



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI AGRONOMIA ANIMALI ALIMENTI
RISORSE NATURALI E AMBIENTE

Corso di laurea di Scienze e Tecnologie Alimentari

TECNICHE INNOVATIVE PER LA PREVENZIONE E LA RIDUZIONE
DELLA CONTAMINAZIONE DA PATULINA IN PRODOTTI FRESCHI E
PROCESSATI A BASE DI MELA

Relatore
Prof. Luca Sella

Laureando
Carlo Gabardi

Matricola n.
1223018

INDICE

RIASSUNTO.....	5
1 INTRODUZIONE.....	7
2 <i>Penicillium expansum</i>	9
2.1 Generalità.....	9
2.2 Caratteristiche del fungo.....	11
2.3 Produzione di patulina.....	14
3 PATULINA.....	17
3.1 Caratteristiche, rilevamento e quantificazione.....	17
3.2 Alimenti contaminati e limiti.....	20
3.3 Effetti negativi.....	23
4 METODI DI CONTROLLO DELLO SVILUPPO FUNGINO IN POST-RACCOLTA...	25
5 METODI DI DECONTAMINAZIONE E DETOSSIFICAZIONE DELLA PATULINA IN PRODOTTI FRESCHI E PROCESSATI.....	35
5.1 Metodi di decontaminazione.....	35
5.2 Metodi di detossificazione.....	38
5.2.1 Metodi fisici.....	38
5.2.2 Metodi biologici.....	45
5.2.3 Metodi chimici.....	48
6 CONCLUSIONI.....	50
BIBLIOGRAFIA.....	53

RIASSUNTO

Penicillium expansum è uno dei funghi fitopatogeni più importanti che interessano il settore frutticolo sia in campo che in post-raccolta. In particolare, questo fungo è l'agente causale della malattia nota come muffa verde-azzurra delle pomacee. Oltre a portare a marcescenza i frutti, *P. expansum* produce anche una serie di metaboliti secondari tossici per l'uomo, il più importante dei quali è la patulina, che può contaminare le pomacee e i prodotti derivati. Si stima che ogni anno solo in USA vengano persi 4,5 milioni di dollari di prodotti a causa della muffa verde-azzurra delle pomacee. Diventa quindi importante gestire adeguatamente questa problematica, non solo per arginare le ingenti perdite economiche, ma anche per salvaguardare la salute del consumatore.

Dopo una descrizione di *P. expansum* e della patulina, il presente elaborato si concentrerà sui metodi innovativi di contenimento del problema. Per quanto riguarda la gestione del fungo nel post-raccolta, si evidenzieranno i possibili vantaggi dell'uso di agenti antagonisti di biocontrollo e dell'atmosfera controllata. Tecnologie di decontaminazione come la cernita, il lavaggio e la filtrazione, e di detossificazione con l'uso di metodi fisici, biologici e chimici, invece verranno esaminati come strategie per mitigare la contaminazione da patulina nei prodotti trasformati.

ABSTRACT

Penicillium expansum is one of the most important phytopathogenic fungi affecting the fruit sector both in the field and postharvest. Specifically, this fungus is the causative agent of the disease known as blue-green mold of pome fruit. In addition to leading to fruit rot, *P. expansum* also produces a number of secondary metabolites that are toxic to humans, the most important of which is patulin, which can contaminate pome fruit and derived products. It is estimated that \$4.5 million worth of produce is lost each year in the U.S. alone due to blue-green mold in pome fruit. Therefore, it becomes important to properly manage this issue, not only to stem the huge economic losses, but also to safeguard consumer health.

After a description of *P. expansum* and patulin, this paper will focus on innovative methods for containing the problem. Regarding post-harvest management of the fungus, the possible advantages of using biocontrol antagonistic agents and controlled atmosphere will be highlighted. Decontamination technologies such as sorting, washing and filtration, and detoxification technologies using physical, biological and chemical methods, on the other hand, will be examined as strategies to mitigate patulin contamination in processed products.

1 INTRODUZIONE

La mela (*Malus sp.*, Rosaceae) è una coltura molto importante per l'alimentazione a livello globale; nel 2020 sono stati coltivati 4,6 milioni di ettari, con una produzione stimata di 86,4 milioni di tonnellate [FAOSTAT, 2020]. La maggior parte di questi frutti è consumata fresca, ma un'alta percentuale viene trasformata per lo più in succo di mela, anche se tale valore dipende da molte variabili interne dei paesi tra cui la domanda di frutta fresca, l'esportazione, le preferenze dei consumatori ecc.

Altro aspetto importante è che le mele che non rispettano gli standard per il consumo fresco, solitamente vengono destinate alla lavorazione nelle industrie. Proprio per questo, nei trasformati di mela si può avere un maggior rischio di contaminazione da metaboliti secondari tossici prodotti da funghi che si sviluppano sulla superficie dei frutti.

La mela è un frutto piuttosto suscettibile alle contaminazioni fungine sia in campo, ma soprattutto nel post-raccolta, e ciò determina delle significative perdite economiche che possono arrivare al 30-40%, fino al 60% nei casi più estremi [Naets et al., 2018].

Oltre alla problematica economica si ha anche quella legata alla sicurezza alimentare; infatti alcuni di questi funghi contaminanti producono delle molecole tossiche per l'uomo.

Le mele per le necessità delle industrie e di consumo fresco devono essere a disposizione tutto l'anno e per fare ciò devono poter essere conservate in celle frigorifere anche per 9-12 mesi [Patriarca, 2019]. Ecco che in questo periodo di stoccaggio, nonostante le basse temperature e le atmosfere controllate, alcuni patogeni riescono a svilupparsi, dare sintomi e produrre micotossine.

Le micotossine sono sostanze molto pericolose per la salute pubblica in quanto il loro accumulo nell'organismo può determinare effetti tossici, cancerogeni e mutageni. Negli studi sugli animali, la somministrazione di patulina causa danni a diversi organi, tra cui cervello, reni, fegato [de Melo et al. 2012; Song et al. 2014; Boussabbeh et al. 2015], timo [Arzu Koçkaya et al. 2009] e pelle [Saxena et al. 2009].

Una volta che le micotossine si sono formate all'interno del frutto, sarà difficile gestirne la contaminazione, poiché sono stabili nello stoccaggio e piuttosto insensibili ai trattamenti fisici e chimici. Pertanto, il modo migliore per limitare l'esposizione a queste sostanze è quello di ridurre la formazione fin dalle prime fasi di produzione [Copetti et al., 2014].

Una delle micotossine più pericolose e più riscontrate nelle pomacee è la patulina che viene prodotta da vari funghi quali specie di *Aspergillus*, *Byssochlamys* e *Penicillium* [Saleh e Goktepe, 2019]. Tuttavia, è stato riscontrato che la specie maggiormente responsabile della

produzione di questa micotossina è *Penicillium expansum*. Questo fungo patogeno nelle pomacee causa la fitopatia della muffa verde-azzurra, che è una delle principali malattie nel post-raccolta. Essa rappresenta fino al 20% delle perdite annuali a livello globale [Pereira et. al, 2022].

Il controllo delle malattie in post-raccolta viene attualmente gestito utilizzando fungicidi di sintesi che sono dannosi per l'ambiente e per il consumatore, richiedendo quindi alternative altrettanto efficaci ma più sicure ed ecocompatibili. In questo elaborato si andranno ad analizzare alcune tecniche innovative che cercano di ridurre la formazione o la contaminazione della micotossina senza l'utilizzo di prodotti fitosanitari che potrebbero lasciare residui e arrivare al consumatore.

2 *Penicillium expansum*

2.1 Generalità

La famiglia dei *Penicillium* è una tra le più studiate in quanto, oltre ad essere distribuita su tutto il nostro Pianeta, è responsabile di alcune scoperte che hanno cambiato il corso della storia dell'uomo. La più importante tra queste è la scoperta della Penicillina, antibiotico naturale ad oggi farmaco salvavita tra i più efficaci. Molte specie sono anche coinvolte nella degradazione della sostanza organica e sono responsabili di molte fitopatie che colpiscono e portano a marcescenza frutta e verdura. Oltre a ciò, alcuni *Penicillium*, come *P. roqueforti*, sono utilizzati per la produzione di formaggi.

I *Penicillium* appartengono al Phylum degli Ascomiceti e alla Famiglia delle Trichocomaceae. Storicamente la classificazione delle specie di questo genere era basata sulle caratteristiche morfologiche, più precisamente sulle ramificazioni dei conidiofori (400–700 μm) [Errampalli, 2014]. Queste strutture consistono nella terminazione di un'ifa e possono essere semplici o ramificate. All'apice dei conidiofori sono presenti grappoli di fialidi, cellule a forma di fiasco sulle quali si sviluppano i conidi. Queste spore asessuate si sviluppano in catenelle verso l'esterno e contribuiscono alla diffusione del *Penicillium*.

Se le fialidi si inseriscono direttamente nel ramo conidioforo principale, si ha la forma monoverticillata, se si hanno due ramificazioni siamo nel caso della bivertricillata, mentre la struttura più complessa con tre o quattro ramificazioni è denominata terverticillata, a cui appartiene il Sottogenere *Penicillium*.

Una delle prime specie di *Penicillium* descritte è stata proprio *Penicillium expansum* che è classificato come terverticillato. Questo significa che le fialidi sono inserite su più rami secondari che partono dal ramo conidioforo.

P. expansum, insieme a *P. marinum* e *P. sclerotigenum*, appartiene alla Sezione *expansa*, gruppo determinato sulla base di morfologia, ecologia, modello di crescita, metaboliti secreti e sequenze parziali della β -tubulina. Questa Sezione è caratterizzata dalla presenza di due o tre ramificazioni dei conidiofori con pareti lisce e conidi subelissoidali o subglobosi (3-3.5 μm x 2.5-3 μm). Inoltre si contraddistinguono per la veloce crescita delle colonie e per le fialidi più robuste [Frisvad e Samson, 2004].

Per quanto riguarda il riconoscimento di *P. expansum* si fa utilizzo di un microscopio ottico per osservare ife e conidi, il colore e la forma della colonia; si misura, inoltre, il tasso di crescita su terreni artificiali.

Invece, per la caratterizzazione molecolare del fungo si utilizzano marcatori molecolari come RAPD (tipo di PCR che amplifica frammenti casuali di DNA) e si analizzano le sequenze di DNA della β -tubulina.

Nell'immagine sottostante (**Figura 1**) sono ben visibili le strutture sopra descritte [Frisvad e Samson, 2004].



Fig. 1. *Penicillium expansum*. Colonie di 7 giorni a 25°C in A. CYA, B. MEA, C. YES. D-H conidiofori, I conidi. Barra bianca 10 μ m.

La tassonomia del genere *Penicillium* è piuttosto difficoltosa a causa della plasticità fenotipica. Ecco che si è reso necessario utilizzare altri strumenti per la classificazione, oltre

alla micromorfologia e altri pochi caratteri precedentemente impiegati. L'introduzione del sequenziamento del DNA e la ricerca dei metaboliti secondari hanno contribuito positivamente all'affinamento della classificazione del genere *Penicillium* (**Tabella 1**).

Tab. 1. Tassonomia di *Penicillium expansum* [Errampalli, 2014]

Regno	Funghi
Divisione	Ascomiceti
Ordine	Eurotiales
Classe	Eurotiomycetes
Famiglia	Trichocomaceae
Genere	<i>Penicillium</i>
Sottogenere	<i>Penicillium</i>
Sezione	<i>expansa</i>
Specie	<i>expansum</i>

2.2 Caratteristiche del fungo

Penicillium expansum è tra i funghi più ubiquitari, può essere frequentemente isolato su materiale vegetale in decomposizione ed è comunemente trasportato dall'aria [Errampalli, 2014].

Questo fungo fitopatogeno, come già ribadito, è responsabile del marciume verde-azzurro o marciume molle che colpisce per lo più mele e pere, ma anche nettarine, prugne, albicocche, pesche, ciliegie, uva, cachi, mango, avocado, fragole, lamponi, cucurbitacee, cipolle, carote e pomodori [Rosenberger, 1990; Lugauskas et al., 2005; Kwon et al., 2006].

Sulle pomacee la muffa verde-azzurra si presenta con sintomi osservabili come aree edematose, macchie morbide e acquose di colore marrone chiaro che si sviluppano in maniera radiale, dapprima solo sull'epicarpo e in seguito anche in profondità nella polpa. Il rammollimento è molto drastico con infossamenti della parte marcescente; il tessuto va incontro a disfacimento completo con abbondante rilascio di una poltiglia finemente macerata. Le lesioni presentano margini ben definiti tanto che è facile enucleare la polpa danneggiata da quella sana.

La colonizzazione e l'invasione dei tessuti, oltre che la loro macerazione, è garantita da enzimi prodotti dal fungo, primo tra tutti la poligalatturonasi (PG). Tale enzima è in grado di

degradare le pectine, polimeri di parete cellulare, dando il caratteristico marciume molle e acquoso.

Un particolare meccanismo di difesa attivato da alcuni frutti come la mela al momento dell'attacco fungino, è quello della trascrizione delle proteine inibitrici della poligalatturonasi (PGIP). Queste sono indotte come risposta alle prime fasi di infezione del patogeno e vanno a inibire la degradazione della parete cellulare e di conseguenza la colonizzazione dei tessuti. Uno studio di Yao et al. (1999) ha osservato la maggior concentrazione di PGIP nelle aree infettate da *P. expansum*.

A temperatura ambiente (20-25°C) l'alterazione è piuttosto rapida e, in presenza di umidità relativa elevata, si evidenzia l'evasione del fungo sotto forma di una muffa biancastra. Questa, dopo 3-4 giorni, nel momento della sporulazione, assume la tipica colorazione verde-azzurrognola con rilascio di materiale polverulento.

L'infezione di questo patogeno può verificarsi durante il periodo vegetativo, al momento della raccolta, in post-raccolta, in conservazione o nel trasporto. Si può dire che la flora microbiologica presente sulla superficie delle mele dipende da molte variabili che influenzano direttamente l'infezione finale. In base alla cultivar, all'area geografica, al clima, alla presenza di microrganismi competitivi, ai trattamenti fitosanitari subiti in pre e post-raccolta e alle condizioni di conservazione, si ha una diversa diffusione e sviluppo del fungo fitopatogeno. Variabile che incide molto è anche la pulizia, in quanto le spore di *P. expansum* sono in grado di essere trasportate dal campo al luogo di conservazione anche con suolo, residui e attrezzature. Altra fonte di inoculo sono i frutti infetti, che anche se allontanati dai frutti sani, possono comunque liberare nell'aria spore che a contatto con la frutta sana daranno una nuova infezione. Molto probabile è anche che i propaguli fungini siano veicolati dall'acqua utilizzata per i lavaggi.

Sebbene alcuni funghi patogeni del post-raccolta possano infettare direttamente i frutti, non essendo in grado di produrre appressori *P. expansum* necessita di ferite per penetrare nel tessuto vegetale. Più rare, invece, sono le infezioni a partire da aperture naturali, che solitamente avvengono da lenticelle più sensibili o più aperte [Errampalli, 2014]. Altra via di ingresso segnalata è quella all'estremità del peduncolo. Ponendo dei conidi di *P. expansum* all'estremità del peduncolo di mele "Empire", si è registrato che il 27-47% dei frutti, dopo conservazione di 7-9 mesi in atmosfera controllata (CA) (1,1°C, 1,6% di O₂ e 2,2% di CO₂), risultava colpito dal fungo [Rosenberger et al., 2006].

Nelle ferite fresche la spora trova le condizioni di umidità e di quantità di composti metabolizzabili ideali per germinare e dare vita a nuovo micelio. Se la ferita ha avuto il

tempo di rimarginarsi prima di venire a contatto con le spore di *P. expansum*, queste hanno più difficoltà nel germinare. Infatti, il frutto, nei punti in cui l'epicarpo è danneggiato, accumula sostanze come tannini, lignine e altri composti fenolici che vanno a creare uno strato protettivo all'infezione fungina.

Fattori agronomici e climatici possono favorire lo sviluppo della muffa verde-azzurra nel post-raccolta. Il calcio (Ca) viene distribuito in frutteto prima della raccolta in quanto questo catione è un elemento essenziale per la crescita del frutto. Garantisce una buccia più resistente e previene i difetti superficiali dell'epicarpo che sono le vie di ingresso di *P. expansum*. I danni causati da eventi atmosferici come grandinate o forte vento, aumentano la probabilità di comparsa di problemi legati alla muffa verde-azzurra nel post-raccolta. Questi, assieme alle ferite causate dagli insetti, sono i punti di infezione più comuni di *P. expansum*.

Comunemente l'infezione da *P. expansum* è riscontrabile nel post-raccolta, sebbene il contatto col propagulo fungino può avvenire già nel pre-raccolta. Ecco che il fungo è in grado di rimanere sulla superficie del frutto e attaccarlo in un secondo momento. Questo in quanto il propagulo percepisce il grado di maturazione della mela e la attacca quando la concentrazione zuccherina è massima e i tessuti sono più facilmente aggredibili. Si capisce che diventa fondamentale riuscire a inibire o ritardare il più possibile la germinazione. Uno dei sistemi essenziali per gestire le malattie nel post-raccolta è l'abbassamento rapido della temperatura subito dopo la raccolta e l'uso della catena del freddo.

Le mele sono conservate a una temperatura che va da -1 a 4 °C. Tali valori sono necessari per prolungare la shelf-life del prodotto, evitare lo sviluppo di funghi indesiderati e per evitare la comparsa di fisiopatie come danni da freddo o da congelamento.

P. expansum è un fungo a carattere psicrofilo e quindi è in grado di svilupparsi lentamente anche a temperature molto basse. Con l'uso della refrigerazione delle celle di conservazione, quindi, non si è in grado di bloccare completamente la crescita di tale fungo, ma si riesce a rallentarla di molto. Sono stati registrati valori minimi di temperatura di crescita attorno ai -2, -3 °C, ottimi tra i 15 e i 25°C e massimi vicini ai 35°C [Lahlali et al., 2005]. Alle diverse temperature sono stati osservati, inoltre, dei cambiamenti morfologici a carico della forma, colore e dimensione delle colonie cresciute su terreno di coltura artificiale; questo può essere riconducibile a diverse risposte allo stress termico [Tannous et al., 2015].

Per quanto concerne l'umidità relativa, al 99-100% le spore sono in grado di germinare con successo dando luogo all'infezione.

Altro parametro che influisce sulla crescita del fungo è l'attività dell'acqua (a_w), si è visto che si ha una crescita ottimale a valori di 0,99, anche se è facile trovare contaminazione da

patulina anche in frutti secchi. Per quanto riguarda i valori minimi di a_w , invece, la germinazione delle spore di questo fungo si blocca a valori tra lo 0,83 e lo 0,85 in base al ceppo [Judet-Correia et al. 2010].

Il pH di crescita ideale di *P. expansum* si attesta intorno a 4 e, se il substrato di crescita è a valori più alti, il fungo è in grado di produrre acido gluconico per abbassare il pH fino a valori ottimali [Tannous et al., 2015].

2.3 Produzione di patulina

P. expansum è il maggior responsabile della produzione della micotossina patulina. La muffa verde-azzurra, oltre a creare danno portando a marcescenza il frutto, è in grado di produrre questo metabolita tossico che si accumula nei tessuti infetti.

Da un punto di vista chimico si tratta di un lattone eterociclico insaturo (4-idrossi-4H-furo[3,2c]piran-2(6H)-one) la cui sintesi è stata molto studiata e ampiamente descritta. La via biosintetica è simile a quella degli acidi grassi e consiste in almeno 10 reazioni di condensazione e riduzione, la maggior parte delle quali mediate da enzimi.

Il primo step consiste nella produzione di acido 6-Metilsalicilico (6-MSA) a partire da una molecola di Acetil-CoA e 3 di Malonil-CoA. Il singolo enzima multifunzionale coinvolto è la 6-MSA sintasi che ha diverse attività: acetil e malonil transferasi, chetoacil sintasi, chetoreduttasi e disidratasi [Puel et al., 2010]. L'inibizione di questo enzima è stata dimostrata inibire la produzione della patulina [Moake et al., 2005]

Successivamente la 6-MSA decarbossilasi porta alla formazione di m-Cresolo, secondo intermedio della via biosintetica. A seguito di attività idrossilasiche si vanno a formare alcol m-Idrossibenzilico, Gentsaldeide e alcol Gentsilico. Come si vede dallo schema (**Fig. 2**) il gruppo metile dell'm-Cresolo viene ossidato per formare il gruppo aldeidico e alcolico. A questo punto, per la produzione della patulina, che possiede due anelli aromatici, è necessaria l'apertura dell'anello attraverso una monossigenasi o una diossigenasi. A seguito di studi condotti nei decenni si sono riusciti a isolare 4 precursori post-aromatici della patulina; questi sono Isoeossidone, Fillostina, Neopatulina e Ascladiolo.

Recentemente, da studi di Li B. et al. (2019) sono stati identificati quindici geni coinvolti nella biosintesi della patulina; tra questi, i geni PatE e PatH si sono dimostrati necessari per la produzione di tale micotossina. Inoltre, si è visto che tre proteine del complesso Velvet sono responsabili della regolazione dei livelli di patulina (VeA, VelB e VelC) [Puel et al., 2010; Saleh e Goktepe, 2019].

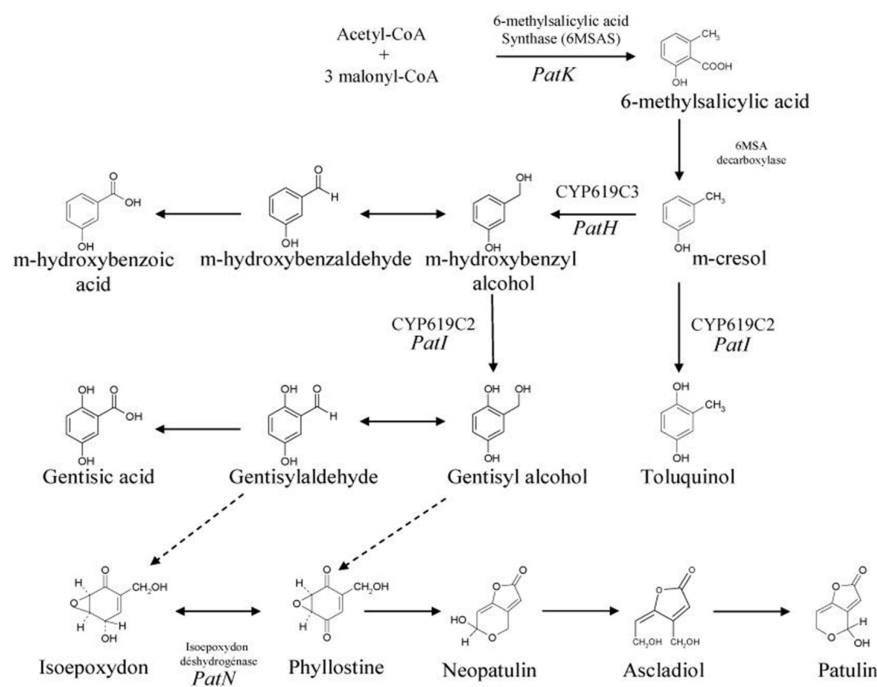


Fig. 2. Metabolismo biosintetico della patulina [Puel et al., 2010]

P. expansum, oltre ad avere valori di optimum di crescita, produce quantità diverse di patulina in base ai valori di temperatura, a_w e pH.

La produzione di patulina in funzione della temperatura ha mostrato un andamento a gaussiana (**Fig. 3A**). Le condizioni ottimali di sintesi da parte del fungo sono state identificate da Paster et al. (1995). Su mela si è registrata una produzione massima della micotossina a 17°C. Per quanto riguarda l'attività dell'acqua, *P. expansum* ha il massimo di produzione di patulina a 0,99; a valori più bassi di 0,95 e 0,9 i livelli registrati erano di molto inferiori, mentre a 0,85 non è stata prodotta (**Fig. 3B**). Anche il pH del substrato di coltura ha mostrato effetti significativi sulla sintesi di micotossina. Il valore minore è stato registrato a pH 2,5, mentre il massimo a pH 4; oltre a tale valore, invece, i livelli prodotti sono diminuiti di molto (**Fig. 3C**). Gli scarsi livelli di patulina riscontrati a pH molto bassi sono riconducibili alla scarsa sintesi, piuttosto che all'instabilità della molecola. Infatti, secondo Drusch et al. (2007), la stabilità della micotossina è stata valutata in un ampio range di pH, più precisamente da pH 2,5 a pH 5,5.

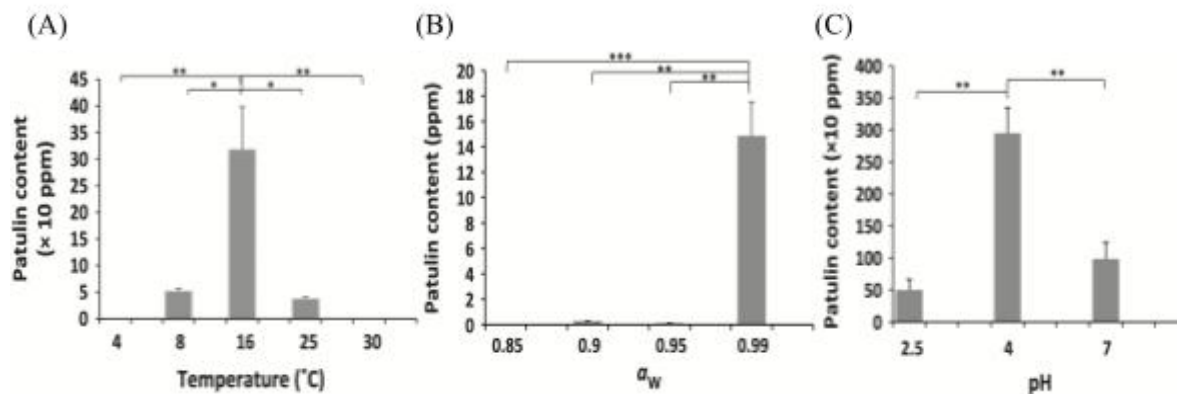


Fig. 3. Produzione di patulina (ppm) in base a temperatura (A), attività dell'acqua (B) e pH (C) di *Penicillium expansum* ceppo NRRL 35695 su Czapek glucose agar. In A sono state testate 5 temperature (4°C, 8°C, 16°C, 25°C, e 30°C) con valori di pH e a_w fissati rispettivamente a 5,2 e 0,99. In B sono state testate 4 attività dell'acqua (0,85, 0,9, 0,95 e 0,99) con valori di pH e temperatura fissati rispettivamente a 5,2 e 25°C. In C sono stati testati 3 valori di pH (2,5, 4 e 7) con valori di temperatura e attività dell'acqua fissati rispettivamente a 25°C e 0,99. I risultati mostrati sono frutto di 3 repliche tecniche per ogni variabile. Gli errori standard della media (SEM) sono rappresentati con barre di errore: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ [Tannous et al., 2015].

3 PATULINA

3.1 Caratteristiche, rilevamento e quantificazione

Birkinshaw et al. (1943) furono i primi ad isolare la patulina da *Penicillium griseofulvum* e *Penicillium expansum*. La scoperta della penicillina da parte di Fleming fece iniziare una campagna di ricerca di nuove molecole fungine con funzioni antibiotiche; durante questo screening fu scoperta la patulina.

La patulina ($C_7H_6O_4$) (4-idrossi-4H-furo[3,2c]piran-2(6H)-one) (Fig. 4) è un lattone tetrachetide formato da due anelli eterociclici. Si presenta come una polvere biancastra, con peso molecolare di 154.12 g/mol e un punto di fusione di 111 °C [Goncalves et al., 2019]. Solubile in acqua e in vari solventi organici come acetato di etile, etanolo e metanolo, ha bassa volatilità e proprietà chimiche stabili. Infatti, è in grado di rimanere inalterata durante i processi di trasformazione dei prodotti. Alte temperature e pH acidi non alterano la sua struttura, mentre in condizioni alcaline è meno stabile. In particolare si registra la massima stabilità della molecola a valori di pH compresi tra i 2,5 e i 5,5 [Morales et al., 2008].

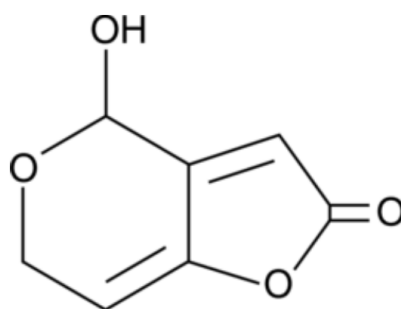


Fig. 4. Struttura chimica della patulina [Ziarati et al., 2019]

Uno dei motivi per cui la patulina è nociva per gli organismi viventi è la sua elevata reattività; infatti, si associa facilmente a proteine e acidi nucleici. Dall'altro lato tale caratteristica è positiva in quanto consente una rapida inattivazione della tossina negli alimenti [Ziarati et al., 2019].

In principio, fu dichiarato che la patulina era in grado di inibire varie specie batteriche di Gram positivi e Gram negativi grazie alla sua proprietà antibiotica universale [Korzybski et al., 1967]. Continui studi hanno a lungo sostenuto le proprietà antimicotica, antibatterica, antivirale e antiprotozoaria della molecola, addirittura suggerendola per il trattamento della congestione nasale e del raffreddore comune [Raistrick et al. 1943; Stansfield et al. 1944]. Tuttavia negli anni Cinquanta e Sessanta, altrettanti studi hanno evidenziato la tossicità della

patulina per gli animali e le piante superiori, invece che per i batteri [Iyengar e Starky 1953; Norstadt e McCalla 1963; Berestets'kyi e Synyts'kyi 1973].

La patulina è stata classificata nel gruppo 3 (non classificabile in relazione alla sua cancerogenicità per l'uomo) dall'Agencia Internazionale per la Ricerca sul Cancro [IARC, 1986]. Sebbene non vi siano prove sufficienti per dimostrare la cancerogenicità della patulina verso l'uomo, sono stati riscontrati fenomeni che confermano i suoi effetti nocivi sulla salute. Per la quantificazione della patulina, il metodo più comunemente diffuso, è la cromatografia liquida ad alte pressioni (HPLC) combinata a un rilevatore UV. Il problema sta nel fatto che la matrice frutta su cui si esegue l'analisi, spesso interferisce, in quanto ricca di zuccheri (saccarosio, glucosio, fruttosio, xilosio), di acidi (citrico, fumarico, tartarico) e composti fenolici. Per aggirare tale problema, i campioni prima dell'analisi cromatografica, subiscono dei pre-trattamenti di purificazione con lo scopo di estrarre la patulina dalla matrice. Per prima cosa si deve fare l'estrazione, che comunemente per la patulina è un'estrazione liquido-liquido (LLE). La LLE con acetato di etile, seguita da pulizia con carbonato di sodio, rientra nel metodo ufficiale 2000.02 dell'Association of Official Analytical Chemists (AOAC) per la preparazione del succo e della purea di mela all'analisi della patulina [MacDonald et al. 2000]. Il carbonato di sodio viene utilizzato per andare ad allontanare i polifenoli potenzialmente presenti nel campione che potrebbero andare ad interferire con la determinazione dell'analita durante l'HPLC [Marsol-Vall et al. 2014]. Il problema del carbonato di sodio è che tende ad aumentare il pH del campione, portando ad una parziale degradazione della patulina, più stabile in ambiente acido. Per mitigare tale effetto sono stati incorporati nella procedura altri sali come il solfato di sodio e l'idrogenocarbonato di sodio [Barreira et al. 2010]. Il problema della LLE rimane quello del consumo di grandi quantità di solventi organici e di tempi relativamente lunghi di analisi [Sadok et al. 2018]. Buone alternative a questo tipo di trattamento sono l'estrazione liquido-liquido ad ultrasuoni (ULLE) [Sargenti e Almeida, 2010], la micro-estrazione liquido-liquido dispersiva (DLLME) [Farhadi e Maleki, 2011] e la micro-estrazione liquido-liquido con vortex (VALLME) [Yiantzi et al., 2010]. L'estrazione in fase solida (SPE) è un ulteriore approccio vantaggioso nella preparazione dei campioni per l'analisi cromatografica; infatti, ci permette di usare quantità minori di campione e di solventi organici, oltre ad avere una maggiore rapidità di procedura. Si basa sulla sospensione del campione in acetonitrile e il suo passaggio successivo su una fase solida polimerica che permette di isolare, concentrare e purificare la molecola di patulina.

Un metodo di pretrattamento dei campioni per l'analisi cromatografica è anche il QuEChERS (acronimo di Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe). Questa tecnica possiede molti vantaggi, inclusi nel suo nome, e prevede l'omogenizzazione del campione con acetonitrile, l'aggiunta di solfato di magnesio anidro e di cloruro di sodio e poi la separazione in fase solida dispersiva (dSPE). In seguito a diversi studi, la procedura originale è stata modificata per adattarsi meglio alla quantificazione della patulina in matrici di frutta. In questo caso per l'estrazione, invece dell'acetonitrile, si possono utilizzare il metanolo [Vaclavikova et al. 2015], una miscela di acqua e acetonitrile [Desmarchelier et al. 2011] o l'acetonitrile acidificato con acido acetico [Sadok et al. 2018].

Successivamente alla purificazione l'estratto viene essiccato (temperatura > 45°C), il solvente evapora e il residuo secco viene disciolto in acqua acidificata con acido acetico (pH 4). A questo punto si può procedere a determinare i livelli di patulina con diverse tipologie di cromatografia. Tra le più utilizzate ci sono l'HPLC accoppiata a rilevatori UV, la cromatografia liquida ad alte prestazioni accoppiata a spettrometria di massa (LC-MS) e la GC.

Nel caso di HPLC-UV, la lunghezza d'onda (λ) impostata per rilevazione e quantificazione è di 276 nm; valore di massimo assorbimento della patulina. A questa λ sorge, però, il problema che alcuni composti fenolici, in particolare 5-idrossimetilfurfurale (5-HMF), interferiscono con l'analisi. La patulina e la 5-HMF hanno un tempo di ritenzione simile e un forte assorbimento UV, di conseguenza si ha la tendenza ad avere sovrapposizione dei picchi nel cromatogramma. Grazie a studi e ricerche, le condizioni ottimali di rilevamento e quantificazione della patulina in mele e prodotti a base di mele sono state stabilite [Abu-Bakar et al. 2014; Lee et al. 2014; Karakose et al. 2015].

Oltre all'HPLC-UV, viene molto utilizzata anche la LC-MS in quanto versatile, specifica e selettiva. Nella maggior parte delle volte che si utilizza LC per l'analisi della patulina, si accoppia uno spettrometro di massa tandem a triplo quadrupolo (LC-QQQ). Essendo però la patulina una molecola target molto polare, l'analisi LC-MS soffre di una bassa sensibilità. Questo è dovuto dal fatto che si hanno scarsa azione di ionizzazione della molecola sia con elettrospray che con ionizzazione chimica a pressione atmosferica [Vaclavikova et al., 2015]. L'introduzione di metodi di LC-MS a bersaglio singolo hanno permesso di superare il problema della sensibilità dovuta alla polarità. In questa tecnica, si pre-trattano i campioni in modo più sofisticato, un esempio è l'uso della microestrazione in provetta in fase solida (SPME) [Kataoka et al. 2009].

L'accoppiamento tra tecnica QuEChERS e cromatografia liquida con spettrometro di massa tandem (LC-MS/MS), ha portato a risultati ottimi con limiti di quantificazione (LOQ) fino a 10 µg/L per tutte le matrici testate [Desmarchelier et al. 2011]. Il metodo LC più avanzato con analizzatore a triplo quadrupolo ha dato buoni risultati sia su mele che su succo, purea e composta, ottenendo LOQ tra 2 e 15 µg/kg [Beltrán et al. 2014]. In alcuni lavori sono state anche utilizzate altre tecniche di pulizia, come LLE accoppiata a LC-MS/MS, ottenendo LOQ compresi tra 0,8 e 2,4 µg/kg [Seo et al. 2015].

3.2 Alimenti contaminati e limiti

La presenza di patulina in molti alimenti diversi, rispecchia la natura ubiquitaria dei suoi produttori, che comprendono almeno 60 specie diverse di funghi. Queste appartengono a *Penicillium*, *Aspergillus* e *Byssosclamyces*. *P. expansum* è considerato la principale specie fungina responsabile della contaminazione da patulina delle pomacee ed è su di esso che sono stati fatti i maggiori progressi.

Come già riportato, ceppi di funghi produttori di patulina sono stati isolati in molte varietà di frutta e verdura, tra cui mele, pere, nettarine, albicocche, pesche, prugne, ciliegie, uva, lamponi, fragole, mirtilli, gelsi, bacche di ligon, banane, pomodori, verze, cipolle, carote, mandorle, noci pecan, nocciole, arachidi [Pierson et al., 1971; Harvey et al., 1972; Buchanan et al., 1974; Lovett et al., 1974; Sommer et al., 1974; Akerstrand et al., 1976; Andersson et al., 1977; Frank et al., 1977; Harwig et al., 1978; Brackett e Marth, 1979a; Jelinek et al., 1989; Jiminez et al., 1991; Prieta et al., 1994; Leggott e Shephard, 2001; Demirci et al., 2003; Ritieni, 2003; Lugauskas et al., 2005; Kwon et al., 2006].

La produzione di patulina è generalmente, ma non esclusivamente, associata alla muffa verde-azzurra delle pomacee causata da *P. expansum*. La presenza di tale fungo però, non garantisce necessariamente la produzione della tossina, servono anche le condizioni adatte in termini di temperatura, a_w e pH. Altro aspetto che incide, a testimonianza della variabilità di presenza di patulina, è la differenza di produzione all'interno di diverse cultivar di mele: Jonathan, Goudreinetter, Cox's Orange Pippin e Bramley sembrano essere piuttosto suscettibili [McCallum et al., 2002], mentre Golden Delicious ha mostrato particolare resistenza [Corbett, 2003].

La ricerca col passare degli anni ha evidenziato la naturale presenza di patulina in diversi prodotti trasformati a base di frutta come succhi di mela, pera, uva, ribes, arancia, ananas, sidro di mela pastorizzato e non pastorizzato, purea di mela, marmellate e alcuni tipi di

alimenti per l'infanzia [Prieta et al., 1994; Rychlik e Schieberle, 1999; Ake et al., 2001; Leggott e Shephard, 2001; Ritieni, 2003]. Oltre che nei prodotti ortofrutticoli, la patulina è stata individuata anche nel formaggio cheddar [Bullerman e Olivigni, 1974] e in prodotti a base di cereali come insilati per mangimi, malti d'orzo e frumento [Lopez-Diaz 1997; Pittet 1998] e prodotti a base di farina come pasta e pane [Reiss, 1976].

Nonostante la moltitudine di prodotti potenzialmente contenenti patulina, le mele e i rispettivi trasformati, sono quelli che destano maggiori preoccupazioni. Infatti la frequenza con cui si misura la patulina negli altri prodotti alimentari è molto minore rispetto alle pomacee e ai loro derivati.

I prodotti più a rischio di contaminazione da patulina sono stati regolamentati da parte delle autorità. In Europa con il REGOLAMENTO (CE) N. 1881/2006 DELLA COMMISSIONE del 19 dicembre 2006, sono stati istituiti i seguenti limiti (**Tab. 2**):

Tab. 2. Limiti di legge stilati dalla Commissione Europea per alcuni alimenti.

Prodotti alimentari		Tenore massimo (µg/kg)
2.3	Patulina	
2.3.1	Succhi di frutta, succhi di frutta ricostituiti e nettari di frutta	50,0
2.3.2	Bevande spiritose, sidro e altre bevande fermentate derivate dalle mele o contenenti succo di mela	50,0
2.3.3	Prodotti contenenti mele allo stato solido, compresi la composta di mele e il passato di mele, destinati al consumo diretto, eccetto i prodotti alimentari di cui ai punti 2.3.4 e 2.3.5	25,0
2.3.4	Succo di mela e prodotti contenenti mele allo stato solido, compresi la composta e il passato di mele, per lattanti e bambini, etichettati e venduti come tali	10,0
2.3.5	Alimenti destinati ai lattanti e ai bambini diversi dagli alimenti a base di cereali	10,0

Anche all'interno del Codex Alimentarius, il Codex Committee on Food Additives and Contaminants (CCFAC) ha delineato una raccomandazione per la prevenzione e la riduzione della presenza di patulina nei succhi di mela e negli ingredienti a base di succo di mela usati in altre bevande [Codex Alimentarius, 2003].

La Commissione Europea, sulla base dei livelli NOEL (No Observed Effect Level) per la patulina (43 µg/kg di peso corporeo), ha stabilito una dose giornaliera massima tollerabile

(PMTDI) di 0,4 µg/kg di peso corporeo. Tale livello è utilizzato tuttora per le analisi sulla valutazione del rischio sanitario degli alimenti (CE, 2006).

Di seguito viene riportata una tabella con alcuni esempi di succhi analizzati contaminati da patulina (**Tab. 3**).

Tab. 3. Contaminazione da patulina nei succhi di frutta.

Tipo di succo	Campioni totali	Campioni positivi	Valori di patulina nei campioni positivi (µg/kg)	>EU ^d	Paese	Riferimento
Mela	20	20	5,8 - 82,2	5	Qatar	Hammami et al., 2017
Mela	68	28	1,2 - 42,0	0	Portogallo	Barreira et al., 2010
Mela	100	68	0,5 - 118,7	10	Spagna	Murillo-Arbizu et al., 2009
Mela ^a	33	16	fino a 53,4	1	Italia	Piemontese et al., 2005
Mela ^b	24	12	fino a 69,3	2	Italia	Piemontese et al., 2005
Mela ^c	30	24	4,5 - 889,0	-	Tunisia	Zouaoui et al., 2015
Albicocca	27	7	> 10	0	Italia	Spadaro et al., 2008
Uva	24	4	5,2 - 14,2	0	Sud Corea	Cho et al., 2010
Arancia	24	2	9,9 - 30,9	0	Sud Corea	Cho et al., 2010
Pera	3	2	11,7 - 38,9	0	Ceca	Vaclavikova et al., 2015
Pera ^a	7	1	1,1	0	Italia	Piemontese et al., 2005
Pera ^b	8	4	fino a 61,0	1	Italia	Piemontese et al., 2005
Pesca	30	2	> 10	0	Italia	Spadaro et al., 2008
Fragola	3	0	> 0,5	0	Ceca	Vaclavikova et al., 2015
Misto	34	17	10 - 55,7	-	Tunisia	Zouaoui et al., 2015
Misto	30	26	1,2 - 91,8	6	Cina	Yuan et al., 2010
Misto	29	9	> 10	0	Italia	Spadaro et al., 2008
Alimenti destinati ai lattanti e ai bambini	23	3	fino a 0,5	0	Italia	Piemontese et al., 2005
	11	2	13,1 - 17,1	2	Italia	Ritieni, 2003

^a Convenzionale, ^b Biologico, ^c Concentrato, ^d Numero di campioni che superano le raccomandazioni dell'UE (50 µg/L o 50 µg/kg per i succhi di frutta e 10 µg/L o 10 µg/kg per alimenti destinati ai lattanti e ai bambini) [Sadok et al., 2018].

3.3 Effetti negativi

I prodotti alimentari contaminati sono la maggior fonte di esposizione alla patulina con cui viene a contatto l'uomo. Sono state studiate altre vie di esposizione a questa micotossina, ma con scarsi risultati; ecco che l'ingestione è considerata la principale via di esposizione [Pal et al., 2017].

I rischi collegati alle micotossine riguardano l'intera popolazione, e livelli elevati di queste sostanze possono creare danni a chiunque, indipendentemente da luogo di provenienza, fascia d'età e genere. Tuttavia, ci sono dei gruppi di persone che sono più sensibili all'esposizione. Un esempio sono i lattanti che possono venire a contatto con la sostanza tossica attraverso il latte materno. Uno studio condotto nel 2017 ha dimostrato che se la madre veniva a contatto con dosi singole o multiple di patulina, il latte non era a livelli di rischio, al contrario di altre micotossine [Degen et al., 2017].

Altra popolazione a rischio è quella delle donne in gravidanza; questo in quanto le sostanze tossiche assunte dalla madre, possono influenzare direttamente lo sviluppo del feto.

Essendo che *P. expansum* e gli altri funghi produttori di patulina colpiscono quasi esclusivamente frutta e verdura, la popolazione vegetariana è considerata un altro potenziale gruppo di persone a rischio. Secondo uno studio condotto in Francia, nell'arco di una giornata la popolazione francese assume mediamente dai 18 ai 30 ng/kg di peso corporeo di patulina, mentre la popolazione vegetariana ne assume dai 34 ai 50 ng/kg di peso corporeo [Leblanc et al., 2005].

La patulina è stata identificata anche come possibile proteotossica; infatti alcuni studi hanno evidenziato un'influenza degli organismi a livello proteomico. La patulina sembra abbia un'attività di interferenza endocrina e per questo gli studi a riguardo sono stati condotti utilizzando modelli maschili e femminili [Soler e Oswald, 2018]. A sostegno di ciò esiste anche uno studio su conigli che vede conseguenze peggiori nei soggetti maschi [Duranova et al., 2015].

La tossicità acuta della patulina è dovuta all'esposizione a ingenti quantità di tossina. I sintomi sono di tipo gastrointestinale tra cui nausea, vomito, ulcere, emorragie intestinali e lesioni. Nei roditori la DL50 orale della patulina si attesta su valori che vanno dai 29 ai 55 mg/kg di peso corporeo [McKinley et al., 1982].

L'affinità della patulina ai gruppi sulfidrilici spiega il suo effetto inibitorio di una serie di enzimi (ATPasi, enzimi lisosomiali, RNA polimerasi ecc.) [Puel et al., 2010]. Tale effetto è stato riscontrato su ratti con la somministrazione di quantità subacute. Oltre alla perdita di

peso, alle alterazioni gastriche, intestinali e renali, la patulina ha causato anche neurotossicità (tremori e convulsioni) e inibizione di enzimi intestinali e cerebrali [Devaraj et al., 1986].

Per quanto riguarda l'esposizione cronica, lo IARC ha inserito la patulina nel gruppo 3 degli agenti cancerogeni, quindi non ci sono sufficienti studi su animali o studi epidemiologici a sostegno della sua cancerogenesi [IARC, 1986]. Tuttavia, l'OMS la considera come un possibile composto genotossico [OMS, 2018].

La patulina, quindi, ha mostrato danni a organi e ai sistemi vitali, come intestino, reni e cervello [Pal et al., 2017]. Nello studio di Akbari et al. 2017, viene dimostrata la tossicità alla barriera intestinale da parte della patulina. Oltre a ciò, questa micotossina potrebbe andare ad influenzare negativamente anche la naturale composizione della flora intestinale [Robert et al., 2017].

Numerosi studi hanno dimostrato che la patulina avrebbe anche un effetto nei confronti della risposta immunitaria [Oswald et al., 1998], sia in vitro [Sorenson et al., 1986] che su ratti [Escoula et al., 1988] [Paucod et al., 1990].

4 METODI DI CONTROLLO DELLO SVILUPPO FUNGINO IN POST-RACCOLTA

Considerando tutto quello che sopra è stato riportato, diventa necessario avere delle strategie che prevengano lo sviluppo di *P. expansum* nelle mele in conservazione. Limitando ciò, si possono tenere sotto controllo i livelli di patulina nei frutti riuscendo a minimizzare i rischi per i consumatori. Oltre a fare ciò, tali strategie dovranno avere anche effetto positivo sulla conservazione delle mele, andando a prolungarne la shelf-life preservando il più possibile le caratteristiche organolettiche.

Le tecnologie maggiormente utilizzate sono basate sull'abbassamento della temperatura e/o sulla modifica della composizione atmosferica nelle celle di stoccaggio. Come già scritto nel capitolo 2.2, *P. expansum* è in grado di crescere anche a temperature basse, intorno agli 0°C, quindi l'utilizzo di queste tecniche su mele infettate, difficilmente previene il loro deterioramento [Jackson et al., 2003]. La cosa positiva invece è che, sebbene le mele siano inoculate e presentino sintomi da muffa verde-azzurra, durante la conservazione a bassa temperatura, non vedono la formazione di patulina [Morales et al., 2007]. In studi successivi si è evidenziato che la produzione della micotossina avviene quando il fungo sul frutto raggiunge una massa micellare critica [Morales et al., 2008]. Il trasferimento delle mele da un ambiente a basse temperature a uno a temperatura ambiente, ha registrato uno sviluppo più veloce della muffa. Ecco che diventa importante riuscire a gestire *P. expansum* sia durante la conservazione in cella refrigerata, sia durante la conservazione a temperatura ambiente.

P. expansum è un fungo molto ubiquitario e le sue spore possono contaminare le mele già nel pre-raccolta attraverso il suolo, l'aria, i residui di raccolta e le attrezzature. Una volta che il frutto è venuto a contatto con una spora, il fungo viene trasportato ai luoghi di condizionamento dove si può diffondere ad esempio attraverso le acque di lavaggio. Da queste osservazioni nasce la necessità di avere sempre un'ottima disinfezione degli ambienti di lavaggio e stoccaggio. Amiri et al. (2005) e Spotts et al. (1998) sono andati a verificare la contaminazione da *P. expansum*, rispettivamente nell'aria di celle non disinfettate e nelle acque reflue di industrie di lavorazione delle mele. I risultati hanno sottolineato quanto sia importante la disinfezione degli ambienti di lavorazione per contenere la diffusione del fungo: 6×10^3 conidi di *P. expansum* per m³ di aria in magazzini e tra $4,2 \times 10^3$ e $1,2 \times 10^4$ conidi per mL di acque reflue. Tali fonti di contaminazione difficilmente possono essere azzerate, ma possono essere ridotte con la disinfezione.

Baert et al. (2008) hanno osservato che diverse dimensioni di inoculo di *P. expansum* in ferite di mela, determinavano diverso sviluppo del marciume. In particolare, con inoculi più ridotti (20 spore) non si osservava nemmeno crescita. Ciò significa che un numero inferiore di spore nei locali di stoccaggio e lavorazione, ridurrebbe il rischio di marcescenza delle mele, anche se questo non sarebbe determinato solamente dalla minor probabilità di contatto tra il fungo e il frutto, ma anche dal fatto che è necessario un inoculo maggiore per far partire l'infezione.

Le dimensioni dell'inoculo influenzano anche la fase di latenza; in condizioni di refrigerazione a 1°C, la fase di latenza si può allungare anche di 20 giorni se le spore collocate nella ferita di una mela sono ridotte da 20.000 a 200 [Morales et al., 2008].

Lo studio di Morales et al. (2008) ha investigato anche sul tasso di crescita in relazione all'inoculo. Andando a misurare il diametro del marciume, si è capito che *P. expansum* ha una crescita maggiore con inoculi più concentrati (0,15 cm al giorno, rispetto a 0,19 cm al giorno). Se si considera poi che con inoculi meno concentrati, aumenta il tempo di latenza, la differenza è ancora maggiore.

Il controllo delle spore nei locali di stoccaggio e lavorazione, e quindi le condizioni igieniche di tali luoghi, influenzano direttamente la probabilità che le spore raggiungano le ferite della mela, la possibilità di dare inizio all'infezione, il tempo che trascorre prima della comparsa di sintomi, e quindi nel complesso la gravità del marciume. Riuscendo a contenere *P. expansum* si può limitare la percentuale di mele colpite e la percentuale di mela danneggiata. In più si può influire direttamente sulla produzione di patulina; questo in quanto, marciumi più estesi presentano accumuli di patulina maggiori.

Molto spesso per il controllo della muffa verde-azzurra delle pomacee si ricorre all'uso di fungicidi. Solitamente si parla di prodotti applicati prima della conservazione per fare in modo che il fungo non si sviluppi. Il problema di tali trattamenti è che la loro efficienza è in diminuzione a causa dello sviluppo di ceppi meno sensibili ai principi attivi. La tendenza è quella di alternare diversi fitosanitari o aumentare le dosi, ma la conseguenza è quella di un aumento dei residui nel prodotto finito. Oltre a ciò, sembra che alcuni fungicidi possano addirittura stimolare la produzione di patulina, ottenendo accumuli maggiori. Per tutti questi motivi la tendenza è quella di cercare di abbandonare tali trattamenti favorendo quelli che non utilizzano sostanze chimiche di sintesi.

Le interazioni tra i microrganismi avvengono in modo ubiquitario e il risultato di tale influenza reciproca può essere il mutualismo, il neutralismo o l'antagonismo. In quest'ultimo caso uno dei due soggetti viene sostituito dall'altro attraverso diversi modi: competizione per i nutrienti, colonizzazione, antibiosi diretta o una combinazione di esse. Uno dei metodi per

controllare i patogeni, come *P. expansum*, è proprio quello di andare a creare un antagonismo con un altro microrganismo così da limitarne la crescita. Questi antagonisti, che generalmente sono batteri o lieviti, sono comunemente conosciuti come BCA (Biological Control Agent) e sono solitamente isolati dalla superficie dei frutti. L'uso dei BCA ha come maggior vantaggio, oltre a quello di inibire la proliferazione di *P. expansum*, quello di essere un metodo sano e rispettoso dell'ambiente.

Prima di tutto, un potenziale BCA deve essere testato affinché i suoi effetti non siano negativi nei confronti della salute umana, in seguito bisogna verificarne l'idoneità all'applicazione industriale. Talvolta, sebbene l'azione del BCA sia dimostrata, in condizioni di conservazione tale effetto si presenta in modo insufficiente o non si manifesta, facendo diventare inutile l'utilizzo di questi microrganismi.

Nella **Tab. 4** sono riportati alcuni esempi di lieviti che si sono dimostrati degli inibitori della crescita di *P. expansum*. Dopo diversi studi si è visto che questi BCA sono in grado di antagonizzare il patogeno della muffa verde-azzurra delle pomacee in diversi modi, senza andare ad alterare peso, durezza, solidi totali solubili, acidità e livelli di acido ascorbico nelle mele [Cao et al., 2013]. Inoltre, presentano caratteristiche interessanti, come l'assenza di produzione di micotossine, l'assenza di effetti allergici e i benefici per la salute umana e animale [Godana et al., 2020]. I meccanismi che interferiscono con lo sviluppo di *P. expansum* sono riconducibili nella maggior parte dei casi alla competizione per i nutrienti e lo spazio, la sintesi di enzimi litici (β -1,3 glucanasi e chitinasi in grado di idrolizzare la parete delle cellule del micelio) e la chelazione del ferro. Ulteriore efficacia nel colonizzare il frutto e bloccare la crescita dei patogeni è data dalla possibilità di alcuni lieviti di creare biofilm [Cordero-Bueso et al., 2017]. Infatti, più velocemente le ferite e l'esocarpo della mela sono ricoperte di lievito, minore sarà la possibilità per il patogeno di insediarsi e dare l'alterazione. Questi BCA sono anche in grado di inibire direttamente la germinazione delle spore o lo sviluppo del micelio in quanto causano il rigonfiamento e la denaturazione del protoplasto del patogeno [Yu et al., 2020]. Lo sviluppo dei lieviti sulla superficie della mela, sembra anche indurre la produzione di metaboliti che sono coinvolti nella resistenza agli attacchi dei microrganismi. Nei frutti trattati, si è registrato un aumento di attività di perossidasi, polifenolossidasi e catalasi. Questi enzimi sono direttamente collegati al meccanismo di lignificazione delle cellule della pianta ospite che diventano meno penetrabili da parte del fungo.

Rhodosporidium paludigenum è stato uno dei microrganismi studiati per capire il collegamento tra i BCA e l'induzione della resistenza ai patogeni da parte del frutto. Si è

osservato che la parete cellulare di questo lievito, può portare a una riduzione della germinazione di *P. expansum* nelle ferite del frutto dopo 24 ore dall'applicazione. La distribuzione di estratto di parete cellulare di questo lievito, ha indotto nel frutto, a livello trascrizionale, la produzione di proteine legate alla patogenesi (PR). Nello specifico, queste PR si sono dimostrate essere endo- β -1,3-glucanasi e endochitinasi, che sono in grado di inibire direttamente la crescita dei funghi in quanto degradano il β -1,3-glucano e la chitina presente nella loro parete cellulare [Sun et al., 2018]. Si è osservato, inoltre, che *R. paludigenum*, può portare a una riduzione della germinazione di *P. expansum* nelle ferite del frutto dopo 24 ore dall'applicazione.

Essendo che le mele mature sono conservate a basse temperature per prolungare la durata e, che in tali condizioni i lieviti non possono essere applicati su larga scala, Arrarte et al. (2017) hanno isolato un lievito psicrofilo. Si tratta di *Candida sake* ceppo 41E ritrovata in campioni di acqua e suolo della regione subantartica e in grado di inibire la proliferazione di *P. expansum* tramite la formazione di composti organici volatili (VOC). Nello studio si è riusciti a stabilire che l'incidenza della muffa verde-azzurra delle pomacee, su mele conservate a 25 o 0°C per 7 o 30 giorni e trattate con *C. sake* 41E, era diminuita del 25%. Altro lievito in grado di svilupparsi a basse temperature e inibire *P. expansum* si tratta di *Metschnikowia andauensis* ceppo NCYC 3728 (PBC-2). Questo microrganismo ha dimostrato di avere una buona attività di biocontrollo su un'ampia gamma di pomacee conservate a 1°C \pm 0,5°C per 3 mesi; inoltre, non è in grado di svilupparsi su liquido gastrico simulato a 37°C, testimoniando l'incapacità di svilupparsi all'interno dello stomaco umano [Manso e Nunes, 2011].

Nella **Tab. 4** sono riportati altri lieviti potenzialmente utilizzabili come BCA, però, non tutti sono considerati Generally Regarded as Safe (GRAS) dalla FDA. Infatti, *Rhodotorula mucilaginosa* [Deligios et al., 2015], *Candida guilliermondii* [Lan e Xu, 2006] e *Aureobasidium pullulans* [Kopecka et al., 2003], sono stati classificati come patogeni opportunisti e quindi la loro applicazione in sicurezza non può essere garantita.

Oltre ai lieviti, BCA potenzialmente utilizzabili e studiati sono i batteri. *Paenibacillus polymyxa* [Zhou et al., 2008], *Pseudomonas fluorescens* [Wallace et al., 2017], *Rhodobacter sphaeroides* [Wang et al., 2016], *Bacillus subtilis* [Wang et al., 2016], *Bacillus cereus* [Wang et al., 2015a,b] e *Lactobacillus plantarum* [Hawar et al., 2013]. Questi microrganismi interferiscono in diverso modo per alterare lo sviluppo di *P. expansum* e contrastarlo; si parla di produzione di antibiotici, composti volatili e acidi organici come si vede in **Tab. 5**.

B. subtilis si presenta come un ottimo agente di biocontrollo in quanto, oltre a produrre endospore resistenti nell'ambiente, è in grado di sintetizzare composti antimicotici come

Tab. 4. Specie di lieviti in grado di inibire la crescita di *P. expansum*.

Specie	Meccanismo di azione	Frutti testati	Trattamento di biocontrollo	Incidenza della malattia dopo il trattamento (%)	Riferimento
<i>Pichia ohmeri</i>	Produzione di tossine killer	-	-	-	Coelho et al., 2009
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Competizione per i nutrienti	Mele con ferite	1×10 ⁸ cellule/mL, conservate a 20°C per 7 giorni	<30	Zheng et al., 2017
<i>Rhodotorula kratochvilovae</i>	Competizione per i nutrienti	Mele con ferite	1×10 ⁸ cellule/mL, conservate a 20°C per 7 giorni	<30	Lima et al., 2011
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Riduzione stress da ossidazione	Mele con ferite	1×10 ⁷ cellule/mL, conservate a 25°C per 4 giorni	<45	Chen et al., 2015b
<i>Starmerella bacillaris</i>	Produzione di composti volatili	Mele con ferite	1×10 ⁷ cellule/mL, conservate a 25°C per 7 giorni	-	Nadai et al., 2018
<i>Candida guilliermondii</i>	Produzione di tossine killer	-	-	-	Coelho et al., 2009
<i>Candida sake</i>	Produzione di composti organici volatili	Mele con ferite	1×10 ⁷ cellule/mL, conservate a 0°C per 30 giorni	53,0	Torres et al., 2007
<i>Cryptococcus laurentii</i>	Induce produzione di ROS	Mele con ferite	1×10 ⁸ cellule/mL, conservate a 25°C per 4 giorni	<50	Yu et al., 2013
<i>Cryptococcus victoriae</i>	Produzione di enzimi litici	Mele con ferite	1×10 ⁶ cellule/mL, conservate a 0°C per 120 giorni	<10	Lutz et al., 2013
<i>Cryptococcus albidus</i>	Produzione di enzimi litici	Mele con ferite	1×10 ⁶ cellule/mL, conservate a 0°C per 120 giorni	<15	Lutz et al., 2013
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Produzione di enzimi litici	Mele intatte	1×10 ⁸ cellule/mL, conservate a 4°C per 45 giorni	25,0	Zhang et al., 2010
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Competizione per i nutrienti	Mele con ferite	1×10 ⁷ cellule/mL, conservate a 1°C per 30 giorni	-	Ruiz-Moyano et al., 2016

Tab. 5. Ceppi batterici in grado di inibire la crescita di *P. expansum*.

Ceppo	Composti	Frutti testati	Riferimento
<i>Paenibacillus polymyxa</i> HT16	Proteina 4517 Da	-	Zhou et al., 2008
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Composti volatili	Mele con ferite	Wallace et al., 2017
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Non determinato	Mele con ferite	Wang et al., 2016
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Non determinato	Mele con ferite	Wang et al., 2016
<i>Bacillus subtilis</i> CICC 10034	Non determinato	Mele con ferite	Wang et al., 2016
<i>Weissella cibaria</i> TM128	Acidi organici	Mele con ferite	Trias et al., 2008
<i>Rahnella aquatilis</i>	Non determinato	Mele con ferite	Calvo et al., 2007
<i>Lactobacillus plantarum</i> UFG 121	Acidi organici	-	Russo et al., 2017
<i>Lactobacillus plantarum</i> CECT 749	Peptidi	-	Luz et al., 2017

lipopeptidi, fengicina ed enzimi in grado di aggredire i polimeri strutturali dei funghi [Gao et al., 2018; Wang et al., 2016]. Secondo recenti ricerche però, oltre a queste sostanze, *B. subtilis* è in grado di creare una serie di VOC derivanti da metabolismi primari e secondari, che a loro volta hanno una forte azione antimicotica [Gao et al., 2018]. A temperatura ambiente e in refrigerazione durante la conservazione a breve termine, *Bacillus sp.* SL-6, è in grado di ridurre l'incidenza e la gravità della muffa verde-azzurra delle pomacee [Cozzolino et al., 2020]. I metaboliti prodotti da *Bacillus spp.*, essendo molto biodegradabili e poco tossici, potrebbero essere ulteriormente sviluppati per poter essere utilizzati come agenti alternativi per il controllo delle malattie della frutta in post-raccolta. *Rhanelia aquatilis* è un altro batterio studiato per il suo meccanismo di biocontrollo. Questo batterio, infatti, a concentrazioni di 10^6 cell/mL a 28°C, è in grado di bloccare la germinazione delle spore di *P. expansum* e di ridurre la severità dell'attacco del 57% a 4°C [Calvo et al., 2007]. Gli autori hanno riportato che l'inibizione della germinazione del fungo si verifica quando c'è un'interazione diretta tra l'antagonista e il patogeno. Si è visto infatti che, se i due microrganismi coinvolti venivano separati da un filtro a membrana, l'azione del batterio sul fungo non si presentava, anche se i metaboliti erano in grado di essere interscambiati. Pertanto, il meccanismo esatto con cui questo antagonista inibisce la germinazione delle spore non è ancora chiaro, anche se sembra necessario un contatto diretto.

Anche i batteri lattici (LAB), che ormai sono di largo impiego nella produzione di alimenti, sono stati testati per l'uso come BCA, anche se le condizioni di crescita sulla superficie dei frutti non sono per loro ottimali. I composti secreti da questa tipologia di batteri sono considerati antimicotici e *Lactobacillus plantarum* ha dimostrato anche buone capacità di assorbire e degradare la patulina [Wang et al., 2015 a, b].

Secondo Etebarian et al. (2005), l'uso di *Pseudomonas fluorescens* su mele a temperatura ambiente, riduce i marciumi causati da *P. expansum* del 60-100%. Questo antagonismo è stato spiegato dal fatto che il batterio è in grado di sequestrare il ferro. Altro possibile BCA testato è stato *Pseudomonas syringae* che è in grado di ridurre l'incidenza della muffa verde-azzurra del 50% se usato singolarmente, e del 90% se usato in co-trattamento con fungicidi [Errampalli et al., 2006].

Quelli sopra descritti sono BCA che sono stati studiati andando ad essere applicati sui frutti dopo la raccolta e prima della conservazione, ma l'utilizzo di questi agenti di biocontrollo può essere fatto anche nel pre-raccolta. Lahlali et al. (2009) hanno testato l'antagonismo di *Pichia anomala* nei confronti di *P. expansum* in campo, trattando direttamente le piante. Nonostante la variabilità di condizioni, alcuni saggi hanno mostrato una consistente riduzione

della marcescenza delle mele nel post-raccolta. Il problema è che gli eventi meteorologici (temperatura, aria, umidità, pioggia) influenzano molto il successo dell'applicazione dei BCA e il microclima del frutteto influenza la loro vitalità [Ippolito e Nigro, 2000].

I composti antifungini, oltre a essere prodotti da lieviti e batteri, possono anche essere prodotti dalle piante, sia in risposta a stress che ad attacchi patogeni [Zhong et al., 2018]. Oli essenziali, estratti vegetali e flavanoni, essendo sicuri, facilmente decomponibili, ecologici e non fitotossici, negli ultimi anni sono stati soggetti a molte ricerche. Questi composti possono essere associati a BCA per aumentarne l'efficacia. Un esempio è lo jasmonato di metile (MeJA) che è un fitormone prodotto dalle piante sottoposte a stress. Questa sostanza permette di aumentare l'efficacia di *Meyerozyma guilliermondii* nel contrasto della muffa verde-azzurra, abbassando la sua incidenza dal 42,4% al 21,6% [He et al., 2020]. Oltre a ciò il MeJA è in grado di prolungare la shelf-life dei frutti in quanto è in grado di incrementare l'espressione di enzimi di difesa come chitinasi, β -1,3-glucanasi, polifenolossidasi e perossidasi. Anche la glicina betaina (GB) in associazione a *Sporidiobolus pararoseus* ceppo Y16 riesce a ridurre significativamente l'incidenza e il diametro delle lesioni di *P. expansum* rispetto ai controlli o ai campioni trattati con solo *S. pararoseus*. Se l'incidenza del controllo dopo 7 giorni di conservazione era del 100%, con l'uso di *S. pararoseus* Y16 modificato con GB era solo dell'11,1% [Abdelhai et al., 2019]. Singolarmente sono stati testati anche altri estratti da aglio [Ikeura et al., 2011], peperoncino [Luo et al., 2011], limone [Venturini et al., 2002], cumino [Mohammadifaret et al., 2012] e cannella [Čvek et al., 2010].

Per quanto riguarda gli oli essenziali, invece, si tratta di metaboliti secondari delle piante che hanno funzioni antimicrobiche naturali. Secondo uno studio di Zhou et al. (2018), il decanale esogeno degli oli essenziali è in grado di andare a inibire la produzione di patulina, l'espressione dei geni di biosintesi di *P. expansum* e quindi controllare il marciume della muffa verde-azzurra su mele nel post-raccolta. Altri oli essenziali testati sono stati quelli di menta, basilico e di cedro bianco [Singh e Geeta, 2007].

Oltre alle tecniche di biocontrollo, sono stati sviluppati anche metodi di controllo fisico; questi sono l'atmosfera controllata, i trattamenti termici e l'irradiazione. L'atmosfera controllata (CA), insieme all'abbassamento della temperatura, consente una riduzione considerevole del metabolismo dei prodotti ortofrutticoli, ritarda la senescenza, ha azione fungistatica ritardando la crescita e lo sviluppo dei patogeni post-raccolta e mantiene la qualità di frutta e verdura per periodi più lunghi. Può essere considerato un metodo complementare per la gestione dei patogeni e prevede ambienti con elevati livelli di anidride carbonica (CO₂) e ridotte percentuali di ossigeno (O₂). Per quanto riguarda le concentrazioni

dei gas si passa da un 21% di O₂ dell'atmosfera, a 1-3%, mentre da un 0,04% della CO₂ a un 1,5-5%. Le condizioni di ossigeno basso (LO) e di ossigeno ultrabasso (U-LO) si riferiscono sia alla percentuale di O₂ che di CO₂ in equilibrio con l'azoto (N₂). Nel primo caso ci si riferisce a pressioni parziali di O₂/CO₂ di 3/3%, mentre per la U-LO si parla di condizioni di 3/1% [Morales et al., 2009]. La crescita di *P. expansum* è scarsamente influenzata da alti livelli di CO₂; infatti, è stato registrato che tale fungo può crescere senza essere completamente inibito anche con livelli di 12% di CO₂ [Sitton e Patterson, 1992]. Altra caratteristica di *P. expansum* è la capacità di svilupparsi anche con bassi livelli di ossigeno. Si può dire, infatti, che ha scarso fabbisogno di questo gas ed è in grado di accrescersi anche a 2,1% di O₂ [Pitt e Hocking, 1997]. La muffa verde-azzurra delle pomacee, come testimonia lo studio di Sydenham et al. (1997), è influenzata maggiormente dalle alte concentrazioni di CO₂ che dalle basse concentrazioni di O₂. Morales et al. (2007) sono andati a studiare gli effetti di LO e U-LO a basse temperature sulla crescita di *P. expansum*. Quello che hanno visto è stato che dopo 2 mesi di conservazione, le mele in U-LO presentavano lesioni da muffa verde-azzurra maggiori rispetto alle mele conservate in LO. Questo conferma la teoria che il fungo patogeno, è più sensibile ad alti livelli di CO₂ che a bassi livelli di O₂. Oltre a questo, anche la perdita di caratteristiche organolettiche come la compattezza e l'acidità, erano maggiori nelle mele conservate per 3 mesi in ambiente a 1% di CO₂ rispetto a 3% di CO₂ [Chang et al., 2005]. Nonostante la U-LO pare abbia scarsi risultati nei brevi periodi di conservazioni, il suo effetto aumenta con l'allungamento del tempo di stoccaggio dei frutti. Dopo 2,5 mesi di CA, in termini di lesioni non sono state rilevate differenze tra LO e U-LO [Morales et al., 2007]. Pare che basse concentrazione di ossigeno per un tempo prolungato possono causare danni permanenti al fungo.

Per quanto riguarda i trattamenti termici sono impiegati per sanificare i frutti e migliorare il processo di cicatrizzazione delle eventuali ferite e microferite. Oltre a ciò ha il vantaggio di migliorare il colore delle mele, inibire alcuni enzimi idrolitici responsabili dell'ammorbidimento dei tessuti e ridurre la produzione di etilene [Lurie et al., 1998]. Tutto questo influisce sul ritardo della maturazione e ciò aiuta a limitare gli attacchi dei funghi patogeni. L'immersione delle mele in un bagno di acqua calda a 55°C per 15 secondi con spazzolatura, ha ridotto di molto lo sviluppo del marciume sia a 20°C per 4 settimane che a 1°C per 4 mesi [Fallik et al., 2001].

Lo sviluppo di *P. expansum* può essere ridotto anche con l'impiego della radiazione gamma. Questa tecnologia per lo più viene associata a un'altra tecnica di controllo come ad esempio le basse temperature o la CA. Drake et al. (1999) hanno evidenziato la possibilità di riduzione

dell'incidenza della muffa verde-azzurra esponendo le mele di varietà Fuji e Granny Smith a radiazione gamma tra 0,30 e 0,90 kGy. Si riporta che la perdita di compattezza rilevata dipendeva dalla cultivar, ma comunque non c'è stata nessuna perdita di acidità titolabile. Nel micelio di *P. expansum* trattato con radiazioni gamma a 1,0-3,0 kGy si sono osservati cambiamenti morfologici, scomparsa di fialidi e perdita di capacità di formare conidi [Foaad et al., 2002]. Basse dosi di radiazioni gamma (0,3-0,6 kGy) associate a una conservazione in refrigerazione, hanno ridotto al minimo le perdite dovute alla muffa verde-azzurra di mele Red Delicious inoculate con *P. expansum* e conservate per 9 mesi [Mostafavi et al., 2012]. Sono state rilevate anche mutazioni morfologiche in conidi di *P. expansum* dopo l'esposizione per 30 minuti a raggi UV [Ulevičius et al., 2008]. Gómez-López et al. (2007) hanno studiato l'effetto della luce UV pulsata, ricca in UV-C per la decontaminazione di frutta e verdura.

In conclusione, per il controllo di *P. expansum* nel post-raccolta, si stanno studiando numerosi composti chimici che, oltre a interferire con lo sviluppo del patogeno, devono essere ecologici e non pericolosi per i consumatori. L'acido fitico e l'acido ascorbico sono utilizzati per aumentare l'efficacia di alcuni BCA nei confronti della muffa verde-azzurra [Yang et al., 2015], mentre il bicarbonato di sodio e il cloruro di calcio sono stati studiati per il loro effetto diretto sullo sviluppo di *P. expansum* [Ippolito et al., 2005]. Il calcio è in grado di interferire sulla germinazione delle spore, sull'attività degli enzimi pectinolitici fungini e aumenta la resistenza della parete cellulare delle cellule del frutto.

L'uso sinergico delle tecniche di controllo biologico, fisico e chimico ha dimostrato migliore efficacia e migliore stabilità. Oltre a questo, permette di utilizzare quantità molto inferiori di fungicidi o di trattamenti più brevi per ottenere lo stesso risultato [Yu et al., 2020]. Negli ultimi decenni sono stati condotti numerosi studi per individuare metodi privi di fungicidi per il controllo della muffa verde-azzurra delle pomacee e si è notato che, per una gestione integrata della malattia, è necessaria l'applicazione combinata di più strategie. Nella **Tab. 6** sono riportati alcuni esempi di trattamenti combinati per il contenimento di *P. expansum*.

La ricerca evidenzia che gli approcci di controllo hanno un potenziale contro *P. expansum*, ma una qualsiasi tecnica da sola, non è sufficiente a garantire il controllo della muffa verde-azzurra delle pomacee nel post-raccolta. La combinazione di diversi approcci consente maggiore efficacia e minor possibilità di sviluppo di resistenze.

Tab. 6. Applicazione combinata di diversi metodi di controllo di *P. expansum*.

Combinazione di metodi	Dose	Frutti testati	Incidenza della malattia dopo il trattamento (%)	Riferimento
Trattamento con aria calda + <i>Pichia guilliermondii</i>	Aria calda a 45°C per 4 ore + 10 ⁸ cellule/mL e conservazione a 25°C per 4 giorni	Mele intatte e con ferite	0	Zhao et al., 2019
Glicina betaina + <i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i>	1mM + 5×10 ⁷ cellule/mL, e conservazione a 25°C per 4 giorni	Mele con ferite	0	Siu et al., 2012
Acido fitico + <i>Pichia caribbica</i>	4 µmol/mL + 2×10 ⁸ cellule/mL e conservazione a 20°C per 10 giorni	Mele con ferite	<10	Mahunu et al., 2016
Acido ascorbico + <i>Pichia caribbica</i>	250 µgmL + 1×10 ⁸ cellule/mL e conservazione a 25°C per 15 giorni	Mele con ferite	<20	Li et al., 2014a
Radiazioni gamma + <i>Pseudomonas fluorescens</i>	200 Gy + 1 × 10 ⁴ cellule/mL e conservazione a 1°C per 9 mesi	Mele con ferite	0	Mostafavi et al., 2013

5 METODI DI DECONTAMINAZIONE E DETOSSIFICAZIONE DELLA PATULINA IN PRODOTTI FRESCHI E PROCESSATI

Lo sviluppo di *P. expansum* nelle mele in post-raccolta comporta la contaminazione da patulina dei tessuti. Poiché i frutti con questi difetti non vengono utilizzati per il consumo fresco, ma vengono destinati alla produzione di puree o succhi, tali prodotti potrebbero contenere livelli più elevati di patulina rispetto ai limiti, determinando un rischio per i consumatori. Come già riportato, le lesioni nelle mele portano a un aumento considerevole dei frutti colpiti da muffa verde-azzurra, quindi, un primo accorgimento per aumentare la qualità dei frutti è sicuramente quello di avere dei buoni metodi di raccolta e trasporto. A testimonianza di ciò, uno studio di Jackson et al. (2003), ha visto che la patulina non era rilevabile nel sidro prodotto da 7 varietà di mele fresche raccolte da albero, mentre nel sidro ottenuto da 4 varietà di mele raccolte a terra, arrivava a concentrazioni comprese tra 40,2 e 374 mg/L.

I metodi per ridurre la patulina nei prodotti trasformati si dividono in tecniche di decontaminazione e tecniche di detossificazione. Nel primo caso si parla di interventi preventivi che cercano di evitare che la patulina arrivi a concentrazioni troppo elevate nel prodotto finito. In questo caso la molecola non viene distrutta o degradata, semplicemente viene allontanata eliminando le parti di materia prima che potrebbero essere più contaminate. Nel secondo caso invece si parla di distruzione o inattivazione in sito della patulina con strategie che vanno per lo più ad agire direttamente sulla molecola eliminandola o modificandone la struttura. Con le tecniche di detossificazione si interviene su prodotti che si ha già la conferma che presentano livelli alti di patulina e si attuano per cercare di ridurla.

5.1 Metodi di decontaminazione

Uno dei primi metodi di decontaminazione che si possono riscontrare nel flowsheet di produzione del succo, del sidro o delle puree a base di mela, è quello della cernita. Questo passaggio è molto importante in quanto le mele utilizzate per produrre questi alimenti, solitamente sono ricche di ammaccatura, lesioni e marciumi, e la cernita ci permette di eliminare i frutti di minor qualità [Acar et al., 1998; CODEX, 2003]. Questo, quindi, incide direttamente sulla quantità di patulina del prodotto finito e permette di ridurre anche la possibilità di contaminazione incrociata. Selezionando le mele con lesioni da muffa verde-azzurra inferiori ai 10 cm², si è dimostrato che il contenuto di patulina in sidro torbido e limpido si è ridotto rispettivamente da 15,8 µg/kg a 1,1 µg/kg e da 8,3 µg/kg a 0,6 µg/kg,

rispetto a un controllo senza cernita [Baert et al., 2012]. Il problema di questo metodo è che, a meno che le aree deteriorate non siano visibili in superficie, l'individuazione delle mele colpite da *P. expansum* è molto difficile.

Esistono altre misure che possono essere adottate per ridurre il contenuto finale di patulina e aumentare la sicurezza del prodotto oltre alla cernita. I più utilizzati in genere sono il lavaggio e l'asportazione delle parti del frutto marcescenti.

Il lavaggio, tipicamente, viene effettuato tramite immersione in una vasca d'acqua o tramite l'applicazione di getti a pressione. Il fine principale di tale operazione è quello di rimuovere detriti, sporcizia e residui vegetali, i quali, come riportato nel capitolo 4, possono trasportare propaguli fungini. Essendo la patulina una molecola solubile in acqua, il lavaggio ha anche il vantaggio di solubilizzare una parte della micotossina, riuscendo ad allontanarla dalle mele [Cole et al., 2003]. Diversi studi hanno evidenziato che proprio questa è una delle fasi più critiche della lavorazione, non solo perché la patulina può essere ridotta anche del 54% [Acar et al., 1998; Sydenham et al., 1995], ma anche perché se mal gestita, l'acqua di lavaggio può diventare una fonte di contaminazione incrociata per l'intero impianto di lavorazione. Un altro studio ha dimostrato che la pulizia delle mele prima della trasformazione ha maggiore effetto rispetto al trattamento con enzimi o alla microfiltrazione. Infatti il lavaggio consente la riduzione del 33,6% della patulina, mentre le altre due tecniche, rispettivamente, consentono una riduzione solo del 9,9% e del 3,7%, rispettivamente [Yuan et al., 2010]. Jackson et al. (2003) hanno dimostrato che l'efficacia del lavaggio con getti ad alta pressione è maggiore rispetto all'immersione in vasche di acqua rotante. Questo perché l'acqua in pressione favorisce anche la rimozione fisica della parte di polpa infetta, dove i livelli di patulina sono maggiori. Pur essendo una tecnica molto efficace per rimuovere la patulina, il solo lavaggio non è sufficiente a garantire la sicurezza dei prodotti finiti e deve essere applicata come un punto di controllo critico, attentamente seguito e monitorato.

Altro metodo per la mitigazione della patulina nei prodotti a base di mele è quello di eliminare le parti rovinate o marcescenti del frutto. Essendo stato dimostrato che la patulina si concentra per lo più nei tessuti marcescenti o comunque danneggiati da *P. expansum*, eliminando tali parti si riesce ad abbattere significativamente il contenuto di micotossina nel prodotto finito [De Souza Sant'Ana et al., 2008]. Questa tecnica ha dimostrato risultati molto soddisfacenti, riducendo addirittura del 93-99% il contenuto totale di patulina [Lovett et al., 1995]. Questo metodo è economicamente utile in quanto, a differenza della cernita, prevede lo scarto solo di piccole porzioni, quelle effettivamente colpite dal patogeno e potenzialmente pericolose. Come per le acque di lavaggio, anche questi scarti, essendo ricchi di propaguli

fungini e tossina, vanno maneggiati con attenzione e allontanati perché possono diventare a loro volta fonte di inoculo o contaminazione [Rychlik et al., 2001]. Oltre all'eliminazione delle aree marcescenti, è interessante anche la mondatura e l'asportazione del torsolo. Nella produzione dei purea di mele, una passatrice in grado di allontanare i residui di buccia e torsolo tramite setacci da 4 mm e 1,25 mm, ha mostrato una riduzione fino all'80% del livello di patulina. Questo è determinato dal fatto che, in mele contaminate, lo sviluppo di *P. expansum* avviene per lo più sull'esocarpo e nel torsolo [Janotová et al., 2011].

Le tecniche sopra descritte fanno riferimento a metodi di prelaborazione, ovvero applicate prima che le mele siano trasformate. Di seguito sarà analizzata la chiarificazione che può essere applicata ai prodotti trasformati liquidi per abbassare i livelli di patulina.

Le tecniche di chiarificazione e filtrazione sono sempre state comunemente utilizzate nella produzione di succhi di frutta. Tale categoria di tecniche è impiegata principalmente per l'allontanamento di particelle solide che rendono torbide le soluzioni. Dopo studi, però, si è visto che una depectinizzazione, seguita da chiarificazione e filtrazione, potevano ridurre il contenuto di patulina anche del 39% [Acar et al., 1998]. Questo avviene in quanto le particelle in sospensione nel liquido contengono la maggior parte della contaminazione sia di micotossine che di fungo patogeno. Bisseur et al. (2001) sono andati a studiare l'influenza delle diverse tecniche di chiarificazione sulla patulina e hanno stimato che la bentonite è in grado di ridurre il livello di tossina totale in succo di mela dell'8,5%, le diatomee del 3,4%, mentre la centrifugazione da sola ha determinato una riduzione del 20,5%.

L'uso di pectinasi nei succhi di mela, permette di rompere le catene di pectina che circondano le proteine e di conseguenza facilita la loro sedimentazione. Poiché la patulina tende ad essere associata a particelle proteiche in soluzione, una loro precipitazione consente di allontanare anche la tossina dal succo.

Una tecnica più costosa, sia in termini monetari che di tempo, è quella dell'impiego di carbone attivo in polvere o carbone come mezzo di filtrazione. Con entrambe le tecniche i risultati hanno fatto registrare riduzioni del contenuto di patulina nel succo di mela del 98,15-100% [Sands et al., 1976]. Va tenuto conto che in studi più recenti [Gökmen et al., 2001] non si sono registrati livelli di riduzione così elevati da parte del carbone attivo. Nonostante ciò, l'uso di carbone attivo è risultata una tecnologia di chiarificazione molto efficace nel ridurre il contenuto di patulina, anche se pare che sequestri anche altri elementi che influiscono su colore, zuccheri e altri nutrienti [Root et al. 2015].

Microfiltrazione e ultrafiltrazione sono altre due tecniche utilizzate per l'illimpidimento dei prodotti, che hanno, a confronto della chiarificazione, il vantaggio di usare meno coadiuvanti

e la possibilità di essere effettuate in flusso continuo. Le due tecniche si distinguono per la grandezza dei pori della membrana filtrante che nella microfiltrazione è in grado di separare particelle da 0,1 a 2 μm , mentre l'ultrafiltrazione da 0,001 a 0,1 μm . Sempre per il fatto che la patulina è associata alle particelle grossolane in sospensione, anche queste due tecniche sono in grado di ridurre il contenuto della micotossina nei prodotti liquidi a base di mela. Welke et al. (2009) hanno registrato un abbassamento del contenuto di patulina nel succo di mela del 20,1%; invece, l'ultrafiltrazione ha registrato una riduzione del 2,6% secondo lo studio di Gökmen et al. (2001) e del 12% secondo lo studio di Acar et al. (1998). La diminuzione del contenuto totale di patulina è sicuramente collegata alla rimozione delle particelle grossolane in sospensione e non alla filtrazione diretta della tossina. Questo potrebbe spiegare la differenza dei risultati: la diversa composizione in particelle dei succhi utilizzati potrebbe avere maggiore effetto sull'esito rispetto alla differenza di dimensione dei filtri.

5.2 Metodi di detossificazione

I metodi di detossificazione possono essere divisi in tre categorie in base alle tecniche impiegate per la degradazione o distruzione della patulina all'interno dei prodotti alimentari. I metodi possono essere fisici, nel caso si utilizzino calore, radiazioni, adsorbenti o altri trattamenti non termici come le alte pressioni idrostatiche (HPP) o la luce pulsata (PL); biologiche se si usano microrganismi, enzimi o molecole naturali; chimici se si fa uso di sostanze in grado di degradare la tossina modificandone direttamente la struttura.

5.2.1 Metodi fisici

Una prima tecnologia di detossificazione è quella dell'adsorbimento. Tale sistema si basa sulla rimozione della patulina attraverso delle sostanze o dei microrganismi che sono in grado di legarla e toglierla dal succo. Gli adsorbenti più utilizzati sono quelli chimici, questo in quanto hanno una serie di vantaggi, tra cui la praticità, la facile rigenerazione e l'elevate capacità di adsorbimento in tempi brevi. Un esempio di questi adsorbenti chimici sono le microsferiche magnetiche con gruppi sulfidrilici. Queste sferette di 1 μm di diametro sono costituite da un nucleo di ossido di ferro rivestito da uno strato di silicati attivati da gruppi sulfidrilici. L'applicazione di questa tipologia di adsorbente ha registrato un'efficienza di adsorbimento della patulina in succo di mela del 71,25% dopo solo 4 ore di contatto. Le microsferiche con la patulina poi sono separate dalla matrice succo tramite l'uso di un separatore magnetico per 5 minuti [Bayraç et al., 2019]. Liu et al. (2019) sono andati a studiare l'uso di

diatomee avvolte da uno strato di ossido di grafene attivato con zolfo. GO-SH/diatomite, secondo il lavoro, è riuscito a rimuovere oltre il 90% della patulina da succo di mela con una capacità di adsorbimento di 10,88 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (μg di patulina assorbita per mg di adsorbente utilizzato) in 8 ore di contatto. Oltre all'elevata efficienza, questa tecnica ha anche il vantaggio di riuscire a separare la matrice dall'adsorbente con una semplice filtrazione (pori di 0,45 μm) e di lasciare invariate tutte le caratteristiche organolettiche del succo. Successivamente è stato sviluppato un altro adsorbente interessante a base metallo-organica funzionalizzata con cisteina (UiO-66(NH₂)@Au-Cys). Nello studio di Liu, Wang, Yang et al. (2019), UiO-66(NH₂)@Au-Cys è riuscito a ridurre significativamente i tempi di contatto a solo 3 ore pur mantenendo livelli di adsorbimento alti, intorno ai 4,18 $\mu\text{g}/\text{mg}$. Per quanto riguarda la citotossicità dei residui di questo composto all'interno del succo di mela, sono stati condotti studi su cellule NIH 3T3 (cellule di fibroblasti di topo) che non hanno evidenziato danni.

Altra categoria di adsorbenti sono quelli a base di biomolecole. La trietilene tetramina (TETA) è un reagente funzionalizzante che consente di modificare il chitosano innestando dei gruppi amminici per migliorare la sua capacità di adsorbimento. Si è osservato che la modificazione di farina di mais con TETA, insolubile in acqua e ingabbiata da chitosano magnetico (TETA-WICF/MCR), va a creare una struttura molto porosa che è in grado di adsorbire in modo molto efficiente la patulina. Questo composto è in grado di adsorbire oltre il 90% della micotossina in un succo di mela contaminato con 100 $\mu\text{g}/\text{L}$. L'uso di TETA per modificare la resina di chitosano, ha messo a disposizione un maggior numero di gruppi amminici (-NH₂), nonché di gruppi ossidrilici (-OH) per poter legare la patulina. Per lo stesso motivo lo studio ha riscontrato anche un aumento della percentuale di assorbimento della micotossina all'aumentare del dosaggio dell'adsorbente [Guo et al., 2020]. La resina di chitosano e xantano CXCR (Cross-linked xanthated chitosan resin), in un altro lavoro, è stata preparata tramite reticolazione inversa in sospensione e utilizzando il disolfuro di carbonio come agente di modifica per aumentare il contenuto di gruppi sulfidrilici. La resina CXCR è stata testata in succo di mela e si è visto avere una capacità di assorbimento della patulina di 23,8 $\mu\text{g}/\text{mg}$ in 18 ore [Peng et al., 2016].

Il terzo gruppo di adsorbenti sono quelli che si basano sull'uso di microrganismi che sono in grado di sequestrare la patulina. I bioadsorbenti a base di lievito hanno dimostrato molti vantaggi nella rimozione dei composti tossici, ma hanno i problemi della bassa capacità di adsorbimento e della difficoltà di separazione dal succo. Per aggirare tali problemi un recente studio di Qiu et al. (2020) ha verificato diversi modi per funzionalizzare i gruppi tiolici (-SH)

e incorporare le cellule di lievito inattivato con l'aerogel di agar (Y-SH(GI)@Agar). Riuscendo a aumentare il contenuto di gruppi tiolici in grado di interagire, si è riusciti ad aumentare l'adsorbimento di patulina. Tale tecnica, nonostante possieda una capacità di adsorbimento di 1,08 µg/mg in 24 ore, ha i vantaggi di essere piuttosto economica, facile da mettere in pratica e permette una semplice separazione dell'adsorbente dal succo di mela.

Secondo diversi studi anche i LAB sono interessanti bioadsorbenti. Attualmente la decontaminazione della patulina con questi microrganismi avviene principalmente mediante componenti della parete, come polisaccaridi e proteine che possiedono siti di legame [Yuan et al., 2014; Wang et al., 2015b]. Tuttavia, Zoghi et al. (2017) sono riusciti a produrre un succo di mela con *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus plantarum* che nel corso di 6 settimane di conservazione refrigerata sono riusciti a rimuovere il 91,33% del contenuto di patulina. Gli autori hanno però riferito che sono necessari altri studi per riuscire a capire l'esatto meccanismo di adsorbimento e per valutare la stabilità nel tratto gastrointestinale. I migliori risultati ottenuti sull'adsorbimento della patulina da parte di microrganismi, si sono registrati con l'impiego di *Lactobacillus rhamnosus* ceppo 6224 e *Enterococcus faecium* ceppo 21605 inattivati. Questi microrganismi hanno diminuito la patulina rispettivamente del 80,4% e del 64,5% [Hatab et al., 2012b]. *Bifidobacterium bifidum* ceppo 6071 e *Lactobacillus rhamnosus* ceppo 6149 sono stati utilizzati sia come cellule vitali che non vitali, e nel giro di 24 ore hanno rispettivamente restituito valori di riduzione di 52,9% e 54,1% per *B. bifidum*, e 51,15 e 52,0% per *L. rhamnosus* [Hatab et al., 2012a].

Nella **Tab. 7** è possibile osservare, oltre ai sistemi adsorbimento sopra descritti, altre tecniche messe a confronto.

Spesso per la produzione degli alimenti si fa uso di trattamenti termici mirati all'allungamento della conservazione. Un esempio è la pastorizzazione o la sterilizzazione che sono applicate a una svariata gamma di prodotti per aumentarne la loro sicurezza. Anche evaporazione e distillazione sono processi che utilizzano il calore per permettere di rimuovere l'acqua o altri componenti dagli alimenti. Nonostante l'uso di questi trattamenti termici sia stato messo in discussione a causa dell'alta stabilità della patulina al calore, la pastorizzazione negli anni ha dimostrato risultati diversi e contrastanti sulla detossificazione della patulina. Nella tabella riassuntiva (**Tab. 8**) è possibile osservare questi risultati. Sebbene l'aumento del tempo e della temperatura di riscaldamento, solitamente, aumentino il livello di riduzione di patulina, la maggior parte della degradazione della molecola avviene nei primi momenti di applicazione del processo [Kadalkal et al., 2003]. Se Scott et al. (1968) hanno riportato che un trattamento di pastorizzazione a 80°C per 20 minuti era in grado di ridurre il

Tab. 7. Confronto di capacità di adsorbimento di patulina in succo di mela tra vari adsorbenti.

Adsorbimento	Capacità di adsorbimento della patulina (µg/mg)	Tempo di adsorbimento (h)	Riferimento
Adsorbente a base metallo-organica funzionalizzato con cisteina UiO-66(NH ₂)@Au-Cys	4,18	3	Liu, Wang, Yang et al., 2019
Microsfere magnetiche con gruppi sulfidrilici	2,375	4	Bayraç et al., 2019
Ossido di grafene funzionalizzato con zolfo (GO-SH)	10,68	8	Liu, Wang, Wang et al., 2019
Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ @CS-GO@MIP	7,11	24	Sun et al., 2020
Cross-linked xanthated chitosan resin (CXCR)	23,81	18	Peng et al., 2016
Lieviti inattivati in aerogel Y-SH(GI)@Agar	1,077	24	Qiu et al., 2020
Cellule di <i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> inattivate con il calore	0,0126	24	Sajid et al., 2018

Tab. 8. Influenza dei trattamenti termici sulla riduzione di patulina in prodotti liquidi a base di mela

Temperatura di processo (°C)	Tempo di processo (min)	Contenuto iniziale di patulina (µg/kg)	Riduzione della patulina (%)	Riferimento
80	20	4	55	Scott et al., 1968
80	30	ND	NS	Kubacki et al., 1986
90	0,17	96,5	13,4	Kadakal et al., 2002
90	0,17	20	19	Wheeler et al., 1987
90	0,5	433	39,6	Welke et al., 2009
90	7	1500	60	Taniwaki et al., 1992
90	10	140	12,1	Janotová et al., 2011
90	20	220	18,8	Kadakal et al., 2003
90	20	1000	NS	Woller et al., 1982
100	20	220	26	Kadakal et al., 2003

NS= nessuna riduzione significativa nel contenuto di patulina, ND= dati non disponibili

contenuto di micotossina del 50% nel succo di mela, Kubacki et al. (1986) riportano che la patulina era stabile per 30 minuti a 80°C. Nello stesso lavoro si riporta che per ottenere una riduzione della micotossina sono necessari almeno 120°C per 30 minuti. In studi successivi, l'introduzione di tecniche ad alta temperatura e breve durata (HTST) a 90°C per 10 secondi

hanno fatto registrare maggiori riduzioni del contenuto di patulina (-18,8%) [Wheeler et al., 1987]. Successivi lavori, però, hanno portato all'ottenimento di risultati ancora contrastanti: la riduzione di patulina era rispettivamente del 18,81% e del 25,99% con pastorizzazione a 90°C e 100°C rispettivamente per 20 minuti [Kadakal et al., 2003]. La distillazione ha dimostrato di incidere in modo significativo sul contenuto di patulina, e in uno studio di Kubacki et al. (1986) si è visto che le riduzioni possono arrivare anche al 24%. Questo è causato dall'effetto del calore sulla molecola della micotossina e non dalla sua volatilità [Kryger et al., 2001]. Il processo di evaporazione, applicato a succo di mela a 96°C per 30 secondi, ha registrato una diminuzione della micotossina del 28,4% [Welke et al., 2009], valore più alto rispetto a quelli registrati da Kadakal et al. (2003), che riportavano una riduzione del 14,1% con un trattamento a 80°C per 20 minuti. Nel caso in cui i prodotti trasformati a base di mela siano sottoposti a trattamenti termici prolungati, la patulina si scinde in molecole di degradazione più piccole, l'acido gliossilico e il 3-cheto-5-idrossi-pentanololo [Collin et al., 2008; Tabatabaie et al., 2010].

La grande variabilità dei risultati ottenuti con l'applicazione di questi processi termici può essere attribuita ai diversi parametri di trattamento e alle caratteristiche del prodotto di partenza. Un esempio può essere il livello iniziale di patulina nel succo; se si parte da un prodotto con un contenuto di 200 µg/L, difficilmente un trattamento termico riuscirà a portare la contaminazione dell'alimento sotto i limiti di legge (50 µg/L) [Kadakal et al., 2003]. Altro esempio può essere la presenza di particelle grossolane in sospensione come fibre, proteine o zuccheri. Queste possono legare la patulina e renderla più stabile e meno alterabile dalle alte temperature [Welke et al., 2009]; per tale motivo le puree di mela tendenzialmente contengono livelli più elevati di questa micotossina [Raiola et al. 2012]. Pure il pH del succo influenza i trattamenti termici; la patulina ha dimostrato di resistere anche a 125°C nell'intervallo di pH 3,5-5,5 [Lovett et al., 1973]. Altra spiegazione della insufficiente coerenza dei risultati dei trattamenti termici può essere la creazione di diversi legami tra la patulina e la matrice. Essendo molto reattiva, questa tossina è in grado di reagire in modo diverso con solfiti, tioli o altri composti, determinando resistenze diverse alla degradazione termica.

Irradiazione con luce UV, luce pulsata (PL) e alte pressioni idrostatiche (HPP) sono tre processi di detossificazione fisica non termici che hanno dimostrato avere influenza sulla riduzione del contenuto di patulina nei prodotti a base di mela.

La radiazione con luce ultravioletta (UV) è sempre stata utilizzata per alterare e abbattere la carica microbica, ma successivamente diversi studi, hanno dimostrato che questa tecnica è in

grado anche di modificare la struttura della molecola di patulina riuscendo a diminuirne la tossicità e il suo contenuto totale. Con un intervallo di esposizione che va da 14,2 a 99,4 mJ/cm² su sidro di mele si è riusciti ad ottenere riduzioni che vanno dal 9,4 al 43,4% [Dong et al., 2010]. Nota positiva è anche che non è stata registrata alcuna variazione o perdita per quanto riguarda pH, °Brix e acidi totali, di conseguenza le qualità organolettiche del prodotto potenzialmente non sono variate. Zhu et al. (2012) e Tikekar et al. (2014) hanno registrato una maggior efficacia dei trattamenti UV (a 253,7 nm) nel succo rispetto al sidro. Una spiegazione può essere che, essendo il sidro più torbido, i raggi fanno più fatica a penetrare e ad interagire con la micotossina. Il sidro, inoltre, è molto più ricco di solidi insolubili e sostanze che, potenzialmente, interferiscono con la degradazione. Una filtrazione/chiarificazione, sicuramente può aumentare le capacità della radiazione UV di penetrare tutto il prodotto e avere quindi maggior effetto detossificante. Sono stati osservati tassi di degradazione più elevati in un sistema dinamico rispetto a uno statico. Ciò può essere dovuto all'agitazione, che può aumentare la possibilità di collisione tra le molecole di patulina e i fotoni, aumentandone così l'efficacia [Zhu et al., 2013].

Oltre alla presenza di torbidità, anche l'acido ascorbico è in grado di interferire sulla buona riuscita del trattamento, in quanto sembra essere in grado di assorbire le radiazioni UV. Questo acido è molto utilizzato nel campo dei succhi di mela e nelle puree come additivo con proprietà antiossidanti e anti imbrunimento. Se si prevede quindi l'utilizzo di trattamenti UV, è bene aggiungere l'acido ascorbico in un secondo momento così da garantire la riuscita del processo di detossificazione [Assatarakul et al., 2012].

Le radiazioni UV comprendono lunghezze d'onda che vanno dai 100 ai 400 nm. Secondo uno studio di Zhu et al. (2014), proprio questo parametro avrebbe molta influenza sulla degradazione della patulina nel succo di mela o nel sidro. La patulina assorbe gli UV a 276 nm; pertanto, assorbe facilmente i fotoni con lunghezza d'onda più vicina a 276 nm. Questo è il motivo per il quale le radiazioni a 222 nm hanno avuto un effetto maggiore sulla degradazione della micotossina rispetto alle lunghezze d'onda di 282 o 254 nm.

Fruttosio e glucosio, in condizioni di presenza di raggi UV, sono in grado di produrre radicali idrossialchili e acilici in grado di accelerare il processo di fotodegradazione della patulina. Al contrario, i polifenoli assorbono parte delle radiazioni, causando una minor efficienza di detossificazione [Tikekar et al., 2014].

Nonostante molti studi abbiano confermato che l'applicazione di questa tecnica non influenzi significativamente pH, solidi solubili, acidi o colore, un panel sensoriale addestrato ha evidenziato che il succo trattato con radiazioni UV era completamente diverso da quello

prodotto in modo tradizionale [Assatarakul et al., 2012]. Sono quindi necessari ancora studi per verificare, oltre all'interferenza delle radiazioni UV sulla patulina, l'influenza dell'ultravioletto sui composti aromatici e sensoriali dei prodotti liquidi a base di mele. Poiché la via di fotodegradazione della patulina rimane poco chiara, anche la tossicità dei prodotti di degradazione della tossina richiedono ulteriori indagini.

L'uso della luce pulsata (PL) è un altro strumento di detossificazione fisica in grado di ridurre il contenuto di patulina nei prodotti a base di mela. Questa tecnica prevede l'uso di brevi (1 μ s-0,1 s) e potenti impulsi di luce ad ampio spettro, con lunghezza d'onda compresa fra i 200 e i 1100 nm [Gomez-Lopez et al., 2007]. Durante il trattamento, la temperatura della sostanza trattata può aumentare, ma quello che causa la distruzione della molecola è la radiazione e non il calore [Abbasi et al., 2019]. Secondo uno studio di Funes et al. (2013), la PL è in grado di ridurre il contenuto di patulina del 22% nel succo di mela e del 51% nella purea di mela. Uno studio di Rodríguez-Bencomo et al. (2020) è andato a esaminare una strategia basata sulla reazione tra glutazione (GSH) e patulina attivata da PL e catalizzata da ioni Fe^{2+} . Si è visto che la degradazione della tossina in succo di frutta arriva circa al 91% con un rapporto molare GSH/ Fe^{2+} di 5. La formazione di addotti di GSH-patulina hanno necessità di ulteriori studi per verificare la loro sicurezza e il loro effetto dopo l'ingestione. Inoltre, sono necessarie ricerche per stabilire la stabilità e l'influenza organolettica sui prodotti alimentari trattati.

La tecnologia PL, fino a dosi di 14 J/cm², non altera le proprietà chimiche, fisiche e organolettiche degli alimenti trattati, ma a dosi maggiori, è possibile che si abbia un impatto negativo sul sapore e la capacità antiossidante dei campioni [Funes et al. 2013].

Un ultimo trattamento di detossificazione con metodi fisici è quello dell'applicazione di alte pressioni idrostatiche (HPP). Questo metodo di trattamento non termico fu originariamente sviluppato per la riduzione della contaminazione da microrganismi negli alimenti. Le alte pressioni sono in grado di andare a ridurre, anche del 56,24%, il contenuto di patulina nel succo di mela contaminato con 100 ppb di micotossina. Le pressioni sono state applicate in combinazione con diverse temperature: si andava da 300 a 500 MPa e da 30 a 50°C. I risultati di riduzione erano molto variabili e non si è notata alcuna tendenza a un rapporto ottimale tra pressione e temperatura. La ragione di questa variazione non è ben nota, ma come per gli altri trattamenti di detossificazione fisica, i parametri di trattamento, la composizione del prodotto, il pH e la concentrazione iniziale di patulina sono molto rilevanti. A pressioni di 600 MPa per 300 secondi, la riduzione ha registrato valori del 31% [Hao et al., 2016].

Da studi è stato evidenziato che le alte pressioni portano alla formazione di nuove molecole per reazione della tossina con composti contenenti gruppi sulfidrilici, come glutatione o cisteina [Schebb et al., 2009]. La rottura di legami ionici e idrogeno, e la denaturazione di proteine dei prodotti ortofrutticoli, possono liberare e esporre tali gruppi che favoriscono la formazione di addotti con la patulina. Hao et al. (2016) ha evidenziato anche la rottura dell'anello laconico della patulina, che determina una minore tossicità della stessa.

5.2.2 Metodi biologici

Il controllo della patulina con tecniche biologiche si basa su qualsiasi metodo che fa uso di microrganismi per detossificare gli alimenti; quindi, si parla di lieviti o batteri in grado di modificare chimicamente la struttura della micotossina inattivandola o riducendone la sua tossicità.

Ceppi di *Metschnikowia pulcherrima* sono stati capaci di degradare la patulina in terreno liquido contaminato con diverse quantità di tossina (5, 7,5, 10 e 15 µg/mL). Si è visto che uno dei ceppi è stato in grado di ridurre del 100% in 48 ore il contenuto di micotossina a tutte le concentrazioni. Il ceppo non ha avuto un'azione di adsorbimento della patulina, in quanto un'analisi delle pareti cellulari ha determinato l'assenza di molecole di micotossina adese. Altro aspetto evidenziato dal lavoro è stato che il numero di cellule di lievito non era influenzato dalla presenza della tossina, il che fa pensare che questi ceppi erano immuni ai suoi effetti tossici [Reddy et al., 2011]. Ianiri et al. (2017) hanno suggerito che, aggiungendo il succo di mela con piccole quantità di patulina prima della fermentazione, si era in grado di indurre resistenza in cellule di *Sporobolomyces sp.* Secondo lo stesso studio questo gruppo di lieviti rossi è in grado di degradare la patulina in prodotti di degradazione come l'acido desossipatulino e l'ascladiolo.

Saccharomyces cerevisiae ha degradato il 96% della patulina in succo di mela che conteneva una contaminazione di 4,5 µg/mL dopo 6 giorni a 25°C. In un campione con 7,0 µg/mL di tossina, invece, la riduzione è stata del 90%, suggerendo che la detossificazione dipende anche dalla concentrazione iniziale di composto tossico [Ioi et al. 2017]. *Pichia ohmeri*, dopo incubazione per due giorni a 25°C in un succo di mela con contaminazione di 8.92 µg/ml, è riuscito a abbassare tale valore dell'83%; dopo 15 giorni i livelli di tossina erano al di sotto di quelli di rilevabilità [Coelho et al., 2008]. *Rhodotorula mucilaginosa* ceppo JM19 è in grado di detossificare oltre il 50% della concentrazione iniziale di 100 µg/mL di patulina [Li X. et al., 2019].

Diversi composti di degradazione sono stati individuati in base al microrganismo utilizzato per la degradazione. Acido desossipatulico è stato prodotto soprattutto *R. mucilaginosa* ceppo JM19 [Li X. et al., 2019], *Rhodotorula kratochvilovae* [Pinedo et al., 2018] e *Rhodospiridium paludigenum* [Zhu et al., 2015], mentre ascladiolo da *S. cerevisiae* [Li et al., 2018], *Candida guilliermondii* [Chen et al., 2017] e *Pichia caribbica* [Zheng et al., 2018]. Pinedo et al. (2018) hanno rilevato che, a seguito della perdita del gruppo emiacetalico e all'idrolisi del gruppo lattonico, l'acido desossipatulico è molto meno citotossico della patulina.

La fermentazione viene utilizzata per convertire zuccheri in alcol, gas e/o acidi sfruttando il metabolismo dei lieviti. Molti studi hanno riportato la presenza di contaminazione da patulina nei succhi di mela, ma, sono pochi quelli che testimoniano contaminazione nel sidro alcolico. Questo è spiegato dal fatto che la fermentazione è in grado di ridurre anche del 90% il contenuto di patulina totale [Burroughs, 1977]. Un lavoro più recente è andato a esaminare tre diversi ceppi di *Saccharomyces cerevisiae*, ed è emerso che tutti sono in grado di degradare la patulina all'interno del succo di mela. Questo si è visto avvenire solamente durante la fermentazione, e non durante la crescita aerobica, testimoniando che la riduzione non è data da un assorbimento della molecola da parte dei microrganismi, ma da una modificazione della struttura chimica. I prodotti di degradazione della micotossina sono stati ritrovati all'interno del succo dopo il processo [Moss et al., 2002].

I batteri lattici (LAB) sono stati molto studiati perché, oltre al loro effetto benefico per la salute, sembra abbiano un ottimo potenziale di degradazione della patulina e di riduzione della sua biodisponibilità [Zoghi et al., 2017]. *Lactobacillus plantarum* è un ottimo probiotico e si è anche dimostrato un ottimo detossificatore della patulina in vitro. Si è visto infatti che in brodo MRS per 4 ore a 37°C, l'80% della patulina è stata biotrasformata in E-ascladiolo e Z-ascladiolo. Questi due composti, sottoposti ad analisi, hanno evidenziato minimi o nulli effetti tossici [Hawar et al., 2013]. Uno studio più recente ha confermato che E-ascladiolo e Z-ascladiolo sono composti non tossici per le cellule del tratto gastrointestinale, dei reni, del fegato e del sistema immunitario dell'uomo [Tannous et al., 2017]. Anche *Lactobacillus casei* ceppo YZU01 in succo di mela crudo è stato in grado di eliminare completamente la patulina presente dopo 36 ore di incubazione [Zheng et al., 2020]. Un altro studio, condotto su succo di mela con 10 ceppi di LAB, ha evidenziato la capacità di *Lactobacillus rhamnosus* ceppo 6224 e *Enterococcus faecium* ceppo 21605 di rimuovere la patulina, rispettivamente dell'80,4% e del 64,5% [Hatab et al., 2012a].

Oltre a lieviti e batteri, anche i funghi filamentosi si sono dimostrati in grado di detossificare la patulina. Secondo Zhao et al. (2018), *Byssoschlamys nivea* ceppo FF1-2 ha una particolare attitudine alla biodegradazione della patulina. Purea di mela contaminata con diverse quantità di tossina (125, 250 e 500 µg/mL) e successivamente fermentata dal fungo ha subito una riduzione del contenuto totale di oltre il 97%. L'azione del fungo ha determinato una riduzione di acidi, aldeidi e chetoni, mentre ha aumentato composti che influenzano l'aroma come alcoli alifatici ed esteri. Tali modificazioni hanno contribuito alla produzione di un prodotto con caratteristiche organolettiche accettabili, migliorando la purea.

Un nuovo metodo biologico che ha dato ottimi risultati è stato quello dell'uso di enzimi. In seguito ad analisi sui residui di colture o degli estratti intracellulari di alcuni lieviti, si è notato che la detossificazione della patulina è spesso mediata da enzimi, per lo più contenuti all'interno delle cellule [Li et al., 2018]. Analogamente gli studi su *R. paludigenum* [Zhu et al., 2015] e su *P. caribbica* [Zheng et al., 2016] hanno riscontrato che la degradazione della micotossina poteva essere indotta dalla presenza della stessa.

Xiao et al. (2019), utilizzando una lipasi pancreatica suina, sono stati in grado di degradare la patulina da un succo di pera; aggiungendo 0,02 g/mL di enzima, hanno degradato 0,375 mg/L di tossina in 24 ore a 40°C. La degradazione rispetto al contenuto iniziale (1 mg/L) ha raggiunto il 70% in un succo di mela [Tang et al., 2018]. Il vantaggio di questa tecnica è la possibilità di ridurre consistentemente la quantità di composto tossico, pur non alterando le caratteristiche organolettiche e nutrizionali dell'alimento.

L'orotato fosforibosiltransferasi è un enzima coinvolto nella biosintesi della pirimidina e può essere separato e purificato da *R. mucilaginosa*. Questo enzima in succo di mela ha dimostrato che, a condizioni ottimali di 25°C per 18 ore, è in grado di degradare la patulina di 1 mg/L. La riduzione totale è stata dell'80%, senza interferire con le caratteristiche organolettiche e nutrizionali del prodotto [Tang et al., 2019]. *Candida guilliermondii* è indotta dalla patulina a sintetizzare deidrogenasi a catena corta (SDR) [Chen et al., 2017]. Tale enzima incubato in un succo di mela ha ridotto la concentrazione della patulina dell'80%, senza interferire con la qualità del prodotto [Xing et al., 2021].

La ricerca e conseguente estrazione e purificazione degli enzimi è un procedimento piuttosto lungo e costoso, ma si è visto dare risultati molto interessanti. Per riuscire a ottenere tecniche sicure e eco-compatibili con cui trattare gli alimenti contro la patulina, è necessario approfondire questa tecnica di detossificazione biologica.

5.2.3 Metodi chimici

Un'ultima tecnica di detossificazione della patulina è quella chimica. Questa consiste nell'uso di varie sostanze chimiche per cercare di degradare la micotossina nei prodotti alimentari a base di mele. Alcuni dei composti sotto esposti sono nuovi, mentre altri sono additivi frequentemente utilizzati nell'industria, ma che successivamente si sono rivelati efficaci nel mitigare i composti tossici.

L'acido ascorbico ha determinato lievi riduzioni della patulina nei prodotti a base di mela: si parla di una riduzione del 5% dopo 3 ore e del 36% dopo 44 ore [Fremy et al., 1995]. Anche durante la conservazione del succo di mela addizionato di acido ascorbico si sono registrate delle diminuzioni, si parla di una riduzione del 70% dopo 34 giorni a pH acido [Drusch et al., 2007]. Ammoniaca e permanganato di potassio in ambiente acido e basico sono stati studiati come mezzi di controllo. Entrambi sono stati molto efficaci in soluzione acquosa standard, riducendo la micotossina del 99,9%. Nota negativa è che il permanganato di potassio in soluzioni acide può produrre composti potenzialmente mutageni e dannosi, il che ne limita il potenziale uso nei prodotti alimentari. La patulina si è dimostrata essere instabile anche in presenza di composti contenenti zolfo [Pohland et al., 1970]. Questa osservazione ha suggerito di studiare l'effetto dell'anidride solforosa (SO_2). In una soluzione contenente 200 ppm di SO_2 si è misurato una degradazione della patulina del 12% dopo 24 ore e del 90% dopo due giorni [Burroughs et al., 1977]. Anche cisteina e glutatione sono in grado di legarsi alla tossina creando addotti meno tossici. Questo è dato dalla forte affinità della patulina con gruppi sulfidrilici, amminici e tiolici [Wu et al., 2008].

L'ozono (O_3) è un composto molto ossidante che è in grado di legarsi con una vasta serie di gruppi chimici. La patulina in sistema acquoso, trattata con una soluzione al 10% di ozono, si è ridotta da 5 ppm a livelli inferiori a quelli rilevabili in 15 secondi [McKenzie et al., 1997]. In uno studio più recente di Karaca et al. (2009), viene confermata l'azione dell'ozono sulla patulina. Infatti in questo lavoro, un solo minuto di contatto con O_3 , ha ridotto del 93% la quantità di tossina. Inoltre, l' O_3 non ha dato alcun segno di alterazione delle caratteristiche di qualità dei prodotti alimentari trattati [Wu et al., 2008]. Il calcio D-pantotenato è un altro composto studiato da Yazici et al. (2002) con lo scopo di ridurre la contaminazione dei prodotti liquidi a base di mela. L'aggiunta di questa molecola tra i 1000 e i 2500 mg/kg in succo di mela concentrato e il successivo stoccaggio per 6 mesi, ha determinato una rispettiva riduzione che va dal 73,6 al 94,3% del contenuto di patulina. Sebbene sia efficace, questo periodo di tempo potrebbe essere impraticabile per molti prodotti e la tossicità degli addotti formati richiede ulteriori studi sulla loro sicurezza.

Molto spesso negli studi legati ai metodi di detossificazione si parla di produzione di composti secondari, di degradazione o addizione derivanti dalla patulina. Si parla quindi del fatto che comunque delle sostanze di derivazione dalla micotossina rimangono all'interno dei prodotti alimentari. Queste talvolta non sono rilevabili col metodo di analisi impiegato, eppure ci sono. Spesso i metodi di detossificazione sopra riportati, negli studi davano ottimi risultati sulla riduzione del contenuto di patulina, ma va tenuto conto che le molecole risultate di questa degradazione, potenzialmente potrebbero essere tossiche allo stesso livello, o a un livello maggiore della patulina.

6 CONCLUSIONI

La patulina rappresenta un problema molto importante per quanto riguarda l'industria delle mele, sia per quanto riguarda l'aspetto economico, determinato dagli scarti, sia per quanto riguarda la sicurezza del consumatore.

In questo lavoro si è partiti dalla descrizione del fungo che causa la maggior parte della produzione di patulina all'interno degli alimenti, *Penicillium expansum*. Con questa prima parte si è riusciti a comprendere le condizioni ideali in cui il fungo riesce a svilupparsi e i segni e i sintomi dati dalla muffa verde-azzurra delle pomacee. Questo è di fondamentale importanza in quanto, conoscendo l'ecologia microbica e le caratteristiche di sviluppo, si possono mettere in atto metodiche che limitano la proliferazione del fungo patogeno. Tali informazioni, in combinazione con la tecnologia, hanno permesso la messa a punto di sistemi innovativi di conservazione, che sono stati analizzati nel capitolo 4 sul controllo di *P. expansum* in post-raccolta. L'abbassamento della temperatura, l'uso della CA, i trattamenti termici, l'irradiazione, l'uso di composti chimici ecologici e dei BCA, sono tutti metodi che permettono in modo preventivo, con ottimi risultati, di evitare prodotti finiti con alte concentrazioni di patulina. Come già riportato l'uso sinergico di queste strategie consente lo sviluppo di una tecnologia ad ostacoli che porta a effetti ancora migliori sullo sviluppo di *P. expansum*. La trattazione dei fungicidi utilizzabili per il controllo della muffa verde-azzurra delle pomacee è stato volontariamente omesso in quanto le necessità odierne sono quelle di ridurre l'utilizzo di questi prodotti di sintesi a favore di tecniche alternative più ecosostenibili e sicure.

Dopo aver esaminato le caratteristiche della patulina nel capitolo 3, la sua stabilità, i metodi di rilevamento e quantificazione, i limiti di legge e i suoi effetti negativi, nel capitolo 5 si sono riportati una serie di metodi di decontaminazione e detossificazione che negli ultimi anni hanno dato risultati soddisfacenti. Come già riportato, la detossificazione della molecola con gran parte dei metodi fisici, biologici e chimici, tende a residuare nel prodotto alimentare molecole derivate dalla degradazione della patulina. Alcune di queste come E-ascladiolo, Z-ascladiolo e acido desossipatulिनico sono state isolate e analizzate dal punto di vista della sicurezza, ma molte altre potrebbero essere difficili da determinare dopo i trattamenti. In molti studi scientifici la detossificazione ha determinato riduzioni molto elevate della patulina, spesso anche oltre l'80%. Questo vuol dire che, a parte nel caso della tecnica dell'adsorbimento, gran parte della tossina ha subito modificazioni strutturali che non ne hanno consentito la rilevazione. Queste tecniche hanno necessità di ulteriori studi proprio per

individuare tutte le molecole di degradazione o gli addotti che si formano e testare la loro stabilità nel prodotto e la loro eventuale tossicità una volta ingeriti dai consumatori.

L'incognita sulle molecole risultanti dai trattamenti di detossificazione sono il motivo più importante per cui, fino ad ora, le tecniche di decontaminazione sono quelle da preferire. La decontaminazione si basa sull'asportazione della molecola tossica dal prodotto alimentare e non sulla sua modifica.

In conclusione si può ribadire l'importanza di ottenere alimenti partendo da prodotti con qualità elevata. Anche se nel caso dei succhi e delle puree di mela tale obiettivo è piuttosto difficile da ottenere, in quanto i frutti di qualità più elevata sono destinati alla vendita come prodotti freschi, l'adozione di tecniche di prevenzione durante la conservazione e di decontaminazione prima della trasformazione, garantiscono usualmente prodotti sicuri e con scarsi residui tossici.

BIBLIOGRAFIA

- Abbasi A., Babaali E., Berizi E.: Effect of radiation, heating, high pressure, and the commercial processing method on reduction and/or elimination of patulin in fruit and vegetable products: a systematic review, *Toxin Reviews* 2019.
- Abdelhai M. H., Awad F. N., Yang Q., Mahunu G. K., Godana E. A., Zhang H.: Enhancement the biocontrol efficacy of *Sporidiobolus pararoseus* Y16 against apple blue mold decay by glycine betaine and its mechanism. *Biological Control* 2019, 139:104079.
- Abu-Bakar N., Makahleh A., Saad B.: Vortex-assisted liquid–liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography for the determination of furfurals and patulin in fruit juices. *Talanta* 2014, 120:47-54.
- Acar J., Gokmen V., Taydas E. E.: The effects of processing technology on the patulin content of juice during commercial apple juice concentrate production. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A.* 1998, 207:328–331.
- Acar J., Gokmen V., Taydas, E. E.: The effects of processing technology on the patulin content of juice during commercial apple juice concentrate production. *Zeitschrift für lebensmittel-untersuchung und -forschung* 1998, 207(4):328–331.
- Akbari P., Braber S., Varasteh S., Alizadeh A., Garssen J., Fink-Gremmels J.: The intestinal barrier as an emerging target in the toxicological assessment of mycotoxins. *Arch. Toxicol.* 2017, 91:1007–1029.
- Ake M., Eba B., Malan A. K., Atindehou E.: Détermination de la Patuline dans le Jus de Fruits Commercialisés en Côte d’Ivoire. *Sci Aliment* 2001, 21:199–206.
- Akerstrand K., Molander A., Andersson A., Nilsson G.: Occurrence of moulds and mycotoxins in frozen blueberries. *Vår Föda* 1976, 28:197–200.
- Amiri A., Bompeix G.: Diversity and population dynamics of *Penicillium* spp. On apples in pre- and post-harvest environments: Consequences of decay development. *Plant Pathology* 2005, 54:74–81.
- Andersson A. E., Josefsson G, Nilsson G, Akerstrand K. 1977. Mögelsvampar och Patulin I Fukt Och Bär. *Vår Föda* 8:292–8.
- Arrarte E., Garmendia G., Rossini C., Wisniewski M., Vero S.: Volatile organic compounds produced by Antarctic strains of *Candida sake* play a role in the control of postharvest pathogens of apples. *Biological Control* 2017, 109:14–20.
- Assatarakul K., Churey J. J., Manns D. C., Worobo R. W.: Patulin reduction in apple juice from concentrate by UV radiation and comparison of kinetic degradation models between apple juice and apple cider. *Journal of food protection* 2012, 75 (4):717–724.
- Baert K., Devlieghere F., Amiri A., De Meulenaer B.: Evaluation of strategies for reducing patulin contamination of apple juice using a farm to fork risk assessment model. *Int. J. Food Microbiol.* 2012, 154:119–129.
- Baert K., Devlieghere F., Bo L., Debevere J., De Meulenaer B.: The effect of inoculum size on the growth of *Penicillium expansum* in apples. *Food Microbiology* 2008, 25(1):212–217.
- Barreira M. J., Alvito P. C., Almeida C. M. M.: Occurrence of patulin in apple- based-foods in Portugal. *Food Chemistry* 2010, 121(3):653–658.
- Bayraç C., Camızcı G.: Adsorptive removal of patulin from apple juice via sulfhydryl-terminated magnetic bead-based separation. *Journal of Hazardous Materials* 2019, 366:413–422.
- Beltrán E., Ibáñez M., Sancho J. V., Hernández F.: Determination of patulin in apple and derived products by UHPLC-MS/MS. Study of matrix effects with atmospheric pressure ionisation sources. *Food Chem.* 2014, 142:400–407.
- Berestets’kyi O. O., Synyts’kyi: Phytotoxic activity in different strains of *Penicillium urticae* banier. *Mikrobiol Zh* 1973, 35:349.
- Bisseur J., Permaul K., Odhav B.: Reduction of patulin during apple juice clarification. *J. Food Prot.* 2001, 64:1216–1219.
- Boussabeh M., Ben Salem I., Prola A., Guilbert A., Bacha H., Abid-Essefi S., Lemaire C.: Patulin Induces Apoptosis through ROS-Mediated Endoplasmic Reticulum Stress Pathway. *Toxicological Sciences* 2015, 144:328–337.
- Brackett R. E., Marth E. H.: Patulin in apple juice from roadside stands in Wisconsin. *J Food Prot* 1979 a, 42(11):862–3.
- Buchanan J. R., Sommer N. F., Fortlage R. J., Maxie E. C., Mitchell F. G., Hsieh D. P. H.: Patulin from *Penicillium expansum* in stone fruits and pears. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 1972, 99(3):262–5.
- Bullerman L. B., Olivigni F. J.: Mycotoxin producing potential of molds isolated from cheddar cheese. *J Food Sci* 1974, 39:1166–8.
- Burroughs L.: Stability of patulin to sulfur dioxide and to yeast fermentation. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1977, 60:100–103.
- Calvo J., Calvente V., de Orellano M. E., Benuzzi D., Sanz de Tosetti M. I.: Biological control of postharvest spoilage caused by *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* in apple by using the bacterium *Rahnella aquatilis*. *International Journal of Food Microbiology* 2007, 113(3):251-257.
- Cao B. H., Li, H., Tian S. P., Qin G. Z.: Boron improves the biocontrol activity of *Cryptococcus laurentii* against *Penicillium expansum* in jujube fruit. *Postharvest Biology and Technology* 2012, 68:16–21.
- Chang H., Moon K., Chung S., Choi J.: Control of internal browning and quality improvement of “Fuji” apples by stepwise increase of CO₂ level during controlled atmosphere storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2005, 85:883–888.

- Chen J., Li B., Qin G., Tian S. (2015b). Mechanism of H₂O₂-induced oxidative stress regulating viability and biocontrol ability of *Rhodotorula glutinis*. *International Journal of Food Microbiology* 2015b, 193:152–158.
- Chen Y., Peng H., Wang X., Li B., Long M., Tian S.: Biodegradation mechanisms of patulin in *Candida guilliermondii*: An iTRAQ-based proteomic analysis. *Toxins* 2017, 9(2):48.
- Cho M.S., Kim K., Seo E. et al.: Occurrence of patulin in various fruit juices from South Korea: an exposure assessment. *Food Sci Biotechnol* 2010, 19:1–5.
- Codex Alimentarius Commission (2003). Code of practice for the prevention and reduction of patulin contamination in apple juice and apple juice ingredients in other beverages. CAC/RCP 50-2003. Food and Agriculture Organization, Geneva.
- CODEX. Maximum Level for Patulin in Apple Juice and Apple Juice Ingredients and Other Beverages; Codex Alimentarius Commission, Ed.; 235; Codex Alimentarius Commission: Rome, Italy, 2003.
- Coelho A. R., Tachi M., Pagnocca F. C., Nobrega G. M., Hoffmann F. L., Harada K., et al.: Purification of *Candida guilliermondii* and *Pichia ohmeri* killer toxin as an active agent against *Penicillium expansum*. *Food Additives & Contaminants* 2009, 26(1):73–81.
- Coelho A., Celli M., Sataque Ono E., Hoffmann F., Pagnocca F., Garcia S., Sabino M., Harada K., Wosiacki G., Hirooka E.: Patulin biodegradation using *Pichia ohmeri* and *Saccharomyces cerevisiae*. *World Mycotoxin J.* 2008, 1:325–331.
- Cole R J, Jarvis B B, Schweikert M A, (Eds.), (2003). Handbook of secondary fungal metabolites, 3-volume set. Elsevier. Academy Press: San Diego, CA, USA.
- Collin, S., Bodart E., Badot C., Bouseta A., Nizeta S.: Identification of the main degradation products of patulin generated through heat detoxication treatments. *Journal of the institute of brewing* 2008, 114 (2):167–171.
- Copetti M. V., Iamanaka B. T., Pitt J. I., Taniwaki M. H.: Fungi and mycotoxins in cocoa: from farm to chocolate. *International Journal of Food Microbiol* 2014, 178:13–20.
- Corbett D.: Patulin—U.K. producers perspective In: Patulin technical symposium. February 18–19, 2003; Kissimmee, Fla. National Center for Food safety and Technology. Summit, Ill.
- Cordero-Bueso G., Mangieri N., Maghradze D., Foschino R., Valdetara F., Cantoral J. M., et al.: Wild grape-associated yeasts as promising biocontrol agents against *Vitis vinifera* fungal pathogens. *Frontiers in Microbiology* 2017, 8:2025.
- Cozzolino M. E., Distel J. S., García P. A., Mascotti M. L., Ayub M. J., Benazzi L. M., Di Masi S. N., Silva P. G.: Control of postharvest fungal pathogens in pome fruits by lipopeptides from a *Bacillus sp.* isolate SL-6. *Scientia Horticulturae* 2020, 261:108957.
- Čvek D., Markov K., Frece J., Dragičević T. L., Majica M., Delaš F.: Growth inhibition of *Aspergillus ochraceus* ZMPBF 318 and *Penicillium expansum* ZMPBF 565 by four essential oils. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju* 2010, 61:191–196.
- De Melo F. T., de Oliveira I. M., Greggio S., Dacosta J. C., Guecheva T. N., Saffi J., Henriques J. A. P., Rosa R. M.: DNA damage in organs of mice treated acutely with patulin, a known mycotoxin. *Food and Chemical Toxicology* 2012, 50:3548-3555.
- De Souza Sant'Ana A., Rosenthal A., de Massaguer P.R.: The fate of patulin in apple juice processing: A review. *Food Res. Int.* 2008, 41:441–453.
- Degen G. H., Partosch F., Munoz K., Gundert-Remy U.: Daily uptake of mycotoxins - TDI might not be protective for nursed infants. *Toxicol. Lett.* 2017, 277:69–75.
- Deligios M., Fraumene C., Abbondio M., Mannazzu I., Tanca A., Addis M. F., et al.: Draft genome sequence of *Rhodotorula mucilaginosa*, an emergent opportunistic pathogen. *Genome Announcements* 2015, 3(2):e00201–e00215.
- Demirci M., Arici M., Gumus T.: Presence of patulin in fruit and fruit juices produced in Turkey. *Ernaehrungs-Umschau* 2003, 50(7):262–3.
- Desmarchelier A., Mujahid C., Racault L., Lancova K.: Analysis of patulin in pear- and apple-based foodstuffs by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59:7659–7665
- Desmarchelier A., Mujahid C., Racault L., Perring L., Lancova K.: Analysis of patulin in pear- and apple-based foodstuffs by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59, 14, 7659–7665.
- Devaraj H.; Suseela R. E.; Devaraj N.: Patulin toxicosis in chicks. *Curr. Sci.* 1986, 55:998–999.
- Dong, Q., Mannas D. C., Feng G., Yue T., Churey J. J., Worobo R. W.: Reduction of patulin in apple cider by UV radiation. *Journal of food protection* 2010, 73(1):69–74.
- Drake S.R., Sanderson P.G., Neven L.G.: Response of apple and winter pear fruit quality to irradiation as a quarantine treatment. *J. Food Process. Preservation* 1999, 23:203–216.
- Drusch S., Kopka S., Kaeding J.: Stability of patulin in a juice-like aqueous model system in the presence of ascorbic acid. *Food Chem.* 2007, 100:192–197.
- Drusch S., Kopka S., Kaeding J.: Stability of patulin in a juice-like aqueous model system in the presence of ascorbic acid. *Food Chem.* 2007, 100:192–197.

- Duranova H., Kovacova V., Babosova R., Omelka R., Adamkovicova M., Grosskopf B., Capcarova M., Martiniakova M.: Sex-related variations in bone microstructure of rabbits intramuscularly exposed to patulin. *Acta Vet. Scand.* 2015, 57, 50.
- Errampalli D., Brubacher N. R., DeEll J. R.: Sensitivity of *Penicillium expansum* to diphenylamine and thiabendazole and postharvest control of blue mold with fludioxonil in 'McIntosh' apples. *Postharvest Biology and Technology* 2006, 39:101–107.
- Errampalli D.: *Penicillium expansum* (Blue Mold). *Postharvest decay: control strategies* 2014, p.189-231.
- Escoula L., Thomsen M., Bourdiol D., Pipy. B., Peuriere S., Roubinet, S.: Patulin immunotoxicology: Effect on phagocyte activation and the cellular and humoral immune system of mice and rabbits. *Int. J. Immunopharmacol.* 1988, 10:983–989.
- Etebarian H. R., Sholberg P. L., Eastwell K. C., Saylor R. J.: Biological control of apple blue mold with *Pseudomonas fluorescens*. *Canadian Journal of Microbiology* 2005, 51(7):591–598.
- Fallik E., Tuvia-Alkalai S., Feng X., Lurie S.: Ripening characterisation and decay development of stored apples after a short pre-storage hot water rinsing and brushing. *Innovative Food Sci. Emerg. Technol.* 2001, 2:127–132.
- Farhadia K., Malek R.: Dispersive liquid-liquid microextraction followed by HPLC-DAD as an efficient and sensitive technique for the determination of patulin from apple juice and concentrate samples. *Journal of the Chinese Chemical Society* 2011, 58:340-345.
- Foad M.A., Ayesh A.M., Swailem H.M.H.: Efficiency of gamma irradiation on patulin elimination produced by apple mycoflora. *Egypt. J. Food Sci.* 2002, 30:289–312.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations: FAOSTAT, 2020. 2020. Available online in: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>.
- Frank H.K., Orth R., Figge A.: Patulin in foods of plant origin. II. Several kinds of fruit and vegetables and fruit and vegetable products. *Z Lebensm Unters Forsch* 1977, 163:111–4.
- Fremy J. M., Castegnaro M. J., Gleizes E., DeMeo M., Laget M.: Procedures for destruction of patulin in laboratory wastes. *Food Addit. Contam.* 1995, 12:331–336.
- Frisvad J. C., Samson R. A.: Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Studies in Mycology* 2004, 49:1-174.
- Funes J.G., Gómez P. L., Resnik S. L., Alzamora S. M., et al.: Application of pulsed light to patulin reduction in McIlvaine buffer and apple products. *Food control* 2013, 30(2):405–410.
- Godana E. A., Yang Q., Wang K., Zhang H., Zhang X., Zhao L., Abdelhai M. H., Guillaume Legrand N. N.: Bio-control activity of *Pichia anomala* supplemented with chitosan against *Penicillium expansum* in postharvest grapes and its possible inhibition mechanism. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 2020, 124:109188.
- Gökmen V., Artık N., Acar J., Kahraman N., Poyrazoglu E.: Effects of various clarification treatments on patulin, phenolic compound and organic acid compositions of apple juice. *Eur. Food Res. Technol.* 2001, 213:194–199.
- Gómez-López V.M., Ragaert P., Debevere J., Devlieghere F.: Pulsed light for food decontamination: a review. *Trends Food Sci. Technol.* 2007, 18:464–473.
- Goncalves B. L., Coppa C. F. S. C., de Neeff D. V., Corassin C. H., Oliveira C. A. F.: Mycotoxins in fruits and fruit-based products: Occurrence and methods for decontamination. *Toxin Reviews* 2019, 38:263–272.
- Guo C., Han L., Guo M., Li M., Yu L., Yang Y.: Synthesis of triethylene tetramine-modified water-insoluble corn flour caged in magnetic chitosan resin and its adsorption application for removal of patulin from apple juice. *Journal of Food Science* 2020, 85(4):1371–1379.
- Hammami W., Al-Thani R., Fiori S., Al-Meer S., Atia F.A., Rabah D., Migheli Q., Jaoua S.: Patulin and patulin producing *Penicillium* spp. occurrence in apples and apple-based products including baby food. *J. Infect. Dev. Coun.* 2017, 11:343–349.
- Hao H., Zhou T., Koutchma T., Wu F., Warriner K.: High hydrostatic pressure assisted degradation of patulin in fruit and vegetable juice blends. *Food Control* 2016, 62:237–242.
- Harvey J. M., Smith Jr. W.L., Kaufman J.: Market diseases of stone fruits: cherries, peaches, nectarines, apricots, and plums. *USDA Handbook* 1972, 414:64.
- Harwig J., Blanchfield B. J., Scott P.M.: Patulin production by *Penicillium roqueforti* Thom from grape. *Can Inst Food Sci Technol J.* 1978, 11(3):149–51.
- Hatab S., Yue T., Mohamad O.: Reduction of patulin in aqueous solution by lactic acid bacteria. *Journal of Food Science* 2012a, 77(4):M238–M241.
- Hatab S., Yue T., Mohamad O.: Reduction of patulin in aqueous solution by lactic acid bacteria. *Journal of Food Science* 2012b, 77(4):M238–M241.
- Hatab S., Yue T., Mohamad, O.: Removal of patulin from apple juice using inactivated lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 2012b, 112(5):892–899.
- Hawar S., Vevers W., Kariab S., Ali B. K., Billington R., Beal J.: Biotransformation of patulin to hydroascladiol by *Lactobacillus plantarum*. *Food Control* 2013, 34:502–508.

- Hawar S., Vevers W., Kariieb S., Ali B.K., Billington R., Beal J.: Biotransformation of patulin to hydroascladiol by *Lactobacillus plantarum*. *Food Control* 2013, 34:502–508.
- He F., Zhao L., Zheng X., Abdelhai M. H., Boateng N. S., Zhang X., Zhang H.: Investigating the effect of methyl jasmonate on the biocontrol activity of *Meyerozyma guilliermondii* against blue mold decay of apples and the possible mechanisms involved. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 2020, 109:101454.
- Ianiri, G., Pinedo, C., Fratianni, A., Panfili, G., Castoria, R.: Patulin degradation by the biocontrol yeast *Sporobolomyces* sp. Is an inducible process. *Toxins* 2017, 9:61.
- IARC. Some Naturally Occurring and Synthetic Food Components, Furocoumarins and Ultraviolet Radiation. In *Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*; IARC: Lyon, France, 1986; pp. 83–98.
- Ikeura H., Somsak N., Kobayashi F., Kanlayanarat S., Hayata Y.: Application of selected plant extracts to inhibit growth of *Penicillium expansum* on apple fruits. *Plant Pathol. J.* 2011, 10:79–84.
- Ioi J. D., Zhou T., Tsao R., Marccone M. F.: Mitigation of Patulin in Fresh and Processed Foods and Beverages. *Toxins* 2017, 9:157.
- Ippolito A., Nigro F.: Impact of preharvest application of biological control agents on postharvest diseases of fresh fruits and vegetables. *Crop Protection* 2000, 19:715–723.
- Ippolito A., Schena L., Pentimone I., Nigro F.: Control of postharvest rots of sweet cherries by pre- and post-harvest applications of *Aureobasidium pullulans* in combination with calcium chloride or sodium bicarbonate. *Postharvest Biology and Technology* 2005, 36(3):245–252.
- Iyengar M.R.S., Starky R. L.: Synergism and antagonism of auxin by antibiotics. *Science* 1953, 118:357.
- Jackson L. S., Beacham-Bowden T., Keller S. E., Adhikai C., Taylor K. T., Chirtel S. J., et al.: Apple quality, storage and washing treatments affect patulin levels in apple cider. *Journal of Food Protection* 2003, 66:618–624.
- Jackson L.S., et al.: Apple quality, storage, and washing treatments affect patulin levels in apple cider. *Journal of food protection* 2003, 66(4):618–624.
- Janotová L., Cížková H., Pivonka J., Voldrich M.: Effect of processing of apple puree on patulin content. *Food Control* 2011, 22:977–981.
- Jelinek F. F., Pohland A. E., Wood G. E.: Review of mycotoxin contamination. worldwide occurrence of mycotoxins in foods and feeds: an update. *J. AOAC* 1989, 72:223–30.
- Jimenez M., Mateo R., Querol A., Huerta T., Hernandez E.: Mycotoxins and mycotoxigenic moulds in nuts and sunflower seeds for human consumption. *Mycopathologia* 1991, 115:121–7.
- Judet-Correia D., Bollaert S., Duquenne A., Charpentier C., Bensoussan M., Dantigny P.: Validation of a predictive model for the growth of *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* on grape berries. *International Journal of Food Microbiology* 2010, 142:106-113.
- Kadalkal C., Nas S.: Effect of heat treatment and evaporation on patulin and some other properties of apple juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2003, 83(9):987–990.
- Kadalkal C., Sebahattin N., Poyrazog ̇lu E. S.: Effect of commercial processing stages of apple juice on patulin, fumaric acid and hydroxymethylfurfural (HMF) levels. *J. Food Qual.* 2002, 25:359–368.
- Karaca H., Sedat Velioglu Y.: Effects of some metal sand chelating agents on patulin degradation by ozone. *Ozone Sci. Eng.* 2009, 31:224–231.
- Karakose A., Sanli S., Sanli N., Bulduk I.: Evaluation of patulin in commercial baby foods by solid phase extraction and liquid chromatography PDA detection. *Czech J Food Sci* 2015, 33:52–57
- Kataoka H., Itano M., Ishizaki A., Saito K.: Determination of patulin in fruit juice and dried fruit samples by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2009, 1216:3746–3750.
- Koçkaya A. E., Selmanoglu G., Özsoy N., Gül N.: Evaluation of patulin toxicity in the thymus of growing male rats. *Arh Hig Rada Toksikol* 2009, 60:411-418.
- Kopecka M., Gabriel M., Takeo K., Yamaguchi M., Svoboda A., Hata K.: Analysis of microtubules and F-actin structures in hyphae and conidia development of the opportunistic human pathogenic black yeast *Aureobasidium pullulans*. *Microbiology* 2003, 149:865–876.
- Korzybski T, Kowszyk-Gindifier Z, Kurylowicz S. 1967. Antibiotics origin, nature, and properties Vol. II. New York: Pergamon Press. p 1223–30.
- Kubacki, S. The analysis and occurrence of patulin in apple juice. In *Proceedings of the 6th International IUPAC Symposium on Mycotoxins Phycotoxins*, Pretoria, South Africa, 22–25 July 1986; pp. 293–304. 88.
- Kwon J. H., Jeong S. G., Hong S. B., Chae Y. S., Park, C.S.: Occurrence of blue mold on sweet persimmon (*Diospyros kaki*) caused by *Penicillium expansum*. *Res. Plant Dis.* 2006, 12:290–293.
- Kwon J.H., Jeong S.G., Hong S.B., Chae Y.S., Park C.S.: Occurrence of blue mold on sweet persimmon (*Diospyros kaki*) caused by *Penicillium expansum*. *Res. Plant Dis.* 2006, 12:290–293.

- Lahlali R., Massart S., De Clercq D., Serrhini M. N., Creemers P., Jijakli M. H.: Assessment of *Pichia anomala* (strain K) efficacy against blue mould of apples when applied pre- or post-harvest under laboratory conditions and in orchard trials. *European Journal of Plant Pathology* 2009, 123:37–45.
- Lahlali R., Seehini M.N., Jikakil M.H.: Studying and modelling the combined effect of temperature and water activity on the growth rate of *Penicillium expansum*. *Int. J. Food Microbiol.* 2005, 103:315–322.
- Lan L., Xu J.: Multiple gene genealogical analyses suggest divergence and recent clonal dispersal in the opportunistic human pathogen *Candida guilliermondii*. *Microbiology* 2006, 152:1539–1549.
- Leblanc J. C., Tard A., Volatier J. L., Verger P.: Estimated Dietary Exposure to Principal Food Mycotoxins from the First French Total Diet Study 2005, 22:652–672.
- Lee T. P., Sakai R., Manaf N. A., Rodhi A. M., Saad B.: High performance liquid chromatography method for the determination of patulin and 5-hydroxymethylfurfural in fruit juices marketed in Malaysia. *Food Control* 2015, 38:142-149.
- Leggott N. L., Shephard G. S.: Patulin in South African commercial apple products. *Food Control* 2001,12:73–6
- Li B., Chen Y., Zong Y., Shang Y., Zhang Z., Wang X., Long M., Tian S.: Dissection of patulin biosynthesis, spatial control and regulation mechanism in *Penicillium expansum*. *Environmental Microbiology* 2019, 21:124–1139.
- Li C., Zhang H., Yang Q., Komla M. G., Zhang X., Zhu S.: Ascorbic acid enhances oxidative stress tolerance and biological control efficacy of *Pichia caribbica* against postharvest blue mold decay of apples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2014a, 62(30):7612–7621.
- Li M., Chen W., Zhang Z., Zhang Z., Peng, B.: Fermentative degradation of patulin by *Saccharomyces cerevisiae* in aqueous solution. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie* 2018, 97:427–433.
- Li X., Tang H., Yang C., Meng X., Liu B.: Detoxification of mycotoxin patulin by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*. *Food Control* 2019, 96:47-52.
- Lima G., Castoria R., De Curtis F., Raiola A., Ritieni A., De Cicco V.: Integrated control of blue mould using new fungicides and biocontrol yeasts lowers levels of fungicide residues and patulin contamination in apples. *Postharvest Biology and Technology* 2011, 60(2):164–172.
- Liu J., Wisniewski M., Droby S., Vero S., Tian S., Hershkovitz V.: Glycine betaine improves oxidative stress tolerance and biocontrol efficacy of the antagonistic yeast *Cystoflobasidium infirmominatum*. *International Journal of Food Microbiology* 2011, 146(1):76–83.
- Liu M., Wang J., Wang X., Zhu W., Yao X., Su L., Sun J., Yue T., Wang, J.: Highly efficient and cost-effective removal of patulin from apple juice by surface engineering of diatomite with sulfur-functionalized graphene oxide. *Food Chemistry* 2019, 300, 125111.
- Liu M., Wang J., Yang Q., Hu N., Zhang W., Zhu W., Wang R., Suo Y., Wang J.: Patulin removal from apple juice using a novel cysteine-functionalized metal-organic framework adsorbent. *Food Chemistry* 2019, 270:1–9.
- Lopez-Diaz T. M., Flannigan B.: Production of patulin and cytochalasin E by *Aspergillus clavatus* during malting of barley and wheat. *Int J Food Microbiol* 1997, 35:129–36.
- Lovett J., Boutin B., Thompson R. G.: Patulin production in cherry by *Penicillium* and *Aspergillus* species. *J. Milk Food Technol.* 1974, 37:530.
- Lovett J., Peeler J.: Effect of pH on the thermal destruction kinetics of patulin in aqueous solution. *J. Food Sci.* 1973, 38:1094–1095.
- Lovett J., Thompson R., Boutin B.: Patulin production in apples stored in a controlled atmosphere. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1975, 58:912–914.
- Lugauskas A., Repečkienė J., Novošinskas H.: Micromycetes, producers of toxins, detected on stored vegetables. *Ann. Agri. Environ. Med.* 2005, 12:253–260.
- Lugauskas A., Repečkienė J., Novošinskas H.: Micromycetes, producers of toxins, detected on stored vegetables. *Ann. Agri. Environ. Med.* 2005, 12:253–260.
- Luo X. J., Peng J., Li Y. J.: Recent advances in the study on capsaicinoids and capsinoids. *Eur. J. Pharmacol.* 2011, 650:1–7.
- Lurie S., Fallik E., Klein J.D., Kozar F., Kovacs K.: Postharvest heat treatment of apples to control San Jose scale (*Quadraspidiotus perniciosus* Comstock) and blue mold (*Penicillium expansum* Link) and maintain fruit firmness. *J. Am. Soc. Horticultural Sci.* 1998, 123:110–114.
- Lutz M. C., Lopes C. A., Rodriguez M. E., Sosa M. C., Sangorin M. P.: Efficacy and putative mode of action of native and commercial antagonistic yeasts against postharvest pathogens of pear. *International Journal of Food Microbiology* 2013, 164(2–3):166–172.
- Luz C., Saladino R., Luciano F. B., Manes J., Meca G.: In vitro antifungal activity of bioactive peptides produced by *Lactobacillus plantarum* against *Aspergillus parasiticus* and *Penicillium expansum*. *Lwt - Food Science and Technology* 2017, 81:128–135.
- MacDonald S., Long M., JOHN Gilbert J.: Liquid chromatographic method for determination of patulin in clear and cloudy apple juices and apple puree: collaborative study. *Journal of AOAC International* VOL. 83, NO. 6, 2000.

- Mahunu G. K., Zhang H. Y., Yang Q. Y., Zhang X. Y., Li D. D., Zhou Y. X.: Improving the biocontrol efficacy of *Pichia caribbica* with phytic acid against post-harvest blue mold and natural decay in apples. *Biological Control* 2016, 92:172–180.
- Manso T., Nunes C.: *Metschnikowia andauensis* as a new biocontrol agent of fruit postharvest diseases. *Postharvest Biology and Technology* 2011, 61(1):64–71.
- Marsol-Vall A., Delpino-Rius A., Eras J., Balcells M., Canela-Garayoa R.: A fast and reliable UHPLC-PDA method for determination of patulin in apple food products using QuEChERS extraction. *Food Analytical Methods* 2014, 7:465–471.
- McCallum J. L., Tsao R., Zhou T.: Factors affecting patulin production by *Penicillium expansum*. *Journal of Food Protection* 2002, 65:1937–1942.
- McKenzie K. S., Sarr A. B., Mayura K., Bailey R. H., Miller D. R.; Rogers T. D.; Norred W. P., Voss K.A., Plattner R.D., Kubena L.F., et al.: Oxidative degradation and detoxification of mycotoxins using a novel source of ozone. *Food Chem. Toxicol.* 1997, 35:807–820.
- McKinley E. R., Carlton W. W., Boon G. D.: Patulin mycotoxicosis in the rat: toxicology, pathology and clinical pathology. *Food Chem. Toxicol.* 1982, 20:289–300.
- Moake M. M., Padilla-Zakour O. I., Worobo R. W.: Comprehensive review of patulin control methods in foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2005, 4:8–21.
- Mohammadifar M., Norabadi M. T., Hasanzadeh M., Dashtipoor S., Etebarian H. R., Sahebani N.: Study of antifungal activities of seven essential oils from some Iranian medicinal plants against various postharvest phytopathogenic fungi. *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* 2012, 45:2046–2056.
- Morales H., Barros G., Marín S., Chulze S., Ramos A. J., Sanchis V.: Effects of apple and pear varieties and pH on patulin accumulation by *Penicillium expansum*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2008, 88:2738–2743.
- Morales H., Marín S., Centelles X., Ramos A. J., Sanchis V.: Cold and ambient deck storage prior to processing as a critical point for patulin accumulation. *International Journal of Food Microbiology* 2007, 116:260–265.
- Morales H., Marín S., Ramos A. J., Sanchis V.: Influence of post-harvest technologies applied during cold storage of apples in *Penicillium expansum* growth and patulin accumulation: A review. *Food Control* 2010, 21:953–962."
- Morales H., Sanchis V., Coromines J., Ramos A. J., Marín S.: Inoculum size and intraspecific interactions affects *Penicillium expansum* growth and patulin accumulation in apples. *Food Microbiology* 2008, 25:378–385.
- Moss M.O., Long, M.T.: Fate of patulin in the presence of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Addit. Contam.* 2002, 19:387–399.
- Mostafavi H. A., Mirmajlessi S. M., Fathollahi H., Shahbazi S., Mirjalili S. M. : Integrated effect of gamma radiation and biocontrol agent on quality parameters of apple fruit: An innovative commercial preservation method. *Radiation Physics and Chemistry* 2013, 91:193–199.
- Mostafavi H.A., Mirmajlessi S.M., Mirjalili S.M., Fathollahi H., Askari H.: Gamma radiation effects on physico-chemical parameters of apple fruit during commercial post-harvest preservation. *Radiat. Physics. Chem.* 2012, 81:666–671.
- Murillo-Arbizu M., Amézqueta S., González-Peñas E., de Cerain A. L.: Occurrence of patulin and its dietary intake through apple juice consumption by the Spanish population. *Food Chemistry* 2009, 113:420–423.
- Nadai C., Lemos W. J. F., Favaron F., Giacomini A., Corich V.: Biocontrol activity of *Starmerella bacillaris* yeast against blue mold disease on apple fruit and its effect on cider fermentation. *PloS One* 2018, 13(9):e0204350.
- Naets M., van Dael M., Vanstreels E., Daelemans D., Verboven P., Nicolai B., Keulemans W., Geeraerd A.: To disinfect or not to disinfect in postharvest research on the fungal decay of apple? *International Journal of Food Microbiol* 2018, 266:190–199.
- Norstadt F. A., McCalla T. M.: Phytotoxic substance from a species of *Penicillium*. *Science* 1963, 140:410–1.
- OMS: Micotoxins 2018, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mycotoxins>
- Oswald I. P., Comera C. Immunotoxicity of mycotoxins. *Rev. Med. Vet.* 1998, 149:585–590.
- Pal S., Singh N., Ansari K.M.: Toxicological effects of patulin mycotoxin on the mammalian system: an overview. *Toxicol. Res. (Camb)* 2017, 6:764–771.
- Paster N., Huppert D., Barkai-Golan R.: Production of patulin by different strains of *Penicillium expansum* in pear and apple cultivars stored at different temperatures and modified atmospheres. *Food Addit. Contam.* 1995, 12:51–58.
- Patriarca A.: Fungi and mycotoxin problems in the apple industry. *Current Opinion in Food Science* 2019, 29:42–47.
- Paucod J. C., Krivobok S., Vidal D.: Immunotoxicity testing of mycotoxins T-2 and patulin on Balb/c mice. *Acta Microbiol. Hung.* 1990, 37:331–339.
- Peng X., Liu B., Chen W., Li X., Wang Q., Meng X., Wang D.: Effective biosorption of patulin from apple juice by cross-linked xanthated chitosan resin. *Food Control* 2016, 63:140–146.
- Pereira L., Cunha A., Almeida-Aguiar C.: Portuguese propolis from Caramulo as a biocontrol agent of the apple blue mold. *Food Control* 2022, 139:109071.
- Piemontese L., Solfrizzo M., Visconti A.: Occurrence of patulin in conventional and organic fruit products in Italy and subsequent exposure assessment. *Food Addit. Contam.* 2005, 22:437–442.

- Pierson C. F., Ceponis M. J., McColloch L. P.: Market diseases of apples, pears, and quinces. *Agric Handbook* 1971, 376:14–6.
- Pinedo C., Wright S., Collado I. G., Goss R., Castoria R., Hrelia P., Maffei F., Duran- Patron R.: Isotopic labeling studies reveal the patulin detoxification pathway by the biocontrol yeast *Rhodotorula kratochvilovae* LS11. *Journal of Natural Products* 2018, 81(12):2692–2699.
- Pitt J. I., Hocking A. D. (Eds.). (1997). *Fungi and food spoilage*. London: Blackie Academic and Professional.
- Pittet A.: Natural occurrence of mycotoxins in foods and feed: an updated review. In: Bars JL, Galtier P, editors. *Mycotox 98. Mycotoxin in Food Chain. Processing and Toxicological Aspects*. Toulouse, France: Revue de Medecine Veterinaire 1998, p 479–92.
- Pohland A., Allen R.: Stability studies with patulin. *J. AOAC* 1970, 53:688–691.
- Prieta J., Moreno M. A., Diaz S., Suarez G., Dominguez L.: Survey of patulin in apple juice and children's apple food by diphasic dialysis membrane procedure. *J Agric Food Chem* 1994, 42:1701–3.
- Puel O., Galtier P., Oswald I. P.: Biosynthesis and toxicological effects of patulin. *Toxins* 2010, 2:613-31.
- Qiu Y., Zhang Y., Wei J., Gu Y., Yue T., Yuan Y.: Thiol-functionalized inactivated yeast embedded in agar aerogel for highly efficient adsorption of patulin in apple juice. *Journal of Hazardous Materials* 2020, 388:121802.
- Raiola A., Meca G., Garcia-Llatas G., Ritieni A.: Study of thermal resistance and in vitro bioaccessibility of patulin from artificially contaminated apple products. *Food and chemical toxicology* 2012, 50 (9):3068–3072.
- Raistrick J., Birkinshaw J. H., Bracken A., Michael S. E., Hopkins W. A., Gye W. E.: Patulin in the common cold, collaborative research on a derivative of *Penicillium patulum* Banier. *Lancet* 1943, 245:625.
- Reddy K.R., Spadaro D., Gullino M.L., Garibaldi, A.: Potential of two *Metschnikowia pulcherrima* (yeast) strains for in vitro biodegradation of patulin. *J. Food Prot.* 2011, 74:154–156.
- Reiss J.: Prevention of the formation of mycotoxins in whole wheat bread by citric acid and lactic acid (mycotoxins in foodstuffs IX). *Experientia* 1976, 32(2):168–9.
- Ritieni A.: Patulin in Italian commercial apple products. *J Agric Food Chem* 2003, 51:6086–90.
- Robert H., Payros D., Pinton P., Theodorou V., Mercier-Bonin M., Oswald I. P.: Impact of mycotoxins on the intestine: are mucus and microbiota new targets? *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 2017, 20:249–275.
- Rodríguez-Bencomo J. J., Sanchis V., Viñas I., Martín-Belloso O., Soliva-Fortuny R.: Formation of patulin-glutathione conjugates induced by pulsed light: A tentative strategy for patulin degradation in apple juices. *Food Chemistry* 2020, 315:126283.
- Root W.H., Barrett D.M.: Apples and apple processing. In *Processing Fruits*; Barrett, D.M., Somogyi, L., Ramaswamy, H., Eds.; CRC Press: Danvers, MA, USA, 2005; pp. 455–479.
- Rosenberger D.A., 1990. Blue mold. In: Jones, A.L., Aldwinckle, H.S. (Eds.), *Compendium of Apple and Pear Diseases*. American Phytopathological Society Press, St Paul, MN, pp. 54–55.
- Rosenberger D.A., Engle C.A., Meyer F.W., Watkins C.B., 2006: *Penicillium expansum* invades apples through stems during controlled atmosphere storage [Online]. Available at: <http://www.plantmanagementnetwork.org/sub/php/research/2006/storage/>.
- Ruiz-Moyano S., Martin A., Villalobos M. C., Calle A., Serradilla M. J., Cordoba M. G., et al.: Yeasts isolated from figs (*Ficus carica* L.) as biocontrol agents of post-harvest fruit diseases. *Food Microbiology* 2016, 57:45–53.
- Russo P., Fares C., Longo A., Spano G., Capozzi V.: *Lactobacillus plantarum* with broad antifungal activity as a protective starter culture for bread production. *Foods* 2017, 6(12):110.
- Rychlik M., Schieberle P.: Model studies on the diffusion behavior of the mycotoxin patulin in apples, tomatoes, and wheat bread. *Eur. Food Res. Technol.* 2001, 212:274–278.
- Rychlik M., Schieberle P.: Quantification of the mycotoxin patulin by a stable isotope dilution assay. *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47:3749–3755.
- Sadok I., Szmagara A., Staniszewska M. M.: The validated and sensitive HPLC-DAD method for determination of patulin in strawberries. *Food Chemistry* 2018, 245:364-370.
- Sajid M., Mehmood S., Niu C., Yuan Y., Yue T.: Effective adsorption of patulin from apple juice by using non-cytotoxic heat-inactivated cells and spores of *Alicyclobacillus* strains. *Toxins* 2019, 10(9):344.
- Saleh I., Goktepe I.: The characteristics, occurrence, and toxicological effects of patulin. *Food and Chemical Toxicology* 2019, 129:301–311.
- Sands D.C., McIntyre J.L., Walton G.S.: Use of activated charcoal for the removal of patulin from cider. *Appl. Environ. Microbiol.* 1976, 32:388–391.
- Sargenti S. R., Almeida C. A. A.: Determination of patulin in apple juice by HPLC using a simple and fast sample preparation method. *Ecl. Quím., São Paulo* 2010, 35-2:14-21.
- Saxena N., Ansari K. M., Kumar R., Dhawan A., Dwivedi P. D., Das M.: Patulin causes DNA damage leading to cell cycle arrest and apoptosis through modulation of Bax, p53 and p21/WAF1 proteins in skin of mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2009, 234:192–201.

- Schebb N. H., Faber H., Maul R., Heus F., Kool J., Irth H., Karst, U.: Analysis of glutathione adducts of patulin by means of liquid chromatography (HPLC) with biochemical detection (BCD) and electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2019, 394:1361–1373.
- Scott P., Somers E.: Stability of patulin and penicillic acid in fruit juices and flour. *J. Agric. Food Chem.* 1968, 16:483–485.
- Seo M., Kim B., Baek S. Y.: An optimized method for the accurate determination of patulin in apple products by isotope dilution-liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2015, 407:5433–5442.
- Singh Y. P., Geeta S.: Efficacy of leaf extracts and essential oils of some plant species against *Penicillium expansum* rot of apples. *Ann. Plant Prot. Sci.* 2007, 15:135–139.
- Sitton J. W., Patterson M. E.: Effect of high carbon dioxide and low oxygen controlled atmospheres on postharvest decay of apples. *Plant Disease* 1992, 76:992–995.
- Soler L., Oswald I. P.: The importance of accounting for sex in the search of proteomic signatures of mycotoxin exposure. *J. Proteomics* 2018, 178:114–122.
- Sommer N. F., Buchanan J. R., Fortlage R. J.: Production of patulin by *Penicillium expansum*. *Appl. Microbiol.* 1974, 28:589–93.
- Song E., Xia X., Su C., Dong W., Xian Y., Wang W., Song Y.: Hepatotoxicity and genotoxicity of patulin in mice, and its modulation by green tea polyphenols administration. *Food and Chemical Toxicology* 2014, 71:122–127.
- Sorenson W. G., Gerberick G. F., Lewis D. M., Castranova V.: Toxicity of mycotoxins for the rat pulmonary macrophage in vitro. *Env. Health Persp.* 1986, 66:45–53.
- Spadaro D., Garibaldi A., Gullino M. L.: Occurrence of patulin and its dietary intake through pear, peach, and apricot juices in Italy. *Food Addit Contam Part B Surveill* 2008, 1:134–139.
- Spotts R. A., Sanderson P. C., Lennox C. L., Sugar C., Cervantes L. A.: Wounding, wound healing and staining of mature pear fruit. *Postharvest Biology and Technology* 1998, 13:27–36.
- Stansfield J. M., Francis A. E., Stuart-Harris C. H.: Laboratory and clinical trials of patulin. *Lancet* 1944, ii:370.
- Sui Y., Liu J., Wisniewski M., Droby S., Norelli J., Hershkovitz V.: Pretreatment of the yeast antagonist, *Candida oleophila*, with glycine betaine increases oxidative stress tolerance in the microenvironment of apple wounds. *International Journal of Food Microbiology* 2012, 157(1):45–51.
- Sun C., Lin M., Fu D., Yang J., Huang Y., Zheng X., et al.: Yeast cell wall induces disease resistance against *Penicillium expansum* in pear fruit and the possible mechanisms involved. *Food Chemistry* 2018, 241:301–307.
- Sun J. D., Guo W., Ji J., Li Z. J., Yuan X., Pi F. W., Zhang Y. Z., Sun, X. L.: Removal of patulin in apple juice based on novel magnetic molecularly imprinted adsorbent Fe₃O₄@SiO₂@CS-GO@MIP. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie* 2020, 118:108854.
- Sydenham E. W., Vismer H. F., Marasas W. F. O., Brown N. L., Schlechter M., Rheeder J. P.: Influence of deck storage and initial processing on patulin levels in apple juice. *Food Additives and Contaminants* 1997, 14:429–434.
- Sydenham E. W., et al.: Reduction of patulin in apple juice samples - influence of initial processing. *Food control* 1995, 6(4):195–200.
- Tabatabaie F., Mortazavi S. A., Tabatabaie F., Ebadi A. G.: Reduction of patulin in apple juice after treatment with SO₂ and heat. *Indian journal of science and technology* 2010, 3:596–597.
- Tang H., Li X., Zhang F., Meng X., Liu B.: Biodegradation of the mycotoxin patulin in apple juice by Orotate phosphoribosyltransferase from *Rhodotorula mucilaginosa*. *Food Control* 2019, 100:158–164.
- Tang H., Peng X., Li X., Meng X., Liu B.: Biodegradation of mycotoxin patulin in apple juice by calcium carbonate immobilized porcine pancreatic lipase. *Food Control* 2018, 88:69–74.
- Taniwaki M., Hoenderboom C., De Almeida Vitali A., Firoa, M.: Migration of patulin in apples. *J. Food Prot.* 1992, 55:902–904.
- Tannous J., Atoui A., El Khoury A., Francis Z., Oswald I. P., Puel O., Lteif R.: A study on the physicochemical parameters for *Penicillium expansum* growth and patulin production: effect of temperature, pH, and water activity. *Food Science & Nutrition* 2015, 4: 211–222.
- Tannous J., Keller N. P., Atoui A., El Khoury A., Lteif R., Oswald I.P., Puel O.: Secondary metabolism in *Penicillium expansum*: Emphasis on recent advances in patulin research. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2017, 58:2082–2098.
- Tikekar R. V., Anantheswaran R. C., LaBorde L. F.: Patulin degradation in a model apple juice system and in apple juice during ultraviolet processing. *J. Food Process. Preserv.* 2014, 38:924–934.
- Torres R., Teixido N., Vinas I., Mari M., Casalini L., Giraud M., et al.: Efficacy of *Candida sake* CPA-1 formulation for controlling *Penicillium expansum* decay on pome fruit from different Mediterranean regions. *Journal of Food Protection* 2006, 69:2703–2711.
- Trias R., Baneras L., Montesinos E., Badosa E.: Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi. *International Microbiology* 2008, 11:231–236.
- Ulevičius V., Pečiulyte D., Plauškaite K., Špirkauskaitė N.: Resistance of airborne fungal propagules to ultraviolet irradiation: Laboratory study. *Lithuanian J. Physics* 2008, 48:265–273.

- Vaclavikova M., Dzuman Z., Lacina O., Fenclova M., Veprikova Z., Zachariasova M., Hajslova J.: Monitoring survey of patulin in a variety of fruit-based products using a sensitive UHPLC–MS/MS analytical procedure. *Food Control* 2015, 47:577–584.
- Venturini M.E., Blanco D., Oria R.: In vitro antifungal activity of several antimicrobial compounds against *Penicillium expansum*. *J. Food Prot.* 2002, 65:834–839.
- Wallace R. L., Hirkala D. L., Nelson L. M.: Postharvest biological control of blue mold of apple by *Pseudomonas fluorescens* during commercial storage and potential modes of action. *Postharvest Biology and Technology* 2017, 133:1–11.
- Wang L., Wang Z. L., Yuan Y. H., Cai R., Niu C., Yue T. L.: Identification of key factors involved in the biosorption of patulin by inactivated lactic acid bacteria (LAB) cells. *PLoS One* 2015a, 10.
- Wang L., Yue T. L., Yuan Y. H., Wang Z. L., Ye M. Q., Cal, R.: A new insight into the adsorption mechanism of patulin by the heat-inactive lactic acid bacteria cells. *Food Control* 2015b, 50:104–110.
- Wang Y., Yuan Y., Liu B., Zhang Z., Yue T.: Biocontrol activity and patulin-removal effects of *Bacillus subtilis*, *Rhodobacter sphaeroides* and *Agrobacterium tumefaciens* against *Penicillium expansum*. *Journal of Applied Microbiology* 2016, 121:1384–1393.
- Welke J. E., Hoeltz M., Dottori, H. A., Noll I.B.: Effect of processing stages of apple juice concentrate on patulin levels. *Food Control* 2009, 20:48–52.
- Wheeler J. L., Harrison M. A., Koehler P.E.: Presence and stability of patulin in pasteurized apple cider. *J. Food Sci.* 1987, 52:479–780.
- Woller R., Majerus P.: Patulin in obsterzeugnissen-egenschaften, bildung und vorkommen. *Flussiges Obst* 1982, 49:564–570.
- Wu T. S., Liao Y. C., Yu F. Y., Chang C. H., Liu B. H.: Mechanism of patulin-induced apoptosis in human leukemia cells (HL-60). *Toxicol. Lett.* 2008, 183:105–111.
- Xiao Y., Liu B., Wang Z., Han C., Meng X., Zhang F.: Effective degradation of the mycotoxin patulin in pear juice by porcine pancreatic lipase. *Food and Chemical Toxicology* 2019, 133:110769.
- Xing M., Chen Y., Li B., Tian S.: Characterization of a short-chain dehydrogenase/reductase and its function in patulin biodegradation in apple juice. *Food Chemistry* 2021, 348:129046.
- Yang Q., Zhang H., Zhang X., Zheng X., Qian J.: Phytic acid enhances biocontrol activity of *Rhodotorula mucilaginosa* against *Penicillium expansum* contamination and patulin production in apples. *Food Microbiology* 2015, 6:1296.
- Yao C., Conway W.S., Ren R., Smith D., Ross G.S., Sams C.E.: Gene encoding polygalacturonase inhibitor in apple fruit is developmentally regulated and activated by wounding and fungal infection. *Plant Mol. Biol.* 1999, 39:1231–1241.
- Yazici, S., Velioglu, Y. S.: Effect of thiamine hydrochloride, pyridoxine hydrochloride and calcium-D-pantothenate on the patulin content of apple juice concentrate. *Nahrung/Food* 2002, 46:256–257.
- Yiantzi E., Psillakis E., Tyrovola K., Kalogerakis N.: Vortex-assisted liquid–liquid microextraction of octylphenol, nonylphenol and bisphenol-A. *Talanta* 2010, 80:2057–2062.
- Yu C., Zhou T., Sheng K., Zeng L., Ye C., Yu T., et al: Effect of pyrimethanil on *Cryptococcus laurentii*, *Rhodospodium paludigenum*, and *Rhodotorula glutinis* biocontrol of *Penicillium expansum* infection in pear fruit. *International Journal of Food Microbiology* 2013, 164:155–160.
- Yu L., Qiao N., Zhao J., Zhang H., Tian F., Zhai Q., Chen W.: Postharvest control of *Penicillium expansum* in fruits: A review. *Food Bioscience* 2020, 36:100633.
- Yuan Y., Wang X., Hatab S., Wang Z., Wang Y., Luo Y., Yue T.: Patulin reduction in apple juice by inactivated *Alicyclobacillus* spp. *Letters in Applied Microbiology* 2014, 59(6):604–609.
- Yuan Y., Zhuang H., Zhang T., Liu J.: Patulin content in apple products marketed in Northeast China. *Food Control* 2010, 21:1488–1491.
- Zhang D. P., Spadaro D., Garibaldi A., Gullino M. L.: Efficacy of the antagonist *Aureobasidium pullulans* PL5 against postharvest pathogens of peach, apple and plum and its modes of action. *Biological Control* 2010, 54(3):172–180.
- Zhao G., Yang X., Nisar T., Tian Y., Sun L., Zhang X., Guo, Y.: Patulin biodegradation and quality improvement of apple puree fermented with *Byssoschlamys nivea* FF1-2. *Food Bioscience* 2018, 21:45–52.
- Zhao Y., Li Y., Yin J.: Effects of hot air treatment in combination with *Pichia guilliermondii* on postharvest preservation of peach fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2019, 99(2):647–655.
- Zheng X., Li Y., Zhang H., Apaliya M. T., Zhang X., Zhao L., Jiang Z., Yang Q., Gu X.: Identification and toxicological analysis of products of patulin degradation by *Pichia caribbica*. *Biological Control* 2018, 123:127–136.
- Zheng X., Wei W., Rao S., Gao L., Li H., Yang Z.: Degradation of patulin in fruit juice by a lactic acid bacteria strain *Lactobacillus casei* YZU01. *Food Control* 2020, 112:107147.
- Zheng X., Yang Q., Zhang H., Cao J., Zhang X., Apaliya M.: The possible mechanisms involved in degradation of patulin by *Pichia caribbica*. *Toxins* 2016, 8(10):289.
- Zheng X., Yang Q., Zhang X., Apaliya M. T., Ianiri G., Zhang H., et al.: Biocontrol agents increase the specific rate of patulin production by *Penicillium expansum* but decrease the disease and total patulin contamination of apples. *Frontiers in Microbiology* 2017, 8:1240.

- Zhong L., Carere J., Lu Z., Lu F., Zhou T.: Patulin in apples and apple-based food products: The burdens and the mitigation strategies. *Toxins* 2018, 10(11):475.
- Zhou T., Wang X., Ye B., Shi L., Bai X., Lai T.: Effects of essential oil decanal on growth and transcriptome of the postharvest fungal pathogen *Penicillium expansum*. *Postharvest Biology and Technology* 2018, 145:203–212.
- Zhou W. W., Huang J. X., Niu T. G.: Isolation of an antifungal *Paenibacillus* strain HT16 from locusts and purification of its medium-dependent antagonistic component. *Journal of Applied Microbiology* 2008, 105(3):912–919.
- Zhu R., Feussner K., Wu T., Yan F., Karlovsky P., Zheng X.: Detoxification of mycotoxin patulin by the yeast *Rhodospiridium paludigenum*. *Food Chemistry* 2015, 179:1–5.
- Zhu Y., Koutchma T., Warriner K., Shao S., Zhou T.: Kinetics of patulin degradation in model solution, apple cider and apple juice by ultraviolet radiation. *Food Sci. Technol. Int.* 2012, 19:291–303.
- Zhu Y., Koutchma T., Warriner K., Shao S., Zhou T.: Kinetics of patulin degradation in model solution, apple cider and apple juice by ultraviolet radiation. *Food science and technology international* 2013, 19 (4):291–303.
- Zhu, Y., Koutchma T., Warriner K., Zhou T.: Reduction of patulin in apple Juice products by UV light of different wavelengths in the UVC range. *Journal of food protection* 2014, 77(6):963–971.
- Ziarati P., Shirkan F., Mostafidi M., Zahedi M. T., Sawicka B.: Introduction of methods to reduce and remove patulin from food product. *Food Science and Technology* 2019, 76.
- Zoghi A., Khosravi-Darani K., Sohrabvandi S., Attar H., Alavi S. A.: Effect of probiotics on patulin removal from synbiotic apple juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2017, 97(8):2601–2609.
- Zouaoui N., Sbahi N., Bacha H., Abid-Essefi S.: Occurrence of patulin in various fruit juice marketed in Tunisia. *Food Control* 2015, 51:356-36