

POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

**Corso di Laurea Magistrale
in Ingegneria Chimica e dei Processi Sostenibili**

Tesi di Laurea Magistrale

**Studio sui metodi di
riduzione dell'ocratossina A nei vini:
Modellazione di un biofiltro**



Relatori

prof.ssa Francesca Bosco
prof.ssa Micaela Demichela

Candidato

Sabino Angelo Forte

Dicembre 2020

Indice

Sommario	7
1. Introduzione	9
2. Micotossine	13
2.1 Informazioni generali.....	13
2.1.1 <i>Definizione generale</i>	13
2.1.2 <i>Effetti tossici e malattie</i>	13
2.1.3 <i>Principali alimenti contaminati</i>	14
2.1.4 <i>Influenza dei fattori ambientali sulla produzione di micotossine</i>	17
2.1.5 <i>Specie fungine tossiche</i>	17
2.1.6 <i>Patulina</i>	18
2.2 Ocratossina A	19
2.2.1 <i>Struttura chimica</i>	19
2.2.2 <i>Sintesi OTA</i>	20
2.2.3 <i>Effetti</i>	23
2.2.4 <i>Contaminazione da ocratossina A nei vini</i>	24
2.2.5 <i>Analisi rischio OTA nelle diverse zone viticole</i>	25
2.2.6 <i>Aspetti normativi</i>	26
3. Prevenzione in agricoltura biologica contro i marciumi secondari	29
3.1 Marciumi secondari.....	29
3.2 Strategie di controllo.....	30
3.2.1 <i>Pratiche generali</i>	30
3.2.2 <i>Fungicida – Rame</i>	30
3.2.3 <i>Fungicida – Zolfo</i>	32
3.2.4 <i>Fungicida – Zeolite</i>	33
3.2.5 <i>Insetticida - Bacillus thuringiensis</i>	34
4. Protezione contro l’Ocratossina A	37
4.1 Agenti chiarificanti	37
4.1.1 <i>Effetti dei diversi agenti chiarificanti</i>	37
4.1.2 <i>L’uso dei carboni attivi in cantina come decontaminanti</i>	39
4.2 L’uso di microrganismi come riduttori di OTA	40
4.2.1 <i>Lactobacillus (LAB)</i>	40
4.2.2 <i>Funghi filamentosi</i>	44
4.2.3 <i>Enzimi</i>	45
5. L’uso delle vinacce come biomassa filtrante: Meccanismo d’adsorbimento	48
5.1 Materiali e metodi.....	50

5.1.1	<i>Reagenti e campioni</i>	50
5.1.2	<i>Esperimenti di adsorbimento</i>	51
5.1.3	<i>Isoterme d'adsorbimento all'equilibrio</i>	52
5.1.4	<i>Elaborazione dei dati e curve fitting</i>	53
5.2	Modelli isotermici di adsorbimento per ocratossina A	54
5.2.1	<i>Modello di Langmuir</i>	55
5.2.2	<i>Modello di Freundlich</i>	57
5.3	Risultati e discussione	58
5.3.1	<i>Effetto della dimensione delle particelle</i>	58
5.3.2	<i>Effetto del tempo di contatto</i>	59
5.3.3	<i>Effetto del pH</i>	59
5.3.4	<i>Effetto concentrazione adsorbente</i>	62
5.3.5	<i>Isoterme d'adsorbimento (micotossina singola)</i>	63
5.3.6	<i>Isoterme d'adsorbimento ocratossina A</i>	64
5.3.7	<i>Isoterme d'adsorbimento (micotossine multiple)</i>	65
5.3.8	<i>Effetto pH nel desorbimento</i>	66
5.3.9	<i>Aspetti termodinamici</i>	68
6.	L'uso delle vinacce come biomassa filtrante: Il "ripasso"	71
6.1	Materiali e metodi	71
6.1.1	<i>Evoluzione dell'OTA durante i processi di vinificazione e conservazione</i>	71
6.1.2	<i>Andamento nel tempo dell'adsorbimento dell'ocratossina A da parte di vinacce non contaminate</i>	73
6.1.3	<i>Ripasso su vinacce della stessa varietà di uva rossa</i>	73
6.1.4	<i>Ripasso su vinacce in scala industriale</i>	74
6.1.5	<i>Ripasso su vinacce provenienti da varietà di uve diverse</i>	76
6.2	Risultati e discussione	78
6.2.1	<i>Andamento nel tempo dell'adsorbimento dell'ocratossina A da parte di vinacce non contaminate</i>	78
6.2.2	<i>Ripasso su vinacce della stessa varietà di uva rossa</i>	79
6.2.3	<i>Ripasso su scala industriale</i>	82
6.2.4	<i>Ripasso su vinacce provenienti da varietà di uve diverse</i>	82
6.2.5	<i>Effetto ripasso sui parametri di qualità del vino</i>	84
7.	Modellazione biofiltro	89
7.1	Panoramica generale del biofiltro	89
7.1.1	<i>Rappresentazione 3D</i>	89
7.1.2	<i>Principio di funzionamento</i>	93
7.1.3	<i>Fasi del processo</i>	94

7.2 Dimensionamento biofiltro ed elementi ausiliari	95
7.2.1 Dimensioni biofiltro in 2D (figure 63-65)	95
7.2.2 Dimensionamento biofiltro	96
7.2.3 Dimensionamento pompe e tubazioni	98
7.2.4 Agitatore laterale	107
7.2.5 Valvola a diaframma con apertura ad iride	108
7.2.6 Processo di pulizia (CIP)	109
7.3 Tempi e percentuali di rimozione OTA	111
7.3.1 Tempi singola operazione	111
7.3.2 Tempo totale del processo per ogni concentrazione di OTA	112
8. Conclusioni	115
Bibliografia	118

Sommario

Questo lavoro di tesi si propone di studiare le principali micotossine presenti nelle colture dell'azienda agricola biologica *Forte*, considerando come “case study” la coltura della vite. In particolare, sono state approfondite le cause che determinano la contaminazione dell'uva da parte di questi metaboliti secondari, dannosi per la salute dell'uomo. Inoltre, al fine di garantire la salubrità di uno dei prodotti finali derivanti dal frutto della *vite*, il vino, sono stati analizzati studi sperimentali relativi alla riduzione della ocratossina A. Infine, partendo dai dati raccolti si è modellizzato un biofiltro, a base di vinacce, capace di ridurre la concentrazione di micotossine presenti.

Nelle annate sfavorevoli, la contaminazione da ocratossina A nei vini prodotti in aree geografiche a rischio contaminazione da *Aspergillus carbonarius*, il fungo maggiormente responsabile della produzione di questa micotossina sull'uva, può essere particolarmente elevata per cui sono necessari interventi di decontaminazione in cantina.

Comparando diversi agenti capaci di ridurre la concentrazione dell'ocratossina A (lieviti, batteri, enzimi, scarti vegetali ecc.) si è visto come le vinacce abbiano una elevata affinità per tale micotossina; durante i processi di vinificazione esse adsorbono il 95% della tossina inizialmente presente nei grappoli contaminati mentre il 4% resta nel mosto/vino e l'1% rimane adeso alle fecce. Durante le fasi di pigiatura e macerazione, l'ocratossina A raggiunge un equilibrio dinamico tra la quantità disciolta nella frazione liquida e quella adesa alla frazione solida, per cui dopo la svinatura e la pressatura la concentrazione di micotossina rimane invariata nel vino anche dopo un anno [1].

L'uso di agenti chiarificanti, come il carbone ad uso enologico attivo, ha efficacia notevole nell'adsorbimento di ocratossina A (OTA), infatti il codice di comportamento per la prevenzione e la riduzione di tale tossina nei vini prevede l'uso di tale carbone enologico attivo nella cantine, alle dosi più basse possibili (*Codex Alimentarius Commission*, 2007).

Il carbone enologico ha però, effetti negativi nei vini; ad esempio, nei vini rossi riduce il corpo, l'intensità di colore e le concentrazioni di polifenoli, inoltre può indurre riduzioni ancora più drastiche di altre sostanze molto importanti che contribuiscono agli effetti salutistici dei vini rossi.

Analizzando il fenomeno di adsorbimento su vinacce tramite dati sperimentali, sono stati utilizzati modelli come quello di *Langmuir* e *Freundlich*, al fine di ottenere dei parametri d'interesse nella modellazione del biofiltro con vinacce prive, o con livelli molto bassi, di contaminazione. Lo scopo è quello di automatizzare il processo di decontaminazione dei mosti/vini attraverso una via utile ed ecologica, che può essere applicata dalle aziende vinicole per soddisfare sia il Regolamento UE, che gli standard di commercio privato senza alterare i parametri di qualità di mosti e vini, garantendo in alcuni casi, miglioramento di alcune proprietà.

1. Introduzione

I funghi filamentosi microscopici, comunemente noti come muffe, possono svilupparsi principalmente su derrate alimentari di origine vegetale (mais, grano, ecc.) ed in alcuni casi anche di origine animale (prodotti carnei, insaccati), e produrre, in particolari condizioni ambientali, sostanze tossiche note come micotossine. Le micotossine sono prodotte dal metabolismo secondario di alcune specie fungine appartenenti principalmente ai generi *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* sia a seguito di stress ambientali cui la pianta è stata sottoposta, ad esempio condizioni di estrema aridità del campo, mancanza di un assorbimento bilanciato di nutrienti, sia a causa di fattori ambientali come condizioni climatiche (temperatura e umidità), o ancora attacco da insetti e volatili. Attualmente, sono note più di 300 micotossine che, essendo prodotte da un ampio spettro di specie fungine, presentano strutture chimiche differenziate, ad esempio le aflatossine che presentano una struttura eterociclica altamente ossigenata, le ocratossine che presentano il gruppo isocumarina, e le patuline che invece sono dei lattoni eterociclici insaturi.

Le micotossine sono dotate di elevata tossicità per l'uomo con caratteristiche di genotossicità, cancerogenicità, immunotossicità, mutagenicità, nefrotossicità e teratogenicità. Gli alimenti possono risultare contaminati da micotossine a seguito di contaminazione fungina direttamente sulla derrata: è stato calcolato che nel mondo circa il 25% dei raccolti sono soggetti alla contaminazione da micotossine nelle varie fasi di produzione, lavorazione, trasporto ed immagazzinamento. [2]

Analizzando le caratteristiche intrinseche della frutta prodotta nell'azienda campione, si è visto come gli alimenti ricchi in carboidrati siano risultati più esposti a questo tipo di contaminazione. Nell'azienda in questione dunque, la contaminazione da parte della patulina risulta preponderante nelle colture delle *Drupaceae*, di cui fanno parte la pianta del Pesco e dell'Albicocco, la contaminazione persiste fino al prodotto trasformato che può essere ad esempio, il succo di frutta derivante da queste materie prime. Per quanto riguarda la contaminazione da parte dell'ocratossina A (OTA), essa è presente nella coltura della vite, interessando maggiormente le uve nere e anche in questo caso, la contaminazione è presente nei prodotti di trasformazione derivanti da tali materie prime, come ad esempio il vino rosso.

La prevenzione in quest'ambito è fondamentale; partire da una materia prima poco contaminata da questo genere di funghi è il modo migliore per garantire un prodotto finale di qualità e salubrità elevate. Nel caso di colture biologiche, la prevenzione acquisisce un ruolo ancora più importante in quanto si ha poco margine di protezione in questo tipo di agricoltura nel caso di avvenuta contaminazione da parte di funghi.

Gli anticrittogamici nella coltura biologica sono ad esempio lo zolfo, il rame, la zeolite micronizzata e il *Bacillus thuringiensis* che a differenza degli altri tre, ha un'azione insetticida piuttosto che fungicida.

Talvolta però, per cause climatiche, ambientali ed in generale per fattori esterni, la prevenzione risulta inefficace e si incorre ugualmente nella contaminazione della materia prima da parte di funghi, e dunque nella lavorazione di tali vegetali è opportuno avere delle tecniche o dei mezzi capaci di abbattere la carica di micotossine presenti, sotto i limiti di legge, al fine di commercializzare un prodotto sano.

In passato, sono stati impiegati metodi di decontaminazione fisica e chimica, con successo variabile. Qualunque sia la strategia di decontaminazione utilizzata, essa deve soddisfare alcuni criteri di base:

- La micotossina deve essere inattivata o distrutta mediante trasformazione in composti non tossici;
- Le spore fungine e il micelio dovrebbero essere distrutti, in modo che non si formino nuove tossine;
- L'alimento o la materia prima devono conservare il loro valore nutritivo e le caratteristiche organolettiche;
- Le proprietà fisiche della materia prima non dovrebbero cambiare in modo significativo;
- La decontaminazione deve essere economicamente sostenibile ed il costo deve essere inferiore al valore della merce contaminata.

La maggior parte delle micotossine sono termostabili, quindi il trattamento termico, solitamente applicato nella tecnologia alimentare, non ha un effetto significativo sul livello di micotossine, oltre che essere economicamente dispendioso. In diversi paesi, sono stati compiuti sforzi per trovare un modo economicamente accettabile di distruzione delle micotossine in prodotti non tossici utilizzando diverse sostanze chimiche come alcali e agenti ossidanti. Sebbene tali trattamenti riducano quasi completamente la concentrazione di micotossine, queste sostanze chimiche causano anche perdite di alcuni nutrienti. Più recentemente, sono state utilizzate la decontaminazione biologica e la biodegradazione di micotossine con microrganismi o enzimi. È stato dimostrato che molte specie di batteri e funghi degradano le micotossine.

La fermentazione è uno dei mezzi più semplici ed economici di conservazione degli alimenti, oltre a conferire benefici nutrizionali e organolettici agli alimenti fermentati. La fermentazione è effettuata dal microbiota presente naturalmente nelle materie prime o da colture “starter” aggiunte nel processo. I lieviti, in particolare *S. cerevisiae*, *Candida krusei*, e i batteri lattici (LAB) fanno parte della popolazione microbica naturale nella fermentazione alimentare spontanea e come colture “starter” nell'industria alimentare e delle bevande.

Tuttavia, rimane il dubbio sulla tossicità dei prodotti della degradazione enzimatica e sugli effetti indesiderati della fermentazione con microrganismi non nativi, sulla qualità degli alimenti[3].

Per contribuire alla riduzione della tossicità e all'aumento della sicurezza dei vini, un gruppo spagnolo di *Tecnalia, Biotechnology & Pharma Unit* ha valutato la rimozione di ocratossina A dal vino rosso mediante trattamento con sei agenti chiarificanti: bentonite, albumina di uovo, complesso di PVPP (polivinilpolipirrolidone), gelatina, chitina e chitosano. Oltre alla variazione di concentrazione di OTA, è stato misurato l'impatto su: pH del vino, parametri di colore, quali tono (T), intensità del colore (CI) e parametri colorimetrici CIELab; indice polifenolico totale (TPI); e contenuto totale di antocianine.

L'effetto quantitativo sull'eliminazione dell'OTA e anche quello sui parametri di qualità del vino variavano in base al dosaggio e al tipo di agenti applicati. Generalmente, la rimozione dell'OTA ottenuta in tutti i trattamenti aumentava all'aumentare del dosaggio del chiarificante, ma peggiorava anche l'impatto sulla qualità del vino [4].

Tra gli agenti chiarificanti più utilizzati per questa applicazione si ha il carbone enologico, che mostra la più alta capacità di adsorbimento dell'ocratossina A. Il carbone per uso enologico è stato proposto come pratica accettabile per i vini fermi e il codice di condotta per la prevenzione e la riduzione della contaminazione dell'ocratossina nel vino prevede l'uso delle dosi più basse ed efficaci di carbone enologico. Tuttavia è noto che l'efficacia del carbone nella rimozione dell'OTA è

direttamente correlata alla riduzione dei parametri di qualità dei vini trattati, compreso il contenuto di polifenoli [5].

Recentemente, è stata suggerita una procedura di vinificazione innovativa che prevede l'uso di vinacce d'uva come misura correttiva per ridurre i livelli di ocratossina A nel mosto e nel vino, dove per vinacce s'intende il residuo della pressa che rimane durante la lavorazione dell'uva per la vinificazione, costituito da bucce pressate, frazioni cellulari derivanti dalla polpa dell'uva e vinaccioli. La procedura ha proposto il ripasso di mosti o vini contaminati su vinacce non aventi o contaminazione da OTA, arrivando a percentuali di rimozione fino al 65% di OTA entro 24 ore. Questi risultati hanno supportato l'ipotesi che la vinaccia abbia un'ottima affinità per l'adsorbimento di OTA [6].

A partire da questi studi, si è approfondito ciascun meccanismo di riduzione di OTA e si è sviluppato, in chiave teorica, un modello di biofiltro capace di rimuovere efficacemente l'ocratossina A senza incidere negativamente le proprietà del vino.

2. Micotossine

2.1 Informazioni generali

2.1.1 Definizione generale

Il termine micotossina fu usato per la prima volta nel 1961 all'indomani di una crisi veterinaria in Inghilterra, durante la quale morirono migliaia di animali. La malattia era collegata a una farina di arachidi, incorporata nella dieta, contaminata da una tossina prodotta dal fungo filamentoso *Aspergillus flavus* (Bennet & Klich, 2003; Richard, 2007).

In generale, le micotossine sono composti a basso peso molecolare che vengono sintetizzati durante il metabolismo secondario da funghi filamentosi; la loro struttura chimica può variare da semplici composti C₄ a sostanze complesse (Paterson e Lima, 2010). Le micotossine sono contaminanti naturali nelle materie prime, negli alimenti e nei mangimi.

Apparentemente, le micotossine non hanno alcun significato biochimico sulla crescita dei funghi; potrebbero essersi sviluppate per fornire un sistema di difesa contro insetti, microrganismi, nematodi, animali e umani (Etzel, 2002) [7].

2.1.2 Effetti tossici e malattie

Le micotossine sono tossiche per i vertebrati e gli esseri umani a basse concentrazioni. Le micotossicosi nell'uomo o negli animali sono state correlate al consumo di alimenti o mangimi, esse sono non contagiose, non trasferibili e non infettive (Zain, 2011).

Le micotossine hanno vari effetti acuti e cronici sull'uomo e sugli animali, a seconda della specie. All'interno di una data specie, l'impatto delle micotossine sulla salute è influenzato da età, sesso, peso, dieta, esposizione ad agenti infettivi e dalla presenza di altre micotossine (effetti sinergici) e sostanze farmacologicamente attive (Milicevic et al., 2010; Zain, 2011). La maggior parte delle micotossine attualmente conosciute sono raggruppate, in base alla loro tossicità cronica, come mutagene, cancerogene o teratogene. In base al loro sito di azione, sono classificate in emotossine, epato-, nefroni, dermato-, neuro- o immunotossine (Niessen, 2007). Le micotossine maggiormente presenti al mondo sono: aflatossine, fumonisine, ocratossine, deossivalenolo e zearalenone. La cancerogenicità è stata accertata per aflatossine e fumonisine (Mazzoni et al., 2011; Wogan, 1992). L'aflatossina B₁ (AFB₁) è stata collegata al cancro primario del fegato nell'uomo, AFB₁ agisce sinergicamente con l'infezione da HBV ed è stata classificata come cancerogena nell'uomo (cancerogeno di gruppo 1). La fumonisina B₁, il più abbondante dei numerosi analoghi della fumonisina, è stata classificata come cancerogeno del gruppo 2B (possibile cancerogeno per l'uomo) (Zain, 2011; Wild & Gong, 2010). Il ruolo potenziale dei fattori dietetici per contrastare gli effetti tossici delle micotossine è stato esaminato da Galvano et al. (2001): è stato segnalato l'effetto di antiossidanti, componenti alimentari e additivi sulla riduzione della tossicità, diminuendo la formazione di tossine e aumentando il metabolismo. Più micotossine possono essere presenti contemporaneamente all'interno di una materia prima come frutta o cereali, a seconda delle condizioni ambientali e

della disponibilità del substrato (Milicevic et al., 2010). Quindi ci si può aspettare che gli esseri umani e gli animali siano esposti ad una miscela di micotossine piuttosto che a singoli composti. Ad esempio, gli effetti citotossici interattivi (sinergici) di ocratossina A, ocratossina B (OTB), citrinina e patulina, prodotti da un certo numero di specie di *Penicillium* e *Aspergillus*, sono stati recentemente studiati nel lavoro di Heussner et al. (2006) [8]. Nella figura 1 è possibile osservare gli effetti tossici di ciascuna tossina:

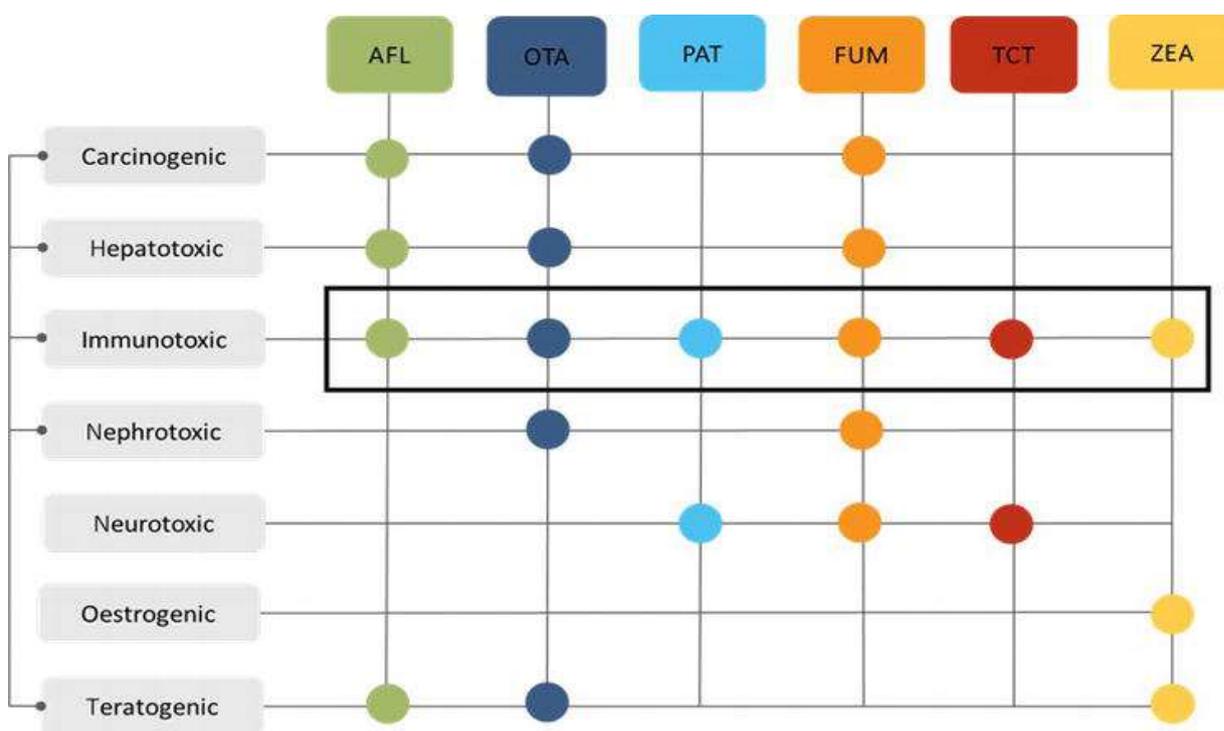


Figura 1, Effetti sulla salute di aflatoxina (AFL), ocratossina A (OTA), patulina (PAT), fumonisina (FUM), tricoteceni (TCT) e micotossina zearalenone (ZEA) [9]

L'esposizione alle micotossine può avvenire dunque per ingestione, inalazione e contatto cutaneo ed è quasi sempre accidentale. La maggior parte dei casi di micotossicosi (animali e umani) derivano dal consumo di alimenti contaminati.

2.1.3 Principali alimenti contaminati

È stato stimato che il 25% delle colture mondiali è contaminato da funghi filamentosi e le materie prime possono essere, sia prima che dopo il raccolto, contaminate da micotossine. Le micotossine presenti negli alimenti differiscono da paese a paese in relazione alle diverse colture, pratiche agronomiche e condizioni climatiche (Bryden, 2007). Poiché i cambiamenti climatici influenzano la crescita dei funghi micotossinogeni, anche la produzione di micotossine ne viene influenzata (Magan et al., 2003).

Attualmente sono note più di 400 micotossine. L'attenzione scientifica si è concentrata principalmente su quelle che si sono dimostrate cancerogene e / o tossiche per l'uomo e gli

animali. Tra le varie classi di micotossine presenti nell'agricoltura e nell'industria alimentare, cinque classi di micotossine sono considerate le più pericolose: aflatossine (aflatossina B₁), ocratossine (ocratossina A), fumonisine (fumonisina B₁), zearalenone e patulina che derivano dal metabolismo del polichetide (PK) e tricoteceni (deossinivalenolo), la cui via biosintetica è di origine terpenoide. Le PK sono metaboliti derivati dalla condensazione ripetitiva di unità di acetato o altri acidi carbossilici a corta catena, tramite un meccanismo enzimatico simile a quello responsabile della sintesi degli acidi grassi (*Huffman et al.*, 2010). L'aflatossina, l'ocratossina, la fumonisina, il tricotecene, lo zearalenone e la patulina sono le micotossine più diffuse nell'alimentazione animale e umana [10]. Nella tabella 1 sono rappresentati i principali alimenti contaminati da alcune micotossine con i relativi effetti tossici:

Micotossine	Genere / specie	Alimenti contaminati	Effetti tossici e malattie
Aflatossina	<i>Aspergillus flavus</i> <i>A. parasiticus</i> <i>A. nomius</i> <i>Penicillium</i>	Cereali, mangimi, semi oleosi e polpa, cocco	Cancerogeno, epatotossicità, teratogenicità, diminuzione del sistema immunitario, che influisce sulla struttura del DNA, epatite, sanguinamento, lesioni renali
Fumonisina	<i>Fusarium verticillioides</i> <i>F. culmorum</i>	Cereali, mais	Encefalomalacia, edema polmonare, cancerogeno, neurotossicità, danno epatico, insufficienza cardiaca, cancro esofageo nell'uomo
Ocratossina OTA	<i>Aspergillus Penicillium</i> <i>A. ochraceus</i> <i>P. nordicum</i> <i>P. verrucosum</i>	Cereali, erbe aromatiche, semi oleosi, fichi, carne essiccata, frutta e vino	Danni ai reni e al fegato, perdita di appetito, nausea, vomito, danni al sistema immunitario, cancerogeno
Patulina	<i>Aspergillus terreus</i> <i>A. clavatus</i> <i>Penicillium carneum</i> <i>P. clavigerum</i> <i>P. griseofulvum</i>	Insilato, frumento, mangimi, mele, uva, pesche, pere, albicocche, olive, cereali	Sindromi neurali, emorragia cerebrale, lesioni cutanee, cancro della pelle, polmone, mutagenicità, effetto antibatterico
Tricoteceni (T2, DON, DAS, HT2)	<i>Fusarium Cephalosporium Trichoderma Fusarium oxysporum</i>	Cereali, mangimi, insilati, legumi, frutta e verdura	Immunosoppressione, citotossico, necrosi cutanea, emorragia, anemia, granulocitopenia, lesioni epiteliali orali, lesioni GIS, aleucia tossica alimentare (ATA) ematopoietica, ipotensione, coagulopatia
Zearalenone	<i>Fusarium F. graminearum F. culmorum</i>	Cereali, mais, insilato, erba timoteo, foraggio	Cancerogeno, squilibrio ormonale effetto estrogenico, teratogeno

Tabella 1, Nome di alcuni importanti funghi produttori di micotossine, alimenti contaminati ed effetti delle micotossine su esseri umani e animali [11]

2.1.4 *Influenza dei fattori ambientali sulla produzione di micotossine*

La produzione di micotossine è fortemente influenzata dalla temperatura, dall'umidità, dall'attività dell'acqua (a_w), alla concentrazione di ossigeno e dal pH dell'alimento, gli stessi fattori ambientali che influenzano la crescita fungina.

L'umidità e la temperatura sono due fattori che hanno un effetto cruciale sulla proliferazione fungina e sulla biosintesi della tossina (*Bryden, 2007; Paterson & Lima, 2010*). L'incidenza e il livello di contaminazione da micotossina sono strettamente correlati alla posizione geografica ed ai fattori stagionali, nonché alle condizioni di coltivazione, raccolta, stoccaggio e trasporto (*Milicevic et al., 2010*). La contaminazione da micotossine può avvenire in momenti differenti:

- Coltura in via di sviluppo (pre-coltivazione);
- Dopo maturazione (post-raccolta).

Nel periodo pre-raccolta, le misure preventive sono incluse nelle buone pratiche agronomiche, come l'uso attento di insetticidi e fungicidi, l'irrigazione per evitare lo stress da umidità, la raccolta alla maturità e il miglioramento della resistenza genetica all'attacco fungino. Durante il periodo post-raccolta, il controllo dell'umidità e della temperatura della merce immagazzinata determinerà in gran parte il grado di attività fungina e di conseguenza la sintesi della micotossina (*Bryden, 2007*) [12].

2.1.5 *Specie fungine tossiche*

Aspergillus, Alternaria, Claviceps, Fusarium, Penicillium e *Stachybotrys* sono i generi riconosciuti di funghi micotossinogeni (*Milicevic et al., 2010; Reddy et al., 2010*); molti di questi generi sono onnipresenti. La flora fungina naturale associata alla produzione alimentare è dominata dai generi *Aspergillus, Fusarium* e *Penicillium* (*Sweeney & Dobson, 1998*). Le specie *Fusarium* sono agenti patogeni che si trovano su colture di cereali e altre materie prime e producono micotossine prima o immediatamente dopo il raccolto. Alcune specie di *Aspergillus* e *Penicillium* sono anche patogeni o commensali delle piante, ma questi generi sono più comunemente associati ad alimenti durante l'essiccazione e la conservazione (*Pitt, 2000*). È noto che le muffe tossigene producono uno o più di questi metaboliti secondari tossici. Tuttavia, non tutte le muffe sono tossigene e non tutti i metaboliti secondari delle muffe sono tossici. Molti funghi producono diverse micotossine contemporaneamente, soprattutto specie del genere *Fusarium*. Oggigiorno, l'identificazione e la quantificazione dei funghi micotossigeni vengono effettuate mediante PCR. I sistemi diagnostici basati sulla PCR sono ora disponibili per tutti i funghi tossigeni più rilevanti: produttori di aflatossine, tricoteceni, fumonisine e patulina (*Niessen, 2007; Paterson, 2006*). I primer per le sequenze del percorso delle micotossine sono stati esaminati nel lavoro di *Paterson (2006)* [13].

2.1.6 Patulina

La patulina (PAT) è stata scoperta nel 1943 in relazione a *P. griseofulvum* e *P. expansum*. La molecola è stata inizialmente studiata come potenziale antibiotico, ma la ricerca successiva ha dimostrato le sue proprietà tossicologiche (Baert *et al.*, 2007; Birkinshaw *et al.*, 1943). PAT è prodotto da diverse specie di *Aspergillus*, *Penicillium*, tra queste, *P. expansum* è la più rilevante. Al microscopio essa si presenta come mostrato nella figura 2:

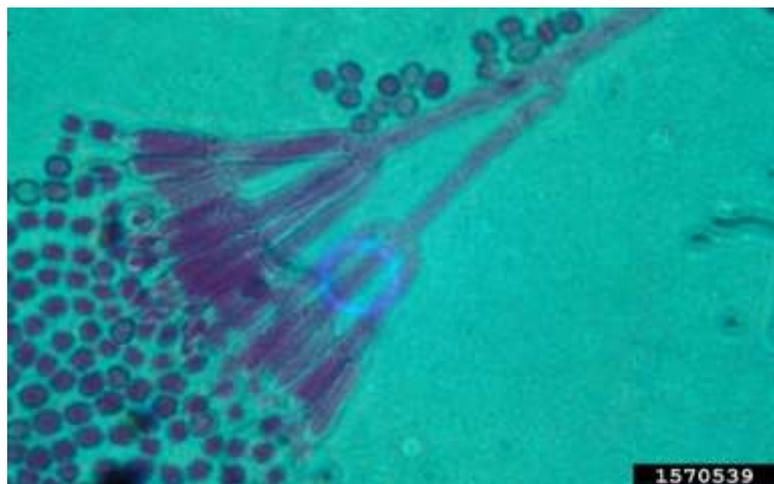


Figura 2, ife conidiofore di *Penicillium expansum* [14]

In effetti, quasi tutti gli isolati di *P. expansum* sono produttori di PAT (Puel *et al.*, 2010) [15]. La contaminazione PAT di mele e altri alimenti, bevande a base di frutta è un importante problema di sicurezza alimentare a causa dell'elevato consumo di queste materie prime. La contaminazione da PAT è considerata la principale preoccupazione nelle mele e nei prodotti a base di mele; tuttavia, questa micotossina è stata trovata anche in altri frutti, come pere, pesche, fragole, mirtilli, ciliegie, albicocche e uva, nonché nel formaggio [16].

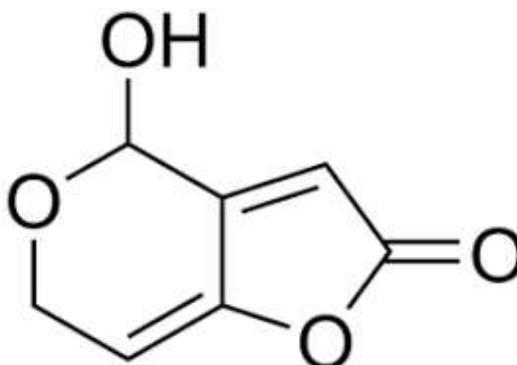


Figura 3, Struttura chimica della Patulina [17]

La patulina, nome IUPAC 4-idrossi-4H-furo-[3,2c]piran-2[6H]-one, è un lattone emiacetale, con formula empirica C₇H₆O₄, peso molecolare 154,12 g / mol e possiede la struttura chimica rappresentata in figura 3. Macroscopicamente si presenta con un aspetto di polvere bianca e possiede un punto di fusione di 110°C. Essa presenta un massimo di assorbimento UV a 276 nm (Ciegler *et al.*, 1971; Nielsen & Smedsgaard, 2003) [18].

2.2 Ocratossina A

2.2.1 Struttura chimica

Il nome chimico dell'OTA è N - [(3R) - (5-Chloro-8-idrossi-3-metil-1-osso-7isocromanile) carbonil] -L-fenilalanina; L'OTA appartiene a un gruppo di metaboliti con una struttura chimica simile, come mostrato nella Figura 4 e nella Tabella 2.

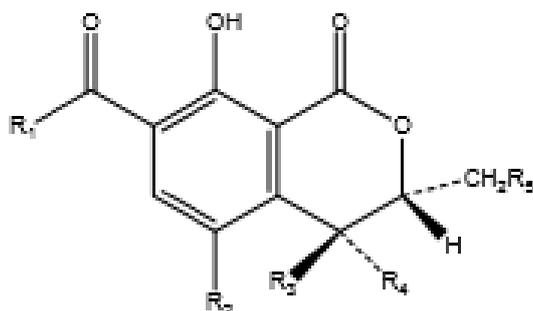


Figura 4, Generica struttura dell'OTA e dei suoi metaboliti (El Khoury & Atoui, 2010)

Name	R1	R2	R3	R4	R5
OTA	Phe*	Cl	H	H	H
OTB	Phe	H	H	H	H
OTC	Ethyl-ester, Phe	Cl	H	H	H
OTA methyl-ester	Methyl-ester, Phe	Cl	H	H	H
OTB methyl-ester	Methyl-ester, Phe	H	H	H	H
OTB-ethyl-ester	Ethyl-ester, Phe	H	H	H	H
OT α	OH	Cl	H	H	H
OT β	OH	H	H	H	H
4-R-hydroxy OTA	Phe	Cl	H	OH	H
4-s-hydroxy OTA	Phe	Cl	OH	H	H
10-hydroxy OTA	Phe	Cl	H	H	OH
Tyr* analog of OTA	Tyr	Cl	H	H	H
Ser* analog of OTA	Ser	Cl	H	H	H
Hyp* analog of OTA	Hyp	Cl	H	H	H
Lys* analog of OTA	Lys	Cl	H	H	H

Tabella 2 Radicali nei metaboliti dell'OTA *(Phenylalanine; Tyrosine; Serine; Hydroxyproline; Lysine) (El Khoury & Atoui, 2010)

La via biosintetica per l'OTA non è stata ancora completamente descritta; tuttavia, il gruppo isocumarina è uno scheletro pentacetide formato da acetato e malonato attraverso una via di sintesi del polichetide con la L-fenilalanina derivata dalla via dell'acido shikimico (*O'Callaghan et al.*, 2003). L'OTA è un acido organico debole (il pKa è 7,1 e la massa molare è 403,8 g mol⁻¹). In condizioni acide, l'OTA è solubile in solventi organici polari, leggermente solubile in acqua e insolubile in eteri di petrolio e idrocarburi saturi. In condizioni alcaline, l'OTA è solubile in soluzioni acquose di bicarbonato di sodio e in tutte quelle alcaline. Ha un punto di fusione di circa 90 °C, quando cristallizzato dal benzene come solvato (*El Khoury & Atoui*, 2010; *KeeperGoodman & Scott*, 1989). A causa della sua resistenza alle condizioni acide e alle alte temperature, OTA è caratterizzata da un'elevata stabilità. Pertanto, è molto difficile eliminare la molecola: OTA viene solo parzialmente degradata in condizioni di cottura normali e dopo tre ore di sterilizzazione a vapore ad alta pressione a 121 °C, anche a 250 °C, la sua distruzione non è completa [19].

2.2.2 Sintesi OTA

L'OTA è sintetizzata dalle muffe dei generi *Aspergillus* e *Penicillium*. *Aspergillus carbonarius* è il principale agente di contaminazione da OTA. Le prime osservazioni, in Italia, avevano mostrato che gli *Aspergillus* erano maggiormente diffusi nelle regioni meridionali, mentre i *Penicillium* sono predominanti nelle regioni settentrionali. Alcuni recenti lavori hanno permesso di identificare i principali funghi produttori di OTA sull'uva: si tratta di *Aspergillus carbonarius* (figura 5), maggior produttore, e di *Aspergillus niger* (figura 6), la cui attività risulta inferiore [20].

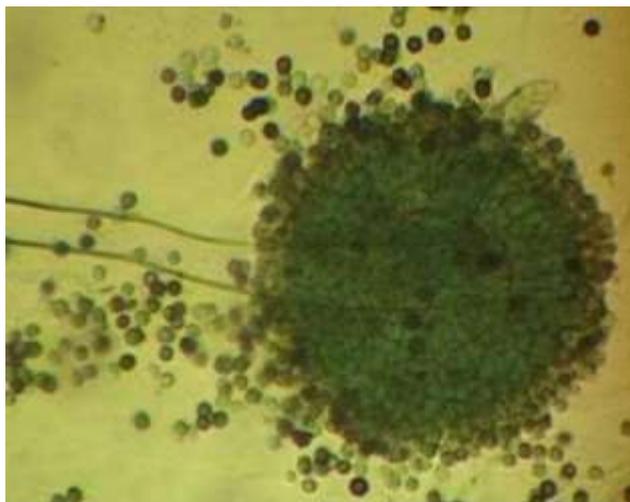


Figura 5, *Aspergillus carbonarius* [19]



Figura 6, *Aspergillus niger* [19]

Nel 2001, è stato effettuato un lavoro sperimentale che prevedeva 373 prelievi nelle fasi di chiusura del grappolo, d'invasatura e di vendemmia, su uve *Carignan*, *Syrah*, *Sauvignon blanc* e *Moscato*. La frequenza di comparsa dei funghi aumenta con lo sviluppo del grappolo. Tra le muffe riscontrate, quelle in grado di sintetizzare OTA erano il 10% circa all'invasatura¹, ma ben il 47% alla maturità (figura 7). Nel 96% dei casi queste muffe appartenevano al genere *Aspergillus* (95% *A. carbonarius* e 1% *A. niger*), solo il 4% erano *Penicillium* [20].

1- Per invasatura si intende la fase temporale dove i grappoli d'uva cambiano colore, quando gli acini delle varietà a bacca bianca passano dal verde al giallo e quando le varietà a bacca rossa assumono diverse tonalità di rosso, viola [21].

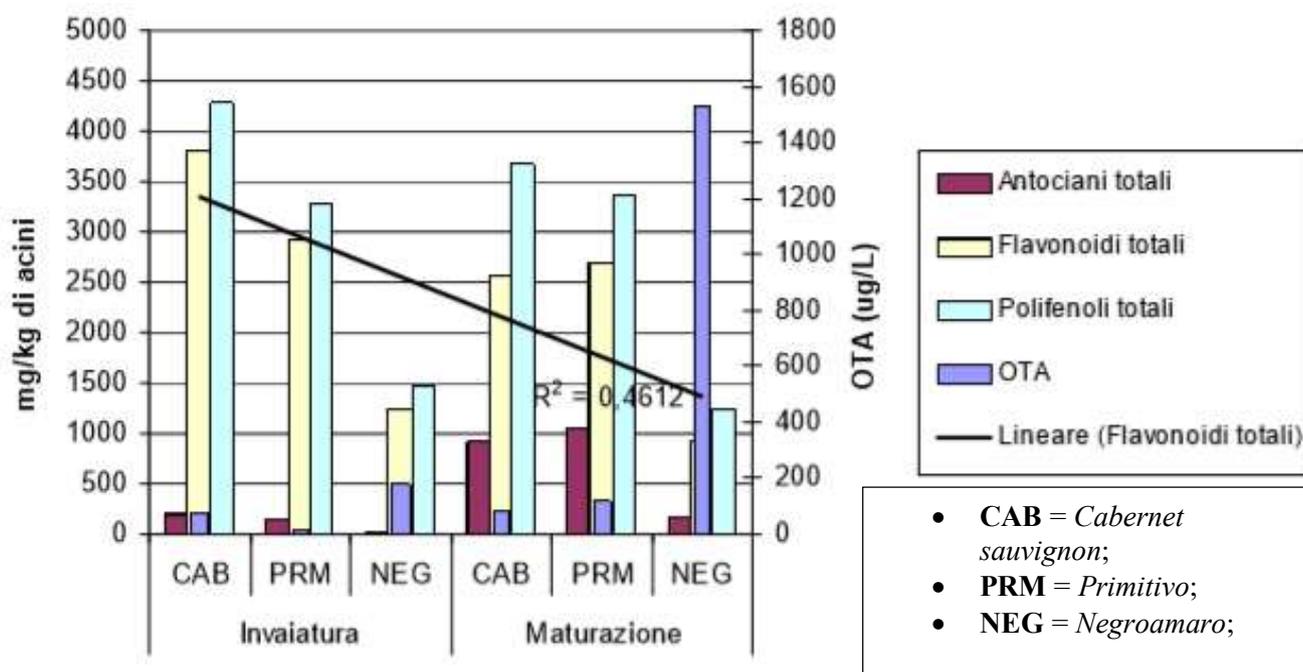
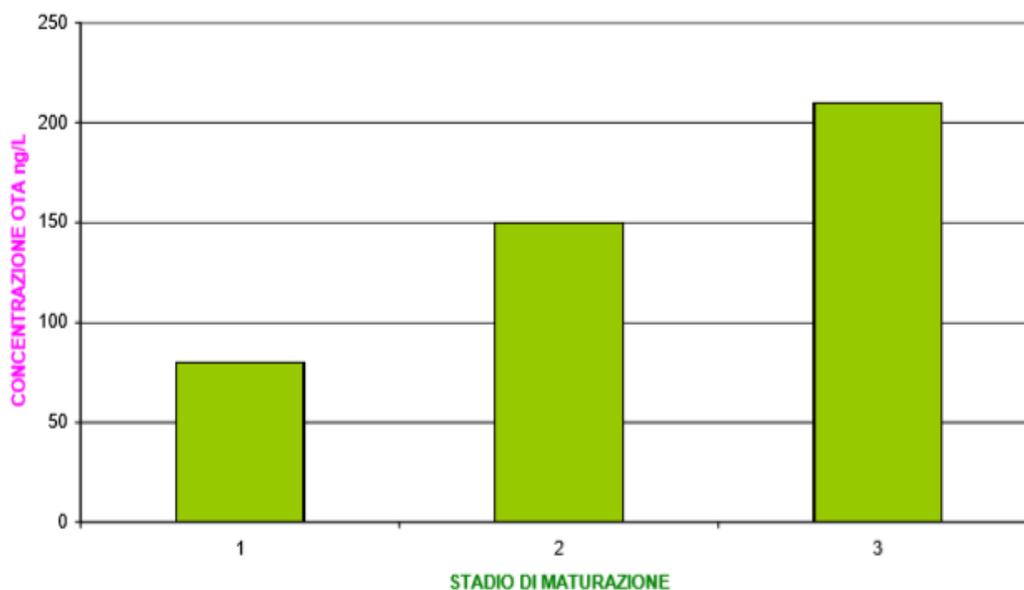


Figura 7, Relazione tra classi di sostanze fenoliche delle bucce e OTA prodotta [76]

L'ICV (Istituto cooperativo di viticoltura e del vino Montpellier Francia) ha condotto uno studio sui tenori in OTA di 84 vini della propria cantina sperimentale, nelle annate dal 1998 al 2001. Si tratta di vini elaborati a partire da uve prelevate a diversi stadi di maturità sugli stessi vigneti. Il contenuto in ocratossina A tende ad aumentare con lo stadio di maturità, come è rilevabile dalla figura 8.



Stadio 1: Raccolta n° 1 quando il mosto aveva una gradazione zuccherina tale da ottenere un vino con un potenziale grado alcolico del 12% volume;
Stadio 2: Raccolta 7 giorni successivi alla prima;

Figura 8, Tenore in OTA in funzione dello stadio di maturazione [20]

Oltre all'epoca di maturazione, un altro fattore importante che determina lo sviluppo di queste muffe è dato dalle caratteristiche climatiche, ed in particolar modo la pluviometria in Agosto e Settembre.

Da uno studio realizzato da *Foulon-Sopagly* tra il 1999 ed il 2002 su mosti di *Carignan* si evidenzia che la frequenza e l'entità della contaminazione dei mosti sono molto più elevate nel 1999 e nel 2002 che sono state annate in cui si è registrata elevata piovosità.

I danni meccanici agli acini o le perforazioni provocate da insetti come la *tignola* sono un vettore per trasportare le spore di *Aspergillus* mettendole in contatto con la polpa. Numerose pubblicazioni rilevano che il contenuto di OTA aumenta nei vini prodotti da uve colpite da *tignola* rispetto ai vini provenienti da uve del campione di controllo in cui non si è verificato l'attacco.

L'OTA può raggiungere livelli molto elevati in caso di cattivo stato sanitario delle uve e in uno stadio di maturità molto avanzata. Invece su uve con buon stato sanitario, la ricerca della maturità fenolica piena non è all'origine di un aumento significativo della contaminazione dei vini [20].

Un altro fattore importante è la scelta varietale [31]. Uno studio condotto dall'*Università Cattolica del Sacro Cuore (Piacenza)* su alcune cultivar di *Vitis vinifera* (includendo uve bianche e rosse) nel territorio pugliese ha rilevato la diversa suscettibilità delle diverse cultivar all'infezione di *Aspergillus carbonarius* e contaminazione di OTA. Lo studio è consistito nell'inoculo artificiale di *Aspergillus carbonarius* nelle diverse cultivar analizzate ponendole nelle stesse situazioni ambientali, su frutti intatti e perforati a 20°C e 25°C. Dalla sperimentazione è risultato che le cultivar *Cabernet Sauvignon*, *Montepulciano* e *Trebbiano* sono le varietà più suscettibili all'attacco in cui si registra il più alto contenuto di OTA, a seguire includiamo *Verdeca*, *Malvasia Nera* e *Primitivo* con valori non significativamente diversi. Le cultivar *Pampauto* e *Uva di Troia* presentano scarsa suscettibilità all'attacco fungino.

Nel Nord Europa, il *P. verrucosum* rappresenta il principale produttore di OTA, in particolare a valori di bassa attività dell'acqua libera e a temperatura a 15°C.

I funghi del genere *Aspergillus* colonizzano molto precocemente l'uva, spesso prima dell'invasatura, non sono capaci di perforare la buccia e non riescono quindi a penetrare all'interno dell'acino se non attraverso le ferite (scoppio degli acini, punture d'insetto). Una volta in contatto con la polpa o il succo d'uva, essi iniziano a produrre OTA.

Lo sviluppo di questi funghi è possibile in condizioni di umidità dell'aria comprese tra il 72 ed il 90%, ed a temperature tra 12 e 39°C (temperatura ottimale a 28°C) inoltre sono in grado di svilupparsi su più tipi di alimenti [21]. Tra gli altri fattori che influenzano lo sviluppo vi sono la composizione gassosa (atmosfera) e lo stress della pianta (es. siccità).

2.2.3 Effetti

In letteratura sono riportati molti lavori che attestano gli effetti negativi dell'OTA sulla salute umana essendo neurotossica, nefro-cancerogena infatti provoca alterazioni irreversibili ai reni, alcuni lavori la classificano anche teratogena, inoltre manifesta proprietà immunodepressive [22].

Nel 1993 l'*Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC)* ha classificato l'OTA come classe cancerogena 2B (pericolosa per gli animali e con buona probabilità per l'uomo).

Nel 1998 il *Codex Alimentarius Commission* ha effettuato una ricerca sul diverso contenuto di OTA nei cibi dove è emerso che tramite il vino si assume il 15% della quantità totale presente negli alimenti (*Codex Alimentarius Commission*, 1998).

Delle nove ocratossine descritte in letteratura, solo l'ocratossina A riveste importanza come micotossina. In qualche, circostanza, in alcuni prodotti fortemente colonizzati dal fungo, è stata trovata l'ocratossina B (*Visconti e Bottalico*, 1983) [23].

L'ingestione di 0,1 mg di ocratossina per kg al giorno provoca danni al sistema immunitario con diminuzione delle immunoglobuline, IgG e IgM.

La contaminazione da parte di ocratossina riguarda diversi paesi nel mondo; ad esempio in Giappone il 95% dei nefropatici risulta positivo per i livelli serici di ocratossina (90 ng/ml) mentre in Algeria, i livelli di ocratossina sono più simili a quelli europei di 0,1 ng/ml [24].

2.2.4 Contaminazione da ocratossina A nei vini

La presenza della ocratossina A è stata messa in evidenza nel vino, nei succhi d'uva e nell'uva passa per la prima volta a metà degli anni 90. Alcune analisi effettuate in Danimarca ed in Finlandia hanno mostrato che il vino poteva contenerne quantità significative [20]. Da allora numerosi lavori, tra cui quelli svolti dall'*ICV* hanno permesso di comprendere meglio l'importanza dell'OTA, i fattori di sviluppo e le possibilità di prevenzione.

L'*ONIVINS (Office National Interprofessionnel Des Vins)* ha realizzato due indagini per valutare l'importanza dell'Ocratossina A nei vini francesi [25]. La prima, nel 1998, riguardava 265 vini, l'altra nel 2001 982 vini. Ne è emerso quanto segue:

- Il 75% dei vini non presentavano livelli rilevabili di OTA e nel 17% dei casi, la concentrazione era al di sotto di 0,5 µg/l;
- L'Ocratossina A si può trovare in tutti i tipi di vino: *DOC, IGT*, vini da tavola, rossi, bianchi, rosati e passiti;
- Normalmente, c'è più OTA nei vini rossi che nei bianchi e nei rosati;
- Nelle regioni mediterranee, si ritrovano più vini con contenuti elevati di OTA [25-26].

Secondo le analisi realizzate in Europa dal 1996, si possono trovare concentrazione fino a 10 µg/l in certi vini, succhi d'uva o vini da dessert.

Tutte le indagini compiute a partire dal 1999 mostrano che i vini mediterranei sono quelli più soggetti alla contaminazione da OTA; tuttavia, anche se in misura diversa, anche i vini di altre regioni possono contenere OTA.

Le analisi realizzate dalla società *Foulon-Sopagly* [20] sui mosti destinati alla produzione di succo d'uva mostrano che esiste un certo rischio medio in Provenza (Francia), Veneto e Mancha (Spagna).

L'Ocratossina A è stata segnalata anche in altri paesi produttori d'oltreoceano (Australia, America, Africa del Sud) [27-28].

2.2.5 Analisi rischio OTA nelle diverse zone viticole

In Italia centro-meridionale, il problema è più rilevante come è possibile verificare dalla mappa delle zone viticole a rischio OTA riportata nella figura 9.

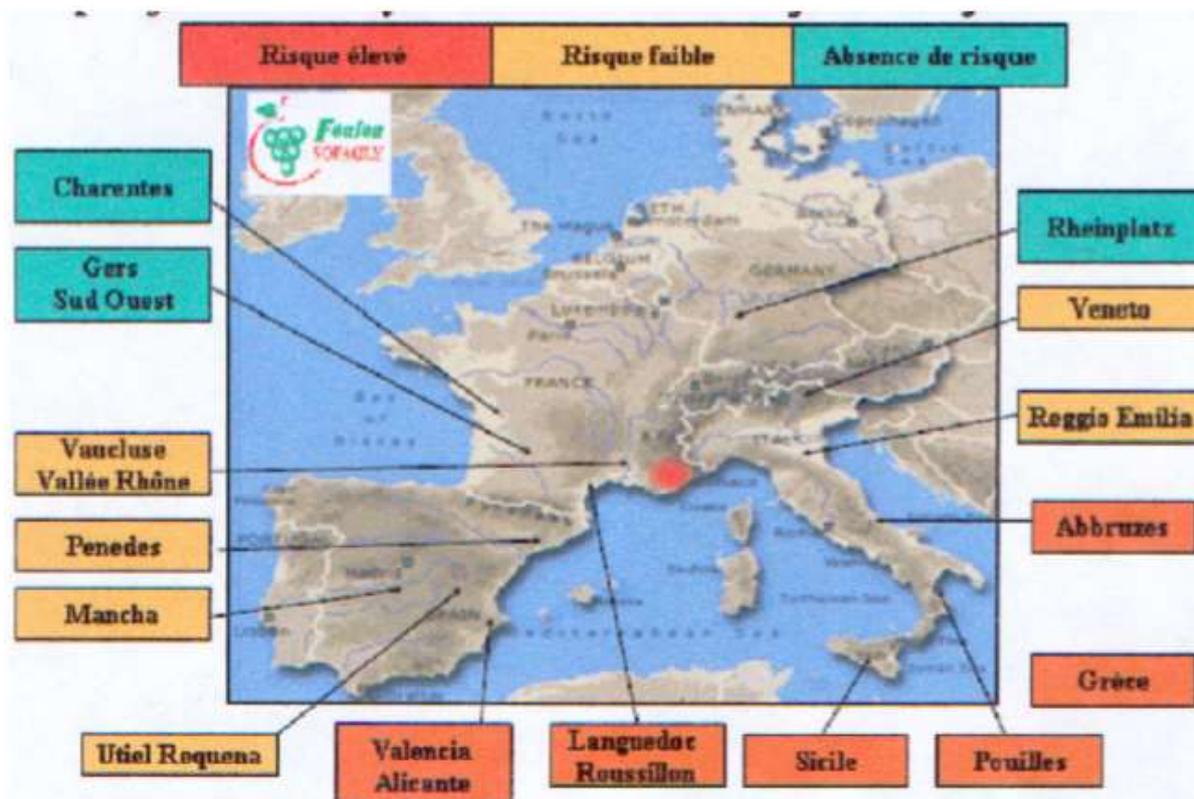


Figura 9, Zone viticole a rischio contaminazione OTA [29]

Il suddetto studio include l'analisi di 267 campioni di vino provenienti dall'Italia meridionale (Sicilia-Puglia) e dall'Ungheria, di cui 19 vini da dessert, 186 vini rossi, 11 vini rosati e 51 vini bianchi prodotti nelle annate dal 1997 al 2002. I risultati hanno evidenziato che nessun campione dei vini Ungheresi era contaminato, mentre la situazione era ben diversa per i vini Italiani (tabella 3-4):

TIPOLOGIA VINO	CAMPIONI POSITIVI %	RANGE RILEVATO ng/mL
Vino rosso	84	0,01-4,00
Vino da dessert	63	0,01-1,64
Vino bianco	56	0,01-0,21
Vino rosato	19	0,01-1,04

Tabella 3, Risultati analisi campioni in Italia [29]

Annata	Vino	Grado alcolico (% vol.)	OTA (µg/kg)
1939	Rosè	14	0,04
1962	Rosso	14	0,07
1964	Rosè	14	0,06
1964	Rosè	14	0,19
1966	Rosso	14	0,24
1974	Rosè	13.50	0,28
1979	Rosè	13.50	0,26
1980	Rosso	12.50	0,15
1980	Rosè	12.50	0,17
1982	Rosso	13.50	0,18
1983	Rosso	13.50	0,16
1985	Rosso	12.50	0,11
1985	Rosso	13.50	0,13
1987	Rosso	13.50	0,28
1987	Rosso	13.50	0,24
1988	Rosso ^a	13.00	0,15
1988	Rosè	13.00	0,22

^aProdotto nel Lazio con uve Cesanese, Sangiovese e Montepulciano

Tabella 4, Concentrazioni di Ocratossina A in vini pugliesi prodotti con uve *Negroamaro* e *Malvasia nera* nel periodo 1939-1988 [30]

2.2.6 Aspetti normativi

La normativa europea che regola i limiti delle micotossine è stata emanata in ritardo rispetto alle ricerche sperimentali, con il Regolamento CE N. 1525/98 del 16 luglio 1998 che stabiliva i tenori massimi ammissibili di alcuni contaminanti dei prodotti alimentari. In questo regolamento non venivano riportati i limiti per l'uva e prodotti derivati, per cui il *Ministro della Sanità* con la circolare n. 10 del 9 settembre 1999 intervenne stabilendo il contenuto massimo di OTA ammissibile in matrici alimentari sopperendo parzialmente all'incompletezza del suddetto Regolamento.

La *Comunità Europea* nel 2001 con il Regolamento CE n. 466/2001 nell'allegato II al punto 2 specifica il tenore di OTA in diverse matrici alimentari (tabella 5), anche in questa normativa non c'è un limite per il vino ma solo per le uve (come si vede nell'allegato seguente estratto dalla legge).

Prodotto	Tenore massimo ammissibile (µg/kg o ppb)	Metodo di campionamento	Metodo d'analisi di riferimento
2.2. OCRATOSSINA A			
2.2.1. Cereali (compreso riso e grano saraceno) e prodotti a base di cereali			
2.2.1.1. Cereali non lavorati (compreso riso non lavorato e grano saraceno)	5	Direttiva 2002/26/CE della Commissione (*)	Direttiva 2002/26/CE
2.2.1.2. Tutti i prodotti derivati dai cereali (compresi i prodotti lavorati a base di cereali ed i cereali destinati al consumo umano diretto)	3	Direttiva 2002/26/CE	Direttiva 2002/26/CE
2.2.2. Frutti essiccati della vite (uva passa di Corinto, uva passa, uva sultanina)	10	Direttiva 2002/26/CE	Direttiva 2002/26/CE
2.2.3. Caffè crudo e torrefatto e prodotti a base di caffè, vino, birra, succo d'uva, cacao, prodotti a base di cacao e spezie	-		

Tabella 5, Regolamento CE n. 466/2001 allegato II, punto 2

Il Regolamento CE n. 466/2001 successivamente modificato, stabilisce che il metodo di campionamento e la metodica di analisi devono essere conformi alla Direttiva 2002/26/CE. In seguito, quando verrà affrontata la problematica della determinazione dell'OTA verranno indicati i contenuti di tale direttiva.

Il Regolamento CE n. 123/2005 (tabella 6) ha modificato l'allegato II del Regolamento CE n. 466/2001 indicando il contenuto di OTA in diversi alimenti fissando la concentrazione di 2 µg/kg come valore massimo accettabile per i vini e bevande a base di mosto d'uva. Per vini si intendono i bianchi, rossi, rosati, inclusi vini frizzanti ma esclusivi i vini liquorosi e i vini con un tenore alcolico pari o superiore al 15% volume.

Ocratossina A	Tenori massimi (µg/kg)
Cereali non trasformati	5,0
Tutti i prodotti derivati dai cereali non trasformati, compresi i prodotti trasformati a base di cereali e i cereali destinati al consumo umano diretto, eccetto i prodotti alimentari di cui ai punti 2.2.9 e 2.2.10	3,0
Uve secche (uve di Corinto, uva passa, uva sultanina)	10,0
Caffè torrefatto in grani e caffè torrefatto macinato, escluso il caffè solubile	5,0
Caffè solubile (istantaneo)	10,0
Vini (compreso il vino spumante ed esclusi i vini liquorosi e i vini con un titolo alcolometrico non inferiore al 15 % vol) e vini di frutta	2,0
Vini aromatizzati, bevande aromatizzate a base di vino e cocktail aromatizzati di prodotti vitivinicoli	2,0
Succo d'uva, succo d'uva concentrato ricostituito, nettare d'uva, mosto d'uva e mosto d'uva concentrato ricostituito, destinati al consumo umano diretto	2,0
Alimenti a base di cereali e altri alimenti destinati ai lattanti e ai bambini	0,50
Alimenti dietetici a fini medici speciali destinati specificamente ai lattanti	0,50

Tabella 6, Regolamento CE n. 123/2005

3. Prevenzione in agricoltura biologica contro i marciumi secondari

In agricoltura biologica, si ha basso margine di protezione verso un avvenuto attacco fungino e parassitario tramite fitosanitari, in quanto si deve rispettare la normativa europea di riferimento, ovvero il Regolamento CE n.834/2007. Tale regolamento pone dei limiti nell'utilizzo di fitosanitari, consentendo l'uso di alcuni agenti di difesa come rame, zolfo, zeoliti e *Bacillus thuringiensis* al fine di avere una materia prima priva il più possibile di agenti chimici.

3.1 Marciumi secondari

I marciumi secondari (figura 10) del grappolo sono quelli dovuti a funghi diversi da *Botrytis cinerea*. Si tratta di funghi ad attività saprofitaria secondaria che è comunque subordinata alla presenza di lesioni sugli acini, in quanto non hanno un'attività diretta di penetrazione. In conseguenza dell'attacco di tali patogeni si hanno sull'acino dei marciumi molli con conseguente proliferazione. Si può rilevare la contemporanea presenza di marciumi secondari e marciume acido. I danni di tali funghi sulle uve da tavola sono irrilevanti, mentre possono risultare molto pericolosi sulle uve da vino perché alcuni di essi possono risultare produttori di ocratossina A; nonostante il vino vada incontro a fermentazione la contaminazione da parte di OTA persiste, può determinare quindi una contaminazione dei vini. I funghi responsabili appartengono alla sezione *Nigri* del genere *Aspergillus* (*Black Aspergilli*), in modo particolare *Aspergillus carbonarius* e alcune specie del genere *Penicillium* [32] citate nel secondo capitolo.



Figura 10, Marciumi secondari del grappolo [32]

In agricoltura biologica, non ci sono molecole attive contro i marciumi secondari del grappolo. Non sono praticabili azioni di difesa fitosanitaria contro tali marciumi a causa dell'estrema variabilità

dei funghi coinvolti e della loro diversa suscettibilità ai fungicidi disponibili. Rimangono fondamentali tutte quelle azioni volte a evitare lesioni degli acini, quali attacchi parassitari di varia natura, quindi è importante un'attenta e scrupolosa difesa fitosanitaria preventiva [32].

3.2 Strategie di controllo

3.2.1 Pratiche generali

L'obiettivo è quello di avere uno sviluppo equilibrato della pianta con una buona aerazione della vegetazione e dei grappoli e cercare anche di ottenere la totale sanità della produzione evitando ferite di ogni tipo.

Riguardo alla scelta del sito di impianto, sarà opportuno privilegiare le zone collinari più ventilate ed evitare le zone pianeggianti dove più facili sono i ristagni di umidità.

Forma di allevamento e orientamento dei filari dovranno essere tali da garantire la massima circolazione di aria ai grappoli.

Tra le pratiche agronomiche sono da considerare: la potatura estiva, il diradamento e la sfogliatura dei grappoli, anche queste attività finalizzate a fornire un migliore arieggiamento. Tra tali pratiche, si può annoverare anche la nutrizione minerale. Un'eccessiva concimazione può portare a un eccessivo rigoglio vegetativo con la formazione di micro-aree particolarmente umide. Inoltre l'eccesso di azoto può portare a un eccessivo numero di acini e a una maggiore compattezza del grappolo. Altro elemento chimico importante è il calcio che aumenta in genere la resistenza alle malattie e riduce la fuoriuscita di essudati, substrato ideale per lo sviluppo della malattia. Una carenza di calcio aumenta la suscettibilità nei confronti di *B. cinerea*. [33]

Molto importanti sono le ultime fasi della filiera produttiva, nel vigneto si deve fare attenzione al rispetto dell'integrità dell'uva, si devono limitare i ritardi nei conferimenti ed evitare di compattare le uve nei carri.

Infine è buona norma applicare le buone pratiche di igiene e sanitizzazione delle attrezzature: le vendemmiatrici meccaniche, i rimorchi, le tramogge di ricezione, i nastri e le tubature di trasporto del pigiato, le pompe ecc.

3.2.2 Fungicida – Rame

Il rame (nella figura 11 è rappresentata la forma di rame più utilizzata in agricoltura) rappresenta un indiscusso metodo di contenimento di molte malattie fungine. Al rame, nel corso del tempo, si sono affiancate (spesso sostituendolo), altre molecole dalle caratteristiche più diverse.

Il modo in cui esso agisce modifica la permeabilità della membrana cellulare, mediante la denaturazione delle proteine strutturali ed enzimatiche che la compongono; una volta penetrato nella cellula fungina, interferisce con numerose attività enzimatiche, alterando i processi ossido-riduttivi. Questi meccanismi di azione multi-sito comportano soprattutto un blocco della germinazione di spore e conidi.



Figura 11, Poltiglia bordolese [34]



Figura 12, Pianta della vite dopo trattamento con poltiglia bordolese [34]

Dimostrando un'efficacia pari a quella degli altri principi attivi, si sta assistendo ad un lento ritorno all'utilizzo del rame, pratica spesso abbandonata a causa della concorrenza di agro-farmaci sistemici, citotropici o translaminari, che hanno la capacità, al contrario del rame, di penetrare nel vegetale e di attuare la difesa al suo interno, senza essere influenzati dalle precipitazioni dilavanti (nella figura 12 viene mostrato la presenza superficiale sulla pianta dopo il trattamento con poltiglia bordolese). Il rame, infatti, è un prodotto di contatto e preventivo, pertanto la sua presenza sugli organi vegetali da proteggere deve avvenire prima che il fungo riesca a svilupparsi.

Esistono infatti in commercio diverse strutture chimiche contenenti il rame in diverse forme, le più note sono:

- Solfato di rame in purezza;
- Poltiglia bordolese;
- Solfato trifasico di rame;

- Ossicloruro di rame;
- Ossido rameoso;

Lo ione rame, che è il vero principio attivo dei formulati cuprici, si libera a contatto con le secrezioni della pianta e con l'anidride carbonica contenuta nell'acqua piovana. Quanto più rapidamente e tanti più ioni vengono rilasciati in forma libera, tanto più attivo risulta il preparato. La velocità con la quale avviene la liberazione degli ioni e le dimensioni fisiche delle particelle distinguono le diverse forme chimiche del rame; tanto più queste sono ridotte, tanto più rapidamente avviene il rilascio degli ioni e tanto meglio essi vengono distribuiti sulla superficie della pianta trattata [34].

3.2.3 Fungicida – Zolfo

Lo zolfo (figura 13) è la molecola più importante nella difesa di alcune malattie fungine come il "mal bianco" e agisce allo stato di vapore su micelio e spore del parassita.

La sua azione si differenzia dagli anticrittogamici "sistemici" in quanto non penetra nel tessuto e nella linfa delle piante e quindi non causa fenomeni di tossicità e resistenza. Agisce sottraendo acqua alla cellula fungina, disidratandola e bloccando i processi respiratori sostituendosi all'ossigeno. È efficace sotto forma di vapore (nella figura 14 viene mostrato come la pianta si presenta dopo il trattamento): il passaggio allo stato gassoso è direttamente proporzionale alle temperature e alla finezza delle sue particelle.

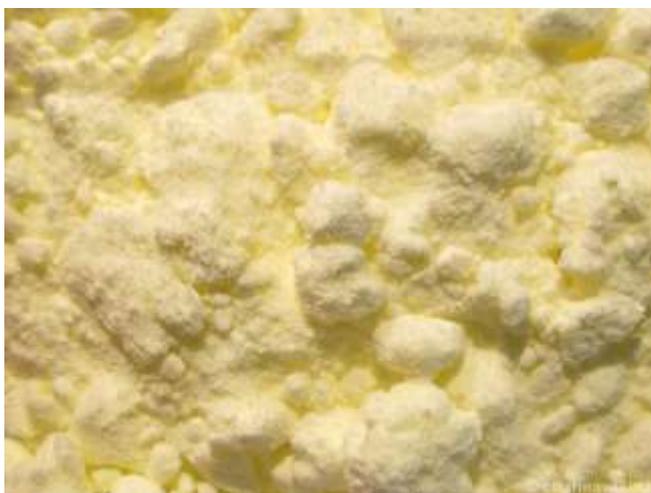


Figura 13, Zolfo pulverulento [35]



Figura 14, Vite dopo trattamento con zolfo [35]

Gli zolfi per trattamenti liquidi richiedono apporti quantitativi più bassi rispetto ai prodotti pulverulenti che hanno il solo vantaggio di penetrare meglio attraverso la vegetazione.

In commercio esistono varie formulazioni contenenti zolfo:

- Zolfo bagnabile, è un prodotto idrosospensibile;
- Zolfo micronizzato, polvere bagnabile con particelle di 3-5 m;
- Zolfo colloidale costituito da particelle molto fini di natura colloidale; in commercio si trovano formulati in cui lo zolfo si trova insieme ad altri prodotti di varia natura come rame, supporti proteici vegetali (proteinato di zolfo);
- Zolfo pulverulento ventilato, polvere secca da distribuirsi con impolveratori meccanici, ma va evitato l'uso nelle ore più calde per non creare problemi di fitotossicità;
- Zolfo bentonitico costituito facendo adsorbire lo zolfo fuso da argilla bentonitica;
- Zolfo bagnabile e cere terpeniche, consente un aumento di adesività e persistenza e diminuzione di fitotossicità [35].

3.2.4 Fungicida – Zeolite

Le zeoliti (figura 15) sono silicati cristallini porosi con una struttura cristallografica complessa che dà origine a specifici pori molecolari. Si estraggono da rocce di origine vulcanica, poiché i giacimenti si formano proprio grazie ai depositi di lava sedimentata. È possibile inoltre trovarle anche in rocce sedimentarie di origine marina, per cui sono presenti anche in tutti gli oceani. In generale, i minerali di questa famiglia sono alluminosilicati idratati e hanno metalli alcalini e alcalino terrosi.

L'uso classico della zeolite è quello per migliorare le condizioni del terreno. Negli ultimi anni però, specie in viticoltura biologica, si sta diffondendo la zeolite micronizzata, ovvero ridotta in fine polvere. Questa viene usata in agricoltura per le applicazioni fogliari, con la funzione di corroborante. In altre parole, la polvere migliora le resistenze naturali delle piante nei confronti di agenti patogeni fungini e parassiti.



Figura 15, Zeolite micronizzata [36]

La zeolite micronizzata miscelata con l'acqua diviene polvere bagnabile. Applicata sulle foglie, crea una sottile patina protettiva, che rende l'attacco degli agenti patogeni fungini più difficile. È un prodotto di copertura, da usare in prevenzione, e che può essere dilavato dalle piogge. L'aspetto positivo del dilavamento è che il prodotto finisce poi sulla terra apportando benefici, a differenza dei classici fungicidi, come la poltiglia bordolese e gli altri prodotti a base di rame.

Essa tra i suoi vantaggi presenta:

- Migliora assorbimento e trattenimento del concime;
- Corregge il pH in caso di terreni acidi;
- Attenua le escursioni termiche nel suolo. Evita quindi gli shock termici causa di foglie arcciate, spaccatura della buccia ecc.;
- In terreni sabbiosi aiuta a trattenere l'acqua, quindi riduce le irrigazioni;
- In terreni argillosi migliora la permeabilità ed evita il ristagno idrico, che causa malattie fungine come il marciume del colletto;
- Concima in modo diretto, con il rilascio graduale di sali minerali ed elementi quali: silicio, fosforo, potassio, calcio, sodio, ferro, magnesio. Aiuta quindi a prevenire fenomeni come il marciume apicale;
- Depura il terreno grazie alla capacità di assorbire i metalli pesanti come il nichel [36].

3.2.5 Insetticida - *Bacillus thuringiensis*

Il *Bacillus thuringiensis* (figura 16) consiste in batteri sporulanti gram-positivi, aerobi, costituiti da una sola cellula. Agiscono esclusivamente per ingestione con azione tossica che si esplica a livello dell'intestino medio del fitofago. In questo ambiente di natura basica gli enzimi presenti attivano le tossine dalle spore e dai cristalli proteici del batterio. Quindi le tossine interagiscono con le cellule intestinali provocando la paralisi dell'apparato boccale e dell'intestino medio. Le larve intossicate smettono di nutrirsi e la morte sopraggiunge in un tempo variabile da poche ore ad alcuni giorni.

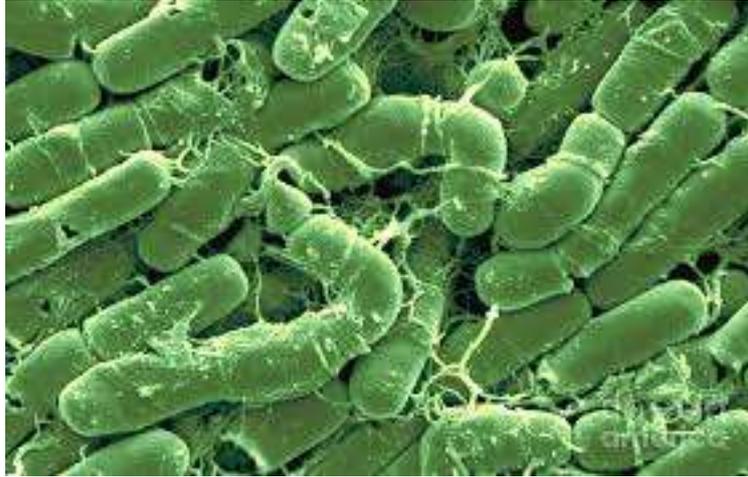


Figura 16, *Bacillus thuringiensis* [37]

È selettivamente attivo sulle larve dei *Lepidotteri* e non ha alcuna efficacia su uova e adulti. *Bacillus thuringiensis* è innocuo per i mammiferi e gli altri animali, per i predatori e i nemici naturali degli insetti nocivi, nonché per le api e gli altri impollinatori [37].

4. Protezione contro l'ocratossina A

Seguendo la filiera produttiva, il problema della contaminazione e sviluppo dell'OTA è presente nelle fasi di ammostamento e vinificazione.

Partendo dal presupposto che l'OTA è presente nel vino solamente quando l'uva è contaminata e che spesso gli interventi di buona pratica viticola non sono sufficienti ad evitare il problema, perlomeno in certe zone ad alto rischio, attualmente risulta importante verificare quale influenza possa avere la pratica enologica sul livello di OTA nel vino e quali strategie tecnologiche possono essere attuate per limitare la presenza di tale micotossina [38].

4.1 Agenti chiarificanti

4.1.1 Effetti dei diversi agenti chiarificanti

Per contribuire alla riduzione della tossicità e all'aumento della sicurezza dei vini, un gruppo spagnolo di *Tecnalia, Biotechnology & Pharma Unit* ha valutato la rimozione di OTA dal vino rosso mediante trattamento con sei agenti chiarificanti (tabella 7): bentonite, albumina di uovo, complesso di PVPP (Polivinilpolipirrolidone), proteine vegetali e silice amorfa, gelatina, chitina e chitosano. Gli agenti sono stati aggiunti a campioni di vino rosso fortificato (liquoroso) con OTA (2,5 µg/L) a diverse concentrazioni entro l'intervallo di uso enologico e i parametri di base che descrivono la qualità del vino sono stati misurati prima e dopo ogni trattamento. Oltre alla variazione di concentrazione di OTA, è stato misurato l'impatto su: pH del vino; parametri di colore, quali tono (T), intensità del colore (CI) e parametri colorimetrici CIELab; indice polifenolico totale (TPI); e contenuto totale di antocianine [39].

Adsorbente	Dosaggi testati	Rimozione di OTA
Bentonite sodica attivata (bentonite)	10, 20, 40 e 60 g/hl	22-33%
Complesso PVPP, proteine vegetali e silice amorfa	10, 23, 36 e 50 g/hl	30-40%
Albumina d'uovo	10, 12, 14 e 16 g/hl	14-16%
Gelatina in fogli ad alto peso molecolare (gelatina)	10, 12, 14 e 16 g/hl	16-39%
Chitina	10, 50, 200 e 500 g/hl	15-29%
Chitosano	10, 50, 200 e 500 g/hl	3-67%

Tabella 7, Grado di rimozione di OTA dal vino con diversi adsorbenti [39]

Analizzando nello specifico ciascun adsorbente si sono ottenute le seguenti informazioni:

- La bentonite ha dimostrato una buona efficienza nella rimozione dell'OTA, compresa tra il 22% e il 33% rispetto al vino non trattato, con differenze significative tra il dosaggio massimo e gli altri dosaggi. Con questo trattamento però il valore CI del vino diminuiva in modo considerevole (fino al 12,5%) e si avevano valori significativamente più alti dei parametri colorimetrici CIELab a tutti i dosaggi testati.
- La rimozione di OTA a tutti i dosaggi sia di albumina d'uovo sia di gelatina è stata significativa, in confronto al vino non trattato. La percentuale di rimozione era maggiore con la gelatina (16-39%) che con l'albumina d'uovo (14-16%). Nel vino trattato con questi adsorbenti, a tutti i dosaggi, sono stati significativi l'abbassamento del valore CI e l'aumento dei parametri CIELab, ma anche l'effetto sulla concentrazione polifenolica e sul contenuto di antocianine, in particolare dopo il trattamento con gelatina.
- Il trattamento con il complesso PVPP, proteine vegetali e silice amorfa ha permesso una significativa rimozione di OTA dal vino a tutti i dosaggi testati, fino a un massimo di 40% al dosaggio più elevato. Questo adsorbente ha però influenzato in modo significativo i parametri del colore e la concentrazione polifenolica, riducendo i valori di CI, TPI e di antocianine totali, rispettivamente del 4,9%, 15,7% e 8,5%.
- Il trattamento con chitina e chitosano ha ridotto l'OTA significativamente dal vino non trattato: mentre per il chitosano c'erano differenze significative nella rimozione di OTA in base al dosaggio che andava dal 3 fino al 67%, per la chitina la variabilità era molto minore (15-29%).

Questi risultati sono in accordo con precedenti studi che avevano riscontrato che la massima rimozione di OTA con questi prodotti si verificava quando si aggiungeva la massima dose [40]. Al più alto dosaggio testato che rappresenta anche il limite legalmente utilizzabile, il chitosano ha permesso di ottenere la più elevata rimozione di OTA (67%), ma influiva pesantemente sui parametri del vino, la chitina, invece al dosaggio 50 g/hL rimuoveva il 18% dell'OTA senza influire in modo significativo sui parametri del vino.

Poiché le cantine puntano a utilizzare la minima quantità possibile di agente chiarificante, risulta importante analizzare qual è la capacità di adsorbimento dell'OTA dei vari adsorbenti alla dose minima testata, corrispondente a 10 g/hL.

La massima rimozione dell'OTA è stata raggiunta con il complesso PVPP che ne riduceva la concentrazione del 30%, seguita dal valore di rimozione del 22% che si otteneva con la bentonite. In entrambi i casi, si tratta di una percentuale significativamente più alta di quella che si aveva con la stessa dose di chitosano e albumina d'uovo. Con albumina d'uovo, chitina e gelatina alla dose di 10 g/hL si è ottenuta una riduzione di OTA simile, compresa tra 14% e 16%, mentre il valore più basso di rimozione di questa micotossina (3%) si è raggiunto con il chitosano.

Per quanto riguarda l'effetto dei trattamenti sui parametri di qualità del vino analizzati, questo variava in base al tipo di agente aggiunto.

Tutti gli adsorbenti avevano solo un minimo effetto sul pH del vino. Per quanto riguarda i parametri del colore, la riduzione significativamente più elevata di CI è stata determinata dalla gelatina, mentre chitina e chitosano sono gli agenti che meno hanno influenzato questo parametro. Il valore del tono del colore è aumentato in seguito al trattamento con bentonite, mentre con altri agenti questo diminuiva. Bentonite, albumina d'uovo e gelatina hanno invece più di tutti influenzato i parametri CIELab. Gelatina e complesso hanno causato una riduzione significativa del TPI e delle antocianine totali rispetto ad altri adsorbenti.

Generalmente, la rimozione dell'OTA, ottenuta in tutti i trattamenti, aumentava all'aumentare del dosaggio del chiarificante, ma peggiorava anche l'impatto sulla qualità del vino.

La massima percentuale di rimozione (67%) è stata ottenuta con il chitosano, ma i parametri di qualità del vino sono stati fortemente influenzati. Dall'altro lato, il trattamento con bentonite ha permesso di eliminare l'OTA con una relativa efficienza, ma ha anche causato una diminuzione considerevole del valore dell'intensità del colore (CI).

I risultati suggeriscono il potenziale utilizzo del polimero non tossico chitina e di adsorbenti privi di allergeni (complesso e gelatina) come alternative per la rimozione dell'OTA durante il processo di vinificazione. La chitina infatti era in grado di rimuovere l'OTA fino al 18% senza influenzare significativamente la qualità del vino. Ai dosaggi maggiori la gelatina ed il complesso PVPP permettevano di ottenere una maggiore rimozione dell'OTA (fino al 39-40%) rispetto a bentonite, albumina d'uovo e chitina, e avevano un impatto relativo sui parametri del colore e sulla concentrazione polifenolica [41].

4.1.2 L'uso dei carboni attivi in cantina come decontaminanti

Il carbone e i prodotti commerciali che lo contengono sono i più efficaci tra gli agenti chiarificanti nel rimuovere l'OTA dai vini rossi (tabella 8). Il codice di comportamento per la prevenzione e la riduzione dell'OTA nei vini prevede, infatti, l'uso di carbone enologico in cantina alle dosi più basse possibili (*Codex Alimentarius Commission*, 2007):

Materiali testati	Dosi testate (g/hl)					
	5	10	20	40	50	200
Carbone enologico (Esseco) ^a	-	80%	92%	-	-	-
Carbone attivo (SIGMA) ^a	-	36%	73%	85%	88%	-
Carbone attivo ^b	50%	-	-	-	-	-

^avino rosso contaminato con 10 µg/kg OTA (Visconti *et al.*, 2008);
^bvino rosso contaminato con 3,8 µg/kg OTA (Castellari *et al.*, 2001);

Tabella 8, Riduzione percentuale di OTA in vini rossi con i principali carboni utilizzati in cantina [42]

Com'è noto, però, il carbone nei vini rossi riduce il corpo, l'intensità di colore e le concentrazioni di polifenoli. In particolare, abbiamo accertato che il carbone riduce fino all'11% l'intensità del colore dei vini rossi trattati mentre riduzioni molto più accentuate (60-70%) sono state osservate per il resveratrolo e la quercetina, sostanze molto importanti che contribuiscono agli effetti salutistici dei vini rossi [42].

Ad esempio, è stato dimostrato che la produzione di ossido nitrico, indotta dal vino rosso nei monociti del sangue, diminuisce drasticamente quando il vino viene privato dei polifenoli attraverso l'aggiunta di carbone [43].

I composti polifenolici possono esercitare numerose attività biologiche benefiche tra cui attività antiaterogene e vasorilassamento dell'endotelio attraverso una maggiore sintesi di ossido nitrico [44].

Il trans-resveratrolo e la quercetina, appartenenti rispettivamente ai gruppi chimici stilbene e flavonolo, si ritrovano frequentemente ad alti livelli nei vini rossi ed esercitano diverse azioni biologiche benefiche tra cui la protezione del colesterolo lipoproteico a bassa densità dall'ossidazione e la promozione del vasorilassamento endoteliale [45-46]. Una correlazione positiva tra i livelli di ocratossina A e stilbene totale è stata trovata nei vini rossi altamente sensibili alla contaminazione da ocratossina A, suggerendo che i livelli tossici di ocratossina A possono essere, in una certa misura, controbilanciati dagli effetti benefici dei derivati del resveratrolo [47].

4.2 L'uso di microrganismi come riduttori di OTA

I metodi biologici utilizzano microrganismi in grado di trasformare o adsorbire OTA per rendere l'alimento salubre o per evitare gli effetti tossici quando vengono ingerite le micotossine. Diverse specie di batteri, lieviti e funghi filamentosi sono in grado di biodegradare l'OTA [48]. Da recenti ricerche è possibile osservare come vengano studiati principalmente questi tre differenti metodi biologici per ridurre la concentrazione di OTA:

- Possibilità di degradazione da parte di batteri e lieviti;
- Studio di muffe in grado di degradare questa micotossina;
- Identificazione e isolamento degli enzimi che intervengono nella degradazione.

4.2.1 *Lactobacillus* (LAB)

È stato dimostrato che alcune specie di *Lactobacillus* eliminano 0,05 mg di OTA L⁻¹ aggiunti al terreno di coltura, in particolare, *L. bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. acidophilus*, eliminano rispettivamente fino al 94%, 72% e 46% di OTA [49].

Sono state riportate, dopo 24 ore di incubazione, in un terreno di coltura avente concentrazione di OTA pari a 0,3 mg L⁻¹, le seguenti percentuali di rimozione da parte di alcuni *Lactobacillus*:

- *L. plantarum* 54%;
- *L. brevis* 50%;
- *L. sanfrancisco* 37% [50].

È ormai generalmente accettato che l'adsorbimento di OTA alle pareti cellulari sia il meccanismo predominante coinvolto nella decontaminazione da parte dei LAB. Ad esempio, gli effetti di adsorbimento sono stati rivendicati da *Turbic et al.* [50], dove si è scoperto che le cellule trattate con acido e calore di due ceppi di *L. rhamnosus* erano più efficaci nel rimuovere l'OTA dalle soluzioni in tampone fosfato rispetto alle cellule vitali; i ceppi hanno rimosso dal 36% al 76% nella soluzione tampone (pH 7,4) dopo 2 ore a 37 ° C. Allo stesso modo, *Piotrowska e Zakowska* [51] hanno verificato che *L. acidophilus* (figura 17) e *L. rhamnosus* hanno causato riduzioni dell'OTA

(concentrazione iniziale 1 mg L^{-1}) del 70% e dell'7% , dopo cinque giorni di incubazione a 37°C e che erano presenti livelli significativi di OTA nelle cellule batteriche separate dalla fase liquida. Anche altri LAB (*L. brevis*, *L. plantarum* e *L. sanfranciscensis*) hanno ridotto (in misura minore) la concentrazione di OTA (circa il 50%).



Figura 17, *Lactobacillus acidophilus* [52]

Del Prete et al. [52] ha testato 15 ceppi di LAB enologico al fine di determinare la capacità *in vitro* di rimuovere l'OTA e hanno individuato *Oenococcus oeni* (figura 18) come il più efficace, con riduzioni dell'OTA del 28%.

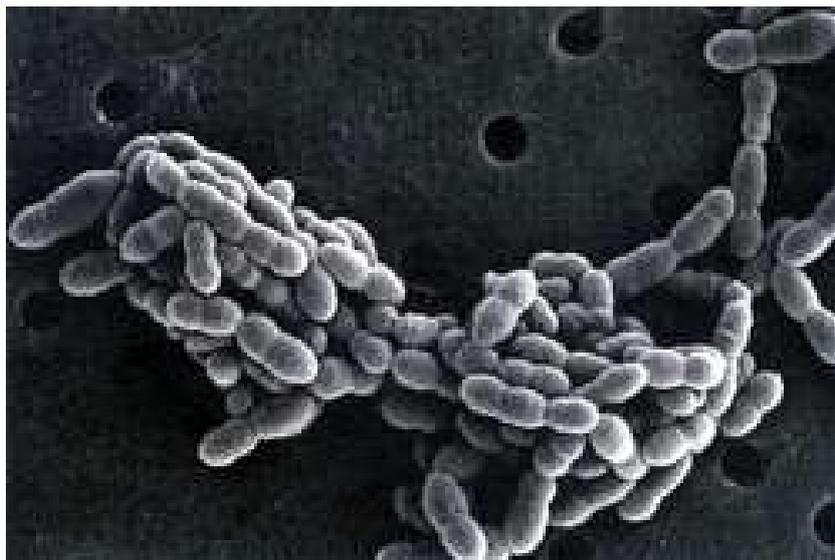


Figura 18, *Oenococcus oeni* [53]

L'azione decontaminante dovuta al legame cellulare è stata confermata poiché:

- 1) Fino al 57% dell'OTA assorbito dalle cellule è stato recuperato attraverso l'estrazione di metanolo dai pellet di batteri;
- 2) L'estratto grezzo di cellule non era in grado di degradare l'OTA;
- 3) I prodotti di degradazione non sono stati rilevati.

Tuttavia, alcuni autori ritengono che possa essere coinvolto anche il metabolismo microbico.

Fuchs et al. [53] ha confermato che le cellule vitali di *L. acidophilus* hanno rimosso l'OTA in modo più efficiente rispetto a quelle morte. Il ceppo di *L. acidophilus* è stato in grado di ridurre $\geq 95\%$ l'OTA in soluzioni tampone (pH 5,0) contenenti 0,5 e 1 mg di OTA L⁻¹ quando incubate a 37 ° C per 4 ore [54].

Altri ceppi di *L. acidophilus* hanno dimostrato solo una moderata riduzione del contenuto di OTA, suggerendo un effetto ceppo-specifico.

In sintesi, alcuni LAB assorbono l'OTA tramite un meccanismo di legame della parete cellulare specifico del ceppo, sebbene venga ipotizzato l'intervento di un'azione catabolica. Il rilevamento di questo catabolismo OTA può essere possibile solo con OTA radiomarcato.

Il potenziale dei LAB come agenti decontaminanti per le micotossine è stato studiato in diversi processi di fermentazione. Il contenuto di OTA, il suo destino durante la vinificazione e le possibilità del suo degrado sono stati studiati a fondo. Le panoramiche riguardanti la presenza e il destino di questa micotossina nell'uva, nel vino e nella birra sono state pubblicate da *Mateo et al.* [55] e *Varga e Kozakiewicz* [56]. Sebbene la diminuzione del contenuto di OTA in fase liquida, durante il processo di vinificazione, sia stata osservata dalla maggior parte dei ricercatori, i risultati sono controversi riguardo al meccanismo di rimozione. Il risultato finale sembrerebbe essere un'azione combinata da parte dei batteri lattici nella fermentazione malolattica [57] e l'adsorbimento alle pareti cellulari da parte del lievito [58].

4.2.2 *Saccharomyces*

Sono stati pubblicati diversi lavori sulla biodegradazione dell'OTA da parte di *S. cerevisiae* (figura 19) e altri lieviti, la maggior parte dei quali attribuisce un ruolo importante ai meccanismi di adsorbimento della parete cellulare.

È stato affermato che *S. cerevisiae* biodegrada il 41% di OTA (0,3 mg L⁻¹) dopo 24 ore a 30 °C, ma non sono stati forniti dettagli sul meccanismo coinvolto [59]. Allo stesso modo, *Böhm et al.* ha affermato che alcuni ceppi hanno degradato fino al 38% di OTA (0,05 mg L⁻¹) senza descrivere i metaboliti di degradazione [48]. D'altra parte, l'adsorbimento di OTA da parte di ceppi enologici di *Saccharomyces* è stato dimostrato da *Bejaoui* e coautori, poiché hanno verificato che le cellule morte, trattate con acido e calore, potevano legare una quantità significativamente maggiore di OTA rispetto a quelle vitali [60].

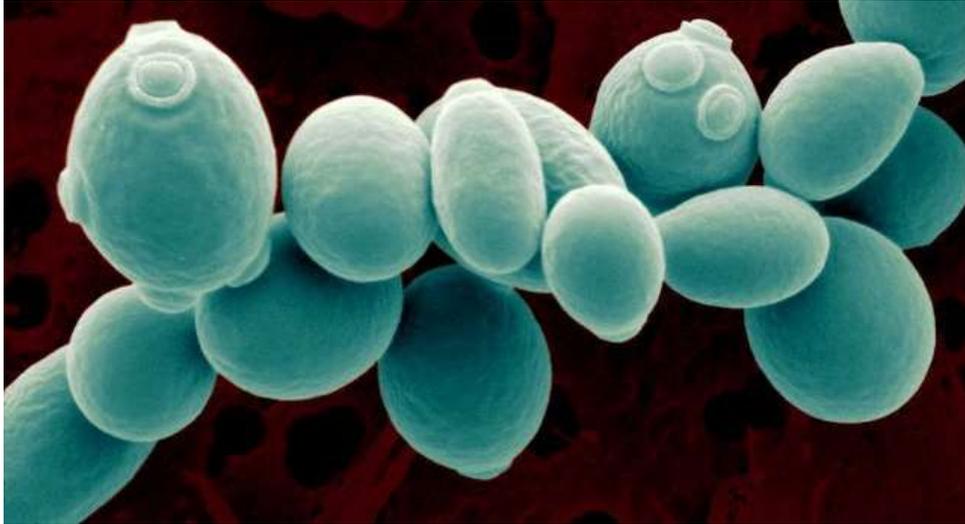


Figura 19, *Saccharomyces cerevisiae* [60]

Il lievito vitale lega fino al 35% e al 45% dell'OTA, a seconda del mezzo e del ceppo, mentre le cellule trattate con calore e acido legano un massimo del 75%. Inoltre, vari studi affermano che il lievito riduca la concentrazione dell'OTA nei processi di fermentazione alcolica come la fermentazione o la vinificazione. Durante la fermentazione del mosto, i lieviti hanno adsorbito al massimo il 21% dell'OTA aggiunta [61]. Inoltre, quasi il 30% dell'OTA aggiunta è stato rimosso dopo un contatto prolungato con la biomassa di lievito [62].

Cecchini e coautori hanno verificato, durante le prove di vinificazione, che fino al 70% di OTA poteva essere rimosso dal vino e che una percentuale significativa dell'OTA rimossa era stata trovata nelle fecce di lievito [63].

Moruno e coautori hanno testato la capacità dei lieviti secchi attivi² e delle fecce di lievito nel rimuovere l'OTA dai vini e hanno riportato una riduzione di circa il 70% quando sono state utilizzate le fecce di lievito [64]. È stato studiato il bioadsorbimento *in vitro* dell'OTA da parte della vinaccia contenente pareti cellulari di lievito, β -glucano di lievito purificato e frazioni di parete cellulare di lievito (separate dalle cellule) essiccate [65]. Le frazioni di parete cellulare di lievito essiccate sono state segnalate come le più efficienti nell'adsorbire l'OTA. Diversi rapporti hanno spiegato questo fenomeno correlandolo ai β -D-glucani di lievito [66], ai glucomannani [67] e al mannanoligosaccaride [68].

Trichosporon, *Rhodotorula* e *Cryptococcus* hanno dimostrato una capacità di biodegradare l'OTA attraverso la scissione del legame ammidico e il rilascio di OT α [69]. In questo studio, il ceppo più efficace ha degradato fino al 100% di OTA (0,2 mg di L⁻¹) dopo cinque ore di incubazione a 35 ° C. Questo lievito è stato successivamente classificato come la nuova specie *Trichosporon mycotoxinivorans* per la sua eccellente capacità di detossificare OTA e ZEA [70]. Tuttavia, uno studio recente ha riconosciuto il *T. mycotoxinivorans* come un nuovo patogeno umano associato alla fibrosi cistica e alla morte di un paziente con polmonite da *Trichosporon* documentata istologicamente: questo ovviamente solleva problemi di sicurezza sul suo utilizzo pratico [71].

Un ceppo di *Phaffia rhodozyma* è stato in grado di degradare il 90% di OTA (7,5 mg L⁻¹) dopo 15 giorni a 20 ° C [72]. In questo studio, è stata osservata la conversione di OTA in OT α e l'adsorbimento di OTA in cellule vitali e trattate termicamente. Più recentemente, *Aureobasidium*

pullulans è stato segnalato per degradare l'OTA, attraverso l'idrolisi del legame ammidico, in OT α [73]; è stato valutato anche l'uso come agente di biocontrollo poiché è stata segnalata una riduzione dell'OTA nell'uva e nel vino. Tuttavia, il fungo (*Aureobasidium pullulans*) sembra essere coinvolto nelle malattie umane e questo problema deve essere risolto prima che possa essere raccomandato un uso più generale [74-76].

4.2.2 Funghi filamentosi

Alcuni ceppi di *Aspergillus fumigatus* (figura 20), *A. japonicus* e *A. niger* sono in grado di degradare l'OTA a prodotti meno tossici come l'ocratossina R [77]. *A. fumigatus*, *A. japonicus* e *A. niger* hanno degradato 2 mg di OTA L⁻¹ dopo 10 giorni di incubazione a 30 ° C. È stato rilevato OT α ed è stata osservata un'ulteriore degradazione in un composto sconosciuto. Anche *A. niger* ed altri funghi filamentosi hanno dimostrato di biodegradare completamente o parzialmente l'OTA, dopo la crescita in un terreno di coltura contenente 1 mg di OTA L⁻¹, per sei giorni a 25 ° C [78]. OT α è stato rilevato, in particolare nei saggi eseguiti con *A. niger* e altri tipi di aspergilli neri.



Figura 20, *Aspergillus fumigatus* [77]

Un metabolita di biodegradazione non identificato è stato osservato nei saggi effettuati con *A. ochraceus* che non ha prodotto OTA e alcuni ceppi di *A. wentii*. Inoltre, *R. homothallicus*, *R. oryzae*, *R. stolonifer* e altre specie *Rhizopus* hanno degradato più del 95% di OTA (7,5 mg di L⁻¹) dopo 16 giorni di incubazione a 25 ° C [79]. OT α è stato rilevato anche in questo studio. Successivamente è stata confermata l'eccellente capacità di alcuni aspergilli neri di degradare l'OTA: alcuni ceppi di *A. carbonarius*, *A. japonicus* e *A. niger* hanno degradato più dell'80% di OTA (2 mg L⁻¹) [80].

Più recentemente, la capacità della *Botrytis cinerea* di degradare l'OTA è stata confermata con riduzioni dal 24,2% al 26,7% [81]. Ciò ha fornito una spiegazione per la bassa contaminazione OTA della muffa nobile e dei vini da vendemmia tardiva.

È stato inoltre dimostrato che *Rhizopus japonicus* e *Phanerochaete chrysosporium* biodegradano l'OTA in misura minore rispettivamente del 38% e del 36%.

4.2.3 Enzimi

Diversi enzimi possono essere coinvolti nella degradazione dell'OTA. Tuttavia, sono disponibili poche informazioni e pochissimi enzimi sono stati purificati e caratterizzati. La prima proteasi segnalata in grado di idrolizzare l'OTA è stata la carbossipeptidasi A (CPA) del pancreas bovino (figura 21) [82].

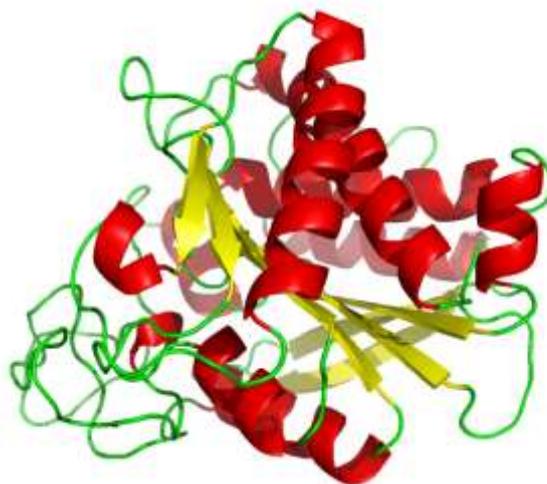


Figura 21, Carbossipeptidasi A [82]

Successivamente, uno studio di screening che includeva diverse idrolasi commerciali, ha verificato che un prodotto grezzo di lipasi di *A. niger* era in grado di idrolizzare l'OTA attraverso il legame ammidico [83]. L'enzima è stato purificato mediante cromatografia a scambio anionico ed è stato dimostrato che scinde OTA e p-nitrofenil palmitato, uno specifico substrato della lipasi.

Sono state studiate anche diverse preparazioni proteolitiche, coinvolte nell'idrolisi dell'OTA in OT α . Questi includevano principalmente la proteasi A da *A. niger* e la pancreatina dal pancreas suino [84]. Inoltre, è stata segnalata la produzione e la purificazione di un preparato enzimatico grezzo senza cellule di *A. niger* che ha dimostrato una capacità significativa di scindere il legame ammidico dell'OTA. L'enzima coinvolto nella degradazione OTA è stato purificato mediante cromatografia a scambio anionico e caratterizzato [85]. Questo enzima ha mostrato una maggiore attività di degradazione dell'OTA rispetto al CPA a pH 7,5 e 37 ° C ed è stato inibito dall'EDTA, che è un inibitore specifico delle metalloproteasi.

È stato riscontrato che la carbossipeptidasi Y (CPY) del *S. cerevisiae* (figura 22) è anche in grado di idrolizzare l'OTA con attività ottimale a pH 5,6 e 37 ° C. Tuttavia, l'attività specifica di CPY è molto bassa, come indicato dal fatto che la reazione di idrolisi dell'OTA è molto lenta. Tuttavia, dopo cinque giorni di incubazione, CPY ha convertito il 52% dell'OTA presente nella miscela di reazione in OT α . Questa attività è sufficiente per ridurre significativamente i livelli di OTA durante la

fermentazione del vino o della birra, poiché questi processi richiedono diversi giorni per essere completati. Quindi, un percorso di biodegradazione è possibile per *S. cerevisiae* oltre al fenomeno di adsorbimento di OTA.

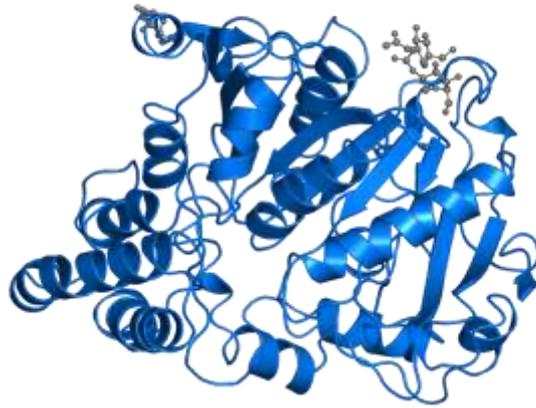


Figura 22, Carbossipeptidasi Y [82]

È necessario considerare che la CPY è una esopeptidasi vacuolare³ in cui l'OTA entra nelle cellule di lievito prima di essere catabolizzato. Tuttavia, le proprietà adsorbenti della parete del *S. cerevisiae* possono rendere difficile l'assorbimento dell'OTA. Sono necessari ulteriori studi per caratterizzare i prodotti di degradazione e per indagare l'attività di questi microrganismi ed enzimi negli alimenti.

3- L'aggettivo "vacuolare" si riferisce alla presenza di vacuoli all'interno della struttura a cui tale aggettivo è associata.

5. L'uso delle vinacce come biomassa filtrante: Meccanismo d'adsorbimento

La vinificazione genera rifiuti sotto forma di vinacce (figura 23-24) che rimangono dopo che l'uva è stata pressata. Sulla base di alcune stime, circa il 20% del peso totale dell'uva è scarto, il che si traduce in più di 8 milioni di tonnellate di vinacce in tutto il mondo [86]. L'eliminazione delle vinacce è costosa e, se non trattata in modo efficace (tramite una opportuna quantità di spandimento sui terreni per utilizzo agronomico ad esempio), rappresenta un grave problema ambientale [87]. Sono stati suggeriti diversi processi per l'utilizzo di esse, inclusa l'estrazione di antociani, acido citrico, etanolo e olio di semi d'uva [88].



Figura 23, Vinacce [88]



Figura 24, Vinacce e mosto [88]

Attualmente, la vinaccia d'uva viene utilizzata principalmente per il condizionamento del suolo o come materia prima a basso costo come mangime per animali, soprattutto per erbivori e nella stagione secca quando i pascoli scarseggiano [89-90].

La vinaccia rappresenta una fonte potenzialmente preziosa di antiossidanti fenolici, che può avere applicazioni tecnologiche come additivi per mangimi e possibili benefici nutrizionali e salutistici [91].

È stata tentata l'integrazione della vinaccia nell'alimentazione umana e l'utilizzo della stessa durante alcuni processi di trasformazione alimentare. Sotto forma di farina essiccata e macinata, la vinaccia d'uva è stata incorporata in prodotti da forno per fare biscotti, torte o pani speciali, che hanno mostrato un contenuto più elevato di fibre alimentari, composti fenolici e proprietà antiossidanti potenziate [92-93].

A causa della potenziale capacità della vinaccia di legare l'OTA e dei suoi ben noti benefici per la salute è stato considerato come "case study" quello compiuto da G. Avantaggiato, D. Greco, A. Damascelli, M. Solfrizzo e A. Visconti, ("Assessment of Multi-mycotoxin Adsorption Efficacy of Grape Pomace", *Institute of Sciences of Food Production (ISPA), National Research Council (CNR)*), dove si è analizzata la capacità della vinaccia di adsorbire simultaneamente diverse micotossine da colture liquide, individuando il modello isoterma (modello di *Langmuir*, *Freundlich* ecc.) ed i parametri di tale modello che meglio approssimano l'adsorbimento di ciascuna micotossina.

Le micotossine analizzate sono:

- Aflatossina B₁ (AFB₁);
- Zearalenone (ZEA);
- Fumonisina B₁ (FB₁);
- Deossinivalenolo (DON);
- Ocratossina A (OTA).

Per lo studio di adsorbimento è stata utilizzata la vinaccia ottenuta da un vitigno a bacca rossa (*Primitivo*-figura 25) [94].



Figura 25, Grappolo di *Primitivo* [94]

5.1 Materiali e metodi

5.1.1 Reagenti e campioni

L'adsorbimento delle micotossine è stato studiato a diversi valori di pH utilizzando diversi soluzioni tampone (1 mmol/L), come tamponi citrato a pH 3, 4 e 5 e tamponi fosfato a pH 6, 7, 8 e 9.

Soluzioni “stock” di micotossine di AFB₁, OTA, ZEA e DON (1 mg/mL ciascuno) sono state preparate miscelando tossine commerciali in acetonitrile.

È stata preparata una soluzione standard contenente una miscela di micotossine (200 µg/mL di ciascuna tossina). Questa soluzione o le soluzioni madre di micotossine sono state opportunamente diluite con tamponi a diversi valori di pH per preparare le soluzioni di lavoro per esperimenti di adsorbimento.

La vinaccia fermentata è stata ottenuta dalla lavorazione manuale di uve di un vitigno a bacca rossa (*Primitivo*) coltivate e raccolte a *Conversano* (Puglia, Italia). I semi ed i raspi sono stati separati manualmente e scartati, e la buccia e la polpa sono state essiccate in forno a 50 °C fino a peso costante. Il materiale essiccato è stato macinato in polvere fine. L'analisi OTA della vinaccia è stata eseguita secondo il metodo descritto da *Solfrizzo et al.* evidenziando l'assenza di tossine (come l'esempio riportato in figura 26):

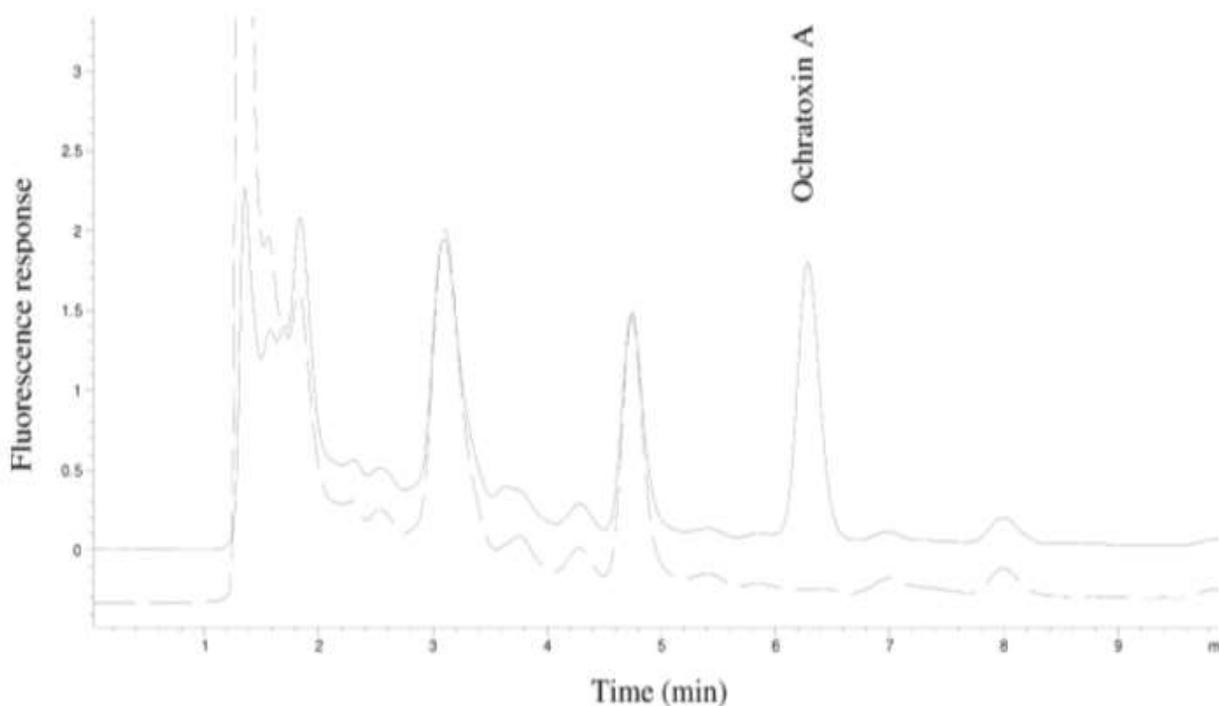


Figura 26, Cromatogrammi di un campione di vinaccia addizionata con 10 µg / kg di OTA (-) e campione puro (- -) analizzati con il presente metodo [95]

Tale metodo cromatografico è stato applicato a campioni contaminati naturalmente e artificialmente. Esso consiste nel rilevamento della fluorescenza, tramite la colonna di immunoaffinità, per la determinazione dell'ocratossina A nei sottoprodotti della cantina [95].

DON, AFB₁, ZEA e OTA sono stati analizzati secondo un metodo UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) che ha consentito la determinazione simultanea delle tossine.

5.1.2 *Esperimenti di adsorbimento*

La vinaccia è sospesa con un volume appropriato di soluzione di lavoro contenente più micotossine nel tampone. Dopo il periodo di incubazione, il campione è stato lasciato sedimentare e 1 mL di sospensione è stato centrifugato per 20 min. Il campione surnatante è stato suddiviso in due aliquote e analizzato per il contenuto residuo di micotossine mediante HPLC (High Performance Liquid Chromatography) per FB₁ e UPLC per AFB₁, ZEA, OTA e DON.

È stato preparato un test di controllo contenente la soluzione delle micotossine in tampone senza vinaccia. Il controllo ha permesso di valutare la stabilità delle tossine a differenti pH e un eventuale adsorbimento non specifico. Non sono state rilevate precipitazioni chimiche e perdite di micotossine dovute ad adsorbimento non specifico. Esperimenti preliminari di adsorbimento sono stati eseguiti a temperatura costante (37 ° C) per determinare l'effetto di vari parametri (dimensione delle particelle, tempo di contatto, pH medio e dosaggio della vinaccia) sull'adsorbimento delle micotossine. La concentrazione di micotossina era di 1 µg/mL, in tutti i casi.

Per studiare l'effetto della dimensione delle particelle sull'adsorbimento di micotossine, sono state testate cinque differenti frazioni di vinaccia a pH 7 e concentrazione 0,5% w/v (5 mg/mL).

Per studiare l'effetto del tempo di contatto sul processo di adsorbimento, la vinaccia è stata testata a pH 7 e concentrazione 0,1% w/v (1 mg/mL). I campioni sono stati recuperati a tempi differenti (1–120 min). Il liquido surnatante è stato filtrato a 0,2 μm e analizzato per il contenuto residuo di micotossine.

Per studiare l'effetto del pH sull'adsorbimento delle tossine, sono stati eseguiti esperimenti a diversi valori di pH (3–9), utilizzando una concentrazione di 0,5% w/v (5 mg/mL).

Per studiare la capacità di desorbimento delle micotossine dalla vinaccia, a differenti valori di pH, 10 mg di vinaccia sono stati miscelati con 1 mL di soluzione (pH 3), contenente 1 $\mu\text{g/mL}$ di ciascuna tossina (AFB₁, ZEA, OTA, FB₁ e DON) (dosaggio adsorbente 1% w/v). Successivamente, sono stati centrifugati e i surnatanti sono stati analizzati per il contenuto residuo di micotossine. I “pellet” sono stati lavati con 1 mL di tampone a pH 7 (agitazione per 30 min), quindi sono stati centrifugati e i surnatanti analizzati per valutare il desorbimento.

I valori di adsorbimento di micotossine (pH 3) e il desorbimento (pH 7) sono stati calcolati per ciascuna tossina ed espressi in termini percentuali. L'effetto della concentrazione della vinaccia sull'adsorbimento delle tossine è stato studiato mediante isoterme di equilibrio. Esperimenti a pH costante (7 e 3), hanno testato una quantità fissa di tossine con concentrazione di vinaccia differenti (0,05-3% w/v corrispondenti a 0,5-30 mg / mL).

I dati sull'adsorbimento sono stati espressi come percentuale di micotossine adsorbite e tracciati in funzione del dosaggio della vinaccia. I grafici di adsorbimento delle micotossine sono stati adattati dal modello di *Langmuir* (Tabella 9) [96],

5.1.3 Isoterme d'adsorbimento all'equilibrio

Tre serie di isoterme di adsorbimento sono state eseguite a temperatura e pH costanti testando una quantità fissa di vinaccia con soluzioni di micotossine a diverse concentrazioni (0,05-5 $\mu\text{g/mL}$). Le isoterme di equilibrio sono state impostate in base ai risultati degli esperimenti preliminari di adsorbimento, utilizzando un tempo di contatto di 90 min, una frazione di dimensione delle particelle minore di 500 μm , una dose di vinaccia dello 0,1% w/v (1 mg/mL) per l'adsorbimento AFB₁ e ZEA e una dose di vinaccia dello 0,2% w/v (2 mg/ mL) per l'adsorbimento di OTA e FB₁.

Le isoterme consistevano in 10 o più punti sperimentali e venivano eseguite in triplicato.

La prima serie di isoterme (sistema a micotossina singola) è stata condotta a temperatura costante ($37,0 \pm 0,5$ °C) e a diversi valori di pH (3 e 7). Queste isoterme sono state utilizzate per calcolare i parametri (capacità massima di adsorbimento, entità di adsorbimento ed eterogeneità del processo di adsorbimento) relativi agli adsorbimenti di AFB₁, ZEA, OTA e FB₁ sulla vinaccia e all'effetto del pH sull'adsorbimento.

La seconda serie di isoterme è stata condotta a pH 7 e a temperature diverse ($5,0 \pm 0,5$, $37,0 \pm 0,5$, $50,0 \pm 0,5$ e $70,0 \pm 0,5$ °C). Queste isoterme hanno permesso di studiare l'influenza della variazione di temperatura sull'adsorbimento di micotossine e il calcolo dei parametri termodinamici (ΔG° , ΔH° e ΔS°) relativi all'adsorbimento delle micotossine.

La terza serie di isoterme (miscela di micotossine) sono state eseguite a temperatura costante ($37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$) e pH 7 utilizzando soluzioni contenenti cinque micotossine, nell'intervallo di concentrazione $0,05\text{-}5 \mu\text{g} / \text{mL}$ in rapporto 1:1. Queste isoterme di adsorbimento multiple sono state eseguite per verificare se la presenza simultanea di AFB₁, ZEA, OTA, FB₁ e DON può interferire con il processo di adsorbimento relativo a ciascuna micotossina.

La variazione dei valori di adsorbimento dovuta alla presenza contemporanea di più micotossine è stata valutata confrontando le isoterme di adsorbimento ed i relativi parametri ottenuti da esperimenti di adsorbimento condotti su micotossine singole o in miscela [97].

5.1.4 Elaborazione dei dati e curve fitting

La quantità di micotossina adsorbita è stata calcolata come la differenza tra la quantità di micotossina nel surnatante delle provette senza vinaccia e la quantità trovata nel surnatante delle provette sperimentali con la vinaccia. Questa quantità è stata quindi correlata alla quantità presente nel surnatante delle provette di controllo ed espressa in percentuale. La quantità di micotossina legata per unità di massa di vinaccia è stata calcolata utilizzando l'equazione (1):

$$Q_{eq} = \frac{[(C_0 - C_{eq})V]}{m} \quad (1)$$

- Q_{eq} = quantità di micotossine adsorbite per milligrammo di vinaccia ($\mu\text{g}/\text{mg}$);
- C_0 = concentrazione di micotossine nei surnatanti provenienti dalle provette senza vinaccia ($\mu\text{g}/\text{mL}$);
- C_{eq} = concentrazione residua di micotossine nel surnatante delle provette sperimentali con vinaccia all'equilibrio ($\mu\text{g}/\text{mL}$);
- V = volume della soluzione (mL);
- m = massa della vinaccia (mg).

Le isoterme di adsorbimento sono state ottenute registrando di volta in volta la quantità di micotossina adsorbita per unità di massa di adsorbente (Q_{eq}) rispetto la concentrazione della tossina nella fase esterna (C_{eq}), in condizioni di equilibrio ($Q_{eq} = f(C_{eq})$) [97].

La soglia per il livello di significatività per il test di normalità e varianza costante è stata fissata a $p < 0,05$. Il coefficiente di determinazione (R^2), gli errori standard della stima ($s_{y|x}$), la somma dei quadrati residua (SS_{res}) e la somma dell'errore residuo predetto dei quadrati (PRESS) è stata calcolata per valutare l'adeguatezza/idoneità dei modelli di regressione. I modelli isotermici che fornivano SS_{res} , $s_{y|x}$ e PRESS più bassi e R^2 più alto sono stati considerati per fornire il fitting più adatto [99].

Equazioni e modelli isotermici		
Freundlich	$Q_{eq} = K_f C_{eq}^{1/n}$	K_f = costante di <i>Freundlich</i> n = intensità d'adsorbimento
Langmuir	$Q_{eq} = Q_{max} [(K_L C_{eq}) / (1 + K_L C_{eq})]$	Q_{max} = costante relativa alla massima quantità d'adsorbimento della micotossina ($\mu\text{g}/\text{mL}$) Q_{eq} = quantità di micotossina adsorbita per mg di vinaccia ($\mu\text{g}/\text{mg}$) K_L = costante di <i>Langmuir</i>
Fattore di separazione di Langmuir	$R_L = 1 / (1 + K_L C_0)$	C_0 = concentrazione iniziale della micotossina in soluzione ($\mu\text{g}/\text{mL}$) C_{eq} = concentrazione micotossina in soluzione all'equilibrio dove adsorbimento con vinacce ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Hill		R_L indica la natura d'adsorbimento:
Sips		<ul style="list-style-type: none"> • $R_L > 1$ adsorbimento non favorevole; • $0 < R_L < 1$ adsorbimento favorevole; • $R_L = 0$ adsorbimento irreversibile.

Tabella 9, Modelli ed equazioni isotermiche utilizzati per analizzare i dati sperimentali d'adsorbimento (le equazioni del modello di *Hill* e *Sips* non sono presenti in quanto tali modelli approssimano bene solo i dati sperimentali per l'adsorbimento di AFB₁ e non quelli relativi all'OTA) [97]

5.2 Modelli isotermici di adsorbimento per ocratossina A

Nell'adsorbimento di OTA si è deciso di approfondire solo i modelli che meglio approssimavano i dati sperimentali di tale processo d'adsorbimento; i modelli in questione sono quelli di *Langmuir* e *Freundlich*, tralasciando il modello di *Hill* e *Sips*.

5.2.1 Modello di Langmuir

Per sistemi considerati in condizioni ideali si assume che l'adsorbato si comporti come un gas ideale in condizioni isoterme. Ipotesi principali:

- Ogni sito può contenere al massimo una molecola di adsorbato (solo copertura monostrato);
- L'adsorbimento non può procedere oltre la copertura di un monostrato (condizione di massimo adsorbimento);
- I siti sono tutti equivalenti dal punto di vista energetico (hanno la stessa entalpia di adsorbimento dunque la stessa probabilità di essere occupati) e la superficie è assunta uniforme (cioè perfettamente piana su scala microscopica);
- L'interazione adsorbato-adsorbato è considerata trascurabile rispetto all'adsorbato-adsorbente interazione (energia di adsorbimento costante indipendentemente dal materiale adsorbito);
- L'adsorbimento è reversibile;
- L'attività può essere sostituita con la concentrazione (per soluzione diluita) [98].



Figura 27. Modellazione isoterma di Langmuir [98]

Il modello consiste in un monostrato continuo di molecole di adsorbato che circondano una superficie solida omogenea (figura 27). La pressione parziale dell'adsorbato, p_A , è correlata al suo volume, V , adsorbito su un adsorbente solido (figura 28-29-30). Il legame dell'adsorbato viene trattato come una reazione chimica tra la molecola di adsorbato A e un sito vuoto, S . Il complesso adsorbito A_{ad} con una costante di equilibrio K_{eq} associata è possibile vederlo nelle equazioni seguenti [99]:

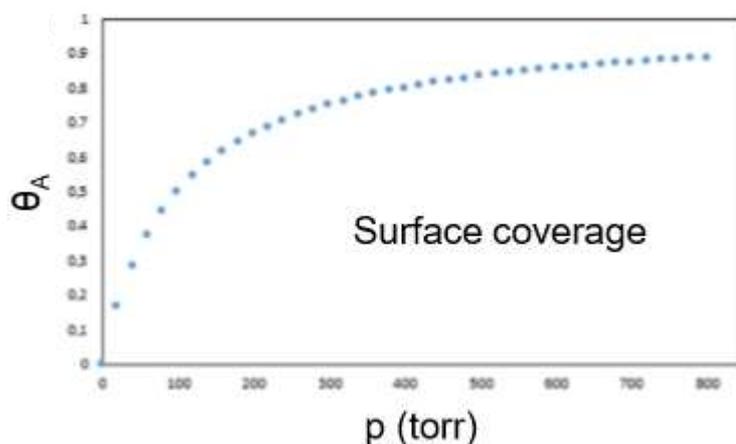


Figura 28, Grado di occupazione θ_A in funzione della pressione parziale di adsorbato [99]

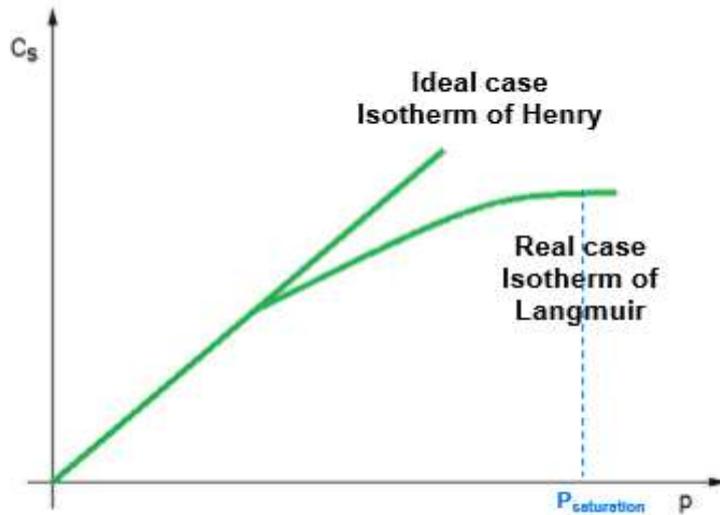


Figura 29, Andamento tipico dell'isoterma di Langmuir [99]

$$\theta_A = \frac{V}{V_m} = \frac{K_{eq}^A \cdot P_A}{1 + K_{eq}^A \cdot P_A} \quad (3)$$

$$\frac{\theta_A}{1 - \theta_A} = K_{eq}^A \cdot P_A \quad (4)$$

$$X_A = \frac{Q^0 \cdot b \cdot C_{eq}}{1 + b \cdot C_{eq}} \quad (5)$$

- θ_A = grado di occupazione dei siti di adsorbimento;
- V_m = volume del monostrato;
- X_A = massa di adsorbato per unità di massa di adsorbente in equilibrio, kg_A / kg_{ads} ;
- C_{eq} = concentrazione in equilibrio di adsorbato nel fluido, $kmol_A / m^3$; kg_A / m^3 ; kPa ;
- Q_0 = massa di adsorbato per unità di massa adsorbente per uno strato monomolecolare di copertura della superficie del solido, kg_A / kg_{ads} ;
- $b = b^0 \exp(-E_A / RT)$: quantità massima adsorbibile;
- E_A = energia di adsorbimento < 0 [99].

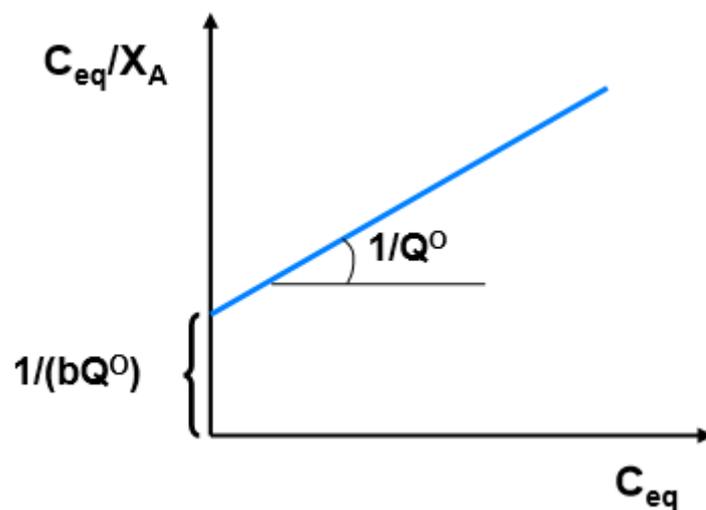


Figura 30, C_{eq}/X_A VS C_{eq} [99]

Il modello di *Langmuir* non tiene conto della rugosità superficiale dell'adsorbente (più tipi di sito disponibili per l'adsorbimento, inoltre il calore dell'adsorbimento può variare da sito a sito); ignora le interazioni adsorbato-adsorbato (interazione diretta e interazione indiretta) che potrebbero rendere più o meno favorevole l'adsorbimento vicino ad un'altra molecola di adsorbato ed influenzare notevolmente il comportamento ad alta copertura [99].

5.2.2 Modello di *Freundlich*

L'isoterma di *Freundlich* è la più importante isoterma di adsorbimento multisito per superfici rugose in cui si tiene conto della disomogeneità e delle interazioni adsorbato-adsorbato [100]:

$$\theta_A = k \cdot p^n \quad (6)$$

$$X_A = k \cdot (C_{eq})^{\frac{1}{n}} \quad (7)$$

$$\log X_A = \log k + \frac{1}{n} \log C_{eq} \quad (8)$$

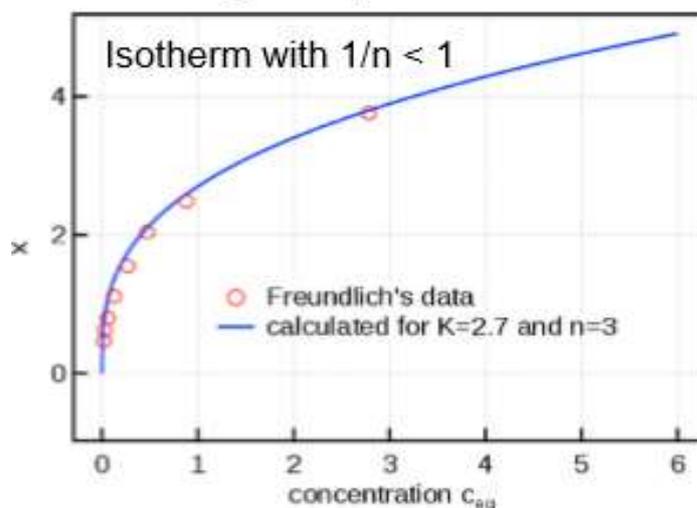


Figura 32, Tipico andamento isoterma di *Freundlich* per $1/n < 1$ [100]

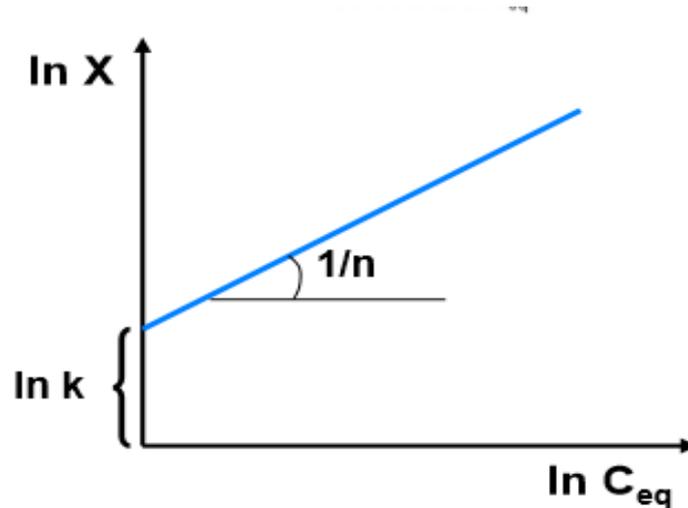


Figura 33, $\ln X$ vs $\ln C_{eq}$ [100]

- θ_A = occupazione frazionaria dei siti di adsorbimento k ;
- n = parametri di adattamento caratteristici (due, in *Langmuir* solo uno);
- N = affinità adsorbato-adsorbente (n piccola / pendenza alta, quantità elevata di adsorbato su adsorbente);
- X_A = massa di adsorbato per unità di massa di adsorbente all'equilibrio, kg_A / kg_{ads}
- C_{eq} = concentrazione all'equilibrio di adsorbato nel fluido, $kmol_A / m^3$, kg_A / m^3 , kPa ;

Le isoterme si spostano verso l'alto con il diminuire della temperatura mentre la capacità di adsorbimento aumenta. L'adsorbimento di *Freundlich* non è più valido ad alta pressione ($1/n \rightarrow 0$) [100].

5.3 Risultati e discussione

5.3.1 Effetto della dimensione delle particelle

L'effetto della dimensione delle particelle sul processo di adsorbimento delle micotossine è stato studiato utilizzando frazioni con dimensioni delle particelle comprese tra > 500 e $< 60 \mu m$ (Tabella 10).

Effetto dimensione particelle				
Dimensione particella	Percentuale d'adsorbimento delle micotossine (%)			
	<i>AFB₁</i>	<i>ZEA</i>	<i>OTA</i>	<i>FB₁</i>
>500	74,8	63,1	50,3	26,3
300-500	79,1	69	54,8	26,6
100-300	80	69,2	56,6	27,5
60-100	81,9	69,5	60,5	27,5
<60	80,2	68,9	58,9	27,8

Tabella 10, Effetto della dimensione delle particelle sull'adsorbimento AFB_1 , ZEA , OTA e FB_1 [101]

Tutte le frazioni hanno adsorbito quantità significative di AFB₁, ZEA, OTA e FB₁, mentre l'adsorbimento di DON è stato trascurabile. Per la maggior parte delle micotossine, la frazione grossolana ha prodotto valori di adsorbimento significativamente inferiori (75% AFB₁, 63% ZEA, 50% OTA e 26% FB₁). Questi valori aumentavano leggermente diminuendo la dimensione delle particelle (<500 µm) ed erano costanti nell'intervallo da 500 a <60 µm.

I massimi adsorbimenti registrati in questo intervallo sono stati 82% AFB₁, 70% ZEA, 61% OTA e 28% FB₁. Pertanto, la frazione di vinaccia <500 µm è stata utilizzata per i successivi esperimenti di adsorbimento [101].

5.3.2 Effetto del tempo di contatto

L'effetto del tempo di contatto per l'adsorbimento delle micotossine da parte della vinaccia è stato studiato per un periodo di 2 ore (figura 33). Dagli esperimenti cinetici, il grafico dell'adsorbimento di micotossine rispetto al tempo ha mostrato che il livello di adsorbimento di AFB₁, ZEA, OTA e FB₁ da parte della vinaccia è veloce nelle fasi iniziali del periodo di contatto e poi diventa più lento vicino all'equilibrio.

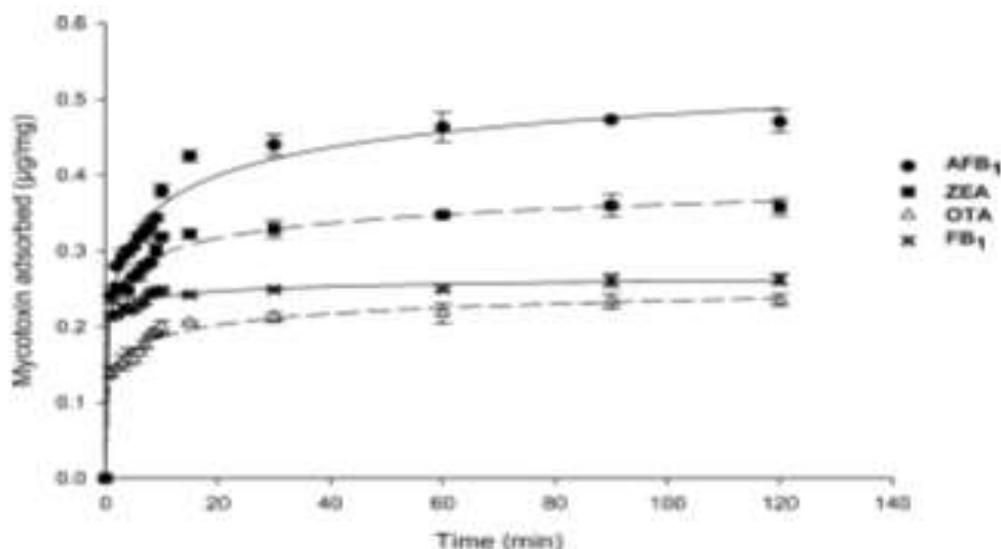


Figura 33, Effetto tempo di contatto [101]

La metà dell'adsorbimento totale si è verificata in meno di 3 minuti e l'adsorbimento massimo è stato raggiunto in 15 minuti. Non sono state osservate ulteriori modifiche nell'adsorbimento oltre il periodo di 15 minuti fino a 2 ore (figura 33) [101].

5.3.3 Effetto del pH

La rimozione delle micotossine dal mezzo acquoso attraverso un processo di adsorbimento è, nella maggior parte dei casi, fortemente dipendente dal pH.

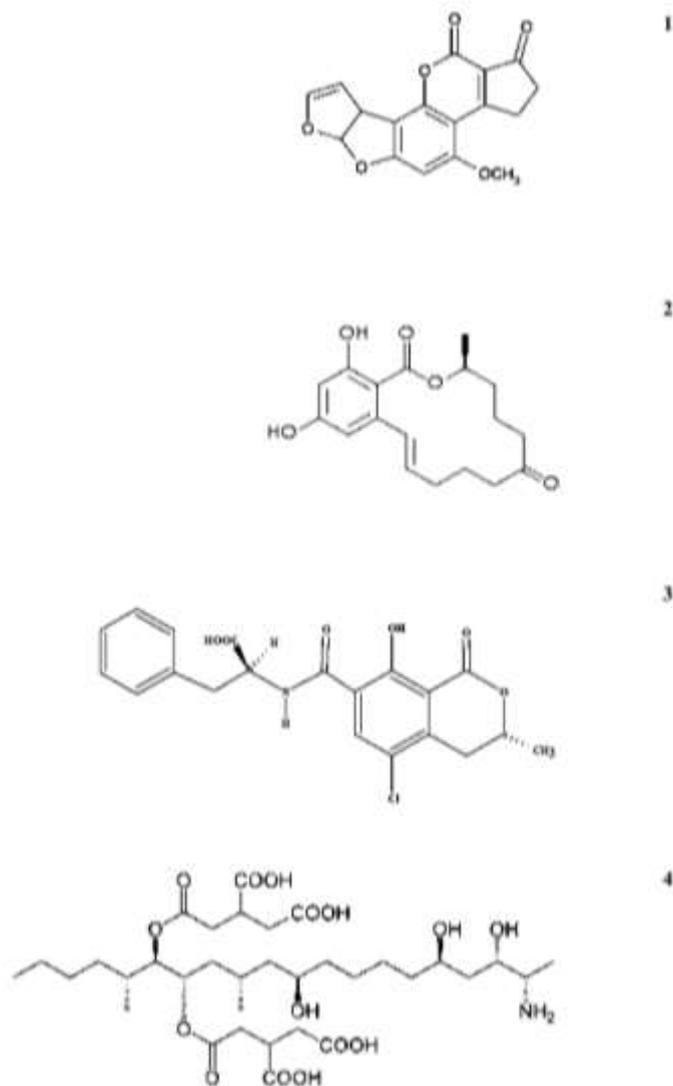


Figura 34, Struttura micotossine: **1,** AFB₁; **2,** ZEA; **3,** OTA; **4,** FB₁ [102]

Il pH può influenzare la carica superficiale degli adsorbenti e il grado di ionizzazione delle tossine e, di conseguenza, può portare a uno spostamento nella cinetica di reazione e nelle caratteristiche di equilibrio del processo di adsorbimento. Ciò è più importante quando il processo di adsorbimento coinvolge interazioni elettrostatiche. In generale, la carica della tossina dipende dal suo pKa. La tossina è principalmente in forma protonata a $\text{pH} < \text{pKa}$ e in forma deprotonata a $\text{pH} > \text{pKa}$. L'effetto del pH sull'adsorbimento di AFB₁, ZEA, OTA e FB₁ da parte della vinaccia è differente a seconda del grado di ionizzazione delle molecole (Tabella 11).

Effetto del pH				
pH	Percentuale d'adsorbimento delle micotossine (%)			
	<i>AFB₁</i>	<i>ZEA</i>	<i>OTA</i>	<i>FB₁</i>
3	83,2	67,9	67,6	26,7
4	83	68	65,4	25,8
5	83,4	68,2	62,2	26,4
6	84,6	69	62,3	33,8
7	82	67	61,3	34,7
8	82,6	68,3	62,4	35,4
9	83	64,1	60,7	33,7

Tabella 11, Effetto del pH nel processo di adsorbimento dalle vinacce [102]

AFB₁ è una molecola non ionizzabile (figura 34) e il pKa in acqua non è applicabile. Pertanto, una variazione del pH non dovrebbe influire sull'assorbimento di *AFB₁*. Di conseguenza, la vinaccia ha sequestrato *AFB₁* nella stessa misura in tutti gli intervalli di pH analizzati nello studio (Tabella 11). *ZEA* è un composto difenolico con un pKa stimato di 7,6 [103], quindi una certa quantità di anione fenolato può essere presente in acqua vicino a pH 7.

L'adsorbimento di *ZEA* non è stato influenzato dal pH nell'intervallo 3–8 ed è inferiore a pH 9.

Nessun rapporto riguardante il pKa di *FB₁* è disponibile in letteratura [104]. I valori di pKa per l'acido tricarballylico sono 3,5, 4,6 e 5,8 e il gruppo delle ammine alifatiche dovrebbe avere un pKa > 9. Pertanto, a pH compreso tra 6 e 9, *FB₁* potrebbe essere in forma anionica a causa della deprotonazione dei gruppi carbossilici, mentre potrebbe essere in forma cationica a pH <6 a causa della protonazione del gruppo amminico. L'adsorbimento di *FB₁* da parte della vinaccia ottenuto a pH ≥6 è stato significativamente superiore a quello ottenuto a pH ≤5 (Tabella 11). Sembra che la forma anionica di *FB₁* contribuisca all'adsorbimento da parte della vinaccia, mentre la forma cationica diminuisca tale adsorbimento.

L'*OTA* è una diidroisocumarina legata attraverso il suo gruppo 7-carbossilico da un legame ammidico alla L-fenilalanina (figura 34). I valori di pKa sono compresi negli intervalli di 4,2-4,4 e 7,0-7,3, rispettivamente, per il gruppo carbossilico della porzione fenilalanina e per il gruppo idrossile fenolico della parte isocumarina [104]. Ciò indica che, in soluzioni acquose a pH 7, sia l'anione monovalente (*OTA*⁻¹) che quello bivalente (*OTA*⁻²) sono presenti, mentre la tossina protonata è presente in soluzioni acide (pH <4). Gli adsorbimenti di *OTA* registrati a pH ≤4 erano costanti e significativamente superiori a quelli registrati a pH ≥5 (Tabella 11). Questo risultato suggerisce che l'adsorbimento di *OTA* è maggiore quando è nella forma neutra e diminuisce leggermente quando è nella forma anionica. Contrariamente ad *AFB₁*, *ZEA* e *OTA*, *FB₁* è una tossina più polare e solubile in acqua, contenente gruppi funzionali carbossilici, idrossilici e amminici.

È stato eseguito uno studio di desorbimento per valutare se il cambiamento del pH può causare il rilascio delle tossine sequestrate. Le micotossine sono state prima adsorbite sulla vinaccia a pH 3, quindi il "pellet" contenente le micotossine adsorbite è stato lavato con una soluzione a pH 7. I valori di adsorbimento e desorbimento erano, rispettivamente, 94 e 4% per *AFB₁*; 87 e 10% per *ZEA* 84 e 14% per *OTA*; e 16 e 45% per *FB₁*. Questi risultati suggeriscono che la vinaccia ha un'elevata capacità d'adsorbimento *AFB₁*, *ZEA* e *OTA* a pH acido, ed è in grado di trattenere le tossine adsorbite quando

il pH presenta valori neutri. FB_1 viene sequestrato male a pH 3 e quasi la metà dell'adsorbito la tossina può essere rilasciata quando il pH del mezzo cambia da 3 a 7 [105].

5.3.4 Effetto concentrazione adsorbente

L'adsorbimento di AFB_1 , ZEA, OTA e FB_1 è stato significativamente influenzato dalla concentrazione dell'adsorbente e la percentuale di micotossine rimosse da soluzioni tampone neutre o acide è aumentata con l'aumentare delle concentrazioni della vinaccia (figura 25).

Il modello di *Langmuir* ha fornito buone correlazioni per i grafici relativi all'isoterma di adsorbimento. Le isoterme AFB_1 , ZEA e OTA ottenute a diversi valori di pH erano comparabili (Figura 3). I valori sperimentali per l'adsorbimento di AFB_1 , ZEA e OTA erano rispettivamente negli intervalli di 28-98%, 21-94% e 6-94%. Gli adsorbimenti di FB_1 erano significativamente più alti a pH 7 (17-44%) che a pH 3 (11-31%) (Figura 35). Il modello di *Langmuir* ha consentito il calcolo dell'adsorbimento massimo teorico (Ads_{max}) e del C_{50} [106], ovvero il dosaggio di adsorbente teoricamente stimato per ottenere una riduzione del 50% della tossina assorbibile (Tabella 12). Non è stato possibile calcolare la C_{50} per FB_1 a pH 3. Per tutte le micotossine, i valori di Ads_{max} e C_{50} erano in accordo con i valori sperimentali ottenuti (Figura 35). Tenendo conto di questi risultati, non è utile aumentare il dosaggio di vinacce oltre i 4 mg/mL per sequestrare AFB_1 , ZEA e OTA da soluzioni di micotossine ≥ 1 $\mu\text{g/mL}$. Pertanto, per tutti i successivi esperimenti sull'isoterma, il dosaggio della vinaccia è stato fissato a 1 mg/mL per AFB_1 e ZEA ed a 2 mg/mL per OTA e FB_1 [107].

Quantità massima teorica (Ads_{max}) di adsorbimento e concentrazione vinaccia per ottenere 50% di riduzione della concentrazione iniziale di micotossina (C_{50})				
Tossina	Ads_{max} (%)		C_{50} (mg/mL)	
	pH 3	pH 7	pH 3	pH 7
<i>AFB₁</i>	103,9	103,2	1,4	1,2
<i>ZEA</i>	101,9	100,7	2,5	2,5
<i>OTA</i>	100,3	100,2	2,5	4
<i>FB₁</i>	22,8	45,5	-	30

Tabella 12, Adsorbimento massimo (Ads_{max}) e concentrazione di vinaccia per ridurre del 50% la carica di micotossine (C_{50}) [108]

Effetto sull'adsorbimento della concentrazione di adsorbente

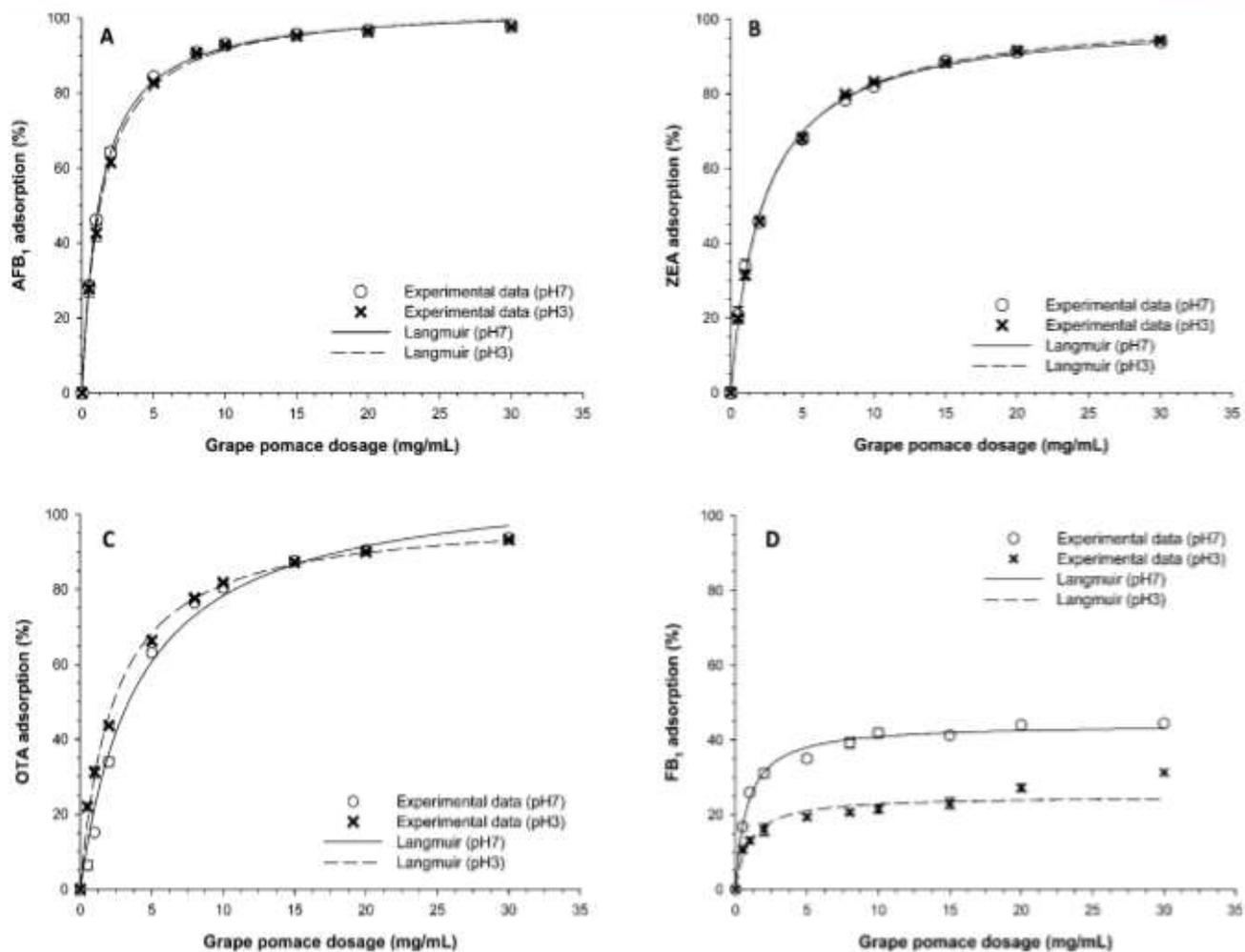


Figura 35, Effetto del dosaggio di adsorbente su AFB₁, ZEA, OTA e FB₁ da parte della vinaccia. Le isoterme di adsorbimento di equilibrio sono state ottenute a temperatura (37°C) e pH (3 e 7) costanti testando una quantità fissa di tossine (1 µg/mL) con dosaggi di adsorbente crescenti (0,05-3% w/v) [109]

5.3.5 Isoterme d'adsorbimento (micotossina singola)

L'isoterma di adsorbimento è una curva che descrive il fenomeno che regola la ritenzione (o il rilascio) o la mobilità di una sostanza dagli ambienti acquosi ad una fase solida a temperatura e pH costanti [110]. I suoi parametri fisico-chimici insieme alle ipotesi termodinamiche sottostanti forniscono informazioni dettagliate sul meccanismo di adsorbimento e le proprietà superficiali, nonché il grado di affinità degli adsorbenti [110].

Parametri dei modelli di <i>Langmuir</i> e <i>Freundlich</i>									
Modello	Parametro	<i>AFB₁</i>		<i>ZEA</i>		<i>OTA</i>		<i>FB₁</i>	
		pH 7	pH 3	pH 7	pH 3	pH 7	pH 3	pH 7	pH 3
Freundlich	K_f	0,65	0,66	0,42	0,43	0,18	0,43	0,16	0,06
	1/n	0,7	0,7	0,77	0,76	0,87	0,77	0,84	0,45
	R ²	0,9974	0,0971	0,9888	0,9973	0,9939	0,9963	0,991	0,9791
	SSres	0,024	0,023	0,051	0,01	0,003	0,013	0,003	0,0004
	S _{y x}	0,023	0,028	0,036	0,019	0,013	0,022	0,014	0,005
	PRESS	0,027	0,027	0,071	0,012	0,004	0,018	0,008	0,0006
Langmuir	Q_{max}	2,86	3,02	2,73	2,65	2,54	2,79	1,6	0,13
	K_L	0,31	0,29	0,19	0,2	0,08	0,19	0,11	0,99
	R ²	0,9976	0,9976	0,9916	0,9972	0,9935	0,9953	0,9941	0,9791
	SSres	0,022	0,018	0,038	0,01	0,003	0,017	0,002	0,0008
	S _{y x}	0,022	0,026	0,032	0,019	0,013	0,025	0,011	0,007
	PRESS	0,026	0,023	0,054	0,013	0,004	0,025	0,005	0,001

Tabella 12, Parametri dei vari modelli isothermici per l'adsorbimento delle micotossine da parte delle vinacce a diversi valori di pH [111]

Sono state pubblicate diverse equazioni per studiare l'adsorbimento isothermico di micotossine a materiali adsorbenti organici e inorganici [112]. In questo studio, quattro modelli di adsorbimento spesso riportati in letteratura sono stati utilizzati per fornire la migliore descrizione dell'adsorbimento di micotossine da parte della vinaccia (Tabella 9). Il metodo di analisi della regressione non lineare [110] invece della regressione lineare con variabili trasformate, è stato applicato per valutare la bontà dei "fitting" e per calcolare i parametri coinvolti nel meccanismo di adsorbimento (Tabella 12). Tutti i modelli di adsorbimento hanno fornito una buona linea di adattamento ai dati sperimentali di adsorbimento (Tabella 12). La quantità di micotossine adsorbite per unità di massa di vinaccia è aumentata gradualmente aumentando la concentrazione di micotossine nella soluzione; quindi, le isoterme hanno mostrato una relazione esponenziale e una tipica forma L-1 (*Langmuir*) (Figura 35). Ciò suggerisce che, nelle condizioni sperimentali di questo studio, il plateau non è stato raggiunto e dunque solo parte della capacità totale di adsorbimento di OTA è stata saturata.

5.3.6 Isotherme d'adsorbimento ocratossina A

A differenza degli adsorbimenti di AFB₁ e ZEA, l'adsorbimento dell'OTA era leggermente influenzato dal pH. I valori sperimentali per l'adsorbimento di OTA erano 54-33% a pH 3 e 33-26% a pH 7. I valori sperimentali correlati per la massima capacità di adsorbimento erano, rispettivamente, 0,82 ± 0,08 µg/mg (2,04 ± 0,20 mmol / kg) e 0,64 ± 0,09 µg/mg (1,58 ± 0,22 mmol / kg) (Figura 35). Ad entrambi i valori di pH testati nello studio, i modelli *Freundlich* e *Langmuir* hanno fornito una buona linea di adattamento ai dati sperimentali, mentre i modelli *Hill* e *Sips* non sono convergenti (Tabella 12). Questi ultimi modelli, superando il numero massimo di tentativi di adattamento ripetuti prima del fallimento (200 iterazioni), fornivano parametri imprecisi. Le capacità massime di adsorbimento sono state calcolate dal modello *Langmuir* e comparabili a pH 3 e 7, rispettivamente di 2,79 ± 0,21 µg/mg (6,91 ± 0,52 mmol / kg) e 2,54 ± 0,47 µg / mg (6,29 ± 1,16 mmol / kg). Tra i modelli biparametrici, il modello di *Freundlich* era superiore al modello di *Langmuir* per quanto riguarda i dati di adsorbimento. Ciò può essere spiegato dal processo di legame che si verifica in condizioni al di fuori delle ipotesi del modello di *Langmuir* e suggerisce un meccanismo di legame eterogeneo. L'isoterma di *Freundlich* è la prima relazione nota che descrive l'adsorbimento non ideale

e reversibile, non limitato alla formazione di mono-strato [113]. Questo modello empirico può essere applicato all'adsorbimento multistrato, con distribuzione non uniforme del calore di adsorbimento e entità sulla superficie eterogenea. Il modello di *Freundlich* non fornisce informazioni sulla capacità di adsorbimento del mono-strato, a differenza del modello di *Langmuir*. L'indice di eterogeneità nel modello di *Freundlich*, $1/n$, fornisce informazioni sulla popolazione dei siti di legame e sull'intensità di adsorbimento ed è associato alla efficacia del processo di legame. Un valore di $1/n = 1$ suggerisce che la popolazione dei siti di legame è omogenea, mentre un valore inferiore all'unità implica una efficacia dell'adsorbimento.

A pH acido e neutro, i valori calcolati per il parametro *Freundlich* $1/n$ erano rispettivamente $0,77 \pm 0,01$ e $0,87 \pm 0,02$. Questi valori erano <1 e indicano preferenza per il processo di adsorbimento OTA. Tuttavia, essendo il parametro $1/n$ stimato a pH 3 inferiore rispetto a pH 7, si può presumere che si possano trovare più siti di legame o un'intensità di adsorbimento più elevata a pH acido che a pH neutro. Di conseguenza, la costante K_f di *Freundlich*, che è attribuita all'affinità dell'adsorbente, era 2 volte più alta a pH 3 che a pH 7 (Tabella 12).

In conclusione, un aumento del pH medio da 3 a 7 riduce l'affidabilità dell'adsorbimento. La diminuzione dell'affinità di adsorbimento di OTA da parte della vinaccia a pH 7 può essere indotta dalla presenza di una forma anionica della tossina, che probabilmente porta alla repulsione tra le molecole di OTA e le cariche negative che si potrebbero trovare sulla superficie di adsorbimento. In accordo con questi risultati, l'adsorbimento di OTA da parte di superfici a carica negativa (come le zeoliti) è stato trovato significativamente più alto a pH 3 che a pH 7 e 9 [114]. L'esistenza di un adsorbimento eterogeneo nel caso dell'OTA suggerisce che possono verificarsi diversi tipi di interazione, come le forze idrofobiche e ioniche [115].

5.3.7 Isoterme d'adsorbimento (micotossine multiple)

In generale, le interazioni adsorbato-superficie complicano l'adsorbimento nei sistemi multicomponenti [116]. I sistemi multi-micotossine hanno ricevuto meno attenzione rispetto ai sistemi a singola micotossina e le isoterme di adsorbimento multi-micotossine non sono mai state descritte in letteratura. Pertanto, l'adsorbimento di AFB₁, ZEA, OTA e FB₁ da parte della vinaccia è stato studiato anche mediante isoterme di adsorbimento di equilibrio utilizzando un sistema a cinque componenti. Questo sistema conteneva contemporaneamente AFB₁, ZEA, OTA, FB₁ e DON in rapporti uguali. Naturalmente, questi rapporti non si riflettono nel mondo reale della contaminazione naturale in cui una aflatossina e una fumonisina si verificano a distanza di ordini di grandezza. Le isoterme di adsorbimento di multi-micotossine sono state ottenute come nel sistema di adsorbimento di singole micotossine, testando le tossine a pH 7 e 37 °C. I parametri di adsorbimento calcolati per ciascuna tossina in presenza (sistema a cinque micotossine) e assenza (sistema a micotossina singola) di altre micotossine sono presentati nella Tabella 13. I grafici dell'isoterma di adsorbimento AFB₁ sono stati adattati dai modelli *Sips/Hill*, perché hanno prodotto una migliore bontà di adattamento. Le isoterme di adsorbimento ZEA, OTA e FB₁ erano ben adattate dall'equazione di *Langmuir*.

Confronto parametri tra sistema singola e multi micotossina				
Micotossina	Parametro	Sistema singola micotossina	Sistema multi micotossina	Q^{mix}/Q^0
<i>AFB₁</i>	Q^{max}	4,69	4,71	0,99
	K_L	0,16	0,12	
<i>ZEA</i>	Q^{max}	2,73	2,72	1,00
	K_L	0,19	0,21	
<i>OTA</i>	Q^{max}	2,54	2,59	0,98
	K_L	0,08	0,14	
<i>FB₁</i>	Q^{max}	1,6	1,51	1,06
	K_L	0,11	0,12	

Tabella 13, Parametri calcolati per le isoterme di adsorbimento di micotossine ottenute da sistemi di adsorbimento a micotossine singole e multiple (37°C, pH 7) [117]

Per tutte le micotossine considerate nello studio, i valori sperimentali per l'adsorbimento di micotossine ottenuti nei sistemi di adsorbimento a singola e multi-micotossina erano comparabili. Allo stesso modo, i parametri di adsorbimento isothermico previsti, non sono cambiati (Tabella 13). L'effetto delle interazioni tra micotossine sull'adsorbimento può essere rappresentato dal rapporto tra la capacità di adsorbimento di una micotossina in presenza delle altre micotossine, Q_{mix} , e la capacità di adsorbimento per la stessa micotossina quando è presente da sola nella soluzione, Q_0 . Quando $(Q_{mix}/Q_0) > 1$, l'adsorbimento è promosso dalla presenza di altre micotossine; quando $(Q_{mix}/Q_0) = 1$, non c'è interazione netta; e quando $(Q_{mix}/Q_0) < 1$, l'adsorbimento è soppresso da altre micotossine. Come mostrato nella Tabella 13, i valori di Q_{mix}/Q_0 sono tutti quasi uguali a 1. Pertanto, si può supporre che l'adsorbimento di micotossine da parte della vinaccia non sia soppresso o potenziato dalla presenza di altre micotossine nelle condizioni sperimentali. In conclusione, questo studio dimostra che la vinaccia può adsorbire contemporaneamente *AFB₁*, *ZEA*, *OTA* e *FB₁* e che queste micotossine non competono per l'adsorbimento. La vinaccia mostra il potenziale per essere utilizzata come materiale adsorbente ad ampio spettro [117].

5.3.8 Effetto pH nel desorbimento

Il pH è un parametro importante che influenza l'interazione tra le molecole di micotossine e le vinacce. È stato eseguito uno studio di desorbimento per valutare se una variazione del pH può causare il rilascio delle tossine sequestrate. Le micotossine sono state prima adsorbite su sottoprodotti agricoli a pH 3, quindi il pellet contenente le micotossine adsorbite è stato prima lavato con un mezzo a pH 7 e poi con metanolo. Come mostrato nella Tabella 7, le vinacce e il guscio di mandorle hanno rilasciato meno del 21% di *AFB₁* e *ZEA* adsorbiti quando i valori di pH del terreno sono cambiati da 3 a 7. È interessante notare che il solvente organico (metanolo) ha estratto metà delle quantità adsorbite, suggerendo un forte legame di *AFB₁* e *ZEA* dai sottoprodotti agricoli selezionati. L'adsorbimento di *OTA* a pH 3 e il desorbimento di *OTA* a pH 7 erano inversamente correlati. I sottoprodotti più efficienti nell'adsorbire l'*OTA* (vinacce d'uva) sono stati i più efficienti nel trattenere le molecole adsorbite nonostante il cambiamento di pH. Tuttavia, il metanolo ha estratto una grande quantità della frazione adsorbita di *OTA*. *FB₁* è stato scarsamente adsorbito dai sottoprodotti agricoli selezionati (<15%) e quasi completamente desorbito a pH 7 [120].

	Adsorbimento pH 3 (%)	Desorbimento pH 7 (%)	Desorbimento con metanolo (%)
<i>AFB₁</i>			
Sangiovese V	92,3	5,2	51,4
Malvasia V	87,3	8,6	52,3
Guscio di mandorla	90,2	6,4	51,1
Carciofo	62,6	21,2	46,6
<i>ZEA</i>			
Sangiovese V	85,3	12	63,1
Malvasia V	84	12,7	62,3
Guscio di mandorla	84,3	11,2	59,9
Carciofo	88,8	7,4	32,4
<i>OTA</i>			
Sangiovese V	77,6	23,7	74,7
Malvasia V	65,6	52,7	75,2
Guscio di mandorla	39	87,8	-
Carciofo	11,7	90	-
<i>FB₁</i>			
Sangiovese V	14,8	55,2	58
Malvasia V	13,1	81	63
Guscio di mandorla	9,8	99,5	-
Carciofo	-	-	-
V = Vinaccia			

Tabella 14, Valori di adsorbimento e desorbimento ottenuti per sottoprodotti agricoli selezionati. I valori sono il risultato di esperimenti triplicati indipendenti [118]

In conclusione, questi risultati suggeriscono che i sottoprodotti agricoli selezionati hanno una buona efficacia nell'adsorbire AFB₁, ZEA e OTA a pH acido, e sono in grado di trattenere le tossine adsorbite quando il pH sale a valori neutri. In accordo con gli studi in vivo di *Gambacorta et al.* [119], questo lavoro mostra che le vinacce d'uva sono superiori ad altri sottoprodotti agricoli nell'agire come leganti multi-tossine.

In relazione all'uso di residui vegetali come bio-adsorbenti, è stato evidenziato che diversi parametri, come dimensione delle particelle, dosaggio adsorbente, componenti rimossi, concentrazione iniziale, tipo di agitazione, tempo di contatto, valore pH e composizione naturale dei residui, influenza la capacità di adsorbimento [120]. I bio-adsorbenti ideali dovrebbero essere ricchi di lignina e ricchi di fenoli. Il contenuto di grassi naturali può anche aumentare l'efficienza promuovendo la formazione di mono-strato [120].

Le vinacce d'uva sono composte da acqua, proteine, lipidi, carboidrati, vitamine, minerali e composti con importanti proprietà biologiche, come i composti fenolici (tannini, acidi fenolici, antociani e resveratrolo) [121]. La composizione chimica delle fibre d'uva varia a seconda della cultivar dell'uva, delle condizioni climatiche e di coltivazione e delle condizioni di lavorazione [122].

5.3.9 Aspetti termodinamici

Negli studi sull'adsorbimento, è necessario considerare sia i fattori di energia che di entropia per determinare quali processi si verificheranno spontaneamente [123]. La variazione di energia libera di *Gibbs*, ΔG° (kJ/mol), è il criterio fondamentale della spontaneità.

Le reazioni si verificano spontaneamente a una data temperatura se ΔG è una quantità negativa. I parametri termodinamici per l'adsorbimento di AFB₁, ZEA, OTA e FB₁ da parte della vinaccia sono stati calcolati a pH 7 ed a diverse temperature (5, 37, 50 e 70 °C).

Per tutte le tossine, i dati sperimentali di adsorbimento e le capacità di adsorbimento massime previste calcolate secondo i modelli isoteromici sono diminuiti con un aumento della temperatura, indicando un processo esotermico. Di conseguenza, i valori per la costante di equilibrio K_0 per la reazione di adsorbimento sono diminuiti all'aumentare della temperatura (Tabella 14). Ciò può essere dovuto ad una tendenza delle molecole di micotossine a fuoriuscire dalla fase solida con un aumento della temperatura della soluzione. Il K_0 è stato utilizzato per calcolare l'energia libera di adsorbimento standard di *Gibbs*, ΔG° [125]. I valori negativi di ΔG° nella tabella 14 sono indicativi di un processo di adsorbimento spontaneo con un'elevata affinità delle micotossine alla superficie della vinaccia. I parametri termodinamici (ΔH° e ΔS°) sono stati calcolati secondo l'equazione di *Van't Hoff* e sono stati determinati dalla pendenza e dall'intercetta dei grafici di $\ln K_0$ vs $1/T$ [123].

I valori di ΔH° e ΔS° sono presentati nella Tabella 14. I valori di ΔH° per l'adsorbimento delle micotossine sono negativi, confermando la natura esotermica del fenomeno. L'ampiezza del valore ΔH° fornisce un'indicazione del tipo di adsorbimento, che può essere fisico o chimico [124]. Quello di tipo fisico coinvolge associazioni deboli, che includono legami idrogeno, *van der Waals*, dipolo-dipolo e dipolo indotto.

Parametri termodinamici						
Micotossina	Temperatura (K)	K ⁰	ln K ⁰	ΔG^0 (kJ/mol)	ΔH^0 (kJ/mol)	ΔS^0 (kJ/mol)
<i>AFB₁</i>	278	1270	7,13	-17,3	-7,2	34
	310	1134	7,02			
	323	775	6,65			
	343	731	6,59			
<i>ZEA</i>	278	673	6,51	-15,5	-8,94	22,2
	310	482	6,18			
	323	412	6,02			
	343	319	5,77			
<i>OTA</i>	278	394	5,98	-13,9	-14,7	-2,7
	310	238	5,47			
	323	170	5,14			
	343	118	5,77			
<i>FB₁</i>	278	431	6,07	-13,9	-17,4	-11,6
	310	160	5,07			
	323	294	5,68			
	343	79	4,37			

Tabella 15, Parametri termodinamici per l'adsorbimento di AFB₁, ZEA, OTA e FB₁ [125]

L'adsorbimento chimico implica una reazione chimica o la condivisione di elettroni tra l'adsorbente e l'adsorbato, come i legami covalenti. L'adsorbimento fisico è descritto come avente un'entalpia minore di 20 kJ/mol, mentre quello chimico è generalmente maggiore di 20 kJ/mol [126]. Per tutte le micotossine il valore di entalpia era minore di 20 kJ/mol, indicando un fenomeno di adsorbimento fisico (Tabella 14).

L'adsorbimento fisico, richiede una piccola energia e consente di raggiungere rapidamente l'equilibrio e il processo di essere facilmente reversibile. È interessante notare che i valori di ΔS^0 erano positivi per gli adsorbimenti AFB₁ e ZEA, ma negativi per gli adsorbimenti OTA e FB₁ (Tabella 14). I valori negativi di ΔS^0 per l'adsorbimento di OTA e FB₁ possono essere intesi in termini di restrizione del movimento delle molecole sulla superficie (due dimensioni), rispetto alla soluzione in massa (tre dimensioni). Il legame di OTA e FB₁ sulla vinaccia è quindi guidato solo entalpicamente. Generalmente, questa situazione corrisponde a interazioni polari non covalenti (beneficio in entalpia associato a un costo in entropia), come interazioni elettrostatiche o legami idrogeno. Al valore di pH di questo studio ($7,0 \pm 0,5$), OTA e FB₁ sono in forma anionica; quindi, possono essere coinvolti in interazioni polari non covalenti. Al contrario, valori di ΔS^0 positivi per il processo di adsorbimento AFB₁ e ZEA riflettono un aumento della casualità all'interfaccia solido/liquido e suggeriscono un'interazione idrofobica tra l'adsorbente e l'adsorbato [127-129]. La variazione positiva dell'entropia può anche essere causata dalla diminuzione del numero di molecole d'acqua che circondano sia l'adsorbente che le molecole di adsorbato coinvolte nell'interazione idrofobica. Generalmente, le interazioni idrofobiche sono associate a un costo in entalpia.

In conclusione, i parametri termodinamici calcolati per l'adsorbimento delle micotossine sulla vinaccia forniscono informazioni sul tipo di interazione coinvolta nel processo di adsorbimento. A pH 7, le interazioni idrofobiche potrebbero essere associate con l'adsorbimento di AFB₁ e ZEA (valori ΔH^0 piccoli e ΔS^0 positivi). Le interazioni elettrostatiche potrebbero spiegare i valori ΔH^0 più alti e ΔS^0 negativi calcolati per l'adsorbimento di OTA e FB₁ [125].

6. L'uso delle vinacce come biomassa filtrante: Il “ripasso”

Considerando come secondo “case study” la tecnica del “ripasso” analizzata da M. Solfrizzo, G. Avanti, G. Panzarini e A. Visconti (“Removal of Ochratoxin A from Contaminated Red Wines by Repassage over Grape Pomaces”, *Institute of Science of Food Production (ISPA), National Research Council (CNR)*), si è mostrato che l'adsorbimento dell'ocratossina A da parte delle vinacce è un processo rapido, che raggiunge l'equilibrio in meno di 10 ore e non è influenzato dalle concentrazioni di tossine testate.

Il ripasso di vino da uve *Primitivo* additivate con 2-10 µg/kg di ocratossina A su vinacce ottenute dalle stesse uve ha portato alla rimozione di alte percentuali di ocratossina A in 24 ore. Risultati simili sono stati ottenuti con vini *Primitivo* o *Negroamaro* ripassati su vinacce di diversi vitigni tra cui uve bianche (*Malvasia, Greco di Tufo*) e uve rosse (*Sangiovese, Aglianico*). Le vinacce d'uva hanno mantenuto una buona efficacia nel rimuovere l'ocratossina A dopo essere state riutilizzate. A differenza di altri agenti chiarificanti enologici, l'uso di vinacce di uva per adsorbire l'ocratossina A da vini rossi dello stesso vitigno (*Primitivo*) non ha influenzato i parametri rilevanti di qualità del vino, inclusi l'intensità del colore e il contenuto fenolico benefico (trans-resveratrolo, quercetina, polifenoli totali). Questi parametri di qualità sono stati invece influenzati positivamente o negativamente quando i vini contaminati sono stati ripassati su vinacce di altri vitigni, l'effetto è direttamente correlato alle caratteristiche intrinseche della varietà delle vinacce [130].

6.1 Materiali e metodi

6.1.1 Evoluzione dell'OTA durante i processi di vinificazione e conservazione

L'idea di utilizzare il ripasso breve come tecnica di decontaminazione nasce dalla valutazione dei risultati ottenuti monitorando l'OTA durante i processi di vinificazione di uve rosse (*Primitivo* e *Negroamaro*) naturalmente contaminate da OTA. I risultati di questo studio, condotto sia in laboratorio che su scala industriale, hanno dimostrato che, durante la pigiatura e la macerazione, l'OTA presente nei grappoli contaminati si distribuisce tra le vinacce e il mosto, che a fine macerazione hanno concentrazioni omogenee di tossina che si accumula prevalentemente nelle vinacce. Mediamente il 95% dell'OTA presente nelle uve contaminate si distribuisce omogeneamente e rimane adesa alle vinacce (di cui il 98% nelle bucce e il 2% nei vinaccioli), l'1% si lega alle fecce, mentre il 4% resta all'interno del mosto/vino. Durante la pigiatura, la macerazione e la svinatura, il tempo necessario per raggiungere l'equilibrio tra la quantità di OTA presente nel mosto/vino e quella adesa alle vinacce sembra essere correlato ai livelli di contaminazione [131].

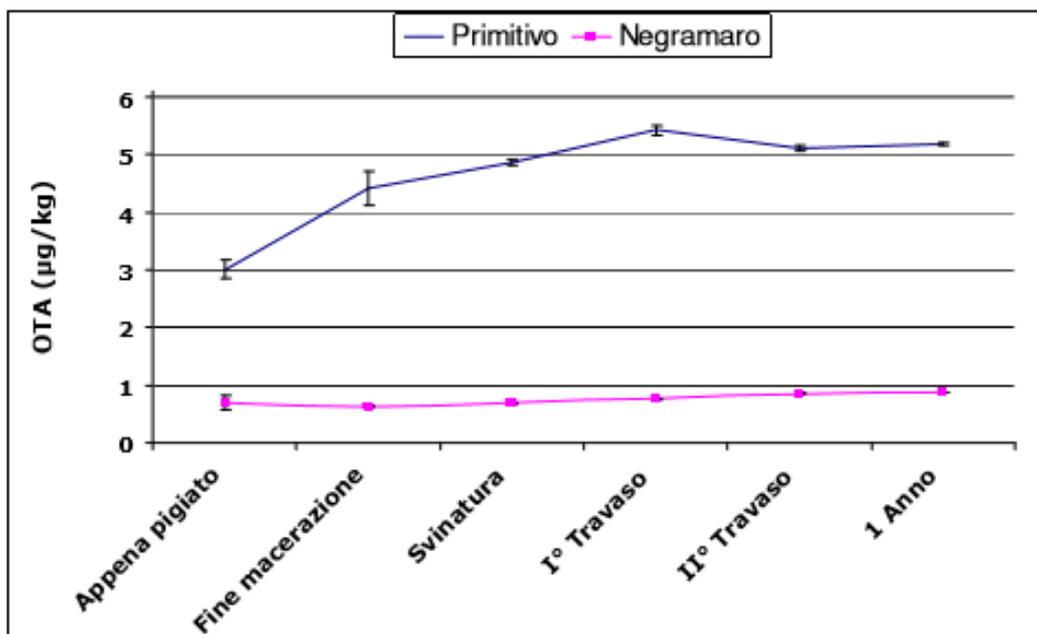


Figura 36, Evoluzione dell'OTA nei mosti/vini naturalmente contaminati di *Negroamaro* e *Primitivo* durante le fasi di vinificazione, travaso e conservazione [134]

In Figura 36 è riportata l'evoluzione dell'OTA durante la macerazione, dopo la svinatura, i travasi e a distanza di un anno. Come si può vedere in Figura 36 per il *Negroamaro*, che aveva livelli di OTA contenuti, l'equilibrio veniva raggiunto in tempi molto brevi, ovvero subito dopo la pigiatura.

Per il *Primitivo*, invece, che aveva livelli di OTA molto più elevati, erano necessari 6-7 giorni affinché la concentrazione di tossina si stabilizzasse nel mosto/vino. È stata inoltre osservata una buona correlazione tra le concentrazioni di OTA nel mosto e nelle vinacce come mostrato in Figura 37. Durante la pigiatura e la macerazione l'OTA si distribuisce omogeneamente oltre che nel mosto anche nelle vinacce come dimostrato dall'analisi di campioni prelevati in punti diversi della massa di vinacce proveniente dallo stesso vinificatore. Questo significa che per conoscere la concentrazione di OTA nelle vinacce è sufficiente analizzare un singolo campione per ogni vinificatore [131-132].

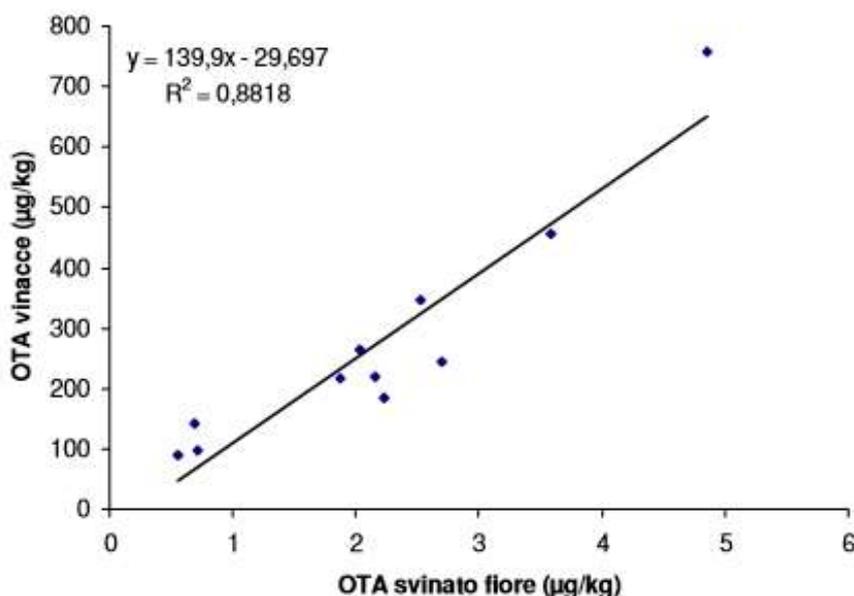


Figura 37, Correlazione tra le concentrazioni di OTA nel mosto (svinato fiore) e nelle corrispondenti vinacce di *Primitivo* o *Negroamaro* (annata 2005). I valori dell'OTA delle vinacce sono riferiti al peso secco [132]

Queste informazioni sono utili agli operatori del settore vitivinicolo per programmare gli interventi finalizzati alla riduzione dell'OTA nei mosti/vini contaminati. Per esempio analizzando lo svinato è possibile sia conoscere in anticipo la concentrazione di OTA che avrà il vino dopo i travasi che conoscere approssimativamente la concentrazione di tossina nelle vinacce [134].

6.1.2 Andamento nel tempo dell'adsorbimento dell'ocratossina A da parte di vinacce non contaminate

Le uve rosse della varietà *Cardinale* a maturazione precoce, raccolte ad *Adelfia* (Puglia, Italia), sono state utilizzate per valutare l'andamento nel tempo dell'adsorbimento dell'ocratossina A sulle vinacce. La selezione di questa varietà a maturazione precoce (fine luglio) ha consentito di pianificare entro la stessa stagione di raccolta le successive sperimentazioni di ripasso utilizzando varietà a maturazione tardiva (da metà a fine settembre) di uve rosse sensibili all'ocratossina A.

Otto porzioni di uva da 1,1 kg (1-8) sono state diraspate manualmente, pigiate e poste in piccole bacinelle di plastica. Quattro porzioni (5-8) sono state contaminate artificialmente con ocratossina A aggiungendo 10 mL di una miscela di mosto (preventivamente centrifugato) e soluzioni stock di ocratossina A (50:50, v/v) per ottenere 5, 10, 32, 70 µg/kg di ocratossina A. Ogni porzione è stata miscelata e lasciata a macerare/fermentare a temperatura ambiente (25-30 C) per 6 giorni. Dopo la fermentazione, aliquote di 5 mL di ciascun vino sono state sottoposte all'analisi per valutare le concentrazioni di ocratossina A nei campioni arricchiti (5-8) e confermare la sua assenza nei quattro campioni di controllo (1-4). Quindi ogni campione di uva pigiata è stato svinato e pressato per separare le vinacce dal vino. Le vinacce dei campioni 1-4 sono state utilizzate per decontaminare i vini derivati dai campioni 5-8, mentre i materiali rimanenti (vinacce dei campioni 5-8 e vini dei campioni 1-4) sono stati scartati. I vini contaminati ottenuti dai campioni 5-8, rispettivamente, sono stati aggiunti e lasciati a contatto per 28 ore mescolando tre volte ad intervalli regolari. Per gli esperimenti di ripasso descritti, la quantità di vinacce e vino sono quelle derivanti dalla lavorazione delle uve.

Per valutare l'andamento nel tempo dell'adsorbimento dell'ocratossina A da parte delle vinacce, aliquote (5 ml) di vino sono state raccolte dopo 2, 8, 21 e 28 ore. Per l'analisi, i campioni di vino sono stati centrifugati a 4000 rpm per 15 min, quindi sono stati analizzati 5 ml di supernatanti come descritto sopra. La riduzione dell'ocratossina A (%) ottenuta dal ripasso sulle vinacce è stata calcolata dalla differenza di concentrazione di ocratossina A nel vino prima e dopo il ripasso [135].

6.1.3 Ripasso su vinacce della stessa varietà di uva rossa

Gli esperimenti di ripasso con i vini e le vinacce della stessa varietà di vite sono stati compiuti in cantina con quattro lotti di circa 25 kg di uva *Primitivo* prodotta a *Manduria* (Puglia, Italia).

Le prove di vinificazione sono state condotte presso il *Consorzio Produttori Vini e Mosti* (*Manduria*, Italia) utilizzando la tecnologia attualmente utilizzata in quella cantina. In breve, le uve sono state diraspate e pigiate, integrate con di metabisolfito di potassio (0,1 g/kg di uva), 0,5 g/kg di

lievito secco commerciale *Saccharomyces cerevisiae* *Blastosil Gran Cru FR 95* e 0,3 g/kg di attivatore di fermentazione *Actibiol*.

La procedura di sperimentazione consiste in:

- Le miscele sono state poste in serbatoi di plastica da 50 L, lasciate macerare/fermentare per 5 giorni a temperatura ambiente (25-30 ° C) e poi svuotate per separare il vino dalle vinacce;
- Le vinacce dei lotti 1-3 sono state pesate e collocate in vasche di plastica mentre quelle del lotto 4 sono state scartate;
- I vini dei quattro lotti sono stati pesati (20 kg circa ciascuno) e contaminati artificialmente con ocratossina al fine di ottenere una concentrazione finale pari a 2, 5, 10 e 5 µg/kg per poi essere miscelati per un'ora;
- Successivamente il vino dei lotti 1-3 è stato aggiunto alle relative vinacce in serbatoi di plastica da 50L, lasciato a temperatura ambiente per 24 ore in cui è stato mescolato ogni 8 ore per consentire l'adsorbimento dell'ocratossina A;
- Dopo 24 ore, i serbatoi vengono svuotati, e ogni campione di vino e di vinaccia pressata viene pesato.
- Campioni di vino e campioni di vinacce, per l'analisi dell'ocratossina A, sono stati prelevati prima e dopo l'aggiunzione di OTA e dopo il ripasso sulle vinacce;
- Prima e dopo il ripasso sono stati prelevati campioni di vino per l'analisi dei parametri di qualità.

Per valutare, inoltre, la capacità delle stesse vinacce di decontaminare più lotti di vino contaminato, un'aliquota (corrispondente ad un terzo) di vinacce raccolte dal lotto 2 dopo il primo ripasso è stata posta in una tanica di plastica da 15 L e trattata tre volte consecutivamente (24 ore come sopra descritto) con aliquote (corrispondenti ad un terzo) di vino contaminato del lotto 4 (addizionato dunque con 5 µg/kg di ocratossina A). Dopo ogni periodo di ripasso i vini sono stati raccolti e sottoposti ad analisi dell'ocratossina A per calcolare la relativa riduzione percentuale di ocratossina A [135].

6.1.4 Ripasso su vinacce in scala industriale

La procedura di decontaminazione proposta è stata anche testata su scala industriale (figura 38) eseguendo la macerazione/fermentazione del pigiato in serbatoi cilindrici verticali da 50 tonnellate.



Figura 38, Serbatoi generici utilizzati in cantina [135]

Due delle cinque vasche disponibili presso il *Consorzio Produttori Vini e Mosti (Manduria, Italia)* sono state selezionate per l'analisi di ocratossina A nel vino. Poiché il vino di tutti i serbatoi era contaminato da ocratossina A, per l'esperimento sono stati selezionati i serbatoi con concentrazioni di ocratossina A maggiore ($1,44 \pm 0,04 \mu\text{g}/\text{kg}$) e inferiore ($0,83 \pm 0,05 \mu\text{g}/\text{kg}$). In particolare, il vino con concentrazioni inferiori di ocratossina A è stato drenato e le vinacce gocciolanti lasciate nel serbatoio. Successivamente il vino con concentrazione di OTA maggiore è stato drenato e pompato nel serbatoio con le vinacce gocciolanti.

Il vino circolava nella vasca per 24 ore ripassando (tramite rimontaggio) il vino sulle vinacce (pompando vino dal fondo alla parte superiore della vasca per tre volte). Dopo 24 ore, aliquote di vino sono state campionate e analizzate per l'ocratossina A [135].

6.1.5 Ripasso su vinacce provenienti da varietà di uve diverse

Questo esperimento è stato eseguito per confermare la capacità di adsorbimento di diverse vinacce e valutare il cambiamento dei parametri di qualità quando vinacce di diverse varietà vengono utilizzate per decontaminare i vini *Primitivo* e *Negroamaro*.

Il vino *Primitivo* (80 kg) è stato preparato come descritto sopra, mentre 80 kg di vino *Negroamaro* è stato fornito dalla cantina *Cantele* (*Guagnano*, Puglia, Italia).

I vini *Primitivo* e *Negroamaro* sono stati addizionati con 400 µg di ocratossina A e ben miscelati per 1 ora. Vinacce pulite (senza ocratossina A) di due vitigni a bacca rossa (*Sangiovese* e *Aglianico*- figure 39-40) e due vitigni a bacca bianca (*Malvasia* e *Greco di Tufo* figure 41-42) sono stati ottenuti come sopra descritto con la differenza che, per le uve bianche, la pigiatura è stata eseguita subito dopo la diraspatura e la pressatura. Per ogni vitigno sono stati utilizzati 50-60 kg di uva, prodotta a *Conversano* (*Puglia*, Italia). Quattro aliquote (15kg cad.) di vini *Primitivo* e *Negroamaro* contaminati sono state decontaminate su vinacce ottenute da *Sangiovese*, *Aglianico*, *Malvasia* e *Greco di Tufo*, seguendo il procedimento sopra descritto (stesso rapporto vino/vinacce, 24 ore contatto, mescolando tre volte ad intervalli regolari). Le analisi dell'ocratossina A sono state eseguite su campioni di vino e su campioni di vinacce prelevati prima e dopo il ripasso.

Analisi sui parametri di qualità del vino sono stati compiuti prima e dopo il ripasso [135].



Figura 39, Grappolo di *Sangiovese* [134]



Figura 40, Grappolo di *Aglianico* [134]



Figura 41, Grappolo di *Malvasia* [134]



Figura 42, Grappolo di *Greco di Tufo* [134]

6.2 Risultati e discussione

6.2.1 Andamento nel tempo dell'adsorbimento dell'ocratossina A da parte di vinacce non contaminate

I risultati degli esperimenti di ripasso per indagare il decorso temporale dell'adsorbimento di ocratossina A dal vino alle vinacce sono riportati nella figura 43.

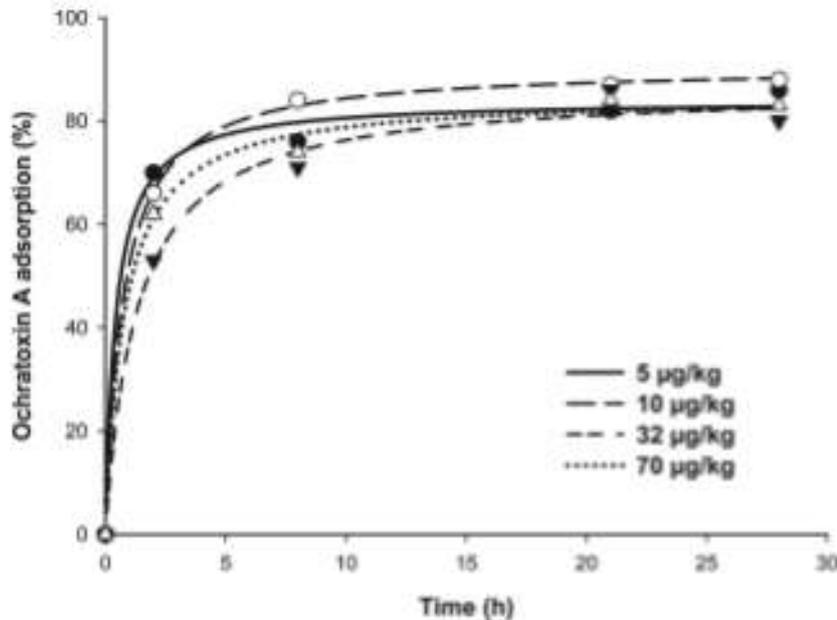


Figura 43, Adsorbimento (%) su varie concentrazioni di OTA in funzione del tempo (ore) [135]

L'adsorbimento da parte delle vinacce ha raggiunto l'equilibrio (cioè una distribuzione costante del contenuto di ocratossina A tra vino e vinacce) in meno di 10 ore e non è stato influenzato dalla concentrazione di micotossine nel vino. Una leggera differenza nella percentuale di adsorbimento, a seconda della concentrazione iniziale di micotossine, è stata osservata solo all'inizio delle prove, dopo 2 ore di contatto tra le vinacce e il vino, quando l'adsorbimento relativo delle micotossine (compreso tra il 53% e il 70%) nei vini contenenti livelli inferiori era superiore a quello nei vini con alti livelli di micotossine. Dopo 24 ore, è stato registrato un adsorbimento di ocratossina A superiore all'80% per tutti le concentrazioni testate (compresi tra 5 e 70 µg/kg). Un tempo di contatto di 24 ore è stato quindi utilizzato per successivi esperimenti di adsorbimento/ripasso.

Il rapporto naturale tra vinacce e vino di pigiato è stato mantenuto anche per gli altri esperimenti di decontaminazione qui descritti [135].

6.2.2 Ripasso su vinacce della stessa varietà di uva rossa

Per questi esperimenti, l'ocratossina A è stata aggiunta ai campioni di vino dopo aver separato il vino dalle vinacce (travasato). Risultati ottenuti con campioni di vino *Primitivo* addizionati con tre diversi livelli di ocratossina A sono mostrati nella Figura 44.

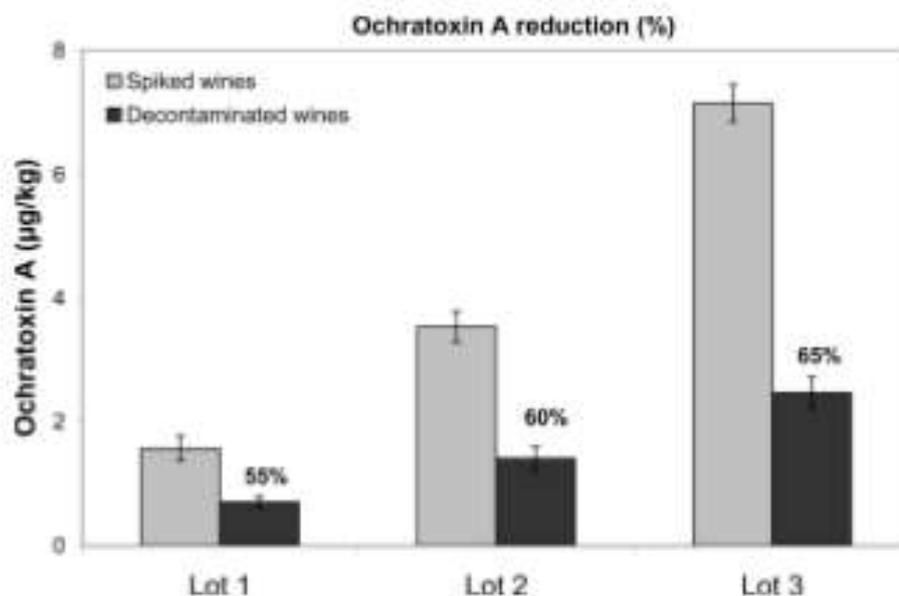


Figura 44, Rimozione di OTA da campioni di vino Primitivo (18,9 kg) addizionati a diversi livelli di ocratossina A (2, 5, 10 µg/kg nei lotti 1, 2 e 3, rispettivamente) dopo 24 ore di ripasso su vinacce (3,2 kg) di uve *Primitivo* [135]

Dopo 24 ore di contatto con le vinacce, il contenuto di ocratossina nei vini è diminuito del 55-65% rispetto ai livelli misurati nei campioni arricchiti. Una riduzione di ocratossina, dovuta al ripasso sulle vinacce, è stata calcolata confrontando le concentrazioni nel vino misurate prima e dopo il ripasso.

Il vino, appena travasato, contiene biomassa sospesa che può adsorbire parte della tossina addizionata riducendo il valore effettivo di arricchimento. La concentrazione effettiva di ocratossina A nei vini contaminati artificialmente è stata valutata mediante analisi HPLC; tale analisi è stata utilizzata inoltre per calcolare l'effettiva rimozione della tossina ottenuta mediante ripasso sulle vinacce. Poiché per gli esperimenti di decontaminazione descritti in questo capitolo sono stati utilizzati campioni di vino (con livelli di OTA molto bassi) contenenti biomassa sospesa, la quantità di ocratossina A adsorbita dalla biomassa non è stata attribuita al ripasso su vinacce pulite (Figure 44 e 45) [135].

I risultati del bilancio di massa dell'ocratossina A per questo esperimento (Tabella 16) mostrano che le quantità di ocratossina A rimosse dal vino sono state recuperate quasi completamente nelle vinacce esauste, che contenevano l'83-100% di ocratossina A presente nel vino prima del ripasso.

Parametri	Lotto 1	Lotto 2	Lotto 3
Concentrazione OTA addizionata al vino ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	2	5	10
OTA addiziona al vino (μg) ^a	39,5	95,5	190,5
Concentrazione endogena OTA nelle vinacce ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	4,1	4,3	4,4
OTA endogena nelle vinacce (μg)	2,9	2,6	3,5
Peso del vino dopo il ripasso (kg)	18,7	19,1	18,1
Concentrazione OTA nel vino dopo il ripasso ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0,7	1,4	2,5
OTA nel vino dopo il ripasso (μg) A	13,1	26,9	44,6
Peso secco delle vinacce dopo il ripasso (kg)	0,7	0,6	0,8
Concentrazione OTA delle vinacce a secco, dopo il ripasso ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	42	90,3	158,7
OTA nelle vinacce a secco dopo il ripasso (μg) B	29,4	54,2	127
OTA totale (μg) (A+B)	42,5	81,1	171,6
OTA recuperata rispetto alla quantità iniziale (%)	100	83	88

^a la quantità endogena di OTA presente nel vino ($1,5 \mu\text{g}$ per ogni lotto di vino da $18,9 \text{ kg}$) è inclusa nel valore

Tabella 16, Bilancio di massa dell'Ocratossina A durante il ripasso del vino *Primitivo* su vinacce di *Primitivo* [135]

In particolare, nelle vinacce esauste analizzate dopo ripasso di vino arricchito a $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ è stato riscontrato un livello di ocratossina A di $158 \mu\text{g}/\text{kg}$ rispetto ai $4,4 \mu\text{g}/\text{kg}$ endogeni di ocratossina A.

Sebbene i grappoli utilizzati in questo esperimento siano stati selezionati manualmente per evitare l'uso di grappoli contaminati, sono stati riscontrati bassi livelli di ocratossina A nel vino *Primitivo* ($0,08 \mu\text{g}/\text{kg}$) e nelle vinacce ($4,4 \mu\text{g}/\text{kg}$).

Ciò non sorprende perché a volte i grappoli senza sintomi visibili possono contenere ocratossina A [136]. Il contenuto di ocratossina A endogena del vino e delle vinacce è stato considerato per il calcolo del bilancio di massa.

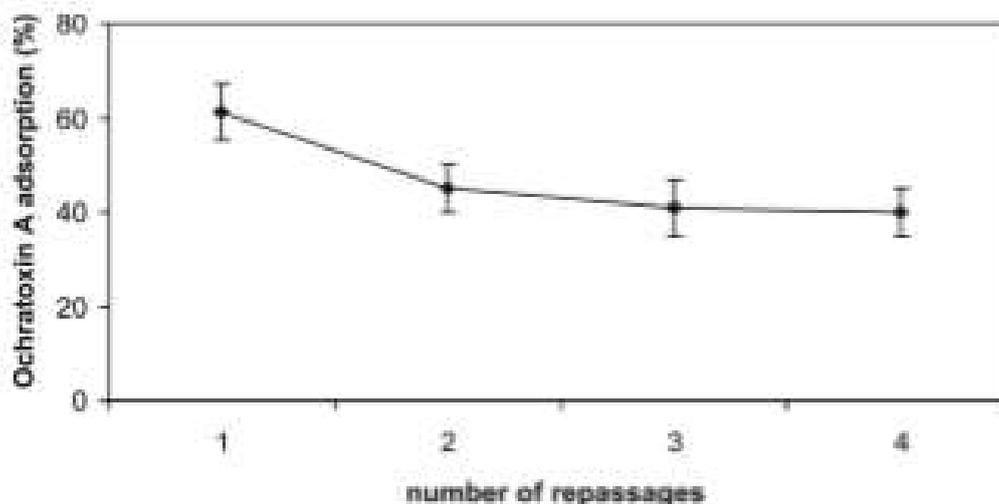


Figura 46, Rimozione ocratossina da quattro aliquote di vino Primitivo addizionate con 5 ug/kg di OTA dopo 4 ripassi [135]

I risultati, mostrati nella figura 46, dimostrano che le vinacce possono essere riutilizzate per rimuovere una quantità significativa di ocratossina A da quattro aliquote di vino addizionate a 5 µg/kg di ocratossina A e ripassate consecutivamente sulle stesse vinacce. In particolare, la riduzione dell'ocratossina A varia dal 61% (1° ripasso) al 40% (4° ripasso) [135].

6.2.3 Ripasso su scala industriale

L'efficacia del ripasso nell'eliminazione dell'ocratossina A dal vino è stata dimostrata anche a livello industriale utilizzando vinacce di uve meno contaminate in serbatoi da 50 ton. Il ripasso di vino contenente 1,44 µg/kg di ocratossina A per 24 ore su vinacce gocciolanti derivate da vino contenente 0,83 µg/kg di ocratossina A ha portato ad una diminuzione del 40% della concentrazione di tossina, cioè da $1,44 \pm 0,04$ µg / kg a $0,87 \pm 0,03$ µg /kg.

I risultati dimostrano che il ripasso fornisce una buona decontaminazione anche quando applicato a vino naturalmente contaminato. Inoltre, questi risultati dimostrano che le vinacce di vini contenenti meno di 1 µg/kg di OTA possono essere utilizzate per ridurre significativamente i livelli di tossicità nei vini contenenti più di 1 µg/kg OTA [135].

6.2.4 Ripasso su vinacce provenienti da varietà di uve diverse

I risultati sull'efficacia del ripasso per rimuovere l'ocratossina A dal vino utilizzando vinacce di diverse varietà sono mostrati in Figura 45. Sono state testate le vinacce non contaminate di *Sangiovese* e *Aglianico* (uva rossa) o *Greco di Tufo* e *Malvasia* (uva bianca) su vini *Primitivo* e *Negroamaro* contaminati artificialmente.

Le vinacce ottenute da uno qualsiasi dei vitigni testati hanno ridotto significativamente i livelli di ocratossina A sia nei vini *Primitivo* che *Negroamaro* rispetto ai controlli.

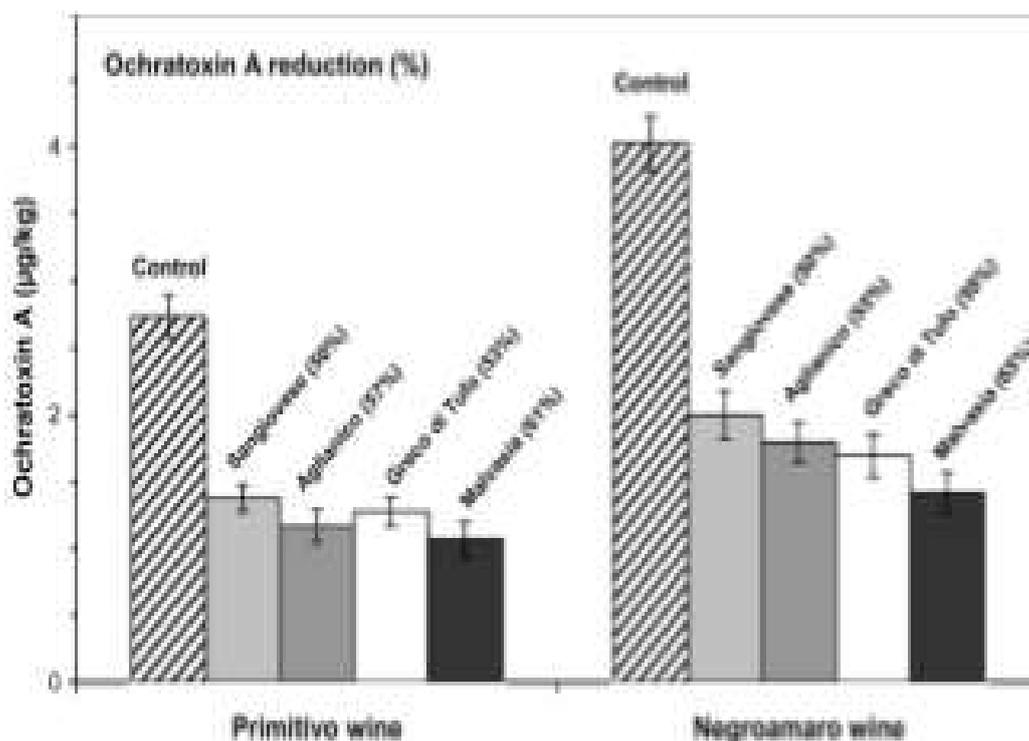


Figura 45, Eliminazione dell'OTA nei vini *Primitivo* e *Negroamaro* addizionati con 5 µg/kg di ocratossina tramite ripasso di vinacce non contaminate di *Sangiovese*, *Aglianico*, *Greco di Tufo* e *Malvasia*; vinacce e vino sono state a contatto per 24 ore [135]

Nessuna differenza significativa nell'adsorbimento di ocratossina è stata riscontrata tra le vinacce di uve rosse e bianche. Il contenuto di ocratossina A è diminuito dal 50% al 61% nei vini *Primitivo* e dal 50% al 65% nei vini *Negroamaro*, risultando leggermente più efficaci le vinacce di *Malvasia* (Figura 45).

Come per l'esperimento precedente, il bilancio di massa dell'ocratossina A prima e dopo questi esperimenti di ripasso ha confermato che la quantità di ocratossina A rimossa dai vini *Primitivo* o *Negroamaro* è stata trovata nei campioni di vinacce esauste. Sebbene ai vini *Primitivo* e *Negroamaro* siano state addizionate le stesse quantità di ocratossina A (5 µg/kg), le concentrazioni misurate prima del ripasso sulle vinacce erano diverse. Questa differenza non è sorprendente e può essere spiegata dal fatto che il vino *Primitivo* era particolarmente ricco di biomassa sospesa poiché era stato appena travasato (vino separato dalle vinacce), mentre il vino *Negroamaro* era quasi privo di biomassa sospesa poiché era stato travasato e successivamente sifonato⁴.

Come riportato sopra, la biomassa sospesa può adsorbire parte dell'ocratossina A addizionata, il che spiega la minore concentrazione di tossina misurata nel vino *Primitivo* rispetto al vino *Negroamaro*. Anche per questi esperimenti la quantità di tossina adsorbita dalla biomassa prima del ripasso non era considerato per il calcolo della rimozione delle tossine ottenuta con il ripasso su vinacce incontaminate (vedi figura 45) [137].

4- sifonare il vino dai sedimenti.

6.2.5 Effetto ripasso sui parametri di qualità del vino

I parametri di base che descrivono la qualità del vino sono stati misurati prima e dopo ogni esperimento per valutare l'effetto del ripasso sulle vinacce. In questo studio sono stati considerati anche polifenoli totali, resveratrolo e quercetina considerata la loro presenza rilevante nei vini rossi e le loro proprietà benefiche per la salute [137].

I dati analitici relativi al vino *Primitivo* prima e dopo il ripasso sulle vinacce di *Primitivo* sono riportati nella Tabella 17.

Parametri della qualità del vino	Prima del ripasso	Dopo 24 ore di ripasso
Trans-resveratrolo ($\mu\text{g/L}$)	64	62
Quercetina ($\mu\text{g/L}$)	354	429
Polifenoli totali (mg/L)	1225	1243
Contenuto alcolico (g/100 mL)	11,48	11,43
Acidità volatile (g/L)	0,24	0,28
Intensità di colore (420 nm – 520 nm)	5,7	5,7
Tonalità (420 nm-520 nm)	0,68	0,68
I valori raffigurati sono la media di triplici esperimenti		

Tabella 17, Parametri di qualità del vino *Primitivo* prima e dopo ripasso su vinacce di *Primitivo* [137]

L'analisi statistica dei risultati mostra che il ripasso non ha influenzato negativamente nessuno dei parametri di qualità testati, mentre un aumento significativo della quercetina è stato osservato nel vino con conseguente miglioramento della qualità.

I parametri qualitativi delle vinacce *Primitivo* e *Negroamaro* prima e dopo il ripasso sulle vinacce di *Sangiovese*, *Aglianico*, *Malvasia* e *Greco di Tufo* sono riportati in Tabella 18.

Parametri della qualità del vino	Prima del ripasso	Dopo il ripasso su vinacce			
		<i>Sangiovese</i>	<i>Aglianico</i>	<i>Malvasia</i>	<i>Greco di Tufo</i>
Vino Primitivo					
Trans-resveratrolo ($\mu\text{g/L}$)	540	450	320	650	1050
Quercetina ($\mu\text{g/L}$)	1450	2910	1630	7090	6760
Polifenoli totali (mg/L)	516	590	639	467	570
Contenuto alcolico (g/100 mL)	10,23	10,33	10	9,78	10,17
Acidità volatile (g/L)	0,2	0,15	0,15	0,13	0,12
Intensità di colore (420 nm – 520 nm)	4	5,9	5,4	3,2	3,2

Vino Negroamaro					
Trans-resveratrolo (µg/L)	930	640	580	480	810
Quercetina (µg/L)	8420	4780	4210	7240	10450
Polifenoli totali (mg/L)	1522	1585	1167	1265	1208
Contenuto alcolico (g/100 mL)	14,23	14,02	13,71	11,62	11,9
Acidità volatile (g/L)	0,18	0,18	0,18	0,18	0,21
Intensità di colore (420 nm – 520 nm)	12,1	13,6	11,5	8,3	9,6
I valori raffigurati sono la media di triplici esperimenti					

Tabella 18, Parametri di qualità dei vini *Primitivo* e *Negroamaro* prima e dopo ripasso (24 ore) su vinacce incontaminate di *Sangiovese*, *Aglianico* (uve a bacca rossa), *Malvasia* e *Greco di Tufo* (uve a bacca bianche) [137]

Come mostrato anche nella Tabella 18, il ripasso ha influenzato in modo significativo la maggior parte dei parametri di qualità del vino dei vini trattati. Per il vino *Primitivo*, sono stati osservati effetti positivi e negativi rispettivamente per il 63% e il 29% dei casi, mentre per *Negroamaro* gli effetti osservati sono stati negativi nella maggior parte dei casi. Da questi dati si può concludere che, per la decontaminazione del vino *Negroamaro*, è da preferire l'utilizzo di vinacce di questa varietà, mentre per il vino *Primitivo* si può considerare l'utilizzo di vinacce provenienti da vitigni diversi tenendo conto che alcuni parametri di qualità possono essere influenzati [137].

Il ripasso del *Primitivo* su vinacce dello stesso vitigno non causava alcuna variazione statisticamente significativa su 4 dei 5 parametri analizzati che rimanevano invariati, mentre un effetto benefico si otteneva per la quercetina che aumentava significativamente nel vino ripassato.

Il ripasso di *Primitivo* su vinacce di *Aglianico* o *Sangiovese* produceva una esaltazione dei parametri qualitativi. Si osservava infatti un incremento significativo dell'intensità di colore, dei polifenoli totali e della quercetina e una leggera diminuzione del resveratrolo. Il ripasso su queste vinacce produceva effetti benefici anche sui valori di acidità volatile che diminuivano. In Figura 47 sono riportate le variazioni percentuali dei parametri qualitativi dopo ripasso del *Primitivo* su vinacce di *Aglianico* o *Sangiovese* [138].

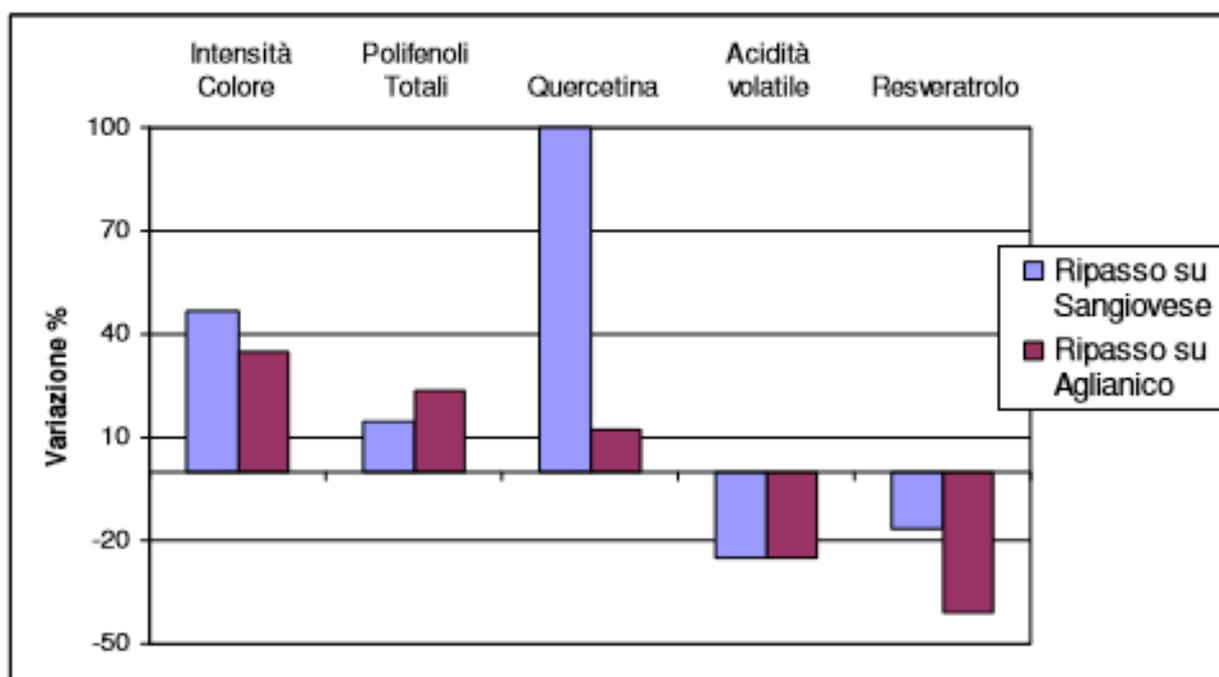


Figura 47, Variazioni percentuali dei parametri qualitativi di *Primitivo* ripassato su vinacce di *Sangiovese* o *Aglianico* [138]

Il ripasso del *Primitivo* su vinacce bianche (*Malvasia bianca* o *Greco di Tufo*) produceva un aumento sostanziale di resveratrolo e quercetina, diminuzione dell'acidità volatile, mentre i polifenoli totali aumentavano con il ripasso su *Greco di Tufo* e diminuivano leggermente con ripasso su *Malvasia bianca*. Com'era logico aspettarsi, il ripasso sulle vinacce bianche causava un sensibile decremento dell'intensità del colore.

Il ripasso del *Negroamaro*, sulle quattro vinacce testate in questo studio, complessivamente produceva un generale decremento di quasi tutti i parametri qualitativi con l'eccezione dell'acidità volatile, invariata, e della quercetina che aumentava con il ripasso sulle vinacce di *Greco di Tufo*. Questi risultati non sono sorprendenti, in quanto è noto che il *Negroamaro* è tra i vitigni più ricchi di polifenoli, resveratrolo, quercetina e antociani per cui è difficile aumentare ulteriormente questi parametri. Se il vino *Negroamaro* è ricco di sostanze nobili, lo sono anche le vinacce che possono quindi essere utilizzate con successo per rimuovere l'OTA dai mosti/vini contaminati e contemporaneamente esaltarne le caratteristiche qualitative [138].

I risultati dimostrano che l'ocratossina A può essere efficacemente rimossa dal vino contaminato mediante ripasso del vino su vinacce incontaminate ottenute dallo stesso vitigno o da diversi vitigni. Il ripasso del vino su vinacce della stessa varietà non ha influenzato i parametri di qualità del vino trattato. Le vinacce ottenute da vitigni diversi dal vino da decontaminare possono essere utilizzate anche tenendo presente che le loro caratteristiche intrinseche possono modificare (positivamente o negativamente) i parametri qualitativi del vino trattato.

Il processo può essere facilmente eseguito su scala industriale tramite rimontaggio del vino sulle vinacce utilizzando attrezzature già disponibili nelle cantine e può essere applicato sia ai mosti che ai vini. D'altra parte, il ripasso su scala industriale è comunemente utilizzato per la produzione di alcuni vini italiani di alta qualità come il *Valpolicella*. La tecnica del "ripasso" dunque consiste nell'aggiungere le bucce di uve secche appena pigiate (es. *Amarone*) a vini normali (es. *Valpolicella*)

e lasciarle rifermentare per 15-20 giorni per conferire ulteriore ricchezza e profondità. Al giorno d'oggi, ci sono più di 60 vini italiani “ripasso” sul mercato, che sono stati fatti da un certo numero di produttori, spesso utilizzando le proprie varianti di questo metodo di base [139]

Nelle zone ad alto rischio e in determinate stagioni, può non essere facile trovare sanse pulite da utilizzare per la decontaminazione, è noto tuttavia che in diverse aree geografiche il rischio di ocratossina A è basso e le vinacce ivi prodotte potrebbero essere efficacemente utilizzate ai fini della decontaminazione. Questo significa che il mosto/vino contaminato prodotto in regioni ad alto rischio (generalmente associato a climi caldi e umidi e colture a maturazione precoce) possono essere decontaminati in cantine situate in regioni con maggiore disponibilità di vinacce con contaminazione da ocratossina A nulla o scarsa. Un'altra possibilità come rimedio ad una vendemmia negativa, cioè con forte contaminazione da ocratossina A, potrebbe essere la conservazione di lotti di vino contaminati da ocratossina A fino a quando non saranno disponibili annate con vinacce pulite dello stesso vitigno. A questo proposito, va sottolineato il vantaggio aggiuntivo della procedura proposta che consente di consumare le vinacce di uva per la ricostituzione di più campioni di mosto/vino contaminati provenienti da luoghi o annate diverse [139].

7. Modellazione biofiltro

Al fine di creare delle condizioni più favorevoli ed aumentare l'efficienza di adsorbimento di ocratossina A del vino da parte delle vinacce, si è sviluppato un modello completamente automatizzato, un "filtro" (figure 48-62) con caratteristiche tali da poter ridurre i tempi di contatto tra vinacce e vino ed allo stesso tempo avere un contatto omogeneo. A differenza del ripasso dove si ha un contatto vino-vinacce parziale, con questo biofiltro tutto il vino sarà a contatto con le vinacce. Il ripasso effettuato su scala industriale consiste nel "rimontaggio" del vino; in tale processo si ha una certa difficoltà ad operare un adeguato adsorbimento della micotossina presente nel vino a causa dell'elevato spessore del cappello di vinacce, infatti, in questo caso, si creano dei canali preferenziali che fanno passare il liquido irrorato sopra il cappello sempre dagli stessi percorsi, sfruttando solo parzialmente l'intera quantità di vinaccia presente.

Per il dimensionamento di tale filtro si è preso in considerazione l'esigenza (ipotetica) di decontaminare un silos contenente 40 tonnellate di vino contaminato da ocratossina A in 4 cicli (trattando dunque 10 tonnellate per ogni ciclo) della durata di circa 15 ore ciascuno (anziché 24 ore come nel ripasso). È stata ipotizzata una durata del processo pari a 15 ore, in quanto, come si vede nella figura 43, il processo di adsorbimento raggiunge l'equilibrio in meno di 10 ore, dunque operando in scala industriale, in condizioni teoricamente favorevoli per la rimozione di OTA, si è ipotizzato un margine di circa 5 ore per poter sfruttare l'intera capacità di adsorbimento della vinaccia ed arrivare ad equilibrio. A tale fine, ottimizzando i costi d'investimento per il processo di adsorbimento, si è optato per un serbatoio della capacità complessiva di 15 m³ ed un rapporto in peso vinacce-vino uguale a quello utilizzato nello studio del ripasso [139], nonché la quantità presente nel mosto naturalmente (in media le vinacce occupano il 10-20% in peso del mosto totale e dunque si è utilizzato un rapporto pari 0,175).

Tale modello non deriva da analisi empiriche fatte su un modello pilota in scala di laboratorio, dunque per i vari calcoli sono state utilizzate informazioni provenienti da studi sull'adsorbimento della vinaccia così come descritto nei capitoli 5 e 6. In quest'ultimo, in particolare, è stato approfondito il discorso sull'adsorbimento tramite ripasso sulla stessa vinaccia e sono state utilizzate le stesse percentuali di adsorbimento per ogni ciclo (61%, 45%, 42%, 40%) in modo tale da giungere poi a considerazioni con dati certi in cui, ipotizzando tale modello, si ha un margine di miglioramento dell'adsorbimento (da verificare con prove sperimentali successivamente) fino ad una rimozione dell'80% (percentuale derivante da analisi in scala di laboratorio dopo 28 ore di contatto tra vino e vinacce miscelate solamente ogni 9 ore).

7.1 Panoramica generale del biofiltro

7.1.1 Rappresentazione 3D

Al fine di rappresentare a 360° il modello in questione, si è utilizzato il programma "Tinkercad" con cui si è progettato il biofiltro:

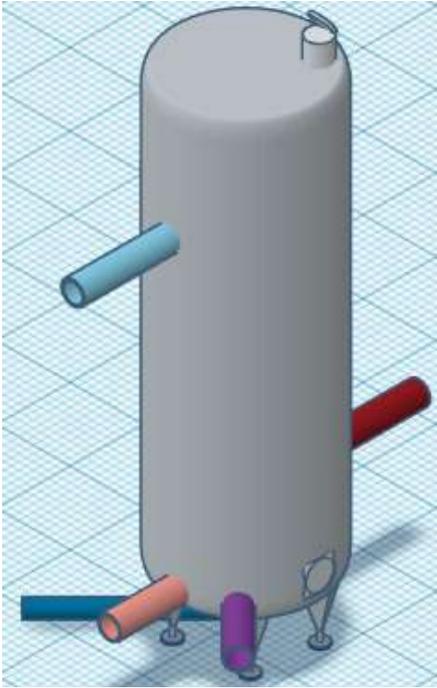


Figura 48, Biofiltro vista angolare (destra-posteriore)

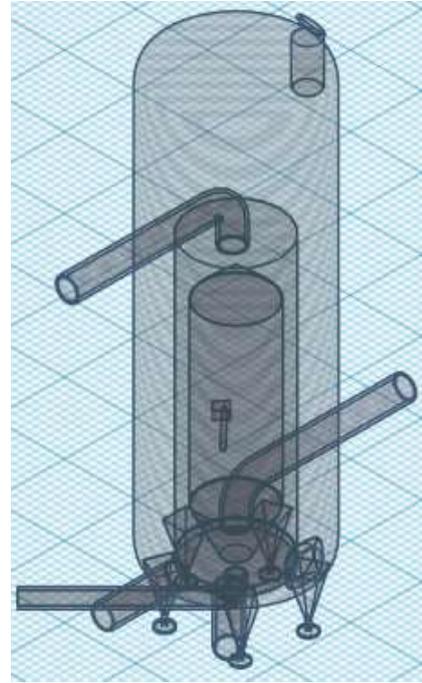


Figura 49, Biofiltro vista angolare (destra-posteriore) in sezione

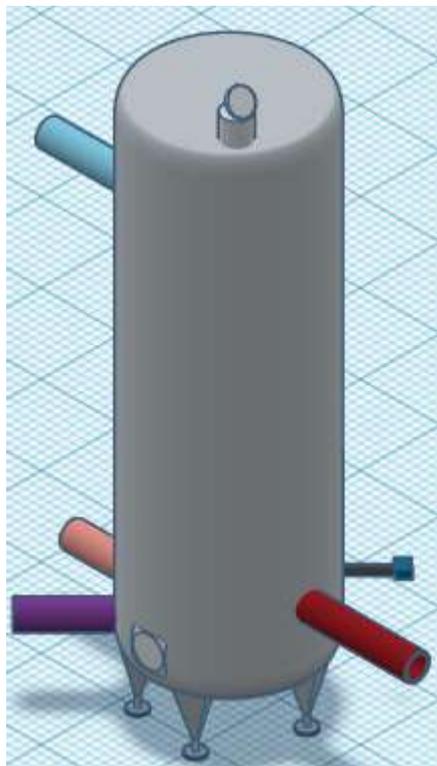


Figura 50, Biofiltro vista angolare (sinistra-posteriore)

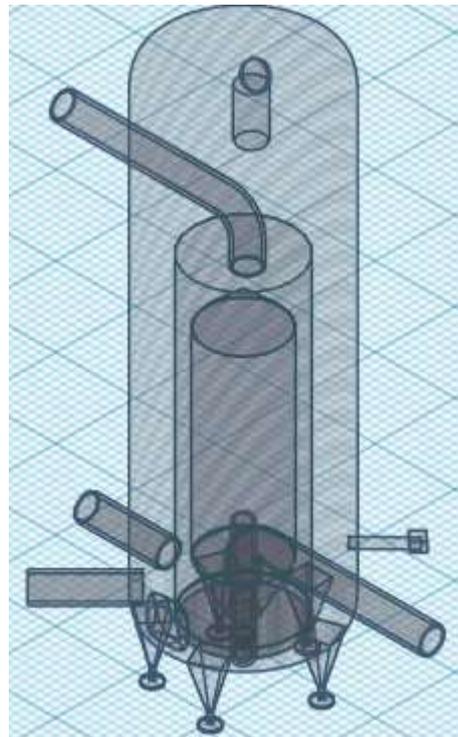


Figura 51, Biofiltro vista angolare (sinistra-posteriore) in sezione

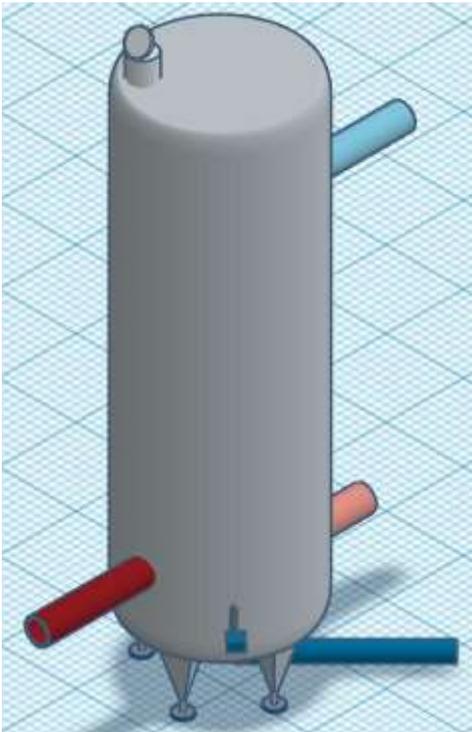


Figura 52, Biofiltro vista angolare (sinistra-frontale)

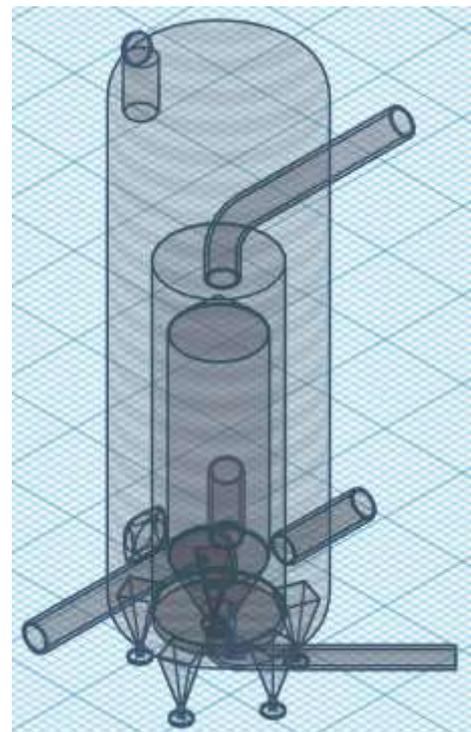


Figura 53, Biofiltro vista angolare (sinistra-frontale)

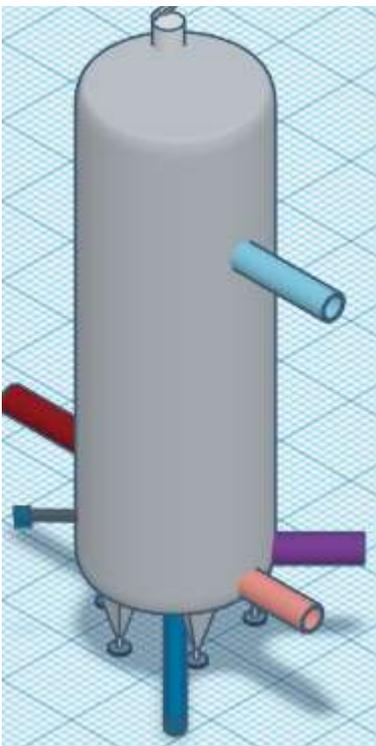


Figura 54, Biofiltro vista angolare (destra-frontale)

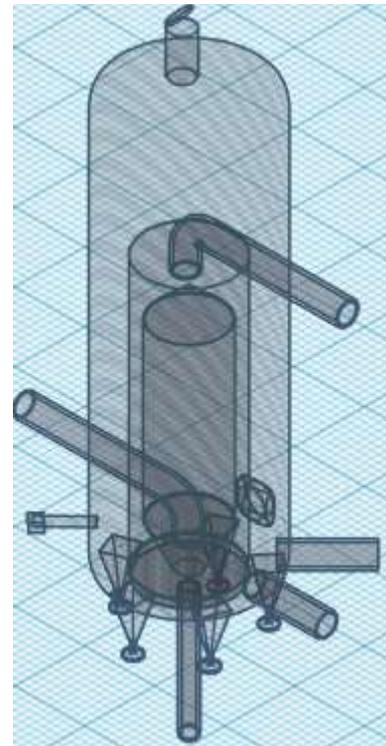


Figura 55, Biofiltro vista angolare (destra-frontale) in sezione

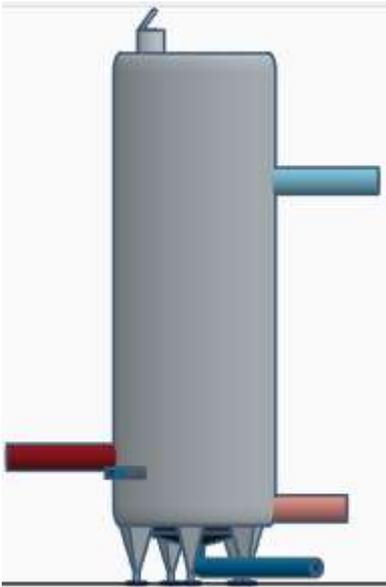


Figura 56, Biofiltro vista frontale

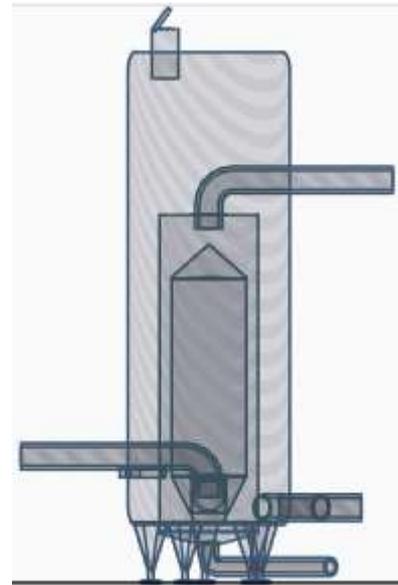


Figura 57, Biofiltro vista frontale in sezione

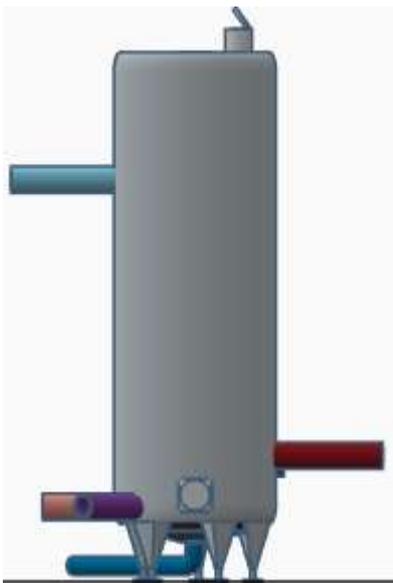


Figura 57, Biofiltro vista posteriore

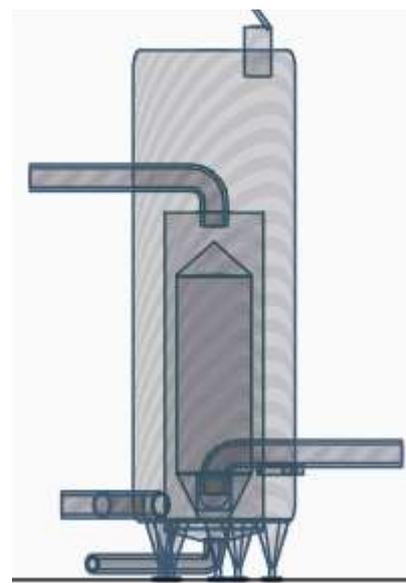


Figura 58, Biofiltro vista posteriore in sezione

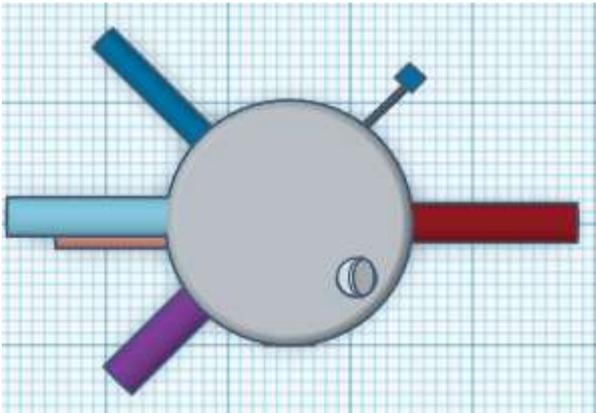


Figura 59, Biofiltro vista dall'alto

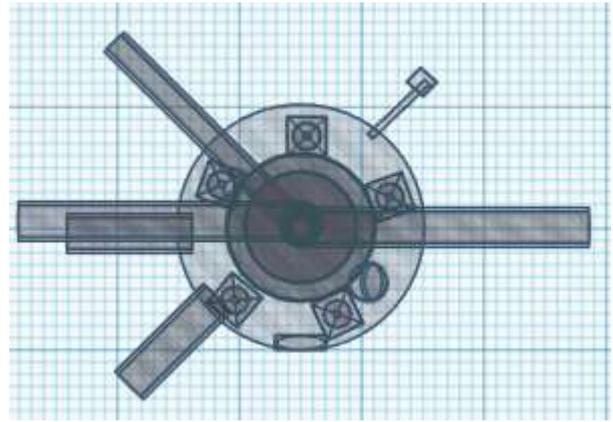


Figura 60, Biofiltro vista dall'alto in sezione

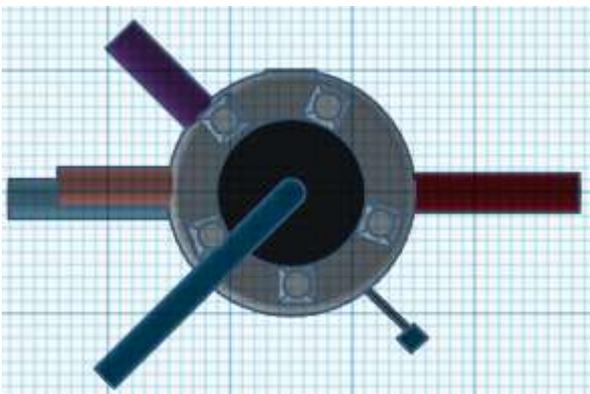


Figura 61, Biofiltro vista dal basso

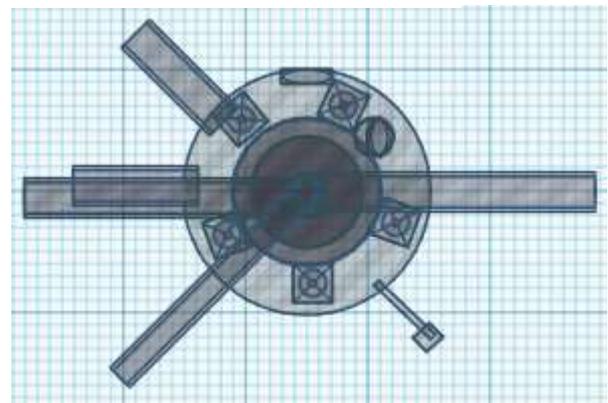


Figura 62, Biofiltro vista dal basso in sezione

7.1.2 Principio di funzionamento

Il biofiltro consiste in un serbatoio di capacità pari a 15 m³ con al suo interno una "camicia" costituita da una rete in acciaio inox a maglie strette.

La vinaccia viene pompata tramite una tubazione (tubazione celeste) in questa camicia e con l'ausilio di una struttura conica con punta smussata (per non creare sforzi di taglio nella vinaccia che raggiunge la punta del cono) viene distribuita uniformemente lungo tutta la corona circolare facendo in modo che la quantità pompata di vinaccia si sviluppi in altezza per l'intero volume occupato dal vino, aumentando così la superficie di contatto tra liquido e solido. La vinaccia è stata dunque introdotta all'interno della camicia piuttosto che lasciata libera in sospensione per ottenere un diretto contatto con una quantità maggiore di vino rispetto a quello ottenuto dal ripasso.

Per incrementare ulteriormente il fenomeno di adsorbimento si è ipotizzato l'uso di un agitatore laterale (generalmente utilizzato nelle cantine durante il processo di vinificazione).

L'agitatore inserito crea una certa turbolenza nel liquido, in questo modo viene coinvolto nel processo di adsorbimento l'intero volume del vino, inoltre, questo evita che ci siano sforzi di taglio direttamente sulla vinaccia che potrebbero causare il rilascio di sostanze pericolose per le qualità organolettiche del vino, rilasciando ad esempio aromi erbacei.

Il vino contaminato viene pompato (tubazione rossa) direttamente nella parte cava all'interno della camicia per avere una prima azione di contatto vinaccia-vino e creare una certa forza spingente per poter attraversare la camicia ed avere una distribuzione ottimale del liquido.

7.1.3 Fasi del processo

Le fasi del processo variano a seconda della concentrazione dell'OTA in quanto potrebbe essere necessario per concentrazioni elevate dover utilizzare 2 cicli invece che uno solo per decontaminare 10 m³:

- Per concentrazioni fino 3,3 µg/L:

- 1) Pompaggio vinacce (prive di OTA) dall'alto (tubazione celeste) riempiendo la camicia;
- 2) Pompaggio vino contaminato (tubazione rossa);
- 3) Attivazione agitatore laterale (elemento con asse nero e motore blu)
- 4) Scarico vino decontaminato (tubazione rosa);

Dopo quattro cicli si procede con le fasi 5, 6 e 7:

- 5) Apertura valvola a diaframma con apertura a iride;
- 6) Scarico vinacce (tubazione blu);
- 7) Processo di pulizia CIP;

- Per concentrazioni pari a 3,4 µg/L le ultime tre fasi vengono eseguite dopo 3 cicli;
- Per concentrazioni da 3,5 a 3,6 µg/L le ultime tre fasi vengono eseguite dopo 2 cicli;
- Per concentrazioni da 3,7 a 5,1 µg/L le ultime tre fasi vengono eseguite dopo 1 ciclo;
- Per concentrazioni da 5,1 a 10 µg/L il processo di decontaminazione per 10 m³ di vino prevede l'utilizzo di 3500kg di vinacce invece che di 1750kg, in quanto dopo un solo ciclo di 15 ore si è ancora al di sopra del limite di legge (2 µg/L):

- 1) Pompaggio vinacce (prive di OTA) dall'alto (tubazione celeste) riempiendo la camicia;
- 2) Pompaggio vino contaminato (tubazione rossa);
- 3) Attivazione agitatore laterale;
- 4) Scarico vino con concentrazione ancora al di sopra di 2 µg/L (tubazione viola), in un serbatoio polmone della stessa capacità del serbatoio di filtraggio;
- 5) Processo di pulizia CIP;
- 6) Pompaggio nuove vinacce (tubazione blu);
- 7) Pompaggio vino da serbatoio polmone (tubazione viola);
- 8) Scarico vino decontaminato (tubazione rosa);
- 9) Apertura valvola a diaframma con apertura a iride;
- 10) Scarico vinacce (tubazione blu);
- 11) Processo di pulizia CIP.

7.2 Dimensionamento biofiltro ed elementi ausiliari

7.2.1 Dimensioni biofiltro in 2D (figure 63-65)

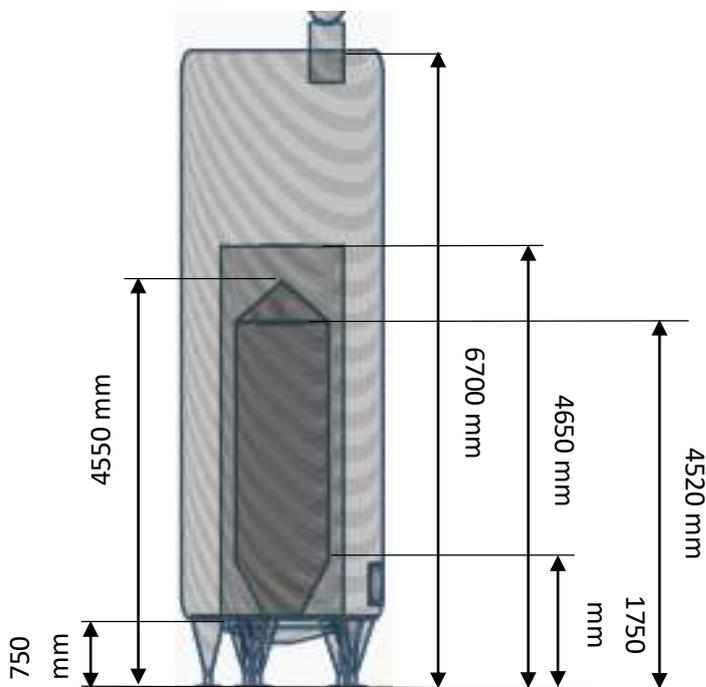


Figura 63, Dimensioni biofiltro (vista laterale)

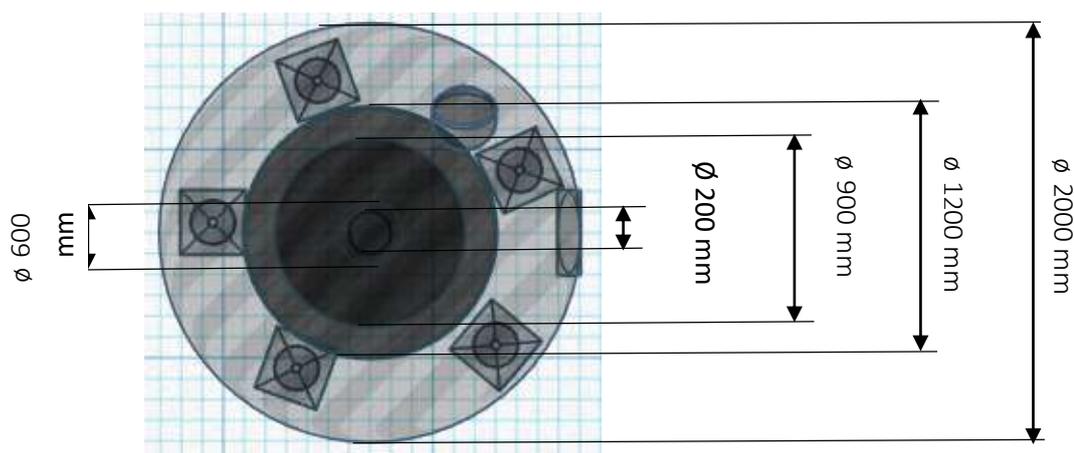


Figura 64, Dimensioni biofiltro (vista dall'alto)



Figura 65, Dimensioni vasca di scarico per le vinacce (vista laterale)

7.2.2 Dimensionamento biofiltro

Per il dimensionamento di questo sistema di filtraggio dell'ocratossina A si è considerato di trattare 10 m^3 di vino (circa 10 tonnellate) ad ogni ciclo con 1750kg di vinacce impaccate in una camicia alta complessivamente (dal fondo del serbatoio) 3900 mm. Le dimensioni del serbatoio di filtraggio ipotizzate sono state adattate a quelli in commercio con le caratteristiche più simili a tale serbatoio, scegliendone uno con un volume totale di 15 m^3 .

I volumi in gioco sono rispettivamente per il vino e per le vinacce pari a $10,1 \text{ m}^3$ (considerando una densità pari a 990 kg/m^3) e $1,67 \text{ m}^3$ (considerando una densità della vinaccia pari a 1050 kg/m^3) [140].

La cavità dove viene inserita la vinaccia è compresa tra il cilindro "2" (figura 66) esterno di diametro 1200 mm ed una struttura interna "3+4+5" (figura 66) costituita, partendo dall'alto, da un cono, un cilindro e un tronco cono; il cono superiore ha il compito di spargere in maniera uniforme all'interno della camicia la vinaccia proveniente dalla tubazione superiore mentre il tronco cono inferiore ha lo scopo di agevolare la caduta per gravità della vinaccia contenuta nella cavità, all'interno della vasca di scarico al di sotto del serbatoio (figura 65) da cui poi avverrà lo scarico tramite pompa (tubazione celeste) una volta terminato il ciclo di lavoro della vinaccia, rendendo così il processo automatizzato anche per la rimozione delle vinacce.

Confrontando da cataloghi, si è visto come l'altezza media dei supporti per serbatoi delle dimensioni in gioco sono di 750 mm con un numero di piedi pari a 5.

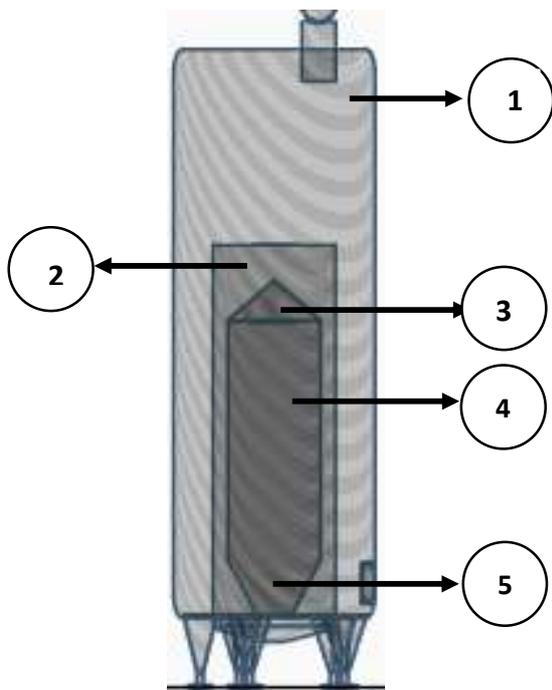


Figura 66, Assegnazione numerica ai vari elementi del biofiltro



Figura 67, Assegnazione numerica vasca di scarico

	1	2	3	4	5	6	7
h_{cilindro} (m)	-	3,9	-	2,5	-	0,1	-
R_{cilindro} (m)	-	0,6	-	0,45	-	0,6	-
h_{cono} (m)	-	-	0,3	-	-	-	-
R_{cono} (m)	-	-	0,45	-	-	-	-
R_{b-s} (m)	-	-	-	-	0,45	-	0,6
R_{b-i} (m)	-	-	-	-	0,3	-	0,2
h_{tr-c} (m)					1	-	0,2
V (m³)	15	4,41	0,067	1,59	0,45	0,11	0,11
V_C (m³)	2,31						
V_T - V_c (m³)	12,69						
h_V (m)	3,75						
h_B (m)	3						

Tabella 19, Dimensionamento dei volumi e delle altezze in gioco nel processo (figura 66-67)

I termini utilizzati sono i seguenti:

- V_V = Volume del vino da trattare (m³);
- V_B = Volume delle vinacce utilizzate (m³);
- m_V = massa del vino da trattare (kg);
- m_B = massa delle vinacce utilizzate (kg);
- Z = altezza serbatoio del sistema di filtraggio (m);
- T = diametro serbatoio del sistema di filtraggio (m);
- $V_{cilindro}$ = Volume cilindro (m³);
- $R_{cilindro}$ = Raggio cilindro (m);
- $h_{cilindro}$ = Altezza cilindro (m);
- V_{cono} = Volume cono (m³);
- R_{cono} = Raggio cono (m);
- h_{cono} = Altezza cono (m);
- $V_{tronco-cono}$ = Volume tronco di cono (m³);
- R_{b-s} = Raggio base superiore tronco di cono (m);

- R_{b-i} = Raggio base inferiore tronco di cono (m);
- h_{tr-c} = Altezza tronco di cono (m);
- V_c = Volume camicia per le vinacce (m³);
- h_v = Altezza raggiunta dal vino nel serbatoio (trascurando la porosità nella camicia di vinacce) (m);
- h_B = Altezza vinacce nella camicia (m).

Le equazioni utilizzate sono le seguenti:

$$V_V = m_V / \rho_V \quad (9)$$

$$V_B = m_B / \rho_B \quad (10)$$

$$V_T = \sqrt{\pi \cdot Z \cdot T^2 / 4} \quad (11)$$

$$V_{cilindro} = \pi \cdot R_{cilindro}^2 \cdot h_{cilindro} \quad (12)$$

$$V_{cono} = 1,0472 \cdot R_{cono}^2 \cdot h_{cono} \quad (13)$$

$$V_{tronco-cono} = 1,0472 \cdot h_{tr-c} \cdot (R_{b-s}^2 + R_{b-s} \cdot r_{b-i} + r_{b-i}^2) \quad (14)$$

$$V_C = V_2 - (V_3 + V_4 + V_5) \quad (15)$$

7.2.3 Dimensionamento pompe e tubazioni

Per le varie operazioni di alimentazione e scarico di vino e vinacce si è deciso di optare per delle pompe volumetriche a lobi rotativi *Vogelsang* (figura 68) (generalmente utilizzate in cantina), in quanto a differenza delle pompe centrifughe, per poter determinare una grande energia cinetica, non c'è bisogno di lavorare ad alte velocità di rotazione dei rotori (1500-3000 giri/min), comportando dunque un'azione molto energica sul fluido. Le macchine volumetriche possono lavorare a velocità più basse (100 giri/min) e quindi trasferire il prodotto in modo più delicato e meno impattante.

La pompa in questione si basa su una camera di pompaggio all'interno della quale si trovano due lobi controrotanti. Il loro movimento sincronizzato, assieme alla tenuta contro le pareti della pompa, crea il vuoto all'interno della camera, determinando il trasferimento del fluido dal lato di mandata a quello di pompaggio. Per le sue caratteristiche, la pompa a lobi rotativi non presenta pulsazioni, è insensibile al passaggio di corpi estranei (punti metallici, pietre e simili) anche di notevoli dimensioni, è autoadescante, ha portata regolabile e può girare a vuoto senza danni, inoltre, viene utilizzata per ogni tipo di operazione in cantina come trasferimento dei mosti, rimontaggio, rimozione delle fecce e così via, quindi è adatta per fluidi molto viscosi e per il trasporto di solidi come appunto le vinacce.

Per le tubazioni si è scelto il diametro (considerando anche la portata ipotizzata per le operazioni) opportuno per avere velocità del vino al loro interno di circa 0,2 m/s, in quanto generalmente le

velocità consigliate per avere le sollecitazioni più basse sono tra 0,1-0,3 m/s, mentre per le vinacce si è ipotizzate una velocità di scorrimento di 0,1 m/s, in quanto trattandosi di solidi si è ipotizzato di sollecitarli al minimo per garantire il trasporto all'interno della camicia in condizioni ottimali.



Figura 68, Pompa serie VX-136 Vogelsang

Forma costruttiva	Marathon	Volume corsa	Portata max.*		Pressione max.			Velocità max.	Flessione max. albero	
			l/g	m ³ /h	l/min	Q bar	QD bar		Marathon bar	min ⁻¹
Serie VX100										
45		0,29	17	290	10			1000	0,01	
64		0,42	25	420	9			1000	0,02	
90		0,59	35	590	7			1000	0,04	
128		0,84	50	840	4			1000	0,08	
Serie VX136										
70	140 [70/70]	1,27	61	1.016	10		16	800	0,01	0,002
105	210 [105/105]	1,90	91	1.520	10	12	16	800	0,03	0,004
140	280 [140/140]	2,53	121	2.024	8	12	14	800	0,05	0,007
210	420 [210/210]	3,80	182	3.040	5	10	12	800	0,16	0,016
280		5,06	243	4.048		8		800		0,031
420		7,59	364	6.072		6		800		0,090

Tabella 20, Dati tecnici pompe Vogelsang

Al fine di ottimizzare i tempi per le operazioni di carico e scarico con i volumi in gioco, si è deciso di optare per la pompa VX-100-70 che garantisce una portata massima di 61 m³/h con una pressione massima di 10 bar.

Per verificarne l'effettiva correttezza di tale scelta si è deciso in prima approssimazione di adattarla ad una ipotetica situazione reale in cui sono presenti serbatoi di stoccaggio del vino da

decontaminare, serbatoi di filtraggio, serbatoio polmone, serbatoio di stoccaggio vinacce prive di OTA e infine serbatoio di stoccaggio del vino decontaminato dopo l'operazione di filtraggio.

Il serbatoio di filtraggio ed il serbatoio polmone (15 m³ entrambi) hanno le seguenti caratteristiche (figura 69-tabella 21):



Figura 69, Automatic Pomace Removal Tank – *Prettech Machinery & Technology*

Capacity	Diameter	Shell Height	Total Height
HL	mm	mm	mm
100	1900	3600	4650
150	2000	4880	5950
200	2300	4880	6100
250	2600	4880	6200
300	2600	5500	6550
400	2900	6100	7400
500	3200	6100	7600
600	3300	7000	7830
800	3800	7320	8300

Tabella 21, Automatic Pomace Removal Tank dimensioni – *Prettech Machinery & Technology*

Il serbatoio di stoccaggio (figura 70-tabella 21) del vino e delle vinacce (50 m³ entrambi) hanno le seguenti caratteristiche:



Figura 70, Pump Over Fermentation Tank – *Prettech Machinery & Technology*

Capacity	Diameter	Shell Height	Total Height
HL	mm	mm	mm
10	920	1500	2180
20	1270	1610	2600
30	1500	1830	3000
50	1600	2440	3650
80	1820	3050	4150
100	1900	3600	4650
150	2000	4880	5950
200	2300	4880	6100
250	2600	4880	6200
300	2600	5500	6550
400	2900	6100	7400
500	3200	6100	7600
600	3300	7000	7830
800	3800	7320	8300

Tabella 22, Pump Over Fermentation Tank dimensioni – *Prettech Machinery & Technology*

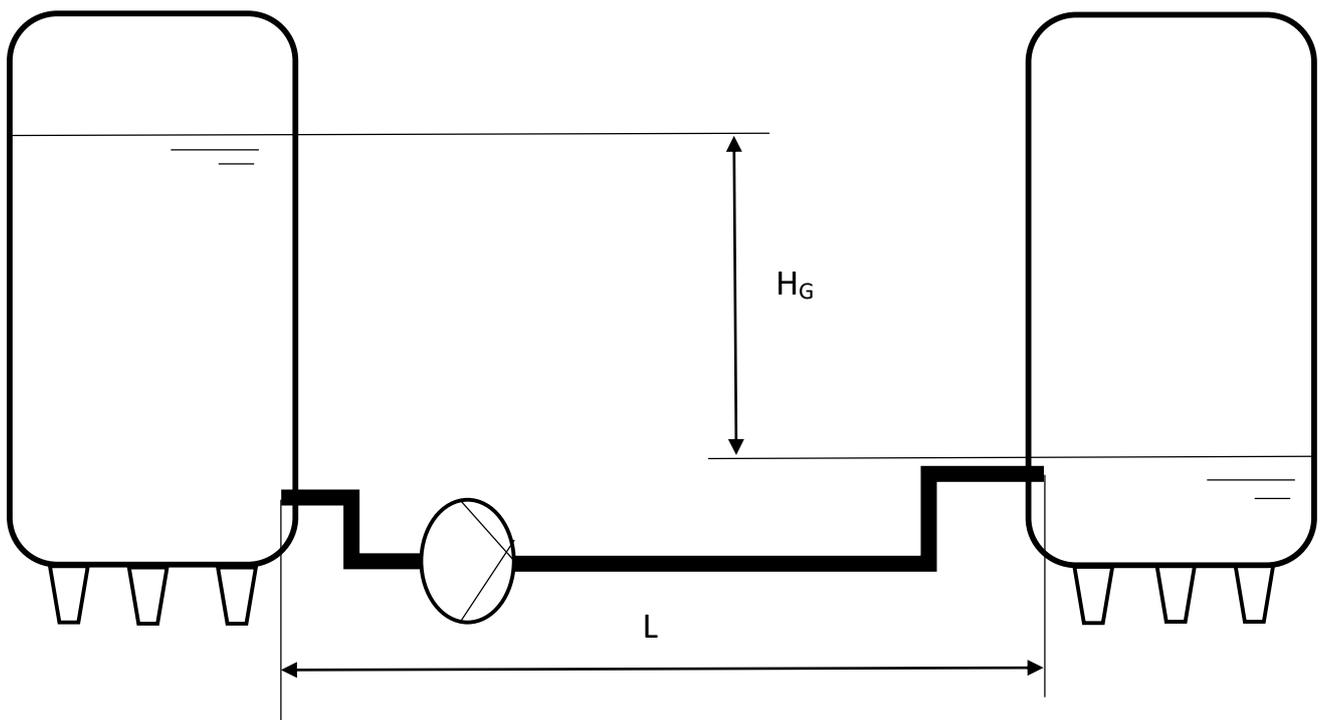


Figura 71, Schematizzazione generale delle operazioni di alimentazione e scarico in cui il serbatoio "I" a sinistra scarica tramite la pompa (posta a livello 0) nel serbatoio "II" a destra (tutti i serbatoi si trovano sullo stesso livello)

	Q (m ³ /s)	D (m)	Re	K_s (m ^{1/3} /s)	J (m.c.a./m)
Operazione 1	0,007	0,3	10 ⁻⁶	-	2,76x10 ⁻⁵
Operazione 2	0,01413	0,3	39600	130	7,44x10 ⁻⁵
Operazione 3	0,01413	0,3	39600	130	7,44x10 ⁻⁵
Operazione 4	0,01413	0,3	39600	130	7,44x10 ⁻⁵
Operazione 5	0,00314	0,2	10 ⁻⁶	-	6,58x10 ⁻⁵

Tabella 23, Parametri per il calcolo delle perdite di carico; operazione 1= pompaggio vinacce nel biofiltro; operazione 2= pompaggio vino contaminato nel biofiltro; operazione 3= pompaggio vino nel serbatoio polmone; operazione 4 = pompaggio vino decontaminato; operazione 5 = scarico delle vinacce

	Serbatoio I	Serbatoio II	L (m)	I-S	C	D (m)	ρ (kg/m ³)	H _G (m)	Y (m.c.a.)	P (bar)
Operazione 1	Serbatoio vinacce incontaminate	Serbatoio di filtraggio	50	2	5	0,3	1050	4,74	0,02	0,47
Operazione 2	Serbatoio vino contaminato	Serbatoio di filtraggio	50	2	5	0,3	990	5,02	0,072	0,49
Operazione 3	Serbatoio di filtraggio	Serbatoio polmone	50	2	4	0,3	990	3,75	0,063	0,37
Operazione 4	Serbatoio di filtraggio	Serbatoio vino decontaminato	50	2	4	0,3	990	3,75	0,063	0,37
Operazione 5	Serbatoio di filtraggio	Serbatoio scarico vinacce	50	2	4	0,2	1050	3	0,066	0,32

Tabella 24, Perdite di carico per ogni operazione. Operazione 1= pompaggio vinacce nel biofiltro; operazione 2= pompaggio vino contaminato nel biofiltro; operazione 3= pompaggio vino nel serbatoio polmone; operazione 4 = pompaggio vino decontaminato; operazione 5 = scarico delle vinacce

Per svolgere i calcoli ed ottenere i risultati esposti nelle tabelle 23-24 si sono fatte le seguenti ipotesi:

- Lunghezza tubazione costante per ogni operazione
- Viscosità del vino pari 1,15 cP mentre per la vinaccia 10⁶ cP;
- Tubazioni in acciaio inox con coefficiente di scabrezza di *Gauckler-Strickler* costante;
- Nessuna operazione avviene in parallelo ad un'altra.

Dai calcoli si nota come la pressione da fornire è molto inferiore rispetto ai 10 bar massimi che la pompa può fornire, indicando dunque l'adeguatezza non solo per la portata fornita ma anche per le varie perdite di carico presenti.

Per le tubazioni generalmente in cantina vengono utilizzate quelle flessibili piuttosto che quelle in acciaio inox, tuttavia all'interno del bioreattore sono presenti 2 tubazioni rigide fisse (quelle di alimentazione delle vinacce e del vino).

Per la scelta delle tubazioni flessibili si è utilizzato il catalogo dell'azienda ATAG (tabella 25):

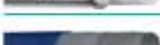
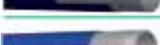
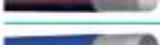
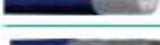
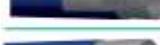
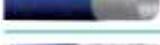
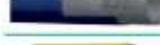
		Codice	Sottostrato	Temperatura d'esercizio °C	Pressione (bar) Depressione (mth ₂ O)	Ø min max (mm)	Note	Legenda	Disp.
	A-FOOD SIL NET	F8G07..-F8G17..	FVMQ	-60 / 180	6 bar + 60 bar*	6 + 50	rinforzi in Kevlar *	ALM	●
	A-FOOD ARIANNA BIO	WBP18..	PVC BIOLOGICO	-10 / 60	4-20 bar	6 - 50	T +125 x picchi	RET	○
	A-FOOD SIL FDA	F8G20..	FVMQ	-60 / 200	2,35 + 12,48 bar*	10 + 100	n.n.	RET ALM	○
	A-FOOD SIL FDA SP	F8G21..	FVMQ	-60 / 200	2,35+12,48 bar* 0,91 mth ₂ O*	10 + 100	n.n.	SPR ALM	●
	A-FOOD SIL BGA	T4SR..	FVMQ	-60 / 180	...	1,5 + 40	estruso	ALM	●
	A-FOOD SIL PLATINICO	T4SPL..	FVMQ	-50 / 200	...	a richiesta	n.n.	FDA	○
	A-FOOD SIL FDA NET	F8G07..-F8G17..	FVMQ	-60 / 180	6 bar + 60 bar	6 + 50	rinforzi in Kevlar *	ALM	●
	A-FOOD NBR FDA SP	F8G13..	NBR	-30 / 100	10 bar 9,18 mth ₂ O	25 + 150	alcool 96%	ALM	●
	A-FOOD NBR FDA	F8G14..	NBR	-30 / 100	10 bar 9,18 mth ₂ O	32 + 100	alcool 96%	ALM	○
	A-FOOD PURPURSCHLANGE	F8G11..	CIIR	85	16bar 1,02 + 5,10 mth ₂ O*	13 + 100	alcool 98%	RET	○
	A-FOOD LACTOPAL	F8G04..	NBR	-20 / 80	16bar	13 + 100	n.n.	RET FDA	●
	A-FOOD LACTOPAL L	F8G05..	NBR	-20 / 80	16bar 8,16mth ₂ O	19 + 100	n.n.	SPR FDA	●
	A-FOOD MILK	F8G06..	NBR	-25 / 80	10 bar	13 + 102	n.n.	RET FDA	○
	A-FOOD MILK SP	F8G10..	NBR	-25 / 80	10 bar 7,13 mth ₂ O	25 + 89	n.n.	SPR FDA	○
	A-FOOD PVC	F8P01..	PVC	-20 / 60	1,00 + 7,00 bar* 4,0 + 7,0 mth ₂ O*	20 + 300	atossico	SPR	●

Tabella 25, Catalogo tubazioni flessibili ATAG

Per la scelta delle tubazioni inox invece si è ricorso alla normative *AISI 304-316L* (tabella 26):

AISI 304 - 316L (Altre qualità a richiesta)
Tabella dei Pesì teorici Kg/m

Diametro esterno		Spessore mm.						
mm	pollici	1	1,2	1,5	2	2,5	3	4
6		0,126						
8		0,176						
10		0,226	0,275	0,321				
12		0,277	0,326	0,396	0,504			
13		0,300	0,355	0,432	0,551			
17,2	3/8"	0,408	0,484	0,593	0,766			
20		0,478	0,568	0,699	0,907			
21,3	1/2"	0,512	0,608	0,748	0,973	1,184		
25,4		0,614	0,731	0,903	1,179	1,442		
26,9	3/4"	0,653	0,777	0,960	1,255	1,537	1,806	
30		0,730	0,925	1,077	1,411	1,732	2,041	
33,7	1"	0,824	0,983	1,217	1,598	1,966	2,321	
38		0,932	1,112	1,379	1,814	2,236	2,646	
40		0,982	1,173	1,455	1,915	2,362	2,797	
42,4	1 1/4"	1,043	1,236	1,546	2,036	2,514	2,979	
48,3	1 1/2"	1,191	1,424	1,769	2,333	2,885	3,424	
50,8		1,254	1,499	1,863	2,459	3,042	3,613	
60,3	2"		1,787	2,222	2,938	3,641	4,331	5,675
63,5			1,883	2,343	3,099	3,843	4,573	5,997
70			2,080	2,589	3,427	4,252	5,065	6,652
76,1	2 1/2"		2,264	2,819	3,734	4,636	5,526	7,267
88,9	3"			3,303	4,379	5,443	6,494	8,557
101,6	3 1/2"			3,783	5,019	6,243	7,454	9,838
114,3	4"			4,263	5,659	7,043	8,414	11,118
139,7	5"			5,223	6,940	8,643	10,334	13,678
168,3	6"			6,305	8,381	10,445	12,496	16,561
219,1	8"			8,225	10,936	13,639	16,329	21,762
273	10"			10,262	13,658	17,041	20,412	27,115
323,9	12"				16,223	20,248	24,260	32,245
355,6	14"					22,245	26,656	35,441

Tabella 26, Tubazioni inox *AISI 304-316L*

Le tubazioni flessibili scelte sono le *A-Food PVC F8P01* con diametri pari a 0,2 m e 0,3 m; le tubazioni rappresentate nel modello sono dunque così realizzate (tabella 27):

Utilizzo della tubazione	Colore tubazione nel modello 3D	Raccordo con tubazione inox nel biofiltro	Diametro tubazione flessibile (mm)	Diametro esterno tubazione in acciaio inox (mm)	Spessore tubazione inox (mm)
Alimentazione vinacce	Celeste	Si	300	273	2
Alimentazione vino contaminato	Rosso	Si	300	273	2
Scarico vino nel serbatoio polmone	Viola	No	300	-	-
Scarico vino decontaminato	Rosa	No	300	-	-
Scarico vinacce	Blu	No	200	-	-

Tabella 27, Dimensionamento tubazioni del modello

Equazioni utilizzate per il dimensionamento della pompa e delle tubazioni:

$$Re = \rho \cdot v \cdot \frac{D}{\mu} \quad (16)$$

$$v = \frac{Q}{0,785 \cdot D^2} \quad (17)$$

$$F_A = \frac{64}{Re} \text{ (in regime laminare)} \quad (18)$$

$$J = \frac{128 \cdot v \cdot Q}{\rho \cdot g \cdot \pi \cdot D^4} \text{ (in regime laminare)} \quad (19)$$

$$J = \frac{10,29 \cdot Q^2}{K_S^2 \cdot D^{5,33}} \text{ (in regime turbolento)} \quad (20)$$

$$Y_{loc} = k \cdot \frac{v^2}{2 \cdot g} \quad (21)$$

$$Y_{dis} = J \cdot L \quad (22)$$

$$Y_{TOT} = Y_{loc} + Y_{dis} \quad (23)$$

$$H_M = H_g + Y \quad (24)$$

$$P = \rho \cdot g \cdot \frac{H_M}{10^5} \quad (25)$$

I termini utilizzati sono i seguenti:

- **Re**= Numero di Reynolds;
- **D**= Diametro tubazione (m);
- **g** = accelerazione gravitazionale (m/s²);
- **μ** = viscosità (cP);
- **I-S** = numero di imbocchi-sbocchi della tubazione;
- **C** = numero di curve a 90°;
- **v** = Velocità del fluido (m/s);
- **F_A**= Fattore d'attrito;
- **J**= Perdita di carico continua unitaria (m.c.a./m);
- **L**= Lunghezza tubazione complessiva(m);
- **Y_{loc}**= perdite di carico localizzate (m.c.a.);
- **Y_{dis}**= perdite di carico distribuite (m.c.a.);
- **Y**= Perdite di carico totali (m.c.a.);
- **H_G**= Prevalenza geodetica (m.c.a.);
- **H_M**=Prevalenza totale (m.c.a);
- **Q**= portata (m³/s);
- **P**= Pressione (bar).

7.2.4 Agitatore laterale

L'agitatore ipotizzato per aumentare la turbolenza all'interno del sistema (per coinvolgere l'intero volume di liquido nel processo d'adsorbimento) è un agitatore universale ad attacco laterale (figura 72); esso si basa su di un albero retraibile e su un'elica pieghevole ad apertura automatica. Questa soluzione permette l'installazione e lo smontaggio del macchinario direttamente su serbatoi pieni, attraverso valvole a passaggio totale, senza perdita di liquido e senza l'utilizzo di attrezzi.

Inizialmente il processo di filtraggio prevedeva un agitatore centrale con cui movimentare sia le vinacce che il vino; tuttavia si è preferito optare per un sistema di questo tipo in quanto presenta come vantaggio, oltre la versatilità e la semplicità di utilizzo, quello di non avere parti o pale meccaniche che vadano direttamente a contatto con le vinacce, provocando l'eventuale rottura con conseguente rilascio di sostanze nel vino caratterizzate da gusti amari ed astringenti e con l'esaltazione delle note erbacee.



Modello	Motore (Kw)	Alimentazione	Velocità	Capacità max serbatoio	Dimensione	Peso
870	1,5 (1,1)	three-phase	1400 rpm	200 hl	230x250x960 mm	20 kg

Figura 72, Agitatore universale con dati tecnici

7.2.5 Valvola a diaframma con apertura ad iride

Per il passaggio delle vinacce dal biofiltro alla vasca di scarico (figura 65) è stato ipotizzato l'uso di una valvola a diaframma con apertura ad iride (figura 73), che garantisce versatilità nel processo in esame in quanto durante l'alimentazione delle vinacce e durante il filtraggio rimane chiusa senza perdita di liquido; quando la vinaccia dev'essere scaricata tale valvola si apre in maniera trasversale all'asse del biofiltro senza dunque richiedere spazi di apertura e di chiusura longitudinali.

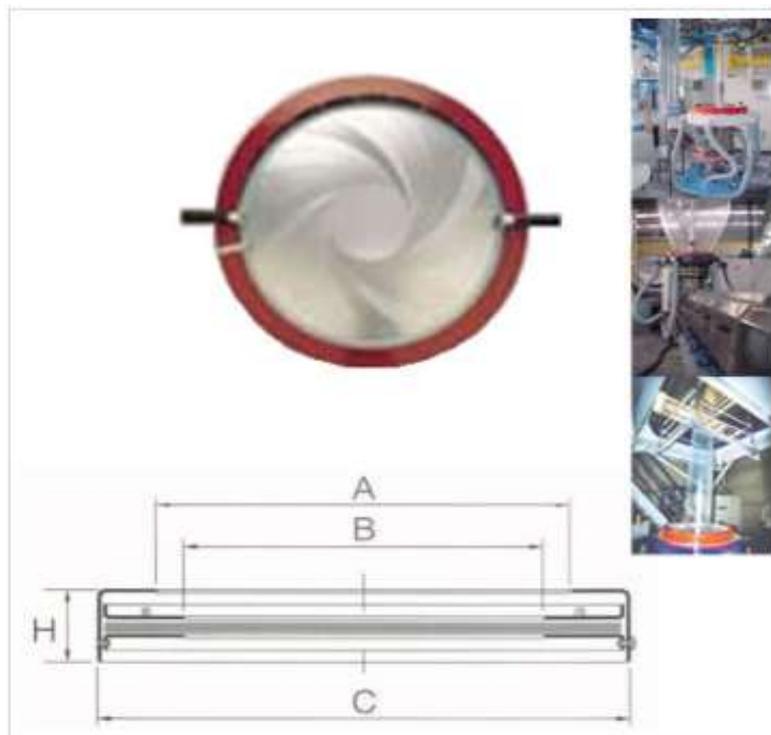


Figura 73, Valvola a diaframma con apertura a iride- *Attrezzatura Olonia*

Tipo:	A	B	C	H	Lame n°	Apertura max	Apertura min	Peso Kg
340	370	340	455	60	16	340	50	5
500	530	500	618	70	24	500	120	8
600	630	600	718	70	24	600	200	9
700	730	700	845	100	24	700	250	14
800	840	800	945	100	30	800	340	18
900	940	900	1090	100	24	900	350	26
1030	1080	1030	1230	100	24	1030	450	30
1200	1280	1200	1470	100	30	1200	500	54
1440	1520	1440	1755	100	30	1440	650	75
1600	1680	1600	1940	110	32	1600	800	82

Tabella 28, Valvola a diaframma con apertura a iride, dati tecnici- *Attrezzzeria Olonia*

Il tipo di valvola utilizzato è il 1200 (tabella 28) in quanto ha lo stesso diametro del cilindro esterno della camicia garantendo dunque una rimozione totale della vinaccia per gravità nella vasca di scarico.

7.2.6 Processo di pulizia (CIP)

Per il processo di pulizia, in prima approssimazione, si è ipotizzato di operare tramite un sistema di lavaggio di tubazioni e serbatoi in loco (Clean In Place).

Il processo consiste nei seguenti passaggi:

- 1) Prelavaggio con acqua per rimuovere lo sporco grossolano;
- 2) Lavaggio dell'impianto tramite lisciva;
- 3) Risciacquo intermedio con acqua per rimuovere il detergente;
- 4) Lavaggio dell'impianto con acidi;
- 5) Risciacquo;
- 6) Disinfezione con vapore o agenti chimici;

Le pompe di alimentazione del detergente sono dimensionate per capacità superiori a quelle di eliminazione del prodotto, in modo da mantenere una velocità nelle tubazioni variabile da 1.5 a 3 m/s, a questa velocità il flusso è molto turbolento e si ha un ottimo effetto di pulizia della superficie delle apparecchiature.



	TJ SaniJet 25	TJ 20G	TZ-67	TJ40G
Tank Size	Mid-sized	Mid-sized	Large ranging from 50m ³ to 500m ³	Large ranging from 50m ³ to 500m ³
Throw Length (max)	56FT	46FT	56FT	70FT
Cycle Time	2-8Min	6-10Min	11-19Min	2-16Min
Working Pressure	44-116PSI	44-116PSI	44-174PSI	44-174PSI
Recommended Pressure	73-94PSI	73-94PSI	73-94PSI	73-102PSI
Working Temperature (max)	203°F	203°F	203°F	203°F
Ambient Temperature (max)	284°F	284°F	284°F	284°F
Standards	2.2 material upon request, FAT & SAT, ATEX and EHEDG	USDA, USFDA, 3.1 material upon request, and ATEX	2.1 material certificate upon request and ATEX	3.1 material certificate upon request and ATEX

Tabella 29, Rotary jet cleaners from *Alfa Laval*

Per la pulizia del serbatoio di filtraggio è stato ipotizzato l'uso di una *Cleaning Machine Alfa Laval SaniJet 25* (tabella 29) in quanto garantisce una pressione di circa 8 bar, necessaria per poter attraversare le maglie della camicia presente all'interno del serbatoio e arrivare con pressione sufficiente alla parete del serbatoio.

La portata da erogare per la pulizia di questo serbatoio è di circa 9,35 m³/h ed il tempo di pulizia ipotizzato in prima approssimazione è di 4 ore (in media è di circa 5 ore [141], ma non essendo un processo di fermentazione che rilascia incrostazioni e cristalli, si è teorizzato che il tempo di pulizia potesse essere più basso della media).

L'equazione utilizzata per il calcolo della portata da erogare è la seguente:

$$Q_{cip} = (T \cdot \pi \cdot 1490) \cdot 0,001 \quad (26)$$

Dove i termini rappresentati sono:

- **Q_{cip}**= Portata da erogare (m³/h);
- **T**= Diametro serbatoio (m) [142];

7.3 Tempi e percentuali di rimozione OTA

7.3.1 Tempi singola operazione

Operazioni singole	Tempo operazione (h)	Tempo operazione (min)
Pompaggio vinacce nella camicia del Serbatoio di filtraggio	0,06	4
Pompaggio vino contaminato nel Serbatoio di filtraggio	0,19	11,8
Processo	15	900
Pompaggio vino nel Serbatoio polmone	0,19	11,8
Pompaggio vino decontaminato nel Serbatoio di stoccaggio	0,19	11,8
Rimozione delle vinacce	0,15	8,9
Pulizia	4	240

Tabella 30, Tempi singola operazione coinvolta nel processo

L'equazione utilizzata per il calcolo dei tempi è la seguente:

$$t = V/Q \quad (27)$$

Dove ciascun termine rappresenta:

- t =tempo dell'operazione (h);
- V = volume da trasportare;
- Q =portata utilizzata (m^3/h);

7.3.2 Tempo totale del processo per ogni concentrazione di OTA

I tempi per il processo di decontaminazione sono direttamente proporzionali al grado di contaminazione del vino da parte dell'ocratossina A (tabella 31), dunque nella seguente tabella si sono valutate le varie quantità di rimozione a seconda del grado di contaminazione (10 ppm è la quantità massima registrata dallo studio compiuto dall'*ONIVINS*) considerando come efficienza quella del ripasso analizzata nel capitolo 6 (condizioni di efficienza minima dunque per questo sistema in quanto si ipotizza che tale biofiltro abbia efficienze di rimozioni più alte del ripasso):

Quantità di vinaccia	Grado di contaminazione (ppm)	1° ciclo (61% di rimozione)	2° ciclo (45% di rimozione)	3° ciclo (42% di rimozione)	4° ciclo (40% di rimozione)	1° ciclo nuova vinaccia (61% di rimozione)	Tempo totale (h)
1750 kg per 4 cicli	Da 2 a 3,3	1,287	1,815	1,914	1,98	-	65,73
1750 per 3 cicli	3,4	1,326	1,87	1,972		-	50,35
1750 kg per 2 cicli	Da 3,5 a 3,6	1,404	1,98			-	34,97
1750 kg per 1 ciclo	Da 3,7 a 5,1	1,989				-	19,59
3500 kg per 1 ciclo	Da 5,1 a 10					1,56	39,18

Descrizione tabella:

- Ogni ciclo si riferisce al trattamento di 10 m³;
- I valori numerici presenti nelle celle celesti sono da intendersi come la concentrazione di OTA presente nel vino dopo ciascun ciclo;
- I valori numerici presenti nelle celle celesti sono riferiti alla concentrazione di OTA massima nel range della corrispondente cella gialla;
- Le celle rosse rappresentano il superamento del limite di legge utilizzando la stessa vinaccia usata nei cicli precedenti, dunque quando si è concluso l'ultimo ciclo (antecedente il rettangolo rosso) bisogna rimuovere la vinaccia e pomparne una nuova decontaminata per poter iniziare un nuovo ciclo;
- I tempi totali nelle celle arancioni sono riferiti alla stessa vinaccia per un numero di cicli pari al numero di celle celesti presenti nella corrispondente riga;
- Il tempo presente nella cella verde è da intendersi per decontaminazione di 10 m³ contaminati dal corrispondente quantitativo di OTA (cella gialla).

Tabella 31, Percentuali di rimozione OTA con i corrispettivi tempi

Ipotizzando un aumento dell'efficienza del sistema di filtraggio tramite questo biofiltro, risulta importante studiarne il margine di miglioramento possibile rispetto alle efficienze del ripasso:

Quantitativo vinacce (kg)	Percentuale di rimozione ipotetica (%) al 1° ciclo	Max grado di contaminazione OTA (ppm)	Max Grado di contaminazione OTA con efficienza minima (ppm)	Concentrazione OTA presente dopo il 1° ciclo
1750	65%	5,7	5,1	1,995
	70%	6,6		1,98
	75%	8		2
	80%	10		2

Nella tabella è espresso il massimo grado di contaminazione (celle in verde) che 1750 kg di vinacce possono trattare in un ciclo unico prima di dover essere sostituite con nuove vinacce incontaminate; nella cella in rosso viene rappresentato il grado di contaminazione massimo all'efficienza minima che la vinaccia può trattare prima di essere sostituita con una nuova incontaminata.

Tabella 32, Confronto margine di miglioramento del processo rispetto all'efficienza del ripasso

Come illustrato nella tabella 32, si nota come il range di utilizzo di 1750 kg di vinacce aumenti con l'aumentare dell'efficienza, ciò comporta non solo un guadagno di tempi ma anche di costi associati nel trattamento di vini con contaminazioni da OTA elevate.

8. Conclusioni

L'ocratossina A è una grave fonte di contaminazione nel vino, soprattutto per quanto riguarda il vino rosso; essa ha un'attività essenzialmente nefrotossica.

L'ocratossina A può provocare danni all'intero organismo, essa è capace di legarsi alle sieralbumine del sangue causando la diffusione sistemica della tossina. In dosi elevate può risultare anche immunotossica, cancerogena e genotossica e, nei casi peggiori, può causare la comparsa di epatiti, enteriti e necrosi del tessuto linfatico.

Per questi motivi è di fondamentale importanza ridurre il più possibile la concentrazione di essa negli alimenti e, come affrontato in questo lavoro di tesi, anche nel vino.

I processi di decontaminazione di OTA nel vino sono generalmente considerati dalle cantine in maniera marginale in quanto non tutti gli anni si hanno delle concentrazioni superiori al limite di legge (2 ppm); accade però, nelle annate sfavorevoli, a causa del clima e di altri fattori ambientali e non, che la contaminazione da parte di questa micotossina superi il limite di legge e dunque sia necessario per commercializzare il prodotto, intervenire.

Generalmente si utilizzano i carboni enologici in quanto riducono efficacemente, con pochi grammi per ettolitro di vino, il livello di OTA; questo metodo però comporta perdite importanti in alcune proprietà che sono determinanti per la qualità del vino; vengono alterate le proprietà organolettiche originarie (corpo, intensità di colore ecc.) con conseguenti difficoltà di vendita del prodotto.

In questo lavoro di tesi, si sono analizzate le cause principali di formazione dell'OTA nell'uva, approfondendo metodi di prevenzione (in agricoltura) e di protezione (tramite tecniche di laboratorio e di cantina) al fine di fornire una valida alternativa al carbone enologico, ottimizzando il processo di rimozione di OTA.

Il modello ipotizzato nasce da una serie di studi in letteratura nell'ambito dell'adsorbimento di OTA ed in generale nella rimozione di OTA; comparando i vari metodi ed elementi (biologici e non) capaci di rimuoverla, si è optato per lo sviluppo di un "biofiltro" costituito da vinacce (bucce e vinaccioli dell'uva). Dopo aver approfondito studi in letteratura relativi alla vinaccia, si è visto come tale biomassa possa adsorbire efficacemente la micotossina, migliorando contemporaneamente le qualità del vino come corpo, intensità di colore e contenuto di polifenoli a seconda del tipo di vinaccia utilizzata.

In generale, si è visto come sia preferibile utilizzare una vinaccia proveniente dalla stessa varietà di uva con cui si è prodotto il vino, non escludendo però la possibilità di utilizzare altri tipi di vinacce per ottenere un vino con caratteristiche nuove.

Il biofiltro modellizzato è stato dimensionato con l'idea di ottimizzare la quantità di vino trattato rispetto ad un ipotetico costo d'investimento necessario alla realizzazione dell'impianto.

L'idea di progettare un biofiltro capace di trattare, in maniera completamente automatizzata una certa quantità di vino contaminata, nasce, inoltre, da studi compiuti su scala industriale partendo da una tecnica chiamata "ripasso". Nel ripasso su scala industriale il vino viene semplicemente pompato dal fondo del serbatoio fino alla sommità dello stesso ove è presente il cappello di vinacce (rimontaggio). Durante la fase di attraversamento del vino nel cappello si esplica l'azione di adsorbimento della micotossina che viene però limitato dai canali preferenziali percorsi da esso riducendo il contatto con la vinaccia.

Il biofiltro sviluppato e modellizzato, ha lo scopo di migliorare tale procedimento tramite l'utilizzo di una "camicia" costituita da reti in acciaio inox a maglie strette (per permettere il passaggio del vino all'interno di essa) in modo tale da non disperdere la vinaccia nel vino e "forzarla" nell'avere un contatto lungo tutto il volume del liquido (e non solo sulla sommità come avviene nel ripasso tramite rimontaggio). Inoltre, si è ipotizzato l'uso di un agitatore laterale per rinnovare continuamente il vino a contatto con la vinaccia al fine d'avere una rimozione più omogenea; da queste premesse si è ipotizzato di avvicinarsi all'efficienza di rimozione di OTA ottenuta su scala di laboratorio (80%) del vino da parte delle vinacce e quindi ottimizzare il processo.

Tale sistema di filtraggio però, non è stato sviluppato a partire da studi fatti su un modello su scala di laboratorio, dunque tutte le condizioni operative ipotizzate, il dimensionamento attuato e l'effettiva possibilità e sostenibilità di tale biofiltro richiedono ulteriori approfondimenti con l'ausilio di prove sperimentali che ne garantiscano l'effettiva possibilità di utilizzo in ambito industriale.

Bibliografia

- [1] M. Solfrizzo, G. Panzarini, G. Avantageggiato, F. Grieco e A.Visconti, “Rimozione dell’OTA con il ripasso breve”, *Solfrizzo et al.*, 1, 2010
- [2] M. Miraglia e C. Brera, “Le micotossine nella filiera agro-alimentare”, Istituto Superiore di Sanità, 2004
- [3] G. Juodeikiene, L. Basinskiene, E. Bartkiene and P. Matusevicius, “Mycotoxin Decontamination Aspects in Food, Feed and Renewables Using Fermentation Processes” Submitted: November 30th 2011, Reviewed: April 24th 2012, Published: August 22nd 2012
- [4] S. Guenzi, “Rimozione dell’ocratossina A dal vino rosso con diversi agenti chiarificanti” 25 Dicembre 2013
- [5] M. Castellari, A. Versari, A. Fabiani, G. Parpinello, S. Galassi, “Removal of ochratoxin A in red wines by means of adsorption treatments with commercial fining agents”, *J. Agric. Food Chem.*, 49, 3917–3921, 2001
- [6] M. Solfrizzo, G. Avantageggiato, G. Panzarini, A. Visconti, “Removal of ochratoxin A from contaminated red wines by repassage over grape pomaces”, *J. Agric. Food Chem.*, 58, 317–323, 2010
- [7] F. Bosco, C. Mollea, “Mycotoxins in Food”, *Politecnico di Torino*, 169-171, 2012
- [8] F. Bosco, C. Mollea, “Mycotoxins in Food”, *Politecnico di Torino*, 171-172, 2012.
- [9] A. Cinar, E. Onbasi, “Mycotoxins: The Hidden Danger in Foods”, Faculty of Engineering and Natural Sciences, Department of Food Engineering, *Bursa Technical University, Bursa*,4, 2019
- [10] F. Bosco, C. Mollea, “Mycotoxins in Food”, *Politecnico di Torino*, 169-171, 2012
- [11] A. Cinar, E. Onbasi, “Mycotoxins: The Hidden Danger in Foods”, Faculty of Engineering and Natural Sciences, Department of Food Engineering, *Bursa Technical University, Bursa*, 5, 2019
- [12] F. Bosco, C. Mollea, “Mycotoxins in Food”, *Politecnico di Torino*, 170, 2012
- [13] G. Holmes, Strawberry Center, Cal Poly San Luis Obispo, Bugwood.org
- [14] F. Bosco, C. Mollea, “Mycotoxins in Food”, *Politecnico di Torino*, 185-186, 2012
- [15] G. Juodeikiene, L. Basinskiene, E. Bartkiene and P. Matusevicius, “Mycotoxin Decontamination Aspects in Food, Feed and Renewables Using Fermentation Processes”, *Structure and Function of Food Engineering*, Ayman Amer Eissa, IntechOpen, DOI: 10.5772/46184. Available from: <https://www.intechopen.com/books/structure-and-function-of-food->

engineering/mycotoxin-decontamination-aspects-in-food-feed-and-renewables-using-fermentation-processes, 2012

- [16] S. Pires, J. Lopes, I. Nunes and E. Gaspar, "Patulin Analysis: Sample Preparation Methodologies and Chromatographic Approaches", Fig. 2, *Ecotoxicology*, Dr. Ghousia Begum (Ed. III), ISBN: 978-953- 51-0027-0, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/ecotoxicology/patulin-analysis-samplepreparation-methodologies-and-chromatographic-approaches>, 2012
- [17] S. Pires, J. Lopes, I. Nunes and E. Gaspar. *Patulin Analysis: Sample Preparation Methodologies and Chromatographic Approaches*, Patulin, *Ecotoxicology*, Dr. Ghousia Begum (Ed.), ISBN: 978-953- 51-0027-0, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/ecotoxicology/patulin-analysis-samplepreparation-methodologies-and-chromatographic-approaches>, 2012
- [18] F. Bosco, C. Mollea, "Mycotoxins in Food", *Politecnico di Torino*, 176-177, 2012
- [19] J. Rousseau, *Ocratossina A nel vino*, parte 1: le micotossine vinidea.net – rivista internet tecnica del vino, n.1, *Viticulture Institut Cooperatif du Vin*, Montpellier 2004
- [20] N. delage, D'Harlingue, B.Colonna Ceccaldi, G. Bompeix, *Food Control* 14 225, 2003
- [21] E.E. Creppy, *J. Toxicol.*, Rev. 18, 277, 1999
- [22] M. Weidenborner, *Encyclopedia of Food Mycotoxins Springer, Berlin Germany*, 2001
- [23] *Webzine Sanità Pubblica Veterinaria* Numero 18 - febbraio 2003 Breaholtz, 1991; Creppy, 1993
- [24] P. Majerus, H Ottender, *Dtsch. Lebensm.-Rundsh.* 92, 388, 1996
- [25] H. Majerus, P. Ottender, *Food Addit. Contamin.* 17, 793, 2000
- [26] P. Markaki, C. Delpont-Binet, F. Grosso, S Dragacci, *J. Food Prot.* 64, 2001
- [27] B. Zimmerli, R. Dick, *Food Add. Contam.*, 13,655, 1996
- [28] C Brera, J.M. Soriano, F. Debegnach, M. Miraglia, *Microchemical Journal* 79 109-113, 2005
- [29] M. Solfrizzo, G. Panzarini, G. Avantaggiato, F. Grieco e A.Visconti, *Solfrizzo et al.*, "rimozione dell'OTA con il ripasso breve" Tabella 1, pag. 1, 2010
- [30] A. Silva, "Destino dell'OTA nella vinificazione, dal 1°Congresso nazionale: Le micotossine nella filiera agro-alimentare" *ISS* 2004
- [31] R. Mazzilli, P. Braccini, *Manuale di viticoltura biologica*, 78-85– *ARSIA*, 2010

- [32] R. Mazzilli, P. Braccini, *Manuale di viticoltura biologica*, 85-87– ARSIA, 2010
- [33] F. Prospero, “Tanti prodotti, un unico principio attivo: Il rame contro la peronospora della vite”, *L’informateur Agricole*, 2010
- [34] R. Mazzilli, P. Braccini, *Manuale di viticoltura biologica*, 90-95 -ARSIA, 2010
- [35] R. Mazzilli, P. Braccini, *Manuale di viticoltura biologica*, 86-87– ARSIA, 2010
- [36] R. Mazzilli, P. Braccini, *Manuale di viticoltura biologica*, 103– ARSIA, 2010
- [37] A. Silva, “Destino dell’OTA nella vinificazione, dal 1° Congresso nazionale: Le micotossine nella filiera agro-alimentare” *ISS* 2004
- [38] Quintela S, Villarán MC, López de Armentia I, Elejalde E. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 29 (7): 1168-1174, 2012
- [39] Bornet A, Teissedre PL. *Eur Food Res Technol*. 226(4):681-689, 2008
- [40] Castellari M, Versari A, Fabiani A, Parpinello GP, Galassi S. *J Agric Food Chem*. 49:3917-3921, 2001
- [41] M. Solfrizzo, G. Panzarini, G. Avantaggiato, F. Grieco, A.Visconti, “Rimozione dell’OTA con il ripasso breve”, *Solfrizzo et al.*, 3-6, 2010
- [42] Magrone, T.; Tafaro, A.; Jirillo, F.; Panaro, M. A.; Cuzzuol, P.; Cuzzuol, A. C.; Pugliese, V.; Amati, L.; Jirillo, E.; Covelli, V. *Red wine consumption and prevention of atherosclerosis: An in vitro model using human peripheral blood mononuclear cells*. *Curr. Pharm. Des.* 2007, 13 (36), 3718–3725.
- [43] M. Flesh, A. Schwartz, M. Bohm, “Effect of red wine and white wine on endothelium-dependent vasorelaxation of rat aorta and human coronary arteries”, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 275, 1183–1190, 1998
- [44] A.S. Mayer, M. Heinonen, E.N. Frankel, “Antioxidant interactions of catechin, cyanidin, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation”. *Food Chem.*, 61, 71–75, 1998
- [45] C.K. Chen, C.R. Pace-Asciak- “Vasorelaxing activity of resveratrol and quercetin in isolated rat aorta.” *Gen. Pharmacol.*, 27, 363–366, 1996
- [46] G. Perrone, I. Nicoletti, M. Pascale, A. De Rossi, A. De Girolamo, A. Visconti, “Positive correlation between high levels of ochratoxin A and resveratrol related compounds in red wines” *J. Agric. Food Chem.*, 55, 6807–6812, 2007
- [47] Abrunhosa L., Paterson RRM., Venâncio A., “Biodegradation of ochratoxin A for food and feed decontamination” *Toxins*. 2: 1078-1099, 2010
- [48] Böhm J., Grajewski J., Asperger H., Rabus B., Razzazi E., “Study on biodegradation of some trichothecenes (NIV, DON, DAS, T-2) and ochratoxin A by use of probiotic microorganisms.” *Mycot. Res.* 16: 70-74, 2000
- [49] Piotrowska M., Zakowska Z., “The biodegradation of ochratoxin A in food products by lactic acid bacteria and baker’s yeast.” In: Bielecki S., Tramper J., Polak J., editors. *Progress in Biotechnology (food Biotechnology)*. Vol. 17. Amsterdam: Elsevier. pp. 307-310, 2000

- [50] Turbic A, Ahokas JT, Haskard CA, “Selective in vitro binding of dietary mutagens, individually or in combination, by lactic acid bacteria.” *Food Addit. Contam.* 19: 144-152, 2002
- [51] Piotrowska M., Zakowska Z., “The elimination of ochratoxin A by lactic acid bacteria strains.” *Pol. J. Microbiol.* 54: 279-286, 2005
- [52] Del Prete V., Rodriguez H., Carrascosa A.V., Rivas BDL, Garcia-Moruno E, Munoz R, “In vitro removal of ochratoxin A by wine lactic acid bacteria” *J. Food Protect.* 70:2155-2160, 2007
- [53] Fuchs S., Sontag G., Stidl R., Ehrlich V., Kundi M., Knasmuller S. “Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria.” *FoodChem. Toxicol* 46: 1398-1407, 2008
- [54] Shetty PH., Jespersen L., “Saccharomyces cerevisiae and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents” *Trends Food Sci. Techn.* 17: 48-55, 2006
- [55] Mateo R., Medina A., Mateo EM., Mateo F., Jimenez M., “An overview of ochratoxin A in beer and wine.” *Int. J. Food Microbiol.* 119 (1–2): 79-83, 2007
- [56] Varga J., Kozakiewicz Z. “Ochratoxin-A in grapes and grape-derived products.” *Trends Food Sci. Techn.* 1: 72-81, 2006
- [57] Kozakiewicz Z., Battilani P., Cabanes I., Venancio A., Mule G., Tjamos E. “Making wine safer.” In: van Egmond H., van Osenbruggen T., Lopez Garcia R., Visconti A., editors. “Meeting the Mycotoxin Menace.”, *Wageningen: Wageningen Academic Publisher.* pp.131-140, 2003
- [58] Binder EM., Heidler D., Schatzmayr G., Thimm N., Fuchs E., Schuh M., Krska R., Binder J., *Microbial detoxification of mycotoxins in animal feed.* In: De Koe WJ., Samson RA., Van Egmond HP., Gilbert J., Sabino M., editors. *Mycotoxins and Phytotoxins in Perspective at the Turn of the Millenium.* Proceedings of the 10-th International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phytotoxins, Garuja, Brazil, May 20-25. IUPAC. pp.271-277, 2000
- [59] Line JE, Brackett RE, “Role of toxin concentration and second carbon source in microbial transformation of aflatoxin B₁ by *Flavobacterium aurantiacum*” *J.FoodProtect.* 58: 1042-1044, 1995
- [60] Bejaouii H., Mathieu F., Taillandier P., Lebrihi A., “Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces* strains” *J. Appl. Microbiol.* 97: 1038-1044, 2004
- [61] Abrunhosa L., Paterson RRM., Venâncio A., “Biodegradation of ochratoxin A for food and feed decontamination” *Toxins.* 2: 1078-1099, 2010
- [62] Bizaj E., Mavri J., Cus F., Raspor A., “Removal of ochratoxin A in *Saccharomyces cerevisiae* liquid cultures”, *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 30: 151-155, 2009
- [63] Cecchini F., Morassut M., Garcia Moruno E., Di Stefano R., “Influence of yeast strain on ochratoxin A content during fermentation of white and red must” *Food Microbiol.* 23: 411-417, 2006

- [64] Moruno EG., Sanlorenzo C., Boccaccino B., Di Stefano R., “Treatment with yeast to reduce the concentration of ochratoxin A in red wine” *Am. J. Enol. Vitic.* 56: 73-76, 2005
- [65] Ringot D., Lerzy B., Bonhoure JP., Auclair E., Oriol E., Larondelle Y., “Effect of temperature on in vitro ochratoxin A biosorption onto yeast cell wall derivatives.” *Process biochem.*40: 3008-3016, 2005
- [66] Yiannikouris A., Andre G., Poughon L., Francois J., Dussap CG., Jeminet G., Bertin G., Jouany JP., “Chemical and conformational study of the interactions involved in mycotoxin complexation with β -D-glucans.” *Biomacromolecules.* 7: 1147-1155, 2006
- [67] Raju MVLN., Devegowda G., “Esterified-glucomannan in broiler chicken diets contaminated with aflatoxin, ochratoxin and T-2 toxin: Evaluation of its binding ability (in vitro) and efficacy as immunomodulatory.” *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 15: 1051-1056, 2002
- [68] Oguz H., Parlat SS., “Effects of dietary mannanoligosaccharide on performance of Japanese quail affected by aflatoxicosis.” *S. Afr. J. Anim. Sci.* 34: 144-148, 2004
- [69] Schatzmayr G., Heidler D., Fuchs E., Mohnl M., Täubel M., Loibner AP., Braun R., Binder EM., “Investigation of different yeast strains for the detoxification of ochratoxin A.” *Mycot. Res.* 19: 124-128, 2003
- [70] Molnar O., Schatzmayr G., Fuchs E., Prillinger H., “Trichosporon mycotoxinivorans sp nov., a new yeast species useful in biological detoxification of various mycotoxins.” *Syst. Appl. Microbiol.* 27: 661-671, 2004
- [71] Hickey PW., Sutton DA., Fothergill AW., Rinaldi MG., Wickes BL., Schmidt HJ., Walsh TJ., “Trichosporon mycotoxinivorans: A novel respiratory pathogen in patients with cystic fibrosis.” *J. Clin. Microbiol.* 47: 3091-3097, 2009
- [72] Peteri Z., Teren J., Vagvolgyi C., Varga J., “Ochratoxin degradation and adsorption caused by astaxanthin-producing yeasts.” *Food Microbiol.* 24: 205-210, 2007
- [73] de Felice DV., Solfrizzo M., De Curtis F., Lima G., Visconti A., Castoria R., “Strains of Aurebasidium pollulans can lower ochratoxin A contamination in wine grapes”, *Phytopathology.* 98: 1261-1270, 2008
- [74] Hawkes M., Rennie R., Sand C., Vaudry W., “Aurebasidium pullulans infection: Fungemia in an infant and a review of human cases.” *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 51:209-213, 2005
- [75] E. Garcia-Moruno, M. Savino, “Ocratossina Anella filiera vite-vino e tecnologie innovative per contrastarla”, CRA –ENO, ASTI CRA-UTV, BARLETTA, 2006
- [76] Varga J., Rigó K., Téren J., “Degradation of ochratoxin A by Aspergillus species.”, *Int. J. Food Microbiol.* 59: 1-7, 2000
- [77] Abrunhosa L., Serra R., Venâncio A., “Biodegradation of ochratoxin A by

- fungi isolated from grapes.” *J. Agric. Food Chem.* 50: 7493-7496, 2002
- [78] Varga J., Péteri Z., Tábori K., Téren J., Vagvolgyi C., “Degradation of ochratoxin-A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates.” *Int. J. Food Microbiol.* 99: 321-328, 2005
- [79] Bejaoui H., Mathieu F., Taillandier P., Lebrihi A., “Biodegradation of ochratoxin A by *Aspergillus* section *Nigri* species isolated from French grapes: A potential means of ochratoxin A decontamination in grape juices and musts.” *FEMS Microbiol. Lett.* 255: 203-208, 2006
- [80] Valero A., Sanchis V., Ramos AJ., Marin S., *Brief in vitro study on Botrytis cinerea and Aspergillus carbonarius regarding growth and ochratoxin A.* *Lett. Appl. Microbiol.* 47: 327-332, 2008
- [81] Pitout MJ., “The hydrolysis of ochratoxin A by some proteolytic enzymes.” *Biochem. Pharmacol.* 18: 485-491, 1969
- [82] Stander MA., Bornscheuer UT., Henke E., Steyn PS., “Screening of commercial hydrolases for the degradation of ochratoxin A.” *J. Agric. Food Chem.* 48: 5736-5739, 2000
- [83] Abrunhosa L., Santos L., Venâncio A., “Degradation of ochratoxin A by proteases and by a crude enzyme of *Aspergillus niger*.” *Food Biotechnol.* 20: 231-242, 2006.
- [84] Abrunhosa L., Venâncio A., “Isolation and purification of an enzyme hydrolyzing ochratoxin A from *Aspergillus niger*” *Biotechnol. Lett.* 29: 1909-1914, 2007.
- [85] Abrunhosa L., Venâncio A., “Isolation and purification of an enzyme hydrolyzing ochratoxin A from *Aspergillus niger*” *Biotechnol. Lett.* 29: 1909-1914, 2007.
- [86] FAO-STAT. FAO statistical data base; <http://www.fao.org> (accessed February 2010).
- [87] Inbar Y., Chen Y., Hadar Y., Verdonck O., “Composting of agricultural wastes for their use as container media--simulation of the composting process.” *Biol. Wastes*, 26, 247-59, 1988
- [88] Fontana A. R., Antonioli A., Bottini, R., “Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics.” *J. Agric. Food Chem.*, 61, 8987-9003, 2013
- [89] Mazza G., “Anthocyanins in grapes and grape products.” *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 35, 341-371, 1995
- [90] Guemour D. Bannelier C., Dellal A., Gidenne T., “ Nutritive value of sun-dried grape pomace, incorporated at a low level in complete feed for the rabbit bred under magrebian conditions.” *World Rabbit Sci.*, 18, 17-25, 2010
- [91] Pinelo M., Arnous, A., Meyer, A. S., “Upgrading of grape skins: significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol

- release.” *Trends Food Sci. Technol.*, 17, 579–590, 2006
- [92] Hoye, C., Jr. Ross, C. F. “Total phenolic content, consumer acceptance, and instrumental analysis of bread made with grape seed flour.” *J. Food Sci.*, 76, 428–436, 2011
- [93] Mildner-Szkudlarz, S., Bajerska, J., Zawirska-Wojtasiaka, R., Górecka, D., “White grape pomace as a source of dietary fibre and polyphenols and its effect on physical and nutraceutical characteristics of wheat biscuits.” *J. Sci. Food Agric.*, 93, 389–395, 2013
- [94] G. Avantaggiato, D. Greco, A. Damascelli, M. Solfrizzo, and Angelo Visconti, “Assessment of Multi-mycotoxin Adsorption Efficacy of Grape Pomace”, *Institute of Sciences of Food Production (ISPA), National Research Council (CNR)*, 498, 2013
- [95] M. Solfrizzo, G. Panzarini, A. Visconti, “Determination of Ochratoxin A in Grapes, Dried Vine Fruits, and Winery Byproducts by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorometric Detection (HPLC-FLD) and Immunoaffinity Cleanup”, *Institute of Sciences of Food Production (ISPA), National Research Council (CNR)*, 11083, 2008
- [96] G. Avantaggiato, D. Greco, A. Damascelli, M. Solfrizzo, and Angelo Visconti, “Assessment of Multi-mycotoxin Adsorption Efficacy of Grape Pomace”, *Institute of Sciences of Food Production (ISPA), National Research Council (CNR)*, 498-499, 2013
- [97] G. Avantaggiato, D. Greco, A. Damascelli, M. Solfrizzo, and Angelo Visconti, “Assessment of Multi-mycotoxin Adsorption Efficacy of Grape Pomace”, *Institute of Sciences of Food Production (ISPA), National Research Council (CNR)*, 499, 2013
- [98] S. Specchia, *MED_09 Adsorption column*, 6, 2019
- [99] S. Specchia, *MED_09 Adsorption column*, 7, 2019
- [100] S. Specchia, *MED_09 Adsorption column*, 8, 2019
- [101] G. Avantaggiato, D. Greco, A. Damascelli, M. Solfrizzo, and Angelo Visconti, “Assessment of Multi-mycotoxin Adsorption Efficacy of Grape Pomace” *Institute of Sciences of Food Production (ISPA), National Research Council (CNR)*, 500, 2013
- [102] G. Avantaggiato, D. Greco, A. Damascelli, M. Solfrizzo, and Angelo Visconti, “Assessment of Multi-mycotoxin Adsorption Efficacy of Grape Pomace”, *Institute of Sciences of Food Production (ISPA), National Research Council (CNR)*, 501, 2013
- [103] Lemke, S. L.; Grant, P. G.; Phillips, T. D. “Adsorption of zearalenone by organophilic montmorillonite clay”, *J. Agric. Food Chem.*, 46, 3789–3796, 1998
- [104] Pietri, A.; Bertuzzi, T. “Simple phosphate buffer extraction for the determination of fumonisins in masa, maize, and derived products.”, *Food Anal. Methods*, 5, 1088–1096, 2012

- [105] Daković, A.; Tomasevic-Canovic, M.; Rottinghaus, G.; Dondur, V.; Masic, Z. “Adsorption of ochratoxin A on octadecyldimethyl benzyl ammonium exchanged-clinoptilolite-heulandite tuff.” *Colloids Surf., B*, 30, 157–165, 2003
- [106] G. Avantaggiato, D. Greco, A. Damascelli, M. Solfrizzo, and Angelo Visconti, “Assessment of Multi-mycotoxin Adsorption Efficacy of Grape Pomace”, *Institute of Sciences of Food Production (ISPA), National Research Council (CNR)*, 500-501, 2013
- [107] Döll, S.; Dänicke, S.; Valenta, H.; Flachowsky, G. “In vitro studies on the evaluation of mycotoxin detoxifying agents for their efficacy on deoxynivalenol and zearalenone.” *Arch. Anim. Nutr.*, 58, 311–324, 2004
- [108] G. Avantaggiato, D. Greco, A. Damascelli, M. Solfrizzo, and Angelo Visconti, “Assessment of Multi-mycotoxin Adsorption Efficacy of Grape Pomace”, *Institute of Sciences of Food Production (ISPA), National Research Council (CNR)*, 501, 2013
- [109] G. Avantaggiato, D. Greco, A. Damascelli, M. Solfrizzo, and Angelo Visconti, “Assessment of Multi-mycotoxin Adsorption Efficacy of Grape Pomace”, *Institute of Sciences of Food Production (ISPA), National Research Council (CNR)*, 502, 2013
- [110] Foo, K. Y.; Hameed, B. H. Insights into the modeling of adsorption isotherm systems. *Chem. Eng. J.*, 156,2–10, 2010
- [111] G. Avantaggiato, D. Greco, A. Damascelli, M. Solfrizzo, and Angelo Visconti, “Assessment of Multi-mycotoxin Adsorption Efficacy of Grape Pomace”, *Institute of Sciences of Food Production (ISPA), National Research Council (CNR)*, 503, 2013
- [112] Grant, P. G.; Phillips, T. D. ” Isothermal adsorption of aflatoxin B₁ on HSCAS clay.” *J. Agric. Food Chem.*, 46, 599–605, 1998
- [113] Freundlich, H. M. F. “Über die Adsorption in Lösungen.” *Z. Phys. Chem.*, 57, 385–470, 1906
- [114] Daković, A.; Tomasevic-Canovic, M.; Rottinghaus, G.; Dondur, V.; Masic, Z. “Adsorption of ochratoxin A on octadecyldimethyl benzyl ammonium exchanged-clinoptilolite-heulandite tuff.”, *Colloids Surf., B*, 30, 157–165, 2003
- [115] G. Avantaggiato, D. Greco, A. Damascelli, M. Solfrizzo, and Angelo Visconti, “Assessment of Multi-mycotoxin Adsorption Efficacy of Grape Pomace”, *Institute of Sciences of Food Production (ISPA), National Research Council (CNR)*, 504, 2013
- [116] Seco, A.; Marzal, P.; Gabaldón, C. “Adsorption of heavy metals from aqueous solutions onto activated carbon in single Cu and Ni systems and in binary Cu-Ni, Cu-Cd and Cu-Zn systems.”, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 68, 23–30, 1997
- [117] G. Avantaggiato, D. Greco, A. Damascelli, M. Solfrizzo, and Angelo Visconti, “Assessment of Multi-mycotoxin Adsorption Efficacy of Grape Pomace”, *Institute of Sciences of Food Production (ISPA), National Research Council (CNR)*, 505,

2013

- [118] D. Greco, V. D'Ascanio, E. Santovito, "Comparative efficacy of agricultural byproducts in sequestering mycotoxins: Multi-mycotoxin adsorption efficacy of agricultural byproducts", *Journal of the Science of Food and Agriculture, Effect of pH on mycotoxin adsorption and desorption study*, 2018
- [119] Gambacorta L, Pinton P, Avantaggiato G, Oswald IP and Solfrizzo M, "Grape pomace, an agricultural byproduct reducing mycotoxin absorption: in vivo assessment in pig using urinary biomarkers." *J. Agric. Food Chem.* 64:6762–6771, 2016
- [120] Laufenberg G, Kunz B and Nystroem M, "Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations.", *Bioresour Technol* 87:167–198, 2003
- [121] Karovicová J, Kohajdová Z, Minarovicová L and Kuchtová V, "The chemical composition of grape fibre.", *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences* 9:53–57, 2015
- [122] Sousa EC, Uchôa-Thomaz AMA, Carioca JOB, de Morais SM, de Lima A, Martins CG et al., "Chemical composition and bioactive compounds of grape pomace (*Vitis vinifera* L.), Benitaka variety, grown in the semiarid region of northeast Brazil.", *Food Sci Technol* 34:135–142, 2014
- [123] Ringot, D.; Lerzy, B.; Bonhoure, J. P.; Auclair, E.; Oriol, E.; Larondelle, Y. "Effect of temperature on in vitro ochratoxin A biosorption onto yeast cell wall derivatives.", *Process Biochem.*, 40, 3008–3016, 2005
- [124] Gatta, G. D. "Determination of adsorption heats.", *Thermochim. Acta*, 96, 349–363, 1985
- [125] G. Avantaggiato, D. Greco, A. Damascelli, M. Solfrizzo, and Angelo Visconti, "Assessment of Multi-mycotoxin Adsorption Efficacy of Grape Pomace", *Institute of Sciences of Food Production (ISPA), National Research Council (CNR)*, 506, 2013
- [126] Grant, P. G.; Phillips, T. D." Isothermal adsorption of aflatoxin B₁ on HSCAS clay." *J. Agric. Food Chem.*, 46, 599–605, 1998
- [127] Manohar, D. M.; Anoop Krishnan, K.; Anirudhan, T. S. "Removal of mercury (II) from aqueous solutions and chlor-alkali industry wastewater 2-mercaptopbenzimidazole-clay." *Water Res.*, 36, 1609– 1619, 2002
- [128] Ho, Y. S. "Removal of copper ions from aqueous solution by tree fern." *Water Res.*, 37, 2323–2330, 2003
- [129] Kobya, M. "Removal of Cr(VI) from aqueous solutions by adsorption onto hazelnut shell activated carbon: kinetic and equilibrium studies." *Bioresour. Technol.*, 91, 317–321, 2004
- [130] M. Solfrizzo, G. Avantaggiato, G. Panzarini and A. Visconti, "Removal of Ochratoxin A from Contaminated Red Wines by Repassage over Grape Pomaces", *Institute of Science of Food Production (ISPA), National Research Council (CNR)*,

317, 2010

- [131] M. Solfrizzo, G. Panzarini, G. Avantaggiato, F. Grieco e A.Visconti, “Rimozione dell’OTA con il ripasso breve”, *Solfrizzo et al.*, 2, 2010
- [132] M. Solfrizzo, G. Panzarini, G. Avantaggiato, F. Grieco e A.Visconti, “Rimozione dell’OTA con il ripasso breve”, *Solfrizzo et al.*, 3, 2010
- [133] M. Solfrizzo, G. Avantaggiato, G. Panzarini and A. Visconti, “Removal of Ochratoxin A from Contaminated Red Wines by Repassage over Grape Pomaces, *Institute of Science of Food Production (ISPA), National Research Council (CNR)*”, 319, 2010
- [134] A. Visconti, G. Perrone, G. Cozzi, M. Solfrizzo, “Managing ochratoxin A risk in the grape wine food chain.” *Food Addit. Contam.*, 25(2); 193-202, 2008
- [135] M. Solfrizzo, G. Avantaggiato, G. Panzarini and A. Visconti, “Removal of Ochratoxin A from Contaminated Red Wines by Repassage over Grape Pomaces”, *Institute of Science of Food Production (ISPA), National Research Council (CNR)*, 320, 2010
- [136] Cozzi G., Pascale M., Perrone G., Visconti A., Logrieco A. Effect of *Lobesia botrana* damages on black aspergilli rot and ochratoxin A content in grapes. *Int. J. Food Microbiol.*, 111 (Suppl.1), S88–S92, 2006
- [137] M. Solfrizzo, G. Avantaggiato, G. Panzarini and A. Visconti, Removal of Ochratoxin A from Contaminated Red Wines by Repassage over Grape Pomaces, *Institute of Science of Food Production (ISPA), National Research Council (CNR)*, 321, 2010
- [138] M. Solfrizzo, G. Panzarini, G. Avantaggiato, F. Grieco, A.Visconti, “Rimozione dell’OTA con il ripasso breve” , *Solfrizzo et al.*, 5, 2010
- [139] M. Solfrizzo, G. Avantaggiato, G. Panzarini and A. Visconti, Removal of Ochratoxin A from Contaminated Red Wines by Repassage over Grape Pomaces, *Institute of Science of Food Production (ISPA), National Research Council (CNR)*, 322, 2010
- [140] E. Ruzzene e F. Tacoli, “Studio di fattibilità relativo a un impianto a biogas alimentato a vinacce”, *Università degli studi di Udine*, 2015
- [141] B. Jude e E. Lemaire, “L’ottimizzazione dei processi CIP (Clean-In-Space) nell’industria alimentare”, *Schneider Electric*, 2013
- [142] D. Fissore, Impianti CIP (Clean-in-place), *Politecnico di Torino*, 25, 2019

Ringraziamenti

Ai miei genitori, per essermi sempre stati vicini e per avermi insegnato i valori importanti nella vita che mi hanno reso il ragazzo che sono oggi.

A mio fratello, per essere stato la forza che mi ha aiutato nei momenti più difficili.

A mia sorella, per essere stata seppur lontana, sempre presente nel momento del bisogno.

A Savino, Sabino e Giada per essere state le persone che più di tutte mi hanno dimostrato lealtà e che mi hanno aiutato nei momenti di sconforto.

Alla mia famiglia per aver creduto in me.

A mio nonno Giacomo e mio zio Vito che da lassù mi guardano e mi proteggono.

A me stesso, per non aver mai mollato.