



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente

CORSO DI LAUREA IN
SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

**PRODUZIONE E SICUREZZA DELLA BIRRA: IMPORTANZA DEL CONTROLLO DELLA
CONTAMINAZIONE DA DEOSSINIVALENOLO (DON)**

Relatore:

Prof. Luca Sella

Laureando:

Giacomo Dalmonego

Matricola n. 1192184

ANNO ACCADEMICO 2023-2024

INDICE

RIASSUNTO	6
ABSTRACT	7
1. LA BIRRA	8
1.1 Cenni storici	9
1.2 Ingredienti principali	10
<i>1.2.1 Luppolo</i>	10
<i>1.2.2 Acqua</i>	11
<i>1.2.3 Lievito</i>	13
<i>1.2.3.1 Fasi del lievito durante la fermentazione</i>	14
<i>1.2.4 Orzo</i>	15
1.3 Processi di birrificazione	15
<i>1.3.1 Maltificazione</i>	15
<i>1.3.2 Macinazione</i>	16
<i>1.3.3 Ammostamento</i>	17
<i>1.3.4 Cottura del mosto/bollitura-luppolatura</i>	18
<i>1.3.5 Fermentazione</i>	18
<i>1.3.6 Filtrazione</i>	19
<i>1.3.7 Pastorizzazione</i>	20
<i>1.3.8 Imbottigliamento</i>	20
2. FOCUS SULL'ORZO	22
2.1 Produzione e domanda mondiale	23
2.2 Varietà e caratteristiche	23
2.3 Orzo distico da birra	24
2.4 Lavorazione	25

3. FUSARIUM	26
3.1 Specie patogene dell'orzo	28
3.1.1 <i>Fusarium graminearum</i>	28
3.1.2 <i>Fusarium culmorum</i>	29
3.2 Fusariotossine	30
3.3 Strategie di contenimento in campo	32
3.3.1 <i>Bacillus spp</i> contro <i>Fusarium graminearum</i>	33
3.3.2 <i>Pythium oligandrum</i> contro <i>Fusarium spp.</i>	34
3.4 Fattori che favoriscono l'infezione fungina durante la maltazione	34
4. DEOSSINIVALENOLO	36
4.1 Caratteristiche generali e formula chimica	36
4.2 Contaminazione da DON durante la birrificazione	37
4.2.1 <i>Influenza del cambio d'acqua sulla contaminazione da DON durante la maltazione</i>	39
4.3 Cenni di legislazione e linee guida	41
4.4. Metodi analitici per il suo rilevamento	43
4.4.1 <i>Metodo LC-MS/MS</i>	45
4.4.2 <i>Test ELISA</i>	45
4.5 Effetti tossici e potenziali rischi per la salute	46
5. STRATEGIE PER IL CONTROLLO DELLA CONTAMINAZIONE DA FUSARIUM E DON NELLA BIRRIFICAZIONE	51
5.1 Agenti di biocontrollo (BCA): proposte per l'industria birraria	51
5.2 Degradazione fotocatalitica del DON	54
6. CONCLUSIONI	58
7. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA	60

RIASSUNTO

Attraverso l'evoluzione delle conoscenze scientifiche, tecniche e produttive, relativamente all'alimentazione umana, nel tempo anche per la birra si è posta l'attenzione sulla sua sicurezza alimentare.

La birra è una bevanda alcolica tra le più diffuse e consumate al mondo, ottenuta attraverso la fermentazione dei cereali, principalmente orzo distico, acqua, lievito, luppolo ed eventuali altri ingredienti.

La qualità della birra dipende da più fattori: la salubrità delle materie prime utilizzate, i corretti processi di birrificazione e l'efficacia delle tecniche di controllo dei fattori alteranti che possono presentarsi durante la sua produzione.

Nello specifico, in questa tesi ci si focalizzerà su una delle problematiche più frequenti: la contaminazione dell'orzo da parte di funghi del genere *Fusarium*, sui fattori che ne favoriscono l'infezione e le tecniche di controllo e contenimento della contaminazione della micotossina deossinivalenolo (DON) prodotta da alcune specie di *Fusarium* e maggiormente riscontrata nella birra. Il DON, noto anche come vomitossina, è oggetto di ricerca da parte di numerosi studi data la sua pericolosità per la salute umana e animale. In questo elaborato verranno descritte le vie attraverso le quali il DON può contaminare la birra, le strategie di prevenzione e contenimento, sia in campo che durante la birrificazione, nello specifico con l'ausilio di tecniche come l'utilizzo di agenti di biocontrollo (BCA) e la fotocatalisi. A tale riguardo si accennerà anche alle normative e alle linee guida attualmente in vigore sulla materia, nonché agli effetti del deossinivalenolo sulla salute umana.

ABSTRACT

Through the evolution of scientific technical, and production knowledge related to human nutrition, over time attention has also been placed on the food safety of beer.

Beer is one the most widely consumed alcoholic beverages globally, produced through the fermentation of cereals, mainly two-row barley, water, yeast, hops and possible other ingredients. The quality of beer depends on several factors: the safety of the raw materials used, proper brewing processes and the effectiveness of techniques to control the factors that can affect it during production.

This thesis specifically focuses on a common issue: contamination of barley by the *Fusarium* fungus, on factors influencing its occurrence and techniques for controlling and limiting the mycotoxin deoxynivalenol (DON) produced by some *Fusarium* species, which is commonly found in beer.

DON, also known as vomitoxin, is the subject of numerous studies due to its dangerousness to human and animal health.

This paper will describe the ways in which DON can contaminate beer, prevention and containment strategies, both in the field and during brewing, specifically through techniques such as the use of biocontrol agents (BCA) and photocatalysis. Additionally, there will be a mention of current regulations and guidelines on the matter as well as the effects of deoxynivalenol on human health.

1. LA BIRRA

La birra è la bevanda più diffusa al mondo. Nel 2020, il consumo globale è stato stimato in 177,5 miliardi di litri. Il mercato della birra è dominato dalle grandi multinazionali, al punto che 40 aziende contribuiscono al 90% della produzione mondiale. In Europa, la tradizione birraria è una cultura fortemente radicata nei vari Paesi, con marcate differenze nelle preferenze di gusto e tipologie di produzione. L'Italia è agli ultimi posti con un consumo pro capite, che privilegia la qualità alla quantità, in costante crescita e che nel 2021 si è attestato intorno ai 36,8 litri annui (Il Sole 24 Ore). Nel nostro paese sono in grande espansione i microbirrifici e gli agribirrifici che promuovono la diffusione di birre speciali ed artigianali. Secondo il D.M. 212/2010, la birra prodotta dai birrifici agricoli viene considerata un prodotto agricolo, purché la materia prima sia coltivata in proprio nella misura non inferiore al 51%.

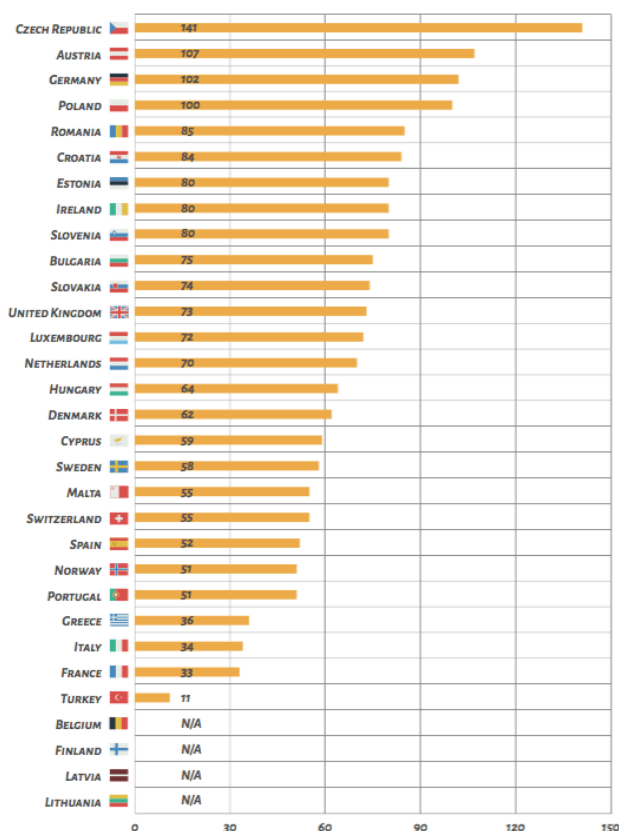


Tabella 1. Consumo di birra (in litri) pro-capite nei paesi EU nel 2018 (www.brewersofeurope.eu)

1.1 Cenni storici

La birra è una bevanda fermentata gassata ottenuta da cereali maltati. La sua produzione è una delle pratiche più antiche conosciute dall'umanità e risale a circa 7000 anni fa. Origina dall'antica regione della Mesopotamia (oggi geograficamente compresa tra Siria, Iraq, Iran e Kuwait), abitata dai Sumeri, considerati i primi birrai professionisti perché furono tra i primi a scoprire il processo della fermentazione, attraverso la pratica della panificazione. La birra ha avuto un significato sacro per queste antiche civiltà che la utilizzavano anche in medicina e nelle cerimonie religiose. In Egitto, ad esempio, era considerata liquido divino e purificante. Si riteneva che la birra avesse un legame con l'immortalità, tanto che alcuni costruivano birrerie in miniatura nelle loro tombe. I Greci la consumavano principalmente in occasione delle feste in onore di Demetra, la dea dell'agricoltura.

Gli etruschi furono i primi in Italia a produrre birra, influenzando anche i romani. Tra i popoli nordici, i Germani e i Celti erano noti bevitori di birra, essi svilupparono una forte tradizione legata a questa bevanda. Nel Medioevo, fu nei monasteri che si contribuì a migliorare la produzione della birra, introducendo il luppolo come ingrediente fondamentale che nel tempo divenne parte integrante del processo di birrificazione. Prima dell'uso del luppolo, la birra era aromatizzata con erbe e spezie.

Dopo la scoperta dell'America (1492), si svilupparono nuove tipologie di birra in tutta Europa e la birra a bassa fermentazione (bassa temperatura) divenne la più diffusa.

Nel 1516, in Germania venne emanata una legge "sulla purezza" (IL REINHEITSGEBOT) che imponeva l'utilizzo di tre soli ingredienti nella produzione della birra: orzo, luppolo e acqua.

La storia moderna della birra inizia però con le innovazioni scientifiche e tecnologiche della seconda metà del '700, cioè con la Rivoluzione industriale. Questo permise di trasformare la sua produzione in attività industriale, grazie all'automazione e all'invenzione dei termometri/densimetri per il controllo delle temperature e degli zuccheri disciolti nel mosto, del tostacaffè per la tostatura del malto. Ma furono i rilevanti progressi della microbiologia a modernizzare la produzione brassicola. A metà '800, il lavoro del chimico Louis Pasteur sul ruolo dei lieviti nella fermentazione portò ad un miglior controllo della flora microbica alterante.

Nel 1953, M. W. Coutts sviluppò la tecnica della fermentazione continua, metodo in cui la birra viene tenuta sotto pressione e al riparo dall'aria fino all'imbottigliamento. Tutte queste

innovazioni, insieme alla refrigerazione che consentiva il controllo delle temperature di fermentazione, allo sviluppo della logistica e del marketing hanno fatto oggi della birra un prodotto del mercato globale.

È quindi evidente come la birra sia stato e sia un elemento antichissimo dell'alimentazione umana, che ha attraversato i tempi e le civiltà, oggetto di sempre nuove tecniche e capacità di ricerca, al fine di migliorare la sua qualità, seguendo anche l'evoluzione dei gusti.

1.2 Ingredienti principali della birra

I quattro ingredienti impiegati nella brassificazione sono: il luppolo, l'acqua, il lievito e l'orzo. Essi svolgono ciascuno un ruolo fondamentale nell'assicurare un prodotto finale di qualità. Per la birra vengono utilizzati anche additivi quali: aromi, spezie, altri cereali aggiunti.

1.2.1 Luppolo

Il luppolo (*Humulus lupulus* L.) è una pianta rampicante, appartenente alla famiglia delle Cannabacee, che presenta fiori maschili e femminili su individui separati. I suoi tralci crescono sostenuti da pali fino ad una considerevole altezza (6-9 metri). La pianta produce infiorescenze alla fine dell'estate che vengono raccolte quando sono completamente mature. I fiori maschili non risultano interessanti per la birraificazione in quanto sprovvisti delle resine, le quali caratterizzano le peculiarità organolettiche ed olfattive. I fiori femminili (che per via della loro forma vengono chiamati "coni") sono invece ricchi di ghiandole resinose dalle quali viene secreta la luppolina, sostanza di color giallo intenso e principale artefice del sapore amaro e dell'aroma della birra.

La luppolina è costituita da α -acidi (principalmente composti da umulone, coumulone e adumulone) in grado di conferire maggiore amaricatura, β -acidi (principalmente composti da lupulone, colupulone e adlupulone), polifenoli ed oli essenziali, alcuni dei quali contribuiscono al profumo della birra.

Il luppolo possiede anche proprietà antibatteriche e, combinandosi con le componenti proteiche della birra, aiuta a mantenere la schiuma. Le varietà di luppolo di alta qualità e aromatiche conferiscono un amaro morbido e piacevole, mentre quelle meno costose e con rese più elevate

conferiscono sapori più intensi. Dopo la raccolta, il luppolo viene immediatamente essiccato per ridurre l'umidità al di sotto del 14%.

Del luppolo si utilizzano i fiori interi o ciò che rimane dopo la rimozione di rachidi e petali per aumentare il contenuto di resine, oli essenziali e tannini. Questi prodotti concentrati vengono ottenuti in stabilimenti specializzati, non direttamente nelle birrerie.

Il luppolo amaro viene aggiunto durante l'ebollizione del mosto, mentre quello aromatizzante viene aggiunto durante la maturazione della birra, processo noto come "luppolatura a secco", "luppolatura a freddo" o "dry hopping" che conferisce un aroma floreale più pronunciato.

Anche questa pianta può essere contaminata da *Fusarium* e quindi contribuire alla formazione di micotossine; fortunatamente la quantità di luppolo utilizzata è limitata rispetto a quella del malto, che resta il principale responsabile della comparsa di micotossine nella birra.

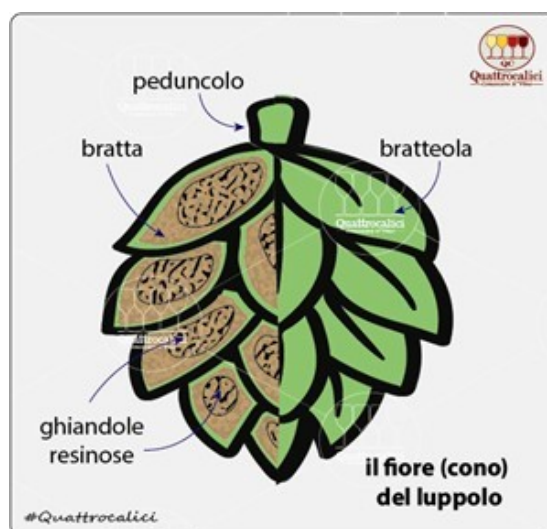


Figura 1. Infiorescenza femminile del luppolo (www.quattrocalici.it)

1.2.2 Acqua

L'acqua costituisce l'80-90% della birra e le sue caratteristiche contribuiscono a definirne il profilo. In passato infatti, l'acqua ha contribuito a creare diversi e specifici stili di birra collegati alle peculiarità del territorio dove essa veniva prodotta. Le caratteristiche chimico-fisiche dell'acqua oggi vengono gestite attraverso impianti di trattamento che permettono di stabilizzarle secondo le

esigenze di produzione: riduzione della durezza, salificazione, osmosi inversa, eliminazione di eventuali contaminanti. I valori principali dell'acqua di cui si deve tenere conto sono: la durezza, la quantità di sali disciolti all'interno e il pH.

La durezza si misura generalmente in gradi francesi con una scala che parte dallo zero e va salendo. Più la misura della durezza si avvicina allo zero e più un'acqua viene detta dolce, mentre quando si ha una misura più alta essa verrà definita dura. La durezza misura il contenuto di ioni di calcio e magnesio presenti nell'acqua. Le acque dolci sono adatte soprattutto per birre chiare e maltate ed in generale per quelle a bassa fermentazione, mentre le acque dure vengono utilizzate per ottenere birre scure.

Misure della durezza dell'acqua

La durezza viene generalmente espressa in **gradi francesi** (°f), dove un grado rappresenta 10 mg di carbonato di calcio (CaCO₃) per litro di acqua:

1 °f = 10 mg/l = 10 ppm.

CLASSIFICAZIONE DELLE ACQUE IN BASE ALLA DUREZZA

TIPO DI ACQUA	°F
Molto dolce	0÷4
Dolce	4÷8
Medio-dura	8÷12
Discretamente dura	12÷18
Dura	18÷30
Molto dura	>30

Tabelle 2 e 3. Misure e classificazione dell'acqua (www.slideplayer.it)

I sali minerali sono componenti molto variabili nelle acque. Oltre al calcio - che abbassa il pH in fase di ammostamento, migliora l'efficienza enzimatica nel mosto e favorisce la flocculazione del

lievito - e al magnesio, nella birrificazione è utile conoscere i livelli di sodio che conferiscono una nota sapida e rotondità alla birra, di cloruro, che in dosi importanti esalta la parte maltata, di solfati, che evidenziano l'amaro dei luppoli, dei carbonati, che diminuiscono l'effetto acidificante dei malti scuri/torrefatti. Sono quindi estremamente rilevanti le caratteristiche organolettiche dell'acqua per definire la tipologia di birra voluta.

Nella brassazione è importante anche il pH dell'acqua che viene misurato rapportando la quantità dello ione idrogeno (H^+) e dello ione idrossido (OH^-) nell'acqua. Valori di pH di 5,2-5,4 sono considerati ottimali perché gli enzimi svolgano efficacemente l'estrazione degli zuccheri nella fase di mash, favorendo la solubilizzazione delle proteine, delle sostanze amare ed il colore della birra.

Per avere acque perfette (o che si avvicinino il più possibile all'ideale), molti birrai trattano l'acqua aggiungendo sali o acidi per migliorarne i parametri. Altri birrifici, al contrario, preferiscono studiare le tipologie di birra da produrre e adattarsi in base al tipo di acqua che hanno a disposizione.

1.2.3 Lievito

È un microrganismo unicellulare appartenente al regno dei funghi. Una cellula di lievito ha dimensioni che variano dai 5 ai 10 micron e si compone di una membrana cellulare che avvolge il citoplasma al cui interno si trovano gli organelli che sono responsabili delle reazioni metaboliche.

Il lievito guida il processo di fermentazione alcolica, trasforma gli zuccheri in alcol etilico e anidride carbonica, crea vari composti secondari, in particolare esteri ed alcol superiori. Questi, insieme agli oli essenziali rilasciati dalla pianta del luppolo, conferiscono il profumo caratteristico alle birre. La proporzione di esteri ed alcol superiori varia a seconda dei diversi tipi e ceppi di lievito.

Nella produzione della birra si adottano principalmente due varianti di lievito. Il primo è il *Saccharomyces carlbergensis*. Questo particolare tipo di lievito lavora ottimamente a temperature comprese tra 5-10°C e, una volta terminata la sua opera, tende a posarsi sul fondo del fermentatore, formando una sorta di marmellata di lievito denso con un'umidità del 70-80%, che può essere riutilizzata. Il secondo, noto come *Saccharomyces cerevisiae*, predilige temperature tra 15-25°C e dà vita a catene cellulari che intrappolano le bollicine di anidride carbonica, le quali, risalendo, spingono verso l'alto la massa di lievito, creando una sorta di strato superficiale che può essere raccolto con ampi cucchiari per eventuale uso futuro.

1.2.3.1 Fasi del lievito durante la fermentazione

La prima fase è l'inoculo del lievito nel fermentatore. È importante verificare che il lievito sia idratato e ad una temperatura che eviti shock termici alle sue cellule.

La seconda è la fase logaritmica (fase log) in cui le cellule del lievito si riproducono molto velocemente. Dapprima il lievito consuma l'ossigeno e altri nutrienti e successivamente converte gli zuccheri in alcol e anidride carbonica.

Nella fase stazionaria, il lievito, dopo aver consumato la quasi totalità degli zuccheri, a causa delle limitazioni dei nutrienti e dell'accumulo di sostanze tossiche, smette di moltiplicarsi ed inizia a flocculare e precipitare.

Da qui in poi, nella fase finale, detta "fase di morte", l'accumulo di sostanze tossiche o altri stress ambientali porta alla diminuzione della vitalità e alla morte delle cellule di lievito.

Il metabolismo del lievito può influire direttamente sulle micotossine trasformandole in forme meno tossiche, cioè in micotossine mascherate o modificate. Tuttavia può agire anche in senso opposto, cioè smascherare le tossine mascherate.

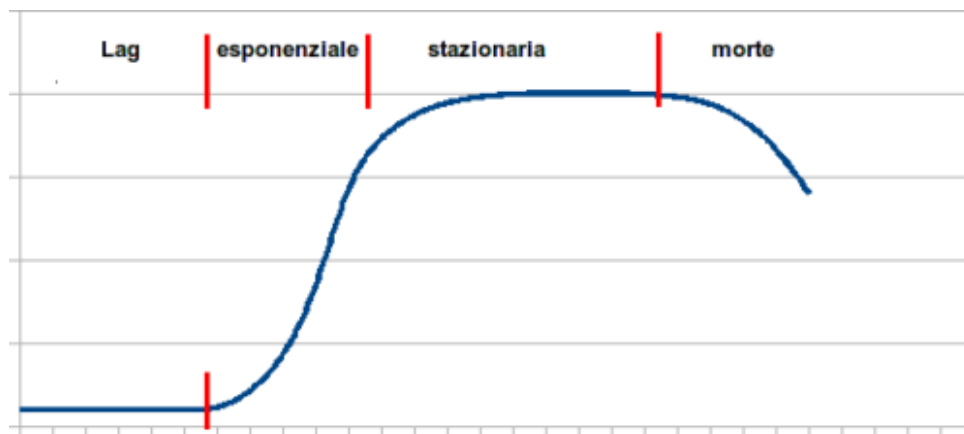


Figura 2. Curva del lievito (www.wikipedia.org)

1.2.4 Orzo

È il cereale più comune nell'industria birraria. Questa pianta cresce in maniera prospera in varie condizioni climatiche e a latitudini diverse. I suoi chicchi sono ricchi di enzimi e le bucce sono particolarmente utili durante il processo di maltazione e filtrazione del mosto. L'orzo infatti viene quasi sempre sottoposto a maltatura poiché crudo porta a risultati insoddisfacenti. Con una quantità di orzo crudo superiore al 10% infatti, emergono difficoltà nella filtrazione della miscela e una conseguente diminuzione del gusto delle birre ottenute (sentore erbaceo, sgradevole) rispetto a quelle realizzate con orzo maltato.

Tuttavia, per le birre scure, come le *stout*, si impiega l'orzo torrefatto, quindi non maltato, il quale conferisce alla birra un colore molto scuro e un sapore caratteristico. Per ottenere birre di alta qualità, si preferisce usare l'orzo distico, i cui chicchi crescono solamente in due direzioni (da qui il nome) mentre altre varietà d'orzo (esastico, tetrastico, ecc.) possono contribuire ad un sapore della bevanda leggermente astringente.

1.3 Processo di birrificazione

Il processo di produzione della birra è il procedimento attraverso il quale l'orzo o altri cereali vengono trasformati in birra. Esso può essere suddiviso in diverse fasi di cui, qui di seguito, si riporta una panoramica.

1.3.1 Maltificazione

Conosciuta anche come "maltazione", costituisce il fondamentale processo di germinazione dei cereali, tra cui l'orzo, utilizzato nella creazione della birra ed il preferito dai birrai. Questa fase coinvolge il trattamento del cereale preparandolo all'estrazione degli zuccheri necessari per la fermentazione.

La maltificazione comincia con la selezione e la pulizia dell'orzo, seguita dall'immersione dei chicchi nelle vasche di macerazione contenenti acqua ad una temperatura controllata (solitamente fra i 12-15°C), per un periodo di circa 40 ore. In seguito, i chicchi umidi vengono stesi su un pavimento nella cosiddetta "stanza di germinazione", lasciandoli esposti all'ossigeno ed all'umidità per stimolare questo processo. Durante questa fase, i germogli iniziano a svilupparsi sui chicchi,

raggiungendo circa i due terzi della loro lunghezza, misura considerata dai birrai il punto ottimale di germinazione. A questo punto, essa viene interrotta e il cereale, definito ora “malto verde”, viene sottoposto a temperature elevate in un forno di essiccazione.

Questa fase è cruciale per impedire che i chicchi continuino a germinare e per stabilizzare il malto, le cui proteine potrebbero causare problemi di intorbidamento e alterazione del sapore della birra. Al malto vengono tolti i germi e le radichette, dove peraltro si concentra una parte rilevante di deossinivalenolo (DON).

A seconda della temperatura a cui vengono sottoposti i chicchi durante questa fase, si otterranno diversi tipi di malto, che possono conferire caratteristiche specifiche alla birra finale. Ad esempio, una temperatura di circa 80°C produrrà malto per birre chiare, mentre temperature più elevate genereranno malto per birre più scure.

1.3.2 Macinazione

Costituisce un fondamentale passaggio del processo di birrificazione, poiché si occupa di ridurre i grani del cereale in polvere o frammenti, preparandoli per la successiva fase di produzione.

Vi sono due tipi di approcci: la macinatura a secco e la macinatura umida. La scelta fra le due dipende dalle esigenze specifiche della produzione del malto, quindi dalla birra che si intende produrre e dalle preferenze del birraio, tenendo conto dei vantaggi e degli svantaggi di ciascun metodo.

La macinazione a secco rispetto a quella umida ha come vantaggi:

- ✓ l'efficienza energetica poiché non coinvolge l'aggiunta di liquidi che richiedono ulteriori processi di evaporazione;
- ✓ il controllo della qualità, infatti, esso permette di avere una maggior gestione sulla consistenza e la distribuzione delle particelle di malto, essenziale per ottenere risultati uniformi durante la successiva fase di ammostamento;
- ✓ un minore rischio microbiologico, infatti, l'assenza di umidità rende più difficoltosa la crescita di microrganismi indesiderati.

Fra gli svantaggi invece si citano:

- ✓ la maggior usura degli strumenti per mancanza di lubrificazione data dall'acqua;
- ✓ la polverizzazione dei chicchi di malto d'orzo, in quanto l'ottenimento di un corpo farinoso eccessivo può portare all'estrazione inefficace dell'amido e quindi degli zuccheri.

1.3.3 Ammostamento

Durante questa fase il malto macinato viene mescolato con acqua calda. L'obbiettivo principale dell'ammestamento è l'estrazione degli zuccheri dal malto, che saranno successivamente fermentati dai lieviti per produrre alcol ed anidride carbonica.

L'ammestamento comprende diverse fasi chiave:

- ✓ la mescolatura, dove il malto macinato viene miscelato con acqua calda a temperatura specifica, di solito intorno ai 65-75°C, per attivare gli enzimi nel malto responsabili della conversione degli amidi in zuccheri;
- ✓ il mash, dove gli enzimi del malto cominciano ad agire sugli amidi, spezzandoli in zuccheri fermentabili come il glucosio e il maltosio;
- ✓ il riscaldamento, dove la temperatura della miscela d'acqua calda e malto può essere regolata per favorire reazioni enzimatiche specifiche. Generalmente, si hanno periodi a temperature leggermente più basse, quindi 62-67°C, in cui prevale l'azione di enzimi che producono zuccheri e periodi a temperature più alte, fra i 71-75°C, che promuovono la loro dissoluzione;
- ✓ la filtrazione, dove il mosto zuccherino ottenuto viene separato dai residui solidi di malto attraverso un processo di filtrazione. Questo passaggio elimina i solidi e produce un mosto chiaro che sarà utilizzato per la fase successiva.

Il mosto chiaro, ottenuto dall'ammestamento, è il punto di partenza per il processo di ebollizione in cui vengono aggiunti il luppolo e altri ingredienti. L'efficacia dell'ammestamento influisce significativamente sulla qualità e sul profilo del sapore della birra finale.

1.3.4 Cottura del mosto/bollitura-luppolatura

In questa fase il mosto viene portato ad ebollizione in un grande pentolone. Durante la bollitura, si aggiungono i luppoli che contribuiscono all'aroma, al sapore amaro e alla conservazione della birra. La bollitura dura generalmente da 60 a 90 minuti e in questa fase i luppoli vengono aggiunti in momenti diversi, per primi quelli che conferiscono amarezza e nella parte finale (15-30 minuti) quelli per conferire l'aroma. Infine, dopo la bollitura, il mosto viene raffreddato rapidamente per arrestare il processo di cottura. In seguito, il mosto viene trasferito all'interno del fermentatore.

1.3.5 Fermentazione

È una delle fasi cruciali nel processo di produzione della birra durante la quale il mosto zuccherino ottenuto dalla macerazione e dalla bollitura viene trasformato in birra grazie all'introduzione del lievito, microrganismo che consuma gli zuccheri presenti nel mosto e li trasforma in alcool etilico e anidride carbonica.

Sono due i principali tipi di lievito utilizzati nella birrificazione: il lievito *Saccharomyces cerevisiae* (alta fermentazione) e il lievito *Saccharomyces carlbergensis* (bassa fermentazione).

L'alta fermentazione avviene a temperature comprese tra i 15°C e i 25°C. Qui i lieviti si trovano sulla superficie del mosto perché l'anidride carbonica prodotta li spinge verso l'alto formando agglomerati. I lieviti ad alta fermentazione producono una maggiore quantità di esteri ed alcoli superiori e per questo le birre risultano con note più fruttate. Alcuni esempi di birre realizzate con questo tipo di lievito sono le *Ale*.

Nella bassa fermentazione invece le temperature si aggirano intorno ai 10°C e i lieviti si depositano sul fondo. La ridotta temperatura riduce anche il metabolismo e la produzione di esteri e alcoli superiori. La birra pertanto risulta con aromi di malto e luppolo più accentuati. Le birre di questo tipo sono chiamate *Lager*.

L'aggiunta del lievito avviene dopo il raffreddamento del mosto. All'interno del fermentatore si avvia così il processo di fermentazione che prevede quattro diverse fasi corrispondenti alla curva della crescita del lievito.

Qui di seguito se ne evidenziano i passaggi:

- ✓ *fermentazione primaria*: durante questa fase il lievito è molto attivo e si moltiplica rapidamente. La temperatura è controllata con cura e in base al tipo di birra che si sta producendo. Le *Ale* infatti fermentano generalmente a temperature più alte rispetto alle *Lager*. Durante la fermentazione primaria, il lievito converte gli zuccheri in alcool, anidride carbonica ed altri composti che influenzano il sapore e l'aroma della birra;
- ✓ *fermentazione secondaria*. Questa seconda fermentazione è opzionale e viene portata avanti per alcune birre, le quali vengono trasferite in un secondo fermentatore per un periodo aggiuntivo di maturazione. Questo passaggio può migliorare la chiarezza ed il sapore della birra;
- ✓ *maturazione*. Dopo la fermentazione la birra è spesso lasciata a maturare per un periodo di tempo che permette la pulizia e il miglioramento dei suoi sapori. Questa fase può durare da qualche settimana a diversi mesi, a seconda del tipo di birra;
- ✓ *condizionamento*. Talvolta la birra può essere condizionata con anidride carbonica (CO₂) o zucchero, aggiunti prima dell'imbottigliamento per conferire l'effervescenza e la carbonatazione.

Diversi elementi incidono sulla resa fermentativa del lievito. La temperatura ha un ruolo fondamentale, infatti, se essa supera i 25°C, oltre ai pericoli di contaminazione batterica, può generare odori indesiderati. Se invece è troppo bassa diminuirà l'attività metabolica del lievito. Anche la corretta presenza di nutrienti (ad esempio, azoto, ossigeno, vitamine o enzimi ausiliari) rappresenta un elemento da considerare, la loro carenza infatti potrebbe interrompere prematuramente il processo di fermentazione.

Altre variabili richiedono attenzione, come l'equilibrio del pH nel mosto, il grado Plato iniziale e la concentrazione finale dell'alcol.

La fermentazione, insieme alla gestione appropriata del lievito, costituisce il fulcro essenziale per ottenere birra di qualità, ma non può essere disgiunta dalle altre fasi.

1.3.6 Filtrazione

Lo scopo principale della filtrazione è rimuovere le particelle indesiderate come il lievito residuo, le proteine e i sedimenti che potrebbero influire sulla limpidezza e sulla stabilità della birra. Questo

passaggio coinvolge l'utilizzo di specifici filtri che consentono di eliminare queste impurità. La birra filtrata pertanto risulterà più chiara e trasparente.

1.3.7 Pastorizzazione

È un processo termico utilizzato per prolungare la durata di conservazione della birra. Dopo la filtrazione, la birra viene riscaldata per un breve periodo di tempo a temperature di circa 60-70°C. Questo trattamento uccide i microrganismi rimanenti, tra cui i lieviti e i batteri, che col tempo potrebbero causare deterioramento o fermentazioni indesiderate. La pastorizzazione aiuta a stabilizzare la birra e prevenire la formazione di sedimenti o sapori indesiderati durante la conservazione.

Filtrazione e pastorizzazione contribuiscono a migliorare la qualità e la shelf life della birra garantendo che il prodotto rimanga fresco e gustoso per un periodo più lungo prima di essere consumato. Queste due fasi di processo non riguardano la produzione di birre artigianali.

1.3.8 Imbottigliamento

È la fase conclusiva del processo. La birra viene trasferita dai serbatoi di fermentazione o maturazione alle bottiglie/lattine/fusti, chiusi ermeticamente e destinati alla distribuzione e al consumo.

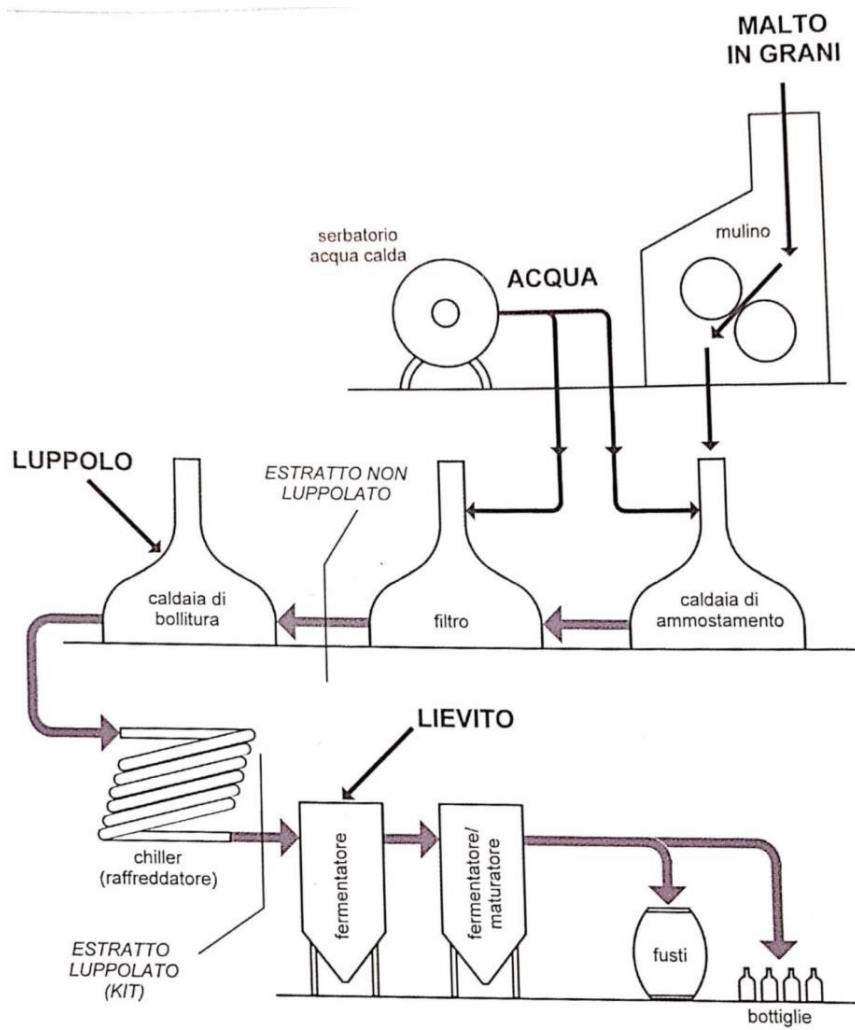
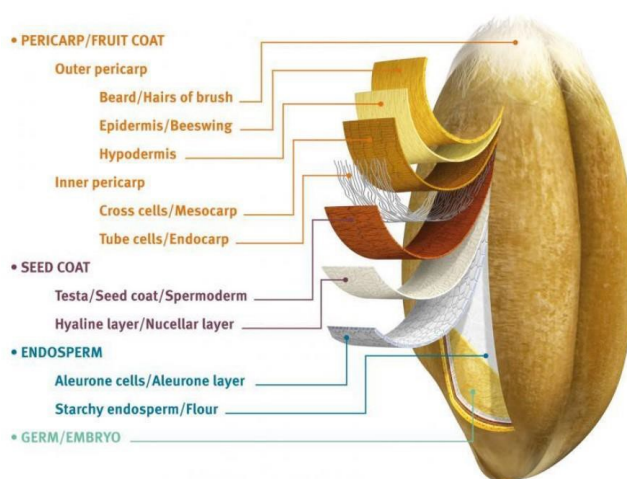


Figura 3. Fasi di produzione della birra (www.associazioneeuro.org)

2. FOCUS SULL'ORZO

L'orzo è noto scientificamente come "*hordeum vulgare*". La sua trasformazione in malto è gestibile con relativa facilità. Le bucce favoriscono la separazione del mosto dai residui insolubili e la composizione del mosto di malto d'orzo è ideale per le esigenze del lievito poiché contribuisce in modo ottimale al sapore della birra finita.

Gli enzimi, sia nell'orzo che nel malto, svolgono un ruolo fondamentale nella conversione di sostanze complesse in sostanze più semplici, come la trasformazione dell'amido in zuccheri e delle sostanze azotate ad alto peso molecolare in amminoacidi, essenziali per il metabolismo del lievito. Senza l'orzo, la produzione della birra non sarebbe possibile.



Umidità 13-15%
Carboidrati 70-85%
Proteine 10-12%
Sali 2-4%
Grassi 2%
Altro 1-2%

Figura 4 e tabella 4. Cariosside dell'orzo e sua composizione (www.associazioneeuro.org)

2.1 Produzione e domanda mondiale

L'orzo occupa la quarta posizione tra i cereali a livello globale. Si prevede che per soddisfare la domanda mondiale nel 2050 la richiesta di orzo debba aumentare del 54%. In Italia, circa 350.000 ettari sono dedicati alla sua coltivazione. La produzione oscilla intorno alle 95.000 tonnellate all'anno da cui si ricavano 78.000 tonnellate di malto destinato alla produzione di birra. Per ogni ettolitro di birra sono necessari circa 15 chilogrammi di malto.

Dato il recente aumento della domanda che si attesta sulle 170.000 tonnellate circa, si ricorre all'importazione di una parte importante del fabbisogno. Tuttavia, il problema della disponibilità del cereale è reso più complesso a causa della crescente diffusione della *Fusarium Head Blight (FHB)*. Questa fitopatia è responsabile di gravi perdite di raccolto delle quali soffrono anche le industrie del malto che necessitano e richiedono soluzioni chimico-biologiche efficaci contro questa malattia.

2.2 Varietà e caratteristiche

Dal punto di vista botanico, le varietà di orzo vengono distinte in base al numero di file di grani della spiga:

- ✓ orzo distico che presenta solo due file di grani, in posizione alterna (two-row);
- ✓ orzo polistico esastico, ovvero a sei file di semi, con cariossidi disposte a raggiera regolare (six-row);
- ✓ orzo polistico esastico con cariossidi laterali molto divaricate, disposte diversamente e sovrapposte (six-row).

La selezione delle varietà ha una grande importanza.

Le varietà two-row hanno chicchi più grossi e maggior rendimento delle varietà six-row e presentano contenuti di azoto, proteine inferiori e glume più piccole. La maggior parte di quelle usate ha spighe con un'inclinazione di circa 30° - intermedia tra le specie *hordeum erectum* e *hordeum nutans* - che si piegano durante il riempimento. Le nuove cultivar d'orzo si caratterizzano per una struttura della paglia più debole e quindi per un'alta resa di granella per ettaro.

2.3 Orzo distico da birra

L'orzo da birra impiegato tradizionalmente e che fornisce le maggiori prestazioni qualitative è costituito dalle varietà distiche. Vengono scelte varietà d'orzo a due file perché forniscono cariossidi più uniformi e grosse che permettono di mantenere un equilibrio ottimale degli enzimi, un processo di germinazione più uniforme e, nel complesso, un comportamento molto regolare nella fase di maltazione. In Italia, tra le più diffuse varietà vi sono: Braemar, Tea, Scarlett, Aldebaran, Pariglia, Tunika e Beta.

L'orzo polistico può essere utilizzato ma, se si vogliono ottenere birre di altissima qualità, è preferibile il malto da orzo distico primaverile.

Negli ultimi 30 anni la ricerca scientifica ed agraria ha perseguito tre principali obiettivi: la creazione di varietà resistenti alle malattie, l'aumento della resa per ettaro e l'ottenimento di varietà con steli di altezza limitata per contrastare l'allettamento dovuto a piogge o venti intensi, che può causare la formazione di micotossine.

In Italia sono state avviate sperimentazioni sull'orzo distico sin dal 1953. In Umbria, il CERB (Centro di eccellenza sulla ricerca della birra) effettua sperimentazioni sulle caratteristiche delle varietà e i raccolti vengono annualmente sottoposti a micromaltaggio per valutarne le prestazioni.

Nel nostro paese c'è quindi un'attenzione speciale alla selezione delle varietà, scelte in base alla loro maturazione precoce, in quanto già a maggio si hanno temperature elevate (fenomeno detto "stretta") che possono bloccare lo sviluppo prima della completa maturazione. Questo porta ad avere chicchi più piccoli con una relazione sfavorevole tra la scorza ed il contenuto (il contrario di ciò che un birraio desidera in termini di qualità) e a una minore resa cerealicola.



Figura 5. Orzo di varietà distica e Figura 6. Orzo di varietà esastica
(www.giornaledellabirra.it)

2.4 Lavorazione

È importante che l'orzo da birra sia sano, privo di contaminanti, con un buon odore e un'umidità inferiore al 14% per poter essere stoccato senza rischio di deterioramento e con un'elevata capacità di germinazione.

In Italia, l'orzo matura durante il mese di giugno, quando le temperature durante la raccolta superano i 30°C ed è quindi essenziale raffreddarlo per preservarne la capacità di germogliare. Uno studio approfondito, condotto dall'azienda Carlsberg, ha dimostrato che se l'orzo rimane a questa temperatura dopo circa sei settimane non germina più ed è suscettibile all'attacco di varie muffe. Di conseguenza, è necessario ridurre la temperatura a valori inferiori ai 15°C il prima possibile. Tuttavia, il raffreddamento di migliaia di tonnellate d'orzo comporta costi significativi.

Le malterie italiane, che raccolgono l'orzo con un'umidità dell'11-12% e quindi privo di malattie anche grazie al clima mediterraneo, evitano i costi dell'essiccazione, a differenza delle malterie in altre regioni dove spesso l'orzo ha un'umidità del 16-17% e deve essere essiccato.

Per ottenere una birra di alta qualità è importante che tutti i chicchi abbiano le stesse dimensioni, in modo che possano assorbire l'acqua uniformemente durante la macerazione. Per questo motivo l'orzo viene setacciato in malteria per separare i chicchi più piccoli. Attualmente, vengono lavorati solo i chicchi di prima qualità, con un diametro non inferiore ai 2,5 millimetri.

3. FUSARIUM

Le piante sono costantemente esposte a un'ampia gamma di stress biotici (ad esempio funghi, batteri e parassiti) e abiotici (ad esempio siccità e ristagno idrico), (Badea et al., 2023). Il *Fusarium* è un genere di fungo filamentoso scoperto nel 1809 dal botanico J.H.F. Link. Alcune sue specie sono agenti patogeni che causano stress biotici alle piante. Largamente riscontrati nei cereali, sono tra i fattori principali che minacciano la produzione agricola con perdite globali della produzione che vanno dall'8 al 40% circa. Inoltre producono micotossine potenzialmente dannose per l'uomo e gli animali (Ntushelo et al., 2019).

A condizionare la presenza di *Fusarium* concorrono le pratiche agricole, la composizione del suolo, la rotazione delle colture e le condizioni meteorologiche che ogni anno possono essere diverse. Alcuni ricercatori (Perrone et al., 2020) sospettano anche una notevole modifica sia del profilo fungino che della risposta delle piante all'infezione dovuta al cambiamento climatico (CC). Infatti, il riscaldamento globale non avrà solo un impatto sulle interazioni ospite-patogeno, ma potrebbe favorire l'emergere di nuove malattie e cambiamenti nella biodiversità del microbioma fungino a causa delle fluttuazioni nelle loro nicchie ecologiche. Ciò comporterà modifiche nella comparsa, nell'attività e nella struttura della comunità dei patogeni fungini. Inoltre, anche le condizioni degli ospiti verranno alterate.

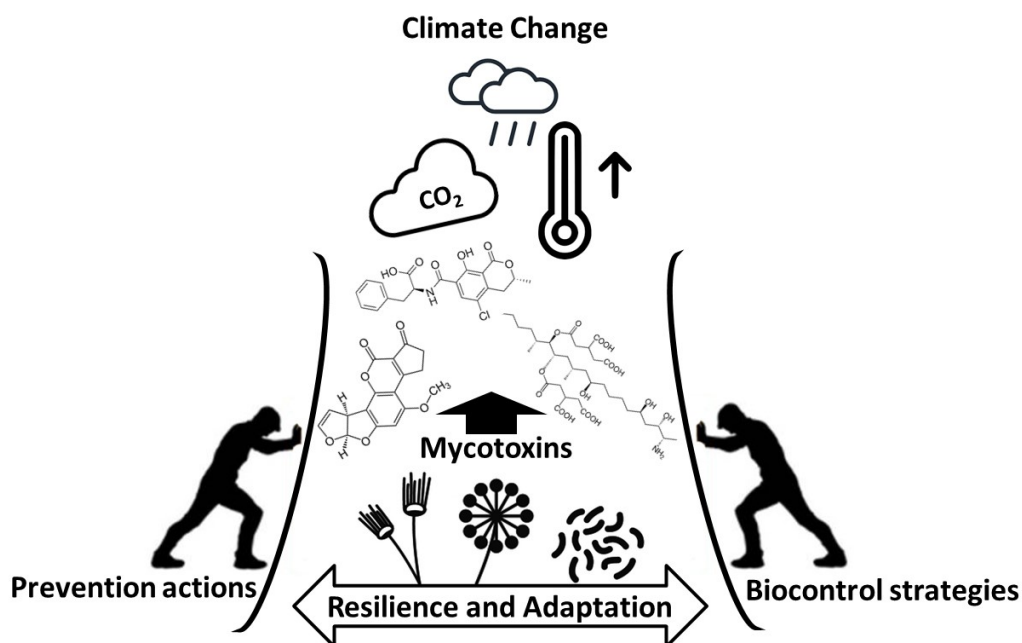


Figura 7. CC e fattori di interazione dell'agroecosistema (Perrone, 2020)

I funghi possono permanere nel suolo anche anni, disperdersi nell'aria, diffondersi durante il trasporto e all'interno dei magazzini di stoccaggio se i cereali non vengono conservati correttamente, cioè considerando temperatura, aerazione e umidità adeguate. L'infezione da specie di *Fusarium* quali *Fusarium graminearum* e *culmorum* (vedi capitolo 3.1) può compromettere in modo significativo la composizione del cereale e dei suoi enzimi, che successivamente saranno coinvolti nella produzione della birra.

I chicchi d'orzo, la cui umidità iniziale non dovrebbe superare il 13%, offrono un nutrimento ricco per la crescita e lo sviluppo di questi microrganismi, specie nella maltazione, quando si creano condizioni estremamente favorevoli per il loro sviluppo e per la produzione e l'accumulo delle micotossine.

L'industria birraria è quindi molto attenta alle possibili contaminazioni che possono alterare la qualità e salubrità della birra e non garantiscono un adeguato livello di sicurezza alimentare.

3.1 Specie patogene dell'orzo

Le specie appartenenti al genere *Fusarium* sono centinaia. Tra queste, le specie *F. graminearum* e *F. culmorum* colpiscono particolarmente l'orzo causando perdite della resa agricola, della qualità dei raccolti, producendo al contempo micotossine. Il cereale colpito dal fungo diventa pertanto inadatto ai processi di maltazione della birra. (Drakopoulos et al., 2021).

Il momento più propizio per l'infezione avviene tra la fase di spigatura e quella di fioritura. Le spore dei *F. graminearum* e *F. culmorum* possono giungere dai residui sul terreno o dalle foglie basali infette fino alle spighe, in presenza di pioggia persistente il cui ruolo è determinante per l'avvio del processo d'infezione (umidità relativa dell'aria >80%). Le spore, germinando, penetrano i tessuti della spiga e da lì si diffondono (con le proprie ife) invadendola progressivamente. La velocità di diffusione dipende dalla temperatura e dalla disponibilità di acqua libera nei tessuti vegetali (water activity). Durante la fase di invasione, i funghi capaci di sintetizzare micotossine accumulano questi composti tossici nei tessuti vegetali.

Quando l'orzo viene colpito dal fungo si verifica una diminuzione del suo valore nutritivo, con frazioni d'amido e proteine più basse, perdita di colore e variazioni nell'odore e nel gusto (Mastanjevic et al., 2018).

3.1.1 *Fusarium graminearum*

Fusarium graminearum, classificato come quarto patogeno fungino più significativo (Dean et al., 2012), è un fungo ascomicete, noto anche come *Gibberella zeae*, che insieme al *Fusarium culmorum* rappresenta la specie più diffusa di *Fusarium* nell'area del Mediterraneo. Le fitopatie indotte da tali funghi includono la fusariosi della spiga (*Fusarium Head Blight, FHB*) che conduce alla precoce dissecazione delle spighe, e il mal del piede (*Foot and Root Rot, FRR*), una malattia che comporta alterazioni nella parte inferiore del fusto.

Il patrimonio genetico di *Fusarium graminearum* include circa 11.640 geni (Kemper et al., 2006), tra i quali rientrano quelli deputati alla produzione di micotossine che hanno un ruolo cruciale durante il processo infettivo. Sia *F. graminearum* che *F. culmorum* sintetizzano i tricoteceni mediante il complesso genico denominato "Tri". Tra questi, i principali sono il nivalenolo (NIV) e il deossinivalenolo (DON), che favoriscono la necrosi dei tessuti della pianta ospite. Il fungo produce anche la micotossina zearalenone (ZEA), non essenziale nell'infezione.

La crescita ottimale di *F. graminearum* si raggiunge tra i 24.5 – 25.5°C in combinazione con una “water activity” di 0.997 – 0.995. Il tasso di crescita diminuisce con la diminuzione dell’attività dell’acqua e il valore <0.920 può essere considerato valore soglia (Neagu e Borda, 2013).



Figura 8. Macroconidi di *Fusarium graminearum*
(www.wikipedia.org)

3.1.2 *Fusarium culmorum*

Fusarium culmorum è un fungo ascomicete molto diffuso che causa malattie in vari cereali ed ha attitudine saprofitaria. Le fitopatie da esso causate sono simili a quelle del *F. graminearum* e si possono verificare sia in campo che in fase di stoccaggio. Il *F. culmorum* produce micotossine quali: deossinivalenolo, zearalenone e fusarina che contaminano i prodotti e causano sindromi tossiche all’uomo e agli animali.

Buona parte del genoma del *Fusarium culmorum* è ancora sconosciuto, tuttavia si sono individuati geni coinvolti nella produzione dei tricoteceni e si sono identificate specifiche proteine che prendono parte all’effetto schiuma nella birra (gushing), del quale è responsabile anche il *Fusarium graminearum* (Sarlin et al., 2012).

Il *Fusarium culmorum* si manifesta in campo con segni di ruggine, macchie color marrone e puntini biancastri sui semi nel mal del piede, e con schiaritura delle spighe, ruggine, semi scuri e piccoli in caso di fusariosi della spiga. La sua comparsa è fortemente correlata alle condizioni ambientali: cresce ottimamente con una “water activity” pari a 0,98 (soglia di crescita minima a 0,90) e temperature tra i 15°C e i 25°C, con disponibilità di carbonio e azoto, le quali possono aumentarne l’aggressività (Hope et al., 2005).



Figura 9. Sintomi di *Fusarium culmorum* su radice, stelo e nodi
(www.wikipedia.org)

3.2 Fusariotossine

La produzione della birra rappresenta uno dei procedimenti più complessi e sensibili nell’industria alimentare, sia sotto il profilo biochimico che fisico. Infatti, essa può essere soggetta a contaminazione da parte di varie micotossine provenienti dai cereali maltati o non maltati che si utilizzano.

Le fusariotossine costituiscono i derivati metabolici secondari dei funghi appartenenti al genere *Fusarium* e fungono altresì da indicatori della qualità e della sicurezza dei cereali. Come scritto

sopra, rappresentano una minaccia per la salute umana e animale e risulta quindi cruciale determinare la concentrazione di tali sostanze prima che i cereali siano sottoposti alla maltazione. La ricerca sviluppa costantemente nuovi approcci per individuare e quantificare concentrazioni sempre più ridotte di micotossine e dei loro derivati. Oggi sono classificate diverse centinaia di sostanze, delle quali circa 200 sono appartenenti al gruppo dei tricoteceni; tra questi il deossinivalenolo e lo zearalenone che appartengono al gruppo B di questa classe (Lu L. et al., 2022).

È noto che le micotossine manifestano una notevole resistenza alle elevate temperature impiegate durante la produzione di malto e ai valori di pH più bassi come quelli presenti nella birra. La maggior parte degli studi riconosce i tricoteceni come le micotossine più rilevanti. Questo è da attribuire principalmente alla loro solubilità in acqua, caratteristica che consente loro di disciogliersi nel mosto e di pervenire nel prodotto finale. Altri tipi di micotossine che possono ritrovarsi nella birra sono le aflatossine, le fumonisine, l'ocratossina A (OTA) (Piacentini et al., 2019).

Il deossinivalenolo (DON) e lo zearalenone (ZEN) sono prodotti del metabolismo sesquiterpenoide (via biochimica di sintesi), con il DON noto per la sua diffusione globale. Lo ZEN è un'altra micotossina altamente contaminante e pertanto da monitorare con attenzione (Piacentini et al., 2019).

Gruppo delle micotossine	Rappresentanti rilevanti	Principali funghi produttori	Cereali più colpiti
Tricoteceni A	Tossine T-2 e HT-2	<i>F. sporochioides</i> , <i>F. langsethiae</i>	Avena, orzo
	DAS	<i>F. equiseti</i>	Frumento, avena, orzo, segale, sorgo
Tricoteceni B	DON, DON-3-Glc, 3- e 15-AcDON	<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. cerealis</i>	Frumento, orzo, mais, avena, segale

Gruppo delle micotossine	Rappresentanti rilevanti	Principali funghi produttori	Cereali più colpiti
Micotossine emergenti	Butenolide	<i>F. graminearum</i> <i>F. equiseti</i>	Frumento, avena, orzo, segale, sorgo
	Equisetina	<i>F. equiseti</i> , <i>F. semitectum</i>	Frumento, avena, orzo, segale, sorgo
	Nesolaniolo	<i>F. graminearum</i>	Orzo, mais, riso, sorgo, frumento, triticale

Tabella 5. Micotossine *del Fusarium* rilevanti per malto e birra.

DAS = diacetossiscirpenolo; DON = deossinivalenolo; DON-3-Glc = deossinivalenol-3-glucoside; 3-AcDON = 3-acetildeossinivalenolo; 15-AcDON = 15-acetildeossinivalenolo; (Pascari, 2022)

3.3 Strategie di contenimento in campo

La gestione della *FHB* provocata da *F. graminearum* si basa su un approccio integrato che impiega la maggiore resistenza genetica (varietà resistenti), fungicidi e pratiche colturali. La lavorazione del terreno, la gestione dei residui colturali attraverso tecniche convenzionali, la modifica delle date di semina, la rotazione delle colture sono interventi che, insieme, possono inibire lo sviluppo di alcune varietà di *Fusarium*. Incrementare la resistenza contro l'*FHB* rimane quindi prioritario per evitare perdite economiche anche all'industria birraria. Nell'orzo, l'utilizzo di una varietà moderatamente resistente (con basso accumulo di DON), abbinata all'uso di fungicidi, come protioconazolo e tebuconazolo (applicati a inizio fioritura) attualmente, fornisce una parziale riduzione dei sintomi di *FHB* e della contaminazione da DON (Drakopoulos et al., 2021). Per contro, i fungicidi, potrebbero favorire la proliferazione di altre micotossine.

Di conseguenza è necessario che le strategie di controllo comportino diverse misure preventive e interventi mirati al fine di gestire in modo sostenibile la presenza di micotossine nell'orzo.

In Svizzera è stato recentemente realizzato uno studio sull'orzo (2016-2017) che ha analizzato 253 campioni di cereali e 237 campioni di paglia (Wegulo et al. 2015). Questo studio ha rilevato elevati livelli di DNA di *F. graminearum* e deossinivalenolo in campi a lavorazione ridotta. Inoltre, l'utilizzo di regolatori della crescita delle piante è associato ad un aumento della tossina culmorina, mentre la loro non applicazione porta ad una concentrazione elevata di nivalenolo; anche il controllo chimico con fungicidi è efficace per contrastare l'azione del fungo, ma molto dipende dal momento in cui si applicano, dallo stato della fioritura e dalle condizioni meteorologiche (Wegulo et al., 2015). In conclusione le singole pratiche agricole per essere efficaci contro i fitopatogeni necessitano di strategie di controllo combinate (Drakopoulos et al., 2021). Un'analisi multipla su oltre 100 campi è stata effettuata anche negli Stati Uniti ed ha rilevato che i fungicidi azolici come metconazolo, prothioconazolo e tebuconazolo erano i più efficaci nel ridurre la contaminazione da deossinivalenolo. Al contrario, i fungicidi strobilurinici sono stati spesso correlati ad un aumento della gravità della patologia e del contenuto di deossinivalenolo nei cereali (Vogelgsang et al., 2019). L'uso di fungicidi, a lungo termine, può però causare un impatto ambientale indesiderato, così come l'uso di erbicidi e insetticidi (Drakopoulos et al., 2021).

3.3.1 *Bacillus* spp. contro *Fusarium graminearum*

Dati il crescente interesse per la salvaguardia dell'ambiente e la sostenibilità, e la consapevolezza dei rischi legati all'uso di sostanze chimiche, il controllo biologico sta riscuotendo molta attenzione a livello globale.

Esso si basa sull'utilizzo di sostanze naturali e organismi viventi per limitare la diffusione di agenti patogeni. Il suo impiego si pone quindi come alternativa ad altre metodologie e idealmente potrebbe rimpiazzarle. Gli approcci biologici di controllo adottano diverse strategie per indebolire i funghi, come dimostrato dal microrganismo *Bacillus subtilis* (un batterio gram⁺) che produce sostanze attive che ostacolano la crescita di *F. graminearum*. Il *Bacillus* è altresì in grado di sopravvivere durante l'inverno e proteggere l'orzo dalla malattia in diverse stagioni (Ntushelo et al., 2019). I ricercatori sollecitano ulteriori approfondimenti sul *Bacillus* e sul suo genoma come efficace antagonista in grado di attivare le difese della pianta (resistenza sistemica indotta - ISR) contro il *Fusarium*, producendo sostanze per esso tossiche come surfattina, fengicina, iturina

(Zhao et al., 2014). Tuttavia bisogna conoscere bene i meccanismi d'azione e gli effetti di questi antagonisti al fine di evitare l'insorgenza di altre problematiche.

3.3.2 *Pythium oligandrum* contro *Fusarium* spp.

Il *P. oligandrum*, un microrganismo oomicete presente naturalmente nel terreno e nell'acqua, si è rivelato un efficace antagonista di vari funghi patogeni, difendendo le piante da infezioni fungine (Ayed et al., 2007; Benhamou et al., 2001; Postulkova et al., 2018; Ng et al., 2021). Dopo essere stato applicato, penetra nei tessuti dei funghi dannosi e, attraverso l'azione di enzimi idrolitici, induce il deterioramento delle cellule (ottenendo così il sostentamento per la sua crescita e sviluppo). In seguito, si diffonde nel terreno e nei tessuti delle piante, occupando lo spazio vitale e contrastando l'azione dei funghi patogeni. Durante la sua proliferazione, *P. oligandrum* produce composti che favoriscono la formazione di difese chimiche e morfologiche nelle piante, contribuendo a proteggerle dagli attacchi dei parassiti. Questi metaboliti stimolano la crescita delle radici e delle parti aeree delle piante. Esso viene utilizzato per contrastare la fusariosi della spiga nei cereali, sia invernali che primaverili come orzo, grano, avena, ecc. (www.fitogest).

Esso ha ottenuto l'approvazione sia dall'Unione Europea che dall'EPA degli Stati Uniti (Agenzia per la protezione dell'ambiente) come organismo per la difesa in contesti agricoli (Ng et al., 2021).

3.4 Fattori che favoriscono l'infezione fungina durante la maltazione

I funghi del genere *Fusarium* sono riconosciuti come i principali agenti patogeni nelle industrie della produzione di malto e birra. La loro proliferazione viene favorita da condizioni di processo ottimali durante la maltazione: presenza di nutrienti, temperature più contenute, buona aerazione, elevata umidità dell'aria e dei cereali durante la germinazione e l'inizio dell'essiccazione. Queste condizioni contribuiscono alla crescita microbica e alla sintesi di metaboliti secondari. Nelle varie fasi della maltazione, infatti, si producono livelli diversi di umidità, con valori di umidità relativa (UR) che vanno dal 45% durante la macerazione - quando l'orzo è a contatto con l'acqua - a circa il 4% dopo la fase di cottura/essiccazione.

L'incremento della contaminazione da *Fusarium* durante la maltazione dipende principalmente dal tasso iniziale d'infezione e dalle caratteristiche nutritive dell'orzo. La germinazione (10-14°C)

favorisce lo sviluppo delle spore fungine e la crescita miceliare che si manifesta con un micelio bianco ed arioso e con chicchi che assumono un aspetto soffice e peloso. L'essiccazione (umidità 4%), fase finale della maltazione, crea le condizioni per uccidere il micelio fungino ma non elimina l'eventuale contaminazione da DON.

L'infezione incide anche sugli aspetti qualitativi del malto; oltre alla riduzione di peso dei chicchi e alla minore capacità germinativa, si hanno la degradazione delle proteine e dell'amido e intensi aromi e sapori della birra (gusto di melassa bruciata, note piccanti, ecc.)

L'accumulo di micotossine ha un impatto enorme sulla qualità del malto, specie in presenza di una concentrazione significativa di deossinivalenolo (Mastanjevic et al., 2018).

4. DEOSSINIVALENOLO

4.1 Caratteristiche generali e formula chimica

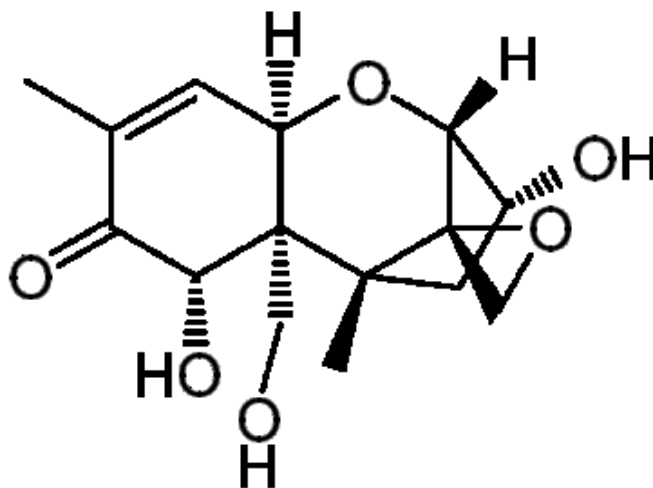


Figura 10. Formula chimica del deossinivalenolo $C_{15}H_{20}O_6$ (www.waterandfoodsecurity.org)

Il deossinivalenolo (DON), conosciuto anche come vomitossina, è un prodotto metabolico di alcune specie fungine del genere *Fusarium* ed è classificato come tricotecene del gruppo B. Si ritrova comunemente nei vegetali, soprattutto in cereali come grano, mais, orzo, avena e segale. Esistono circa 200 tricoteceni, ma le micotossine più comuni in Europa sono il deossinivalenolo, il 3-acetil e il 15-acetil-deossinivalenolo. Il DON e i suoi derivati mantengono la loro stabilità durante lo stoccaggio, la macinazione, la lavorazione e la cottura degli alimenti, non degradandosi nemmeno ad alte temperature. Le concentrazioni di queste tossine nei cereali sono generalmente basse (pochi ppm), ciò nonostante, a causa delle loro forti proprietà citotossiche e immunosoppressive, costituiscono un serio rischio per la salute ed è quindi doveroso verificarne la presenza durante il processo di birrificazione.

4.2 Contaminazione da DON durante la birrificazione

Le micotossine rappresentano composti notevolmente resistenti sia alle alte temperature che agli estremi valori di pH (Kabak et al., 2009; Piacentini et al., 2019). Nonostante i processi di germinazione e di fabbricazione della birra operino a temperature massime inferiori a quelle necessarie per l'eliminazione delle micotossine, sono in grado di influenzarne la concentrazione a causa delle modifiche fisiche, chimiche e biochimiche che si verificano durante tali processi (Piacentini et al., 2019).

Nel corso della ricerca di Piacentini (2019) sono stati analizzati i livelli di micotossine in sette fasi del processo di birrificazione.

Fase 1 - Inizialmente sono stati esaminati l'orzo e l'acqua, rilevando i livelli di DON presenti in entrambe le matrici: media di 3835 µg/kg nell'orzo e di 599 µg/kg nell'acqua. La presenza di DON nell'acqua potrebbe essere attribuita alla sua natura solubile. Inoltre, confrontando i livelli di DON nell'orzo, nel primo e terzo giorno di macerazione, si è notata una sua riduzione che potrebbe essere associata anche alla dispersione della micotossina nell'acqua.

Fase 2 - Il passaggio successivo riguarda la fase di germinazione che ha rilevato una significativa diminuzione del DON tra il primo e il terzo giorno. Una possibile causa di questa diminuzione potrebbe essere attribuita all'aumento del contenuto di glucosio che potenzialmente attiva l'enzima responsabile della trasformazione del DON in DON-3-glucoside (D3G), quindi la glicosilazione del DON. Alcuni studi hanno evidenziato che circa il 50% del DON viene convertito dopo pochi giorni dalla germinazione.

Nonostante tutto, durante questa fase, è opportuno far presente che la biomassa fungina e la produzione di micotossine potrebbero comunque aumentare, a causa dell'eventuale contaminazione dell'acqua residua di macerazione o a causa di un'eventuale infezione latente dei chicchi d'orzo, la quale potrebbe essere attivata dall'incremento dell'umidità durante il processo di germinazione.

Fase 3 - La fase finale della maltazione, chiamata essiccazione, arresta il processo di germinazione preparando il malto verde per il suo immagazzinamento e trasporto. Questa fase si svolge a varie temperature (da 55°C a 100°C) ed è fondamentale per il gusto e il colore del malto. Nel corso di

questo studio, si è notato un significativo decremento dei livelli di DON tra il terzo giorno di germinazione e la fase di malto. Questo potrebbe essere associato alle alte temperature d'essiccazione ed alla separazione delle radichette dal chicco nelle quali viene rilasciata la maggior parte della micotossina.

Fase 4 - Dopo la fase di maltazione, si procede alla macinatura dei chicchi e si aggiunge acqua per iniziare la creazione della birra. Durante l'ammontamento, l'acqua viene riscaldata tra i 62°C e i 71°C per attivare gli enzimi, come α -amilasi e β -amilasi, che trasformano gli amidi in zuccheri fermentabili. Riguardo all'impatto sulle micotossine, potrebbe verificarsi il rilascio di DON legato alle proteine, aumentando la sua concentrazione a 1211 $\mu\text{g}/\text{kg}$ nel malto. In questa fase, se si aggiungono i risultati del mosto e dei chicchi esausti la concentrazione di DON può raddoppiare, fino a 2173 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Fase 5 - La fase di bollitura è caratterizzata dall'inattivazione degli enzimi, dall'aggiunta del luppolo, dall'isomerizzazione degli α -acidi, dall'evaporazione di acqua e composti volatili indesiderati come i dimetilsolfuri, dalla precipitazione delle proteine, dalla sterilizzazione e dalle reazioni di Maillard che modulano il gusto. Durante questa fase, la temperatura (oltre 100°C) e il tempo d'ebollizione (1 ora circa) potrebbero ridurre la presenza di micotossine nel mosto. Alcuni autori hanno evidenziato che il DON rimane stabile e si degrada durante la lavorazione alimentare intorno ai 153°C (Kabak et al., 2009; Milani e Maleki, 2014).

Va poi considerato che in questa fase l'aggiunta di additivi come mais, grano e sorgo può influenzare ulteriormente la presenza di micotossine.

Fase 6 - Dopo la fase di ebollizione, il mosto viene raffreddato a 21°C per dare avvio alla fermentazione attraverso l'aggiunta del lievito (genere *Saccharomyces*). La fermentazione avviene a temperature comprese tra 2°C e 30°C per un periodo di 7-9 giorni. Qui il DON ha dimostrato una notevole stabilità, con una riduzione apparente del 3,8% (da 1132 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 1089 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

Fase 7 - Nel corso di questo studio sono stati analizzati i lieviti anche dopo la fase di fermentazione, dimostrando l'effettivo assorbimento del DON grazie ai β -glucani presenti nella

parete cellulare del lievito che sono in grado di adsorbire le micotossine. Le pareti cellulari dei lieviti sono composte principalmente da polisaccaridi, proteine e lipidi che offrono numerosi gruppi funzionali (gruppi carbossilici, idrossilici, fosfati e amminici) nonché siti di adsorbimento idrofobico (catene di carbonio alifatico e anelli aromatici) per l'eventuale legame di micotossine. La biomassa di lievito può rivelarsi una buona fonte di materiale adsorbente per le micotossine grazie alla presenza di mannoproteine e β -glucani nel materiale della parete cellulare (Jouany et al., 2005).

In questa ricerca si è utilizzato il metodo d'analisi LC-MS/MS. Il DON è stato rilevato e misurato tramite colonna HPLC collegata ad uno spettrometro di massa con trappola ionica.

4.2.1 Influenza del cambio d'acqua sulla contaminazione da DON durante la maltazione

Per esaminare l'impatto dell'infezione da *F. graminearum* e delle micotossine rilevate durante il processo di maltazione, Habschied et al., (2019) hanno implementato due approcci. Uno in cui l'acqua di macerazione veniva cambiata durante il processo e l'altro in cui l'acqua di macerazione non subiva variazioni.

L'analisi approfondita delle diverse tossine presenti nei campioni di malto ha evidenziato un aumento delle micotossine monitorate e di altre sostanze tossiche in entrambe le situazioni, correlato al grado di contaminazione da *F. graminearum*. I risultati mostrano che i campioni infettati da *F. graminearum* e sottoposti a cambio dell'acqua di macerazione presentavano concentrazioni più elevate di micotossine.

Una possibile spiegazione potrebbe essere che l'introduzione di acqua fresca di rubinetto aumenti i minerali essenziali disciolti e i livelli d'ossigeno nel lotto, attivando così gli enzimi fungini coinvolti nella produzione di micotossine. Un'altra teoria suggerisce che l'acqua dolce possa influenzare il micelio fungino, inducendo la produzione di micotossine.

I risultati dell'analisi del DON e dei suoi derivati, noti come micotossine modificate, indicano un aumento della sintesi di micotossine nel lotto in cui l'acqua di macerazione veniva regolarmente sostituita.

Come indicato in Tabella 6, con un tasso iniziale di contaminazione del 20%, la produzione di DON è stata circa 1,5 volte maggiore nel lotto A, in cui è stata effettuata la sostituzione dell'acqua di

macerazione, rispetto al lotto B, dove non è stata effettuata la sostituzione dell'acqua di macerazione. Effetti analoghi sono stati riscontrati anche per i derivati del DON, come il DON-3-glucoside e il 3-ADON (3-acetildeossinivalenolo). Queste micotossine modificate dipendono dalla glicosilazione del DON, dovuta all'aumento di contenuto di glucosio durante la germinazione dell'orzo che può attivare l'enzima responsabile della reazione che trasforma il DON in DON-3-glucoside e 3-ADON (3-acetildeossinivalenolo), (Piacentini et al., 2019).

Lotto	Tossina ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)		
	DON	DON-3-GLC	3-ADON
Cambio d'acqua			
0	25,4 ^{segg}	<LOD *	8.03 ^e
10	282 ^d	354 ^d	14,4 ^d
20	1001 ^a	695 ^a	110 ^a
Nessun cambio d'acqua			
0	38,1 ^e	<LOD	5.10 ^{ss}
10	370 ^{ca}	407 ^c	24,1 ^c
20	685 ^{a.C}	639 ^{a.C}	84,5 ^{a.C}

Tabella 6. Concentrazioni di DON (deossinivalenolo) e dei suoi derivati (deossinivalenolo-3-glucoside e 3-acetildeossinivalenolo) nei campioni di malto, con tre diversi livelli di contaminazione (0%, 10% e 20%). Limite di rilevamento (LOD) per DON = $0,3 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$; DON-3-GLC = $0,02 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$; 3-ADON = $0,3 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Habschied, 2019).

4.3 Cenni di legislazione e linee guida

La legge n.1354 del 1962 definisce la birra come *“il prodotto ottenuto dalla fermentazione alcolica con ceppi di saccharomyces carlsbergensis o cerevisiae di un mosto preparato con malto, anche torrefatto, di orzo o di frumento o di loro miscele ed acqua e luppolo. Il malto di orzo o di frumento può essere sostituito con altri cereali e con materie prime amidacee e zuccherine nella misura massima del 40%”*.

Per quanto riguarda le micotossine, la normativa risulta molto complessa e in continua evoluzione. A livello comunitario, il Regolamento (CE) n. 1881/2006 definisce i valori sui contaminanti nei prodotti alimentari.

Nel 2007 è stato pubblicato il Regolamento n.1126 che modifica il precedente contenente i nuovi tenori massimi di deossinivalenolo e le sue forme coniugate (Journal Volume 15, Issue 9).

Per il DON si è stabilito un limite di 1250 µg/kg per i cereali non trasformati e 750 µg/kg per i cereali destinati al consumo umano diretto. La tollerabilità di assunzione giornaliera per la micotossina DON è di 1.0 µg/kg.

Nell'aprile 2023 l'Ue ha emanato un nuovo Regolamento (n. 915) sui contaminanti nei prodotti alimentari che però, attualmente, mantiene i tenori massimi di DON già prescritti. Inoltre, al paragrafo 3.2.12, dedicato ai cereali, si legge che *“i tenori massimi non si applicano ai cereali impiegati per la produzione di birra o distillati, purché il residuo di cereali restante non sia immesso sul mercato come alimento.”*

Anche in questo regolamento si ribadisce che: *“per garantire un'efficiente tutela della salute pubblica, gli alimenti il cui contenuto di contaminanti superi il tenore massimo non soltanto non dovrebbero essere immessi sul mercato come tali, ma non dovrebbero nemmeno essere impiegati come ingredienti alimentari o miscelati con alimenti. I prodotti che superano i livelli massimi consentiti non devono essere immessi sul mercato dell'UE”*.

Nel Regolamento (CE) n. 401/2006 si definiscono i metodi di campionamento e di analisi per il controllo delle micotossine nei prodotti alimentari. Questo assicura che i metodi siano gli stessi e che vengano applicati da tutti gli enti preposti al controllo alimentare. Molti di questi criteri fanno riferimento al Codex Alimentarius che è stato istituito dall'ONU, in cooperazione con l'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità) e con la FAO (Organizzazione per l'alimentazione e l'agricoltura). Esso definisce gli standard alimentari internazionali e pratiche eque nel commercio

mondiale degli alimenti. Questi standard, anche se rappresentano soltanto delle raccomandazioni sono utilizzati come base per la legislazione sanitaria degli Stati Membri (ONU).

Inoltre, ogni operatore del settore alimentare (OSA) deve attenersi al sistema HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points), ovvero un sistema di autocontrollo igienico, introdotto in Europa nel 1993 e attualmente definito dal Regolamento CE 853/2004 (Norme generali in materia di igiene dei prodotti alimentari) basato su sette principi fondamentali:

1. Indicazione dei pericoli connessi alle diverse fasi della linea di produzione, analisi dei pericoli e definizione delle misure più idonee per il controllo
2. Individuazione dei Punti Critici di Controllo - CCP
3. Definizione dei Limiti Critici o di Accettazione
4. Realizzazione di un sistema di monitoraggio
5. Determinazione delle azioni correttive da attuarsi in caso di scostamento dai limiti critici prefissati
6. Determinazione delle procedure di verifica
7. Raccolta e Conservazione di documenti e Registrazioni

In Europa, l'ente preposto a trattare la materia della sicurezza alimentare è l'EFSA (European Food Safety Authority) che raccoglie e valuta i dati sulla presenza di micotossine in alimenti e mangimi, prepara le linee guida destinate alle autorizzazioni in merito alla valutazione della sicurezza alimentare. L'EFSA fornisce consulenza scientifica ai responsabili della gestione del rischio sulla definizione dei livelli massimi di micotossine (come aflatossine, ocratossina A, deossinivalenolo o zearalenone) stabilendone le dosi giornaliere tollerabili.

4.4 Metodi analitici per il rilevamento di DON in matrici alimentari

Da molti anni si conducono approfondite ricerche sulle micotossine, seguite dallo sviluppo di metodi analitici via via più precisi con l'obiettivo di misurarne i composti in modo sempre più accurato. È infatti cruciale che il metodo di analisi e la preparazione del campione siano corretti.

Per la rilevazione di micotossine si possono impiegare tecniche come la cromatografia su strato sottile (TLC), la gascromatografia (GC), la cromatografia liquida (LC), la LC combinata con la spettrometria di massa (LC/MS), oppure utilizzare approcci immunochimici, come il Test ELISA (saggio immunoassorbente legato all'enzima). Nella seguente tabella sono riassunti i vantaggi e svantaggi di questi metodi.

Metodo	Vantaggio	Svantaggio	
Tecniche cromatografiche	TLC	basso costo; semplice; rapido;	mancanza di automazione
	GC		per composti volatili;
	HPLC	alta risoluzione; limite basso di rilevamento; abbinabile ad un sistema automatizzato di rilevazione multipla; specifica;	costoso; richiede tempo; attrezzature costose e procedure di pulizia;
	LC-MS/MS	alta selettività; alta sensibilità; pulizia del campione	costoso; richiede tempo; attrezzature costose e procedure di pulizia;

Metodo		Vantaggio	Svantaggio
		relativamente semplice; determinazione multi-micotossine;	
Immunologico	ELISA	metodo di screening per matrici diverse; sensibile, specifico, rapido, relativamente economico e semplice; limite di rilevamento basso;	a causa della reattività crociata con le micotossine mascherate, i risultati ELISA mostrano solitamente una sovrastima dei risultati; stabilità degli enzimi;
Biologico	Biosensori	rapido; sensibile; pratico;	rigenerazione della superficie del recettore; specificità; sensibilità; riproducibilità; stabilità;

Tabella 7. Alcuni dei metodi più utilizzati per il rilevamento e la quantificazione delle micotossine (Mastanjevic, 2018)

Le metodologie più attuali si fondano sull'analisi multi-micotossina che consentono di risparmiare tempo e risorse permettendo la determinazione simultanea di diverse micotossine. Oggi, il metodo più ampiamente impiegato e affidabile per identificare le micotossine, comprese quelle di recente scoperta, è la LC-MS/MS.

La determinazione delle micotossine negli alimenti può essere fatta anche utilizzando la tecnologia innovativa dei biosensori (microchip a rilevamento ottico, elettrochimico e fotoelettrochimico) che offrono un rilevamento rapido e con quantità di campione ridotte. Tuttavia, l'utilizzo dei microchip per rilevare le micotossine presenta alcune sfide, come la necessità di pulire il campione da complesse matrici alimentari prima dell'analisi.

4.4.1 Metodo LC-MS/MS

La LC-MS/MS, acronimo di “Liquid Chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry” (Cromatografia liquida-spettrometria di massa) è un moderno metodo analitico usato per rilevare e quantificare le sostanze a livello di tracce ed è spesso utilizzato per la rilevazione di micotossine in quanto offre numerosi vantaggi: è molto sensibile, è efficiente e adatto a numerose applicazioni. Inoltre, sono disponibili metodi multi-analiti che sono di grande importanza soprattutto per l’analisi delle micotossine. Tuttavia, la LC-MS/MS ha anche un inconveniente: il risultato dell’analisi è fortemente influenzato dalla matrice e può causare l’incertezza del risultato. Gli effetti matrice sono causati dai vari componenti che riducono o aumentano l’efficienza della ionizzazione. Questo può portare ad una sottostima o sovrastima della concentrazione dell’analita. Tali effetti possono essere ridotti o compensati con strumenti appropriati, come la pulizia del campione attraverso l’uso di colonne ad immunoaffinità.

La tecnica LC-MS/MS prevede la separazione, l’identificazione e la quantificazione di composti chimici in una miscela. La cromatografia liquida (LC) separa i composti e la spettrometria di massa (MS) identifica e quantifica gli ioni prodotti da tali composti. Il campione viene immesso in un sistema di cromatografia liquida dove i composti si separano in base alle loro interazioni con una fase stazionaria. Successivamente, i composti separati vengono introdotti in uno spettrometro di massa dove vengono ionizzati e analizzati in base al loro rapporto massa-carica (m/z).

4.4.2 Test Elisa

Il Test ELISA, acronimo di “Enzyme Linked Immunosorbent Assay” (saggio immuno-assorbente legato ad un enzima), è una tecnica di laboratorio ampiamente utilizzata per rilevare la presenza di anticorpi o antigeni in un campione. Coinvolge l’uso di un substrato enzimatico che produce una reazione colorimetrica misurabile quando entra in contatto con il complesso antigene-anticorpo. Questa colorazione è proporzionale alla quantità di micotossina presente nel campione, consentendone la quantificazione attraverso la lettura ottica dei risultati.

Il Test ELISA fornisce una metodologia sensibile e specifica per diverse applicazioni ed è utilizzata per il monitoraggio della sicurezza alimentare, garantendo che i prodotti a base di cereali siano conformi ai limiti stabiliti per il deossinivalenolo.

Il Test ELISA è particolarmente efficace come strumento di screening prima di procedere all'analisi dettagliata mediante LC. Tuttavia, a causa della reattività incrociata con micotossine mascherate, i risultati dell'ELISA tendono spesso a sovrastimare i dati.

4.5 Effetti tossici e potenziali rischi per la salute

Oggi c'è una crescente domanda di cibi sicuri e salutari, anche grazie ad una più matura consapevolezza dei consumatori che chiedono elevati standard di sicurezza e qualità degli alimenti. Le istituzioni controllano ogni aspetto dell'industria alimentare e la ricerca scientifica sviluppa costantemente nuove tecniche per individuare livelli sempre più bassi di sostanze nocive che possono avere un impatto significativo sulla salute umana e animale. (Mastanjevic et al., 2018).

Il consumo di alimenti contaminati con deossinivalenolo, conosciuto anche come vomitossina, può provocare sintomi gastroenterici acuti come rifiuto di cibo, vomito, anoressia e diarrea emorragica. Gli effetti del DON sugli animali possono essere simili a quelli riscontrabili nell'uomo (Drakopoulos et al., 2021).

L'Agencia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) ha collocato il DON nel Gruppo 3: "Non classificabile in relazione alla sua cancerogenicità per l'uomo". Questa categoria viene usata per agenti per i quali l'evidenza di cancerogenicità è inadeguata nell'uomo e inadeguata o limitata nell'animale da esperimento. Eccezionalmente, possono essere collocati in questo gruppo agenti per i quali l'evidenza nell'uomo è inadeguata ma l'evidenza nell'animale è sufficiente e, tuttavia, vi è forte evidenza che i meccanismi di cancerogenicità nell'animale non siano operativi nell'uomo (C.e.I.R.S.A., aggiornamento 2016). L'EFSA (European Food Safety Authority) riporta che il DON è stato responsabile di una serie di episodi di intossicazione umana in Asia.

Anche se le micotossine non interferiscono con il procedimento di produzione della birra, in quanto non interferiscono con la fermentazione, se presenti in quantità elevate (>10 mg/L di DON) possono notevolmente influenzare la salute umana. (Mastanjevic et al., 2018).

Secondo vari articoli (Varga et al., 2013; Benešová et al., 2012; Piacentini et al., 2015; Bauer et al., 2016; Peters et al., 2017; Warth et al., 2012), le birre disponibili sul mercato potrebbero contenere diverse micotossine in quantità ridotte (<1 µg/L): non solo i tricoteceni del gruppo B, DON e

nivalenolo (NIV), ma anche i tricoteceni del gruppo A (T-2 e HT-2), il DAS, lo ZEN, le aflatossine, l'ocratossina A e le fumonisine prodotte da altre specie di *Fusarium*, presenti negli altri cereali utilizzati per la produzione della birra e frequentemente usati come additivi (mais, frumento, grano, avena, riso, miglio, ecc.), (Bertuzzi et al., 2018).

Gruppo delle micotossine	Rappresentanti rilevanti	Produzione di funghi	Cereali più colpiti	Tossicità negli esseri umani e negli animali
Tricoteceni A	Tossine T-2 e HT-2	<i>F. sporochioides</i> , <i>F. langsethiae</i>	Avena, orzo	Epatotossicità, diminuzione della vitalità cellulare, inibizione della proliferazione cellulare, stress ossidativo, danno mitocondriale, aleukia tossica alimentare (ATA), interruzione della sintesi di DNA e RNA
	DAS	<i>F. equiseti</i>	Frumento, avena, orzo, segale, sorgo	Immunotossicità, ematotossicità, disturbi polmonari e della crescita, lesioni gastrointestinali e diarrea osservati in vari animali da allevamento
Tricoteceni B	Nivalenolo	<i>F. graminearum</i>	Grano, segale	Immunotossico, genotossico, interruzione dell'omeostasi microbica, sviluppo di malattia enterica cronica
	DON, DON-3-Glc, 3- e 15-AcDON	<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. cerealis</i>	Frumento, orzo, mais, avena, segale	Alterazioni delle strutture intestinali, rottura delle barriere

Gruppo delle micotossine	Rappresentanti rilevanti	Produzione di funghi	Cereali più colpiti	Tossicità negli esseri umani e negli animali
				epiteliali, compromissione della risposta immunitaria della mucosa intestinale, cambiamenti nella composizione del microbiota intestinale, ritardo della crescita
Zearalenone	ZEN, α -ZEL, β -ZEL, ecc.	<i>F. graminearum</i>	Granoturco	Effetto estrogenico, metilazione del DNA, diminuzione del tasso di impianto dell'embrione, stress ossidativo, diminuzione della concentrazione di testosterone e aumento del livello di progesterone
Fumonisine	FB1, FB2, FB3, FB4	<i>F. verticillioides</i> , <i>F. proliferatum</i>	Granoturco	Interruzione del metabolismo degli sfingolipidi, tumori dell'esofago e del fegato, difetti del tubo neurale, problemi cardiovascolari
Micotossine emergenti	Beauvericina ed enniatine	Complesso <i>G. fujikuroi</i>	Grano, avena	Citotossico, potenziale genotossico, ematotossico
	Butenolide	<i>F. graminearum</i> <i>F. equiseti</i>	Frumento, avena, orzo, segale, sorgo	Tossicità per inalazione, tossicità cutanea, citotossicità, potenziale induzione di danno miocardico
	Fusarin C	<i>F. verticillioides</i> , <i>F. graminearum</i>	Granoturco	Cancerogeno (esofageo e mammario),

Gruppo delle micotossine	Rappresentanti rilevanti	Produzione di funghi	Cereali più colpiti	Tossicità negli esseri umani e negli animali
				mutageno, citotossico
	Equisetina	<i>F. equiseti</i> , <i>F. semitectum</i>	Frumento, avena, orzo, segale, sorgo	Tossicità moderata per i topi
	Nesolaniolo	<i>F. graminearum</i>	Orzo, mais, riso, sorgo, frumento, triticale	Risposta anoressica all'esposizione nei topi (più forte nel caso di un'esposizione intraperitoneale che orale)

Tabella 8. Tossicità delle micotossine *del Fusarium* rilevanti per malto e birra.

DAS = diacetossiscirpenolo; DON = deossinivalenolo; DON-3-Glc = deossinivalenol-3-glucoside; 3-AcDON = 3-acetildeossinivalenolo; 15-AcDON = 15-acetildeossinivalenolo; α -ZEL = α -zearalenolo; β -ZEL = β -zearalenolo; FB = fumonisina (B₁, B₂, B₃ e B₄), (Pascari, 2022)

Queste micotossine sono state riscontrate nei campioni di birra ad una concentrazione quasi equivalente o leggermente superiore al livello di assunzione giornaliera accettabile, che viene indicata con l'acronimo TDI ("Tolerable daily intake") e fissata nella misura di 1 μ g/kg di peso corporeo/giorno.

Queste non sono le sole tossine presenti nel malto e nella birra, poiché si stanno evidenziando multitossine emergenti (vedi Tabelle 5 e 8), prodotte anche da altre specie di *Fusarium* e che suscitano crescente preoccupazione (Mastajnevic., 2018; Mastanjevic et al., 2019; Krstanovic et al., 2015; Pascari et al., 2022; Varga et al., 2013).

Le fasi di maltazione e birrificazione non sono attualmente contemplate nella normativa sulle micotossine, ma potrebbero costituire in futuro una sfida per la salute generale, considerando che la birra rappresenta una bevanda ampiamente consumata (Habschied et al., 2019).

Secondo gli studi di Warth et al., (2012) infatti, l'assunzione massima tollerabile giornaliera provvisoria (PMTDI) per il DON può essere superata nei cosiddetti consumatori di birra, ossia coloro che bevono due birre o 1 litro di birra al giorno.

Alla luce di alcuni studi scientifici recenti (Mastajnevic., 2018; Mastanjevic et al., 2019; Krstanovic et al., 2015; Varga et al., 2013) che hanno studiato la presenza di micotossine nella birra, è cruciale

un aggiornamento immediato riguardo alle nuove micotossine, accompagnato da una valutazione del relativo rischio.

Un altro elemento da considerare è che il processo di birrificazione coinvolge sia birrifici di tipo industriale (di portata globale) che birrifici di tipo artigianale e birrifici agricoli. Il deposito delle materie prime in questi birrifici di dimensioni ridotte può causare la diffusione di muffe e, di conseguenza, la contaminazione da micotossine (Mastanjevic et al., 2018).

5. STRATEGIE PER IL CONTROLLO DELLA CONTAMINAZIONE DA *FUSARIUM* E DA DON NELLA BIRRIFICAZIONE

La possibilità di controllare efficacemente la contaminazione da *Fusarium* e da DON negli alimenti si concentra principalmente nella prevenzione dell'infezione fungina. Nel capitolo 3.3 sono state già descritte alcune strategie di controllo che prevedono l'uso di tecniche di campo. Di seguito si descrivono invece alcune tecniche proposte per il processo di birrificazione: gli agenti di biocontrollo e la fotocatalisi.

5.1 Agenti di Biocontrollo (BCA): proposte per l'industria birraria

Le limitazioni delle tecniche convenzionali chimiche e fisiche nel ridurre gli impatti negativi delle specie di *Fusarium*, nella fase di maltazione, hanno suscitato interesse verso le strategie biologiche di controllo. Gli approcci chimici, aggressivi, incidono sulla qualità del malto e possono generare sottoprodotti e residui indesiderati, mentre le tecniche fisiche influenzano negativamente la germinazione dell'orzo. Gli agenti di controllo biologico (BCA) invece possono contribuire all'ottimizzazione della qualità dei cereali in quanto presentano la possibilità di diminuire la contaminazione da DON nel malto sopprimendo la crescita delle specie di *Fusarium* durante il processo di maltazione (Ng et al., 2023).

L'impiego di prodotti antifungini naturali è anche conforme alla sicurezza alimentare e alla sostenibilità ambientale. Sono diverse le soluzioni biologiche suggerite per l'impiego nel processo di maltazione al fine di limitare la crescita delle specie di *Fusarium* e ridurre la presenza di micotossine, come il DON (Ng et al., 2023; Postulkova et al., 2018). Ad esempio, si è dimostrata l'efficacia dei batteri lattici (LAB), naturalmente presenti sulla superficie dell'orzo, nel minimizzare la proliferazione dei funghi *Fusarium* durante la maltazione (Lowe e Arendt, 2004; Mauch et al., 2010; Oliveira et al., 2015b). Tuttavia, alcuni tipi di batteri lattici possono causare contaminazioni microbiche indesiderate nelle birre, generando incertezza nell'applicazione su vasta scala industriale.

Geotrichum candidum è un fungo filamentoso che si trova comunemente nell'ambiente. Il microrganismo è stato proposto alle industrie birrarie da un lato per inibire la crescita della flora

tossigena durante la maltazione e la sintesi di micotossine, dall'altro, per migliorare le caratteristiche biochimiche e fisiche del malto. I vantaggi ottenuti grazie al *Geotrichum candidum* sono un effetto inibitore sulla flora indesiderata (*Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*) e un'inibizione della produzione di metaboliti secondari come le micotossine e altri precursori del fenomeno noto come "gushing" (ovvero una reazione effervescente ed incontrollata della birra, che si verifica dopo l'apertura della bottiglia senza alcuna precedente agitazione, causando la fuoriuscita improvvisa della schiuma) causato dal DON e da piccole proteine fungine caratteristiche dei funghi filamentosi.

Boivin e Malanda, (1999) propongono l'uso del *Geotrichum candidum* nella maltazione di cereali ed altri vegetali, quali frumento, orzo, riso, sorgo, mais, grano saraceno. Il *Geotrichum candidum* può essere inoculato e omogeneizzato mediante aerazione nell'acqua di prima macerazione, oppure mediante spruzzatura direttamente sull'orzo, immediatamente prima della macerazione. Tuttavia è preferibile inoculare il microrganismo durante la prima macerazione e, se in presenza di orzo molto contaminato, anche durante due o tre macerazioni ad umido. L'inoculazione può essere eseguita anche durante il trasporto dell'orzo dal recipiente di macerazione a quello di germinazione.

Va sottolineato che l'inoculo di *Geotrichum candidum* insieme al miglioramento della qualità del malto comporta altri vantaggi qualitativi quali una riduzione degli acidi grassi del mosto che sono spesso responsabili del sapore sgradevole della birra (gusto ossidato) e della scarsa ritenzione della schiuma. Infine, grazie all'utilizzo di alcuni ceppi di *Geotrichum candidum*, è possibile favorire la crescita di batteri lattici e migliorare la qualità del malto mediante un naturale abbassamento del pH.

L'Istituto francese della birra e del malto (IFBM) ha depositato un brevetto che propone l'utilizzo di un ceppo di *Geotrichum candidum* durante la fase di maltazione.

G. candidum è frequentemente utilizzato nell'industria agroalimentare in quanto partecipa ad alcune microflore di origine alimentare. Infatti, i ceppi commerciali di *G. candidum* vengono impiegati come coltura iniziale per la maturazione del formaggio o nel processo di produzione della birra per conferire alla bevanda un caratteristico gusto floreale.

Attualmente, i maltatori mescolano il ceppo di *G. candidum* sotto forma liofilizzata durante la macerazione, la prima fase del processo di maltazione, condotta tra 10 e 25 ° C per 30-50 ore.

Quindi, durante la fase di germinazione (da tre a cinque giorni), *G. candidum* colonizza i chicchi d'orzo per evitare la proliferazione dei funghi (Kawtharani et al., 2022). La liofilizzazione degli agenti di biocontrollo ne consente la stabilizzazione e la conservazione, inoltre, rispetto alle forme liquide, i prodotti essiccati sono più facili da utilizzare nei processi industriali.

Un altro agente promettente per contrastare il fungo del genere *Fusarium* durante la fase di maltazione è il *Pythium oligandrum* (M1), che ha dimostrato buoni risultati contro le specie di *Fusarium* in campo, inibendo conseguentemente la crescita delle specie di *Fusarium* durante la maltazione dell'orzo.

Ng et al., (2023) si sono focalizzati sull'impiego del *P. oligandrum* valutando l'inibizione della crescita di *F. culmorum* e la produzione di micotossine durante la maltazione d'orzo, naturalmente contaminato, esaminando l'impatto del controllo biologico sulla qualità del malto e della birra, suggerendo il suo potenziale di utilizzo nell'industria birraria (Postulkova et al., 2018). Attraverso l'uso della PCR (Polymerase Chain Reaction) si è osservato il grado di contaminazione da *F. culmorum* al fine di evidenziare l'efficacia di *P. oligandrum* nel contrastare la diffusione dei funghi. L'inserimento dell'agente di biocontrollo ha determinato un'inibizione della proliferazione di *F. culmorum* compresa fra il 35% e il 59% (Ng et al., 2023). Per quanto riguarda gli effetti apportati sui parametri di qualità del malto d'orzo, il suo impiego ha portato ad un incremento della capacità enzimatica e della friabilità in confronto all'orzo non trattato.

Invece, per quanto concerne la birra, l'ausilio di *P. oligandrum* ha portato ad una maggiore intensità di colore, valori più elevati nell'estratto e nell'alcol rispetto al processo senza biocontrollo, mentre la velocità di fermentazione e il pH sono rimasti invariati (Ng et al., 2023).

Infine, è stato valutato anche il passaggio di DON e DON-3-glucoside, le micotossine più abbondanti e frequentemente rilevate, dal malto d'orzo alla birra. Il malto d'orzo trattato con *P. oligandrum* (M1) ha determinato un prodotto finale con riduzioni rispettivamente del 26% e del 18% in DON e DON-3-glucoside, rispetto alla birra ottenuta da malto d'orzo non trattato (Ng et al., 2023; Tabella 9).

Campione	DON ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	D3G ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Malto d'orzo	104 \pm 19	205 \pm 40
Malto d'orzo+ <i>P. oligandrum</i> (M1)	77 \pm 15	168 \pm 35

Tabella 9. Deossinivalenolo (DON) e deossinivalenolo-3-glucoside (D3G) nella birra preparata da malto d'orzo (BM) con e senza il trattamento con *P. oligandrum* (M1) aggiunto nell'acqua della seconda macerazione (1×10^6 oospore M1/ kg di orzo) (Ng, 2023).

5.2 Degradazione fotocatalitica del DON su ossido ferrico a struttura simil-dendritica sotto irradiazione di luce visibile

Date le caratteristiche stabili della micotossina DON, le metodologie convenzionali per ridurla richiedono spesso l'impiego di potenti ossidanti, temperature elevate e pressioni considerevoli, che comportano un notevole dispendio energetico.

I metodi convenzionali comprendono approcci fisici, chimici e biologici. Le tecniche fisiche consistono in lavaggi, selezioni basate sulla densità, trattamenti termici ed assorbimenti. Per esempio, Pronyk et al., (2006). hanno indicato che il 52% del DON potrebbe essere diminuito in 6 minuti con una temperatura di 185°C, per contro questi trattamenti possono influenzare negativamente la germinazione del malto.

Alcuni composti chimici come l'ozono (O_3), il carbonato di sodio (Na_2CO_3), il bicarbonato di sodio (NaHCO_3) ed il bisolfito di sodio (NaHSO_3), sono stati usati per eliminare il DON. L'uso dell'ozono è comune nella lavorazione dei prodotti agricoli per eliminare le micotossine. In 4 ore l'ozono può ridurre il 53% del DON nei cereali (Wang et al., 2017). I composti chimici possono però rivelarsi aggressivi, influire sulla qualità del malto e portare alla formazione di sottoprodotti e residui indesiderati.

Esplorare approcci ecocompatibili, efficienti e rispettosi dell'ambiente per eliminare o diminuire la presenza di DON costituisce quindi un obiettivo importante e complesso. L'applicazione della fotocatalisi per l'eliminazione delle micotossine può apportare notevoli vantaggi rispetto ai metodi concorrenti e sopracitati. Come definito dalla International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) nel 1997, la fotocatalisi è "il cambiamento nella velocità di una reazione chimica (o il suo inizio) sotto l'azione della radiazione ultravioletta, visibile o infrarossa in presenza di una sostanza, ovvero il catalizzatore, che assorbe la luce ed è coinvolto nella trasformazione chimica dei componenti di reazione". Quindi, attraverso aria, luce ed acqua, si attiva un processo ossidativo che alla fine è in grado di attaccare le molecole dei microrganismi neutralizzandole.

In questi ultimi anni si è quindi registrato un crescente interesse per questa tecnologia. La fotodegradazione viene già utilizzata per la degradazione degli inquinanti ambientali nell'aria e nell'acqua. Rispetto ai metodi sopramenzionati, essa presenta numerosi vantaggi: (1) utilizzo di energia pulita dalla luce solare con un basso consumo energetico; (2) degradazione degli inquinanti mediante capacità di superossidazione in condizioni di reazione blande; (3) mineralizzazione completa delle sostanze organiche senza inquinamento secondario; (4) fotocatalizzatore efficiente, stabile e riutilizzabile (Qi Sun et al., 2023).

Bai et al., (2017) hanno dimostrato che gli ibridi grafene/ZnO hanno la capacità di degradare il DON sotto irradiazione con luce UV. La luce UV però rappresenta solo una piccola percentuale (4%) dell'energia solare rispetto alla luce visibile (43%), di conseguenza per utilizzare l'energia solare in modo più efficiente, si è reso necessario sviluppare un catalizzatore che risponda alla luce visibile.

In questo contesto, un ossido di ferro a struttura simil-dendritica (α -Fe₂O₃), ovvero ramificata, ha dimostrato una maggiore efficacia rispetto all' α -Fe₂O₃ di tipo commerciale nel processo di fotodegradazione del DON in soluzione acquosa e sottoposto a irraggiamento con luce visibile (con lunghezza d'onda $\lambda > 420$ nm). Questo trattamento in presenza di ossido di ferro di tipo dendritico ha portato ad una riduzione del 90,3% del DON (con una concentrazione iniziale di 4,0 $\mu\text{g/mL}$) in sole 2 ore (Wang et al. 2019).

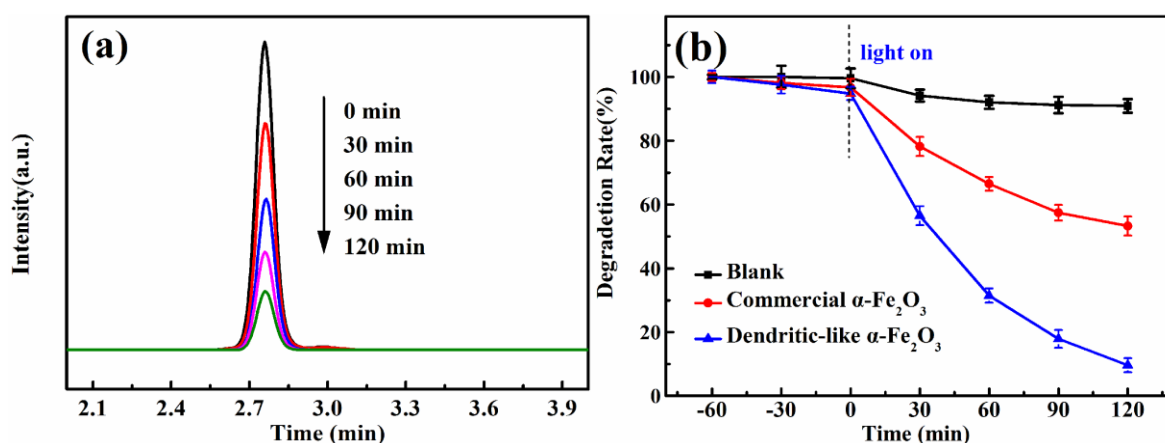


Figura 11. (a) Cromatogramma HPLC della fotodegradazione del DON su $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ di tipo simil-dendritico con tempi diversi (b) Degradazione fotocatalitica del DON su $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ di tipo dendritico , $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ commerciale sotto luce visibile e controllo del vuoto (Wang, 2019).

Dalla Figura 11 (a) si evidenzia che l'intensità del DON è diminuita significativamente con il tempo su $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ di tipo dendritico sotto irradiazione di luce visibile. Nella Figura 11 (b) la riga Blank mostra che il DON non può essere degradato alla luce visibile senza un fotocatalizzatore o in presenza del fotocatalizzatore senza luce visibile (entrambi sono infatti necessari per la degradazione fotocatalitica) e inoltre, il trattamento della sospensione mediante agitazione magnetica (per un'ora al buio) ha prodotto solo una leggera flessione del contenuto di DON. Si è dimostrato che l' $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ di tipo dendritico assorbe più DON di quello dell' $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ commerciale, il che aumenta l'attività di degradazione fotocatalitica. L' $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ di tipo dendritico (la linea blu) ha mostrato un'efficienza fotocatalitica notevolmente più elevata con un tasso di degradazione del 90,3% in 2 ore rispetto a quello dell' $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ commerciale (46,7 %). Le ragioni della migliore efficienza del l' $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ di tipo dendritico dipendono dalle caratteristiche tridimensionali del nanomateriale e dalla sua morfologia che aumenta l'assorbimento della luce solare e fornisce più percorsi di trasferimento di carica e quindi più siti attivi per migliorare l'efficienza delle attività fotocatalitiche.

Anche i possibili prodotti di degradazione del DON sono stati analizzati mediante HPLC-MS dopo 120 minuti di fotoreazione, scoprendo che i principali siti di tossicità (i gruppi 12, 13-epossilici e idrossilici) nel DON sono stati distrutti, indicando che la tossicità di questa micotossina può diminuire dopo un efficace trattamento fotocatalitico.

Questo studio non solo presenta un metodo ecocompatibile e promettente per contrastare la contaminazione da micotossine, ma può altresì offrire preziose indicazioni per ricerche e approfondimenti futuri, grazie al grande interesse che sta riscontrando il settore delle nanotecnologie.

6. CONCLUSIONI

In questo elaborato si è trattato il processo di produzione della birra e i potenziali rischi di contaminazione da deossinivalenolo (DON), metabolita secondario prodotto da specie fungine del genere *Fusarium* pericoloso per la salute umana e animale. La birra è la bevanda più diffusa e consumata al mondo, ad oggi però non sono in vigore limiti di legge relativi alla sua possibile contaminazione da DON. Questo rappresenta un potenziale rischio al quale viene esposto il consumatore. Sono molti i fattori che incidono sulla presenza e quantità di DON nella birra, a partire dall'integrità della materia prima orzo (e degli altri ingredienti) fino alle dinamiche con le quali si sviluppano le fasi di birrificazione e alle tecniche di controllo della contaminazione delle specie di *Fusarium* produttrici di micotossine.

Geothricum candidum e *Pythium oligandrum* si sono dimostrati validi agenti di biocontrollo (BCA) per l'inibizione della flora fungina e per il contenimento del DON durante la fase di maltazione (Wang et al., 2019). Grazie ai risultati ottenuti nelle sperimentazioni, questi BCA sono stati proposti all'industria birraria come validi strumenti per il contenimento della micotossina DON.

È stato riportato inoltre un metodo innovativo ed ecocompatibile basato sulla fotodegradazione catalitica, una nanotecnologia già in uso per altri ambiti (sanificazione dell'aria e dell'acqua), basata su nanosemiconduttori e proposta come nuovo metodo per la decontaminazione delle micotossine negli alimenti e nell'ambiente. In particolare, la fotocatalisi si è dimostrata efficace nel degradare significativamente il DON. Grazie al trattamento con un fotocatalizzatore $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ a struttura simil-dendritica (ramificata), sotto irradiazione di luce visibile si è dimostrata la notevole efficacia di questo metodo: in presenza di una concentrazione iniziale di DON di 4,0 $\mu\text{g/mL}$, si è ottenuta una riduzione del 90,3% in sole due ore di trattamento (Wang et al., 2019).

Nonostante questi progressi, i ricercatori sono consapevoli che c'è ancora molta strada da fare prima dell'applicazione pratica di questa tecnologia; infatti non esistono ancora studi approfonditi sulla valutazione della tossicità delle sostanze degradate con la fotocatalisi, considerate sia singolarmente che in combinazione.

È pertanto necessaria una sinergia tra la ricerca scientifica che individua criticità e soluzioni, mette a punto conoscenze e strumentazioni tecnologiche sempre più mirate, rapide, accessibili ed

economiche, e il mondo professionale (agricolo e birraio) al fine di garantire un'adeguata qualità e sicurezza alimentare.

7. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

Arrúa A.A., Moura Mendes J., Arrua P., Ferreira F.P., Caballero G., Cazal C., Mohan Kohli U., Peralta I., Ulke G., Fernández Ríos D. (2019). Occurrence of Deoxynivalenol and Ochratoxin A in Beers and Wines Commercialized in Paraguay. *Toxins* - 11(6), 308.

Ayed F., Daami-Remadi M., Jabnoun-Khiareddine H., El Mahjoub, M. (2007). In vitro and in vivo evaluation of some biofungicides for potato *Fusarium* wilt biocontrol. *International Journal of Agricultural Research* - 2, 282–288.

Badea A., Tucker J.R., Sabra A., Netticadan T., Blackwell B., Yu L., Kodikara C., Wijekoon C. (2023). Endogenic Phenolic Compounds of Barley as Potential Biomarkers Related to Grain Mycotoxin Production and Cultivar Selection. *Biology* - 12(10), 1306.

Bai X.J., Sun C.P., Liu D., Luo X.H., Li D., Wang J., Wang N.X., Chang X.J., Zong, R.L., Zhu, Y.F. (2017). Photocatalytic degradation of deoxynivalenol using graphene/ZnO hybrids in aqueous suspension. *Appl. Catal. B-Environ* - 204, 11–20.

Bauer J.I., Gross M., Gottschalk C., Usleber E. (2016). Investigations on the occurrence of mycotoxins in beer. *Food Control* - 63, 135–139.

Benešová K., Běláková S., Mikulíková R., Svoboda Z. (2012). Monitoring of selected aflatoxins in brewing materials and beer by liquid chromatography/mass spectrometry. *Food Control* - 25, 626–630.

Benhamou N., Belanger R.R., Rey P., Tirilly Y. (2001). Oligandrin, the elicitor-like protein produced by *Pythium oligandrum*, induces systemic resistance to *Fusarium* crown and root rot in tomato plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 39: 681-696.

Bertuzzi T., Rastelli S., Mulazzi A., Donadini G., Pietri A. (2018). Known and Emerging Mycotoxins in Small- and Large-Scale Brewed Beer. *Beverages* - 4(2), 46.

Boivin P., Malanda, M. (1999). Inoculation by *Geotrichum candidum* during Malting of Cereals or Other Plants. *US Patent - 5,955,070 - freepatentsonline.com*

Dean R., Al Van Kan J., Zacaria A., Pretorius A., Kim E., Hammond K., Di pietro A., Spanu P.D., Rudd J.J., Dickman M., Kahman R., Ellis J. Foster G.D., (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology - 13: 414-430.*

Drakopoulos D., Sulyok M., Jenny E., Kägi A., Bänziger I., Logrieco A.F., Krska R, Vogelgsang S. (2021). *Fusarium Head Blight* and Associated Mycotoxins in Grains and Straw of Barley: Influence of Agricultural Practices. *Agronomy - 11(4), 801.*

Gaspari A., Ritieni A. (2008). Manuale HACCP per la prevenzione e il controllo delle Micotossine nelle produzioni alimentari. Università La Sapienza (https://www.collegiocapitani.com/file_statici/attualita/Manuale%20HACCP%20per%20la%20prevenzione%20e%20il%20controllo%20delle%20Micotossine%20nelle%20produzioni%20alimentari.pdf).

Habschied K., Krska R., Sulyok M., Lukinac J., Jukic M., Sarkanj B., Kristanovic V., Mastanjević K. (2019). The Influence of Steeping Water Change during Malting on the Multi-Toxin Content in Malt. *Foods 2019 - 8(10), 478.*

Hope R., Aldred D., Magan N. (2005) Comparison of environmental profiles for growth and deoxynivalenol production by *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* on wheat grain. *Letters in Applied Microbiology*, Volume 40, Issue 4, 1 April 2005, Pages 295–300.

Huiting W, Mao J., Zhang Z., Zhang Q., Zhang L., Zhang W. e Li P. (2019). Photocatalytic Degradation of Deoxynivalenol over Dendritic-Like α -Fe₂O₃ under Visible Light Irradiation. *Toxins - 11(2), 105.*

Jouany J., Yiannikouris A., Bertin G. (2005). The chemical bonds between mycotoxins and cell wall components of *Saccharomyces cerevisiae* have been identified. *Arch. Zootech. - 26–50.*

Kabak B. (2009). The fate of mycotoxins during thermal food processing. *J. Sci. Food Agric.* - 89: 549-554.

Kämper J., Kahmann R., Bölker M., Ma L.J., Brefort T., Saville B.J., Banuett F., Kronstad J.W., Gold E.S., Müller O., Perlin H.M., Wösten A.B.H., de Vries R., Ruiz-Herrera J., Reynaga-Peña G.C., Snetselaar K., McCann M., Pérez-Martin J., Feldbrügge M., Basse W.C., Steinberg G., Ibeas I.J., Holloman W., Guzman P., Birren W.B. (2006). Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* volume - 444, 97–101. (<https://www.nature.com/articles/nature05248>)

Kawtharani H., Beaufort S., Anson P., Taillandier P., Mathieu F., Pascale Snini S. (2022). Impact of the Inoculation Method of *Geotrichum candidum*, Used as Biocontrol Agent, on T-2 Toxin Produced by *Fusarium sporotrichioides* and *F. langsethiae* during the Malting Process. *Toxins* - 14(4), 239.

Krstanović V., Mastanjević K., Velić N., Pleadin J., Perši N., Španić V. (2015). The influence of *Fusarium culmorum* contamination level on deoxynivalenol content in wheat, malt and beer. *Rom. Biotechnol. Lett.* - 20, 10901–10910.

Lowe, D.P.; Arendt, E.K. (2004). The use and effects of lactic acid bacteria in malting and brewing with their relationship to antifungal activity, mycotoxins and gushing: A review. *J. Inst. Brew.* - 110, 163–180.

Lu L., Mei X., Dong W. (2022). Biological Detoxification of Mycotoxins: Current Status and Future Advances. *Int. J. Mol. Sci.* 23(3), 1064.

Mastanjević K., Šarkanj B., Mastanjević K., Šantek B., Krstanović V. (2019). *Fusarium culmorum* mycotoxin transfer from wheat to malting and brewing products and by-products. *World Mycotox. J.* - 12, 55–66.

Mastanjević K., Lukinac J., Jukić M., Šarkanj B., Krstanović V., Mastanjević K. (2019). Multi-(myco)toxins in malting and brewing by-products. *Toxins* - 11 (1), 30.

Mastanjević K., Šarkanj B., Krska R., Sulyok M., Warth B., Mastanjević Kre., Šantek B., Krstanović V. (2018). From malt to wheat beer: A comprehensive multi-toxin screening, transfer assessment and its influence on basic fermentation parameters. *Food Chem.* - 254, 115–121.

Mastanjević K., Kristanovic V., Mastanjevic K., Sarkanj B. (2018). Malting and Brewing Industries Encounter *Fusarium spp.* Related Problems. *Fermentation* - 4(1), 3.

Levasseur-Garcia C. (2018). Updated Overview of Infrared Spectroscopy Methods for Detecting Mycotoxins on Cereals (Corn, Wheat, and Barley). *Toxins* - 10(1), 38.

Mauch A., Dal Bello F., Coffey Z., Arendt E. (2010). The use of *Lactobacillus brevis* PS1 to in vitro inhibit the outgrowth of *Fusarium culmorum* and other common *Fusarium* species found on barley. *International Journal of Food Microbiology* 141(1-2):116-21.

McKee G., Cowger C., Dill-Macky R., Friskop A., Gautam P., Ransom J., Wilson W. (2019). Disease Management and Estimated Effects on DON (Deoxynivalenol) Contamination in *Fusarium* Infested Barley. *Agriculture* - 9(7), 155.

Milani J., Maleki, G. (2014). Effects of processing on mycotoxin stability in cereals. *J. Sci. Food Agric.*, 94: 2372-2375.

Neagu C., Borda D. (2013) Modelling the growth of *Fusarium graminearum* on barley and wheat media extract. *Romanian Biotechnological Letters*. Vol 18 (4) 8489

Ng C. A., Pernica M., Litvanova K., Koluchova I., Branyik T. (2023). Biocontrol Using *Pythium oligandrum* during Malting of *Fusarium*-Contaminated Barley. *Fermentation* - 9(3), 257.

Ng C., Postulkova M., Matoulkova D., Psota V., Hartman I., Branyik T. (2021). Methods for suppressing *Fusarium* infection during malting and their effect on malt quality. *Czech Journal of Food Science* - 39, (5) 340–359.

Nogueira M.S., Decudo G., Martinez M., Dieguez S.N., Moreira F., Moreno M.V., Stenglein S.A. (2018). Natural Contamination with Mycotoxins Produced by *Fusarium graminearum* and *Fusarium poae* in Malting Barley in Argentina. *Toxins* - 10(2), 78.

Ntushelo K., Ledwaba L.K., Rauwane M. E., Adebo O. A., Njobeh P. B. (2019). The Mode of Action of *Bacillus* Species against *Fusarium graminearum*, Tools for Investigation, and Future Prospects. *Toxins* - 11(10), 606.

Oliveira P., Brosnan B., Jacob F., Furey A., Coffey A., Zannini E., Arendt E.K. (2015b): Lactic acid bacteria bioprotection applied to the malting process. Part II: Substrate impact and mycotoxin reduction. *Food Control* - 51: 444-452.

Pascari S., Ramos A.J., Sanchis V. (2022). Relevant *Fusarium* Mycotoxin in Malt and Beer. *Foods* - 11(2), 246.

Paul P.A., Lipps P.E., Hershman D.E., McMullen M.P., Draper M.A., Madden L. V. (2008). Efficacy of triazole-based fungicides for *Fusarium Head Blight* and deoxynivalenol control in wheat: A multivariate meta-analysis. *Phytopathology* 98, 999-1011.

Perrone G., Ferrara M., Medina A., Pascale M., Magan N. (2020). Toxigenic Fungi and Mycotoxins in a Climate Change Scenario: Ecology, Genomics, Distribution, Prediction and Prevention of the Risk. *Microorganisms* - 8(10), 1496.

Peters J., Van Dam R., Van Doorn R., Katerere D., Berthiller F., Haasnoot W., Nielen M.W.F. (2017). Mycotoxin profiling of 1000 beer samples with special focus on craft beer. *PLoS ONE* - 12, e0185887.

Piacentini K.C., Běláková S., Benešová K., Pernica M., Savi G.D., Rocha L.O., Hartmann I., Čáslavský J., Correa B. (2019). *Fusarium* Mycotoxins Stability during the Malting and Brewing Processes. *Toxins* - 11(5), 257.

Piacentini K.C., Dagostim Savi G., Olivo G.; Scussel V.M. (2015). Quality and occurrence of deoxynivalenol and fumonisins in craft beer. *Food Control* 50, 925–929.

Postulkova M., Rezanina J., Fiala J., Ruzicka M.C., Dostalek P., Branyik T. (2018). Suppression of fungal contamination by *Pythium oligandrum* during malting of barley. *J. Inst. Brew.* - 124: 336–340.

Pronyk C., Cenkowski S., Abramson D. (2006). Superheated steam reduction of deoxynivalenol in naturally contaminated wheat kernels. *Food Control* - 17, 789–796.

Qi Sun, Zhijuan Li, Jianmei Li, Ningxin Liu, Min Zhang, Tao Le (2023). Advances in photocatalysis for mycotoxins elimination: engineering strategies in photocatalyst designing, practical applications and future prospect. *Journal of Alloys and Compounds* Volume 955 - 170234.

Romani R. (2017). Il mondo del Sommelier, ed. Didattica di Associazione Italiana Sommelier, pp. 240-279.

Sarlin T., Vilpola A., Kotavuuta E., Olkku J., Haikara A. (2012). Fungal Hydrophobins in the Barley-to-Beer Chain. *Journal of the Institute of Brewing* - 113: 147-153.

Suzzi G., Tofalo R. (2018). Microbiologia enologica - Seconda edizione della Collana Edagricole Università & Formazione

Tucker J.R., Badea A., Blagden R., Pleskach K., Tittlemier S.A. e Dilantha Fernando Wg (2019). Deoxynivalenol-3-Glucoside Content Is Highly Associated with Deoxynivalenol Levels in Two-Row Barley Genotypes of Importance to Canadian Barley Breeding Programs. *Toxins* - 11(6), 319.

Varga, E.; Malachova, A.; Schwartz, H.; Krska, R.; Berthiller, F. (2013). Survey of deoxynivalenol and its conjugates deoxynivalenol-3-glucoside and 3-acetyl-deoxynivalenol in 374 beer samples. *Food Addit. Contam. Part A* - 30, 137–146.

Vogelgsang S., Beyer M., Pasquali M., Jenny E., Musa T., Bucheli T.D., Wettstein F.E., Forrer H.R. (2019). An eight-year survey of wheat shows distinctive effects of cropping factors on different *Fusarium* species and associated mycotoxins. *Eur. J. Agron* - 105, 62–77.

Wang L., Wang Y., Shao H.L., Luo X.H., Wang R., Li Y.F. Li Y.N., Luo Y.P., Zhang D.J., Chen Z.X., (2017). In vivo toxicity assessment of deoxynivalenol-contaminated wheat after ozone degradation. *Food Addit. Contam* - 34, 103–112.

Warth B., Sulyok M., Fruhmann P., Berthiller F., Schumacher R., Hametner C., Adam G., Fröhlich J., Krska R. (2012). Assessment of human deoxynivalenol exposure using an LC–MS/MS based biomarker method. *Toxicol. Lett.* - 211, 85–90.

Wegulo S.N., Baenziger P.S., Hernandez Nopsa J., Bockus W.W., Hallen-Adams H. (2015). Management of *Fusarium head blight* of wheat and barley. *Crop Protection* - 73, 100–107.

Yang X., Li L., Duan Y., Yang X. (2017). Antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* JM113 in vitro and its protective effect on broiler chickens challenged with deoxynivalenol. *Journal of Animal Science*, Volume 95, Issue 2.

Zangrando T., Marconi M. (2018). Birra. Materie prime, tecnologia, stili – 2. Edizioni Edagricole

Zeppa G., (2011). Appunti di tecnologia birraria. Università degli Studi di Torino

Zhao Y., Selvaraj J.N., Xing F., Zhou L., Wang Y., Song H., Tan X., Sun L., Sangare L., Folly Y.M.E., (2014). Antagonistic action of *Bacillus subtilis* strain SG6 on *Fusarium graminearum*. *PLOS ONE* 9(3): e92486.

<https://www.enciclopediadellabirra.it/>

<https://www.microbiologiaitalia.it>

<https://r-biopharm.com/it/>

<https://www.mauriziotommasini.it/aflatossine-micotossine-pericoli-salute/>

<https://www.efsa.europa.eu/it/topics/topic/mycotoxins>

<https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/en/>

<https://eur-lex.europa.eu/legal-content>

<https://www.geopop.it/storia-e-diffusione-della-birra-la-bevanda-alcolica-piu-consumata-al-mondo/>

https://www.salute.gov.it/portale/temi/p2_6.jsp?id=1225&area=sicurezzaAlimentare&menu=igi

<https://blog.mr-malt.it/le-diverse-tipologie-di-malto-caratteristiche-e-utilizzo-nella-produzione-della-birra/>

<https://www.giornaledellabirra.it/>

<https://www.fermentobirra.com/storia-birra/la-birra-nella-storia-lindustrializzazione/>

<https://www.sciencedirect.com/topics/pharmacology-toxicology-and-pharmaceutical-science/vomitoxin>

https://cerb.unipg.it/?fbclid=IwAR2j_3miXjFzW0VEFaWgbVRRYjMEav1DuwlGZCLxC_VlVx08izZjPyUdGwo

<https://www.waterandfoodsecurity.org/scheda.php?id=28>

<https://fitogest.imagelinenetwork.com/it/sostanze-attive/pythium-oligandrum-ceppo-m1/818>

https://www.ilsole24ore.com/art/birra-consumi-crescita-184percento-AEjEVib?refresh_ce=1

<https://www.quattrocalici.it/birra/luppolo-materie-prime-della-birra/>

<https://slideplayer.it/slide/594042/>

https://it.m.wikipedia.org/wiki/Microbiologia_alimentare

<https://en.wikipedia.org/wiki/Fusarium>

<https://brewersofeurope.org/uploads/mycms-files/documents/publications/2022/european-beer-trends-2022.pdf>

<http://associazioneeuro.org/wp-content/uploads/2019/05/Materie-prime,-maltificazione-e-produzione.pdf>

RINGRAZIAMENTI

Alla fine di questo lungo e tortuoso cammino universitario, dopo la stesura di questo mio elaborato, è doveroso fare alcuni ringraziamenti.

In primo luogo ringrazio i miei genitori che mi hanno permesso di concludere questo percorso, mia sorella e tutti i miei familiari che mi hanno sostenuto nei tanti momenti difficili. In particolar modo ci tengo a menzionare mia zia Clara che mi ha seguito e dedicato tantissimo del suo tempo per aiutarmi a concludere la tesi.

Naturalmente, ringrazio i miei amici, Lorenzo ed Alessia, neo genitori della splendida Ginevra, la mia cara amica ed infermiera Alice, il mio socio d'avventure e schedine Cristian e la sua morosa Cristina, il miglior dj del Trentino ed ora anche top driver Alberto, l'amico sin dall'infanzia, ex pastore ed ora super camionista Giordano, Alessandro P. aspirante imprenditore e detto anche il "fighetta", il prossimo sposo canadese Simone, la fashion blogger Lisa.

Ringrazio Davide, detto "The Persian" con il quale scambio infinite chiacchierate sul basket e la sua morosa Chiara, soprannominata "Chicca" e "El Pelos" Daniele, che con il suo *DAI CHE NEN* ne ha fatto il mio principale motto.

Ringrazio i miei docenti per il sapere che ho acquisito e i miei compagni di università, in particolare Alessandro F., Nicola, Marco, Maria Z., Maria S., Giovanni con i quali ho trascorso bei momenti e che ho la fortuna di frequentare ancora, nonostante la distanza.

Oltre ad Edoardo, compagno di corse e bevute, che mi sta facendo avvicinare sempre di più al complesso ed affascinante mondo del vino, ringrazio anche tutti gli altri colleghi dell'Enoteca provinciale di Trento con i quali è sempre piacevole fermarsi a parlare dopo il lavoro.

Ringrazio infine tutte le altre persone non citate con le quali ho condiviso momenti ed esperienze nell'arco dei miei 25 anni.

È stata dura, ma finalmente ce l'ho fatta. GRAZIE A TUTTI!