

EVOLUZIONE DEI FOSFITI IN RELAZIONE ALLA TECNICA DI VINIFICAZIONE E AL CEPPO DI LIEVITO

Giorgio NICOLINI*, Tomás ROMÁN VILLEGAS, Loris TONIDANDEL, Mario MALACARNE, Andrea ZANONI, Roberto LARCHER

Unità Chimica Vitenologica e Agroalimentare, Centro Trasferimento Tecnologico, Fondazione E. Mach, v. Mach 1, 38010 San Michele all'Adige (TN), Italia

* autore corrispondente: giorgio.nicolini@fmach.it

Poster presentato a Enoforum 2015, 5-7 Maggio, Vicenza (Italia)

Introduzione

L'interesse per l'analisi del contenuto di fosfiti in uva e vino è legato, dal punto di vista normativo, alla residualità del fosetyl-Al - un agrofarmaco largamente utilizzato in viticoltura come antiperonosporico - di cui rappresentano il principale prodotto di degradazione. Il limite europeo (MRL: Maximum Residue Level) per il fosetyl-Al in uva da vino è di 100 ppm ed è riferito alla somma del principio attivo, dell'acido fosforoso e dei relativi sali, espressi come fosetyl (Reg. EC No 396/205). Tale limite è relativamente elevato e non rappresenta un problema per i produttori, poiché tiene conto anche dei contributi derivanti da prodotti a base di acido fosforoso che in viticoltura vengono impiegati comunemente e massicciamente come fertilizzanti fogliari e/o fungicidi per la lotta alla peronospora.

Tuttavia, la mancanza di criteri e regolamenti comuni in Paesi extra-europei rischia di procurare serie difficoltà alle esportazioni di vino. Ne è un esempio il caso degli Stati Uniti d'America, dove nella primavera del 2014 una scarsa chiarezza normativa ha provocato un certo allarmismo fra gli operatori europei del settore vino. Nella regolamentazione statunitense, infatti, il limite tollerato per il fosetyl-Al in uva da vino è pari a 10 ppm al netto dell'acido fosforoso e dei rispettivi sali, che negli USA sono considerati dei fertilizzanti e non rientrano quindi nella categoria dei "pesticidi". Tuttavia, la presenza all'interno del Regolamento US EPA (United States Environmental Protection Agency 180.415: Aluminium tris (O-ethylphosphonate)) di un riferimento ai prodotti di degradazione ha fatto presupporre che l'MRL comprendesse anche acido fosforoso e fosfiti, provocando inizialmente una errata interpretazione di tale limite. Se per gli Stati Uniti l'allarme fosfiti è rientrato, non si può dire altrettanto per Paesi come Cina e India, le cui regolamentazioni prevedono un MRL pari a 10 ppm, riferito alla somma di fosetyl, acido fosforoso e relativi sali.

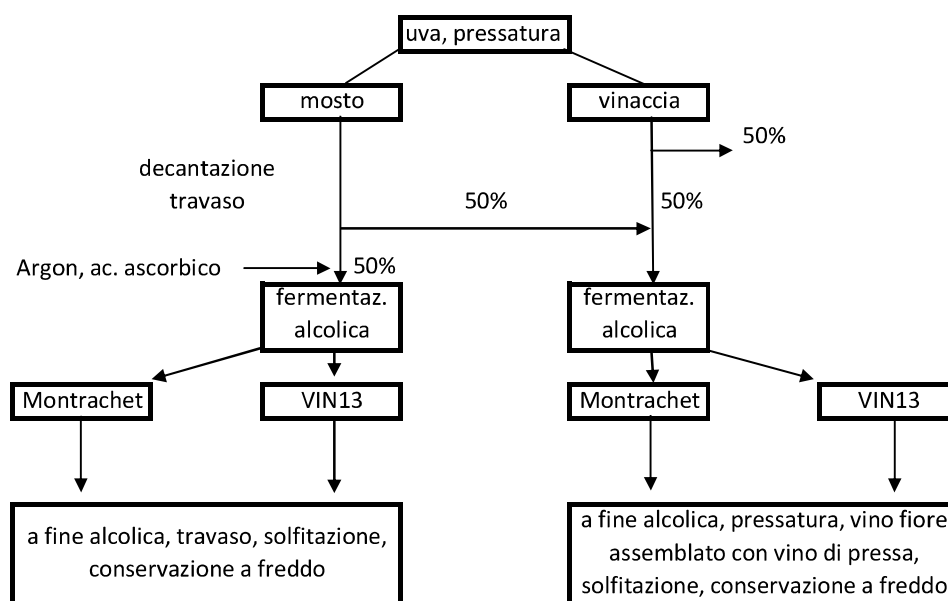
Da questi fatti è nato l'interesse per approfondire l'argomento "fosfiti" in vitienologia e, nell'ambito di questo lavoro più strettamente enologico, la loro evoluzione in relazione alla tecnica di vinificazione e al ceppo di lievito.

Materiali e metodi

Uve di 5 varietà (Teroldego, Lagrein, Merlot, Marzemino, Traminer aromatico) sono state raccolte in cassette a maturazione tecnologica nel corso della vendemmia 2014, ottenendo da ciascuna massa di uva monovarietale due lotti. Ognuno dei 10 lotti così ottenuti è stato trattato secondo il protocollo di Figura 1. I 10 mosti illimpiditi e solfitati (30 mg/L), prima di essere divisi per fermentare in bianco o in rosso, sono stati addizionati di dosi variabili di acido fosforoso in soluzione acquosa (con acqua MilliQ) fino a un massimo di 100 mg/L di H₃PO₃ (purezza 99%, CAS-13598-36-2; Sigma Aldrich). I mosti bianchi sono stati protetti dalla presenza di ossigeno con Argon e acido ascorbico (10

mg/L), al fine di massimizzare le possibili differenze tra una vinificazione tendenzialmente "riducente" com'è quella in bianco rispetto ad una - quella in rosso - più marcatamente "ossidante". I mosti sono stati inoculati alla dose di 300 mg/L con *Saccharomyces cerevisiae* ceppi Montrachet e VIN13 preventivamente reidratati a 38°C-40°C. Le vinificazioni in bianco sono state realizzate a temperatura variabile tra 18°C e 20°C; quelle in rosso sono decorse tra 24°C e 26°C, con movimentazione manuale della vinaccia due volte al giorno per 7 giorni.

Figura 1. Protocollo delle vinificazioni



L'analisi dell'acido fosforoso è stata realizzata - con poche modifiche dovute all'uso di un UHPLC anziché di un HPLC - applicando il metodo europeo QuPPE (Anastassiades et al. 2013) finalizzato all'analisi di residui di pesticidi altamente polari per i quali non sia possibile l'approccio multiresiduo "QuEChERS" descritto nello standard europeo EN 15662:2008. È stato utilizzato un Aquity UHPLC-MS/MS accoppiato con uno spettrometro di massa Xevo TQ che ha operato in modalità di ionizzazione elettrospray (ESI) negativo. Si è utilizzata una colonna Hypercarb 2.1 x 100 mm 5 m (P/N 35005-102130) operante a 40°C e una pre-colonna Hypercarb Guard 2.1 x 10 mm 5 m (P/N 35005-102101). L'eluente A era: 0.2% acido formico + 5% MeOH. L'eluente B era: 0.1% acido formico in MeOH.

La determinazione dei parametri chimico-compositivi di base è stata realizzata per FTIR, con un WineScan™ FT 120 Type 77310 (Foss Electric A/S, Hillerød, Denmark) adeguatamente settato in confronto con i metodi ufficiali dell'UE e dell'OIV. L'elaborazione statistica dei dati è stata realizzata con le procedure del pacchetto software STATISTICA v. 8.0 (StatSoft. Inc., Tulsa, OK, USA).

Risultati e discussione

I contenuti di fosfiti ottenuti nei mosti - anche a seguito dell'aggiunta effettuata di acido fosforoso - sono riportati nella Tabella 1. La variabilità, descritta dalle semplici statistiche di distribuzione tabulate, è piuttosto ampia, come si evince dai valori del minimo (13.3 mg/L) e del massimo (232.5 mg/L). La distribuzione non sembra spostarsi troppo da una tipica gaussiana, come paiono indicare anche i valori abbastanza prossimi di media e mediana oltre che quelli del 25° e del 75° percentile (rispettivamente Lower Quartile e Upper Quartile).

Tabella 1. Statistiche di distribuzione dei contenuti di fosfiti nei mosti.

Variable	H ₃ PO ₃ (mg/L)							
	N.	Mean	Median	Min	Max	Lower Q.	Upper Q.	Std. Dev.
mosti	10	97.6	87.0	13.3	232.5	65.0	134.2	63.2

Composizione di base dei vini

La composizione di base dei 40 vini prodotti, distinta per tecnica di vinificazione e per ceppo di lievito, è riportata nella Tabella 2. Nessun vino ha subito la fermentazione malolattica (FML; acido lattico sempre < DL, 0.5 g/L), ad eccezione di due Traminer vinificati in rosso ambedue con il ceppo Montrachet. In uno di questi la FML è stata praticamente completata (pH finale, 3.51; acido malico, 0.2 g/L; acido lattico, 2 g/L) mentre nell'altro (pH finale, 3.43; acido malico, 2.0 g/L; acido lattico, 0.6 g/L) si è solamente avviata prima dell'aggiunta di SO₂.

Tabella 2. Statistiche di distribuzione dei parametri compositivi dei vini

Variable	All Groups							
	N.	Mean	Median	Min	Max	Lower Q.	Upper Q.	Std.Dev.
Alcol (%vol)	40	11.23	11.20	9.60	12.70	10.45	11.95	0.87
Zuccheri (g/L)	40	1.65	1.55	0.00	5.20	1.15	2.00	0.90
pH	40	3.22	3.20	2.86	3.56	3.04	3.43	0.21
Acidità Tot (g/L)	40	7.70	7.75	4.10	9.70	7.30	8.50	1.15
Ac. Volatile (g/L)	40	0.28	0.27	0.06	0.64	0.19	0.36	0.13
Acido Malico (g/L)	40	3.50	3.65	0.20	4.70	2.90	4.30	0.94

All'analisi di varianza sono emerse differenze statisticamente significative tra le tecniche di vinificazione (relativamente ad alcol, pH e acidità totale), ma non tra i ceppi (Tabella 3) né per l'interazione "tecnica x ceppo".

I meccanismi di estrazione dalle parti solide e le successive precipitazioni e casuali malolattiche hanno incrementato nei vinificati in rosso il pH e diminuito l'acidità totale; nessuna differenza significativa è stata osservata per malico, acidità volatile e zuccheri mentre le rilevanti differenze significative relative alla gradazione alcolica sono da attribuirsi ai maggiori fenomeni di volatilizzazione dell'alcol stesso nelle vinificazioni in rosso nei piccoli serbatoi da microvinificazione e alle perdite di alcool con la vinaccia.

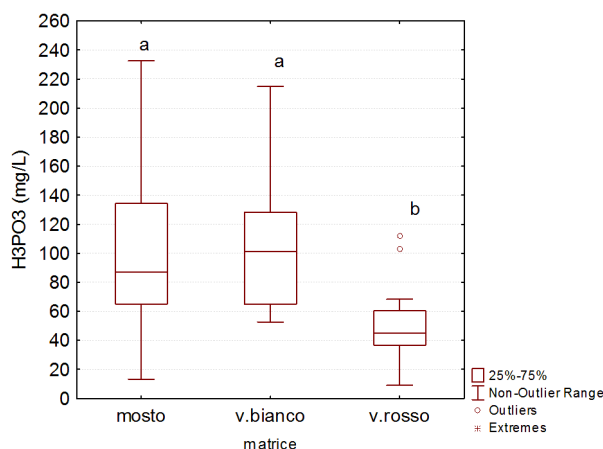
Tabella 3. Risultati dell'ANOVA, test LSD di Fisher, per le fonti di variazione tecnica di vinificazione (a sx.) e ceppo di lievito (a dx.).

tecnica di vinificazione			ceppo di lievito		
Alcol (%vol)					
Rosso	10.63	a	VIN13	11.21	n.s.
Bianco	11.83	b	Montrachet	11.25	n.s.
Zuccheri (g/L)					
Bianco	1.55	n.s.	VIN13	1.44	n.s.
Rosso	1.76	n.s.	Montrachet	1.87	n.s.
pH					
Bianco	3.05	a	VIN13	3.21	n.s.
Rosso	3.38	b	Montrachet	3.22	n.s.
Acidità Titolabile (g/L)					
Rosso	7.29	a	Montrachet	7.57	n.s.
Bianco	8.12	b	VIN13	7.84	n.s.
Acidità Volatile (g/L)					
Rosso	0.27	n.s.	VIN13	0.27	n.s.
Bianco	0.29	n.s.	Montrachet	0.29	n.s.
Acido Malico (g/L)					
Rosso	3.34	n.s.	Montrachet	3.37	n.s.
Bianco	3.66	n.s.	VIN13	3.62	n.s.

Fosfiti nei vini

Relativamente alla tecnica di vinificazione si sono trovate differenze altamente significative ($p < 0.001$; test di Tukey), con i vini rossi a contenuti significativamente più bassi - addirittura più che dimezzati - rispetto ai bianchi. Tali differenze vanno ben al di là di quelle che potrebbero essere attribuite alle possibili diluizioni conseguenti al protocollo sperimentale applicato. Nel confronto con i mosti di origine, non si osservano differenze significative con i valori riscontrati nei vini bianchi, mentre sono significative quelle con i vini rossi (Figura 2).

Figura 2. Box plot di distribuzione dei contenuti nei mosti e nei relativi vini ottenuti per vinificazione in bianco o in rosso (test di Tukey per numerosità differenti, $p < 0.05$).



Effetto del ceppo di lievito sui fosfiti

Non si sono osservate differenze statisticamente significative tra i ceppi utilizzati, né considerando i vini nel loro complesso né prendendo in considerazione singolarmente i vini bianchi e i vini rossi (Tabella 4).

Tabella 4. Fosfiti nei vini bianchi (N=20) e nei rossi (N=20) in relazione al ceppo di lievito.

Vino	Lievito	H ₃ PO ₃ (mg/L)	sign.
bianco	Montrachet	108.0	n.s
	VIN13	110.7	n.s
rosso	VIN13	48.1	n.s
	Montrachet	48.7	n.s

In conclusione, la presenza di fosfiti nei mosti determina una presenza sostanzialmente non diversa di fosfiti nei vini bianchi adeguatamente protetti dall'ossidazione; nel caso dei vini rossi, decisamente meno protetti rispetto ai bianchi, la quantità di fosfiti residuali viene invece significativamente ridimensionata e - almeno limitatamente ai lieviti utilizzati - in modo indipendente dal ceppo che ha condotto la fermentazione. Relativamente alla giustificazione degli andamenti osservati, non è stato possibile misurare le eventuali variazioni nei fosfati ed effettuare un bilancio complessivo anche relativamente all'uptake da parte della biomassa; non si possono peraltro escludere a priori anche altri fattori incidenti nelle quantità misurate nel caso dei rossi.

Letteratura

- Anastassiades M., Kolberg D. I., Mack D., Wildgrube C., Sigalov I., Dörk D. (2013). Quick method for the analysis of residues of numerous highly polar pesticides in foods of plant origin involving simultaneous extraction with methanol and LC-MS/MS determination (QuPPE-Method) - Version 7.1 (Nov 2013). www.eurl-pesticides.eu, EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides Single Residue Methods (EURL-SRM).