



Ocratossina A nella filiera vite- vino e tecnologie innovative per contrastarla

Emilia Garcia-Moruno, Michele Savino



CRA – ENO, ASTI
CRA-UTV, BARLETTA

Importanti micotossine dal punto di vista agronomico

⌘ Aflatossine

⌘ Zearalenone

⌘ Ocratossina A

⌘ Deossinivalenolo

⌘ Patulina

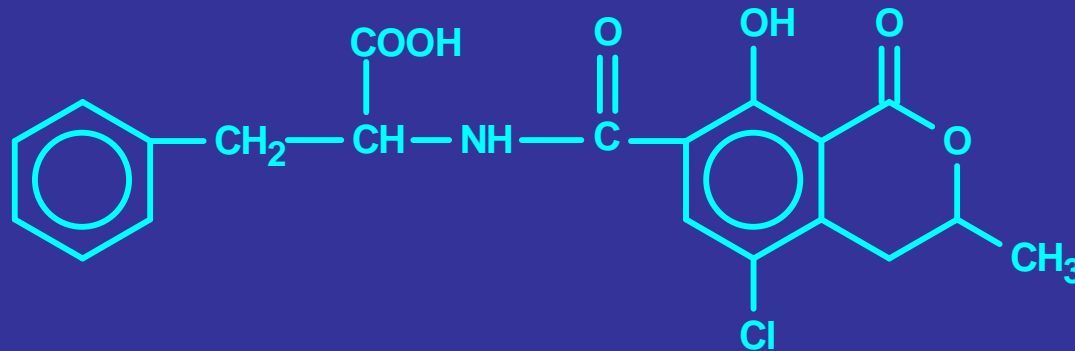
⌘ Fumonisine

Prodotte da specie
di *Aspergillus* e
Penicillium

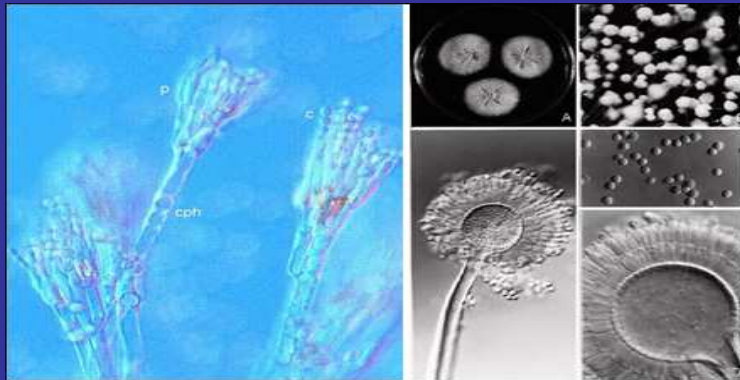
Prodotte da specie
di *Fusarium*

Ocratossina A

“L’Ocratossina A (OTA) è una micotossina con proprietà cancerogene, nefrotossiche, immunotossiche e possibilmente anche neurotossiche” **(EU Scientific Committee on Food, 1998)**



Prodotta da
Penicillium verrucosum
Aspergillus ochraceus e,
nell'uva,
Aspergillus carbonarius



L'Ocratossina A negli alimenti

Prodotti vegetali

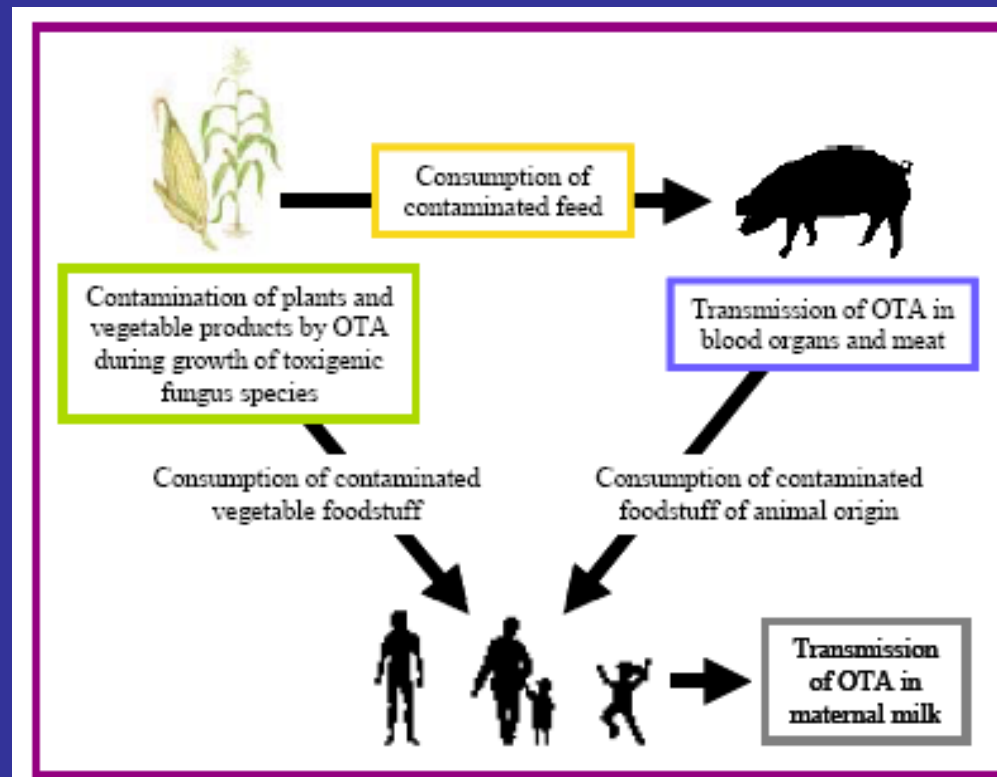
- Cereali
- Legumi
- Caffè
- Cacao
- Uva passita
- Spezie

Prodotti di origine animale

- Carni suine e pollame e prodotti derivati

Bevande

- Birra
- Vino



OTA in the food chain. Possible routes for contamination of humans by OTA
(Bauer and Gareis, 1987)

Il Comitato Scientifico per l'Alimentazione JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) ha concluso che l'assunzione giornaliera massima tollerabile (TDI) di ocratossina A deve essere mantenuta a valori inferiori a 5 ng/kg di peso corporeo



Limiti massimi di Ocratossina A espressi in µg/Kg in diverse matrici

Prodotto	Ocratossina µg/Kg
Cereali non lavorati (compreso riso non lavorato e grano saraceno)	5
Tutti i prodotti derivati dai cereali (compresi i prodotti lavorati a base di cereali ed i cereali destinati al consumo umano diretto)	3
Frutti essiccati della vite (uva passa di Corinto, uva passa, uva sultanina)	10
Caffè torrefatto e caffè torrefatto macinato, ad eccezione del caffè solubile	5
Caffè solubile (istantaneo)	10
Vino (rosso, bianco e rosé) e altri vini e/o altre bevande a base di mosto d'uva. Succo d'uva, ingredienti a base di succo d'uva in altre bevande, incluso il nettare di uva e il succo d'uva concentrato, ricostituito. Mosto d'uva e mosto d'uva concentrato ricostituito, destinati direttamente al consumo umano	2
Alimenti per bambini e alimenti a base di cereali per lattanti e bambini. Alimenti dietetici destinati a fini medici speciali, soprattutto all'alimentazione dei lattanti	0,5
Cacao e cioccolato in polvere	2
Cioccolato e suoi derivati	0,5
Carne suina e prodotti derivati	1

Regolamento (CE) 1881/2006 della commissione del 19 dicembre 2006

NEL VINO:



- 1996 Zimmerli e Dick evidenziano la presenza di OTA in diversi vini europei
- 2005 Regolamento (CE) N.123/2005 che stabilisce un tenore massimo ammissibile di OTA nei mosti e nei vini di 2 $\mu\text{g}/\text{Kg}$

Origine dell'Ocratossina A nel vino

- Contaminazione di origine fungina dell'uva
- Durante la macerazione l'OTA passa nel mosto; per questo motivo i vini rossi risultano più contaminati dei bianchi

OTA nell'uva



La comparsa dei funghi aumenta con:

- sviluppo del grappolo
- UR = 72 - 90%
- T = 12 - 39°C
(T ottimale di crescita = 28°C)

Una volta in contatto con la polpa o il succo d'uva, i funghi iniziano a produrre OTA.

C'è una relazione diretta e molto stretta tra lo stato sanitario dell'uva ed il tenore in OTA dei vini: più le uve sono danneggiate, maggiore è la contaminazione da OTA.

- Il rischio di formazione di OTA dipende da vari fattori:
 - Aree geografiche,
 - Condizioni climatiche (temperature, piogge, umidità)
 - Livello di sanità delle uve,
 - Suscettibilità varietale,
 - Interventi agronomici,
 - Interazioni con altri microrganismi

Come evitare la contaminazione?

- Prevenire la crescita dei funghi
- Trattamenti di decontaminazione in alimenti/bevande e mangimi
- Inibizione dell'assorbimento nel tratto digestivo

Criteria per i trattamenti di decontaminazione

L'alimento (o mangime) deve conservare le sue proprietà nutrizionali e organolettiche (deve rimanere commestibile)

Non devono originarsi composti tossici come conseguenza del trattamento

Il costo del trattamento deve essere economicamente sostenibile

TRATTAMENTI PER ABBATTERE IL CONTENUTO DI OTA NEI VINI

- con il **carbone decolorante** si ottengono i migliori risultati: 90 % di abbattimento alla dose di 10-15 g/hL (Savino *et al.*, 2004)
- con l'impiego di **Lievito Secco Attivo** (LSA) alla dose di 1 g/L, dopo soltanto 90' di contatto tra il lievito ed il vino è possibile abbattere di circa il 23% il contenuto di OTA del vino, mentre con 4 g/L di LSA la percentuale d'abbattimento di OTA raggiunge più del 46% (Garcia Moruno *et al.*, 2005)
- con i **chips** si ottengono percentuali variabili di abbattimento (13-75%) in funzione della dose e il tempo di contatto (Savino *et al.*, 2004)

ASSORBIMENTO

Decontaminazione biologica

**I lieviti assorbono OTA durante la fermentazione
in percentuale variabile tra il 47-70 % (Cecchini et al., 2006)**

**I batteri lattici assorbono il contenuto di OTA
In percentuale variabile tra l'8 – 28% (Del Prete et al., 2007)**



**Selezione di ceppi di lievito e batterici per le
Fermentazioni alcolica e malolattica**

ASSORBIMENTO

Decontaminazione biologica

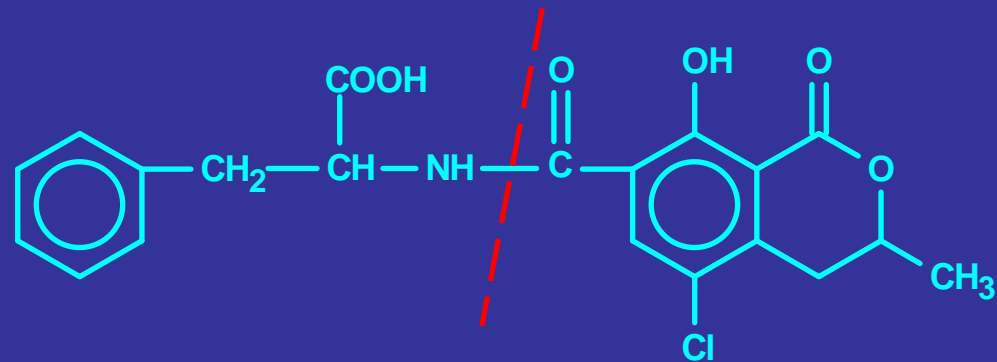


Attraverso l'utilizzo di microrganismi selezionati, la micotossina deve essere **degradata** per trasformazione in composti non tossici o meno tossici

DEGRADAZIONE

MICROORGANISMI CHE DEGRADANO L'OCRATOSSINA A

Sono stati descritti enzimi con attività carbossipeptidasi A (CPA), come la CPA di pancreas bovino, in grado di idrolizzare il legame ammidico rilasciando L-fenilalanina e ocratossina α (500 volte meno tossica dell' ocratossina A)



Nella letteratura scientifica è descritta la degradazione dell' OTA, in proporzioni variabili, da parte di alcuni microrganismi:

- *Phenylobacterium immobile*
- *Acinetobacter calcoaceticus*
- *Sphingomonas*
- *Trichosporon mycotoxinivorans*
- *Aspergillus niger*

Il meccanismo di degradazione è analogo a quello della CPA, liberando L-fenilalanina e ocratossina α

Attualmente non esiste nessun trattamento biologico commercializzato per ridurre il contenuto di OTA in alimenti, bevande e mangimi.

Si aprono nuove prospettive

I risultati di un lavoro congiunto tra il CRA-ENO ed il CSIC di Madrid hanno mostrato la capacità di degradare al 100% l'OTA, da parte di specie del genere *Brevibacterium*, cioè batteri che già fanno parte della catena alimentare (utilizzati come starter nella maturazione di alcuni tipi di formaggio).



Studi sull'uva:

Progetto ALISAL

Alcuni risultati del workpackage 1

Il ruolo dei composti fenolici, in relazione alla varietà d'uva
e dell'oligalatturonide OGA come induttore di resistenza.



Varietà di uve prescelte

Cabernet sauvignon e Primitivo

(epoca di maturazione: medio - precoce)



Negroamaro

(epoca di maturazione: tardiva)

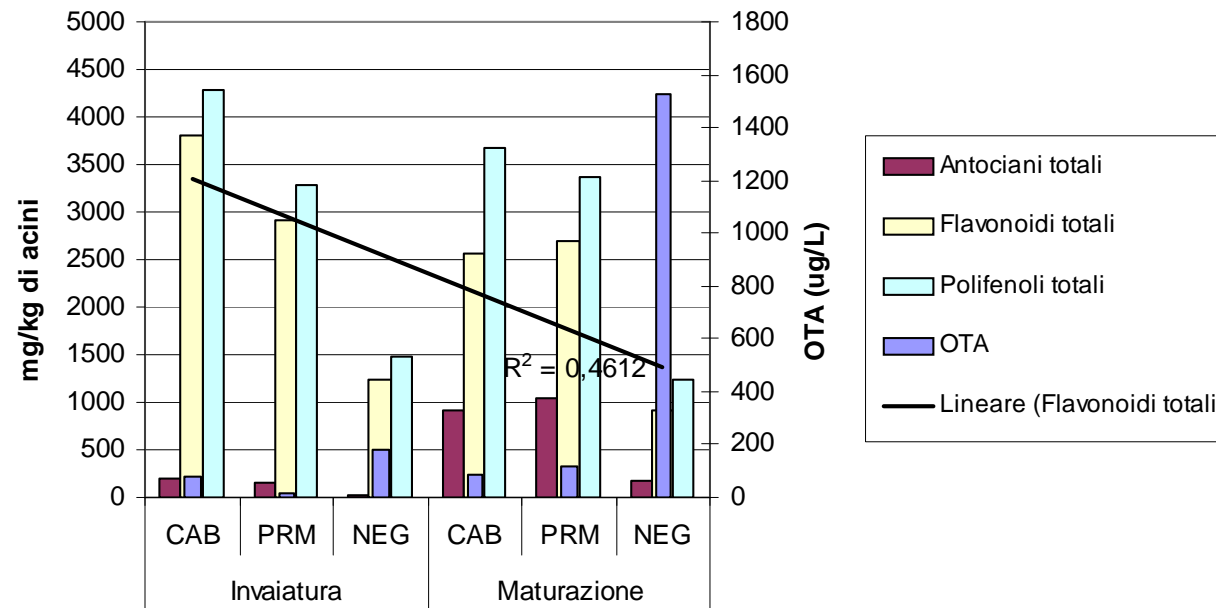


Sangiovese

(epoca di maturazione: medio - tardiva)

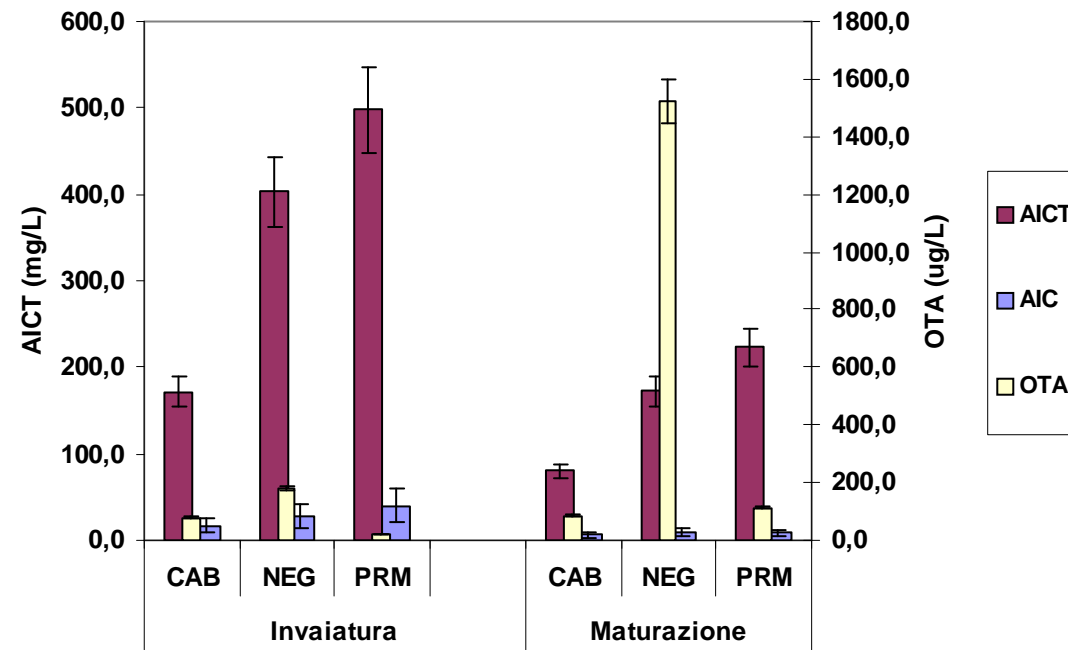


Relazione tra classi di sostanze fenoliche delle bucce e OTA prodotta



Esiste una moderata correlazione negativa tra contenuto di sostanze fenoliche delle bucce e produzione di Ocratossina A

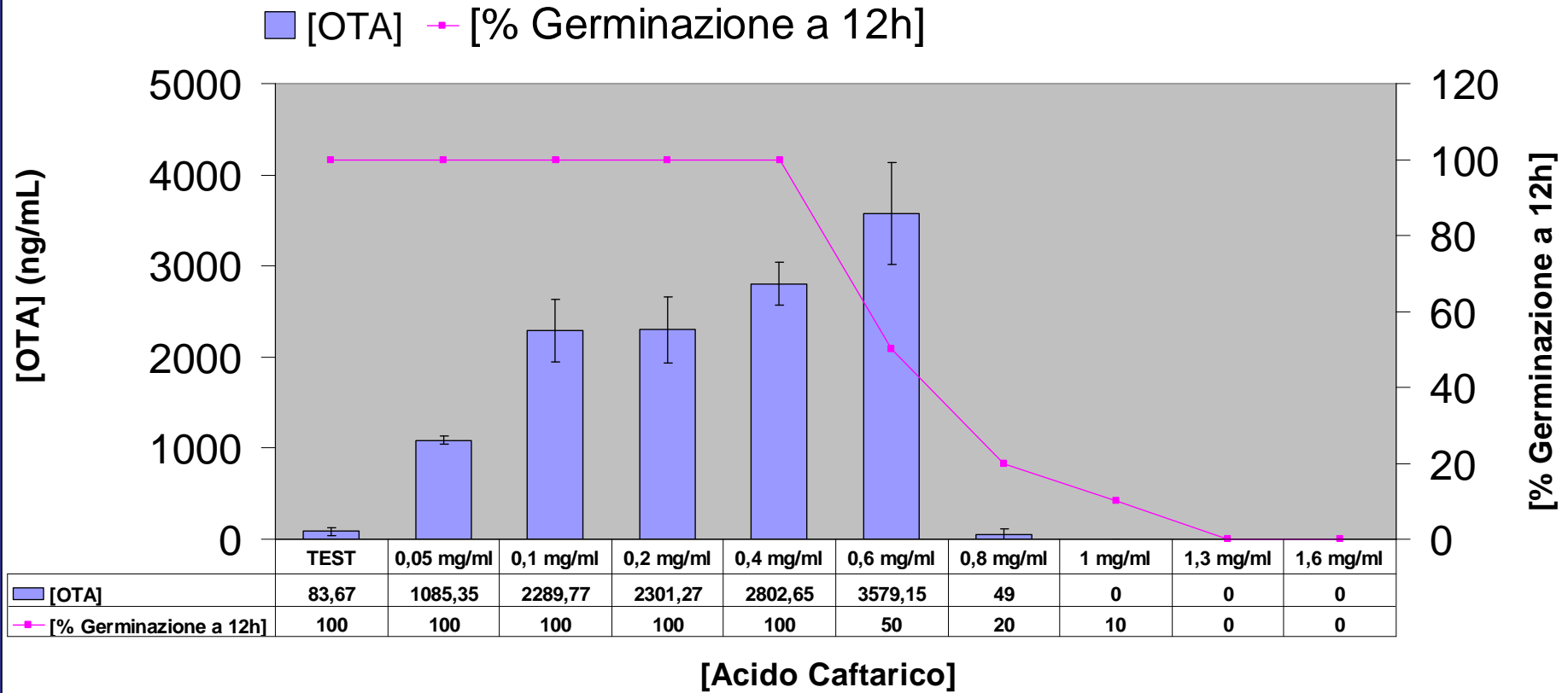
Relazione tra contenuto AICT delle bucce e OTA prodotta



Con la maturazione e la diminuzione del contenuto degli acidi idrossicinnamici, liberi o esterificati con l'acido tartarico, si osserva una maggiore produzione di OTA

Produzione di ocratossina A da parte di *A. carbonarius* su MM in presenza di concentrazioni crescenti di estratto di acidi idrossicinnamici

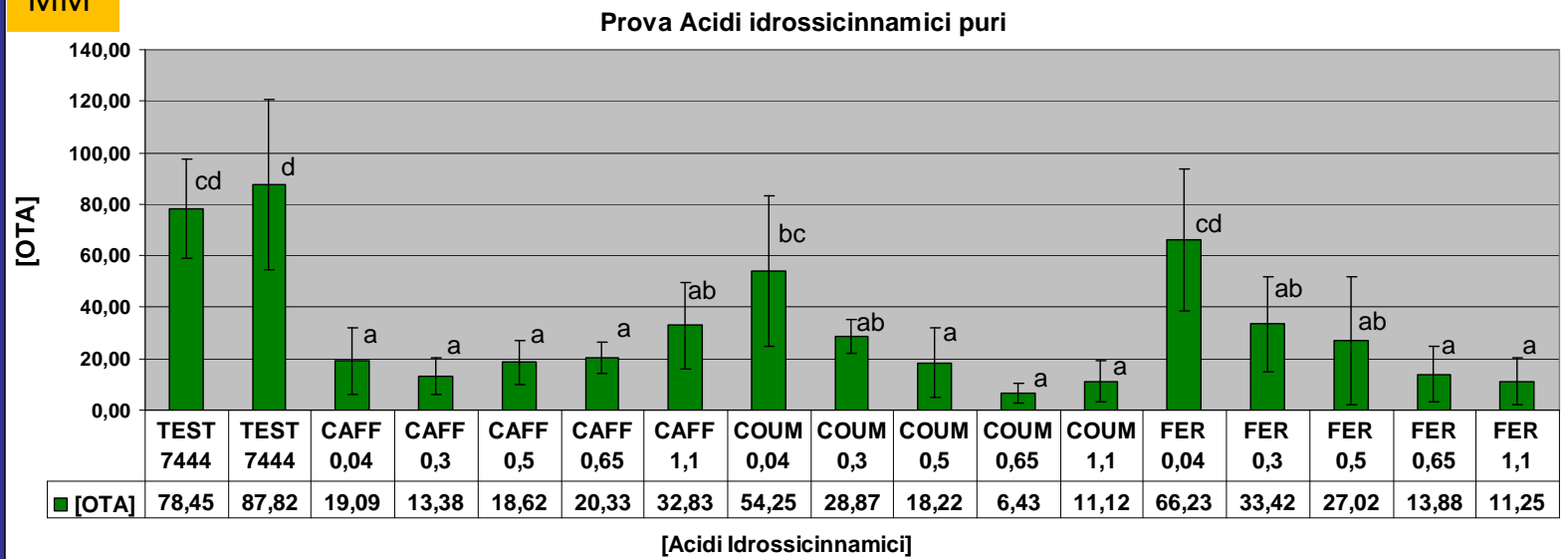
Prova Estratto Acidi Idrossicinnamici



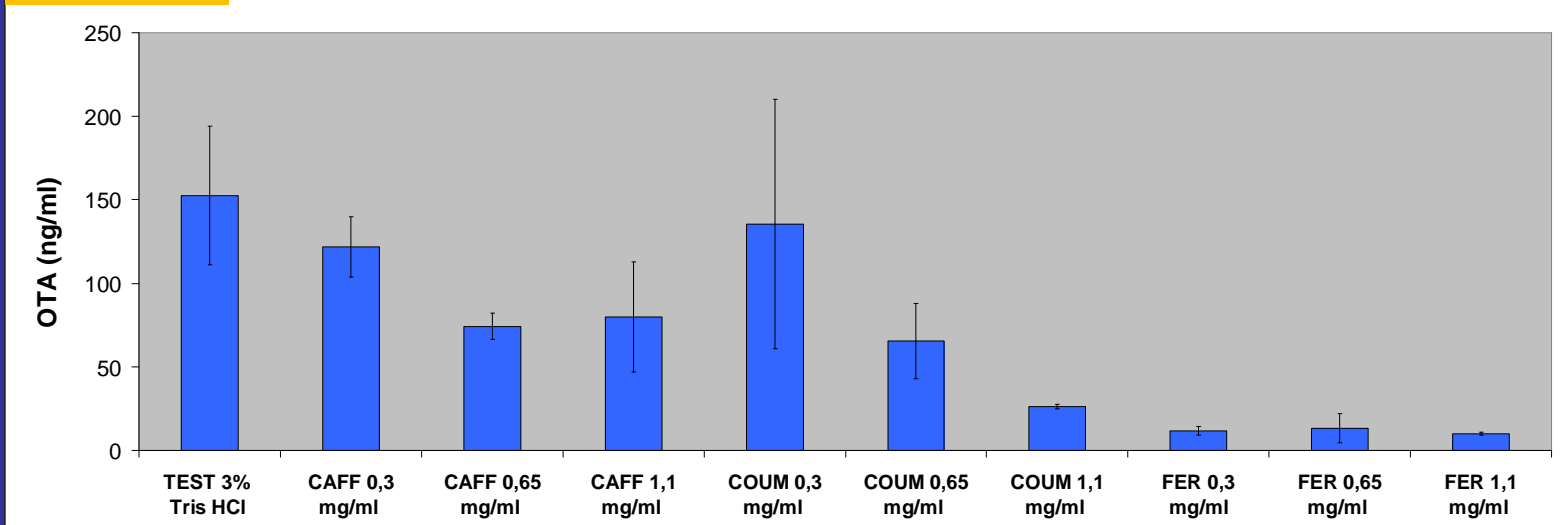
Prove con estratti di buccia contenenti AICT a concentrazioni > 0,8 mg/mL inibiscono la formazione del micelio, mentre a concentrazioni inferiori dimostrano di favorire la germinazione delle spore e stimolano il fungo a sintetizzare OTA.

Produzione di ocratossina A da parte di *A. carbonarius* su MM e su Succo d'uva

MM

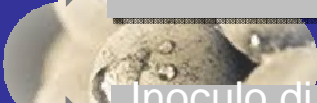


Succo d'Uva



Prove OGA su bacche d'uva in vitro 2010

→ 9 bacche in piena invaiatura delle 4 varietà in camera umida a 25 °C



→ Inoculo di *A. carbonarius* ITEM 7444 a 2×10^7 conidi/mL, 10 μ L x bacca dopo 24 h

A.	B.	C.
Sospensione di OGA a 0.5 mg/mL	Diverse modalità di applicazione OGA (goccia o immersione)	Sospensione di OGA a 1 e 2 mg/mL

Prove OGA su bacche d'uva in campo ed *in vitro* 2011.

Dopo le prove condotte nel 2010 su bacche d'uva in vitro, abbiamo testato l'oligalatturonide OGA in campo per prove di induzione di resistenza al fungo ocratossigeno *A. carbonarius*.



OGA 0,2 mg/mL



Dopo 24/48h trattamento *A. carbonarius*

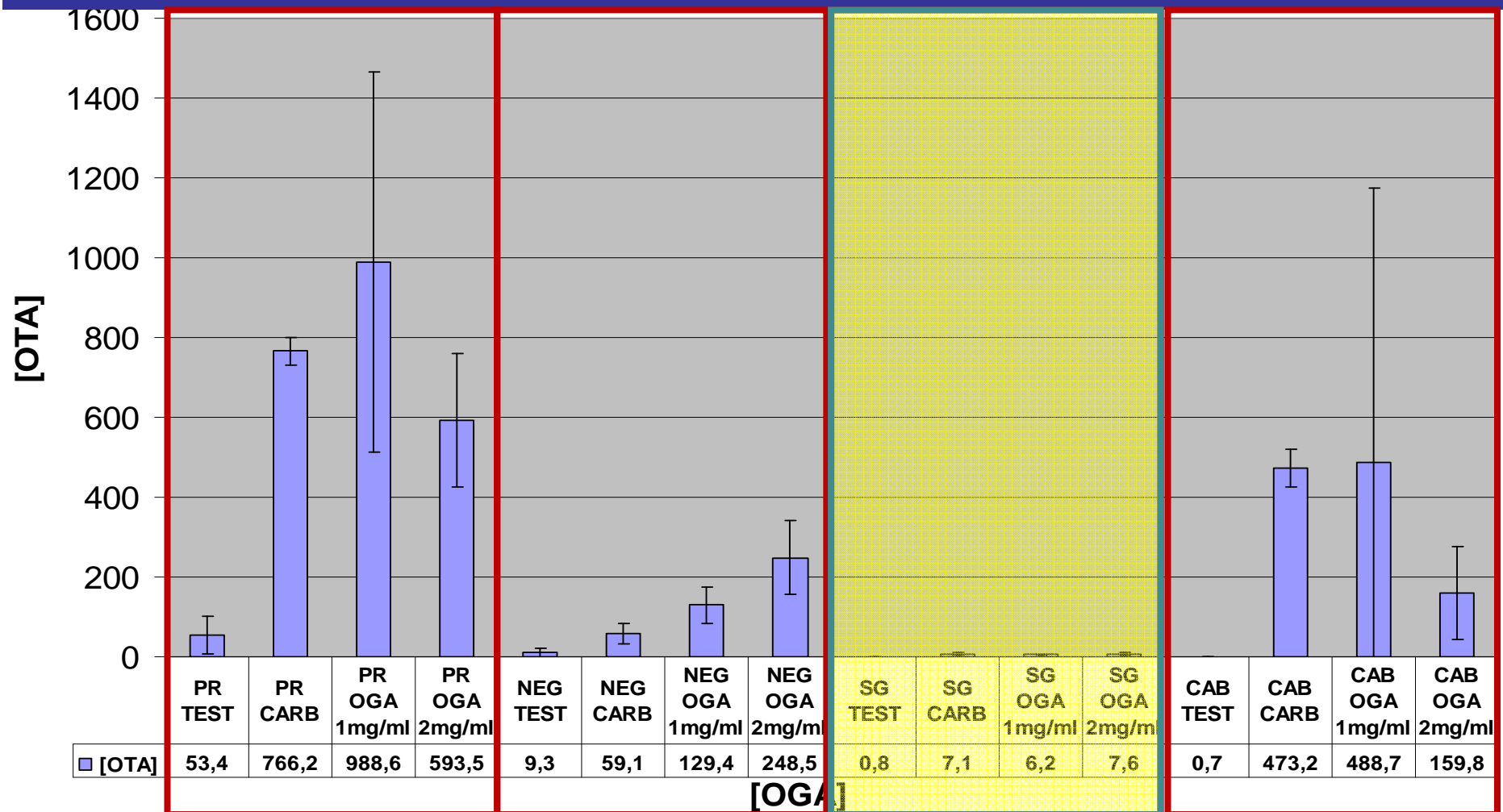


4 grappoli x pianta
(3 piante x tesi) x prova in campo



10 bacche x 3 repliche
prova *in vitro*

Produzione di ocratossina A da parte di *A. carbonarius* su bacche d'uva dopo pretrattamento con concentrazioni di 1 e 2 mg/ml di OGA



PR
primitivo

NEG-
negroamaro

SG
sangiovese

CAB
Cabernet s.

una ridotta suscettibilità alla contaminazione da *A. carbonarius* della cv Sangiovese

- I risultati conseguiti sulla caratterizzazione delle uve evidenziano una minore suscettibilità al patogeno nelle cv con maggiore contenuto in sostanze polifenoliche e durezza della buccia.
- Il Primitivo è in generale è risultata la varietà più suscettibile all'attacco del fungo ed alla contaminazione da OTA, tra le 4 cv considerate nelle prove CRA- VIT/UTV, mentre il Sangiovese è risultato resistente alla colonizzazione da *A. carbonarius* e OTA.
- Le prove con i composti Idrossicinnamici puri hanno evidenziato la capacità da parte di questi composti di agire in maniera specifica sull'inibizione della biosintesi di OTA. Sono in corso prove con estratti purificati per la frazione degli acidi idrossicinnamici e delle catechine per verificarne la differente attività.
- Le prove con l'uso di OGA mediante pretrattamento sia in campo, sia *in vitro* non hanno evidenziato alcun effetto nell'indurre resistenza ad *A. carbonarius* sulle bacche inoculate.

PROSEGUIMENTO DELLE RICERCHE

- Ruolo di alcuni composti fenolici, e della diversa suscettibilità varietale nell'interazione funghi ocratossigeni-vite e possibili applicazioni per una riduzione del rischio.
- Valutazione di composti fenolici come possibili inibitori della crescita del fungo e della biosintesi di OTA.
- Degradazione biologica dell'OTA



GRAZIE PER L'ATTENZIONE