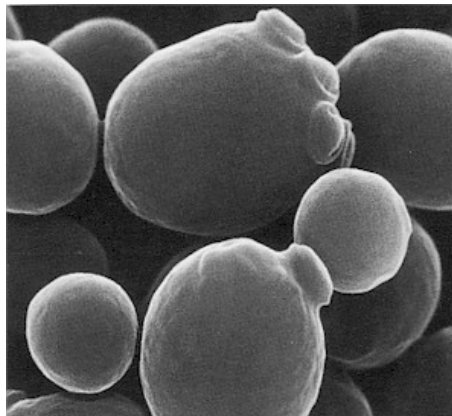




UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



# NECESIDADES NITROGENADAS DE CUATRO LEVADURAS VÍNICAS COMERCIALES DURANTE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA



**MASTER EN Ciencia e Ingeniería de los Alimentos**

Alicia Gutiérrez Linares

J. Manuel Guillamón Navarro

Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos

# NECESIDADES NITROGENADAS DE CUATRO LEVADURAS VÍNICAS COMERCIALES DURANTE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

Alicia Gutiérrez <sup>\*1</sup>, Marta Sancho<sup>2</sup>, Xavier Ganiko<sup>2</sup>, Eva Navascues<sup>3</sup>, Gemma Beltrán<sup>2</sup> y José M. Guillamón<sup>1,2</sup>

## RESUMEN

El contenido de nitrógeno en mosto condiciona el crecimiento celular y la velocidad de fermentación de las levaduras. Las necesidades nitrogenadas de las levaduras varían en función de sus características, de la fuente de nitrógeno y de la concentración a la que ésta se encuentre. Por ello, se pretende determinar la cantidad mínima de nitrógeno que requiere una cepa vínica comercial para asegurar la obtención máxima de población en las primeras horas de fermentación y, en consecuencia, una fermentación más rápida. Se ha ensayado con cuatro levaduras de la empresa Agrovín (PDM, EP2, RVA, TTA), usando tres fuentes de nitrógeno (amonio, arginina y glutamina) a concentraciones crecientes. Se han analizado diferentes parámetros relacionados con el crecimiento celular (valor máximo OD y tiempo de duplicación), la capacidad fermentativa (producción de CO<sub>2</sub>) y se ha estudiado la eficiencia de diferentes marcadores bioquímicos y moleculares para la detección de carencia de nitrógeno durante la fermentación. Con los resultados obtenidos se ha observado que la arginina y la glutamina producen mayor biomasa que el amonio y que las células muestran mejor vitalidad. También se ha visto que las cepas PDM y RVA presentan una mayor tasa de crecimiento y que la velocidad de fermentación es directamente proporcional al contenido nitrogenado. La actividad arginasa y glutamato deshidrogenasa, al igual que la expresión génica de los transportadores de nitrógeno *GAP1* y *MEP2*, se pueden considerar buenos indicadores de situaciones deficitarias de nitrógeno en la fermentación, pudiendo ser utilizados en las bodegas por su sencillez y rapidez, evitando la alteración de la calidad del vino.

Palabras clave: nitrógeno asimilable, *Saccharomyces*, velocidad fermentativa, levadura vínica, amonio, fermentación alcohólica.

---

<sup>1</sup> Departamento de Biotecnología de los Alimentos, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC), Apartado de Correos 73, 46100 Burjassot, Valencia. Telf. 963900022. E-mail: aguli@iata.csic.es

<sup>2</sup> Biotecnologia Enològica, Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia, Universitat Rovira i Virgili, Marcel·li Domingo s/n, 43007, Tarragona.

<sup>3</sup> Agrovín S.A. Poligono industrial Alces. Alcazar de San Juan, Ciudad Real.

El contingut de nitrogen en most condiciona el creixement cel·lular i la velocitat de fermentació dels llevats. Les necessitats nitrogenades dels llevats varien en funció de les seues característiques, de la font de nitrogen i de la concentració a la que esta es troba. Per això, es preten determinar la quantitat mínima de nitrogen que requereix una soca vínica comercial per a assegurar l'obtenció màxima de població en les primeres hores de fermentació i, en conseqüència, una fermentació més ràpida. L'assaig s'ha realitzat amb quatre llevats de l'empresa Agrovin (PDM, EP2, RVA, TTA), utilitzant tres fonts de nitrogen (amoni, arginina i glutamina) a concentracions creixents. S'han analitzat diferents paràmetres relacionats amb el creixement cel·lular (valor màxim OD i temps de duplicació), la capacitat fermentativa (producció de CO<sub>2</sub>) i s'ha estudiat l'eficiència de diferents marcadors bioquímics i moleculars per a la detecció de carència de nitrogen durant la fermentació. Amb els resultats obtinguts s'ha observat que la arginina i la glutamina produeixen major biomassa que l'amoni i que les cèl·lules mostren millor vitalitat. També s'ha vist que les soques PDM i RVA presenten una major taxa de creixement i que la velocitat de fermentació es directament proporcional al contingut nitrogenat. L'activitat arginasa i glutamato deshidrogenasa, de la mateixa manera que l'expressió gènica dels transportadors *GAP1* i *MEP2*, es poden considerar bons indicadors de situacions deficitàries de nitrogen en la fermentació, podent ser utilitzats en les bodegues per la seua senzillesa i rapidesa, evitant l'alteració de la qualitat del vi.

The nitrogen composition of grape musts affects cell growth and fermentation rate of yeast. Nitrogen needs of yeast depend on nitrogen source and its concentration. For this reason, in this study we want to determine the minimum nitrogen amount that requires commercial strain yeast, in order to ensure the maximum population obtained during the first hours of fermentation, and consequently a quick fermentation. Four yeasts from Agrovin Company (PDM, EP2, RVA, TTA) have been tested, using three nitrogen sources (ammonium, arginine and glutamine) at increasing concentrations. Several parameters regarding with cell growth (OD maximum value and duplication time) and with fermentative capacity (CO<sub>2</sub> production) have been analyzed, and studied the efficiency of different biochemical and molecular markers, with the aim of detecting nitrogen deficiency during the fermentation. From the results it has been observed that arginine and glutamine produce more biomass than the ammonium, and the cells present better vitality. It has been detected that PDM and RVA strains have a higher growth rate, and that the rate of fermentation is directly proportional to the nitrogen content. Arginase activity and glutamate dehydrogenase activity, as genetic expression *GAP1* and *MEP2* transporters, can be considered like good indicators of nitrogen deficit situations during the fermentation, and they can be used in the winery due to its simplicity, avoiding the alteration of the wine's quality.

## INTRODUCCIÓN

El vino es el resultado de complejas interacciones entre hongos, bacterias y levaduras que comienzan en el viñedo y continúan a lo largo del proceso de fermentación hasta el envasado del producto. La composición química es fundamental en sus características sensoriales, y está determinada por muchos factores como la variedad de uva, las condiciones geográficas y vitícolas del cultivo de vid, las prácticas de vinificación, la ecología microbiana de la uva y los procesos de fermentación (Cole and Noble, 1997). Las levaduras son las responsables de la fermentación alcohólica del mosto, aportando efectos beneficiosos en el aroma del vino (Henschke, 1997). Levaduras del género *Saccharomyces* y principalmente la especie *S. cerevisiae* son los microorganismos con mayor capacidad fermentativa. Sin embargo, su caracterización ha puesto de manifiesto que aparte de producir etanol, esta levadura genera muchos metabolitos secundarios que son fundamentales para determinar la calidad del vino (Fleet and Heard, 1993; Lambrechts and Pretorius, 2000). Los principales productos volátiles del metabolismo de la levadura, el etanol y el dióxido de carbono hacen una contribución relativamente pequeña en el sabor; por el contrario, alcoholes superiores y ésteres formados durante la fermentación alcohólica tienen una fuerte influencia sobre las propiedades sensoriales del vino (Nykänen, 1986; Romano et al., 2003).

El factor más importante desde el punto de vista de la composición del mosto es generalmente el contenido en nitrógeno, ya que suele ser limitante para el crecimiento de *S. cerevisiae* desde un punto de vista nutricional (Ingledew and Kunkee, 1985), y el principal causante de las paradas de fermentación (Bisson, 1999). En el mosto existe una gran variedad de formas y concentraciones en las que se encuentra el nitrógeno, que dependen de numerosos factores como el tipo de vinificación, el momento de la cosecha, la variedad de uva y su grado de maduración, y que condicionan el crecimiento celular y la velocidad de fermentación. Los suelos pobres en compuestos nitrogenados y las cosechas tempranas, afectan a la composición de la uva, obteniendo un mosto con un bajo contenido en aminoácidos. Este problema se puede evitar con la fertilización del suelo, sin embargo, esta solución no siempre asegura el suficiente contenido de nitrógeno en la uva (Bell and Henschke, 2005). Por esta razón, la solución más adecuada es añadir al mosto suplementos nutricionales antes de la fermentación, usualmente fuentes inorgánicas como las sales de amonio.

Los compuestos mayoritarios del mosto son: amonio (3-10%), aminoácidos (25-30%), polipéptidos (25-40%) y proteínas (5-10%). *Saccharomyces* es incapaz de asimilar de la misma manera las diferentes fuentes nitrogenadas, ya que, así como las proteínas y polipéptidos no pueden ser consumidos por la levadura debido a que carecen de sistemas de digestión extracelular de este tipo de compuestos, el amonio y los aminoácidos son fundamentales para su crecimiento y por lo tanto son las fuentes preferidas de nitrógeno (Ough and Amerine, 1988). Los aminoácidos pueden ser considerados cuantitativamente los componentes más importantes en cuanto a la aportación de nitrógeno para la síntesis de

proteínas estructurales y funcionales que hacen aumentar la biomasa de las levaduras, y para la producción de enzimas y transportadores de metabolitos que intervienen en la fermentación alcohólica. Por otra parte, la disponibilidad de los aminoácidos en la levadura es muy variable: mientras algunos son consumidos rápidamente (glutamina), otros tienen dificultades para hacerlo en condiciones anaerobias o fermentativas (prolina). Durante las primeras horas de fermentación, las células de levadura captan la mayoría de fuentes nitrogenadas presentes en el mosto y los compuestos nitrogenados son asimilados y degradados en un orden de preferencia, que viene marcado por diferentes mecanismos moleculares que permiten que la levadura utilice preferentemente aquellas fuentes que le permitan crecer mejor. Este mecanismo de selección se conoce como “Represión por catabolito del nitrógeno” (NCR) y se caracteriza porque la célula es capaz de detectar la presencia de las fuentes de nitrógeno más ricas. Esto desencadena una cadena de señales, que provoca la activación de los genes implicados en el transporte y metabolismo de estas fuentes, y en la represión de aquellos genes implicados en el transporte y utilización de fuentes más pobres. La selectiva inactivación y subsecuente degradación de las permeasas, previene la utilización de fuentes pobres de nitrógeno. Una vez consumidas las fuentes de nitrógeno más ricas (amonio, glutamina y asparagina), la levadura activa la maquinaria metabólica para la utilización de las más pobres (arginina, glutamato, alanina...)

Además del efecto sobre el crecimiento, la disponibilidad de nitrógeno también tiene un efecto importante sobre el metabolismo de las levaduras, afectando a la formación de compuestos volátiles y no volátiles, los cuales son de gran relevancia en la calidad del vino final. Una concentración por debajo de 140 mg/l de nitrógeno asimilable dificulta la fermentación (Bely et al., 1990), y una adición excesiva puede producir efectos no deseados como la alteración microbiológica del vino y del aroma.

Se han realizado numerosos estudios relacionados con el efecto del nitrógeno en la fermentación, en los cuales algunos autores explican que la adición de diferentes fuentes de nitrógeno en el mosto incrementan la biomasa de levaduras y la velocidad de utilización de los azúcares, mientras que otros comentan que el uso de sales de amonio para incrementar el contenido de nitrógeno en mosto induce a la represión en el consumo de aminoácidos en las levaduras, lo cual podría reducir la eficiencia de la fermentación y disminuir la síntesis de aromas (Beltrán et al., 2005). De hecho, se ha visto que las necesidades de nitrógeno de *S. cerevisiae* dependen de la cepa y de las condiciones de fermentación (concentración de azúcar, temperatura, presencia de oxígeno...).

Por esta razón, el objetivo de este trabajo es determinar la cantidad mínima de nitrógeno necesaria para obtener la máxima población en las primeras etapas de fermentación, y en consecuencia una fermentación más rápida. Se ha probado con tres fuentes de nitrógeno, para determinar cuál de ellas es más eficaz (amonio, arginina y glutamina). Estos compuestos actúan de manera diferente en la levadura: el amonio se asimila fácilmente y rápidamente durante el crecimiento exponencial, la glutamina es el aminoácido que más rápido se consume y que no está sometido a represión

por catabolito, y la arginina es el aminoácido mayoritario en los mostos, pero su captación solo se produce cuando el amonio, y posiblemente la glutamina, se han consumido totalmente, puesto que está sometido a represión por catabolito. El ensayo se ha realizado probando con concentraciones crecientes de nitrógeno, y se han analizado diferentes parámetros relacionados con el crecimiento celular (valor máximo OD y tiempo de duplicación), capacidad fermentativa (producción de CO<sub>2</sub> medido por modificación de la impedancia), marcadores bioquímicos y moleculares de carencia de nitrógeno durante la vinificación (acumulación de trehalosa, actividad arginasa y glutamato deshidrogenasa, expresión génica de los genes *GAP1* y *MEP2*).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Cepas de estudio**

En el presente trabajo se utilizaron cuatro cepas vínicas comerciales de la empresa Agrovín: PDM, EP2, RVA, TTA. Para asegurar que todas ellas se corresponden con diferentes cepas o genotipos fueron identificadas y genotipadas por diversas técnicas moleculares a nivel de especie y de cepa.

La extracción de DNA se realizó según el protocolo descrito por Querol et al., (1992). Los métodos de identificación utilizados fueron:

### **ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN DE DNA MITOCONDRIAL (mtDNA)**

El DNA era digerido con el enzima de restricción *HinfI* durante 3 horas a 37°C. Esta enzima es del tipo GCAT y no reconoce las secuencias ricas en GC ni en AT. El mtDNA se caracteriza por presentar zonas ricas en AT y otras ricas en GC, donde no se encuentran los cuatro nucleótidos juntos. Debido al bajo número de sitios de restricción en el mtDNA y al alto número de puntos de corte en el DNA nuclear, se obtienen fragmentos de pequeño tamaño de DNA nuclear y se pueden visualizar los fragmentos de mayor tamaño del mtDNA mediante una electroforesis. Estos fragmentos eran separados en un gel de agarosa al 0,8%. Las condiciones de electroforesis eran 20V durante toda la noche en tampón TBE (Tris base 89 mM, Ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8). Tras la electroforesis el gel era teñido con Bromuro de etidio y visualizado y fotografiado en la cámara de captación de imágenes GelPrinter Plus (TDI).

### **MÉTODOS BASADOS EN LA TÉCNICA DE PCR (MICROSATÉLITES Y ELEMENTOS $\delta$ )**

Se amplificaron las regiones comprendidas entre los elementos delta utilizando los primers específicos  $\delta 12$  y  $\delta 21$  (Legras y Karst, 2003), siguiendo el programa de la PCR con las siguientes condiciones: 4 min. 95°, 35 ciclos (30 seg. 95°C, 30 seg. 46°C, 90 seg. 72°C) y 10 min 72°C. A continuación las diferentes muestras eran separadas por electroforesis.

Los microsátélites O y P eran amplificados con el siguiente programa de PCR: 4 min 95°, 34 ciclos (30 seg. 94°C, 30 seg. 67°C, 90 seg. 72°C) y 10 min 72°. Los fragmentos generados son separados mediante una electroforesis capilar utilizando el secuenciador automático ABI PRISM 310 Genetic Analyzer.

## ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN DE REGIONES RIBOSOMALES (ITS, 5,8S)

Se realizó la amplificación de la región ribosomal mediante los cebadores *its1* (5' TCCGTACGTGAACCTGCGG 3') e *its4* (5' TCCTCCGCTTATTGATA TGC 3') mediante un termociclador GenAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem) La región amplificada comprende los espaciadores intergénicos ITS1 e ITS2 y el gen ribosomal 5.8S, la cual es muy específica para cada especie. Tras la PCR, el amplicón se digería con el enzima de restricción *HaeIII*, tal como describió Guillamon et al., (1998).

## Condiciones de fermentación

Las cepas se usaban en forma de levadura seca activa y se sometían a un proceso de rehidratación para su utilización posterior (0,1 g de LSA en 10 ml H<sub>2</sub>O mQ: 10<sup>8</sup> cel/ml, 30 min a 37°C). Tras la rehidratación, eran inoculadas en un mosto sintético a una concentración de 2.10<sup>6</sup> células/ml. A este mosto sintético (composición descrita en Beltran et al., 2004) se le adicionaba diferentes concentraciones de nitrógeno total asimilable, en un rango de 20 mg/l a 200 mg/l, en forma de amonio, glutamina, arginina y sus respectivas combinaciones.

## Crecimiento celular

Para cuantificar el crecimiento celular de las levaduras, se ha utilizado el lector de placas microtiter POLARstar OPTIMA de BGM labtech. Este aparato mide la Densidad Óptica (OD) (medida indirecta de la producción de biomasa en el tiempo), a una longitud de onda de 595 nm durante 45h y a 28°C. Las placas microtiter están constituidas por 96 pocillos de 250 µl cada uno, en los que hacíamos crecer las distintas levaduras en el mosto sintético y únicamente se iba cambiando la concentración de N y el tipo de fuente de N. Con el lector obtenemos directamente las curvas de crecimiento, y a partir de estos datos se ha calculado el tiempo de duplicación y la OD máxima para cada condición.

## Cinética fermentativa en presencia de distintas fuentes de nitrógeno y en diferentes concentraciones

Para ver el efecto de las distintas fuentes de nitrógeno en la cinética fermentativa, se realizaron fermentaciones de laboratorio con las distintas cepas de estudio en mosto sintético y 140 mg/l de nitrógeno total asimilable en forma de arginina, glutamina o amonio. Los mostos fueron inoculados con una concentración inicial de 2.10<sup>6</sup> células/ml. Se siguió la cinética

fermentativa a 28°C mediante el descenso de la densidad del mosto, la cinética de crecimiento mediante la medida de la absorbancia (OD 600nm) y el consumo de nitrógeno asimilable mediante la metodología del índice de formol (Aerny, 1996).

Por otro lado, se ha analizado también el efecto de distintas concentraciones de nitrógeno (140, 170, y 300 mg/l) sobre la cinética fermentativa de la cepa PDM.

### **Vitalidad celular**

Entendemos por vitalidad celular la cantidad de CO<sub>2</sub> que son capaces de producir las levaduras en las primeras horas de fermentación. Para determinar este parámetro se utilizó el análisis de la modificación de la impedancia indirecta como consecuencia de la disolución de CO<sub>2</sub> en una solución de KOH (equipo Bac-Trac 4300 Microbiological Analyser). Para ello, las distintas levaduras eran crecidas en mosto sintético que contenía distintas fuentes de nitrógeno (140 mg/l). Una vez crecidas en las distintas fuentes de N, se analizaba su vitalidad. El análisis consistía en determinar el tiempo necesario para disminuir un 10% la impedancia (dM10%) de un medio con glucosa (YPD). A mayor vitalidad, mayor producción de CO<sub>2</sub>, y menor tiempo para disminuir la impedancia.

### **Marcadores bioquímicos y moleculares**

Para poder analizar los marcadores relacionados con la carencia de nitrógeno, se realizaron fermentaciones de laboratorio a 28°C, modificando la concentración de nitrógeno. Primero se realizó el ensayo con una concentración de nitrógeno asimilable de 60 mg/l, considerada como una situación deficitaria de esta fuente nutricional, que puede provocar paradas fermentativas. Esta fermentación se comparó con otra en que la concentración de N era de 140 mg/l. Esta concentración se considera la concentración mínima para asegurar una fermentación.

La fermentación se llevo a cabo en tubos falcons, a los que se les añadía 40 ml de Mosto Sintético (MS), 800 µl de la fuente de nitrógeno y el inóculo de la cepa correspondiente. Para poder tener información a lo largo de toda la curva de crecimiento de la levadura, se cogió muestra a 3h, 8h, 24h, 48h y 72h. El *pellet* obtenido después de centrifugar la muestra, se congelaba en nitrógeno líquido y se guardaba a -20°C hasta su próxima utilización.

### **DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN TREHALOSA**

La extracción y digestión de la trehalosa intracelular se realizó siguiendo el protocolo Parrou y Francois (1997). El método consiste en la hidrólisis de la trehalosa intracelular mediante el enzima trehalasa y medida de la glucosa producida mediante el kit enzimático de glucosa (Boehringer Mannheim) (teniendo en cuenta que una molécula de trehalosa contiene dos de glucosa).

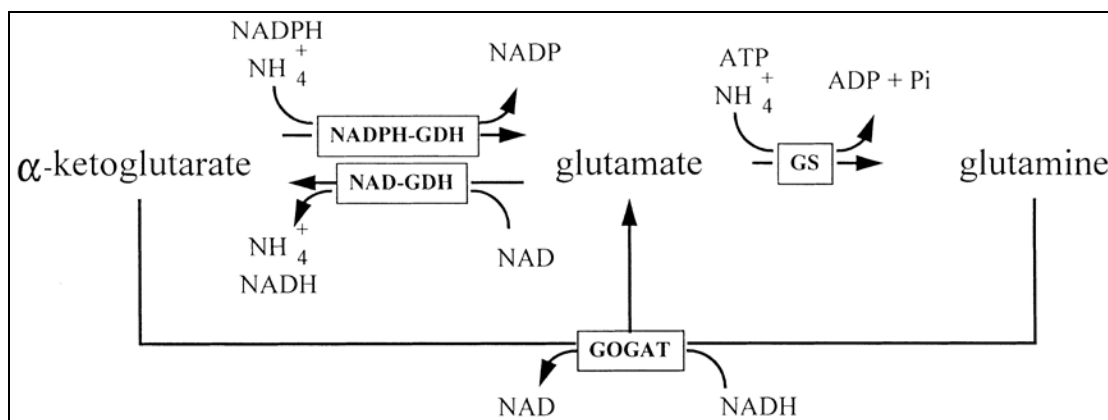


## DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ARGINASA

La degradación de la arginina está catalizada por la arginasa, obteniendo como producto ornitina y urea. La actividad arginasa se puede determinar midiendo el incremento en la concentración de ornitina mediante el reactivo ninhidrina (Carrasco et al., 2003).

## DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD GLUTAMATO DESHIDROGENASA

La glutamato deshidrogenasa es el enzima encargado de la síntesis de glutamato a partir de  $\alpha$ -cetoglutarato y amonio (ver Fig. 1, Metabolismo central del nitrógeno). Esta actividad depende de la cantidad de amonio disponible en el medio de crecimiento. Para su determinación se siguió el método descrito por Doherty (1970).



**FIGURA 1.** Metabolismo del nitrógeno.

## CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE LOS GENES *GAP1* y *MEP2*

La PCR en tiempo real se basa en la detección y cuantificación de los marcadores fluorescentes a lo largo de la reacción de PCR. Esto permite conocer la cantidad de fluorescencia emitida durante la fase exponencial de la reacción, donde un aumento significativo del producto de la PCR se correlaciona con la cantidad inicial de ADN o ADN complementario (proveniente de la retrotranscripción del ARN) en estudio.

Para obtener el RNA de las cuatro cepas de levadura las células eran lisadas por calor (agua a 65°C), descrito por Jing et al. (2008). El RNA resuspendido en 100  $\mu$ l de agua-DEPC era purificado con el High Pure RNA Isolation Kit (Roche). La concentración de RNA obtenida era cuantificada mediante el Nanodrop (ND-1000 Spectrophotometer) y a continuación se realizaba la retrotranscripción para transformar el RNA en cDNA, utilizando la Superscript™ II Rnasa Transcriptasa reversa (Invitrogen). En la reacción de PCR cuantitativa se utilizó como marcador fluorescente el SYBR® Green I PCR (Applied Biosystems). Se utilizaron placas de 96 pocillos y a cada pocillo se le añadían 20  $\mu$ l del reactivo (primers, SYBR Green y agua mQ) y

5 µl de la muestra de cDNA. El programa de PCR utilizado fue: 95°C 10 min y 40 ciclos de 95°C 15 seg y 60°C 1 min. El termociclador utilizado fue el Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

Los primers utilizados para el gen *GAP1* y *MEP2* se pueden ver en la Tabla 1. El gen de la actina (*ACT1*) era utilizado como gen de expresión constitutiva (“housekeeping gene”) que permitía la normalización de los datos.

**TABLA 1.** Primers utilizados en el trabajo.

Primer	Secuencia de nucleótidos (5'→3')
GAP1-F	CTGTGGATGCTGCTGCTTCA
GAP1-R	CAACACTTGGCAAACCCCTTGA
ACT-F	TGGATTCCGGTGATGGTGTT
ACT-R	CGGCCAAATCGATTCTCAA
MEP2-F	GGTATCATCGCTGGCCTAGTG
MEP2-R	ACAACGGCTGACCAGATTGG

Al obtener las curvas de amplificación, se evaluaron la  $C_T$  (ciclo umbral). El valor  $C_T$  está representado por el número de ciclos en el cual la producción de fluorescencia se eleva por encima del umbral establecido. Este valor es inversamente proporcional al log de la cantidad de producto de PCR (cDNA). Un mayor valor de  $C_T$ , nos indica una menor concentración de cDNA, y por lo tanto una baja expresión de los genes estudiados, y viceversa.

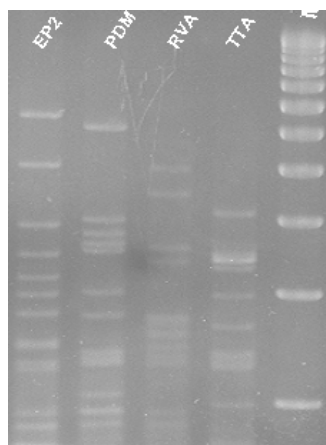
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Identificación molecular y genotipado de las cepas de estudio.

#### IDENTIFICACIÓN A NIVEL DE CEPA

##### 1. Análisis de restricción del DNA mitocondrial.

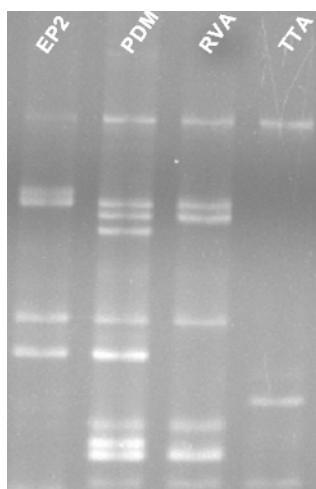
El mtDNA de *S. cerevisiae* es una pequeña molécula de 65-80 kb con un alto grado de polimorfismo, muy útil en la caracterización de cepas vínicas. En la figura 2 podemos visualizar las bandas correspondientes al mtDNA de las cuatro cepas, lo que indica que son cepas diferentes al tener patrones de bandas diferentes.



**FIGURA 2.** Análisis de restricción del ADN mitocondrial mediante la endonucleasa *HinfI*.

## 2. Métodos basados en la técnica de la PCR.

Con la identificación mediante microsatélites y elementos delta, también se observan diferentes perfiles de amplificación para cada cepa. Estas secuencias cortas distribuidas a lo largo del genoma, son altamente variables entre especies y son unos buenos marcadores moleculares intra e interespecífico.



**FIGURA 3.** Patrones de amplificación de los elementos delta.

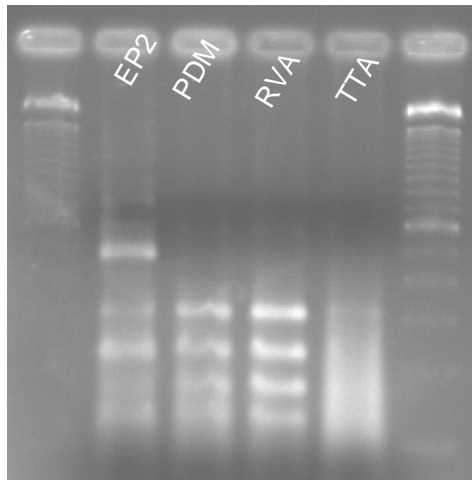
## IDENTIFICACIÓN A NIVEL DE ESPECIE

### 1. Análisis de regiones ribosomales (5,8S, ITS).

La región ribosomal amplificada se caracteriza porque combina zonas muy conservadas (gen ribosomal 5.8S) con zonas muy polimórficas como son los ITS. Estas zonas polimórficas son las que difieren entre las distintas especies, convirtiéndola en una molécula ideal para la identificación de

especies. Para esta identificación se puede secuenciar el amplificado o, para agilizar el análisis, digerir el amplificado con distintas enzimas de restricción. Las diferencias en las secuencias nucleotídicas de las diferentes especies darán lugar a fragmentos de distintos tamaños que son examinados por electroforesis.

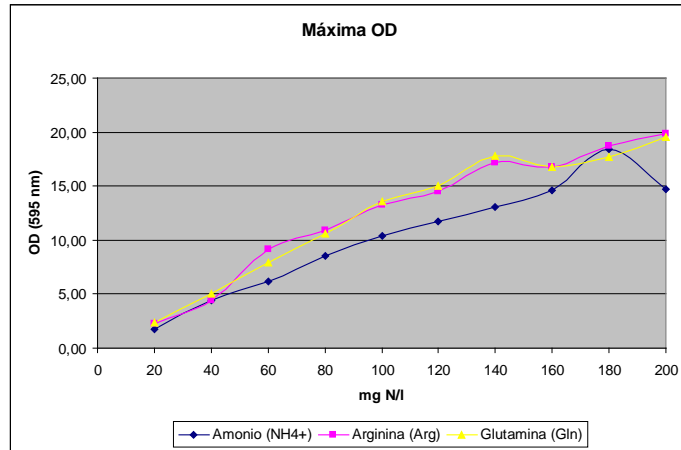
La figura 2 nos muestra un mismo patrón de bandas para las cepas PDM, RVA y TTA, y otro diferente para la EP2. Esto nos indica que la EP2 pertenece a otra especie, ya que la zona de los ITS es una región no codificadora e hipervariable que permite el reconocimiento a nivel interespecífico. Aunque la mayoría de las cepas comerciales pertenecen a la especie *S. cerevisiae*, la cepa EP2 pertenece a la especie *S. uvarum*.



**FIGURA 4.** Análisis de restricción de las regiones ribosomales de cuatro cepas vínicas.

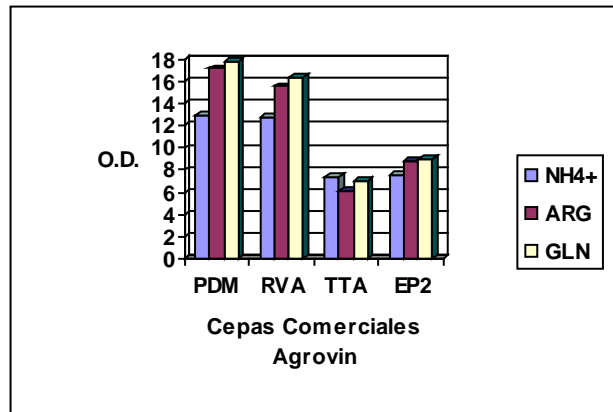
#### **Necesidades nitrogenadas de las distintas cepas para la obtención de la biomasa óptima para llevar a cabo la fermentación alcohólica**

La producción de biomasa en la fermentación alcohólica está influenciada por la concentración de nitrógeno y por la forma química en el que éste se encuentra en el mosto. Con los resultados obtenidos en la Fig.5, se observa que un aumento de la concentración de nitrógeno produce mayor cantidad de biomasa hasta 140 mg/l, donde el nitrógeno deja de ser limitante (mayores concentraciones no producen un aumento significativo de la biomasa). Respecto a las distintas fuentes de nitrógeno, los aminoácidos producen mayor biomasa que el amonio. La glutamina permite un crecimiento celular similar a la arginina, y resulta sorprendente que la menor producción de biomasa se obtenga con la utilización de amonio, teóricamente una de las fuentes de nitrógeno más interesantes para la levadura.



**FIGURA 5.** Valores de OD máxima en función de diferentes concentraciones y fuentes de nitrógeno, alcanzados por la cepa PDM.

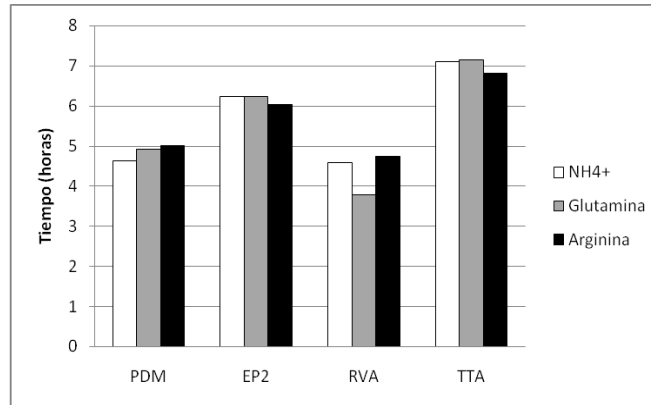
Las cepas utilizadas en este trabajo mostraban diferente comportamiento, bajo condiciones idénticas (Fig. 6). Realizando una comparación de las cuatro cepas, observamos que PDM y RVA presentan unas OD muy superiores, alcanzando un mayor tamaño poblacional. Estas dos cepas presentan una mayor tasa de crecimiento con respecto a la TTA y EP2 (posible *S. uvarum*). En cuanto a las fuentes de nitrógeno, el amonio parece ser el que menos biomasa produce frente a la arginina y la glutamina (excepto para la cepa TTA que parece ser al contrario).



**FIGURA 6.** Comparación de la máxima OD para cada cepa y diferentes fuentes de nitrógeno a una concentración de 140 mg de N/l.

El tiempo de duplicación te indica las horas que necesita la levadura para duplicar su población. El tiempo de generación mínimo se alcanza con concentraciones bajas de nitrógeno y a partir de aquí apenas varía con el incremento de nitrógeno. Esto también depende de la fuente de N utilizada. El amonio parece ser el que más rápidamente alcanza este valor mínimo (a partir de 40 mg N/l apenas varía este tiempo). Curiosamente, el amonio producía menos biomasa, pero la produciría en menos tiempo. Las cepas PDM y RVA presentan un tiempo de generación similar y significativamente

menor que el presentado por las cepas TTA y EP2 para todas las fuentes de N ensayadas. La cepa EP2 prácticamente muestra el mismo tiempo de duplicación para todas las fuentes de nitrógeno ensayadas (esta cepa no es *S. cerevisiae*). Con respecto a la cepa TTA es la que presenta un crecimiento más lento, con tiempos de duplicación por encima de las 6 horas (Fig. 7).



**FIGURA 7.** Tiempo de duplicación de las cuatro cepas crecidas en las tres fuentes de nitrógeno con una concentración de 140 mg/l N

### Efecto del nitrógeno sobre la cinética fermentativa

El contenido en nitrógeno también tiene una influencia clara sobre la velocidad fermentativa (Thaillandier et al., 2007). La mayor parte de la fermentación alcohólica se produce en la fase estacionaria, y a pesar de que durante este periodo no hay multiplicación celular, las levaduras necesitan nitrógeno para mantener su metabolismo activo. El medio de fermentación es un ambiente cambiante y hostil que requiere una readaptación continua para las nuevas condiciones, lo que supone un recambio proteico continuo en la maquinaria enzimática celular y la disponibilidad de nitrógeno en el medio de fermentación.

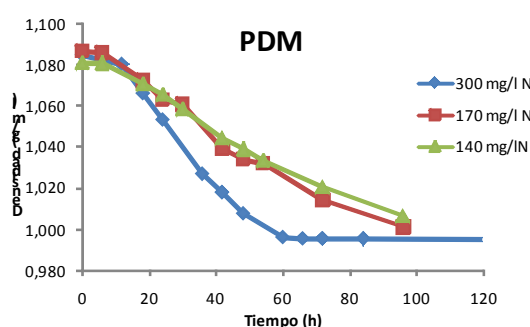
Los resultados obtenidos con la cepa PDM (Tabla 2), muestran una mayor producción de biomasa y una cinética más rápida en las células fermentando en mosto con arginina como única fuente de nitrógeno. Curiosamente, a pesar de que las células crecidas en amonio tienen un menor tiempo de duplicación que la arginina, éstas tienen cinéticas fermentativas más lentas, lo cual coincide también con una menor producción de biomasa. Se observa también que el consumo de arginina es más lento que el consumo de las otras fuentes nitrogenadas (las cuales consumen el nitrógeno en 24 horas), lo cual explica también el crecimiento algo más lento de éstas células y una fase de latencia ligeramente mayor. Sin embargo, una vez la arginina se ha consumido completamente (sobre las 44 horas) se obtiene un aumento de biomasa, siendo mayor que en glutamina y amonio, y también un aumento en la velocidad fermentativa, coincidiendo con una mejor vitalidad. Podemos decir que la levadura consume la arginina más lenta pero eficazmente.

El análisis de la vitalidad consiste en ver la producción de CO<sub>2</sub> (medido como tiempo en disminuir el 10% de la impedancia de una solución de KOH) tras crecer las células 24 y 48 horas en un mosto con distintas fuentes de N (Tabla 2). Independientemente de la fuente de N, las células de 24 horas de crecimiento presentan una mejor vitalidad que las células crecidas 48 horas. Las células todavía están en crecimiento exponencial a las 24 horas, sin embargo, ya han entrado en fase estacionaria a las 48 horas. Esta mayor actividad metabólica de las células en fase exponencial puede ser debida a un mayor contenido de reservas intracelulares de nutrientes, especialmente de nitrógeno. En cualquier caso, las células crecidas en arginina o glutamina mostraban mejor vitalidad que las células crecidas en amonio. Estos resultados sugieren que la arginina y la glutamina son buenas fuentes de reserva de nitrógeno, y se acumulan en el interior celular para ser usadas en la fase estacionaria o en ausencia de nitrógeno extracelular. Igualmente se confirma que existe una relación directa entre la velocidad fermentativa y la cantidad de biomasa.

**TABLA 2.** Efecto de las distintas fuentes de nitrógeno sobre el crecimiento celular (OD600 y UFC/ml), consumo de azúcares (densidad del medio), nitrógeno asimilable residual (YAN; contenido inicial 140mg/l) y vitalidad celular (tiempo de disminución de un 10% de la impedancia después de crecer 24 y 48 horas en mostos con distintas fuentes de N) en la cepa PDM.

	Max. OD600	Max. viables UFC/ml	OD600		Densidad (mg/L)		[YAN] (mg/l)		dM10%(h)	
			24 h	48h	24 h	48h	24 h	48h	24 h	48h
			<b>Arg</b>	12.3	1,03E+08	2,92	7.68	1070.2	1043.6	50.0
<b>Gln</b>	11.05	1,10E+08	3,12	8.88	1068,4	1045.8	2,8	1.11	1.12	2.18
<b>NH4</b>	8.3	9,20E+07	3,82	6.85	1067,7	1044.0	5,0	1.59	1.36	2.09

También se ha verificado que la velocidad de fermentación es directamente proporcional al contenido nitrogenado (Fig. 8). El gráfico nos muestra que la fermentación con 300 mg/l nitrógeno es más rápida y tiene un menor tiempo de latencia.



**FIGURA 8.** Cinética fermentativa de la cepa PDM en distintas concentraciones de nitrógeno asimilable.

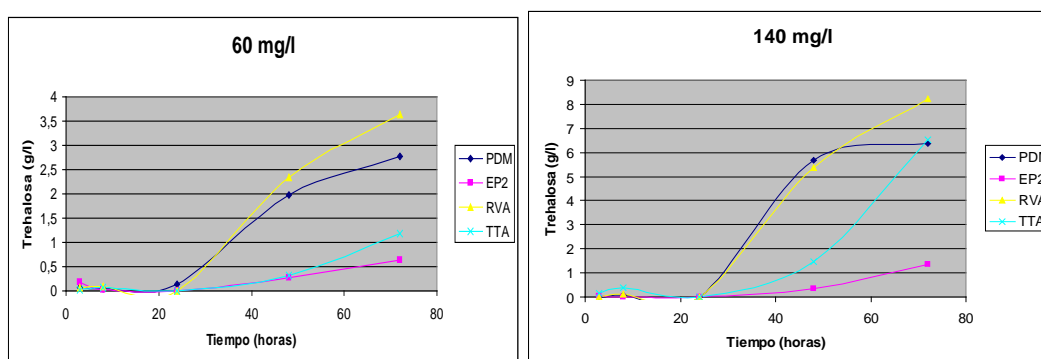
## Selección de marcadores bioquímicos y moleculares de limitación de nitrógeno.

Nos interesa encontrar un marcador que nos detecte en las primeras horas de fermentación, la falta de nitrógeno en el mosto, sin que se vea afectado por otras variables. Es muy importante detectar las deficiencias de nitrógeno, ya que un déficit puede producir una parada de fermentación, y un exceso puede provocar inestabilidad microbiológica en el vino y aromas desagradables en el producto final.

### DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO INTRACELULAR EN TREHALOSA

La trehalosa es un metabolito intracelular que *Saccharomyces cerevisiae* sintetiza al ser cultivada bajo limitación de algún nutriente (nitrógeno, carbono o fósforo) o en condiciones de estrés. En nuestro trabajo ensayamos con dos concentraciones diferentes de nitrógeno (60 y 140 mg/l), para comprobar si el contenido en trehalosa es un buen indicador de la carencia de nitrógeno. En la bibliografía hay varios trabajos que muestran que el metabolismo de la trehalosa está afectado por la disponibilidad de nitrógeno, ya que una vez es consumido el nitrógeno del medio comienza la acumulación de trehalosa intracelular (Novo, 2006).

En el presente trabajo se observa que a partir de las 24h empieza la acumulación de trehalosa en la levadura, y a las 72h se empieza a estabilizar ya que las levaduras entran en fase estacionaria (Fig. 9). Esto sucede de la misma manera en los dos ensayos realizados (60 mg/l y 140 mg/l N).



**FIGURA 9.** Concentración de trehalosa a lo largo de la fermentación alcohólica en cuatro cepas comerciales, a diferentes concentraciones de nitrógeno.

Las cepas acumulan la trehalosa de manera diferente. Mientras la PDM y la RVA actúan de manera similar, la TTA y EP2 sintetizan menor cantidad de trehalosa. Esto puede estar relacionado con el crecimiento celular y la velocidad fermentativa de cada cepa, ya que la PDM y RVA en menor tiempo alcanzan una mayor biomasa (y también mayor velocidad fermentativa).

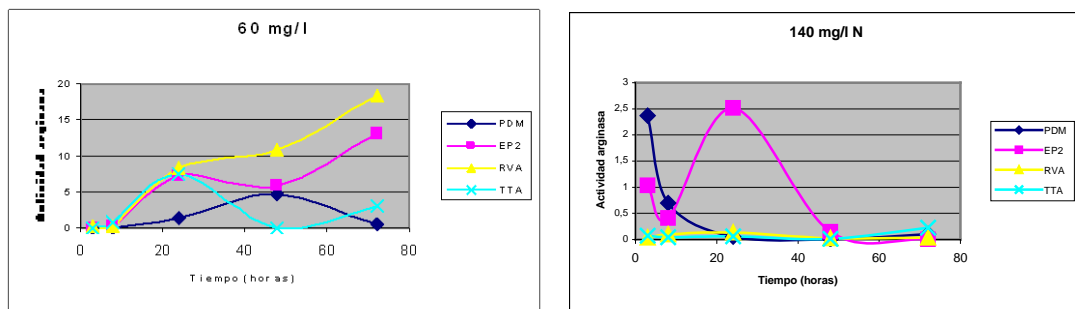


Este parámetro no es un buen marcador de carencia de nitrógeno, ya que aparte de que la acumulación de trehalosa ocurre cuando la célula entra en fase estacionaria y no cuando hay una situación deficitaria de nitrógeno, en el ensayo realizado con menor concentración de N se produce una menor acumulación de trehalosa (puede ser debido a que a 60 mg/l N, hay tan poca cantidad de N, que la célula tiene un metabolismo lento y no puede sintetizar componentes que ayuden a la acumulación de trehalosa), y con 140 mg/l la acumulación se debería retrasar, empezando la fase exponencial más tarde.

## DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ARGINASA

Según varios trabajos, la concentración límite para que finalice una fermentación es de 140 mg/l N, aunque cada situación es diferente dependiendo de la cepa utilizada, condiciones de aireación, temperatura y la presencia de nutrientes en el mosto que pueden ser inhibidores del crecimiento. Según estudios realizados, cuando la fermentación se realiza bajo condiciones de nitrógeno deficitarias, las grandes cantidades de arginina acumuladas en las vacuolas son transportadas al citoplasma, donde es degradada enzimáticamente y utilizada para la biosíntesis de compuestos nitrogenados. Por ello, la determinación de la actividad arginasa es importante para detectar el momento en el que la concentración de nitrógeno existente en el mosto, es deficitaria en unas condiciones determinadas.

Se compararon las actividades de las cuatro cepas, las cuales fueron sometidas a dos concentraciones diferentes de nitrógeno, y se observa un aumento de la actividad arginasa cuando el nitrógeno disponible en el medio es consumido (Fig.10).



**FIGURA 10.** Actividad arginasa (nmoles ornitina/minuto\* $\mu$ g proteína)

El ensayo de 60 mg/l N muestra un aumento de la actividad a lo largo de la fermentación. En las primeras horas se consume el nitrógeno y cuando ya no hay nitrógeno disponible, se activa la arginasa y se obtienen ornitina y urea como producto de reacción, que se utilizan en la biosíntesis de compuestos nitrogenados. En todas las cepas, excepto en la PDM, se produce la activación de la arginasa a las 24h y después se estabiliza, y sigue aumentando en la RVA y EP2, pero disminuye en el caso de la TTA. La cepa PDM tiene su mayor activación a las 48h (cuando en esta cepa se ha consumido todo el nitrógeno) y después disminuye. Se observa diferente

comportamiento de las cuatro cepas, dependiendo de la velocidad de consumo de nitrógeno.

Con 140 mg/l N la actividad por parte de las cuatro cepas es menor que en el otro ensayo, alcanzando valores mínimos las cepas RVA y TTA (no sufren condiciones limitantes de nitrógeno, y por eso la enzima no se activa). La PDM en las primeras horas tiene actividad arginasa, lo que puede ser debido a que aun no ha detectado que en el medio hay nitrógeno, al igual que la cepa EP2.

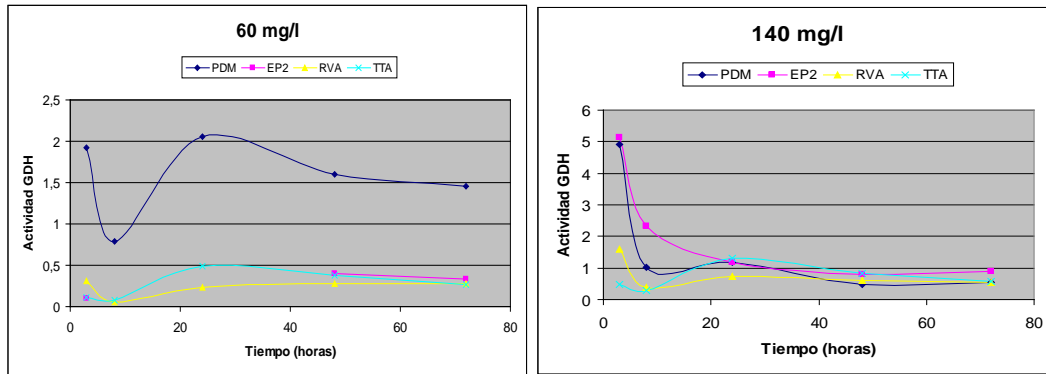
Este parámetro es un buen sensor de la carencia de nitrógeno en el medio donde transcurre la fermentación. Aunque las concentraciones utilizadas en el estudio no son demasiado diferentes (ya que las dos se pueden considerar limitantes, dependiendo de la cepa), se observan claras diferencias, mostrando una mayor actividad en el ensayo con mayor carencia nitrogenada. Podría ser un buen marcador para detectar en que momento se produce el déficit de nitrógeno, y de esta manera añadir los suplementos nitrogenados en ese instante para que no afecte a la calidad del vino, ya que pueden producirse sabores y aromas anómalos.

#### DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD GLUTAMATO DESHIDROGENASA (NADPH-GDH)

La respuesta fisiológica que da la célula dependiendo de la fuente de nitrógeno que hay en el medio puede inactivar, degradar y sintetizar enzimas que están relacionados con el uso de esa fuente nitrogenada. La actividad de NADPH-GDH depende del amonio que haya en el medio, que puede estar en el mosto o ser sintetizado a partir de algunos aminoácidos. Por lo que la GDH tendrá mayor actividad, cuando haya más amonio en el medio.

Como se observa en la Figura 11, en las primeras horas de fermentación la actividad enzimática es elevada, cayendo bruscamente a las 8h, punto en el cual ya se ha consumido todo el nitrógeno disponible en el mosto (mayoritariamente amonio que es su fuente preferida). En las siguientes horas la actividad enzimática es baja aunque aumenta con respecto a las 8h, ya que las levaduras ya han consumido todo el amonio pero la actividad puede ser debida a los aminoácidos que hay en el medio, que son captados más tarde. En las primeras horas todo el amonio disponible en el medio es convertido en glutamato (elevada actividad NADPH-GDH).

Como en los dos casos la concentración de nitrógeno es deficitaria para las distintas cepas vínicas, en ambos ensayos la actividad es baja excepto en las primeras horas de fermentación alcohólica en la que se consume todo el nitrógeno disponible. La PDM es la cepa que mayor actividad tiene en los dos casos, obteniendo un mayor rendimiento de las fuentes de nitrógeno, lo que puede estar relacionado con su mejor crecimiento y mayor velocidad fermentativa. La EP2 en el ensayo de 140 mg/l N, a las 8h aún no ha captado todo el amonio, por lo que la actividad no cae bruscamente como en las otras cepas, debido a su crecimiento más lento.

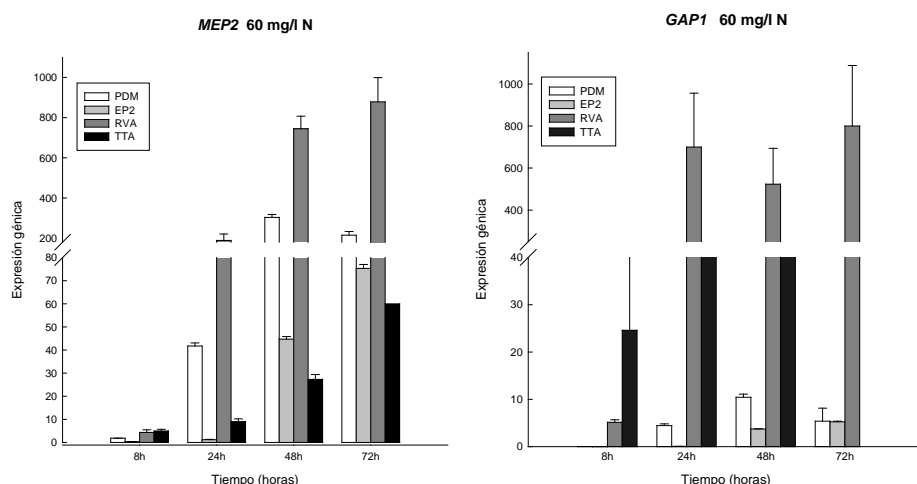


**FIGURA 11.** Actividad NADPH-GDH a diferentes concentraciones de nitrógeno (60 y 140 mg/l), en cuatro cepas vínicas. Unidades  $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$  proteína celular total soluble

Aunque el trabajo se ha realizado con concentraciones bajas de nitrógeno, se observan diferencias en este marcador bioquímico. La actividad enzimática alcanza valores más elevados en el ensayo de 140 mg/l N, lo que indica que es un buen marcador de carencia de nitrógeno, aunque aún se tiene que probar con concentraciones mayores de nitrógeno (300 mg/l), para observar si de verdad es fiable.

#### CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE *GAP1* y *MEP2*

La expresión de los transportadores de nitrógeno *GAP1* y *MEP2* fue analizada en las cuatro cepas durante la fermentación alcohólica a una concentración de nitrógeno de 60 mg/l. Se realizó la cuantificación relativa de la expresión con el gen constitutivo de la actina, y se utilizó como valor de referencia la expresión obtenida a las 3h (diferente para cada cepa). La figura 12 muestra la diferente expresión génica de las permeasas para cada cepa. El ensayo se ha realizado a con una concentración de nitrógeno de 60 mg/l, lo que implica una situación de carencia. Todas las cepas tienen una gran expresión de los dos transportadores (mayoritariamente del *MEP2*), debido a que la falta de nitrógeno en el medio, activa la síntesis de permeasas para que la levadura pueda asimilar mayor cantidad de amonio y aminoácidos. Las dos cepas que tienen mayor expresión son la PDM y RVA. Esto puede estar relacionado con su crecimiento más rápido y su mayor obtención de biomasa. Estas cepas detectan un déficit de nitrógeno, y activan los transportadores para obtener amonio y aminoácidos y poder continuar la fermentación sin ningún peligro. Las otras dos cepas también detectan la carencia de nitrógeno, pero se generan menos permeasas, por lo que las cepas disponen de menos nitrógeno, y por lo tanto crecen más lentas, generando menor cantidad de células.



**FIGURA 12.** Expresión génica de *GAP1* y *MEP2* en las cuatro levaduras.

## CONCLUSIONES

En la fermentación alcohólica el contenido de nitrógeno en el mosto es muy importante afectando a la generación de la biomasa óptima para el proceso, a la velocidad fermentativa y a la calidad final del vino. Sin embargo, en el siguiente estudio también queda manifiesto las diferentes necesidades dependiendo de la cepa. Las cepas PDM y RVA alcanzan una mayor biomasa con una menor concentración de nitrógeno (reflejado tanto en la O.D. máxima y en el menor tiempo de duplicación). Esto, a su vez, tiene un claro efecto sobre la cinética fermentativa, siendo las más rápidas en el consumo de los azúcares. A pesar de las características de cada cepa, si que se pueden obtener conclusiones más o menos generales para todas las cepas.

La arginina (aminoácido mayoritario en el mosto) es muy eficaz tanto para la producción de biomasa como en la actividad fermentativa. Esto ha resultado sorprendente, ya que, debido al mecanismo de represión por catabolito, es consumida cuando ya no queda en el medio ni amonio ni glutamina, y era considerada una fuente pobre de nitrógeno. Esto podría tener una aplicación práctica en bodega, donde únicamente se utilizaba como fuente de nitrógeno suplementada el amonio. En base a nuestros resultados, la arginina sería una buena alternativa a las sales de amonio.

Otro objetivo de este trabajo era determinar marcadores de deficiencia de nitrógeno en el mosto en fermentación. Para ello, se han estudiado tres marcadores bioquímicos: contenido en trehalosa intracelular, actividad arginasa y actividad glutamato deshidrogenasa; y dos marcadores moleculares: la actividad transcripcional de las permeasas Gap1 y Mep2. Nuestros resultados muestran que el contenido en trehalosa estaría más relacionado con la fase de crecimiento (exponencial o estacionaria). Por el contrario, la actividad arginasa y glutamato deshidrogenasa si muestran una actividad directamente proporcional a la presencia de nitrógeno en el medio. La arginasa se activa cuando se consume el N del medio, mientras que la

glutamato deshidrogenasa decae cuando se consume el amonio del medio. Con respecto a los genes *GAP1* y *MEP2* también muestran una clara activación en todas las cepas tras 8 horas de inoculación (coincidiendo con el consumo del nitrógeno). Esta activación transcripcional era mucho más rápida y superior en las cepas con buena velocidad de crecimiento. Por tanto, se podrían considerar buenos marcadores. La simplificación de estos protocolos, junto con la adaptación para su uso industrial, podrían ser útiles para determinar las carencias de nitrógeno en la industria enológica.

## REFERENCIAS

- Aerny, J. Composés azotés des moûts et vins. *Reveu suisse Vitic.Arboric.Hortic.* 1996, 28, 161-165.
- Bell and Henschke, 2005 S.J. Bell and P.A. Henschke, Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine, *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11 (2005), pp. 242–295.
- Beltran, G., Esteve Zarzoso, B., Rozes, N., Mas, A., Guillamon, J.M. 2005. Influence of the timing of nitrogen additions during synthetic grape must fermentations on fermentations kinetics and nitrogen consumption. *J. Agric. Food Chem.* 53, 996-1002.
- Beltran, G., Novo, M., Rozes, N., Mas, A., Guillamon, J.M. Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentations. *FEMS Yeast Res.* 2004, 4, 625-632.
- Bely, M., Sablayrolles, J.M., Barre, P. 1990. Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions. *J. Ferment. Bioeng.* 70:246-252.
- Bisson, L. 1999. Stuck and sluggish fermentations. *Am. J. Enol. Viticult.* 50:107-119.
- Carrasco, M.P., Pérez-Ortín, J.E. and del Olmo, M. (2003) Arginase activity is a useful marker of nitrogen limitation during alcoholic fermentation. *Syst. Appl. Microbiol.* 26, 471-479.
- Cole, V.C., Noble, A.C., 1997. Flavour chemistry and assessment. In: Law, A.G.H., Piggot, J.R. (Eds.), *Fermented Beverage Production*. Academia and Professional, London, United Kingdom, pp. 361–385.
- Fleet, G.H., Heard, G.M., 1993. Yeasts-growth during fermentation. In: Fleet, G.H. (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academia Publishers, Chur, Switzerland, pp. 27–55.
- Guillamon, J.M., Sabate, J., Barrio, E., Cano, J., and Querol, A. (1998) Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Arch. Microbio.* 169, 387-392.
- Henschke, P., 1997. Wine yeast. In: Zimmerman, F.K., Entian, K.D. (Eds.), *Yeast Sugar Metabolism, Biochemistry, Genetics, Biotechnology and Applications*. Lancaster, United Kingdom, pp. 527–560.
- Inglede, M., Kunkee, R.E. 1985. Factors influencing sluggish fermentations of grape juice. *Am. J. Enol. Viticult.* 36:65-76
- Lambrechts, M.G., Pretorius, I.S., 2000. Yeast and its importance to wine aroma. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21, 97–129.
- Novo Molinero, M. 2006. Biochemistry and physiology of rehydration and adaptation of active dry wine yeast for winemaking. Tesis doctoral. Universitat Roviri I Virgili.
- Nykänen, L., 1986. Formation and occurrence of flavour compounds in wine and distilled alcoholic beverages. *Am. J. Enol. Vitic.* 37, 84–96.
- Ough, C.S.; Amerine M.A. 1988. Nitrogen Compounds. *Methods for analysis of must and wines*. Segunda edición. John Wiley and sons. University of California.
- Parrou, J.L. and Francois, J. 1997. A simplified procedure for a rapid and reliable assay of both glycogen and trehalose in whole yeast cells. *Anal. Biochem.* 248,186-188.

Querol, A., Barrio, E., Ramon, D. A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Syst. Appl. Microbiol.* 1992, 21, 315-323. Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., Carece, A., 2003. Function of yeast species and strains in wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 169–180.

Thaillandier, P.; Ramon-Portugal, F.; Fuster, A. & Strehaiano P. 2007. Effect of ammonium concentration on alcoholic fermentation kinetics by wine yeasts for high sugar content. *Food Microbiology* 24: 95-100.