ מכולם הוא אוכרטוקסין A, הגורם לנזק קשה בבעלי חיים ועדויות נסיבתיות מצביעות על פגיעה גם בבני אדם. אתר הפגיעה העיקרי הן הכליות, בהן גורם הטוקסין לנקרוזות עד כדי אובדן תפקוד, אך הטוקסין פוגע גם ברקמות הכבד וידוע כמעכב גידול בבעלי חיים. הרעלה המונית בבני אדם, שארעה בארצות הבלקן בשנות השישים, יוחסה מאוחר יותר לנוכחות אפשרית של אוכרטוקסין במשקאות תוססים שהוכנו מגרעיני דגנים המכילים את הטוקסין.

## רמת האוכרטוקסין ביין ובמוצרי ענבים אחרים

ידע רב הצטבר בשנים האחרונות על התפוצה הטבעית של אוכרטוקסינים בענבים ומוצריהם. התכולה הטבעית של אוכרטוקסין A ביינות ובמיצי ענבים נבדקה במדינות רבות, בהן שוויץ, גרמניה, פולניה, צרפת, איטליה, ספרד, פורטוגל, יוון, מרוקו, דרום אפריקה, קנדה, ארצות הברית, ברזיל, ארגנטינה, צ'ילה, יפן ואחרות. הרמות הגבוהות שנרשמו היו מעל 5 מ"ג/ליטר במיצי ענבים ומעל 7 מ"ג/ליטר ביין אדום. חשוב לציין, כי הרמה המירבית של אוכרטוקסין שהותרה באופן רשמי על ידי מדינות הקהילה האירופית לגבי יין ומיץ ענבים היא 2 מ"ג/ליטר בלבד. מנות נמוכות של אוכרטוקסין נמצאו בחומץ, בעיקר בחומץ בלסמי המיוצר מענבים. ענבים מיובשים, כגון צימוקים למיניהם, הנחשבים "מזון בריאות" לפני עצמם או בשילובם בעוגות, ביסקוויטים ומזונות אחרים, מהווים מקור לאוכרטוקסין עבור בני אדם הצורכים כמויות גדולות ובעיקר עבור ילדים.

תכולת האוכרטוקסין בפירות מיובשים נחקרה בשנים האחרונות בבריטניה, יוון, הונגריה, מצרים, קנדה, ארגנטינה ומדינות אחרות. הערכים המירביים שנמצאו בפירות המיובשים עולים בהרבה על הערכים שנמצאו ביינות ובמיצים, בהגיעם עד כדי 250 מ"ג/ק"ג. יש לציין, כי הרמה המירבית של אוכרטוקסין שהותרה על ידי מדינות הקהילה האירופית לגבי צימוקים או ענבים מיובשים היא 10 מ"ג/ק"ג.

## גורמים המשפיעים על יצירת האוכרטוקסין

יצירת אוכרטוקסין בענבים ורמתו במוצריהם השונים תלויה במיקרו-אקלים המאפשר את נביטת הנבגים, התפתחות התפטר וביסוסו בפרי. מחקרים *in vitro* הראו, כי הגורמים החשובים ביותר המשפיעים על מחזור החיים של מיני האספרגילוס המייצרים אוכרטוקסין הם הטמפרטורה, פעילות המים והתכונות הכימיות של מצע המזון עליו הם גדלים.

הטמפרטורה האופטימלית לצמיחת הפטריה *A. carbonarius* היא 30-35 מ"צ, עם צמיחה מזערית בטמפרטורות נמוכות מ-15 מ"צ. לעומת זאת, אוכרטוקסין נוצר רק לעתים רחוקות ב-35 מ"צ והאופטימום ליצירתו הוא 20-25 מ"צ.



בין אתרי הקישור בתאים לבין הטוקסין. בכל מקרה, קיימת תחרות על אתרי קשירה אלה בין הטוקסין ורכיבים אחרים הנמצאים בו, כמו פוליפנולים. בין מרכיבי הזופן של תאי השמרים נמצאים פוליסקרידים, חלבונים ושומנים. כל אלה מהווים אתרי קשירה, ולפיכך לדפנות התאים יש כושר ספיחה גבוה מאשר לכל מרכיב בנפרד.

ירידה ברמת האוכרטוקסין בעת הכנת היין מיוחסת גם לספיחת הטוקסין אל חלקי ענבים הנמצאים בנוזל (קליפות, חלקי גרעינים וכו'). כך, בכל תהליך סינון מורחק עם החלקיקים המוצקים גם טוקסין הקשור אליהם. רמת הטוקסין הנמצאת בין אדום גבוהה לרוב מזו הנמצאת בין לבן. בתהליך הכנת היין הלבן נמחצים הענבים לפני התסיסה ולפיכך יותר חלקיקים מוצקים, המהווים אתרי קשירה לטוקסין ומורחקים במהלך היינון, זמינים כבר בתחילת התהליך. בנוסף, בעת הכנת יין לבן קיימים יותר תהליכי הצללה בעזרת חומרים המרחיקים גם הם את הטוקסין.

חומרים המשמשים להצללה, כגון בנטוניט, פחמן ואשלגן קאזאינט, סופחים אוכרטוקסין. פחמן פעיל למשל, נמצא יעיל ביותר בהרחקת אוכרטוקסין, אם כי השימוש בחומר זה גורם גם להרחקת מספר חומרים ארומטיים בו. יעילותם של חומרים אלה בהרחקת אוכרטוקסין תלויה בין היתר בכמות החומר, סוג היין שמכילים ורמת הטוקסין ההתחלית.

כפי שצוין, קיימת תחרות בין אוכרטוקסין וחומרים הנמצאים בו (פוליפנולים, חלבונים) על אתרי הקשירה בחומרים הסופחים. לפיכך, כמויות הטוקסין המורחקות תלויות בכמות החומרים המתחרים על אתרים אלה. תרכובות פנוליות הנמצאות בוין סופחות כשלעצמן אוכרטוקסין. בכל מקרה, רמת הספיחה של אוכרטוקסין למרכיב כלשהו בוין, או לחומר מוסף בתהליך היינון, תלויה בדיקה הכימית שבין הטוקסין לאתרי הקשירה הנמצאים בכל חומר וחומר.

## פירות

1. Barkai Golan R., Paster N. (2008): *Mycotoxins in Fruits and Vegetables*. Elsevier, San Diego, CA., 395 pp.
2. Battilani P., Magan N., Logrieco A. (2006): European research on ochratoxin A in grapes and wine. *International Journal of Food Microbiology* 111: S2-S4.
3. Battilani P., Pietri A. (2002): *Ochratoxin A in grapes and wine*. *Eur. J. Plant Pathol.* 108, 639-643.
4. Drusch S., Aumann J. (2005): *Mycotoxins in fruits: Microbiology, occurrence, and changes during fruit processing*. *Adv. Food Nutrit. Res.* 50, 33-78.
5. Drusch S., Ragab W. (2003): *Mycotoxins in fruits, fruit juices, and dried fruits*. *J. Food Prot.* 66, 1514-1527.
6. Guzew L., Danshin A., Ziv S., Lichter A. (2006): Occurrence of ochratoxin A producing fungi in wine and table grapes in Israel. *Int. J. Food Microbiol.* 111, S67-S71. ☒

מתחיל בכרם וממוקד במידה רבה בשמירה על מצב הענבים הצעירים, בעיקר בתקופה שבה חלים בעינב שינויי צבע (verasion), במהלכה הפרי רגיש ביותר ליצירת האוכרטוקסין. כן ממוקד הטיפול בשמירה על נקיון הקרקע משיירי צמחים רקובים, ההופכים אותה למצע מתאים לצמיחת הפטריות, ובהפחתת הנזק המכני לענבים הנגרם במהלך הבציר ולאחריו.

לאחרונה נמצא, שהזברה ביולוגית בעזרת בקטריה מהסוג *Bacillus* יעילה אף היא לדיכוי צמיחת הפטריה. כמו כן, חומר אנטיביוטי הנוצר על ידי *Streptomyces* הביא לדיכוי צמיחת הפטריה ויצירת הרעלן. מאחר שלמצב העינב יש השפעה רבה על התפתחות הפטריות בפרי ועל הצטברות האוכרטוקסין במוצרי הענבים, יש להימנע משימוש בענבים רקובים או פגועים בעת ריסוק הפרי או במהלך ייבושו.

הפחתת רמת האוכרטוקסין בענבים או ביין קשורה בראש ובראשונה בהדברת מיני האספרגילוס השחורים בפרי. בחינת יעילותם של פונגיצידיים בדיכוי צמיחת הפטריה *Aspergillus carbonarius* ויצירת האוכרטוקסין בתרבית הראתה, שלא כל הפונגיצידיים המעכבים את צמיחת הפטריה מפחיתים את יצירת הרעלן. בניגוד לפונגיצידיים המכילים גופרית, פונגיצידיים המכילים נחושת או סטרובילורנים מפחיתים הן את צמיחת הפטריה והן את יצירת האוכרטוקסין.

אם כי תוצאות מעודדות נמצאו לגבי דיכוי הריקבון הנגרם על ידי *A. carbonarius* גם בתנאי הדבקה טבעיים בכרם, אין עדיין כיום פונגיצידיים המוקדשים להדברת מיני האספרגילוס השחורים בענבים.

## הפחתת אוכרטוקסין בשלבים השונים של ייצור יין

ענבים נגועים בפטריה עלולים להכיל כמויות גדולות של אוכרטוקסין, ולפיכך יין שיוק מענבים אלה צפוי להכיל את הטוקסין. בנוסף, צבעם של ענבים נגועים חיוור, הם מצומקים ומכילים חומצות הפוגעות בטעמו של היין. מכאן, שסילוק אשכולות נגועים משפר את איכות היין. השפעת השמרים בהם משתמשים לתסיסה, כמו גם חומרים המוספים במהלך הכנת היין, על רמת האוכרטוקסין, נבדקה במספר רב של עבודות. אוכרטוקסין משתחרר למיץ כבר במהלך ריסוק ודריכת הענבים. לפיכך חשוב ביותר לנטר את רמת הטוקסין בשלב הראשוני של הכנת היין. תאי השמרים המשמשים לתסיסה סופחים אוכרטוקסין. רמת הספיחה תלויה בכמות הטוקסין הראשונית, בסוג השמר, סוג היין אותו מכינים ובריכוז האלכוהול. בכל מקרה, הטוקסין היה יציב בכל תהליכי התסיסה, אם כי כמותו פוחתת בעיקר, כאמור, עקב ספיחה לתאי השמר ולחומרים המוספים בתהליך היינון. מנגנון הספיחה נבדק בניסויים שונים. כך למשל, בדקו את ספיחת הטוקסין למספר תכשירים מסחריים בהם משתמשים, כגון תאי שמר מנוקים ובטא-גלוטן המופק משמרים. הספיחה המירבית הייתה לתאים עצמם ומיוחסת לקשירה בלתי קוולנטית הקיימת