

DOCUMENTO  
TECNICO

**\*Paola Battilani**  
**\*\*Amedeo Pietri**  
**\*\*\*Angela Silva**  
**\*\*\*\*Giordano Zinzani**

*\*Istituto di Entomologia e  
Patologia vegetale*

*\*\* Istituto di Scienze degli ali-  
menti e della Nutrizione*

*\*\*\* Istituto di Enologia e  
Ingegneria Alimentare,*

*Università Cattolica del Sacro  
Cuore - Piacenza*

*\*\*\*\* Caviro - Faenza*



Da sinistra:  
P. Battilani  
A. Silva

## OCRATOSSINA, DALLA VITE AL VINO CAUSE DI PRESENZA E POSSIBILI INTERVENTI DI DECONTAMINAZIONE

L'ocratossina A, dopo la segnalazione nel vino avvenuta nel 1995, ha assunto una notevole importanza per il settore vitivinicolo. È quindi necessario individuare i punti della filiera rilevanti per la sua formazione e i possibili interventi per minimizzarne la presenza, in vista dei limiti che la Commissione Europea intende fissare.

### Premessa

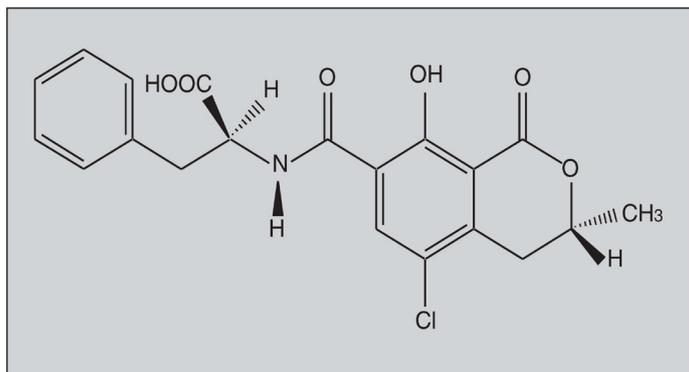
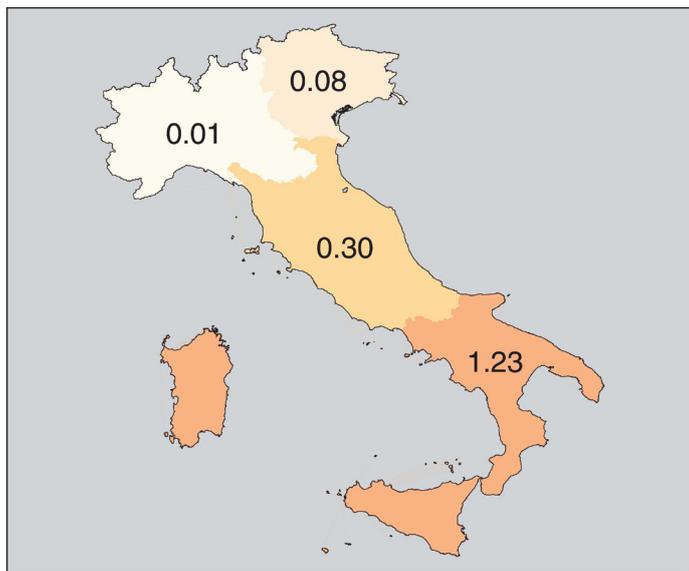
Nel 1996, in un'indagine condotta in Svizzera su campioni di vino e succhi d'uva provenienti da vari paesi, è stata rilevata, per la prima volta, la presenza di ocratossina A (OTA, Zimmerli e Dick, 1996; Fig. 1; Fig. 2). OTA è una potente nefrotossina per tutte le specie animali testate, ad eccezione dei ruminanti adulti; è cancerogena per i roditori e provoca effetti teratogeni, immunotossici e probabilmente an-

che neurotossici e genotossici. Inoltre, potrebbe essere implicata come fattore nella Nefropatia Endemica dei Balcani e nello sviluppo di tumori del tratto urinario nell'uomo. Nel 1993, lo IARC ha classificato l'OTA come possibile cancerogeno per l'uomo (gruppo 2B). Nel 1998, lo Scientific Committee on Food ha espresso il parere che sia prudente ridurre l'esposizione all'OTA il più possibile, in modo da portarsi verso il limite inferiore dell'intervallo di ingestione

giornaliera tollerabile (TDI) di 1,2-14 ng/kg di peso corporeo per giorno, ad es. sotto i 5 ng/kg di peso corporeo per giorno.

La presenza di OTA in diverse materie prime di origine agricola è stata ampiamente documentata in tutto il mondo; essa può essere presente in diversi prodotti di origine vegetale quali cereali, caffè, cacao, spezie, legumi e birra. La sua presenza è stata rilevata anche in prodotti di origine animale quali siero e rene di suino, insac-



**Fig. 1 - Formula di struttura dell'ocratossina A****Fig. 2 - Concentrazione media ( $\mu\text{g/L}$ ) di ocratossina A in vini rossi di differenti zone italiane**

(Pietri et al., 2001, modificata)

cati e altri prodotti alimentari derivati dal suino e nel sangue umano (FAO/WHO, 2001).

Dal 1996 sono state condotte varie indagini in diversi paesi europei e in Marocco, Giappone ed Australia, che hanno confermato la frequente presenza di OTA in prodotti derivati dell'uva e nel vino. E' stato osservato, inoltre, un gradiente sia su base geografica che in relazione al colore del vino; sia l'incidenza che la concentrazione di OTA sono risultate superiori nelle regioni dell'Europa meridionale, con un gradiente positivo nell'ordine bianco<rosè<rosso (Visconti et al., 1999; Otteneder e Majerus, 2000; Pietri et al., 2001).

L'ocratossina risulta al

momento l'unica micotossina segnalata nell'uva e nei suoi derivati.

L'intervallo dei livelli di OTA nel vino prodotto in Europa è risultato compreso tra 0 e circa 10  $\mu\text{g/l}$  e questa bevanda risulta essere il secondo alimento (dopo i cereali) nella classifica degli alimenti che apportano OTA alla nostra dieta.

Per l'analisi dell'OTA nei vini è disponibile un metodo validato a livello internazionale, che è stato adottato dal Comitato Europeo di Standardizzazione (CEN) come Standard Europeo (prEN 14133), dall'AOAC Association of Official Analytical Chemists) International (First Action AOAC Official Method 2001.01) e dall'OIV (Office International de la Vigne et du Vin) (Resolution OENO 16/2001) come metodo ufficiale (Visconti et al., 2001). Il metodo prevede la purificazione del campione su colonna di immunoaffinità e l'analisi mediante HPLC con rivelazione fluorimetrica.

## I funghi ocratossigeni

I funghi responsabili della presenza di ocratossina A (OTA) nei derivati dell'uva sono stati inizialmente considerati i medesimi dei cereali, *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium verrucosum*. Indagini svolte in vigneto hanno però riferito solo raramente la presenza di *A. ochraceus*, mentre *P. verrucosum* non è mai stato isolato. Frequenti sono invece gli aspergilli della sezione Nigri (Black Aspergilli-BA); si tratta di funghi caratterizzati dal produrre muffe di colore nero. A questa sezione appartengono diverse specie, difficili da distinguere osservandone solo i caratteri morfologici. A livello microscopico si possono individuare 2 gruppi, definiti uniseriati e biseriati (Fig. 3), e nell'ambito di quest'ultimo è relativamente semplice individuare una specie: *A. carbonarius* (Fig. 4). L'identificazione della specie è importante; infatti, *A. carbonarius*

è considerato il fungo più rilevante per la produzione di OTA, dato che la quasi totalità dei ceppi appartenenti a questa specie è in grado di produrre la tossina e generalmente in quantità rilevanti. Al contrario, tutte le altre specie hanno una percentuale di ceppi tossigeni nell'ordine di poche unità percentuali e ne producono quantità molto minori.

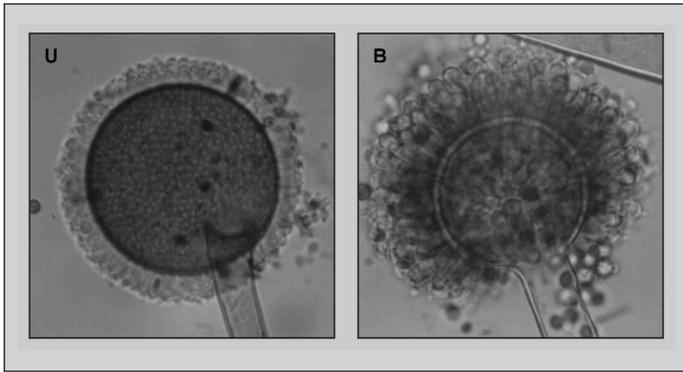
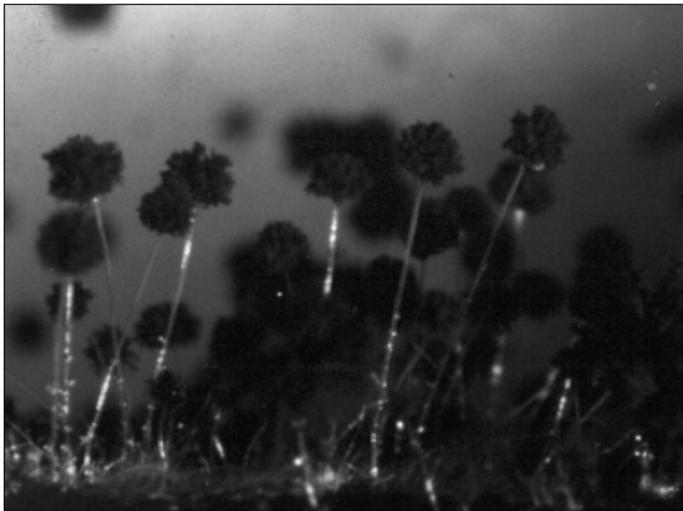
Sistemi innovativi e rapidi di identificazione di specie fungine produttrici di OTA sarebbero di valido aiuto per una diagnosi precoce di tali specie. Recentemente, sono stati messi a punto primers specifici per *A. carbonarius* isolati da uva al fine di realizzare uno strumento molecolare utile al rilevamento e identificazione di ceppi appartenenti a queste due specie (Perrone et al., 2004). Tali primers potrebbero essere di grande aiuto anche per ulteriori sviluppi di saggi di PCR da matrice vegetale. A tale riguardo, è stato messo a punto un saggio di real-time quantitative PCR per *A. carbonarius*, al fine di ottenere contemporaneamente una valutazione qualitativa e soprattutto quantitativa, permettendo quindi di misurare la portata dell'infezione.

## La produzione di OTA in vigneto

I BA si conservano nel terreno, sono presenti sui grappoli già dall'allegagione, ma la loro incidenza inizia ad essere rilevante solo all'invaia-tura; la presenza di questi funghi durante la fase di maturazione, a seconda delle aree geografiche e dell'andamento stagionale, può aumentare, come avviene in diversi paesi europei, o diminuire, come spesso avviene in Italia (Fig. 5).

OTA viene prodotta in vigneto; in genere è assente dai grappoli fino a inizio invaia-tura anche quando è presente in quantità rilevanti a maturazione. La presenza dei funghi non è necessariamente correlata a quella di OTA. La tossina può essere rilevata anche



**Fig. 3 - Conidiofori di uniseriati (U) e biseriati (B)****Fig. 4 - Sviluppo di *Aspergillus carbonarius* su acino di uva**

in grappoli privi di muffe nere visibili, ma in acini danneggiati, sia con danni meccanici che parassitari, e con muffe nere evidenti, il contenuto è normalmente maggiore.

L'ambiente gioca un ruolo di primo piano per questa problematica; infatti, l'area geografica e l'andamento climatico possono determinare la presenza o l'assenza di OTA. Monitoraggi svolti sul territorio europeo evidenziano una costanza delle aree in cui la tossina viene rilevata nei grappoli a maturazione, anche se vi sono annate in cui, anche in queste zone, OTA non viene rilevata nei campioni di grappoli.

Con riferimento al territorio italiano, il sud è certamente una zona a maggiore rischio, con differenze fra le annate. Ad esempio, nel 1999 sono stati trovati campioni di grappoli con contenuto eleva-

to di tossina, risultata assente in tutti i campioni analizzati nel 2000. L'andamento meteorologico è stato molto diverso in queste 2 annate, con piogge abbondanti nella prima, anche nella fase finale di maturazione, e assenza di piogge e temperature più elevate nella seconda. Anche il sistema colturale è importante, almeno in relazione alle varietà e alla forma di allevamento.

Riguardo ai fungicidi, è importante considerare che il controllo dello sviluppo della muffa non necessariamente limita la sintesi di tossina; infatti, dato che si ritiene che le micotossine siano sintetizzate dai funghi in condizioni di stress, i fungicidi possono anche esercitare un effetto stimolante. Al momento, gli unici fungicidi che hanno mostrato un'azione di controllo sia sul fungo che sulla tossina sono stati Fludioxonil e Cyprodinil usati in miscela. È opportuno sottolineare che la difesa fitosanitaria del vigneto, contro funghi e insetti, è importante. Infatti, in presenza di danni sulle bacche, il fungo ha maggiore sviluppo e il contenuto di tossina è decisamente superiore (Fig. 6).

La vendemmia e il trasferimento delle uve in cantina sono 2 momenti critici per la problematica dell'OTA. In questa ottica, la cernita delle uve e i tempi di sosta brevi prima della trasformazione, soprattutto in presenza di bacche contaminate, sono fondamentali.

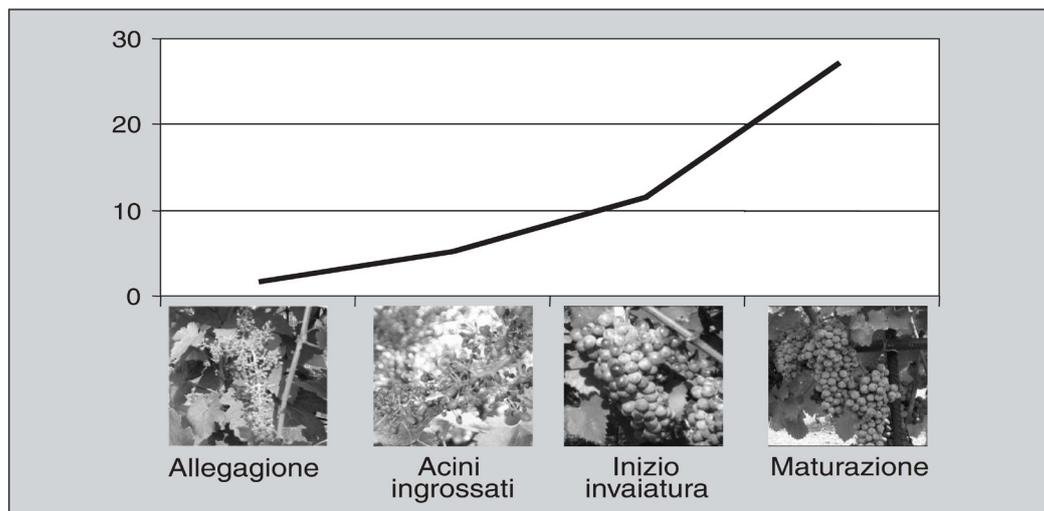
Come detto OTA viene sintetizzata in vigneto, quindi la prevenzione deve avvenire durante la coltivazione. Molteplici sono i fattori che intervengono nel determinare la presenza dei funghi responsabili, ma soprattutto la sintesi della tossina. Per questo il migliore approccio per gestire questa problematica consiste nella messa a punto di un Sistema di Supporto alle Decisioni (DSS), che consenta di organizzare tutte le informazioni disponibili al fine di guidare gli interventi colturali per minimizzare il rischio, in questo caso il rischio di presenza di OTA nei grappoli.

li. Alla base di un DSS c'è un modello previsionale, ossia un modello in grado di prevedere il comportamento del fungo in funzione di tutte le variabili che lo possono influenzare. La messa a punto di un modello previsionale richiede la definizione di relazioni quantitative tra le variabili che influenzano il fungo e la variabile risposta, ovvero la sua crescita e la sua attività metabolica. Questi dati al momento sono disponibili solo in parte, ma sono comunque in fase di acquisizione sia tramite prove in vitro che in vigneto. Una volta messo a punto, il modello, dovrà essere validato e per questo sono stati individuati dei punti critici di controllo (CCP), in particolare inizio invaiatura e maturazione, nei quali sarà necessario valutare lo stato delle bacche e la presenza di funghi ocratossigeni, si auspica con l'aiuto di metodi molecolari; a maturazione sarà necessario determinare anche la quantità di OTA.

## Destino dell'OTA in vinificazione

Attualmente non esistono limiti normati per il tenore di OTA nei vini, ma sono state emanate raccomandazioni sia da parte del Ministero Italiano delle politiche agricole che da parte dell'OIV (Office International de la vigne et du vin) che sollecitano il proseguimento delle ricerche per individuare misure di prevenzione e protezione atte ad evitare/ridurre la formazione di OTA nelle uve. In via provvisoria l'OIV ha stabilito, per i vini ottenuti a partire dalla vendemmia 2005, un contenuto massimo di OTA pari a 2 µg/L con la riserva di abbassare tale limite in base all'acquisizione di nuove conoscenze sui possibili interventi preventivi e correttivi.

Partendo dal presupposto che l'OTA è presente nel vino solamente quando l'uva risulta contaminata e che spesso gli interventi di buona pratica viticola non sono sufficienti ad evitare il problema, perlomeno in certe zone vita-

**Fig. 5 - Incidenza percentuale media di black aspergilli dall'allegagione alla maturazione****Fig. 6 - Sviluppo di *Aspergillus carbonarius* su acini danneggiati**

te quali le regioni centro-meridionali ed insulari, allo stato attuale risulta importante verificare quale influenza possa avere la pratica enologica sul livello di OTA del vino e quali strategie tecnologiche possono essere attuate per limitare la presenza di tale micotossina. In questo ambito il lavoro sviluppato nel progetto "Wine-ochra risk", finanziato dalla Comunità europea e coordinato dall'Università Cattolica del Sacro Cuore, ha lo scopo di seguire il destino dell'OTA in vinificazione e di individuare coadiuvanti in grado di ridurre il livello della tossina nel mosto e nel vino.

I risultati ottenuti fino ad oggi chiariscono in parte il destino dell'OTA in vinifica-

zione e consentono di tracciare alcune strategie di intervento per la riduzione del contenuto di OTA originariamente presente nei mosti.

In particolare le fasi della vinificazioni considerate sono la pigiatura, la macerazione, la fermentazione alcolica e la fermentazione malo-lattica. Se la pigiatura è l'operazione che determina il passaggio dell'OTA nel mosto almeno per l'80%, la macerazione nelle prime fasi può contribuire per l'altro 20% nella vinificazione in rosso. Tale comportamento indica che il livello massimo di OTA si ha nelle prime fasi della lavorazione delle uve e che la micotossina viene solubilizzata in tempi relativamente rapidi. Gli stadi successivi della la-

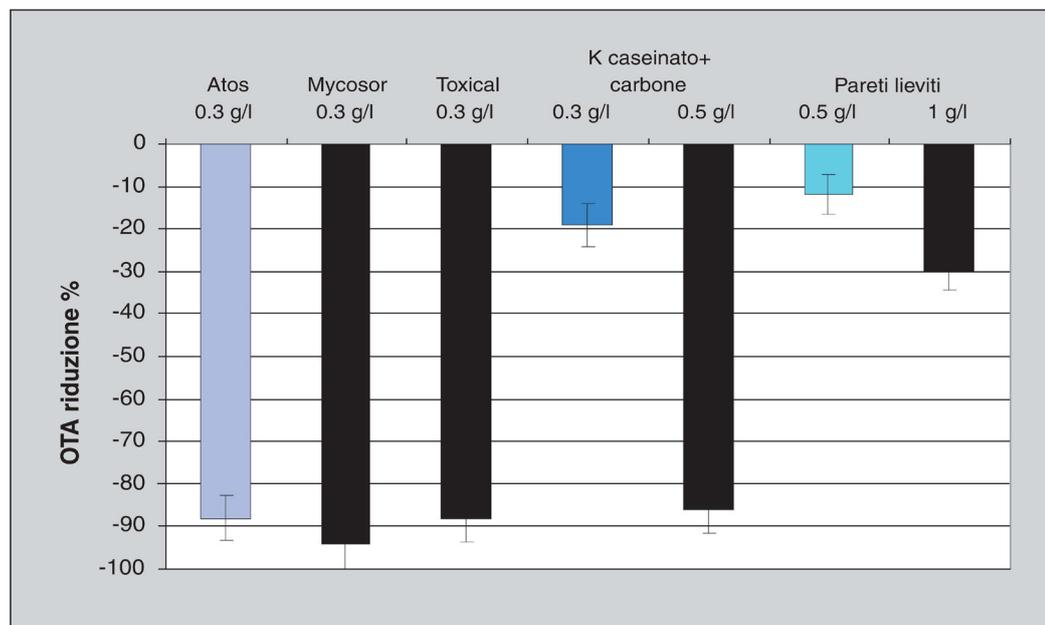
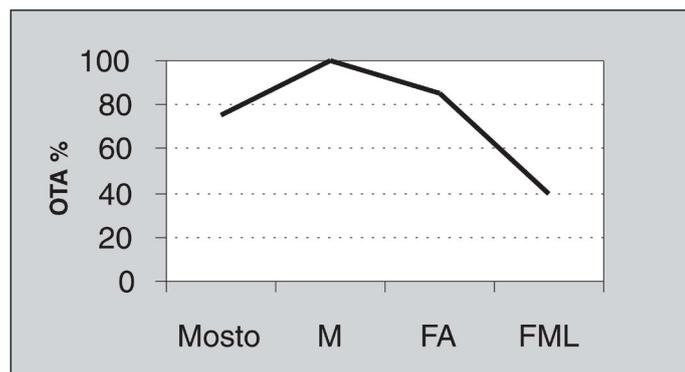
vorazione portano ad una riduzione del livello di OTA nei vini rossi. In particolare la fermentazione malo-lattica causa un abbattimento, anche rilevante, del contaminante (Fig. 7). Diversi ceppi di batteri lattici sono in grado di diminuire la concentrazione della tossina con cinetiche differenti in relazione alla composizione del substrato e con percentuali di degradazione che sono in relazione al ceppo ed al contenuto di OTA presente. Il meccanismo di azione dei batteri lattici nei confronti dell'OTA (adsorbimento e/o degradazione) è in fase di approfondimento.

## Interventi correttivi

Per quanto concerne gli interventi correttivi con alcuni coadiuvanti chimici, essi possono rappresentare un valido strumento di controllo del tenore di OTA nei mosti e soprattutto nei mosti bianchi, ma necessitano di molta attenzione nel caso dei vini ed in particolare dei vini rossi. Infatti la maggior parte dei coadiuvanti di uso comune in enologia (bentonite, gelatina, pareti cellulari di lievito, ecc.) è poco efficace nel determinare una reale riduzione di OTA, mentre i formulati attivi in tale direzione sono per lo più a base di carbone vegetale. L'uso di coadiuvanti contenenti carbone vegetale pone, però, alcuni problemi legati all'alta affinità di tale sostanza per i composti polifenolici che determinano il colore del vino. Se tale adsorbente è utilizzato a basse concentrazioni i nostri risultati indicano che il trattamento non determina modifiche sostanziali del profilo polifenolico e del colore dei vini rossi. La problematica può diventare rilevante quando i tenori di OTA sono elevati e richiedono alti livelli di coadiuvante che causano una perdita importante di pigmenti. Altri adsorbenti sono attualmente allo studio nell'ambito delle strategie correttive soprattutto per i vini rossi (Fig. 8).

Le conoscenze acquisite



**Fig. 8 - Effetto di alcuni adsorbenti sul tenore di ocratossina A nel vino****Fig. 7 - Andamento dell'ocratossina A in vinificazione**

mediante la ricerca mettono in luce che è sicuramente importante, soprattutto nelle zone a rischio, controllare la concentrazione di OTA nel mosto e durante la macerazione, perché ciò consente di verificare la contaminazione e di prevedere il livello di OTA nel vino giovane. Il problema riguarda particolarmente i vini rossi, in quanto nel caso dei vini bianchi la contaminazione è certamente minore già a livello di mosto ed i trattamenti di chiarifica del mosto, abbinati all'uso dell'anidride solforosa, provocano un'ulteriore riduzione del tenore di OTA. Per i mosti bianchi il controllo dell'OTA è, comunque, altrettanto importante perché nel caso di livelli elevati di OTA si può program-

mare un trattamento con formulati a base di carbone vegetale in fase di illimpidimento del mosto stesso.

Gli studi illustrati sono stati svolti nell'ambito del progetto finanziato dalla comunità europea, V° programma quadro, dal titolo "Risk assessment and integrated ochratoxin A (OTA) management in grape and wine", acronimo WINE-OCHRA RISK, a cui partecipano 12 gruppi, appartenenti a 7 diversi paesi ([www.ochra-wine.com](http://www.ochra-wine.com)).

## Bibliografia

Battilani P, Giorni P, and Pietri A (2003), 'Epidemiology of toxin producing fungi and ochratoxin A occurrence

in grape', Eur J Plant Pathol, 109, 715-722.

Battilani P, Pietri A, Bertuzzi T, Formenti S, Barbano C, Languasco L (2003), 'Effect of fungicides on ochratoxin producing black aspergilli', J Plant Path, 85 (4) Special issue, 285 (Abstract).

Battilani P, Pietri A, Giorni P, Bertuzzi T and Barbano C, (2003), 'Growth and ochratoxin A production of *Aspergillus* section *Nigri* isolates from Italian grapes', in Bryson RJ, Kennedy R, Magan N and Scudamore KA, Aspects Appl Biol, 68, Mycotoxin in food production systems, 175-180.

Battilani P, Pietri A, Bertuzzi T, Languasco L, Giorni P and Kozakiewicz Z (2003), 'Occurrence of ochratoxin A producing fungi in grapes grown in Italy, J Food Prot, 66 (4), 633-636.

Battilani P, Pietri A, Silva A and Giorni P (2003), 'critical control points for ochratoxin a control in the grapevine chain, J Plant Path, 85 (4) Special issue, 285 (Abstract).

Otteneder H and Majerus P (2000), 'Occurrence of ochratoxin A in wines: influence of the type of wine and its geographical origin. Food Addit Contam, 1 (9), 793-798.

Pietri A, Bertuzzi T, Pallaroni L and Piva G (2001), 'Occurrence of ochratoxin A in Italian wines', Food Addit Contam, 18 (7), 647-654.

Silva A, Galli R, Grazioli B, and Fumi MD (2003), 'Metodi di riduzione di residui di ocratossina A nei vini', Symposium "La difesa anti-parassitaria nelle industrie alimentari e la protezione degli alimenti", Piacenza, Italy, 18 th -20 th 2002, in: Industria delle Bevande, 32, 467-472.

Visconti A, Pascale M and Centonze G (1999), 'Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and HPLC', J Chromatogr A, 864, 89-101.

Zimmerli B and Dick R (1996), 'Ochratoxin A in table wine and grape-juice: occurrence and risk assessment', Food Addit Contam, 13 (6), 655-668.

