ZUBÍA Monográfico	7	103-111	Logroño	1995
-------------------	---	---------	---------	------

SELECCIÓN DE LEVADURAS VÍNICAS EN LA DENOMINACIÓN DE ORIGEN CALIFICADA RIOJA*

Ana Rosa Gutiérrez Viguera**
M^a Pilar Santamaría Aquilué***
Rosa M^a López Martín***
M^a Jesús Sevilla****

RESUMEN

Se ha seleccionado una levadura de vinificación autóctona de la D.O.C. Rioja, capaz de mantener la tipicidad de los vinos de esta región. La metodología seguida en el proceso ha sido una selección a partir de 245 aislados de la especie Saccharomyces cerevisiae, siguiendo cronológicamente los criterios: factor killer, comportamiento fermentativo en diferentes condiciones y análisis químico y organoléptico de los vinos elaborados.

Palabras clave: levaduras, selección, vinificación, aromas fermentativos, factor killer.

A wine yeast from D.O.C. Rioja has been selected. The result of this selection is a yeast able to keep the characteristics of the wines of this region. The process to achieve this yeast has been a selection among 245 Saccharomyces cerevisiae isolated colonies which have been applied this technical criteria: killer factor, effect of different conditions on wine fermentation, chemical and organoleptic composition of elaborated wines.

Key words: yeasts, selection, winemaking, aroma composition, killer factor.

0. INTRODUCCIÓN

La utilización de levaduras seleccionadas en vinificación es una técnica enológica utilizada en los últimos años con el fin de controlar la población de levaduras indígenas que tradicionalmente dirigen el proceso, puesto que la población microbiana protagonista de la fermentación alcohólica va a condicionar notablemente la calidad del producto final

* Recibido el 19 de diciembre de 1994. Aprobado el 10 de marzo de 1995.

Este trabajo ha sido subvencionado por la Consejería de Agricultura y Alimentación de la C.A. de La Rioja.

** Departamento de Agricultura y Alimentación. Universidad de La Rioja.

*** Centro de Investigaciones Agrarias de La Rioja. Apdo. 1056. 26080 Logroño (La Rioja).

**** Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibertsitatea.

(Suárez-Lepe, 1990; Strydom, 1985). Este hecho es conocido desde que Pasteur en 1876 afirmara que "el gusto y la calidad del vino dependen en gran parte de la naturaleza específica de las levaduras que se desarrollan durante la fermentación".

A pesar de las ventajas que a priori tiene la utilización de levaduras seleccionadas, en España y también en Rioja, existe cierta reticencia a su utilización sistemática como una técnica enológica más, debido principalmente a que las levaduras que actualmente se comercializan son foráneas y es bien conocido que las mismas especies aisladas en zonas vitivinícolas alejadas ceden al vino parámetros enológicos, al menos cuantitativamente distintos (Bravo, 1991).

A pesar de esta oposición a introducir microorganismos ajenos a la propia flora indígena, el consumo de levaduras comerciales en la D.O.C. Rioja, se ha duplicado en los últimos cinco años. De ahí surgió la necesidad desde nuestro punto de vista, de disponer de levaduras seleccionadas originarias de la D.O.C. Rioja que puedan utilizarse cuando los enólogos crean oportuno y de este modo eliminar el temor de uniformización de la flora fermentativa en las distintas zonas productoras.

La selección de cepas o selección clonal se basa en el aislamiento de un número elevado de cultivos puros, que una vez caracterizados taxonómicamente, se estudian desde el punto de vista enológico. Según Vezinhet y Pineau (1990), el criterio a la hora de seleccionar una levadura es que ésta se adapte a la materia prima original, a las condiciones tecnológicas disponibles y a las características del producto final que queremos obtener.

Las metodologías seguidas en los procesos de selección atienden a criterios diversos que pueden ser generales o específicos de determinadas regiones vitivinícolas (Parish y Carroll, 1987; Caillet, 1991). Distintos autores proponen esquemas que estudian con mayor o menor interés determinados parámetros (Delteil, 1990; Suárez Lepe, 1990; Gaia, 1992; Delfini, 1992).

1. MATERIALES Y MÉTODOS

Levaduras: partimos de 245 cultivos puros de la especie *Saccharomyces cerevisiae* aislados en las distintas zonas de la D.O.C. Rioja.

Análisis físico-químico de mostos y vinos: se siguieron los métodos oficiales de análisis de la CEE aplicables al sector del vino (Diario oficial de la CEE, 1990), excepto para el ácido tartárico (método colorimétrico de Rebelein; Lipka y Tanner, 1974), y ácido málico, ácido láctico, glicerol, ácido succínico y etanol (métodos enzimáticos de la firma Bohëringer Mannheim).

Análisis organoléptico: se siguió la ficha de cata propuesta por el Instituto Nacional de Denominaciones de Origen (INDO).

Poder floculante: se utilizó el Test de Helm (Caillet, 1991).

Producción de ácido sulfhídrico: se analizó sembrando sobre agar sulfito de bismuto (Delfini y Bardi, 1990), y por análisis organoléptico.

Velocidad de fermentación: se calculó según indican Houtman y Du Plessis (1980).

Formación de espuma: se analizó según describe Vezinhet (1989), pero modificación de acuerdo a las consideraciones realizadas por Bagot y col. (1989).

Determinación del fenotipo killer: siguiendo la metodología descrita por Bussey (1981) e Hidalgo (1989).

Análisis aromático de los vinos: por cromatografía de gases (Gutiérrez, 1994).

Vinificaciones: a lo largo de todo el proceso de selección se realizaron dos tipos de ensayos de fermentación: microvinificaciones sobre mosto sintético (glucosa 20%; KH_2PO_4 0,5%; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,2%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,04%; Extracto de levadura 0,1%) y microvinificación sobre 5 litros de mosto de uva.

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los criterios utilizados cronológicamente en la selección de cepas de la especie *Saccharomyces cerevisiae* fueron los siguientes:

- Factor killer
- Comportamiento fermentativo en diferentes condiciones
- Análisis químico y organoléptico de los vinos producidos

2.1. Fenotipo killer

Atendiendo a esta propiedad, las levaduras pueden clasificarse en tres fenotipos distintos: killer, sensibles y neutras. Las levaduras de fenotipo killer sintetizan y excretan al medio una toxina (factor killer) que es letal para las células sensibles. Las levaduras con fenotipo neutro no la sintetizan pero son resistentes a su acción. Las levaduras de fenotipo sensible no sintetizan la toxina ni son resistentes a la misma por lo que son destruidas por las cepas killer.

El factor killer juega un importante papel en la concurrencia entre cepas durante la fermentación alcohólica (Tiourina et al., 1980; Rossini, 1985; Petering et al., 1991). El hecho de que la cepa inoculada posea fenotipo killer le confiere una ventaja importante sobre la flora indígena (Radler, 1980; Hidalgo, 1992). Por ello se eligió como primer factor de selección la producción y resistencia al factor killer. Como podemos ver en la Tabla 1, el fenotipo dominante entre las cepas en proceso de selección es el neutro.

Como resultado de esta primera etapa de selección eliminamos para la siguiente fase todos los aislados que poseían fenotipo sensible.

Tabla 1: Caracterización de las levaduras en proceso de selección respecto a su fenotipo "killer"

Fenotipo	Nº cepas	Frecuencia
Killer (K ⁺ R ⁺)	11	4,5%
Neutro (K ⁻ R ⁺)	208	84,9%
Sensible (K ⁻ R ⁻)	26	10,6%

2.2. Comportamiento fermentativo

2.2.1. Preselección sobre cepas neutras

Antes de abordar la segunda etapa de selección, y dada la imposibilidad material de seguir trabajando con las 11 cepas killer y las 208 cepas neutras, pasamos por una etapa previa de preselección sobre levaduras con fenotipo neutro.

A pesar de que hubiera parecido lógico que en la segunda fase de selección sólo se incluyeran las cepas killer, el hecho de que el fenotipo dominante fuera el neutro, nos indujo

a no eliminar las 208 cepas que poseían este fenotipo. Además una cepa neutra es resistente a la acción de cepas salvajes killer y esto hace que no se encuentre en situación tan desfavorable como una cepa sensible.

Esta preselección se llevó a cabo mediante la realización de microfermentaciones sobre mosto sintético estéril con cada una de las cepas neutras. El análisis químico de estos vinos se utilizó como criterio discriminador en función de una serie de pautas de evidente interés enológico (Tabla 2).

Tabla 2: *Cepas Neutras eliminadas en base a diferentes criterios enológicos*

Criterios	Nº de cepas
Grado alcohólico inferior a 11% v/v	46
Acidez volátil superior a 0,7 g/l*	39
Fermentación superior a 15 días	34
Altura de espuma formada mayor a 1 cm	21

* Dato anormalmente elevado en fermentaciones de mosto de uva, pero normal en mosto sintético.

Entre los clones restantes que habían desarrollado fermentaciones normales, elegimos los nueve que mostraron mejor comportamiento: cuatro aislados caracterizados como variedad *bayanus*, por su facilidad de adaptación a medios donde exista etanol (Gerland y Vallart, 1993), y los cinco clones que produjeron mayor grado alcohólico, puesto que en nuestra Denominación de Origen hay zonas donde el mosto habitualmente posee un elevado grado alcohólico potencial, y para que la fermentación de estos mostos sea correcta son necesarias levaduras capaces de transformar totalmente los azúcares y en consecuencia producir grados alcohólicos altos.

Tabla 3: *Nomenclatura, origen y caracterización taxonómica de las 20 cepas de Saccharomyces cerevisiae seleccionadas*

Nombre	Variiedad	Fenotipo	Aislamiento	Origen
V.21	bayanus	killer	vino	La Grajera
V.22	cerevisiae	killer	vino	La Grajera
RA.63	cerevisiae	killer	vino	Aldeanueva
TA.32	cerevisiae	killer	a las 24 h. de encubado	Aldeanueva
SV.71	cerevisiae	killer	vino	San Vicente
RSV.45	cerevisiae	killer	fermentación tumultuosa	San Vicente
RSV.51	cerevisiae	killer	fermentación lenta	San Vicente
RSV.73	cerevisiae	killer	vino	San Vicente
GH.64	cerevisiae	killer	vino	Haro
TH.44	cerevisiae	killer	fermentación tumultuosa	Haro
TH.54	cerevisiae	killer	fermentación lenta	Haro
RA.54	bayanus	neutro	fermentación lenta	Aldeanueva
GH.21	bayanus	neutro	uva	Haro
GA.71	bayanus	neutro	vino	Aldeanueva
1.95	bayanus	neutro	fermentación tumultuosa	La Grajera
BT.5	cerevisiae	neutro	vino	La Grajera
3.22	cerevisiae	neutro	fermentación lenta	La Grajera
3.53	cerevisiae	neutro	fermentación lenta	La Grajera
1.94	cerevisiae	neutro	fermentación tumultuosa	La Grajera
1.55	cerevisiae	neutro	fermentación tumultuosa	La Grajera

Tras llevar a cabo la primera selección según el factor killer y la preselección sobre cepas neutras, el grupo de clones a estudiar quedó definitivamente compuesto por 20 aislados cuyo origen y características han quedado expuestos en la Tabla 3.

2.2.2. Estudio de la capacidad floculante

Se estudió mediante el test de Helm. En base a esta característica no pudimos eliminar ninguna de las 20 cepas puesto que todas poseen crecimiento disperso, característica necesaria para conseguir una masa fermentativa homogénea (Parish y Carroll, 1987).

2.2.3. Producción de ácido sulfhídrico

El análisis en placa sobre agar sulfito de bismuto mostró que todas las cepas forman este ácido con mayor o menor intensidad, siendo este resultado acorde con lo reflejado por Suzzi et al. (1975) en relación a que sólo un porcentaje muy bajo de cepas están exentas de generar este ácido.

Sin embargo en el análisis organoléptico de los vinos elaborados en mosto sintético con las 20 cepas, solamente tres mostraban claramente aromas sulfhídricos. Estas 3 muestras, TA.32, SV.71 y 1.55 fueron automáticamente eliminadas del grupo de levaduras en proceso de selección, puesto que la producción de estos compuestos provoca desviaciones aromáticas perjudiciales para la calidad.

2.2.4. Microvinificaciones en matraces de 100 ml

En esta etapa tratamos de estudiar el comportamiento fermentativo y refermentativo de las 17 cepas restantes en diferentes condiciones.

Para el estudio del comportamiento fermentativo se realizaron tres microvinificaciones diferentes con cada una de las cepas: la primera sobre mosto sintético, la segunda sobre mosto sintético adicionado con 3,3 g/l de ácido málico y 100 mg/l de anhídrido sulfuroso, a fin de estudiar la capacidad de degradación del ácido y la adaptación a esos niveles de antiséptico. Y finalmente la tercera microfermentación se realizó sobre mosto de uva esterilizado por filtración.

La capacidad refermentativa de cada cepa se estudió mediante dos ensayos de microfermentación sobre mosto sintético adicionado en la primera prueba con 7% v/v de etanol y la segunda añadiendo el 10%. Estos ensayos se realizaron para estudiar la posibilidad de utilizar estas cepas para refermentar vinos que por cualquier motivo hubieran quedado dulces. En todos los casos, la temperatura de fermentación fue de 20°C.

Los parámetros estudiados en las 5 microfermentaciones fueron: grado alcohólico, pH, acidez total, acidez volátil, ácido tartárico, ácido málico, ácido láctico, azúcares reductores, anhídrido sulfuroso libre y total, altura de espuma formada, glicerol, duración y velocidad de la fermentación.

Como resultado de los datos obtenidos, se seleccionaron las 7 cepas de levadura que mostraron un comportamiento enológico más adecuado y homogéneo en todas las experiencias.

2.3. Análisis químico y organoléptico de los vinos producidos

La fase final de selección sobre los 7 clones restantes se llevó a cabo mediante vinificaciones puras sobre mosto de uva en volúmenes superiores (5 litros), que permitieran un análisis químico exhaustivo de los vinos, así como análisis organoléptico de los mismos.

El mosto obtenido a partir de uvas de la variedad Tempranillo y esterilizado por filtración, tenía las siguientes características analíticas: 193 g/l de azúcares, lo que implica un futuro grado alcohólico aproximado de 11,4% v/v; pH, 3,23; acidez total, 7,41 g/L de ácido tartárico; ácido tartárico, 4,73 g/L; ácido málico, 3,27 g/L; SO₂ libre y total, 33/100 mg/L; y contenido en nitrógeno total de 478,8 mg/l.

2.3.1. Análisis químico

Los datos analíticos de los vinos elaborados se muestran en las Tablas 4 y 5.

Tabla 4: Resultados de los análisis físico-químicos en los vinos elaborados con las 7 cepas seleccionadas

Parámetros	Cepas						
	V.22	RSV.45	RSV.73	TH.44	TH.54	3.22	3.53
Densidad	0.9930	0.9940	0.9927	0.9930	0.9939	0.9936	0.9939
Grado alcohólico	11.80	11.55	11.60	11.60	11.65	11.60	11.65
Azúcares reductores	1.61	1.57	1.47	1.52	1.67	2.77	1.80
pH	3.30	3.25	3.28	3.27	2.27	3.33	3.29
Acidez total	7.13	7.34	7.45	7.10	7.06	7.39	7.31
Ácido tartárico	4.32	4.45	4.36	4.54	4.45	4.53	4.54
Acidez volátil	0.21	0.28	0.19	0.19	0.20	0.25	0.18
Ácido málico	2.18	2.27	2.03	2.13	1.94	2.22	2.21
Ácido D-láctico	0.106	0.155	0.170	0.167	0.153	0.125	0.162
Ácido L-láctico	0.031	0.017	0.016	0.017	0.019	0.022	0.020
Ácido succínico	0.295	0.413	0.432	0.433	0.455	0.280	0.377
Glicerol	4.01	4.47	4.46	3.80	4.72	3.96	4.03
SO ₂ libre y total	9/109	9/116	8/102	7/103	9/109	11/110	8/99

Tabla 5: Composición aromática de los vinos elaborados con las 7 cepas seleccionadas (mg/l)

Parámetros	Cepas						
	V.22	RSV.45	RSV.73	TH.44	TH.54	3.22	3.53
Etanal	54,5	55,7	45,5	45,5	52,6	57,9	53,4
Metanol	46,4	43,4	40,5	49,0	42,6	41,9	43,4
1-Propanol	24,7	35,1	30,5	32,2	31,7	31,7	35,9
Isobutanol	90,0	87,4	88,4	102,4	88,4	55,9	76,1
2-Metil 1-Butanol	14,2	17,0	17,0	17,0	16,6	14,2	14,2
3-Metil 1-Butanol	119,7	139,2	142,7	155,3	144,9	125,8	163,5
Alcoholes superiores	248,6	278,7	278,6	306,9	281,6	227,6	289,7
Acetato de etilo	30,0	51,0	33,3	43,4	35,4	31,6	42,6

Según se deriva de los análisis físico-químicos, todas las cepas mostraron un comportamiento similar. Destaca el mayor contenido en azúcares reductores del vino elaborado con la cepa 3.22, así como la menor producción de ácido succínico de las cepas V.22 y 3.22. Los clones V.22, TH.44, 3.22 y 3.53 producen cantidades de glicerol inferiores al resto de cepas. Todas las levaduras incrementan ligeramente el nivel de SO₂ total respecto al inicialmente añadido.

En cuanto a la composición aromática, las cepas V.22 y 3.22 son las que menor cantidad de alcoholes superiores ceden al vino y también las menos productoras de acetato de etilo, parámetros que producen características organolépticas negativas (Yang, 1975;

Suárez-Lepe, 1990). Las cepas 3.22 y 3.53 se caracterizan además por ser las que menos isobutanol comunican al vino tras la fermentación alcohólica, y la cepa V.22 por ser la menor formadora de propanol.

2.3.2. Análisis organoléptico de los vinos

Todo proceso de selección de levaduras se compone de una serie de estudios de las cepas en base a criterios tecnológicos y bioquímicos. Sin embargo el objetivo final siempre es que la levadura seleccionada autóctona sea capaz de producir un buen vino de calidad que mantenga la tipicidad propia de una región.

Por ese motivo los vinos obtenidos con las 7 cepas fueron sometidos a un examen organoléptico por un panel de 10 catadores expertos. En la Tabla 6 se muestran los resultados obtenidos. Como se puede observar, los vinos mejor valorados fueron los elaborados con las cepas V.22 y la 3.22, situándose el resto por detrás. El vino peor calificado fue el elaborado con la cepa TH.54.

Tabla 6: Calificación organoléptica de los vinos

Cepas	Calificación
V.22	22,5 (Muy bien)
RSV.45	27,0 (Bien)
RSV.73	28,8 (Bien)
TH.44	30,4 (Bien)
TH.54	42,0 (Bien)
3.22	23,4 (Bien)
3.53	28,5 (Bien)

Como resultado de este examen concluimos el proceso de selección eligiendo finalmente la cepa denominada V.22, porque además de ser la mejor calificada en la cata, posee un fenotipo killer respecto a la 3.22 que es neutra. Sin embargo esta última cepa queda reservada para futuros proyectos puesto que desde el punto de vista aromático se la calificó como excelente.

3. CONCLUSIONES

Como resultado de todo el proceso descrito, finalmente se ha seleccionado una cepa autóctona *Saccharomyces cerevisiae* variedad *cerevisiae*, llamada V.22. Esta cepa posee características fisiológicas y enológicas interesantes que se muestran a continuación:

- Fenotipo "killer"
- No floculante
- Baja productora de SH₂
- Elevada velocidad de fermentación
- Buena degradación de azúcares
- Baja productora de acidez volátil
- No espumógena
- Buena capacidad refermentadora
- Degrada aproximadamente el 30% del ácido málico en mosto de uva
- Producción moderada de glicerol
- Producción moderada de alcoholes superiores y etanal

4. BIBLIOGRAFÍA

- BAGOT, D., MEYER, J.P. y SCHAEFFER, A., 1989. Relation entre le métabolisme de souches de levures et la formation de mousse. *Rev. Fr. Oenologie*, (117), 5-13.
- B.O.E., 1981. *Métodos oficiales de Análisis de Productos Derivados de la Uva*. Métodos de análisis para vinos.
- BRAVO, F., 1991. Vinos higiénicos. Compuestos con actividad farmacológica formados en procesos biológicos incontrolados. *Vitivinicultura* (7), 26-31.
- BUSSEY, H., 1981. Physiology of killer factor in yeast. *Adv. Microbial Physiol.* (22), 93-112.
- CAILLET, M., 1991. Les nouvelles techniques de tirage. Levures agglomerantes. Production et application. *Le Vigneron Champenois*, (1), 27-39.
- DELFINI, C., 1992. Controllo microbiologico delle fermentazioni vinarie. *Vignevini*, (4), 17-30.
- DELFINI, C. y BARDI, L., 1990. La biotecnología aplicada a la enología y a los microorganismos del vino. *Vitivinicultura* (9), 32-38.
- DELTEIL, D., 1990. *Le levurage en oenologie*. Institut Cooperatif du vin. Doc 6/90.
- DIARIO OFICIAL DE LA CEE, 1990. *Métodos oficiales de análisis vinos*. Reglamento (CEE) N° 2676/90. 3 de Octubre de 1990.
- GAIA, P., 1992. I fermenti selezionati in enologia. *Vignevini* (7-8), 55-58.
- GERLAND, C. y VALLART, B., 1993. Le levurage. *Revue des oenologues* (69), 21-23.
- GUTIÉRREZ, A.R., 1994. *Selección de levaduras vínicas en la D.O.C. Rioja*. Tesis doctoral. Universidad del País Vasco.
- HIDALGO, M.P., 1989. *El factor killer en las fermentaciones realizadas por levaduras vínicas en bodegas pertenecientes a la Denominación específica "Vinos de Madrid"*. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- HIDALGO, P., 1992. Caracterización de levaduras de la Denominación de Origen "Vinos de Madrid", respecto a la presencia del factor killer. Influencia de parámetros enológicos. *XX Congreso Mundial de la Viña y el Vino*. Madrid (España).
- HOUTMAN, A.C. y DU PLESSIS, C.S., 1985. Influence du cépage et de la souche de levure sur la vitesse de fermentation et sur la concentration des composants volatils du vin. *Bull. O.I.V.*, (648-649), 235-246.
- LIPKA, Z. y TANNER, H., 1974. Une nouvelle méthode de dosage de l'acide tartrique dans les moûts, les vins et autres boissons (selon Rebelein). *Revue suisse de viticulture, arboriculture et horticulture*, VI (1), 5-10.
- PARISH, M.E. y CARROLL, D.E., 1987. Fermentation characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* isolates from *Vitis rotundifolia* grapes and musts. *Am. J. Enol. Vitic.*, Vol. 38 (1), 45-48.
- PETERING, J.E.; SYMONS, M.R.; LANGRIDGE, P. y HENSCHKE, A., 1991. Determination of killer yeast activity in fermenting grape juice by using a marked *Saccharomyces* wine yeast strain. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 57, (11), 3232-3236.
- RADLER, F., 1980. Les facteurs "killer" des levures. *Bull. L'O.I.V.* (593-594), 568-572.

- ROSINI, G., 1985. Effet d'une levure "killer" de *Saccharomyces cerevisiae* sur une souche de levure sensible de la même espèce, non productrice de H₂S et sélectionnée pour la vinification dans un milieu de culture mixte. *Bull. L'O.I.V.* (648-649), 214-217.
- STRYDOM, M., 1985. Caractérisation de quatorze souches de levures par leurs capacités de fermentation et par la composition et qualité du vin produit. *Bull. O.I.V.*, (648-649), 218-227.
- SUÁREZ-LEPE, J.A., 1990. Selección de levaduras vínicas. Criterios, conservación y biotecnología. *Vitivinicultura* (9), 23-30.
- SUZZI, G.; ROMANO, P. y ZAMBONELLI, C., 1985. *Saccharomyces* strain selection in minimizing SO₂ requirement during vinification. *Am. J. Enol. Vitic.*, Vol. 36, (3), 199-202.
- TIOURINA, L.V.; BOURJAN, N.I. y SKARIKOVA, T.K., 1980. Emploi des cultures pures du phénotype "killer" dans la fermentation des moûts de raisin. *Bull. L'O.I.V.* (593- 594), 573-576.
- VEZINHET, F., 1989. Obtention par recombinaison intragénomique de clones non-mousants a partir d'une souche de levure d'intérêt oenologique *Saccharomyces cerevisiae*. *Sciences des Aliments* (9), 253-265.
- VEZINHET, F. y PINEAU, J., 1990. Le levurage. *Progrès Agricole et Viticole*, 107 (9), 219-221.
- YANG, H.Y., 1975. Effect of sulfur dioxide on the activity of the *Schizosaccharomyces pombe*. *Am. J. Enol. Vitic.*, Vol. 26, (1), 1-4.