

DOCUMENTO
TECNICO**Enrico Vaudano
Giovanna Maggiorotto
Antonella Bosso
e Rocco Di Stefano***Istituto sperimentale per
l'Enologia - Asti**E. Vaudano*

LE PIU' RECENTI ACQUISIZIONI TEORICHE E PRATICHE SUGLI ARRESTI DI FERMENTAZIONE

Le attuali conoscenze sulle cause che portano agli arresti di fermentazione hanno consentito di limitare nell'industria enologica i danni provocati da questi fenomeni. In questo lavoro vengono esaminate le cause di ordine molecolare e vengono proposti rimedi di cui si è constatata l'efficacia nella pratica di cantina.

Introduzione

Gli arresti di fermentazione non rappresentano certamente solo un problema dell'enologia moderna, come spesso si vuol far credere; in realtà, in passato, quando non si disponeva di lieviti selezionati e quando non era possibile il controllo della temperatura, il fenomeno era molto frequente e ad esso erano dovute molte delle alterazioni oggi, per fortuna, diventate rare. Anche l'uso razionale dell'anidride solforosa ha contribuito a mi-

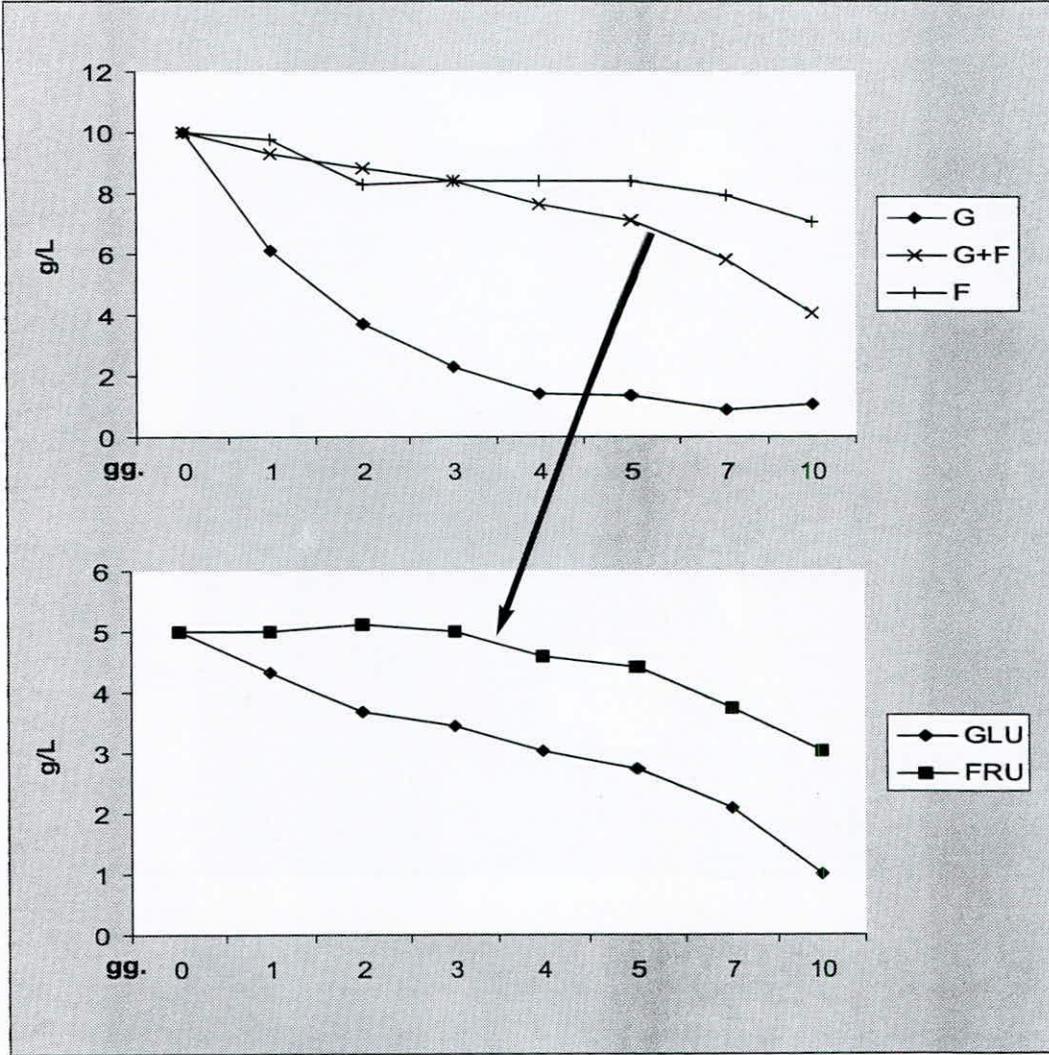
nimizzare questi inconvenienti.

Malgrado i progressi della microbiologia del vino, i nuovi metodi di gestione della fermentazione, soprattutto nella produzione dei vini bianchi, hanno indotto fermentazioni lente, arresti e in qualche caso alterazione del metabolismo fermentativo dei lieviti (ad es., produzione di elevati tenori di acido acetico) (Garcia - Moruno et al., 1993).

D'altra parte, la necessità di vinificare uve dotate di matu-

rità fenolica ed aromatica per conseguire i nuovi standard qualitativi richiesti dal mercato, hanno portato alla richiesta di uve dotate di contenuti di zuccheri elevati e ad un incremento dei rischi di arresti di fermentazione.

La ricchezza in zuccheri del mosto, l'insufficiente aerazione, le carenze nutritive, i fenomeni di inibizione, l'eccessiva chiarifica dei mosti, i fenomeni di antagonismo fra ceppi di lieviti e fra lieviti e batteri sono i fattori che più comunemente intervengono

Fig. 1 - Esperienza di rifermentazione n° 1. Evoluzione degli zuccheri

negli arresti di fermentazione (Ribéreau-Gayon, 1999).

Questo stesso autore, inoltre, indica come cause specifiche degli arresti di fermentazione nei vini rossi:

- le solfitazioni inadeguate della vendemmia, che possono indurre sviluppo di batteri lattici;

- la temperatura scarsamente controllata o eccessiva;

- l'insufficiente aerazione dei lieviti durante la fase di crescita;

e nei vini bianchi:

- la separazione troppo rapida del mosto dalle parti solide dell'uva o l'eccessiva chiarifica;

- l'insufficiente contatto con l'ossigeno;

- le eccessive variazioni di temperatura durante la fermentazione.

L'alterazione del trasporto attivo degli zuccheri dal mo-

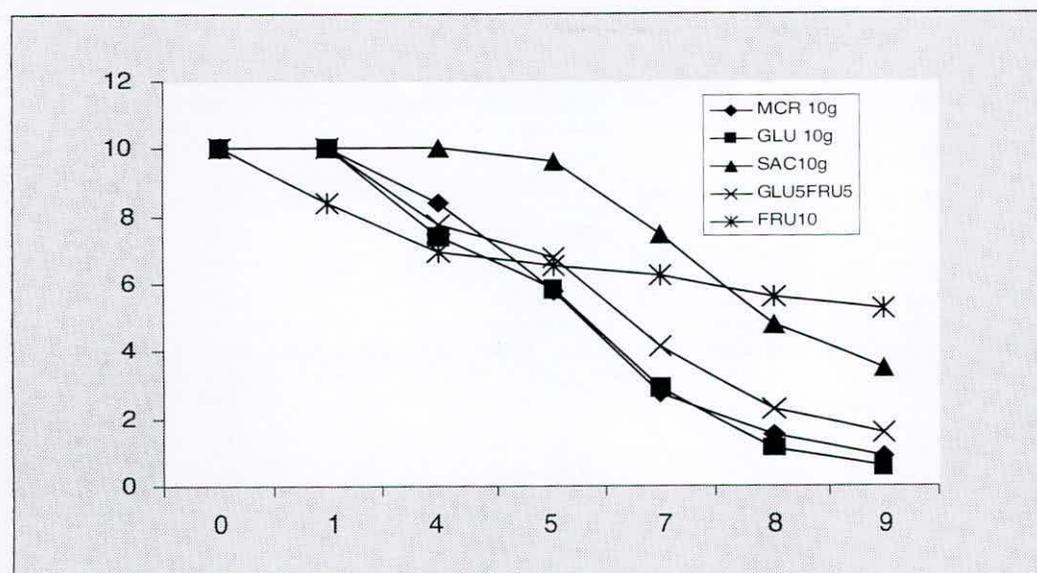
sto all'interno della cellula del lievito, carenze nel contenuto in azoto e in fosforo, carenze vitaminiche, alterazione dei rapporti fra cationi metallici ed ioni idrogeno, tossicità dell'etanolo, possibile alterazione della fluidità della membrana plasmatica, presenza di sostanze inibitrici della crescita del lievito sono altri fattori a cui si attribuisce la responsabilità degli arresti di fermentazione (Bisson, 1999).

La chiarifica del mosto

La chiarifica del mosto nella fermentazione in bianco. Nella produzione dei vini bianchi, i mosti vengono chiarificati in modo più o meno spinto, prima dell'inoculo di lieviti selezionati, per in-

durre da parte di questi microrganismi la formazione di esteri e deprimere la produzione di alcoli superiori e di composti solforati maleodoranti. Con la chiarifica vengono asportate le particelle di solido d'uva che, rappresentando parti di membrane cellulari, contengono sostanze lipidiche (steroli e acidi grassi insaturi a 18 atomi di carbonio) che il lievito può impiegare, in carenza di ossigeno, per costruire le proprie membrane incorporandoli direttamente o utilizzandoli per insaturare, in assenza di ossigeno, gli acidi grassi saturi che esso sintetizza. Appare evidente che, se il mosto viene impoverito eccessivamente di queste sostanze, il lievito va incontro a problemi di sopravvivenza, soprattutto nei casi in cui il contatto con l'ossigeno è scarso o addirittura

inesistente (Houtman e Du Plessis, 1981, 1986; Tromp, 1984; Delfini e Costa, 1993). Tutto questo è aggravato dalle basse temperature di fermentazione. Una buona chiarifica del mosto, tuttavia, in certe situazioni (ad es., quando si vinificano uve con scarso tenore in zuccheri o poco mature) rappresenta una necessità in quanto con questa pratica si induce il lievito a produrre aromi di fermentazione che devono compensare lo scarso livello degli aromi varietali di cui il mosto è dotato. La vinificazione di queste uve con livelli di torbidità elevati è certamente un errore che porta a prodotti di scarso livello qualitativo. Diverso è il caso delle uve mature che sono dotate di un maggior livello di aromi varietali e che danno vini con un contenuto in alcol più elevato. In questo caso, soprattutto in presenza di un tenore di azoto amminico del mosto sufficientemente alto, si può tollerare un certo livello di torbidità, tuttavia non eccessivo, per non incorrere nei problemi di mancanza di aromi di fermentazione. Le chiarifiche spinte, oltre ad indurre la produzione di esteri degli acidi grassi a media catena e di acetati degli alcoli superiori (composti responsabili dell'aroma fruttato di fermentazione) determinano la cessione al mosto, da parte dei lieviti, di acidi grassi a media catena. Si ritiene che questi composti, in particolare gli acidi ottanoico e decanoico, tossici per la cellula del lievito quando superano il livello di 20 mg/L, possano essere la causa di arresti di fermentazione in quanto inducono un trasporto passivo di ioni H⁺ dall'esterno all'interno della cellula del lievito, alterando il pH citoplasmatico e causando, di conseguenza il blocco delle funzioni cellulari (Stevens e Hofmeyer, 1993). Le nostre esperienze mostrano, però, che raramente nei vini bianchi ottenuti da mosti chiarificati si raggiungono livelli di guardia relativamente a questi composti che, d'altra parte, sono contenuti nei vini rossi in quantità tanto piccola

Fig. 2 - Esperienza di rifermentazione n° 2. Evoluzione degli zuccheri**Tab. 1 - di un vino Barbera, con acidità volatile 0,78 g/l, addizionato di zuccheri diversi. Dopo il 4° giorno la fermentazione procede molto lentamente e non è ancora completata dopo 15 giorni**

Tempo (d)	3		4	
	G	F	G	F
MCR 10g + F 15g	3,5	15,8	3,5	15,5
MCR 10g + F 15g	3,6	16,6	2,5	14,5
G 10g + F 15g	8,1	13,6	8,1	13
G 10g + F 15g	8,2	13,3	8	12,5
G 5g + F 20g	4,4	18	4,1	16,7
G 5g + F 20g	4,2	17,8	3,8	16,1
Sacc. 10g + F 15g	3,1	16,2	3,1	15,3
Sacc. 10g + F 15g	3,1	15,4	3,1	14,8
F 25g	-	21,7	-	19,2
F 15g	-	12,5	-	11,5

da non giustificare il loro coinvolgimento nel fenomeno in questione. Constatata la necessità di operare una chiarifica dei mosti, sono necessarie alcune precauzioni per evitare fermentazioni eccessivamente lente, alla temperatura di 18-20°C. Tali precauzioni si identificano: nell'aggiunta al mosto, possibilmente dopo la chiarifica, di anidride solforosa, in dosi non eccessive, per inibire lo sviluppo di batteri e di lieviti indesiderati, nell'uso di un consistente inoculo di lieviti in attiva fermentazione, riprodotti su un mosto della stessa varietà (fino al 5% del volume totale del mosto da fermentare), nell'aerare nei pri-

mi giorni il mosto che inizia a fermentare (sembra che aerazioni dopo la fase esponenziale non siano di alcuna utilità, malgrado dalle esperienze di Houtman e Du Plessis, 1981, si deduca il contrario) per fornire ai lieviti l'ossigeno necessario alla sintesi degli acidi grassi insaturi e degli steroli. L'anidride solforosa, oltre a quanto sopra, serve ad inibire le polifenolossidasi che consumando l'ossigeno presente, nei fenomeni ossidativi, non lo rendono disponibile per i lieviti (Delfini et Conterno, 1992). Inoltre, appare corretto aggiungere al mosto azoto, durante la fase di crescita e alla fine della fase esponenziale.

Il caso dei vini rossi

Nella produzione dei vini rossi, i lieviti dovrebbero essere in grado di fermentare agevolmente gli zuccheri presenti a causa della presenza delle parti solide che rappresentano una fonte importante di steroli, di acidi grassi insaturi e di sostanze azotate. Inoltre, attraverso i rimontaggi o le follature il mosto riceve ossigeno che, nella fase esponenziale può essere utilizzato dai lieviti, mentre nelle fasi successive può indurre per via indiretta la polimerizzazione degli antociani con i tannini o fra tannini, iniziando il processo di maturazione del vino. Dato che il lievito dovrebbe trovare in questo tipo di vinificazione le condizioni ideali per poter fermentare senza problemi, gli arresti fermentativi che si segnalano sempre più frequentemente potrebbero essere attribuiti all'impiego di ceppi che non sono in grado di fermentare elevate quantità di zuccheri, alla scarsa aerazione iniziale, alla eccessiva temperatura di fermentazione, alla riproduzione di batteri la cui attività può così iniziare prima della fine della fermentazione alcolica ed inibire quella dei lieviti. Generalmente l'inizio dell'attività batterica coincide con un arresto della fermentazione causato dalla temperatura eccessivamente alta o dal blocco dell'attività dei lieviti in seguito a carenze o alla presenza di sostanze che reprimono la loro attività. In questo caso i batteri si possono riprodurre in competizione con l'eventuale ripresa dell'attività dei lieviti. Il modo più semplice per ovviare a questi inconvenienti è di solforare moderatamente il pigiato e di iniziare la fermentazione con un buon inoculo di lieviti selezionati in attiva fermentazione, in grado di fermentare elevate quantità di zuccheri. Occorre, inoltre, aerare all'inizio della fermentazione il mosto per fornire ai lieviti l'ossigeno di cui hanno bisogno. Tale aerazione andrebbe effettuata di preferen-

Tab. 2 - Rifermentazione con *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces bayanus* di un vino Cortese, addizionato di zuccheri diversi

Prova	1° Prelievo		2° Prelievo		3° Prelievo		4° Prelievo		5° Prelievo		6° Prelievo		7° Prelievo		8° Prelievo	
	Gluc.	Frutt.														
Sacc. Cerevisiae																
Sacc. 10 g + F 15g	3,7	17,9	2,4	14,3	1,6	11,4	tr.	8,3	-	5,1	-	2,7	-	0,8	-	0,4
F 25g	-	18,2	-	15,1	-	12,5	-	9,5	-	5,7	-	3,2	-	1,1	-	0,5
G 10g + F 10g	5,8	13,8	4,3	11,7	2,5	9,6	1,3	7,2	tr.	4,8	-	2,3	-	1,0	-	0,5
MCR 10g + F 15g	2,5	16,3	1,6	13,0	1,0	10,4	tr.	7,0	-	4,1	-	2,4	-	0,8	-	0,3
G 5g + F 20g	2,9	16,8	2,0	13,4	1,3	11,3	tr.	8,5	-	5,4	-	3,2	-	1,3	-	0,6
Sacc. bayanus																
Sacc. 10 g + F 15g	5,1	20,2	3,9	15,9	2,8	12,8	1,5	8,9	0,7	5,1	-	2,4	-	0,9	-	0,4
F 25g	-	22,3	-	17,1	-	15,5	-	9,9	-	6,2	-	3,3	-	1,0	-	0,4
G 10g + F 10g	7,1	13,8	5,9	11,1	3,7	8,9	1,9	5,7	0,8	3,2	-	1,6	-	0,7	-	0,3
MCR 10g + F 15g	2,8	15,1	2,0	11,2	1,3	8,6	0,7	5,5	tr.	3,8	-	1,5	-	0,5	-	0,3
G 5g + F 20g	4,1	18,3	3,0	14,2	2,1	11,3	1,1	7,5	tr.	4,6	-	2,3	-	0,7	-	0,3

Tab. 3 - Composizione di vini della stessa cantina in cui si sono registrati arresti fermentativi

Campione	Glucosio g/L	Fruttosio g/L	Zuccheri g/L	Acid.Volat. g/L	pH	Acid.Tot. g/L	Gr. Alc. %
1	0,72	2,28	3,0	0,43	3,40	5,77	11,30
2	2,26	4,14	6,4	0,41	3,30	5,82	10,92
3	0,99	6,01	7,0	0,82	3,25	6,52	12,60
4	3,21	8,79	12,0	0,95	3,05	6,75	12,42
5	5,93	26,07	32,0	0,8	3,25	5,62	11,09
6	2,13	12,67	14,8	0,75	3,05	6,60	12,16
7	1,69	4,91	6,6	0,58	3,00	6,60	11,82
8	0,56	9,64	10,2	0,62	3,25	5,62	12,34
9	1,21	7,79	9,0	0,64	3,25	5,55	12,30
10	2,68	10,22	12,9	0,78	3,10	6,97	12,00
11	1,42	10,08	11,5	0,78	3,10	6,67	11,96
12	1,00	10,40	11,4	0,76	3,10	6,67	12,00
13	1,82	13,28	15,1	0,47	3,25	6,37	11,82
14	1,18	8,02	9,2	0,84	3,15	6,67	12,65
15	-	3,20	3,20	0,45	3,25	6,75	11,64

za quando la fermentazione è iniziata per far sì che l'ossigeno non utilizzato dai lieviti venga rapidamente strappato dall'anidride carbonica che si sviluppa e non ossidi, attraverso la mediazione delle PPO, i polifenoli che diffondono dalle bucce nel mosto. Un altro accorgimento elementare è quello di non superare la temperatura di 30°C e di evitare sbalzi di temperatura tanto comuni nelle zone a forte escursione termica nel periodo autunnale. L'eccessivo raffreddamento della mas-

sa in fermentazione durante la notte porta infatti ad un rallentamento della fermentazione e a difficoltà nella ripresa dell'attività dei lieviti, specie quando si tratta di piccole vasche.

Malgrado questi accorgimenti, non esiste la certezza che tutto vada per il meglio. In quest'ultimo caso, ci si deve preparare ad effettuare una corretta diagnosi dell'arresto della fermentazione e predisporre quanto possibile per la ripresa dell'attività fermentativa. La diagnosi e la cura de-

gli arresti fermentativi, oltre a quanto sopra riportato, richiedono però la conoscenza dei fattori che regolano l'attività metabolica dei lieviti durante la fermentazione.

Zuccheri e arresti fermentativi

Trasporto degli zuccheri e arresti fermentativi. Appare ovvio che il rallentamento della fermentazione deve essere attribuito ad una alterazione nell'attività catabolica della cellula del lievito nei confronti degli zuccheri. Questa alterazione può essere dovuta o a danni che la membrana subisce per effetto della presenza dell'alcol, soprattutto quando il lievito non è stato posto in condizioni di sintetizzare o di incorporare steroli e lipidi insaturi, o ad alterazione del trasporto attivo degli zuccheri. A questo trasporto attivo regolato da apposite proteine a bassa e ad alta affinità per il substrato (si tratta di glicoproteine) si deve la regolazione dell'attività fermentativa dei lieviti (Bisson, 1999). Un insieme di geni assicurano in *Saccharomyces cerevisiae* la produzione di proteine che regolano il trasporto del glucosio e del fruttosio dal mosto all'interno della cellula, in dipendenza dalla concentrazione di queste molecole nel mezzo, in

Tab. 4 - Composizione fenolica di vini della stessa cantina, i cui si sono registrati arresti di fermentazione

dic-91	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Flavonoidi mg/l	445,40	482,50	519,60	436,10	464,00	556,80	510,40	575,30	538,20	491,80	245,00	215,30	371,20	334,10
Antociani mg/l	174,50	188,90	241,60	141,70	165,50	302,50	182,20	203,10	221,60	193,40	88,20	75,60	152,30	134,10
Delfinidina-3-G %	6,68	7,39	13,81	9,20	5,30	5,42	5,90	5,46	8,89	6,63	8,29	8,64	5,20	3,50
Cianidina-3-G %	1,39	1,58	4,66	2,30	1,40	0,89	1,14	1,18	1,15	1,06	0,79	1,64	0,58	0,40
Petunidina-3-G %	9,90	10,00	13,76	7,47	7,20	8,91	9,25	8,94	12,00	10,00	10,73	11,40	8,63	8,75
Peonidina-3-G %	3,65	4,07	6,42	7,51	3,50	4,13	3,46	3,51	4,08	3,94	5,17	5,76	3,73	6,00
Malvidina-3-G%	64,44	63,92	53,27	63,38	64,83	65,78	69,02	67,52	63,01	66,53	66,22	63,29	70,08	67,27
Acetati %	4,02	3,41	0,98	2,94	7,53	4,33	3,13	4,38	2,75	2,83	2,86	3,31	4,60	4,90
Cinnamati%	9,91	9,62	5,90	6,60	10,24	10,53	8,03	9,00	8,11	8,99	5,94	5,95	7,17	9,18
apr-92	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Flavonoidi tot. mg/l	424,52	481,05	516,65	488,85	454,7	623,60	454,39	579,03	467,67	472,85	237,55	200,43	347,42	318,46
Antociani tot. mg/l	152,70	175,50	210,20	166,20	207,50	288,20	157,00	181,20	184,50	170,60	75,00	62,40	125,10	112,80
Delfinidina-3-G %	5,06	5,01	11,77	8,48	4,01	4,88	4,78	5,19	5,74	6,11	6,22	6,71	4,16	2,73
Cianidina-3-G %	1,36	1,32	4,72	2,80	0,60	0,94	0,94	0,90	1,48	1,07	0,60	0,80	0,55	0,38
Petunidina-3-G %	9,53	10,83	13,58	11,80	7,88	9,16	8,21	9,75	10,96	10,98	8,18	9,76	8,03	7,75
Peonidina-3-G %	4,37	4,58	7,05	6,80	2,58	2,96	4,33	3,59	5,82	4,09	5,39	7,36	4,41	5,88
Malvidina-3-G%	65,23	64,08	54,57	61,37	67,97	67,97	70,51	68,79	62,99	65,56	68,74	64,93	70,62	69,72
Acetati%	9,43	9,68	5,40	6,84	10,79	10,79	8,52	7,74	9,53	9,29	7,69	9,11	8,81	10,02
Cinnamati %	5,01	4,49	2,89	1,83	6,20	6,20	2,73	4,03	3,47	2,90	3,17	2,13	3,42	3,51

modo che si instauri un equilibrio fra gli zuccheri fermentati e gli zuccheri trasportati. Un trasporto passivo non regolato o un eccessivo flusso di glucosio verso l'interno della cellula dovuto ad alterazione del sistema di trasporto attivo, provoca la repressione catabolica dell'attività cellulare e, di conseguenza, l'arresto della sua attività fermentativa. Si è osservato che la disponibilità di azoto è il fattore chiave nell'attività delle proteine che regolano il trasporto attivo degli zuccheri. La carenza di azoto può infatti impedire la sintesi di tali proteine, ma più probabilmente influenza altri fattori che regolano la loro attività, non la loro sintesi. Infatti, fornendo azoto ad un mosto in fermentazione, al momento in cui inizia la fase stazionaria, si nota una ripresa dell'attività fermentativa e della sintesi proteica (Belly et al., 1994). L'aggiunta di azoto insieme ad un antibiotico (cicloeximide) che blocca l'attività del DNA e della sintesi proteica, porta all'arresto dell'attività del lievito; la stessa addizio-

ne di azoto insieme ad un altro antibiotico, la tunicamicina, che blocca la sintesi delle glicoproteine quali, ad es., quelle che regolano il trasporto degli zuccheri, non induce il blocco dell'attività fermentativa, né la sintesi proteica. Si ipotizza, pertanto, che le proteine di trasporto siano sintetizzate durante la fase di crescita ma che esse richiedono per il loro funzionamento particolari attivatori, probabilmente di natura proteica, che vengono continuamente sintetizzati e la cui assenza causa l'alterazione del meccanismo di trasporto. Da ciò deriva la necessità di una riserva di azoto da immettere nel mosto alla fine della fase esponenziale dell'attività dei lieviti.

Complesse interazioni, inoltre, avvengono fra le cellule dei lieviti al momento in cui l'attività fermentativa comincia a dare problemi. Pare che questi microrganismi siano in grado di inviare segnali alle altre cellule quando si trovano in situazioni negative per la propria sopravvivenza (Bisson et al., 1999), determinando così il blocco

dell'attività della totalità o di una parte della popolazione (tutto avviene come se, per la sopravvivenza della colonia, una parte degli individui si sacrificano per servire da materiale nutritivo agli altri).

Gli arresti di fermentazione possono però essere dovuti ad altre cause poco esplorate in quanto, di solito, poco comuni. Ad es., sono stati segnalati mosti non fermentescibili per un contenuto di rame eccessivo. In questo caso si rende necessario un trattamento con solfuro di sodio (non consentito), per abbassare il contenuto di questo elemento e rendere possibile la fermentazione.

Nel caso dei mosti ottenuti da uve passite, attaccate da muffe anche se non chiaramente visibili, la fermentazione può essere stentata e può arrestarsi a bassi contenuti di alcol, salvo a riprendere in seguito, probabilmente in quanto lieviti resistenti si saranno selezionati. La causa di questo fenomeno viene attribuita alla produzione da parte della *Botrytis* di sostanze antibiotiche non ancora chiaramente indivi-

duate. Le micotossine non rappresenterebbero invece sostanze inibitrici della fermentazione (Bisson, 1999) in quanto i lieviti sono in grado di fermentare mosti ottenuti da cereali attaccati da muffe produttrici di tali sostanze.

La presenza di pesticidi (antimuffa) in quantità eccessiva viene, inoltre, indicata come causa di arresti di fermentazione.

Materiali e metodi

Le determinazioni della gradazione alcolica, del pH, dell'acidità titolabile, dell'acidità volatile e degli zuccheri riduttori sono state effettuate secondo i metodi ufficiali CEE. (1990); gli acidi fissi come riportato da Cane. (1990), il glucosio e il fruttosio secondo il metodo seguente:

Colonna Merck Polyspher OA KC;

Eluente H₂SO₄ 0,01N;

Flusso 0,3 mL/min;

Temperatura della colonna 70°C;

Rivelatore IR Hitachi.

Tab. 5 - Composizione, dopo rifermentazione, di vini della stessa cantina che avevano subito un arresto fermentativo

Campione mag-92	Glucosio g/L	Fruttosio g/L	Zuccheri g/L	Ac. Tartarico g/L	Ac. Malico g/L	Ac. Scichimico mg/L	Ac. Lattico g/L
1	0,15	0,29	0,44	2,2		30	1,206
2	0,28	0,20	0,48	2,3	0,46	34	1,34
3	0,61	3,59	4,20	3,3		44	0,98
4	0,36	0,96	1,32	4,1		41	1,06
5	3,76	17,68	21,44	2,6		36	1,14
6	1,02	5,65	6,67	3,3		35	0,90
7	0,38	1,06	1,43	3,6		37	0,82
8	0,30	5,00	5,30	2,7		51	0,95
9	0,55	3,44	3,99	2,8		51	0,93
10	0,98	3,62	4,60	2,5	0,71	34	0,29
11	0,33	2,25	2,58	3,4		33	0,86
12	0,24	2,43	2,67	3,0		33	0,98
13	0,40	2,84	3,24	3,4		58	1,12
14	0,67	4,43	5,10	3,0		37	1,04
15	0,81	0,78	1,59	3,3	0,79	54	0,34

Tab. 6 - Composizione di vini della stessa cantina che avevano subito arresti fermentativi (1992)

	Glucosio g/L	Fruttosio g/L	Zuccheri g/L	Ac. Tartarico g/L	Ac. Malico g/L	Ac. Scichimico mg/L	Ac. Lattico g/L
1	0,42	9,25	9,67	3,7	1,32	46,4	
2	0,26	0,38	9,31	3,6	1,31	47,7	
3	6,70	26,45	33,15	4,0		27,5	0,71
4	18,16	45,53	63,69	4,1	1,12	26,2	
5	4,90	24,60	29,50	3,7	1,08	29,0	
6	5,80	27,22	33,02	3,6	0,98	28,0	
7	6,20	28,45	34,65	3,8	1,06	29,2	
8	5,70	27,10	32,80	3,7	1,07	28,7	
9	5,33	26,62	31,95	3,8	1,03	27,6	0,30
10	0,30	9,05	9,35	3,6	1,06	45,5	
11	0,26	0,26	8,98	3,6	1,30	44,9	

Risultati e discussione

All'inizio degli anni '90', quando nel nostro Istituto iniziò dal punto di vista analitico l'esame di vini che avevano subito un arresto di fermentazione, si era evidenziato che, in ogni caso, gli zuccheri residui erano rappresentati da fruttosio insieme a quantità sensibilmente più basse di glucosio. Tutto questo era ipotizzabile a priori in quanto, generalmente, i lieviti *Saccharomyces cerevisiae* utilizzati nelle fermentazioni in campo enologico sono glu-

cosofili. A questa composizione glucidica si potevano ricondurre i frequenti insuccessi che si riscontravano nelle rifermentazioni dei vini che avevano subito un arresto di fermentazione, per alcuni dei quali non erano sufficienti, a realizzare la trasformazione totale degli zuccheri, inoculi con lieviti buoni fermentatori, l'aggiunta di attivatori di fermentazione e temperature superiori a 20°C.

A parte l'ipotesi dell'intervento degli acidi grassi a media catena, poco era noto allora sulle cause degli arresti di fermentazione.

Nella pratica corrente,

quando si riscontrava questo problema, soprattutto nella produzione dei vini bianchi e quando si notava un aumento dell'acidità volatile, si procedeva rapidamente ad una chiarifica e ad una filtrazione del vino per allontanare gli eventuali batteri e poi si tentava il riavvio della fermentazione che, anche con questo accorgimento, presentava obiettive difficoltà.

Nel tentativo di contribuire alla soluzione di questi problemi, iniziò lo studio della rifermentazione di vini di cui si simulò la composizione al momento dell'arresto della fermentazione, attraverso

Tab. 7 - Prove di fermentazione sui campioni n. 4 e n. 5 della Tab. 6, previamente trattati con bentonite

Prelievo	1°		2°		3°		4°		6°		7°		8°	
	Gluc.	Frutt.												
Campione n. 4														
Lieviti	4,4	22,3	3,5	19,2	2,0	13,4	0,28	4,90	0,40	2,0	tr.	2,5	tr.	1,30
N+Lieviti	4,5	23,1	3,5	19,3	2,3	14,8	0,38	5,60	0,60	3,4	0,47	3,3	tr.	1,70
N+MCR+Lieviti	9,0	27,7	7,3	23,8	4,6	18,5	0,58	8,59	0,60	4,7	0,50	3,2	tr.	1,40
MCR+Lieviti	9,2	28,0	7,7	24,4	4,1	17,6	1,35	9,20	0,85	4,9	0,40	3,7	tr.	1,93
Campione n. 5														
Lieviti	13,9	37,2	9,8	29,7	5,0	20,5	0,67	6,10	0,3	2,3	tr.	1,7	tr.	0,7
N+Lieviti	13,6	36,6	10,0	28,9	5,1	20,1	0,47	5,02	0,5	2,8		1,5	tr.	1,2

Tab. 8 - Composizione dei vini che avevano subito un arresto di fermentazione

	Vino rosso 2000	Dolcetto 2001
alcool%	14,43	13,42
acidità totale g/l	5,70	7,05
acidità volatile g/l	0,65	0,38
SO ₂ libera mg/l	tracce	6,4
SO ₂ totale mg/l	15,0	25,0
pH	3,72	3,36
densità	0,9970	0,9919
estratto secco totale g/l	40,50	40,00
Zuccheri riduttori g/l	7,95	11,02
estratto secco netto g/l	32,55	28,98
fruttosio (HPLC) g/l	5,95	10,21
glucosio (HPLC) g/l	0,70	0,24
ac.tartarico (HPLC) g/l	1,79	1,85
ac.malico (HPLC) g/l	0,01	0,76
ac.lattico (HPLC) g/l	0,82	0,49
ac.citrico (HPLC) g/l	-	-
ac.succinico (HPLC) g/l	0,65	0,55
ac.C8 (GC) mg/l	779	1942
ac.C10 (GC) mg/l	295	576
ac.C12 (GC) mg/l	tracce	35
polifenoli totali mg/l	2660	2250

l'aggiunta di un residuo di zuccheri (glucosio, fruttosio, MCR, saccarosio). Questi due ultimi zuccheri sono stati inclusi nelle esperienze in quanto il MCR, oltre ad essere costituito da glucosio e fruttosio, contiene inoltre, un fattore di crescita, e il saccarosio viene comunemente usato nella presa di spuma che si realizza attraverso una rifermentazione, partendo da vini già illimpiditi e stabilizzati.

Furono allestite alcune

prove impiegando vini diversi addizionati di zuccheri.

Prova numero 1

È stato impiegato un vino Corvèse diluito con acqua fino ad un grado alcolico di 10,35 vol, a cui sono stati aggiunti zuccheri diversi (glucosio 10 g/L, glucosio 5 g/L e fruttosio 5 g/L, fruttosio 10 g/L e saccarosio 10 g/L). Sono stati impiegati

Saccharomyces cerevisiae del commercio attivati come prescritto dal produttore. La temperatura di fermentazione è stata mantenuta a 25°C. I risultati, limitatamente alle fermentazioni con glucosio, glucosio + fruttosio e fruttosio sono riportati in Fig. 1

Nel campione contenente solo glucosio la fermentazione procede più rapidamente che in quelli che contengono glucosio + fruttosio o solo fruttosio. Queste ultime sono le più lente; anzi, una di esse non ha completato la fermentazione. Inoltre, nelle prove con glucosio e fruttosio, come previsto, il glucosio viene consumato più rapidamente. Viene così confermato che la presenza del solo fruttosio può portare ad una rifermentazione eccessivamente lenta o difficile.

Prova numero 2

La prova è stata ripetuta utilizzando anche MCR come zucchero (MCR corrispondente a 10 g/L di zuccheri, Glucosio 10 g/L, saccarosio 10 g/L, glucosio 5 g/L + fruttosio 5 g/L, fruttosio 10 g/L). Dalla Fig. 2 si deduce che le prove contenenti glucosio e MCR hanno ultimato per prime la fermentazione, queste sono state seguite da una delle due prove contenenti glucosio e fruttosio insieme e da quelle contenenti saccarosio, mentre le prove contenenti solo fruttosio sono sta-

te le più lente. Tutte le prove, nel tempo, hanno completato la fermentazione.

Nelle prove successive è stata utilizzata una maggior quantità di zuccheri e nello stesso tempo è stato cambiato il vino a cui aggiungere queste sostanze.

Prova numero 3

È stato utilizzato a tale scopo un vino rosso della cantina dell'Istituto della vendemmia 1991 avente un'acidità volatile piuttosto alta (0,78 g/L) per simulare la composizione che a volte si riscontra nei vini che hanno subito un arresto. La composizione delle prove è riportata in Tab. 1. Si osserva che in tutte le prove la fermentazione è proceduta lentamente e alla fine si è bloccata, praticamente allo stesso livello di zuccheri per tutte le tesi. È evidente che l'alto livello dell'acidità volatile è indice di un attacco batterico o di una fermentazione condotta da lieviti particolari che hanno rilasciato sostanze che hanno inibito l'attività dei lieviti.

Prova numero 4

Per saggiare l'influenza della r.f. del lievito sulla ripresa della fermentazione, è stata effettuata una prova successiva, su un vino Cortese 1991. Sono stati utilizzati un *Saccharomyces cerevisiae* r.f. *cerevisiae* e un *S.c.* r.f. *bayanus* secondo lo stesso protocollo della prova n° 3. I risultati sono riportati in Tab. 2. Hanno iniziato a fermentare prima i *cerevisiae*, ma i *bayanus* li hanno seguiti da vicino. La fermentazione si è protratta per circa 15 giorni; alla fine tutte le prove sono pervenute all'esaurimento del contenuto in zuccheri. Con solo fruttosio, la fermentazione è stata più lenta.

Si deduce da queste prove che effettivamente, la rifermentazione dei mosti che contengono soprattutto frut-

tosio senza o con piccole quantità di glucosio è più difficile di quella dei mosti che contengono MCR o solo glucosio o glucosio più fruttosio in parti uguali o saccarosio. Diverso è il caso dei vini che hanno una acidità volatile alta (pur restando nei limiti di legge). In questo caso la rifermentazione può risultare particolarmente difficile.

Esperienze pratiche in cantina

Alla fine di queste esperienze non si era ancora ipotizzato alcun trattamento per risolvere questi ultimi casi. L'occasione è venuta dalla segnalazione che in una cantina, nella produzione di vini rossi, si era osservato un blocco della fermentazione su un rilevante numero di vasche. Le gradazioni alcoliche di tali vini non erano particolarmente elevate (Tab. 3). Qualsiasi tentativo di riavviare la fermentazione attraverso un inoculo di lieviti selezionati, non aveva dato risultati. Dalla composizione del vino riportata in Tab. 3, si deduce che i contenuti in alcol si distribuivano intorno ad una media di 11,93 %vol (min. 10,92, max 12,65) e che l'arresto era avvenuto a vari livelli del contenuto in zuccheri. Inoltre, le acidità volatili erano piuttosto elevate. Per tentare di capire cosa era accaduto al vino, si è proceduto all'analisi dei composti fenolici e dei singoli zuccheri. I dati dei polifenoli, riportati in tab 4, mostrano che si tratta di vini di scarsa struttura polifenolica, secondo lo stile di quel periodo. I polifenoli totali, espressi come flavonoidi totali, infatti, variano da un minimo di 215,3 mg/L a un massimo di 575,3 mg/L con media di 441,8 mg/L. Anche l'analisi degli antociani monomeri non rivelava scostamenti sostanziali da quelli tipici della cultivar Montepulciano d'Abruzzo. I dati della Tab. 3 mostrano che gli zuccheri dei vini in questione erano rappresentati prevalentemente da fruttosio. Le difficoltà riscontrate nel riavvio

della fermentazione, potevano essere dovute proprio al carattere glucosifilo dei lieviti inoculati. Si era comunque a livello di ipotesi. Considerato, tuttavia, che la fermentazione si era arrestata in quasi tutte le vasche della cantina, si è pensato che il blocco fosse dovuto alla presenza, nella stessa cantina, di lieviti inquinanti aventi caratteristiche Killer, cattivi fermentatori, che avevano preso il sopravvento sugli eventuali lieviti selezionati inoculati. Si trattava solo di una ipotesi su cui non si faceva molto affidamento in quanto dai dati della letteratura si rilevava che le proteine killer hanno un'azione limitata al pH dei vini. Con grande sorpresa, si riscontrò, tuttavia, che un trattamento con bentonite allo scopo di rimuovere le proteine killer consentiva una rapida ripresa della fermentazione ad opera dei lieviti aggiunti in precedenza senza risultati. Si apriva così una nuova ipotesi sulle cause che portano agli arresti di fermentazione. L'analisi effettuata sugli stessi vini ad un prelievo successivo, durante la rifermentazione, rivelava la composizione in zuccheri riportata in Tab. 5. A parte il n° 5, si osserva che la maggior parte dei campioni ha completato la fermentazione alcolica. Un prelievo successivo ha rivelato che in tutti i campioni, il livello degli zuccheri era sotto 4 g/L. La rifermentazione non ha influito in modo sostanziale sulla composizione fenolica (Tab. 4). La bentonite, pertanto, ha consentito di rimuovere qualche metabolita, probabilmente di natura proteica che inibiva i lieviti aggiunti.

Si trattava, certamente di un caso particolare. Inoltre andava chiarita la natura di tale o di tali sostanze ipotetiche e se, effettivamente, queste erano state prodotte dai lieviti. L'acidità volatile elevata, infatti, portava anche ad ipotizzare la presenza di batteri, ma non erano state effettuate ricerche in tal senso.

Che si trattasse di microrganismi inquinanti di cantina, veniva verificato anche l'an-

no successivo (1992), quando nella stessa cantina, puntualmente si registrò una serie di arresti di fermentazione ai livelli di zuccheri riportati nella Tab. 6. Il basso livello di acido acetico e di acido lattico, determinati nei vini per HPLC, portava all'esclusione di un intervento batterico e, di conseguenza, a confermare l'ipotesi della produzione di proteine killer.

Prove di rifermentazione, limitatamente ai campioni n° 4 e n° 5, dopo trattamento con bentonite, con aggiunta di attivanti e di MCR oltre che di lieviti, portarono, ai risultati riportati in Tab. 7. I lieviti aggiunti, in attiva fermentazione, erano stati previamente riprodotti, in mosto di moscato (si è usato il mosto di questa cultivar, perché facilmente reperibile nella zona dell'Asti). Si può osservare che, in queste condizioni, si è avuta una buona ripresa della fermentazione in tutti i casi.

Le esperienze sono continuate nella vendemmia 2001 con l'esame di alcuni vini in cui si era registrato un blocco della fermentazione.

Nella Tab. 8 è riportata la composizione di un vino rosso dell'annata 2000 che presentava un residuo di zuccheri di 7,95 g/L e un grado alcolico di 14,43. Tutti gli altri parametri, compresa l'acidità volatile (non particolarmente alta per un vino dotato del suddetto contenuto in alcol), si possono considerare regolari. Le cause dell'arresto della fermentazione di questo vino potevano essere attribuite all'eccessiva fluidità della membrana o ad alterazione dei meccanismi che regolano il trasporto attivo degli zuccheri o alla scarsa capacità del lievito a fermentare elevate quantità di zuccheri o a carenze azotate. Inoltre, non veniva scartata l'ipotesi della repressione dell'attività dei lieviti indotta dalla riproduzione di batteri lattici. Il vino, infatti, aveva subito la fermentazione malolattica.

Le prove di rifermentazione sono state effettuate secondo il protocollo riportato in Tab. 9 utilizzando lieviti a

Tab. 9 - Protocollo sperimentale utilizzato per la rifermentazione dei vini riportati in tabella 8 (il teste non è stato inoculato)

Terreno	Teste	1	2	3	4	5	6	7	8	9
g/Hl										
Ergoferm			10	20					20	
Maxaferm				20	40				20	
Gelbentonite							10	30	20	20

Tab. 10 - Composizione glucidica dei vini Rosso 2000 e Dolcetto 2001 dopo rifermentazione (Il teste non è stato inoculato)

Vino rosso 2000 Prove	Vino inizio fermentazione	teste	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Glucosio g/l	0,7	0,65	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fruttosio g/l	5,95	5,87	tracce								
Dolcetto 2001 Prove	Vino inizio fermentazione	teste	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Glucosio g/l	0,24	0,21	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fruttosio g/l	10,21	10,15	tracce								

elevata fruttifilia, due attivatori di diversa composizione e gelbentonite alle dosi riportate nella stessa tabella. Le analisi effettuate dopo 15 giorni dall'inoculo (Tab. 10) hanno mostrato che i lieviti avevano completato la fermentazione in tutti i campioni, compreso il teste. Tutto questo supporta l'ipotesi che l'arresto della fermentazione fosse avvenuto o per la non ottimale capacità fermentativa del lievito o per carenze azotate. Non si può escludere, tuttavia, che il lievito che ha condotto la fermentazione possa aver subito danni a livello di membrana, indotti dall'elevato contenuto di alcol prodotto.

Lo stesso risultato si è ottenuto nella rifermentazione di un vino Dolcetto d'Acqui 2001 che aveva subito un arresto della fermentazione ad un contenuto di zuccheri di 11,02 g/L e ad un grado alcolico di 13,42 (Tab. 8). Anche in questo caso si è utilizzato il protocollo sopra esposto per il vino rosso 2000 (Tab. 9). Le analisi effettuate dopo 15 giorni hanno evidenziato che in tutti i campioni erano stati consumati gli zuccheri (Tab. 10). In questo caso l'arresto si può attribuire solo al-

la scarsa capacità fermentativa del lievito o a carenze azotate, in quanto non si è registrata una riproduzione batterica (presenza di acido malico e bassa acidità volatile).

Considerazioni conclusive

Le esperienze sopra descritte hanno dimostrato che le difficoltà che si riscontrano nella ripresa delle fermentazioni che hanno subito un arresto, possono dipendere da diversi fattori fra i quali la composizione in zuccheri, rappresentata da solo fruttosio gioca un ruolo importante. Anche l'intervento dei batteri lattici o la ipotizzata presenza di proteine killer a cui probabilmente si deve l'arresto di molte fermentazioni, possono determinare difficoltà nella ripresa fermentativa.

Considerando le basi molecolari degli arresti di fermentazione e quanto riscontrato nelle suddette prove, si possono segnalare le seguenti linee guida per ovviare al fenomeno, tenendo però presente che si tratta di eventi casuali, di difficile controllo pratico.

Vini bianchi:

- utilizzare in modo corretto l'anidride solforosa, commisurando il suo impiego alla tecnica di preparazione del mosto e al suo livello di chiarifica;

- evitare, quando possibile, le chiarifiche eccessive;

- evitare temperature troppo basse (18-20°C sembrano ottimali, a meno che vengano impiegati lieviti criofili);

- iniziare la fermentazione con un inoculo di lieviti in attiva fermentazione che tenga conto dello stato fisico e della composizione chimica del mosto. Ad es., si consiglia, nel caso di mosti ossigenati o iperossigenati di prevedere un inoculo fino al 5% del volume totale di mosto per evitare la prevalenza dei lieviti apiculati. Lo stesso vale per i mosti fortemente chiarificati. Il volume di inoculo può essere diminuito man mano che la torbidità aumenta;

- aggiungere, se necessario (se cioè è basso il contenuto di azoto assimilabile) attivatori di fermentazione azotati in quantità non eccessiva, all'inizio della fermentazione o durante la fase riproduttiva dei lieviti;

- ossigenare il mosto nelle

fasi iniziali della fermentazione;

- aggiungere azoto prontamente assimilabile all'inizio della fase stazionaria dei lieviti.

Vini rossi:

- commisurare l'impiego dell'anidride solforosa allo stato sanitario dell'uva (l'uso di questa sostanza deve essere molto limitato e volto all'inibizione dei lieviti selvaggi);

- iniziare la fermentazione con un inoculo importante di lieviti selezionati buoni fermentatori (in ogni caso, in grado di fermentare gli zuccheri presenti nel mosto) in modo che essi possano prendere il sopravvento sui cattivi fermentatori, spesso anche consumatori di fattori di crescita (compreso l'azoto);

- ossigenare il mosto durante la fase esponenziale e durante la fase riproduttiva dei lieviti;

- tenere sotto controllo la temperatura in modo che non superi il livello di guardia di 30°C;

- aggiungere attivatori azotati all'inizio della fase stazionaria;

- evitare sbalzi di temperatura durante la fermentazione (soprattutto quando le vasche di piccole dimensioni sono poste in locali aperti).

Cura degli arresti fermentativi. La rifermentazione degli zuccheri residui, rappresentati praticamente dal solo fruttosio, dopo un arresto di fermentazione, non sempre si rivela facile.

Dalle esperienze sopra descritte, appare chiaro che, se non si conosce la causa dell'arresto, è buona pratica innanzi tutto rimuovere la massa cellulare la cui attività si è bloccata, solfitare, chiarificare e trattare con bentonite. Questo per evitare che cellule di batteri e che proteine killer possano inibire l'attività dei lieviti che verranno aggiunti. Una volta che queste operazioni sono state compiute, si tratta di riprodurre un lievito adatto alle rifermentazioni che, possibilmente, abbia una buona affi-

nità anche per il fruttosio e di aggiungerlo al vino contenente un residuo di zuccheri, arricchito previamente di attivatori azotati. La temperatura del vino da rifermentare deve essere mantenuta ad un livello compatibile con il tipo di vino stesso. Piccole aggiunte di MCR potrebbero rivelarsi interessanti per consentire ai lieviti aggiunti di disporre di glucosio trasportabile all'interno della cellula più facilmente del fruttosio e di continuare regolarmente il processo fermentativo iniziato durante la fase di moltiplicazione esterna.

Una ossigenazione, inoltre, compatibilmente con il tipo di vino con cui si ha a che fare, può rappresentare un valido aiuto alla moltiplicazione e alla fermentazione dei lieviti. Nel caso in cui si sia appurato che i problemi fermentativi derivino da eccessivo contenuto in rame si può prevedere l'inizio della fermentazione con lieviti produttori di H₂S (anche se questa operazione è piuttosto critica), mentre per mosti ricchi di residui di antimuffa appare necessario un trattamento con carbone decolorante. Infine, nella fermentazione di uve passite è consigliabile l'uso di enzimi che demoliscano glucani e proteine prodotti dalla Botrytis. ■

Riassunto

Gli arresti di fermentazione possono essere causati da alterazione del meccanismo di trasporto degli zuccheri dal mosto all'interno della cellula del lievito, indotto anche da carenze azotate, da competizione lievito-lievito, lieviti-batteri, da eccessiva chiarifica del mosto nella fermentazione in bianco, da scarso o nullo apporto di ossigeno durante la fase riproduttiva dei lieviti, da carenza di fattori di crescita, determinata anche dalla riproduzione iniziale di lieviti selvaggi, da sbalzi di temperatura, da scarsa resistenza del lievito all'alcol, dalla presenza di proteine killer prodotte da lieviti dotati di scarso po-

tere fermentativo, da eccessivo contenuto in rame o in antimuffa del mosto. La presenza del solo fruttosio fra gli zuccheri residui, dopo un arresto fermentativo, causa difficoltà nel riavvio della fermentazione che possono essere ovviate con la rimozione delle cellule presenti al momento dell'arresto, con un trattamento con bentonite allo scopo di rimuovere eventuali proteine killer, con l'aggiunta di attivatori azotati di fermentazione, con l'eventuale aggiunta di piccole quantità di MCR e con un importante inoculo di cellule di lievito in attiva fermentazione, adatto alle rifermentazioni e avente buona capacità di trasportare il fruttosio.

Summary

Changes in yeast sugar uptake from must to cell cytoplasm can lead to fermentation difficulties.

Nitrogen limitation, yeast-yeast and yeast-bacteria competition, excess of must clarification, ethanol toxicity, low level of oxygen and growth factors, presence of killer factors, temperature shocks, high amount of copper and pesticides, can all cause a decrease in fermentation rate and, finally, sluggish and stuck fermentations.

The predominance of fructose in the residual sugars after a stuck fermentation, gives re-start difficulties. These can be avoided by removing the existing biomass, removing killer factors by bentonite treatments, supplementing nitrogen contents, adding little amounts of grape juice concentrate, and re-inoculating an adequate quote of yeast in active fermentation.

The yeast for the re-inoculum must have high fructose uptake ability.

Parole chiave. Arresti fermentativi, lievito, proteine killer, rifermentazione.

Key words. Stuck fermentations, yeast, killer protein, rifermentation.

Bibliografia

- Belly M., Salmon J. M., Barre P. -1994- Assimilable nitrogen addition and hexose transport system activity during enological fermentation. *J. Inst. Brew.*, 100, 279-284.
- Bisson L. F. -1999- Stuck and sluggish fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.*, 50, (1), 107-119.
- Cane P. (1990). Il controllo della qualità dei vini mediante HPLC: determinazione degli acidi organici. *L'Enotecnico*, (1-2): 69-72.
- Delfini C., Conterno L. - 1992- Influence of clarification and suspended solid contact on the oxygen demand and long chain fatty acid contents of free run, macerated and pressed grape musts in relation to acetic acid production. *Vitic. Eno. Sci.*, 47, 69-75.
- Delfini C., Costa A. - 1993- Effects of the grape must lees and insoluble materials on the alcoholic fermentation rate and the production of acetic acid, piruvic acid and acetaldehyde. *Am. J. Enol. Vitic.*, 44, (1), 86-92.
- Garcia Moruno E., Delfini C., Pessione E., Giunta C. - 1993- Factors affecting acetic acid production by yeasts in strongly clarified grape musts. *Microbios*, 74, 249-256.
- Houtman A. C., Du Plessis C. S. -1981- The effect of juice clarity and several conditions promoting yeast growth on fermentation rate, the production of aroma components and wine quality. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, 2, (2), 71-81.
- Houtman A. C., Du Plessis C. S. -1986- Nutritional deficiencies of clarified white grape juices and their correction in relation to fermentation. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, 7, (1), 39-46.
- Ribéreau-Gayon P. -1999- Reflexions sur les causes et les conséquences des arrêts de la fermentation alcoolique en vinification. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, 33, (1), 39-48.
- Tromp A. -1984- The effect of yeast strain, grape solids, nitrogen and temperature on fermentation rate and wine quality. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, 5, (1), 1-6.



