

ORIGINAL

Producción de sulfhídrico por parte de la levadura durante la fermentación alcohólica: mecanismos y mitigación

Por Matthew Dahabieh, Jessica Swanson, Eleni Kinti y John Husnik.

Renaissance BioScience Corporation, Vancouver (Columbia Británica, Canadá).

Los avances en la comprensión del mecanismo genético de la producción de sulfhídrico por parte de la levadura han conducido recientemente al desarrollo de una serie de levaduras no transgénicas que inhiben la formación del «gas de los huevos podridos». Estas cepas permiten a los enólogos evitar la formación de H₂S para no depender de las medidas paliativas.

El sulfhídrico (H₂S) es un compuesto organosulfurado volátil y reactivo químicamente, habitual en las bebidas alcohólicas fermentadas como el vino, la sidra, la cerveza, el sake, los aguardientes, etc...¹ En conjunto, el H₂S y sus derivados (principalmente el etilmercaptano o etanotiol y el dietil disulfuro) confieren al vino una característica «reductora» que se suele describir como aroma de huevos podridos, ajo o goma quemada³. Aunque existen varios métodos para mitigar el efecto del H₂S, su elevado potencial aromático (detección en ~2 ppb)⁴ indica que, incluso a concentraciones muy bajas, puede influir negativamente en la percepción sensorial del vino. Si no se toman medidas, o si las concentraciones son demasiado elevadas para que dichas medidas resulten eficaces, la contaminación por H₂S puede echar a perder el vino por completo^{3,5}.

Los métodos convencionales de disipación del H₂S tras la fermentación incluyen el aireado, el arrastre mediante gas inerte, el precipitado por sulfato cúprico y el mezclado⁶ (blending). Aunque estos métodos pueden ser eficaces, también acarrear gastos secundarios, así como problemas de calidad y eficiencia⁷. Por ejemplo, las técnicas de disipación del H₂S tras la fermentación no tienen un mecanismo específico, esto es, a la vez que eliminan el H₂S, también pueden eliminar otros compuestos aromáticos y volátiles como los ésteres, los tioles y los terpenos, muchos de los cuales pueden ser deseables. Además, los métodos paliativos convencionales eliminan el H₂S después de su formación, por lo que aún pueden surgir problemas asociados a sus derivados del (mercaptanos y disulfuros)^{2,8}, que tienen un umbral sensorial inferior al del H₂S y no son fáciles de eliminar⁹.

Hasta hace poco, el único método [semi]preventivo para paliar la producción de H₂S por parte de la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) durante la fermentación eran los



Las levaduras para vino con inhibición de la producción de sulfhídrico de Renaissance Yeast están disponibles comercialmente en cinco cepas para tinto y para blanco, así como en una cepa con la calificación de orgánica emitida por la USDA para la producción orgánica de vinos tinto, blanco y de frutas, así como sidra.

suplementos nutritivos. De hecho, es sabido que la reducción del nitrógeno (en especial los aminoácidos serina, ácido aspártico, cisteína y metionina) y de las vitaminas (en concreto, el ácido pantoténico) potencian la

capacidad de las levaduras de producir H_2S ^{1,10,11}. Sin embargo, existen otros factores determinantes en el volumen de H_2S que producirá una determinada cepa de levadura. Entre ellos se encuentran los niveles elevados de azufre elemental en el mosto y/o en el viñedo¹², los niveles elevados de dióxido de azufre (SO_2) durante la fermentación¹⁵ y la presencia de compuestos precursores organosulfurados¹⁶. Además de estas variables ambientales que afectan a la producción de H_2S , las diferencias genéticas entre cepas de levadura indican la reacción de cada cepa ante dichas variables. De hecho, los estudios realizados en diversas cepas de levadura indican que, aunque todas producen H_2S en mayor o menor medida, existen grandes diferencias en la cantidad producida. Además, incluso en las fermentaciones bien alimentadas, esto es, las que reciben suficiente nitrógeno y vitaminas, muchas cepas de levadura siguen produciendo H_2S ¹⁶⁻¹⁹.

En líneas generales, el H_2S se forma como producto derivado del metabolismo de la levadura durante la fermentación alcohólica primaria^{3,5}. En concreto, el ion sulfuro (S^{2-}), que forma el H_2S cuando sale de la célula para entrar en el entorno ácido del vino²⁰ se forma como molécula intermedia en la vía de la secuencia de reducción del sulfato (Figura 1). Esta vía es responsable de la capacidad de la levadura de utilizar el azufre para producir los aminoácidos con contenido de azufre (cisteína y metionina) necesarios para el crecimiento^{1,12}. En resúmenes cuentas, el sulfato (SO_4^{2-}) exógeno del mosto entra en la célula, donde se reduce mediante una serie de pasos enzimáticos para formar el sulfito (SO_3^{2-}) y después se sigue reduciendo hasta el sulfuro (S^{2-}). A continuación, la célula utiliza este sulfuro como fuente de azufre para la producción de homocisteína y cisteína, así como diversos compuestos derivados del bioproceso con contenido de azufre, como la metionina, el Met-tARN, la S-adenosilmetionina (SAM), el glutatión, etc.¹⁹

Sin embargo, cuando las condiciones ambientales provocan un desequilibrio entre la producción de sulfuro y su utilización, como se explica arriba, el exceso de sulfuro sale de la célula y entra en el vino, donde forma H_2S y lo deteriora.

La comprensión de la base genética de la formación de H_2S , así como la observación de que determinadas cepas de levadura no producen H_2S o producen muy poco durante la fermentación, sirvieron de fundamento a la idea de que se pueden emplear cepas de levadura, tanto naturales como modificadas, como herramienta para evitar la contaminación por H_2S del vino. Recientemente se ha desarrollado una serie de cepas comerciales no transgénicas para la producción de vino que reducen o evitan la formación de H_2S , cada una basada en una tecnología genética diferente.

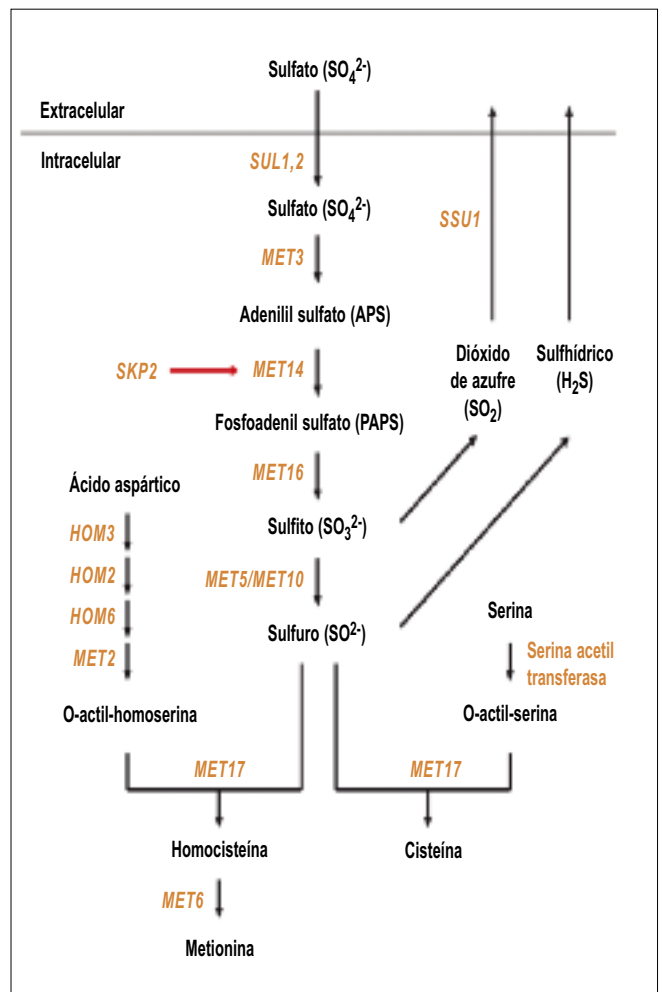


Figura 1. Vía de secuencia de reducción del sulfato (SRS) en *S. cerevisiae*. Adaptado de Wang et al¹⁰. Los compuestos metabólicos se muestran en negro; los genes en los que se codifican las enzimas relevantes se muestran en rojo.

TECNOLOGÍA 1: MET2/SKP2 – JN17

Se ha determinado la participación de numerosos genes involucrados en el metabolismo del azufre en la propensión de la levadura a producir H_2S . Los más notables de esos genes participan directamente en la conversión enzimática del sulfato en sulfuro (MET2, MET3, MET5, MET6, MET10, MET14, MET17, MET16 y CYS4)²²⁻²⁷. Sin embargo, otros genes, como los que toman parte en la regulación y la estabilización de las enzimas de la vía de SRS (MET4 y SKP2), también pueden desempeñar un papel en la producción de H_2S ²⁸. Estos datos, en conjunto, apuntan a que este carácter biológico depende de diversos mecanismos genéticos que pueden interactuar de forma compleja.

Para empezar a resolver esta interacción, Nobel et al. realizaron recientemente un análisis de locus de carácter cualitativo (QTL) de dos cepas de levadura para vino: una

de producción elevada de sulfito (JN10) y otra de producción baja (JN17)²⁹. QTL es una herramienta de análisis de ligamientos que abarca todo el genoma y permite a los investigadores examinar la contribución y la interacción de diversos genes a caracteres multigénicos complejos, como la producción de sulfuro. Así, Nobel et al. lograron cartografiar las versiones de los genes MET2 y SKP2 responsables de la producción de H₂S en la cepa de sulfito elevado JN10. Con el fin de desarrollar un producto comercial, los autores emplearon a continuación técnicas de mejora y selección genéticas para trasladar las versiones de MET2 y SKP2 con baja producción de sulfito de la levadura JN17 a la JN10, de elevada producción de sulfito. Esto permitió a los autores sustituir los genes MET2 y SKP2 de JN10 y, con ello, reducir su propensión a formar H₂S, SO₂ y acetaldehído. En la actualidad, esta nueva cepa de levadura está disponible comercialmente y se distribuye como cepa general para «vinos rosados, blancos y tintos jóvenes, frescos y aromáticos».

TECNOLOGÍA 2: MET5/MET10 – PDM

Como se ha explicado anteriormente, la vía de SRS convierte el sulfato en sulfito y después en sulfuro. La sulfito reductasa, una enzima heterodimérica codificada en MET5 y MET10, actúa de catalizador en la principal etapa enzimática de formación del H₂S²¹, y se ha observado una correlación positiva entre la producción de H₂S y la actividad de la sulfito reductasa³⁰.

Dada la relación entre la sulfito reductasa y el H₂S, Cordente et al. lograron emplear métodos de mutagénesis y selección químicas para aislar variantes con baja producción de H₂S de la levadura para vino PDM³¹. La caracterización genética de estas variantes confirmó que diversas mutaciones individuales de los aminoácidos dentro de MET5 y de MET10 eran causantes de la baja propensión de la cepa a formar H₂S. Un análisis de los parámetros químicos básicos del vino elaborado, que incluía el azúcar residual, el glicerol, el ácido acético y el SO₂, indicó que las cepas mutagenizadas eran similares al PDM precursor excepto en lo tocante al SO₂, mucho mayor en algunas de las cepas mutantes³¹. Varias de estas cepas nuevas, todas derivadas de PDM, se pueden obtener comercialmente. Se distribuyen como cepas comerciales «idóneas para todos los tipos de uva y estilos de vino», recomendadas para la producción de «vinos afrutados con una contribución mínima de la levadura».

TECNOLOGÍA 3: MET10 – UCD932

Se ha demostrado la importancia de la subunidad MET10 de sulfito reductasa a la hora de determinar cuánto H₂S produce cada cepa de levadura. De hecho, se ha establecido que numerosas mutaciones de MET10 modifican su actividad, con lo que reducen los niveles de H₂S^{31,32}. Además, una criba de todo el genoma de la levadura

identificó el MET10 como uno de los cuatro genes que, si se borran, eliminan la producción de H₂S²⁷.

En un intento de identificar las cepas de producción baja de H₂S, dos cribas independientes identificaron una cepa aislada de los viñedos italianos, UCD932, cuya producción de H₂S es indetectable^{17,19}. El análisis genético de UCD932 identificó una sola mutación de aminoácidos en MET10 que tiene como resultado su característica incapacidad para producir H₂S durante la fermentación⁷. La caracterización adicional indica que la versión de MET10 de la cepa UCD932 no afecta a su capacidad de sintetizar la metionina, ni altera su velocidad de fermentación ni otros factores⁷. Con el fin de desarrollar un producto comercial, los investigadores emplearon técnicas de mejora y selección genéticas para trasladar la versión de MET10 que inhibe la producción de H₂S de UCD932 a varias cepas de levadura para viticultura. Al sustituir la versión de MET10 de otra cepa por la de UCD932 se crea una nueva cepa con inhibición de la producción del H₂S. En la actualidad se comercializan diversas cepas de levadura para blancos y tintos que previenen la formación de mediante la tecnología MET10–UCD932. Cada una de ellas se desarrolla y distribuye para una aplicación concreta, como blanco en general, blanco aromático, blanco limpio, tinto en general, tinto con cuerpo, pinot noir y vino orgánico.

OBJETIVO

Los recientes avances en la comprensión del genoma de la levadura y el metabolismo del azufre han conducido recientemente al desarrollo de una serie de levaduras con producción baja o nula de H₂S. Para comparar el rendimiento de estas cepas realizamos fermentaciones de mosto de uvas chardonnay y evaluamos su cinética de fermentación, su producción de H₂S y SO₂ y su acidez volátil (ácido acético). En todos esos ensayos comparamos las cepas con producción baja o nula de H₂S con EC1118 (una cepa muy empleada en viticultura) y Montrachet 522 (una cepa habitual que produce elevados niveles de H₂S).

MÉTODOS EXPERIMENTALES

Se rehidrataron levaduras secas activas comerciales adecuadas para la producción de vino (esto es, en el estudio no se evaluaron cepas específicas para vino tinto) y se inocularon en fermentaciones de 300 mililitros de mosto con pasteurización HTST de chardonnay australiano (Brix 21,1°, YAN 182 g/l, SO₂ total 28 ppm, SO₂ libre 5,76 ppm) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las fermentaciones se incubaron a 21,5 °C durante 15 días y la cinética se controló según la pérdida de CO₂. El H₂S se midió con tubos de detección de gases de precisión Sensidyne H₂S (0,75-300 ppm tubo núm. 120SB, 25-2000 ppm tubo núm. 120SF) acoplados a los recipientes de fermenta-

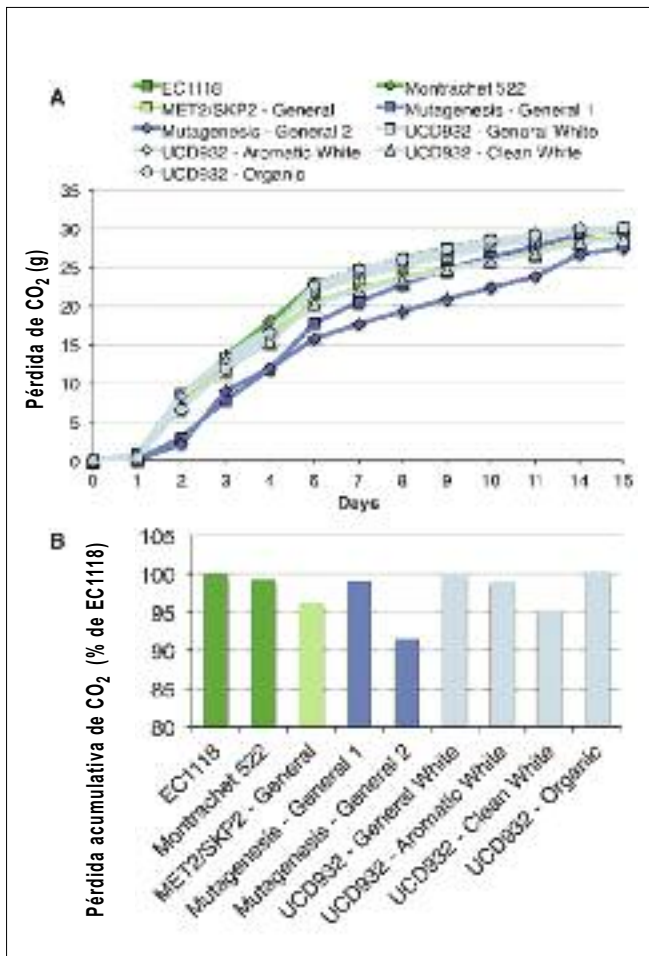


Figura 2. Análisis cinético de la fermentación. Se realizaron fermentaciones a escala de laboratorio (300 ml) de mosto de uvas chardonnay (Brix 19,9°, YAN 182 g/l, SO₂ total 28 ppm, SO₂ libre 5,76 ppm) a 21,5 °C durante 15 días. La cinética de la fermentación se midió por la pérdida de masa de CO₂. A) Cinética de la fermentación a lo largo del proceso. B) Pérdida acumulada de CO₂ en relación con EC1118 al final de la fermentación.

ción. El SO₂ total se midió por yodometría (A17 revisado por 377/2009). Método: OIV-MA-AS323-04B. El ácido acético se midió con el método enzimático manual de punto de equivalencia AK/PTA (Megazyme International, Irlanda, 2015, K-ACETRM 06/15).

RESULTADOS

Como se muestra en la Figura 2, la mayoría de las cepas con producción baja o nula de H₂S fueron capaces de completar la fermentación en 15 días. Las cepas UCD932-General White, UCD932-Aromatic y UCD932-Organic mostraron una cinética comparable a la de las cepas convencionales EC1118 y Montrachet 522 (Figura 2A). Cabe destacar que las dos cepas derivadas de la mutagénesis (General 1 y General 2) fueron entre uno y dos días más lentas que las demás. General 2 solo había alcanzado el 92 % de la pérdida de CO₂ del EC1118 de control dentro

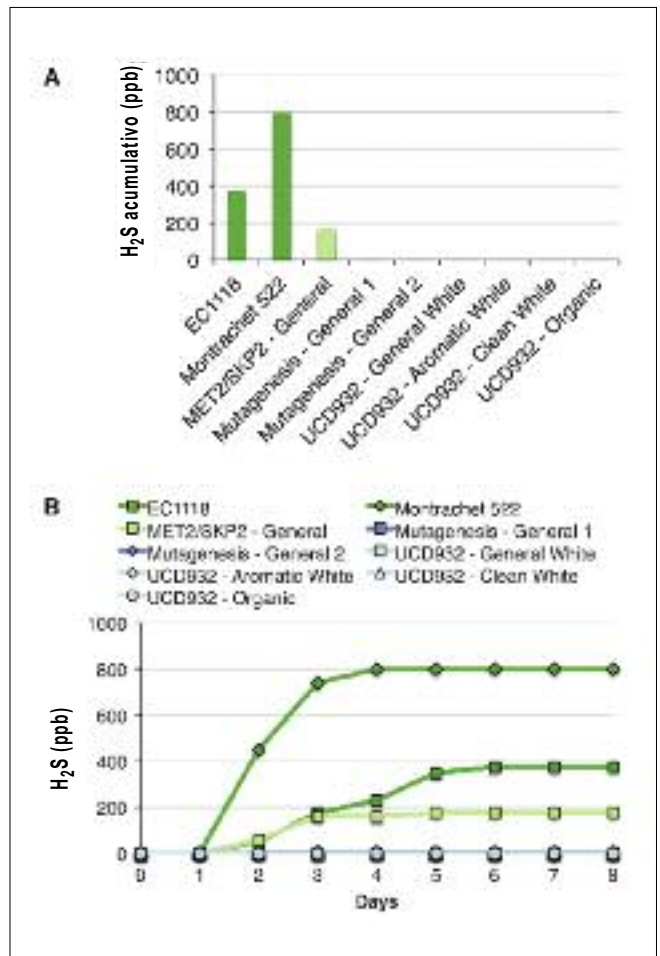


Figura 3. Análisis de la producción de H₂S. Se realizaron fermentaciones a escala de laboratorio (300 ml) de mosto de uvas chardonnay (Brix 19,9°, YAN 182 g/l, SO₂ total 28 ppm, SO₂ libre 5,76 ppm) a 21,5 °C durante 15 días. La producción de H₂S se midió con tubos de detección de gases de precisión Sensidyne H₂S acoplados a los recipientes de fermentación. A) Producción acumulada de H₂S medida al final de la fermentación. B) Cinética de la producción de H₂S los ocho primeros días de fermentación.

del plazo de fermentación de 15 días (Figuras 2A y 2B). A continuación examinamos la producción de H₂S por parte de la levadura durante las fermentaciones (Figura 3). Tal como se esperaba, las cepas convencionales EC1118 y Montrachet 522 produjeron cantidades significativas de H₂S: 375 y 800 ppb respectivamente (Figura 3A). Además, estas levaduras produjeron H₂S en etapas tempranas de la fermentación: entre dos y seis días después de la inoculación (Figura 3B). En contraposición, las levaduras con producción baja o nula de H₂S, en su mayoría, no produjeron H₂S detectable a lo largo de la fermentación (Figuras 3A y 3B). Sin embargo, sorprendentemente, la cepa MET2/SKP2-General produjo 175 ppb de H₂S entre el segundo y el quinto día de fermentación (Figuras 3A y 3B).

Dada la interacción entre el H₂S y el metabolismo del azufre, se ha observado que algunas cepas con produc-

ción baja o nula de H₂S el resultado es una producción elevada de SO₂^{22-24,31}. Aunque la producción de SO₂ por parte de la levadura puede resultar útil con vistas a la estabilidad microbiana del vino, su exceso es perjudicial, ya que un nivel elevado de SO₂ inhibe notablemente la fermentación maloláctica, deteriora la percepción sensorial del vino y puede sobrepasar los límites legales en algunos mercados. Para determinar si alguna de las cepas con producción baja o nula de H₂S producía un exceso de SO₂ medimos los niveles totales de SO₂ al final de la fermentación (Figura 4A). En comparación con las cepas convencionales EC1118 y Montrachet 522, todas las cepas con producción baja o nula de H₂S, con excepción de Mutagenesis–General 1, produjeron volúmenes de SO₂ comparables (20 ppm aproximadamente). En contraposición, la cepa Mutagenesis–General 1 produjo cantidades significativas de SO₂ (79 ppm) (Figura 4A).

Además de H₂S y SO₂, las levaduras producen ácido acético en respuesta al desequilibrio de nutrientes y el estrés. Un exceso de ácido acético (>0,8 g/l) puede tener como resultado niveles elevados de acidez volátil, que influyen negativamente en la calidad del vino y pueden sobrepasar los límites legales en algunos mercados³³. Para determinar si alguna de las cepas con producción baja o nula de H₂S producía un exceso de acidez volátil medimos los niveles de ácido acético al final de la fermentación (Figura 4B). En comparación con las cepas convencionales EC1118 y Montrachet 522, todas las cepas produjeron cantidades similares de acético entre los 0,5-0,65g/l. (Figura 4B). Sin embargo, una cepa, Mutagenesis–General 1 mostró niveles elevados de ácido acético (0,86 g/l) (Figura 4B).

ANÁLISIS Y CONCLUSIÓN

El reciente desarrollo de cepas de levadura con producción baja o nula de H₂S es una excelente noticia para los enólogos. Estas cepas, surgidas de la profundización en la comprensión de los mecanismos genéticos asociados al metabolismo del azufre por parte de la levadura, pueden limitar o evitar la producción de H₂S durante la fermentación. Así, estas cepas permiten a los vinicultores evitar la formación de H₂S en vez de concentrarse en las medidas paliativas. Sin embargo, para resultar útiles en la industria vinícola, las cepas de levadura con producción baja o nula de H₂S deben tener un rendimiento comparable al de las cepas convencionales en una serie de características clave.

En el presente estudio se ha evaluado el rendimiento de una serie de cepas con producción baja o nula de H₂S derivadas de tres tecnologías genéticas distintas: 1) cartografía y mejora genéticas de variantes de MET2/ SKP2; 2) mutagénesis y selección de variantes de MET5/MET10, y 3) mejora y selección de MET10-UCD932. Para ello

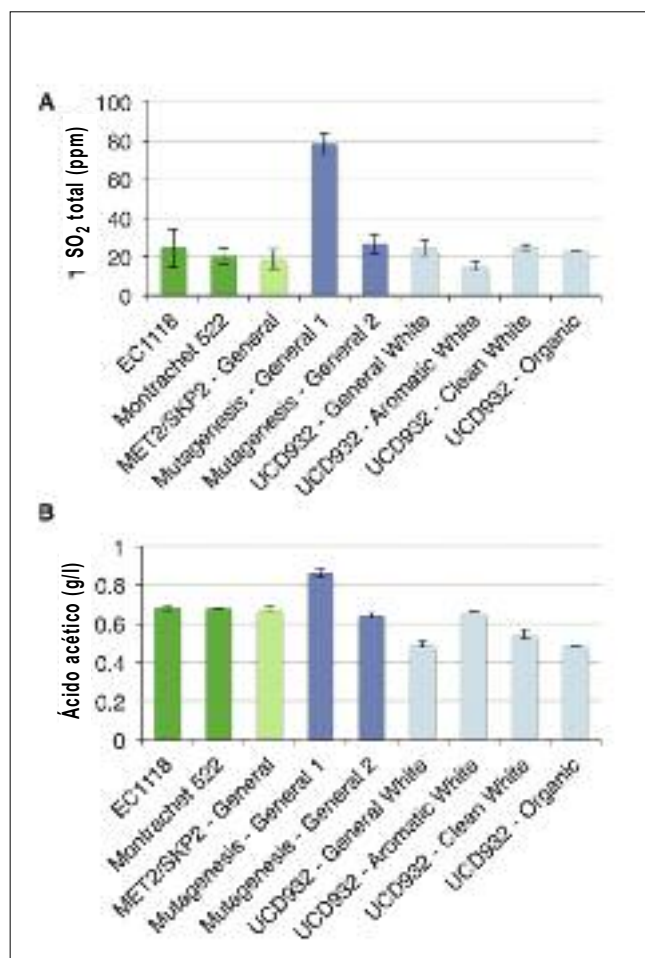


Figura 4. Análisis del SO₂ y el ácido acético. Las cepas de levadura no producen un exceso de SO₂. Se realizaron fermentaciones a escala de laboratorio (300 ml) de mosto de uvas chardonnay (Brix 19,9°, YAN 182 g/l, SO₂ total 28 ppm, SO₂ libre 5,76 ppm) a 21,5 °C durante 15 días. A) El SO₂ total se midió por yodometría al final de la fermentación (A17 revisado por 377/2009). Método: OIV-MA-AS32304B. B) El ácido acético se midió al final de la fermentación con el método enzimático manual de punto de equivalencia AK/P TA (Megazyme International, Irlanda, 2015, K-ACETRM 06/15). Las barras de error representan una desviación estándar en experimentos triplicados.

hemos medido una serie de atributos funcionales clave de las levaduras para vinicultura, como la cinética de la fermentación, la producción de SO₂, la acidez volátil y la producción de H₂S.

Nuestros datos indican que las cepas de levadura con producción baja o nula de H₂S difieren considerablemente en estos parámetros clave. Por ejemplo, se observó que MET2/SKP2–General produce en realidad cantidades notables de H₂S en las condiciones del ensayo; ninguna de las otras cepas con producción baja o nula de H₂S produjo H₂S detectable (Figura 3). En cuanto a la cinética de la fermentación, las cepas Mutagenesis–General 1 y Mutagenesis–General 2 resultaron más lentas que la

levadura convencional y el resto de las levaduras con producción baja o nula de H₂S (**Figura 2**).

En lo relativo a la producción de SO₂, la cepa Mutagenesis-General 1 produjo cantidades significativas de SO₂ durante la fermentación: aproximadamente cuatro veces más que la levadura convencional y el resto de las levaduras con producción baja o nula de H₂S (**Figura 4A**). Por último, al examinar la acidez volátil constatamos que la cepa Mutagenesis-General 1 produjo niveles elevados de ácido acético, aproximadamente 1,5 veces más que las otras cepas (**Figura 4B**).

En conclusión, nuestros datos subrayan la variabilidad de los atributos relevantes entre las cepas con producción baja o nula de H₂S y, sobre todo, entre las distintas tecnologías genéticas de inhibición del H₂S. Por ello, es aconsejable que los enólogos evalúen críticamente sus opciones a la hora de seleccionar cepas de levadura con producción baja o nula de H₂S, con el fin de elegir aquellas que proporcionen el rendimiento y el resultado óptimos en la aplicación deseada.

REFERENCIAS

¹ Vos, P.J.A. and Gray, R.S. (1979) The origin and control of hydrogen sulfide during fermentation of grape must.

American Journal of Enology and Viticulture 30:187-197.

² Bobet, R.A.; Noble, A.C. and Boulton, R.B. (1990) Kinetics of the ethanethiol and diethyl disulfide interconversion in wine-like solutions. Journal of Agricultural and Food Chemistry 38:449-452.

³ Eschenbruch, R. (1974) Sulfite and sulfide formation during winemaking - A Review. American Journal of Enology and Viticulture 25:157-161.

⁴ Herderich, M.J.; Francis, I.L.; Ugliano, M.; Siebert, T.E. and Jeffery, D.W. (2011) Analysis and formation of key sulfur aroma compounds in wine, 267-286. In Qian, M.C.; Fan, X. and Mahattanatawee, K. (eds.), Volatile sulfur compounds in food. American Chemical Society, Washington, DC.

⁵ Bisson, L.F. and Karpel, J.E. (2010) Genetics of yeast impacting wine quality. Annual Review of Food Science Technology 1:139-162.

⁶ Iland, P. (2004) Monitoring the winemaking process from grapes to wine: Techniques and concepts. Patrick Iland Wine Promotions.

⁷ Linderholm, A.; Dietzel, K.; Hirst, M. and Bisson, L.F. (2010) Identification of MET10-932 and characterisation as an allele reducing hydrogen sulfide formation in wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Applied Environ-



mental Microbiology 76:7699–7707.

⁸ Thoukis, G. and Stern, L.A. (1962) A review and some studies of the effect of sulfur on the formation of off-odours in wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 13:133–140.

⁹ Goniak, O.J. and Noble, A.C. (1987) Sensory study of selected volatile sulfur compounds in white wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 38:223–227.

¹⁰ Wang, X.D.; Bohlscheid, J.C. and Edwards, C.G. (2003) Fermentative activity and production of volatile compounds by *Saccharomyces* grown in synthetic grape juice media deficient in assimilable nitrogen and/or pantothenic acid. *Journal of Applied Microbiology* 94:349–359.

¹¹ Giudici, P. and Kunkee, R.E. (1994) The effect of nitrogen deficiency and sulfur-containing amino acids on the reduction of sulfate to hydrogen sulfide by wine yeasts. *American Journal of Enology and Viticulture* 45: 107-112.

¹² Rauhut, D. and Kurbel, H. (1994) The production of H₂S from elemental sulfur residues during fermentation and its influence on the formation of sulfur metabolites causing off-flavours in wines. *Wein-Wissenschaft* 49:27–36.

¹³ Stratford, M. and Rose, A.H. (1985) Hydrogen sulfide production from sulfite by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology* 131:1417–1424.

¹⁴ Nickerson, W.J. (1953) Reduction of inorganic substances by yeasts. I. Extracellular reduction of sulfite by species of *Candida*. *The Journal of Infectious Diseases* 93:43–56.

¹⁵ Schütz, M. and Kunkee, R.E. (1977) Formation of hydrogen sulfide from elemental sulfur during fermentation by wine yeast. *American Journal of Enology and Viticulture* 28:137–144.

¹⁶ Acree, T.E.; Sonoff, E.P. and Splittstoesser, D.F. (1972) Effect of yeast strain and type of sulfur compound on hydrogen sulfide production. *American Journal of Enology and Viticulture* 23:6–9.

¹⁷ Kumar, G.R.; Ramakrishnan, V. and Bisson, L.F. (2010) Survey of hydrogen sulfide production in wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *American Journal of Enology and Viticulture* 61:365–371.

¹⁸ Mendes-Ferreira, A.; Mendes-Faia, A. and Leão, C. (2002) Survey of hydrogen sulfide production by wine yeasts. *Journal of Food Protection* 65:1033–1037.

¹⁹ Spiropoulos, A.; Tanaka, J.; Flerianos, I. and Bisson, L.F. (2000). Characterisation of hydrogen sulfide formation in commercial and natural wine isolates of *Saccharomyces*. *American Journal of Enology and Viticulture* 51:233–248.

²⁰ Jiranek, V.; Langridge, P. and Henschke, P.A. (1995) Regulation of hydrogen sulfide liberation in wine-producing *Saccharomyces cerevisiae* strains by assimilable nitrogen. *Applied and Environmental Microbiology* 61:461–467.

²¹ Thomas, D. and Surdin-Kerjan, Y. (1997) Metabolism of

sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61:503–532.

²² Hansen, J. and Kielland-Brandt, M.C. (1996) Inactivation of MET2 in brewer's yeast increases the level of sulfite in beer. *Journal of Biotechnology* 50:75–87.

²³ Donalies, U.E.B. and Stahl, U. (2002) Increasing sulfite formation in *Saccharomyces cerevisiae* by over-expression of MET14 and SSU1. *Yeast* 19:475–484.

²⁴ Hansen, J. and Kielland-Brandt, M.C. (1996) Inactivation of MET10 in brewer's yeast specifically increases SO₂ formation during beer production. *Nature Biotechnology* 14:1587–1591.

²⁵ Spiropoulos, A. and Bisson, L.F. (2000) MET17 and hydrogen sulfide formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 44:21–4426.

²⁶ Linderholm, A.L.; Olineka, T.L. and Hong, Y. (2006) Allele diversity among genes of the sulfate reduction pathway in wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *American Journal of Enology and Viticulture* 57 (4):431-440.

²⁷ Linderholm, A.L.; Findleton, C.L.; Kumar, G.; Hong, Y. and Bisson, L.F. (2008) Identification of genes affecting hydrogen sulfide formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 74:1418–1427.

²⁸ Yoshida, S.; Imoto, J.; Minato, T.; Oouchi, R.; Kamada, Y.; Tomita, M.; Soga, T. and Yoshimoto, H. (2010) A novel mechanism regulates H₂S and SO₂ production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 28:109–121.

²⁹ Noble, J.; Sanchez, I. and Blondin, B. (2015) Identification of new *Saccharomyces cerevisiae* variants of the MET2 and SKP2 genes controlling the sulfur assimilation pathway and the production of undesirable sulfur compounds during alcoholic fermentation. *Microb Cell Fact* 14:68.

³⁰ Nowak, A.; Kusewicz, D.; Kalinowska, H.; Turkiewicz, M. and Patelski, P. (2004) Production of H₂S and properties of sulfite reductase from selected strains of wine-producing yeasts. *European Food Research and Technology* 219:84–89.

³¹ Cordente, A.G.; Heinrich, A.; Pretorius, I.S. and Swiegers, J.H. (2009) Isolation of sulfite reductase variants of a commercial wine yeast with significantly reduced hydrogen sulfide production. *FEMS Yeast Research* 9:446–459.

³² Sutherland, C.M.; Henschke, P.A.; Langridge, P. and Lopes, M.deB. (2003) Sub-unit and co-factor binding of *Saccharomyces cerevisiae* sulfite reductase - towards developing wine yeast with lowered ability to produce hydrogen sulfide. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 9:186–193.

³³ Cordente, A.G.; Curtin, C.D.; Varela, C. and Pretorius, I.S. (2012) Flavouractive wine yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology* 96:601–618.