

LA ADICIÓN DE MATERIA NITROGENADA AL MOSTO DE UVA

ROSA LÓPEZ MARTÍN¹
PILAR SANTAMARÍA AQUILUÉ¹
SARA EPIFANIO¹
PATROCINIO GARIJO¹
ANA ROSA GUTIÉRREZ²

RESUMEN

Se ha estudiado la adición de materia nitrogenada en distintos mostos de uva y su efecto sobre la fermentación alcohólica (desarrollo y microorganismos presentes). Esta adición no dio lugar a modificaciones significativas en el desarrollo y resultado final de las distintas elaboraciones llevadas a cabo durante tres campañas consecutivas. Tampoco se han encontrado diferencias en la biodiversidad de las *Saccharomyces cerevisiae* presentes en las fermentaciones, ni en los clones dominantes en cada campaña. Estos resultados fueron independientes del nivel de nitrógeno en el mosto inicial y de las distintas cantidades añadidas, lo que parece indicar que la distribución de clones en el curso de la fermentación alcohólica es independiente del contenido en nitrógeno.

Palabras clave: fermentación alcohólica espontánea, nitrógeno fácilmente asimilable (NFA), *Saccharomyces cerevisiae*, paradas de fermentación.

In this paper the addition of nitrogen to different musts and their effect on alcoholic fermentation (development and microorganisms) has been studied. The addition didn't produced significant modifications on vinifications (development and result) during three consecutive vintages. No differences in Saccharomyces cerevisiae biodiversity have been detected. These results were independent of the nitrogen level in musts and of the nitrogen level added. These results showed that the distribution of Saccharomyces cerevisiae strains during alcoholic fermentation is independent of the nitrogen level.

Key words: spontaneous alcoholic fermentation, easily assimilable nitrogen, *Saccharomyces cerevisiae*, stuck fermentation.

0. INTRODUCCIÓN

Para que la fermentación alcohólica del mosto de uva se desarrolle sin dificultad, se necesita una cantidad mínima de nitrógeno en el medio, con el fin de que

1. Servicio de Investigación y Desarrollo Tecnológico de La Rioja (CIDA), Ctra. de Mendavia-Logroño (NA 134, km. 88), 26071, Logroño (La Rioja). Tel. 941291383. E-mail: microbiologia.cida@larioja.org.

2. Departamento de Agricultura y Alimentación (CCT), Universidad de La Rioja, C/Madre de Dios, 51 26006 Logroño, (La Rioja). Tel. 941299727. e-mail: ana-rosa.gutierrez@daa.unirioja.es.

las levaduras puedan formar sus estructuras celulares y reproducirse. En el mosto hay distintas fuentes de materia nitrogenada, pero las levaduras no tienen la misma afinidad por unas y otras. A la suma del ión amonio y los aminoácidos, a excepción de la prolina, se le denomina nitrógeno fácilmente asimilable (NFA), y constituye la principal fuente de materia nitrogenada utilizada por las levaduras. Los péptidos y las proteínas sólo son metabolizados excepcionalmente (Fleet y Heard, 1993). En general, se considera que la cantidad de NFA en el mosto inicial debe ser superior a 150 mg/l para lograr el correcto desarrollo de la fermentación (Blouin y Peynaud, 2004; Henschke y Jiranek, 1993; Suárez y col., 2003). Las necesidades de nitrógeno fácilmente asimilable se incrementan con el aumento de la concentración de azúcares en el mosto (Jiranek y col., 1995) y puede variar significativamente en función de la cepa de levadura, ya que algunas pueden necesitar hasta dos veces más cantidad de nitrógeno para fermentar el mismo mosto (Julien y col., 2001).

La deficiencia en NFA puede conducir a la disminución de la velocidad de la fermentación y a paradas precoces de la misma, ya que el nitrógeno se utiliza en la biosíntesis de las proteínas que participan en el sistema de transporte de los azúcares (Bell y Henschke, 2005). La falta de NFA en el mosto, también se ha relacionado con la producción de ácido sulfhídrico (SH₂), lo que incide negativamente en la composición aromática del producto final (Gagner y col., 2002).

En general, se considera que el mosto contiene cantidades suficientes de materia nitrogenada para desarrollar la fermentación sin problemas. Pero en ciertos casos (vendimias pobres en nitrógeno, mostos muy desfangados, mostos con elevada cantidad de azúcares) se recomienda la adición de sales amoniacales para garantizar su correcto desarrollo (Ribéreau-Gayon, 1999). El empobrecimiento del mosto en nutrientes nitrogenados producido por el desfangado en la elaboración de vinos blancos, hace que en la actualidad la mayoría de las bodegas que elaboran este tipo de vinos adicione sistemáticamente materia nitrogenada con el fin de evitar problemas de ralentizaciones o paradas de la fermentación. Sin embargo, un exceso de nitrógeno residual en el vino final, puede tener un impacto en la calidad aromática, en la estabilidad microbiológica y puede dar lugar a la acumulación de urea, molécula precursora del carbamato de etilo (Butzke, 1998).

La adición de materia nitrogenada a los mostos se realiza normalmente en forma de sales de amonio, cuya dosis está limitada en la Unión Europea (UE) a 30 g/Hl, cantidad que para algunos autores es insuficiente (Munoz y Ingledew, 1990; Ribéreau-Gayon, 1999). Otra cuestión es el momento en que debe realizarse la adición para que su efectividad sea máxima. Algunos autores recomiendan realizar la adición al comienzo de la fermentación (Castino y Stefano, 1990), otros aconsejan hacerlo en la fase estacionaria (Sablayrolles y col., 1996), y finalmente otros recomiendan dividir la adición en más de una vez (Hidalgo, 2003).

Este trabajo describe el efecto de la adición de materia nitrogenada en diferentes fermentaciones espontáneas llevadas a cabo durante tres campañas consecutivas. Además se estudia la influencia de la dosis empleada y del momento de la adición, sobre el desarrollo de la fermentación espontánea y sobre la población de levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae* presente.

1. MATERIALES Y MÉTODOS

Las fermentaciones se desarrollaron durante tres campañas consecutivas, en depósitos de acero inoxidable de 50 l de capacidad, con mostos procedentes de uva de la variedad blanca Viura obtenido mediante estrujado, prensado, desfangado y

sulfitado (50 mg/l). Se estudió la adición de materia nitrogenada en distintas cantidades y momentos de la elaboración. El compuesto utilizado para la adición fue fosfato diamónico (DAP).

El primer año se estudió la adición al mosto, antes del inicio de la fermentación, de distintas cantidades de DAP (15 y 30 g/Hl). El segundo año se estudió nuevamente la dosis de 30 g/Hl de difosfato amónico, pero la adición se realizó al final de la fase de crecimiento exponencial de las levaduras (descenso de tres unidades en el °Brix). El tercer año, se aumentó la dosis a 60 g/Hl de DAP, teniendo en cuenta la opinión de ciertos autores, que consideran insuficiente la dosis máxima permitida. También este año la adición se realizó al final de la fase de crecimiento exponencial de las levaduras.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado y la temperatura de fermentación en todos los casos se controló a 18°C.

El seguimiento de las fermentaciones, en todos los depósitos y en las distintas campañas, se realizó mediante medida diaria del °Brix (medida con refractómetro digital ATAGOdbx-30), del nitrógeno fácilmente asimilable (NFA) analizado mediante valoración con formol (Aerny, 1996), y recuento de levaduras viables. El recuento de las levaduras se realizó siguiendo la técnica de diluciones decimales sucesivas y siembra en placa. El medio utilizado fue Cloranfenicol-glucosa agar (Biokar Diagnostics, Beauvais, France). Las placas se incubaron en estufa a 25°C durante 48 horas. Se eligieron para el recuento las placas que contenían entre 30 y 300 colonias. En dos momentos de la fermentación (tumultuosa y final) se aislaron aleatoriamente 10 colonias de cada placa para su posterior identificación. Tanto la comprobación de la pertenencia de los aislados a la especie *Saccharomyces cerevisiae* como su caracterización a nivel clonal se realizó mediante el análisis de restricción del ADN mitocondrial (mtDNA) (Querol y Barrio, 1990; Gillamón, 1996). Los análisis microbiológicos se realizaron por triplicado sobre una muestra de 3 ml formada mediante la mezcla de 1 ml de mosto procedente de cada una de las tres repeticiones de cada ensayo. Los parámetros fisicoquímicos de los mostos y vinos se determinaron según los métodos oficiales de análisis de la U.E. (Diario Oficial de la CEE, 1990).

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El contenido de los mostos en NFA varió considerablemente de una campaña a otra, lo que permitió estudiar el efecto de la adición de materia nitrogenada en distintas condiciones iniciales (Tabla 1). El primer año el mosto presentaba un nivel de NFA suficiente, el segundo un contenido elevado, y el tercero un nivel inferior al mínimo recomendado. En todos los casos el contenido en azúcares del mosto fue similar.

TABLA 1.
COMPOSICIÓN ANALÍTICA DE LOS MOSTOS EN LAS TRES CAMPAÑAS ESTUDIADAS

PARÁMETROS	PRIMER AÑO	SEGUNDO AÑO	TERCER AÑO
Turbidez (NTU)	15	50	25
Azúcar (g/l)	189	193	201
pH	3.33	3.36	3.31
Ac. total (g/l ácido tartárico)	6.15	7.43	5.59
NFA (mg/l de N)	176	244	139

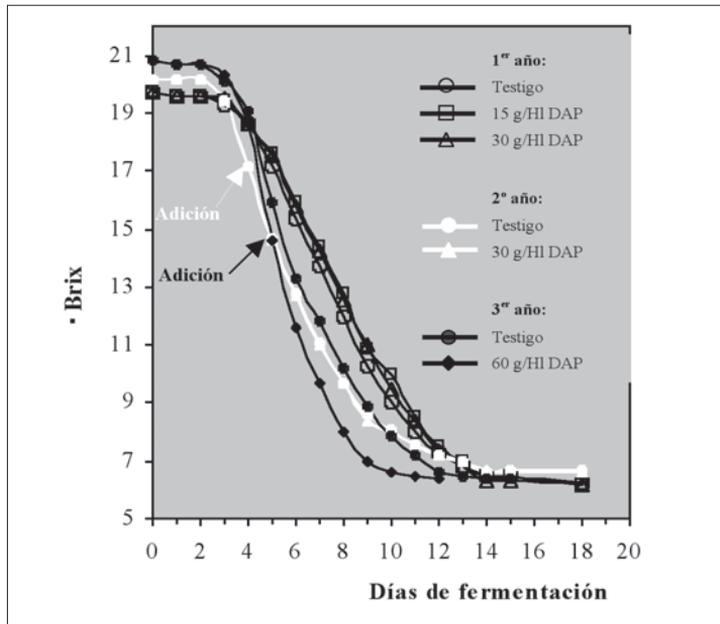


Figura 1.- Evolución de la fermentación alcohólica en elaboraciones realizadas con distintas adiciones de materia nitrogenada en diferentes campañas.

La adición de materia nitrogenada prácticamente no afectó al desarrollo de la fermentación alcohólica, como se observa en la Figura 1, donde se muestra la evolución del grado Brix en las tres campañas estudiadas. En los dos primeros años, la adición de DAP no supuso mejoría en el desarrollo de las fermentaciones, siendo únicamente de destacar que las realizadas con adición de nitrógeno dieron lugar a vinos ligeramente más secos (Tabla 2). Estos resultados se debieron probablemente, a que en estas campañas, la cantidad de NFA en el mosto era alta y suficiente para el correcto desarrollo de la fermentación, por lo que en estas condiciones, la adición de materia nitrogenada no supuso ninguna mejoría en el proceso fermentativo. En el tercer año, se observó una mejora en la velocidad de fermentación del ensayo con adición de DAP respecto al testigo. Sin embargo como se puede apreciar en la Figura 1, la mejora había comenzado antes de realizarse la adición. Así, ni la elevada dosis utilizada (el doble de la permitida legalmente), ni el momento de la adición parecen incidir directamente en esta mejora. A priori, las condiciones de esta campaña parecían las idóneas para comprobar el efecto beneficioso de la adición de nitrógeno, ya que la cantidad de NFA presente en el mosto (139 mg/l) es considerada insuficiente para el correcto desarrollo de la fermentación por la mayoría de autores consultados (Bely y col., 1990; Ribéreau-Gayon, 1999). A pesar de todo ello, tanto las elaboraciones testigo como las realizadas con adición de DAP del tercer año fueron las mejores en cuanto a duración y contenido final en azúcar, de todas las elaboraciones realizadas en las tres campañas (Tabla 2). Asimismo, todos los años, se observó un mayor contenido en nitrógeno residual en los vinos donde se habían realizado aportes de materia nitrogenada. Otros autores han señalado ya,

que mayores cantidades de NFA en el medio no están siempre relacionadas con mejores cinéticas de fermentación (Ough y col., 1991; Torija y col., 2003). Berger y col. (2000), consideran que el margen para que el nitrógeno presente en el medio pase de ser suficiente a ser limitante para las levaduras, es tan estrecho, que los primeros síntomas de estrés en las levaduras provocados por la falta de nitrógeno aparecerían de repente, y esto explicaría que fermentaciones con bajo contenido en nitrógeno se desarrollen con normalidad aunque se encuentren próximas a este punto crítico, siempre que no lleguen a alcanzarlo. La explicación, en última instancia, estaría en relación con la mayor habilidad de ciertas cepas para utilizar el nitrógeno disponible (Bisson y Butzke, 2000; Jiranek y col., 1995), ya que se ha comprobado que tanto los requerimientos en nitrógeno como la eficacia en su utilización es diferente en función de la cepa de levadura (Julien y col., 2000) y que esta diferencia entre cepas tiene una base genética (Poole y col., 2000).

TABLA 2.
PARÁMETROS DESCRIPTIVOS DE LAS FERMENTACIONES ESTUDIADAS

PARÁMETROS	PRIMER AÑO			SEGUNDO AÑO		TERCER AÑO	
	T	15 DAP	30 DAP	T	30 DAP	T	60 DAP
Duración (días)	19	19	19	18	18	15	12
Azúcar residual (g/l)	2.49	2.09	2.16	3.46	3.26	2.20	1.84
Nº máximo de levaduras (ucf ml ⁻¹ x 10 ⁶)	14.4	12.2	18	52	53	122	127
NFA residual (mg/l)	13	23	40	70	102	15	60

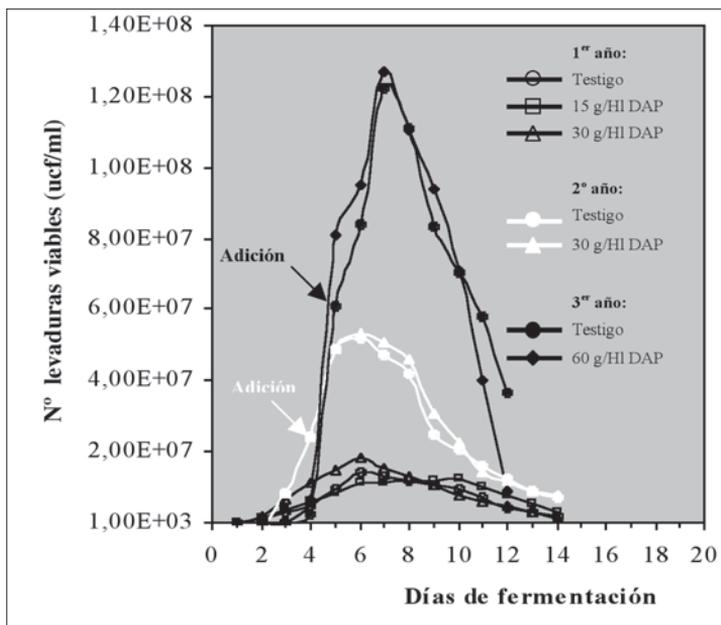


Figura 2.- Evolución de la población de levaduras en elaboraciones realizadas con distintas adiciones de materia nitrogenada en diferentes campañas.

En la Figura 2, se muestra la evolución de las poblaciones de levaduras en las distintas campañas y se señala el momento de las adiciones de DAP en el segundo y tercer año. En la primera vendimia se produjeron pequeñas diferencias en las poblaciones de levaduras que llevaron a cabo las fermentaciones, en el sentido de que fueron las fermentaciones realizadas con el mayor aporte de nitrógeno, las que se alcanzaron mayor número de levaduras viables, aunque este aumento no afectó a la cinética de fermentación. Como exponen Gagner y col., (2002) la asimilación de nitrógeno del medio no está necesariamente relacionada de forma proporcional con la formación de biomasa, ya que puede ser utilizada para aumentar la actividad fermentativa (Julien y col., 2000), o retenida en las vacuolas celulares como reservorio para su utilización a lo largo de la fermentación (Bisson, 1999). En esta primera campaña, se observó también que en las elaboraciones realizadas con aporte de 15 g/Hl de DAP, la población de levaduras viables al final de la fermentación fue mayor que en el resto de ensayos.

En el segundo año, la adición no parece lograr una mayor multiplicación de las levaduras, lo que concuerda con lo indicado por otros autores cuando la adición de materia nitrogenada se realiza en la fase estacionaria (Blateyron y col., 2000; Julien y col., 2000). En el tercer año, la adición de DAP, a pesar de su elevada dosis, tampoco supuso un aumento en la población de levaduras, como le sucediera a Grossmann y col., (2000). Estos autores observaron que la adición de DAP no tenía ningún efecto en algunas cepas de levadura, incluso con adiciones del 150% sobre el límite permitido. Cabe destacar que esta campaña, a priori deficiente en materia nitrogenada, se alcanzaron las poblaciones de levaduras más elevadas del conjunto de las tres campañas, al margen de la adición de nitrógeno realizada.

Al estudiar las levaduras aisladas en las fermentaciones de todos los ensayos realizados los tres años, se encontraron 29 perfiles de mtDNA diferentes que se corresponden con diferentes clones o cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (Guillamón, 1996), a excepción de uno de los clones hallados el primer año cuyo perfil no correspondió al típico para esta especie (clon XIV). En la Tabla 3 se recogen todos los patrones hallados en las diferentes campañas y tratamientos.

En la primera campaña, se encontraron 14 clones diferentes. En las elaboraciones testigo, los clones dominantes fueron el I, el IX y el X. Estos dos últimos repitieron su dominio en las adicionadas con 30 g/Hl. Sin embargo, fueron los clones II y III los que mayoritariamente dirigieron las fermentaciones adicionadas con 15 g/Hl. Hay que recordar que cuando se estudió la evolución del número de levaduras a lo largo de la fermentación (Figura 2), éstas elaboraciones ya mostraron un comportamiento ligeramente diferente al resto al final de la fermentación.

En las elaboraciones del segundo año, se encontraron 11 perfiles de DNAm diferentes. El clon XVI fue claramente dominante en todas las elaboraciones, tanto en las testigos como en las adicionadas con materia nitrogenada, y representó en todas ellas un mínimo del 50% de la población. La diversidad clonal en testigos y adicionados fue similar, con una media de 7 patrones distintos por elaboración.

En las elaboraciones del tercer año, se encontraron 6 perfiles de DNAm diferentes. En esta campaña se repite el esquema del año anterior: hubo un clon claramente mayoritario (clon VII) que representó más del 50% en todas las elaboraciones, tanto en las testigo como en las tratadas. La diversidad clonal tampoco mostró diferencias significativas, se encontraron 5 clones diferentes en el testigo y 4 en el ensayo con adición de materia nitrogenada.

TABLA 3.
FRECUENCIA DE APARICIÓN (%) DE LOS DISTINTOS PATRONES DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*
AISLADOS EN CADA CAMPAÑA. LOS DATOS SON LA MEDIA DE LA FERMENTACIÓN Y DE LAS
REPETICIONES.

PATRONES	PRIMER AÑO			SEGUNDO AÑO		TERCER AÑO	
	T	15 DAP	30 DAP	T	30 DAP	T	60 DAP
I	20	5	-	-	-	-	-
II	-	25	5	-	-	-	-
III	-	20	-	-	-	-	-
IV	10	-	5	-	-	-	-
V	5	5	10	-	-	-	-
VI	-	10	-	-	-	-	-
VII	-	5	-	-	-	55	80
VIII	5	5	10	-	5	-	-
IX	20	-	30	-	-	-	-
X	20	5	20	-	-	-	-
XI	-	10	5	-	-	-	-
XII	5	-	-	-	-	-	-
XIII	10	10	-	-	-	-	-
XIV*	5	-	15	-	-	-	-
XV	-	-	-	5	-	-	-
XVI	-	-	-	65	50	-	-
XVII	-	-	-	5	-	-	-
XVIII	-	-	-	5	-	-	-
XIX	-	-	-	-	10	-	-
XX	-	-	-	10	10	-	-
XXI	-	-	-	5	-	-	-
XXII	-	-	-	5	5	-	-
XXIII	-	-	-	-	5	-	-
XXIV	-	-	-	-	15	-	-
XXV	-	-	-	-	-	5	-
XXVI	-	-	-	-	-	15	-
XXVII	-	-	-	-	-	20	10
XXVIII	-	-	-	-	-	5	5
XXIX	-	-	-	-	-	-	5
Nº de clones diferentes	9	10	8	7	7	5	4

* levadura no-*Saccharomyces*

Las ligeras diferencias encontradas en los clones de *Saccharomyces cerevisiae* presentes en cada ensayo no se pudieron relacionar con el aporte de materia nitrogenada. Similares resultados fueron obtenidos por Granchi y col. (2003) que comprobaron que la limitación de NFA no es suficiente para incidir en la diversidad genética de las levaduras presentes en la fermentación espontánea. En trabajos anteriores se ha señalado que el requerimiento en nitrógeno y la eficiencia en la asimilación del mismo están claramente ligados a la cepa de levadura (Jiranek y col., 1995; Julien y col., 2001), lo que podría llevar a una selección de las cepas presentes en función de la disponibilidad de nitrógeno inicial y de la tasa de agotamiento de este compuesto a lo largo de la fermentación. En nuestros ensayos, no se ha podido comprobar este efecto, ya que tanto cuando el nitrógeno ha estado presente en exceso (segundo año) como cuando ha sido deficiente (tercer año), la distribución de clones mayoritarios de elaboraciones testigo y con adición de materia nitrogenada ha sido similar.

Al comparar los perfiles de restricción del mtDNA de las tres vendimias estudiadas no se encontró ningún patrón común a las tres (Tabla 3). Los únicos patrones hallados en más de una campaña fueron el VII y el VIII que aparecieron en dos años distintos cada uno. El clon VII, se encontró solamente el primer año estudiado en las elaboraciones con adición de 15 g/Hl de DAP con una presencia mínima (5%). Sin embargo, en la tercera campaña fue el clon mayoritario con una frecuencia superior al 50%. En el segundo caso, el clon VIII, estuvo presente en todas las elaboraciones realizadas el primer año en porcentaje variable del 5% al 20% y cuando reapareció al año siguiente, lo hizo con una frecuencia del 5%.

Estos resultados mostraron, por tanto, la falta de influencia de la adición de materia nitrogenada sobre la distribución y frecuencia de los clones mayoritarios de *Saccharomyces cerevisiae*, ya que no se pudo encontrar una relación entre tratamiento y presencia de clones en la fermentación.

3. CONCLUSIONES

La adición de nitrógeno amoniacal, añadido al mosto antes de comenzar la fermentación o una vez iniciada ésta, incluso cuando la dosis empleada fue superior al límite legal, no dio lugar a modificaciones significativas en el desarrollo y resultado final de las distintas fermentaciones llevadas a cabo durante tres campañas.

El escaso efecto de las distintas adiciones de materia nitrogenada sobre los parámetros del proceso fermentativo, constatada en estos ensayos, podría deberse a que los mostos de partida presentaban una concentración en materia nitrogenada suficiente para un correcto desarrollo de la fermentación alcohólica por lo que, en estas condiciones, el aporte de nitrógeno no supuso ninguna mejora en la cinética fermentativa ni en el número de levaduras. Por otra parte, la mayor o menor disponibilidad de nitrógeno, tampoco influyó en la variabilidad clonal (número de clones diferentes) ni en su distribución en las distintas fermentaciones realizadas.

Por lo tanto, la adición sistemática de nitrógeno en mostos, como práctica para mejorar el desarrollo de las elaboraciones en virgen, puede no suponer ninguna mejora y sí un riesgo debido a la acumulación de nitrógeno residual en los vinos, ya que el exceso de estos compuestos supone una disminución de la estabilidad microbiológica.

4. BIBLIOGRAFÍA

- Aerny, J., 1996. Composés azotés des moûts et des vins. *Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hortic.* (28), 161-165.
- Bely, M., Sablayrolles, J.M., Barre, P., 1990. Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in enological condition. *J. Ferment. Bioeng.* (70), 246-252.
- Bell, S.J., Henschke, P.A., 2005. Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research.* (11), 242-295.
- Berger, S., Fardossi, A., Eder, R., 2000. *Yeast convertible nitrogen in must influence on alcoholic fermentation and wine quality. Inoculation rate and nutritional aspects.* Symposium Lallemand, Austria. 73-75.
- Bisson, L., 1999. Stucks and sluggish fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 50 (1), 107-119.
- Bisson, L., Butzke, C. E., 2000. Diagnosis and rectification of stuck and sluggish fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 51 (2), 168-177.
- Blateyron, L., Julien, A., Sablayrolles, J.M., 2000. *Stuck fermentations. Oxygen and nitrogen requirements. Importance of optimizing their addition. Inoculation rate and nutritional aspects.* Simposium Lallemand. Austria. 7-13.
- Blouin, J., Peynaud, E., 2004. *Enología práctica. Conocimiento y elaboración del vino.* Ed. Mundi-Prensa. 4ª Edición.
- Butzke, C. E., 1998. Survey of yeast assimilable nitrogen status in musts from California, Oregon and Washington. *Am. J. Enol. Vitic.* 49 (2), 220-224.
- Castino, M., Stefano, R., 1990. El empleo de coadyugantes a base de celulosa para favorecer el desarrollo de las fermentaciones. *Vitivinicultura.* (10), 59-64.
- Diario Oficial de la CEE, 1990. *Métodos oficiales de análisis de vinos.* Reglamento CEE, nº 2676/90.
- Fleet, G. H., Heard, G. M., 1993. *Yeast. Growth during fermentation. Wine microbiology and biotechnology.* Graham H. Fleet (Ed.). Harwood Academic Publisher. Switzerland. 27-54.
- Gagner, J., Poole, K., Jiranek, V., 2002. Practical significance of relative assimilable nitrogen requirements of yeast: a preliminary study of fermentation performance and liberation of H₂S. *Australian Journal of Grape and Wine Research.* (8), 175-179.
- Granchi, L., Ganucci, C., Giovannetti, L., Vizenzini, M., 2003. *Saccharomyces cerevisiae* biodiversity in spontaneous commercial fermentation of grape musts with adequate and inadequate assimilable nitrogen content. *Letters in Applied Microbiology.* (36), 54-58.
- Grossmann, M., Hagemann, O., Sponholz, W.R., Rauhut, D., Glowacz, E., Löhnertz, O., 2000. *Diversity nutritional demands of commercial sparkling yeasts to ensure accuracy of second fermentation. Inoculation rate and nutritional aspects.* Symposium Lallemand. Austria. 21-26.
- Guillamón, J. M., 1996. *Estudio ecológico de la fermentación alcohólica mediante la utilización de marcadores moleculares.* Tesis, Universidad de Valencia.

- Henschke, P.A., Jiranek, V., 1993. *Yeast. Metabolism of nitrogen compounds. Wine microbiology and biotechnology*. Graham H. Fleet (Ed.). Harwood Academic Publisher. Switzerland. 2º Edición. 77-164.
- Hidalgo, J., 2003. *Tratado de enología*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
- Jiranek, V., Langridge, P., Henschke, P. A., 1995. Amino acids and ammonium utilization by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts from a chemically defined medium. *Am. J. Enol. Vitic.* 46 (1), 75-83.
- Julien, A., Roustan, J.L., Dulau, L., Sablayrolles, J.M., 2000. Comparison of nitrogen and oxygen demands of enological yeasts: Technological consequences. *Am. J. Enol. Vitic.* 51(3), 215-222.
- Julien, A., Roustan, J.L., Dulau, L., Sablayrolles, J.M., Palacios, A., Navascués, E., 2001. Variabilidad en las necesidades de oxígeno y nitrógeno asimilable en función de las cepas de levadura enológicas. *Viticultura y Enología Profesional*. (76), 39-42.
- Munoz, E., Ingledew, W.M., 1990. Yeast hulls in wine fermentation. A review. *Journal of wine research*. 1(3), 197-209.
- Ough, C. S., Huang, Z., Stevens, D., 1991. Amino acid uptake by four commercial yeasts at two different temperatures of growth and fermentation effects on urea excretion and reabsorption. *Am. J. Enol. Vitic.* 42 (1), 26-40.
- Poole, K., Gagner, J., Wenk, M., Barros, M., Jiranek, V., 2000. *New strategies for fermenting low nitrogen musts: bne mutants and proline-utilising strains. Inoculation rate and nutritional aspects*. Symposium Lallemand. Austria. 15-20.
- Querol, A., Barrio, E., 1990. A rapid a simple method for the preparation of yeast mitochondrial DNA. *Nucl. Acids Res.* (18), 1657.
- 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.
- Sablayrolles, J. M., Salmon, J. M., Barre, P., 1996. Carences nutritionnelles des moûts. Efficacité des ajouts combinés d'oxygène et d'azote ammoniacal. *R.F.O.E.* (159), 25-32.
- Suárez, C., Palacios, A., Santiago, L., Santamaría, P., López, R., Gutiérrez, A. R., 2003. Efecto del uso de levaduras inactivas en las paradas de fermentación. Influencia de los ácidos grasos en el desarrollo de la fermentación alcohólica. *La Semana Vitivinícola*. (2990), 4134-4140.
- Torija, M.J., Beltran, G., Novo, M., Poblet, M., Rozès, N., Guillamón, J.M., Mas, A., 2003. Effect of the nitrogen source on the fatty acid composition of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology*. (20), 255-258.