ISIS PAOLINO D'AQUILEIA

DI CIVIDALE DEL FRIULI

Istituto Tecnico – Settore Tecnologico

Indirizzo "Agraria, agroalimentare e agroindustria" – Articolazione "Viticoltura ed Enologia

TESI DEL CORSO DI SPECILIZZAZIONE PER ENOTECNICO

Ocratossina A nel vino: problematica, scenari futuri e nuovi metodi per il rilevamento e il controllo

CANDIDATO

Andrea Caporale

Anno scolastico 2022 – 2023

INDICE

1 INTRODUZIONE 3

2 L'OCRATOSSINA A 6

2.1 STRUTTURA CHIMICA 7
2.2 TOSSICITÀ 8

3 OCRATOSSINA A IN AMBITO ENOLOGICO 9

10
3.1 FATTORI CHE INFLUISCONO SULLA PRESENZA DI OTA SULLE UVE, NEL MOSTO E NEL VINO 10
3.2 PRESENZA GEOGRAFICA 11
3.3 OCRATOSSINA A NEI VINI E CAMBIAMENTO CLIMATICO 12

4 CONTROLLO E LOTTA 14

4.1 IL CONTROLLO IN VIGNETO 14
4.2 IL CONTROLLO IN CANTINA 15

5 TECNICHE E TECNOLOGIE INNOVATIVE 17

5.1 METODI DI RILEVAMENTO 17
5.1.1 BIOSENSORE PER SMARTPHONE PER IL RILEVAMENTO DELL'OTA TRAMITE LA CHEMILUMINESCENZA 17
5.1.2 TEST IMMUNOENZIMATICO PER LA RILEVAZIONE DELL'OCRATOSSINA A NEL VINO 18
5.1.3 COLONNE DI IMMUNOAFFINITÀ DA UTILIZZARE PER IL RILEVAMENTO DELL'OCRATOSSINA A 18
5.1.4 QUANTIFICAZIONE DI OCRATOSSINA A IN DIVERSE MATRICI ALIMENTARI MEDIANTE BIOSENSORI A CANTILEVER 18
5.2 METODI DI CONTROLLO 19
5.2.1 BIOCONTROLLO CON CEPPO DI *BREVIBACTERIUM* 19

6 CONCLUSIONI 20

7 BIBLIOGRAFIA 21

1 Introduzione

L'ocratossina A (OTA) è una micotossina prodotta da diverse specie di miceti del genere *Aspergillus* e *Penicillium*. Le micotossine sono dei metaboliti secondari e possono contaminare le uve durante le fasi di raccolta e trasporto, provocando potenzialmente gravi danni all'uomo, poiché l'esposizione anche a basse dosi per lunghi periodi può portare ad avvelenamenti e malattie croniche. L'OTA è un contaminante di mangimi e alimenti soprattutto a base di cereali, tuttavia, viene riscontrata anche in altri ambiti come quello enologico. Le prime specie ad essere ritenute responsabili della presenza dell'OTA nel vino, furono *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium viridicatum*; attualmente, la specie *A. ochraceus* ha un'incidenza poco rilevante, mentre gli *Aspergillus* della sezione *Nigri* (chiamati così perché sviluppano una muffa nera), specialmente la specie *A. carbonarius,* vengono indicati come principali responsabili del problema OTA nel vino. Infatti, quelli isolati sulle uve sono in alta percentuale produttori di OTA e ne producono quantità notevoli in tempi brevi.

L'ocratossina A è formata dall' acido 7-carbossil-5-cloro-8-idrossil-3,4-diidro-3-metil isocumarinico combinato con fenilalanina e presenta quindi un estere etero ciclico legato ad un anello benzenico. Questa struttura è comune in tutte le micotossine che causano danni alla cellula animale, attraverso la loro attività biologica. Un'intossicazione da OTA può causare seri danni, in quanto è considerata citotossica, nefrototossica, teratogena, genotossica, neurotossica, cardiotossica, immunotossica, mutagena e può causare paralisi e arresti respiratori (1); inoltre, è cancerogena. La dose massima giornaliera è compresa tra i 0,3 e i 0,89 nanogrammi per un uomo di 60 kg. Proprio per la sua tossicità, l'Unione Europea ha stabilito un limite di 2 µg/kg nel vino. (2)

Gli *Aspergillus* sez. *Nigri*, generalmente, sopravvivono nel terreno e riescono a colonizzare i grappoli molto rapidamente, già dall'allegagione. Il grappolo viene attaccato quando sono presenti acini già danneggiati, in quanto gli *Aspergillus* non sono in grado di perforare l'acino; è necessaria, inoltre, un'umidità compresa tra il 72 e il 90%, ed una temperatura tra i 12° e i 39°.

Uno studio effettuato 2001 ha analizzato campioni prelevati da uve di Sauvignon Blanc, Syrah, Moscato e Carignan, per monitorare la presenza di OTA all'interno dei grappoli durante le varie fasi della maturazione. Sono state riscontrate muffe che potevano sintetizzare l'Ocratossina A: al momento dell'invaiatura erano circa il 10%, ma al momento della maturità erano circa il 47%, e quasi tutte queste muffe appartenevano al genere *Aspergillus*. (3)

La rilevazione di OTA è più frequente nei vini rossi e nei vini dolci, e ciò è dovuto al tipo di tecnologia di vinificazione che viene utilizzata, ma si possono avere gravi contaminazioni già sul mosto, in regioni a rischio e in varietà particolarmente sensibili. L'Organizzazione Internazionale della Vite e del Vino ha elencato tutti i metodi biologici e tecnologici che possono essere utilizzati per rimuovere l'Ocratossina A dai vini, come:

- Impiantare il vigneto in zone ben arieggiate, ed evitare zone molto umide
- Scegliere dei portainnesti con una minore vigoria e che abbiano una buona resistenza allo sviluppo di muffe e marciumi; scegliere un clone che si adatti alle caratteristiche pedoclimatiche della cona di coltura
- Favorire il rapporto foglie/frutti e ridurre gli eccessi di vigoria, favorire una disposizione ordinata dei grappoli per evitare il loro ammassamento
- Effettuare trattamenti fitosanitari preventivi contro le tignole e le cicaline pruinose che favoriscono lo sviluppo di muffe sugli acini danneggiati
- Durante la vendemmia sarebbe opportuno controllare l'igiene dei recipienti usati per la raccolta, selezionare gli acini eliminando quelli contaminati o danneggiati, trasportare più in fretta possibile le uve in cantina
- È possibile utilizzare il carbone enologico per trattare i mosti, è consigliato usare per la fermentazione dei recipienti con pareti lisce, per evitare contaminazioni da fermentazioni avvenute in precedenza (4);

Si sta iniziando ad utilizzare sempre di più tecniche biologiche per combattere la contaminazione da OTA, inibendo la formazione di funghi filamentosi e favorendo la degradazione e l'assorbimento da parte delle cellule dei lieviti e dei batteri malolattici. Una di queste tecniche è l'utilizzo dei filtrati di colture di *Saccharomyces cerevisiae,* che inibiscono la produzione di Ocratossina A in *A. ochraceus* e *A. carbonarius.* Anche alcuni lieviti non-*Saccharomyces* sono in grado di inibire lo sviluppo di questa tossina, infatti la biomassa dei lieviti è un buon materiale adsorbente, visto che la parete è costituita da B-glucani e mannoproteine; queste ultime, a pH del vino, presentano una carica negativa, vista la presenza del mannosio fosfato, e per questo possono instaurare interazioni con l'Ocratossina A. La parete cellulare dei lieviti però, rimuove anche altri composti, come composti fenolici e pigmenti, e quindi portando a una perdita di colore nel vino. Per questo, sono stati selezionati dei ceppi di lieviti *S.cerevisiae,* che hanno una buona capacità fermentativa e un'ottima capacità di rimozione dell'Ocratossina A, ma che allo stesso tempo hanno una bassa capacità di

assorbimento dei composti fenolici e dei pigmenti che danno colore al vino. Anche la presenza di amine biogene e dell'etanolo può portare una diminuzione di Ocratossina A. (5)

L'obiettivo del presente elaborato è quello di trattare il problema della presenza di OTA in ambito enologico e approfondire le diverse tecniche di controllo e lotta a partire da quelle classiche e soffermarsi sulle innovazioni.

2 L'ocratossina A

L'ocratossina A è stata isolata per la prima volta nel 1965 da colture di *Aspergillus ochraceus.* È una micotossina prodotta da specie fungine del genere *Aspergillus (*in particolare *Aspergillus ochraceus*) e *Penicillium* (soprattutto *Penicillium verrucosum),* in grado di contaminare diversi alimenti come cereali, caffè, birra, mosto d'uva, vino e anche prodotti di origine animale dato che si accumula nei tessuti, rendendo potenzialmente tossiche anche le carni

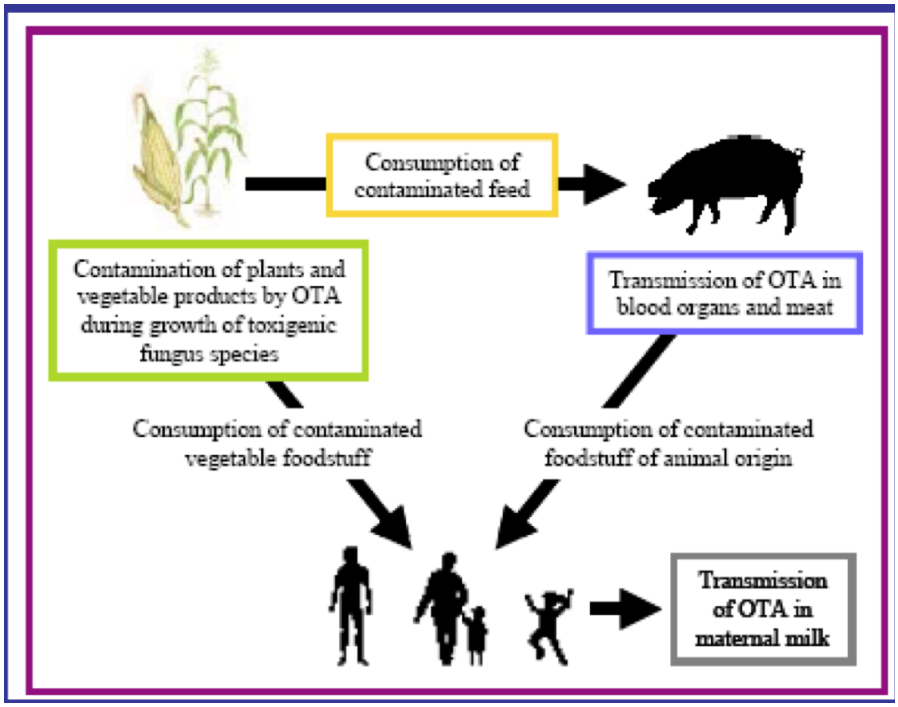


Figura 1: OTA nella catena alimentare. Possibili vie di contaminazione degli esseri umani (Bauer e Gareis, 1987)

A causa della sua tossicità, con il regolamento (CE) n. 1881/2006 (6) erano stati definiti i tenori massimi di OTA per alcuni alimenti, tra cui il vino; da notare che questa tossina è l'unica per cui esista una regolamentazione sul contenuto nel vino. I limiti di OTA in questo prodotto erano stati fissati a 2 µg/kg. Tenendo conto del fatto che, recentemente, l'ocratossina A è stata riscontrata in alimenti per i quali non era ancora stato fissato alcun tenore massimo ma che contribuiscono all'esposizione umana all'ocratossina A, e tenendo conto, inoltre, delle conoscenze più attuali, con il regolamento UE 2022/1370 (2), dal 1° gennaio 2023, sono stati introdotti nell'Unione Europea nuovi limiti. Questi risultano talvolta più restrittivi rispetto al precedente regolamento: sono stati introdotti per alimenti che prima ne erano privi, mentre per altri alimenti sono stati abbassati. I nuovi inserimenti riguardano i seguenti prodotti:

- Prodotti da forno, merende a base di cereali
- Frutta in guscio e secca, bevande non alcoliche, prodotti a base di liquirizia
- Semi di girasole, di zucca, di cocomero, di melone, di soia e cacao in polvere
- Erbe essiccate, radici di altea, radici di tarassaco

I prodotti per cui sono stati ridotti i limiti di OTA sono:

- Il caffè (da 10 a 5 µg/kg il caffè solubile, da 5 a 3 µg/kg il caffè tostato)
- Prodotti da forno (da 3 a 2 µg/kg i prodotti privi di frutta a guscio, frutta secca e noci)
- Uva sultanina (da 10 a 8 µg/kg) (7)

Per quanto riguarda il vino, si fa riferimento ai limiti del 2006.

2.1 Struttura chimica

Le ocratossine sono un gruppo di derivati isocumarici comprendenti ocratossina A, B, C, α, β, 4R/Sidrossiocratossina A, 10-idrossiocratossina A e ocratossina A aperta. La prima tra queste ad essere scoperta è l'ocratossina A la più tossica tra le ocratossine, isolata per la prima volta da *Aspergillus ochraceus*,

L'OTA è una molecola formata da un anello diidrossicumarico legato alla β-fenilalanina, tramite un legame ammidico con il carbossilico-7 (Figura 2).

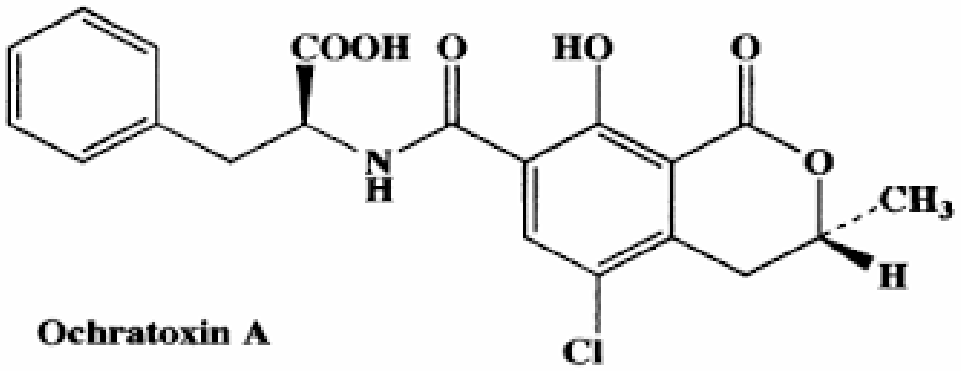


Figura 2: struttura chimica dell'ocratossina A (Carli D., UNIPI)

È una sostanza solida cristallina che libera un una luce blu se viene illuminata da luce ultravioletta, ed è una molecola abbastanza stabile al calore e nel tempo. (8)

Ha un punto di fusione circa di 90°C; è poco solubile in acqua, mentre invece è molto solubile in solventi polari e in bicarbonato di sodio acquoso. (9)

La molecola può subire modificazioni alla sua struttura per via di reazioni chimiche e biologiche, che avvengono durante il metabolismo o la trasformazione degli alimenti, e che possono aumentarne la tossicità.

2.2 Tossicità

Una volta ingerita, l'OTA viene assorbita velocemente, arriva nel sangue in poco tempo, ed è molto disponibile all'interno dell'organismo. Tra i rischi principali bisogna tenere in considerazione la sua tossicità e il rischio di tumori ai reni. (10)

Questa sostanza si è rivelata tossica per molte specie animali ma non, ad esempio, per i ruminanti adulti. Nei roditori si è rivelata essere cancerogena, con effetti neurotossici, genotossici e immunotossici.

Una volta ingerita dall'organismo umano, l'OTA può avere un'azione:

- nefrotossica; infatti, può causare lo sviluppo di tumori del tratto urinario. È stata classificata cancerogena (classe 2B) dal Centro Nazionale della Ricerca contro il Cancro, in quanto causa danni irreversibili ai reni
- epatotossica, andando ad interferire nell'assorbimento della vitamina D3
- cardiotossica, può causare delle ulcere cardiache
- genotossica, i bambini nati da madri intossicate da OTA non raggiungono uno sviluppo completo e hanno sintomi di fragilità ossea
- immunodepressiva
- causa paralisi e arresti respiratori (11)

Proprio per questo lo Scientific Comittee on Food ha consigliato di ridurre l'assunzione di OTA, indicando come dose massima giornaliera quella di 1,2-14 ng/kg di peso corporeo. (12)

3 Ocratossina A in ambito enologico

La prima volta che furono individuati livelli di OTA preoccupanti nel vino fu nel 1996, durante una ricerca in Svizzera, in cui vennero analizzati campioni di vino e succo d'uva provenienti da vari paesi (12), e questo portò a compiere delle indagini non solo in Europa, ma anche in altri paesi come Giappone e Australia, rilevando la presenza di OTA anche in quelle zone. La contaminazione delle uve è dovuta allo sviluppo di *Aspergillus sez. Nigri* (Figura 3), soprattutto da *Aspergillus carbonarius*. L'infezione può avvenire già durante le fasi di maturazione del frutto, quindi all'allegagione, ma più frequentemente durante l'invaiatura e la raccolta.

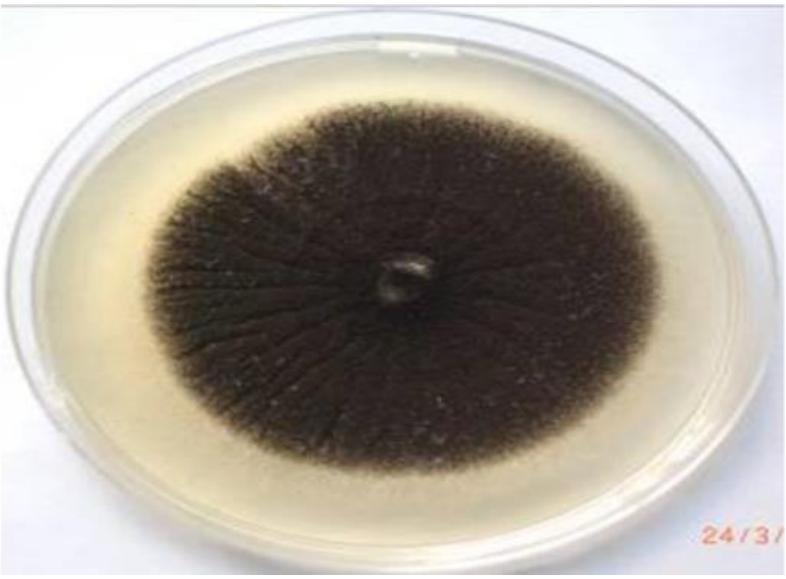


Figura 3: Aspergillus Nigri (M. Messaoudi, Research Gate)

Nonostante studi risalenti a circa 15 anni fa non avessero rilevato valori al di sopra dei limii normativi nei vini europei, i risultati di uno studio condotto nel 2021 (13) mostrato la presenza di livelli superiori, anche di 3 volte, ai tenori consentiti, in vini provenienti da Spagna, Francia e Polonia (tabella 1) dimostrando che la problematica resta ancora molto attuale

		Poland	Spain	France
	Min.	6.318	6.712	6176
	Max.	6.825	6.941	6902
	Mean	6.629	6.848	6711
	SD	0.198	0.085	0,230
Exceeding the norm [a]	n	5	6	8
	%	100	100	100

min –minimum value; max – maximum value; mean – mean value; SD – standard deviation; n – number of samples that exceeded the norm; % - percentage of samples that exceeded the norm; [a] *Norm for OTA in wine:* 2 ppb *(µg/L)* (EU, 2006).

Tabella 1: Contaminazione da ocratossina A (µg/L) compreso il paese di origine.

3.1 Fattori che influiscono sulla presenza di OTA sulle uve, nel mosto e nel vino

I fattori che influiscono maggiormente sullo sviluppo di OTA nell'uva sono (figura 4):

- Ferite sull'acino, che legate alla presenza di oidio e tignola possono favorire l'infezione da parte di funghi; la contaminazione può essere causata anche dall'attacco di cocciniglie e cicaline;
- Condizioni ambientali, infatti una temperatura tra i 12 e i 39°, un buon arieggiamento e un'umidità compresa tra il 70 e il 90%, condizioni legate ad una competizione tra specie fungine, sono fattori che favoriscono lo sviluppo del patogeno;
- Epoca di raccolta, in quanto le uve raccolte più tardivamente o che vengono lasciate appassire in campo, sono più soggette alla presenza di OTA, dato che questa aumenta con l'avanzare della maturazione (8). Nei primi anni del 2000 è stato effettuato un lavoro sperimentale in Francia, in cui si studiavano 4 varietà d'uva nei diversi momenti della maturazione, e si è notato infatti che più si sviluppava il grappolo, maggiore era la frequenza con cui comparivano i funghi. Si riscontarono diverse muffe in grado di sviluppare OTA, ed erano il 10% al momento dell'invaiatura, e il 47% alla maturità dell'uva. (3)

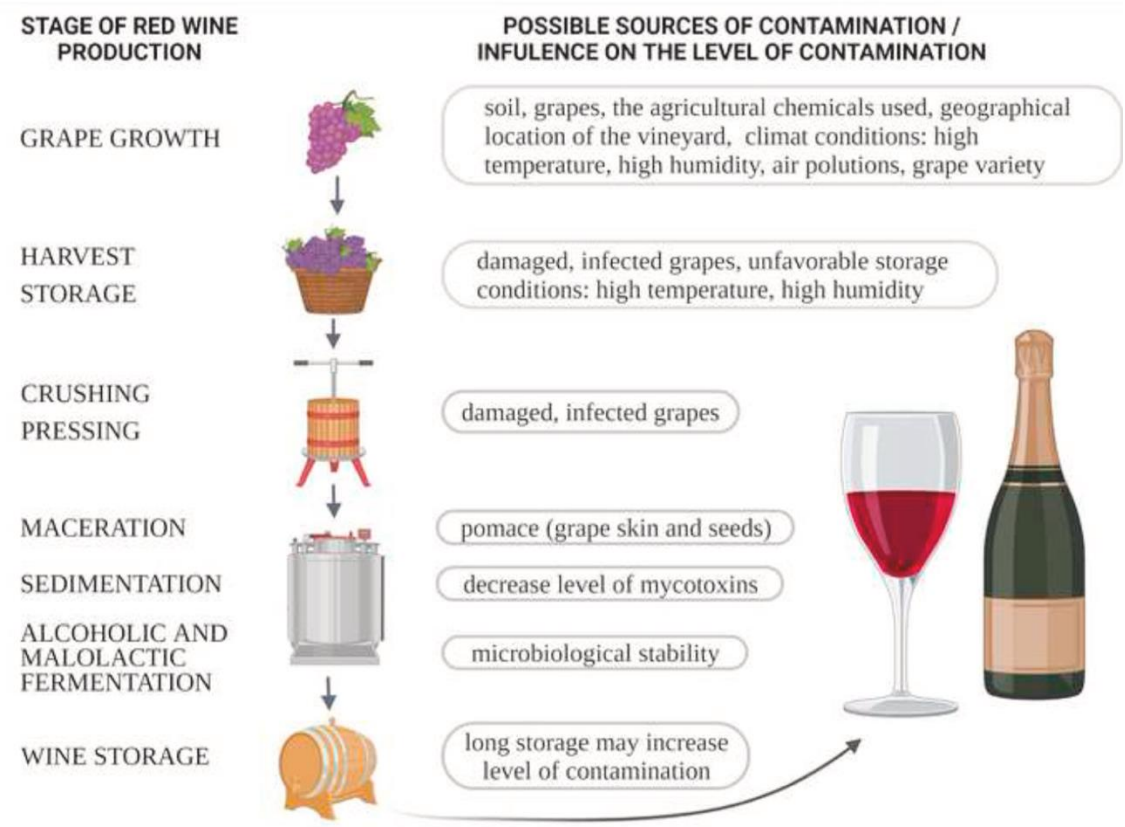


Figura 4: Potenziali fonti di contaminazione da micotossine durante la produzione di vino rosso e impatto delle fasi di processo sul livello di contaminazione da micotossine nel vino

3.2 Presenza geografica

Come già detto, uno dei fattori che influiscono sullo sviluppo e la presenza di OTA è il clima.

Infatti, degli studi hanno dimostrato come nei vini prodotti nell'Europa meridionale, vi sia maggiore presenza di OTA, e che i vini più suscettibili alla contaminazione sono i vini rossi e quelli dolci (14), anche se l'ocratossina A si può ritrovare in tutte le tipologie di vino, che sia rosso, bianco, rosato, passiti e anche vini da tavola.

Zone come il Sud Italia quindi, considerato che *Aspergillus carbonarius* è un fungo termofilo, sono le zone da considerarsi più a rischio viste le condizioni adatte allo sviluppo del fungo (Figura 5). I vigneti che si trovano in pianura, o più vicini al mare, sono sono considerati più soggetti all'attacco del fungo, attacchi che sono più frequenti in annate piovose: questo è stato dimostrato da uno studio condotto dalla Foulon-Sopagly, che va ad evidenziare l'effetto dell'annata e di come la presenza di piogge nei mesi di agosto e settembre possa andare ad aumentare il rischio di contaminazione. Sempre la Foulon-Sopagly ha effettuato delle analisi sui mosti, che hanno

evidenziato come le regioni del Mediterraneo siano quelle più esposte alla contaminazione da OTA, con una variabilità legata ai fattori climatici e ambientali, mentre regioni come Veneto, Provenza e Mancha hanno un rischio medio. (3)

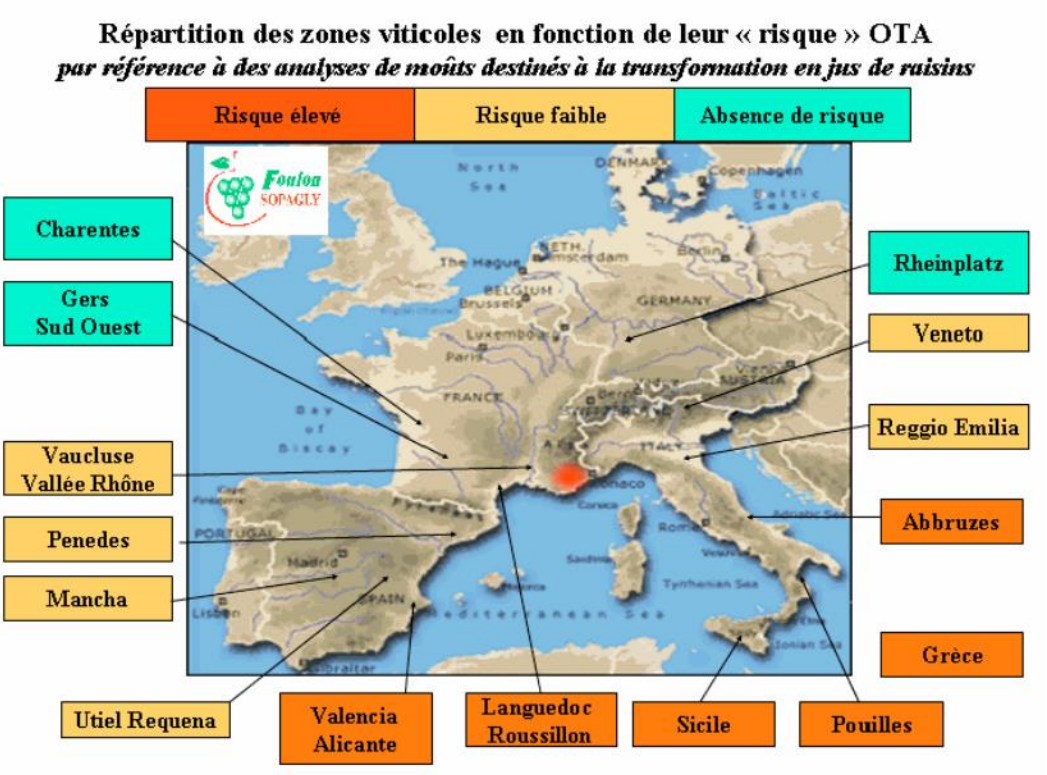


Figura 5: Ripartizione delle zone in base al rischio di presenza di OTA: le regioni mediterranee sono quelle a rischio maggiore (dati della Foulon-Sopagly) (Rosseau J., 2004)

3.3 Ocratossina A nei vini e cambiamento climatico

Una review (15) suggerisce che uno dei problemi prioritari che dovranno essere considerati in futuro sarà l'effetto del cambiamento climatico sulle colture, oltre all'effetto sulla contaminazione da micotossine. Gli scenari risultano essere molto diversi:

- Il cambiamento climatico potrebbe determinare un aumento di fumonisine (prodotte da Aspergillus niger) nell'uva con una diminuzione dell'OTA. Causa di ciò il fatto che scenari climatici più secchi e caldi favorirebbero una prevalenza di A. tubingensis e A. niger rispetto a A. carbonarius, in quanto meglio adattabili a temperature estremamente elevate e a condizioni più secche.
- La coltivazione delle uve potrebbe spostarsi in zone attualmente non vocate, con abbassamento dei livelli di micotossine a causa del che l'uva venga coltivata in nuovi terreni

con conseguenti bassi livelli di micotossine a causa del "Parasite Lost Phenomenon" per il quale nuove colture vengono colpite in minor misura.

- Si verificherà probabilmente una riduzione degli organismi antagonisti naturali che esercitano un biocontrollo sui funghi produttori di micotossine.
- Si ipotizza che l'area adatta alla viticoltura diminuirà dal 19 al 73% nelle principali regioni produttrici di vino entro il 2050. Il cambiamento climatico potrebbe causare l'insediamento di vigneti a quote e latitudini più elevate. Ci si può aspettare un aumento delle malattie e della potenziale contaminazione da micotossine man mano che il clima diventa meno adatto alla vite

4 Controllo e lotta

Per il controllo dello sviluppo del fungo si può agire sia in vigneto che in cantina.

4.1 Il controllo in vigneto

In vigneto la lotta può essere fatta nel breve periodo, quindi con interventi immediati, oppure con una lotta a lungo termine, e che vada quindi a prevenire nel tempo l'eventuale attacco da parte di funghi. Alla base della prevenzione c'è il monitoraggio e una corretta gestione della lotta fitosanitaria, verso i parassiti che causano lo sviluppo di marciumi nell'uva.

Altrettanto importante è prevenire lo sviluppo di *Oidio* e *Peronospora*. Per prevenire gli attacchi, si può intervenire con potature verdi e diradamento, in modo da aumentare l'arieggiamento dei grappoli. Da alcuni studi è emerso che l'avanzare della maturazione porta all'aumento delle ocratossine; quindi, è importante anche il controllo in campo dello stato di maturazione dell'uva.

La prevenzione nel tempo è altrettanto importante: se il sito d'impianto si trova in luogo dove l'umidità può essere molto elevata, ad esempio a fondovalle o vicino al mare, ci sarà un rischio maggiore di presenza di funghi. Anche la scelta di varietà resistenti allo sviluppo di marciumi può aiutare ad evitare l'insorgenza di funghi. (16)

Si è riscontrato che nei vini prodotti da uve che sono state trattate con un fungicida ovicida, il Flufenoxuron, c'è stata una riduzione circa dell'82% dei tenori di OTA. Negli anni successivi è stata portata avanti la lotta con l'utilizzo di fungicidi ovicidi, che hanno portato risultati molto simili a quelli del 2001, con una riduzione dell'80% dei tenori di OTA. Lo stesso studio ha evidenziato che la defogliazione riesce a diminuire leggermente la contaminazione di OTA. (3)

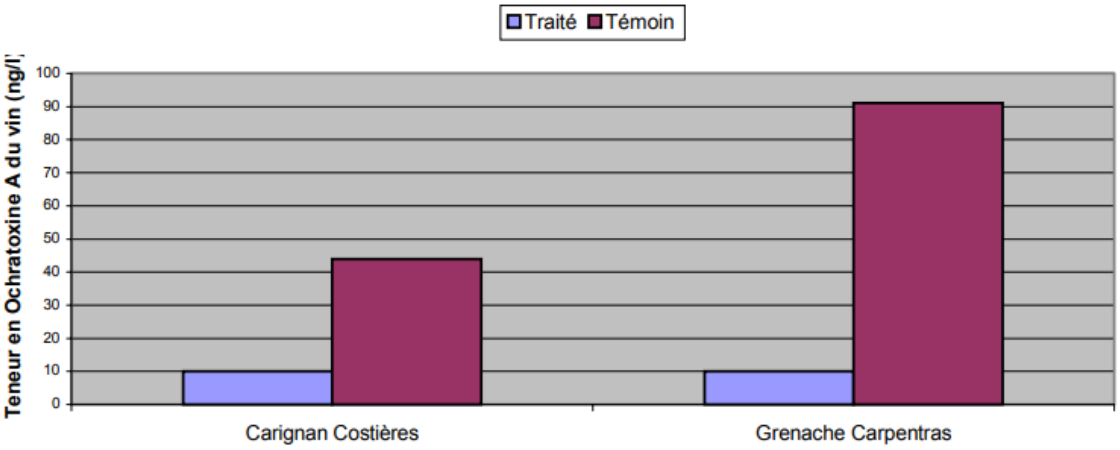


Figura 6: grafico che confronta la presenza di OTA nei vini prodotti con l'utilizzo di fungicidi e senza (Jaques R., 2004)

4.2 Il controllo in cantina

In cantina ci sono due momenti critici, che sono la pressatura e la pigiatura, operazioni in cui l'ocratossina A presente nell'uva passa in soluzione, fasi in cui bisognerebbe analizzare il mosto per poter quantificare la presenza della micotossina.

Per quanto riguarda la vinificazione in bianco, i problemi che si incontrano sono minori, dato che l'OTA viene assorbita dai lieviti durante la fermentazione, o dai chiarificanti se si interviene sul mosto per la defecazione. Nel caso ci fosse una presenza elevata di OTA, sempre nei vini bianchi, il carbone è un prodotto molto efficace per la rimozione dell'ocratossina, facendo attenzione a non rimuovere anche elementi positivi al vino (antociani e polifenoli). (17)

Nella vinificazione in rosso invece, le fasi in cui si deve fare più attenzione sono la pigiatura e la fase iniziale della macerazione, dato che nelle fasi che seguono il contenuto di OTA diminuirà grazie al potere adsorbente delle vinacce e alla biomassa dei lieviti. Anche nelle fasi di filtrazione e chiarifica, e durante la fermentazione malolattica, il contenuto di ocratossina A può diminuire fino al 60%. Se durante tutte le operazioni il contenuto di OTA rimane elevato, si può intervenire usando gelatina o coadiuvanti tecnologici, come scorze con un buon potere adsorbente.

Nel caso si avesse un mosto molto ricco di OTA, per i bianchi sarebbe ottimale intervenire con trattamenti prima dell'inizio della fermentazione, utilizzando carbone o coadiuvanti tecnologici durante la fase di defecazione. Per quanto riguarda la vinificazione in rosso, si dovrebbe evitare di fare trattamenti troppo invasivi al mosto, ma si dovrebbe cercare di accorciare i tempi di

macerazione, favorire l'estrazione dei componenti della buccia e cercare di non utilizzare temperature troppo elevate.

Durante la fase di fermentazione, sempre per i rossi, è consigliato *utilizzare Saccaromyces cerevisiae*, che hanno una buona capacità di assorbimento nei confronti dell'ocratossina; anche i batteri lattici sono in grado di adsorbire l'OTA. (18)

5 Tecniche e Tecnologie innovative

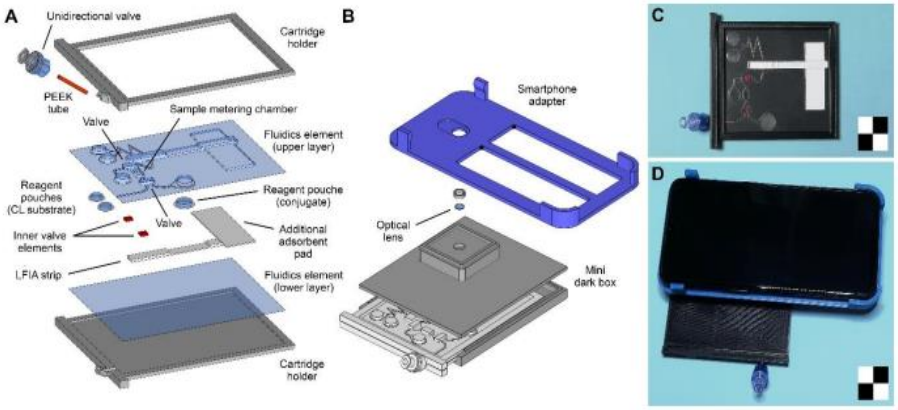
5.1 METODI DI RILEVAMENTO

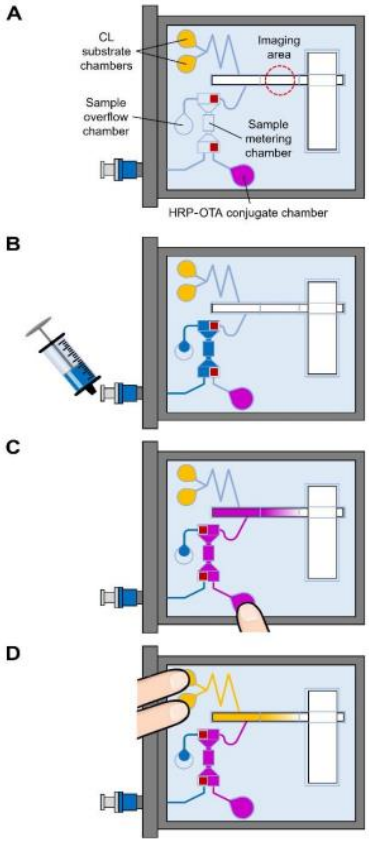
5.1.1 Biosensore per smartphone per il rilevamento dell'OTA tramite la chemiluminescenza

L'università di Torino sta sviluppando uno smartphone portatile, dotato di un biosensore che ha il compito di rilevare e quantificare la presenza di ocratossina A nel vino. Questo strumento sarebbe un dispositivo autonomo integrato nello smartphone, che sfrutta la chemiluminescenza per la rilevazione della tossina.

La chemiluminescenza è l'emissione luminosa di una specie chimica che perde l'energia in eccesso sotto forma di radiazione.

Lo strumento, oltre al dispositivo integrato nello smartphone, utilizzerebbe cartucce analitiche usa e getta contenenti i reagenti necessari per effettuare l'analisi. L'analisi potrebbe essere effettuata in qualunque momento, anche da personale non specializzato, che usa la fotocamera dello smartphone come luce per rilevare l'ocratossina presente nel campione. (19)

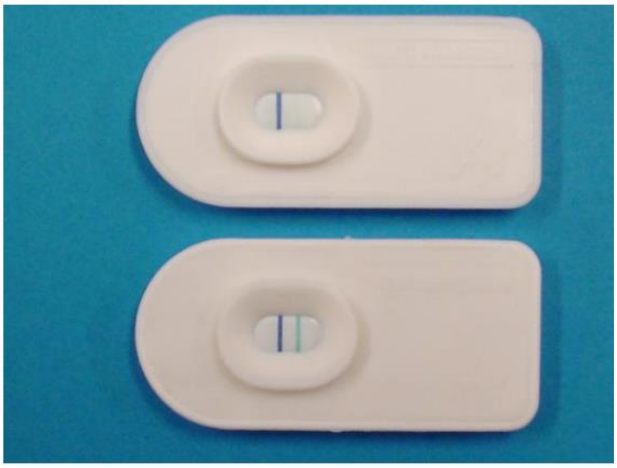




Smartphone biosensor for point-of-need chemiluminescence detection of ochratoxin A, Università degli Studi di Torino

5.1.2 Test immunoenzimatico per la rilevazione dell'ocratossina A nel vino

Questo test è prodotto dalla R-Biopharm Nederland, ed è un test rapido che rispetta i regolamenti dell'UE per il rilevamento dell'OTA.



Il test si basa su anticorpi monoclonali di topo contro l'OTA. Il kit contiene tutti i reagenti necessari per eseguire i test.

È un test che può individuare la presenza di ocratossina nei vini rossi, bianchi e rosé, cona sensibilità di 2 ppb.

Il campione da esaminare viene preparato semplicemente agitandolo in presenza di una soluzione di estrazione (fornita con il kit), e va poi utilizzato. Questo metodo è in grado di dare i risultati dell'analisi in 10 minuti, e senza la necessità di personale preparato.

5.1.3 Colonne di immunoaffinità da utilizzare per il rilevamento dell'ocratossina A

La procedura si basa sulla tecnologia dell'anticorpo monoclonale, che rende il test sensibile, rapido e semplice da eseguire. Le colonne contengono una sospensione in gel di anticorpo monoclonale specifico per la tossina da rilevare. Dopo l'estrazione della tossina, l'estratto del campione viene filtrato, diluito e fatto passare lentamente attraverso la colonna di immunoaffinità e ogni tossina presente viene trattenuta dall'anticorpo all'interno della sospensione in gel.

La colonna viene poi lavata e la tossina viene rilasciata dalla sospensione in gel. (20)

5.1.4 Quantificazione di ocratossina A in diverse matrici alimentari mediante biosensori a cantilever

Il dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari dell'Università di Torino ha dimostrato che è possibile utilizzare un nanobiosensore a cantilever per individuare l'ocratossina A in diversi alimenti.

I cantilever sono delle travi vincolate a un'estremità, caratterizzati da una frequenza di risonanza che dipende dalla massa della trave stessa. Quando viene attivata la superficie del cantilever con anticorpi anti OTA, la massa di questo aumenta se in presenza della micotossina. L'aumento della massa è determinato dalla variazione della frequenza di risonaza, che viene monitorata sia prima che dopo il legame con l'analita in modo da poter quantificare la micotossina.

L'OTA, usando questo metodo, è stata riscontrata in caffè verde, succo d'uva e vino. (21)

5.2 METODI DI CONTROLLO

5.2.1 Biocontrollo con ceppo di *Brevibacterium*

I ricercatori della CREA sono riusciti ad isolare un ceppo di batterio *Brevibacterium*, che è in grado di degradare l'ocratossina A andando a formare sostanze non tossiche per l'essere umano. Dai test di laboratorio effettuati per verificarne l'efficacia, è emerso che il ceppo di Brevibacterium riesce ad eliminare completamente anche 40mg/L di OTA.

Antonella Costantini, ricercatrice di CREA, ha spiegato che ora sta lavorando con delle aziende cercando di creare un prodotto, che sfrutti il batterio che hanno isolato, per eliminare la tossina dai prodotti che presentano livelli di OTA. (22)

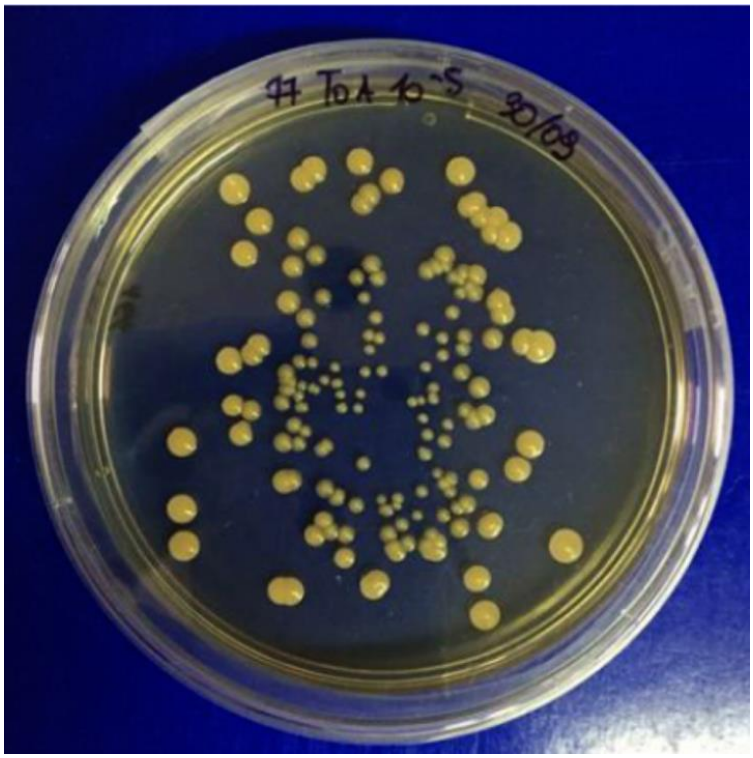


Figura 7: Brevibacterium
Fonte: Agronotizie, T. Cinquemani, L'ocratossina? Se la mangiano i batteri

6 Conclusioni

- L'Ocratossina A OTA) è una micotossina prodotta da diverse specie di miceti del genere *Aspergillus* e *Penicillium*. In ambito enologico il maggior responsabile delle contaminazioni da OTA è la specie *A. carbonarius.*
- L'OTA è una molecola tossica per la maggior parte degli animali, compreso l'essere umano. Risulta essere nefrotossica, cancerogena (2B), epatotossica, cardiotossica, genotossica, immunodepressiva; può inoltre causare paralisi e arresti respiratori.
- Il Regolamento CE 1881/2006 ha fissato i limiti di OTA nel vino a 2 μg/kg
- Pur non essendoci molti dati a disposizione in letteratura, il problema dell'OTA nel vino sembra essere ancora attuale. Uno studio risalente al 2021 ha infatti individuato livelli di OTA 3 volte superiori ai tenori consentiti in vini provenienti da paesi europei.
- La contaminazione da OTA nei vini è strettamente correlata a fattori geografici e climatici; lo studio dei cambiamenti climatici in atto apre a diversi scenari riguardo l'evoluzione delle contaminazioni da micotossine in ambito enologico, che dovranno essere considerati nella scelta delle future strategie di controllo della problematica.
- Oltre alle classiche tecniche analitiche per la determinazione dei tenori di OTA e alle classiche tecniche di controllo, la ricerca si sta concentrando sull'identificazione di nuovi sistemi di pronto uso e di sistemi di biocontrollo per la gestione delle contaminazioni.

7 Bibliografia

1) Ana Maria Moar Grobas, *Ocratossina A nel vino*, www.sinergoservizi.com

2) Regolamento UE, *Regolamento per i tenori massimi di ocratossina A in alcuni prodotti alimentari*, https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32022R1370&from=EN

3) Jaques Rosseau, *Ocratossina A nel vino: stato delle conoscenze,* 2004, Vinidea.net

4) CODICE DI BUONE PRATICHE VITIVINICOLE PER LIMITARE AL MASSIMO LA PRESENZA DI OCRATOSSINA A NEI PRODOTTI DERIVATI DALLA VITE, ://www.infowine.com https /docs/ochra-oiv.pdf

5) Romano P, Cocolin L, Ciani M, 2022, *Microbiologia della vite e del vino,* CEA, pp. 32

6) La commissione delle Comunità Europee, REGOLAMENTO (CE) N. 1881/2006 DELLA COMMISSIONE del 19 dicembre 2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari, Gazzetta ufficiale dell'Unione Europea, https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006R1881&from=ES#:~:text=Per%20garantire%20un%27efficiente%20tutela,come%20ingredienti%20di%20altri%20alimenti.

7) Contaminanti alimentari. Nuovi limiti in UE sulla ocratossina A dall'1.1.23, di Dario Dongo e Ylenia Patti Giammello, 4-11-2022, https://www.greatitalianfoodtrade.it/sicurezza/contaminanti-alimentari-nuovi-limiti-in-ue-sulla-ocratossina-a-dall1-1-23/

8) Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroalimentari (DiSTA) Facoltà di Agraria, "RIMOZIONE DI OCRATOSSINA A IN UN VINO MODELLO MEDIANTE PROTEASI ACIDE", Tiziana Fabianelli

9) AVANZATE METODOLOGIE BIOSENSORISTICHE PER LA SICUREZZA ALIMENTARE APPLICATE NEL RILEVAMENTO DI OCRATOSSINA A, Università degli Studi di Napoli, Luisa Iozzino

10) EFSA, Ocratossina A nel cibo, https://www.microbiologiaitalia.it/micologia/ocratossina-a-nel-cibo-una-ricerca-dellefsa/

11) "I metabolici tossici fungini. - Biogenesi, biotossicità, analitica qualiquantitativa, decontaminazione" Cirilli. Laboratorio di chimica Applicata – Bologna

12) P.Battilani, A. Pietri, A. Silva, G. Zinzani, 2004, OCRATOSSINA, DALLA VITE AL VINO, CAUSE DI PRESENZA E POSSIBILI, INTERVENTI DI DECONTAMINAZIONE, L'enologo, pp. 1

8) Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroalimentari (DiSTA) Facoltà di Agraria, "RIMOZIONE DI OCRATOSSINA A IN UN VINO MODELLO MEDIANTE PROTEASI ACIDE", Tiziana Fabianelli

13) Joanna Kochman, Karolina Jakubczyk, Katarzyna Janda, Micotossine nel vino rosso: occorrenza e valutazione del rischio, Food Control, Volume 129, 2021, 108229, ISSN 0956-7135, https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108229.

14) Ottender H. e Majerus P., Occurence of ochratoxin A (OTA) in wine: Influence of the type of wines and its geographical origin, Ottobre 2000

3) Jaques Rosseau, *Ocratossina A nel vino: stato delle conoscenze,* 2004, Vinidea.net

15) Paterson, R. R. M., Venâncio, A., Lima, N., Guilloux-Bénatier, M., & Rousseaux, S. (2018). Micotossine predominanti, funghi micotossigeni e cambiamenti climatici legati al vino. Ricerca alimentare internazionale, (Ottawa, Ont.), 103, 478–491. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.080

16)*Michele Borgo (ex vicepresidente della commissione viticoltura dell'OIV),* Ocratossina A, pericolo sempre in agguato, https://www.imbottigliamento.it/2013/05/17/ocratossina-a-pericolo-sempre-in-agguato/

3) Jaques Rosseau, *Ocratossina A nel vino: stato delle conoscenze,* 2004, Vinidea.net

17) P. Battilani e A. Silva. Controlling ochratoxin A in the vineyard and winery, 2010

18) AgroNotizie, Tommaso Cinquemani, "L'ocratossina? Se la mangiano i batteri", 2021, https://agronotizie.imagelinenetwork.com/agricoltura-economia-politica/2021/02/01/l-ocratossina-se-la-mangiano-i-batteri/69176

19) Università degli studi di Torino; M. Zangheri, F. Di Nardo, D. Calabria, B. Marchegiani, L. Anfossi, M. Guardigli, M. Mirasoli, C. Baggiani, A. Roda; "Smartphone biosensor for point-of-need chemiluminescence detection of ochratoxin A in wine and coffee"; 2023

20) Ocratossina A nel vino: limiti e metodi analitici, Biopharm, https://food.r-biopharm.com/it/news/ocratossina-a-nel-vino-limiti-e-metodi-analitici/

21) Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari, Università degli Studi di Torino, K. Santoro, D. Spadaro, M.L. Gullino, A. Garibaldi, C. Ricciardi, “Quantificazione di ocratossina A in diverse matrici alimentari mediante biosensori a cantilever”

22) Angela Silva, professore associato di Enologia della Facoltà di Agraria dell’Università del Sacro Cuore di Piacenza, “Ocratossina A: pericolo sempre in agguato”