



*Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroalimentari
(DiSTA)
Facoltà di Agraria*

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOTECNOLOGIE DEGLI ALIMENTI
XIX CICLO

**“RIMOZIONE DI OCRATOSSINA A IN UN VINO
MODELLO MEDIANTE PROTEASI ACIDE”**

SSD AGR/15

Coordinatore del Dottorato:
Prof. Ing. Mauro Moresi

Tutor:
Prof. Marco Esti

Tesi di Dottorato di:
Dott.ssa Tiziana Fabianelli

ANNO ACCADEMICO 2005-06

INDICE

1. RIASSUNTO	1
1. ABSTRACT	3
2. INTRODUZIONE	5
2.1 <i>Le micotossine</i>	5
2.2 <i>L'ocratossina A (OTA)</i>	10
2.2.1 <i>L'ocratossina A nell'uva e nei suoi derivati</i>	12
2.3 <i>Incidenza geografica dell'ocratossina A</i>	15
2.4 <i>L'ocratossina A e i suoi derivati: struttura chimica</i>	17
2.5 <i>Effetti tossici dell'OTA: studi epidemiologici e sperimentali</i>	18
2.6 <i>Limiti di legge dell'OTA nei derivati dell'uva</i>	19
2.7 <i>Riduzione del contenuto di OTA nel vino</i>	20
2.8 <i>Impiego di proteasi acide in enologia</i>	25
2.9 <i>Meccanismi d'azione degli enzimi selezionati</i>	26
2.9.1 <i>Proteasi aspartica</i>	26
2.9.2 <i>Proteasi cisteinica</i>	28
3. SCOPO DEL LAVORO	30
4. MATERIALI E METODI	32
4.1 <i>Prove di caratterizzazione dei preparati enzimatici</i>	32
4.1.1 <i>Attività proteasica</i>	32
4.1.1.a <i>Dosaggio delle proteine</i>	32
4.1.2 <i>Stabilità enzimatica</i>	33
4.1.2.a <i>Dosaggio dei polifenoli totali</i>	35
4.1.3 <i>Effetto degli enzimi sul colore del vino rosso</i>	35
4.2 <i>Prove di degradazione dell'ocratossina A</i>	36
4.2.1 <i>Thin layer chromatography (TLC)</i>	36
4.2.2 <i>Analisi spettrofotometriche</i>	37
4.2.3 <i>HPLC-FL</i>	38
5. RISULTATI E DISCUSSIONE	39
5.1 <i>Attività enzimatica dei preparati enzimatici</i>	39
5.2 <i>Stabilità dei preparati enzimatici</i>	39
5.2.1 <i>Proteasi aspartica</i>	39
5.2.1.a <i>Effetto di pH e temperatura sull'attività enzimatica</i>	39
5.2.1.b <i>Effetto dell'etanolo sull'attività enzimatica</i>	42

5.2.1.c Effetto del metabisolfito di potassio sull'attività enzimatica	43
5.2.1.d Effetto di tannini procianidinici delle bucce e dei vinaccioli sull'attività enzimatica...	45
5.2.2 Proteasi cisteinica	47
5.2.2.a Effetto di pH e T sull'attività enzimatica	47
5.2.2.b Effetto dell'etanolo sull'attività enzimatica	49
5.2.2.c Effetto del metabisolfito di potassio sull'attività enzimatica	51
5.2.2.d Effetto di tannini procianidinici delle bucce e dei vinaccioli sull'attività enzimatica nel tempo	53
5.3 Effetto sul colore delle due proteasi acide	55
5.3.1 Proteasi aspartica	55
5.3.2 Proteasi cisteinica	56
5.4 Prove di degradazione dell'ocratossina A	58
5.4.1 Analisi in Thin Layer Chromatography (TLC)	58
5.4.2 Analisi spettrofotometrica	59
5.4.3 Analisi in HPLC-FL	65
5.4.3.a Rimozione di OTA mediante proteasi aspartica	65
5.4.3.b Rimozione di OTA mediante proteasi cisteinica	68
6. CONCLUSIONI	72
7. BIBLIOGRAFIA	73
7.1 SITOGRAFIA	77

1. RIASSUNTO

Questa tesi di dottorato ha riguardato lo studio di proteasi acide food-grade una di origine microbica (proteasi aspartica, EC 3.4.23.18) ed una di origine vegetale (proteasi cisteinica, 3.4.4.24) utilizzate per la degradazione di ocratossina A (OTA), aggiunta ad un vino modello (tampone tartarico a pH 3.2 ed etanolo al 12%vol).

Il lavoro di ricerca è stato suddiviso in due parti: una di caratterizzazione ed una di impiego delle proteasi acide selezionate per la detossificazione del vino sintetico dall'OTA.

❖ In una prima fase sono state selezionate dal commercio due proteasi acide sulla base del loro optimum di pH e della capacità di idrolizzare il legame peptidico R-phe. L'attività proteolitica dei due enzimi è stata studiata, in funzione di diversi pH (3.2-3.5-3.8), temperature (25-35-40 °C), concentrazioni di etanolo (fino al 12 %vol.), in presenza di metabisolfito (fino a 100 mg/l) e di tannini procianidinici dei vinaccioli e delle bucce d'uva (da 0.5 a 2 g/l). E' stato, inoltre, valutato l'effetto sul colore di un vino rosso delle aggiunte di concentrazioni crescenti dei due enzimi.

La proteasi aspartica è risultata più stabile di quella cisteinica alle condizioni chimico-fisiche testate. In particolare il pH, la temperatura, l'etanolo e il metabisolfito di potassio non hanno influenzato l'attività enzimatica della proteasi microbica nelle prime 2h, contrariamente a quanto osservato per la proteasi vegetale. La presenza di tannini delle bucce e soprattutto dei vinaccioli hanno, invece, ridotto in misura significativa l'attività proteolitica di entrambi i preparati. In 24h, comunque, gli enzimi si inattivavano indipendentemente dalle condizioni del mezzo sintetico.

❖ Il monitoraggio del decremento di OTA, indotto dalle proteasi acide, è stato effettuato con metodiche analitiche diverse quali: TLC, spettrofotometria e HPLC con rivelazione fluorimetrica (HPLC-FL). La variazione del contenuto della micotossina è stata esaminata in funzione della concentrazione di enzima, del tempo e delle condizioni di agitazione.

▪ Nelle prove in TLC il calo di concentrazione di OTA, in funzione del tempo di contatto proteasi aspartica-tossina, è stato seguito osservando l'area e l'intensità della fluorescenza delle macchie alla luce UV. Non è stata, comunque, effettuata una quantificazione della micotossina.

- Per le prove spettrofotometriche è stata effettuata una scansione da 250 a 450 nm della miscela di reazione costituita da proteasi aspartica e OTA, ed è stato monitorato il decremento di tossina a 330 nm.

Il decremento di OTA, registrato nella prova condotta in assenza di agitazione, è stato pari al 20% dopo 20 ore, mentre in condizioni di agitazione continua (400 rpm), ha raggiunto il 38% dopo 24h.

- Nelle prove condotte in HPLC-FL, le due proteasi acide ed il substrato sono stati sciolti in provette da 40-ml mantenute a 35°C, in condizioni di continua agitazione (400 rpm). L'attività idrolitica nel tempo è stata analizzata a differenti concentrazioni di enzima ed OTA.

Entrambi gli enzimi hanno mostrato attività degradativa nei confronti della micotossina. La proteasi aspartica, sebbene più stabile alle condizioni chimico-fisiche testate, è risultata, comunque, meno efficace di quella cisteinica. Il calo massimo di OTA osservato in presenza di proteasi vegetale è stato, infatti, del 70% a fronte del 30% ottenuto con la proteasi microbica.

1. ABSTRACT

This PhD thesis was aimed at studying ochratoxin A (OTA) removal in a model wine (tartaric buffer at pH 3.2 and ethanol 12%vol) by using two commercial acid proteases of GRAS microbial (aspartic protease, EC 3.4.23.18) or vegetable (cysteinic protease, EC 3.4.4.24) origin. This work reports the main results of the following two activities directed to:

1. Screening and characterization of the activity of acid microbial and vegetable proteases in a model wine solution;
2. OTA degradation by means of the two enzymes in model wine solution.

❖ For the characterization trials, the enzymatic activity of two acid proteases was tested in function of different pH (3.2, 3.5, 3.8), and temperatures (25, 35, 40 °C), ethanol concentrations (until 12%vol.), in presence or no of potassium-metabisulfite (until 100 mg/l) and grape tannins of seeds and of skin (0, 5-2 g/l), to reproduce the physical-chemical conditions of wine.

The effect of two proteases on red wine colour was tested too, adding different concentrations (from 20 to 2000 mg/l) of two enzymes.

Aspartic protease was more stable than cysteinic one. In fact, temperature, pH, ethanol and $K_2S_2O_5$, did not influence protease aspartic activity in short time such as the cysteinic protease. Both proteolytic activity were negatively influenced by tannins. The two enzymes showed a total inactivation in 24h.

❖ For degradation trials, OTA decrement was assessed with three different analytic methods (TLC, spectrophotometric analysis and HPLC-FL), as a function of enzyme concentration, time and stirring conditions.

- In TLC trials the OTA degradation, as function of reaction time with aspartic protease, was observed by the decreasing of spot fluorescence brought UV light.

- With spectrophotometric analysis the OTA decrease, in presence of aspartic protease, was monitored at 330 nm, as well as the corresponding spectra in the range from 250 to 450 nm.

It was revealed a decrease in OTA of about 20% in 20 hours, without stirring conditions and of about 38% after 24 hours under stirring conditions.

- In the trials lead to study OTA degradation in presence of both enzymes, with HPLC-FL, all dispersions were poured in 40-ml flasks kept at

35°C under stirring condition (400 rpm). The time course of hydrolytic activity was assessed at different enzyme and OTA concentrations.

Both the acid proteases tested were able to remove the OTA added to a model wine. Cysteinic acid protease resulted more active than the aspartic one, their corresponding OTA reduction yields being about 70 and 30%, respectively.

2. INTRODUZIONE

2.1 Le micotossine

Le micotossine sono molecole a basso peso molecolare, prodotte naturalmente e in minime quantità dal metabolismo secondario di alcune specie di funghi parassiti, appartenenti principalmente ai generi *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*.

Le derrate alimentari più facilmente contaminate da tali funghi sono rappresentate dalle granaglie quali mais, riso, orzo e frumento, semi oleaginosi (arachidi, girasoli etc.), frutta secca e legumi, spezie, cacao, caffè e tè verde ed ancora frutta e verdura e mangimi per animali, soprattutto se immagazzinati in condizioni microclimatiche di umidità e temperatura favorevoli (Bottalico, A. et al. 1988). Anche i prodotti di origine animale come latte e formaggi, e vino e birra se provenienti da materie prime contaminate, possono risultare a rischio.

Tra i funghi produttori di micotossine, alcuni sono in grado di sintetizzare più tossine e al contempo, una stessa tossina può essere prodotta da diversi funghi, che possono crescere e svilupparsi sui prodotti alimentari di origine vegetale durante ogni stadio del ciclo produttivo, in campo o nella fase di immagazzinamento e trasformazione in alimenti finiti. La presenza delle micotossine non è strettamente correlata alla contemporanea presenza fisica del fungo, in quanto esse possono persistere anche dopo la scomparsa del produttore. La qualità e la quantità della produzione delle tossine sono influenzate da diversi fattori ambientali e non quali: la presenza di acqua libera, l'umidità, la temperatura, il pH e l'eventuale utilizzo di agenti biocidi in aree coltivate (Ritieni e Randazzo, 1997).

Le micotossine presentano sia notevoli differenze da un punto di vista chimico, sia un'ampia gamma di effetti biologici dovuti alla loro capacità di interagire con differenti organi e/o sistemi bersaglio. Le differenti attività biologiche manifestate dalle micotossine nei vari organismi sono causate da interazioni delle stesse e/o dei loro derivati con le diverse molecole cellulari, quali: DNA, RNA, proteine funzionali, cofattori enzimatici e costituenti di membrana.

Esse sono in grado di produrre effetti tossici acuti e possono risultare cancerogene, genotossiche, teratogene, mutagene, nefrotossiche, epatotossiche ed immunodepressive nei confronti degli animali e dell'uomo. Evidenziano diversi

tipi di tossicità in dipendenza della dose, dell'organo interessato, del sesso, dell'età e della specie (Kuiper-Goodman, 2004). Il rischio maggiore risiede nell'accumulo delle stesse all'interno degli organismi viventi con eventuale insorgenza di sintomatologie di tipo cronico (Berry, C.L.; et al. 1988).

Esiste un rischio reale di intossicazione da micotossine per l'uomo, anche alla luce dei risultati di alcune indagini epidemiologiche condotte su popolazioni di aree geografiche più a rischio, che evidenziano una significativa correlazione positiva tra la presenza di micotossine nella dieta e l'incidenza di alcune malattie endemiche [World Helath Organization (WHO)/ International Agency for Cancer Research (IARC), 2003]

L'esposizione dell'uomo alle micotossine può verificarsi principalmente attraverso il consumo di alimenti di origine vegetale contaminati, ma anche latte e suoi derivati, carne e insaccati provenienti da animali alimentati con mangimi contaminati.

La perossidazione lipidica, l'alterazione di struttura e funzione della membrana, l'apoptosi (induzione di morte programmata delle cellule), l'inibizione della sintesi di DNA, RNA e proteine, l'immunosoppressione, l'epatotossicità, la nefrotossicità, la neurotossicità e la genotossicità. sono considerati le maggiori conseguenze delle micotossicosi (Surai, 2002). I dati sperimentali mostrano che le proprietà delle micotossine possono determinare la loro tossicità attraverso l'incorporazione delle micotossine stesse nella struttura della membrana con conseguenti effetti nocivi come l'alterazione della composizione in acidi grassi e la perossidazione dei PUFA di membrana. Vengono danneggiati i recettori causando alterazioni a livello dei messaggeri secondari e inattivazione degli enzimi di membrana. Le risultanti alterazioni nella permeabilità e flessibilità della membrana inducono cambiamenti a livello biochimico e di funzioni fisiologiche, inclusi crescita, sviluppo e riproduzione (Surai & Dvorska, 2005).

Anche il consumo prolungato di piccole quantità di micotossine può risultare in danni al sistema immunitario e diminuzione della resistenza alle malattie infettive; diversi studi hanno infatti dimostrato che l'immunosoppressione coinvolge animali che ingeriscono micotossine anche a livelli inferiori a quelli che causano tossicità evidente (Corrier, 1991; Richard et al., 1978).

Attualmente si conoscono oltre 400 micotossine, ma il loro numero è in continuo aumento. In realtà quelle più frequenti e più tossiche sono soltanto una decina. Tra queste, ce ne sono alcune molto pericolose come le note aflatossine, che sono state catalogate dall'agenzia internazionale per la ricerca sul cancro (IARC) tra le sostanze sicuramente cancerogene (Tab. 1: effetti tossici delle micotossine).

Le principali micotossine che sono all'attenzione dell'Autorità Sanitaria preposta alla tutela della salute pubblica sono le aflatossine, l'ocratossina A (OTA), lo zearalenone, le fumonisine, i tricoteceni e la patulina (TECNOALIMENTI S.C.P.A.- 2006).

- Le aflatossine, sono le micotossine più pericolose per la salute umana ed animale, sono prodotte dalle specie *Aspergillus Flavus* (aflatossine B1 e B2) e *A. parasiticus* (aflatossine B1, B2, G1 e G2). Esse possono ritrovarsi in numerosi prodotti alimentari, quali semi oleosi, granaglie, frutta secca e spezie, soprattutto se originari dei paesi tropicali e subtropicali. Il latte e i prodotti lattiero caseari possono contenere aflatossina M1, cioè il 4-idrossi derivato dell'aflatossina B1, presente nei mangimi contaminati.

I livelli massimi ammissibili di Aflatossine nei prodotti destinati all'alimentazione umana e in quelli destinati agli animali vengono regolamentati rispettivamente dal Reg. (CE) 2174/2003, dal Reg. 683/2004, dal Reg. (CE) 472 2002.

- I tricoteceni (deossinivalenolo o vomitossina, nivalenolo, tossina T2), micotossine largamente distribuite negli alimenti, soprattutto nei cereali, quali mais, orzo e frumento, sono prodotte da alcune specie di *Fusarium*, quali *F. graminearum*, *culmorum*, *crookwellense*. Queste specie sono importanti agenti di fusariosi dei cereali che si sviluppano prevalentemente in zone temperate (10-30 °C), con condizioni ambientali di elevata umidità relativa. La tossina T2 è un tricotecene con elevata tossicità, prodotto principalmente da *Fusarium sporotrichioides*, una specie fungina dotata di debole attitudine parassitaria e che si sviluppa poco nei cereali in campo. A differenza del deossinivalenolo e del nivalenolo questa tossina è molto meno diffusa nelle derrate alimentari e costituisce un problema solo per granaglie umide lasciate in campo in autunno o per le varietà invernali.

- Gli zearalenoni (zearalenone e zearalenolo), sono prodotti da alcune specie di *Fusarium*, quali *F. graminearum*, *culmorum* e *crookwellense* in condizioni

ambientali simili a quelle che favoriscono la sintesi di deossinivalenolo, quali elevata umidità relativa dell'aria e temperature comprese tra 10 e 30°C. Per questa ragione spesso si ritrovano negli stessi campioni contaminati da deossinivalenolo, in particolare mais e frumento.

- Le fumonisine costituiscono un gruppo di metaboliti tossici di recente scoperta e caratterizzazione, prodotte da funghi del genere *Fusarium*, in particolare da *F. verticilloides* e *proliferatum*. Esse risultano le micotossine più frequentemente ritrovate nel mais e in alimenti e mangimi a base di mais in ogni parte del mondo. Tra le fumonisine identificate come contaminanti naturali del mais, la fumosina B1 è la più abbondante e la più tossica, seguita dalle fumonisine B2 e B3.

I limiti legali per le fumonisine sono stabiliti dal Reg. (CE) 856/2005 che, modificando il Reg. (CE) 466/2001, stabilisce i nuovi limiti di legge per le *Fusarium*- tossine nei cereali destinati al consumo umano.

- La Patulina è una micotossina prodotta da funghi appartenenti ai generi *Penicillium*, *Aspergillus* e *Byssosclamyces*. Le fonti principali della tossina sono i prodotti derivati dalle mele, anche se la tossina può comparire in molti frutti, chicchi ed in altri alimenti ammuffiti. La presenza di Patulina è solitamente limitata alle parti ammuffite del frutto ed il livello di contaminazione è generalmente correlato al livello di ammuffimento. La Patulina è resistente ai processi di lavorazione industriali della frutta per cui le produzioni da questi derivanti costituiscono le principali fonti di assunzione. I prodotti fermentati invece sono privi della tossina per la distruzione operata dalla fermentazione alcolica. L'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro, ha classificato la Patulina nel Gruppo 3, cioè "non classificabile come agente cancerogeno per l'uomo"; tuttavia anche se non è ritenuta cancerogena, è considerata mutagena. I limiti massimi ammissibili di Patulina nei prodotti destinati all'alimentazione umana vengono regolamentati dal Reg (CE) 1425/2003 e 455/2004.

■

<i>MICOTOSSINE</i>	<i>EFFETTI TOSSICI</i>
Aflatossine	Epatiti, nefriti, cancerogenesi, genotossicità.
Ocratossina A	Epatiti, nefriti, teratogenicità, neurotossicità, genotossicità
Zearalenoni	Ipopertilità, azione estrogenica
Tricoteceni	Vomito, rifiuto del cibo, gastroenteriti ulcerative, emorragie intestinali, immunosoppressione, edemi polmonari, dermatossicità
Fumonisine	Cancerogenesi (neurotossicità, citotossicità)
Patulina	Mutagenicità

Tabella 1: Effetti tossici delle micotossine

2.2 L'ocratossina A (OTA)

L' ocratossina A (OTA) è stata isolata per la prima volta nel 1965 da colture di *Aspergillus ochraceus* (Van der Merwe *et al.*, 1965), dal quale ha preso il nome.

L' OTA è una micotossina prodotta come metabolita secondario da diverse specie fungine appartenenti al genere *Aspergillus* e *Penicillium*, in particolare *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium verrucosum*, capaci di infestare differenti derrate alimentari, quali cereali, caffè, cacao, frutta secca, birra, mosto d'uva e vino, nonché prodotti di origine animale, poichè si accumula nei tessuti, rendendo tossiche e carcinogene anche le carni di animali che si siano nutriti di cibi contaminati (Tab. 2: Presenza delle micotossine nelle varie derrate alimentari).

In generale il genere *Pennicillium* si adatta meglio ad ambienti e climi più freschi ed umidi, mentre il genere *Aspergillus* è il più termofilo, predilige climi caldi, quindi è più diffuso nelle zone meridionali (Causin R., 2004 Estratto Bollettino settimanale ASS.IN.CER).

Secondo la Codex Alimentarius Commission i cereali rappresentano la fonte principale di contaminazione da OTA per l'uomo, contribuendo per il 45-50% del consumo abituale; il vino è in seconda posizione con un apporto del 10-20% (Rousseau, 2004).

MICOTOSSINA	DERRATE ALIMENTARI
Aflatossine B 1, B 2, G 1, G 2	Cereali, semi oleaginosi, spezie, frutta fresca e secca, mais, arachidi, cotone, mandorle
Aflatossina M 1	Latte e derivati
Ocratossina A	Cereali, spezie, cacao, caffè, carni suine ed avicole, vino, birra, succhi di frutta
Zearalenone	Mais
Tricoteceni	Cereali, mais, orzo e frumento
Fumonisine	Mais
Patulina	Mele

Tabella 2: Presenza delle micotossine nelle varie derrate alimentari

2.2.1 L'ocratossina A nell'uva e nei suoi derivati

Livelli preoccupanti di OTA nel vino da tavola e nel succo d'uva sono stati segnalati per la prima volta nel 1996 (Zimmerli e Dick, 1996).

Diverse indagini condotte in paesi europei, Giappone e Australia hanno confermato la presenza frequente di OTA nei derivati dell'uva e nel vino (Ueno, 1998; Burdaspal e Legarda, 1999; Festas et al., 2000; Otteneder e Majerus, 2000; Stockley, 2000; Pietri et al., 2001).

La contaminazione delle uve è attribuita, principalmente, allo sviluppo di funghi appartenenti ad *Aspergillus* sezione *Nigri* e tra questi il ruolo chiave è svolto da *Aspergillus carbonarius* (Fig. 1: L'*Aspergillus carbonarius* al microscopio e Fig. 2: isolati ocratossicogeni di *Aspergillus carbonarius* su uve a bacca rossa). Nell'uva passa si può trovare anche l'*Aspergillus ochraceus* e l'*Aspergillus foetidus* (Da Rocha Rosa et al., 2002; Sage et al., 2002; Belli et al., 2004).

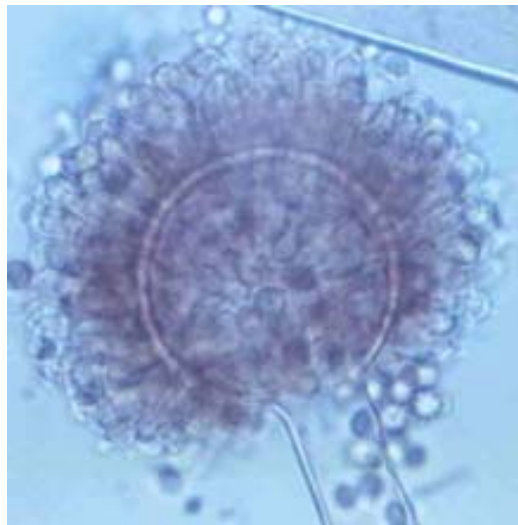


Figura 1: *Aspergillus carbonarius* al microscopio



Figura 2: Marciume da *Aspergillus carbonarius*.

La presenza di OTA nei mosti e nei vini è riconducibile, pertanto, alla contaminazione delle uve da parte del fungo che può svilupparsi già durante lo sviluppo del frutto, allegaggione, ma in maniera più rilevante durante l'invasatura e la raccolta (Battilani e Logrieco, 2006)

Temperatura (12-39°C), umidità (70-90%), arieggiamento, durata dell'infezione e competizione tra specie fungine sono i fattori che determinano la produzione della micotossina da parte del patogeno, soprattutto in post-raccolta (Festas et al., 2000).

Il fungo può sviluppare la tossina solo una volta a contatto con la polpa ed il succo d'uva, quindi dopo esser penetrato nell'acino attraverso ferite della buccia, punture d'insetto o scoppio dell'acino.

Altri fattori influiscono sulla presenza di OTA, e tra questi:

- l'epoca della vendemmia: le uve raccolte con la tecnica del posticipo o lasciate appassire in campo o in post-raccolta sono più soggette ai “marciumi secondari”: il tenore in OTA tende infatti ad aumentare con lo stadio di maturità dell'uva (Rousseau, 2004);
- macro e micro lesioni degli acini: legate alla presenza di tignola e oidio o causate da fattori abiotici creano le condizioni per l'infezione da parte di *Aspergillus* e *Penicillium*; anche melate zuccherine prodotte dall'attacco di cocciniglie e cicaline possono favorire l'insediamento (Rousseau, 2004);

- pratiche agronomiche: le sfogliature atte a limitare la botrite o la presenza di varietà a grappolo spargolo, così come il mantenimento di un corretto equilibrio vegeto-produttivo della vite e la pulizia del vigneto, sono tutte pratiche che contribuiscono a ridurre la presenza di OTA.

2.3 Incidenza geografica dell'ocratossina A

La presenza di OTA nell'uva e nei suoi derivati è influenzata da molti parametri, tra i quali molto importanti sono i fattori climatici. L'andamento climatico della stagione, la latitudine e l'altitudine sono determinanti per la presenza della tossina.

Diversi studi hanno messo in evidenza che l'OTA è presente, principalmente, nei vini dell'Europa meridionale e che l'incidenza e i livelli di contaminazione nei vini rossi e da dessert sono più alti di quelli riscontrati nei vini bianchi e rosati (Ottender H. e Majerus P., 2000).

Si è osservata, un'incidenza maggiore della micotossina nelle zone più calde, come il Sud Italia, e i vigneti di pianura più vicini al mare (entro 30 km dalla costa) e con altitudine inferiore ai 200 metri sono da considerare quelli maggiormente a rischio.

Inoltre, anche se l'ocratossina A può ritrovarsi in tutti i vini, da tavola, rossi, bianchi, rosati e passiti, le sue concentrazioni sono estremamente variabili e dipendenti dalle zone di provenienza. Il tenore di OTA nei vini prodotti in Europa varia da 0.01 a circa 3 µg/l. Concentrazioni di 0.5 µg/l sono state riscontrate da diversi studiosi in vini europei (Burdaspal e Legarda, 1999; Markaki et al., 2001; Pietri et al., 2001), e secondo le analisi effettuate in Europa dal 1996, in certi vini, succhi d'uva e vini da dessert, si possono trovare fino a concentrazioni di 10 µg/l (Filali et al., 2001, Rousseau, 2004).

Le analisi realizzate dalla società Sopagly-Foulon sui mosti destinati alla produzione di succo d'uva, mostrano che le regioni del mediterraneo sono le più esposte alla contaminazione da OTA, nonostante una certa variabilità, legata ai fattori sopraindicati (*Fig. 3: Distribuzione delle zone viticole in funzione del rischio di OTA*).

L'ocratossina A è stata ritrovata anche in altri paesi produttori d'oltreoceano (Australia e Africa del Sud) (Rousseau, 2004).

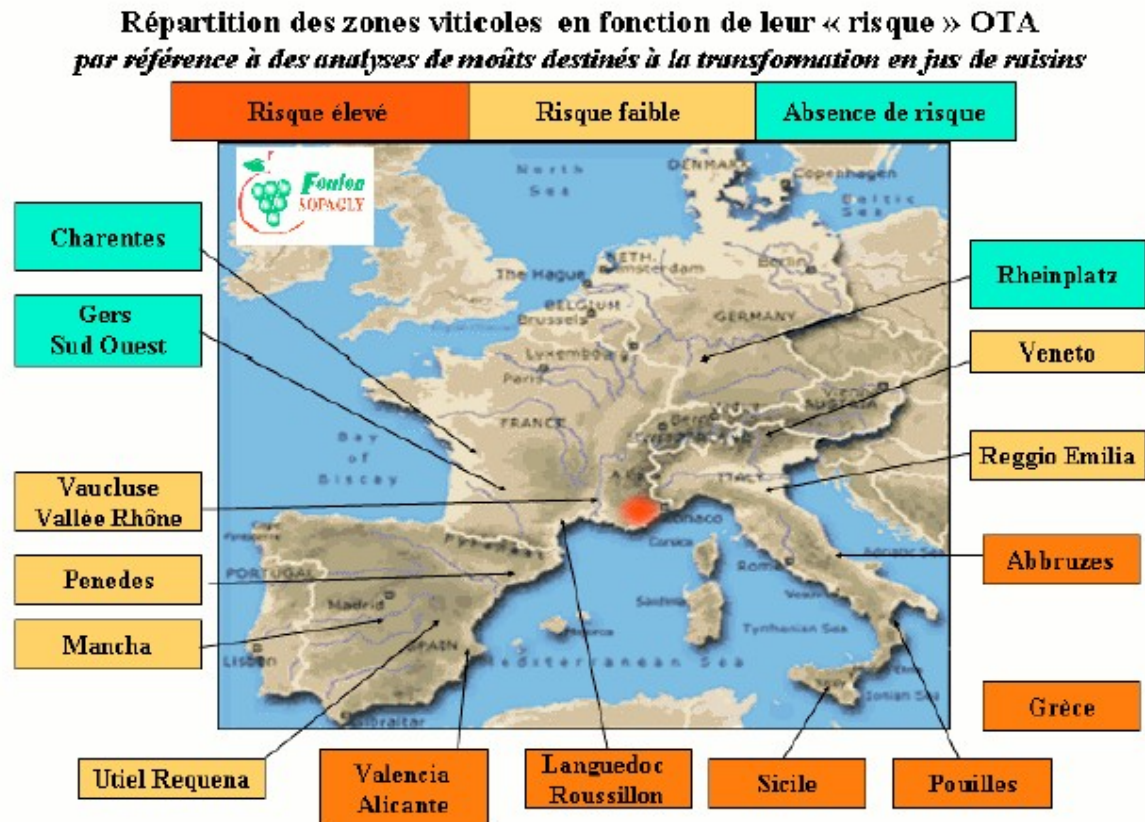


Figura 3: Ripartizione delle zone viticole in funzione del rischio di OTA

2.4 L'ocratossina A e i suoi derivati: struttura chimica

L'ocratossina A (OTA) ($C_{20}H_{18}ClNO_6$, PM 403,82 daltons; $\rho=1.4 \text{ g/cm}^3$) è una molecola costituita da un anello diidrosocumarico legato alla β -fenilalanina tramite un legame ammidico con il gruppo carbossilico-7. (Fig. 4: struttura dell'ocratossina A).

Essa è una sostanza solida cristallina, incolore, che emette fluorescenza blu sotto luce ultravioletta. La molecola è abbastanza stabile nel tempo e al calore (p.f. 169°C), anche se si conoscono alcuni suoi prodotti caratteristici di degradazione.

Per declorazione si può trasformare in OTB (derivato non clorato) (Fig. 5: struttura dell'ocratossina B), mentre per esterificazione in OTC (estere etilico dell'OTA) altrettanto tossica dell'OTA (Fig. 6: struttura dell'ocratossina C).

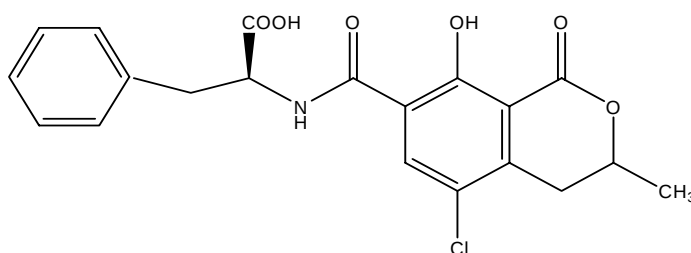


Figura 4: Formula di struttura dell'OTA: 7- (L- β fenilalanina carbonil)- carbossi-5-cloro-3,4-diidro-8-idrossi-3R-metilisocumarina.

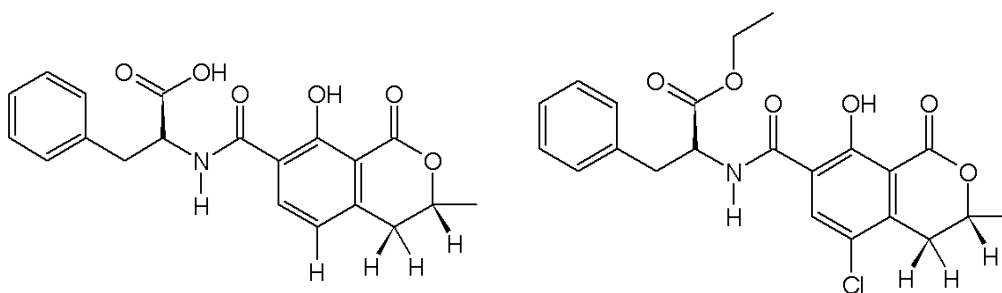


Figura 5: Formula di struttura dell'OTB **Figura 6:** Formula di struttura dell'OTC

2.5 Effetti tossici dell'OTA: studi epidemiologici e sperimentali

L'OTA è una potente nefrotossina ed è un potenziale agente cancerogeno per l'uomo, classificata dallo IARC nel gruppo 2B. E' stato dimostrato che inibisce la sintesi delle proteine per competizione con la fenilalanina, nella amminoacilazione del tRNA^{phe} catalizzata dalla fenilalanina-tRNA sintetasi (PheRS) (Dirheimer e Creppy, 1996).

I suoi metaboliti sono genotossici e formano complessi con il DNA delle cellule renali in specie animali diverse. E' stato dimostrato che l'OTA induce la formazione di radicali liberi dell'ossigeno con conseguente perossidazione lipidica e danno cellulare.

Studi epidemiologici suggeriscono una correlazione tra esposizione ad ocratossina A e "Nefropatia Balcanica Endemica" (BEN), nefrite progressiva riscontrata in aree limitrofe al Danubio, che colpisce il 3-8% della popolazione femminile dei Balcani, e costituisce una malattia cronica caratterizzata da alterata funzionalità e fibrosi renale. Uno studio condotto in Bulgaria (Marasas e Nelson, 1987; Castegnaro et al. 1987) descrive una correlazione tra concentrazione nel cibo e concentrazione nei fluidi biologici di Ocratossina A e nefropatia balcanica. Osserva, inoltre, un'elevata incidenza di tumori del tratto uroteliale urinario.

Studi sperimentali dimostrano che l'OTA è un potente agente teratogeno, e causa immunosoppressione in numerose specie animali per una riduzione del contenuto di immunoglobuline ed altri fattori umorali nei topi e nei polli; causa, inoltre, una riduzione delle risposte immunitarie cellulari.

Il gruppo di esperti scientifici dell'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) è giunto alla conclusione che l'OTA si sia dimostrata una potente nefrotossina e che l'entità del danno renale dipenda dalla dose e dalla durata dell'esposizione. Ha inoltre concluso che vi sono prove sempre più numerose che la tossicità renale dell'OTA e i suoi effetti genotossici siano dovuti, con ogni probabilità, alla produzione di radicali liberi nocivi per le cellule (il cosiddetto "stress ossidativo cellulare") (Surai & Dvorska, 2005).

Tale effetto può portare allo sviluppo di tumori renali ed epatici, come si è osservato negli studi condotti sui roditori (<http://www.efsa.europa.eu>).

2.6 Limiti di legge dell'OTA nei derivati dell'uva

Al fine di proteggere il consumatore dai rischi di esposizione alla micotossina, un'attenzione particolare è stata rivolta ai gruppi vulnerabili come i neonati e i bambini e ai gruppi di consumatori che, per le loro abitudini alimentari, sono esposti a livelli più elevati di OTA rispetto al consumatore medio.

Negli alimenti per lattanti e prima infanzia, il tenore massimo di ocratossina A è stato fissato in 0,50 µg/kg. (con il Regolamento (CE) 683/2004 della Commissione del 13 aprile 2004 che modifica il regolamento (CE) 466/2001 per quanto riguarda le aflatossine e l'ocratossina A).

La Commissione Europea, invece, ha stabilito un livello massimo consentito di OTA nei vini, nei mosti e nei succhi d'uva di 2 µg/l (Regolamento CE 123/2005 del 26 gennaio 2005).

Su richiesta della Commissione europea, il gruppo di esperti scientifici sui contaminanti nella catena alimentare (gruppo CONTAM) dell'EFSA, ha revisionato il precedente parere del Comitato scientifico dell'alimentazione umana (SCF, 1998), e alla luce dei più recenti studi tossicologici e dati sull'esposizione, ha indicato una dose settimanale tollerabile della tossina TWI (Tolerable Weekly Intake) pari a 120 ng/Kg di peso corporeo (<http://www.efsa.eu.int>).

2.7 Riduzione del contenuto di OTA nel vino

Negli ultimi anni, anche in seguito al limite imposto da parte della Unione Europea, sono state condotte numerose ricerche finalizzate all'individuazione di metodi chimici, fisici e biologici per ridurre il contenuto di ocratossina A nei derivati dell'uva.

L'Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV, 2005) ha proposto un codice di buone pratiche vitivinicole per la gestione del rischio OTA, strettamente legato alla tecnica agronomica impiegata (biologica o convenzionale).

Durante il processo produttivo del vino, si possono individuare tre fasi di intervento, tre punti critici di controllo (Rousseau, 2004): sul vigneto, sull'uva e in vinificazione. Non tutti gli interventi consentono di prevenire o limitare l'accumulo di OTA nel vino allo stesso modo. La prevenzione della presenza di ocratossina A deve avvenire principalmente durante la coltivazione (Fregoni, 2005).

In vigneto, l'intervento più efficace è costituito dai trattamenti preventivi rispetto a quelli curativi, ad esempio contro le tignole, poiché questi insetti possono fungere da vettori delle spore dei funghi nell'acino e le lesioni da essi provocate sulle bacche favoriscono la penetrazione del fungo. Altri accorgimenti da seguire nel vigneto, compatibili con il metodo biologico ed in grado di limitare l'ocratossina A, sono la gestione dello stato sanitario delle uve e la defogliazione, utile per diminuire le condizioni locali di umidità. Anche la lotta fitosanitaria, durante l'invasatura ma soprattutto in pre-raccolta, rappresenta un effetto diretto di controllo sia sul fungo che sulla tossina (Battilani, 2004).

Da settembre 2005, lo SWITCH®, fungicida di Syngenta Crop Protection (<http://www.syngenta.it/syngentacp>), a base di cyprodinil e fludioxonil, già ampiamente riconosciuto come prodotto di riferimento per la difesa antibotritica, può essere impiegato come fungicida per i marciumi secondari del grappolo provocati da *Aspergillus* e *Penicillium*. Le due sostanze attive che compongono il prodotto SWITCH sono entrambe efficaci contro i due funghi, come dimostrato dalle prove in vitro (Leroux et al., 2002). Per quanto concerne la gestione dell'OTA in vigneto, l'impiego di Switch come strumento per contenere i livelli di contaminazione della micotossina è stato documentato da svariate pubblicazioni relative agli studi di istituzioni scientifiche a livello internazionale

(Kappes et al., 2005). In particolare, le fasi fenologiche più adatte per l'intervento sono l'invaiaatura e la pre-raccolta; quest'ultima epoca è apparsa la più efficace nella maggior parte dei vigneti (Fregoni, 2005).

Sulle uve dopo la raccolta, l'unica azione realmente efficace è costituita dalla selezione e dalla preservazione dell'integrità delle uve stesse durante il trasporto.

Nei vini, il contenuto di ocratossina A è anche legato al tipo di vinificazione effettuata. Infatti, la maggiore presenza che si riscontra solitamente nei vini rossi rispetto ai bianchi sarebbe legata non tanto alla durata della macerazione quanto alla pressatura.

E' stato messo in evidenza che il passaggio dell'OTA nel succo è particolarmente veloce, già l'operazione di pigiatura ne comporta la solubilizzazione dell'80%, il resto passa nei primi momenti di macerazione per poi subire un graduale calo. Un prolungamento del tempo di macerazione sembra addirittura diminuirne il contenuto.

Alcuni ceppi batterici, lieviti o le loro pareti cellulari possono ridurre la biodisponibilità delle micotossine. Ceppi di batteri lattici sono in grado di rimuovere l'OTA in soluzione (Turbic et al., 2002). Tali effetti sembrano ascrivibili alla composizione della parete e tendono a scomparire usando le pareti cellulari di batteri Gram negativi (El-Nezami et al., 1988).

Inoltre, è ben noto che le fermentazioni ruminali ed intestinali possono modificare le molecole delle micotossine in parte detossificandole come nel caso dell'OTA che viene degradata ad ocratossina alfa nel rumine (Holher et al., 1999).

Una diminuzione del contenuto di OTA rispetto ai livelli massimi raggiunti durante la pigiatura e la macerazione, è stata riscontrata dopo la fermentazione alcolica e malolattica ad opera dei lieviti e dei batteri lattici (Farris et al., 2006; Silva et al., 2001). Diversi ceppi di batteri lattici, durante la fermentazione malolattica, ne causano un abbattimento anche rilevante, nell'ordine del 50-60%, mentre l'affinamento sulle fecce ne induce una riduzione non molto importante, tuttavia nell'ordine del 15-20%. Ciò può far supporre che trattamenti con scorze di lievito o loro derivati potrebbe indurre effetti simili o forse anche migliori.

Anche le operazioni successive di illimpidimento, che prevedono una separazione solido-liquido, riducono la quantità di OTA per fenomeni di adsorbimento-assorbimento.

Una riduzione del contenuto di OTA nei mosti e nei vini, può essere ottenuta mediante l'adsorbimento su prodotti specifici legalmente commercializzati nell'industria alimentare, quali bentonite e coadiuvanti enologici a base di carbone (Castellari et al., 2001). Questi prodotti, però, sono poco selettivi (gli effetti sul colore e sui composti odorosi sono proporzionali alle dosi di impiego) e possono essere impiegati in dosi massime di 100 g/hl (Reg. (CE) 1622/00 all. IV). Quindi, i trattamenti chiarificanti classici, come gelatine, bentoniti, sol di silice hanno un effetto abbastanza limitato.

Buoni effetti si ottengono pure con prodotti a base di fibre vegetali modificate (es Micosorb del Gruppo Vason- ENOLOGICA VASON S.r.l., Nassar di Pedemonte (VR) in fase di fermentazione che tendono ad adsorbire le ocratossine e gli acidi grassi a media catena (prodotti metabolici nocivi che possono causare rallentamenti o arresti di fermentazione) e a eliminarli poi con le fecce.

(<http://www.acquabuona.it/agronomo/annodue/micotossine.html>;

<http://www.teatronaturale.it/articolo/1689.html>).

Tuttavia, i livelli possono rimanere al disopra della soglia massima consentita (Silva e Battilani, 2006).

L'impiego di antiossidanti quali agenti detossificanti delle micotossine si basa sulla capacità di questi ultimi di proteggere le cellule ed i tessuti dall'azione tossica, di tipo ossidativo, esercitata dall'OTA (Galvano et al., 2001). L'integrazione alimentare di vitamina E si è rivelata in grado di proteggere i polli dalla formazione di perossidi lipidici dovuta alla presenza di OTA (Hoeler e Marquardt, 1996).

Interessanti risultati sono stati recentemente pubblicati sull'efficacia di antiossidanti naturali quali la cianidina-3-glucoside, l'acido rosmarinico nel ridurre gli effetti tossici dell'OTA (Baldi et al., 2004; Guerra MC et al. 2004 e 2005).

Sono ormai allo studio da qualche anno, tuttavia, sistemi biotecnologici quali l'uso di batteri lattici ed enzimi proteolitici (papaina e proteasi di origine fungina), nella riduzione della tossina.

(Grimelli A., 2005, <http://www.teatronaturale.it/articolo/1689.html>).

Proteasi acide food-grade a basso costo, che nella pratica enologica possono rappresentare un' alternativa alla bentonite per evitare rischi di cassa proteica,

potrebbero essere utilizzate per degradare l'OTA presente sia nei mosti che nei vini, e nelle fasi finali del processo di vinificazione se i livelli dell'OTA fossero ancora al disopra dei limiti consentiti.

Esperimenti in vitro hanno dimostrato l'azione degradante nei confronti dell'OTA da parte di enzimi proteolitici quali carbossipeptidasi A ed α -chimotripsina in grado di scindere l'OTA in fenilalanina e forma alfa, meno tossica (Pitout, 1968; Deberghes et al., 1995; Varga et al., 2000). (Fig. 7: Prodotti di idrolisi dell' OTA).

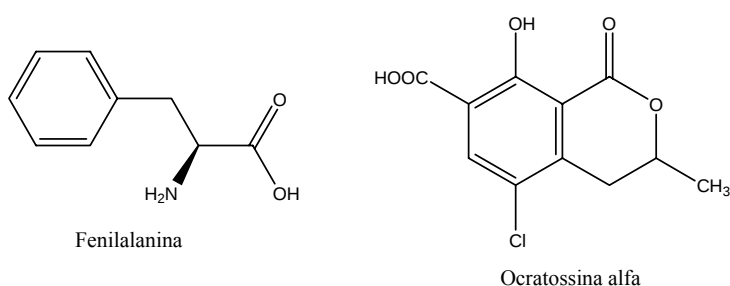


Figura 7: Prodotti di idrolisi dell'OTA nella forma alfa e fenilalanina

Particolari enzimi, forniti in Mycofix® Plus da componenti biologiche brevettate (presentati all'Euro Tier 14-17 Novembre 2006), eliminano la tossicità di tricoteceni, zearalenone e ocratossina A, modificando le loro strutture tossiche ([http://: www.italia.biomin.net](http://www.italia.biomin.net)). Questa “biotrasformazione” porta a metaboliti non tossici, sicuri da un punto di vista ambientale (Fig. 8: biotrasformazione dell'ocratossina A).

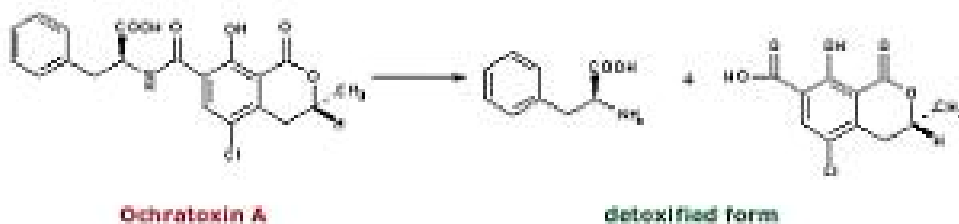


Figura 8: Biotrasformazione dell'OTA ad opera di enzimi di Mycofix® Plus

2.8 Impiego di proteasi acide in enologia

In USA esiste già un'applicazione di tipo tecnologico in enologia delle proteasi, che vengono impiegate per rimuovere o ridurre le proteine instabili al calore, come si può osservare dalla seguente tabella (Tab.3):

Queste proteasi sono state riconosciute dalla FDA come GRAS (generally recognized as safe), cioè non dannose per la salute del consumatore, quindi accettate per il loro impiego alimentare

(http://www.wineinstitute.org/industry/fedlaw/regs/27cfr_part24/24_246.htm).

ENZIMI	IMPIEGO	REFERENZE O LIMITAZIONI
Proteasi (in generale)	Per ridurre o rimuovere le proteine instabili al calore	L'attività enzimatica impiegata proviene da <i>Aspergillus niger</i> or <i>Bacillus subtilis</i> su parere della FDA (08/18/83) o da <i>Bacillus licheniformis</i> per 21 CFR 184.1027 (GRAS).
Bromelina	Per ridurre o rimuovere le proteine instabili al calore	L'attività enzimatica impiegata proviene da <i>Ananas comosus</i> or <i>Ananas bracteatus</i> (L) su parere della FDA (8/18/83) (GRAS*)
Ficina	Per ridurre o rimuovere le proteine instabili al calore	L'attività enzimatica impiegata proviene da <i>Ficus</i> spp. su parere della FDA (8/18/83) (GRAS*)
Papaina	Per ridurre o rimuovere le proteine instabili al calore	L'attività enzimatica impiegata proviene da <i>Carica papaya</i> (L) per 21 CFR 184.1585 (GRAS*)
Pepsina	Per ridurre o rimuovere le proteine instabili al calore	L'attività enzimatica impiegata proviene dallo stomaco di suini e bovini su parere della FDA (8/18/83) (GRAS*)
Tripsina	Per ridurre o rimuovere le proteine instabili al calore	L'attività enzimatica impiegata proviene dal pancreas di suini e bovini su parere della FDA (8/18/83) (GRAS*)

Tabella 3: Proteasi incluse tra i materiali autorizzati per il trattamento di vini e succhi di frutta americani.

2.9 Meccanismi d'azione degli enzimi selezionati

Alla luce di tali informazioni bibliografiche, per questo lavoro di dottorato, sono state selezionate dal commercio proteasi acide food-grade, in grado di lavorare alle condizioni chimico-fisiche del vino. Da uno screening iniziale, basato fondamentalmente sul pH ottimale e sulla capacità di idrolizzare il legame peptidico R-phe, sono state individuate una proteasi acida di origine microbica (EC 3.4.24.18) ed una di origine vegetale (EC 3.4.22.33)

2.9.1 Proteasi aspartica

La proteasi di origine microbica, appartiene al gruppo delle proteasi aspartiche, che hanno un meccanismo di idrolisi caratteristico, di tipo acido/base. Questo tipo di catalisi, a differenza delle proteasi cisteiniche e seriniche, porta alla formazione di un intermedio tetradrico neutro, non covalente.

L'attività catalitica della proteasi aspartica è dovuta alla presenza di due residui invarianti di aspartato nel sito attivo dell'enzima, la cui orientazione è mantenuta fissa grazie ad una fitta rete di legami a idrogeno che coinvolgono anche una molecola d'acqua, sempre presente nel sito attivo.

Il meccanismo catalitico prevede la protonazione di un aspartato ad opera della molecola d'acqua, con un attacco nucleofilo al carbonio carbonilico del legame peptidico e contemporaneamente la donazione di un protone, da parte dell'altro aspartato, all'ossigeno del gruppo carbonilico del peptide del substrato. Questo porta alla rottura del legame CO-NH (*Fig. 9 Meccanismo d'azione delle proteasi aspartiche*)

(<http://cgat.ukm.my/protease/cysteinemech.html>-<http://delphi.phys.univ-tours.fr/Prolysis/>)

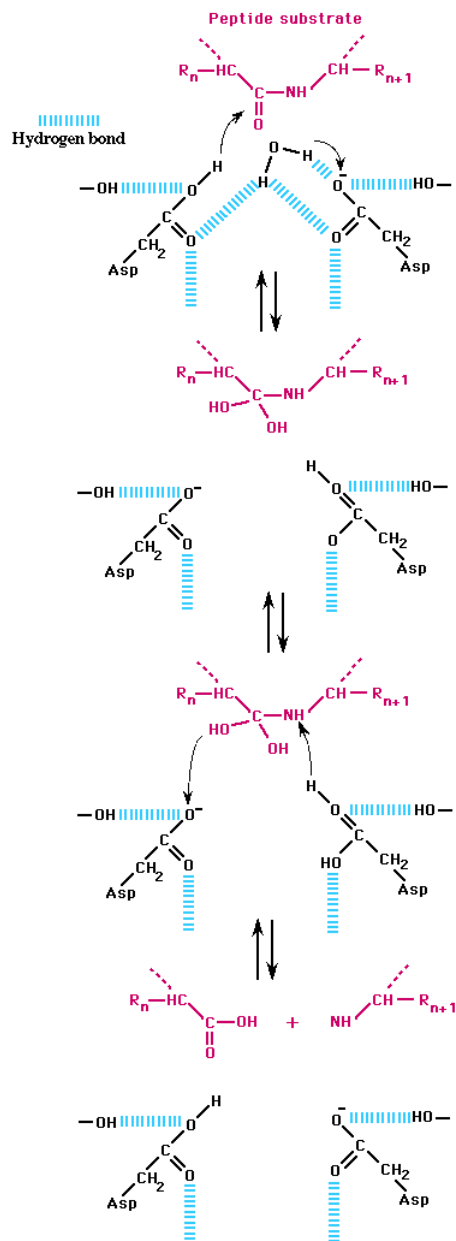


Figura 9: Meccanismo d'azione delle proteasi aspartiche

2.9.2 *Proteasi cisteinica*

La proteasi di origine vegetale, invece, appartiene al gruppo delle proteasi cisteiniche che, a loro volta, hanno un meccanismo catalitico comune che si basa su un'attacco nucleofilo del residuo di cisteina presente nel sito attivo, verso il carbonio carbonilico del peptide del substrato, che porta alla formazione di un intermedio tetraedrico covalente (analogo all'enzima acilato delle serine proteasi).

Il meccanismo d'azione prevede vari passaggi:

- il primo stadio consiste nella deprotonazione del tiolo nel sito attivo dell'enzima ad opera di un amminoacido adiacente della catena laterale di base, solitamente un residuo d'istidina;
- segue quindi l'attacco nucleofilo dello zolfo anionico deprotonato della cisteina al carbonio carbonilico del substrato;
- a questo punto, viene rilasciato un frammento del substrato con un amminoacido terminale, il residuo d'istidina della proteasi è riportato alla sua forma deprotonata e si forma un intermedio tioestere che lega il nuovo gruppo carbossilico terminale del substrato al tiolo della cisteina;
- il legame tioestere successivamente è idrolizzato per generare la parte dell'acido carbossilico sul frammento restante del substrato, mentre si rigenera l'enzima libero (*Fig. 10: Meccanismo d'azione delle proteasi cisteiniche*).

(<http://cgat.ukm.my/protease/cysteinemech.html>-<http://delphi.phys.univ-tours.fr/Prolysis/>)

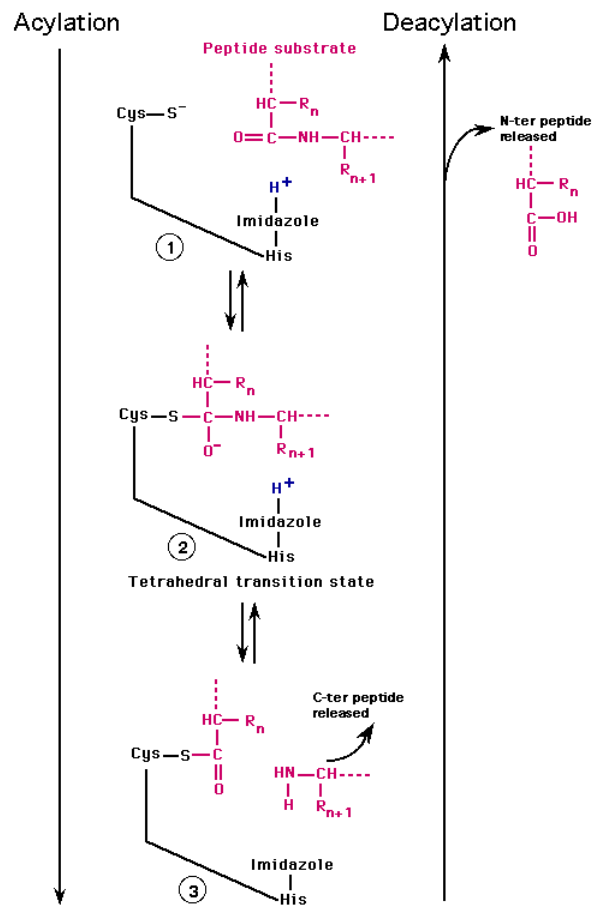


Figura 10: Meccanismo d'azione delle proteasi cisteiniche

3. SCOPO DEL LAVORO

L'ocratossina A è una micotossina estremamente tossica, classificata dalla IARC nel gruppo 2B (possibile agente cancerogeno per l'uomo). In seguito al limite di legge stabilito dalla Commissione Europea, con il Regolamento (CE) 123/2005, essa rappresenta un problema aggiuntivo per l'enologia.

Le strategie di detossificazione hanno sollevato un grande interesse nei ricercatori del settore.

Attualmente esistono numerosi metodi per ridurre il contenuto, che vanno dalla prevenzione in vigneto ai trattamenti curativi del mosto e del vino. Tuttavia, tali trattamenti non consentono un'eliminazione completa dell'OTA, quindi occorrerebbero metodi innovativi in grado di ridurre il contenuto della micotossina qualora essa, a seguito di tutti i processi atti a ridurre il contenuto, risultasse ancora al di sopra del limite consentito per legge.

Qualunque processo di decontaminazione deve essere tecnicamente ed economicamente fattibile e dovrebbe rispondere ai seguenti requisiti:

- 1) distruggere, inattivare o rimuovere le tossine;
- 2) non produrre e non lasciare residui tossici e/o cancerogeni/mutageni nei prodotti finali;
- 3) non alterare significativamente le proprietà nutrizionali e tecnologiche dell'alimento.

La bibliografia, evidenzia che enzimi contenenti attività carbossipeptidasi potrebbero catalizzare l'idrolisi della tossina in L-β-fenilalanina e acido isocumarico, prodotti non tossici.

L'impiego di enzimi proteolitici food-grade a basso costo potrebbe essere un metodo alternativo e nello stesso tempo innovativo per detossificare il vino dalla micotossina.

Lo scopo di questa tesi di dottorato è stato, pertanto, quello di valutare l'efficacia di interventi biotecnologici, basati sull'uso di enzimi proteolitici (proteasi acide di origine fungina e vegetale), finalizzati all'eliminazione della tossina o alla sua riduzione a concentrazioni al di sotto del limite di legge.

L'attività di ricerca è stata suddivisa in due parti.

- La prima indirizzata alla ricerca di mercato, selezione e caratterizzazione in vino modello delle proteasi acide scelte. In questa fase è stata monitorata l'attività degli enzimi nel tempo, variando le condizioni di pH e temperatura, le

concentrazioni di etanolo, di metabisolfito di potassio e di tannini. Inoltre, è stato valutato l'effetto che tali enzimi potevano avere sul colore del vino. La caratterizzazione di tali preparati enzimatici, è stata effettuata al fine di poterne valutare l'efficacia in caso di reale applicazione al vino.

- Nella seconda fase è stata studiata l'attività degradativa dei due enzimi nei confronti dell'OTA, sempre in vino sintetico, monitorando la tossina con diverse metodiche analitiche (TLC, spettrofotometria e HPLC-FL).

-

4. MATERIALI E METODI

La sperimentazione è stata condotta su due proteasi acide food-grade selezionate dal commercio: una di origine vegetale, (proteasi cisteinica, EC 3.4.22.33, Enzeco, New York, U.S.A), l'altra di origine microbica (proteasi aspartica, EC 3.4.23.18, Sigma Aldrich s.r.l., Milano, Italia). I preparati enzimatici sono stati sottoposti a prove di caratterizzazione dell'attività proteasica in condizioni chimiche riscontrabili nei vini, e a prove di degradazione dell'ocratossina A.

L'OTA utilizzata, prodotta da *Aspergillus ochraceus*, è stata acquistata dalla Sigma Aldrich s.r.l., Milano, Italia.

4.1 Prove di caratterizzazione dei preparati enzimatici

4.1.1 Attività proteasica

Il saggio enzimatico è stato eseguito secondo il metodo colorimetrico di Anson (1938) e Folin e Ciocalteu (1927). Un'unità di enzima è stata definita come la quantità di enzima in grado di idrolizzare la caseina per produrre il colore equivalente ad 1 μ mole di tirosina (181 μ g) per minuto, a pH 3 e a 37°C. L'assorbimento alla lunghezza d'onda di 660 nm è stato misurato con spettrofotometro Perkin-Elmer Lambda 25 UV/VIS (Beaconsfield Bucks, B), utilizzando cuvette in plastica da 1 cm di percorso ottico (PO).

4.1.1.a Dosaggio delle proteine

Il dosaggio delle proteine in soluzione è stato effettuato secondo il metodo colorimetrico di Bradford (1976), che prevede la formazione di un complesso tra il colorante Coomassie Brilliant Blue G (presente nel reattivo di Bradford) e i residui basici delle proteine. Il complesso, ottenuto dalla reazione, ha un massimo di assorbimento a 595 nm, proporzionale alla quantità di proteine presenti.

Per calcolare la concentrazione proteica è stato necessario costruire una retta di taratura che esprime l'assorbanza a 595 nm in funzione di concentrazioni di una proteina nota, la proteina di siero bovino (BSA), precisamente di: 0.25, 0.5, 1 e 2 mg/l.

Il reattivo di Bradford (miscela acquosa di Blu Coomassie allo 0.01%, etanolo al 4.7% e acido fosforico all'8.5%) e la BSA, sono stati acquistati dalla Sigma Aldrich s.r.l., Milano, Italia.

4.1.2 Stabilità enzimatica

Le prove di caratterizzazione dell'attività proteasica dei due enzimi, nel tempo massimo di 24h, sono state effettuate in vino modello contenuto in provette da 40 ml e tenuto in continua agitazione (400 rpm) su agitatore magnetico (FALC, Vetroscientifica s.r.l, Roma, Italia).

Il vino modello (tampone tartarico con etanolo al 12 %vol), è stato preparato aggiungendo ad una certa quantità d'acqua distillata 5g di acido tartarico (BDH, Chemicals Ltd Poole, England) e poi nell'ordine 22,2 ml di NaOH 1N (Carlo Erba reagenti SpA, Milano, Italia), 125 ml di etanolo al 95% (Sigma Aldrich s.r.l., Milano, Italia), ed ancora acqua fino ad 1l.

A tempi regolari (al tempo 0, dopo 2h e 24h), erano effettuati prelievi della miscela di reazione per misurarne l'attività enzimatica.

Al fine di valutare l'influenza di temperatura e pH, sono state condotte prove a 25, 35 e 40 °C, aggiustando opportunamente il pH del tampone tartarico a valori di 3.2, 3.5 e 3.8. La temperatura veniva regolata utilizzando un bagnetto collegato ad un termocriostato (C825QZ, Barrington, Cambridge, England) (*Fig. 11*).

Successivamente, mantenendo la temperatura a 35° C e il pH del tampone tartarico a 3.2 (condizioni simili a quelle del saggio di attività proteasica, con il substrato caseina), è stata valutata l'influenza sull'attività enzimatica di:

- Etanolo (Carlo Erba reagenti SpA, Milano, Italia), allo 0, 6 e 12 %vol;
- SO₂ libera, aggiunta sottoforma di metabisolito di potassio (titolo 51.8-57.6 %) (Carlo Erba reagenti SpA, Milano, Italia) alle dosi di 0, 20, 50 e 100 mg/l. Nel vino modello tutta la SO₂ sviluppata dal sale restava in forma libera;
- tannini procianidinici dei vinaccioli e delle bucce, preparati commerciali (IntecWine, Verona, Italia) aggiunti alle dosi di 0, 0.5, 1, 1.5 e 2g/l.

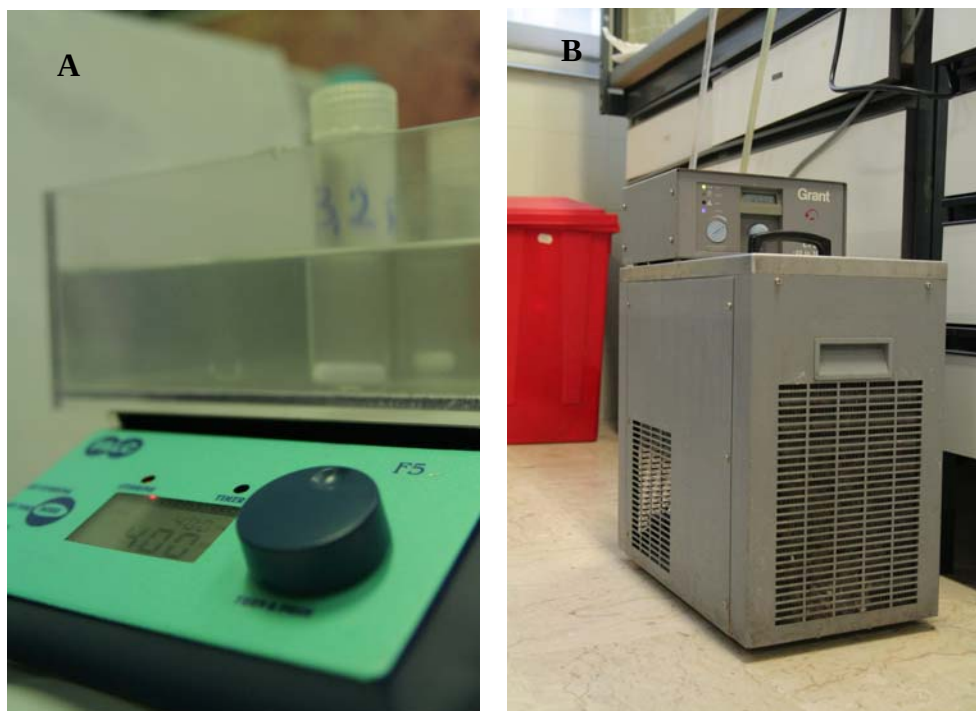


Figura 11: Provette da 40 ml immerse in bagnetto posto su un agitatore magnetico (A) e collegato ad un termocriostato (B).

4.1.2.a Dosaggio dei polifenoli totali

Il contenuto in polifenoli totali dei preparati a base di tannini, è stato misurato con il metodo di Folin-Ciocalteu (1927). Ad 1ml di campione, opportunamente diluito, si aggiungono nell'ordine: 5ml di Folin-Ciocolteau, dopo 5 min, 10ml di Na_2CO_3 al 20% ed acqua fino a 100ml. Dopo 30' al buio, si legge l'assorbanza a 700 nm, in cuvette in plastica da 1 cm di PO.

Il tenore di polifenoli totali è stato espresso in % in peso di acido gallico, riferendosi ad una retta di taratura effettuata con tale composto fenolico alle concentrazioni di 0.5, 1.0, 1.5 e 2 g/l. Tutti i reattivi impiegati erano della Sigma Aldrich s.r.l., Milano, Italia.

4.1.3 Effetto degli enzimi sul colore del vino rosso

Per studiare l'effetto dei due enzimi sul colore del vino, concentrazioni da 200 a 2000 mg/l sono state aggiunte ad un Nebbiolo di 12 mesi di conservazione. E' stato quindi eseguito uno spettro sul vino tal quale da 230 a 700 nm, utilizzando cuvette a quarzo da 1mm di PO (Hellma cuvettes, quartz SUPRASIL, Sigma Aldrich s.r.l., Milano, Italia) ed impiegando uno spettrofotometro Perkin-Elmer Lambda 25 UV/VIS (Beaconsfield Bucks, B).

Sono quindi state calcolate l'intensità colorante ($\text{Abs}_{420} + \text{Abs}_{520}$) e la tonalità ($\text{Abs}_{420}/\text{Abs}_{520}$).

4.2 Prove di degradazione dell'ocratossina A

La capacità di degradazione dell'OTA da parte delle due proteasi acide, come quelle di caratterizzazione, è stata valutata in vino modello base, costituito da tampone tartarico a pH 3.2 con etanolo al 12 %vol.

Le prove iniziali sono state condotte con la proteasi aspartica. L'OTA e i prodotti di degradazione sono stati determinati mediante thin layer chromatography (TLC) e spettrofotometria (Pitout, 1968; 1969); in particolare la forma alfa, fluorescente, meno tossica dell'OTA, in TLC e la fenilalanina in spettrofotometria.

L'azione sull'OTA dei entrambi i preparati enzimatici è stata, successivamente, osservata mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni, con rivelazione fluorimetrica (HPLC-FL).

4.2.1 Thin layer chromatography (TLC)

Le prove sono state condotte in provette da 15 ml, mantenendo la temperatura a 25°C, senza agitazione meccanica. La miscela di reazione era costituita da concentrazioni finali pari a:

- 1) 25 mg/l di OTA in presenza di 200 mg/l di enzima;
- 2) 5 mg/l di OTA in presenza di 200 mg/l di enzima.

Il calo della tossina è stato monitorato, in funzione del tempo di contatto enzima-OTA, dopo 10', 1h, 2h, 3h.

Allo scopo si sono utilizzate piastre cromatografiche (Merk TLC plates) di gel di silice (250 µm di spessore) su supporto di vetro (20X20 silica gel 60 matrix), sulle quali venivano pipettati circa 5µl della miscela di reazione. Le piastre, previa attivazione in stufa (100°C, per 2h), venivano immerse in una vaschetta di vetro con eluente costituito da una miscela di benzene, metanolo e acido acetico, nel rapporto di 18:1:1. Solventi e piastre sono stati acquistati dalla Sigma Aldrich s.r.l., Milano, Italia.

4.2.2 Analisi spettrofotometriche

Sono stati rilevati gli spettri di assorbimento di OTA, fenilalanina e proteasi aspartica, nel range compreso tra 250 e 450 nm, in cuvette di quarzo da 1 cm PO (Hellma cuvettes, quartz SUPRASIL, Sigma Aldrich s.r.l., Milano, Italia) ed impiegando uno spettrofotometro Perkin-Elmer Lambda 25 UV/VIS (Beaconsfield Bucks, B).

Le sostanze sono state disciolte in tampone tartarico a pH 3.2, con etanolo al 12 %vol, alle seguenti concentrazioni:

- 1) soluzione di OTA alla concentrazione di 66.6 mg/l;
- 2) soluzione di fenilalanina alle concentrazioni di 33.3 e 16.7 mg/l;
- 3) preparato enzimatico alle concentrazioni di 50, 100 e 200 mg/l.

Le letture sono state effettuate usando come riferimento la soluzione di tampone stessa.

Sono state condotte, successivamente prove di degradazione dell'OTA con la proteasi aspartica, entrambe a 25 °C, in assenza di agitazione ed in condizioni di continua agitazione (400 rpm). La miscela di reazione, del volume finale di 3 ml, era costituita da 1 ml della micotossina (alla concentrazione di 33.3 mg/l) e 2 ml di soluzione enzimatica (alla concentrazione di circa 16.7 mg/l).

Per queste letture spettrofotometriche è stata utilizzata come miscela di riferimento 1 ml di tampone e 2 ml di soluzione enzimatica (Pitout, 1969).

La degradazione di OTA è stata analizzata monitorando la diminuzione nel tempo del picco di assorbimento a 330 nm (picco massimo di assorbimento dell'OTA in soluzioni acide).

4.2.3 HPLC-FL

Le prove di degradazione, in presenza di diverse concentrazioni della tossina e di entrambi i preparati enzimatici, sono state condotte in provette da 40 ml, mantenute alla temperatura di 35°C e in condizioni di continua agitazione (400 rpm), per un periodo di 6-7 giorni. La diminuzione di OTA nel tempo è stata monitorata attraverso la cromatografia liquida ad alte prestazioni, con rilevazione fluorimetrica (HPLC-FL).

E' stato utilizzato il cromatografo Dionex (Gemering, D), dotato di una pompa P680, di un iniettore manuale (Rheodyne) con loop di 20µl, di un forno termostato TCC-100 e di un fluorimetro RF2000 (Dionex, Gemering, D), controllati dal software Chromeleon (version 6.50).

La colonna cromatografia era una Novapack C18 (4µ, 4,6 mm x 250 mm), protetta da una precolonna dello stesso materiale (Waters Corp., Milford, MA), entrambe termostatate a 30°C.

La fase mobile, costituita da acqua:acetonitrile:acido acetico (99:99:2), era mantenuta ad un flusso di 1 ml/min. Le lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione al fluorimetro erano, rispettivamente, di 333 nm e 460 nm (Visconti et al.1999).

5. RISULTATI E DISCUSSIONE

5.1 Attività enzimatica dei preparati enzimatici

L'attività enzimatica delle proteasi aspartica e cisteinica, determinata con il metodo colorimetrico di Anson (1938) e Folin e Ciocalteu (1927), è indicata nella tabella sottoriportata (Tab. 4).

Preparati enzimatici	Attività proteasica (U/mg solido)	Attività proteasica (U/mg proteina)
Proteasi aspartica	0.2	/
Proteasi cisteinica	0.1	0.2

Tab 4: Attività enzimatica dei preparati enzimatici

Il formulato commerciale della proteasi cisteinica risultava meno purificato e si rilevava una forte interferenza di composti reattivi con il Folin- Ciocalteu

5.2 Stabilità dei preparati enzimatici

I risultati del monitoraggio dell'attività proteasica nel tempo sono stati riportati graficamente indicando sia il valore assoluto (U/mg solido), sia la variazione relativa rispetto al valore iniziale (rapporto tra U/mg di solido ed U/mg di solido al tempo iniziale t_0).

In ogni grafico è riportata, come riferimento, la curva di inattivazione dell'enzima a 35°C, in vino modello base.

5.2.1 Proteasi aspartica

5.2.1.a Effetto di pH e temperatura sull'attività enzimatica

Il pH, non è risultato influenzare l'attività enzimatica della proteasi aspartica nell'intervallo di tempo studiato (24h). Il decremento dell'attività proteasica, a parità di temperatura, mostrava un andamento analogo ai diversi pH testati (Fig. 12 a, b, c).

L'effetto della temperatura, invece, è stato più evidente.

In particolare, le alte temperature hanno influenzato negativamente l'attività enzimatica, che a 40°C, dopo 2h, diminuiva da circa 0.2 a 0.01, 0.07 e 0.13 U/mg

solido, rispettivamente a pH 3.2, 3.5 e 3.8 (Fig 13 a, b, c), con cali percentuali pari a 91, 76 e 21% (Fig. 12 a, b, c).

Seppur la prova condotta a pH 3.8 mostrasse una maggiore resistenza dell'enzima ai 40°C nell'arco delle prime 2h, tuttavia in 24h l'abbattimento percentuale è risultato pressoché simile (98, 94 e 87% a pH 3.2, 3.5 e 3.8).

A 35°C si è rilevato, agli stessi pH, un lieve calo dopo 2h (8, 4 e 25%), ed un abbattimento più marcato dopo 24h (71, 76 e 40%).

A 25°C, invece, l'attività enzimatica è rimasta inalterata nell'arco delle 24h ai tre pH considerati (Fig. 13 a, b, c).

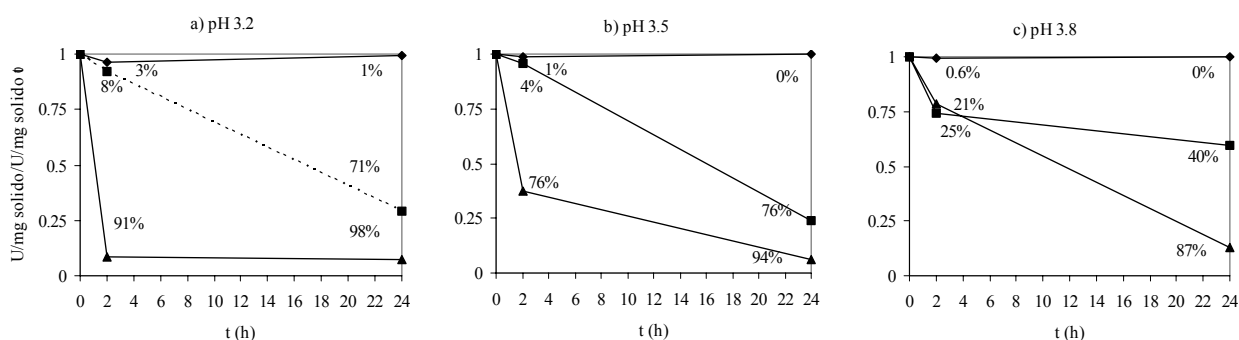


Figura 12: Monitoraggio del decremento relativo dell'attività enzimatica della proteasi aspartica nel tempo (24h) in vino modello a diversi pH: a) 3.2 b) 3.5 c) 3.8, in funzione della temperatura di: 25 (♦), 35 (■) e 40 (▲)°C.

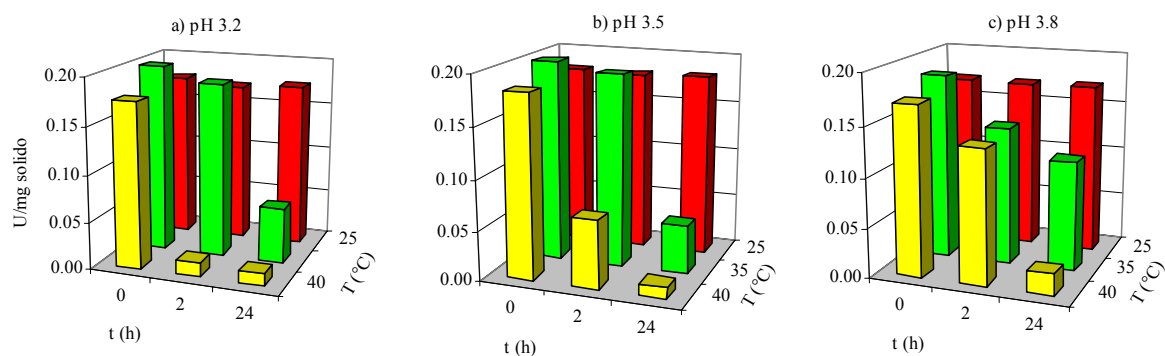


Figura 13: Monitoraggio del decremento dell'attività enzimatica della proteasi aspartica (U/mg solido) nel tempo (24h), in vino modello a diversi pH: a) 3.2 b) 3.5 c) 3.8, in funzione della temperatura rispettivamente di: 25 (■), 35 (■) e 40 (■) °C.

5.2.1.b Effetto dell'etanolo sull'attività enzimatica

L'aggiunta di etanolo (6 e 12 %vol) al vino modello non ha avuto effetti sull'attività della proteasi aspartica che, a 35 °C e pH 3.2, risultava stabile dopo 2h e diminuiva nelle 24h (come nella prova precedente, cfr. *Figg. 12 e 13 a*), passando da circa 0.2 a 0, 0.004 e 0.07 U/mg solido, rispettivamente con 0, 6 e 12 %vol di etanolo (*Fig. 14 a*). I cali percentuali corrispondenti sono stati del 100, 98 e 63% (*Fig. 14 b*).

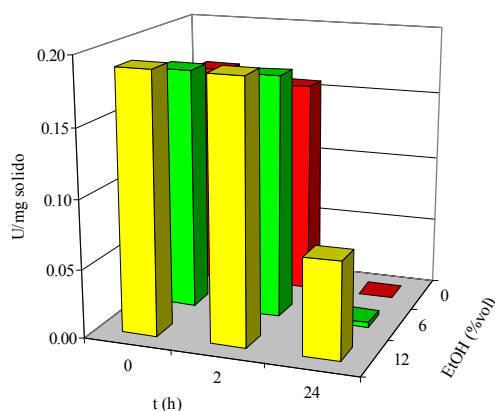


Figura 14 a: Monitoraggio del decremento dell'attività enzimatica della proteasi aspartica (U/mg solido) nel tempo (24h), in vino modello a diverse concentrazioni di etanolo (%vol): 0 (■), 6 (■) e 12 (■).

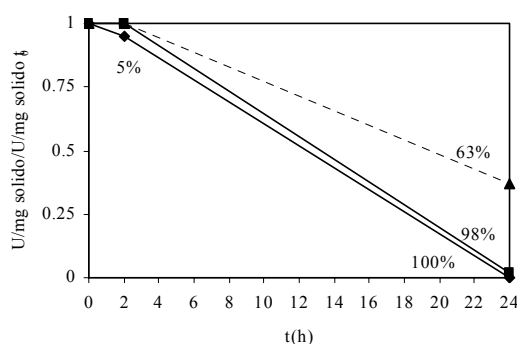


Figura 14 b: Monitoraggio del decremento relativo dell'attività enzimatica della proteasi aspartica nel tempo (24h) in vino modello a diversi a diverse concentrazioni di etanolo (%vol): 0 (◆), 6 (■) e 12 (▲).

5.2.1.c Effetto del metabisolfito di potassio sull'attività enzimatica

La proteasi aspartica non è risultata influenzata dalla presenza di SO_2 libera, aggiunta al vino modello come metabisolfito di potassio. L'attività enzimatica, infatti, si è mantenuta pressoché stabile dopo 2h per poi calare nelle 24h, passando da circa 0.2 a 0.06, 0.1 e 0.07 U/mg solido, rispettivamente con 20, 50 e 100 mg/l di metabisolfito (*Fig. 15 a*). I cali percentuali corrispondenti sono stati del 71, 50 e 63% (*Fig. 15 b*).

Nella prova di riferimento, condotta in assenza di metabisolfito, l'attività è passata, dopo 24h, da circa 0.2 a 0.07 U/mg solido, con una calo del 63% e un andamento analogo alle prove con metabisolfito (stabile dopo 2h e in forte calo dopo 24h) (*Figg. 15 a, b*).

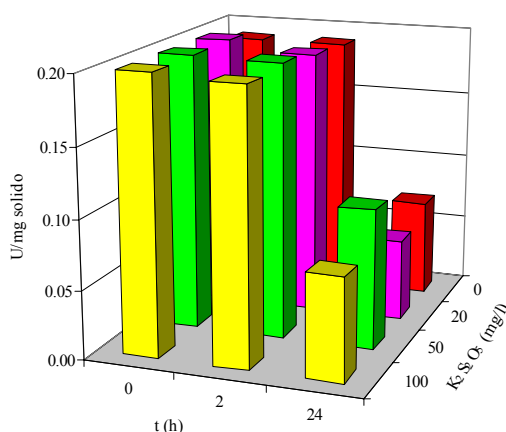


Figura 15 a: Monitoraggio del decremento dell'attività enzimatica della proteasi aspartica (U/mg solido) nel tempo (24h), in vino modello a diverse concentrazioni di metabisolfito di potassio: 0 (■), 20 (■), 50 (■) e 100 (■) mg/l.

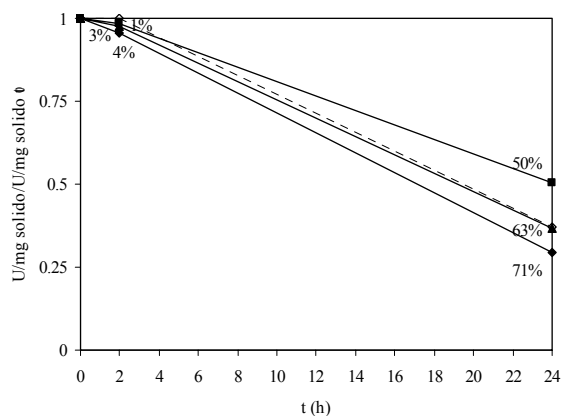


Figura 15 b: Monitoraggio del decremento relativo dell'attività enzimatica della proteasi aspartica nel tempo (24h) in vino modello a diverse concentrazioni di metabisolfito di potassio: 0 (◇), 20 (◆), 50 (■) e 100 (▲) mg/l.

5.2.1.d Effetto di tannini procianidinici delle bucce e dei vinaccioli sull'attività enzimatica

La presenza nel vino modello dei tannini procianidici dei vinaccioli ha indotto un evidente calo dell'attività enzimatica immediatamente dopo l'aggiunta e con diminuzioni proporzionali alle dosi impiegate. Infatti da circa 0.2 l'attività è scesa a 0.07, 0.06, 0.04 e 0.03 U/mg solido, rispettivamente con 0.5, 1, 1.5 e 2 g/l di tannini (Fig. 16 b).

Invece, l'effetto, appena dopo l'aggiunta dei tannini procianidinici delle bucce d'uva è risultato trascurabile (Fig. 16 a).

Anche dall'osservazione dell'attività enzimatica nel tempo, i tannini delle bucce hanno provocato un calo di attività indipendente dalle dosi impiegate e significativo solo dopo 24h (Figg 16 a e 17 a), a fronte di una forte azione inibitoria provocata da quelli dei vinaccioli. Infatti, già dopo 2h, l'attività scendeva da circa 0.07 a 0.04, da 0.06 a 0.02, da 0.04 a 0.013 e da 0.03 a 0 U/mg solido, rispettivamente con 0.5, 1, 1.5, e 2 g/l di tannini procianidinici dei vinaccioli, fino ad annullarsi nelle 24h (Fig. 16 b). L'inibizione era direttamente proporzionale alla concentrazione impiegata. I cali percentuali corrispondenti dopo 2h sono risultati del 43, 68, 73 e 96% (Fig. 17 b).

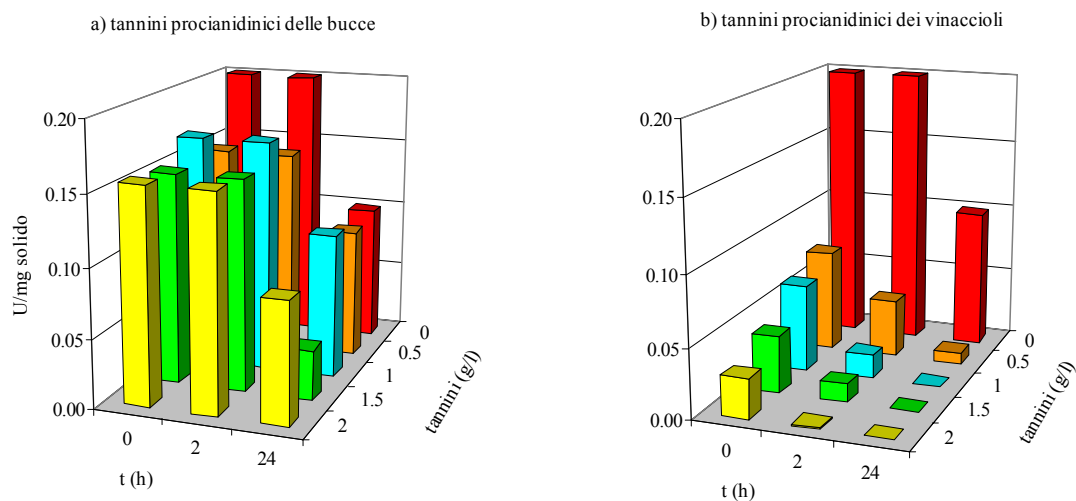


Figura 16: Monitoraggio del decremento dell'attività enzimatica della proteasi aspartica (U/mg solido) nel tempo (24h), in vino modello addizionato di tannini procianidinici delle bucce a) e dei vinaccioli b), a diverse concentrazioni: 0 (■), 0.5 (■), 1 (■), 1.5 (■) e 2 (■) g/l.

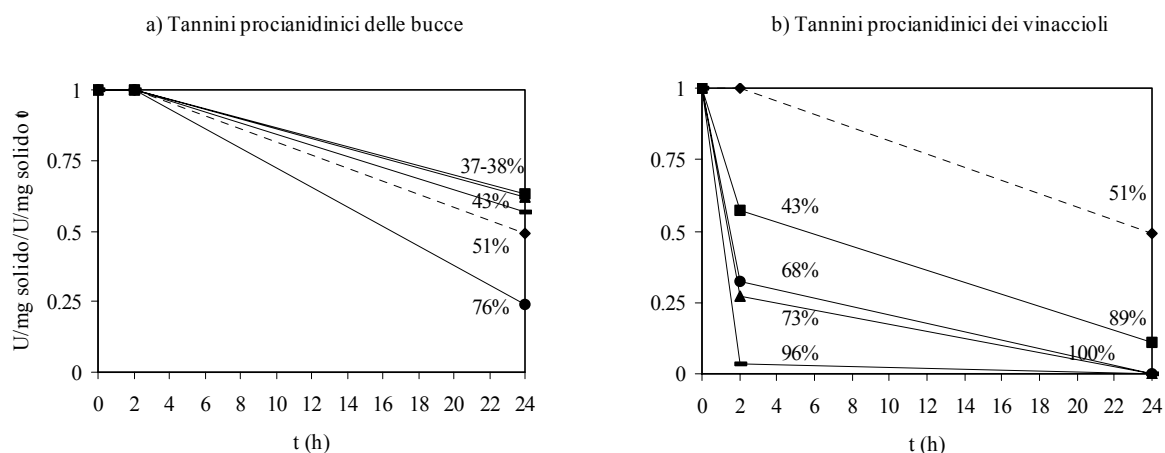


Figura 17: Monitoraggio del decremento relativo dell'attività enzimatica della proteasi aspartica nel tempo (24h) in vino modello addizionato di tannini procianidinici delle bucce *a*) e dei vinaccioli *b*), a diverse concentrazioni: 0 (◆), 0.5 (■), 1 (▲), 1.5 (●) e 2 (—) g/l.

Il forte effetto inibitorio dei tannini procianidinici dei vinaccioli, rispetto a quello dei tannini delle bucce, è attribuibile alla natura dei polimeri flavanici (Esti et al. 2007) e al maggiore titolo in polifenoli totali, espressi come acido gallico, del preparato commerciale (50% rispetto al 46%).

5.2.2 Proteasi cisteinica

5.2.2.a Effetto di pH e T sull'attività enzimatica

Il pH ha mostrato influenzare l'attività enzimatica della proteasi cisteinica, a differenza della proteasi aspartica. A pH 3.2 e 3.5 il calo di attività enzimatica, nelle prime due ore era maggiore rispetto a pH 3.8, sebbene dopo 24h l'enzima risultava, comunque, inattivo (*Figg. 18 e 19 a, b, c*).

Le alte temperature, analogamente all'altro enzima, hanno influenzato negativamente l'attività della proteasi cisteinica, rivelatasi instabile anche a 25 °C. A questa temperatura, infatti, già dopo 2h, si registrava una diminuzione rispettivamente del 14, 28 e 19% a pH 3.2, 3.5 e 3.8 (*Fig. 18 a, b, c*), con un'attività enzimatica che scendeva da circa 0.11 e 0.12 a 0.09 U/mg solido a pH 3.2 e 3.5, e da circa 0.15 a 0.12 U/mg solido a pH 3.8 (*Fig 19 a, b, c*)

A 40°C, dopo 2h, l'attività della proteasi cisteinica ha mostrato cali del 71% e del 70%, a pH 3.2 e 3.5; mentre a 35°C del 65 e 45%, in corrispondenza degli stessi pH (*Figg. 18 e 19 a, b*). A pH 3.8 i cali percentuali sono stati rispettivamente del 9 e 34% a 35 e 40°C (*Fig. 18 c*).

In generale, la proteasi cisteinica si è rivelata, dopo le prime 2h, più instabile di quella aspartica anche a temperature moderate e a valori bassi di pH. Comunque, come per l'altro enzima l'attività si annulla nelle 24h (*Fig. 18 e 19 a, b, c*).

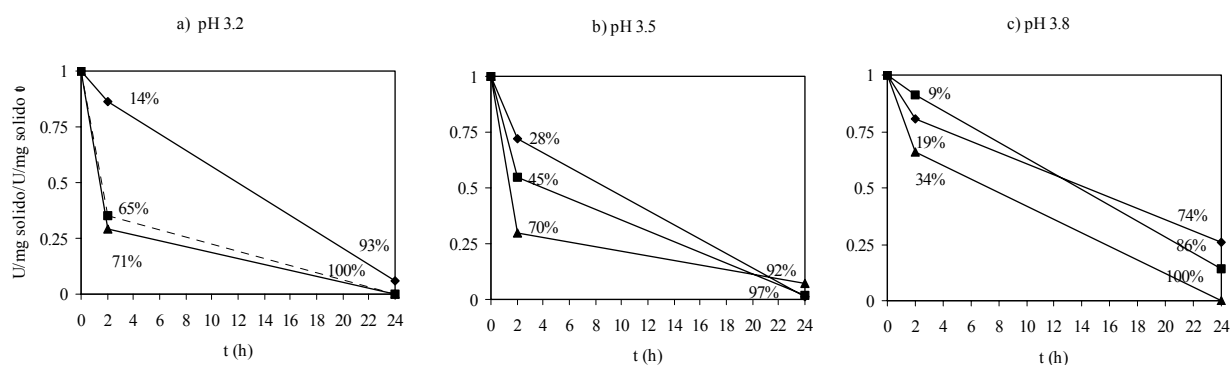


Figura 18: Monitoraggio del decremento relativo dell'attività enzimatica della proteasi cisteinica nel tempo (24h) in vino modello a diversi a diversi pH: a) 3.2, b) 3.5, c) 3.8, in funzione della temperatura, rispettivamente di: 25 (♦), 35 (■) e 40 (▲)°C.

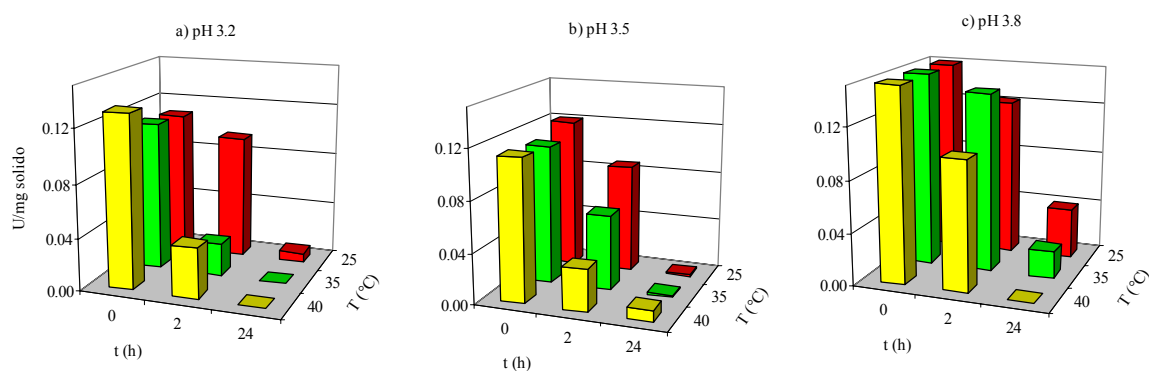


Figura 19: Monitoraggio del decremento dell'attività enzimatica della proteasi cisteinica (U/mg solido) nel tempo (24h), in vino modello a diversi pH: a) 3.2, b) 3.5, c) 3.8, in funzione della temperatura, rispettivamente di: 25 (■), 35 (■) e 40 (■)°C.

5.2.2.b Effetto dell'etanolo sull'attività enzimatica

L'etanolo alle concentrazioni di 6 e 12 %vol ha mostrato, nelle prime 2h, un effetto negativo sulla proteasi, proporzionale alle quantità aggiunte. Si è osservata una marcata riduzione dell'attività enzimatica, che passava da 0.11 a 0.08 e 0.04 U/mg solido corrispondente a cali percentuali del 30 e 65% (Figg. 20 a, b).

Nel vino modello senza etanolo, invece, l'attività enzimatica dopo 2h rimaneva pressoché costante (Figg. 20 a, b).

Dopo 4h i cali percentuali di attività risultavano, pari al 64, 84 e 90%, rispettivamente con 0, 6 e 12 %vol di etanolo e raggiungevano, nelle 24h, il 98 e 100% (Fig. 20 b)

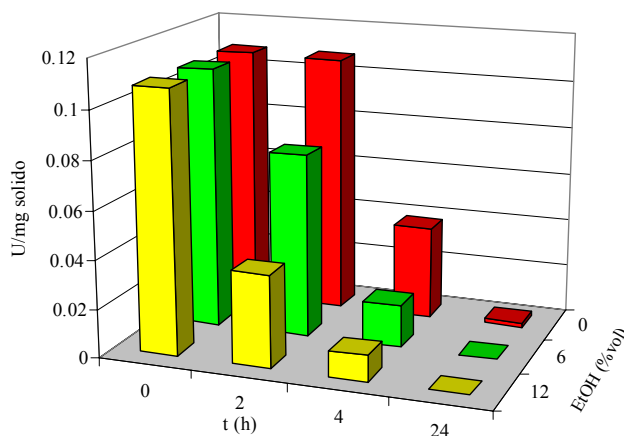


Figura 20 a: Monitoraggio del decremento dell'attività enzimatica della proteasi cisteinica (U/mg solido) nel tempo (24h), in vino modello a diverse concentrazioni di etanolo (%vol): 0 (■), 6 (■) e 12 (■).

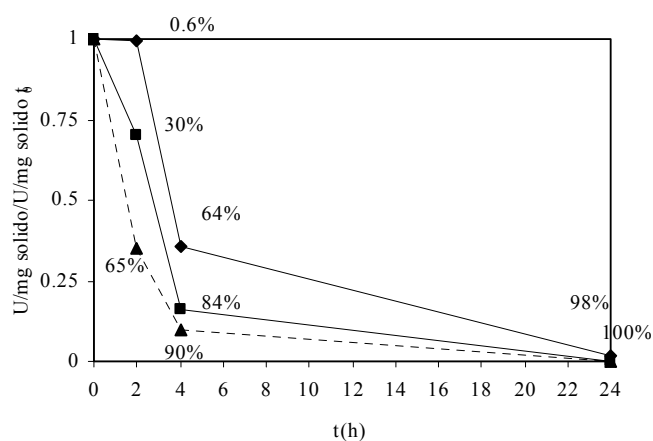


Figura 20 b: Monitoraggio del decremento relativo dell'attività enzimatica della proteasi cisteinica nel tempo (24h) in vino modello a diverse concentrazioni di etanolo (%vol): 0 (♦), 6 (■) e 12 (▲).

5.2.2.c Effetto del metabisolfito di potassio sull'attività enzimatica

L'aggiunta al vino modello di metabisolfito di potassio ha indotto un effetto negativo sull'attività enzimatica alle concentrazioni di 50 e 100 mg/l; infatti dopo 2h essa scendeva da 0.11 a 0.005 e 0.007 U/mg solido, rispettivamente (Fig. 21 a), con cali percentuali corrispondenti del 94 e 96%. Dopo 24h il calo risultava essere, comunque, del 100% con entrambe le concentrazioni (Fig. 21 b).

Fino alla concentrazione di 20 mg/l, l'attività enzimatica non sembrava, invece, essere influenzata dalla presenza del metabisolfito, e dunque della SO_2 libera sviluppata in soluzione acquosa. Il calo percentuale, infatti, dopo 2h è risultato del 61%, molto simile a quello che si era rilevato nella prova di controllo (65%) (Fig. 21 b). L'attività enzimatica scendeva da circa 0.11 a 0.04 U/mg sia nella prova con 20 mg/l di metabisolfito che nella prova di controllo (Fig 21 a).

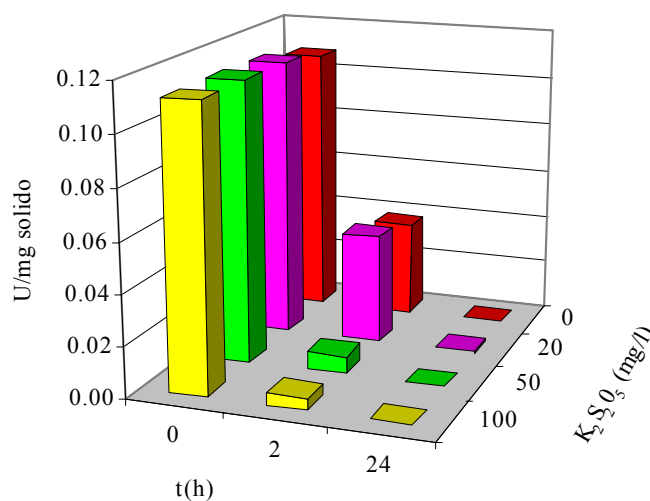


Figura 21 a: Monitoraggio del decremento dell'attività enzimatica della proteasi cisteinica (U/mg solido) nel tempo (24h), in un vino modello a diverse concentrazioni di metabisolfito di potassio: 0 (■), 20 (■), 50 (■) e 100 (■) mg/l.

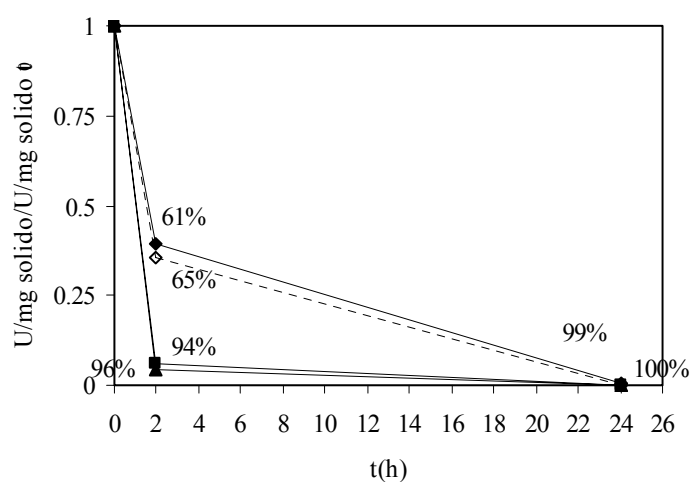


Figura 21 b: Monitoraggio del decremento relativo dell'attività enzimatica della proteasi cisteinica nel tempo (24h), in vino modello a diverse concentrazioni di metabisolfito di potassio: 0 (◇), 20 (◆), 50 (■) e 100 (▲)mg/l.

5.2.2.d Effetto di tannini procianidinici delle bucce e dei vinaccioli sull'attività enzimatica nel tempo

L'aggiunta al vino modello di tannini procianidinici sia delle bucce d'uva che dei vinaccioli a diverse concentrazioni, ha provocato un'inibizione della proteasi cisteinica, immediatamente dopo l'aggiunta, con un maggiore calo provocato dai tannini dei vinaccioli (*Fig. 22 a e b*). Infatti, in queste prove, le attività enzimatiche scendevano da circa 0.12 a 0.07, 0.06, 0.04 e 0.03 U/mg solido, rispettivamente con 0.5, 1, 1.5 e 2 g/l di tannini procianidinici dei vinaccioli (*Fig. 22 b*).

Anche dall'osservazione degli andamenti dell'attività enzimatica nel tempo, è risultato che i tannini dei vinaccioli hanno avuto un maggiore effetto inibitorio. Infatti, già dopo 2h, l'attività della proteasi cisteinica scendeva a 0.04, 0.02, 0.013, 0 U/mg solido, in presenza rispettivamente di 0.5, 1, 1.5 e 2 g/l di tannini (*Fig. 22b*), con cali percentuali, in generale, direttamente proporzionali alle dosi aggiunte (*Fig. 23 b*).

I tannini procianidinici delle bucce hanno, invece, interferito con l'enzima in misura minore ed indipendente dalle concentrazioni dei flavani polimerici. L'attività si è pressoché dimezzata dopo 2h (*Fig. 22 e 23 a*).

L'attività enzimatica tendeva, comunque, ad annullarsi nell'arco delle 24h (*Fig. 22 a, b*).

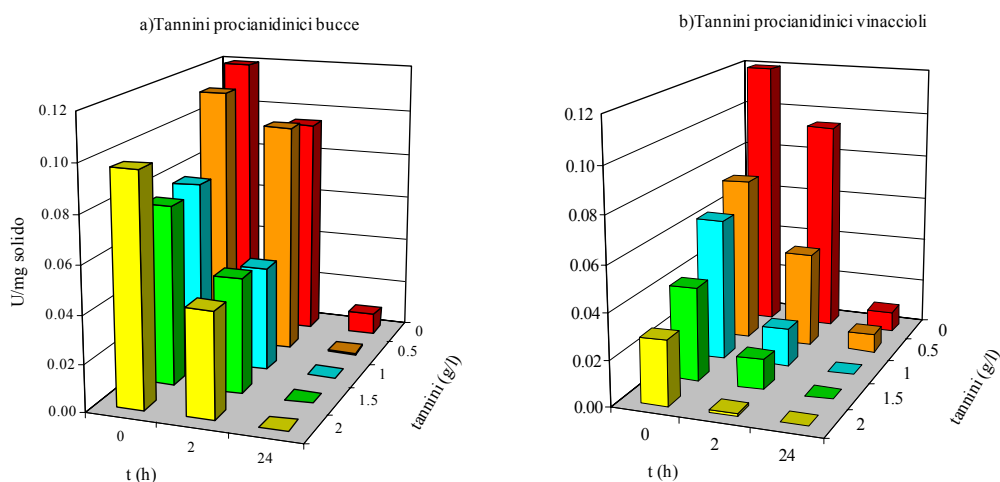


Figura 22: Monitoraggio del decremento dell'attività enzimatica della proteasi cisteinica (U/mg solido) nel tempo (24h), in vino modello addizionato di tannini procianidinici delle bucce a) e dei vinaccioli b), a diverse concentrazioni: 0 (■), 0.5 (■), 1 (■), 1.5 (■) e 2 (■) g/l.

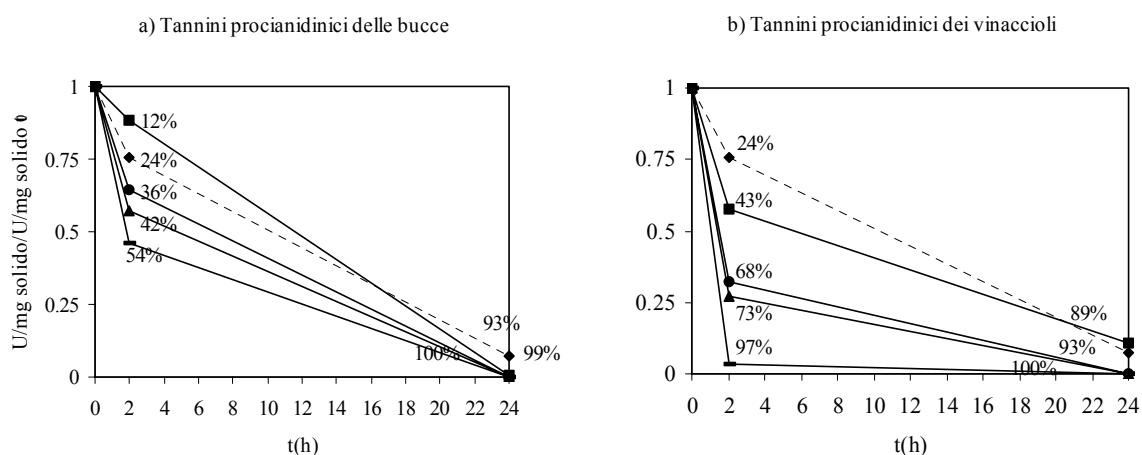


Figura 23: Monitoraggio del decremento relativo dell'attività enzimatica della proteasi cisteinica nel tempo (24h), in vino modello addizionato di tannini procianidinici delle bucce a) e dei vinaccioli b), a diverse concentrazioni: 0 (♦), 0.5 (■), 1 (▲), 1.5 (●) e 2 (—) g/l.

5.3 Effetto sul colore delle due proteasi acide

5.3.1 Proteasi aspartica

In seguito ad aggiunte di proteasi aspartica fino a 600 mg/l, l'effetto sul colore era trascurabile, mentre alle concentrazioni da 800 a 2000 mg/l si è evidenziato un aumento dell'intensità e della tonalità colorante del 10% (Fig. 24: Effetto sul colore della proteasi aspartica). Ciò potrebbe essere dovuto ad un incremento dell'assorbanza a 420 nm, quindi del colore giallo.

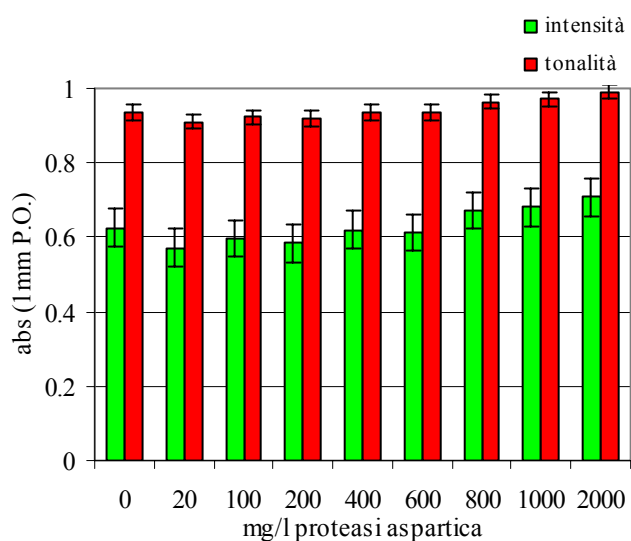


Figura 24: Effetto sul colore di un vino rosso (Nebbiolo di 1 anno di conservazione) della proteasi aspartica.

5.3.2 Proteasi cisteinica

La tonalità del Nebbiolo non ha subito variazioni significative in seguito ad aggiunte di proteasi cisteinica. L'intensità, d'altra parte, è calata in percentuali trascurabili per aggiunte di enzima fino a 200 mg/l, del 10% per aggiunte di 400-600 mg/l e del 20-30% da 800 a 2000 mg/ (Fig. 25: Effetto sul colore della proteasi cisteinica)

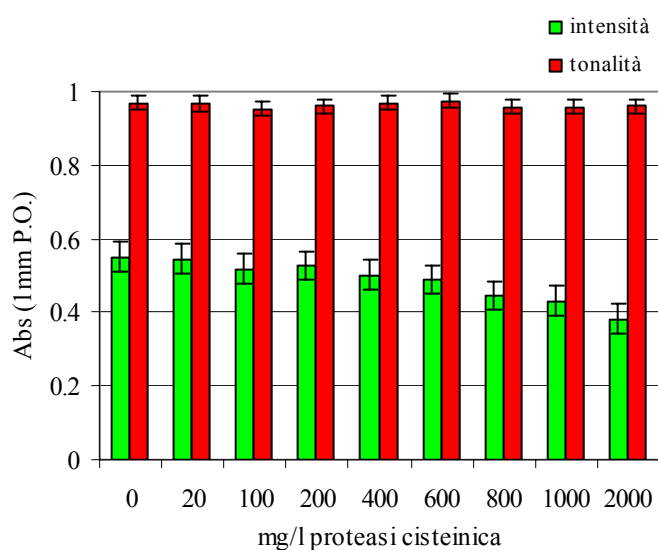


Figura 25: Effetto sul colore di un vino rosso (Nebbiolo di 1 anno di conservazione) della proteasi cisteinica.

Tali risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti dalla DAL CIN GILDO spa, (Milano, 2006), la quale ha studiato l'effetto del carbone attivo Atoxil, da essa prodotto, sul colore di un vino rosso di Puglia del 2000. Da tale confronto si evince che dosi di 150 g/hl di carbone attivo hanno un effetto analogo a quello che si ottiene con concentrazioni di 400 e 600 mg/l di proteasi cisteinica.

La proteasi aspartica e la proteasi cisteinica, aggiunte al vino modello, hanno dimostrato di inattivarsi completamente in 24h indipendentemente dalle condizioni del mezzo testate: pH (3.2, 3.5, 3.8), temperatura (25, 35, 40°C), etanolo (fino al 12 %vol), metabisolfito di potassio (fino a 100 mg/l) e tannini (fino a 2g/l). La proteasi cisteinica ha evidenziato una maggiore instabilità già dopo 2h.

Entrambi gli enzimi sono stati inibiti sia dalle alte temperature (40°C) che dalla presenza di tannini, soprattutto dei vinaccioli, nelle prime 2h; mentre le restanti variabili sperimentali testate, hanno influenzato in misura differenziata la loro attività enzimatica. In particolare, l'effetto del pH è risultato trascurabile sulla proteasi aspartica, mentre si è rilevato più determinante sulla proteasi cisteinica, che ha dimostrato di mantenersi più stabile a pH più alti (3.8).

L'etanolo e il metabisolfito di potassio, allo stesso modo, non hanno avuto effetti evidenti sulla proteasi aspartica, mentre hanno inibito la proteasi cisteinica, soprattutto alle concentrazioni più alte testate.

In conclusione, dunque, la proteasi aspartica, a differenza di quella cisteinica, ha dimostrato di essere più stabile alle condizioni sperimentali testate e più comunemente riscontrabili nel vino, quindi più adatta ad applicazioni alla matrice reale.

Alla luce di questi risultati, le prove iniziali di degradazione dell'OTA in TLC e spettrofotometria, e successivamente in HPLC-FL, sono state condotte con tale enzima.

5.4 Prove di degradazione dell'ocratossina A

5.4.1 Analisi in Thin Layer Chromatography (TLC)

Le prove condotte in TLC alle concentrazioni di OTA ed enzima rispettivamente di 25 e 200 mg/l hanno permesso una chiara rilevazione della micotossina, la cui concentrazione diminuiva in funzione del tempo di contatto enzima-substrato, come si evidenziava da una riduzione del diametro e dell'intensità della fluorescenza degli spot (*Fig. 26*).

Tuttavia, non è stato possibile rilevare la forma alfa, probabilmente a causa della ridotta capacità degradativa dell'enzima, unitamente alla bassa sensibilità del metodo. Infatti, abbassando la concentrazione dell'OTA fino a 5 mg/l, gli spot delle lastre cromatografiche risultavano sfocati e difficili da visualizzare (foto non riportata).

Con tale metodo, inoltre, non è stato possibile quantificare il decremento della tossina.

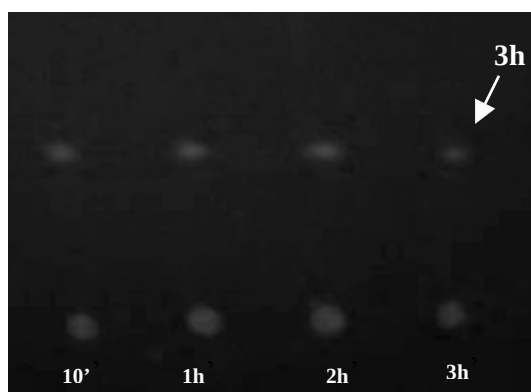


Figura 26: Degradazione dell'ocratossina (25 mg/l) nel tempo da parte della proteasi aspartica (200 mg/l).

5.4.2 Analisi spettrofotometrica

Prima di testare spettrofotometricamente l'attività idrolitica della proteasi aspartica, è stata effettuata una scansione della soluzione standard di ocratossina A, da 250 a 400 nm, che ha messo in evidenza la sensibilità delle caratteristiche spettrali dell'OTA alle variazioni di pH, dovuta al gruppo idrossilico sul carbonio 8 (Pitout, 1969). Infatti, a pH acido, il picco massimo di assorbimento si spostava da 380 a 330 nm (Fig. 27).

Il limite minimo di quantificazione dell'OTA allo spettrofotometro corrispondeva ad una concentrazione di circa 20 mg/l.

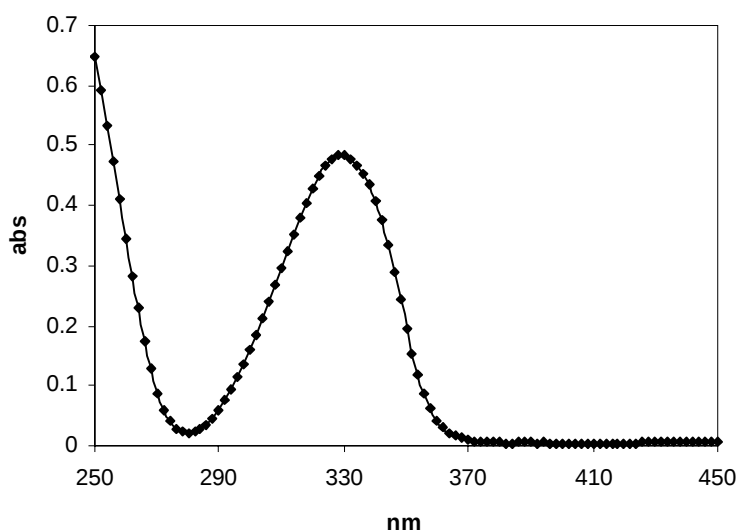


Figura 27: Spettro di assorbimento della soluzione standard di OTA (66.6 mg/l) in vino modello base.

Per verificare l'eventuale formazione dei prodotti di degradazione dell'OTA, quali la fenilalanina e l'ocratossina α , sono stati effettuati spettri di assorbimento di soluzione standard di fenilalanina a diverse concentrazioni.

Lo spettro della fenilalanina ha mostrato di non interferire con quello dell'OTA, (picchi caratteristici con massimo di assorbimento intorno a 254-256 nm) (Fig. 28).

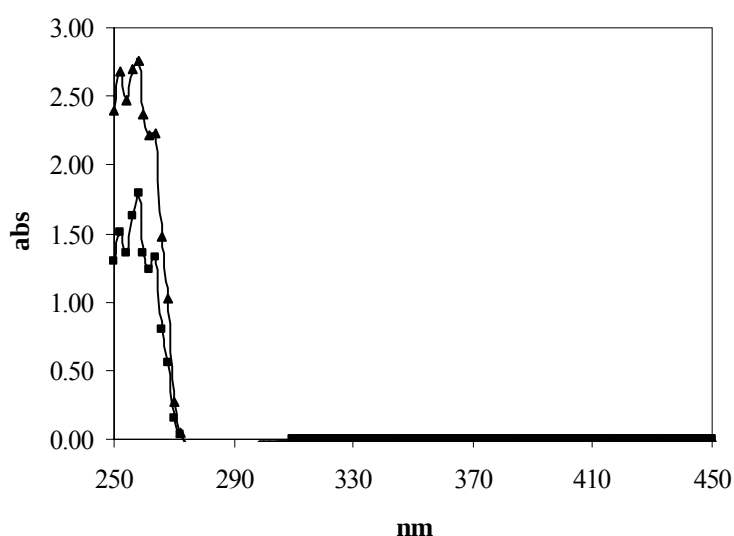
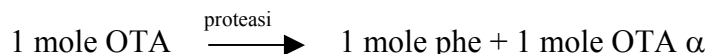


Figura 28: Spettri di assorbimento di soluzioni di fenilalanina, in vino modello, rispettivamente di 33.3 mg/l (▲) e 16,7 mg/l (■)

La concentrazione minima di fenilalanina rilevabile spettrofotometricamente è risultata di 2 mg/l, cioè 2/165 (PM_{phe}), cioè 0.012 mM.

Per poterla rilevare allo spettrofotometro, considerando la seguente reazione:



ed una degradazione totale operata dalla proteasi sull'ocratossina A, la concentrazione iniziale di OTA sarebbe dovuta essere di circa 5 mg/l, cioè 0.012 mM*403.8 (PM_{OTA}), o addirittura superiore se l'attività degradativa non avesse provocato la completa idrolisi dell'OTA presente.

Questo pone dei limiti al metodo, perchè per fini applicativi al vino occorre operare a concentrazioni di OTA nell'ordine dei ppb.

Gli spettri di assorbimento della proteasi aspartica, contrariamente alla fenilalanina, interferivano con quello dell'OTA, fino alla concentrazione di 50 mg/l, e per tale motivo è stato necessario diluire l'enzima, rispetto a quanto previsto da bibliografia e rispetto alle prove in TLC (Pitout 1968, 1969) (*Fig. 29*).

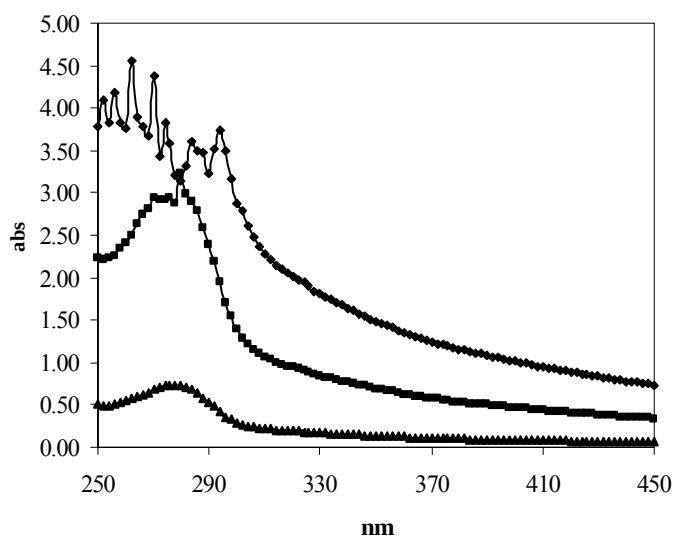


Figura 29: Spettri di assorbimento di soluzioni di proteasi aspartica, in vino modello, a diverse concentrazioni: 50 (▲) 100 (■) e 200 (♦) mg/l.

Alla luce di tutti i limiti imposti dal metodo, le prove di degradazione dell'OTA sono state quindi condotte, con una concentrazione di enzima di 16.7 mg/l e di 33.3 mg/l di OTA.

La prova degradativa dell'OTA condotta in assenza di agitazione, ha rilevato una riduzione della micotossina pari a circa il 5% dopo 2h, e al 20% circa, dopo 24h. Se la reazione veniva fatta proseguire fino a 5 giorni, non veniva rivelata ulteriore diminuzione di OTA (*Fig. 30*).

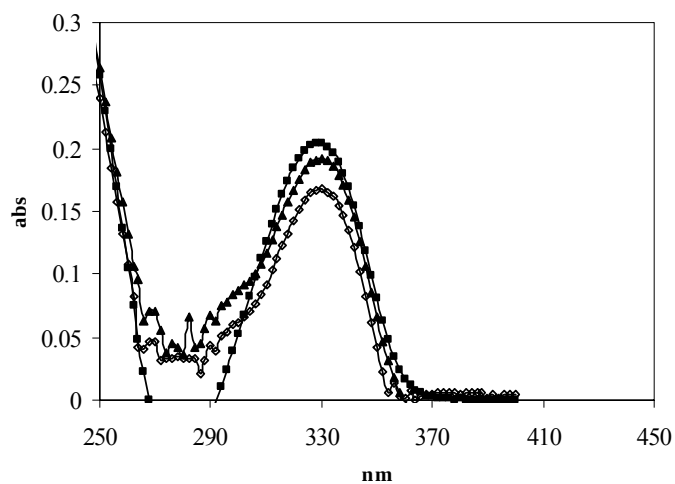


Figura 30: Spettro di assorbimento OTA-proteasi aspartica (33.3-16.7 mg/l) in vino modello, al tempo 0 (■), dopo 2h (▲) e dopo 24h (◇), rispettivamente, in assenza di agitazione.

Nella prova condotta in condizioni di continua agitazione, la riduzione dell'OTA dopo 17h era di circa il 12%, mentre dopo 24h scendeva al 38%, e si manteneva tale fino al quinto giorno (*Fig. 31*).

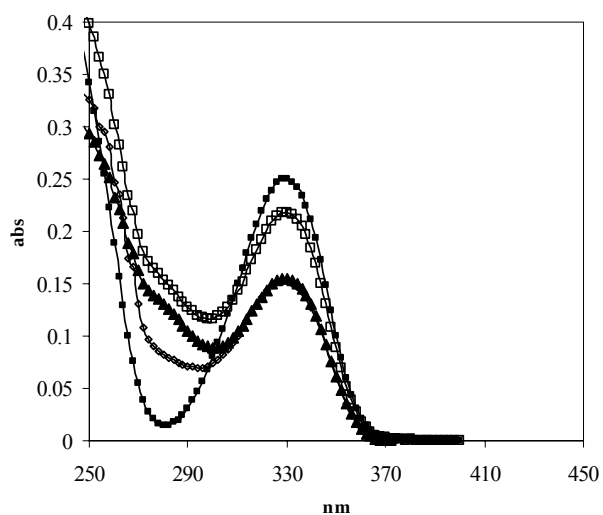


Figura 31: Spettro di assorbimento OTA-proteasi aspartica (33.3-16.7 mg/l) in vino modello, al tempo 0 (■), dopo 17h (□), 24 h (▲) e 5 giorni (◇), rispettivamente, in condizioni di continua agitazione.

I metodi impiegati, quali TLC e spettrofotometria hanno consentito di rilevare solo concentrazioni elevate della tossina (mg/l), risultando non adeguati ai fini di un'applicazione concreta al vino ($\mu\text{g/l}$).

Inoltre, l'efficacia degradativa della proteasi aspartica nei confronti dell'OTA è risultata maggiore in condizione di agitazione continua, ed evidente solo nelle prime 24h, con un calo massimo del 38%.

Le prove di degradazione dell'OTA, in presenza di entrambi gli enzimi e monitorate mediante HPLC-FL, sono state condotte:

- in presenza di concentrazioni, gradualmente più basse di OTA, fino a quelle più comunemente riscontrate nei vini contaminati (2-10 $\mu\text{g/l}$);
- effettuando aggiunte successive dei preparati enzimatici per superare l'eventuale stato stazionario;
- aumentando la concentrazione iniziale di enzima, fino alla saturazione, al fine di evidenziare la massima cinetica di degradazione della tossina.

5.4.3 Analisi in HPLC-FL

5.4.3.a Rimozione di OTA mediante proteasi aspartica

L'effetto di un'alta concentrazione di proteasi aspartica (5 g/l) è stato testato con due concentrazioni iniziali differenti di OTA (3,000 e 20 $\mu\text{g/l}$) monitorando il decremento della tossina per circa 144h (6 giorni). In presenza di 3,000 $\mu\text{g/l}$ di OTA, la riduzione era del 29% in 24h alla velocità di 36 $\mu\text{g/l}\cdot\text{h}$; mentre, in presenza di 20 $\mu\text{g/l}$ di OTA, il decremento era del 17% in 24h alla velocità di 0.15 $\mu\text{g/l}\cdot\text{h}$ (Fig. 32). In entrambe le prove il decremento finale di OTA osservato era di circa il 30%.

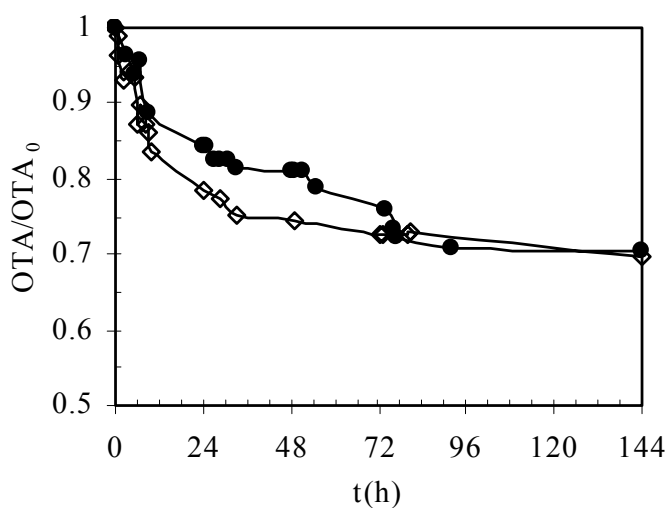


Figura 32: Monitoraggio del decremento relativo di OTA in un vino modello usando proteasi aspartica ($E_0 = 5 \text{ g/l}$) a due diverse concentrazioni di OTA_0 : $\diamond$, 3,000 $\mu\text{g/l}$; $\bullet$, 20 $\mu\text{g/l}$.

Utilizzando la stessa concentrazione iniziale di OTA (circa 6.5 $\mu\text{g/l}$), il decremento di OTA riferito allo stesso periodo (144h) era diverso in relazione al contenuto di proteasi. Il decremento di OTA aumentava dal 23% al 30% del valore iniziale con l'aumentare della concentrazione di enzima da 10 mg/l a 5 g/l (Fig. 33). In ciascuna prova si raggiungeva uno pseudo stato stazionario dopo 24h.

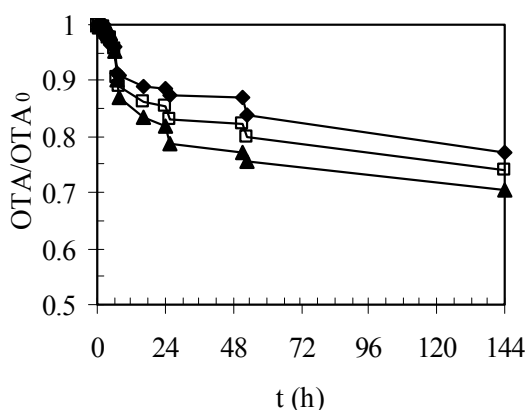


Figura 33: Decremento relativo di OTA in un vino modello a $\text{OTA}_0 = 6.5 \mu\text{g/l}$ e a differenti concentrazioni di enzima (mg/l): 10 (♦), 50 (□), e 5,000 (▲)

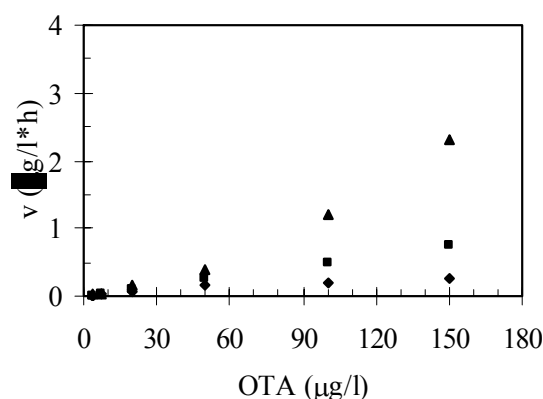


Figura 34: Velocità di rimozione di OTA, (v) riferita a un periodo di 24h in funzione di diverse concentrazioni di enzima (mg/l): 10 (♦), 50 (■), e 5,000 (▲)

La velocità di rimozione dell'OTA aumentava, ovviamente, all'aumentare della concentrazione di enzima (Fig. 34). Tuttavia, nel range di 2-10 $\mu\text{g/l}$ di OTA (livelli che si ritrovano nei vini contaminati), era trascurabile un aumento della velocità di rimozione della tossina all'aumentare della concentrazione di enzima.

Ulteriori prove sono state condotte aggiungendo enzima in corrispondenza dello pseudo stato stazionario. Si notava un piccolo decremento di OTA dopo la prima aggiunta di 5 g/l di enzima a 24h, ma non si osservavano ulteriori diminuzioni con le successive aggiunte (Fig. 35). Questo era funzione dell'attività dell'enzima, poiché dopo 24h l'enzima risultava praticamente inattivo (Fig. 36). La perdita di attività dell'enzima si verificava sia in presenza che in assenza di OTA, quindi potrebbe essere attribuita ad un'auto-inibizione dell'enzima nelle condizioni sperimentali testate.

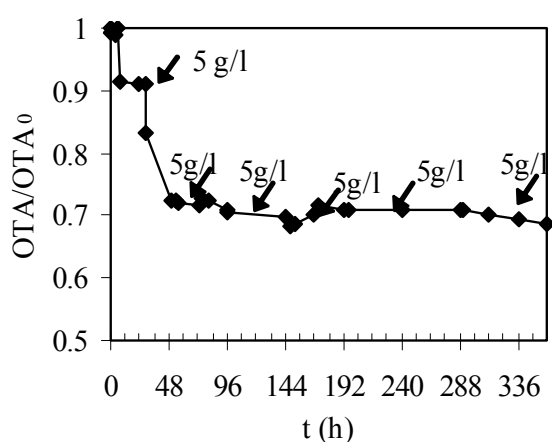


Figura 35: Monitoraggio del decremento relativo di OTA in un vino modello alle concentrazioni iniziali di $OTA_0 \sim 3,000 \mu\text{g/l}$ in presenza di una concentrazione iniziale di proteasi aspartica di 5 g/l seguita da 6 aggiunte successive di 5 g/l.

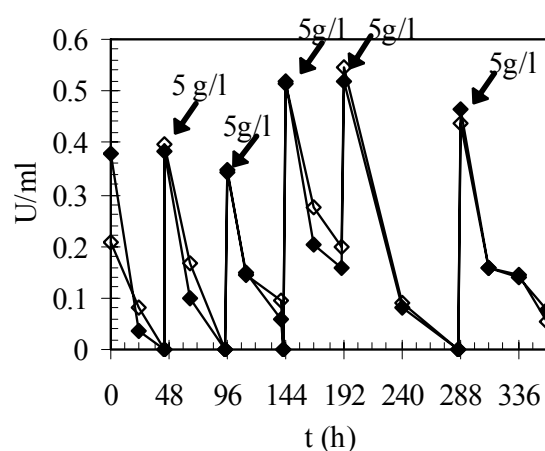


Figura 36: Monitoraggio dell'attività enzimatica della proteasi aspartica di 5g/l in presenza (♦) o in assenza di OTA (◇).

5.4.3.b Rimozione di OTA mediante proteasi cisteinica

E' stato testata l'attività idrolitica di 5 g/l di enzima nei confronti di una concentrazione iniziale di OTA di 20 µg/l, per un periodo di 6 giorni. Dopo 24h la riduzione di OTA e la velocità di decremento erano del 56% e 0,36 µg/l*h, rispettivamente. Dopo 96h la riduzione della concentrazione iniziale di OTA era scesa al 70%. Aggiungendo ulteriore enzima (1 g/l) in corrispondenza dello stato stazionario si notava un'ulteriore decremento del 10% circa (Fig. 37). Confrontando questi dati con quelli ottenuti per la proteasi aspartica, si notava una maggiore efficienza di degradazione nei confronti dell'OTA della proteasi vegetale nonostante la sua minore attività enzimatica di 0,28 U/ml contro 0.4 U/ml della prima (Fig. 38).

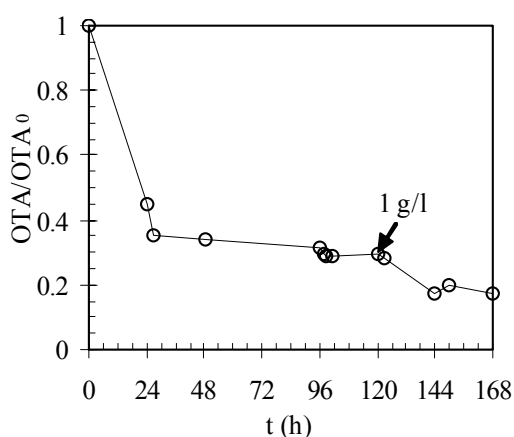


Figura 37: Monitoraggio del decremento relativo di OTA in un vino modello nel tempo rispetto alla concentrazione iniziale di ~20 µg/l in presenza di una concentrazione iniziale di enzima di 5 g/l seguita da un'ulteriore aggiunta di 1 g/l

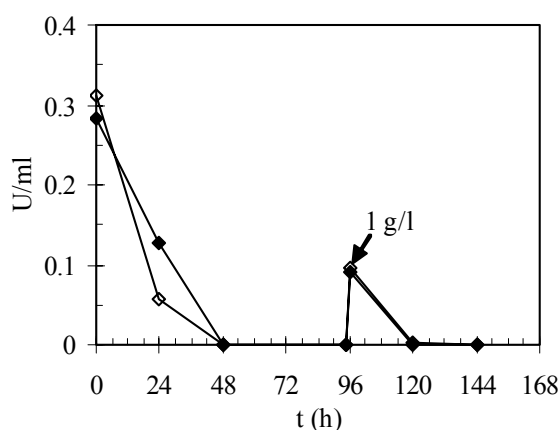


Figura 38: Monitoraggio dell'attività enzimatica della proteasi cisteinica (5 g/l) in presenza (♦) ed in assenza (◇) di OTA

Similmente alla proteasi aspartica, la proteasi cisteinica ha evidenziato una graduale perdita di attività durante il processo idrolitico, che scendeva del 55%-100% dalle 24h alle 48h, indipendentemente dalla presenza o assenza di OTA (Fig. 38).

Utilizzando la stessa concentrazione di enzima (5 g/l) è stato possibile degradare di circa il 70% una quantità quadrupla di OTA (80 µg/l) ad una velocità maggiore di circa 4 volte (1,6 µg/l*h in 24h). (Fig. 39). Anche in questa prova è stata monitorata l'attività enzimatica nel tempo, che evidenziava una graduale diminuzione del 78%, 85% e 97% a 24h, 48h e 96h, rispettivamente. (Fig. 40)

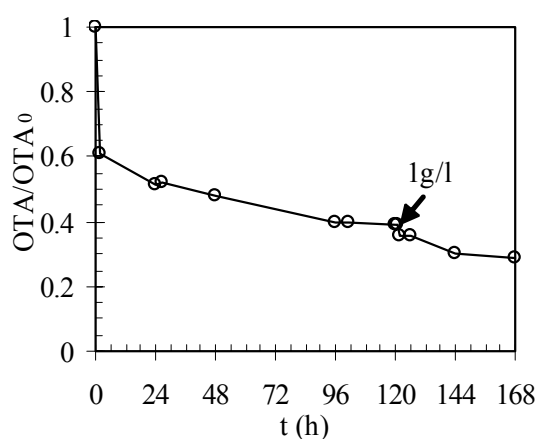


Figura 39: Monitoraggio del decremento relativo di OTA in un vino modello nel tempo rispetto alla concentrazione iniziale di ~80 µg/l in presenza di una concentrazione iniziale di enzima di 5 g/l seguita da un'ulteriore aggiunta di 1 g/l

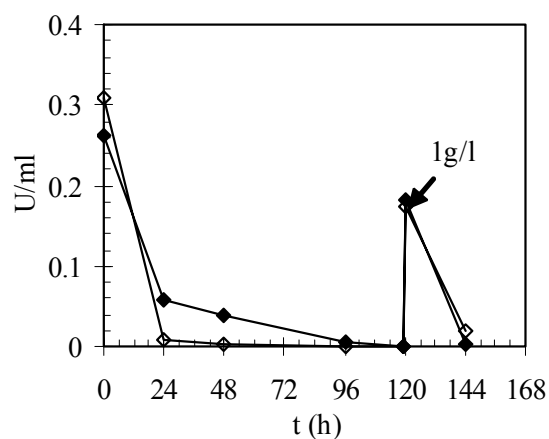


Figura 40: Monitoraggio dell'attività enzimatica della proteasi cisteinica (5 g/l) in presenza (♦) ed in assenza (◇) di OTA

Ulteriori prove sono state condotte utilizzando concentrazioni di enzima più basse (2 g/l) e aggiungendo enzima (sempre 2 g/l) quando questo perdeva di attività. Il decremento di OTA è stato monitorato per circa 300h. E' stata osservata una diminuzione dell'OTA del 17% dopo 24h (tempo della prima disattivazione dell'enzima). Aggiungendo in sequenza 2 g/l di enzima ogni volta che questo si inattivava, fino ad una massimo di 6 g/l, è stato possibile raggiungere un decremento della concentrazione iniziale di OTA del 70% (Fig. 41-42).

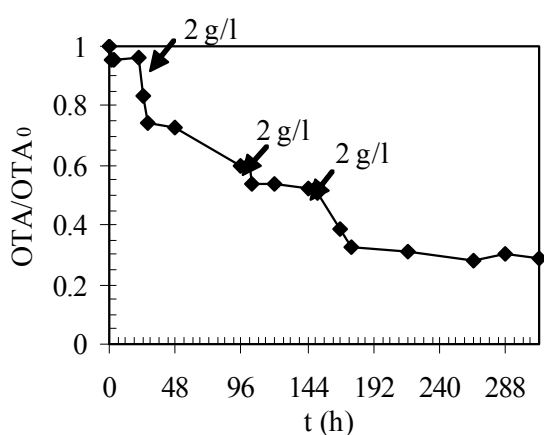


Figura 41: Monitoraggio del decremento relativo di OTA in un vino modello nel tempo rispetto alla concentrazione iniziale di ~40 µg/l in presenza di una concentrazione iniziale di enzima di 2 g/l seguita da tre ulteriori aggiunte di 2 g/l

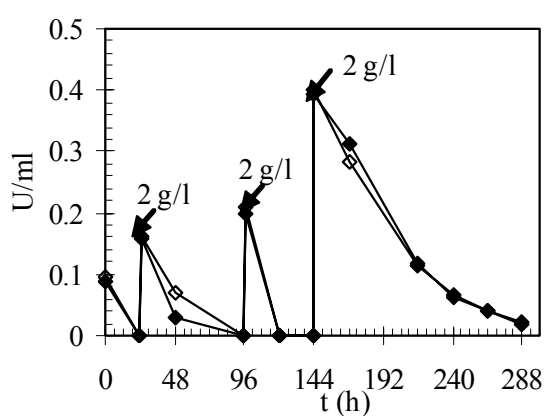


Figura 42: Monitoraggio dell'attività enzimatica della proteasi cisteinica (2 g/l) in presenza (♦) ed in assenza (◇) di OTA

Per confrontare l'effetto della rimozione di OTA utilizzando differenti concentrazioni della proteasi cisteinica (100 mg/l, 2,000 mg/l e 5,000 mg/l), la riduzione della tossina (240 $\mu\text{g/l}$) è stata monitorata per 24h, prima dell'inattivazione dell'enzima. La percentuale di decremento di OTA tendeva ad aumentare dal 4% al 60% passando da 100 mg/l a 5,000 mg/l di enzima (Fig. 43-44). In ogni prova si raggiungeva dopo 24h uno pseudo stato-stazionario.

La velocità di rimozione dell'enzima, stimata su un periodo di 24h, aumentava all'aumentare sia della concentrazione enzimatica che di OTA. In modo diverso dalla proteasi aspartica, nel range di OTA di 2 $\mu\text{g/l}$ -10 $\mu\text{g/l}$, questo aumento risultava più evidente ad alte concentrazioni di enzima.

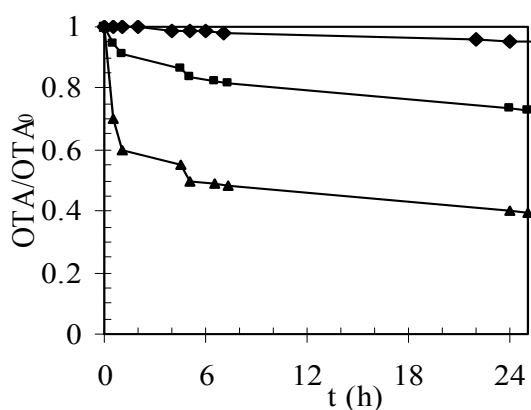


Figura 43: Decremento relativo di OTA in un vino modello nel tempo rispetto alla concentrazione iniziale di ~240 $\mu\text{g/l}$ a differenti concentrazioni di enzima (mg/l), 100 (♦), 2,000 (■) e 5,000 (▲)

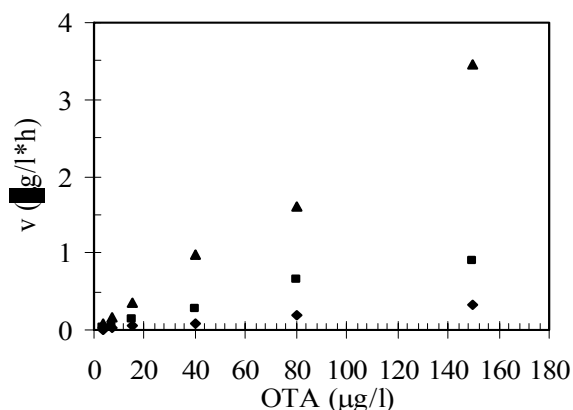


Figura 44: Velocità di rimozione dell'OTA riferita ad un periodo di 24h in funzione della concentrazione (mg/l) di: 100 (♦), 2,000 (■) e 5,000 (▲)

6. CONCLUSIONI

- Lo studio di caratterizzazione delle due proteasi acide, in vino modello, ha verificato una differente adattabilità dei due preparati enzimatici alle condizioni proprie dei vini. La proteasi cisteinica ha, infatti, manifestato una maggiore sensibilità agli effetti indotti dai parametri chimico-fisici testati nel vino modello (pH, temperatura, etanolo, anidride solforosa, tannini delle bucce e dei vinaccioli). Entrambi gli enzimi sono, comunque, risultati inattivi, dopo 24h, a temperature comprese tra 25 e 40°C.

- I risultati delle prove di risanamento da ocratossina A del vino modello, hanno evidenziato una maggiore efficacia detossificante della proteasi cisteinica rispetto a quella aspartica. La prima, infatti, ha indotto un abbattimento massimo del 70% del tenore iniziale della tossina a fronte del 30% riscontrato con l'altra.

- In conclusione, alla luce dei risultati sperimentali e tenuto conto del più basso costo dell'estratto enzimatico vegetale (20\$/kg), si può considerare più vantaggioso l'impiego della proteasi cisteinica per applicazioni in scala industriale. Il trattamento con l'enzima in forma libera sarebbe, comunque, da effettuarsi su vini finiti ancora contaminati, allo scopo di riportare il tenore della tossina entro valori di assoluta sicurezza.

- Prove di immobilizzazione della proteasi cisteinica sono state, tuttavia, programmate allo scopo di affrontare le problematiche legate alla stabilità dell'attività proteolitica, al sovradosaggio del preparato enzimatico, e al raggiungimento dello stato stazionario di pseudo-equilibrio.

7. BIBLIOGRAFIA

- **Anson M.L.** (1938) The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *Journal of General Physiology*, 22:79-89
- **Abarca ML., Accensi F., Bragulat MR., and Cabanes FJ.** (2001) Current importance of ochratoxin A-producing *Aspergillus* spp. *Journal of Food Protection* 64: 903–906
- **Baldi A. et al.** (2004). Evaluation of the protective effects of alpha-tocopherol and retinol against ochratoxin A cytotoxicity. *Brit. J. Nutr.*, 91:507-12. IF 2,616
- **Battilani P., Logrieco A.** (2006) Difesa della vite e funghi ocratossigeni nella filiera vitivinicola. *Informatore Fitopatologico*, 4: 26-29.
- **Belli N., Pardo E., Marìn S., Farré G., Ramos A.J., Sanchis V.,** (2004). Occurrence of ochratoxin A and toxigenic potential of fungal isolates from Spanish grapes. *J. Sci. Food Agric.*, 84: 541- 546
- **Berry C.L.** (1988). The pathology of mycotoxins. *J. Pathology*, 154: 301-311.
- **Bottalico A.** (1988). Le micotossine nelle piante e nelle derrate alimentari. *L'Italia Agricola*, 125: 193-212.
- **Bradford M.M.** (1976). *Anal.Biochem.*, 72: 248
- **Burdaspal P.A., and Legarda T.M.** (1999). Ochratoxin A in wines and grape products originating from Spain and other European countries. *Alimentaria*, 36: 107–113
- **Castellari M., Versari A., Fabiani A., et al.** (2001). Removal of Ochratoxin A in red wines by means of adsorption treatments with commercial fining agents. *J. Agr. Food Chem.*, 49:3917-3921.
- **Causin R.** (2004). Le micotossine: chi le produce, cosa sono e cosa fanno. *Estratto Bollettino settimanale ASS.IN.CER.*
- **Corrier D.E.** (1991). Mycotoxicosis: mechanisms of immunosuppression. *Veterinary immunology and immunopathology*, 30: 73-87.
- **Deberghes P., Betbeder A.M., Boisard F., et al.** (1995). Detoxification of Ochratoxin A, a food contaminant: prevention of growth of *Aspergillus ochraceus* and its production of Ochratoxin A. *Mycotox. Res.*, 11:37-47.
- **Dirheimer G.** (1996). Mechanistic approaches to ochratoxin toxicity. *Food Add. Cont.*, 13: 45-48.

- **Da Rocha Rosa C.A., Palacios V., Combina M., Fraga M.E., De Oliveira Rekson A., Mangoli C.E., Dalcero A.M.**, (2002). Potential ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil. *Food Add. Cont.*, 19, 408-414.
- **El-Nezami H et al.** (1998). Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B1. *Food Chem Toxicol*, 36:321-326.
- **Esti M., Fidaleo M., Moresi M., Tamborra P.** (2007). Modelling of urea degradation in white and rosè wines. *J. Agr. Food Chem*: (in press)
- **Farris G. A., Cabras P., Cubaiu ., Angioni A., Budroni M., and Orro D.** (2006). Interazione tra lieviti vinari e Ocratossina A in fase fermentativa. *VQ*, 4:40-44
- **Festas I., Herbert P., Santos L., Cabral M., Barros P., and Alves A.** (2000). Ochratoxin A in some Portuguese wines: Method validation and screening in PortWine and Vinho Verde. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51: 150–154
- **Fregoni M.** (2005). Interventi nel vigneto per ridurre l'OTA nei vini. *VQ*, 2: 64-66.
- **Filali A., Ouammi L., Betbeder A.M., Baudrimont I., Soulaymani R., Benayada A. and Creppy E.E.** (2001). Ochratoxin A in beverages from Morocco: A preliminary survey. *Food Additives and Contaminants*, 18: 565–568
- **Folin D, Ciocalteau V** (1927). On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *Journal of Biology and Chemistry*, 73: 627–50.
- **Galvano F et al.** (2001) Dietary strategies to counteract mycotoxins' effects. A review. *J Food Prot*, 64:120-131.
- **Guerra M.C. et al.** (2004). Effects of rosmarinic acid against aflatoxin B1 and ochratoxin-A-induced cell damage in a human hepatoma cell line (Hep G2). *J. Appl. Toxicol.*, 24:289-96. IF 1,272
- **Guerra MC. et al.** (2005). Cyanidin-3-o-B-glucopyranoside, a natural free radical scavenger, against aflatoxin b1 and ochratoxin a induced cell damage in a human hepatoma cell line (hep g2) and in a human colonic adenocarcinoma cell line (caco-2). *Brit. J. Nutr.* IF 2,616 (in press)
- **Hoehler D and RR Marquardt.** (1996). Influence of vitamins E and C on

the toxic effects of ochratoxin A and T-2 toxin in chicks. *Poult Sci*, 75:1508-1515.

- **Hohler D et al.** (1999). Metabolism and excretion of ochratoxin A fed to sheep.. *J Anim Sci*, 77:1217-1223.
- **Kappes E.M., Serrati L., Drouillard J.B., Cantus J.M., Kazantzidou A.**, (2005). A crop protection approach to *Aspergillus* and OTA management in Southern European vineyards. In: Proc.s of International Workshop: “Ocharatoxin A in grapes and wine: prevention and control”; section 2: Field and environment, Marsala (TP) 20-21 October. *Internet Journal of viticulture and Enology* 2006 N°2 www.infowine.com
- **Kuiper-Goodman T.**, (2004). Risk assessment and risk management of mycotoxins in food. In *Mycotoxins in food, detection and control*, Magan N. and Olsen M. Eds, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England.
- **Jelinek, C.F.** (1987). Distribution of mycotoxins and analysis of worldwide commodities data, including data from FAO/WHO/UNEP food contamination monitoring programme. Docum. MYC 87/5, Joint FAO/WHO/UNEP. Second International Conference on Mycotoxins. Bangkok 28.9/3.10, 103.
- **Leroux P., Gredt M., Guérin L., Béguin J., Lebrihi A.**, (2002). Fungicides utilisés en viticulture et mycotoxines. *PHYTOMA La Défense des Végétaux*, 553: 28-31.
- **Markaki P., Delpont Binet C., Grosso F., and Dragacci S.** (2001). Determination of ochratoxin A in red wine and vinegar by immunoaffinity high-pressure liquid chromatography. *Journal of Food Protection*, 64: 533–537
- **Ottener H., and Majerus P.** (2000). Occurrence of ochratoxin A in wines: Influence of the type of wine and its geographical origin. *Food Additives and Contaminants*, 17, 9: 793–798
- **OIV**, (2005). Codice di buone pratiche vitivinicole per limitare al massimo la presenza di ocratossina A nei prodotti derivati dalla vite. *Risoluzione Viti-Oeno* 1/2005
- **Pietri A., Bertuzzi T., Pallaroni L., and Piva G.** (2001). Occurrence of ochratoxin A in Italian wines. *Food Additives and Contaminants*, 18: 647–654
- **Pitout M.J.** (1968). The hydrolysis of ochratoxin A by some proteolytic enzymes. *Biochemical Pharmacology*, 18: 485-491.

- Piva A. et al. 2005. Performance and biochemical parameters of weanling pigs consuming contaminated diets with or without the addition of activated charcoal. *J. Anim. Sci.* IF 1,576 (Accettato per la pubblicazione)
- **Regolamento (CE) N. 123/2005** della Commissione del 26 gennaio 2005.
- Regolamenti (CE) N: 466/2001, 472/ 2002; 2174/2003, 1425/2003, 683/2004, 856/2005, 455/2004
- **Richard J., Thurston J.R. and Pier A.C.** (1978). Effect of mycotoxins on immunity. In: *Toxins: animal, plants and microbial* (P. Rosemberg, ed) Pergamon press, New York, 801-817.
- **Ritieni A.; Randazzo G.** (5 Maggio 1997). Le micotossine (Parte I). *Biologi Italiani* Anno XXVII : 22-29.
- **Rousseau J.** (2004) Ocratossina A nei vini: stato delle conoscenze. Parte 1, 2, 3, 4. www.vinidea.net - *Rivista Internet Tecnica del Vino* - N°1-2-3
- **Sage L., Krivobok S., Delbos E., Seigle-Murandi F., Creppy E.E.,** (2002). Fungal flora and ochratoxin A production in grapes and musts from France. *J. Agric.Food Chem.*, 50: 1306-1311.
- **Silva A., and Battilani P.** (2006). Ocratossina A nell'uva potrebbe essere un problema. *L'Informatore Agrario* 21: 58-61
- **Silva A., Galli R., Grazioli B. and Fumi M.D.** (2003). Metodi di riduzione dei residui di ocratossina A nei vini. *Ind Bevande*, 32, 187: 467-472.
- **Stockley C.S.** (2000). Ochratoxin A a metabolite on the agenda for the global wine industry. *Australian-Grapegrower & Winemaker*, 438a: 111-112
- **Surai P.F. & Dvorska J.E.** (2005). Interactions Between Mycotoxins, Immunity and Antioxidant Systems. In: *European Mycotoxin Seminar Series – Evaluating the impact of Mycotoxins in Europe (European Lecture Tour 2005)*, 110-132.
- **Surai P.F.** (2002). *Natural Antioxidants in Avian Nutrition and Reproduction*. Nottingham University Press. Nottingham, UK.
- **TECNOALIMENTI S.C.P.A.** (2006) Le micotossine: modalità di contaminazione, i rischi per la salute, gli strumenti di prevenzione e la regolamentazione nel mondo a tutela del consumatore.
- **Turbic A et al.** (2002). Selective in vitro binding of dietary mutagens, individually or in combination, by lactic acid bacteria. *Food Addit Contam.*, 19:144-52.

- Ueno Y.** (1998). Residue and risk of ochratoxin A in human plasma and beverages in Japan. *Mycotoxins*, 47: 25–32
- **Van der Merwe K.J., Steyn P.S., Fourie L.,** (1965). Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus*. *Wilh. Nature*, 205: 1112-1113.
 - **Varga J., Rigo K., Teren J.** (2000). Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus species*. *International Journal of Food Microbiology*, 59: 1–7.
 - **Visconti A., Pascale M., and Centonze G.** (2000). Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and HPLC. *Journal of Chromatography A*, 864: 89–101.
 - **World Health Organization-International Agency for research on cancer, (WHO/IARC)** (1993). Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. *Lione*, 56: 599.
 - **Zimmerli B., and Schlatter J.** (1991). Ethyl carbamate: analytical methodology, occurrence, formation, biological activity and risk assessment. *Mutat. Res.*, 259: 325–350.

7.1 SITOGRAFIA

- <http://www.aboproject.it/DettaglioSostenitore.asp?id=264&L=IT>
Gruppo Vason- ENOLOGICA VASON S.r.l., Nassar di Pedemonte(VR)
- <http://www.acquabuona.it/agronomo/annodue/micotossine.html>
Tosi L. Micotossine e Vino.
- <http://www.codexalimentarius.net/web/index>
- <http://cgat.ukm.my/protease/cysteinemech.html>-<http://delphi.phys.univ-tours.fr/Prolysis/>
- <http://www.dalcin.com/ita/depliant/Atoxil.pdf>
- <http://www.efsa.eu>
- <http://www.euro.who.int/foodsafety> (WHO – Regional office for Europe)
- <http://www.fao.org>
- <http://www.fda.gov/>
- <http://www.iarc.fr/>
- <http://www.ific.org>
- <http://europe.ilsa.org/> (ILSI Europe - International Life Sciences Institute)
- <http://www.italia.biomin.net>

(Mycofix[®] Plus, Biomin GmbH, 3130 Herzogenburg, Austria; Biomin Laboratory 3791 Singapore; Biomin America Inc. 1846 Lockhill-Selma Suite 101 San Antonio).

- <http://jecfa.ilsa.org> (JECFA)
- <http://www.ochra-wine.com/navigation.html>
- <http://www.politicheagricole.it>
- <http://progetti.iss.it/cnra/tema> (ISS)
 - <http://www.syngenta.it/syngentacp->
- <http://www.teatronaturale.it/articolo/1689.html>

Grimelli A., (2005) Ocratossina, un pericolo e una minaccia per la salute umana. Stabilito il limite di legge, in vigore dalla campagna 2005 ora è necessario ottemperarvi.

- <http://www.who.int/pcs/> (IPCS)
- <http://www.who.int/home-page/>
- http://www.wineinstitute.org/industry/fedlaw/regs/27cfr_part24/24_246.htm