

l'Enologo

DAL 1893 LA VOCE DELLA CATEGORIA

MENSILE DELL'ASSOCIAZIONE ENOLOGI ENOTECNICI ITALIANI. ORGANIZZAZIONE NAZIONALE DI CATEGORIA DEI TECNICI DEL SETTORE VITIVINICOLO - N° 11 NOVEMBRE 2018



**ITALIA PRIMA AL MONDO
PER BIODIVERSITÀ**



ASOENOLOGI
IL VINO PER CULTURA E PROFESSIONE

PRESENZA DI FOSETIL NEI VINI APPROFONDIMENTI SULLA NEOFORMAZIONE IN RELAZIONE A VARIABILI ENOLOGICHE

L'acido fosfonico nei mosti può essere all'origine della formazione dell'etilfosfonato (fosetil) che si trova nel vino. Tale formazione avviene essenzialmente per via chimica, favorita da alte concentrazioni di acido fosfonico e alcol, elevate temperature di conservazione, pH bassi - ancorché in intervalli enologicamente corretti -, nonché dal tempo. Qualche differenza è stata osservata tra fermentazioni in bianco condotte da ceppi di lievito diversi, mentre nessuna in relazione alla sosta sui lieviti; tali fattori sono di minor significato tecnologico rispetto alle altre fonti di variazione.



Di
Tomás Román¹
Loris Tonidandel²
Mattia Zeni³
Simon Cembran⁴
Roberto Larcher⁵
Giorgio Nicolini^{6*}
Centro Trasferimento Tecnologico,
Fondazione Mach - San Michele all'Adige (TN)

* autore corrispondente: giorgio.nicolini@fmach.it

INTRODUZIONE

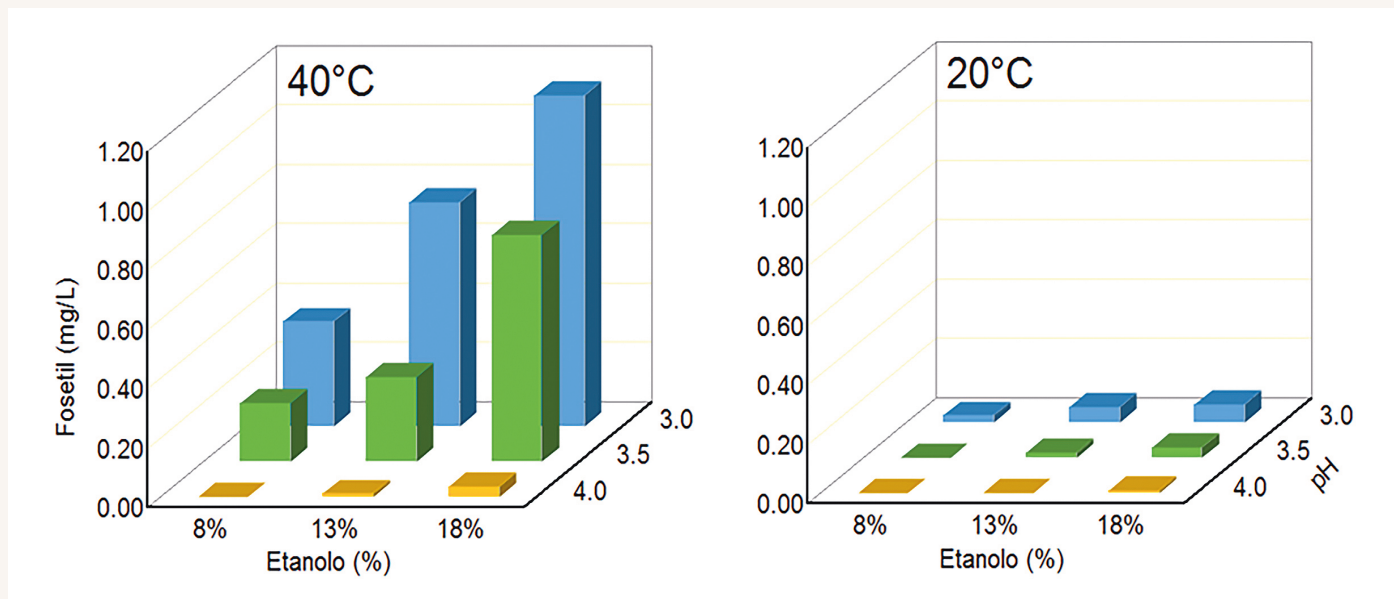
● Il fosfonato di etile è il principio attivo (p.a.) di un fungicida sistemico ben noto in agricoltura da quando, nel 1982, il composto in forma salificata con l'alluminio (Fosetyl-Al) fu messo sul mercato col nome commerciale di Aliette®. Il fosfonato di etile - più noto nell'ambiente agricolo come fosetil - è utilizzato nella

lotta integrata contro diverse malattie fungine dovute a oomiceti, date le sue performance in termini di buona protezione sistemica della pianta, minore tossicità per l'operatore rispetto ad altri p.a. (EFSA 2012) e minor sviluppo di resistenza da parte dei patogeni (Dercks e Creasy 1989).

● In viticoltura è utilizzato nella gestione dei marciumi radicali (*Phytophthora spp*) e, soprattutto, contro la peronospora

(*Plasmopara viticola*) grazie al suo duplice meccanismo d'azione: infatti, da una parte presenta la capacità di inibire lo sviluppo del micelio fungino e la sporulazione attraverso il blocco della sintesi della parete cellulare e del citoscheletro (King *et al.* 2010), dall'altra agisce come biostimolatore delle difese innate della pianta, aumentando la sintesi di fitolessine e di sostanze fenoliche quali gli stilbeni (Andreu *et al.* 2006;

Fig. 1 - Concentrazione di fosetil dopo 76 ore a 40°C o a 20°C, in funzione del pH e della gradazione alcolica, per una matrice simil-vino avente una concentrazione di acido fosfonico corrispondente al limite (100 mg/kg) definito per le uve non-bio.



Dercks e Creasy 1989). Dopo il trattamento, il fosfonato di etile dissociatosi dall'alluminio può degradarsi ulteriormente in acido fosfonico ed etanolo sulla superficie dei tessuti vegetali, nel terreno o già all'interno della pianta. Per questo motivo, nella regolamentazione comunitaria - Reg. (UE) N. 459/2010/CE del 27.5.2010; Reg (UE) 2016/75/CE del 21.01.2016 - il livello massimo di residuo (LMR) ammesso per il Fosetil-Al (100 mg/kg in uva da tavola e da vino) è definito come la somma di fosetil, acido fosfonico e dei suoi sali, espressi tutti come fosetil. L'etanolo rilasciato è in seguito liberato nell'atmosfera oppure

organicato come fonte carboniosa per la pianta.

- Una volta assorbito, per via fogliare o radicale, il fosfonato di etile è traslocato in senso acropeto (dalle radici verso i tessuti sink) o basipeto (dai tessuti verdi verso le radici) nella sua forma originale o già degradato in acido fosfonico, apportando in questo modo il suo potere sistemico.

- I sali (potassici o disodici) dell'acido fosfonico sono autorizzati come sostanze attive - Reg. (UE) N. 369/2013/CE e Reg. (UE) 832/2013/CE, rispettivamente - e, anche per il loro costo contenuto, sono stati molto utilizzati fino al più recente

passato come concimi e biostimolatori, sebbene gli effetti siano controversi e i fosfiti siano sostanzialmente forme nutrizionalmente inefficaci del P (Ratjen e Gerendás 2009; Thao e Yamakawa 2009; Gómez-Merino e Trejo-Téllez 2015). La letteratura riporta inoltre evidenze circa la presenza di fosfonati in concimi organici da pollame (Giles *et al.* 2014).

- Nel terreno il fosfonico presenta anche un'elevata persistenza e soltanto pochi microrganismi sono in grado di metabolizzarlo come fonte di fosforo, comunque con una conversione a fosfato molto lenta (MacIntire *et al.* 1950); per l'insieme di questi motivi si considera che la sua

Tab. 1 - Composizione di base dei mosti da vinificazione in bianco.

Mosto	Fosetil (mg/L)	Acido forfonico (mg/L)	Solidi solubili (°Brix)	pH	Acidità titolabile (g/L)	Acido malico (g/L)	Acido tartarico (g/L)	Potassio (g/L)	APA (mg/L)
Pinot bianco	<0,01	2,1	19,71	3,02	3,59	2,01	3,49	0,72	138
Solaris	<0,01	0,3	22,28	3,05	4,55	2,07	3,89	0,75	159
Pinot grigio	<0,01	24,0	22,63	3,05	6,07	3,68	4,65	1,14	155
Chardonnay	<0,01	17,8	21,83	3,18	5,60	3,74	4,95	1,35	163
Pinot grigio	<0,01	25,2	21,38	3,05	5,89	3,61	4,87	1,15	144
Pinot nero	<0,01	29,4	24,43	3,25	4,48	2,83	3,65	1,29	224

presenza nei terreni agricoli, pur in concentrazioni diversificate, sia sostanzialmente ubiquitaria.

- I sali dell'acido fosfonico non sono però autorizzati in agricoltura biologica (il fosfonato di potassio lo è stato fino al 30.10.2013); ne consegue che - come per tutti i fitofarmaci sulla base del DM 309 del 13.1.2011 - basterebbe riscontrare la presenza nel vino del fosfonato di etile sopra il limite di quantificazione di 0,01 mg/kg perché un prodotto biologico non possa più essere certificato tale.

- A fronte dell'evidenza a livello europeo di residui di acido fosfonico in prodotti biologici molto al di sopra dei limiti ammessi, la Direzione Generale per la Promozione della Qualità Agroalimentare e dell'Ippica del MiPAAF - con attenzione a non porre comunque rischi per la salute del consumatore (EFSA 2014) - ha confermato per questi prodotti un LRM temporaneo per il solo acido fosfonico a 60 mg/kg, mantenendo inalterato il limite del fosfonato di etile a 0,01 mg/kg in attesa comunque di ulteriori approfondimenti conoscitivi.

OBIETTIVO

- Il motivo che ha portato ad affrontare il tema del fosfonato di etile è stata l'osservazione in vari vini di sicura origine biologica - che quindi non avevano visto la recente utilizzazione di derivati dell'acido fosfonico - di livelli quantificabili di fosetil associati a residui di fosfonico superiori ai 20 mg/L.

- Gli studi intrapresi hanno portato a dimostrare per la prima volta la formazione *de novo* di fosfonato di etile sia in simil-vino che in matrici enologiche (Tonidandel *et al.* 2018). Nel presente articolo, quindi, riassumeremo brevemente i fattori di rilievo tecnologico studiati nel lavoro originario appena citato, integrandoli però con ulteriori osservazioni e casistiche - in condizioni di cantina su mosti reali - relative all'impatto della concentrazione di fosfonico, del ceppo di lievito e della presenza di feccia di lievito durante la conservazione a fine alcolica.

MATERIALI E METODI

- Per quanto riguarda i dettagli delle condizioni sperimentali circa l'effetto

del grado alcolico, della temperatura e del pH di conservazione si rimanda al lavoro di Tonidandel *et al.* (2018); analogamente, per quanto riguarda la metodica ufficiale QuPPEe.

- Gli studi circa la formazione del fosfonato di etile in matrici enologiche sono stati invece realizzati in scala semi-industriale a partire da 6 masse di mosti limpidi da vinificazione in bianco appartenenti a 5 varietà (**Tab. 1**).

- Per la verifica dell'effetto della concentrazione iniziale di acido fosfonico nei mosti, dalle due masse con la più bassa concentrazione di acido fosfonico naturale (0,3 e 2,1 mg/L) sono state ricavate 3 aliquote, di cui la prima lasciata tal quale (controllo) e le altre due addizionate rispettivamente di 20 e 60 mg/L di fosfonico.

- Ciascuna aliquota è poi stata fermentata con 5 *Saccharomyces cerevisiae* commerciali (SC1, SC2, SC3, SC4, SC5; $5 \cdot 10^6$ UFC/mL) e il campionamento per le analisi è stato realizzato a fine fermentazione alcolica.

- Per la verifica dell'effetto del ceppo di lievito, anche le altre 4 masse di mosti disponibili, già naturalmente ricche di fosfonico, sono state addizionate di 20 e di 60 mg/L dello stesso acido e fermentate anch'esse con gli stessi 5 lieviti.

- La conduzione di tutte le fermentazioni in bianco è avvenuta a 18-22°C, moni-

torandone il decorso per pesata fino a peso costante per almeno 3 misure successive; a quel punto il vino è stato campionato per l'analisi di fosetil e di acido fosfonico residuo.

- L'effetto della sosta sulla feccia di lievito è stato indagato su 21 vini ottenuti dalla fermentazione con 3 ceppi di lievito (SC2, SC3 e SC5) delle 6 masse di partenza più quello trattato con 60 mg/L di una sola massa. L'affinamento in presenza o in assenza di feccia di lievito è durato 6 mesi.

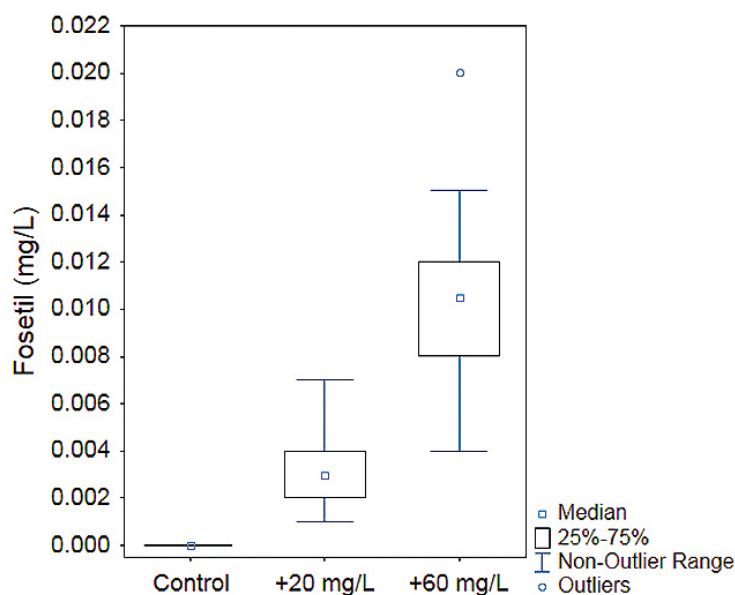
RISULTATI E DISCUSSIONE

Esperienze in vino e simil-vino

- Il lavoro di Tonidandel *et al.* (2018) ha dimostrato che, in presenza di 20 mg/L di acido fosfonico nel vino, dopo lassi di tempo non particolarmente prolungati era possibile trovare concentrazioni quantificabili di fosfonato di etile anche nelle condizioni sperimentali più limitanti da loro applicate; questo invece non avveniva per i vini di controllo privi di acido fosfonico.

- Ne deriva che anche i livelli di acido fosfonico di 60 mg/kg definiti dal MiPAAF per il biologico non garantivano il non superamento della soglia legale del fo-

Fig. 2 - Effetto della concentrazione di acido fosfonico nei mosti sulla formazione fermentativa di fosetil. (LEGENDA. Controllo: 0,3-2,1 mg/L; +20 e +60 mg/L: le aggiunte di fosfonico ai mosti di controllo; ogni box plot rappresenta la distribuzione di 10 processi fermentativi).



setil pari a 0,010 mg/kg per questa tipologia di vini.

- Il pH più acidi (3,0 e 3,5 rispetto a 4,0) e le gradazioni alcoliche maggiori tra le 3 studiate (8-13-18 % vol), così come la temperatura a 40° anziché a 20°, si erano dimostrati in grado di accelerare la esterificazione a fosfonato di etile (**Fig. 1**), la cui formazione alle condizioni sperimentali non aveva ancora raggiunto l'equilibrio chimico.

Fermentazioni in condizioni enologiche

- I mosti sono stati scelti in modo di garantirsi la disponibilità di una ragionevole variabilità compositiva iniziale dei valori di pH e di zuccheri, parametri che - direttamente o indirettamente - impatterebbero sia sul metabolismo del lievito che sulla cinetica di esterificazione chimica secondo la reazione di Fischer.

- Nessun mosto (**Tab. 1**) aveva un contenuto iniziale di fosetil superiore al limite per il biologico pari a 0,01 mg/L; la concentrazione di partenza di acido fosfonico era invece variabile fra i 0,3 mg/L e i 29 mg/L. Gli apporti di acido fosfonico di 20 mg/L e 60 mg/L sono stati definiti e realizzati al fine di creare variabilità attorno il limite di residuo massimo ammesso e, conseguentemente, poter valutare l'incidenza della presenza di acido fosfonico in condizioni di reale necessità poiché, come già osservato, la vinificazione in bianco non determina significative variazioni nella concentrazione di questo acido (Nicolini *et al.* 2015).

Effetto della concentrazione di acido fosfonico.

- Alla fine della fermentazione alcolica, i vini ottenuti da mosti di controllo - con un contenuto di acido fosfonico massimo di 2,1 mg/L - non hanno mostrato concentrazioni rilevabili di fosfonato di etile. L'effetto dovuto alla concentrazione iniziale di acido sulla produzione di fosetil è marcato, ed evidenziato chiaramente in **Fig. 2**; il limite per il bio sarebbe stato superato già a fine alcolica nel caso dei mosti con 60 mg/L di acido fosfonico.

Effetto del ceppo di lievito.

- L'effetto del ceppo di lievito, presentato nella **Fig. 3**, è stato naturalmente

indagato sui soli campioni addizionati di acido fosfonico.

- La differenza statistica (Anova effetti principali, fonte di variazione: ceppo e massa. Test LSD di Fisher, $n = 12$, $p < 0.05$) riguarda solamente i processi fermentativi condotti dal ceppo siglato SC1 rispetto a SC3, con un differenziale medio di circa 0,005 mg/L pari alla metà del limite per il bio. In questo caso, alla luce delle condizioni sperimentali che non hanno registrato puntualmente lo sviluppo di temperatura e del fatto che i campioni sono stati raccolti a fine fermentazione, con una durata della stessa naturalmente un poco differente tra i vari ceppi, il parlare di processo di fermentazione gestito dal ceppo anziché di specifico effetto diretto del ceppo appare sostanzialmente più corretto.

- Peraltro, SC3 è stato mediamente il più lento a fermentare (media±dev.st.: 211±49 h), benché non significativamente rispetto a SC1 (183±26 h), mentre il più veloce è stato SC4 (126±14 ore), e SC3 e SC4 non hanno fatto registrare differenze significative tra loro in termini di fosetil.

- L'assorbimento dell'acido fosfonico da parte di *Saccharomyces spp* è già stato dimostrato (Killian e Ough 1979) e si potrebbe in linea di principio speculare circa il ruolo attivo del ceppo di lievito nella esterificazione enzimatica dell'acido

fosfonico con l'etanolo all'interno delle cellule di lievito, così come avviene per altri composti; il disegno sperimentale tuttavia non permette di trarre conclusioni a riguardo.

Affinamento sulla feccia

- Il risultati ottenuti nei vini a fine fermentazione alcolica non permettono di scorporare l'eventuale esterificazione enzimatica da quella per via esclusivamente chimica.

- Quindi, per cercare di valutare da un punto di vista tecnologico il peso di ciascuna via di formazione si è voluto verificare se la presenza di feccia di lievito durante l'affinamento del vino portasse ad ulteriori differenze, ipotizzando, anche per il fosfonato di etile, la nota liberazione degli esteri prodotti e immagazzinati all'interno dei vacuoli (Buono *et al.* 2006) e l'assenza di idrolisi acida del fosetil.

- Dopo 6 mesi di affinamento - usuali per molti dei vini bianchi - i valori medi (N=21) di fosetil formato sull'intero data-set non sono risultati statisticamente diversi in presenza (0.037±0.017 mg/L) o in assenza di feccia (0.039±0.019 mg/L) e tale situazione è confermata anche per singolo ceppo di lievito (**Fig. 4**).

- L'insieme di questi risultati sembra indicare, quindi, che le eventuali differenze

Fig. 3 - Effetto del ceppo di *Saccharomyces cerevisiae* (SC) sulla concentrazione di fosfonato di etile nei vini. Ogni box plot rappresenta la distribuzione dei valori delle 12 fermentazioni realizzate per ceppo.

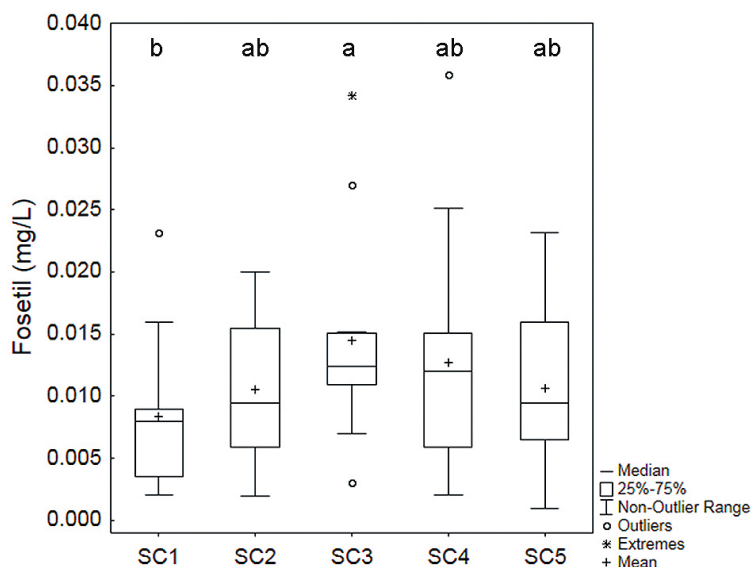
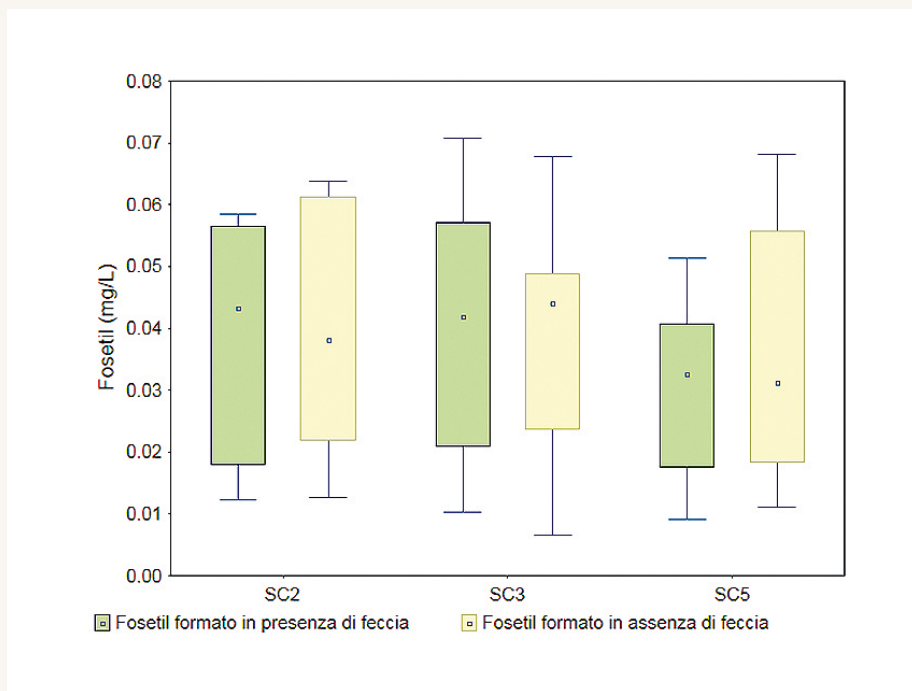


Fig. 4 - Fosetil presente in vini ottenuti con 3 ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* (SC), conservati per 6 mesi dopo fine alcolica sulla propria feccia o in assenza di essa.



riconducibili al ceppo di lievito utilizzato nel processo fermentativo verrebbero essenzialmente assorbite da quanto invece riconducibile alla formazione per via chimica, pur non potendosi escludere il contributo di una via enzimatica.

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

- Per la prima volta è stata riportata la neof ormazione di fosetil in matrici enologiche. I valori riscontrati sono al disotto di quelli legalmente accettati per vini da gestione agronomica integrata e non si evidenziano rischi in termini di salute per il consumatore.
- La cinetica formativa riscontrata potrebbe invece portare a una situazione delicata nei vini da produzione biologica derivati da mosti naturalmente ricchi di acido fosfonico; la sola presenza di fosetil porterebbe infatti ad una non conformità del prodotto secondo la normativa vigente.
- Gli interventi di natura tecnologica non sembrerebbero mettere a disposizione dell'enologo significativi margini di intervento, in quanto la formazione pare essere essenzialmente regolata dagli aspetti chimici. Vini caratterizzati da pH bassi, elevato contenuto alcolico e de-

stinati a lungo invecchiamento sono a maggior rischio di formazione di fosetil, caratteristiche che sono peraltro spesso tipiche dei prodotti a maggior valore aggiunto. La valutazione del rischio mediante analisi dell'acido fosfonico prima dell'inizio dell'affinamento sembra essere in questo momento il modo migliore per valutare in modo consapevole l'attitudine all'invecchiamento dei vini in termini prettamente legali.

- Condizioni subottimali di conservazione dei vini che presentassero residui di acido fosfonico - ad esempio, nel corso di un trasporto marittimo o nel caso di soste prolungate in serbatoi non termocondizionati situati all'aperto - potrebbero tradursi in non conformità.

SUMMARY

Fosetyl in wine. Further studies about its *de novo* formation related to winemaking variables.

- The presence of phosphonic acid in juice can result in detectable amounts of fosetyl in white wine, mainly formed via a chemical esterification. High concentrations of phosphonic acid and ethanol, high temperature, long conservation time and low pH values promote fosetyl formation. As regards the concentration

of this ester, statistically significant differences have been observed between white wines produced using different yeast strains in semi-industrial winemaking conditions, but these differences - as well as a 6-month maturation on the fine lees - are technologically marginal compared to the variables governing the chemical esterification. ●

BIBLIOGRAFIA

- Andreu A. B., Guevara M. G., Wolski E. A., Daleo G. R., Caldiz D. O. (2006). Enhancement of natural disease resistance in potatoes by chemicals. *Pest Management Science* 62, 162-170.
- Bueno J.E., Peinado R.A., Medina M., Moreno J. (2006). Effect of a short contact time with lees on volatile composition of Airen and Macabeo wines. *Biotechnology letters* 28(13), 1007-1011.
- Dercks W., Creasy L.L. (1989). Influence of fosetyl-Al on phytoalexin accumulation in the *Plasmopara viticola*-grapevine interaction. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 34(3), 203-213.
- EFSA (European Food Safety Authority) (2012). Reasoned opinion on the review of the existing maximum residue levels (MRLs) for fosetyl according to Article 12 of Regulation (EC) No 396/2005.
- EFSA (European Food Safety Authority) (2014). Statement on the dietary risk assessment for proposed temporary maximum residue levels (t-MRLs) for fosetyl-Al in certain crops. *EFSA Journal* 2014; 12(5):3695, 22pp. doi: 10.2903/j.efsa.2014.3695.
- Giles C.D., Cade-Menun B.J., Liu C.W., Hill J.E. (2015). The short-term transport and transformation of phosphorus species in a saturated soil following poultry manure amendment and leaching. *Geoderma* 257-258, 134-141.
- Gómez-Merino F.C., Trejo-Tellez L.I. (2015). Biostimulant activity of phosphite in horticulture. *Scientia Horticulturae* 196, 82-90.
- Killian E., Ough C.S. (1979). Fermentation esters—formation and retention as affected by fermentation temperature. *American Journal of Enology and Viticulture* 30(4), 301-305
- King M., Reeve W., Hoek M.B., Williams N., McComb J., O'Brien P.A., Hardy G.E.S.J. (2010). Defining the phosphite-regulated transcriptome of the plant pathogen *Phytophthora cinnamomi*. *Molecular Genetics and Genomics* 284, 425-435.
- MacIntire W. H., Winterberg S. H., Harbin L. (1950). Fertilizer evaluation of certain phosphorus, phosphorous and phosphoric materials by means of pot cultures. *Agronomy Journal* 42, 543-549.
- Nicolini G., Román T., Tonidandel L., Malacarne M., Zanoni A., Larcher, R. (2015). Evoluzione dei fosfiti in relazione alla tecnica di vinificazione e al ceppo di lievito. *Infowine* 8(1), 1-5. handle: <http://hdl.handle.net/10449/26181>.
- Ratjen A.M., Gerendás J. (2009). A critical assessment of the suitability of phosphite as a source of phosphorus. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 172(6), 821-828.
- Thao H. T. B., Yamakawa T. (2009). Phosphite (phosphorous acid): fungicide, fertilizer or bio-stimulator? *Soil science and plant nutrition* 55(2), 228-234
- Tonidandel L., Román T., Nicolini G., Larcher R. (2018). First evidence of ethyl-hydrogen phosphonate (fosetyl) formation in winemaking. *Food Chemistry* 256, 297-303.