



TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE NUEVAS LEVADURAS KILLER
Saccharomyces cerevisiae Y *Torulaspota delbrueckii*
PARA ELABORAR VINOS TRANQUILOS Y
ESPUMOSOS**

ROCÍO VELÁZQUEZ MOLINERO

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS

Conformidad de los directores:

Fdo. D. Manuel Ramírez Fernández

Fdo. D. Luis Miguel Hernández Martín

2015

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi gratitud a muchas personas e instituciones, sin las cuales, esta tesis no hubiera sido posible. A todos ellos, me gustaría manifestar mi más sincero agradecimiento.

En primer lugar, quisiera expresar mi más profundo agradecimiento al principal supervisor de este trabajo, mi director de tesis, Catedrático Manuel Ramírez Fernández, por la oportunidad de trabajar bajo su supervisión en un proyecto apasionante. Me gustaría darle las gracias por su constante apoyo y asistencia desinteresada. Su ayuda ha contribuido sin duda a mi desarrollo profesional y espero continuar colaborando con él en futuros proyectos así como manteniendo una duradera amistad. Por todo esto y más, MUCHÍSIMAS GRACIAS.

También me gustaría extender mi gratitud a mi co-director de tesis, Doctor Luis Miguel Hernández Martín, por su apoyo científico, administrativo y amistad. Especial agradecimiento al Doctor Isaac Corbacho Cuello, por acogerme e instruirme en los primeros años de este trabajo, al Doctor Francisco Teixidó Basurto, por su constante apoyo durante una parte del mismo, a la Doctora Matilde Maqueda Gil, por su apoyo y contribución en la última etapa y a la Doctora Isabel Olivero Jiménez por contar conmigo e incluirme en uno de sus artículos. Y por supuesto quiero darle las gracias a mi compañera de laboratorio y amiga, María Rico Trejo, por facilitarme el trabajo y por su apoyo desinteresado, sobre todo en los malos momentos, GRACIAS MERY.

Estoy muy agradecida a todas aquellas personas que de manera directa en indirecta han contribuido al desarrollo de esta tesis doctoral. A la Consejería de Economía, Comercio e Innovación de la Junta de Extremadura, por la concesión de la ayuda asociada al proyecto PRI07A087 y al Ministerio de Ciencia e Innovación por la concesión del proyecto AGL2011-25711, que han hecho posible esta tesis, y aunque pueda parecer irónico, también me gustaría agradecerle al SEXPE (Servicio de Empleo Público Extremeño), por la ayuda económica prestada durante el año 2013 de crisis económica. A todo el personal de la Estación Enológica de Almendralejo, en especial a Emiliano Zamora de Alba, María de la Luz Álvarez Franco y Pedro Antonio Cotilla del Hoyo. A los miembros de la Unidad de Genómica de la Fundación Parque Científico de Madrid y a la empresa Biotechvana SL del Parque Tecnológico de Valencia. A el Servicio de Análisis Elemental y Molecular de los Servicios de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Extremadura, en especial a la Doctora M^a Dolores

López Soto por su impecable trabajo y supervisión en el análisis de aromas. También me gustaría agradecer a HERAL ENOLOGÍA, S.L. y a todas las bodegas que han hecho posible este trabajo. GRACIAS.

También me gustaría darle las gracias a todos y cada uno de los alumnos de Biología, Enología (Licenciatura y Grado) de la Universidad de Extremadura y estudiantes Erasmus de la L'IUT de Dijon-Auxerre de la Universidad de Borgoña que han pasado por este laboratorio y con los que he tenido la maravillosa oportunidad de compartir mis conocimientos y por su puesto por los buenos ratos que hemos pasado. GRACIAS A TODOS.

Por último y no menos importante, me gustaría mostrar mi más sentido agradecimiento a las personas más importantes de mi vida, mi familia, a los cuales esta tesis está dedicada. Gracias Mamá, hermanas María y Mariu, cuñados, y muy especialmente gracias sobrinos, Darío y Olalla, por vuestro amor incondicional y apoyo. Por último, me gustaría dar las gracias a mi otra gran familia, mis amigos, en especial a mis hermanas postizas Fátima y Pilar, por vuestro apoyo y constante confianza. Seguro que hay muchos más, a todos vosotros, MILLONES DE GRACIAS.

ÍNDICE

OBJETIVOS	11
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL	15
I.1. El sector vitivinícola en España y Extremadura.	17
I.1.1. Situación del sector en España.	17
I.1.2. Situación del sector en Extremadura	18
I.2. Retos tecnológicos de la elaboración de vino en Extremadura: madurez tecnológica vs madurez fenólica, reducción del grado alcohólico, disminución de la oxidación, incremento de la acidez fija, e incremento y conservación de aromas	20
I.3. Aromas varietales de la uva y fermentativos de levaduras y bacterias.....	23
I.3.1. Principales compuestos derivados de la uva (tioles volátiles, compuestos terpénicos y norisoprenoides).....	24
I.3.2. Principales compuestos derivados del metabolismo de los microorganismos implicados en el aroma del vino (ésteres etílicos, ésteres acetato, alcoholes superiores, compuestos carbonílicos, ácidos volátiles, fenoles volátiles, lactonas y compuestos azufrados).....	25
I.3.3. Determinación de compuestos volátiles	30
I.4. La importancia de la fermentación maloláctica en Extremadura.....	32
I.5. Fermentación alcohólica espontánea e inoculada con levaduras: importancia de la biodiversidad microbiana en la calidad del vino.....	35
I.6. Utilidad de las levaduras <i>Saccharomyces</i> y no- <i>Saccharomyces</i> en la mejora de la calidad del vino.	38
I.7. Las levaduras asesinas y su utilidad en Enología	43
I.7.1. Fenotipo killer en <i>S. cerevisiae</i>	45
I.7.2. Síntesis, procesamiento y secreción de las toxinas K1, K2, y K28.	49
I.7.3. Modo de acción de las toxinas K1, K2, y K28 y mecanismo de autoinmunidad	53
I.7.4. Interacción célula hospedadora-virus y relación killer-sensibilidad.....	55
I.8. La elaboración de cava en Extremadura. Retos tecnológicos: mejora de aromas, espuma y volumen en boca	58
I.8.1. Microbiología de la segunda fermentación.....	63
I.8.1.1. Cambios morfológicos de las levaduras durante la segunda fermentación	66
I.8.1.2. Cambios bioquímicos en el vino durante la segunda fermentación.....	68
I.8.2. Propiedades de la espuma en el cava	72
I.9. BIBLIOGRAFÍA	74
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS	99
II.1. Estirpes de levaduras.....	101
II.1.1. <i>Saccharomyces</i>	101
II.1.2. No- <i>Saccharomyces</i>	102
II.2. Mosto y uvas	103
II.3. Medios de cultivos.	106
II.4. Soluciones y tampones para extracción de ácidos nucleicos.....	107
II.5. Oligonucleótidos	108
II.6. Cultivo y conservación de levaduras.....	108

II.6.1. Condiciones de crecimiento.....	108
II.6.2. Preparación de inóculos de levaduras.....	109
II.6.3. Producción de levaduras vínicas con distintos medios de cultivo	109
II.6.4. Test fisiológico para identificación de levaduras.	111
II.6.5. Acondicionamiento de levaduras para segunda fermentación en botella.	111
II.6.6. Conjugación y selección de diploides.....	112
II.6.7. Esporulación.	112
II.6.8. Disección de tétradas	113
II.6.9. Conservación de las levaduras.....	113
II.6.10. Determinación del fenotipo killer	113
II.7. Vinificaciones.....	114
II.7.1. Elaboración de vino blanco.	114
II.7.2. Elaboración de vino tinto.....	116
II.7.3. Elaboración de vino cava.....	118
II.8. Parámetros físico-químicos.	123
II.8.1. Grados Brix.	123
II.8.2. Masa volúmica y densidad relativa.....	123
II.8.3. Grado alcohólico volumétrico	123
II.8.4. Azúcares reductores.....	123
II.8.5. Acidez total.....	124
II.8.6. pH.	124
II.8.7. Acidez volátil.....	124
II.8.8. Anhídrido sulfuroso.	124
II.8.9. Ácido málico	124
II.8.10. Ácido láctico.....	125
II.8.11. Glucosa + fructosa.	125
II.8.12. T15 y T100	126
II.9. Parámetros microbiológicos.	126
II.9.1. Recuento de células totales (células/mL)	126
II.9.2. Recuento de células viables en placa (UFC/mL).....	127
II.9.3. Detección de levaduras con marcadores genéticos de resistencia a cicloheximida y rodamina.....	127
II.9.4. Porcentaje de células muertas.....	128
II.10. Análisis sensorial.....	129
II.11. Técnicas de manipulación de ácidos nucleicos.	130
II.11.1. Extracción de ácidos nucleicos (DNA genómico, DNA mitocondrial y dsRNA de virus) de levaduras (mini-prep).....	130
II.11.2. Extracción de cantidades grandes de ácidos nucleicos de levaduras (midi-prep). ...	131
II.11.3. Purificación de dsRNA mediante cromatografía en celulosa CF-11.....	133
II.11.4. Electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa y visualización	133

II.11.5. Naturaleza de los ácidos nucleicos de las partículas TdV-M-barr	134
II.11.6. Purificación de dsRNA víricos a partir de geles de agarosa.....	135
II.11.6.1. Purificación de dsRNA con Kit RNaid®Kit (Método 1)	135
II.11.6.2. Purificación de dsRNA con jeringa y papel de filtro (Método 2)	136
II.11.7. Restricción del DNA mitocondrial.....	138
II.11.8. Amplificación y restricción con endonucleasas de los espaciadores internos de genes ribosomales ITS	138
II.11.9. Amplificación del gen del DNA ribosomal 18S.....	139
II.11.10. Preparación y secuenciación de librerías de cDNA a partir de dsRNA vírico purificado.....	139
II.11.11. Ensamblaje de la secuencia de dsRNA	140
II.12. Determinación de polisacáridos	142
II.12.1. Polisacáridos (azúcares) totales.....	142
II.12.2. Manano de la pared celular de levaduras.	142
II.13. Determinación de proteínas.....	143
II.14. Determinación de compuestos volátiles del vino	144
II.15. Determinación de la espuma.	149
II.15.1. Impresión espumante.....	149
II.15.2. Medida de parámetros de la espuma con equipo Mosalux.....	149
II.16. Análisis de datos.....	151
II. 17. BIBLIOGRAFÍA	152
CAPÍTULO III: Caracterización de nuevas levaduras killer de los géneros <i>Saccharomyces</i> (Klus) y <i>Torulaspota</i> (Kbarr)	155
III.1. ANTECEDENTES	157
III.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	158
III.2.1. Aislamiento, identificación y caracterización morfológica de las nuevas levaduras killer	158
III.2.2. Caracterización fenotípica de las nuevas levaduras killer Klus y Kbarr.....	160
III.2.3. Influencia del pH, temperatura y cepa de levadura sensible sobre el fenotipo killer de las levaduras Kbarr. Comparación con el resto de levaduras <i>S.cerevisiae</i> killer.	171
III.2.4. Caracterización del fenotipo killer de las levaduras Kbarr frente a mutantes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> alterados en la estructura de la pared celular: Análisis del mecanismo de acción de las toxinas killer Klus y Kbarr.	180
III.2.5. Caracterización genotípica de las nuevas levaduras killer Kbarr.....	184
III.2.6. Caracterización molecular de los genomas víricos de las levaduras killer Kbarr	186
III.2.6.1. Purificación de los dsRNA víricos.....	186
III.2.6.2. Preparación de librerías de cDNA a partir de los dsRNA víricos purificados. ..	190
III.2.6.3. Secuenciación, ensamblaje, y análisis de la secuencia de los dsRNA de TdV-LAbarr, TdV-LBCbarr y TdV-Mbarr-1.	195
III.2.6.3.1. TdV-LAbarr.	195
III.2.6.3.2. TdV-LBCbarr.....	205
III.2.6.3.3. TdV-Mbarr-1.....	213

III.2.7. Monitorización de las nuevas levaduras <i>Torulaspota</i> , killer y no-killer, durante la fermentación: uso de polimorfismos moleculares y de mutantes con marcadores genéticos.	216
III.2.8. Producción de las nuevas levaduras killer para vinificación en distintos medios de cultivo, a distintas temperaturas y con distintos tamaños de inóculo.....	218
III.3. BIBLIOGRAFÍA	221
CAPÍTULO IV: Elaboración de vinos tranquilos con nuevas levaduras killer <i>Saccharomyces</i> y <i>Torulaspota</i>	225
IV.1. ANTECEDENTES	227
IV.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	228
IV.2.1. Influencia del fenotipo killer en el desarrollo de las poblaciones de levaduras en vinificación de vinos tranquilos	228
IV.2.2. Vinificaciones de mosto blanco inoculado con levaduras <i>Saccharomyces</i> o <i>Torulaspota</i> . Efecto sobre el consumo de azúcares, fermentación maloláctica, y calidad organoléptica de los vinos.....	231
IV.2.2.1. Análisis de los compuestos aromáticos de los vinos blancos.....	234
IV.2.2.2. Efecto de la turbidez del mosto sobre fermentación maloláctica y la calidad organoléptica de los vinos elaborados con levaduras <i>Torulaspota</i>	238
IV.2.3. Vinificaciones de uva tinta inoculadas con levaduras <i>Saccharomyces</i> o <i>Torulaspota</i> . Efecto sobre el consumo de azúcares, fermentación maloláctica, y calidad organoléptica de los vinos.	242
IV.2.3.1. Primera serie de vinificaciones de uva Cabernet-Sauvignon (2011-1).....	244
IV.2.3.2. Segunda serie de vinificaciones de uva Cabernet-Sauvignon (2011-2).....	247
IV.2.3.3. Tercera serie de vinificaciones de uva Cabernet-Sauvignon (2012-1).....	252
IV.2.3.4. Cuarta serie de vinificaciones de uva Cabernet-Sauvignon (2012-2).....	254
IV.2.3.5. Vinificaciones de uva Tempranillo (2012).	258
IV.2.3.6. Vinificaciones de uva Pinot-Noir (2012).	261
IV.2.3.7. Vinificaciones de uva Garnacha (2013).....	264
IV.2.3.8. Análisis de los compuestos aromáticos de los vinos tintos.	267
IV.2.4. Evaluación de la utilidad del uso de <i>Torulaspota</i> en la elaboración de vino tinto. ..	272
IV.3. BIBLIOGRAFÍA	282
CAPÍTULO V: Elaboración de cava con nuevas levaduras killer <i>Saccharomyces</i> y <i>Torulaspota</i>	285
V.1. ANTECEDENTES	287
V.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	288
V.2.1. Utilidad de cepas autóctonas seleccionadas de levaduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en la elaboración de cava. Análisis preliminar.....	288
V.2.2. Análisis del fenotipo killer en las condiciones de elaboración de cava. Efecto de pH y temperatura.....	291
V.2.2.1. Objetivo: matar a <i>Saccharomyces</i> killer K2 y no-killer K2 ⁰	291
V.2.2.2. Objetivo: matar a <i>Saccharomyces</i> killer Klus y Klus ⁰	293
V.2.2.3. Objetivo: matar a <i>Torulaspota</i> killer Kbarr-1, Kbarr-2 y Kbarr-1 ⁰	295
V.2.3. Elaboración de cava con inóculos mixtos de levaduras killer/no-killer en tubos de laboratorio a baja presión.	297

V.2.3.1. Eficacia de las levaduras <i>Saccharomyces</i> y <i>Torulaspota</i> en la segunda fermentación en tubos de laboratorio a baja presión.....	298
V.2.3.2. Evolución de la viabilidad celular de las levaduras <i>Saccharomyces</i> y <i>Torulaspota</i> en la segunda fermentación en tubos de laboratorio a baja presión	299
V.2.3.3. Desplazamiento de las levaduras sensibles por las levaduras killer y evolución de la muerte celular en la segunda fermentación en tubos de laboratorio a baja presión	300
V.2.3.4. Evolución del contenido en polisacáridos y proteínas en la segunda fermentación en tubos de laboratorio a baja presión.....	303
V.2.4. Elaboración de cava con inóculos mixtos de levaduras <i>Saccharomyces</i> y <i>Torulaspota</i> killer/no-killer en botella a alta presión.	306
V.2.4.1. Eficacia fermentativa de las levaduras a alta presión.....	307
V.2.4.2. Evolución de la viabilidad celular de las levaduras	308
V.2.4.3. Desplazamiento de las levaduras sensibles por las levaduras killer y evolución de la muerte celular.....	310
V.2.4.4. Análisis de la espuma de los cavas.....	312
V.2.4.5. Evolución del contenido en polisacáridos, manano y proteínas durante la fermentación y envejecimiento del cava	314
V.2.4.6. Análisis de compuestos aromáticos.....	317
V.2.4.7. Análisis de la calidad organoléptica de los cavas.....	321
V.2.5. Elaboración de cava con inóculos mixtos de levaduras <i>Saccharomyces</i> killer/no-killer en botella a alta presión con distintas concentraciones de fosfato di-amónico	322
V.2.5.1. Eficacia fermentativa de las levaduras	323
V.2.5.2. Evolución de la viabilidad celular de las levaduras	323
V.2.5.3. Desplazamiento de las levaduras sensibles por las levaduras killer y evolución de la muerte celular.....	324
V.2.5.4. Análisis de la espuma del cava.....	326
V.2.5.5. Evolución del contenido en polisacáridos y proteínas.	327
V.2.5.6. Análisis de compuestos aromáticos.....	330
V.2.5.7. Análisis de la calidad organoléptica de los cavas.....	332
V.2.6. Elaboración de cava con inóculos mixtos de levaduras <i>Saccharomyces</i> killer, no-killer y mutantes afectados en las manoproteínas estructurales de la pared celular.....	335
V.2.6.1. Eficacia fermentativa de las levaduras	335
V.2.6.2. Evolución de la viabilidad celular de las levaduras	336
V.2.6.3. Desplazamiento de las levaduras sensibles por las levaduras killer y evolución de la muerte celular.....	337
V.2.6.4. Análisis de la espuma del cava.....	339
V.2.6.5. Evolución del contenido en polisacáridos y proteínas.	340
V.2.6.6. Análisis de compuestos aromáticos.....	342
V.2.6.7. Análisis de la calidad organoléptica de los cavas.....	345
V.2.7. Análisis general del metaboloma celular de las levaduras <i>Saccharomyces</i> con y sin efecto killer en la elaboración de cava en el conjunto de todas las vinificaciones.	345
V.3. BIBLIOGRAFÍA.....	350
CONCLUSIONES.....	353

OBJETIVOS

Básicamente, el OBJETIVO de esta tesis es caracterizar y seleccionar estirpes de levaduras *Torulaspota* con fenotipo asesino (killer), con capacidad para fermentar mosto de uva y de soportar vivas hasta 14° de alcohol, con capacidad para competir con las levaduras *Saccharomyces* silvestres hasta el final de fermentación, capaces de originar la degradación de ácido málico y la producción de ácido láctico, y que sean adecuadas para elaborar vinos tranquilos diferenciados de excelente calidad organoléptica. Además, se pretende mejorar la calidad del cava acelerando la lisis de las levaduras después de la segunda fermentación con inóculos de mezclas de levaduras killer y sensibles. Los objetivos concretos son:

1. Caracterización morfológica, fenotípica y genotípica de nuevas levaduras *Torulaspota* killer.
2. Aislamiento, caracterización y secuenciación de los nuevos virus killer de levaduras *Torulaspota*.
3. Obtención de levaduras *Torulaspota* killer con un marcador genético de resistencia a cicloheximida para su fácil monitorización en bodega.
4. Realización de vinificaciones experimentales con las nuevas levaduras y selección de las más adecuadas para uso industrial en base a los análisis químicos y organolépticos de los vinos elaborados.
5. Realización de vinificaciones con inóculos mixtos de dos levaduras (una killer y otra sensible o dos killer de distinto tipo) para determinar la cinética de fermentación y magnitud de la muerte de las levaduras sensibles a la toxina.
6. Elaboración experimental de cava con inóculos mixtos de las levaduras killer y sensibles para acelerar la autólisis celular, incrementar la liberación del metaboloma celular y mejorar la calidad aromática y espumante del cava.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL

I.1. El sector vitivinícola en España y Extremadura.

España es uno de los grandes productores mundiales de vino: primero en el ranking por superficie plantada, primero por producción de vino y mosto en la campaña 2013/2014, superando a Italia y a Francia, y primer exportador mundial en términos de volumen en el interanual a septiembre de 2014, aunque tercero en términos de valor. Por su importancia en términos económicos, sociales y medioambientales, así como por la importancia del vino como imagen del país en el exterior, este sector es de extraordinaria relevancia en España. Extremadura, con una superficie de viñedo cercana a 83.000 hectáreas y un 8,7% del viñedo plantado, ocupa el segundo lugar en superficie de viñedo así como de producción a nivel nacional.

I.1.1. Situación del sector en España.

España es el país del mundo con mayor extensión de viñedo, cerca de la mitad se encuentra en Castilla-La Mancha (463.912 has, 48,8 %), la zona con mayor extensión del mundo dedicada a la viña, seguida de Extremadura (83.055 has, 8,7 %), Valencia (65.068 has), Castilla y León (63.732 has), Cataluña, Aragón, Murcia, Andalucía y Rioja. Esto supone un total de 1,018 millones de hectáreas de viñedo (97,4% destinadas a vinificación, 2% a uva de mesa, 0,3 % a elaboración de pasas y 0,3 % a viveros) según datos de la OIV. Nuestra tradición elaboradora de vinos se remonta a la época romana, aunque hasta más recientemente no hubo una exportación masiva y generalizada.

La variedad de suelo, las diferencias climáticas y sobre todo, la situación geográfica de España, lo convierten en un lugar privilegiado para elaborar vinos de distintas características. Desde la incorporación a la UE, los vinos españoles se han adaptado a su normativa. Actualmente los términos tradicionales que se utilizan para indicar que el producto se acoge a una Indicación Geográfica Protegida (IGP) o Denominación de Origen Protegida (DOP), son: Vino de la Tierra para IGP, y Denominación de Origen, Denominación de Origen Calificada, Vino de Calidad con Indicación Geográfica, Vino de Pago y Vino de Pago Calificado para DOP, según la regulación actual del Reglamento (CE) 479/2008. En esta normativa comunitaria se establecen unos requisitos para ambos tipos de protección (**Fig.I.1**).

VINOS con DOP	VINOS con IGP
Su calidad y características son esencialmente o exclusivamente debidas a su origen geográfico, con sus factores humanos y culturales inherentes.	Posee una calidad, reputación u otras características específicas atribuibles a su origen geográfico.
100% de las uvas proceden exclusivamente de la zona geográfica de producción.	Al menos el 85% de las uvas procede exclusivamente de la zona geográfica.
Su elaboración tiene lugar dentro de la zona geográfica.	Su elaboración tiene lugar en el área geográfica.
Se obtiene de variedades vnicas pertenecientes a <i>Vitis vinífera</i> .	Se obtiene de variedades vnicas pertenecientes a <i>Vitis vinífera</i> y otras especies del género <i>Vitis</i> .

Figura I.1. Requisitos normativa comunitaria del Reglamento (CE) 479/2008 (tomada de <http://www.winesfromspain.es/icex/cda>)

I.1.2. Situación del sector en Extremadura.

La regulación de los “vinos de la tierra” en Extremadura apareció en 1987 (Junta de Extremadura and Consejería de Economía y Trabajo, 2004). La denominación de origen Ribera del Guadiana, única de vino de Extremadura y reconocida por el M.A.P.A en 1999, toma su nombre del río que recorre los viñedos de este a oeste, y reúne seis subzonas que están repartidas entre las dos provincias de la comunidad. Tierra de Barros agrupa 36 municipios y cuenta con el 80% de los viñedos, el suelo arcilloso (de barro) presenta muy buena capacidad de retención de agua y considerable contenido en caliza, su orografía poco accidentada ha facilitado la mecanización. Almendralejo (capital de la comarca de Tierra de Barros) conocida como “Ciudad Internacional del Vino” es sede del consejo regulador y, desde 1983, único municipio de Extremadura con D.O. Cava. Más al sur se encuentra Matanegra (8 municipios), con suelos parecidos a los de Tierra de Barros pero clima más fresco debido a su mayor altitud, alrededor de 638 m. Al oeste, Ribera Baja (11 municipios) con suelos arcillosos, terrenos aluviales y poca altitud, unos 286 metros. Al este de la región se encuentra la subzona de Ribera Alta (38 municipios) con una altitud de 427 metros, sobre un terreno arenoso y poco profundo. Finalmente, al norte, en la provincia de Cáceres, se sitúan Cañamero (5 municipios) y Montánchez (27 municipios), con orografía bastante accidentada donde el cultivo se asienta sobre las laderas de las colinas (**Fig. I.2**).



Figura I.2. Comarcas vitivinícolas de Extremadura (tomada de <http://riberadelguadiana.eu/esp/subzonas>).

Extremadura comparte el clima continental de la España central, con veranos muy cálidos que alcanzan más de 40 grados e inviernos suaves donde las temperaturas rara vez bajan de los cero grados. En alguna subzona las variables térmicas son un poco más acusadas debido a la influencia atlántica. La pluviosidad varía de una subzona a otra, aumentado de forma considerable en las áreas de sierra como Cañamero. La pluviometría media está en torno a los 450 mm anuales. Los principales desafíos para los viticultores son la sequía estival y los efectos de las heladas primaverales.

Se cultivan 29 variedades de uva, algunas incluso desconocidas en otras zonas de España y consideradas como autóctonas. Las variedades autóctonas en Tierra de Barros, y en Ribera Baja son Cayetana y Pardina, mientras que Borba y Alarije predominan en las otras tres zonas: Montánchez, Cañamero y Ribera Alta. En Matanegra predomina sobre todo la variedad Eva o Beba de los Santos. La densidad de plantación varía entre 1.000 y 4.000 plantas por hectárea, conducidas tanto en vaso como en espaldera. La vendimia comienza generalmente sobre el 20 de agosto.

La D.O. Ribera del Guadiana consta en la actualidad de 114 bodegas inscritas, repartidas a por toda la geografía extremeña. La renovación en curso está originando buenos resultados, con sus vinos de excelente calidad y creatividad, que están obteniendo reconocimiento en distintos eventos del mundo vinícola nacional e internacional. Se elaboran vinos blancos, rosados y tintos. Ha aumentado la cantidad de tintos que se destinan a crianza en barricas, también se elaboran vinos jóvenes monovarietales de Merlot, Cabernet-Sauvignon y Syrah; aunque la mayoría de los vinos tintos se elaboran a partir de la variedad Tempranillo.

Esta D.O. regula todos los factores que influyen en la calidad del vino (viñedos, sistemas de plantación, control de vendimia, elaboración y crianza) para asegurar las características diferenciales de los vinos acogidos a la misma por el reglamento vigente (Decreto 170/2009, de 24 de julio del D.O.E. Núm. 146 del jueves 30 de julio de 2009).

I.2. Retos tecnológicos de la elaboración de vino en Extremadura: madurez tecnológica vs madurez fenólica, reducción del grado alcohólico, disminución de la oxidación, incremento de la acidez fija, e incremento y conservación de aromas.

Desde hace años se están produciendo importantes cambios en el sector vitivinícola que han conducido a un mercado más exigente que apuesta por vinos de calidad. La tendencia general de los consumidores va dirigida hacia una demanda de productos nuevos con características específicas como por ejemplo vinos tintos de color rojo intenso, con cuerpo, taninos suaves y aromas frutales cuyas características están relacionadas directamente con uvas de alta madurez fenólica (Meléndez et al., 2013). La situación vitivinícola actual, con un descenso en el consumo mundial de vino agravado por la crisis financiera, hace que el sector atraviese momentos difíciles. En este contexto, la gran demanda de vinos tintos o blancos jóvenes, frescos y aromáticos ha revertido en una reconversión del viñedo nacional en busca de variedades más apropiadas para la elaboración de este tipo de productos (Roldán Gómez, 2008). Esto ha conducido a la replantación de los viñedos con variedades tintas como Tempranillo, Cabernet-Sauvignon, Merlot, Syrah, etc. y variedades blancas aromáticas como Sauvignon-Blanc y Chardonnay. Sin embargo, dicha reconversión no resulta fácil, sobre todo para zonas productivistas como en Extremadura, donde la realidad vitivinícola hace necesario poner en práctica otras alternativas fundamentales para obtener vinos de calidad que presenten una acidez y un grado alcohólico suficiente sin ser excesivo, con aromas persistentes, un aumento de la suavidad en boca y disminución de la oxidación de sus caldos, entre otros criterios de calidad. Los vinos procedentes de zonas cálidas del sur de España, elaborados con uvas muy maduras, con alto contenido en azúcar y baja acidez, tienden a evolucionar muy rápidamente durante su conservación.

Durante el proceso de maduración de la uva las sustancias responsables de la calidad se acumulan casi paralelamente a la acumulación de azúcares y a la disminución de acidez, de tal forma que el concepto de calidad óptima de la cosecha tiende a identificarse con la concentración máxima de azúcares en la uva. Esto no es rigurosamente cierto porque, o bien puede producirse una sobremaduración o, en otros

casos, se vendimia anticipadamente cuando se ha alcanzado la madurez tecnológica (cantidad de azúcar), según el tipo de vino que se pretenda elaborar. Los vinos blancos son más frescos en climas fríos, más ácidos y más finos en bouquet, mientras que los de regiones cálidas son ricos en alcohol, cortos de sabor y de aroma (Becker, 1985). La calidad de la uva depende en gran parte de la temperatura durante la maduración: interesa un ambiente fresco pero con calor suficiente para continuar la acumulación de azúcares y desarrollo del aroma de las bayas. Por lo general, la madurez tecnológica es el principal indicador para la elección de la fecha de vendimia, mientras que la madurez fenólica y aromática se tienen en cuenta desde hace muy poco tiempo para la elaboración de vinos de calidad (Kennedy et al., 2006; Ribereau-Gayon et al., 1998). En consecuencia, aumenta el interés de los enólogos por medir la madurez fenólica para predecir la intensidad del color y la composición de polifenoles del vino.

Desde el punto de vista microbiano y asociado al cambio climático, las variaciones previstas en las condiciones ambientales (temperatura, estrés hídrico, etc), en la composición del sustrato, la fisiología de la baya y las técnicas de cultivo hacen probable que se modifiquen la ecología, la biodiversidad y el metabolismo de la microbiota del viñedo y la bodega. Uno de los aspectos que más inquieta es que para alcanzar la madurez fenólica apropiada, el contenido en azúcar de la uva y el grado alcohólico esperado irán probablemente en aumento (González et al., 2007). El exceso de grado alcohólico del vino puede ser abordado desde diferentes puntos de vista y recurriendo a diferentes disciplinas (viticultura, microbiología, tecnología, biotecnología) de manera complementaria. Prácticamente en todas las regiones vitivinícolas del mundo se están aislando y caracterizando levaduras autóctonas para usarlas en vinificación (Pretorius, 2000a). Ante la nueva situación planteada por el cambio climático, sería deseable seleccionar estirpes de *Saccharomyces* con un poder fermentativo más moderado, al menos en términos de rendimiento en etanol. Por lo tanto, una fuente de nuevas levaduras para vinificación, mejor adaptadas a la nueva situación, podría seguir siendo la selección de estirpes silvestres de origen natural, pero con criterios de selección más adecuados a la situación y los estilos de vinificación actuales (Palacios et al., 2006).

En Extremadura es una práctica habitual la acidificación del mosto para elaborar vinos más equilibrados y favorecer su conservación y buena evolución biológica. Generalmente se realiza cuando el pH del mosto es superior a 3,7, ya que es conveniente reducir el pH para evitar contaminaciones bacterianas y mantener la

frescura del vino. La acidificación del mosto está muy limitada hasta el máximo de 1,5 g/L expresado en tartárico, mientras que la acidez máxima permitida en los vinos es 2,5 g/L (E.C.C., 1987). El ácido autorizado para este fin es el tartárico natural o dextrógiro D (+), aunque también se puede utilizar ácido cítrico limitado a un contenido total de 1 g/L, incluyendo el contenido inicial que lleva la vendimia.

Otro criterio fundamental en la producción de vinos de calidad es la exposición controlada al oxígeno. Recientemente se han producido importantes avances en materia de medida del oxígeno, su gestión en bodega, y los mecanismos químicos que explican muchos cambios organolépticos observados durante la oxidación y el envejecimiento (Anastasova et al., 2008; Laurie et al., 2008; Nevares and del Alamo, 2008; Nevares et al., 2009). El proceso de oxidación se desarrolla rápidamente, originando un deterioro de las características organolépticas del vino (Boulton et al., 1996). Una de las soluciones más utilizadas y efectivas para reducir la concentración y los efectos de la exposición al oxígeno es el uso de gases inertes como el nitrógeno y el dióxido de carbono. En cuanto al uso de anhídrido sulfuroso, una de sus funciones más importantes al pH del vino viene dada por su capacidad para reaccionar con el peróxido de hidrógeno e impedir que se produzcan las reacciones oxidativas posteriores (Boulton et al., 1996; Danilewicz, 2007). Asimismo, su rápida reacción con compuestos carbonilos (como acetaldehído o dihidroxiacetona), permite reducir el impacto aromático de estos compuestos, reduciendo la sensación de oxidación en el vino (Laszlo et al., 1978). La reducción en la concentración de anhídrido sulfuroso producto de la oxidación también se explicaría por su reactividad con quinonas (Laurie et al., 2012).

Por último, el incremento y la conservación de la intensidad aromática es otro aspecto muy interesante en los vinos que definen las diferencias entre la amplia diversidad y estilos de vinos producidos en todo el mundo. En zonas de clima cálido como en Extremadura, suele disminuir el aroma varietal, frutal, y puede detectarse presencia de acetaldehído libre, se ha demostrado que la acumulación de terpenos en climas fríos es más lenta que en climas cálidos, pero que al final el contenido en terpenos libres acaba siendo superior (Stahl-Biskup, 1987). Una acumulación excesiva de algunos componentes como las metoxipirazinas en Sauvignon-Blanc se favorece en climas fríos y situaciones sombreadas (Lacey MJ et al., 1991). Las bajas temperaturas que se mantienen en fermentaciones controladas consiguen disminuir la fuga de compuestos volátiles y, por tanto, retienen mayor cantidad de aromas (Suárez Lepe, 1997). No obstante, muchas de las rutas biosintéticas de aromas están condicionadas por

factores como la composición y pH del mosto, la variedad y madurez de la uva, la calidad del suelo, la disponibilidad de agua, el estrujado de la uva, tratamientos del mosto, el tiempo de contacto con las pieles, etc., influyendo significativamente en el aroma final (Bartowsky et al., 2002; Boulton et al., 1996; Henick-Kling, 1993; Houtman et al., 1980a; Houtman AC et al., 1980b; Lambrechts and Pretorius, 2000; Ribéreau-Gayon et al., 2000).

I.3. Aromas varietales de la uva y fermentativos de levaduras y bacterias.

El vino es una bebida compleja que incluye unos 800 compuestos relacionados con sus características organolépticas (Rapp and Mandery, 1986). Durante la fermentación alcohólica, las levaduras no solamente convierten el azúcar en etanol y dióxido de carbono, también producen importantes metabolitos que proporcionan el carácter vinoso (Etievant, 1991; Guth, 1998; Lambrechts and Pretorius, 2000; Rapp, 1998; Romano et al., 2003; Schreier, 1979). El aroma genérico del vino se atribuye mayoritariamente a alcoholes y ésteres etílicos, que le otorgan su calidad e intensidad aromática (Cole and Noble, 1995; Lambrechts and Pretorius, 2000; Noble, 1994). De manera similar, durante la fermentación maloláctica, las bacterias lácticas realizan la desacidificación natural del vino pudiendo mejorar el perfil del flavor. En términos enológicos, el perfil aromático de un vino se clasifica en tres categorías:

- El aroma varietal se compone de sustancias procedentes directamente de la uva, tales como los ésteres del ácido acético y monoterpenos, estos últimos característicos de la variedad de uva Moscatel (Rapp and Mandery, 1986). Dentro de este grupo también se incluyen compuestos que se generan de la manipulación, preparación, extracción y acondicionamiento del mosto en la bodega, y entre ellos cabe destacar aldehídos, cetonas y diferentes tipos de alcoholes (Ramshaw and Hardy, 1969; Schreier, 1979; Stevens et al., 1967).

- El aroma fermentativo se atribuye a los compuestos generados durante la fermentación alcohólica por el metabolismo de las levaduras, fundamentalmente de *Saccharomyces cerevisiae*, aunque no se debe ignorar la contribución de las levaduras oxidativas y apiculadas, denominadas como no-*Saccharomyces*, presentes durante los primeros días de la fermentación, y de las distintas especies de bacterias lácticas durante el desarrollo de la fermentación maloláctica (Viana, 2011a).

- En cuanto al aroma terciario o bouquet de maduración, aparece como consecuencia de reacciones enzimáticas y/o físico-químicas que ocurren durante el

envejecimiento y crianza del vino. Según el tipo de envejecimiento se distinguen dos tipos de aromas terciarios: el de oxidación, originado por la crianza en madera, y el de reducción, generado durante el envejecimiento en botella (Rapp and Mandery, 1986).

I.3.1. Principales compuestos derivados de la uva (tioles volátiles, compuestos terpénicos y norisoprenoides).

Los tioles volátiles son compuestos azufrados con una función tiol (mercaptanos). En la uva se encuentra combinado en forma inodora pero durante la fermentación aparecen por acción de β -liasas específicas. Son importantes en el aroma varietal del vino Savignon-Blanc con umbrales de percepción muy bajos: 3 ng/L para 4-metil-4-mercapto-pentan-2-ona (4MMP, arbusto siempre verde), 60 ng/L para 3-mercapto hexan-1-ol (3MH, pomelo), o 4 ng/L para 3-mercapto hexil acetato (3MHA, maracuyá) (Dubourdiou D, 2006). También se han identificado en vinos elaborados con otras variedades (Colombard, Riesling, Semillon, Merlot y Cabernet-Sauvignon) y a distintas concentraciones, pudiendo afectar potencialmente al aroma del vino (Murat M et al., 2001; Tominaga T, 2000). Se ha propuesto a *S. cerevisiae* como responsable de la formación de estos compuestos durante la fermentación alcohólica, aunque se ha demostrado que 4MMP y 3MH también están presentes en la uva en su forma no volátil (Darriet P, 1995). La concentración máxima de estos compuestos se encuentra en los vinos recién fermentados, perdiéndose con el tiempo y especialmente cuando se aporta oxígeno con los trasiegos. También se ha demostrado que la temperatura de fermentación afecta significativamente a su liberación, a mayor temperatura mayor liberación de tioles volátiles (Flanzy, 2003).

Los compuestos terpénicos están muy extendidos en el reino vegetal (King and Richard Dickinson, 2000) como es el caso de *Vitis vinífera*, del orden de 400 monoterpenoides (C_{10}) y más de 1000 sesquiterpenoides (C_{15}). Dependiendo de la variedad de uva pueden oscilar en el mosto de 500 a más de 1700 mg/L, y los más odorantes son los alcoholes monoterpénicos o terpenoles (linalol, α -terpineol, citronelol, nerol, geraniol, Ho-trienol, etc.). La síntesis de los compuestos terpénicos parte de la glucosa vía acetyl-coenzima A hasta el geranyl pirofosfato del que derivan todos los demás. El geraniol y el nerol se localizan un 90% en el hollejo, mientras que la mitad del linalol se encuentra en el mosto. Algunas levaduras, *Kluyveromyces lactis*, *Torulaspota delbruecki* y *Ambrosiozyma monospora* también producen terpenoides (Drawert and Barton, 1978; Fagan GL, 1981; Klingenberg A, 1985).

Otros compuestos derivados de la uva son los norisoprenoides, siendo especialmente aromáticos la β -damascenona (floral, fruta exótica), β -ionona (violeta), 3-oxo- α -ionol (tabaco), 3-hidroxi- β -damascenona (olor a té) y β -damascona (afrutado, tabaco). El TDN (1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftaleno) con olor a queroseno destaca en la uva por su aroma característico, y en algunos vinos Riesling envejecidos desarrollándose con el tiempo en botella, así como el vitispirano y los actinodoles de aroma alcanforado o a eucalipto.

I.3.2. Principales compuestos derivados del metabolismo de los microorganismos implicados en el aroma del vino (ésteres etílicos, ésteres acetato, alcoholes superiores, compuestos carbonílicos, ácidos volátiles, fenoles volátiles, lactonas y compuestos azufrados).

Los ésteres etílicos y acetatos son probablemente el grupo aromático más importante, responsables en gran medida del carácter afrutado y floral de los vinos jóvenes. El principal es el acetato de etilo, aunque no se aceptan niveles superiores a 170 mg/L en vinos blancos y 160 mg/L en tintos (Corison et al., 1979). Los más relevantes son, por un lado, los ésteres polares (2-hidroxiopropionato de etilo, succinato de dietilo, 4-hidroxibutanoato de etilo, malato de dietilo, 2-hidroxiopropionato de isopentilo y 3-hidroxibutanoato de etilo), responsables de dar al vino cuerpo y consistencia; y los ésteres apolares donde se incluyen los ésteres de acetato de alcoholes superiores (acetato de etilo, afrutado, barniz; acetato de isoamilo (o acetato de isopentilo), plátano, pera; acetato de isobutilo, plátano; acetato de hexilo, manzana madura; y acetato 2-feniletilo, miel, afrutado, floral) (Thurston et al., 1981); y los ésteres etílicos de ácidos grasos saturados (butanoato de etilo, manzana; hexanoato o caproato de etilo, manzana, plátano; octanoato o caprilato de etilo, piña, pera; y decanoato o caprato de etilo, floral) (Baumes et al., 1986; Boulton et al., 1996). La presencia de algunos ésteres de acetato, como el acetato de isoamilo y acetato 2-feniletilo, confieren notas afrutadas acentuando la calidad del vino (Viana, 2011a), y la combinación de ambos ésteres de acetato conduce a una mejor percepción sensorial de las notas florales (Cacho, 2006). En general, los ésteres apolares se asocian al aroma frutal, floral y fresco de vinos jóvenes. En vinos blancos, la mezcla de estos compuestos contribuye a mejorar las notas afrutadas, mientras que en los vinos tintos contribuye a modular su calidad aromática (Ferreira et al., 1995). En cuanto a los ésteres etílicos de ácidos grasos de C_6 - C_{10} , la cantidad transferida desde la levadura al vino disminuye a medida que aumenta su tamaño, pasando al medio el 100% del hexanoato de etilo, el

54-68% del octanoato de etilo y el 8-17% del decanoato de etilo (Nykänen et al., 1977). En general, todos estos compuestos derivan fundamentalmente del metabolismo de los azúcares, los ésteres de acetato se sintetizan en reacciones entre alcohol y acetil-CoA, catalizadas por una alcohol acetil-transferasa (Peddie, 1990), y los ésteres de ácidos grasos se generan previa activación del correspondiente ácido graso por coenzima A, catalizada por alguna acil-CoA sintetasa (Nordström, 1964a, b). Los ésteres de ácidos grasos de cadena larga (C₈-C₁₄) son tóxicos para la levadura, con una fuerte actividad antimicrobiana, que además se intensifica si son insaturados (Bardi et al., 1998), por lo que los ésteres de cadena corta (C₂-C₆) podrían ser producidos a través del mismo proceso de detoxificación.

Los alcoholes superiores son los compuestos que más influyen cuantitativamente en el aroma del vino, engloba a todos aquellos alcoholes que poseen más de dos átomos de carbono y un peso molecular y punto de ebullición superior al etanol, su principal característica es olor penetrante. En concentraciones inferiores a 300 mg/L contribuyen a la complejidad del vino, y por encima de 400 mg/L tendrían un efecto negativo en la calidad (Nykänen, 1986). Se dividen en dos grupos: alifáticos, que incluye el propanol, isobutanol, hexanol y alcohol isoamílico, siendo éste último el más significativo cuantitativa y cualitativamente; y los alcoholes aromáticos que incluyen el tirosol y el 2-feniletanol. Independientemente de la influencia que puedan ejercer por sí mismos sobre las propiedades organolépticas del vino, la importancia enológica de los alcoholes superiores también radica en ser los precursores de los ésteres de acetato (Soles et al., 1982). Durante la producción de vino estos compuestos se pueden generar mediante dos vías, una de ellas es la conversión de aminoácidos de cadena lateral ramificada (valina, leucina, isoleucina y treonina), por lo que los niveles de estos compuestos están muy influidos por las cantidades y tipos de fuentes nitrogenadas en el mosto (Giudici et al., 1993). Esta vía implica transaminación para proporcionar el α -cetoácido correspondiente al aminoácido, seguida por reducción de éste a alcohol. En realidad la mayoría de los alcoholes superiores se producen *de novo* a partir de azúcares, mediante la formación inicial de los correspondientes cetoácidos (Carrascosa et al., 2005).

Los compuestos carbonílicos también son un grupo aromático importante. Los principales son el acetaldehído, con un límite en el vino de 100 mg/L, y el diacetilo, para el que no se admiten concentraciones superiores a 1-4 mg/L. Estos compuestos se generan a partir de dos cetoácidos procedentes de la síntesis o degradación de aminoácidos o alcoholes superiores. En vinos blancos, la presencia de acetaldehído es

indicativa de oxidación, el proceso de conversión de etanol en acetaldehído, en presencia de oxígeno se conoce como maderización, produciendo el típico sabor a almendra amarga de los vinos dulces fortificados de Madeira. El diacetilo produce un agradable aroma dulce de azúcar con mantequilla en bajas concentraciones, pero se vuelve desagradable entre 1-4 mg/L (Sponholz, 1993). La mayoría del diacetilo producido procede de la actividad metabólica de bacterias lácticas, *Pediococcus* y *Lactobacillus* producen altas concentraciones de diacetilo, y *Oenococcus oeni* produce concentraciones menores (0,15-4 mg/L) (Bartowsky and Henschke, 1995). El diacetilo es un compuesto muy inestable, fácilmente metabolizado por *S. cerevisiae* a 2,3-butanodiol y acetoína, la concentración final de diacetilo dependerá del balance entre su formación y su tasa de degradación (Swiegers and Pretorius, 2005).

La acidez volátil de un vino incluye el ácido acético, los ácidos grasos de cadena corta (C₈, C₁₀ y C₁₂) y los ácidos grasos de cadena larga (C₁₆ y C₁₈). El contenido de acidez volátil en el vino constituye un 10-15% del contenido de acidez total, siendo el ácido acético el principal en un 90% (Henschke and Jiranek, 1993; Radler, 1993), que no debe superar los 1-1,5 g/L (Eglinton and Henschke, 1999). El acético es producido por *S. cerevisiae* como un intermediario en la ruta de la piruvato deshidrogenasa, responsable de la conversión del piruvato en acetyl-CoA a través de una serie de reacciones catalizadas por la piruvato descarboxilasa, acetaldehído deshidrogenasa y acetyl-CoA sintasa. Esta ruta es la única fuente de acetyl-CoA citosólica necesaria para procesos anabólicos como la biosíntesis de lípidos (Flikweert et al., 1996; Pronk et al., 1996). Aunque *Saccharomyces* puede producir ácido acético, las altas concentraciones en el vino son el resultado del metabolismo del etanol por parte de las bacterias acéticas; entre ellas *Gluconobacter oxydans*, *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus*, *Gluconobacter liquefaciens* y *Gluconobacter hansenii* están normalmente asociadas a las uvas y al vino (Du Toit and Lambrechts, 2002; Du Toit and Pretorius, 2002). En la reacción de oxidación de etanol a ácido acético, la enzima alcohol deshidrogenasa oxida el etanol a acetaldehído, el cual es fácilmente oxidado a acetato por otra enzima, la aldehído deshidrogenasa (Du Toit and Pretorius, 2002).

Los fenoles volátiles son importantes para el gusto, color y olor de los vinos (Dubois, 1983). Los más importantes son los vinilfenoles (4-viniguaiacol y 4-vinilfenol) en vinos blancos y los etilfenoles (4-etilguaiacol y 4-etilfenol) en los tintos (Chatonnet et al., 1997; Etievant, 1981; Singleton and Esau, 1968). El mosto presenta pequeñas trazas de fenoles volátiles, aumentando su concentración en los vinos durante la

fermentación (Lambrechts and Pretorius, 2000). Algunas levaduras como *Brettanomyces bruxellensis* y *Dekkera bruxellensis* se conocen por su producción de fenoles volátiles (Chatonnet et al., 1993; Du Toit and Pretorius, 2000; Du Toit et al., 2005). Términos como medicinal, farmacéutico, orina de ratón, perro mojado, ahumado, especiado, rancio y metálico describen el aroma y el sabor de vinos afectados por este tipo de levaduras. Las bacterias lácticas también podrían ser responsables de la formación de fenoles volátiles en los vinos, que junto con las acéticas intervienen en la formación de 4-vinilfenol. Sin embargo, no está claro que las bacterias lácticas jueguen algún papel en la formación de etilfenoles (Chatonnet et al., 1992). Otros factores como el envejecimiento en barrica podrían incrementar el número de fenoles volátiles en el vino, la concentración de 4-etilguaiacol y 4-etilfenol muestra un acusado incremento durante el envejecimiento en barrica (Pollnitz et al., 2000).

Las lactonas son una familia de compuestos aromáticos relacionados con los hidroxiácidos, se obtienen de la esterificación intramolecular de estos compuestos. Los 4-hidroxiácidos dan lugar a gamma-lactonas y los 5-hidroxiácidos a delta-lactonas. En el vino se han detectado algunas delta-lactonas (delta-C₅, C₈-C₁₀ y C₁₂) en concentraciones de µg/L muy inferiores a su umbral de detección (Baumes et al., 1986; Etievant, 1991; Etievant and Bayonove, 1983). Las más abundantes son las gamma-lactonas, agrupándose en dos clases según su origen (Etievant, 1991; Muller et al., 1973), la primera clase agrupa a las gamma-butirolactonas sustituidas o no en posición 4 por grupos etoxi e isopentiltoxi, por grupos acetilos, 1-hidroxietilo y carbetoxi; y la segunda clase agrupa a las alquil-gamma-lactonas (gamma-C₅ a C₁₀ y C₁₂), la 2-hidroxi-3,3-dimetil-gamma-butirolactona (pantolactona) y la 2-hidroxi-3-metil-2-penteno-gamma-lactona (sotolón). Excepto el sotolón, formado por levaduras de flor en el vino o por *Botritis cinérea* en la uva (Sponholz, 1993), todas las lactonas se producen durante la fermentación. Las gamma-butirolactonas tienen como origen común los ácidos 2-oxoglutárico y 4-oxobutírico (Fagan et al., 1981). Cuantitativamente las tres lactonas más abundantes son la gamma-butirolactona, 4-carbetoxi-gamma-butirolactona y 4-etoxi-gamma-butirolactona, cuyas concentraciones, sobre todo en los vinos de levaduras de flor, pueden llegar a mg/L, las concentraciones de las demás son del orden de algunos µg/L.

Por último, los compuestos del azufre contribuyen significativamente al aroma del vino debido a su elevada reactividad, aunque en algunos casos son responsables de aromas indeseables (col, huevos podridos, ajo, cebolla, goma quemada etc.). Se dividen

en cinco categorías: tioles (mercaptanos), sulfuros, polisulfuros, tioésteres y compuestos heterocíclicos (Mestres et al., 2000; Rauhut, 1993). El principal es el sulfuro de hidrógeno (también denominado ácido sulfhídrico y/o H_2S), cuyo límite aceptable está en 10-100 $\mu g/L$. El origen de este compuesto se encuentra en el sulfato del medio y en el azufre elemental generado a partir de fungicidas, y su formación por las levaduras está relacionada con el metabolismo del nitrógeno y del azufre (Mestres et al., 2000; Rauhut, 1993). El sulfuro de hidrógeno es producido por levaduras como resultado del metabolismo del azufre al actuar como intermediario en la biosíntesis de aminoácidos azufrados, y que además parece estar en parte genéticamente determinado ya que diferentes estirpes de levaduras producen diferentes cantidades de sulfuro de hidrógeno en las mismas condiciones (Henschke and Jiranek, 1993). En la ruta metabólica SRS (secuencia de reducción de sulfato) el sulfato es importado hacia el interior de la levadura a través de sulfato permeasas, posteriormente reducido a sulfuroso en distintas etapas utilizando varias enzimas (ATP-sulfurilasas y sulfuro reductasas), y después se combina con dos aminoácidos (O-acetilserina o O-acetilhomoserina) para formar cisteína y metionina. La ruta metabólica SRS es inducida siempre que hay una demanda metabólica de estos aminoácidos, que suelen ser limitantes en la uva, por lo que si la fuente de nitrógeno es limitante, los precursores de estos aminoácidos también lo serán, la ruta SRS será activada pero se parará en la etapa de sulfuro, convirtiéndose después en H_2S (Thomas and Surdin-Kerjan, 1997). También se ha descrito la liberación de este compuesto cuando las levaduras entran en autólisis generalmente al final de la fermentación (Suomalainen and Lehtonen, 1979). El sulfuro de hidrógeno es una molécula altamente reactiva, que puede formar parte de muchas reacciones que generan compuestos que afectan el flavor del vino, como el dimetilsulfuro producido por un mecanismo de escisión (del S-metil-L-metionina a homoserina y dimetilsulfuroso), considerado beneficioso a bajas concentraciones durante el envejecimiento en botella, con aromas a espárragos, maíz y melazas (Rauhut, 1993), y umbrales de 25 $\mu g/L$, en vino blanco, y 60 $\mu g/L$ en tintos. Otros compuestos que pueden influir en el aroma de los vinos son los metil- y etil-mercaptanos, este último descrito como cebolla o goma quemada con un umbral de 1,2 $\mu g/L$ en el vino (Goniak and Noble, 1987). Se ha sugerido que éstos compuestos proceden del metabolismo de la metionina de la levadura; sin embargo probablemente los productos liberados de la metionina y los residuos de los pesticidas también sean fuentes importantes de mercaptanos en los vinos (Rauhut, 1993).

I.3.3. Determinación de compuestos volátiles.

El interés por conocer la composición de los aromas ha estado siempre presente en Enología, sin embargo su estudio no ha sido posible hasta hace relativamente poco tiempo, debido a la inexistencia de métodos analíticos capaces de determinar la constitución en compuestos minoritarios, de manera que sólo la cata era el procedimiento útil para discernir sobre este tipo de compuestos (Fernández Cedrón, 2004). Los procedimientos de aislamiento de los compuestos volátiles del vino están basados en distintas propiedades físico-químicas como la volatilidad, la solubilidad en distintas fases orgánicas inmiscibles con la matriz y la capacidad de ser adsorbidos selectivamente sobre ciertos materiales. Los compuestos mayoritarios no necesitan su preconcentración a partir de los vinos, sin embargo hay otro grupo, que se encuentran en concentraciones tan pequeñas que necesitan ser extraídos y concentrados para poder ser determinados, éstos son los volátiles minoritarios, que son la mayoría exceptuando metanol, etanol, los alcoholes superiores, acetato de etilo, acetaldehído, formiato de etilo, otros ésteres, propanal, 2,3 butanodiol, glicerina, y los ácidos que contribuyen a la acidez volátil. Los volátiles minoritarios tienen una especial importancia dentro de los compuestos aromáticos, ya que se les atribuye un papel muy destacado como principales responsables en la diferenciación de los distintos vinos (Fernández Cedrón, 2004). Aunque se encuentran en baja concentración, presentan entre ellos grandes diferencias de concentración, de umbrales de detección, amplio rango de puntos de ebullición y una alta reactividad y labilidad química (Bemelmans, 1979) .

La cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa introducida en 1952 (James and Martin, 1952) ha permitido la separación de estos compuestos presentes en una mezcla. El principio de separación en un cromatógrafo de gases (GC) consiste en una serie de particiones entre una fase móvil gaseosa y una fase estacionaria que puede ser un sólido adsorbente, un líquido retenido en un soporte sólido (como es el caso de las columnas empaquetadas) o un líquido impregnando la pared interna de una columna capilar. La mezcla a separar, una vez volatilizada, se hace pasar a través de la columna con la ayuda de un gas inerte, basándose la separación en la distinta velocidad de los compuestos a su paso por ésta, los cuales van llegando a continuación al sistema de detección. En cuanto a los detectores existen muchos tipos, pero el más usado actualmente para la identificación de compuestos químicos en una mezcla son los detectores de espectrometría de masa (MS). Su principio de funcionamiento radica en la medición entre masa y carga de iones de gases (m/z), los cuáles son separados en

ambientes de alto vacío por campos magnéticos o eléctricos. La detección de estos iones genera el espectro de masa del compuesto, que es único para cada compuesto químico y consiste en una representación gráfica de las abundancias detectadas de cada ión respecto a su m/z (Kitson et al., 1996; Siuzdak, 1996). Además del detector MS, otro detector utilizado es el de ionización de llama (Flame Ionization Detector FID). En este detector se incorpora una llama de aire/hidrógeno en el paso del gas que sale de la columna, donde los compuestos combustionados al pasar cerca de la llama, provocan una corriente que fluye entre dos electrodos en el detector, señal que es amplificada posteriormente. La identificación de los compuestos por medio de este tipo de detector se basa en el uso de los tiempos de retención (Retention Times, RT), que son definidos como los tiempos en que un compuesto químico es detectado al final de la columna cromatográfica. La señal eléctrica del detector representada en el tiempo es el cromatograma obtenido de la muestra, donde se supone que cada pico se relaciona con un compuesto químico en particular. La posición de los picos (tiempo de retención) se utiliza con fines cualitativos, mientras que el área o la altura de los mismos se relacionan con la concentración de los compuestos.

La CG es muy útil cuando pretendemos identificar los compuestos que determinan una característica aromática conocida, pero además es necesario conocer los umbrales a partir de los cuales el producto mejora o empeora la calidad del vino. Es importante determinar el umbral olfativo para determinar la importancia de un compuesto presente en el vino por medio del uso de unidades de aromas o unidades activas de un aroma (Odor Activity Value, OAV). Este concepto fue introducido en los años 60 (Guadagni et al., 1966) y se define como aquella concentración de un compuesto que resulta suficiente para reconocerlo por su olor. Se mide como valor de la actividad aromática de un compuesto “x” y se calcula de acuerdo a la siguiente ecuación: $OAV=C_x/A_x$, donde C_x es la concentración del compuesto “x” en el vino; A_x es la concentración umbral olfatoria del compuesto x en el vino. Se puede distinguir entre aromas activos e inactivos, según el valor de actividad aromática de un compuesto en una matriz determinada. Los compuestos aromáticos cuyo OAV es superior a 1 se consideran compuestos activos, etanol, lactatos de los alcoholes superiores, acetato de etilo, ésteres etílicos de ácidos grasos C_6 , C_8 y C_{10} y alcoholes isoamfílicos se encuentran normalmente entre 1 y 20; 3-hidroxipropionato de etilo, isobutanol, feniletanol, hexanol, nanolactona, 1,1-dietoxietano, 4-etilfenol, 4-etilguaiacol, y 2,3-butanodiona entre 0,1 y 2; y, ácidos isobutírico, hexanóico, octanóico y decanóico, 3-

hidroxibutanona, benzaldehído, sulfuro de dimetilo, metionol y eugenol entre 0,001 y 1 OAVs (Etievant, 1991).

I.4. La importancia de la fermentación maloláctica en Extremadura.

Un vino rico en ácido málico es considerado biológicamente inestable, al ser éste un sustrato fácilmente metabolizable por determinados microorganismos, principalmente bacterias lácticas y algunas levaduras fermentativas. Además, la elevada acidez málica de mostos y vinos origina desequilibrios organolépticos que se hacen patentes en el sabor verde y duro de este ácido dicarboxílico. Debido a esto, la disminución de la acidez total en vinos ricos en este ácido ha constituido uno de los procesos técnicos más estudiados en enología, considerándose indispensable para suavizar los vinos verdes de zonas frías y en zonas cálidas con riego controlado. Sin embargo, las dos vías biológicas posibles de desacidificación, la fermentación maloalcohólica y la fermentación maloláctica, condicionan la acidez y aromaticidad del vino.

El ácido L-málico es el isómero que se encuentra en la uva localizado esencialmente en la pulpa, y es el responsable del sabor verde y ácido, en regiones frías pueden oscilar entre 2-5 g/L, mientras que en zonas cálidas generalmente se encuentra por debajo de 2 g/L (Bauer and Dicks, 2004). La concentración de ácido málico de la uva disminuye constantemente durante la maduración debido a fenómenos de migración y combustión, dependiendo activamente de las condiciones meteorológicas del verano en cada microclima, de la fecha de cosecha, y de la vinífera. El conocimiento de la evolución de la acidez de la uva en el curso de la maduración tiene gran importancia para la futura composición química del mosto y del vino, y su repercusión en los caracteres organolépticos (Suárez Lepe, 1997).

En general, el transporte de málico a través de la membrana plasmática y su degradación por microorganismos es de gran interés en muchos procesos agroalimentarios, especialmente en los que participan las levaduras fermentativas. Solamente algunas levaduras pueden utilizarlo como única fuente de carbono y energía, *Candida sphaerica* (Côte-Real et al., 1989), *Hansenula anomala* (Côte-Real and Leão, 1990) y *Candida utilis* (Cássio and Leão, 1993). En estos casos, la forma disociada del ácido atraviesa la membrana plasmática por simportes protónicos que son inducibles y sometidos a represión por glucosa. Otras levaduras como *Zygosaccharomyces bailii* (Rodríguez and Thornton, 1990) y *Schizosaccharomyces pombe* (Sousa et al., 1992) sólo pueden metabolizar el ácido L-málico en presencia de una fuente de carbono

asimilable (Osothsilp and Subden, 1986). En este caso, la forma disociada atraviesa la membrana de manera activa, mientras que la forma no disociada atraviesa la membrana por difusión simple (Baranowski and Radler, 1984; Osothsilp and Subden, 1986; Sousa et al., 1992).

Lamentablemente, las levaduras *S. cerevisiae*, fundamentales en la fermentación del mosto, casi no metabolizan el L-málico de la uva debido a que carecen de un transportador activo (Grobler et al., 1995; Volschenk et al., 1997) y a la baja afinidad por el sustrato de su enzima málico dependiente de NAD ($K_m \frac{1}{4} 50 \text{ mM}$) (Fuck et al., 1973), que además está sometida a represión catabólica (Redzepovic et al., 2003). El resultado es que los cambios en la acidez total del vino durante la fermentación alcohólica con *S. cerevisiae* son mínimos (Gao and Fleet, 1995). Esto requiere la reducción posterior controlada del ácido málico cuando está en exceso para elaborar vinos equilibrados.

Una opción es la desadificación química precipitando los principales ácidos orgánicos mediante adicción de calcio, potasio u otros cationes produciendo una sal insoluble; y otra añadir zumo de uva o azúcar al vino para enmascarar el sabor del ácido málico. El aspecto negativo de sendos tratamientos es que ambas alternativas alteran las características y calidad del vino, quedando cantidades residuales de ácido málico por un lado que pueden soportar el crecimiento de bacterias contaminantes a menos que se añadan dosis elevadas de sulfitos. Además, la desadificación química hace precipitar otros componentes de calidad, como la fracción aromática, por lo que los vinos quedarían vacíos con sensaciones acuosas en boca aumentando la sequedad del mismo. De forma natural, la desadificación del vino se suele realizar biológicamente mediante fermentación maloláctica, que consiste en la conversión del ácido L-málico en ácido L-láctico y CO_2 normalmente por bacterias lácticas pertenecientes a los géneros *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Oenococcus*. La fermentación maloláctica aporta nuevos matices aromáticos, la producción de diacetilo favorece a la complejidad del vino con toques a dulce de mantequilla que resultan rancios e indeseables cuando superan ciertos niveles (1-4 mg/L) (Sponholz, 1993), la formación de ésteres etílicos como el lactato de etilo y el succinato de dietilo, aportan al vino volumen y redondez con toques lacteados, el aumento de acidez volátil suele ocurrir al final de la fermentación maloláctica (Suárez Lepe, 2003) y el incremento de 3(metilsulfanil)propiónico a partir de la metionina aumenta el aroma a tostado-chocolate (Pripis-Nicolau et al., 2004). Aunque esta técnica es la más extendida en todas las

regiones vitivinícolas del mundo, presenta una serie de inconvenientes como la degradación de terpenos y alteración de los aromas tales como yogur rancio, sudor, fósforos quemados y fruta podrida, y una pérdida de equilibrio y complejidad, así como la formación de aminas biógenas potencialmente perjudiciales para la salud.

Otra alternativa biológica aún en desarrollo es inocular el mosto con levaduras fermentativas capaces de degradar el ácido L-málico. Se puede utilizar *S. pombe*, que degrada completamente el L-málico y produce etanol mediante fermentación maloalcohólica, o *Saccharomyces malidevorans*, capaz de degradar parcialmente el L-málico durante la elaboración del vino (Thornton, patente de EE.UU. N° 4.830.968). *S. pombe* se puede utilizar como células inmovilizadas para la desacidificación biológica de los vinos (Silva et al., 2003) y ya está disponible comercialmente (Promalic®; Proenol, <http://www.proenol.com/>). El problema es que estas dos levaduras producen sabores desagradables y originan vinos de mala calidad. También se ha propuesto utilizar *Issatchenkia orientalis* con la misma finalidad para degradar ácido málico mediante fermentación maloalcohólica en cultivos mixtos con *S. cerevisiae* (Kim et al., 2008).

Por otra parte, se ha intentado hibridar o combinar genomas de levaduras vínicas *S. cerevisiae* con otras especies de levaduras que metabolizan el L-málico mediante fusión de protoplastos (Carrau et al., 1982; Svoboda, 1980); patente de USA N° 5.330.774 de Carrau y col.) o transformación (Lautensach and Subden, 1984; Williams et al., 1984), aunque esta estrategia no ha tenido el éxito esperado en la elaboración industrial de vino. Profundizando en esta estrategia, se han obtenido levaduras transgénicas *S. cerevisiae* capaz de realizar simultáneamente la fermentación alcohólica y la fermentación maloláctica o la malo-alcohólica. Se ha clonado y caracterizado el gen maloláctico (*mleS*) de *Lactobacillus delbrueckii* (Williams et al., 1984) y *Lactococcus lactis* (Ansanay et al., 1993; Denayrolles et al., 1995) y se ha introducirlo y expresado en *S. cerevisiae*. Lamentablemente, aunque las levaduras recombinantes expresan el gen *mleS*, no degradan eficazmente el L-malato a L-lactato (Ansanay et al., 1993; Denayrolles et al., 1995; Williams et al., 1984). Más éxito se ha obtenido con una estirpe industrial de *S. cerevisiae* a la que se ha integrado en el genoma un cassette lineal de DNA en el locus *URA3* con el gen de la enzima malato permeasa de *S. pombe* (*mae1*) y el gen de la enzima maloláctica de *Oenococcus oeni* (*mleA*) bajo el control del promotor constitutivo *PGK1* y con secuencias terminadoras de *S. cerevisiae*. Esta levadura transgénica “maloláctica”, ML01, es capaz de descarboxilar totalmente 5,5 g/L de L-málico en mosto de uva Chardonnay durante la fermentación alcohólica,

previniendo la formación de aminos biológicas indeseables en una posterior fermentación maloláctica bacteriana (Husnik et al., 2006). A pesar de este evidente éxito, y de que la levadura ML01 se comercializa ya en algunos países, su uso no está generalizado por las restricciones legales de cada país y el rechazo de consumidores y activistas al uso de microorganismos transgénicos en la industria alimentaria.

I.5. Fermentación alcohólica espontánea e inoculada con levaduras: importancia de la biodiversidad microbiana en la calidad del vino.

La fermentación del mosto constituye un complejo proceso microbiológico y bioquímico en el que las levaduras, responsables de la fermentación alcohólica, transforman los azúcares del mosto en etanol, dióxido de carbono y un gran número de productos secundarios (Fleet and Heard, 1993) además de desprender bastante calor. Estos compuestos secundarios, aunque minoritarios, son importantes desde el punto de vista sensorial. Como ya mencionamos en el **Apartado I.3.2**, se trata de ésteres etílicos y de acetato, alcoholes superiores, ácidos volátiles, compuestos carbonílicos, fenoles volátiles, compuestos que contienen azufre y tioles. Además, cuando es necesario, la fermentación maloláctica llevada a cabo por las bacterias lácticas, no solo contribuye a la desacidificación del vino sino que además produce compuestos que mejoran el perfil sensorial del vino (Lambrechts and Pretorius, 2000; Swiegers and Pretorius, 2005). Durante la fermentación alcohólica, también se producen una serie de fenómenos bioquímicos colaterales, que tiene una gran importancia en el desarrollo de la misma y en la composición del vino; tales como la fermentación gliceropirúvica, el catabolismo y anabolismo de los aminoácidos, y el metabolismo de los compuestos azufrados.

Tradicionalmente, la fermentación del mosto ha sido un fenómeno espontáneo, realizado por los microorganismos silvestres que se encuentran en la superficie de la uva y en bodega, normalmente transportados por el viento e insectos (Angulo et al., 1994; Peynaud, 1993; Ribereau-Gayon et al., 1989). En el comienzo de la vendimia, las uvas son la principal fuente de levaduras indígenas en los mostos. El número de levaduras sobre la superficie de un grano de uva oscila entre $10-10^3$ UFC/mL en uvas inmaduras, incrementándose esta cantidad a 10^4-10^6 UFC/mL en uvas maduras (Fleet, 2003). Los principales factores que condicionan el crecimiento de *Saccharomyces* durante la fermentación alcohólica son la localización (Bisson and Kunkee, 1991; Boulton et al., 1996; Jackson, 2008; Jolly et al., 2006), condiciones sanitarias (Barcenilla J and V, 1989; Guerzoni et al., 1982; Loureiro and Malfeito-Ferreira, 2003;

Zambonelli, 1988), condiciones climáticas (Briones et al., 1995; Longo et al., 1991; Querol et al., 1990), grado de maduración en el momento de vendimiar (Angulo et al., 1994; Farris et al., 1990; Goto and Gokotsuka, 1977), variedad de uva (Angulo et al., 1994), productos fitosanitario (Oliva et al., 2006; Quesada, 1994), daños físicos debidos a insectos o pájaros (Guerzoni and Marchetti, 1987; Longo et al., 1991) y composición físico-química del suelo (Briones et al., 1995; Farris et al., 1990; Longo et al., 1991). Cuando los mostos no son inoculados, la fermentación es iniciada por varias especies de bajo poder alcoholígeno y cierto poder oxidativo, las levaduras apiculadas (*Kloeckera apiculata* y/o su equivalente sexual *Hanseniaspora uvarum*) son las predominantes en uva y mosto, seguidas de especies de *Candida* (fundamentalmente *C. pulcherrima* y/o su equivalente sexual *Metschnikowia pulcherrima* y *C. stellata*), levaduras formadoras de velo como *Pichia sp* (*P. membranifaciens*), *Debaryomyces* y, en menor medida, *Hansenula* (*H. anomala*), *Kluyveromyces*, *Brettanomyces*, *Cryptococcus* y la levadura rosa *Rhodotorula minuta* (Fleet and Heard, 1993; Jolly et al., 2006; Pretorius, 2000b; Suárez and Iñigo, 1992). Estas levaduras pueden crecer hasta poblaciones totales de 10^6 - 10^7 UFC/mL durante los 2 o 3 primeros días de fermentación. Seguidamente comienzan a morir debido al aumento de la concentración de etanol en el medio, dando paso a levaduras más resistentes y con mayor poder fermentativo como *Zygosaccharomyces*, *Torulaspora* y *Saccharomyces* (Beltran et al., 2002; Constantí et al., 1997; Fleet and Heard, 1993; Jolly et al., 2006). La fermentación es terminada por distintas estirpes de *S. cerevisiae*, que aumentan gradualmente su población desde el principio hasta constituir prácticamente el 100% de las levaduras en fermentación tumultuosa. Por tanto, la mayoría del etanol es producido básicamente por *Saccharomyces*, y en especial *S. cerevisiae*. Esta sucesión de especies se repite sistemáticamente, con ligeras variaciones, en las fermentaciones analizadas en todo el mundo, tal y como se deduce de los trabajos publicados al respecto (Beltran et al., 2002; Constantí et al., 1997; Fleet and Heard, 1993; Garijo et al., 2008; Giudici and Kunkee, 1994; Jolly et al., 2006; Jolly et al., 2003b; Maturano et al., 2015; Pateraki et al., 2014; Raspor et al., 2006; Regodón et al., 1997; Rementeria et al., 2003; Salvadores and Cardell, 1993; Sangorrín et al., 2007; Santamaría et al., 2005; Schuller and Casal, 2007; Sipiczki et al., 2001; Torija et al., 2001).

En los últimos años se observa una mayor tendencia a realizar las fermentaciones con inóculos de levaduras seleccionadas, generalmente del género *Saccharomyces*, con el fin de obtener resultados satisfactorios y reproducibles en la calidad de los vinos

(Caridi A et al., 2002; Pretorius, 2000b; Valero et al., 2005). La producción de las primeras levaduras secas (LSA) para vinificación se remonta a mediados de los años 60. Desde entonces se han extendido los programas para selección de levaduras vnicas aumentando considerablemente las cepas comerciales de levaduras bien caracterizadas disponibles en el mercado (Khachatourians, 1995; Schuller and Casal, 2005). En la actualidad, las investigaciones al respecto se dirigen fundamentalmente en tres sentidos (Degre, 1993):

1) Aislamiento de nuevas cepas locales, mejor aclimatadas a cada región productora, que permitan satisfacer las necesidades de cada industrial bodeguero.

2) Obtención de cepas con propiedades específicas interesantes como: cepas floculantes, que se separen mejor de los vinos facilitando la clarificación; cepas con actividad β -glucosidasa, capaces de liberar terpenos responsables de aromas primarios varietales que mejoran las características organolépticas de ciertos vinos, etc. (Masque et al., 1995; Pérez-González et al., 1993; Rodríguez et al., 2004).

3) Introducción de marcadores genéticos específicos en las cepas seleccionadas para determinar y controlar el crecimiento de las mismas en mostos no estériles. Esto permite saber si la cepa inoculada es realmente el agente mayoritario de la fermentación alcohólica frente a las levaduras silvestres presentes en el mosto (Ambrona et al., 2006; Ambrona et al., 2005b; Delteil and Aizac, 1988; Pérez et al., 2000; Petering et al., 1991; Vezinhet, 1985; Vezinhet and Lacroix, 1984).

Cuando se añade al mosto un cultivo de levadura seleccionada, cuya concentración se encuentra en exceso frente a las levaduras silvestres, esta se convierte en el agente dominante durante la fermentación (Álvarez, 2005; Fleet and Heard, 1993; Querol et al., 1992a). Aunque no cabe descartar la contribución de las levaduras silvestres al sabor y aroma de los vinos (Heard and Fleet, 1985; Lema et al., 1996; Reed and Nagodawithana, 1988), la levadura dominante es la que aporta la mayoría de los aromas secundarios, es decir, los producidos durante la fermentación. Según la levadura empleada en la fermentación del mosto, se producirán unos u otros compuestos que contribuirán a la calidad final del vino; y por tanto, a los resultados de las evaluaciones sensoriales (Heard and Fleet, 1986). Dichos compuestos, volátiles y no volátiles, se producen como consecuencia del metabolismo de las levaduras durante la fermentación. La cantidad producida de estos compuestos depende de los factores que determinan el crecimiento de la levadura (composición del mosto, temperatura, aireación, etc.), y de factores genéticos estables característicos de cada cepa específica de levadura. Esta

fuerte correlación existente entre los metabolitos producidos durante la fermentación y la levadura utilizada, ha conducido a la selección y utilización de estirpes que producen un aroma y sabor más agradable (Houtman and du Plessis, 1985; Parish and Carroll, 1987). Las levaduras seleccionadas deben estar preparadas para fermentar en las condiciones ambientales que se van a encontrar (tipo de mosto, prácticas enológicas, climatología, etc.) (Castino, 1994). Es importante considerar este aspecto cuando se ha seleccionado una levadura en lugares con mostos ricos en nutrientes (Francia, países nórdicos, zonas atlánticas en general) y se pretende utilizar en zonas con mostos habitualmente más pobres, como es el caso de toda la zona mediterránea (Delteil and Lozano, 1995). Por tanto, aunque existen levaduras secas activas (LSA) comerciales teóricamente apropiadas para realizar vinificaciones, resulta mucho más adecuado utilizar cepas autóctonas (locales) seleccionadas (Castino, 1994; Degre, 1993; Melero, 1992; Pérez-Nevado et al., 2006; Querol et al., 1992b; Suárez and Iñigo, 1992).

La mayoría de las levaduras secas activas comercializadas en Extremadura son de origen francés, y están aclimatadas a otras condiciones ambientales, por lo que son desplazadas frecuentemente por levaduras autóctonas no seleccionadas presentes en el mosto, que están mejor aclimatadas a las características ambientales de la zona. La utilización de levaduras locales seleccionadas, mejor aclimatadas a las condiciones ambientales de la zona productora en cuestión, aseguraría su implantación como agente biológico más importante responsable de la fermentación alcohólica, aún en presencia de las levaduras silvestres presentes en los mostos no estériles. Por otra parte, la utilización de levaduras locales seleccionadas puede asegurar el mantenimiento de las características propias típicas de los vinos de la zona, aspecto muy importante a considerar por el industrial bodeguero que comercializa la mayoría de su producción en origen. En la actualidad se están comercializando en la región dos levaduras autóctonas seleccionadas, EX88 y E7AR1 (Pérez-Nevado et al., 2006; Pérez et al., 2000; Regodón, 1997; Regodón et al., 1997), como levadura fresca.

I.6. Utilidad de las levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* en la mejora de la calidad del vino.

A pesar de las ventajas que ofrecen las fermentaciones inoculadas con levaduras vínicas seleccionadas del género *Saccharomyces* (Fleet and Heard, 1993; Ribèreau-Gayon, 1985; Suárez, 1990), se ha constatado que el control del proceso de fermentación va siempre acompañado de una pérdida de tipicidad de los vinos, lo que

no sucede con las fermentaciones espontáneas. Los compuestos producidos por las levaduras durante la fermentación pueden variar y ser característicos de cada estirpe, determinando así la calidad final del vino y, con ello, los resultados de las evaluaciones sensoriales (Heard and Fleet, 1986). Por tanto, existe una controversia dentro del ámbito enológico relativo al empleo de fermentaciones espontáneas o inoculadas, particularmente respecto a la complejidad organoléptica de los vinos.

Estudios recientes sugieren que algunas levaduras no-*Saccharomyces* pueden ser utilizadas para corregir ciertos defectos del vino o para intensificar o mejorar sus propiedades organolépticas, y conseguir así productos más originales y diferenciados. El principal origen de esta mejora de la complejidad aromática de los vinos parece ser la sucesión de poblaciones de levaduras distintas durante la fermentación alcohólica con alternancia de levaduras no-*Saccharomyces* y *Saccharomyces*. A diferencia de las levaduras *Saccharomyces*, las no-*Saccharomyces* secretan al medio más enzimas (como estererasas, glicosidasas, lipasas, proteasas, celulasas, etc.), que degradan ciertos componentes del mosto mejorando algunos procesos tecnológicos (como la maceración, filtración, clarificación, rendimiento alcohólico, extracción de color, etc.) y, en potencia, la calidad aromática del vino. Algunas de estas levaduras no-*Saccharomyces* parecen tener efectos interesantes sobre el aroma y sabor (Ciani and Maccarelli, 1998; Ciani and Picciotti, 1995; Herraiz et al., 1990a; Moreno et al., 1991), además de producir baja cantidad de compuestos indeseables en el vino como acetaldehído, acetoína, ácido acético, y acetato de etilo (Cabrera et al., 1988; Ciani and Ferraro, 1998; Herraiz et al., 1990a; Martinez et al., 1990). Por esta razón se ha evaluado su utilidad para reducir la acidez volátil del vino co-inoculadas con levaduras *Saccharomyces* en cultivos mixtos o de forma secuencial (Ciani et al., 2006; Ciani and Picciotti, 1995; Herraiz et al., 1990a), y de manera singular en vinos elaborados con mostos muy ricos en azúcar (de 350 a 450 g/L) procedentes de uvas botritizadas (Laffon-Lafourcade et al., 1981).

La evaluación de la utilidad de las levaduras no-*Saccharomyces* en la elaboración de vino se realiza normalmente mediante co-inoculación (secuencial o simultánea) con levaduras *Saccharomyces* en fermentaciones controladas. El mayor problema de este uso combinado de diferentes especies de levaduras es que la participación de cada levadura y los resultados de la fermentación son imprevisibles, circunstancia que puede afectar de forma indeseada a la composición química y aromática del vino. En consecuencia, se requiere conocer mejor los efectos de las condiciones ambientales de la fermentación sobre las distintas levaduras y las interacciones entre las distintas

especies y estirpes de levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*; y utilizar las mejores condiciones y las posibles interacciones sinérgicas como una herramienta biotecnológica para controlar mejor el crecimiento de las distintas poblaciones de levaduras durante la fermentación del mosto (Ciani et al., 2010). Por ejemplo, se sabe que la limitación de oxígeno durante la fermentación influye más en la supervivencia de algunas levaduras no-*Saccharomyces*, como *Torulaspota delbrueckii* y *Klyveromyces thermotolerans*, que en *S. cerevisiae* (Hansen et al., 2001), que las interacciones entre células inhiben el crecimiento de estas dos levaduras, o que altas concentraciones de células de *S. cerevisiae* inhiben el crecimiento de *T. delbrueckii* y de *K. thermotolerans* (Hansen et al., 2001; Nissen and Arneborg, 2003; Nissen et al., 2003). A pesar de estas limitaciones, tanto *T. delbrueckii* (para mejorar la calidad organoléptica del vino) como *K. thermotolerans* (para acidificar biológicamente el vino, (Kapsopoulou et al., 2007), se pueden adquirir en el mercado (marcas Hansen, Lallemand o Laffort) para elaborar vino; aunque su utilidad práctica en bodegas comerciales está por confirmar y aún no son levaduras vínicas de uso generalizado. La casa Hansen vende una mezcla de levaduras, MELODY.nsac, compuesta por una estirpe de *S. cerevisiae*, para conseguir una fermentación alcohólica segura y fiable, y dos estirpes no-*Saccharomyces* (*T. delbrueckii* y *K. thermotolerans*) para mejorar el impacto organoléptico del aroma y la sensación en boca del vino (<http://www.chr-hansen.com/>). Por su parte, la casa Lallemand asume que la inoculación de levaduras no-*Saccharomyces* en monocultivo no permite concluir la fermentación (azúcares residuales < 2 g/L) en un tiempo razonable compatible con las exigencias de las actuales técnicas de vinificación, y al mismo tiempo no garantiza la ausencia de defectos sensoriales. Esto es como consecuencia de que, en las condiciones usuales de vinificación, estas levaduras no-*Saccharomyces* tienen una capacidad fermentativa limitada en comparación con las levaduras *Saccharomyces*, debido fundamentalmente a su menor capacidad de multiplicación y a sus necesidades específicas de micronutrientes y oxígeno. En consecuencia, Lallemand comercializa por separado una estirpe de *T. delbrueckii* y otra de *S. cerevisiae* en el kit Level²TD[®], y propone una inoculación del mosto secuencial, primero *T. delbrueckii* y 48 horas después *S. cerevisiae* con la adición de activador de fermentación para asegurar la disponibilidad de nutrientes y el correcto final de fermentación (<http://www.lallemand.com/>). Ambas casas comerciales aseguran resultados positivos y fermentaciones correctas. En estas condiciones de fermentación, las levaduras *T. delbrueckii* actuarían antes de la fermentación alcohólica en clara

competencia por los nutrientes con las levaduras *Saccharomyces* del mosto en la inoculación secuencial (según la propuesta de Lallemant), o con las levaduras *Saccharomyces* del mosto más las inoculadas (según la propuesta de Hansen), y serían remplazadas progresivamente por la estirpe inoculada de *S. cerevisiae* que dominaría la fermentación. En ningún caso *T. delbrueckii* llegaría a ser la levadura dominante de la fermentación. Su supuesta aportación positiva a la calidad del vino se limita al principio de fermentación, y esta aportación puede ser fácilmente modificada por las levaduras dominantes a partir de fermentación tumultuosa hasta el final. La cantidad de estas levaduras no-*Saccharomyces* al final de fermentación es muy pequeña, y la mayoría no son viables debido a su sensibilidad a concentraciones de alcohol superiores 10° (Hansen et al., 2001), aunque esta sensibilidad puede mejorar ligeramente si se añade al mosto ergosterol y tween 80 (Pina et al., 2004).

Los fundamentos en los que se basan las propuestas de estas casas comerciales están bien referenciados en la bibliografía. Así, se ha descrito que la sucesión de poblaciones de levaduras, con alternancia de la dominancia de levaduras no-*Saccharomyces* durante la primera fase de la fermentación alcohólica seguida de la dominancia de *Saccharomyces*, puede mejorar la complejidad aromática de los vinos (Ferraro et al., 2000; Zironi et al., 1993). También se ha demostrado que la reproducción experimental de estas dinámicas de poblaciones de levaduras mediante inoculación secuencial en vinificaciones experimentales, como las realizadas con *T. delbrueckii*, puede ser la clave de la complejidad aromática del vino. No obstante, la inoculación secuencial de levaduras en bodegas comerciales es menos operativa que la inoculación inicial de una mezcla de levaduras; aunque lamentablemente, para reproducir lo que ocurre en la fermentación espontánea haya que efectuar dos inoculaciones sucesivas para garantizar el crecimiento inicial de las levaduras no-*Saccharomyces* (Languet et al., 2005). Incluso así, la cinética de las fermentaciones inoculadas con múltiples levaduras depende mucho del nivel de persistencia de cada levadura durante el proceso. Si las levaduras no-*Saccharomyces* persisten demasiado tiempo en niveles altos pueden llegar vivas a las condiciones estresantes de final de fermentación (altas concentraciones de etanol y/o temperaturas bajas), pudiendo ocasionar paradas de fermentación o fermentaciones muy lentas (Ciani et al., 2006). En un trabajo muy reciente realizado con la intención de subsanar estos indeseables inconvenientes, se demuestra que las levaduras no-*Saccharomyces* combinadas con *S. cerevisiae* pueden incrementar los niveles de polisacáridos, glicerol y compuestos

volátiles y reducir la acidez volátil y total de los vinos. No obstante, y a pesar de estos interesantes resultados, el efecto global de estas levaduras no-*Saccharomyces* en la fermentación y la calidad del vino dependen estrictamente de la proporción de levaduras *Saccharomyces*/no-*Saccharomyces* del inóculo (Comitini et al., 2011), lo que nos obliga a optimizar el proceso para las condiciones concretas de cada vinificación en bodega. Además de esto, hay que considerar que, en general, las levaduras vínicas no-*Saccharomyces* crecen más lentamente y tienen menor vigor fermentativo que las *Saccharomyces*. Esto conlleva un coste adicional en su producción industrial y dificulta su utilización en bodega al requerir más tecnología, cuidados y tiempo para su correcto y exitoso uso en bodegas, lo que sin duda repercute en un incremento de los costes de elaboración del vino.

Otras levaduras no-*Saccharomyces* que se han ensayado a escala de laboratorio para la elaboración de vino son: *Cándida stellata* y *C. zemplinina*, por su capacidad para aumentar el contenido de glicerol y mejorar la composición analítica del vino (Andorrà et al., 2012; Ciani and Ferraro, 1996; Ferraro et al., 2000; Soden et al., 2000). La inoculación secuencial de *Candida cantarelli* y *S. cerevisiae* se ha utilizado para mejorar las características del vino Syrah (Toro and Vazquez, 2002). También se obtuvieron mejoras en el perfil aromático de vinos Chenin Blanc con combinaciones de *C. pulcherrima* y *S. cerevisiae* (Jolly et al., 2003a), en vinos Chardonnay con cultivos mixtos de *Candida membranifaciens* y *S. cerevisiae* (García et al., 2010), y en la fermentación de mosto Debina mediante inoculación secuencial de *Metschnikowia* y *Saccharomyces* (Parapouli et al., 2010). La combinación de *Debaryomyces vanriji* y *S. cerevisiae* aumentó la concentración de geraniol (García et al., 2002); la co-fermentación con *Pichia kluyveri* y *S. cerevisiae* incrementó los tioles varietales (Anfang et al., 2009); y el uso de inóculos secuenciales de *Pichia fermentans* y *S. cerevisiae* aumentó la concentración de ciertos componentes aromáticos (Clemente-Jimenez et al., 2005). Otras levaduras como *S. pombe* e *Issatchenkia orientalis* han sido investigadas por su capacidad de degradar el ácido málico (desacidificación biológica). La primera se usa como células inmovilizadas (Silva et al., 2003) y ya está disponible comercialmente (Promalic®; Proenol); la segunda, se ha utilizado en cultivos mixtos con *S. cerevisiae* (Kim et al., 2008).

Así mismo, diversos grupos continúan investigando sobre el potencial de distintas levaduras no-*Saccharomyces* para su aplicación en enología (Comitini et al., 2011; Cordero-Bueso et al., 2013; De Benedictis et al., 2011; Domizio et al., 2011; Viana,

2011b), en el caso concreto de *T. delbrueckii*, la especie de levadura más representativa en la industria del vino después de *S. cerevisiae*, se recomienda su uso en fermentaciones de mosto con alto contenido en azúcar por su baja producción de ácido acético en la elaboración de vinos dulces, como es el caso del vino Santo procedente de uva pasificada, y por su contribución de ciertos grupos químicos, como las lactonas asociadas a aromas de pastelería, fruta procesada o golosinas, mejorando el aroma de los vinos blancos (Azzolini et al., 2014); también se recomienda su uso en vino tinto en combinación con *S. cerevisiae*, aumentando el contenido de manoproteínas, la estructura y volumen en boca del vino (Belda et al., 2014). Por último, otro estudio realizado recientemente ha sugerido que el uso de cultivos mixtos *Torulaspota/Saccharomyces* está ligado al aumento de ésteres etílico específicos debido a la producción de *S. cerevisiae* en respuesta a la presencia de *T. delbrueckii* (Renault et al., 2015).

I.7. Las levaduras asesinas y su utilidad en Enología.

Uno de los criterios de selección y mejora genética de levaduras vínicas es el fenotipo killer o asesino. Las levaduras *S. cerevisiae* killer secretan una toxina proteica que mata a levaduras sensibles de la misma especie o especies relacionadas, pudiendo afectar a la fermentación de los mostos y a la calidad del vino (Pérez et al., 2001). Este criterio de selección ha sido aceptado solo recientemente por los enólogos, ya que pensaban que inocular los mostos con levaduras killer podría originar problemas al eliminar parte de las levaduras residentes de bodegas y viñedos, pudiendo dificultar las fermentaciones espontáneas. Sin embargo, este enfoque ha cambiado en los últimos años debido a que las levaduras killer silvestres son muy abundantes en nuestros viñedos y bodegas. Actualmente se suele considerar este fenotipo asesino como una característica deseable en las estrategias de selección (Regodón et al., 1997) o mejora genética de levaduras vínicas (Ambrona et al., 2006; Ambrona et al., 2005b; Pérez et al., 2000; Ramírez et al., 1998). Hasta la fecha solo se había descrito la presencia de levaduras killer tipo K2 en prácticamente todas las zonas vitivinícolas del mundo. En consecuencia, se recomienda de forma generalizada inocular los mostos con levaduras killer K2, fundamentalmente para evitar que las levaduras killer K2 silvestres maten a las levaduras inoculadas y, además, para que se impongan mejor durante la fermentación al eliminar posibles levaduras no deseadas sensibles a la toxina killer K2. El fenotipo killer también se ha encontrado en otras especies de levaduras involucradas en procesos

de vinificación (Magliani et al., 1997; Marquina et al., 2002; Schmitt and Breinig, 2002; Shimizu, 1993), como *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Schwanniomyces*, *Tilletiopsis*, *Ustilago*, *Williopsis* y *Zygosacharomyces* (Magliani et al., 1997; Marquina et al., 2002).

El fenotipo killer está codificado fundamentalmente en virus de dsRNA ubicados en el citoplasma de las levaduras. Más del 60% de las levaduras *S. cerevisiae* silvestres aisladas en Extremadura portan alguno de los virus relacionados con el fenotipo killer (Maqueda et al., 2012). Hasta recientemente se habían estudiado en profundidad los virus responsables de los fenotipos K1, K2 y K28 de *S. cerevisiae* (ScV-M1, ScV-M2 y ScV-M28), que codifican para cada una de estas toxinas killer y la correspondiente autoinmunidad (Schmitt and Breinig, 2006). En levaduras vínicas sólo se había descrito la existencia del fenotipo asesino K2. Las levaduras *Saccharomyces* killer tienen un espectro de acción reducido a su propio género, a *Torulopsis glabrata* para K1 y K2 y a *Candida glabrata* para K2 (Magliani et al., 1997; Young and Yagiu, 1978). La actividad killer de otras levaduras, menos importantes en la industria, como *Pichia* (Comitini et al., 2004), *Hansenula* (Yamamoto et al., 1998), *Williopsis* (Buzzini et al., 2004), o *Kluyveromyces* (Ciani and Fatichenti, 2001) es más amplia y afecta a más géneros distintos de levaduras.

En un estudio reciente realizado por nuestro grupo en la D.O. Ribera del Guadiana se aislaron al menos dos nuevos tipos de levaduras vínicas killer: las levaduras *S. cerevisiae* Klus, y las Kbarr, no descritas previamente y aún pendientes de investigar en profundidad. Sabemos que la toxina Klus está codificada en un virus satélite de dsRNA, ScV-Mlus, dependiente de ScV-LA. Aunque no hay casi homología en la secuencia de los ssRNAs (+) de ScV-Mlus y el resto de virus M conocidos, su organización es similar (Rodríguez-Cousiño et al., 2011). Queda pendiente realizar el mismo estudio en las levaduras Kbarr. Lo interesante de estas dos nuevas toxinas es que, al contrario del resto de toxinas conocidas de *S. cerevisiae*, tienen un espectro antifúngico mucho más amplio, matando incluso a otras especies de levaduras contaminantes perjudiciales y frecuentes en las fermentaciones industriales, o varias especies de levaduras patógenas oportunistas correspondientes al género *Candida* aisladas de enfermos hospitalizados. Además, las levaduras Kbarr tienen un fenotipo killer más intenso que todas las levaduras vínicas killer (K2 y Klus) analizadas. Obviamente, estas características hacen pensar que estas nuevas levaduras killer puedan tener innovadoras aplicaciones en el control de las fermentaciones industriales (de vinos

tranquilos o espumosos), en la prevención de contaminaciones indeseables de alimentos fermentados, o quizás en la prevención de infecciones fúngicas (Conti et al., 1998b; Magliani et al., 1997; Séguy et al., 1998).

I.7.1. Fenotipo killer en *S. cerevisiae*.

El sistema killer mejor conocido es el de *S. cerevisiae* y ha sido descrito en detalle en numerosos trabajos (Magliani et al., 1997; Marquina et al., 2002; Schmitt and Breinig, 2006; Schmitt and Breinig, 2002; Shimizu, 1993; Tipper and Schmitt, 1991; Wickner et al., 1991; Wickner et al., 2013; Wickner et al., 2007). Se han descrito cuatro tipos de levaduras asesinas (K1, K2, K28 y Klus) en base a su capacidad para matar a levaduras sensibles, su sensibilidad a otras levaduras killer, las características moleculares de las toxinas secretadas, o el genoma de los virus donde se codifica este fenotipo (ScV-M1, ScV-M2, ScV-M28 y ScV-Mlus) (Magliani et al., 1997; Rodríguez-Cousiño et al., 2013; Schmitt and Breinig, 2006; Schmitt and Breinig, 2002; Wickner, 1991). Aunque la capacidad killer de la mayoría de las levaduras se debe a la presencia de algún virus de dsRNA de tamaño mediano, ScV-M, existen levaduras *Saccharomyces* killer carentes de partículas virales cuyas toxinas, *KHR* y *KHS*, están codificadas en genes nucleares (Goto et al., 1991; Goto et al., 1990). Hasta el momento no se han aislado cepas silvestres con más de un fenotipo killer. De igual manera, tampoco se han aislado cepas con inmunidad múltiple de modo que, una cepa K1 es potencialmente sensible a una K2 y viceversa. Parece que en general estos virus se heredan naturalmente por transmisión de citoplasma de levaduras madres a hijas, u horizontalmente mediante conjugación entre células de distinto sexo o mediante formación de heterocariontes (Wickner et al., 1991), pero se desconoce la existencia de transmisión extracelular natural. En cualquier caso, parece que la infección vírica no provoca la lisis de la levadura infectada ni disminuye la capacidad de crecimiento de las poblaciones de levaduras.

Hasta el momento, en *S. cerevisiae* se han descrito cinco tipos de virus de RNA de doble cadena (dsRNA): LA, LBC, M, W y T (Rodríguez-Cousiño et al., 1998) y se han estudiado en profundidad los virus responsables de los fenotipos K1, K2 y K28. Son virus de RNA de doble cadena (dsRNA) denominados ScV-M1, ScV-M2, y ScV-M28, que codifican para las toxinas killer K1, K2, y K28 respectivamente, y para la correspondiente autoinmunidad (Magliani et al., 1997; Schmitt and Breinig, 2006; Schmitt and Breinig, 2002). En cada caso, el fenotipo killer requiere la presencia adicional del virus “helper” ScV-LA (Schmitt and Breinig, 2006; Schmitt and Breinig,

2002; Sommer and Wickner, 1982). *In vivo*, ambos genomas de dsRNA se encuentran encapsidados separadamente dentro de una cubierta con forma de icosaedro, formando partículas virales (VLPs) que se mantienen estables en el citoplasma de las células infectadas. La partícula ScV-LA no confiere ningún fenotipo al hospedador, ni tampoco provoca la lisis celular o disminución del crecimiento. Así mismo, no requiere la presencia de M para mantenerse en la célula, por lo que podemos encontrar levaduras no-killer o killer-sensibles con ScV-LA (Schmitt and Breinig, 2002). Por el contrario, las partículas M codifican para las toxinas killer y para la inmunidad a la toxina que producen, pero dependen para su mantenimiento de las partículas LA que les proporcionan la cápsida y la RNA polimerasa. Los virus killer se auto-seleccionan matando a las levaduras segregantes sensibles. Las levaduras sensibles pueden sobrevivir al cruzarse con levaduras killer, transmitiendo los virus a la vez que se reparte el citoplasma de la célula madre entre las hijas (Schmitt and Breinig, 2002). En el caso de cruzarse dos levaduras killer distintas, se produce un fenómeno de exclusión que evita la presencia de dos tipos de virus diferentes en las células hijas (Sommer and Wickner, 1984), pudiendo ser esta la causa de que no se encuentren viriones recombinantes o híbridos (Schmitt and Breinig, 2002).

LA es un virus de dsRNA perteneciente a la familia *Totiviridae*. Cada partícula vírica posee 1 copia de dsRNA lineal de 4,6 kb, 120 copias de la proteína de la cápsida de 76 kDa (Gag) y, se estima, 1-2 copias de una de 171 kDa con actividad RNA polimerasa-RNA dependiente (Gag-Pol) (Schmitt and Breinig, 2002). LA codifica las proteínas Gag y la Gag-Pol. El ciclo de replicación de LA es similar al de los reovirus, realizándose de forma secuencial mediante un mecanismo conservativo (Fujimura et al., 1986; Nemeroff and Bruenn, 1986). La síntesis de los ssRNA (+) y (-) ocurre dentro de la partícula viral. Después de la transcripción del dsRNA, el ssRNA (+) sintetizado es extruido fuera de la partícula viral al citoplasma de la célula huésped donde servirá tanto de mRNA en la transcripción de las proteínas, como de ácido nucleico de la nueva partícula viral, y como molde para la replicación del virus. Recientemente, se ha demostrado que LA posee un mecanismo ingenioso denominado “5'-cap-snatching” para incorporar la caperuza (o 5'-cap) a sus mRNAs. Consiste en el robo y transferencia de un grupo m⁷Gp desde el mRNA de la célula hospedadora al mRNA viral (Fujimura and Esteban, 2011). También se ha demostrado que la His-154 de Gag está involucrada en la unión del m⁷Gp durante el 5'-cap-snatching (Blanc et al., 1994; Fujimura and Esteban, 2011, 2012) y Tyr-150, Asp-152, Tyr-452 y Tyr-538 en el reconocimiento del

5'-cap (Fujimura and Esteban, 2011; Masison et al., 1995; Tang et al., 2005; Wickner et al., 2013). La traducción de los ribosomas origina dos tipos de productos, la proteína de la cápsida Gag, y en un 1-2% de los casos, tiene lugar un mecanismo de -1 frameshifting (o de cambio de fase) originando la proteína de fusión Gag-Pol {Blanc, 1994 #992}. La señal del cambio de fase (-1) consiste en un “sitio de deslizamiento” cuya secuencia es: G GGU UUA GG, y una estructura 3'-pseudoknot en forma de stem-loop que provoca la parada del ribosoma (Wickner et al., 2013). Una vez terminado el ensamblaje de la cápsida, Gag-Pol actúa como replicasa sintetizando la nueva cadena (-), generando el dsRNA genómico de la nueva partícula vírica madura (**Fig. I.1**).

Los virus M son satélites de LA, parasitando las proteínas Gag-Pol y Gag para su replicación. A diferencia de LA, no todas las ssRNA (+) sintetizadas son extruidas de la partícula viral al citoplasma, pues al ser más pequeñas que las de LA pueden encontrarse más de una copia en los viriones. La cadena ssRNA (+) sirven de molde (mRNA) en el citoplasma para la replicación de la partícula y la síntesis de la preprotoxina (Bostian et al., 1984; Georgopoulos et al., 1986; Lolle et al., 1984; Schmitt, 1995). Su ciclo replicativo depende de LA y su mecanismo conservativo es similar, aunque con algunas diferencias (Williams and Leibowitz, 1987). El ssRNA (+) sólo sale de la partícula cuando ésta está llena, completando el ciclo de forma similar a LA (**Fig. I.2**). Los virus M contienen estructuras que imitan señales de LA requeridas para la replicación y encapsidación del genoma (Schmitt and Breinig, 2006).

L-BC también es un virus de dsRNA de la familia *Totiviridae* encapsidado formando la partícula viral ScV-LBC que puede convivir con ScV-LA dentro de la misma levadura hospedadora. Su genoma tiene un peso molecular similar al de LA, la misma organización y mecanismo de expresión, aunque la única homología entre ambas secuencias es la misma que se encuentra en todos los totivirus (Park et al., 1996). No se ha descrito que exprese ningún tipo de fenotipo ni función, ni que mantenga a ningún virus M satélite. Los narnavirus W y T, también son moléculas de dsRNA que pueden encontrarse en las levaduras, pero no están encapsidados. Ambos llevan sus respectivos ssRNA(+), denominados 20S RNA para W y 23S RNA para T. Tampoco se ha descrito que expresen fenotipo, sólo se sabe que en situaciones de estrés por temperatura o falta de nutrientes aumenta el número de copias (Rodríguez-Cousiño et al., 1998).

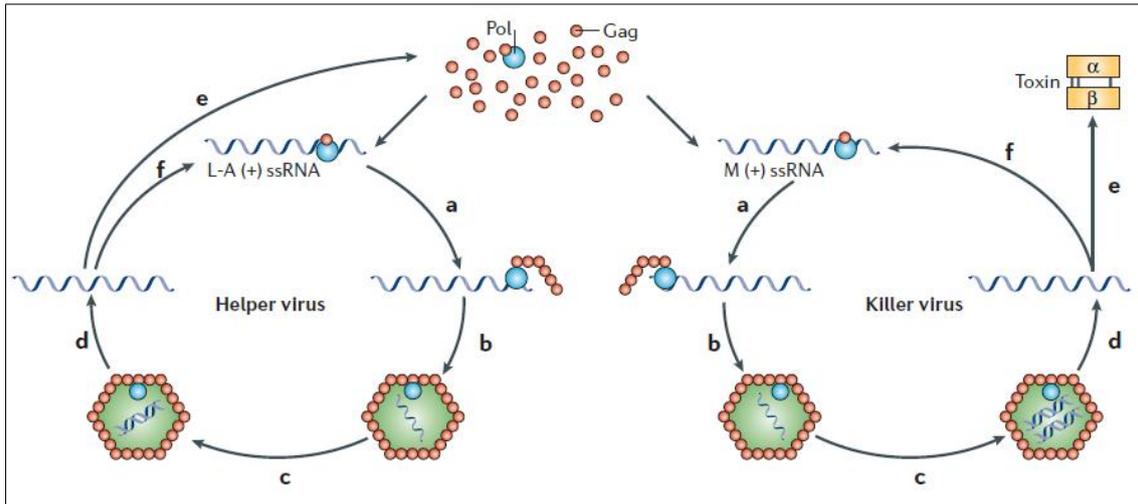


Figura I.1. Ciclo de replicación de ScV-LA y del virus satélite ScV-M que codifica para la toxina killer. Encapsidación del ssRNA (a), ensamblaje del virión (b), síntesis del ssRNA(-) (replicación) (c), síntesis del ssRNA(+) (transcripción) (e) y extrusión de la partícula (d), traducción del ssRNA y unión del ssRNA (f). Figura tomada de (Schmitt and Breinig, 2006).

Se conocen las secuencias completas de los dsRNA de ScV-LA (Icho and Wickner, 1989) y ScV-LB (Park et al., 1996), ScV-M1 (Russell et al., 1997), ScV-M28 (Schmitt and Tipper, 1995) y ScV-Mlus (Rodríguez-Cousiño et al., 2011) que fueron obtenidas a partir de los correspondientes cDNA clonados. Aunque no hay mucha homología en la secuencia de los ssRNAs (+) de ScV-LA, ScV-M1, ScV-M28 y ScV-Mlus, tienen algunos elementos comunes en secuencia o estructura. Poseen una secuencia conservada (5'-GAAAAA) en el extremo 5', seguida de las ORF que codifican para la polimerasa y las proteínas de la cápsida en ScV-LA, y para la preprotoxina en ScV-M1, ScV-M28 y ScV-Mlus (Rodríguez-Cousiño et al., 2011; Schmitt and Breinig, 2002) (**Fig. I.2**). Además, los extremos 3' de los ssRNAs (+) poseen señales específicas llamadas VBS (Viral Binding Sites) necesarias para la encapsidación y replicación de las ssRNAs. Se han encontrado dos elementos esenciales para la replicación, un potenciador de replicación interno (IRE), casi indistinguible de VBS y secuencias de reconocimiento 3'TRE (Terminal Recognition Element) necesarias para el inicio de transcripción. Estas señales se encuentran en secuencias que forman estructuras en bucle (o stem-loop), cuya longitud varía según la partícula, y que están separadas entre ellas por secuencias lineales (**Fig. I.2**). A diferencia de LA, M1 y M28 contienen dos elementos potenciales VBS (Schmitt and Breinig, 2002). En el caso de Mlus solo se ha encontrado el 3'TRE, también presente en M1 y M28, con los cuatro últimos nucleótidos idénticos, del nucleótido 1 al 18 (enumerado desde el extremo 3'),

con una energía libre de $\Delta G = -4,2$ Kcal/mol (Rodríguez-Cousiño et al., 2011). ScV-M1, ScV-M28 y ScV-Mlus poseen además una o dos secuencias intermedia poliadenilada (poliA) que varía en tamaño según el tipo de ScV-M (Rodríguez-Cousiño et al., 2011; Russell et al., 1997)(Fig.I.2). Curiosamente, de ScV-M2, el único virus encontrado en levaduras vínicas hasta el descubrimiento de Mlus en 2011(Rodríguez-Cousiño et al., 2011), y el más abundante en las fermentaciones de mosto (Maqueda et al., 2012), sólo se conoce la secuencia del mensajero que codifica para la preprotoxina K2 y su inmunidad específica. Queda pendiente la secuenciación de la mitad 3' de la molécula y determinar la presencia de señales específicas VBS y 3' TRE.

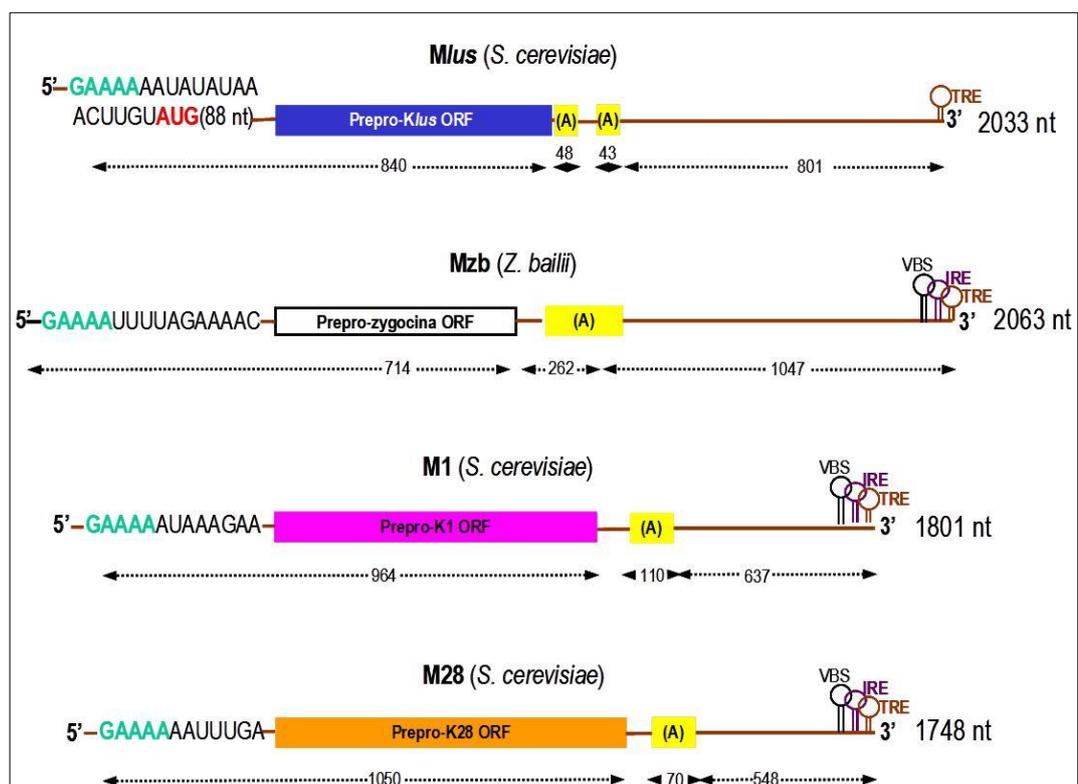


Figura.I.2. Organización genómica y capacidad codificadora de las ssRNA(+) de ScV-Mlus, ZbV-M, ScV-M1, y ScV-M28. Las ORFs de las preprotoxinas se encuentran en los extremos 5' (rectángulos). La secuencia 5'-GAAAA conservada se muestra en verde. El poliA central (A, en amarillo), y las secuencias potenciales 3' cis-acting requeridas para el empaquetamiento del RNA *in vivo* y replicación (VBS, sitio de unión viral; IRE, potenciador de replicación interna; TRE, elemento de reconocimiento 3'-terminal). Los números indican el tamaño (en nucleótidos) de las transcripciones de los virus y sus regiones codificantes y no codificantes.

I.7.2. Síntesis, procesamiento y secreción de las toxinas K1, K2, y K28.

Los ssRNA (+) son traducidos por la maquinaria de síntesis de proteína de la célula huésped, dando lugar a las proteínas y polimerasa en el caso de los transcritos de LA, o a las preprotoxinas que darán lugar a las futuras toxinas killer. Como ocurría con

los ssRNA (+), las toxinas K1, K2, K28 difieren significativamente en la secuencia primaria y en su modo de acción. Sin embargo, guardan homologías tanto en su síntesis, como en el patrón de procesamiento intracelular de la preprotoxina y en su secreción (Bostian et al., 1984; Dignard et al., 1991; Schmitt and Tipper, 1995). Cada toxina está codificada a partir de una sola ORF y es sintetizada como un único polipéptido (preprotoxina) que posee en el extremo N-terminal una secuencia señal altamente hidrofóbica (péptido señal, SP) que se encuentra normalmente en las proteínas de secreción, y sitios potenciales de N-glicosilación y de corte para las proteasas Kex2p/Kex1p. Las preprotoxinas, una vez sintetizadas, sufren modificaciones post-transcripcionales vía retículo endoplasmático-aparato de Golgi-vesículas de secreción, siendo secretadas al medio como un heterodímero (α/β), correspondiente a la toxina madura activa (**Fig. I.3**).

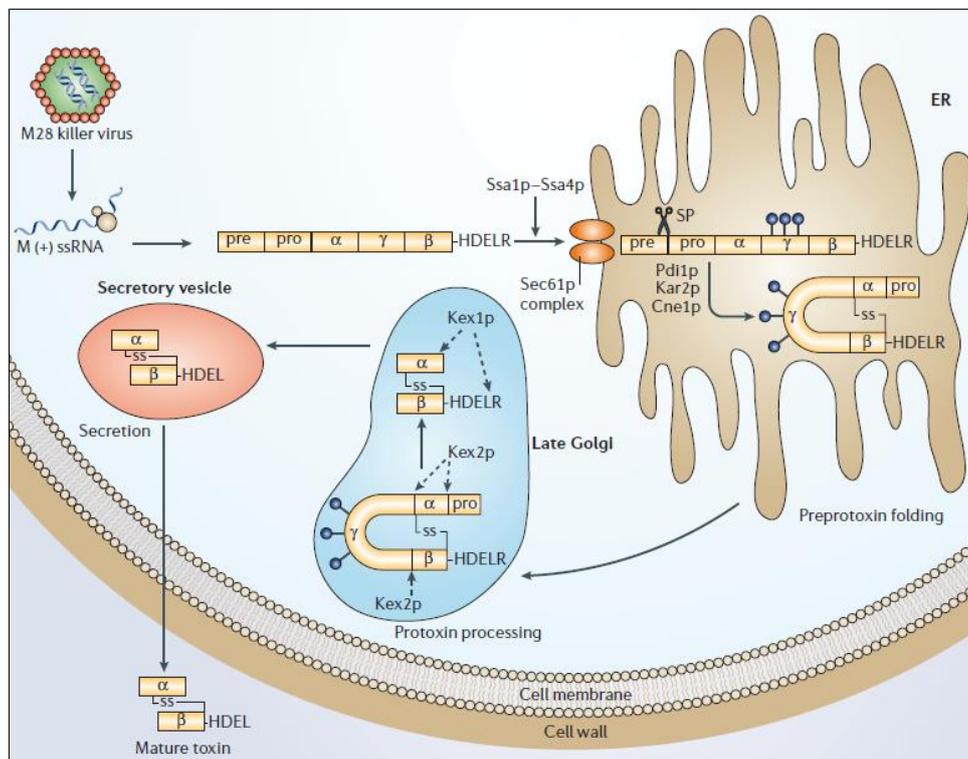


Figura I.3. Procesamiento de la preprotoxina y secreción de la toxina de M28 en la ruta secretora de la levadura. Figura tomada de (Schmitt and Breinig, 2006).

La toxina K1 (19 kDa) es secretada como una molécula formada por dos subunidades distintas sin glicosilar unidas por puentes disulfuro, denominadas α (9,5 kDa) y β (9,0 kDa), derivada de una molécula precursora glicosilada de 42 kDa (protoxina). El producto primario de la traducción del ssRNA (+) de M1 es un polipéptido de 316 aminoácidos y 35 kDa (preprotoxina). Posee una secuencia líder N-terminal de 44 aminoácidos denominada δ , que incluye el péptido señal de 26 residuos

de aminoácidos, seguidos por un dominio α de 103 residuos (posiciones 45 a 147) y el dominio β de 83 residuos (posiciones 234 a 316) de las subunidades de la toxina, las cuales están separadas por un péptido central γ (posiciones 148 a 233) que lleva los tres sitios potenciales de N-glicosilación (Magliani et al., 1997; Schmitt and Breinig, 2002). Una vez sintetizada, la preprotoxina entra en el retículo endoplásmico, dirigido por la secuencia líder o al menos una parte de ella, y el péptido señal es cortado por una peptidasa señal que probablemente corte entre los residuos Val-Ala²⁶ dando lugar a la protoxina (Lolle and Bussey, 1986). El segmento de 27 residuos de aminoácidos que quedan de los 44 aminoácidos de la secuencia líder es presumiblemente cortado en el aparato de Golgi mediante la proteasa *kex2p*. En el retículo endoplásmico, el dominio δ es N-glicosilado y presumiblemente plegado de forma que pueda ser incorporado por translocación al Golgi para su posterior procesamiento mediante un mecanismo en el que están implicados al menos tres sitios de corte proteolítico (Bostian et al., 1984; Bussey et al., 1983). Una endopeptidasa codificada por el gen *KEX2* (*kex2p*) de la levadura es la responsable de los cortes en los residuos Arg-Arg¹⁴⁹, Lys-Arg¹⁸⁸, y Lys-Arg²³³ dando lugar a ambas subunidades (Julius et al., 1984). Estos cortes presumiblemente se dan en distintas proporciones o con distinta eficiencia en la misma vesícula de los últimos compartimentos del Golgi, probablemente para minimizar la producción de fragmentos letales o para maximizar la producción de fragmentos implicados en la expresión de la inmunidad (Zhu et al., 1992). La subunidad α es procesada por una serín-carboxipeptidasa, codificada por el gen *KEX1* (*kex1p*) de la levadura, cortando residuos dibásicos del extremo C-terminal (Dmochowska et al., 1987). Finalmente, la toxina madura es secretada fuera de la célula como un dímero cuyas subunidades están unidas covalentemente por puentes disulfuro. El estudio de la maduración de la toxina K1 ha sido muy productivo y ha conducido a la comprensión de muchos mecanismos implicados en el procesamiento y secreción de proteínas como hormonas peptídicas de eucariotas superiores, o al conocimiento del papel de las proteasas *kex* y sus homólogas en eucariotas (Magliani et al., 1997).

Las toxinas K2 y K28 han sido caracterizadas de forma menos extensa que K1, pero muestran una organización en conjunto similar, principalmente a nivel del precursor. K2 es sintetizado como un precursor de 362 aminoácidos de 38,7 kDa que contiene tres sitios potenciales de glicosilación en los residuos Asn 177, 214, y 261, una señal potencial de secreción N-terminal y sitios potenciales de corte de *kex1p* y *kex2p* (Dignard et al., 1991; Meškauskas and Čitavičius, 1992). Durante el proceso de

maduración, el péptido señal es digerido por la peptidasa señal al cortar después de Ala⁴³, y la molécula que queda es aparentemente cortada por kex2p después de Arg²²², produciendo dos subunidades (α y β) que constituyen la toxina madura secretada. A diferencia con la toxina K1, no parece estar presente en la preprotoxina el dominio γ . Las subunidades α y β finales son más grandes que las de K1 (172 y 140 aminoácidos, respectivamente), y una está N-glicosilada en dos residuos (177 y 214). Finalmente, también requiere kex1p para el procesado completo de α .

La toxina K28, que en un principio se creía una glicoproteína monomérica de 16 kDa rica en serina y que lleva unido carbohidrato mediante enlace O-glicosídico, es sintetizada como una preprotoxina (37,6 kDa) de 345 aminoácidos que comienza con un potencialmente redundante par de péptidos señal de secreción, que son probablemente eliminados por una peptidasa que corta después de Leu³¹ al entrar en el retículo endoplásmico (Pfeiffer and Radler, 1982; Schmitt and Tipper, 1990). La toxina es secretada como un heterodímero formado por las subunidades α (10,5 kDa) y β (11 kDa) unidas entre sí por puentes disulfuros, y que en la preprotoxina se encuentran separados por un dominio γ (residuos 149 a 245) con tres sitios de N-glicosilación. Mientras que el sitio de corte de kex2p está antes del extremo amino terminal de β (residuo 245), haciendo a esta endoproteasa esencial en el procesamiento de la toxina (**Fig.I.3**). Los sitios de corte del extremo carboxilo y el enzima implicado no han sido determinados, aunque Arg¹⁴⁹ sea el sitio de corte más probable. Kex1p también es importante para la actividad de la toxina, presumiblemente interviniendo en el procesamiento final de cualquier C-terminal de α o β (**Fig.I.3**).

La organización de la ORF de ScV-Mlus es similar a la del resto de las preprotoxinas killer. Todas contienen un tramo de aminoácidos hidrofóbicos en el extremo amino terminal, potenciales sitios de procesamiento Kex2p/Kex1p y potenciales sitios para la N-glicosilación de las proteínas. Teóricamente, la escisión proteolítica de la preprotoxina de Klus por la péptidasa señal y la proteasa kex2 podrían producir tres posibles péptidos. De acuerdo con la predicción de la formación de puentes disulfuro (Ceroni et al., 2006), hay dos potenciales puentes disulfuro en el dominio C-terminal de 144 aminoácidos (supuesta subunidad β) (Rodríguez-Cousiño et al., 2011). Queda pendiente purificar la toxina Klus para determinar si se trata de un heterodímero como K1, K2 o K28, o de un monómero como la zigocina.

I.7.3. Modo de acción de las toxinas K1, K2, y K28 y mecanismo de autoinmunidad.

Todas las toxinas maduras secretadas tienen actividad killer sobre células susceptibles mediante diferentes mecanismos que requieren una unión inicial específica a un receptor situado en la pared celular, que posee una estructura precisa, y que permanece aún desconocido. Estudios cinéticos con la toxina K1 indican que las células susceptibles tienen dos tipos de sitios de unión que interactúan con la toxina killer generalmente con diferentes afinidades (Kurzweilová and Sigler, 1994). El primer paso de la unión depende fuertemente del pH (óptimo de 4,6) y tiene baja afinidad y alta velocidad de adsorción (1 min) de la toxina a los receptores de la pared celular, los cuales están presentes en una concentración de $1,1 \times 10^7$ moléculas por célula (Bussey et al., 1979). El segundo paso consiste en una interacción de alta afinidad de la toxina con un probable receptor de la membrana plasmática de baja velocidad y dependiente de energía, que conduce al efecto letal (Zhu and Bussey, 1989). Los constituyentes de la fracción del glucano de la pared celular, principalmente β (1,6) D-glucano, han sido identificados como receptores primarios de la toxina, y su ensamblaje parece requerir un número determinado de genes *KRE* (de resistencia a killer) (Boone et al., 1990a; Brown et al., 1993; Hill et al., 1992; Hutchins and Bussey, 1983). Muchos receptores no parecen necesarios para la actividad de la toxina, pues solamente unos pocos receptores glucano muy próximos a la membrana plasmática parecen ser funcionales, es decir, en el sitio de anclaje final de la yema incipiente a la célula madre. Esto puede explicar por qué las células jóvenes en gemación son más susceptibles a la toxina (Bussey, 1991). Parece que son necesarias ambas subunidades de la toxina madura para la unión al receptor, siendo la subunidad hidrofílica β la primeramente responsable de la unión, mientras que la subunidad α actúa en una vía multifuncional, con distintas regiones del polipéptido solapadas al estar implicadas en la actividad killer, inmunidad, y unión (Zhu and Bussey, 1991).

Después de la unión a la pared celular de la levadura, la toxina K1 es transferida a la membrana citoplasmática donde actúa formando canales transmembranales, que causan la fuga de iones, con la consecuente muerte de la célula (Magliani et al., 1997). Dos regiones fuertemente hidrofóbicas cercanas al extremo C-terminal de la subunidad α (residuos 72 al 91 y 112 al 130) tienen una estructura en α -hélice separada por un segmento corto altamente hidrofílico que puede actuar como un dominio transmembranal responsable de la formación del canal (Magliani et al., 1997).

La toxina K2 tiene virtualmente idéntica actividad tóxica que K1, a pesar de tener diferente estructura, mientras que K28 actúa sobre el ciclo celular por una vía distinta. La toxina K28 presenta un modelo de actuación diferente, se une a residuos de manosas unidos mediante enlaces α (1,3) de las manoproteínas de la pared celular, viaja al núcleo por un sistema de transporte retrógrado y la subunidad α bloquea de forma irreversible la síntesis del DNA, causando la parada del ciclo celular, aparentemente en fase G2, impidiendo la separación de las células hijas de las madres, quedando el DNA nuclear confinado en la célula madre (Schmitt and Breinig, 2006). No está claro si esta temprana y reversible inhibición de la síntesis de DNA es un efecto primario o secundario de la toxina (Schmitt and Breinig, 2006; Schmitt and Radler, 1988; Schmitt and Tipper, 1990).

Las estirpes de levaduras sensibles pueden convertirse en resistentes a la toxina killer por mutación de cualquiera de los 11 genes *KRE* (mutantes *kre*), identificados desde hace tiempo y que parecen implicados en la síntesis del receptor de la pared celular. Sin embargo, los esferoplastos de estos mutantes permanecen sensibles a la toxina, por lo que debe existir un receptor secundario en la membrana plasmática (Boone et al., 1990b). Por otra parte, las estirpes killer de levaduras no son sensibles (son inmunes) a la toxina que ellas producen, uniendo cantidades normales de toxina a la pared de sus células, y sus esferoplastos son resistentes probablemente debido a que el receptor específico de la membrana está tapado, modificado o destruido. El fenotipo killer-inmune está codificado en el dsRNA de M, o artificialmente en copias de su cDNA (Dignard et al., 1991; Lolle et al., 1984; Meškauskas and Čitavičius, 1992; Schmitt and Tipper, 1995; Tipper and Schmitt, 1991). Mediante mutagénesis directa del gen de la preprotoxina y estudios de las mutaciones en la célula hospedadora, se ha demostrado que el precursor de la toxina es la responsable de la inmunidad celular del hospedador en las estirpes K1 (Bussey, 1991; Zhu and Bussey, 1991; Zhu et al., 1993). El mecanismo exacto de la resistencia no está aún claro, aunque al parecer se requieren los componentes α y γ del precursor, incluso sin procesar, para la expresión de la inmunidad. El fragmento que determina la inmunidad aparece esencialmente como una extensión del dominio de la toxicidad de α , y corresponde a la región central α y el extremo N-terminal de γ (Zhu et al., 1993). El dominio de γ parece que juega un papel crítico como promotor de madurez funcional de la protoxina, probablemente actuando como un chaperón interno para el plegamiento de la protoxina, confiriéndole una forma adecuada para la translocación desde el retículo endoplásmico al aparato de Golgi y

para el procesado final mediante *kex2p* y *kex1p*. La protoxina, o sus fragmentos, probablemente interaccionan con un receptor de membrana, tapándolo o modificándolo antes de la producción de la toxina madura. El residuo 31 N-terminal de γ probablemente interacciona específicamente con α , bloqueando su actividad tóxica pero no su unión con el receptor hasta que la toxina no se termina de procesar y se secreta. Las estirpes K2 y K28 muestran un fenómeno de inmunidad similar (Dignard et al., 1991). Recientemente, el mecanismo de inmunidad de K28 ha sido elucidado a nivel molecular (Breinig et al., 2006). De acuerdo con un modelo propuesto, parte de las subunidades β serían selectivamente ubiquitinadas y rápidamente degradada por el proteasoma, otra parte del precursor de la toxina escaparía de ser ubiquitinado y degradado, y podría servir como molde para la importación al retículo endoplásmico y secreción de la toxina o como un componente de la inmunidad para formar un complejo con la re-internalizada toxina α/β (Schmitt and Breinig, 2006).

I.7.4. Interacción célula hospedadora-virus y relación killer-sensibilidad.

Los virus LA y sus satélites M pueden transmitirse *in vivo* sólo durante la división celular, esporulación, o conjugación; la rigidez de la pared celular de los hongos constituye una barrera para la captación de los virus. Se ha conseguido una transfección eficiente *in vitro* inoculando esferoplastos con partículas virales de estirpes killer K1, K2, o K28 (El-Sherbeini and Bostian, 1987; Schmitt and Tipper, 1990). El hospedador juega un papel fundamental en el mantenimiento y expresión del fenotipo killer. Los sistemas killer proveen un excelente modelo para el estudio de los genes cromosomales implicados en el fenómeno y su papel para el hospedador. Además de la función de los genes *KEX1* y *KEX2* que codifican las proteasas necesarias para el procesamiento de las protoxinas y de otras preproteínas de la levadura (Wickner, 1993), se han caracterizado otros genes de la levadura (genes *SEC*) implicados en la secreción de la toxina madura (Lolle and Bussey, 1986; Magliani et al., 1997; Zhu et al., 1992).

Dos grupos de genes del hospedador pueden afectar a la propagación de LA y M1: los genes relacionados con el fenotipo superkiller (*SKI*) y los genes del mantenimiento del fenotipo killer (*MAK*). Los productos de los genes *SKI2* a *SKI8*, reducen el número de copias de M1 y la traducción de sus mRNA. *Ski2*, proteína de la familia de las helicasas, también reprime a LA, LBC, y los replicones del ssRNA 20S (Magliani et al., 1997). Los genes *SKI* constituyen un sistema antiviral que tiene la célula hospedadora para reprimir la propagación de los virus (Magliani et al., 1997; Widner and Wickner, 1993). *SKI2*, *SKI3*, y *SKI8* actúan reprimiendo específicamente la traducción de los

mRNAs sin extremos 5'-cap ni 3'poliA, incluidos los de LA y M1 (Magliani et al., 1997).

Más de 30 genes cromosomales *MAK*, importantes y esenciales para el crecimiento de la célula, son necesarios para la propagación y mantenimiento del fenotipo killer. Solamente tres de ellos (*MAK3*, *MAK10*, y *MAK31*) se requieren para la propagación del dsRNA de LA y M. El gen *MAK3* codifica una N-acetiltransferasa, probablemente implicada en la N-acetilación de proteínas mitocondriales, es la responsable de la acetilación del extremo N-terminal de la proteína Gag de la partícula viral LA y M1 (Tercero et al., 1993; Tercero and Wickner, 1992). El producto de *MAK10*, proteína necesaria para el crecimiento óptimo de los hongos en medio con fuente de carbono no fermentables, es similar a las subunidades de los receptores de las células Linfocitos T, y necesaria para la propagación tanto de LA como de M, y probablemente estabiliza la partícula viral completa (Lee and Wickner, 1992). El producto del gen *MAK31*, necesario para la replicación del virus, está probablemente asociado a la partícula y contribuye a la estabilidad de los viriones, como el producto de *MAK10* (Polevoda and Sherman, 2001).

Además de los tres genes necesarios para LA, se necesitan muchos más genes *MAK* para la propagación del dsRNA satélite M que codifica la toxina killer. Los productos de estos genes incluyen distintas proteínas de la subunidad ribosomal 60S, como L3 (*MAK8*), L4A (*MAK7*), L4B (*KRB1*), y L41B (*MAK18*); una DNA topoisomerasa I (*MAK1*); una proteína esencial asociada a membrana (*MAK11*), y una proteína nuclear necesaria para el tránsito de G1 (*MAK16*) (Carroll and Wickner, 1995; Icho and Wickner, 1988; Ohtake and Wickner, 1995; Wickner, 1991; Wickner, 1996). La mayoría de las mutaciones *mak* originan un descenso del número de subunidades 60S libres o una pobre asociación de las subunidades 60S y 40S (Ohtake and Wickner, 1995). Esto sugiere que LA puede proveer a M1 de Gag y Gag-Pol solamente después de haber cubierto sus propios requerimientos proteicos (Magliani et al., 1997; Ohtake and Wickner, 1995; Valle and Wickner, 1993). Cualquier mutación *mak* que disminuya la concentración de la subunidad 60S puede resultar en la pérdida selectiva de M1 por reducción de la eficiencia en la traducción del ssRNA (+) de LA y, de este modo, de la síntesis de proteínas codificadas por el virus LA.

La sensibilidad a las toxinas killer está relacionada con un número de genes (*KRE*) funcionales del hospedador implicados en la expresión y ensamblaje de receptores específicos, principalmente en la síntesis de glucanos y mananos (Bussey,

1991; Magliani et al., 1997). El estudio de la sensibilidad de diferentes mutantes en la estructura de la pared celular ha sido utilizado para determinar los receptores con los que interaccionan las toxinas K1, K2 y K28. Los mutantes con alteraciones en el glucano de la pared celular, son resistentes a la toxina K1 (Boone et al., 1990b; Brown et al., 1993; Schmitt and Compain, 1995) lo que sugiere que el glucano, o algún intermediario de su biosíntesis, está involucrado en el mecanismo de acción de esta toxina. El receptor es una proteína de la pared celular (*kre1p*), inicialmente unido a la membrana plasmática por un puente de glicosil fostatidil inositol (Breinig et al., 2004) y que está implicada en el ensamblaje del beta glucano (Boone et al., 1990b). La toxina K2 se une directamente al beta (1,6) glucano de la pared celular (Hutchins and Bussey, 1983), mientras que el receptor de la toxina K28 es una manoproteína de alto peso molecular (Schmitt and Radler, 1987).

Mediante el estudio de mutantes resistentes a la toxina K1, se han identificado al menos siete genes que están implicados en la síntesis de la pared celular. Los genes *KRE1* y *KRE5* codifican proteínas requeridas para la síntesis (*KRE1*) o el ensamblaje (*KRE5*) de β (1,6) D-glucano (Boone et al., 1990b; Meaden et al., 1990). *Kre6p* es esencial para la síntesis de beta glucano aunque su función bioquímica precisa no se conoce. Se localiza en el retículo endoplásmico, a lo largo de la ruta secretora y en los sitios de crecimiento polarizado (Kurita et al., 2011). *KRE2* codifica una manosiltransferasa que transfiere la segunda manosa de los O-oligosacáridos (Häusler et al., 1992; Hill et al., 1992). Se han identificado otros genes implicados en la vía de biosíntesis de glucano, como *KRE9*, *KRE10*, *KRE11*, y *CHW41* (Brown et al., 1993; Magliani et al., 1997). El estudio de estos y otros genes y de sus productos ha tenido un valor incalculable para explorar y comprender los complejos mecanismos implicados en la síntesis y ensamblaje de la pared celular de las levaduras (Lesage G and Bussey H, 1992). Estudios moleculares y genéticos sugieren que el β (1,6) D-glucano se forma por la síntesis de un núcleo principal de glucano desde UDP-glucosa, en la que están implicadas las proteínas *kre5p*, *kre6p* y *kre11p*, seguido de la adición de una cadena lateral dependiente de la proteína *kre1p* (Magliani et al., 1997). Los esferoplastos de estos mutantes *kre* son sensibles a la toxina, sugiriendo la existencia de un mecanismo inicial común de adsorción a la membrana plasmática (Zhu and Bussey, 1989).

I.8. La elaboración de cava en Extremadura. Retos tecnológicos: mejora de aromas, espuma y volumen en boca.

En nuestro entorno socioeconómico, la elaboración de vino es de los procesos fermentativos industriales más importantes, siendo una actividad económica muy relevante en España desde hace muchos siglos y generadora de muchos puestos de trabajos por toda la geografía peninsular y el sur de Europa. Desde hace poco más de un siglo se intenta seleccionar y mejorar las levaduras para controlar mejor los procesos industriales, reducir costes y mejorar la calidad de los productos. En consecuencia, existen muchas levaduras seleccionadas comerciales cuyo uso está muy generalizado en bodegas de todo el mundo, dado que su inoculación en los mostos ayuda a controlar la fermentación evitando variaciones en la calidad (Delfini and Bardi, 1990; Melero, 1992).

En el caso concreto de vinos espumosos como el cava, la inoculación con levaduras seleccionadas es absolutamente inevitable para realizar la segunda fermentación. La venta de cava se ha incrementado progresivamente en los últimos años. Según el consejo regulador, el cava ha crecido en el mercado interior después de años de retroceso, situando las ventas en 87,6 millones de botellas (+7,54%). Las exportaciones a países terceros (115 países) mantienen la tendencia positiva y se sitúan en 43,1 millones de botellas. Esta cifra supone el 27,8% del total exportado siendo un 2,36% más que en 2013, alcanzando, además, un crecimiento interanual del 8,8% desde el inicio de siglo. Las expediciones a Europa siguen liderando la exportación de cava con un total de 111,6 millones de botellas. Esta cifra representa el 72% del total de cava exportado. Lógicamente, esto hace prever un incremento en el consumo de levaduras vínicas seleccionadas para la elaboración de cava.

La historia del cava en Extremadura comienza en el municipio de Almendralejo a principio de la década de los 80, cuando un grupo de empresarios se unieron para desarrollar nuevas vías de elaboración y comercialización de productos extremeños poco conocidos en el ámbito nacional. Nació así el cava ‘Vía de la Plata’ inscrito en la D.O. Cava desde 1983, siendo Almendralejo la única ciudad de Extremadura donde se puede elaborar cava. En la actualidad hay cuatro bodegas inscritas en la D.O. Cava: Bodegas López Morena, Bodegas Marcelino Díaz, Bodegas Romale y Bodegas Vía de la Plata.

Los vinos espumosos comprenden un amplio tipo de vinos (espumoso de calidad, fermentado en botella y granvás), según la legislación vigente (Orden del 27 de julio de

1972) son vinos procedente de uvas de variedades adecuadas, que contiene como consecuencia de su especial elaboración gas carbónico de origen endógeno resultado de una segunda fermentación de azúcares agregados o naturales del vino base, realizada en envase cerrado. El producto terminado deberá tener una presión mínima de 4 atm medida a 20°C.

En los vinos espumosos elaborados por el método de “grandes envases” o “Granvás”, la segunda fermentación tiene lugar en condiciones isobáricas dentro de un depósito de gran capacidad con cierre hermético. Este sistema también conocido como “método Charmat”, se atribuye a Egène Charmat que, en 1916 ideó un sistema para elaborar vinos espumosos en grandes cantidades, donde el vino se elabora de un modo similar al método tradicional, salvo que la segunda fermentación y crianza sobre las levaduras se hace en un depósito resistente a la presión, siendo el vino filtrado y estabilizado por frío antes de su embotellado isobárico. Estos depósitos están provistos de agitadores para homogeneizar la mezcla de levadura/vino base y el tiempo mínimo de permanencia del vino con las levaduras antes de salir al mercado es de 21 días (Pozo-Bayón et al., 2003a). El vino espumoso se embotella con posterioridad a su clarificación, pero no puede llevar en la etiqueta la denominación cava y/o champagne. La calidad de estos vinos espumosos es inferior a la de los obtenidos por el sistema tradicional, debido a la insuficiente cesión de autolisados de las levaduras, pues la superficie de contacto lías/vino es muy inferior al realizado en una botella, y además el tiempo de contacto se reduce en gran medida. En ciertos casos, la autólisis de las levaduras puede ser forzada por tratamientos térmicos, sometiendo a los vinos con sus lías de 2 a 5 días entre 33 y 70°C, provocando la autólisis de las levaduras y la consiguiente mejora de la calidad sensorial. Es un método por tanto más barato y simple que el sistema tradicional en botella, siendo adecuado para variedades de uva aromáticas como los “Asti spumante” de Italia elaborados a partir de la variedad Moscatel.

En los vinos espumosos de “fermentación en botella”, la fermentación y crianza transcurre en la misma botella (comúnmente tipo magnum de 1,5 o 2 litros) utilizada para el tiraje un tiempo mínimo de dos meses, siendo posteriormente transvasado de forma isobárica a un depósito, para su posterior eliminación de lías por filtración, estabilizado y embotellado. Este sistema se conoce con el nombre de “método Transfer”, siendo un híbrido entre el método Charmat y el tradicional, pues la fase de tiraje y de rima se hace por el método tradicional, y el resto del proceso de filtración,

estabilización y embotellado se realiza por el método Charmat. Se evita la operación de degüelle y se aprovecha algo de la autólisis natural de las levaduras, lo que hace que los costes de producción sean menores, la etiqueta de estos vinos ha de incluir: fermentado naturalmente en botella.

En los vinos espumosos elaborados por el “método tradicional”, el proceso de elaboración y crianza, desde la segunda fermentación hasta la eliminación de las lías, transcurre en la misma botella donde se ha efectuado el tiraje. En el caso de los vinos espumosos de “Cava” ha sustituido a la denominación “método champenoise” reservada exclusivamente a los vinos de Champagne franceses elaborados por el mismo sistema (Orden del 14 de noviembre de 1991). Los vinos espumosos de Cava están protegidos por la Denominación de Origen “Cava” (www.crcava.es), cuya mayor producción está localizada en la zona del Penedés, en Cataluña, y el resto en algunos municipios de las provincias de Álava, Badajoz, La Rioja, Navarra, Valencia, Valladolid y Zaragoza, donde se establecen tanto los viñedos para la producción de vino base, como las bodegas o cavas para la elaboración de este tipo de vinos.

Las variedades de uva autorizadas para elaborar vino cava son las variedades blancas Macabeo, Xare.lo, Parellada, Subirat (Malvasía Riojana) y Chardonnay. Para la elaboración de vinos espumosos rosados están admitidas las variedades Garnacha Tinta, Monastrell, Pinot-Noir y Trepát. La elaboración de los vinos cava tiene lugar a través de dos fases principales, una primera fermentación donde el mosto es convertido en vino base y una segunda fermentación que da origen al producto final.

Para elaborar el vino base se siguen las mismas normas generales establecidas para la elaboración de vinos blancos o rosados. Las características principales que tendrán los vinos base son: en primer lugar una graduación alcohólica moderada que permita una adecuada toma de espuma, una acidez relativamente elevada que comunique una importante sensación de frescura en la boca; y la menor maceración posible del mosto con los hollejos para lograr vinos base poco coloreados, nada tánicos y, en consecuencia, poco oxidables. Para evitar las maceraciones, la vendimia deberá ser sana y sin defectos o alteraciones que afecten al hollejo, respetando su integridad en el transporte y mejor vendimiadas en recipientes de pequeño volumen, obteniéndose el mosto por prensado directo de la vendimia. Para la obtención del mosto, se lleva a cabo un prensado fraccionado, destinándose las primeras fracciones a la elaboración de los vinos de mayor calidad, con un rendimiento máximo de 1 hectolitro de mosto/vino por cada 150 kilogramos de uva (Orden del 27 de julio de 1972). La suavidad del proceso

de prensado asegura la extracción de mosto de la pulpa de las uvas, evitando la rotura de las pepitas y la extracción de productos del hollejo y del raspón que aumentarían los fangos, las materias colorantes y los aromas y sabores pesados y herbáceos (Flanzy, 2003).

La primera fermentación o fermentación del mosto se lleva a cabo con temperatura controlada entre 18-20°C para conservar y potenciar el mayor número posible de aromas primarios. Los mostos suelen ser inoculados con levaduras seleccionadas, generalmente *S. cerevisiae* (del orden de 10^6 UFC/mL), para conseguir una fermentación regular (Castro, 1986; Hidalgo, 1985). No es habitual que los vinos base realicen la fermentación maloláctica, salvo que su contenido en ácido málico sea excesivo y convenga reducirlo por motivos sensoriales, o bien de estabilidad microbiana durante fases posteriores, pudiendo las bacterias impedir una adecuada clarificación del vino espumoso elaborado dentro de la botella. Los vinos base deberán estar perfectamente limpios y estabilizados, especialmente frente a precipitaciones tartáricas y proteicas. Esta operación se realiza para evitar la precipitación de bitartratos en la botella como consecuencia de las bajas temperaturas y el aumento de etanol durante la segunda fermentación. Posteriormente, tiene lugar la mezcla del vino base de diferentes variedades de uva e incluso de diferentes años, también denominada “coupage”, en proporciones que variarán según la calidad de las cosechas. De acuerdo con la legislación vigente, los vinos base para el “Cava” cumplirán las siguientes características analíticas: graduación alcohólica, entre 9,5-11,5% vol.; acidez total, mínimo de 5,5 g/L en ácido tartárico; acidez volátil, inferior a 0,60 g/L en ácido acético; anhídrido sulfuroso total, inferior a 140 mg/L; y pH, entre 2,8-3,3.

La elaboración de los vinos espumosos por el “método tradicional” se realiza en las botellas como único envase, desarrollándose sucesivamente en las siguientes fases: tiraje, rima, pupitre o punta, degüelle y adicción del licor de expedición. Desde el momento del embotellado, la legislación obliga a que el tiempo mínimo hasta su fecha de expedición sea de 9 meses. Este tipo de elaboración responde a un sistema artesanal desarrollado en Francia a finales del siglo XVII en la región de la Champagne, donde el monje Dom Perignon (1638-1715) en la Abadía Benedictina de Hautvillers, cerca de D’Epernay en el valle del Marne, logró elaborar por primera vez este tipo de vino. Las etapas principales son:

- Fase de tiraje: Comprende tanto la preparación del licor de tiraje, compuesto por una mezcla de vino base, 20-25 g/L de azúcar, levaduras a una concentración de 10^6 - 10^7

UFC/mL y ciertos aditivos como puede ser bentonita (3 g/hL) con el objetivo de facilitar la floculación y posterior eliminación de las levaduras, así como su embotellado y taponado. Una vez introducido en la botella el vino base no se le podrá hacer ningún tratamiento. También se pueden añadir otras sustancias, como el ácido cítrico (2 g/L), para favorecer la inversión de la sacarosa en glucosa y fructosa y/o activadores de la fermentación, como tiamina o sales amoniacales autorizadas en las dosis habituales. Las botellas son de tipo clásico, resistentes a una presión de 6 atm, y utilizándose como formato de elaboración las de 0,75 litros de capacidad aunque también se pueden emplear otros volúmenes. El sistema de cierre se realiza por un obturador de polietileno introducido dentro del gollete de la botella, asegurado por fuera con un tapón corona.

- Fase de rima: Una vez realizado el tiraje, las botellas son colocadas en rima, se almacenan en posición horizontal en locales de crianza especialmente habilitados. En esta posición tiene lugar la segunda fermentación, la llamada toma de espuma y el envejecimiento, durante el cual tiene lugar la autólisis de las levaduras. La “toma de espuma” se desarrolla durante unos dos meses a una temperatura de 10-15°C, donde la presión de gas carbónico se eleva progresivamente. El control de la presión se puede realizar con ayuda de un “afrómetro” o manómetro medidor de espuma fijado al cuello de la botella. Finalizada la segunda fermentación del vino, las levaduras se depositan en un lateral de la botella dispuesta en forma horizontal, y comienza una etapa de “crianza sobre lías” de una duración variable y nunca inferior a los nueve meses desde la fecha de tiraje. En crianzas largas es recomendable agitar las botellas periódicamente, para evitar la adherencia de las levaduras al vidrio de la botella. Durante esta etapa se produce la autólisis de las levaduras, con la cesión de determinadas sustancias al vino elaborado, que mejorarán el desprendimiento del gas carbónico y comunicarán al vino unos caracteres sensoriales singulares.

- Fase de pupitre y/o punta: Al final del envejecimiento, las botellas pasan a la fase conocida de removido y en punta. En primer lugar, las lías resultantes de la segunda fermentación se deben acumular en el cuello de la botella colocada en posición invertida, que más adelante serán eliminados en la fase de degüello. Este proceso se hacía tradicionalmente girando las botellas manualmente un octavo de vuelta durante quince días a la vez que se iban inclinando hasta quedar prácticamente perpendiculares al suelo; en la actualidad ha sido sustituido por pupitres mecanizados (giropalets) que permiten manipular un número más elevado de botellas de una vez.

- Fase de degüello: La eliminación de las lías se realiza provocando su depósito en el cuello de la botella al colocarlas boca abajo, este depósito se congela al sumergir el cuello de la botella en una solución de agua y un anticongelante a menos 20-25°C, formándose un tapón de hielo que engloba las lías. A continuación se invierte y se le quita el tapón y el depósito congelado es expulsado por la propia presión interna. La expulsión de las lías produce una merma que se puede rellenar con la adicción del licor de expedición. Éste puede ser el propio vino espumoso o puede contener sacarosa, mosto de uva, mosto de uva parcialmente fermentado, mosto de uva concentrado, vino base o una mezcla de todos estos productos. Con la adicción del licor de expedición se obtendrán finalmente los distintos tipos de vinos espumosos: brut nature (hasta 3 g/L), extra brut (hasta 6 g/L), brut (hasta 15 g/L), extra seco (entre 12 y 20 g/L), seco (entre 17 y 35 g/L), semi seco (entre 33 y 50 g/L) y dulce (más de 50 g/L). Además de la pérdida de vino durante el degüello se produce una pérdida de presión de aproximadamente 0,5 a 0,6 atmósferas.

Finalmente el cierre de la botella se realiza con un tapón de corcho construido de aglomerado, introduciéndose parcialmente en el cuello de la botella para facilitar su posterior apertura, sujetándolo por medio de un bozal o morrión de alambre. Durante el tiempo que las levaduras permanecen en la botella, éstas experimentan una serie de procesos que son fundamentales para la calidad de los vinos espumosos elaborados mediante este método. Estos procesos son, una vez acabada la segunda fermentación, la autofagia y la autólisis de las levaduras.

I.8.1. Microbiología de la segunda fermentación.

Una vez realizado el tiraje se inicia la segunda fermentación, que tiene lugar desde que el vino base es inoculado hasta que se consumen los azúcares fermentables presentes. Las levaduras utilizadas en la elaboración de cava deben presentar una elevada resistencia a etanol, actividad fermentativa a bajas temperaturas, resistencia a la presión debida al CO₂, capacidad de floculación para facilitar la eliminación de levaduras durante el degüello y no deben producir aromas desagradables durante el envejecimiento en botella. Se ha sugerido además la capacidad autolítica como criterio de selección de estirpes de levaduras para segunda fermentación (Martínez-Rodríguez et al., 2001). Después de la inoculación hay una pequeña fase de latencia o adaptación a las nuevas condiciones del sustrato. El crecimiento de *Saccharomyces* en segunda fermentación se asemeja al de la primera, aunque en términos globales es menor, debido a que la fuente de carbono disponible es mucho menos abundante, y además la elevada

concentración de etanol y la acumulación de CO₂ pueden contribuir a limitar el crecimiento. Se ha demostrado que partiendo de un inóculo del orden de 10⁶ UFC/mL, se alcanzan poblaciones del orden de 10⁷ UFC/mL al terminar la segunda fermentación (Martínez-Rodríguez et al., 2002). La segunda fermentación suele transcurrir entre los primeros 15-20 días después del tiraje, a partir de ahí, la viabilidad desciende lentamente y, pasados 60-90 días, no se detectan levaduras viables en los vinos (Feuillat and Charpentier, 1982). Los aspectos morfológicos relacionados con la viabilidad y la autólisis en levaduras vínicas, como la existencia o no de yemas de división, el tamaño de la vacuola, el tamaño celular, la separación del citoplasma de la pared celular, etc., explicarían los cambios morfológicos de las levaduras vínicas observados en experimentos de segunda fermentación en botella (González et al., 2003; Martínez-Rodríguez et al., 2004; Martínez-Rodríguez et al., 2001). La morfología de estos cultivos permite admitir que células vivas y muertas coinciden en el tiempo, y que por tanto, segunda fermentación y autólisis son fenómenos que se solapan. Precisamente el proceso biológico más importante que tiene lugar durante el envejecimiento es la autólisis de las levaduras, mediante el cual las células liberan el metaboloma celular (compuestos intracelulares) y polisacáridos de la pared celular al vino.

La autólisis es un proceso que sucede tras la muerte de las levaduras y que consiste en la ruptura y degradación de las estructuras celulares por su propia dotación enzimática (Arnold, 1980; Babayan and Bezrukov, 1985b; Charpentier and Feuillat, 1986; Feuillat and Charpentier, 1982; Lurton et al., 1989; Martínez-Rodríguez and Polo, 2000; Pueyo et al., 2000a). Algunos autores plantean cuatro etapas diferenciadas a lo largo del proceso (Charpentier and Freyssinet, 1989): Inicialmente las actividades de las enzimas endo- y exo- β -(1,3)-glucanasas liberan una mezcla de polisacáridos y de cadenas cortas de oligosacáridos. Una parte corresponde a las manoproteínas unidas covalentemente al glucano de la pared intacta. Posteriormente, la hidrólisis parcial del glucano provoca una desestabilización de la estructura de la pared, que supone una liberación de manoproteínas de elevado peso molecular con bajos contenidos de glucosa y que proceden mayoritariamente de la zona periplásmica. En una etapa más tardía continúa la degradación de los glucanos de la pared por las β -(1,3)-glucanasas en los restos de pared y en el medio extracelular. Finalmente, las exo- β -(1,3)-glucanasas, solubilizadas en el medio, degradan el glucano unido a las manoproteínas y estas últimas a su vez pueden ser hidrolizadas por α -manosidasas y por otras proteasas que liberan peptidomananos de menor tamaño.

Aunque la autólisis natural de las levaduras es claramente deseada en la elaboración del cava, es un proceso muy lento que puede durar varios años. Normalmente la autólisis ocurre en células al final de la fase estacionaria de crecimiento y está asociada a la muerte celular (Babayán and Bezrukov, 1985b). Debido a la lentitud del proceso de fermentación en la botella y la necesidad de largos tiempos de envejecimiento, desde hace años se investiga la forma de acelerarlo. Para aumentar los productos de autolisado de levaduras existen dos métodos de aplicación en la elaboración de vinos espumosos: añadir autolisados de levaduras al vino, o bien incrementar la temperatura durante la fase de envejecimiento en botella (Charpentier and Feuillat, 1993). Sin embargo, ambas técnicas producen defectos organolépticos en el vino espumoso y un desagradable olor a tostado. Se ha sugerido que el uso de levaduras con una buena capacidad autolítica puede mejorar la calidad de los vinos espumosos, se recomienda utilizar esta capacidad como criterio fundamental en la selección de levaduras para la segunda fermentación (Martínez-Rodríguez and Polo, 2000). Utilizando levaduras mutantes con una capacidad de autólisis acelerada se ha conseguido mejorar las propiedades de la espuma del cava, además de reducir el tiempo de envejecimiento disminuyendo los costes de elaboración del producto (Núñez et al., 2005). También se ha utilizado mutantes autolíticos termosensibles con la pared celular alterada que liberan los polisacáridos de la pared durante la fermentación (Giovani and Rosi, 2007), o mutantes alterados en el proceso de autofagia para autolisar las levaduras y acelerar por tanto el envejecimiento del cava (Tabera et al., 2006). No obstante, hasta la fecha estos procedimientos no se utilizan a escala comercial, probablemente debido a que estos mutantes no cumplan con las exigencias requeridas para su producción y uso en bodega, especialmente si están afectados en algún proceso metabólico básico para la célula. Se han propuesto otras alternativas como utilizar mezclas de levaduras killer y sensibles como inóculos de la segunda fermentación, de modo que la toxina asesina mataría a las células sensibles, acelerando así su autólisis (Todd et al., 2000a). Sin embargo, aunque esta propuesta ha dado prometedores resultados a nivel de laboratorio, no se ha aplicado aún en la industria ni se ha analizado su efecto sobre las propiedades organolépticas de vinos espumosos.

La mayoría de los trabajos realizados sobre la autólisis en enología han seguido dos enfoques principales: por un lado, el estudio de la degradación de la pared celular de las levaduras durante la autólisis precedida por un proceso autofágico (Charpentier and Feuillat, 1993; Martínez-Rodríguez et al., 2001) y por otro, de los diferentes productos

liberados al vino, siendo estos aspectos tradicionalmente considerados como principales manifestaciones de este proceso (revisado por (Pozo-Bayón et al., 2009)).

I.8.1.1. Cambios morfológicos de las levaduras durante la segunda fermentación.

Durante la segunda fermentación se producen importantes cambios morfológicos en las levaduras que pueden ser estudiados mediante microscopía óptica, sobre todo a nivel de pared celular. Finalizada la segunda fermentación, las células son alargadas y ovoides, la pared celular se presenta gruesa y lisa, y el citoplasma presenta una gran vacuola central rodeada de cuerpos esféricos (autofagosomas). Después de 3-6 meses, la célula y la vacuola son más pequeñas, los autofagosomas se distribuyen alrededor de la vacuola y la pared celular se presenta desorganizada. Pasados 9-12 meses, las células se mantienen principalmente desorganizadas, también pueden aparecer vacías e incluso destrozadas (Alexandre and Guilloux-Benatier, 2006). Varios autores han observado la aparición de pliegues en la pared de la levadura, como consecuencia de pérdida de volumen intracelular durante la autólisis (Charpentier and Feuillat, 1993; Martínez-Rodríguez et al., 2001). Otros trabajos resaltan la desorganización celular con liberación posterior de enzimas hidrolíticas como el paso más importante durante la elaboración de vinos espumosos (Connew, 1998; Fornairon-Bonnefond et al., 2002).

La desorganización celular que precede a la liberación de las enzimas vacuolares se encuentra regulada y organizada por un complejo proceso catabólico conservado en células eucariotas denominado “autofagia” que tiene lugar como respuesta a la carencia de algún nutriente esencial a través del tráfico de productos intracelulares y de membranas hacia la vacuola. En contraposición existe otra ruta denominada Cvt que no es inducida ni inespecífica como la autofagia sino que es constitutiva. Se ha demostrado que la autofagia juega un papel fundamental en la degradación de orgánulos intracelulares dañados así como en programas de muerte celular por mediación de la auto-digestión (Mizushima, 2005). Cuando las células de *S. cerevisiae* están sujetas a condiciones de escasez se genera un pool interno de nutrientes por autofagia que permite la supervivencia durante las prolongadas condiciones de deficiencia nutricional (Takeshige et al., 1992). En células eucariotas, el transporte de citoplasma hacia la vacuola por autofagia está mediado por vesículas de doble membrana denominadas autofagosomas. El autofagosoma maduro, rodeando una porción de citosol inespecíficamente, fusiona su membrana externa con la vacuola liberando los llamados cuerpos autofagosómicos en el lumen. Finalmente este cuerpo autofagosómico es degradado por hidrolasas residentes vacuolares (Baba et al., 1994; Takeshige et al.,

1992). La ruta Cvt es un mecanismo biosintético de transporte de membrana para el transporte específico de la aminopeptidasa I (Ape1p) y la α -manosidasa (Ams1p) hacia la vacuola (Baba et al., 1997; Huang and Klionsky, 2002). Bajo condiciones normales de crecimiento, las hidrolasas sintetizadas en el citosol son secuestradas selectivamente dentro de una vesícula Cvt, como una estructura de doble membrana más pequeña pero similar a los autofagosomas y cuyo proceso de formación implica el mismo conjunto de proteínas que la autofagia. De esta manera, Ape1p y Ams1p son selectivamente incorporadas dentro de los autofagosomas. Hasta la fecha, han sido identificados 29 genes *ATG* (genes relacionados con la autofagia) (Klionsky et al., 2003); la mayoría de ellos comunes en ambas rutas, aunque hay algunos genes específicos de la ruta Cvt y uno, *ATG17*, específico de la autofagia. La mayoría de las proteínas Atg se localizan en un compartimento de membrana cercano a la vacuola llamado estructura pre-autofagosomal (PAS) considerado como el posible centro de formación de estas vesículas (Kim et al., 2002; Suzuki et al., 2001). Atg9p y Atg27p son las únicas proteínas transmembrana identificadas que parecen estar implicadas en la formación del autofagosoma (Lang et al., 2000; Yen and Klionsky, 2007; Yen et al., 2007). El estudio de las relaciones funcionales entre las proteínas Atg residentes en la PAS está permitiendo esclarecer el mecanismo celular implicado en la síntesis de los autofagosomas (Reggiori et al., 2004; Suzuki et al., 2004). Atg1 podría actuar como transductor de la señal procedente de otras rutas de transducción desencadenadas por condiciones de ayuno, como por ejemplo la ruta TOR (Quinasa serina-treonina) (Kamada et al., 2000; Scott et al., 2000), que está activa cuando las células crecen en un medio rico en nutrientes y es inhibida con la concomitante inducción de la autofagia cuando se agotan los nutrientes (Noda and Ohsumi, 1998). La inactivación de la ruta TOR implica cambios en la maquinaria molecular de las proteínas Atg, por ejemplo, Atg13p es parcialmente desfosforilada, aumentando su interacción con Atg17p y Atg1p, que aparece para modular su actividad quinasa (Kabeya et al., 2005; Kamada et al., 2000). El papel de la actividad quinasa de Atg1p es controvertido, algunos estudios sugieren que podría ser más importante para la ruta Cvt, mientras que tendría básicamente un papel estructural en la autofagia (Abeliovich H et al., 2003; Matsuura et al., 1997). Además de la unión de Atg13p y la proteína específica autofágica Atg17p, Atg1p parece ser el núcleo del complejo de la posible proteína junto a otras, como Atg11p, Atg20p y Atg24p, requeridas para el transporte selectivo pero no para autofagia (Klionsky, 2005). Debido a la coexistencia en el mismo complejo de proteínas

específicas para la autofagia y de la ruta Cvt, se ha especulado que este complejo regula la transición desde la ruta Cvt hasta la autofagia bajo condiciones de inanición (Scott et al., 2000). Puesto que la ruta Cvt es de funcionamiento constitutivo, la inducción de la autofagia en condiciones de ayuno podría considerarse como una reorientación de este sistema de transporte que ya estaba funcionando. La diferencia fundamental entre ambos procesos sería el tamaño de las vesículas y la selectividad respecto de la carga de las mismas.

De esta manera la autofagia puede tener lugar en condiciones enológicas como demuestran algunos trabajos realizados mediante el uso de mutantes que afectan a las rutas Cvt y autofágica, monitorizando el transporte de la aminopeptidasa I, pudieron demostrar que la autofagia tiene lugar en condiciones que imitan las de segunda fermentación en botella (Cebollero et al., 2005). Las características morfológicas del proceso autofágico también han sido utilizadas por el mismo grupo para demostrar la inducción de la autofagia bajo condiciones de vinificación, después de 8-10 días de incubación del vino base, la vacuola de una cepa de levadura comercial estaba llena de cuerpos autofágicos (revelado con la ayuda de PMSF), similares resultados fueron observados previamente (Takeshige et al., 1992) en cepas de laboratorio por ayuno prolongado de nitrógeno. Todo ello nos lleva a la conclusión de que, en las condiciones de vinos espumosos, la autólisis debe ir precedida de un proceso autofágico, y que la digestión del material intracelular en la vacuola tendrá una influencia decisiva en la naturaleza y la abundancia de los diferentes compuestos que las levaduras habrán cedido al vino durante la autólisis.

I.8.1.2. Cambios bioquímicos en el vino durante la segunda fermentación.

El proceso de autólisis implica la liberación de moléculas intracelulares de las levaduras (principalmente compuestos nitrogenados, polisacáridos y ácidos grasos), que modifican la composición química, las propiedades sensoriales y las características espumantes de los vinos (Martínez-Rodríguez et al., 2002; Martínez-Rodríguez and Polo, 2000; Pueyo et al., 2000a). Entre todos los compuestos liberados durante la autólisis, péptidos y aminoácidos se consideran los más importantes (Guilloux-Benatier and Chassagne, 2003; Moreno-Arribas et al., 2009). Aunque la cuantificación de ambos ha sido utilizada para evaluar la magnitud del proceso de autólisis, los péptidos se utilizan menos, fundamentalmente por la complejidad de las técnicas analíticas disponibles (Moreno-Arribas et al., 2002). Se ha demostrado que en los primeros estadios de autólisis se liberan los péptidos y posteriormente éstos son hidrolizados a

aminoácidos (Moreno-Arribas and Polo, 1996). Los péptidos de bajo peso molecular son funcionalmente importantes, tienen propiedades tensioactivas y bioactivas (antioxidantes, antimicrobianos, antihipertensivos) y participan en las propiedades sensoriales del vino (Desportes et al., 2001). Se ha comprobado además que la adición de bentonita, afecta también a la fracción de péptidos, a pesar de utilizarse en bajas concentraciones (Martínez-Rodríguez and Polo, 2003) y no influir significativamente en la viabilidad celular. Los péptidos de los vinos espumosos son la mejor representación de la dinámica del proceso de autólisis, ya que se liberan directamente a partir de las proteínas, y simultáneamente son convertidos a aminoácidos libres por acción enzimática. De las proteasas que participan en esta transición, la proteasa A ha sido la más estudiada y es considerada como la más activa, ya que su pH óptimo coincide con el del vino (3-3,5). Los aminoácidos presentes en los vinos espumosos tienen diferentes orígenes: una parte de ellos proceden de la uva y no han sido metabolizados, y otra porción es liberada por las levaduras durante la autólisis. Aunque existen algunas discrepancias entre el comportamiento específico de algunos aminoácidos, casi todos los autores coinciden en que la concentración de la mayor parte de ellos disminuye durante la segunda fermentación y aumenta nuevamente durante el envejecimiento, jugando un papel significativo como precursores de los compuestos aromáticos (Charpentier and Feuillat, 1993).

La concentración de proteínas durante la autólisis ha sido menos estudiada en vinos espumosos, probablemente debido a que los aminoácidos son considerados como buenos marcadores de seguimiento durante este proceso (Alexandre and Guilloux-Benatier, 2006). Algunos autores consideran que la cantidad de proteínas aumenta al inicio de fermentación y desciende posteriormente por insolubilización debido al grado alcohólico creciente y a la acción de proteasas activas (Dizy and Polo, 1996); en este caso los vinos espumosos presentarían una concentración de proteínas menor que los vinos base de partida. Otros autores consideran lo contrario, la concentración de proteínas se mantendría estable después de 90 días y aumentaría ligeramente un 8-13% más tarde (Todd et al., 2000b). Además, la evolución del contenido proteico también parece depender de la estirpe de levadura, ya que en otro estudio donde se comparan dos estirpes diferentes, en una se mantenía estable mientras que en otra disminuía drásticamente desde el final de la segunda fermentación (Leroy et al., 1990). Otro estudio ha demostrado que los niveles de proteínas aumentan durante los primeros 3 meses y después disminuye probablemente debido a la actividad proteasa, aumentando

nuevamente a los 6 meses (Nunez et al., 2005). A pesar de estas diferencias, la mayoría de los trabajos publicados en relación a la calidad de los vinos espumosos coinciden casi unánimemente en que las proteínas del vino, en mayor o menor cantidad, son los compuestos químicos que más influyen en la calidad de la espuma (Andrés-Lacueva et al., 1996; Brissonnet and Maujean, 1991; López-Barajas et al., 1997; Malvy et al., 1994; Molan et al., 1982; Moreno-Arribas et al., 2000; Pueyo et al., 1995; Vanrell et al., 2002).

Los polisacáridos son uno de los principales grupos de macromoléculas en los vinos, pueden proceder de la uva, de las levaduras, bacterias y de contaminaciones fúngicas como *Botrytis cinerea*. Desde el punto de vista enológico y cuantitativo, los más importantes son los procedentes de la uva y las levaduras. Los polisacáridos ricos en arabinosa y galactosa (PRAGs) de tipo II, arabinogalactano-proteínas (AGPs), arabinanos, ramnogalacturonanos tipo I (RG-I) y tipo II (RG-II), y los homogalacturonanos (HLs) derivan de la uva, mientras que los glucanos (GLs), mananos y manoproteínas (MPs) son liberados por las levaduras durante la fermentación o por acción enzimática durante el envejecimiento por autólisis (Martínez-Lapuente et al., 2013). Los polisacáridos presentes en el vino base contienen fundamentalmente arabinosa (66%), después de la segunda fermentación esta composición cambia radicalmente y los azúcares principales son manosa (43%) y glucosa (31%). Durante el envejecimiento y autólisis, la actividad enzimática (proteasas y glucanasas) causan la rotura de los glucanos y la liberación de las manoproteínas de la pared celular (Feuillat, 2003). Esto indica que los polisacáridos que se encuentran en los vinos espumosos después del envejecimiento proceden fundamentalmente de la degradación de la pared celular de las levaduras que tiene lugar durante la autólisis. Estos polisacáridos son fundamentalmente glicoproteínas, el azúcar representa aproximadamente un 85-90% y la parte proteica un 10-15%. Entre las glicoproteínas del vino, las manoproteínas han sido las más estudiadas en los últimos años por su posible mejora de la estabilidad tartárica (Moine-Ledoux and Dubourdieu, 2000), en la quiebra proteica (Dupin et al., 2000), y en las propiedades espumantes de los vinos espumosos (Abdallah et al., 2010; Coelho et al., 2011b; Martínez-Lapuente et al., 2013; Núñez et al., 2006), aunque también se ha demostrado que no todas las manoproteínas tienen el mismo comportamiento (Coelho et al., 2011b; Moreno-Arribas et al., 2000; Núñez et al., 2006). El efecto positivo de las manoproteínas se atribuye al equilibrio formado entre los dominios proteicos (hidrofílicos e hidrofóbicos) que favorecen la creación de

puntos de adsorción en la interfase líquido-gas de la burbuja, incrementando la estabilidad de la espuma (Núñez et al., 2006). De forma similar a lo que ocurre con los compuestos nitrogenados, los polisacáridos de glucanos y mananos aumentan durante la fermentación y el envejecimiento, disminuyendo paulatinamente los glucanos durante el envejecimiento prolongado debido fundamentalmente a la acción de las β -(1,3) glucanasas que son liberadas por las levaduras y que mantienen su actividad en el vino (Carrascosa et al., 2005).

Otros compuestos liberados durante la autólisis y que están presentes en menor cantidad son los lípidos y los ácidos nucleicos, aproximadamente el 90% del RNA y el 40% del DNA celular se degrada durante la autólisis de las levaduras solubilizándose en el vino (Hernawan and Fleet, 1995). Los lípidos son importantes como componentes del flavor y parece ser que además influyen en la estabilidad de la espuma (Forss, 1969; Moreno-Arribas and Polo, 2009). Experimentos llevados a cabo en vino modelo demostraron que los niveles de triacilglicerol, 1,3-diacilglicerol, 2-monoacilglicerol, ácidos grasos libres, ésteres esteroides y esteroides aumentaban después de dos días de autólisis para disminuir posteriormente probablemente debido a la acción de enzimas hidrolíticas de levaduras (Pueyo et al., 2000b). Otros autores consideran que el contenido de lípidos aumenta durante la segunda fermentación y envejecimiento en botella en contacto con las lías (Piton et al., 1988; Troton et al., 1989). Existe cierta controversia respecto a la posible influencia positiva-negativa de los lípidos en la calidad de la espuma. Algunos autores encuentran que la adición de ácidos orgánicos de C_8 - C_{10} reduce la estabilidad de la espuma (Maujean et al., 1990a); mientras que otros autores encuentran que la adición de mezclas de lípidos no afecta a la espuma (Dussaud et al., 1994). Otros estudios han demostrado que el ácido linolénico y palmitolénico son buenos indicadores de estabilidad de la espuma (Pueyo et al., 1995), o que los ácidos C_8 , C_{10} y C_{12} correlacionan negativamente con la calidad de la espuma, mientras que los ésteres etílicos de C_6 , C_8 y C_{10} lo hacen positivamente (Gallart et al., 2002). Recientemente se ha descrito un papel importante de los monoacilglicerol de ácidos palmítico y esteárico así como de cuatro derivados de gliceril-etilenglicol unidos a ácidos grasos como compuestos superficialmente activos en la promoción y estabilización de la espuma de vinos espumosos (Coelho et al., 2011b)

Entre los compuestos volátiles responsables del aroma de los vinos espumosos se encuentran diferentes grupos químicos, ésteres etílicos, ésteres de acetato, alcoholes, furanos, fenoles volátiles, lactonas, ácidos, compuestos carbonílicos y otros. Se ha

confirmado la relación entre el tiempo de envejecimiento y la composición final en compuestos volátiles presentes en los vinos espumosos, de modo que durante el envejecimiento se producen procesos simultáneos de degradación y síntesis de compuestos volátiles (Pozo-Bayón et al., 2003). También se han caracterizado los compuestos volátiles liberados durante la autólisis que podrían servir como marcadores de envejecimiento en los vinos espumosos (Francioli et al., 2003). Los ésteres son la principal familia de compuestos liberados durante la autólisis, los de cadena corta (C₃-C₄) y mediana (C₆-C₁₂) con característica frutales aparecen al principio de la autólisis y después disminuyen, esto explicaría la pérdida de frescura en los vinos más envejecidos. Los alcoholes terpénicos y alcoholes superiores también son liberados durante la autólisis (geraniol, α -terpineol, citronelol, farnesol, isoamil alcohol, 2-feniletanol, etc.) (Alexandre and Guilloux-Benatier, 2006). Los ésteres de acetato disminuyen durante el envejecimiento, mientras que el succinato de dietilo, vitispirano y TDN (1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftaleno) aumentan con el tiempo (Torrens et al., 2010); estos últimos podrían ser utilizados como marcadores de envejecimiento. En otro estudio realizado sobre la autólisis en vino modelo con cepas de *S. cerevisiae* a temperaturas entre 15-20°C o 35-40°C (Chung, 1986) se detectaron entre 80-100 compuestos volátiles clasificados en los siguientes grupos (Lubbers et al., 1994): ésteres (39 compuestos), la mayoría ésteres etílicos de ácidos grasos que aportan notas frutales; alcoholes (15 compuestos), clasificados en dos grupos, alcoholes terpénicos, con aromas típicos de las variedades moscatel, y alcoholes superiores, con aromas herbáceos, medicinales o florales como el 2-fenil-etanol; aldehídos (10 compuestos), de los cuales el 3-metilbutanal es el mayoritario (40% del total) y otros interesantes como el benzaldehído; compuestos azufrados, aumentan a lo largo del envejecimiento, se ha identificado como interesante vitispirano, derivado norisoprenoide con aromas que recuerdan al eucalipto. Por último, lactonas (8 compuestos), con aromas similares a los que presenta la nuez de coco (alfa-decalactona) y el sotolón que aparece en vinos que han sufrido largos periodos de envejecimiento como los vinos espumosos.

I.8.2. Propiedades de la espuma en el cava.

La espuma es la característica principal que define el cava, le distingue de otros tipos de vinos y es lo primero que observa el consumidor en estos vinos; por esta razón ha merecido una especial atención y ha sido objeto de diferentes estudios científicos encaminados a descubrir los componentes principales responsables de su aparición, y que afectan a la composición y a las propiedades espumantes. Aunque se han diseñado

análisis sensoriales capaces de evaluar la calidad de la espuma de forma objetiva (Obiols et al., 1998), es necesaria una técnica instrumental capaz de obtener un valor cuantificable de la calidad de la espuma para poder comparar los vinos espumosos y correlacionar las propiedades espumantes con las características físico-químicas.

Los métodos utilizados para cuantificar la capacidad espumante se clasifican en tres grupos principales (Moreno-Arribas and Polo, 2009): liberación de CO₂ o CO₂ discharging, burbujeo de gas o gas sparging, y análisis de imágenes. El primer método (CO₂ discharging) consiste en la cuantificación de CO₂ liberado espontáneamente, una vez eliminado todo el gas libre, la botella se agita para cuantificar el CO₂ formado (Maujean et al., 1988). Los métodos de burbujeo de gas (gas sparging) son los más utilizados, basados en un procedimiento desarrollado por Bikerman en 1938 (Bikerman, 1938), consiste en crear un flujo de gas a velocidad controlada a través de un volumen de vino; algunos trabajos se han basado en este método para medir la altura de la espuma alcanzada y el tiempo que tarda en desaparecer después de parar el flujo de gas (Edwards et al., 1982; Pueyo et al., 1995). Respecto el método anterior, éste tiene la ventaja de poder evaluar la capacidad espumante de un vino tranquilo. Por último, el análisis de imágenes se utiliza para evaluar la altura y el collar producido en el cristal con un sistema de visión artificial (Machet et al., 1993; Robillard, 1995). Este método tiene la ventaja de poder evaluar la calidad de la espuma de un modo automático utilizando una cámara de video en condiciones reales en una copa de cristal, es importante tener en cuenta la calidad del cristal cuando evaluamos la calidad de la espuma así como los parámetros ambientales durante el análisis.

El equipo Mosalux es un método de burbujeo de gas basado en el principio de Bikerman con algunas modificaciones (Maujean et al., 1990a). Utiliza una celda fotoeléctrica que recoge la altura alcanzada por la espuma incorporando un software para la adquisición de datos, y consiste en inyectar gas carbónico o nitrógeno para provocar, en el vino o en el cava previamente desgasificado, la formación de espuma. Los parámetros medidos son: HM o altura máxima de la espuma en milímetros (mm), HS o altura estable de la espuma en el tiempo (mm), y TS o tiempo de estabilidad después de parar el flujo de gas en segundos (seg). Este equipo ha sido utilizado en numerosos trabajos desde 1990 hasta la fecha (Andrés-Lacueva et al., 1997; Andrés-Lacueva et al., 1996; Brissonnet and Maujean, 1991, 1993; Dussaud et al., 1994; Gallart et al., 2004; Girbau-Sola et al., 2002a; González-Royo et al., 2014; Lao et al., 1999; López-Barajas et al., 1999; López-Barajas et al., 1997; Malvy et al., 1994; Marchal et

al., 2006; Maujean et al., 1990a; Robillard et al., 1993; Senée et al., 1999; Vanrell et al., 2007), y se ha establecido buena relación entre las propiedades de la espuma obtenidas con el Mosalux y la evaluación de la calidad de la espuma con análisis sensorial (Gallart et al., 2002).

Otros estudios se han centrado en los diferentes aspectos físico-químicos de la espuma para intentar explicar la formación de las burbujas (nucleación) y la supervivencia de ésta en el interior del líquido y también en su superficie. Algunos de estos trabajos proponen modelos construidos con fibras que simulan la formación de burbujas y su comportamiento (Casey, 1987; Casey, 1995; Casey, 2000; Jordan and Napper, 1994; Liger-Belair et al., 2006; Péron et al., 2004; Senée et al., 1999; Uzel et al., 2006). Otros trabajos han demostrado que las partículas endógenas, como la bentonita y las levaduras, pueden tener un efecto positivo y/o negativo importante en la calidad de la espuma (Senée et al., 1999). La mayoría de los estudios publicados tienen como objetivo en definitiva establecer el efecto de la composición química de estos vinos y las diferentes tecnologías utilizadas en la producción y la calidad de la espuma.

I.9. BIBLIOGRAFÍA.

- Abdallah, Z., Aguié-Béghin, V., Abou-Saleh, K., Douillard, R., and Bliard, C. (2010). Isolation and analysis of macromolecular fractions responsible for the surface properties in native Champagne wines. *Food Research International* 43, 982-987.
- Abeliovich H, Zhang C, Dunn WA, Shokat KM, and DJ, K. (2003). Chemical genetic analysis of Apg1 reveals a non-kinase role of the induction of autophagy. *Molecular Biology of the Cell* 14, 477-490.
- Al-Aidroos, K., and Bussey, H. (1978). Chromosomal mutants of *Saccharomyces cerevisiae* affecting the cell wall binding site for killer factor. *Canadian Journal of Microbiology* 24, 228-237.
- Alburquerque, M., Yuste, J., Rubio, J., and Yuste, J. (2006). Descripción y caracterización agronómica de 28 variedades tintas de vid en Castilla y León.
- Alexandre, H., and Guilloux-Benatier, M. (2006). Yeast autolysis in sparkling wine - a review. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 12, 119-127.
- Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E., and Lipman, D. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215, 403-410.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25, 3389-3402.
- Álvarez, M. (2005). Análisis de la implantación de levaduras inoculadas en fermentaciones controladas de mostos y su influencia en la calidad de los vinos. In Departamento de Biología y Producción de Vegetales (Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura).
- Ambroña, J., Vinagre, A., Maqueda, M., Álvarez, M., and Ramírez, M. (2006). Rhodamine-pink as genetic marker for yeast populations in wine fermentations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 2977-2984.
- Ambroña, J., Vinagre, A., and Ramírez, M. (2005). Rapid asymmetric evolution of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts under apparently non-selective conditions. *Yeast* 16, 1299-1306.

- Anastasova, S., Milanova, M., and Todorovsky, D. (2008). Photoluminescence response of Ru(II) complex immobilized in SiO₂-based matrix to dissolved oxygen in beer. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 70, 1292-1296.
- Andorrà, I., Berradre, M., Mas, A., Esteve-Zarzoso, B., and Guillamón, J.M. (2012). Effect of mixed culture fermentations on yeast populations and aroma profile. *Food Science and Technology* 49, 8-13.
- Andrés-Lacueva, C., Lamuela-Raventós, R.M., Buxaderas, S., and de la Torre-Boronat, M.d.C. (1997). Influence of variety and aging on foaming properties of Cava (sparkling wine). 2. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 2520-2525.
- Andrés-Lacueva, C., López-Tamames, E., Lamuela-Raventós, R.M., Buxaderas, S., and de la Torre-Boronat, M.d.C. (1996). Characteristics of sparkling base wines affecting foam behavior. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 989-995.
- Anfang, N., Brajkovich, M., and Goddard, M.R. (2009). Co-fermentation with *Pichia kluyveri* increases varietal thiol concentrations in Sauvignon Blanc. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 15, 1-8.
- Angulo, L., López, J., Lema, C., and Freire, M.L. (1994). Flora levaduriforme asociada a diferentes variedades de "Vitis vinifera". XV Jornadas de Viticultura y Enología de Tierra de Barros, 205-214.
- Anónimo (2011). Level2®TD para la complejidad aromática, sensación en boca y la longevidad de los vino (from <http://www.lallemandwine.com/es/?market=22>).
- Anónimo (2012). Inoculación secuencial con levaduras *Torulaspora delbrueckii* y *Saccharomyces cerevisiae*: El Siguiete Paso en Fermentación (from http://www.proenol.com/files/editorials/WUP_1-2010-TD-ESP.pdf?u=).
- Anónimo (2013). ZYMAFLORE® Alpha TD no-*Saccharomyces. Torulaspora delbrueckii*-El potencial de la biodiversidad (from <http://laffort.com/es/productos/470-zymaflore-alpha>).
- Anónimo (2014). Keys for a Successful Malolactic Fermentation (from <http://www.enartisvinquiry.com/download/MLF.pdf>).
- Ansanay, V., Dequin, S., Blondin, B., and Barre, P. (1993). Cloning, sequence and expression of the gene encoding the malolactic enzyme from *Lactococcus lactis*. *FEBS Letters* 332, 74-80.
- Arnold, W. (1980). Yeast cell envelopes biochemistry, biophysics and structure, Vol 2 (CRC Press).
- Azzolini, M., Fedrizzi, B., Tosi, E., Finato, F., Vagnoli, P., Scrinzi, C., and Zapparoli, G. (2012). Effects of *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed cultures on fermentation and aroma of Amarone wine. *European Food Research and Technology* 235, 303-313.
- Azzolini, M., Tosi, E., Lorenzini, M., Finato, F., and Zapparoli, G. (2014). Contribution to the aroma of white wines by controlled *Torulaspora delbrueckii* cultures in association with *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1-17.
- Baba, M., Osumi, M., Scott, S., Klionsky, D., and Oshumi, Y. (1997). Two distinct pathways for targeting proteins from the cytoplasm to the vacuole/lysosome. *The Journal of Cell Biology* 139, 1687-1695.
- Baba, M., Takeshige, K., Baba, N., and Oshumi, Y. (1994). Ultrastructural analysis of the autophagic process in yeast: detection of autophagosomes and their characterization. *The Journal of Cell Biology* 124, 903-913.
- Babayan, T., and Bezrukov, M. (1985). Autolysis in yeasts. *Acta Biotechnology* 5.
- Ballou, C.E. (1990). Isolation, characterization, and properties of *Saccharomyces cerevisiae mnn* mutants with nonconditional protein glycosylation defects. *Methods in Enzymology* 185, 440-470.
- Baranowski, K., and Radler, F. (1984). The glucose-dependent transport of L-malic acid in *Zygosaccharomyces bailii*. *Antonie van Leeuwenhoek* 50, 329-340.
- Barcenilla J, and V, A. (1989). Dinámica fermentativa de los mostos de uva por levaduras en la comunidad de Madrid. *Alimentaria*, 57-65.

- Bardi, L., Crivelli, C., and Marzona, M. (1998). Esterase activity and release of ethyl esters of medium-chain fatty acids by *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic growth. *Canadian Journal of Microbiology* *44*, 1171-1176.
- Bartowsky, E., Costello, P., and Henschke, P. (2002). Management of malolactic-wine flavour manipulation. *The Australian Grapegrower and Winemaker* *461a*, 7-12.
- Bartowsky, E., and Henschke, P. (1995). Malolactic fermentation and wine flavour. *The Australian Grapegrower and Winemaker*
- Bauer, R., and Dicks, L. (2004). Control of malolactic fermentation in wine. A review. *South African Society for Enology and Viticulture* *25*, 74-88.
- Baumes, R., Cordonnier, R., Nitz, S., and Drawert, F. (1986). Identification and determination of volatile constituents in wines from different vine cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture* *37*, 927-943.
- Becker, N. (1985). Site selection for viticulture in cooler climates using local climatic information. Paper presented at: International Symposium on Cool Climate Viticulture and Enology.
- Belda, I., Navascués, E., Marquina, D., Santos, A., Calderon, F., and Benito, S. (2014). Dynamic analysis of physiological properties of *Torulaspora delbrueckii* in wine fermentations and its incidence on wine quality. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1-12.
- Beltran, G., Torija, M.J., Novo, M., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamón, J.M., Rozès, N., and Mas, A. (2002). Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: a six year follow-up study. *Systematic and Applied Microbiology* *25*, 287-293.
- Bely, M., Stoeckle, P., Masneuf-Pomarède, I., and Dubourdieu, D. (2008). Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *International Journal of Food Microbiology* *122*, 312-320.
- Bemelmans, J. (1979). Review of isolation and concentration techniques. *Progress in Flavour Research* *8*, 79-98.
- Bikerman, J. (1938). The unit of foaminess. *Transactions of the Faraday Society* *34*, 634-638.
- Bisson, L., and Kunkee, R. (1991). Microbial interactions during wine production. *Mixed Cultures in Biotechnology*, 37-68.
- Blanc, A., Ribas, J.C., Wickner, R.B., and Sonenberg, N. (1994). His-154 is involved in the linkage of the *Saccharomyces cerevisiae* LA double-stranded RNA virus Gag protein to the cap structure of mRNAs and is essential for M1 satellite virus expression. *Molecular and Cellular Biology* *14*, 2664-2674.
- Boido, E., Medina, K., Fariña, L., Carrau, F., Versini, G., and Dellacassa, E. (2009). The effect of bacterial strain and aging on the secondary volatile metabolites produced during malolactic fermentation of Tannat red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* *57*, 6271-6278.
- Boone, C., Sdicu, A., Wagner, J., Degre, R., Sanchez, C., and Bussey, H. (1990a). Integration of the yeast K1 killer toxin gene into the genome of marked wine yeasts and its effect on vinification. *American Journal of Enology and Viticulture* *41*, 37-42.
- Boone, C., Sommer, S.S., Hensel, A., and Bussey, H. (1990b). Yeast KRE genes provide evidence for a pathway of cell wall beta-glucan assembly. *The Journal of Cell Biology* *110*, 1833-1843.
- Bostian, K., Elliot, Q., Bussey, H., Burn, V., Smith, A., and Tipper, D. (1984). Sequence of the preprotoxin dsRNA gene of type I killer yeast: Multiple processing events produce a two-component toxin. *Cell* *36*, 741-751.
- Boulton, R., Singleton, V., Bisson, L., and Kunkee, R. (1996). Principles and practices of winemaking. Chapman and Hall.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* *72*, 248-254.
- Breinig, F., Schleinkofer, K., and Schmitt, M. (2004). Yeast Kre1p is GPI-anchored and involved in both cell wall assembly and architecture. *Microbiology* *150*, 3209-3218.

- Breinig, F., Sendzik, T., Einfeld, K., and Schmitt, M.J. (2006). Dissecting toxin immunity in virus-infected killer yeast uncovers an intrinsic strategy of self-protection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 3810-3815.
- Briones, A., Izquierdo, P., Palop, M., and Úbeda, J. (1995). Aspectos de la influencia del suelo y el clima en la flora levaduriforme espontánea en las uvas de la variedad Airén. *Alimentaria*, 29-32.
- Brissonnet, F., and Maujean, A. (1991). Identification of some foam-active compounds in champagne base wines. *American Journal of Enology and Viticulture* *42*, 97-102.
- Brissonnet, F., and Maujean, A. (1993). Characterization of foaming proteins in a champagne base wine. *American Journal of Enology and Viticulture* *44*, 297-301.
- Brown, J., North, S., and Bussey, H. (1993). SKN7, a yeast multicopy suppressor of a mutation affecting cell wall beta-glucan assembly, encodes a product with domains homologous to prokaryotic two-component regulators and to heat shock transcription factors. *Journal of Bacteriology* *175*, 6908-6915.
- Bruenn, J.A. (2003). A structural and primary sequence comparison of the viral RNA-dependent RNA polymerases. *Nucleic Acids Research* *31*, 1821-1829.
- Bussey, H. (1991). K1 killer toxin, a pore-forming protein from yeast. *Molecular Microbiology* *5*, 2339-2343.
- Bussey, H., Saville, D., Greene, D., Tipper, D., and Bostian, K. (1983). Secretion of *Saccharomyces cerevisiae* killer toxin: processing of the glycosylated precursor. *Molecular and Cellular Biology* *3*, 1362-1370.
- Bussey, H., Saville, D., Hutchins, K., and Palfree, R. (1979). Binding of yeast killer toxin to a cell wall receptor on sensitive *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* *140*, 888-892.
- Buzzini, P., Corazzi, L., Turchetti, B., Buratta, M., and Martini, A. (2004). Characterization of the in vitro antimycotic activity of a novel killer protein from *Williopsis saturnus* DBVPG 4561 against emerging pathogenic yeasts. *FEMS Microbiology Letters* *238*, 359-365.
- Cabrera, M., Moreno, J., Ortega, J., and Medina, M. (1988). Formation of ethanol, higher alcohols, esters and terpenes by five yeast strains in must from Pedro Ximenez grapes in various degrees of ripeness. *American Journal of Enology and Viticulture* *39*, 283-287.
- Cacho, J. (2006). El aroma del vino y sus precursores. (Departamento de Química Analítica, Universidad de Zaragoza.).
- Cañas, P.I., García, A.P., and Romero, E.G. (2015). Enhancement of flavour properties in wines using sequential inoculations of non-*Saccharomyces* (*Hansenula* and *Torulaspora*) and *Saccharomyces* yeast. *Vitis-Journal of Grapevine Research* *50*, 177.
- Caridi A, Cufari A, and D, R. (2002). Isolation and clonal pre-selection of enological *Saccharomyces*. *The Journal of General and Applied Microbiology* *48*, 261-267.
- Carrascosa, A.V., Muñoz, R., and González, R. (2005). *Microbiología del Vino* (AMV Ediciones).
- Carrau, J., Azevedo, J., Siedbery, P., and Campbell, D. (1982). Methods for recovering fusion products among oenological strains of *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Brazilian Journal of Genetics* *1*, 221-226.
- Carroll, C., and Wickner, R. (1995). Translation and M1 double-stranded RNA propagation: MAK18 = RPL41B and cycloheximide curing. *Journal of Bacteriology* *177*, 2887-2891.
- Casey, J. (1987). Effervescence in sparkling wines. *Australian Grapegrower and Winemaker* (Australia).
- Casey, J. (1995). Effervescence in sparkling wines: the sequel. *Australian Grapegrower and Winemaker* (Australia).
- Casey, J. (2000). Méthode champenoise or mythes champenoises. *Australian Grapegrower & Winemaker* (438a): 168-170, 2000.
- Cássio, F., and Leão, C. (1993). A comparative study on the transport of L(-)malic acid and other short-chain carboxylic acids in the yeast *Candida utilis*: Evidence for a general organic acid permease. *Yeast* *9*, 743-752.
- Castino, M. (1994). *Vino bianchi tecnologia di produzione* (Bologna).

- Castro, J. (1986). Vino blancos: extracción de mosto. Desfangado y otros sistemas. *Fermentación. Viña Vino* 33, 42-51.
- Cebollero, E., Carrascosa, A., and González, R. (2005). Evidence for yeast autophagy during simulation of sparkling wine aging: a reappraisal of the mechanism of yeast autolysis in wines. *Biotechnology Progress* 21, 614-616.
- Ceroni, A., Passerini, A., Vullo, A., and Frasconi, P. (2006). DISULFIND: a Disulfide Bonding State and Cysteine Connectivity Prediction Server. *Nucleic Acids Research* 34, W177-W181.
- Ciani, M., Beco, L., and Comitini, F. (2006). Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 108, 239-245.
- Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., and Domizio, P. (2010). Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Research* 10, 123-133.
- Ciani, M., and Fatichenti, F. (2001). Killer toxin of *Kluyveromyces phaffii* DBVPG 6076 as a biopreservative agent to control Apiculate wine yeasts. *Applied Environmental Microbiology* 67, 3058-3063.
- Ciani, M., and Ferraro, L. (1996). Enhanced glycerol content in wines made with immobilized *Candida stellata* cells. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 128-132.
- Ciani, M., and Ferraro, L. (1998). Combined used of immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae* to improve the quality of wines. *Journal of Applied Microbiology* 85, 247-254.
- Ciani, M., and Maccarelli, F. (1998). Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 14, 199-203.
- Ciani, M., and Picciotti, G. (1995). The growth kinetics and fermentation behavior of some non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *Biotechnology Letters* 17, 1247-1250.
- Cilindre, C., Liger-Belair, G., Villaume, S., Jeandet, P., and Marchal, R. (2010). Foaming properties of various Champagne wines depending on several parameters: Grape variety, aging, protein and CO₂ content. *Analytica Chimica Acta* 660, 164-170.
- Clemente-Jimenez, J., Mingorance-Cazorla, L., Martínez-Rodríguez, S., Las Heras-Vázquez, F., and Rodríguez-Vico, F. (2005). Influence of sequential yeast mixtures on wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 98, 301-308.
- Coelho, E., Rocha, S.I.M., and Coimbra, M.A. (2011). Foamability and foam stability of molecular reconstituted model sparkling wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 8770-8778.
- Cole, V., and Noble, A. (1995). Flavor chemistry and assessment. In *Fermented beverage production* (Springer), pp. 361-385.
- Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., and Ciani, M. (2011). Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology* 28, 873-882.
- Comitini, F., Pepe, L., Mannazzu, I., and Ciani, M. (2004). *Pichia anomala* and *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxins as new tools against *Dekkera/Brettanomyces* spoilage yeasts. *FEMS Microbiology Letters* 238, 235-240.
- Connew, S. (1998). Yeast autolysis A review of current research. *Journal Wine Industry* 13, 61-64.
- Constantí, M., Poblet, M., Arola, L., Mas, A., and Guillamón, J.M. (1997). Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation in a newly established winery. *American Journal of Enology and Viticulture* 48, 339-344.
- Conti, S., Fanti, F., Magliani, W., Gerloni, M., Bertolotti, D., Salati, A., Cassone, A., and Polonelli, L. (1998a). Mycobactericidal activity of human natural, monoclonal, and recombinant yeast killer toxin-like antibodies. *Journal of Infectious Diseases* 177, 807-811.
- Conti, S., Magliani, W., Gerloni, M., Salati, A., Dieci, E., Arseni, S., Fiscaro, P., and Polonelli, L. (1998b). A transphyletic anti-infectious control strategy based on the killer phenomenon. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 22, 151-161.

- Corbacho, I., Olivero, I., and Hernández, L.M. (2005). A genome-wide screen for *Saccharomyces cerevisiae* nonessential genes involved in mannosyl phosphate transfer to mannoprotein-linked oligosaccharides. *Fungal Genetics and Biology* 42, 773-790.
- Cordero-Bueso, G., Esteve-Zarzoso, B., Cabellos, J.M., Gil-Díaz, M., and Arroyo, T. (2013). Biotechnological potential of non-*Saccharomyces* yeasts isolated during spontaneous fermentations of Malvar (*Vitis vinifera* cv. L.). *European Food Research and Technology* 236, 193-207.
- Corison, C., Ough, C., Berg, H., and Nelson, K. (1979). Must acetic acid and ethyl acetate as mold and rot indicators in grapes. *American Journal of Enology and Viticulture* 30, 130-134.
- Côrte-Real, M., and Leão, C. (1990). Transport of malic acid and other dicarboxylic acids in the yeast *Hansenula anomala*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56, 1109-1113
- Côrte-Real, M., Leão, C., and van Uden, N. (1989). Transport of L-malic acid and other dicarboxylic acids in the yeast *Candida sphaerica*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 31.
- Charpentier, C., and Feuillat, M. (1986). Alteration of cell wall structure in *Sacharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* during autolysis. *Applied Microbiology and Biotechnology* 24.
- Charpentier, C., and Feuillat, M. (1993). *Yeast autolysis*, Vol 7.
- Charpentier, C., and Freyssinet, M. (1989). The mechanism of yeast autolysis in wine. *Yeast* 5, 181-186.
- Chatonnet, P., Dubourdie, D., Boidron, J.N., and Pons, M. (1992). The origin of ethylphenols in wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 60, 165-178.
- Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J.N., and Lavigne, V. (1993). Synthesis of volatile phenols by *Saccharomyces cerevisiae* in wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 62, 191-202.
- Chatonnet, P., Viala, C., and Dubourdieu, D. (1997). Influence of polyphenolic components of red wines on the microbial synthesis of volatile phenols. *American Journal of Enology and Viticulture* 48, 443-448.
- Chomé, P. (2006). *Variedades de vid. Registro de variedades comerciales*.
- Chung, S. (1986). Contribution a l'étude de la formation des composé volatils au cours de l'autolyse de levures de vinification (Dijon: Université de Bourgogne).
- Danilewicz, J. (2007). Interaction of sulfur dioxide, polyphenols, and oxygen in a wine-model system: Central role of iron and copper. *American Journal of Enology and Viticulture* 58, 53-60.
- Darriet P, T.T., Lavigne V, Boidron JN, Dubourdieu D (1995). Identification of a powerful aromatic component of *Vitis vinifera* L.var. Sauvignon wines: 4-mercapto-4-methylpentan-2-one. *Flavour Fragrance* 10, 385-392.
- De Benedictis, M., Bleve, G., Grieco, F., Tristezza, M., and Tufariello, M. (2011). An optimized procedure for the enological selection of non-*Saccharomyces* starter cultures. *Antonie van Leeuwenhoek* 99, 189-200.
- De Rosa, T., and Guixá, R.V. (1990). *Tecnología de los vinos espumosos* (Mundi Prensa Libros SA).
- Degre, R. (1993). Selection and commercial cultivation of wine yeast and bacteria. *Wine Microbiology and Biotechnology*, 421-447.
- Delfini, C., and Bardi, L. (1990). La biotecnología aplicada a la enología y a los microorganismos del vino. *Vitivinicultura* 9, 32-38.
- Delteil, D., and Aizac, T. (1988). Comparison of yeast inoculation techniques by the use of a marked yeast strain. *Australian and New Zealand Wine Industry* 3, 53-56.
- Delteil, D., and Lozano, L. (1995). A graphic interpretation of organoleptic analysis of wine aromatic profile, gustatory profile; principal component analysis. *Progres Agricole et Viticole*
- Denayrolles, M., Aigle, M., and Lonvaud-Funel, A. (1995). Functional expression in *Saccharomyces cerevisiae* of the *Lactococcus lactis mleS* gene encoding the malolactic enzyme. *FEMS Microbiology Letters* 125, 37-43.

- Desportes, C., Charpentier, M., Duteurtre, B., Maujean, A., and Duchiron, F. (2001). Isolation, identification, and organoleptic characterization of low-molecular-weight peptides from white wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 52, 376-380.
- Díez, B., Pedrós-Alió, C., Marsh, T., and Massana, R. (2001). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Applied Environmental Microbiology* 67, 2942-2951.
- Díez, B., Pedrós-Alió, C., and Massana, R. (2001). Study of genetic diversity of eukaryotic picoplankton in different oceanic regions by small-subunit rRNA gene cloning and sequencing. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 2932-2941.
- Dignard, D., Whiteway, M., Germain, D., Tessier, D., and Thomas, D. (1991). Expression in yeast of a cDNA copy of the K2 killer toxin gene. *Molecular and General Genetics MGG* 227, 127-136.
- Dizy, M., and Polo, M. (1996). Changes of the concentration of nitrogenous compounds during fermentation of must at pilot-plant scale. *Food Science and Technology International* 2, 87-93.
- Dmochowska, A., Dignard, D., Henning, D., Thomas, D.Y., and Bussey, H. (1987). Yeast KEX1 gene encodes a putative protease with a carboxypeptidase B-like function involved in killer toxin and α -factor precursor processing. *Cell* 50, 573-584.
- Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Comitini, F., Gobbi, M., Mannazzu, I., and Ciani, M. (2011). Outlining a future for non-*Saccharomyces* yeasts: selection of putative spoilage wine strains to be used in association with *Saccharomyces cerevisiae* for grape juice fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 147, 170-180.
- Drawert, F., and Barton, H. (1978). Biosynthesis of flavor compounds by microorganisms. 3. Production of monoterpenes by the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 26, 765-766.
- Du Toit, M., and Pretorius, I.S. (2000). Microbial spoilage and preservation of wine: using weapons from nature's own arsenal—a review. *South African Journal of Enology and Viticulture* 21, 74-96.
- Du Toit, W., and Lambrechts, M. (2002). The enumeration and identification of acetic acid bacteria from South African red wine fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 74, 57-64.
- Du Toit, W., and Pretorius, I. (2002). The occurrence, control and esoteric effect of acetic acid bacteria in winemaking. *Annals of Microbiology* 52, 155-179.
- Du Toit, W., Pretorius, I., and Lonvaud-Funel, A. (2005). The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of *Acetobacter pasteurianus* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. *Journal of Applied Microbiology* 98, 862-871.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P., and Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28, 350-356.
- Dubois, P. (1983). Volatile phenols in wines. *Flavour of distilled beverages*, 110-119.
- Dubourdieu D, T.T., Masneuf I, Peyrot des Gachons C and Murat ML (2006). The Role of Yeasts in Grape Flavor Development during Fermentation: The Example of Sauvignon blanc. *The American Society for Enology and Viticulture* 57, 81-88.
- Dupin, I.V., McKinnon, B.M., Ryan, C., Boulay, M., Markides, A.J., Jones, G.P., Williams, P.J., and Waters, E.J. (2000). *Saccharomyces cerevisiae* Mannoproteins That Protect Wine from Protein Haze: Their Release during Fermentation and Lees Contact and a Proposal for Their Mechanism of Action. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 3098-3105.
- Dussaud, A., Robillard, B., Carles, B., Duteurtre, B., and Vignes-adler, M. (1994). Exogenous lipids and ethanol influences on the foam behavior of sparkling base wines. *Journal of Food Science* 59, 148-151.
- E.C.C. (1987). Reglamento (CEE) N° 822/87 del Consejo de 16 de marzo de 1987. Council Regulation (EEC) N° 822/87 of 16 March 1987 on the common organization of the market in wine.

- E.E.C. (1990). N° 2676. Métodos de análisis comunitarios aplicables en el sector del vino. Official Report of the European Community *L 272*, 191-191.
- Edwards, M., Eschenbruch, R., and Molan, P.C. (1982). Foaming in winemaking. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* *16*, 105-109.
- Eglinton, J., and Henschke, P. (1999). Restarting incomplete fermentations: the effect of high concentrations of acetic acid. *Australian Journal of Grape and Wine Research* *5*, 71-78.
- El-Sherbeini, M., and Bostian, K.A. (1987). Viruses in fungi: infection of yeast with the K1 and K2 killer viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *84*, 4293-4297.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., and Querol, A. (1999a). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8 S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology* *49*, 329-337.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., and Querol, A. (1999b). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.85 rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology* *49*, 329-337.
- Etievant, P. (1991). Wine. Volatile compounds in foods and beverages *1*.
- Etievant, P.X. (1981). Volatile phenol determination in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* *29*, 65-67.
- Etievant, P.X., and Bayonove, C.L. (1983). Aroma components of pomaces and wine from the variety Muscat de Frontignan. *Journal of the Science of Food and Agriculture* *34*, 393-403.
- Fagan, G.L., Kepner, R., and Webb, A. (1981). Biosynthesis of certain gamma-substituted-gamma-butyrolactones present in film Sherries. *American Journal of Enology and Viticulture* *32*, 163-167.
- Fagan GL, K.R., Webb AD (1981). Production of linalool, cis-nerolidol and trans-nerolidol, and trans, trans-farnesol by *Saccharomyces fermentati* growing as a film on simulated wine. *Vitis* *20*, 36-42.
- Farris, G., Budroni, M., Vodret, T., and Deiana, P. (1990). Sull'originir dei lieviti vinari i lieviti dei terreni, delle foglie e degli acini di alcun vigneti sardi. *L'Enotecnico* *6*, 99-108.
- Fernández Cedrón, M. (2004). Estudio analítico de compuestos volátiles en vino. Caracterización quimiométrica de distintas denominaciones de origen. In Departamento de Química (Universidad de La Rioja).
- Ferraro, L., Fatichenti, F., and Ciani, M. (2000). Pilot scale vinification process using immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry* *35*, 1125-1129.
- Ferreira, V., Fernández, P., Peña, C., Escudero, A., and Cacho, J.F. (1995). Investigation on the role played by fermentation esters in the aroma of young Spanish wines by multivariate analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture* *67*, 381-392.
- Ferreira, V., López, R., and Cacho, J.F. (2000). Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture* *80*, 1659-1667.
- Feuillat, M. (2003). Yeast macromolecules: origin, composition, and enological interest. *American Journal of Enology and Viticulture* *54*, 211-213.
- Feuillat, M., and Charpentier, C. (1982). Autolysis of yeasts in champagne. *American Journal of Enology and Viticulture* *33*, 6-13.
- Flanzy, C. (2003). *Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos*, AMV Ediciones edn (Mundi Prensa Libros SA.).
- Fleet, G., and Heard, G. (1993). Yeasts: growth during fermentation. *Wine Microbiology and Biotechnology*, 27-54.
- Fleet, G.H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology* *86*, 11-22.
- Flegelová, H., Novotná, D., Vojtíšková, K., and Janderová, B. (2002). Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants with a different degree of resistance to killer toxins K1 and K2. *FEMS Yeast Research* *2*, 73-79.
- Flikweert, M.T., van der Zanden, L., Janssen, W., Steensma, H.Y., van Dijken, J.P., and Pronk, J.T. (1996). Pyruvate decarboxylase: an indispensable enzyme for growth of *Saccharomyces cerevisiae* on glucose. *Yeast* *12*, 247-257.

- Fornairon-Bonnefond, C., Camarasa, C., Moutounet, M., and Salmon, J. (2002). New trends of yeast autolysis and wine aging on less: bibliographic review. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 36, 49-69.
- Forss, D.A. (1969). Role of lipids in flavors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 17, 681-685.
- Francioli, S., Torrens, J., Riu-Aumatell, M., López-Tamames, E., and Buxaderas, S. (2003). Volatile compounds by SPME-GC as age markers of sparkling wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 54, 158-162.
- Fuck, E., Stark, G., and Radler, F. (1973). Äpfelsäurestoffwechsel bei *Saccharomyces* II. Anreicherung und Eigenschaften eines Malatenzymes. *Archives of Microbiology* 89, 223-231.
- Fujimura, T., and Esteban, R. (2011). Cap-snatching mechanism in yeast LA double-stranded RNA virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 17667-17671.
- Fujimura, T., and Esteban, R. (2012). Cap snatching of yeast LA double-stranded RNA virus can operate in trans and requires viral polymerase actively engaging in transcription. *Journal of Biological Chemistry* 287, 12797-12804.
- Fujimura, T., and Esteban, R. (2013). Cap snatching in yeast L-BC double-stranded RNA totivirus. *Journal of Biological Chemistry* 288, 23716-23724.
- Fujimura, T., Esteban, R., and Wickner, R.B. (1986). In vitro LA double-stranded RNA synthesis in virus-like particles from *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83, 4433-4437.
- Fujimura, T., and Wickner, R.B. (1989). Reconstitution of template-dependent in vitro transcriptase activity of a yeast double-stranded RNA virus. *Journal of Biological Chemistry* 264, 10872-10877.
- Futami, R., Muñoz-Pomer, A., Viu, J., Domínguez-Escribà, L., Covelli, L., Bernet, G., Sempere, J., Moya, A., and Llorens, C. (2011). GPRO: the professional tool for management, functional analysis and annotation of omic sequences and databases.
- Gallart, M., López-Tamames, E., Suberbiola, G., and Buxaderas, S. (2002). Influence of fatty acids on wine foaming. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 7042-7045.
- Gallart, M., Tomás, X., Suberbiola, G., López-Tamames, E., and Buxaderas, S. (2004). Relationship between foam parameters obtained by the gas-sparging method and sensory evaluation of sparkling wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84, 127-133.
- Gao, C., and Fleet, G. (1995). Degradation of malic and tartaric acids by high density cell suspensions of wine yeasts. *Food Microbiology* 12, 65-71.
- García-Carpintero, E.G., Sánchez-Palomo, E., and González-Viñas, M. (2011). Aroma characterization of red wines from cv. Bobal grape variety grown in La Mancha region. *Food Research International* 44, 61-70.
- García, A., Carcel, C., Dulau, L., Samson, A., Aguera, E., Agosin, E., and Günata, Z. (2002). Influence of a mixed culture with *Debaryomyces vanriji* and *Saccharomyces cerevisiae* on the volatiles of a Muscat wine. *Journal of Food Science* 67, 1138-1143.
- García, V., Vázquez, H., Fonseca, F., Manzanares, P., Viana, F., Martínez, C., and Ganga, M. (2010). Effects of using mixed wine yeast cultures in the production of Chardonnay wines. *Revista Argentina de Microbiología* 42, 226-229.
- Garijo, P., Santamaría, P., López, R., Sanz, S., Olarte, C., and Gutiérrez, A.R. (2008). The occurrence of fungi, yeasts and bacteria in the air of a Spanish winery during vintage. *International Journal of Food Microbiology* 125, 141-145.
- Georgopoulos, D., Hanning, E., and Leibowitz, M. (1986). Sequence of the M1-2 region of killer virus double-stranded RNA. *Basic Life Sciences* 40, 203-213.
- Giovani, G., and Rosi, I. (2007). Release of cell wall polysaccharides from *Saccharomyces cerevisiae* thermosensitive autolytic mutants during alcoholic fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 116, 19-24.
- Girbau-Sola, T., López-Barajas, M., López-Tamames, E., and Buxaderas, S. (2002). Foam aptitude of Trepát and Monastrell red varieties in cava elaboration. 2. Second fermentation and aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 5600-5604.

- Giudici, P., and Kunkee, R. (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.
- Giudici, P., Zambonelli, C., and Kunkee, R. (1993). Increased production of n-propanol in wine by yeast strains having an impaired ability to form hydrogen sulfide. *American Journal of Enology and Viticulture* 44, 17-21.
- Goniak, O., and Noble, A. (1987). Sensory study of selected volatile sulfur compounds in white wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 38, 223-227.
- González-Royo, E., Pascual, O., Kontoudakis, N., Esteruelas, M., Esteve-Zarzoso, B., Mas, A., Canals, J.M., and Zamora, F. (2014). Oenological consequences of sequential inoculation with non-*Saccharomyces* yeasts (*Torulaspora delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima*) and *Saccharomyces cerevisiae* in base wine for sparkling wine production. *European Food Research and Technology*, 1-14.
- González, R., Barcenilla, J., and Tabera, L. (2007). Cepas vónicas de *Saccharomyces cerevisiae* con bajo rendimiento en etanol In ACE Revista de Enología.
- González, R., Martínez-Rodríguez, A., and Carrascosa, A. (2003). Yeast autolytic mutants potentially useful for sparkling winw production. *International Journal of Food Microbiology* 84, 21-26.
- Goto, K., Fukuda, H., Kichise, K., Kitano, K., and Hara, S. (1991). Cloning and nucleotide sequence of the KHS killer gene of *Saccharomyces cerevisiae* *Agricultural and Biological Chemistry* 55, 1953-1958.
- Goto, K., Iwase, T., Kichise, K., Kitano, K., Totuka, A., Obata, T., and Hara, S. (1990). Isolation and Properties of a Chromosome-dependent KHR Killer toxin in *Saccharomyces cerevisiae* *Agricultural and Biological Chemistry* 54, 505-509.
- Goto, S., and Gokotsuka, I. (1977). Wild yeast populations in fresh grape musts of different harvest times. *Journal of Fermentation Technology* 55, 417-422.
- Grey, M., and Brendel, M. (1992). Rapid and simple isolation of DNA from agarose gels. *Current Genetics* 22, 83-84.
- Grobler, J., Bauer, F., Subden, R., and Van Vuuren, H. (1995). The *mae1* gene of *Schizosaccharomyces pombe* encodes a permease for malate and other C₄ dicarboxylic acids. *Yeast* 11, 1485-1491.
- Guadagni, D., Buttery, R.G., and Harris, J. (1966). Odour intensities of hop oil components. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 17, 142-144.
- Guerzoni, E., Intrieri, C., Marchetti, R., and Giudici, P. (1982). Contribution à la connaissance d'une nouvelle maladie de la grappe: la pourriture acide. Grecia.
- Guerzoni, E., and Marchetti, R. (1987). Analysis of yeast flora associated with grape sour rot and of the chemical disease markers. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 571-576.
- Guilloux-Benatier, M., and Chassagne, D. (2003). Comparison of components released by fermented or active dried yeasts after aging on lees in a model wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 746-751.
- Gulbinienė, G., Kondratienė, L., Jokantaite, T., Serviėne, E., Melvydas, V., and Petkuniėne, G. (2004). Occurrence of killer yeast strains in fruit and berry wine yeast populations. *Food Technology and Biotechnology* 42, 591-163.
- Guth, H. (1997). Quantitation and sensory studies of character impact odorants of different white wine varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 3027-3032.
- Guth, H. (1998). Comparison of different white wine varieties by instrumental analysis and sensory studies. In: *Chemistry of Wine Flavour*. (ACS Symposium Series 714: San Francisco, USA: Eds. A.L. Waterhouse and S.E. Ebeler).
- Hansen, E., Nissen, P., Sommer, P., Nielsen, J., and Arneborg, N. (2001). The effect of oxygen on the survival of non-*Saccharomyces* yeasts during mixed culture fermentations of grape juice with *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Microbiology* 91, 541-547.
- Häusler, A., Ballou, L., Ballou, C.E., and Robbins, P.W. (1992). Yeast glycoprotein biosynthesis: MNT1 encodes an alpha-1, 2-mannosyltransferase involved in O-glycosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89, 6846-6850.

- Heard, G., and Fleet, G. (1985). Growth of natural yeast flora during the fermentation of inoculated wines. *Applied Environmental Microbiology* 38, 22-25.
- Heard, G., and Fleet, G. (1986). Occurrence and growth of yeast species during the fermentation of some Australian wines. *Food Technology Australia* 38, 22-25.
- Henick-Kling, T. (1993). Malolactic fermentation. In: *Wine Microbiology and Biotechnology* (Ed. G.H. Fleet (Harwood: Camberwell, Vic)).
- Henschke, P., and Jiranek, V. (1993). Yeasts-metabolism of nitrogen compounds. *Wine Microbiology and Biotechnology*, 77-164.
- Hernandez-Orte, P., Cersosimo, M., Loscos, N., Cacho, J., Garcia-Moruno, E., and Ferreira, V. (2008). The development of varietal aroma from non-floral grapes by yeasts of different genera. *Food Chemistry* 107, 1064-1077.
- Hernawan, T., and Fleet, G. (1995). Chemical and cytological changes during the autolysis of yeast. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 14, 440-450.
- Herraiz, G., Reglero, M., Herraiz, P., Alvarez, M., and Cabezudo, M. (1990a). The influence of the yeast and type of culture on the volatile composition of wine fermented without sulphur dioxide. *American Journal of Enology and Viticulture* 41, 313-318.
- Herraiz, T., Reglero, G., Herraiz, M., Martin-Alvarez, P.J., and Cabezudo, M.D. (1990b). The influence of the yeast and type of culture on the volatile composition of wines fermented without sulfur dioxide. *American Journal of Enology and Viticulture* 41, 313-318.
- Hidalgo, J. (1985). Técnicas para la elaboración de vinos espumosos de cava (I). *Viña Vino* 12, 62-66.
- Hill, K., Boone, C., Goebel, M., Puccia, R., Sdicu, A., and Bussey, H. (1992). Yeast KRE2 defines a new gene family encoding probable secretory proteins, and is required for the correct N-glycosylation of proteins. *Genetics* 130, 273-283.
- Houtman, A., and du Plessis, C. (1985). Effect of the grape variety and the yeast strain on the fermentation rate and the concentration of volatile components of wine. *Bull OIV*, 648-649.
- Houtman, A., Marais, J., and Du Plessis, C. (1980a). The possibilities of applying present-day knowledge of wine aroma components: Influence of several juice factors on fermentation rate and ester production during fermentation. *South African Journal of Science* 1, 27-33.
- Houtman AC, Marais J, and CS, D.P. (1980b). Factors affecting the reproducibility of fermentation of grape juice and of the aroma composition of wines. *Vitis* 19, 37-54.
- Huang, W., and Klionsky, D. (2002). Autophagy in yeast: a review of the molecular machinery. *Cell Structure and Function* 27, 409-420.
- Husnik, J., Volschenk, H., Bauer, J., Colavizza, D., Luo, Z., and van Vuuren, H. (2006). Metabolic engineering of malolactic wine yeast. *Metabolic Engineering*, 315-323.
- Hutchins, K., and Bussey, H. (1983). Cell wall receptor for yeast killer toxin: involvement of (1→6)-β-d-glucan. *Journal of Bacteriology* 154, 161-169.
- Icho, T., and Wickner, R. (1989). The double-stranded RNA genome of yeast virus L-A encodes its own putative RNA polymerase by fusing two open reading frames. *The Journal of Biological Chemistry* 264, 6716-6723.
- Icho, T., and Wickner, R.B. (1988). The MAK11 protein is essential for cell growth and replication of M double-stranded RNA and is apparently a membrane-associated protein. *Journal of Biological Chemistry* 263, 1467-1475.
- Izquierdo Cañas, P., García Romero, E., Huertas Nebreda, B., Gómez Alonso, S., Gómez-Alonso, S., Collins, V., Vauzour, D., Rodríguez-Mateos, A., and Corona, G. (2011). Enhancement of flavour properties in wines using sequential inoculations of non-*Saccharomyces*. *Vitis-Journal of Grapevine Research* 50, 177-182.
- Jackson, R.S. (2008). *Wine science: principles and applications* (Academic Press).
- James, A., and Martin, A. (1952). Gas-liquid partition chromatography; the separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid. *The Biochemical Journal* 50, 679-670.
- Jolly, J., Augustyn, O., and Pretorius, I. (2006). The role and use of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production. *South African Journal for Enology and Viticulture* 27, 15.
- Jolly, N., Augustyn, O., and Pretorius, I. (2003a). The effect of non-*Saccharomyces* yeasts on fermentation and wine quality. *South African Society for Enology and Viticulture* 24, 55-62.

- Jolly, N., Augustyn, O., and Pretorius, I. (2003b). The occurrence of non-*Saccharomyces cerevisiae* yeast species over three vintages in four vineyards and grape musts from four production regions of the western cape, south africa. *South African Society for Enology and Viticulture* 24, 35.
- Jolly, N.P., Varela, C., and Pretorius, I.S. (2014). Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Research* 14, 215-237.
- Jordan, A., and Napper, D. (1994). Some aspects of the physical chemistry of bubble and foam phenomena in sparkling wine. Paper presented at: Sixth Australian Wine Industry Conference.
- Julius, D., Brake, A., Blair, L., Kunisawa, R., and Thorner, J. (1984). Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine-cleaving endopeptidase required for processing of yeast prepro- α -factor. *Cell* 37, 1075-1089.
- Junta de Extremadura, and Consejería de Economía y Trabajo, D.G.d.C. (2004). *Guía del vino en Extremadura*.
- Kabeya, Y., Kamada, Y., Baba, M., Takikawa, H., Sasaki, M., and Ohsumi, Y. (2005). Atg17 functions in cooperation with Atg1 and Atg13 in yeast autophagy. *Molecular Biology of the Cell* 16, 2544-2553.
- Kamada, Y., Funakoshi, T., Shintani, T., Pagano, K., Oshumi, M., and Oshumi, Y. (2000). Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *The Journal of Cell Biology* 150, 1507-1513.
- Kapsopoulou, K., Mourtzini, A., Anthoulas, M., and Nerantzis, E. (2007). Biological acidification during grape must fermentation using mixed cultures of *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23, 735-739.
- Kassir, Y., and Simchen, G. (1991). Monitoring meiosis and sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in Enzymology* 194, 94.
- Kennedy, J., Saucier, C., and Glories, Y. (2006). Grape and wine phenolics: History and perspective. *American Journal of Enology and Viticulture* 57, 239-248.
- Khachatourians, G.G. (1995). *Food Biotechnology: Microorganisms* (John Wiley & Sons).
- Kim, D.-H., Hong, Y.-A., and Park, H.-D. (2008). Co-fermentation of grape must by *Issatchenkia orientalis* and *Saccharomyces cerevisiae* reduces the malic acid content in wine. *Biotechnology Letters* 30, 1633-1638.
- Kim, J., Huang, W., Stromhaug, P., and Klionsky, D. (2002). Convergence of multiple autophagy and cytoplasm to vacuole targeting components to a perivacuolar membrane compartment prior to the novo vesicle formation. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 763-773.
- King, A., and Richard Dickinson, J. (2000). Biotransformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspota delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* 16, 499-506.
- Kitson, F.G., Larsen, B.S., and McEwen, C.N. (1996). *Gas chromatography and mass spectrometry: a practical guide* (Academic Press).
- Klingenberg A, S.E. (1985). Production of monoterpenes in liquid cultures by the yeast *Ambrosiozyma monospora*. *Planta Medica* 3, 264-265.
- Klionsky, D. (2005). The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *Journal of Cell Science* 1, 7-18.
- Klionsky, D., Cregg, J., Dunn, J., Emr, S., Sakai, Y., and Sandoval, I. (2003). A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Developmental Cell* 5, 539-545.
- Kurita, T., Noda, Y., Takagi, T., Osumi, M., and Yoda, K. (2011). Kre6 protein essential for yeast cell wall β -1, 6-glucan synthesis accumulates at sites of polarized growth. *Journal of Biological Chemistry* 286, 7429-7438.
- Kurtzman, C. (2011). *Torulaspota Lindner* (1904). In *The Yeasts: A Taxonomic Study Fifth Edition*, C. Kurtzman, J. Fell, and T. Boekhout, eds. (London: Elsevier), pp. 867-874.
- Kurzweilová, H., and Sigler, K. (1994). Kinetic studies of killer toxin K1 binding to yeast cells indicate two receptor populations. *Archives of microbiology* 162, 211-214.

- Lacey MJ, Allen MS, Harris RLN, and VW, B. (1991). Methoxypyrazines in Sauvignon blanc grapes and wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 42, 103–108.
- Laffon-Lafourcade, S., Lucmaret, V., Joyeux, A., and Ribéreau-Gayon, P. (1981). Utilisation de levains mixtes dans l'élaboration des vins de pourriture noble, en vue de réduire l'acidité volatile. *Compte Rendu de l'Académie d'Agriculture de France* 67, 616-622.
- Lambrechts, M., and Pretorius, I. (2000). Yeast and its importance to wine aroma.
- Lang, T., Reiche, S., Straub, M., Bredsschneider, M, and Thumm, M. (2000). Autophagy and the Cvt pathway both depend on AUT9. *Journal of Bacteriology* 182, 2125-2133.
- Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., and Salzberg, S.L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biology* 10, R25.
- Languet, P., Aguera, E., Samson, A., Ortiz-Julien, A., and Salmon, J. (2005). Valorization aromatique des mouts par l'utilisation séquentielle des levures d'espèces non-*Saccharomyces* et *Saccharomyces*. *Revue des oenologues et des techniques vitivinicoles et oenologiques* 117, 31-33.
- Lao, C., Santamaria, A., López-Tamames, E., Bujan, J., Buxaderas, S., and De la Torre-Boronat, M. (1999). Effect of grape pectic enzyme treatment on foaming properties of white musts and wines. *Food chemistry* 65, 169-173.
- Laszlo, J., Van Rooyen TJ, and AF, K. (1978). The combination of molecular oxygen in grape must and young wine and its consequences. *South African Journal of Science* 74, 95-98.
- Laurie, V., Law, R., and W.S. Joslin, A. (2008). Waterhouse: «In situ measurements of dissolved oxygen during low-level oxygenation in red wines». *American Journal of Enology and Viticulture* 59, 215-219.
- Laurie, V., Zuñiga MC, Carrasco-Sanchez V, Santos LS, Canete A, Olea-Azar C, Ugliano M, and E, A. (2012). Reactivity of 3-sulfanyl-1-hexanol and catechol-containing phenolics in vitr. *Food Chemistry* 131, 1510-1516.
- Lautensach, A., and Subden, R. (1984). Cloning of malic acid assimilating activity from *Leuconostoc oenos* in *E. coli*. *Microbios* 39, 29-39.
- Lee, Y.-J., and Wickner, R. (1992). MAK10, a glucose-repressible gene necessary for replication of a dsRNA virus of *Saccharomyces cerevisiae*, has T cell receptor alpha-subunit motifs. *Genetics* 132, 87-96.
- Lema, C., Garcia-Jares, C., Orriols, I., and Angulo, L. (1996). Contribution of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* populations to the production of some components of Albarino wine aroma. *American Journal of Enology and Viticulture* 47, 206-216.
- Lerm, E., Engelbrecht, L., and Du Toit, M. (2010). Malolactic fermentation: the ABC's of MLF.
- Leroy, M., Charpentier, M., Duteurtre, B., Feuillat, M., and Charpentier, C. (1990). Yeast autolysis during champagne aging. *American Journal of Enology and Viticulture* 41, 21-28.
- Liger-Belair, G., Parmentier, M., and Jeandet, P. (2006). Modeling the kinetics of bubble nucleation in champagne and carbonated beverages. *The Journal of Physical Chemistry B* 110, 21145-21151.
- Lolle, S., and Bussey, H. (1986). In vivo evidence for posttranslational translocation and signal cleavage of the killer preprotoxin of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* 6, 4274-4280.
- Lolle, S., Skipper, N., Bussey, H., and Thomas, D. (1984). The expression of cDNA clones of yeast M1 double-stranded RNA in yeast confers both killer and immunity phenotypes. *The EMBO Journal* 3, 1383-1387.
- Longo, E., Cansado, J., Agrelo, D., and Villa, T. (1991). Effect of climatic conditions on yeast diversity in grape musts from northwest Spain. *American Journal of Enology and Viticulture* 42, 141-144.
- López-Barajas, M., López-Tamames, E., Buxaderas, S., Tomás, X., and de La Torre, M. (1999). Prediction of wine foaming. *Journal of agricultural and food chemistry* 47, 3743-3748.
- López-Barajas, M., Viu-Marco, A., López-Tamames, E., Buxaderas, S., and de la Torre-Boronat, M.C. (1997). Foaming in grape juices of white varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 2526-2529.
- Loureiro, V., and Malfeito-Ferreira, M. (2003). Spoilage yeasts in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology* 86, 23-50.

- Lubbers, S., Charpentier, C., Feuillat, M., and Voilley, A. (1994). Influence of yeast walls on the behavior of aroma compounds in a model wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 45, 29-33.
- Luo, R., Liu, B., Xie, Y., Li, Z., Huang, W., Yuan, J., He, G., Chen, Y., Pan, Q., and Liu, Y. (2012). SOAPdenovo2: an empirically improved memory-efficient short-read de novo assembler. *Gigascience* 1, 18.
- Lurton, L., Seguin, Y., and Feuillat, M. (1989). Etude de la protéolyse au cours de l'autolyse de levures en milieu acide. *SciAlim* 9.
- Lussier, M., Sdicu, A.-M., Bussereau, F., Jacquet, M., and Bussey, H. (1997). The Ktr1p, Ktr3p, and Kre2p/Mnt1p Mannosyltransferases Participate in the Elaboration of Yeast O-andN-linked Carbohydrate Chains. *Journal of Biological Chemistry* 272, 15527-15531.
- Machet, F., Robillard, B., and Duteurtre, B. (1993). Application of image analysis to foam stability of sparkling wines. *Sciences des aliments* 13, 73-87.
- Magliani, W., Conti, S., Gerloni, M., Bertolotti, D., and Polonelli, L. (1997). Yeast killer systems. *Clinical Microbiology Reviews* 10, 369-400.
- Maicas, S., Gil, J.-V., Pardo, I., and Ferrer, S. (1999). Improvement of volatile composition of wines by controlled addition of malolactic bacteria. *Food Research International* 32, 491-496.
- Malvy, J., Robillard, B., and Duteurtre, B. (1994). Influence des protéines sur le comportement de la mousse des vins de Champagne. *Sciences des aliments* 14, 87-98.
- Mallouchos, A., Komaitis, M., Koutinas, A., and Kanellaki, M. (2003). Wine fermentations by immobilized and free cells at different temperatures. Effect of immobilization and temperature on volatile by-products. *Food Chemistry* 80, 109-113.
- Maqueda, M. (2008). Las levaduras en las fermentaciones de mosto de la D.O. Ribera del Guadiana: Ecología y Aplicaciones Tecnológicas. In Departamento de Anatomía, Biología Celular y Zoología (Badajoz: Universidad de Extremadura).
- Maqueda, M., Pérez-Navado, F., Regodón, J., Zamora, E., Álvarez, M., Rebollo, E., and Ramírez, M. (2011a). A low-cost procedure for production of fresh autochthonous wine yeast. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 38, 459-469.
- Maqueda, M., Zamora, E., Álvarez, M., and Ramírez, M. (2012). Characterization, ecological distribution, and population dynamics of *Saccharomyces* "sensu stricto" killer yeasts in the spontaneous grape-must fermentations of south-western Spain. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 735-743.
- Maqueda, M., Zamora, E., Rodríguez-Cousiño, N., and Ramírez, M. (2011b). Wine yeast molecular typing using a simplified method for simultaneously extracting mtDNA, nuclear DNA and virus dsRNA. *Food Microbiology* 27, 205-209.
- Marchal, R., Seguin, V., and Maujean, A. (1997). Quantification of interferences in the direct measurement of proteins in wines from the Champagne region using the Bradford method. *American Journal of Enology and Viticulture* 48, 303-309.
- Marchal, R., Warchol, M., Cilindre, C., and Jeandet, P. (2006). Evidence for protein degradation by *Botrytis cinerea* and relationships with alteration of synthetic wine foaming properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 5157-5165.
- Marquina, D., Santos, A., and Peinado, J. (2002). Biology of killer yeasts. *International Microbiology* 5, 65-71.
- Martínez-Lapuente, L., Guadalupe, Z., Ayestarán, B.n., Ortega-Heras, M., and Pérez-Magariño, S. (2013). Changes in Polysaccharide Composition during Sparkling Wine Making and Aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61, 12362-12373.
- Martínez-Rodríguez, A., Carrascosa, A., Barcenilla, J., Pozo-Bayón, M., and Polo, M. (2001). Autolytic capacity and foam analysis as additional criteria for the selection of yeast strains for sparkling wine production. *Food Microbiology* 18, 183-191.
- Martínez-Rodríguez, A., Carrascosa, A., Martín-Álvarez, P., Moreno-Arribas, V., and Polo, M. (2002). Influence of the yeast strain on the changes of the amino acids, peptides and proteins during sparkling wine production by the traditional methods. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 29, 314-322.

- Martínez-Rodríguez, A., González, R., and Carrascosa, A. (2004). Morphological changes in autolytic wine yeast during ageing in two model systems. *Journal of Food Science* *69*, M233-M239.
- Martínez-Rodríguez, A., and Polo, M. (2000). Characterization of the nitrogen compounds released during yeast autolysis in a model wine system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* *48*, 1081-1085.
- Martínez-Rodríguez, A., and Polo, M. (2003). Effect of the addition of bentonite to the tirage solution on the nitrogen composition and sensory quality of sparkling wines. *Food Chemistry* *81*, 383-388.
- Martínez-Rodríguez, A., Polo, M., and Carrascosa, A. (2001). Structural and ultrastructural changes in yeast cells during autolysis in a model wine system and sparkling wines. *International Journal of Food Microbiology* *71*, 45-51.
- Martínez, J., Toledano, F., and Millán, C. (1990). Development of alcoholic fermentation in non-sterile musts from Pedro Ximenez grapes inoculated with pure cultures of selected yeasts. *Food Microbiology* *7*, 217-225.
- Masison, D.C., Blanc, A., Ribas, J.C., Carroll, K., Sonenberg, N., and Wickner, R.B. (1995). Decoying the cap-mRNA degradation system by a double-stranded RNA virus and poly (A)-mRNA surveillance by a yeast antiviral system. *Molecular and Cellular Biology* *15*, 2763-2771.
- Masque, M., Angles, M., Valiente, J., Basualdo, R., Guardiola, S., and Ramon, D. (1995). Utilización de levaduras recombinantes en microvinificación. 3^o Symposium on vine-growing in the Alentejo Evora (Portugal).
- Matsuura, A., Tsukada, M., Wada, Y., and Ohsumi, Y. (1997). Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* *192*, 245-250.
- Maturano, Y.P., Mestre, M.V., Esteve-Zarzoso, B., Nally, M.C., Lerena, M.C., Toro, M.E., Vazquez, F., and Combina, M. (2015). Yeast population dynamics during prefermentative cold soak of Cabernet Sauvignon and Malbec wines. *International Journal of Food Microbiology*.
- Maujean, A., Gomerieux, T., and Garnier, J. (1988). A survey of the durability and quality of foam in sparkling wines. 1. Adjustment of a technique to measure the spontaneous as well as provoked effervescence in fizzy drinks [dissolved and combined carbon dioxide]. *Bulletin de l'OIV (France)*.
- Maujean, A., Poinssaut, P., Dantan, H., Brissonnet, F., and Cossiez, E. (1990a). Etude de la tenue et de la qualité de mousse des vins effervescents. II: Mise au point d'une technique de mesure de la moussabilité de la tenue et de la stabilité de la mousse des vins effervescents. *Bulletin de l'OIV* *63*.
- Maujean, A., Poinssaut, P., Dantan, H., Brissonnet, F., and Cossiez, E. (1990b). Study of the performance and quality of the foam in sparkling wines. 2. Perfecting of a measuring technique for foaming ability, performance and stability of the foam in sparkling wines [measurement of foam properties, bentonite, vegetable black]. *Bulletin de l'OIV (France)*.
- Meaden, P., Hill, K., Wagner, J., Slipetz, D., Sommer, S., and Bussey, H. (1990). The yeast KRE5 gene encodes a probable endoplasmic reticulum protein required for (1-6)-beta-D-glucan synthesis and normal cell growth. *Molecular and Cellular Biology* *10*, 3013-3019.
- Medlin, L., Elwood, H., Stickel, S., and Sogin, M. (1988). The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene* *71*, 491-499.
- Meléndez, E., Ortiz, M., Sarabia, L., Íñiguez, M., and Puras, P. (2013). Modelling phenolic and technological maturities of grapes by means of the multivariate relation between organoleptic and physicochemical properties. *Analytica Chimica Acta* *761*, 53-61.
- Melero, R. (1992). Fermentación controlada y selección de levaduras vínicas. *Revista española de Ciencia y Tecnología de Alimentos* *32*, 371-379.
- Meškauskas, A., and Čitavičius, D. (1992). The K2-type killer toxin-and immunity-encoding region from *Saccharomyces cerevisiae*: structure and expression in yeast. *Gene* *111*, 135-139.
- Mestres, M., Busto, O., and Guasch, J. (2000). Analysis of organic sulfur compounds in wine aroma. *Journal of Chromatography A* *881*, 569-581.

- Miranda-Lopez, R., Libbey, L., Watson, B., and McDaniel, M. (1992). Identification of additional odor-active compounds in Pinot noir wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 43, 90-92.
- Mizushima, N. (2005). The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide. *Cell Death & Differentiation Nature* 12, 1535-1541.
- Moine-Ledoux, V., and Dubourdiou, D. (2000). Role yeast mannoproteins with regard to tartaric stabilisation of wines. In 75, O.I.V, ed., pp. 471-482.
- Molan, P.C., Edwards, M., and Eschenbruch, R. (1982). Foaming in winemaking. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 16, 110-113.
- Moreno-Arribas, M., Polo, M., and Pozo-Bayon, M. (2009). Peptides. In *Wine Chemistry and Biochemistry* (New York: Springer Life Sciences Science Business Media Eds., LLC.), pp. 191-209.
- Moreno-Arribas, M., Pueyo, E., and Polo, M. (2002). Analytical methods for the characterization of proteins and peptides in wines. *Analytica Chimica Acta* 458, 63-75.
- Moreno-Arribas, M.V., and Polo, M.C. (2009). *Wine chemistry and biochemistry* (Springer).
- Moreno-Arribas, V., and Polo, M. (1996). Peptides in musts and wines. Changes during the manufacture of cava (Sparkling wines). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 3783-3788.
- Moreno-Arribas, V., Pueyo, E., Nieto, F., Martín-Alvarez, P., and Polo, M. (2000). Influence of the polysaccharides and the nitrogen compounds on foaming properties of sparkling wines. *Food Chemistry* 70, 309-317.
- Moreno, J., Millan, M.C., Ortega, J., and Medina, M. (1991). Analytical differentiation of wine fermentations using pure and mixed yeast cultures. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 7, 181-190.
- Moyano, L., Zea, L., Moreno, J., and Medina, M. (2002). Analytical study of aromatic series in sherry wines subjected to biological aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 7356-7361.
- Muller, C.J., Kepner, R.E., and Webb, A.D. (1973). Lactones in wines-a review. *American Journal of Enology and Viticulture* 24, 5-9.
- Muñoz-González, C., Moreno-Arribas, M., Martín-Álvarez, P.J., Bartra-Sebastian, E., Puig-Pujol, A., García-Cazorla, J., and Pozo-Bayón, M.Á. (2011). Volatile and sensory characterization of Xarel. lo white wines. *Flavour and Fragrance Journal* 26, 153-161.
- Muñoz, D., Peinado, R., Medina, M., and Moreno, J. (2008). Effect of *Saccharomyces cerevisiae* F12 on volatile compounds in wines at three different stages of industrial biological ageing. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 14, 71-77.
- Murat M, Tominaga T, and Dubourdiou D (2001). Assessing the Aromatic Potential of Cabernet Sauvignon and Merlot Musts Used to Produce Rose Wine by Assaying the Cysteinylated Precursor of 3-Mercaptohexan-1-ol. *Journal Agricultural Food Chemistry* 49, 5412-5417.
- Naumova, E., Bulat, S., Mironenko, N., and Naumov, G. (2001). Differentiation of six sibling species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex by multilocus enzyme electrophoresis and UP-PCR analysis. *Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology* 83, 155-166.
- Nemeroff, M., and Bruenn, J. (1986). Conservative replication and transcription of *Saccharomyces cerevisiae* viral double-stranded RNA in vitro. *Journal of Virology* 57, 754-758.
- Nevares, I., and del Alamo, M. (2008). Measurement of dissolved oxygen during red wines tank aging with chips and micro-oxygenation. *Analytica Chimica Acta* 621, 68-78.
- Nevares, I., del Alamo, M., Carcel, L., Crespo, R., Martin, C., and Gallego, L. (2009). Measure the Dissolved Oxygen Consumed by Red Wines in Aging Tanks. *Food and Bioprocess Technology* 2, 328-336.
- Nissen, P., and Arneborg, N. (2003). Characterization of early deaths of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology* 180, 257-263.
- Nissen, P., Nielsen, D., and Arneborg, N. (2003). Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell-cell contact-mediated mechanism. *Yeast* 20, 331-341.

- Noble, A. (1994). Wine flavour. In *Understanding natural flavors* (Springer).
- Noda, T., and Ohsumi, Y. (1998). Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *The Journal of Cell Biology* 273, 3963-3966.
- Nordström, K. (1964a). Formation of esters from acids by brewer's yeast ii. Formation from lower fatty acids. *Journal of the Institute of Brewing* 70, 42-55.
- Nordström, K. (1964b). Formation of esters from acids by brewer's yeast iv. Effect of higher fatty acids and toxicity of lower fatty acids. *Journal of the Institute of Brewing* 70, 233-242.
- Novotná, D., Flegelová, H., and Janderová, B. (2004). Different action of killer toxins K1 and K2 on the plasma membrane and the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research* 4, 803-813.
- Nunez, Y.P., Carrascosa, A.V., González, R., Polo, M.C., and Martínez-Rodríguez, A.J. (2005). Effect of accelerated autolysis of yeast on the composition and foaming properties of sparkling wines elaborated by a champenoise method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 7232-7237.
- Núñez, Y., Carrascosa, A., Gonzalez, R., Polo, M., and Martínez-Rodríguez, A. (2006). Isolation and characterization of a thermally extracted yeast cell wall fraction potentially useful for improving the foaming properties of sparkling wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 7898-7903.
- Núñez, Y., Carrascosa, A., González, R., Polo, M., and Martínez-Rodríguez, A. (2005). The effect of accelerated autolysis by yeast of the composition and foaming properties of sparkling wines elaborated by a champanoise method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- Nykänen, L. (1986). Formation and occurrence of flavor compounds in wine and distilled alcoholic beverages. *American Journal of Enology and Viticulture* 37, 84-96.
- Nykänen, L., Nykänen, I., and Suomalainen, H. (1977). Distribution of esters produced during sugar fermentation between the yeast cell and the medium. *Journal of the Institute of Brewing* 83, 32-34.
- Obiols, J.M., de la Presa-Owens, C., Buxaderas, S., Bori, J.L., and de la Torre-Boronat, M.C. (1998). Protocolo de evaluación de la formación de la efervescencia de la espuma en un vino espumoso. *ACE, Revista de Enología* 15, 3-15.
- Ohtake, Y., and Wickner, R.B. (1995). Yeast virus propagation depends critically on free 60S ribosomal subunit concentration. *Molecular and cellular biology* 15, 2772-2781.
- Oliva, J., Cayuela, M., Payá, P., Martínez-Cacha, A., Cámara, M., and Barba, A. (2006). Influence of fungicides on grape yeast content and its evolution in the fermentation. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences* 72, 181-189.
- Osothsilp, C., and Subden, R. (1986). Malate transport in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Bacteriology* 168, 1439-1443.
- Pagé, N., Gérard-Vincent, M., Ménard, P., Beaulieu, M., Azuma, M., Dijkgraaf, G.J., Li, H., Marcoux, J., Nguyen, T., and Dowse, T. (2003). A *Saccharomyces cerevisiae* genome-wide mutant screen for altered sensitivity to K1 killer toxin. *Genetics* 163, 875-894.
- Palacios, A., Suárez, C., and Heras, J. (2006). Manejo de la acidez del vino base cava desde el punto de vista organoléptico (ACE Revista de Enología).
- Parapouli, M., Hatziloukas, E., Drainas, C., and Perisynakis, A. (2010). The effect of Debina grapevine indigenous yeast strains of *Metschnikowia* and *Saccharomyces* on wine flavour. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 37, 85-93.
- Parish, M., and Carroll, D. (1987). Fermentation characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* isolates from *Vitis rotundifolia* grapes and musts. *American Journal of Enology and Viticulture* 38, 45-48.
- Park, C., Lopinski, J., Masuda, J., Tzeng, T., and Bruen, J. (1996). A second double-stranded RNA virus from yeast. *Virology* 216, 451-454.
- Pateraki, C., Paramithiotis, S., Doulgeraki, A.I., Kallithraka, S., Kotseridis, Y., and Drosinos, E.H. (2014). Effect of sulfur dioxide addition in wild yeast population dynamics and polyphenolic composition during spontaneous red wine fermentation from *Vitis vinifera* cultivar Agiorgitiko. *European Food Research and Technology* 239, 1067-1075.
- Peddie, H.A. (1990). Ester formation in brewery fermentations. *Journal of the Institute of Brewing* 96, 327-331.

- Pérez-González, J.A., Gonzalez, R., Querol, A., Sendra, J., and Ramón, D. (1993). Construction of a recombinant wine yeast strain expressing beta-(1,4)-endoglucanase and its use in microvinification processes. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 2801-2806.
- Pérez-Nevado, F., Albergaria, H., Hogg, T., and Girio, F. (2006). Cellular death of two non-*Saccharomyces* wine-related yeasts during mixed fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology* 108, 336-345.
- Pérez, F., Ramírez, M., and Regodón, J. (2001). Influence of killer strains of *Saccharomyces cerevisiae* on wine fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek* 79, 393-399.
- Pérez, F., Regodón, J., Valdés, M., De Miguel, C., and Ramírez, M. (2000). Cycloheximide resistance as marker for monitoring yeasts in wine fermentations. *Food Microbiology* 17, 119-128.
- Péron, N., Meunier, J., Cagna, A., Valade, M., and Douillard, R. (2004). Phase separation in molecular layers of macromolecules at the champagne-air interface. *Journal of Microscopy* 214, 89-98.
- Petering, J., Symons, M., Langridge, P., and Henschke, P. (1991). Determination of killer yeast activity in fermenting grape juice by using a marked *Saccharomyces* wine yeast strain. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 3232-3236.
- Peynaud, E. (1993). *La composición del vino* (Madrid: Ediciones Mundi-Prensa).
- Pfeiffer, P., and Radler, F. (1982). Purification and characterization of extracellular and intracellular killer toxin of *Saccharomyces cerevisiae* strain 28. *Journal of General Microbiology* 128, 2699-2706.
- Pfeiffer, P., and Radler, F. (1984). Comparison of the killer toxin of several yeasts and the purification of a toxin of type K2. *Archives of Microbiology* 137, 357-361.
- Pina, C., Santos, C., Couto, J., and Hogg, T. (2004). Ethanol tolerance of five non-*Saccharomyces* wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae*-influence of different culture conditions. *Food Microbiology* 21, 439-447.
- Pineau, B., Barbe, J.-C., Van Leeuwen, C., and Dubourdieu, D. (2007). Which impact for β -damascenone on red wines aroma? *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 4103-4108.
- Pino, J.A., and Queris, O. (2011). Analysis of volatile compounds of mango wine. *Food Chemistry* 125, 1141-1146.
- Piton, F., Charpentier, M., and Troton, D. (1988). Cell wall and lipid changes in *Saccharomyces cerevisiae* during aging of champagne wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 39, 221-226.
- Plata, C., Millan, C., Mauricio, J., and Ortega, J. (2003). Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts. *Food Microbiology* 20, 217-224.
- Polevoda, B., and Sherman, F. (2001). NatC N α -terminal acetyltransferase of yeast contains three subunits, Mak3p, Mak10p, and Mak31p. *Journal of Biological Chemistry* 276, 20154-20159.
- Pollnitz, A.P., Pardon, K.H., and Sefton, M.A. (2000). Quantitative analysis of 4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol in red wine. *Journal of Chromatography A* 874, 101-109.
- Potgieter, A.C., Page, N.A., Liebenberg, J., Wright, I.M., Landt, O., and van Dijk, A.A. (2009). Improved strategies for sequence-independent amplification and sequencing of viral double-stranded RNA genomes. *Journal of General Virology* 90, 1423-1432.
- Pozo-Bayón, M., Martínez-Rodríguez, A., and Pueyo, E. (2009). Chemical and biochemical features involved in sparkling wine production: from a traditional to an improved winemaking technology. *Trends in Food Science & Technology - Journal* 20, 289-299.
- Pozo-Bayón, M., Matéiz-Rodríguez, A., Moreno-Arribas, M., Pueyo, E., Martín-Álvarez, P., and Polo, M. (2003). La elaboración de vinos espumosos y su repercusión en la composición química y la calidad. *Tecnología del Vino* 13, 55-60.
- Pozo-Bayón, M., Pueyo, E., Martín-Álvarez, P., Martínez, A., and Polo, M. (2003a). Influence of yeast strain, bentonite addition, and aging time on volatile compounds of sparkling wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 54, 273-278.
- Pretorius, I. (2000a). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16, 675-729.

- Pretorius, I. (2000b). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16, 675-729.
- Pripis-Nicolau, L., Revel, G.d., Bertrand, A., and Lonvaud-Funel, A. (2004). Methionine catabolism and production of volatile sulphur compounds by *Oenococcus oeni*. *Journal of Applied Microbiology* 96, 1176-1184.
- Pronk, J.T., Steensma, H.Y., and van Dijken, J.P. (1996). Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 12, 1607-1633.
- Pueyo, E., Martín-Alvarez, P.J., and Polo, M.C. (1995). Relationship between foam characteristics and chemical composition in wines and cavas (sparkling wines). *American Journal of Enology and Viticulture* 46, 518-524.
- Pueyo, E., Martínez-Rodríguez, A., Polo, M., Santa-María, G., and Bartolomé, B. (2000a). Release of lipids during yeast autolysis in a model wine system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 116-122.
- Pueyo, E., Martínez-Rodríguez, A., Polo, M.C., Santa-María, G., and Bartolomé, B. (2000b). Release of lipids during yeast autolysis in a model wine system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 116-122.
- Querol, A., Barrio, E., Huerta, T., and Ramón, D. (1992a). Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 2948-2953.
- Querol, A., Huerta, T., Barrio, E., and Ramón, D. (1992b). Dry yeast strain for use in fermentation of Alicante wines: selection and DNA patterns. *Journal of Food Science* 57, 183-185.
- Querol, A., Jiménez, M., and Huerta, T. (1990). Microbiological and Enological Parameters during Fermentation of Musts from Poor and Normal Grape-Harvests in the Region of Alicante (Spain). *Journal of Food Science* 55, 1603-1606.
- Quesada, M. (1994). Influencia de distintos tratamientos vitivinícolas en la evolución de levaduras durante la vinificación. 1ª Parte. *Viticultura Enología Profesional* 34, 41-50.
- Quirós, M., Gonzalez, R., and Morales, P. (2012). A simple method for total quantification of mannoprotein content in real wine samples. *Food chemistry* 134, 1205-1210.
- Radler, F. (1993). Yeasts-metabolism of organic acids. *Wine microbiology and biotechnology*, 165-182.
- Ramírez, M., Pérez, F., and Regodón, J. (1998). A simple and reliable method for hybridization of homothallic wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Environmental Microbiology* 64, 5039-5041.
- Ramírez, M., Regodón, J.A., Pérez, F., and Rebollo, J.E. (1999). Wine yeast fermentation vigor may be improved by elimination of recessive growth-retarding alleles. *Biotechnology and Bioengineering* 65, 212-218.
- Ramshaw, E., and Hardy, P. (1969). Volatile compounds in dried grapes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 20, 619-621.
- Rapp, A. (1998). Volatile flavour of wine. Correlation between instrumental analysis and sensory perception. *Nahrung* 42, 351-363.
- Rapp, A., and Mandery, H. (1986). Wine aroma. *Experientia* 42, 873-884.
- Raspor, P., Milek, D.M., Polanc, J., Možina, S.S., and Čadež, N. (2006). Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region, Slovenia. *International Journal of Food Microbiology* 109, 97-102.
- Rauhut, D. (1993). Yeasts—production of sulfur compounds. *Wine microbiology and biotechnology* 6, 183-223.
- Redzepovic, S., Orlic, S., Majdak, A., Kozina, B., Volschenk, H., and Viljoen-Bloom, M. (2003). Differential malic acid degradation by selected strains of *Saccharomyces* during alcoholic fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 83, 49-61.
- Reed, G., and Nagodawithana, T.W. (1988). Technology of yeast usage in winemaking. *American Journal of Enology and Viticulture* 39, 83-90.
- Reggiori, F., Tucker, K., Stomhaug, P., and Klionsky, D. (2004). The Atg1-Atg13 complex regulates Atg9 and Atg23 retrieval transport from the pre-autophagosomal structure. *Developmental Cell* 6, 79-90.

- Regodón, J. (1997). Obtención y caracterización de cepas autóctonas de levaduras para la elaboración estandarizada de vinos de calidad (Universidad de Extremadura, Spain).
- Regodón, J., Pérez, F., Valdés, M., De Miguel, C., and Ramirez, M. (1997). A simple and effective procedure for selection of wine yeast strains. *Food Microbiology* 14, 247-254.
- Rementería, A., Rodríguez, J., Cadaval, A., Amenabar, R., Muguruza, J., Hernando, F., and Sevilla, M. (2003). Yeast associated with spontaneous fermentations of white wines from the "Txakoli de Bizkaia" region (Basque Country, North Spain). *International Journal of Food Microbiology* 86, 201-207.
- Renault, P., Coulon, J., de Revel, G., Barbe, J.-C., and Bely, M. (2015). Increase of fruity aroma during mixed *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae* wine fermentation is linked to specific esters enhancement. *International Journal of Food Microbiology*.
- Renault, P., Ehsani, M., and Bely, M. (2012). Phenotypic characterization of *Torulaspora delbrueckii* species in wine conditions. Application to mixed inoculation with *Saccharomyces cerevisiae*. Paper presented at: Oeno2011-Actes de colloques du 9e symposium international d'oenologie de Bordeaux: Actes de colloques du 9e symposium international d'oenologie de Bordeaux (Dunod).
- Renault, P., Miot-Sertier, C., Marullo, P., Hernández-Orte, P., Lagarrigue, L., Lonvaud-Funel, A., and Bely, M. (2009). Genetic characterization and phenotypic variability in *Torulaspora delbrueckii* species: potential applications in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology* 134, 201-210.
- Ribas, J.C., and Wickner, R.B. (1998). The Gag Domain of the Gag-Pol Fusion Protein Directs Incorporation into the LA Double-stranded RNA Viral Particles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 273, 9306-9311.
- Ribereau-Gayon, J., Peynaud, E., Ribereau-Gayon, P., and Sudraud, P. (1989). Tratado de enología: Ciencias y Técnicas del vino (Buenos Aires: Hemisferio Sur S.A.).
- Ribereau-Gayon, P. (1978). Wine aroma. Flavour of foods and beverages Academic Press, New York, 362-371.
- Ribereau-Gayon, P. (1985). New developments in wine microbiology. *American Journal of Enology and Viticulture* 36, 1-10.
- Ribereau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Doneche, B., and Lonvaud, A. (1998). *Traité d'oenologie. Microbiologie du vin et vinification*, Editions La Vigne / Dunod edn (Paris: Editions La Vigne / Dunod).
- Ribereau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., and Dubourdieu, D. (2000). *Handbook of Enology. "The Chemistry of Wine Stabilisation and Treatments"*, Vol 2 (Paris: Dunod).
- Robillard, B. (1995). Medición de la espuma por visión artificial. *La Semana Vitivinícola* 2567, 3655-3659.
- Robillard, B., Delpuech, E., Viaux, L., Malvy, J., Vignes-Adler, M., and Duteurtre, B. (1993). Improvements of methods for sparkling base wine foam measurements and effect of wine filtration on foam behavior. *American Journal of Enology and Viticulture* 44, 387-392.
- Rodríguez-Cousiño, N., Gómez, P., and Esteban, R. (2013). LA-lus, a new variant of the LA totivirus found in wine yeasts with Klus killer toxin-encoding Mlus double-stranded RNA: possible role of killer toxin-encoding satellite RNAs in the evolution of their helper viruses. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 4661-4674.
- Rodríguez-Cousiño, N., Maqueda, M., Ambrona, J., Zamora, E., Esteban, E., and Ramírez, M. (2011). A new wine *Saccharomyces cerevisiae* double-stranded RNA virus encoded killer toxin (Klus) with broad antifungal activity is evolutionarily related to a chromosomal host gene. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 1822-1832.
- Rodríguez-Cousiño, N., Solorzano, A., Fujimura, T., and Esteban, R. (1998). Yeast positive-stranded virus-like RNA replicons. 20 S and 23 S RNA terminal nucleotide sequences and 39 end secondary structures resemble those of RNA coliphages. *The Journal of Biological Chemistry* 273, 20363-20371.
- Rodríguez-Cousiño, N., Solórzano, A., Fujimura, T., and Esteban, R. (1998). Yeast positive-stranded virus-like RNA replicons. *The Journal of Biological Chemistry* 273, 20363-20371.

- Rodríguez, M., Lopes, C., Broock, M., Valles, S., Ramón, D., and Caballero, A. (2004). Screening and typing of Patagonian wine yeasts for glycosidase activities. *Journal of Applied Microbiology* 96, 84-95.
- Rodriguez, S., and Thornton, R. (1990). Factors influencing the utilisation of L-malate by yeast. *FEMS Yeast Research* 72, 17-22.
- Roldán Gómez, A. (2008). Estudio y aplicación de nuevas alternativas tecnológicas para la mejora de la producción y calidad de los vinos (Universidad de Cádiz).
- Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., and Capece, A. (2003). Function of yeast species and strains in wine flavour. *International Journal of Food Microbiology* 86, 169-180.
- Russell, P., Bennett, A., Love, Z., and Baggott, D. (1997). Cloning, sequencing and expression of a full-length cDNA copy of the M1 double-stranded RNA virus from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* *Yeast* 13, 829-836.
- Salvadores, M., and Cardell, E. (1993). Aislamiento e identificación de la flora levaduriforme en distintas localidades de la denominación específica Icodem-Daute-Isora (Tenerife). *Alimentación Equipos y Tecnología*.
- Sánchez, A., and Luisa, M. (2000). Caracterización de variedades de *Vitis vinifera* cultivadas en Extremadura, mediante estudios morfológicos, agronómicos y bioquímicos (*Agronomos*).
- Sangorrín, M.P., Lopes, C.A., Giraudo, M.R., and Caballero, A.C. (2007). Diversity and killer behaviour of indigenous yeasts isolated from the fermentation vat surfaces in four Patagonian wineries. *International Journal of Food Microbiology* 119, 351-357.
- Santamaría, P., Garijo, P., López, R., Tenorio, C., and Gutiérrez, A.R. (2005). Analysis of yeast population during spontaneous alcoholic fermentation: effect of the age of the cellar and the practice of inoculation. *International Journal of Food Microbiology* 103, 49-56.
- Scott, S., Nice, D., Nau, J., Weisman, L., Kamada, Y., and KeizerGunnink, I. (2000). Apg13p and Vac8p are part of a complex of phosphoproteins that are required for cytoplasmic vacuole targeting. *The Journal of Cell Biology* 275, 25840-25849.
- Schmitt, M., and Breinig, F. (2006). Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. *Nature Reviews Microbiology* 4, 212-221.
- Schmitt, M., and Radler, F. (1987). Mannoprotein of the yeast cell wall as primary receptor for the killer toxin of *Saccharomyces cerevisiae* strain 28. *Journal of General Microbiology* 133, 3347-3354.
- Schmitt, M., and Radler, F. (1988). Molecular structure of the cell wall receptor for killer toxin KT28 in *Saccharomyces cerevisiae* *Journal of Bacteriology* 170, 2192-2196.
- Schmitt, M., and Tipper, D. (1995). Sequence of the M28 dsRNA: preprotoxin is processed to an a/b heterodimeric protein. *Virology* 213, 341-351.
- Schmitt, M.J. (1995). Cloning and expression of a cDNA copy of the viral K28 killer toxin gene in yeast. *Molecular and General Genetics* 246, 236-246.
- Schmitt, M.J., and Breinig, F. (2002). The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. *FEMS Microbiology Reviews* 748, 1-20.
- Schmitt, M.J., and Compain, P. (1995). Killer-toxin-resistant *kre12* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*: genetic and biochemical evidence for a secondary K1 membrane receptor. *Archives of Microbiology* 164, 435-443.
- Schmitt, M.J., and Tipper, J. (1990). K28, A Unique Double-Stranded RNA Killer Virus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 10, 4807-4815.
- Schreier, P. (1979). Flavour composition of wines: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 12, 59-111.
- Schuller, D., and Casal, M. (2005). The use of genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* strains in the wine industry. *Applied Microbiology and Biotechnology* 68, 292-304.
- Schuller, D., and Casal, M. (2007). The genetic structure of fermentative vineyard-associated *Saccharomyces cerevisiae* populations revealed by microsatellite analysis. *Antonie van Leeuwenhoek* 91, 137-150.
- Séguy, N., Polonelli, L., Dei-Cas, E., and Cailliez, J.C. (1998). XVIII. Effect of a killer toxin of *Pichia anomala* to *Pneumocystis*. Perspectives in the control of pneumocystosis. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 22, 145-149.

- Senée, J., Robillard, B., and Vignes-Adler, M. (1999). Films and foams of Champagne wines. *Food Hydrocolloids* 13, 15-26.
- Shimizu, K. (1993). Killer yeasts. In *Wine microbiology and biotechnology*, G. Fleet, ed. (Newark, N.J.: Harwood Academic Publishers), pp. 243-263.
- Shinohara, T. (1985). Gas chromatographic analysis of volatile fatty acids in wines. *Agricultural and Biological Chemistry* 49, 2211-2212.
- Silva, S., Ramón-Portugal, F., Andrade, P., Abreu, S., de Fatima Texeira, M., and Strehaiano, P. (2003). Malic acid consumption by dry immobilized cells of *Schizosaccharomyces pombe*. *American Journal of Enology and Viticulture* 54, 50-55.
- Singleton, V.L., and Esau, P. (1968). Phenolic substances in grapes and wine, and their significance. *Advances in Food Research* 1, 1-261.
- Sipiczki, M., Romano, P., Lipani, G., Miklos, I., and Antunovics, Z. (2001). Analysis of yeasts derived from natural fermentation in a Tokaj winery. *Antonie van Leeuwenhoek* 79, 97-105.
- Siuzdak, G. (1996). *Mass spectrometry for biotechnology* (Academic Press).
- Soden, A., Francis, I., Oakey, H., and Henschke, P. (2000). Effects of co-fermentation with *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and composition of Chardonnay wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 6, 21-30.
- Soles, R., Ough, C., and Kunkee, R. (1982). Ester concentration differences in wine fermented by various species and strains of yeasts. *American Journal of Enology and Viticulture* 33, 94-98.
- Somers, J., and Bevan, E. (1969). The inheritance of the killer character in yeast. *Genetical Research* 13, 71-83.
- Sommer, S., and Wickner, R. (1982). Yeast L dsRNA consists of at least three distinct RNA's; evidence that the non-Mendelian genes [HOK], [NEX] and [EXL] are on one of these dsRNA's. *Cell* 31, 429-441.
- Sommer, S.S., and Wickner, R.B. (1984). Double-stranded RNAs that encode killer toxins in *Saccharomyces cerevisiae*: unstable size of M double-stranded RNA and inhibition of M2 replication by M1. *Molecular and Cellular Biology* 4, 1747-1753.
- Sousa, M.J., Mota, M., and Leão, C. (1992). Transport of malic acid in the yeast *Schizosaccharomyces pombe*: evidence for a proton-dicarboxylate symport. *Yeast* 8, 1025-1031.
- Sponholz, W. (1993). Wine spoilage by microorganisms. *Wine Microbiology and Biotechnology*, 395-420.
- Stahl-Biskup, E. (1987). Monoterpene Glycosides, State-of-the-Art. *Flavor and Fragrance* 2, 75-82.
- Stevens, K., Bomben, J., and Mc Fadden, W. (1967). Volatiles from grapes. *Vitis vinifera* cultivar Gren-ache. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 15, 378-380.
- Suárez, J.A. (1990). Selección de levaduras vínicas: criterios, conservación y biotecnología. *Vitivinicultura* 9, 23-30.
- Suárez, J.A., and Iñigo, B. (1992). *Microbiología enológica. Fundamentos de vinificación* (Madrid: Ediciones Mundi Prensa).
- Suárez Lepe, J. (1997). *Levaduras vínicas. Funcionalidad y uso en bodega*, Ediciones Mundi-Prensa edn (Mundi Prensa Libros SA.).
- Suárez Lepe, J. (2003). Perfil sensorial del vino tras la fermentación maloláctica. *ACE Revista de Enología*.
- Suomalainen, H., and Lehtonen, M. (1979). The production of aroma compounds by yeast. *Journal of the Institute of Brewing* 85, 149-156.
- Suzuki, K., Kirisako, T., Kamada, Y., Mizushima, N., Nosa, T., and Y, O. (2001). The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *The EMBO Journal* 20, 5971-5981.
- Suzuki, K., Noda, T., and Osumi, Y. (2004). Interrelationships among Atg proteins during atophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 21, 1057-1065.
- Svoboda, A. (1980). Intergeneric fusion of yeast protoplast: *Saccharomyces cerevisiae* & *Schizosaccharomyces pombe*. *Advances in Protoplast Research*, 119-124.

- Swiegers, J.H., and Pretorius, I.S. (2005). Yeast modulation of wine flavor. *Advances in Applied Microbiology* 57, 131-175.
- Tabera, L., Muñoz, R., and Gonzalez, R. (2006). Deletion of BCY1 from the *Saccharomyces cerevisiae* genome is semidominant and induces autolytic phenotypes suitable for improvement of sparkling wines. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 2351-2358.
- Taillandier, P., Lai, Q.P., Julien-Ortiz, A., and Brandam, C. (2014). Interactions between *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* in wine fermentation: influence of inoculation and nitrogen content. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 30, 1959-1967.
- Takehige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T., and Ohsumi, Y. (1992). Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *The Journal of Cell Biology* 119, 301-311.
- Tang, J., Naitow, H., Gardner, N.A., Kolesar, A., Tang, L., Wickner, R.B., and Johnson, J.E. (2005). The structural basis of recognition and removal of cellular mRNA 7-methyl G 'caps' by a viral capsid protein: a unique viral response to host defense. *Journal of Molecular Recognition* 18, 158-168.
- Tercero, J., Dinman, J., and Wickner, R. (1993). Yeast MAK3 N-acetyltransferase recognizes the N-terminal four amino acids of the major coat protein (gag) of the LA double-stranded RNA virus. *Journal of Bacteriology* 175, 3192-3194.
- Tercero, J., and Wickner, R.B. (1992). MAK3 encodes an N-acetyltransferase whose modification of the LA gag NH2 terminus is necessary for virus particle assembly. *Journal of Biological Chemistry* 267, 20277-20281.
- Thomas, D., and Surdin-Kerjan, Y. (1997). Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61, 503-532.
- Thompson, J.D., Thierry, J.-C., and Poch, O. (2003). RASCAL: rapid scanning and correction of multiple sequence alignments. *Bioinformatics* 19, 1155-1161.
- Thorvaldsdóttir, H., Robinson, J.T., and Mesirov, J.P. (2012). Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Briefings in Bioinformatics*, bbs017.
- Thurston, P., Taylor, R., and Ahvenainen, J. (1981). Effects of linoleic acid supplements on the synthesis by yeast of lipids and acetate esters. *Journal of the Institute of Brewing* 87, 92-95.
- Tipper, D., and Schmitt, M. (1991). Yeast dsRNA viruses: replication and killer phenotypes. *Molecular Microbiology* 5, 2331-2338.
- Todd, B., Fleet, G., and Henschke, P. (2000a). Promotion of autolysis through the interaction of killer and sensitive yeasts: potential application in sparkling wine production. *American Journal of Enology and Viticulture* 51, 65-72.
- Todd, B.E., Fleet, G.H., and Henschke, P.A. (2000b). Promotion of autolysis through the interaction of killer and sensitive yeasts: potential application in sparkling wine production. *American Journal of Enology and Viticulture* 51, 65-72.
- Tofterup, J. (2012). Evaluating the impact of *Torulaspora delbrueckii* on malolactic fermentation and wine aroma. In Department of Microbiology and Biochemistry Geisenheim Research (Geisenheim: University of Applied Sciences of Germany).
- Tominaga T, B.-G.R., Gachons C, Dubourdieu D (2000). Contribution of Volatile Thiols to the Aromas of White Wines Made From Several *Vitis vinifera* Grape Varieties. . *American Journal of Enology and Viticulture* 51, 178-181.
- Torija, M.J., Rozes, N., Poblet, M., Guillamón, J.M., and Mas, A. (2001). Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. *Antonie van Leeuwenhoek* 79, 345-352.
- Toro, M., and Vazquez, F. (2002). Fermentation behaviour of controlled mixed and sequential cultures of *Candida cantarellii* and *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 18, 351-358.
- Torrens, J., Riu-Aumatell, M., Vichi, S., López-Tamames, E., and Buxaderas, S. (2010). Assessment of volatile and sensory profiles between base and sparkling wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 2455-2461.

- Troton, D., Charpentier, M., Robillard, B., Calvayrac, R., and Duteurtre, B. (1989). Evolution of the lipid contents of Champagne wine during the second fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*. *American Journal of Enology and Viticulture* 40, 175-182.
- Tugores, J.H. (2003). *Tratado de enología I, II*. Mundi-prensa Madrid.
- Uzel, S., Chappell, M.A., and Payne, S.J. (2006). Modeling the cycles of growth and detachment of bubbles in carbonated beverages. *The Journal of Physical Chemistry B* 110, 7579-7586.
- Valero, E., Schuller, D., Cambon, B., Casal, M., and Dequin, S. (2005). Dissemination and survival of commercial wine yeast in the vineyard: A large-scale, three-years study. *FEMS Yeast Research* 5, 959-969.
- Valle, R., and Wickner, R.B. (1993). Elimination of LA double-stranded RNA virus of *Saccharomyces cerevisiae* by expression of gag and gag-pol from an LA cDNA clone. *Journal of Virology* 67, 2764-2771.
- Van Vuuren, H., and Jacobs, C. (1992). Killer yeasts in the wine industry: a review. *American Journal of Enology and Viticulture* 43, 119-128.
- Vanrell, G., Cabanillas, P., Albet, S., Canals, J., Arola, L., and Zamora, F. (2002). Étude des composés influençant la mousse des Cavas. *Revue française d'oenologie*, 30-36.
- Vanrell, G., Canals, R., Esteruelas, M., Fort, F., Canals, J.M., and Zamora, F. (2007). Influence of the use of bentonite as a riddling agent on foam quality and protein fraction of sparkling wines (Cava). *Food Chemistry* 104, 148-155.
- Veziñhet, F. (1985). Le marquage genetique de souches de levures oenologiques. *Revue française d'oenologie* 25, 47-51.
- Veziñhet, F., and Lacroix, S. (1984). Marquage genetique de levures: outil de controle des fermentations en souche pure [*Saccharomyces*, vinification]. *Bulletin de l'OIV*.
- Viana, F. (2011a). Levaduras no-*Saccharomyces* para modular el aroma secundario de los vinos: incremento del acetato 2-feniletilo mediante cultivos iniciadores mixtos. In Departamento de Biotecnología de los Alimentos (IATA-CSIC) (Universidad Politécnica de Valencia).
- Viana, F. (2011b). Levaduras no-*Saccharomyces* para modular el aroma secundario de los vinos: incremento del acetato de 2-feniletilo mediante cultivos iniciadores mixtos. In Departamento de Biotecnología de los Alimentos (IATA-CSIC) (Universidad Politécnica de Valencia).
- Vodkin, M.H., and Fink, G.R. (1973). A nucleic acid associated with a killer strain of yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 70, 1069-1072.
- Volschenk, H., Viljoen, M., Grobler, J., Petzold, B., Bauer, F., Subden, R., Young, R., Lonvaud, A., Denayrolles, M., and Van Vuuren, H. (1997). Engineering pathways for malate degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Biotechnology* 15, 253-257.
- Wickner, R. (1991). Yeast RNA virology: the killer systems. In *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces: Genome Dynamics, Protein Synthesis, and Energetics* (Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 263-296.
- Wickner, R. (1993). Double-stranded RNA virus. *The Journal of Biological Chemistry* 268, 3797-3800.
- Wickner, R., Icho, T., Fujimura, T., and Winder, W. (1991). Expression of yeast L-A double-stranded RNA virus proteins produces derepressed replication: a ski- phenocopy. *Journal of Virology* 65, 155-161.
- Wickner, R.B. (1996). Double-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological reviews* 60, 250.
- Wickner, R.B., Fujimura, T., and Esteban, R. (2013). Viruses and prions of *Saccharomyces cerevisiae*. *Advances in Virus Research* 86, 1.
- Wickner, R.B., Knipe, D.M., and Howley, P.M. (2007). Viruses and Prions of Yeasts, Fungi and Unicellular Organisms. In (Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins), pp. 737-768.
- Widner, W.R., and Wickner, R.B. (1993). Evidence that the SKI antiviral system of *Saccharomyces cerevisiae* acts by blocking expression of viral mRNA. *Molecular and cellular biology* 13, 4331-4341.

- Williams, S., Hodges, R., Strike, T., Snow, R., and Kunkee, R. (1984). Cloning the gene for the malolactic fermentation of wine from *Lactobacillus delbruekii* in *Escherichia coli* and yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology* 47, 288-293.
- Williams, T.L., and Leibowitz, M.J. (1987). Conservative mechanism of the in vitro transcription of killer virus of yeast. *Virology* 158, 231-234.
- Yamamoto, T., Uchida, K., Hiratani, T., Miyazaki, T., Yagiu, J., and Yamaguchi, H. (1998). In vitro activity of the killer toxin from yeast *Hansenula mrakii* against yeasts and molds. *The Journal of Antibiotics* 41, 398-403.
- Yen, W., and Klionsky, D. (2007). Atg27 is a second transmembrane cycling protein. *Autophagy* 3, 254-256.
- Yen, W., Legakis, J., Nair, U., and Klionsky, D. (2007). Atg27 is required for autophagy-dependent cycling of Atg9. *Molecular and Cellular Biology* 18, 581-593.
- Yip, C.L., Welch, S.K., Klebl, F., Gilbert, T., Seidel, P., Grant, F.J., O'Hara, P.J., and MacKay, V.L. (1994). Cloning and analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* MNN9 and MNN1 genes required for complex glycosylation of secreted proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91, 2723-2727.
- Young, T., and Yagiu, M. (1978). A comparison of the killer character in different yeasts and its classification. *Antonie van Leeuwenhoek* 44, 59-77.
- Zambonelli, C. (1988). *Microbiologia e Biotecnologia dei Vini* (Bologna: Edizione Agricole).
- Zea, L., Moyano, L., Moreno, J.A., and Medina, M. (2007). Aroma series as fingerprints for biological ageing in fino sherry-type wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87, 2319-2326.
- Zhu, H., and Bussey, H. (1989). The K1 toxin of *Saccharomyces cerevisiae* kills spheroplasts of many yeast species. *Applied and environmental microbiology* 55, 2105-2107.
- Zhu, H., and Bussey, H. (1991). Mutational analysis of the functional domains of yeast K1 killer toxin. *Molecular and cellular biology* 11, 175-181.
- Zhu, Y.S., Kane, J., Zhang, X.Y., Zhang, M., and Tipper, D.J. (1993). Role of the γ component of preprotoxin in expression of the yeast K1 killer phenotype. *Yeast* 9, 251-266.
- Zhu, Y.S., Zhang, X.Y., Cartwright, C.P., and Tipper, D.J. (1992). Kex2-dependent processing of yeast K1 killer preprotoxin includes cleavage at ProArg-44. *Molecular microbiology* 6, 511-520.
- Zironi, R., Romano, P., Suzzi, G., Battistutta, F., and Comi, G. (1993). Volatile metabolites produced in wine by mixed and sequential cultures of *Hanseniaspora guilliermondii* or *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters* 15, 235-238.

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

II.1. Estirpes de levaduras.

II.1.1. *Saccharomyces*.

Tabla II.1. Levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces bayanus* utilizadas en las vinificaciones.

Cepa	Genotipo	Origen
<i>Sc</i> EX88	<i>MATa/α HO/HO cyh^S/cyh^S L-A M2 [K2⁺]</i>	M. Ramírez ^a (de vino)
<i>Sc</i> EX85	<i>MAT a/α HO/HO cyh^S/cyh^S L-A M2 [K2⁺]</i>	M. Ramírez ^a (de vino)
<i>Sc</i> EX85R	<i>MAT a/α HO/HO CYH^R/cyh^S [cyh^R K2⁰]</i>	M. Ramírez ^a
<i>Sc</i> E7AR1	<i>MAT a/α HO/HO CYH^R/cyh^S L-A M2 [cyh^R K2⁺]</i>	M. Ramírez ^a
<i>Sc</i> Rod23-1B	<i>MAT a/α HO/HO PDR5/pdr5 L-A M2 [rod^{PC} K2⁺]</i>	M. Ramírez ^a
<i>Sc</i> EX229	<i>MAT a/α HO/HO cyh^S/cyh^S L-A M-lus [Klus⁺]</i>	M. Ramírez ^a (de vino)
<i>Sc</i> EX229-R1	<i>MAT a/α HO/HO CYH^R/cyh^S [cyh^R Klus⁰]</i>	M. Ramírez ^a
<i>Sc</i> Mnn6	<i>MAT a/α HO/HO cyh^S/cyh^S mnn6Δ [L-A⁰ K1⁰ K2⁰ K28⁰ Klus⁰]</i>	I. Olivero y L.M. Hernández ^b
<i>Sc</i> Mnn9	<i>MAT a/α HO/HO cyh^S/cyh^S mnn9Δ [L-A⁰ K1⁰ K2⁰ K28⁰ Klus⁰]</i>	I. Olivero y L.M. Hernández ^b
<i>Sc</i> Rod25-6D	<i>MAT a/α HO/HO PDR5/pdr5 L-A M2 [rod^{PC} K2⁺]</i>	M. Ramírez ^a
<i>Sc</i> SMR10-11D	<i>MAT a/α HO/HO SMR^R/smr^S L-A M2 [smr^R K2⁺]</i>	M. Ramírez ^a
<i>Sc</i> SMR16-5AR	<i>MAT a/α HO/HO SMR^R/smr^S L-A M2 [smr^R K2⁺]</i>	M. Ramírez ^a
<i>Sc</i> E3AR1	<i>MAT a/α HO/HO CYH^R/cyh^S L-A M2 [cyh^R K2⁺]</i>	M. Ramírez ^a
<i>Sc</i> 7AR	<i>MAT a/α HO/HO CYH^R/cyh^S L-A M2 [cyh^R K2⁺]</i>	M. Ramírez ^a
<i>Sc</i> EX1	<i>MATa/α HO/HO cyh^S/cyh^S L-A M2 [K2⁺]</i>	M. Ramírez ^a (de vino)
<i>Sc</i> EX34	<i>MATa/α HO/HO cyh^S/cyh^S L-A M2 [K2⁺]</i>	M. Ramírez ^a (de vino)
<i>Sc</i> EX47	<i>MATa/α HO/HO cyh^S/cyh^S L-A M2 [K2⁺]</i>	M. Ramírez ^a (de vino)
<i>Sc</i> EX73	<i>MATa/α HO/HO cyh^S/cyh^S L-A M2 [K2⁺]</i>	M. Ramírez ^a (de vino)
<i>Sc</i> IOC 18-2007	<i>MATa/α HO/HO L-A M2 [K2⁺]</i>	Institut Oenologique de Champagne ^c
<i>Sb</i> Cremanti®	<i>MATa/α HO/HO</i>	La Littorale Enología SL ^d

^a M. Ramírez. Departamento de Ciencias Biomédicas, Universidad de Extremadura, Badajoz, España.

^b I. Olivero y L.M. Hernández, Departamento de Ciencias Biomédicas, Universidad de Extremadura, Badajoz, España.

^c Institut Oenologique de Champagne ZI de Mardeuil - Allée de Cumières BP 25 - 51201 EPERNAY Cedex France.

^d La Littorale Enología SL, Grupo ERBSLÖH, Ribera del Sena, 21-3º, Edificio APOT, 28042 Madrid, España. *Sc*, *S. cerevisiae*. *Sb*, *S. bayanus*.

Tabla II.2. Levaduras *S. cerevisiae* usadas como controles en el análisis del fenotipo killer.

Cepa	Genotipo	Origen
EX33	<i>MATa/α HO/HO [K1⁰ K2⁰ K28⁰ Klus⁰]</i>	M. Ramírez ^a (de vino)
EX73	<i>MATa/α HO/HO L-A M2 [K2⁺]</i>	M. Ramírez ^a (de vino)
F166	<i>MATα leu1 kar1 L-A-HNB M1 [K1⁺]</i>	J.C. Ribas ^e (de R.B. Wickner)
F182	<i>MATα his2 ade1 leu2-2 ura3-52 ski2-2 L-A M28 [K28⁺]</i>	J. C. Ribas ^e (de M. Schmitt)
EX198	<i>MATa/α HO/HO L-A Mlus [Klus⁺]</i>	M. Ramírez ^a (de vino)

^a M. Ramírez. Departamento de Ciencias Biomédicas, Universidad de Extremadura, Badajoz, España.

^e J. C. Ribas, Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca, Salamanca, España.

Tabla II.3. Mutantes de *S. cerevisiae* afectados en la síntesis de los componentes de la pared celular y usados en el estudio de sensibilidad a fenotipo killer.

Cepa	Genotipo	Función afectada en pared celular	Origen
wt (BY4741)	<i>wt MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Silvestre (wt)	I. Olivero y L.M Hernández ^b (de EUROSCARF).
Mnn2 (BY4741)	<i>wt MATa mnn2Δ</i>	Síntesis de la cadena externa de manoproteínas	I. Olivero y L.M Hernández ^b (de EUROSCARF).
Mnn5 (BY4741)	<i>wt MATa mnn5Δ</i>	Síntesis de la cadena externa de manoproteínas	I. Olivero y L.M Hernández ^b (de EUROSCARF).
Mnn9 (BY4741)	<i>wt MATa mnn9Δ</i>	Síntesis de la cadena externa de manoproteínas	I. Olivero y L.M Hernández ^b (de EUROSCARF).
Kre1 (BY4741)	<i>wt MATa kre1Δ</i>	Síntesis de glucanos	I. Olivero y L.M Hernández ^b (de EUROSCARF).
Mnn1 (BY4741)	<i>wt MATa mnn1Δ</i>	Síntesis de la cadena externa de manoproteínas	I. Olivero y L.M Hernández ^b (de EUROSCARF).
Kre6 (BY4741)	<i>wt MATa kre6Δ</i>	Síntesis de glucanos	I. Olivero y L.M Hernández ^b (de EUROSCARF).
Kre11 (BY4741)	<i>wt MATa kre11Δ</i>	Síntesis de glucanos	I. Olivero y L.M Hernández ^b (de EUROSCARF).
Kre27 (BY4741)	<i>wt MATa kre27Δ</i>	Síntesis de glucanos	I. Olivero y L.M Hernández ^b (de EUROSCARF).
Ktr1 (BY4741)	<i>wt MATa ktr1Δ</i>	Síntesis de la cadena externa de manoproteínas	I. Olivero y L.M Hernández ^b (de EUROSCARF).
Ktr2 (BY4741)	<i>wt MATa ktr2Δ</i>	Síntesis de la cadena externa de manoproteínas	I. Olivero y L.M Hernández ^b (de EUROSCARF).
Ktr3 (BY4741)	<i>wt MATa ktr3Δ</i>	Síntesis de la cadena externa de manoproteínas	I. Olivero y L.M Hernández ^b (de EUROSCARF).
Ktr4 (BY4741)	<i>wt MATa ktr4Δ</i>	Síntesis de la cadena externa de manoproteínas	I. Olivero y L.M Hernández ^b (de EUROSCARF).
Ktr5 (BY4741)	<i>wt MATa ktr5Δ</i>	Síntesis de la cadena externa de manoproteínas	I. Olivero y L.M Hernández ^b (de EUROSCARF).
Mnn6-Ktr6 (BY4741)	<i>wt MATa mnn6Δ</i>	Síntesis de la cadena externa de manoproteínas	I. Olivero y L.M Hernández ^b (de EUROSCARF).
Ktr7 (BY4741)	<i>wt MATa ktr7Δ</i>	Síntesis de la cadena externa de manoproteínas	I. Olivero y L.M Hernández ^b (de EUROSCARF).

^b I. Olivero y L.M. Hernández, Departamento de Ciencias Biomédicas, Área de Microbiología, Universidad de Extremadura, Badajoz, España.

II.1.2. No-Saccharomyces.

Tabla II.4. Levaduras *Torulaspora delbrueckii* vínicas utilizadas en las vinificaciones.

Cepa	Genotipo	Origen
<i>T.delbrueckii</i> TD291	<i>wt</i> L-A	Lallemand Inc. [†]
EX1180	<i>wt</i> L-A M-barr-1 [Kbarr-1 ⁺]	Este estudio (de vino)
EX1180-11C4	<i>cyh^R</i> L-Abarr M-barr-1 [<i>cyh^R</i> Kbarr-1 ⁺]	Este estudio (de EX1180)
EX1180-2K⁻	<i>cyh^R</i> L-Abarr M-barr-0 [<i>cyh^R</i> Kbarr ⁰]	Este estudio (de EX1180)
EX1257	<i>wt</i> L-Abarr M-barr-2 [Kbarr-2 ⁺]	Este estudio (de vino)
EX1257-CYH5	<i>cyh^R</i> L-Abarr M-barr [<i>cyh^R</i> Kbarr-2 ⁺]	Este estudio (de EX1257)

[†]Lallemand Inc. 19 rue des Briquetiers - BP 59 - 31702 Blagnac Cedex – France.

Tabla II.5. Levaduras no-*Saccharomyces* usadas en el análisis del fenotipo killer.

Cepa	Genotipo/Fenotipo relevante	Origen
<i>C.albicans</i> 10231	Patógena, killer y sensible a otras especies de <i>Candida</i> ; a 37°C tiene un 87% de hidrofobicidad en las membranas y un 4% a 22°C.	C. López ^g
<i>C.kefir</i>	Patógena, killer intergenérica; sensible intergenérica	C. López ^g
<i>C.glabrata</i>	Patógena, killer intergenérica; sensible intergenérica	C. López ^g
<i>C.dublinsiensis</i>	Patógena, killer intergenérica; sensible intergenérica	C. López ^g
<i>C.krusei</i>	Patógena, killer intergenérica; sensibilidad intergenérica	C. López ^g
<i>C.parasilosis</i>	Patógena, killer intergenérica; sensible intergenérica	C. López ^g
<i>C.tropicalis</i>	Patógena, killer intergenérica; sensible intergenérica	C. López ^g
<i>C.albicans</i> wt 5314C	Patógena, killer y sensible a otras especies de <i>Candida</i>	J. Correa ^h
<i>C.albicans</i> CAF2 (wt URA3+/-)	Patógena, killer y sensibilidad a otras especies de <i>Candida</i>	J. Correa ^h
<i>Y.lypolytica</i> wt a	Patógena, killer intergenérica	I. Olivero y L.M Hernández ^e
<i>Y.lypolytica</i> mnn9 a	Patógena, killer intergenérica	I. Olivero y L.M Hernández ^e
<i>Y.lypolytica</i> SAI-5 wt	Patógena, killer intergenérica	A. Domínguez ⁱ
<i>K. lactis</i>	Killer intergenérica, killer codificado en plásmido dsDNA pGKL1	A. Domínguez ⁱ
<i>H.mrakii</i> 22 wt	Killer intergenérica, toxina HM1	J.C. Ribas ^d
<i>S.Pombe</i> 33 wt 972h ⁻	Killer intergenérica, sensibilidad intergenérica	J.C. Ribas ^d
Apiculada15	Killer contra <i>S. cerevisiae</i>	M. Ramírez ^a (de vino).

^aM. Ramírez. Departamento de Ciencias Biomédicas, Universidad de Extremadura, Badajoz, España.

^dJ. C. Ribas, Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca, Salamanca, España.

^eI. Olivero L.M. Hernández y J. Correa, Departamento de Ciencias Biomédicas, Área de Microbiología, Universidad de Extremadura, Badajoz, España.

^gC. López. Departamento de Ciencias Biomédicas, Universidad de Extremadura, Badajoz, Spain.

^hJ. Correa, Departamento de Ciencias Biomédicas, Área de Microbiología, Universidad de Extremadura, Badajoz, España.

ⁱA. Domínguez, Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca, Salamanca, España.

II.2. Mosto y uvas.

Se utilizaron mostos o uva estrujada de las siguientes variedades de uva:

Cigüente: Cepa de uva blanca (*Vitis vinifera*) de España. Es una vid de brotación media o tardía, sensible a las enfermedades criptogámicas. Tiene racimos de tamaño grande y compactos, las bayas son de tamaño grande, forma redonda y color verde-amarillento. Según la orden APA/1819/2007, de 13 de junio (BOE del día 21), la variedad Cigüente está recomendada en la Comunidad Autónoma de Extremadura. Está adaptada a los suelos arenosos y pobres de la zona de Castuera, dentro de la D.O. Ribera del Guadiana. Su distribución en Extremadura está centrada en la provincia de Badajoz con un 0,33% de la superficie total de viñedo, estando fundamentalmente concentrado

su cultivo en Castuera, según los datos del Registro Vinícola (1995) (Sánchez and Luisa, 2000).

Macabeo: Es una variedad vigorosa, de racimo grande y compacto, grano redondo, mediano y de piel fina. Época de brotación media. Se adapta a todas las condiciones climáticas y de altitud, pero mejor si se cultiva en suelos fértiles. Acepta bien la mayoría de los portainjertos, aunque mejor los de menos vigor. Un exceso de producción índice notablemente en su calidad. Funciona bien con podas cortas aunque admite podas largas. Propensa a ataques de botritis y sensible al oidio. Esta variedad origina unos vinos buenos, amarillo muy pálido y tonalidades verdosas marcadas. Aromas de intensidad media-alta de frutas maduras y complejos. En fase gustativa son redondos, frescos y untuosos. Tiene un ciclo de maduración muy corto, por lo que puede dar problemas de sobremaduración que se refleja en sus vinos (Maqueda, 2008).

Tempranillo: Es una variedad implantada recientemente en esta región. Tiene una brotación media y tardía, y madurez media-temprana. Es una variedad vigorosa, se adapta a todo tipo de suelos con preferencia de terrenos orientados al medio día bien soleados. Poco sensible a heladas primaverales pero sí a vientos cálidos de primavera. Dependiendo de la zona de cultivo se le practica poda larga o corta, respetando el equilibrio producción-calidad. Sensible al oidio, mildiu y erinosis. Origina vinos muy buenos, tanto jóvenes como de crianza. Los vinos presentan un color rojo violáceo y capa alta, con intensos aromas frutales (frambuesa y mora) y notas de regaliz, equilibrados y redondos en boca. Tiene un ciclo de maduración corto y una acidez total baja (Maqueda, 2008).

Cabernet-Sauvignon: Variedad de brotación y floración tardía. Época de envero precoz/media y madurez fisiológica de la baya medio/tardía. Se adapta a climas templados y mejor a zonas secas y bien ventiladas. No acepta suelos excesivamente fértiles y húmedos que inducen a gran vigor. Se adapta bien a diversas formas de poda teniendo en cuenta las condiciones de clima y suelo. En Extremadura se suele adoptar el sistema de poda en espaldera. Resistencia a enfermedad normal. Al ser una planta vigorosa hay que tener cuidado con enfermedades criptogámicas. Con esta variedad se elaboran vinos jóvenes muy buenos y con unas cualidades excelentes para la crianza nuestra región. Son de color intenso, con tonalidades púrpuras y violáceas, de capa alta, aromas vegetales complejos e intensos (típicos de la variedad), equilibrados en boca, amplios y persistentes (Maqueda, 2008).

Pinot-Noir: Variedad tinta francesa originaria de Borgoña, se la conoce también con los nombres de Pynoz, pinot fin, franc pinot y Noirien. Se trata de una vinífera difícil de cultivar y también complicada de elaborar, con racimos pequeños en forma de piña de donde deriva su nombre; prefiriendo climas relativamente fríos donde su color no es muy elevado, pero produce mezcla de sutiles aromas a frambuesa, violeta, tinta y caza. Se encuentra cultivada en la Champagne, así como en Alemania, Suiza, Italia, Estados Unidos, Chile, Sudáfrica, Australia y Nueva Zelanda (Tugores, 2003).

Garnacha común: Variedad de origen español, probablemente de la región de Aragón. Bastante extendida por todo el mundo. El conocimiento de esta variedad se remonta a la época de la ocupación árabe. Se la conoce también con los nombres de Gironet, Grenache, Lladoner, Roussillon, Tinto Aragonés. Planta muy vigorosa y porte erguido. Producción entre media y alta, con racimos entre medianos y grandes. Planta muy resistente a la sequía, muy versátil, se adapta a todo tipo de suelos. Sensible a mildiu, botrytis y al corrimiento de racimo. Vinos alcohólicos, color granate, aromas ligeros con tonos de fruta roja madura, acidez media-alta, vino poco estructurado. Se emplea para crianzas en ensamblaje con Tempranillo, Cabernet, Macabeo, Syrah y Graciano. Como vino joven no es interesante por su rápida oxidación. Su mayor vocación es la elaboración de rosados a partir de monovarietales de Garnacha (Alburquerque et al., 2006; Chomé, 2006).

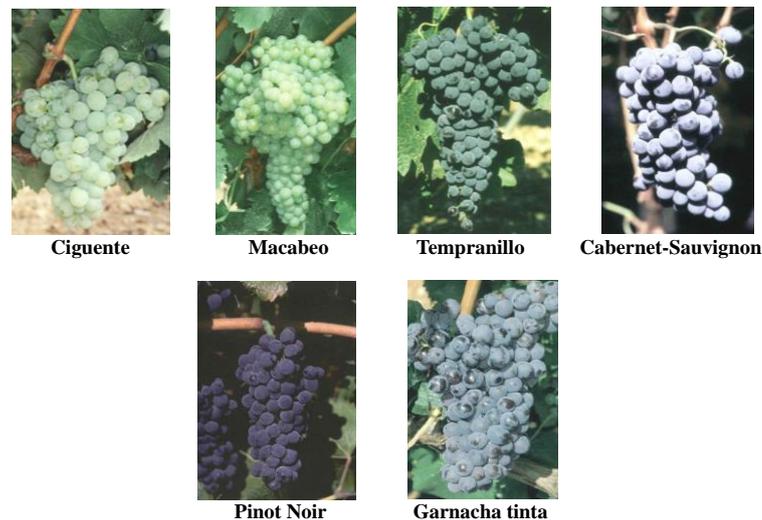


Figura II.1. Variedades de uva utilizadas en este trabajo para la elaboración de vinos tranquilos y espumosos (imágenes tomadas de <http://www.magrama.gob.es/>).

II.3. Medios de cultivos.

La composición de los medios se detalla a continuación, todos ellos se esterilizaron en el autoclave a 120°C durante 15 minutos. Cuando el medio era sólido, se dejó enfriar a 55°C, posteriormente se repartió en placas y se dejaba solidificar y secar 1 día a 30°C.

Medio YEPD: 2% glucosa, 2% peptona, 1% extracto de levadura y 2% agar (sólo para medio sólido).

Medio YEPD-CYH (con cicloheximida 2µg/mL): Igual que el medio YEPD pero con 200 µL de cicloheximida concentrada al 1% en etanol por cada litro de medio para conseguir una concentración final de 2µg/mL.

Medio YEPD-rod (con rodamina 6G 5µg/mL): Igual que el medio YEPD pero con 500 µL de rodamina 6G concentrada al 1% en etanol por cada litro de medio para conseguir una concentración final de 5µg/mL.

Melazas 1×: 50 mL/L melaza, 0,2% extracto de levadura, 0,075% (NH₄)₃PO₄, 0,1% MgSO₄×7H₂O, 0,1 mg/L tiamina, 0,125 mg/L biotina, 10 mg/L pantotenato cálcico. Ajustar pH 3,5-4 con HCl.

Melazas 2×: 100 mL/L melaza, 0,4% extracto de levadura, 0,15% (NH₄)₃PO₄, 0,2% MgSO₄×7H₂O, 0,2 mg/L tiamina, 0,25 mg/L biotina, 20 mg/L pantotenato cálcico. Ajustar pH 3,5-4 con HCl.

Medio de preesporulación: 0,6% YNB (Yeast nitrogen base), 0,5% extracto de levadura, 1% acetato potásico. Ajustar el pH 5,5 con NaOH.

Medio de esporulación: 1% acetato potásico, 0,05% glucosa, 0,1% extracto de levadura y 2% agar (sólo para medio sólido).

Medio 3,2MB: igual que el medio YEPD con 5 mL de azul de metileno concentrado al 0,6% en agua destilada y 100 mL de tampón citrato-fosfato 1M pH 3,2 por cada litro de medio.

Medio 4MB: igual que el medio YEPD con 5 mL de azul de metileno concentrado al 0,6% en agua destilada y 100 mL de tampón citrato-fosfato 1M pH 4 por cada litro de medio.

Medio 4,7MB: igual que el medio YEPD con 5 mL de azul de metileno concentrado al 0,6% en agua destilada y 100 mL de tampón citrato-fosfato 1M pH 4,7 por cada litro de medio.

Medio MLO: 1% glucosa, 0,5% fructosa, 1% peptona, 0,5% extracto de levadura, 0,1% tween 80, 0,35% citrato diamónico, 0,02% MgSO₄×7H₂O, 0,005% MnSO₄×H₂O, 100

mL/L zumo de tomate, 1% natamicina (después de autoclavar), 2% agar (sólo para medio sólido). Ajustar pH 4,8 con HCl.

Medio MRS-Tomate: 6,2% MRS comercial, 100 mL/L zumo de tomate, 1% natamicina (después de autoclavar) y 2% agar (sólo para medio sólido).

Medio GYC: 1% extracto de levadura, 5% glucosa, 2% CaCO₃ y 2% agar (sólo para medio sólido).

Medio CARR: 2% extracto de levadura, 0,002% verde de bromocresol y 2% agar (sólo para medio sólido). Ajustar a pH 5,5 con acético glacial.

II.4. Soluciones y tampones para extracción de ácidos nucleicos.

Tris-HCl 1M pH 7,5-8: Disolver 121 g de Tris base (PANREAC) al 97% en 800 mL de agua destilada, ajustar a pH 7,5-8 con aproximadamente 70 mL de HCl concentrado. Enrasar a 1 L y autoclavar.

EDTA 0,5M pH 8: Se disuelven 186,1 g de EDTA (SERVA) en 800 mL de agua destilada con agitación energética; ajustar a pH 8 con NaOH. Enrasar a 1 L y autoclavar.

Acetato sódico 3M: Pesar 123 g de acetato sódico y disolver en agua destilada. Enrasar a 500 mL y autoclavar.

NaCl 1M: Disolver 58,4 g de NaCl (SERVA) en 800 mL de agua destilada y enrasar a 1L.

SDS 10%: Disolver, calentando a 68°C, 100 g de dodecil sulfato sódico (SDS, electrophoresis grade, SERVA) en 900 mL agua destilada estéril y ajustar a pH 7,5 con unas gotas de HCl concentrado. Enrasar con agua destilada estéril hasta 1L.

EDTA 50mM pH 7: Disolver 18,61 g de EDTA (SERVA) en 800 mL de agua destilada con agitación energética; ajustar a pH 7 con NaOH. Enrasar a 1 L y esterilizar en autoclave.

50mM Tris-SO₄ pH 9,3, 1% mercaptoetanol: Mezclar 25 mL de Tris 1M acidificado con H₂SO₄ hasta pH 9,3 con 5 mL de mercaptoetanol (SERVA). Enrasar con agua destilada estéril hasta 500 mL.

0,1M NaCl, 10mM Tris-CIH pH 7, 10mM EDTA, 0,2 % SDS: Mezclar 100 mL de NaCl 1M, 10 mL de Tris 1M acidificado con HCl hasta pH 7,5-8, 20 mL de EDTA 0,5M pH 7,5-8, y 20 de mL SDS 10%. Enrasar a 1 L y esterilizar en autoclave.

Fenol equilibrado con Tris-CIH pH 8: Golpear con una espátula el fenol sólido (PANREAC) y apartar la cantidad mínima necesaria. Añadir el mismo volumen de Tris-CIH 1M pH 7,5-8 y agitar para homogeneizar. Dejar reposar y cuando se formen las dos

fases, retirar la fase acuosa (parte superior) con trompa de vacío. Repetir el proceso 2-3 veces, y finalmente añadir 20 mL del Tris-ClH 1M pH 7,5-8, y conservar en frigorífico y en frasco opaco para preservar oxidaciones debidas a la luz.

Isopropanol; 2-propanol para análisis instrumental (PANREAC).

TE pH 7,5-8: Tris-HCl 10mM y EDTA 1mM para inhibir nucleasas y preservar ácidos nucleicos. Mezclar 10 mL de Tris-HCl 1M pH 7,5 con 2 mL de EDTA 0,5M pH 8. Enrasar con agua destilada estéril hasta 1L.

TSE 10×: Disolver 5,84 g de NaCl en agua-DEPC. Añadir 50 mL de Tris-HCl 1M pH 7,5 y 2 mL de EDTA 0,5M pH 8. Enrasar con agua-DEPC estéril hasta 100 mL. Solución de trabajo 1×, mezclar 10 mL de TSE 10× en 90 mL de agua-DEPC.

TSE 1× + 15% etanol: mezclar 15 mL de etanol absoluto en 85 mL de TSE 1×.

Tampón de carga 10×: Mezclar azul de bromofenol al 0,025% y glicerol al 30%. Enrasar con agua destilada estéril hasta 100 mL. Solución de trabajo 1×, mezclar 2 µL de tampón de carga 10×, 6µL de miniprep y 12µL de agua MilliQ.

Tampón de electroforesis Tris-Acetato 50× (TAE 50×): Disolver 242 g Tris base (PANREAC) en agua destilada. Añadir 57,1 mL de ácido acético glacial y 100 mL de EDTA 0,5M pH 8. Enrasar con agua destilada estéril hasta 1L. Solución de trabajo 1×, mezclar 20 mL de TAE 50× en 980 mL de agua destilada.

Agua-DEPC 0,1%: Añadir 1 mL de DEPC (dietilpirocarbonato 97%, SERVA) en agua MilliQ. Enrasar hasta 1 L. Incubar durante 2-12 horas a 37°C. Esterilizar en autoclave.

II.5. Oligonucleótidos.

Tabla II.5.1. Oligos empleados como cebadores en reacciones de secuenciación.

Nombre	Secuencia 5'→3'	Referencia
EukA	AACCTGGTTGATCCTGCCAGT	(Díez et al., 2001)
EukB	TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC	
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	(Esteve-Zarzoso et al., 1999a)
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	

II.6. Cultivo y conservación de levaduras.

II.6.1. Condiciones de crecimiento.

Para su mantenimiento, las levaduras se crecieron a 30°C en medio YEPD líquido o sólido (2% de agar). En medio líquido, la incubación se realizó en tubos o matraces de diferentes volúmenes (manteniendo una relación de 1/5 entre el volumen del recipiente y el medio de cultivo) en agitadores orbitales a 200 rpm.

II.6.2. Preparación de inóculos de levaduras.

Los inóculos de levaduras se realizaron partiendo de las levaduras conservadas a -80°C en glicerol al 15%. Tras revitalizar las cepas en YEPD-agar a 30°C durante 48h, se realizaron cultivos seriados en 5 mL, 100 mL y 700 mL de YEPD líquido durante (24-48 h en agitación (200 rpm) a 30°C (**Fig. II.2**).

La cantidad necesaria de cultivo iniciador para cada experimento se obtuvo realizando cultivos escalonados en medio líquido (**Fig. II.2**). Cada paso intermedio sirvió de cultivo iniciador para el siguiente volumen a producir, aumentando así progresivamente el volumen de cultivo. En cada paso se empleó un inóculo que representaba el 10% del volumen a producir.

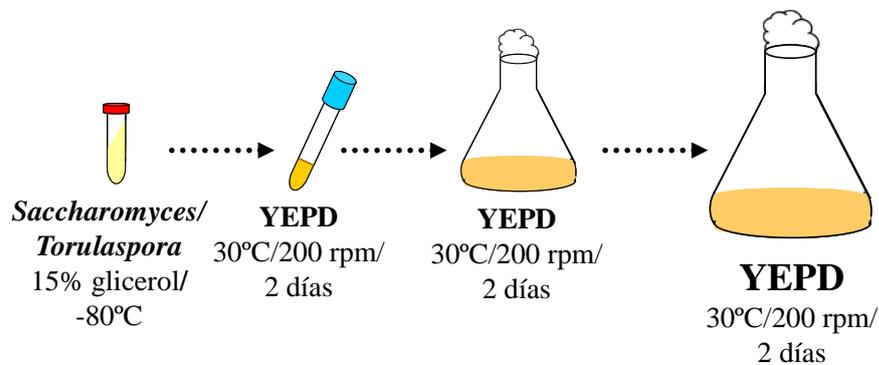


Figura II.2. Esquema de la preparación de los inóculos mediante cultivos puros seriados.

II.6.3. Producción de levaduras vínicas con distintos medios de cultivo.

Se partió de un cultivo puro conservado a -80°C , se inoculó en placa de YEPD y se incubó a 30°C durante 48h. Posteriormente, se inocularon 5 mL de YEPD líquido y se incubaron durante 24h a 30°C con agitación (200 rpm). A partir de estos cultivos se inocularon (10%) los medios de producción de levaduras (YEPD, Melazas 1× y Melazas 2×) y se incubaron a 30°C durante 4 días con agitación constante (200 rpm) (**Fig. II.3**).

Se realizó un seguimiento del crecimiento determinando diariamente la densidad óptica a 600 nm, el número de células totales contando en cámara de *Neubauer* después de diluir la muestra hasta 1:100 con agua destilada estéril, el porcentaje de células muertas y de yemas con azul de metileno (recuento de células azules muertas y yemas en foto realizada en microscopio óptico a 400 aumentos de una preparación con $5\mu\text{L}$ de muestra y $5\mu\text{L}$ de azul de metileno 0,05%). Al inicio y al final del crecimiento se realizó el test de viabilidad (dilución de los cultivos hasta 1:100.000 en agua estéril y siembra

de 100 μ L en placa de YEPD) a 30°C, 48h. Al final del crecimiento se analizó el rendimiento en peso húmedo, rendimiento en peso seco y viabilidad después del secado.

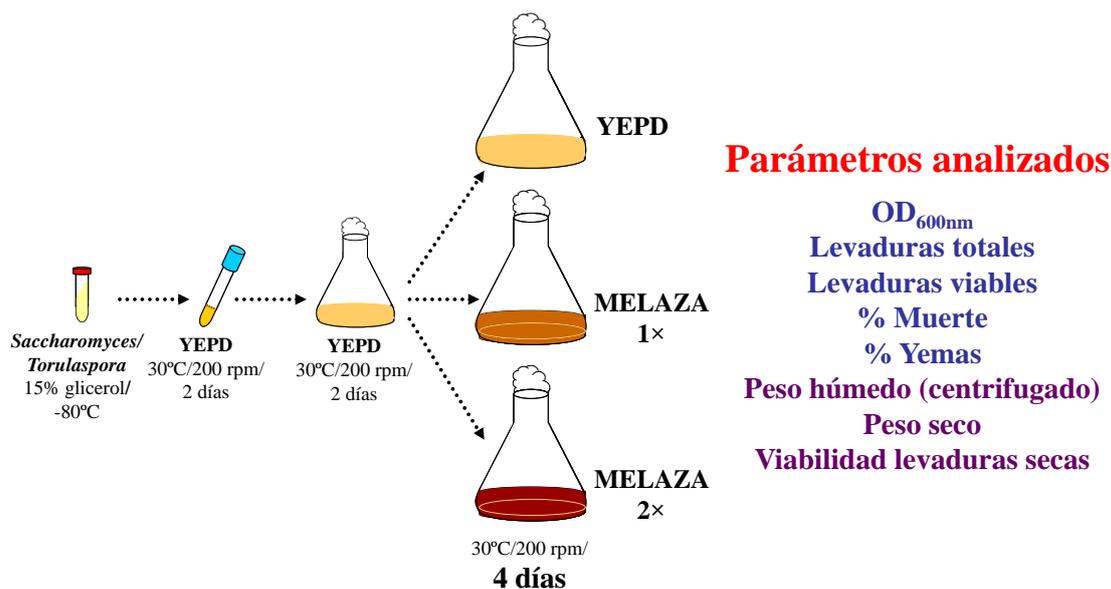


Figura II.3. Esquema de la producción de levaduras para vinificación mediante cultivos seriados en distintos medios.

II.6.3.1. Concentración celular: La medida de la densidad óptica del cultivo a 600nm (OD₆₀₀) se realizó en un espectrofotómetro (Pharmacia Biotec, Ultrospec 1000). Las muestras se diluyeron en agua hasta que la OD alcanzó un valor entre 0,05 y 0,6. El blanco se realizó con el medio de cultivo estéril pertinentemente diluido.

II.6.3.2. Rendimiento en peso húmedo: Se centrifugaron 30 mL de cada cultivo a 3000 rpm durante 3 min, se retiró el sobrenadante y se pesó el precipitado.

II.6.3.3. Rendimiento en peso seco: Los tubos con los precipitados de levaduras se incubaron abiertos en una estufa a 37°C, se pesaron cada semana hasta que la medida del peso se estabilizó.

II.6.3.4. Viabilidad después del secado: Por duplicado, 200 μ L de cultivo se centrifugaron 3 min a 3000 rpm, se quitó el sobrenadante, se resuspendieron en 20 μ L de YEPD líquido, se añadieron a un filtro de papel doblado, se depositaron en placas de Petri estériles, una placa se secó en una estufa a 37°C durante una noche y otra placa igual se conservó húmeda a 4°C, y seguidamente se resuspendieron las levaduras de los dos filtros correspondientes a cada cultivo, seco y húmedo, en 5 mL de YEPD y se analizó la viabilidad en placa.

II.6.4. Test fisiológico para identificación de levaduras.

La determinación de las características fisiológicas para la identificación de las distintas especies se realizó mediante test de crecimiento en diferentes medios siguiendo las técnicas de identificación clásicas (Kurtzman, 2011): crecimiento con galactosa, maltosa, melezitosa, etanol y 2-ceto-D-gluconato; crecimiento en cicloheximida 0,01%; y crecimiento en NaCl 10%+glucosa 5%. Con este test pudimos identificar las levaduras *Torulaspota* a nivel de especie.

II.6.5. Acondicionamiento de levaduras para segunda fermentación en botella.

Con carácter previo al tiraje para la elaboración de vinos espumosos (**Apartado II.7.3**), las levaduras se crecieron en un volumen determinado de YEPD (ej. 500 mL) a 30°C durante 48h y se retiró el sobrenadante. Antes de inocular, las levaduras se adaptaron al crecimiento en vino base, se resuspendieron en un volumen determinado (ej. 50 mL, concentrado de levaduras 10×) de agua con 2,4% de sacarosa y 0,01-0,2% (según ensayo) de diamonio fosfato (NH₄)₂HPO₄ (DAP, PANREAC), y se incubaron a temperatura ambiente 18-22°C durante aproximadamente 2 horas (**Fig. II.4**). Posteriormente procedimos a realizar tres doblajes:

- 1° Doblaje (1×V): Se añadió 1×V (ej. 50 mL) de una mezcla de agua y vino base (1:1) con 2,4% de sacarosa, incubándose aproximadamente 5 horas a temperatura ambiente 18-22°C. Esto supondría el primer doblaje de las levaduras (ej. volumen final de 100 mL).

- 2° Doblaje (1×V): Se volvió a añadir 1×V de vino base con 2,4% de sacarosa, se incubaron toda la noche, aproximadamente 13 horas en las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Esto supondría el segundo doblaje de las levaduras (ej. volumen final de 200 mL).

- 3° Doblaje (1,5×V): Se volvió a añadir 1,5×V de vino base con 2,4% de sacarosa y se incubó 5 horas obteniendo así una población de aproximadamente $2-6 \times 10^8$ CFU/mL durante el tercer doblaje de las levaduras. El volumen final de cultivo iniciador de nuestro ejemplo sería 500 mL, se incrementó 10 veces en los tres doblajes volviendo al volumen del cultivo original (**Fig. II.4**).

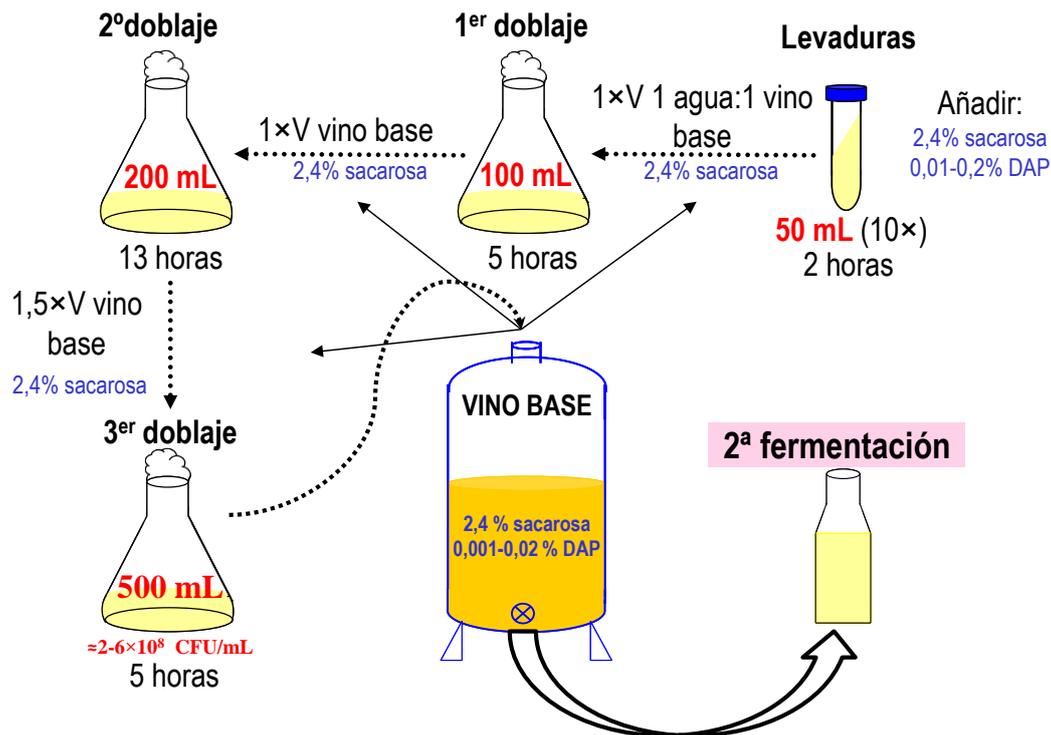


Figura II.4. Esquema de la preparación y acondicionamiento del cultivo iniciador de las levaduras seleccionadas para la segunda fermentación (Tiraje).

II.6.6. Conjugación y selección de diploides.

Para cruzar estirpes de *S. cerevisiae* se depositaban cantidades equivalentes de células de diferente tipo sexual con un palillo sobre una placa de YEPD, se mezclaban y se incubaban a 30°C durante varias horas. Seguidamente se transferían a un medio selectivo para el crecimiento de los diploides. Cuando no se podía utilizar el medio selectivo, se seguía la aparición de los zigotos por observación directa al microscopio (esperar entre 3 y 5 horas tras la mezcla) y se recogían con un micromanipulador (Micro Video Instruments, USA).

II.6.7. Esporulación.

La esporulación de levaduras se realizó básicamente como se describe a continuación (Kassir and Simchen, 1991):

Soluciones
<ul style="list-style-type: none"> • Medio de preesporulación • Medio de esporulación
Procedimiento
<ul style="list-style-type: none"> - Sembrar poca cantidad de células en un tubo de diámetro ancho con 3 mL de medio de preesporulación. - Incubar a 30°C con agitación durante 24 horas. - Pasar las muestras a tubos de centrifuga y centrifugar a 3500 rpm durante 3 minutos. - Descartar el sobrenadante. - Lavar 2 veces consecutivas con 1 mL de medio de esporulación. - Resuspender en 3 mL de medio de esporulación. - Incubar a 30°C el tiempo necesario (8-10 días) hasta que se visualicen tétradas al microscopio.

II.6.8. Disección de tétradas.

Se utilizó el protocolo que se describe a continuación:

Soluciones
<ul style="list-style-type: none"> • Agua estéril • Glusulasa (<i>Sigma-Aldrich</i>)
Procedimiento
<ul style="list-style-type: none"> - Centrifugar 0,5-1 mL de un cultivo esporulado de <i>S. cerevisiae</i> y lavarlo con agua estéril. - Resuspender en 200 µL de agua estéril y añadir 10 µL de glusulasa. - Incubar a 37°C durante 15-20 minutos. - Parar la reacción con 800 µL de agua y guardar a 4°C hasta su posterior disección. - Extender con un palillo las células en líneas rectas sobre una placa de medio YEPD. - Con el micromanipulador (Micro Video Instruments), apartar las ascas y separar las diferentes ascosporas.

II.6.9. Conservación de las levaduras.

Las levaduras de uso rutinario (levaduras) se conservaron en cultivos YEPD-agar a 4°C. Para conservación a más largo plazo, se mantenían congeladas a -80°C en 15% glicerol.

II.6.10. Determinación del fenotipo killer.

Se utilizó una adaptación de un método descrito previamente (Somers and Bevan, 1969), sembrando una gota de cultivo o un pequeño pegote (spot de células) de cada levadura problema con un palillo estéril en placas de MB (methylen blue) sembradas previamente con un césped de una cepa killer-sensible. La presencia del fenotipo killer se manifiesta por la formación de un halo de inhibición de crecimiento alrededor del pegote tras 1-4 días, el criterio utilizado fue: 0, no hay halo, +/-, fenotipo dudoso, 1, halo de 1 mm, 2, halo de 2 mm, 3, halo de 3 mm, 4, halo de 4 mm, 5, halo de 5 mm y 6, halo de 6 mm o más. Se utilizaron 3 medios con pH 3,2, 4 y 4,7 para analizar la influencia del pH, y se incubaron a 12°C o 20°C para analizar el efecto de la temperatura

(Fig. II.5). Se utilizaron como césped levaduras de distinto fenotipo killer ya conocido y las nuevas levaduras killer Kbarr-1 y Kbarr-2.

Paralelamente, se analizó la sensibilidad de las nuevas levaduras killer a las distintas levaduras *S. cerevisiae* (K1, K2, K28 y las recientemente descritas Klus), utilizando en el test las primeras como césped susceptible e inoculando las segundas posteriormente como pegotes de levaduras killer.

Se repitieron estos análisis en las mismas condiciones para analizar el fenotipo asesino de las nuevas levaduras Kbarr frente a levaduras de otras especies, y viceversa para analizar el fenotipo asesino de muchas de estas levaduras no-*Saccharomyces* frente a Kbarr. Entre estas levaduras no-*Saccharomyces* se encuentran especies perjudiciales en la elaboración de vino y patógenas para el ser humano (Tabla II.5).



Figura II.5. Ejemplo de test de fenotipo killer de distintas levaduras sensible-killer *S. cerevisiae* (EX33 sensible, EX73 killer K2, F166 killer K1, F182 killer K28, EX198 killer Klus, EX85 killer K2, EX85R sensible, EX229 killer Klus, EX229-R1 sensible) y *T. delbrueckii* (EX1180 killer Kbarr-1, EX1180-11C4 killer Kbarr-1, EX1180-2K sensible, EX1257 killer Kbarr-2 y EX1257-CYH5 killer Kbarr-2) frente a césped de levadura sensible (EX33) a pH 4 y 20°C.

II.7. Vinificaciones.

II.7.1. Elaboración de vino blanco.

La uva blanca se vendimió con menos de 12°Bé y en buenas condiciones sanitarias para que el mosto estrujado contenga menos de 10^4 CFU/mL de levaduras fermentativas silvestres. La uva se despalilló, se estrujó y se prensó para obtener el mosto. El mosto se clarificó (desfangado) a menos de 10°C, se encubó en recipientes de vidrio o acero inoxidable con distintos volúmenes (5-100 L, según ensayo), se añadió 0,3 g/L activador de fermentación (ACTIMAX, Agrovin) para garantizar el crecimiento de las levaduras, se corrigió de acidez con 3 g/L de ácido tartárico y/o 1 g/L de ácido L-

málico cuando fue necesario, 50 mg/L de sulfuroso cuando se consideró conveniente según estado fitosanitario de la uva, se añadieron levaduras en una concentración de 2×10^6 - 4×10^7 CFU/mL, y se realizó la fermentación entre 16 y 18°C. Diariamente se realizó 1-2 agitaciones suaves para asegurar una mínima disponibilidad de oxígeno a las levaduras y preservar su viabilidad. Terminada la fermentación, posteriormente se realizó el trasiego para clarificar el vino y corregirlo de sulfuroso y acidez si se considerara oportuno para su almacenamiento (**Fig. II.6**).

A lo largo de las fermentaciones se realizó el control de los parámetros físicos (temperatura, °Brix y densidad, **Apartado II.8**) y microbiológicos (recuento de células viables/mL, y tasa de implantación de las levaduras inoculadas mediante análisis de marcadores genéticos con réplica en placa, o de polimorfismos moleculares con electroforesis de ácidos nucleicos, **Apartados II.9 y II.11.7**). Se analizaron como mínimo 3 muestras de mosto/vino, en el inicio (IF), en fermentación tumultuosa (FT) y al final de fermentación (FF) (**Fig. II.6**).

Los parámetros principales físico-químicos de los vinos acabados (densidad, grado alcohólico, azúcares reductores, acidez total, pH, acidez volátil, anhídrido sulfuroso, ácido málico, ácido láctico y glucosa+fructosa) se analizaron mediante los métodos oficiales (E.E.C., 1990) en la Estación enológica de Almedralejo, y los volátiles minoritarios en el Servicio de Análisis Elemental y Molecular (UEx) como se ha descrito previamente (García-Carpintero et al., 2011). Finalmente se realizó el análisis organoléptico por catadores expertos de la Estación enológica de Almedralejo (**Apartado II.10**).

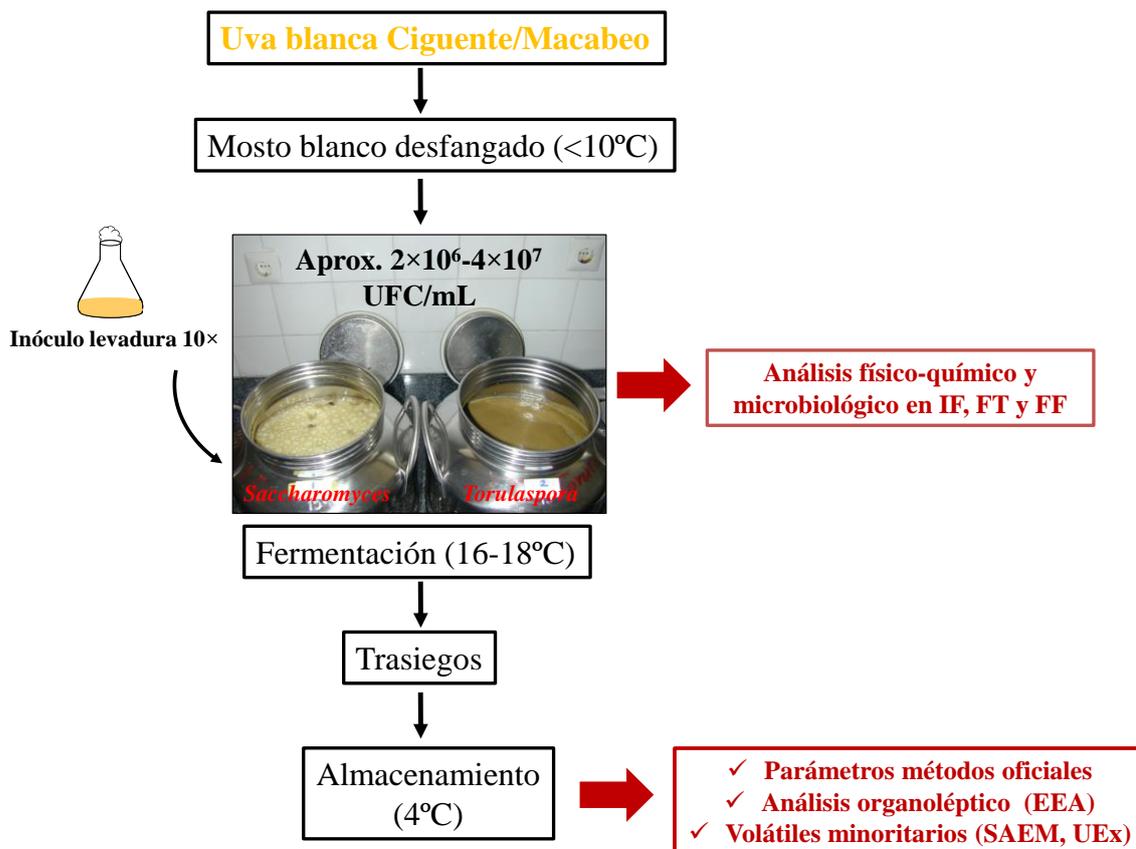


Figura II.6. Esquema de las micro-vinificaciones de vinos blancos. IF, inicio de fermentación; FT, fermentación tumultuosa; FF, final de fermentación; EEA, Estación Enológica de Almendralejo; y, SAEM,UEx, Servicio de Análisis Elemental y Molecular, Universidad de Extremadura.

II.7.2. Elaboración de vino tinto.

La uva tinta se vendimió con menos de 14,5°Bé, y en buenas condiciones sanitarias para que la pasta de uva estrujada contenga menos de 10^6 CFU/mL de levaduras fermentativas silvestres. La pasta de uva tinta previamente despallada y estrujada se encubó en recipientes de vidrio o acero inoxidable con distintos volúmenes (5-100 L, según ensayo), se añadió 50 mg/L sulfuroso cuando se consideró conveniente según estado fitosanitario de la uva, se corrigió de acidez con 3 g/L de ácido tartárico y/o 1 g/L de ácido L-málico cuando fue necesario, se añadieron levaduras en una concentración de 2×10^6 - 4×10^7 CFU/mL, y se realizó la fermentación entre 18 y 22°C. Cada día se realizaron 2-4 bazuqueos para extraer color de los hollejos y asegurar una mínima disponibilidad de oxígeno a las levaduras para preservar su viabilidad. El descube (separación de pepitas y pieles de uva) se realizó a densidad 1000 g/L, o 1005 g/L si se pretendía elaborar un vino más ligero. Se continuó con el proceso en las

mismas condiciones después del descube hasta terminar la fermentación. Posteriormente se realizó el trasiego (separación de las lías) para clarificar el vino y corregirlo de sulfuroso y acidez cuando se consideró oportuno (**Fig. II.7**).

A lo largo de las fermentaciones se realizó el control de los parámetros físicos (temperatura, °Brix y densidad, **Apartado II.8**) y microbiológicos (recuento de células viables/mL, y tasa de implantación de las levaduras inoculadas mediante análisis de marcadores genéticos con réplica en placa, o de polimorfismos moleculares con electroforesis de ácidos nucleicos, **Apartados II.9 y II.11.7**). Se analizaron como mínimo 3 muestras de mosto/vino, en el inicio (IF), en fermentación tumultuosa (FT) y al final de fermentación (FF) (**Fig. II.7**).

Los parámetros principales físico-químicos de los vinos acabados (densidad, grado alcohólico, azúcares reductores, acidez total, pH, acidez volátil, anhídrido sulfuroso, ácido málico, ácido láctico y glucosa+fructosa) se analizaron mediante los métodos oficiales (E.E.C., 1990) en la Estación enológica de Almendralejo, y los volátiles minoritarios en el Servicio de Análisis Elemental y Molecular (UEx) como se ha descrito previamente (García-Carpintero et al., 2011). Finalmente se realizó el análisis organoléptico por catadores expertos de la Estación enológica de Almendralejo (**Apartado II.10**).

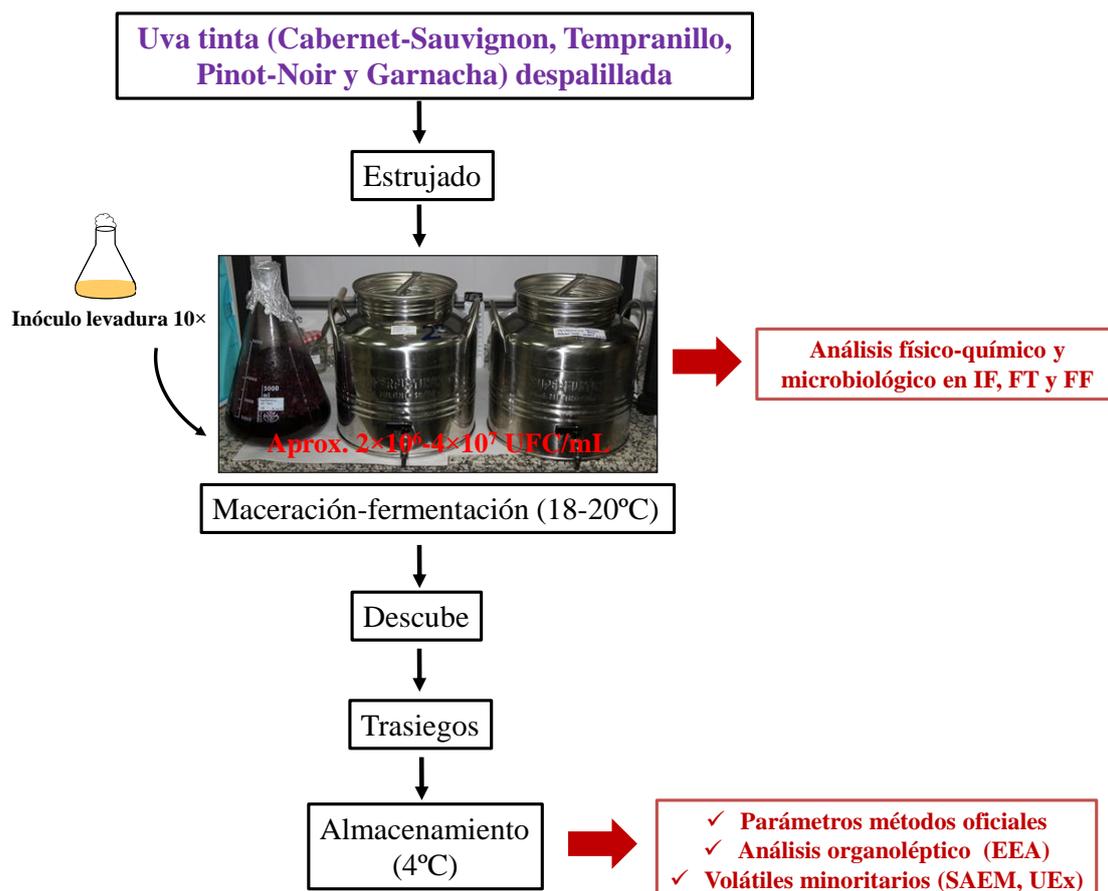


Figura II.7. Esquema de las micro-vinificaciones en de vinos tintos inoculadas con las levaduras objeto de estudio. IF, inicio de fermentación; FT, fermentación tumultuosa; FF, final de fermentación; EEA, Estación Enológica de Almendralejo; y, SAEM, UEx, Servicio de Análisis Elemental y Molecular, Universidad de Extremadura.

II.7.3. Elaboración de vino cava.

Con carácter previo, se evaluó la capacidad para elaborar cava de 16 levaduras vónicas autóctonas seleccionadas *S. cerevisiae* y dos levaduras comerciales de referencia (IOC 18-2007 del Instituto Oenologique du Champagne, y levadura encapsulada Cremanti® de La Littorale Enología, SL). Las levaduras se crecieron en 500 mL de YEPD, se concentraron a 50 mL (10×), y se adaptaron al crecimiento en vino base según el esquema del **Apartado II.6.5**. Se realizó el tiraje con vino base Macabeo con 2,5% de sacarosa, 0,02% de diamonio fosfato $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, y 0,5% de bentonita (solo en esta ocasión). El análisis de la presión se realizó por termostatación del cava a 20°C y medida directa con afrometro adaptable al tapón de corona. Se analizó: grado alcohólico (% v/v), presión (atm), azúcares residuales (g/L), acidez volátil (g/L), acidez total (g/L), pH, ácido láctico (g/L), y extracto seco (g/L).

Para el resto de elaboraciones de cava, partimos de un vino base Macabeo previamente estabilizado y suministrado por la Bodega López-Morena. Se utilizaron 4 vinos base distintos para elaborar cava con inóculos mixtos de levaduras killer/no-killer en tubos falcon a baja presión (vino base 1) y en botella con presión (vino base 2-4) (**Tabla II.6**).

Tabla II.6. Parámetros generales de los vinos base 1-4 variedad Macabeo procedente de Bodegas López-Morena, utilizados para elaboración de cava con inóculos mixtos de levaduras killer/no-killer en tubos de laboratorio a baja presión (vino base 1) y en botella con presión (vino base 2-4).

Parámetro	Vinos base			
	1	2	3	4
Etanol (% v/v)	10,50	9,83	10,60	10,60
pH	2,95	3,27	3,00	3,00
Acidez total (g/L)	5,8	4,8	5,4	5,4
Acidez volátil (g/L)	0,19	0,27	0,23	0,23
Densidad (g/L)	989,7	989,6	989,7	989,7
Az. reductores (g/L)	1,5	1,5	1,6	1,6
Extracto seco (g/L)	14,5	12,4	14,7	14,7
Grado brix	5,2	5,2	5,6	5,6
Ác. málico (g/L)	0,11	0,34	0,09	0,09
Ác. láctico (g/L)	0,56	0,45	0,59	0,59
Proteína (mg/L)	1,93	3,30	9,7	5,9
Polisacárido (mg/L)	160,28	163,21	163,61	99,72
Manosa (mg/L)	-	29,70	53,91	50,1
Σ ésteres etílicos (mg/L)	-	181,39	45,9	38,82
Σ ésteres de acetato (mg/L)	-	2439,95	49,9	25,79
Σ ácidos orgánicos (mg/L)	-	16,07	20,66	14,19
Σ alcoholes (mg/L)	-	228,85	114,04	56,98
Σ monoterpenos (mg/L)	-	0,00	0,00	1,88
Σ furanos+fenoles volátiles (mg/L)	-	10,11	0,33	0,44
Σ lactonas (mg/L)	-	3,83	1,94	2,18
Σ norisoprenoides (mg/L)	-	0,00	0,59	0,67
Σ compuestos carbonílicos (mg/L)	-	0,00	0,01	0,017
Σ otros (mg/L)	-	0,00	0,083	0,016
HM (mm)	-	28,75	46,00	42,00
HS (mm)	-	18,00	34,50	32,67
TS (segundos)	-	349,8	505,33	707,67

Las levaduras se adaptaron al crecimiento en vino base (**Apartado II.6.5**) y se realizó el tiraje con el mismo base con 2,4% de sacarosa para llegar a la presión deseada de 6-7 atm, y 0,001-0,02% (según ensayo) de diamonio fosfato $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ como fuente de nitrógeno asimilable por las levaduras. Se realizó la mezcla de levaduras

(killer+no-killer o dos killer de distinto tipo) por separado y en las proporciones determinadas, se inocularon $1-4 \times 10^7$ células/mL de *Torulaspota* y $1-4 \times 10^6$ de *Saccharomyces*. En los controles con una sola estirpe de levadura se añadió la mitad de células, al no ser previsible ningún efecto killer. No se adicionaron sustancias coadyuvantes que pudieran absorber proteínas y afectar a la espuma del cava, o las toxinas asesinas y disminuir el efecto killer. Posteriormente, se embotellaron en botellas tipo champanesas de 0,75 L con obturador de plástico y tapón de corona (**Fig. II.8**).

Las botellas se colocaron en posición horizontal (rima) para realizar la segunda fermentación a distinta temperatura según experimento (**Capítulo V**). En el tiraje de vino base 1 se incubaron los 7 primeros días a 12°C, 7 días a 20°C con el objetivo de acelerar el efecto killer de las levaduras, y el resto a 12°C. Con vino base 2, los tirajes de mezclas de levaduras *Saccharomyces*+*Saccharomyces* más un control sin inocular se incubaron a 18°C durante los primeros 30 días de fermentación para optimizar el efecto killer y posteriormente se pasaron a 12°C para continuar con la segunda fermentación y crianza en las mismas condiciones que los cavas de *Torulaspota*, *Torulaspota*+*Torulaspota* y *Torulaspota*+*Saccharomyces*. Los tirajes realizados con *Torulaspota* más otro control sin inocular se incubaron a 12°C desde el principio para mitigar en lo posible el efecto deletéreo de las condiciones de tiraje sobre estas levaduras. Con vino base 3, se pusieron las botellas a 12°C todo el tiempo, temperatura recomendada para elaborar champagne. Y finalmente, en el tiraje con vino base 4 las botellas se incubaron a 18°C durante los primeros 17 días y posteriormente a 12°C.

Las botellas se agitaron cada vez que se tomaban muestras para resuspender las levaduras. Se dejó madurar el vino espumoso sobre sus lías hasta cumplir los 9 meses desde la fecha de tiraje, para permitir la muerte y autólisis de las células y la liberación de los componentes celulares que posteriormente se degradarán a moléculas más sencillas. Seguidamente, las botellas se agitaron para resuspender las levaduras y se colocaron inclinadas en los pupitres, donde se removieron diariamente de forma manual durante 15-60 días. Antes del degüello se colocaron en punta en cajas de plástico con el objetivo de separar completamente las lías de la pared de la botella y llevarlas contra el tapón de la botella invertida (**Fig.II.8**).

Finalmente, se realizó el degüello o eliminación de las lías congelando el depósito de levaduras introduciendo el cuello de la botella en una solución de polietilenglicol a -25°C, se quitó el tapón y el depósito congelado fue expulsado por la propia presión interna (**Fig.II.8**).

A lo largo de las fermentaciones se realizó el seguimiento de los parámetros físicos (temperatura, °Brix y presión, **Apartado II.8**) y microbiológicos (recuento de células viables/mL, y tasa de implantación de las levaduras inoculadas mediante análisis de marcadores genéticos con réplica en placa, o de polimorfismos moleculares con electroforesis de ácidos nucleicos, **Apartados II.9 y II.11.7**). Se analizaron muestras a diferentes tiempos (aproximadamente 0, 15, 30, 60, 90, 180 y 270 días) (**Fig.II.8**).

Los parámetros principales físico-químicos de los vinos acabados (densidad, grado alcohólico, azúcares reductores, acidez total, pH, acidez volátil, anhídrido sulfuroso, ácido málico, ácido láctico y glucosa+fructosa) se analizaron mediante los métodos oficiales (E.E.C., 1990) en la Estación enológica de Almendralejo, los volátiles minoritarios en el Servicio de Análisis Elemental y Molecular (UEx) como se ha descrito previamente (García-Carpintero et al., 2011) y los parámetros de la espuma con el equipo Mosalux (**Apartado II.15**). Finalmente se realizó el análisis organoléptico por catadores expertos de la Estación enológica de Almendralejo (**Apartado II.10**).

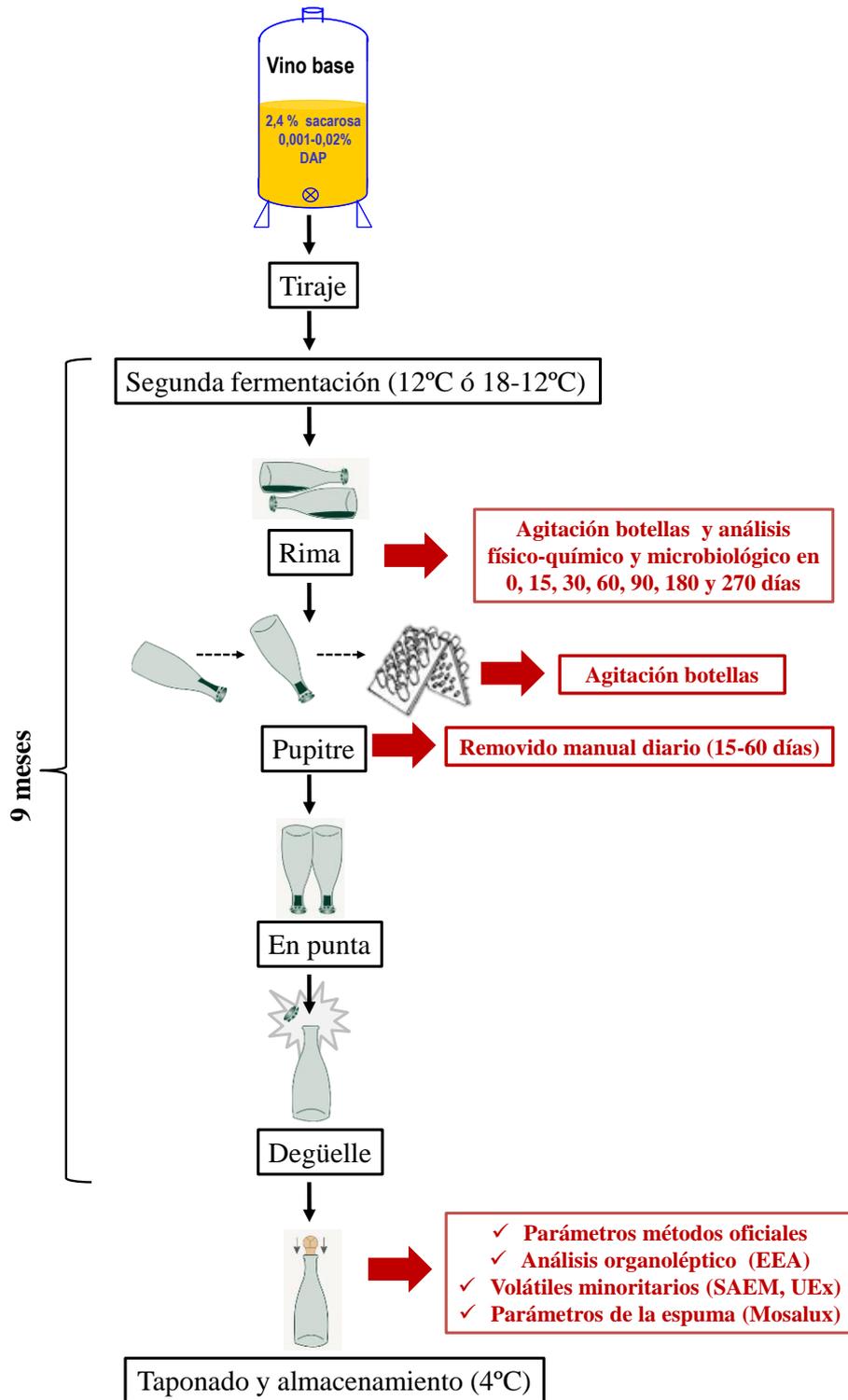


Figura II.8. Esquema de la elaboración de vinos espumosos inoculados con las levaduras previamente acondicionadas (**Apartado II.6.5**) objeto de estudio. EEA, Estación Enológica de Almendralejo; y, SAEM,UEx, Servicio de Análisis Elemental y Molecular, Universidad de Extremadura.

II.8. Parámetros físico-químicos.

II.8.1. Grados Brix.

Los grados Brix son una medida de los azúcares contenidos en una solución acuosa y se traduce en el porcentaje en peso de azúcares, de forma que 1° Brix equivale a 1% de sacarosa en agua destilada (p/p). Su medida está basada en el índice de refracción de la disolución y se realiza a 20°C. El contenido de azúcares de los mostos se midió mediante refractometría, se utilizó un refractómetro digital (ATAGO PR-32, 0-32%), en cuyo prisma se colocaban unas gotas de la muestra a analizar, la medida se efectuaba con arreglo a las instrucciones del aparato utilizado. Esta medida nos permite determinar la evolución de la cinética lo largo de la fermentación.

Cuando la medida se realizó en la Estación enológica de Almendralejo se midió mediante refractometría según el reglamento (CEE) N° 2676/90 de la Comisión del 17 de septiembre (E.E.C., 1990).

II.8.2. Masa volúmica y densidad relativa.

La masa volúmica (sólo para vinos tranquilos) se midió por aerometría vertiendo en una probeta de 250 mL la muestra preparada para el ensayo, se introducía el areómetro y anotaba la densidad. La densidad relativa a 20°C es la relación, expresada en número decimal, entre la masa de un cierto volumen de vino o mosto a 20°C y la masa del mismo volumen de agua a la misma temperatura. Se expresa dividiendo la masa volúmica a 20°C por 0,998203 (masa volúmica del agua a 20°C).

Cuando la medida se realizó en la Estación enológica de Almendralejo se midió por aerometría según el método usual del reglamento (E.E.C., 1990).

II.8.3. Grado alcohólico volumétrico.

El grado alcohólico volumétrico equivale al número de litros de etanol contenidos en 100 litros de vino, medidos a 20°C. La medida se realizó utilizando el método usual del reglamento (E.E.C., 1990) por destilación simple del líquido alcalinizado y medida de la densidad del destilado. El resultado se expresa en % volumen (% vol.), siendo los valores usuales para vinos de mesa entre 9 y 15 % vol.

II.8.4. Azúcares reductores.

La medida de los azúcares reductores (glucosa, fructosa, arabinosa, xilosa, ramnosa, sacarosa, etc) se realizó según el método usual del reglamento (E.E.C., 1990) por defecación plúmbica con acetato neutro de plomo y valoración basada en la acción reductora. El resultado se expresa en g/L de azúcar invertido, siendo < 4 g/L vino seco, entre 4-18 g/L semiseco, 18-45 g/L semidulce y > 45 g/L dulce.

II.8.5. Acidez total.

La acidez total de un vino es la suma de los ácidos titulables cuando se lleva el vino a pH 7 por adición de una solución alcalina valorada. El dióxido de carbono y el dióxido de azufre no se consideran parte de la acidez total y deben ser eliminados previamente (mediante agitación o vacío). La medida se efectuó por valoración potenciométrica de 10 mL de vino con NaOH 0,1M según el método usual del reglamento (E.E.C., 1990). Los resultados se expresan en g/L de ácido tartárico (TH₂), siendo 3,5 g/L la acidez total mínima permitida de ácido tartárico (CEE) N° 1493/99.

II.8.6. pH.

La actividad de los iones de hidrógeno se mide en términos del logaritmo de su concentración. El pH del vino oscila entre 3 y 4. La medida se determinó con un pH-metro Crison 2001 con electrodo combinado.

Cuando la medida se realizó en la Estación enológica de Almendralejo se midió por potenciometría según el método usual del reglamento (E.E.C., 1990).

II.8.7. Acidez volátil.

Se midió mediante el método operativo del reglamento (E.E.C., 1990), valoración de los ácidos volátiles separados del vino por arrastre de vapor de agua y rectificación de los vapores. Previamente debe eliminarse el dióxido de carbono del vino. La acidez del dióxido de azufre libre y combinado destilado en dichas condiciones debe restarse de la acidez del destilado. Se expresa en g/L de ácido acético, siendo los límites establecidos en 1,20 g/L de ácido acético en vinos tintos y 1,08 g/L en vinos blancos y rosados.

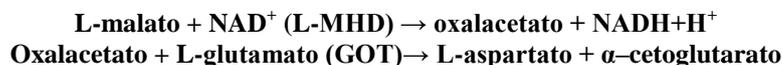
II.8.8. Anhídrido sulfuroso.

Se midió mediante el método del reglamento (E.E.C., 1990), basado en el arrastre del anhídrido sulfuroso con una corriente de aire, fijación y oxidación por borboteo en una solución diluida y neutra de H₂O₂, y valoración del ácido sulfúrico formado con una solución de NaOH. El arrastre en caliente garantiza la extracción del sulfuroso total. Se expresa en mg/L de anhídrido sulfuroso total o libre, siendo los límites establecidos en 160 mg/L de anhídrido sulfuroso total en vinos tintos y 210 mg/L en vinos blancos y rosados; la cantidad de anhídrido sulfuroso libre no está reglamentada.

II.8.9. Ácido málico.

La medida se realizó utilizando el método enzimático del reglamento (E.E.C., 1990), basado en la oxidación del ácido L-málico (L-malato) a oxalacetato en presencia de nicotinamida-adenin-dinucleótido (NAD) por la L-malato-deshidrogenasa (L-MHD).

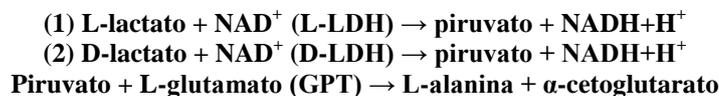
El equilibrio de la reacción está desplazado en el sentido del malato, por lo que la eliminación del oxalacetato por la adición de L-glutamato al medio reactivo (lo transforma en L-aspartato mediante el enzima glutamato-oxalacetato-transaminasa, GOT), desplaza el equilibrio hacia la formación de oxalacetato:



La formación de NADH, medida por el aumento de la absorbancia a la longitud de onda de 340 nm, es proporcional a la cantidad de L-malato presente.

II.8.10. Ácido láctico.

Se utilizó el método enzimático del reglamento (E.E.C., 1990), basado en la oxidación de ácido láctico (L-lactato y D-lactato) a piruvato en presencia de nicotinamida-adenin-dinucleótido (NAD), reacción catalizada por L-lactato deshidrogenasa (L-LDH) y D-lactato deshidrogenasa (D-LDH). Al estar el equilibrio de la reacción desplazado en el sentido del lactato, la eliminación del piruvato por la adición de L-glutamato al medio de reacción, desplaza el equilibrio hacia la formación de piruvato, transformándose en L-alanina por la glutamato-piruvato-transaminasa (GPT).



La formación de NADH, medida por el aumento de la absorbancia a 340 nm, es proporcional a la cantidad de L-lactato presente.

II.8.11. Glucosa + fructosa.

Se utilizó el método enzimático del reglamento (E.E.C., 1990), basado en la fosforilación de la glucosa y la fructosa con adenosin trifosfato (ATP) mediante una reacción enzimática catalizada por la hexokinasa (HK), dando como resultado glucosa-6-fosfato y fructosa-6-fosfato. En principio, la glucosa-6-fosfato se oxida a gluconato-6-fosfato mediante la nicotinamida-adenin-dinucleótido-fosfato (NADP) en presencia de la enzima glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa. La cantidad de nicotinamida-adenin-dinucleótido-fosfato reducida (NADPH) que se origina corresponde a la cantidad de glucosa-6-fosfato, y por lo tanto de glucosa. La nicotinamida-adenin-dinucleótido-fosfato reducida se determina por su absorción a 340 nm. Una vez finalizada esta reacción, la fructosa-6-fosfato se transforma en glucosa-6-fosfato por la acción de la fosfoglucosa-isomerasa. La glucosa-6-fosfato reacciona de nuevo con la nicotinamida-

adenin-dinucleótido-fosfato para dar gluconato-6-fosfato y nicotinamida-adenin-dinucleótido-fosfato reducida, determinándose esta última para conocer cantidad de glucosa-6-fosfato, y por lo tanto de glucosa. Las determinaciones se realizaron con un autoanalizador Lisa 200.

II.8.12. T15 y T100.

Finalizada cada fermentación (blanco y tinto) se calculó el T15 y T100 de cada levadura para evaluar su vigor fermentativo. El T15 es el tiempo necesario para consumir el 15% del azúcar inicial del mosto. El T100 es el tiempo que tardan las levaduras en consumir todos los azúcares del mosto (Ramírez et al., 1999b).

II.9. Parámetros microbiológicos.

II.9.1. Recuento de células totales (células/mL).

El recuento de células totales se hizo con una cámara de Neubauer que es un instrumento utilizado para realizar el recuento de células en un medio líquido. Se trata de un portaobjetos que tiene dos zonas ligeramente deprimidas en el fondo de las cuales se ha marcado con la ayuda de un diamante una cuadrícula de dimensiones conocidas. Se cubre la cámara con un cubre que se adhiere por simple tensión superficial y se introduce el líquido a contar, al que generalmente se ha sometido a una dilución previa, en nuestro caso del orden de 10^{-1} en agua destilada. Para contar las células se observa la cuadrícula al microscopio con el aumento adecuado y se cuentan las células.

En la cuadrícula central, la cámara de Neubauer posee un cuadrado primario que contiene nueve cuadrados secundarios cada uno de ellos divididos a su vez en 16 cuadrados terciarios, el cuadrado central contiene 25 cuadrados, cada uno de ellos dividido a su vez en 16 cuadrados cuaternarios. De este modo realizaremos el recuento de la diagonal central (5 cuadrados centrales) y hallaremos el recuento promedio.

Con base en la cantidad de células contadas, conociendo el volumen de líquido que admite el campo de la cuadrícula, se calcula la concentración de células por unidad de volumen de la muestra líquida inicial. En nuestro caso, la superficie (s) de cada cuadrado era de $0,04\text{mm}^2$ ($0,2\text{mm} \times 0,2\text{mm}$) y la altura de la cámara (h) era de $0,1\text{mm}$, por lo tanto el volumen (V) de cada cuadrado será $0,004\text{mm}^3$; a partir de esta premisa podremos extrapolar la cantidad de células que tenemos en nuestra preparación multiplicando por el factor de dilución, si fuera necesario. La fórmula de valoración del número de células es la siguiente:

$$\text{Células totales/mL} = \text{Recuento promedio} / 0,004\text{mm}^3 \times \text{dilución} \times 1000$$

II.9.2. Recuento de células viables en placa (UFC/mL).

El recuento de células viables se realizó mediante siembra en placas de YEPD de 0,1 mL de las muestras a analizar diluidas convenientemente en agua destilada estéril y extendida con asa de Digrasky. Se incubaron durante aproximadamente 48 horas a 30°C, y se hizo recuento de las colonias de microorganismos viables totales (UFC/mL) multiplicando por el factor de dilución en cada caso (1/100.000 y/o 1/1.000.000) (**Fig. II.9**).

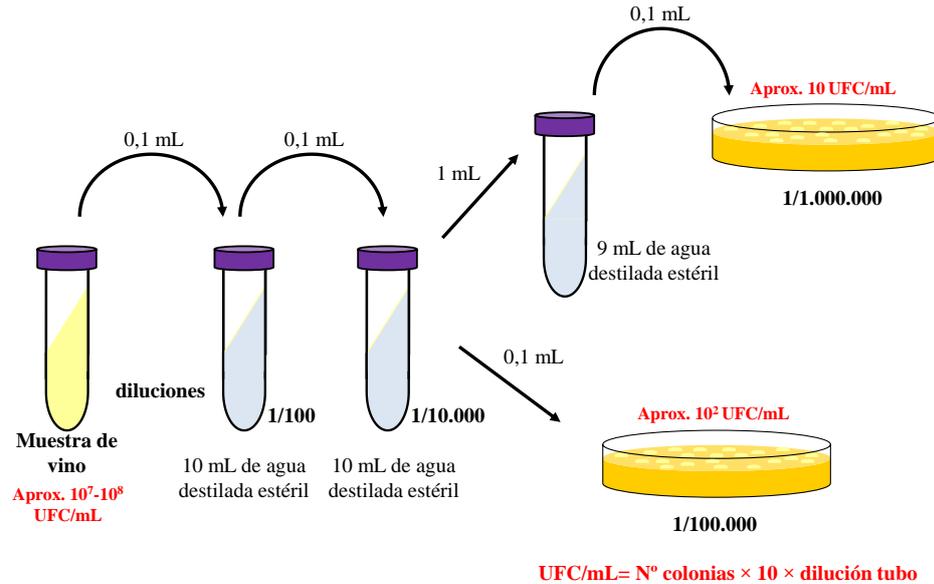


Figura II.9. Esquema de las diluciones seriadas para recuento total de células viables en placa YEPD (UFC/mL).

II.9.3. Detección de levaduras con marcadores genéticos de resistencia a cicloheximida y rodamina.

Para calcular la tasa de imposición de la levadura inoculada, así como el porcentaje de levaduras resistentes/sensibles a cicloheximida y/o rodamina, respectivamente, se utilizó un método rápido, seguro y barato que permite detectar las levaduras inoculadas (resistentes a cicloheximida) en una fermentación, mediante una simple siembra por réplica en placa con terciopelo estéril.

Las levaduras que forman colonias de color rosa claro en medio con baja concentración (5 $\mu\text{g/mL}$) de rodamina (RHOD^{BC}), presentaban cierta resistencia a cicloheximida debido a que se seleccionaron de cruces de mutantes blancos crecidos en medio con alta concentración de rodamina (500 $\mu\text{g/mL}$) y mutantes con resistencia a cicloheximida (Ambrona et al., 2006).

Una vez crecidas las colonias en placas de YEPD, utilizando terciopelo estéril, se replicó sobre una placa de YEPD-CYH (suplementado con 2 $\mu\text{g/mL}$ de cicloheximida)

y/o YEPD-rod (suplementado con 5 µg/mL de rodamina-6G), según el criterio de resistencia a seguir. Se incubaron aproximadamente 48 horas a 30°C. Cuando fue necesario se seleccionaron al azar 20-25 colonias en nuevas placas de YEPD, usando controles de comportamiento conocido positivo y negativo en ambos casos (**Fig. II.10**).

Las levaduras sensibles a cicloheximida (CYH^S) no crecen en placas YEPD-CYH y las sensibles a rodamina crecen y se tiñen de rosa oscuro. Las levaduras resistentes a cicloheximida (CYH^R) crecen en la YEPD-CYH, y las resistentes a rodamina se tiñen de rosa claro (Rod^{PC}) (**Fig. II.10**). El porcentaje de levaduras resistentes respecto a la población total nos da la tasa de imposición de la levadura que domina durante la fermentación:

$$\% \text{ Levadura inoculada} = (\text{N}^\circ \text{ de colonias CYH}^R \text{ o Rod}^{PC} / \text{N}^\circ \text{ de colonias o N}) \times 100$$

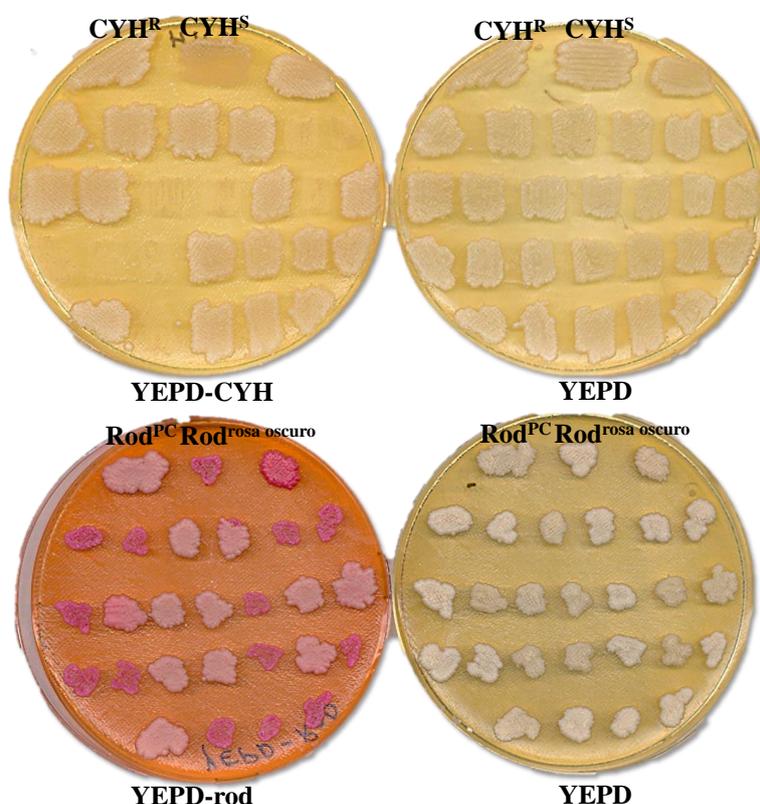


Figura II.10. Ejemplo de réplica en placa en terciopelo para calcular la tasa de imposición de la levadura inoculada, y el porcentaje de levaduras resistentes/sensibles a cicloheximida y/o rodamina-6G, respectivamente. Se muestra placa YEPD (derecha) e YEPD-CYH (suplementado con 2 µg/mL de cicloheximida) o YEPD-rod (suplementado con 5 µg/mL de rodamina-6G) (izquierda).

II.9.4. Porcentaje de células muertas.

Se determinó la muerte celular tiñendo con el colorante vital azul de metileno seguido de observación al microscopio óptico. El azul de metileno (tinción positiva) es

un colorante catiónico, permite teñir el interior celular, tiñe microorganismos procarióticos (vivos o muertos). Los microorganismos eucarióticos sólo se tiñen si están muertos. Para ello, 0,05 mL de muestra a analizar se mezclaron con 0,05 mL de una solución acuosa estéril de azul de metileno a una concentración final de 0,06% y se observó a 600 aumentos con la técnica de Nomarski. De cada muestra se capturaban dos fotografías para su posterior conteaje. Debido a los cambios morfológicos que sufren las levaduras durante la segunda fermentación, el porcentaje total de muerte se calculó como la proporción de células azules, vacías, desorganizadas y destrozadas (**Fig.II.11**).

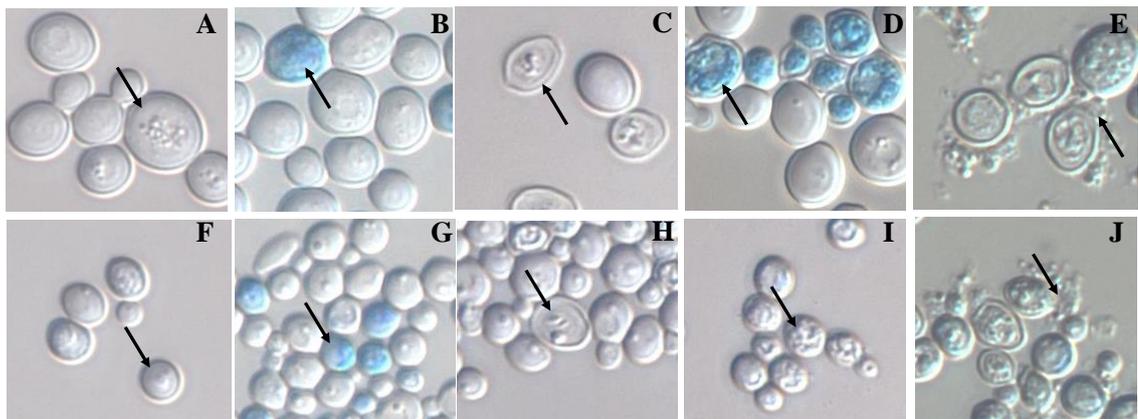


Figura II.11. Tipos de células vivas y muertas de levaduras *Saccharomyces* A-E y *Torulaspora* F-J (A y F, células vivas; B y G, células azules (sub-letales); C y H, células vacías; D e I, células desorganizadas; y, E y J, células destrozadas). Microfotografías captadas con cámara digital a 600× en microscopio óptico con Nomarski.

II.10. Análisis sensorial.

El análisis sensorial de los vinos se realizó en la sala de cata de la Estación enológica de Almendralejo por un panel de ocho a diez miembros del Comité de Cata de la D.O. Ribera del Guadiana, utilizando la ficha de cata oficial. Esta es una ficha penalizadora y se divide en varios apartados: fase visual, fase olfativa (que incluye aspectos de intensidad y calidad), fase gustativa (en la que se valora intensidad y calidad), y por último armonía. El porcentaje de aceptación (de 50 a 100), recogido en las tablas de resultados, se calculó restándole a 100 la puntuación obtenida en las fichas de cata. Por debajo del 50% los vinos se consideraron descalificados.

Un primer análisis sensorial se realizó a lo largo de la fermentación de los vinos tranquilos para detectar desde el principio posibles anomalías o diferencias entre las levaduras inoculadas con *Saccharomyces* y *Torulaspora* (a los 30 días desde el inicio de fermentación aproximadamente). El análisis definitivo se realizó a los 60 días. El análisis organoléptico de los vinos espumosos se realizó de la misma manera que los

vinos tranquilos a los 9 meses de crianza y posterior degüello, sin considerar la espuma que fue evaluada de manera objetiva con el equipo Mosalux (**Apartado II.15**).

II.11. Técnicas de manipulación de ácidos nucleicos.

II.11.1. Extracción de ácidos nucleicos (DNA genómico, DNA mitocondrial y dsRNA de virus) de levaduras (mini-prep).

Material
<ul style="list-style-type: none"> • Solución I: EDTA 50mM pH 7 • Solución II: Tris-SO₄ 50mM pH 9,3+1% mercaptoetanol • Solución III: NaCl 0,1M, Tris-ClH pH 7,5, EDTA 10mM, SDS 0,2% • Acetato sódico 3M • Isopropanol previamente enfriado a -20°C • Fenol pH 7-8/Tris-ClH pH 8 (fresco) • Etanol 70% • Agua+DEPC y/o TE pH 7
Procedimiento
<ol style="list-style-type: none"> 1. Sembrar directamente de la placa de YEPD o de precultivos de YEPD la cepa de interés en 3 mL de YEPD líquido. Incubar a 30°C con agitación a 200 rpm aproximadamente durante 24-48 horas. 2. Centrifugar 3 minutos a 3500 rpm, descartar sobrenadante. 3. Resuspender con 1 mL de solución I y pasar a viales nuevos de 1,5 mL. Centrifugar 1 minuto a 3500 rpm y descartar sobrenadante. 4. Resuspender con 1 mL de solución II. Incubar 15 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar 1-2 minutos a 3500 rpm y descartar sobrenadante. 5. Resuspender hasta aproximadamente 0,6 mL con la solución III. 6. Añadir 0,5 mL de fenol equilibrado con Tris-Cl pH 8. 7. Agitar durante 30 minutos a temperatura ambiente en balanceador (VWR). 8. Centrifugar 6-10 minutos a 3500 rpm. Tomar la fase acuosa con micropipeta y pasarla a un vial nuevo (0,4-0,5 mL de cada uno). Añadir 1/10 de acetato sódico 3M. 9. Añadir 2×V de isopropanol previamente enfriado a -20°C. Agitar bien. Dejar 30 minutos a -20°C (precipitación). 10. Centrifugar 10 minutos a 14000 rpm. Descartar sobrenadante con la bomba de vacío desde cara del tubo opuesta a la cara de precipitación. 11. Lavar dos veces el precipitado con 1 mL de etanol al 70%. Centrifugar 2 minutos a 14000 rpm. Descartar sobrenadante con la bomba de vacío. Secar el precipitado durante unas horas a temperatura ambiente. 12. Resuspender en 25-30 µL de agua-DEPC o TE.

II.11.2. Extracción de cantidades grandes de ácidos nucleicos de levaduras (midi-prep).

Material
<ul style="list-style-type: none"> • Solución I: EDTA 50mM pH 7 • Solución II: Tris-SO₄ 50mM pH 9,3+1% mercaptoetanol • Solución III: NaCl 0,1M, Tris-ClH pH 7,5, EDTA 10mM, SDS 0,2% • Acetato sódico 3M • Isopropanol previamente enfriado a -20°C • Fenol pH 7-8/Tris-ClH pH 8 (fresco) • Etanol 70% • Agua+DEPC • Microfuga/Centrífuga • Palillos estériles • Tubos falcons de 50 mL estériles • Tubos falcons de 15 mL (polivinilo) estériles • Viales estériles de 1,5 mL
Procedimiento
<ol style="list-style-type: none"> 1. Sembrar directamente de pre-cultivos de YEPD (5 mL) dos matraces de 250 mL de capacidad con 50 mL de YEPD líquido. Incubar a 30°C con agitación a 200 rpm aproximadamente durante 48 horas. 2. Centrifugar 45 mL de sendos cultivos en dos tubos falcons de 50 mL durante 3 minutos a 3500 rpm, descartar sobrenadante. 3. Resuspender con solución I hasta aproximadamente 14 mL y pasar el contenido de cada tubo de 50 mL a dos tubos falcons de 15 mL. Centrifugar 1 minuto a 3500 rpm y descartar sobrenadante. 4. Resuspender en solución II hasta aproximadamente 12 mL. Incubar 15 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar 1-2 minutos a 3500 rpm y descartar sobrenadante. 5. Resuspender hasta aproximadamente 7 mL con la solución III. 6. Añadir 5 mL de fenol equilibrado con Tris-Cl pH 8. 7. Agitar durante 30 minutos a temperatura ambiente en balanceador (VWR). 8. Centrifugar 5 minutos a 3500 rpm. Tomar la fase acuosa de cada tubo con micropipeta y pasarla a dos tubos falcon de 15 mL nuevos (6 mL de cada uno). Añadir 1/10 de acetato sódico 3M. 9. Añadir 0,5×V de isopropanol (aproximadamente hasta 11 mL). Agitar bien. Dejar 30 minutos a -20°C (precipitación). 10. Centrifugar 10 minutos a 3500 rpm. Descartar sobrenadante con micropipeta acoplada a bomba de vacío desde cara del tubo opuesta a la cara de precipitación. 11. Lavar dos veces el precipitado con 10 mL de etanol al 70%. Centrifugar 2 minutos a 3500 rpm. Descartar sobrenadante con la bomba de vacío. Secar el precipitado durante unas horas a 37°C. 12. Resuspender el precipitados de cada dos tubos en 300 µL de agua-DEPC y pasar ambas muestras a un único vial de 1,5 mL. Lavar los dos tubos falcons con 100 µL extra de agua-DEPC y juntar con el resto en el mismo vial (total 700 µL). 13. Añadir 1/10 de acetato sódico 3M. 14. Añadir 0,5×V de isopropanol (aproximadamente hasta 1,1 mL). Incubar a -20°C 10-30 minutos. 15. Lavar dos veces con etanol al 70%. 16. Secar toda la noche a 37°C. 17. Resuspender en 100 µL de agua-DEPC y conservar a -35°C.

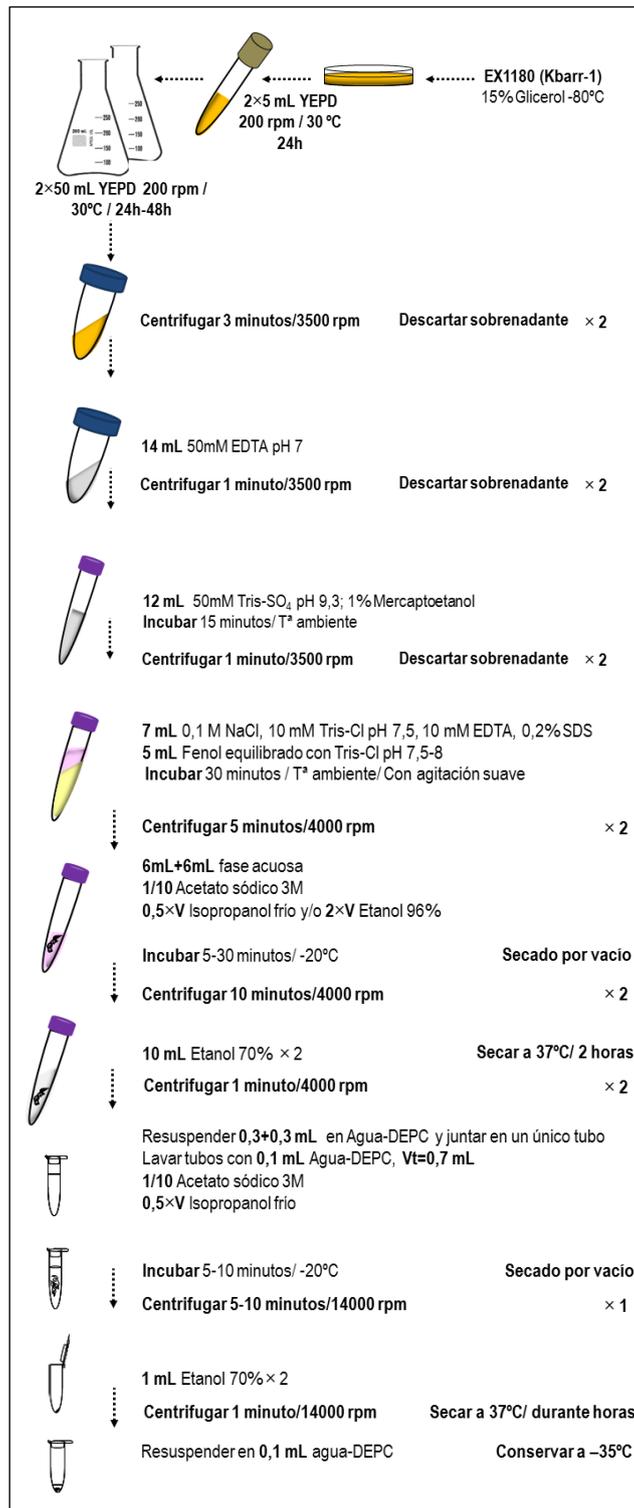


Figura II.12. Esquema de la extracción de cantidades grandes de ácidos nucleicos de levaduras killer Kbarr. Abreviaturas: Tris-SO₄, tris-sulfúrico. Tris-Cl, tris-clorhídrico. SDS, dodecilsulfato sódico. Agua-DEPC, agua esterilizada con dietilpircarbonato al 0,1%. Símbolos: ×2, dos veces; ×1, una vez; 0,5×V, mitad del volumen estimado; 2×V, 2 veces volumen estimado; Vt, volumen total; y, mM, milimolar.

II.11.3. Purificación de dsRNA mediante cromatografía en celulosa CF-11.

Se purificó el conjunto de los dsRNA de las midi-preps con columnas de celulosa como se describe previamente (Rodríguez-Cousiño et al., 2011).

Material
<ul style="list-style-type: none"> • Columnas Poly-Prep® Chromatography colums, 0,8×4 cm, BioRad • Celulosa CF-11 (Whatman) • Tampón TSE 10× • Tampón TSE 1× • Tampón TSE 1×+15% etanol
Procedimiento
<ol style="list-style-type: none"> 1. Hidratar columna (Poly-Prep® Chromatography colums, 0,8×4 cm, BioRad) vacía con agua-DEPC. 2. Preparar columna de CF-11 de celulosa (suspensión en agua-DEPC y esterilizada en autoclave). 3. Equilibrar columna con 5-10 mL de tampón TSE 1×+15% etanol. 4. Añadir muestra (filtrar hasta 500 µL de midi-preps), en 0,133 volumen de TSE 10× y 0,2 volumen de etanol. 5. Lavar columna con 20 mL TSE 1×+15% etanol. 6. Eluir el dsRNA retenido con TSE 1× (sin etanol) y recoger fracciones (F1-F8 de 0,4 mL). 7. Precipitar 40 µL de F1-F8 (Apartado II.11.1). 8. Comprobar bandas de dsRNA en electroforesis agarosa 1%. 9. Recoger las fracciones apropiadas (normalmente F2-F5) y precipitar.

II.11.4. Electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa y visualización.

La separación electroforética de los diferentes de ácidos nucleicos se realizó en gel de agarosa de baja EEO y concentración variable entre el 0,7 y 1,5% en función del tamaño de los fragmentos a separar. De manera rutinaria se utilizó una concentración de 0,7%, que se aumentó para conseguir una óptima separación de fragmentos de menor peso molecular. Cuando se pretendía recuperar los dsRNAs para purificación, la agarosa utilizada fue de bajo punto de fusión (Pronadisa) al 1,2%.

Los geles se prepararon fundiendo la agarosa en el tampón TAE en horno microondas, se dejó enfriar unos minutos, se le añadía bromuro de etidio (MERCK, 5µL/100mL), y se dejó gelificar a temperatura ambiente al menos una hora. Antes de cargar cada muestra (20 µL máximo) se añadió 14 µL de tampón de carga a 6 µL de mini-preps. Para análisis de fragmentos de restricción de mtDNA se añadía 2 µL de tampón de carga 10× a 18 µL de la mezcla de restricción. En las purificaciones de dsRNA (volumen final 1200 µL o 600 µL dependiendo del tamaño del gel), en un solo pocillo para todo el gel, se añadía una mezcla de 200 µL o 100 µL de midi-prep, 880 µL o 440 µL de agua-DEPC, y 120 µL o 60 µL de tampón de carga 10×.

En cada gel se cargó un patrón con bandas de peso molecular conocido (1 Kb de Biotools/500 pb de BioRad Laboratories S.A). Este patrón permite determinar el tamaño de los fragmentos de DNA o dsRNA.

Las electroforesis rutinarias y las destinadas a purificación de dsRNA con un volumen de 1200 μL , se realizaron en una cubeta horizontal (*modelo Owl Scientific*), y en las destinadas a purificaciones de dsRNA con un volumen final de 600 μL se realizaron en una cubeta horizontal de menor tamaño (*modelo Owl Scientific*). Se utilizaron peines de 2 mm de grosor de 20 pocillos. El gel se sumergía en el mismo tampón TAE 1 \times que se había empleado en su preparación y se le aplicaba un voltaje constante de entre 80-100 V (60 minutos aproximadamente). Cuando se deseaba purificar las bandas de dsRNA las condiciones fueron 30V-15m \AA (aproximadamente 5 horas). Una vez finalizada la electroforesis, los fragmentos de DNA/dsRNA se visualizaban en un transiluminador de luz UV (Gel Doc 2000, Bio-Rad) conectado a un equipo informático con el software *QuantityOne* (Bio-Rad).

II.11.5. Naturaleza de los ácidos nucleicos de las partículas TdV-M-barr.

Para determinar el tipo de ácido nucleico de los virus se realizaron dos experimentos con dos nucleasas distintas, una para degradar DNA y otra para RNA.

Para degradar DNA, las mini-preps se trataron con DNAsaI (libre de RNAsa) (Fermentas Life Sciences) siguiendo las instrucciones de la casa comercial: a 1 μL de la muestra se añadió a una mezcla de 7 μL de agua tratada con DEPC, 1 μL de tampón del enzima con MgCl_2 10 \times , y 1 μL de enzima de 1 U/ μL . La mezcla de reacción se incubó 30 minutos a 37°C. La reacción se paró con la adición de 1 μL de EDTA 25mM e incubando 10 minutos a 65°C.

Para degradar RNA se utilizó la metodología descrita previamente (Vodkin and Fink, 1973). Se trató 10 μL de mini-prep con RNAsa A (Sigma-Aldrich) a concentración final de 10 ng/ μL , en presencia o ausencia de 0,5M NaCl. La reacción se dejó 1 minuto a temperatura ambiente y se paró desnaturalizando el enzima con fenol (equilibrado con Tris-HCl pH 8) y precipitando los ácidos nucleicos con isopropanol como se describe en **Apartado II.11.2.**

Finalmente se comprueba si el ácido nucleico de los nuevos virus es realmente dsRNA, si al tratar con DNAsa I desaparece el DNA mitocondrial pero permanece el RNA del virus, y si la RNAsa A digiere parcialmente los dsRNA en presencia de 0,5M de NaCl con la aparición de otras bandas de menor tamaño, debido a que la presencia de estas concentraciones de sal protegen parcialmente al dsRNA de la digestión total por RNAsa A, no al ssRNA que desaparece totalmente. En ausencia de 0,5M NaCl la RNAsa A digiere totalmente todos los RNAs.

II.11.6. Purificación de dsRNA víricos a partir de geles de agarosa.

Tras la separación de los dsRNA en gel de agarosa al 1,2% de bajo punto de fusión (Pronadisa), las bandas de interés se cortaron con un cúter estéril y se purificaron con dos métodos alternativos: un método convencional con un kit comercial (RNaid® Kit, Q-Biogene) que es muy caro y solo permite usar cantidades limitadas de fragmentos de agarosa (Método 1); y un método alternativo con jeringa y papel de filtro, basado en un método previo para aislamiento de DNA a partir de geles de agarosa (Grey and Brendel, 1992), más barato y rápido, y escalado convenientemente para usar cantidades mayores de fragmentos de agarosa (Método 2).

II.11.6.1. Purificación de dsRNA con Kit RNaid®Kit (Método 1).

Procedimiento
<ol style="list-style-type: none"> 1. Electroforesis 1,2% agarosa de bajo punto de fusión para separar las bandas de dsRNA. 2. Cortar la banda de interés y colocarla en un tubo polivinilo de 15 mL. Congelar a -20°C hasta uso. 3. Descongelar muestra y determinar el volumen aproximado por su peso (1 mg=1µL) 4. Añadir 3 veces de RNA Binding Salt (Ej. 0,1g de gel añadir 0,3 mL de RNA Binding Salt). Mezclar y dejar 10 minutos a temperatura ambiente. 5. Añadir 1µL de RNAMATRIX® por cada µg de RNA estimado (estimamos para 20µg=20µL de RNAMATRIX®/tubo). Mezclar bien durante 5 minutos a temperatura ambiente. 6. Centrifugar durante 5 minutos a 4000 rpm. Descartar sobrenadante y guardar para una segunda recuperación con RNAMATRIX®. 7. Añadir 500 µL de RNA Wash solution en cada tubo, resuspender con la pipeta. 8. Centrifugar durante 5 minutos a 4000 rpm. Descartar sobrenadante. Repetir paso anterior 1 o 2 veces. 9. Resuspender el precipitado en 40µL/80µL de agua-DEPC (10-20µL/5µL RNAMatrix). Mezclar bien pipeteando e incubar a 50°C durante 5 minutos. 10. Centrifugar durante 2 minutos a 14000 rpm. Recoger sobrenadante y guardar precipitado (ver paso 12). 11. Repetir el paso 9 para recuperar de 5-15% de RNA y congelar a -20°C. 12. Repetir del paso 6-11 lavando el precipitado con 1 mL del sobrenadante del paso 6 recogiendo todas las bolas de RNAMATRIX® para recuperar todo el RNA residual que pudiera quedar en ellas. Finalmente resuspender en las mismas cantidades y congelar a -20°C hasta su uso.

II.11.6.2. Purificación de dsRNA con jeringa y papel de filtro (Método 2).

Material
<ul style="list-style-type: none">• Acetato sódico 3M• Isopropanol previamente enfriado a -20°C• Etanol 70%• Agua+DEPC y/o TE pH 7• Microfuga/Centrífuga• Jeringa de 10 mL estéril• Pinzas estériles• Filtros estériles• Tubos falcons de 50 mL estériles• Tubos falcons de 15 mL (polivinilo) estériles• Viales estériles de 1,5 mL
Procedimiento
<ol style="list-style-type: none">1. Electroforesis 1,2% agarosa de bajo punto de fusión.2. Cortar la banda de interés y colocarla en un tubo polivinilo de 15 mL. Congelar a -20°C hasta su uso.3. Descongelar muestra y pesar contrapesos.4. Romper el gel con agitación vigorosa manual en vertical y vortex adicional.5. Centrifugar durante 3 minutos a 4000 rpm. Estimar volumen recuperado (ej. 1 mL), no sobrepasar nunca de 3 mL/tubo.6. Adicionar 1×V (ej. 1mL) de agua-DEPC, sonicar durante 3 minutos.7. Congelar la muestra a -35°C durante 15 minutos y volver a sonicar durante 5 minutos más.8. Colocar con una pinza estéril 2 filtros estériles dentro de una jeringa de 10 mL y añadir 40 µL agua-DEPC para empapar los filtros.9. Echar toda la agarosa dentro de la jeringa y dejar que vaya eluyendo el líquido en viales de 1,5-2 mL aproximadamente 0,9 mL en cada tubo, usar varios tubos.10. Lavar los tubos de polivinilo con 1 mL de agua-DEPC pasando de un tubo a otro y echar en la jeringa. Repetir dos veces este último paso para recuperar el máximo de muestra. <i>*Opcional:</i> centrifugar la jeringa a 2500 rpm durante 10 minutos para recuperar líquido residual; y, comprobar la intensidad de ácido nucleicos con BrEt de los tubos de 1,5 mL y jeringa mediante foto en documentador de geles (Fig. II.15)11. Recoger todo el volumen aproximadamente 5 mL (ej. 5 tubos de 1,5 mL con 0,9 mL cada uno). Adicionar 1/10 de acetato de sodio 3M y 0,5×V de isopropanol.12. Congelar durante 30 minutos a -35°C y centrifugar 10 minutos a 14000 rpm.13. Descartar sobrenadante con bomba de vacío y lavar 2 veces con etanol al 70%.14. Secar precipitado a 37°C durante horas.15. Resuspender en 100 µL de agua-DEPC. Congelar a -20°C hasta uso.16. Cuantificar rendimientos en electroforesis 1,2% agarosa, incluyendo midi-preps original sin purificar (1-2 µL) y patrón de pesos moleculares (3 µL).

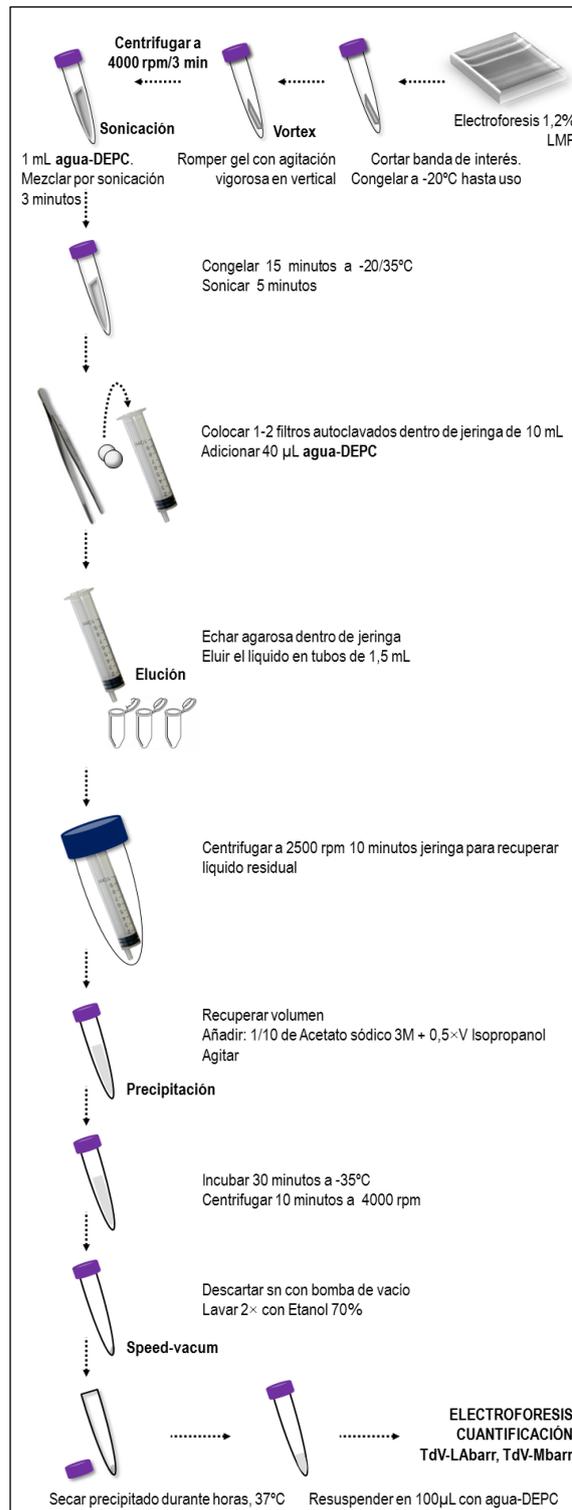


Figura II.14. Esquema de la purificación de dsRNA con jeringa y papel de filtro a partir de trozos de gel agarosa después de electroforesis en gel (1,2% de agarosa de bajo punto de fusión). Abreviaturas: LMP, low melting point. Agua-DEPC, agua esterilizada con dietilpirocarbonato al 0,1%. Símbolos: 0,5×V, mitad del volumen estimado, sn, sobrenadante, y 2×V, 2 veces volumen estimado.

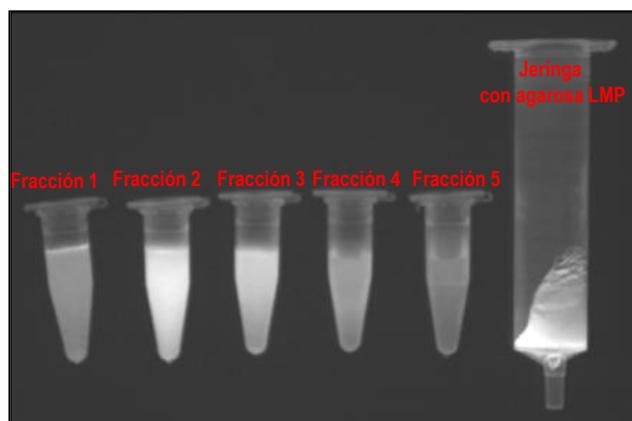


Figura II.15. Detalle de los 5 viales con 0,9 mL eluidos con agua-DEPC y jeringa con agarosa de bajo punto de fusión (derecha) para comprobar la presencia de ácidos nucleicos. Se muestra foto en transiluminador de luz UV (Gel Doc 2000, Bio-Rad) de material teñido con bromuro de etidio (5µL/100mL).

II.11.7. Restricción del DNA mitocondrial.

Para analizar los patrones de restricción de mtDNA se digirió una muestra de mini-prep con la enzima de restricción *RsaI* (Roche) (corte dirección 5'→3' en GT*AC y 3'→5' en CA*TG) o con *Hinf I* (Roche) (corte dirección 5'→3' en G*ANTC y 3'→5' en CTNA*G) con el siguiente protocolo:

Procedimiento

1. Mezcla de reacción:

- 5 µL mini-preps DNA genómico
- 1,8 µL de tampón de restricción 10×
- 0,2 µL de RNAsa A
- 1 µL de enzima de restricción (5 U/µL)
- Agua destilada estéril hasta un volumen de 20 µL

2. Incubar durante 12 horas a 37°C en estufa y/o baño.

3. Centrifugar en microfuga durante 10 segundos.

4. Electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa y visualización (**Apartado II.11.4**).

II.11.8. Amplificación y restricción con endonucleasas de los espaciadores internos de genes ribosomales ITS.

La secuencia de los espaciadores internos del gen ribosomal 5.8S se amplificó en primer lugar mediante PCR utilizando como cebadores los primers ITS1 e ITS4 (**Apartado II.5.1**) en las siguientes condiciones (Esteve-Zarzoso et al., 1999a):

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	5 min	1×
Desnaturalización	94°C	1 min	
Hibridación	55,5°C	2 min	35×
Elongación	72°C	2 min	
Elongación final	72°C	10 min	1×
Pausa	4°C	pausa	-

Los productos de PCR (10 μ L, aproximadamente 0,5-1 μ g) se sometieron posteriormente a restricción *CfoI*, *HaeIII* o *Hinfi*. Los tamaños de los fragmentos obtenidos se analizaron mediante electroforesis en gel (1,5% agarosa, TAE 1 \times). Los tamaños obtenidos se compararon con los de especies de levaduras *Torulaspota* ya descritas para averiguar la especie de las nuevas levaduras.

II.11.9. Amplificación del gen del DNA ribosomal 18S.

Se realizó a partir de mini-preps (**Apartado II.11.1**) con el kit de bolas pReTaqReady-To-Go PCR (Amersham Biosciences) al que sólo hay que añadirle agua, la muestra de ácidos nucleicos, y los cebadores EukA y EukB (Díez et al., 2001; Medlin et al., 1988). Se programó el siguiente protocolo en termociclador (TGradient, Biometra):

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	2 min	1 \times
Desnaturalización	95°C	15 seg	
Hibridación	55°C	15 seg	35 \times
Elongación	72°C	2 min	
Elongación final	72°C	10 min	1 \times
Pausa	4°C	pausa	-

El producto de amplificación se purificó con el kit JetQuickPCR purification Spin Kit (Genomed, Lohne, Germany) siguiendo las recomendaciones del fabricante y fue enviado al servicio de secuenciación Secugen S.L., Madrid (España). Las secuencias del gen fueron revisadas con el software Chromas v. 1.45 (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>). Se utilizó el algoritmo de búsqueda BLAST (Altschul et al., 1990) para obtener los índices de similitud en la base de datos de DNA del Genbank, disponible online en el NCBI (National Centre for Biotechnology Information, <http://ncbi.nlm.nih.gov>). Las secuencias con más de un 99% (>99%) de similitud se incluyeron dentro de la misma especie.

II.11.10. Preparación y secuenciación de librerías de cDNA a partir de dsRNA vírico purificado.

Las librerías de TdV-LAbarr y TdV-LBCbarr (banda purificada de 4,6 kb) se prepararon con el kit “TruSeq RNA Sample Preparation” (Illumina), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron 200 ng de dsRNA purificado (cuantificado por Picogreen). El protocolo comenzó con la etapa de fragmentación, omitiendo la purificación que se realizó previamente (**Apartado II.11.6**). Para facilitar la

desnaturalización del dsRNA se añadió DMSO al 15% antes de la incubación a 94°C durante 8 minutos. Después de la etapa de desnaturalización, se sintetizó la primera cadena de cDNA utilizando random primers y la enzima retrotranscriptasa SuperScriptIII. A continuación, se realizó la síntesis de la segunda cadena de cDNA, la reparación de los extremos, la adenilación de los extremos 3' y el ligamiento de los adaptadores TruSeq. Estos oligonucleótidos adaptadores incluyen señales específicas para su posterior amplificación y secuenciación, y secuencias cortas referidas como “índices” que permitieron la multiplexación en la carrera de secuenciación. Se realizó una PCR adicional para amplificar la librería, asegurando que todas las moléculas incluyeran los adaptadores deseados en ambos extremos. Se realizaron 12 ciclos de PCR y se verificaron con un Bioanalyzer 2100.

Las librerías de TdV-Mbarr-1 (banda purificada de 1,7 kb) se prepararon siguiendo el mismo protocolo modificado con la adición de oligo dTVN + oligo dABN (*Isogen Life Science*) junto con random primers durante la síntesis de la primera cadena de cDNA para mejorar la retrotranscripción del posible poli A central de estos virus que ya ha sido descrito para todos los virus M de levaduras secuenciados (Rodríguez-Cousiño et al., 2011).

Las librerías se desnaturalizaron antes de ser inoculadas en una célula de flujo, donde se formaron los clusters y se secuenciaron utilizando una carrera de secuenciación con paired-end 2×150 para (TdV-LAbarr y TdV-LBCbarr) o 2×80 para (TdV-Mbarr-1) utilizando el sistema MiSeq de Illumina.

II.11.11. Ensamblaje de la secuencia de dsRNA.

Las secuencias de cDNA obtenidas se analizaron y ensamblaron en la empresa Biotechvana SL (Benjamin Franklin Nº 12, módulo 19, el Parque Tecnológico de Valencia, 46980-Paterna, Valencia, España). No hubo problemas para obtener la secuencia completa de TdV-LAbarr o TdV-LBCbarr porque ya disponíamos de secuencias homólogas de alta identidad (ScV-LA o ScV-LBC) que se utilizaron como referencia para la secuencia de ensamblaje. Para TdV-Mbarr-1 no existía una secuencia homóloga de referencia por lo que su secuencia completa se construyó utilizando la siguiente estrategia. En primer lugar se utilizó el software *SOAP deNOVO2* (Luo et al., 2012) para obtener un ensamblaje *de novo* basado en dos librerías de Illumina probando múltiples estrategias de ensamblaje con scaffolding y tamaño de inserto de 200 pero variando el valor Kmer (siendo el Kmer de 47 el más efectivo para obtener el mínimo

número de indeterminaciones “Ns”). Con este ensamblaje K47 se obtuvieron varios contigs y scaffolds, pero ninguno de ellos mostró las características típicas esperadas en los virus M, como el motivo 5´GAAAA o el poli A central. La muestra se filtró eliminando los contigs menores de 300 nucleótidos del archivo y los contigs restantes se utilizaron como input en la base de datos NR NCBI utilizando el protocolo de búsqueda BLASTX (Altschul et al., 1997) mejorado con el software GPRO 1.1 (Futami et al., 2011). Los resultados BLASTX no indicaron similitud de nuestra secuencia con ninguna descrita previamente; pero si se encontró similitud significativa de varios contigs/scaffolds con varias secuencias virales conocidas (LA, LBC y otros) o con otros transcritos de la levadura operadora de estos virus. Estas secuencias, supuestamente contaminantes, también fueron filtradas en el ensamblaje. Asumiendo, que la secuencia de Mbarr-1 puede resultar fragmentada durante el ensamblaje debido a la baja complejidad de la secuencia central de la molécula correspondiente al poli A se utilizó un procedimiento manual para realizar el ensamblaje tal como se indica a continuación. Se utilizó el software *Bowtie2* (Langmead et al., 2009) y dos scripts seleccionados *ad hoc* para filtrar todas las lecturas originales correspondiente a las secuencias contaminantes mapeando las dos librerías Illumina contra estas secuencias contaminantes. Posteriormente, se hizo una búsqueda manual en la nueva librería Illumina limpiada para una nueva lectura que incluyera una parte central importante del poli A o su complementario poli T, para construir manualmente contigs basados en al menos 10 lecturas que contuvieran el poli A. Curiosamente, sólo uno pasó estos filtros, se alargó manualmente alineando otras secuencias que hacían contigs con sus extremos 5´ y 3´. De esta manera se construyó un contig de 300 nucleótidos con una parte central de 78 residuos de adeninas con sus extremos 5´ y 3´ bien definidos. Posteriormente, se buscó en el ensamblaje K47 secuencias complementarias de estos extremos 5´ y 3´ del contig del poli A con al menos 100 nucleótidos, se identificaron 2 contigs del ensamblaje de K47 que se usaron para resolver un contig con prácticamente toda la secuencia de TdV-Mbarr-1, de unos 1500 nucleótidos. Esta secuencia también se alargó todo lo posible seleccionando otras lecturas de las librerías Illuminas ya limpias haciendo contigs con los extremos 5´ y 3´ de la secuencia reconstruida. Se obtuvo una secuencia final de 1705 nucleótidos con la secuencias 5´GAAAAAA y la arquitectura típica del genoma de los virus M. Por último, se usó *Bowtie2* para mapear las librerías Illumina limpias sobre el contig final reconstruido para obtener una secuencia consenso de TdV-Mbarr-1. La navegación visual de la bam-

file con el IGV (Thorvaldsdóttir et al., 2012) mostró cobertura total de la secuencia completa validando la metodología aplicada para reconstruir la secuencia completa del virus.

II.12. Determinación de polisacáridos.

II.12.1. Polisacáridos (azúcares) totales.

Se utilizó el método del fenol-ácido sulfúrico que determina todos los azúcares: reductores, no reductores, sustituidos o polímeros, y se fundamenta en que los carbohidratos son particularmente sensibles a ácidos fuertes y altas temperaturas (Dubois et al., 1956). Bajo estas condiciones una serie de reacciones complejas toman lugar empezando con una deshidratación simple, si se continúa el calentamiento y la catálisis ácida se producen varios derivados del furano que condensan consigo mismos y con otros subproductos para producir compuestos coloreados producto de la condensación de compuestos fenólicos y heterociclos con el nitrógeno como heteroátomo. La condensación más común es con fenol.

Todos los azúcares como oligosacáridos y polisacáridos pueden ser determinados, recordando que éstos bajo hidrólisis ácida producen monosacáridos. La forma en que procede la reacción no es estequiométrica y depende de la estructura del azúcar. Hemos tomado como referencia una recta patrón construida con distintas concentraciones de manosa (entre 0-50 µg de manosa).

Soluciones
<ul style="list-style-type: none"> • Fenol al 4% (Merck) • Ácido sulfúrico 96% (Panreac)
Procedimiento
<ul style="list-style-type: none"> - Añadir hasta 0,1 mL de muestra a un tubo de vidrio (Pyrex). - Añadir 0,4 mL de la solución de fenol al 4% y agitar en vortex. - Añadir 2 mL de ácido sulfúrico al 96% y agitar de nuevo. - Incubar 30 minutos a 30°C en estufa. - Medir absorbancia a 490 nm en espectrofotómetro (Genesys).

II.12.2. Manano de la pared celular de levaduras.

El contenido de manoproteínas se determinó con un método desarrollado previamente (Quirós et al., 2012) modificado, que implica el aislamiento de polisacáridos del vino por cromatografía de exclusión por tamaño con columnas Econo-Pac® 10 DG de 30×10 mm, seguida de una hidrólisis ácida de los polisacáridos solubles en ácido sulfúrico 1M, y análisis de los monosacáridos por cromatografía iónica-HPLC. La cantidad de manosa es proporcional a la cantidad de manano en la muestra.

Material
<ul style="list-style-type: none"> • Muestra de vino • Agua MilliQ • Etanol 25% • Ácido sulfúrico 1M • Microfuga/Centrífuga • Tubos falcons de 15 mL (polivinilo) estériles • Criotubos de 2 mL • Centrífuga (Centrivap concentrator) • Liofilizador (Cryodos, Telstar)
Procedimiento
<p>1. Preparación de la fracción macromolecular:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Congelar y descongelar la muestra de vino hasta que desaparezca el precipitado (3-4 veces). - Pasar 3 mL de muestra a través de la columna 30×10 mm EconoPac 10DG, recoger 3 mL (fracción F1). - Pasar 4 mL de agua MilliQ, recoger 4 mL (fracción F2). - Lavar con 12 mL de agua MilliQ. - Pasar 3 mL de F2, recoger 3 mL (fracción F3). - Pasar 4 mL de agua MilliQ, recoger 4 mL (fracción F4). Reservar y/o congelar F2 y F4 a -20°C para posterior cuantificación de carbohidrato. - Lavar columna con 20 mL de agua MilliQ para eliminar restos de azúcares. - Determinación de carbohidratos (polisacáridos totales) de F2 y F4 utilizando el método del fenol-sulfúrico. <p>2. Hidrólisis ácida de F4:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Preparar 2 alícuotas de 1,9 mL de F4 en criotubos de 2 mL. - Concentrar las muestras (sin tapón de rosca) en centrífuga acoplado a liofilizador durante 4-6 horas. - Resuspender en 0,1 mL de H₂SO₄ 1M, incubar (con tapón de rosca) en horno a 100°C durante 4 horas. - Centrifugar brevemente los tubos en microfuga. - Añadir 0,9 mL de agua MilliQ.

Las muestras hidrolizadas se enviaron al Servicio de Análisis Elemental y Molecular (UEx), se diluyeron 1:40, se filtraron a través de filtros de nylon de un tamaño de poro de 0,22 µm, y se analizaron por duplicado en un cromatógrafo iónico *Metrohm 881 Compact IC PRO* con detección amperométrica. Se utilizó una columna *Metrosep Carb1 ISO/4.0*, NaOH 8mM como fase móvil y un gradiente con NaOH 25mM y acetato de sodio 0,5mM a un flujo de 1 mL/min a temperatura de columna de 30°C para eluir los distintos azúcares. Las concentraciones de cada azúcar fueron calculadas según rectas de calibrado realizadas previamente.

II.13. Determinación de proteínas.

La concentración de proteínas se determinó con el método Bradford (Bradford, 1976), modificado por (Cilindre et al., 2010) por su alta sensibilidad, rapidez y reproducibilidad. Este método se basa en la capacidad del colorante Azul brillante de Coomassie G-250 para unirse a los residuos aromáticos y la arginina de las proteínas, hecho que promueve un cambio en la absorción del colorante de 465 nm a 595 nm. Dado que la intensidad de la señal es proporcional a la cantidad de proteínas, se puede valorar esta última midiendo la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro. Se

utilizó una curva patrón de concentraciones conocidas de seroalbúmina bovina (BSA, Sigma-Aldrich). Todas las medidas se realizaron por cuadruplicado, tomando como valor final la media de las cuatro lecturas. Con carácter previo a la determinación de proteínas, las muestras de mosto/vino se ultrafiltraron (membranas de 10 kDa MWCO, Amicon) durante una hora a baja velocidad (3000×g), con objetivo de eliminar grupos de moléculas aditivas como la bentonita o de compuestos fenólicos procedentes de la uva, potencialmente reactivos con el colorante Azul de Coomassie, y que podrían interferir en la medida de proteínas. La determinación del contenido de proteínas del mosto/vino fue la estimación de la medida directa de proteína (mg/L) menos la estimación del ultrafiltrado (Marchal et al., 1997).

Material
<ul style="list-style-type: none"> • Solución Bradford: Azul de Coomassie G-250 0,01%, etanol al 4,7% y H₃PO₄ al 8,5% • Espectrofotómetro (Genesys) y cubetas desechables • Ultrafiltrado con 10 kDa MWCO
Procedimiento
<ul style="list-style-type: none"> - Mezclar (por cuadruplicado): 0,4 mL de agua destilada+0,4 mL de muestra de vino+0,2 mL de solución Bradford. - Medir absorbancia a 595 nm en espectrofotómetro (Genesys). - Calcular concentración de proteínas en mg/L (medida directa de proteína total (mg/L) menos ultrafiltrado con 10 kDa MWCO (mg/L)).

II.14. Determinación de compuestos volátiles del vino.

En este grupo se incluyen Σ ésteres etílicos, Σ ésteres de acetato, Σ ácidos, Σ alcoholes, Σ monoterpenos, Σ furanos+fenoles volátiles, Σ lactonas, Σ norisoprenoides, Σ compuestos carbonílicos y Σ otros compuestos (**Tabla II.7**). El análisis de las muestras se realizó mediante cromatografía de gases con detector de masas, utilizando un método basado en la extracción y concentración de los aromas minoritarios con cartuchos de extracción en fase sólida (García-Carpintero et al., 2011).

Para la determinación de los aromas minoritarios, 100 mL de muestra, a las que se agregó 2-octanol como patrón interno, se pasaron a través de un cartucho de polipropileno-divenilbenceno (ISOLUTE ENV+ 0.5 g de fase) a un flujo aproximado de 1 mL/min. Posteriormente se pasaron a través del cartucho 50 mL de agua desionizada para eliminar azúcares y otros compuestos polares de bajo peso molecular. Los compuestos objeto de estudio se eluyeron con 10 mL de diclorometano. Dicho extracto se enfrió a -20°C para así eliminar posibles restos de agua de la fase orgánica. La fase orgánica obtenida se concentró a 200 μ L bajo corriente de nitrógeno.

Las muestras se analizaron con un cromatógrafo Agilent modelo 6890 N acoplado a un detector de masas modelo 5973, dotado de programador de temperatura y muestreador automático. Se utilizó una columna capilar de DB WAXETR (60 m × 0,25 mm i.d; 0,25 mm de espesor de película). Se usó helio como gas portador (1 mL/min). El programa de temperatura utilizado y condiciones fueron: programa de temperatura del horno 70°C (durante 5 minutos) rampa a 1°C/min hasta 95°C (durante 10 minutos) y posteriormente rampa a 2°C/min hasta 200 °C (durante 40 minutos); temperatura inyector y detector a 250 y 280°C, respectivamente. El detector de impacto electrónico (EI) a 70 eV se utilizó el modo scan (1 scan/s) en el rango de 20 a 450 m/z. La temperatura de la fuente fue de 178 °C. Se inyectó 1 µL de muestra en modo splitless.

Las áreas de respuesta relativa de cada compuesto volátil fueron calculadas e interpoladas con su correspondiente gráfica de calibración. Para aquellos compuestos cuyo estándar no estaba disponible, la identificación se llevó a cabo por comparación espectral de la librería Wiley A y la cuantificación de estos aromas se realizó asumiendo un factor de respuesta igual a 1.

Tabla II.7. Relación de los compuestos volátiles analizados, CAS, tiempo de retención y procedencia.

Compuesto	CAS**	TR***	Procedencia
Acetato de etilo	141-78-6	7,6	Sigma-Aldrich
Propionato de etilo	105-37-3	8,9	Sigma-Aldrich
Isobutirato de etilo	97-62-1	9,1	Sigma-Aldrich
Acetato de isobutilo	110-19-0	10,79	Alfa Aesar
Butanoato de etilo	105-54-4	11,8	Alfa Aesar
2-metilbutanoato de etilo	7452-79-1	12,58	Sigma-Aldrich
Isovalerato de etilo	108-64-5	13,4	Alfa Aesar
Isobutanol	78-83-1	14,5	Sigma-Aldrich
Acetato de isopentilo	123-92-2	16,6	Alfa Aesar
1-butanol	71-36-31	18,2	Sigma-Aldrich
Alcohol isoamílico	123-51-3	23,1	Sigma-Aldrich
Hexanoato de etilo	123-66-0	25,2	Sigma-Aldrich
1-pentanol	71-41-0	27	Alfa Aesar
Acetato de hexilo	142-92-7	29,3	Sigma-Aldrich
Acetoína	513-86-0	31,8	Sigma-Aldrich
3-metil-1-pentanol	589-35-5	35,2	Sigma-Aldrich
Lactato de etilo	97-64-3	38,1	Sigma-Aldrich
1-hexanol	111-27-31	38,6	Alfa Aesar
3-hexen-1-ol	928-96-1	40,5	Alfa Aesar
3-etoxipropan-1-ol	111-35-3	42,5	Sigma-Aldrich
Cis-3-hexenol	928-96-1	43,5	Alfa Aesar
1,3 ditertbutilbenceno	1014-60-4	47,6	Sigma-Aldrich
Octanoato de etilo	106-32-1	48,5	Sigma-Aldrich
Furfural	98-01-1	53,5	Sigma-Aldrich
N-pentadecano	629-62-9	53,5	Alfa Aesar
3-hidroxibutanoato de etilo	5405-41-4	58	Sigma-Aldrich
Blackberry tiofenona	13679-85-1	59,4	Sigma-Aldrich
Linalool	78-70-6	59,8	Sigma-Aldrich

Tabla II.7 (Continuación). Relación de los compuestos volátiles analizados, CAS, tiempo de retención y procedencia.

Compuesto	CAS**	TR***	Procedencia
2-hidroxi hexanoato de etilo	52089-55-1	59,9	Sigma-Aldrich
1-octanol	111-87-5	60,8	Alfa Aesar
Lactato de isoamilo	19329-89-6	62,1	Tokio Chemical Industry (TCI)
Ácido isobutírico	79-31-2	63,1	SuperCo Analytical
Decanoato de etilo	110-38-3	66,4	Sigma-Aldrich
Ácido butanoico	107-92-6	67,6	Sigma-Aldrich
2-furoato de etilo	614-99-3	66,7	Sigma-Aldrich
Gamma-butirolactona	96-48-0	68	Sigma-Aldrich
Fenilacetaldehído	122-78-1	68,6	Alfa Aesar
Succinato de dietilo	123-25-1	69,8	Alfa Aesar
Ácido isovalérico	503-74-2	70,4	Alfa Aesar
9-decenoato de etilo*	67233-91-4	70,7	-
Terpineol	98-55-5	71,27	Alfa Aesar
Gamma-hexalactona	695-06-7	72,44	Sigma-Aldrich
Metionol	505-10-2	73,1	Sigma-Aldrich
Etoxi-gamma-butirolactona*	932-85-4	74,3	-
4-hidroxibutanoato de etilo	999-10-0	78,3	Ald lab Chemicals
Acetato de 2-feniletilo	103-45-7	79,1	Sigma-Aldrich
β -damascenona	23726-93-4	79,32	Sigma-Aldrich
Laurato de etilo	106-33-2	80	Sigma-Aldrich
Geraniol	106-24-1	80,3	Alfa Aesar
Ácido hexanoico	142-62-1	81,1	Alfa Aesar
N-3-metilbutil acetamida	13434-12-3	81,7	FluoroChem
Alcohol bencílico	100-51-6	83	Sigma-Aldrich
Whisky lactona	39212-23-2	83,53	Sigma-Aldrich
2-fenil etanol	60-12-8	85	Alfa Aesar
Ácido trans-2-hexenoico	13419-69-7	87,9	Alfa Aesar
4-hidroxi-2,5-dimethyl-3(2H)-furanona	3658-77-3	90,98	Merck
Gamma-nonanoic lactona	104-61-0	91,2	Sigma-Aldrich
Malato de dietilo	7554-12-3	91,5	Sigma-Aldrich
Ácido octanoico	124-07-2	92,3	Sigma-Aldrich
Solerone	29393-32-6	93,25	Sigma-Aldrich
2-hidroxiglutarato de dietilo*	69134-53-8	98	-
Gamma-decalactona	706-14-9	98,24	Alfa Aesar
Soloton	28664-35-9	100,58	Sigma-Aldrich
Delta-decalactona	705-86-2	100,6	Sigma-Aldrich
4-vinilguaiacol	7786-61-0	101	Sigma-Aldrich
Palmitato de etilo	628-97-7	103	Sigma-Aldrich
4-etoxicarbonil-gamma-butanolactona	33019-03-3	103,9	Sigma-Aldrich
Ácido decanoico	334-48-5	105,2	Sigma-Aldrich
2-hidroxi-3-fenilpropanoato de etilo*	15399-05-0	106,7	-
2,4-bis-tertbutilfenol	96-76-4	108,2	Sigma-Aldrich
Ácido 9-decenoico	14436-32-9	110,6	Sigma-Aldrich
Gamma-dodecalactona	706-14-9	114,94	Sigma-Aldrich
Succinato de etilo	1070-34-4	116,6	Alfa Aesar
4-vinilphenol	2628-17-3	117,9	Sigma-Aldrich
Ácido laurico	143-07-7	127	Alfa Aesar

(*) No se encontró proveedor, cuantificación considerando como factor de respuesta 1.

(**) Número de registro CAS (Chemical Abstracts Service).

(***) Tiempo de retención en una columna capilar de DB WAXETR.

Tabla II.8. Relación de los compuestos volátiles para los que se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las cantidades presentes en los vinos blancos y tintos inoculados con *Saccharomyces* o *Torulasporea*, descriptor, serie, OPT y referencia.

Compuesto	Descriptor	Serie	OPT (mg/L)	Referencia
Propionato de etilo	Plátano, manzana	Frutal	0,01	(Pino and Queris, 2011)
Isobutirato de etilo	Fruta, cítrico	Frutal	0,015	(Ferreira et al., 2000)
Acetato de isobutilo	Manzana, plátano	Frutal	1,6	(Muñoz et al., 2008)
Butanoato de etilo	Uva, piel de manzana	Frutal	0,02	(Ferreira et al., 2000)
Isovalerato de etilo	Manzana verde, piña verde	Frutal	0,003	(Ferreira et al., 2000)
Acetato de isopentilo	Plátano, fruta	Frutal	0,03	(Guth, 1997)
Hexanoato de etilo	Plátano, manzana verde	Frutal	0,005	(Guth, 1997)
Acetato de hexilo	Verde, floral	Frutal	1,5	(Ferreira et al., 2000)
3-metil-1-pentanol	Cacao, verde, vino	Química, floral	1	(Moyano et al., 2002)
Lactato de etilo	Mantequilla, fresa, fruta	Frutal, grasa	1,14	(Pino and Queris, 2011)
3-etoxipropan-1-ol	Frutal	Frutal	0,1	(Muñoz et al., 2008)
Octanoato de etilo	Plátano, piña, pera, floral	Frutal, floral	0,002	(Guth, 1997)
3-hidroxibutanoato de etilo	Fruta verde, piel de manzana	Frutal	1	(Muñoz et al., 2008)
Blackberry tiofenona	azufre, fruta, baya	Frutal	-	-
2-hidroxi hexanoato de etilo	Piña	Frutal	-	(Pino and Queris, 2011)
1-octanol	cera, cítrico, floral, graso	Frutal	0,2	(Pino and Queris, 2011)
Ácido isobutírico	Queso, rancio, agrio	Grasa	30	(Muñoz et al., 2008)
Decanoato de etilo	Fruta, floral, grasa, dulce, cera, jabón	Frutal, Grasa	0,2	(Pino and Queris, 2011)
Ácido butanoico	Queso	Grasa	0,173	(Etievant, 1991)
Gamma-butirolactona	Dulce, tostado, caramelo	Frutal, tostado	0,035	(Ferreira et al., 2000)
9-decenoato de etilo	Fruta	Frutal	-	(Pino and Queris, 2011)
Gamma-hexalactona	Coco, dulce, balsámico	Frutal, tostado	13	(Ferreira et al., 2000)
Metionol	Patata cocida, cebolla, vegetal	Vegetal	0,5	(Zea et al., 2007)
Etoxi-gamma-butirolactona	Coco, caramelo, tostado	Frutal, tostado	0,035*	(Ferreira et al., 2000)
4-hidroxibutanoato de etilo	Marshmallo, fruta, uva	Frutal	-	(Muñoz et al., 2008)
Acetato de 2-feniletilo	Fruta, floral, rosa	Frutal	0,18	(Pino and Queris, 2011)

Tabla II.8 (Continuación). Relación de los compuestos volátiles para los que se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las cantidades presentes en los vinos blancos y tintos inoculados con *Saccharomyces* o *Torulaspota*, descriptor, serie, OPT y referencia.

Compuesto	Descriptor	Serie	OPT (mg/L)	Referencia
Laurato de etilo	Cera, jabón, floral, lácteo, fruta	Frutal, floral	0,5	(Moyano et al., 2002)
Ácido hexanoico	Agrio, graso, queso	Grasa	3	(Zea et al., 2007)
Malato de dietilo	Verde, fruta, caramelo	Frutal	10	(Muñoz et al., 2008)
Ácido octanoico	Rancio, sudor	Grasa	0,5	(Ferreira et al., 2000)
2-hidroxiglutarato de dietilo*	Algodón de caramelo	Frutal	-	-
4-vinilguaiacol	Ahumado, madera, especiado	Especiada	0,04	(Guth, 1997)
Palmitato de etilo	Cera, fruta, vainilla, balsámico	Frutal	1	(Moyano et al., 2002)
4-etoxicarbonil-gamma-butanolactona	Coco	Frutal	0,035*	(Ferreira et al., 2000)
Ácido decanoico	Rancio, agrio, graso	Grasa	1	(Ferreira et al., 2000)
2-hidroxi-3-fenilpropanoato de etilo	Fruta, fresa, paja seca, animal	Frutal	1	(Pino and Queris, 2011)
Ácido 9-decenoico	cera, mantequilla	Grasa	1	-
Ácido laurico	Coco, laurel, jabón	Grasa	10	(Zea et al., 2007)

OPT, odor perception threshold o umbral de detección en mg/L.

(*), Valor umbral de detección desconocido; para el cálculo del VAO se ha tomado arbitrariamente el valor de 0,035 mg/L correspondiente a la gamma-butirolactona.

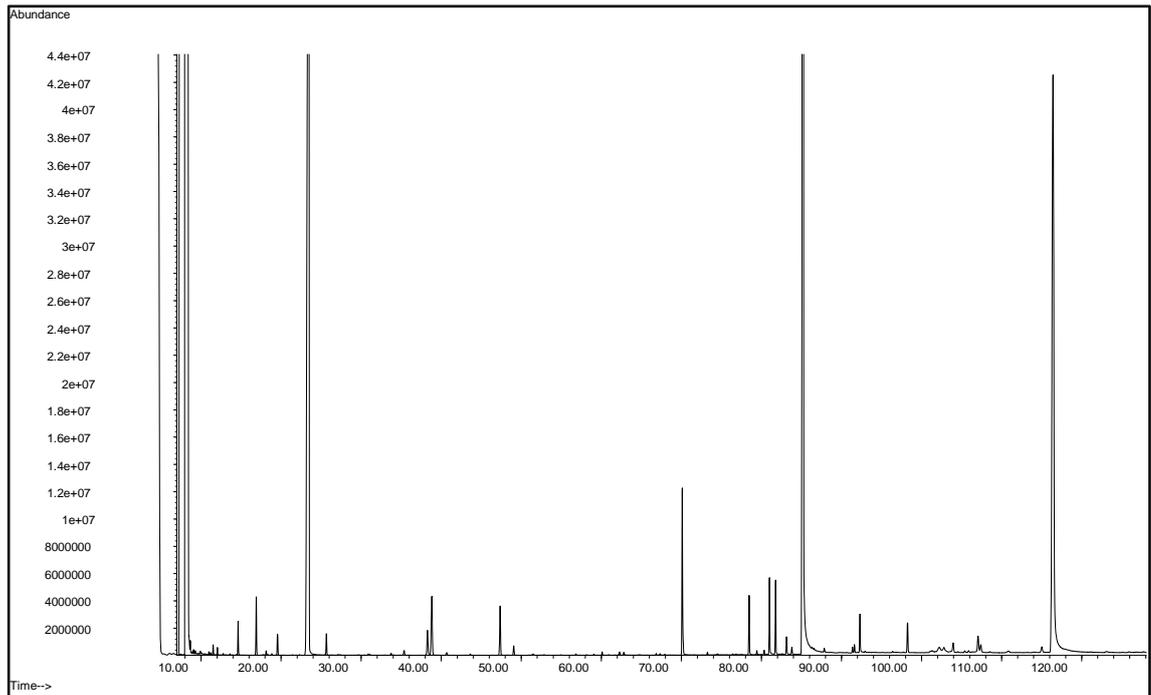


Figura II.17. Cromatograma GC/MS ejemplo de un vino tinto.

II.15. Determinación de la espuma.

II.15.1. Impresión espumante.

La espuma fue valorada subjetivamente (impresión espumante) según la producción de espuma al medir la presión con Afrómetro y abrir la botella de cava para la toma de muestra. Se utilizó una escala de 0 a 6, donde 0 es muy poca y 6 es el máximo de espuma observado. Se estimó una valoración dependiendo de la duración del “perlage” (esfervescencia), el diámetro medio de las burbujas de anhídrido carbónico y la intensidad de su desarrollo (De Rosa and Guixá, 1990).

II.15.2. Medida de parámetros de la espuma con equipo Mosalux.

Se utilizó un equipo Mosalux (Maujean et al., 1990b) compuesto por un módulo con probeta graduada de 40×440 mm, equipada en la parte inferior por un disco poroso de 16-40 μm de diámetro y una pequeña apertura lateral que desemboca por debajo del disco y por donde se inyecta el gas CO_2 durante el análisis. A la izquierda de la probeta se localiza un emisor de luz y a la derecha un receptor o captador del haz de luz incidente. Este receptor emite una señal de 0-10 V que es inversamente proporcional a la altura de la espuma. Además, el módulo tiene un medidor de flujo de balón que permite regular y fijar el flujo de CO_2 a 7 L/hora. El módulo está conectado a un ordenador (software) para recoger los resultados de la prueba en forma de gráfica en función del tiempo (**Figs. II.18 y II.19**).

La curva trazada representa a tiempo real la evolución de la altura de la espuma producida en función del tiempo, indicando 3 características principales del vino:

- La espumabilidad (HM) o la altura máxima de espuma, expresada en milímetros (mm) que se forma al borbotear el gas a flujo (7 L/h) y presión (1 bar y/o 100 kPa) constantes (**Fig. II.19**).
- La altura de estabilidad (HS) refleja la vida media de las burbujas, expresada en mm cuando se establece un equilibrio entre la formación y la desaparición de las burbujas que se mantiene en la superficie (**Fig. II.19**).
- El tiempo de estabilidad de espuma (TS), expresado en segundos (sg), que transcurre desde la interrupción del flujo de gas hasta la desaparición total de la espuma (**Fig. II.19**).



Figura II.18. Imagen del aparato Mosalux (derecha) y software acoplado al equipo (izquierda).

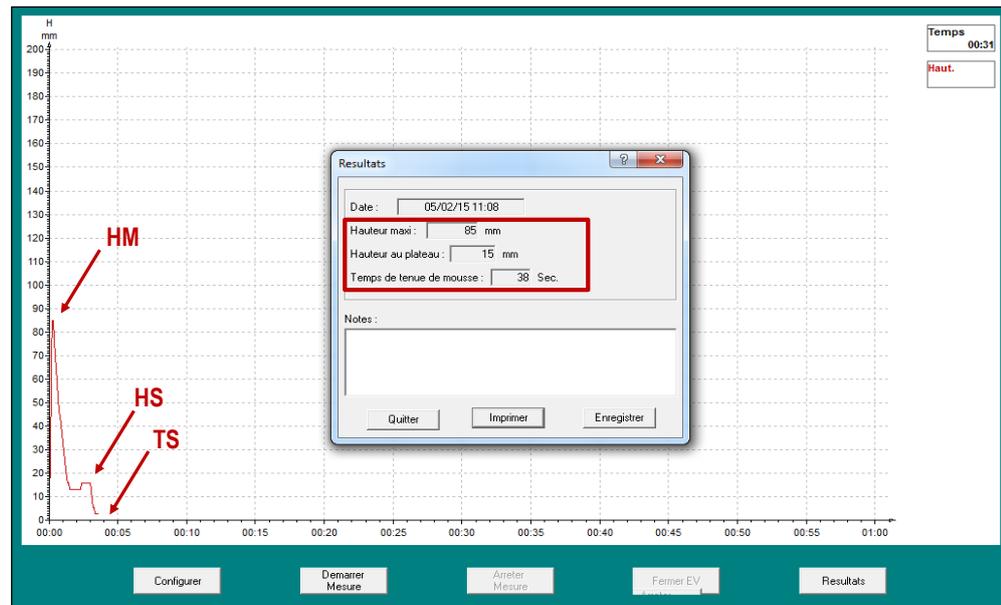


Figura II.19. Representación gráfica de los resultados de la espuma (HM, altura máxima o espumabilidad; HS, altura de estabilidad; y TS, tiempo de estabilidad de la espuma) de un cava obtenido con software acoplado al equipo Mosalux.

Material
<ul style="list-style-type: none"> • 100 mL de vino desgasificado • Probeta graduada de 100 mL • Equipo Mosalux • Probeta graduada de 40×400 mm • Bombona de CO₂ • Agua destilada y etanol al 20%
Procedimiento
<ul style="list-style-type: none"> - Encender el equipo Mosalux. <p>Antes del análisis:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Abrir bombona de CO₂ y ajustar presión (1 bar). - Retirar manguera en la base de la probeta. - Limpiar probeta con alcohol, agua destilada y vino a analizar. - Añadir 100 mL de vino en probeta de 40×400 mm. - Colocar probeta graduada en Mosalux y conectar gas. - Ajustar voltaje entre 9-10 V (comprobar en software) haciendo girar la probeta. <p>Análisis de la muestra (4 réplicas por botella):</p> <ul style="list-style-type: none"> - Comenzar la medida (software). - Registro de HM, HS y TS (Fig. II.19). - Retirar vino de la probeta. - Lavar la probeta. - Comenzar procedimiento de nuevo. <p>Lavado de la probeta:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Lavar con abundante agua destilada. - Lavar dos veces con 50 mL de etanol al 20%. - Volver a enjuagar con abundante agua destilada y dejar secar.

II.16. Análisis de datos.

Se realizaron análisis de la varianza (ANOVA), test pos hoc de Duncan para diferenciar grupos homogéneos, y coeficiente de correlación de Pearson para relacionar

distintos parámetros físico-químicos y microbiológicos de los vinos. En todos estos análisis estadísticos se utilizó un nivel de confianza del 95 o 99%, y se realizaron con el programa SPSS v.22.0 para Windows.

II. 17. BIBLIOGRAFÍA.

- Albuquerque, M., Yuste, J., Rubio, J., and Yuste, J. (2006). Descripción y caracterización agronómica de 28 variedades tintas de vid en Castilla y León.
- Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E., and Lipman, D. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215, 403-410.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25, 3389-3402.
- Ambroña, J., Vinagre, A., Maqueda, M., Álvarez, M., and Ramírez, M. (2006). Rhodamine-pink as genetic marker for yeast populations in wine fermentations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 2977-2984.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Cilindre, C., Liger-Belair, G., Villaume, S., Jeandet, P., and Marchal, R. (2010). Foaming properties of various Champagne wines depending on several parameters: Grape variety, aging, protein and CO₂ content. *Analytica Chimica Acta* 660, 164-170.
- Chomé, P. (2006). Variedades de vid. Registro de variedades comerciales.
- De Rosa, T., and Guixá, R.V. (1990). Tecnología de los vinos espumosos (Mundi Prensa Libros SA).
- Díez, B., Pedrós-Alió, C., Marsh, T., and Massana, R. (2001). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Applied Environmental Microbiology* 67, 2942-2951.
- Díez, B., Pedrós-Alió, C., and Massana, R. (2001). Study of genetic diversity of eukaryotic picoplankton in different oceanic regions by small-subunit rRNA gene cloning and sequencing. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 2932-2941.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P., and Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28, 350-356.
- E.E.C. (1990). Nº 2676. Métodos de análisis comunitarios aplicables en el sector del vino. Official Report of the European Community L 272, 191-191.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., and Querol, A. (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8 S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49, 329-337.
- Etievant, P. (1991). Wine. Volatile compounds in foods and beverages 1.
- Ferreira, V., López, R., and Cacho, J.F. (2000). Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 1659-1667.
- Futami, R., Muñoz-Pomer, A., Viu, J., Domínguez-Escribà, L., Covelli, L., Bernet, G., Sempere, J., Moya, A., and Llorens, C. (2011). GPRO: the professional tool for management, functional analysis and annotation of omic sequences and databases.
- García-Carpintero, E.G., Sánchez-Palomo, E., and González-Viñas, M. (2011). Aroma characterization of red wines from cv. Bobal grape variety grown in La Mancha region. *Food Research International* 44, 61-70.
- Grey, M., and Brendel, M. (1992). Rapid and simple isolation of DNA from agarose gels. *Current Genetics* 22, 83-84.
- Guth, H. (1997). Quantitation and sensory studies of character impact odorants of different white wine varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 3027-3032.

- Kassir, Y., and Simchen, G. (1991). Monitoring meiosis and sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in Enzymology* 194, 94.
- Kurtzman, C. (2011). *Torulasporea Lindner (1904)*. In *The Yeasts: A Taxonomic Study Fifth Edition*, C. Kurtzman, J. Fell, and T. Boekhout, eds. (London: Elsevier), pp. 867-874.
- Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., and Salzberg, S.L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biology* 10, R25.
- Luo, R., Liu, B., Xie, Y., Li, Z., Huang, W., Yuan, J., He, G., Chen, Y., Pan, Q., and Liu, Y. (2012). SOAPdenovo2: an empirically improved memory-efficient short-read de novo assembler. *Gigascience* 1, 18.
- Maqueda, M. (2008). Las levaduras en las fermentaciones de mosto de la D.O. Ribera del Guadiana: Ecología y Aplicaciones Tecnológicas. In Departamento de Anatomía, Biología Celular y Zoología (Badajoz: Universidad de Extremadura).
- Marchal, R., Seguin, V., and Maujean, A. (1997). Quantification of interferences in the direct measurement of proteins in wines from the Champagne region using the Bradford method. *American Journal of Enology and Viticulture* 48, 303-309.
- Maujean, A., Poinssaut, P., Dantan, H., Brissonnet, F., and Cossiez, E. (1990). Study of the performance and quality of the foam in sparkling wines. 2. Perfecting of a measuring technique for foaming ability, performance and stability of the foam in sparkling wines [measurement of foam properties, bentonite, vegetable black]. *Bulletin de l'OIV (France)*.
- Medlin, L., Elwood, H., Stickel, S., and Sogin, M. (1988). The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene* 71, 491-499.
- Moyano, L., Zea, L., Moreno, J., and Medina, M. (2002). Analytical study of aromatic series in sherry wines subjected to biological aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 7356-7361.
- Muñoz, D., Peinado, R., Medina, M., and Moreno, J. (2008). Effect of *Saccharomyces cerevisiae* F12 on volatile compounds in wines at three different stages of industrial biological ageing. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 14, 71-77.
- Pino, J.A., and Queris, O. (2011). Analysis of volatile compounds of mango wine. *Food Chemistry* 125, 1141-1146.
- Quirós, M., Gonzalez, R., and Morales, P. (2012). A simple method for total quantification of mannoprotein content in real wine samples. *Food Chemistry* 134, 1205-1210.
- Ramírez, M., Regodón, J.A., Pérez, F., and Rebollo, J.E. (1999). Wine yeast fermentation vigor may be improved by elimination of recessive growth-retarding alleles. *Biotechnology and Bioengineering* 65, 212-218.
- Rodríguez-Cousiño, N., Maqueda, M., Ambrona, J., Zamora, E., Esteban, E., and Ramírez, M. (2011). A new wine *Saccharomyces cerevisiae* double-stranded RNA virus encoded killer toxin (Klus) with broad antifungal activity is evolutionarily related to a chromosomal host gene. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 1822-1832.
- Sánchez, A., and Luisa, M. (2000). Caracterización de variedades de *Vitis vinifera* cultivadas en Extremadura, mediante estudios morfológicos, agronómicos y bioquímicos (Agronomos).
- Somers, J., and Bevan, E. (1969). The inheritance of the killer character in yeast. *Genetical Research* 13, 71-83.
- Thorvaldsdóttir, H., Robinson, J.T., and Mesirov, J.P. (2012). Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Briefings in Bioinformatics*, bbs017.
- Tugores, J.H. (2003). *Tratado de enología I, II*. Mundi-prensa Madrid.
- Vodkin, M.H., and Fink, G.R. (1973). A nucleic acid associated with a killer strain of yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 70, 1069-1072.
- Zea, L., Moyano, L., Moreno, J.A., and Medina, M. (2007). Aroma series as fingerprints for biological ageing in fino sherry-type wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87,2319-2326

CAPÍTULO III:
Caracterización de nuevas levaduras
killer de los géneros *Saccharomyces*
(Klus) y *Torulaspota* (Kbarr)

III.1. ANTECEDENTES.

La co-inoculación con levaduras *Torulaspota delbrueckii* puede corregir ciertos defectos del vino o mejorar su calidad, aunque su utilidad práctica en bodegas comerciales está por confirmar. El mayor problema de la co-inoculación con distintas levaduras es que los resultados de la fermentación son imprevisibles debido al desplazamiento de las levaduras no-*Saccharomyces* por *Saccharomyces cerevisiae*, que tiene mayor vigor fermentativo y suele dominar las fermentaciones de mosto anulando el efecto de las primeras sobre la composición química y aromática del vino. Se requiere conocer mejor las interacciones entre las distintas levaduras para controlar la participación de las distintas poblaciones de levaduras durante la fermentación. El fenotipo killer o asesino se suele considerar como una característica deseable en las estrategias de selección (Regodón, 1997) o mejora genética de levaduras vnicas (Ambrona et al., 2006; Ambrona et al., 2005b; Pérez et al., 2000; Ramírez et al., 1998). Hasta hace poco tiempo sólo se había descrito la existencia del fenotipo asesino K2 en prácticamente todas las zonas vitivinícolas del mundo. En un estudio reciente realizado en la D.O. Ribera del Guadiana se aislaron al menos dos nuevos tipos de levaduras vnicas killer: las levaduras *S.cerevisiae* Klus que ya han sido caracterizadas (Rodríguez-Cousiño et al., 2011) y las *T. delbrueckii* Kbarr, no descritas previamente y aún pendientes de investigar en profundidad. Lo interesante de estas dos nuevas toxinas es que, al contrario del resto de toxinas K1, K2 o K28 conocidas de *S. cerevisiae*, tienen un espectro antifúngico mucho más amplio, matando incluso a otras especies de levaduras contaminantes perjudiciales y frecuentes en las fermentaciones industriales, o varias especies de levaduras patógenas oportunistas correspondientes al género *Candida* aisladas de enfermos hospitalizados. Además, las levaduras Kbarr tienen un fenotipo killer más intenso que todas las levaduras vnicas killer que hemos analizado. Obviamente, estas características hacen pensar que estas nuevas levaduras killer puedan tener innovadoras aplicaciones en el control de las fermentaciones industriales (de vinos tranquilos o espumosos), en la prevención de contaminaciones indeseables de alimentos fermentados, o quizás en la prevención de infecciones fúngicas (Conti et al., 1998a; Magliani et al., 1997; Séguy et al., 1998). En este capítulo se describe la caracterización morfológica, fenotípica y genotípica de las nuevas levaduras *T. delbrueckii* killer Kbarr capaces de matar a *S. cerevisiae* e imponerse durante la fermentación de mosto; se analiza además el genoma de sus virus killer que codifican para las toxinas Kbarr mediante secuenciación masiva de nueva generación (NGS).

III.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

III.2.1. Aislamiento, identificación y caracterización morfológica de las nuevas levaduras killer.

El aislamiento y caracterización de las levaduras *S.cerevisiae* K2 y Klus fue realizado previamente por nuestro grupo de investigación (Maqueda et al., 2012). En este estudio se aislaron 1040 levaduras *Saccharomyces* sensu stricto (Naumova et al., 2001) de 104 fermentaciones espontáneas realizadas en todas las zonas vitivinícolas de Extremadura. Las levaduras killer fueron el 40,8%, y el 59,2% fueron no-killer. Entre las levaduras killer, la mayoría (80,4%) fueron K2 y la minoría (19,6%) fueron las recientemente descubiertas Klus (Rodríguez-Cousiño et al., 2011). Ambos fenotipos están codificados en genomas de RNA de doble cadena (dsRNA) de tamaño mediano correspondientes a los virus de *Saccharomyces cerevisiae* (ScV) M2 y Mlus, cuya longitud varía de 1,3 a 1,75 kb y de 2,1 a 2,3 kb respectivamente. Las levaduras K2 fueron encontradas en todas las sub-áreas y vendimias analizadas, mientras que las levaduras Klus se encontraron en las sub-áreas y vendimias (periodo de maduración de la uva) más cálidas. No se detectaron levaduras *Torulaspota* en ninguna de estas zonas y vendimias. Las levaduras *Torulaspota* fueron aisladas en otro estudio realizado con mostos en fermentación procedentes de vendimias tardías de uva parcialmente pasificada. Las muestras se tomaron en fase tumultuosa o final de fermentación para conseguir levaduras con buena capacidad fermentativa, y capaces de coexistir vivas con las levaduras *Saccharomyces* dominantes en una proporción detectable en presencia de altas concentraciones de alcohol. La frecuencia de levaduras *Torulaspota* fue mucho menor que la de *Saccharomyces*, tan solo se aislaron en 3 fermentaciones, y solo en dos de ellas se aislaron levaduras *Torulaspota* killer. En una de ellas (procedente del valle del río Albarregas -del latín *Barraecas*- en Mérida) (50 levaduras aisladas), el 80% fueron levaduras *Torulaspota* killer de tipo Kbarraecas-1 (Kbarr-1), y el 20% restante levaduras *Saccharomyces* no-killer. En la otra fermentación (procedente de la finca La Corchuela, Badajoz), (102 levaduras aisladas) el 98% fueron levaduras *Torulaspota* killer de tipo Kbarraecas-2 (Kbarr-2), y el 2% restante levaduras *Saccharomyces* killer K2 y no-killer.

La identificación de las nuevas levaduras en base a la morfología de las colonias (**Fig. III.1**), la forma y tamaño celular (**Fig. III.2**), sus características fisiológicas (Kurtzman, 2011), y la secuencia del gen del DNA ribosomal 18S (Maqueda et al., 2012) indicaron que las levaduras killer Klus son *Saccharomyces cerevisiae*. Las

mismas pruebas de identificación indicaron que las levaduras Kbarr son *Torulaspota delbrueckii* (Figs. III.1 y III.2), excepto las correspondientes a sus características fisiológicas que indicaron que estas levaduras son *T. pretoriensis*. Las pruebas de identificación adicionales basadas en el análisis de los RFLPs de los espaciadores internos de genes ribosomales ITS (Esteve-Zarzoso et al., 1999b) corroboraron que las levaduras Kbarr son *Torulaspota delbrueckii* (Fig. III.3).

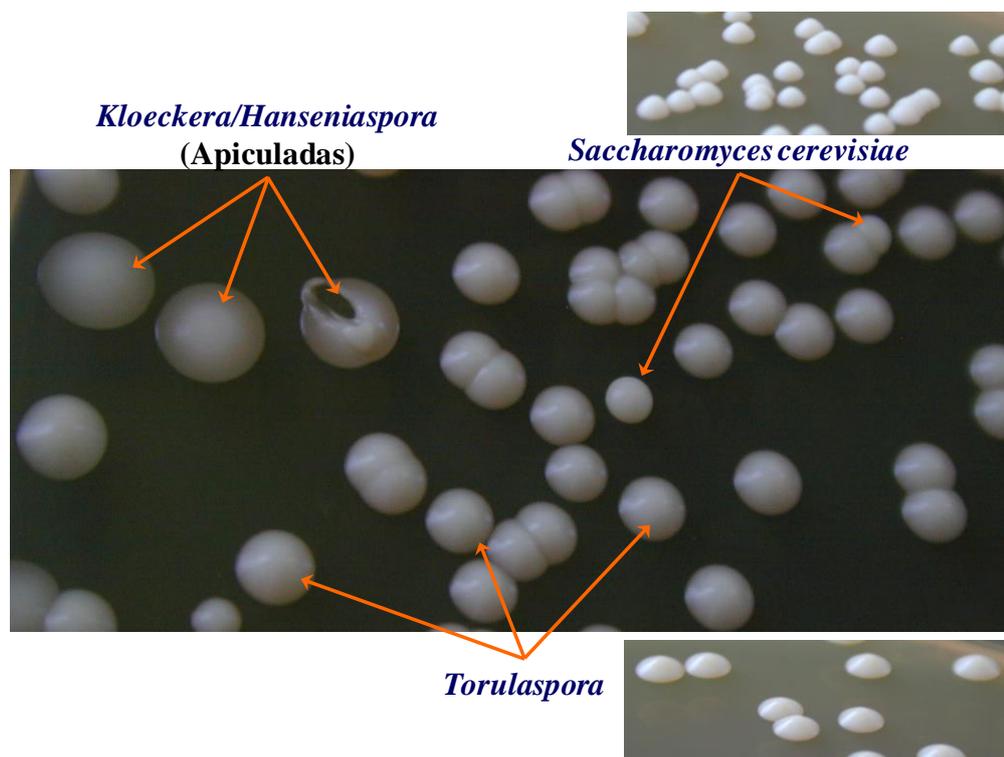


Figura III.1. Morfología de las colonias de las levaduras *Saccharomyces* y *Torulaspota* cultivadas durante 72 horas en placa de YEPD a 30°C. Se observa una morfología intermedia en cuanto a brillo y solidez del color blanco de las levaduras *Torulaspota* respecto a las levaduras *Saccharomyces* y las apiculadas *Kloeckera/Hanseniaspora*.

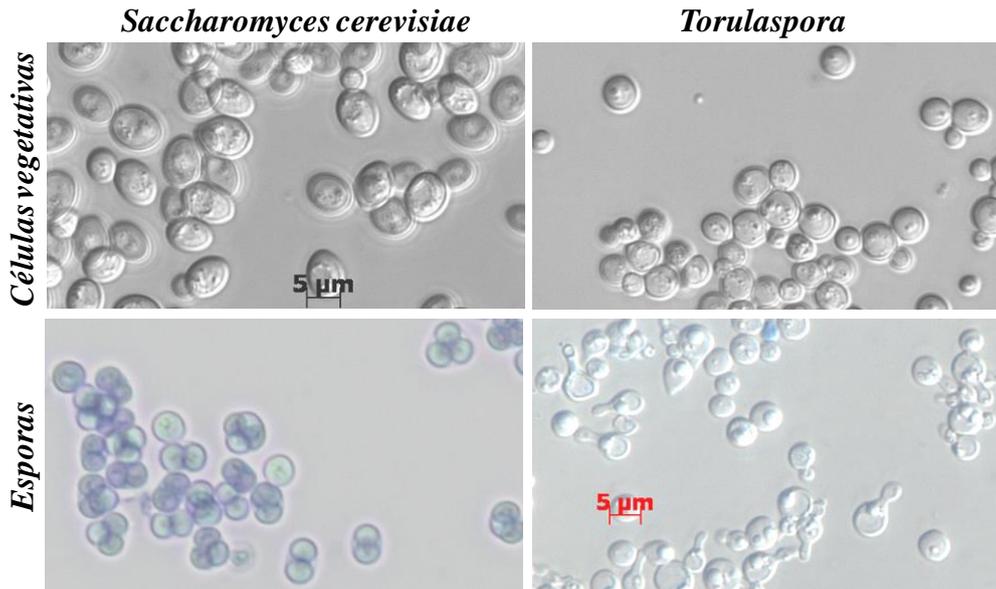


Figura III.2. Microfotografías (600×, Nomarski y campo claro) de las células vegetativas (medio Melazas 1×) y esporas (medio de esporulación) de *Saccharomyces* y *Torulaspora*.

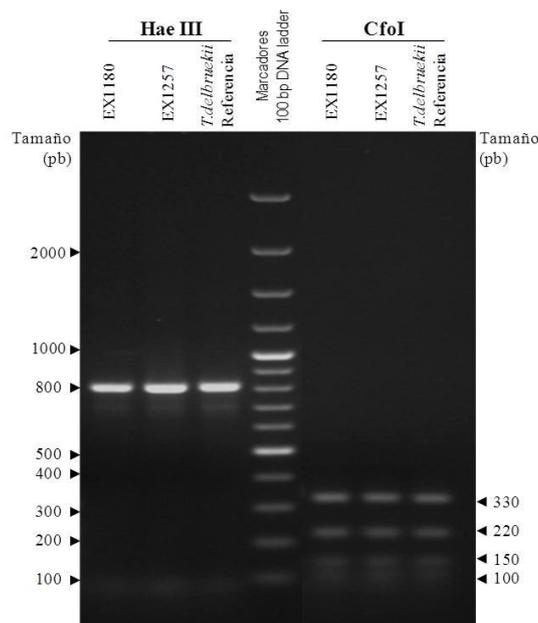


Figura III.3. Análisis electroforético de los RFLPs de los espaciadores internos de genes ribosomales ITS de las levaduras *Torulaspora* en comparación con una cepa de referencia de *T. delbrueckii*. Los productos de PCR de los espaciadores ITS se trataron con los enzimas de restricción *Hae* III y *Cfo* I antes de realizar la electroforesis en gel de 1% agarosa.

III.2.2. Caracterización fenotípica de las nuevas levaduras killer Klus y Kbarr.

La caracterización de las levaduras *S. cerevisiae* Klus fue realizada previamente (Rodríguez-Cousiño et al., 2011). Estas levaduras matan, además de las levaduras sensibles, las levaduras *S. cerevisiae* killer de todos los tipos conocidos (K1, K2 y K28)

y levaduras de otras especies como *Hanseniaspora* sp., *Kluyveromyces lactis*, *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida kefir* y *Candida tropicalis*. Además, las levaduras Klus son muy resistentes a otras levaduras killer, solo mostraron sensibilidad a las toxinas killer de *Hansenula mrakii* y *Hanseniaspora* sp. El fenotipo Klus está codificado en un virus con genoma de dsRNA de tamaño mediano, ScV-Mlus, cuya longitud varía de 2,1 a 2,3 kb; son los virus ScV-M más largos descritos hasta la fecha. ScV-Mlus depende de ScV-LA para replicarse y mantenerse en la célula. Su genoma dsRNA tiene una estructura similar a la de los virus ScV-M1, M2, o M28, con una región codificante de la toxina Klus en la mitad 5'-terminal, seguida de dos secuencias ricas en bases A (poli-A centrales) y de una mitad 3'-terminal sin capacidad codificadora. La cadena (+) de Mlus contiene señales *cis-acting* en sus extremos 5' y 3' necesarias para la transcripción y replicación, que son similares a las presentes en el resto de los virus ScV. La ORF (open reading frame) de la porción 5' codifica para la supuesta pre-pro-toxina con una señal de secreción N-terminal, característicos sitios Kex2p/Kexlp de procesamientos, y varios lugares de posible N-glicosilación (Rodríguez-Cousiño et al., 2011). Aparte de estos motifs comunes en todos los virus ScV-M, el dsRNA Mlus no muestra homología con la secuencia de los dsRNAs de ScV-M1, M2, o M28, que tampoco son homólogas entre sí. Tampoco existe homología entre las secuencias de aminoácidos de las toxinas codificadas por todos estos virus, toxinas K1, K2, K28 y Klus. Sin embargo, la secuencia de aminoácidos de Klus tiene homología con la ORF cromosómica YFR020W cuya función se desconoce, sugiriendo una posible relación evolutiva entre esta ORF y el virus ScV-Mlus (Rodríguez-Cousiño et al., 2011).

Las levaduras Kbarr-1 matan a todos los tipos de levaduras *S. cerevisiae* conocidos, bien sean sensibles a todas las toxinas killer, o bien killer de cualquiera de los tipos conocidos hasta ahora, K1, K2, K28, o Klus. Las levaduras Kbarr-2 tienen un comportamiento similar, pero su fenotipo killer es mucho más débil que el correspondiente a las Kbarr-1 y resulta difícil apreciarlo en algunas condiciones (**Fig. III.4**).

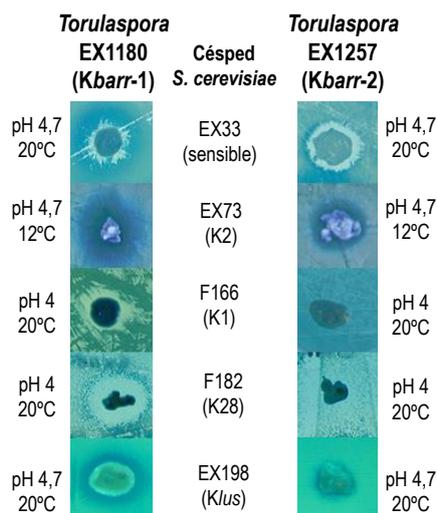


Figura III.4. Fenotipo asesino (killer) de las levaduras *Torulaspota* EX1180 (Kbarr-1) y EX1257 (Kbarr-2). El test se realizó frente a céspedes de estirpes de levaduras *S. cerevisiae* killer-sensible (EX33) o killer K2 (EX73), K1 (F166), K28 (F182), y *Klus* (EX198). Las condiciones de ensayo: levadura de cada pegote, pH y temperatura se muestran a los lados (izquierda o derecha) de cada foto; levadura del césped en la parte superior.

Las levaduras Kbarr-1 matan a las Kbarr-2; sin embargo, las levaduras Kbarr-1 son resistentes a las Kbarr-2. Entre las levaduras *S. cerevisiae*, sólo las *Klus* mataron a las levaduras *Torulaspota* Kbarr, aunque débilmente (**Fig. III.5**). Las levaduras Kbarr-1 también mataron a levaduras de otras especies como *Hanseniaspora* sp., *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans* (estirpes CAF y 10231), *Candida tropicalis*, *Candida dubliniensis*, *Candida kefir*, *Candida glabrata*, *Candida parasilopsis*, *Candida krusei*, *Yarrowia lypolitica* (estirpes wt-a, wt-SA1-5 y mnn9-a) y *Hansenula mrakki*; aunque no mataron a *Brettanomyces*. Las levaduras Kbarr-2 mostraron un fenotipo menos intenso y más restringido, sólo mataron a las levaduras *Candida kefir*, *Candida glabrata*, y *Candida krusei* (**Tabla III.1** y **Fig. III.6**). Por otra parte, las levaduras Kbarr fueron muy resistentes a otras levaduras killer no-*Saccharomyces*, sólo mostraron sensibilidad a las toxinas killer de *Hansenula mrakii* (**Fig. III.7**).

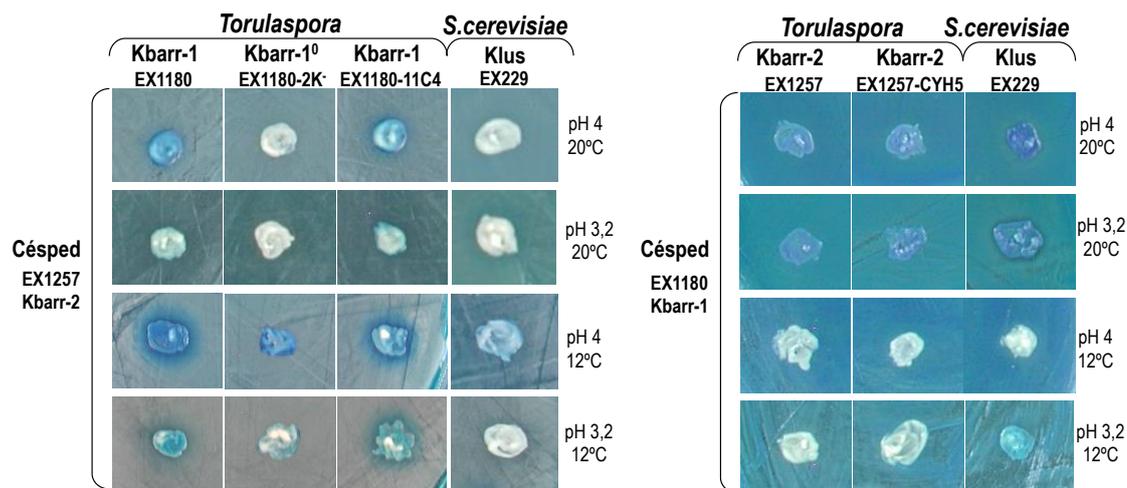


Figura III.5. Fenotipo killer de las levaduras *Torulaspota* Kbarr-1 (EX1180 y EX1180-11C4), *Torulaspota* Kbarr-2 (EX1257), *Torulaspota* Kbarr⁰ (EX1180-2K) y *S. cerevisiae* Klus (EX229) frente a céspedes de las levaduras *Torulaspota* Kbarr-1 (EX1180) y Kbarr-2 (EX1257). Las condiciones de ensayo: levadura del césped se muestra a la izquierda, pH y temperatura a la derecha; y levadura de cada pegote en la parte superior de cada foto.

Tabla III.1. Fenotipo killer de las levaduras *T. delbrueckii* killer Kbarr y otras levaduras *S.cerevisiae* killer y no-killer de referencia frente a diferentes levaduras no-*Saccharomyces* killer y no-killer.

<i>Césped</i>	Intensidad de fenotipo															
	EX33	EX73	F166	F182	EX198	EX85	EX85R	ROD23-1B	EX229	EX229-R1	EX1180	EX1180-11C4	EX1180-2K-	EX1257	EX1257-CYH5	
	K ⁻	K2	K1	K28	Klus	K2	K2 ⁰	K2	Klus	Klus ⁰	Kbarr-1	Kbarr-1	Kbarr-1 ⁰	Kbarr-2	Kbarr-2	
EX33 (K ⁻)	0	4	4	4	1	4	0	4	1	0	3	3	0	1	1	
F166 (K1)	0	4	0	0	0	2	0	2	1	0	3	3	0	0	0	
EX73 (K2)	0	0	4	3	2	0	0	0	1	0	3	3	0	0	0	
F182 (K28)	0	3	3	0	1	0	0	1	1	0	4	4	0	0	0	
EX198 (Klus)	0	0	3	3	0	0	0	0	0	0	3	3	0	1	1	
<i>Brettanomyces</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Hansenula mrakki</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	0	0	0	
<i>Kluyveromyces lactis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	
<i>Hanseniospora sp.</i>	0	0	0	0	3	0	0	0	3	0	2	2	0	0	0	
<i>S. pombe</i>	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	5	5	0	0	0	
<i>C. albicans CAF</i>	0	0	4	3	0	0	0	0	0	0	4	4	0	0	0	
<i>C. albicans 10231</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	
<i>C. kefir</i>	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	5	5	0	3	3	
<i>C. glabrata</i>	0	3	2	1	3	0	0	0	3	0	4	4	0	4	4	
<i>C. dubliniensis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	0	0	0	
<i>C. parasilopsis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	
<i>C. krusei</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
<i>C. tropicalis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	0	0	0	
<i>Yarrowia lipolytica (wt a)</i>	0	0	3	2	0	0	0	0	0	0	5	5	0	0	0	
<i>Y. lipolytica SAI-5 (wt)</i>	0	0	3	3	0	0	0	0	0	0	5	5	0	0	0	
<i>Y. lipolytica (mnn9 a)</i>	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	5	5	0	0	0	

Dimensiones del halo de muerte/inhibición a pH 4,7 y 20°C: 0 = no halo, 1 = halo de 1mm, 2 = halo de 2 mm, 3 = halo de 3 mm, 4 = halo de 4 mm, 5 = halo de 5 mm, 6 = halo de 6 mm.

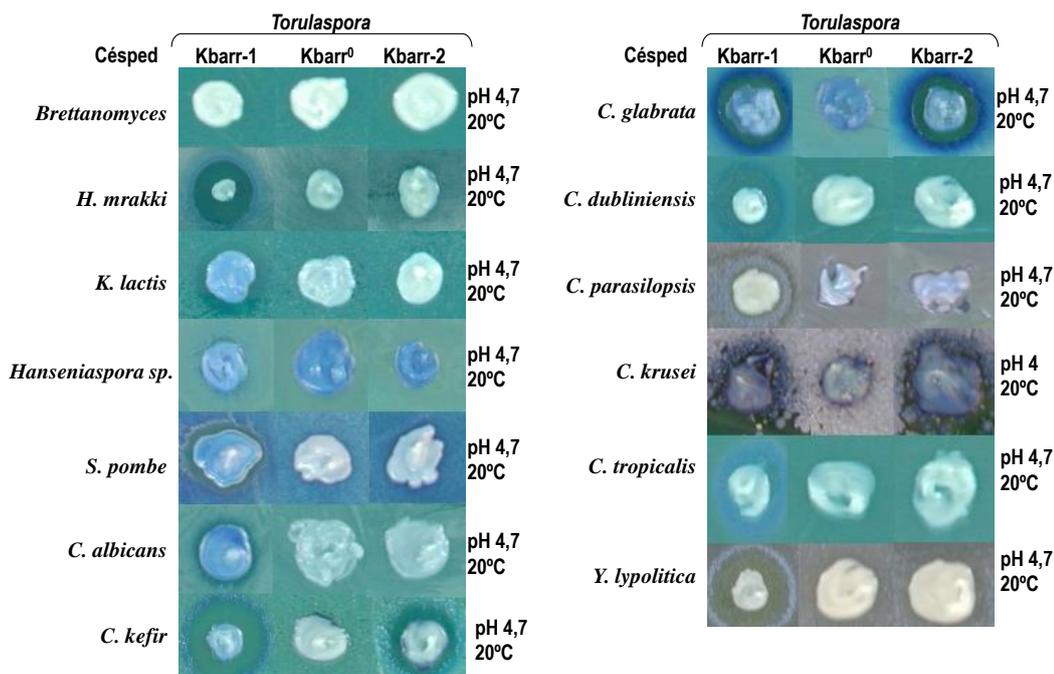


Figura III.6. Fenotipo killer de levaduras no-*Saccharomyces* frente a levaduras *T. delbrueckii* killer Kbarr-1, no-killer Kbarr⁰ y Kbarr-2. Las condiciones de ensayo: levadura del césped, pH y temperatura se muestran a los lados (izquierda o derecha) de cada foto; levadura de cada pegote Kbarr-1, no-killer Kbarr⁰ y Kbarr-2 en la parte superior.

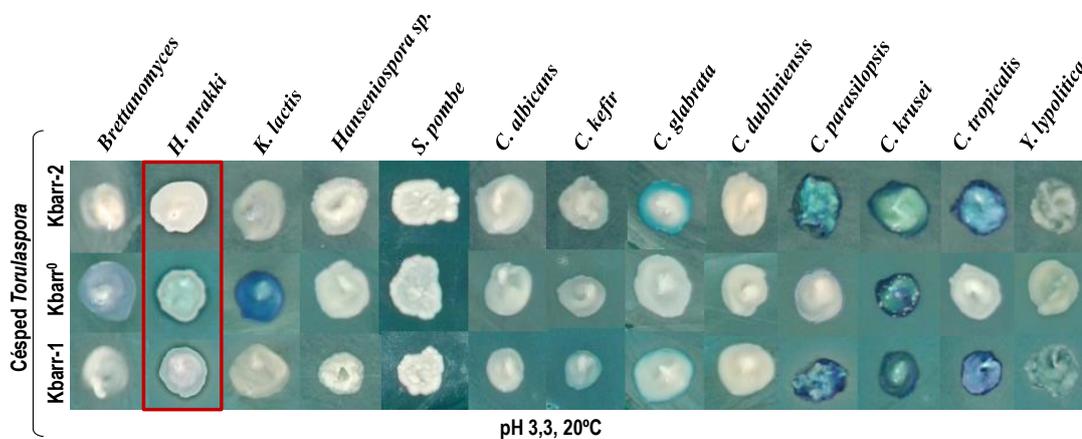


Figura III.7. Fenotipo killer de distintas levaduras no-*Saccharomyces* frente a las levaduras *T. delbrueckii* killer Kbarr-1, no-killer Kbarr⁰ y Kbarr-2. Las condiciones de ensayo: levadura de cada pegote y césped se muestran en el borde izquierdo y superior de la foto, pH y temperatura en borde inferior.

III.2.3. Influencia del pH, temperatura y cepa de levadura sensible sobre el fenotipo killer de las levaduras Kbarr. Comparación con el resto de levaduras *S.cerevisiae* killer.

En este apartado se compara el fenotipo killer de las toxinas Kbarr-1 y Kbarr-2 con el de las toxinas K1, K2, K28 y Klus analizando el fenotipo de las levaduras

EX1180 (TdV-Mbarr-1), EX1180-11C4 (TdV-Mbarr-1), EX1180-2K⁻ (TdV-Mbarr⁰), EX1257 (TdV-Mbarr-2) y EX1257-CYH5 (TdV-Mbarr-2) a distintos pHs (3,2, 4 y 4,7) y temperaturas (12 y 20°C) que se corresponden con el rango habitual de las vinificaciones industriales, y frente a distintas levaduras *S. cerevisiae* con todos los fenotipos killer conocidos hasta la fecha: EX33 (K⁻), EX73 (K2), F166 (K1), F182 (K28), y EX198 (Klus), y además frente a EX85 (K2), EX85R (K2⁰), Rod23-1B(K2), EX229 (Klus) y EX229-R1 (Klus⁰).

La intensidad del efecto killer dependió del pH y la temperatura de ensayo. Como era de esperar, ninguna levadura no-killer (EX33, EX85R, EX229-R1 y EX1180-2K⁻) mostró actividad frente a ninguna de las levaduras ensayadas. La toxina más activa fue Kbarr-1 (91,36 mm acumulados, sumatorio total de los milímetros de halo considerando Kbarr-1 como pegote frente a todas las levaduras utilizadas como césped) seguida de K1 (61 mm), K2 (29,55 mm), Kbarr-2 (20,21 mm), Klus (18,17 mm) y, finalmente, K28 (17,39 mm) (**Tabla III.2**). En conjunto, las toxinas presentaron una actividad ligeramente más alta a 12°C (123,8 mm acumulados) que a 20°C (114,6 mm). El pH 4,7 fue más efectivo a 12°C (54,5 mm acumulados) y el pH 4 a 20°C (43,3 mm); además, esta diferencia se cumple para la mayoría de las toxinas consideradas individualmente a dichas temperaturas. No obstante, el pH 4 fue más efectivo para K1 (1,62±0,78 a pH 4 vs 1,36±0,71 a pH 4,7) y Kbarr-2 (1,08±0,44 a pH 4 vs 1,04±0,49 a pH 4,7) a 12°C y el pH 4,7 para Kbarr-1 (2,32±0,64 a pH 4,7 vs 1,99±0,55 a pH 4) y K28 (0,90±0,48 a pH 4,7 vs 0,38±0,18 a pH 4) a 20°C (**Fig. III.8** y **Tabla III.2**).

Se apreció una ligera variación en los rangos óptimos de pH de las toxinas K1 y K28 respecto a los previamente descritos en bibliografía. Para la toxina K1 se obtuvo la máxima actividad frente a K2 a pH 4 y 12°C (4,33 mm de media), fuera del estrecho rango de pH (4,6-4,8) en el que se ha descrito su máxima actividad (4-5 mm a 26°C) previamente (Gulbiniene et al., 2004). La actividad de K28 fue relativamente baja con un máximo de 3 mm de media a pH 4,7 frente a K2 a 12°C y Klus a 20°C (**Tabla III.2**), ligeramente menor que lo descrito previamente con una actividad de 5-6 mm para su rango óptimo de pH 5-5,8 (Gulbiniene et al., 2004; Pfeiffer and Radler, 1984; Schmitt and Tipper, 1990). La toxina K2 mostró su máxima actividad frente a K28 (3 mm de media) a pH 4 y 20°C (**Tabla III.2**), en consonancia con la máxima actividad descrita previamente en el rango de pH 4 a 4,7 (Marquina et al., 2002; Pérez et al., 2001; Regodón, 1997; Shimizu, 1993; Van Vuuren and Jacobs, 1992).

La toxina Klus mostró su máxima actividad (3 mm de media) frente a K2 a pH 4,7 y 12°C coincidiendo con lo publicado previamente (Maqueda et al., 2011b; Rodríguez-Cousiño et al., 2011). Sorprendentemente, y a pesar de mostrar un fenotipo killer mucho más débil que la mayoría de las levaduras killer, las levaduras Klus fueron las únicas capaces de matar a las levaduras Kbarr-1 (EX1180, EX1180-11C4) y Kbarr-2 (EX1257, EX1257-CYH5) a pH 3,2 y 20°C, aunque siempre con un fenotipo relativamente débil de 1 mm (**Tabla III.2**).

Las levaduras Kbarr-1 mostraron una alta actividad en todos los rangos de pH y temperatura. Las mejores condiciones fueron a pH 4,7 y 12°C frente a K2 con 6 mm de media (**Tabla III.2 y Fig. III.8**).

Las levaduras Kbarr-2 mostraron la máxima actividad (2,83 mm de media) frente a K2 a pH 4 y 12°C y fueron más activas a 12°C de forma generalizada (actividad acumulada de 17,58 mm a 12°C vs 2,63 mm a 20°C). La actividad acumulada de estas levaduras (20,21 mm) fue menor que la de Kbarr-1 (91,36 mm) (**Tabla III.2 y Fig. III.8**).

Las distintas levaduras susceptibles (utilizadas como céspedes en la **Tabla III.3**) mostraron un nivel de sensibilidad variable en las condiciones óptimas para cada toxina killer. Las levaduras K2 fueron sensibles a todos los fenotipos killer, muy sensibles a Kbarr-1 (6 mm de media a pH 4,7 y 12°C) y a K1 (4,33 mm a pH 4 y 12°C), menos sensibles a K28 y Klus (3 mm a pH 4,7 y 12°C en ambos casos) y menos sensible aún a Kbarr-2 (2,83 mm a pH 4 y 12°C). Sorprendentemente, EX85 resultó ser muy sensible a Rod23-1B (3 mm) a pH 4,7 y 12°C, a pesar de que ambas son del mismo fenotipo killer K2 (**Tabla III.3**). Las levaduras K1 (F166) fueron muy sensibles a Kbarr-1 (4 mm de media a pH 3,2 y 4,7 12°C) y menos a K2 (2,66 mm a pH 4,7 y 20°C) que a Kbarr-2 (1 mm a pH 4, 12 y 20°C), K28 (1 mm a pH 4 y 20°C) o Klus (0,5 mm a pH 4-4,7 y 20°C). Las levaduras K28 (F182) fueron muy sensibles a Kbarr-1 (4 mm de media a pH 4,7 y 20°C) y K1 (4 mm a pH 4-4,7 y 12°C), menos sensible a K2 (3 mm a pH 4 y 20°C) y Klus (2 mm a pH 4, 12 y 20°C), y resistente a las levaduras Kbarr-2 (0 mm). Las levaduras Klus (EX198 y EX229) fueron muy sensibles a Kbarr-1 (4,25 mm de media a pH 4,7 y 12°C) y K1 (4 mm a pH 4 y 20°C), menos sensibles a K28 (3 mm a pH 4,7 y 20°C), Kbarr-2 (2,5 mm a pH 4,7 y 12°C) y K2 (2,33 mm a pH 4,7 y 12°C). Las levaduras Kbarr-1 (EX1180 y EX1180-11C4) fueron las más resistentes de todas, tan solo mostraron sensibilidad, y muy débil, frente a Klus (1 mm de media a pH 3,2 y 20°C). Por último, las levaduras Kbarr-2 (EX1257 y EX1257-CYH5) también se

mostraron muy resistentes, solo fueron sensibles a las Kbarr-1 en algunas condiciones (2,5 mm de media a pH 3,2 y 1,5 mm a pH 4, ambas a 12°C) y muy débilmente a las Klus (1 mm a pH 3,2 y 20°C).

En resumen, las levaduras con fenotipo killer más intenso fueron las Kbarr-1 frente a K2 a pH 4,7 y 12°C. Es de destacar que las levaduras K2 son las levaduras killer más abundantes en las vinificaciones industriales. Además, las Kbarr-1 resultaron ser las más resistentes a todas las demás levaduras killer, por lo que podrían ser recomendadas para su uso en fermentaciones industriales en el caso de problemas frecuentes con levaduras killer silvestres. En contraposición, las levaduras menos killer fueron las Kbarr-2 que no mataron a las levaduras K28 y Kbarr-1 en ninguna de las condiciones ensayadas, aunque también se mostraron muy resistentes al resto de las levaduras killer descritas hasta la fecha. En general, las mejores condiciones para conseguir el mejor efecto killer fueron pH 4,7 y 12°C, distintas a las mejores condiciones recomendadas para la elaboración de cava, pH 3,2 y 12°C, y de vinos tranquilos pH 3,5 y 16-24°C.

Tabla III.2. Cuantificación de la actividad media y acumulada (sumatorio) de las levaduras killer.

<i>Pegote de levadura</i>												
T°C	pH	Césped	K-	K1	K2 (3)	K28	Klus (2)	Kbarr1 (2)	Kbarr2 (2)	SUMATORIO (mm)		
12°C	pH3,2	K- (4)	0,00	2,75	1,00	0,75	0,00	2,00	1,75	8,25	28,4	
		K1 (1)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,00	0,00	4,00		
		K2 (3)	0,00	3,00	0,00	0,33	0,00	2,33	1,00	6,67		
		K28 (1)	0,00	3,00	1,00	0,00	1,00	3,00	0,00	8,00		
		Klus (2)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
		Kbarr1 (2)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
		Kbarr2 (2)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,50	0,00	1,50		
		Totales	0,00	8,75	2,00	1,08	1,00	12,83	2,75			
	Media±ET	0,00±0,00	1,25±0,59	0,29±0,18	0,15±0,11	0,14±0,14	1,83±0,56	0,39±0,27				
	pH4	K- (4)	0,00	3,00	1,00	0,75	0,50	2,90	2,25	10,40	40,9	
		K1 (1)	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	3,50	1,00	5,50		
		K2 (3)	0,00	4,33	0,00	0,66	0,00	1,83	2,83	9,65		
K28 (1)		0,00	4,00	1,66	0,00	2,00	3,50	0,00	11,16			
Klus (2)		0,00	0,00	0,17	0,00	0,00	0,00	1,50	1,67			
Kbarr1 (2)		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00			
Kbarr2 (2)		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,50	0,00	2,50			
Totales		0,00	11,3	3,83	1,41	2,50	14,23	7,58				
Media±ET	0,00±0,00	1,62±0,78	0,55±0,25	0,20±0,13	0,36±0,28	2,03±0,57	1,08±0,44					
12°C	pH4,7	K- (4)	0,00	1,50	2,25	1,25	0,50	3,60	2,25	11,35	54,5	
		K1 (1)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,00	0,00	4,00		
		K2 (3)	0,00	4,00	0,33	3,00	3,00	6,00	2,50	18,83		
		K28 (1)	0,00	4,00	2,00	0,00	1,00	3,50	0,00	10,50		
		Klus (2)	0,00	0,00	2,33	0,00	0,00	4,25	2,50	9,08		
		Kbarr1 (2)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
		Kbarr2 (2)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
		Totales	0,00	9,50	6,91	4,25	4,50	21,35	7,25			
	Media±ET	0,00±0,00	1,36±0,71	0,99±0,43	0,61±0,44	0,64±0,42	3,05±0,85	1,04±0,49				
	Totales	0,00	29,6	12,74	6,74	8,00	48,41	17,58				
	20°C	pH3,2	K- (4)	0,00	2,00	1,58	1,00	0,50	1,63	0,00	6,71	31,2
			K1 (1)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,50	0,00	3,50	
K2 (3)			0,00	3,00	0,00	0,66	0,00	2,66	0,00	6,32		
K28 (1)			0,00	2,00	2,66	0,00	1,00	3,00	0,00	8,66		
Klus (2)			0,00	2,00	0,00	0,00	0,00	2,00	0,00	4,00		
Kbarr1 (2)			0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	1,00		
Kbarr2 (2)			0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	1,00		
Totales			0,00	9,00	4,24	1,66	3,50	12,79	0,00			
Media±ET		0,00±0,00	1,29±0,47	0,61±0,41	0,24±0,16	0,50±0,19	1,83±0,53	0,00±0,00				
pH4		K- (4)	0,00	2,75	1,58	1,00	0,25	2,25	0,13	7,96	43,3	
		K1 (1)	0,00	0,00	2,00	1,00	0,50	2,00	1,00	6,50		
		K2 (3)	0,00	4,00	0,00	0,66	1,00	3,66	0,00	9,32		
	K28 (1)	0,00	2,00	3,00	0,00	2,00	3,00	0,00	10,00			
	Klus (2)	0,00	4,00	1,00	0,00	0,00	3,00	1,50	9,50			
	Kbarr1 (2)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00			
	Kbarr2 (2)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00			
	Totales	0,00	12,8	7,58	2,66	3,75	13,91	2,63				
Media±ET	0,00±0,00	1,82±0,70	1,08±0,44	0,38±0,18	0,54±0,28	1,99±0,55	0,38±0,23					
pH4,7	K- (4)	0,00	1,00	1,00	1,00	0,25	2,25	0,00	5,50	40,2		
	K1 (1)	0,00	0,00	2,66	0,00	0,50	3,00	0,00	6,16			
	K2 (3)	0,00	2,66	0,00	2,33	1,17	4,00	0,00	10,16			
	K28 (1)	0,00	3,00	1,33	0,00	1,00	4,00	0,00	9,33			
	Klus (2)	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	9,00			
	Kbarr1 (2)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00			
	Kbarr2 (2)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00			
	Totales	0,00	9,66	4,99	6,33	2,92	16,25	0,00				
Media±ET	0,00±0,00	1,38±0,55	0,71±0,39	0,90±0,48	0,42±0,19	2,32±0,64	0,00±0,00					
Totales	0,00	31,4	16,81	10,65	10,17	42,95	2,63					
SUMATORIO (mm, por pegote de levadura)			0,00	61,0	29,55	17,39	18,17	91,36	20,21	237,67		

Los datos se corresponden a la distancia media en mm entre el pegote de la levadura ensayada y el final del halo de inhibición y/o muerte provocado por la toxina. Los números en paréntesis indican el número de veces que se repitió el test con la misma levadura utilizada como pegote frente a distintos céspedes del mismo tipo de levaduras killer. Cuando se realizaron distintos tests para una misma levadura se calculó la media de los distintos halos de inhibición. Las levaduras sensibles fueron EX33, EX85R, EX229-R1 y EX1180-2K; las killer K1 F166, las K2 EX73, EX85 y Rod23-1B, las Klus EX198 y EX229, las Kbarr-1 EX1180 y EX1180-11C4, y las Kbarr-2 EX1257 y EX1257-CYH5.

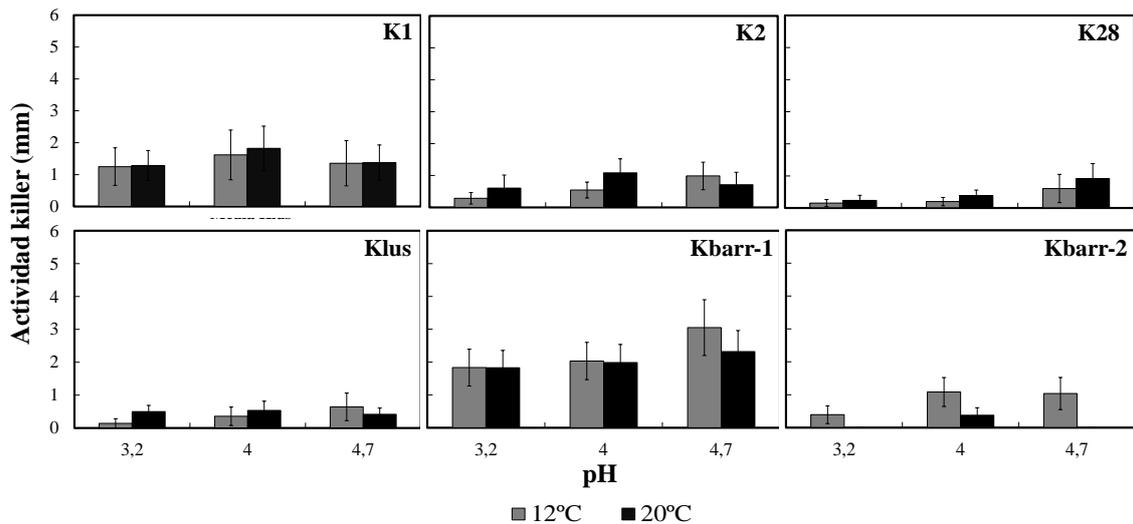


Figura III.8. Actividad killer media (\pm error estándar) de los mm del halo de inhibición de K1, K2, K28, Klus, Kbarr-1 y Kbarr-2 frente a distintos céspedes de levaduras sensibles (EX33, EX85R, EX229-R1 y EX1180-2K) y killer: K1 (F166), K2 (EX73, EX85 y Rod23-1B), Klus (EX198 y EX229), Kbarr-1 (EX1180 y EX1180-11C4) y Kbarr-2 (EX1257 y EX1257-CYH5). Los análisis se realizaron a distintos pHs (3,2, 4 y 4,7) y temperaturas (12 y 20°C).

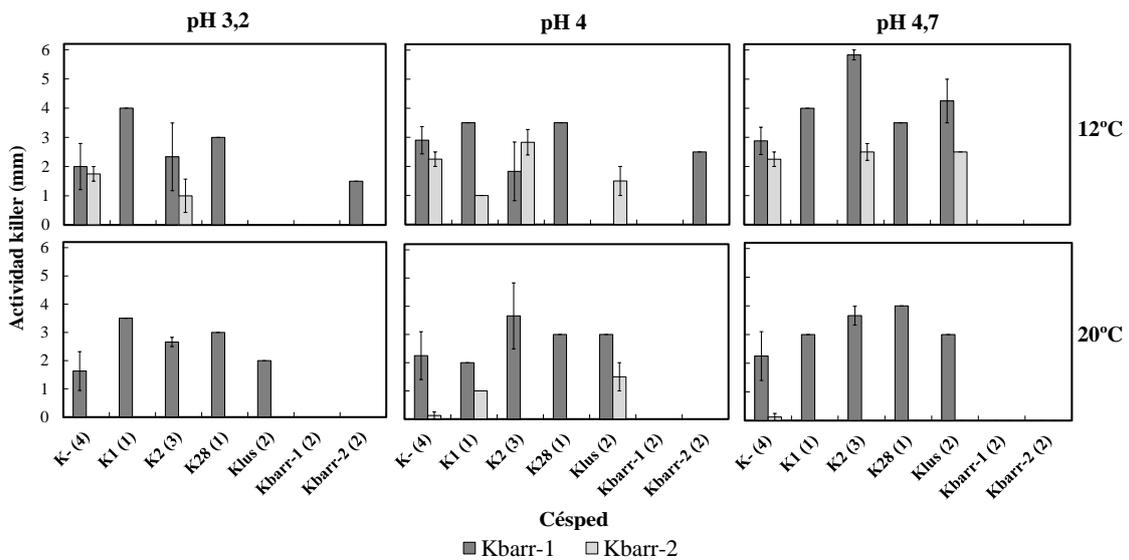


Figura III.9. Actividad killer media (\pm error estándar) en mm del halo de inhibición de Kbarr-1 y Kbarr-2 frente a cada tipo de levaduras sensibles (EX33, EX85R, EX229-R1 y EX1180-2K) o killer K1 (F166), K2 (EX73, EX85 y Rod23-1B), Klus (EX198 y EX229), Kbarr-1 (EX1180 y EX1180-11C4) y Kbarr-2 (EX1257 y EX1257-CYH5). Los análisis se realizaron a distintos pHs (3,2, 4 y 4,7) y temperaturas (12 y 20°C). Los números en paréntesis indican el número de veces que se repitió el test con el mismo tipo de levadura utilizada como césped. Cuando se realizaron distintos análisis para una misma levadura se calculó la media de los distintos resultados.

Tabla III.3. Intensidad del fenotipo killer de las levaduras Kbarr según las condiciones de ensayo.

Condiciones			Intensidad de fenotipo														
			EX33	EX73	F166	F182	EX198	EX85	EX85R	Rod23-1B	EX229	EX229-R1	EX1180	EX1180-11C4	EX1180-2K	EX1257	EX1257-CYH5
Césped	pH	Temp	K ⁰	K2	K1	K28	Klus	K2	K2 ⁰	K2	Klus	Klus ⁰	Kbarr-1	Kbarr-1	Kbarr-1 ⁰	Kbarr-2	Kbarr-2
EX33 (K ⁰)	3,2	12°C	0	4	3	1	0	4	0	4	0	0	3	3	0	2	2
		20°C	0	4	3	2	1	4	0	4	1	0	1	1	0	0	0
	4	12°C	0	4	4	2	2	4	0	4	2	0	3	3	0	2	2
		20°C	0	4	4	2	1	4	0	2	1	0	2	2	0	0	1
	4,7	12°C	0	3	4	4	1	3	0	3	3	0	5	5	0	3	5
		20°C	0	4	4	4	1	4	0	4	1	0	3	3	0	0	0
EX73 (K2)	3,2	12°C	0	0	4	1	0	0	0	0	0	0	4	3	0	2	2
		20°C	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	3	0	0	0
	4	12°C	0	0	5	1	0	0	0	0	0	0	2	2	0	3	4
		20°C	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	2	3	0	0	0
	4,7	12°C	0	0	5	3	4	0	0	0	4	0	6	5	0	3	3
		20°C	0	0	4	3	2	0	0	0	1	0	3	3	0	0	0
F166 (K1)	3,2	12°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	0	0	0
		20°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	3	0	0	0
	4	12°C	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	4	3	0	1	1
		20°C	0	4	0	1	1	1	0	1	0	0	2	2	0	1	1
	4,7	12°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0
		20°C	0	4	0	0	0	2	0	2	1	0	3	3	0	0	0
F182 (K28)	3,2	12°C	0	1	3	0	1	0	0	2	1	0	2	4	0	0	0
		20°C	0	3	2	0	1	2	0	3	1	0	3	3	0	0	0
	4	12°C	0	2	4	0	2	1	0	2	2	0	3	4	0	0	0
		20°C	0	3	2	0	2	3	0	3	2	0	3	3	0	0	0
	4,7	12°C	0	3	4	0	1	2	0	1	1	0	3	4	0	0	0
		20°C	0	3	3	0	1	0	0	1	1	0	4	4	0	0	0
EX198 (Klus)	3,2	12°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		20°C	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0
	4	12°C	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
		20°C	0	1	2	0	0	1	0	1	0	0	3	3	0	1	1
	4,7	12°C	0	4	0	0	0	0	0	4	0	0	5	5	0	2	3
		20°C	0	0	3	3	0	0	0	0	0	0	3	3	0	0	0
EX85 (K2)	3,2	12°C	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	4	3	0	0	0
		20°C	0	0	5	2	0	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0
	4	12°C	0	0	5	1	0	0	0	0	0	0	4	3	0	3	3
		20°C	0	0	6	2	0	0	0	0	0	0	6	6	0	0	0
	4,7	12°C	0	0	3	3	2	0	0	3	1	0	6	6	0	2	3
		20°C	0	0	2	2	1	0	0	0	1	0	4	4	0	0	0

Temp = Temperatura; Dimensiones del halo de muerte: :0 = no hay halo; 1/0 = dudoso; 1= halo 1mm; 2= halo 2mm; 3=halo 3mm; 4= halo 4mm; 5=halo 5mm y 6=halo 6mm.

Tabla III.3. (Continuación) Intensidad del fenotipo killer de las levaduras Kbarr según las condiciones de ensayo.

Condiciones			Intensidad de fenotipo														
			EX33	EX73	F166	F182	EX198	EX85	EX85R	Rod23-1B	EX229	EX229-R1	EX1180	EX1180-11C4	EX1180-2K	EX1257	EX1257-CYH5
Césped	pH	Temp	K ⁰	K2	K1	K28	Klus	K2	K2 ⁰	K2	Klus	Klus ⁰	Kbarr-1	Kbarr-1	Kbarr-1 ⁰	Kbarr-2	Kbarr-2
EX85R (K2 ⁰)	3,2	12°C	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	2	2
		20°C	0	2	3	1	0	2	0	3	0	0	3	2	0	0	0
	4	12°C	0	3	4	0	0	3	0	3	0	0	4	3	0	2	2
		20°C	0	3	3	1	0	3	0	3	0	0	3	3	0	0	0
	4,7	12°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	6	0	2	2
		20°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0
Rod23-1B (K2)	3,2	12°C	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
		20°C	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	3	3	0	0	0
	4	12°C	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2
		20°C	0	0	2	0	3	0	0	0	3	0	3	2	0	0	0
	4,7	12°C	0	0	4	3	4	0	0	0	3	0	6	6	0	2	2
		20°C	0	0	2	2	1	0	0	0	1	0	4	4	0	0	0
EX229 (Klus)	3,2	12°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		20°C	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0
	4	12°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2
		20°C	0	1	2	0	0	1	0	1	0	0	3	3	0	2	2
	4,7	12°C	0	3	0	0	0	0	0	3	0	0	4	3	0	2	3
		20°C	0	0	3	3	0	0	0	0	0	0	3	3	0	0	0
EX229-R1 (Klus ⁰)	3,2	12°C	0	0	4	2	0	0	0	0	0	4	3	0	1	1	
		20°C	0	0	2	1	0	0	0	0	0	3	3	0	0	0	
	4	12°C	0	0	3	1	0	0	0	0	0	4	3	0	2	2	
		20°C	0	0	4	1	0	0	0	0	0	4	4	0	0	0	
	4,7	12°C	0	6	2	1	0	6	0	6	0	3	3	0	1	1	
		20°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	0	0	0	
EX1180 (Kbarr-1)	3,2	12°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		20°C	0	0	0	0	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0	
	4	12°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		20°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	4,7	12°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		20°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
EX1180-11C4 (Kbarr-1)	3,2	12°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		20°C	0	0	0	0	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0	
	4	12°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		20°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	4,7	12°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		20°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Temp = Temperatura; Dimensiones del halo de muerte: :0 = no hay halo; 1/0 = dudoso; 1= halo 1mm; 2= halo 2mm; 3=halo 3mm; 4= halo 4mm; 5=halo 5mm y 6=halo 6mm.

Tabla III.3. (Continuación) Intensidad del fenotipo killer de las levaduras Kbarr según las condiciones de ensayo.

Condiciones			Intensidad de fenotipo															
			EX33	EX73	F166	F182	EX198	EX85	EX85R	Rod23-1B	EX229	EX229-R1	EX1180	EX1180-11C4	EX1180-2K	EX1257	EX1257-CYH5	
Césped	pH	Temp	K ⁰	K2	K1	K28	Klus	K2	K2 ⁰	K2	Klus	Klus ⁰	Kbarr-1	Kbarr-1	Kbarr-1 ⁰	Kbarr-2	Kbarr-2	
EX1257 (Kbarr-2)	3,2	12°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	
		20°C	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	4	12°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0	0
		20°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4,7	12°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		20°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EX1257- CYH5 (Kbarr-2)	3,2	12°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	
		20°C	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
	4	12°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0	
		20°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	4,7	12°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		20°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Temp = Temperatura; Dimensiones del halo de muerte: :0 = no hay halo; 1/0 = dudoso; 1= halo 1mm; 2= halo 2mm; 3=halo 3mm; 4= halo 4mm; 5=halo 5mm y 6=halo 6mm.

III.2.4. Caracterización del fenotipo killer de las levaduras Kbarr frente a mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* alterados en la estructura de la pared celular: Análisis del mecanismo de acción de las toxinas killer Klus y Kbarr.

En este apartado se analiza el mecanismo de acción de las toxinas Klus y Kbarr y se pretenden aportar información sobre las posibles dianas de la pared celular con las que interactúan. Se compararon y analizaron los resultados de sensibilidad obtenidos con levaduras mutantes con alteraciones conocidas en la estructura de la pared celular: mutantes *mnn* (Ballou, 1990), mutantes *ktr* (Lussier et al., 1997) y mutantes *kre* (Al-Aidroos and Bussey, 1978). Los fenotipos de estos mutantes se recogen en el **Apartado II.1 (Tabla II.3)**. Los ensayos de fenotipo killer se realizaron a distintos pHs (3,2, 4 y 4,7) y temperaturas (12 y 20°C), utilizando como césped estos mutantes de *S. cerevisiae* (**Tabla II.3**) frente a distintas estirpes de *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii* con todos los fenotipos killer conocidos hasta la fecha: EX33 (K⁻), F166 (K1), EX73 (K2), F182 (K28), y EX198 (Klus), EX85 (K2), EX85R (K2⁰), Rod23-1B(K2), EX229 (Klus), EX229-R1 (Klus⁰), EX1180 (Kbarr1), EX1180-11C4 (Kbarr1) y EX1180-2K⁻ (Kbarr⁰). Los resultados obtenidos a 12°C y pHs 3,2 y 4,7 no aportaron información relevante (datos no mostrados). Para facilitar el análisis de los resultados se separaron por grupos teniendo en cuenta las características fenotípicas de las levaduras utilizadas como césped: Estirpes silvestres, EX33 y BY4741; estirpes afectadas en síntesis de manoproteínas, mutantes *mnn*, *ktr*, *kre2*; y estirpes afectadas en síntesis de glucano, incluye *kre1* y *kre6* (**Tabla III.4**).

Las toxinas K1 y K2 interactúan con el beta-glucano de la pared (Hutchins and Bussey, 1983), en consecuencia los mutantes defectivos en manoproteínas (*mnn*, *ktr* y *kre2*) no deberían presentar resistencia. En todo caso, sería razonable que los que tienen defectos más drásticos, mostraran mayor sensibilidad ya que al tener defectuosa, o más reducida, la capa de manoproteínas podría facilitar la accesibilidad de las cadenas de glucano. Los resultados obtenidos se ajustaron bien a lo esperado tanto para las levaduras killer K1 como para las dos estirpes K2 (**Tabla III.4**). En general, los mutantes *mnn* mostraron una sensibilidad similar al silvestre, con algunas estirpes más sensibles. La mayor sensibilidad la presentó el mutante *mnn9* que carece prácticamente de toda la cadena externa de N-oligosacáridos. Sin embargo, en ambos casos (toxinas K1 y K2) se observó una disminución de la sensibilidad en alguno de los mutantes *mnn* respecto la estirpe silvestre (especialmente el *mnn1*). Esto parece sugerir que la interacción de estas toxinas con su receptor pudiera necesitar o verse favorecida por

alguna parte de la estructura de las manoproteínas. El gen *MNN1* codifica una manosil transferasa que transfiere las manosas terminales unidas en alfa (1, 3) de las cadenas laterales de las manoproteínas (Yip et al., 1994). Por otro lado, los genes *KTR* codifican enzimas implicadas en la síntesis de manoproteínas de la pared celular, aunque algunos de ellos son redundantes (Corbacho et al., 2005; Lussier et al., 1997). Para las toxinas K1 y K2, el comportamiento de los mutantes *ktr* fue bastante parecido al de los mutantes *mnn* en todas las condiciones ensayadas. En cuanto a los mutantes *kre1* y *kre6*, podrían tener alterado (o no tener) el receptor para las toxinas K1 y K2, por lo que deberían presentar resistencia a ellas. Esta predicción se cumplió en todos los casos. En consecuencia, los resultados obtenidos parecen estar en consonancia con lo publicados previamente (Boone et al., 1990b; Brown et al., 1993; Flegelová et al., 2002; Novotná et al., 2004; Pagé et al., 2003). Por otro lado, *KRE2* codifica una enzima implicada en la síntesis de O-oligosacáridos (Häusler et al., 1992), por lo que la estirpe mutante presenta este tipo de cadenas glucídicas de menor tamaño. Esta característica no debería afectar a la interacción de K1 y K2 con su receptor o, en todo caso facilitarla, por permitir más fácilmente el acceso a la capa de glucano. Los resultados indican que la sensibilidad de *kre2* a K2 es similar a la de la cepa silvestre, por lo que coinciden con lo esperado, sin embargo, en el caso de K1, se observó disminución en la sensibilidad con respecto a la cepa silvestre. Este efecto fue similar al observado en el mutante *mnn1* y comentado anteriormente. Es decir, las manosas terminales de las cadenas de O-oligosacáridos de las manoproteínas podrían tener especial relevancia en la interacción con la toxina K1.

La toxina K28 tiene como receptor manoproteínas de la pared de alto peso molecular (Schmitt and Radler, 1987), en consecuencia, los mutantes *mnn* deberían, en principio, mostrar una sensibilidad reducida, principalmente aquellos cuyos defectos sean más drásticos. Algo similar debería ocurrir con los mutantes *ktr*, aunque sus defectos sean menos detectables fenotípicamente que los *mnn* (Corbacho et al., 2005), 2005). Nuestros resultados, en general están de acuerdo con esta afirmación (**Tabla III.4**), no obstante, la actividad de K28 sobre las cepas ensayadas fue bastante baja en las condiciones de nuestros experimentos.

La toxina Klus también presentó una actividad en general más baja que la observada en el caso de K1 y K2 en las condiciones ensayadas, no obstante, el modelo de actuación parece similar. En los mutantes, con defectos en las manoproteínas de la pared celular no se observan diferencias con respecto a la cepa silvestre, excepto en el

caso del mutante *mnn9* que se comporta como el más sensible, similar a las toxinas K1 y K2. Sin embargo, los mutantes *kre* defectivos en beta-glucano mostraron resistencia a la toxina (**Tabla III.4**), apoyando la sugerencia anterior de que el beta-glucano de la pared podría ser el receptor para Klus, de la misma forma que lo es para K1 y K2.

El comportamiento de Kbarr-1 fue similar al apuntado para Klus, K1 y K2. El mutante *mnn9* fue nuevamente el más sensible, mientras que el resto de mutantes en manoproteínas de pared se comportaron de forma similar a la cepa silvestre (**Tabla III.4**). Por el contrario, los mutantes *kre* presentaron resistencia. Estos resultados indican que el receptor para Kbarr-1 es también el beta-glucano de la pared celular, igual que se ha descrito para K1 y K2 y se ha sugerido para Klus. Esta afirmación se fundamenta en que el mutante más afectado en la estructura de las manoproteínas (*mnn9*) es más sensible, seguramente por razones de accesibilidad del receptor, mientras que los mutantes alterados en el beta-glucano (*kre1* y *kre6*) son resistentes muy probablemente por carecer total o parcialmente del mencionado receptor.

La toxina Kbarr-2 mostró poca o ninguna actividad en las condiciones ensayadas (no mostrado). Sólo mostró actividad muy débil (2-1 mm) frente a *mnn9*, lo que indica que las manoproteínas de pared también podrían interferir en su accesibilidad al receptor específico de la pared, como parece ocurrir para para Kbarr-1.

Tabla III.4. Intensidad del fenotipo killer de las levaduras killer frente a diferentes levaduras sensibles y mutantes de *S.cerevisiae* alterados en la pared celular.

Fenotipo	Césped	Intensidad de fenotipo											
		EX33	F166	EX73	EX85	EX85R	F182	EX198	EX229	EX229-R1	EX1180	EX1180-11C-4	EX1180-2K-
		K ⁻	K1	K2	K2	K ⁻	K28	Klus	Klus	K ⁻	Kbarr-1	Kbarr-1	K ⁻
Silvestre	EX33	0	3	4	4	0	1	1	2	0	3	3	0
	BY4741	0	3	6	6	0	2	2	2	0	2	1	0
Afectados en síntesis de manoproteínas	<i>mnn1</i>	0	2	4	2	0	0	1	1	0	2	1	0
	<i>mnn2</i>	0	3	5	5	0	0	1	2	0	1	2	0
	<i>mnn5</i>	0	3	4	5	0	0	1	2	0	1	1	0
	<i>mnn6/ktr6</i>	0	3	5	6	0	1/0	2	2	0	1	1	0
	<i>mnn9</i>	0	5	6	6	0	0	3	3	0	4	4	0
	<i>kre2</i>	0	1	5	5	0	1	1	1	0	3	2	0
	<i>ktr1</i>	0	3	5	5	0	0	2	2	0	3	3	0
	<i>ktr2</i>	0	3	5	5	0	0	1	1	0	2	2	0
	<i>ktr3</i>	0	3	5	4	0	0	2	1	0	2	3	0
	<i>ktr4</i>	0	3	5	5	0	1/0	1	2	0	2	1	0
	<i>ktr5</i>	0	3	5	5	0	1/0	1	2	0	2	1	0
	<i>ktr7</i>	0	2	5	4	0	0	1	1	0	2	1	0
	Afectados en síntesis de glucano	<i>kre1</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>kre6</i>		0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0

Dimensiones del halo de muerte/inhibición a **pH 4 y 20°C**; 0 = no hay halo; 1/0 = dudoso; 1= halo 1mm; 2= halo 2mm; 3=halo 3mm; 4= halo 4mm; 5=halo 5mm y 6=halo 6mm.

III.2.5. Caracterización genotípica de las nuevas levaduras killer Kbarr.

Las levaduras Kbarr contienen en su interior moléculas de ácidos nucleicos de tamaño similar al de los dsRNA víricos característicos de las levaduras killer *S. cerevisiae*, al menos uno de tamaño grande (L, de 4,6 kb) correspondiente al virus “helper”, y al menos uno de tamaño mediano (M, menor de 2 kb) que codifica para la correspondiente toxina killer. En las *Torulaspota* Kbarr-1 aparece la molécula de 4,6 kb acompañada de otra de 1,7 kb; y en las *Torulaspota* Kbarr-2 aparece la molécula de 4,6 kb acompañada de otras dos de tamaño mediano, una de aproximadamente 1,55 kb y otra de 1,3 kb (**Fig.III.10**). Estas moléculas de tamaño mediano no aparecieron en las levaduras *Torulaspota* sin fenotipo killer, indicando que son las responsables de codificar las correspondientes toxinas.

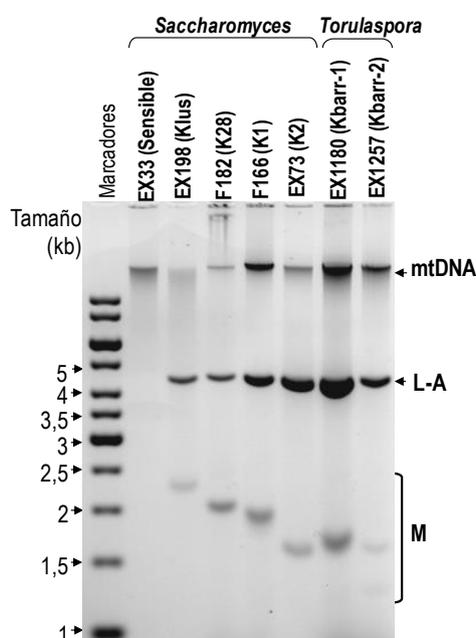


Figura III.10. Presencia de posibles genomas de dsRNA de virus L y M en las levaduras *Torulaspota* Kbarr-1 (EX1180), *Torulaspota* Kbarr-2 (EX1257), y en levaduras de referencia *S.cerevisiae* killer-sensible (EX33), killer Klus (EX198), K28 (F182), K1 (F166) y K2 (EX73). Los ácidos nucleicos fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,1%. Se muestra el gel teñido con bromuro de etidio. Marcadores: 1 kb DNA Ladder de Biotools.

Se confirmó que el genoma de los virus es dsRNA mediante el tratamiento de las preparaciones de ácidos nucleicos con DNasa I y RNasa. El DNA mitocondrial desaparece con el tratamiento de DNasa I, mientras que permanecen intactas las supuestas moléculas de dsRNA vírico; las cuales desaparecen con el tratamiento de RNasa A en baja concentración de NaCl (esperable para moléculas de ssRNA y

dsRNA), y se degradan parcialmente con el tratamiento de RNasa A en alta concentración de NaCl (esperable solo para moléculas de dsRNA) (**Fig. III.11**).

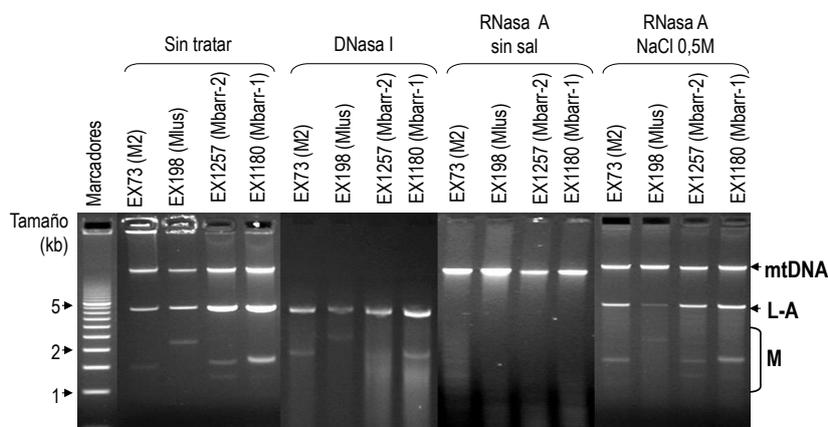


Figura III.11. Tratamiento con nucleasas de los ácidos nucleicos aislados de distintas levaduras killer y sensibles. Las muestras sin tratar y después de digestión con DNasa I, o RNasa A en presencia de baja y alta concentración de sal (NaCl 0,5M), fueron separadas mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,1%. Se muestra el gel teñido con bromuro de etidio. Marcadores: 500pb Molecular Ruler de BioRad.

Se confirmó que la molécula de dsRNA de tamaño mediano (desde ahora Mbarr) contiene el gen de la toxina Kbarr porque los mutantes resistentes a cicloheximida obtenidos a partir de levaduras *Torulaspota* killer Kbarr que pierden el fenotipo killer también pierden la banda de dsRNA de tamaño mediano, mientras que los mutantes que no pierden el fenotipo killer conservan aún dicha banda (**Fig. III.12**).

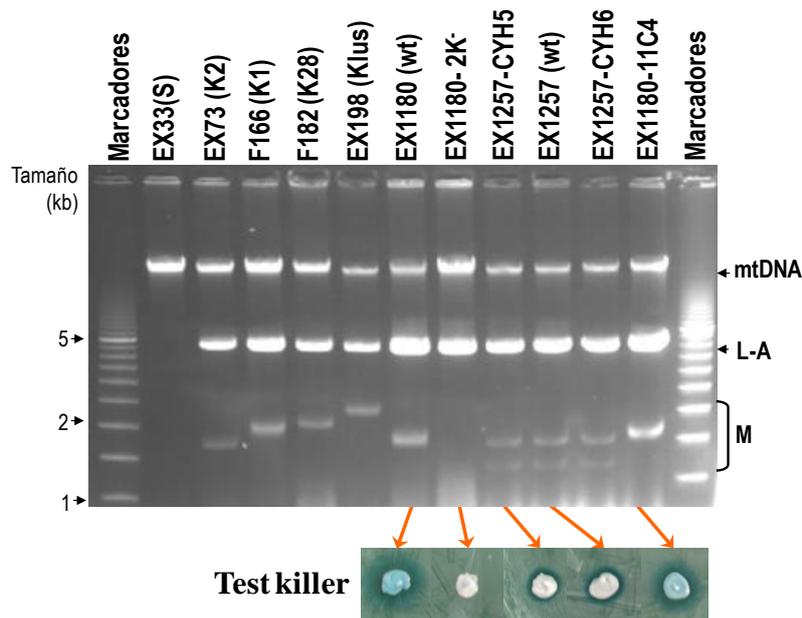


Figura III.12. Presencia de genomas de dsRNA de virus L y M en levaduras de referencia *S.cerevisiae* killer-sensible (EX33), killer K1 (F166), K2 (EX73), K28 (F182), y Klus (EX198); en las levaduras *Torulaspora* Kbarr-1 (EX1180) y Kbarr-2 (EX1257); mutantes killer resistente a cicloheximida obtenidos a partir de EX1180 (EX1180-11C4) o EX1257 (EX1257-CYH5 y EX1257-CYH6); y un mutante no-killer resistente a cicloheximida obtenido a partir de EX1180-11C4 (EX1180-2K⁻). Los ácidos nucleicos fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,1%. Se muestra el gel teñido con bromuro de etidio. Marcadores: 500pb Molecular Ruler de BioRad.

Así pues, el fenotipo Kbarr parece estar codificado en virus con genomas de dsRNA de tamaño mediano (TdV-Mbarr), cuya longitud varía de 1,3 a 1,7 kb; siendo los virus de levaduras vínicas con el genoma más pequeño de los descritos hasta la fecha junto con los virus ScV-M2 de 1,3 a 1,75 kb (Maqueda et al., 2012). Parece que TdV-Mbarr depende de TdV-LAbarr para replicarse y mantenerse en la célula ya que nunca se aislaron levaduras Kbarr sin el dsRNA de 4,7 kb.

III.2.6. Caracterización molecular de los genomas víricos de las levaduras killer Kbarr.

III.2.6.1. Purificación de los dsRNA víricos.

La secuenciación del genoma del virus ScV-Mlus fue realizada previamente a este estudio utilizando un método convencional. Básicamente: se obtuvieron secuencias parciales de cDNA mediante rtPCR con oligonucleótidos de secuencia aleatoria, se clonaron en un vector, se secuenciaron con un oligonucleótido de secuencia conocida

ubicada en dicho vector, se montó la secuencia completa del virus considerando los solapamientos de las distintas secuencias parciales y, finalmente, se completó la secuencia de los extremos del dsRNA con la técnica de secuenciación 5' y 3' RACE (Rodríguez-Cousiño et al., 2011). Como este procedimiento es relativamente largo y consume mucho tiempo, para secuenciar el genoma de los virus de las levaduras Kbarr optamos por poner a punto un método basado en Secuenciación de Nueva Generación (Next Generation Sequencing o NGS).

La secuenciación de estos dsRNAs víricos presenta ciertos inconvenientes respecto a la secuenciación más usual de DNA. Al tratarse de dsRNA hay que desnaturalizarlo previamente antes de convertirlo en cDNA mediante rtPCR, lo cual es un proceso difícil de optimizar. En muchos casos no se dispone de secuencias conocidas, con lo cual hay que realizar una secuenciación “*de novo*” utilizando oligonucleótidos aleatorios para obtener inicialmente el cDNA. Estos genomas víricos son relativamente grandes, hasta 4,7 kb, lo que dificulta obtener un cDNA con la secuencia completa ligando oligonucleótidos de secuencia conocida en los extremos del dsRNA para su posterior amplificación (cDNA) y secuenciación. Finalmente, los virus de tamaño mediano portadores de los genes de las toxinas killer contienen una o más secuencias centrales ricas en pares A-T, lo que dificulta el funcionamiento continuado de las rt-polimerasas impidiendo la obtención de cDNA con la secuencia completa. Esto nos obliga a obtener secuencias parciales sin posibilidad de obtener la secuencia correcta de estas zonas ricas en pares A-T, como ya ocurrió con la secuenciación del virus Mlus (Rodríguez-Cousiño et al., 2011).

La mayoría de estos inconvenientes se podrían evitar utilizando procedimientos de NGS, aunque pueden surgir nuevos inconvenientes inherentes a estas tecnologías. Se trata por ejemplo de fragmentar correctamente la molécula de dsRNA en fragmentos del tamaño preciso para conseguir posteriormente (mediante rtPCR) los fragmentos de cDNA del tamaño correcto requerido para ser secuenciados eficientemente con NGS; o de obtener previamente cDNA de secuencias totalmente desconocidas para fragmentarlo correctamente y obtener estos fragmentos con el tamaño requerido. Para solventar estos inconvenientes se hacía necesario obtener cantidades relativamente grandes de dsRNA vírico purificado con el fin de poder probar distintas estrategias, algunas de las cuales requieren cantidades relativamente altas de dsRNA, y optimizar así la mejor alternativa de NGS. En este apartado se describe el uso de dos métodos de purificación de estos dsRNA víricos y se comparan sus rendimientos.

Los ácidos nucleicos de las levaduras Kbarr se obtuvieron mediante un método simplificado (escalado a nivel de midipreps, **Apartado II.11.2**) que permite extraer simultáneamente mtDNA, fragmentos de DNA nuclear y dsRNA vírico (Maqueda et al., 2011b). Con carácter previo, se purificó el conjunto de los dsRNA de estas midipreps con columnas de celulosa como se describe previamente (Rodríguez-Cousiño et al., 2011). Aunque esta purificación fue muy buena (**Fig. III.13**), decidimos no seguir utilizando este procedimiento porque el rendimiento fue muy bajo (menos del 10% del dsRNA original) y aún se requería realizar una electroforesis posterior para separar los distintos dsRNAs (LA, LBC y Mbarr). En consecuencia, se realizaron electroforesis en 1,2% de agarosa de bajo punto de fusión, a bajo voltaje con la máxima cantidad posible de muestra (midiprep sin purificar) como para obtener una buena resolución de las bandas de dsRNA víricos (**Fig. III.14**). Se cortaron las bandas con un cúter estéril y se purificaron los dsRNAs con dos métodos alternativos: Un método convencional con un kit comercial (RNaid® Kit, Q-Biogene) que es muy caro y solo permite usar cantidades limitadas de fragmentos de agarosa (Método 1, **Apartado II.11.6.1**); y un método alternativo con jeringa y papel de filtro, basado en un método previo para aislamiento de DNA a partir de geles de agarosa (Grey and Brendel, 1992), más barato y rápido, y escalado convenientemente para usar cantidades mayores de fragmentos de agarosa (Método 2, **Apartado II.11.6.2**). El rendimiento medio fue mayor para el Método 2 (52%) respecto al Método 1 (45%) (**Fig. III.15**). No obstante, los rendimientos fueron más variables para el Método 2 (de 35% a 55%) respecto al Método 1 (de 40% a 51%). Esto indica que hay que cuidar de forma más exhaustiva la ejecución del Método 2 para evitar posible degradación de los dsRNAs.

Los dsRNA purificados por estos dos métodos, hasta cantidades cercanas a 40 µg, fueron concentradas mediante precipitación con isopropanol y enviadas al servicio de Next Generation Sequencing/Secuenciación Masiva, de la Unidad de Genómica Cantoblanco (Fundación Parque Científico de Madrid, C/Faraday, 7, 28049 Madrid) para su secuenciación.

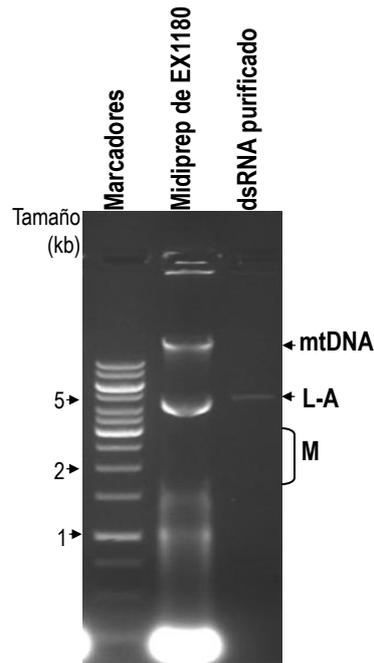


Figura III.13. Electroforesis en gel de agarosa al 1,2% de muestras de midiprep de ácidos nucleicos de la levadura *Torulaspota* Kbarr-1 (EX1180) antes y después de su purificación con columnas de celulosa CF-11 (Rodríguez-Cousiño et al., 2011). Se muestra el gel teñido con bromuro de etidio. Marcadores: 1 kb DNA Ladder de Biotools.

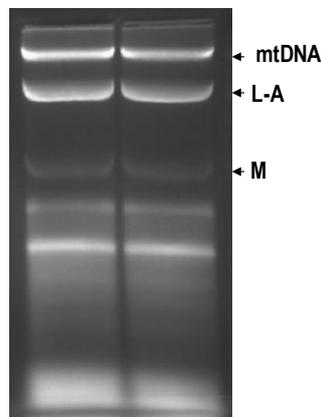


Figura III.14. Electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión (1,2%) de muestras de midiprep de ácidos nucleicos (25 μ L por en cada calle) de la levadura *Torulaspota* Kbarr-1 (EX1180). Se muestra el gel teñido con bromuro de etidio.

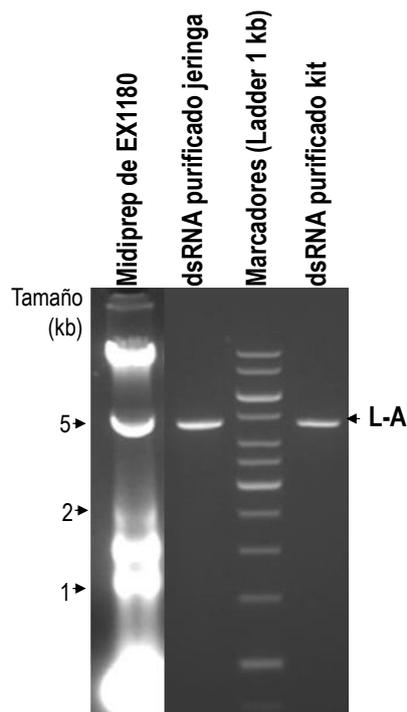


Figura III.15. Purificación de los dsRNA de la levadura *Torulaspora* EX1180 (Kbarr-1) a partir de las bandas cortadas de un gel de agarosa previo utilizando el método artesano con jeringa y papel de filtro o el kit comercial RNaid® (Q-Biogene). Las muestras, antes y después de purificar, se sometieron a electroforesis en gel de agarosa (1,2%). Se muestra el correspondiente gel teñido con bromuro de etidio. Marcadores: 1 kb DNA Ladder de Biotools.

III.2.6.2. Preparación de librerías de cDNA a partir de los dsRNA víricos purificados.

Teniendo en cuenta la dificultad de obtener el cDNA completo de los virus dsRNA experimentada en trabajos previos (Rodríguez-Cousiño et al., 2011), se decidió fragmentar directamente el dsRNA genómico viral con $ZnCl_2$ para facilitar la separación de las dos cadenas de RNA y su posterior retrotranscripción. Se realizaron varias pruebas con dsRNA purificado del virus LAbarr, con distintos tiempos de incubación y concentraciones de $ZnCl_2$. Los resultados iniciales no fueron satisfactorios ya que no se obtuvo prácticamente dsRNA fragmentado. Tras reducir drásticamente la concentración de $ZnCl_2$ y el tiempo de incubación a tan sólo unos segundos, en algún caso se pudo observar una pequeña cantidad de dsRNA fragmentado, pero los resultados nunca fueron reproducibles. No obstante, se intentó generar librerías a partir de estas pequeñas cantidades de dsRNA fragmentado, pero no hubo éxito. Todas estas pruebas supusieron un gran consumo de dsRNA purificado, tiempo y esfuerzo. Para poder realizarlas fue necesario obtener y purificar dsRNA viral varias veces y en gran

cantidad con el método de jeringa y papel de filtro puesto a punto para esta finalidad y descrito en el **Apartado II.11.6.2.**

A la vista de estos resultados negativos, se decidió abordar la generación de cDNA completo basándonos en el método descrito por Potgieter et al. (Potgieter et al., 2009) con algunas modificaciones. Este procedimiento parece adecuado para secuenciar genomas dsRNA víricos. En resumen, el protocolo consistió en ligar al dsRNA unos adaptadores que forman un loop de doble cadena (oligo PC3-T7) utilizando la enzima T4 RNA ligase específica de dsRNA (New England Biolabs, M0239S). A continuación se realizó la desnaturalización del dsRNA con 15% de DMSO (aunque en el artículo referido se utiliza hidróxido de metil mercurio como agente desnaturalizante, nosotros utilizamos el DMSO por ser mucho menos tóxico). Posteriormente se realizó una reacción de retrotranscripción utilizando la enzima SuperScripIII (Invitrogen, 18080-093). Tras eliminar el RNA con 100 mM NaOH, los cDNAs de ambas cadenas (sentido + y -) se anillaron a 65°C y, tras reparar los extremos de cadena simple añadiendo un primer paso a 72°C en la reacción de PCR, se amplificaron por PCR con una enzima de alta fidelidad (Fast Start High Fidelity PCR System dNTP Pack, Roche, 04 738 284 001). Este método se probó previamente con dsRNA comercial del virus Phi6 (Finnzymes, F-630), utilizando varias condiciones de ensayo, e incluyendo como primers adicionales oligo-dA y oligo-dT, ya que el genoma de algunos de los virus objeto de estudio podrían presentar una zona homopolimérica A/T central que podría dificultar el paso de las enzimas de retrotranscripción y la reacción de PCR. Aunque la reacción de ligamiento del oligo PC3-T7 al dsRNA parecía haber funcionado bien ya que obteníamos un *smear* tras realizar la rtPCR, probablemente no obteníamos el cDNA del virus, ya que también aparecía el mismo *smear* en el control de dsRNA sin retrotranscriptasa. La interpretación final fue que el material visible en el gel era realmente el dsRNA inicial, ya que no se apreció diferencia entre las muestras procesadas con y sin retrotranscriptasa (datos no mostrados).

Una vez más y a la vista de estos decepcionantes resultados, se decidió descartar esta segunda estrategia e intentar obtener el cDNA de los virus usando distintas combinaciones de random primers y enzimas en una reacción de rtPCR. De las tres combinaciones ensayadas con el fago Phi6, conseguimos cDNA con dos de ellas: random primers + 15% DMSO + retrotranscriptasa High Capacity RNA to cDNA (Applied Biosystems), y random primers + oligo dTVN + oligo dABN + 15% DMSO + retrotranscriptasa High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied

Biosystems). En ambos casos se pudo observar un *smear* con un tamaño medio en torno a 500pb que no aparece en las reacciones control sin añadir la correspondiente retrotranscriptasa (datos no mostrados). No se obtuvo cDNA vírico utilizando random primers + oligo dTVN + oligo dABN + 15% DMSO + retrotranscriptasa SuperScriptIII (Invitrogen).

Para obtener el cDNA a partir de la muestra de dsRNA purificado del virus LABarr se eligió el primero de los dos protocolos mencionados (random primers + 15% DMSO + retrotranscriptasa High Capacity RNA to cDNA de Applied Biosystems), ya que la adición de oligo dTVN u oligo dABN no modificó el resultado de la reacción (**Fig. III.16**). Adicionalmente se intentó obtener dos librerías similares de forma más rápida y directa con el kit “TruSeq RNA Sample Preparation” (Illumina) tomando como material de partida directamente dsRNA o dsRNA desnaturalizado con 15% DMSO, sin necesidad de obtener previamente el correspondiente cDNA. En los tres casos, siguiendo exactamente el protocolo de preparación de librerías del mencionado kit de Illumina, se obtuvieron buenos resultados (**Fig. III.17**) para la librería generada mediante PCR del cDNA de LABarr. Estas tres librerías se pueden mezclar antes de secuenciar ya que las habíamos marcado con distintos índices (adaptadores con secuencia específica) para cada librería. Una vez cuantificadas estas librerías por qPCR, se mezclaron de forma equilibrada, y se secuenciaron en un MiSeq en una carrera paired-end con una longitud de lectura de 2×150 bases. Las secuencias obtenidas se ensamblaron y analizaron por el equipo bioinformático de la empresa Biotechvana S.L. (Benjamin Franklin N° 12, Module 19, Technological Park of Valencia, 46980-Paterna, Valencia, Spain). Los resultados obtenidos, en relación con la secuencia previamente publicada de los genomas de los virus ScV-LA, ScV-LAlus y ScV-LBC de *S. cerevisiae* se comentan en el apartado **III.2.6.3.1** y **III.2.6.3.2**.

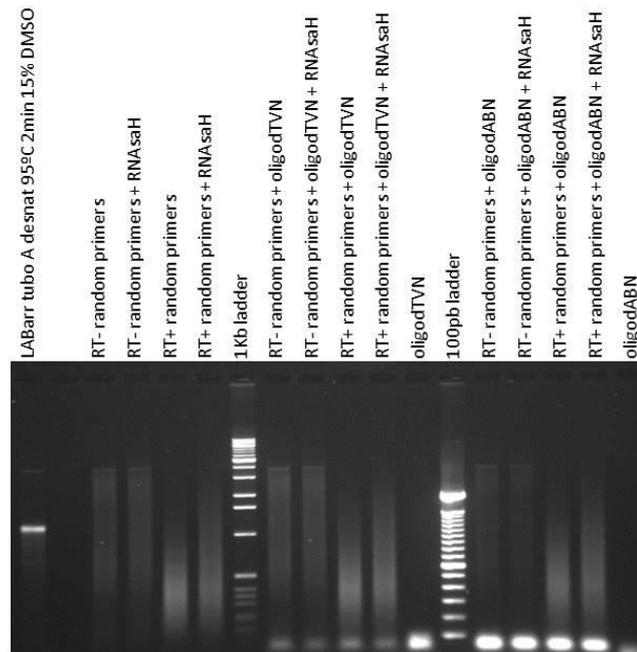


Figura III.16. Obtención de fragmentos de cDNA de tamaño aleatorio a partir del dsRNA purificado del virus LABarr utilizando random primers + High Capacity RNA to cDNA (Applied Biosystems). Se muestra la tinción con GelRed añadido en la preparación del gel de agarosa.

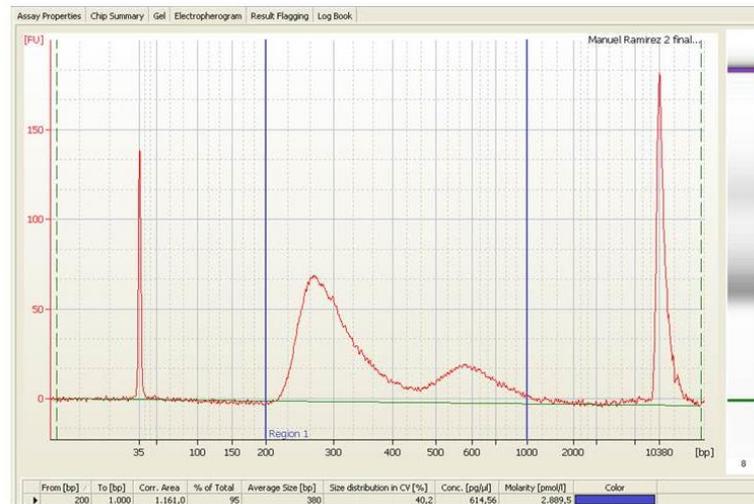


Figura III.17. Perfil del Bioanizador de la librería genética generada a partir del cDNA de LABarr obtenido con random primers + 15% DMSO + retrotranscriptasa High Capacity RNA to cDNA de Applied Biosystems. A la derecha se muestra una representación virtual de un gel de agarosa a partir de los datos del Bioanizador.

Los resultados del análisis informático de las secuencias fueron buenos para las tres librerías, aunque ligeramente mejores para la librería obtenida directamente a partir de dsRNA vírico utilizando random primers + 15% DMSO + la retrotranscriptasa SuperScriptIII (Invitrogen). Por esta razón se utilizó este mismo protocolo modificado

con la adición de oligo dTVN + oligo dABN para generar la nueva librería directamente a partir de dsRNA purificado del virus Mbarr-1 utilizando el protocolo de librerías de RNA TruSeq de Illumina. Esta modificación se sustenta, como ya se ha mencionado, en la posible existencia de secuencias ricas en pares A/T en el centro del genoma de este virus, ya que se ha descrito la presencia de este tipo de secuencias en todos los virus M de levaduras secuenciados previamente (Rodríguez-Cousiño et al., 2011). La librería obtenida (**Fig. III.18**) fue secuenciada en el sistema MiSeq de Illumina, con una nueva versión del kit de secuenciación (v3) y con un formato de lectura 2x80 bases, obteniendo una excelente calidad de las secuencias. Estas lecturas de secuencias se enviaron nuevamente a la empresa Biotechvana para su ensamblaje y análisis. Los resultados obtenidos, en relación con la secuencias previamente publicadas de los genomas de los virus M de levaduras, se comentan en el apartado **III.2.6.3.3**.

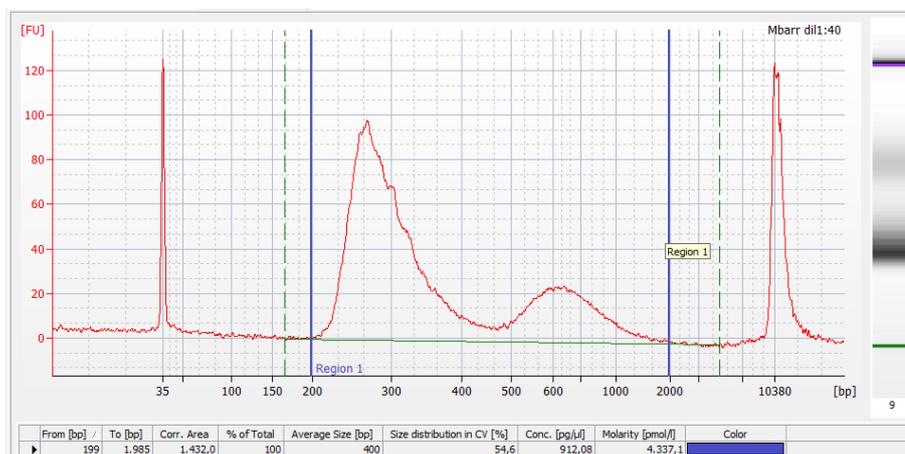


Figura III.18. Perfil del Bioanalizador de la librería genética generada a partir del cDNA obtenido directamente a partir de dsRNA purificado del virus Mbarr-1 con random primers + oligo dTVN + oligo dABN + 15% DMSO + retrotranscriptasa SuperScriptIII de Invitrogen. A la derecha se muestra una representación virtual de un gel de agarosa a partir de los datos del Bioanalizador.

A modo de resumen de este apartado queremos destacar que, después de probar varios protocolos para realizar la complicada tarea de obtener el cDNA de los virus para realizar secuenciación masiva (NGS), utilizando el último de los protocolos descritos, es decir combinando directamente dsRNA viral + radom primers + oligo dTVN + oligo dABN + 15% DMSO + retrotranscriptasa SuperScriptIII de Invitrogen, y aplicando el protocolo de librerías de RNA TruSeq de Illumina método de RNAseq (modificado tan solo por la adición extra de los oligos dTVN y dABN), se obtuvieron fragmentos de cDNA para elaborar librerías (mediante otra reacción adicional de PCR con random

primers + la enzima SuperScriptIII de Invitrogen) de todos los virus dsRNA de levaduras de este estudio con relativa facilidad.

III.2.6.3. Secuenciación, ensamblaje, y análisis de la secuencia de los dsRNA de TdV-LAbarr, TdV-LBCbarr y TdV-Mbarr-1.

Una vez obtenidas las librerías genéticas de las dos bandas de dsRNA vírico presentes en las levaduras killer Kbarr-1 (una de 4,6 kb presumiblemente correspondiente al virus helper TdV-LAbarr, y otra de 1,7 kb presumiblemente correspondiente al virus TdV-Mbarr-1 portador del gen de la toxina Kbarr-1), se secuenciaron en la misma Unidad de Genómica de la Fundación Parque Científico de Madrid (C/ Faraday, 7 – planta baja, Campus de Cantoblanco, 28049 – Madrid, Spain). De la banda de mayor tamaño se pudieron ensamblar dos secuencias claramente distintas. Una de ellas homóloga de los dsRNA de los virus ScV-LA y ScV-LAlus, y la otra homóloga del virus ScV-LBC. Esto indica claramente que en nuestra cepa de *T.delbrueckii*, al igual que ocurre en otras muchas levaduras *S.cerevisiae*, coexisten dos virus L de tamaño similar, LA y LBC (Rodríguez-Cousiño et al., 2011). De la banda de menor tamaño se pudo ensamblar una secuencia que no mostró ninguna homología con ninguna secuencia descrita previamente, ni siquiera con el resto de los virus M conocidos de levaduras, cosa que es de esperar ya que estos virus M conocidos tampoco muestran ninguna homología entre ellos (Rodríguez-Cousiño et al., 2011). A continuación se describe la secuencia y los posibles elementos estructurales relevantes de los genomas de estos tres virus.

III.2.6.3.1. TdV-LAbarr.

La secuencia ensamblada del genoma de este virus tiene una longitud de 4622 nucleótidos, suficiente como para justificar el tamaño de la banda de dsRNA LAbarr estimado en electroforesis (4,6 kb). Esta secuencia parece estar completa ya que muestra mucha homología con la secuencia completa del dsRNA de ScV-LA (60,8% ClustalW) y de ScV-LAlus (61,1% ClustalW), aunque esta homología es menor que la que comparten ScV-LA y ScV-LAlus (73%). No obstante, la región del cambio de fase entre Gag y Pol y la señal de encapsidación mantienen respectivamente un 85% y 87,5% de homología con las mismas regiones del genoma de ScV-LA (**Fig. III.19**), lo que pone de manifiesto la importancia de estas dos regiones en la multiplicación del virus (Rodríguez-Cousiño et al., 2013). Además, contiene la ORF de la proteína de la cápsida, la secuencia correspondiente a RNA-polimerasa, el sitio de cambio de fase para generar la molécula híbrida cápsida-RNA polimerasa (Gag-Pol), el stem-loop asociado

a dicho cambio de fase, el stem-loop implicado en la encapsidación del virus (VBS, solamente cambia un par T-A (T4189 y A4195) por un par C-G en las mismas posiciones del stem-loop, y desaparece un par al cambiar la C4180 por una A), el stem-loop del extremo 3' implicado en la replicación del virus (3'TRE), y la secuencia final encontrada también en ScV-LA y ScV-LAlus (CCATA[A/T]GC). Adicionalmente, en los tres virus se aprecia otra ORF (ORF lejana al dominio Gag) correspondiente exclusivamente a la secuencia de la RNA-polimerasa en la misma fase de lectura que el dominio polimerasa de Gag-Pol, que también aparece en ScV-LA y ScV-LAlus, siendo esta zona muy conservada en los tres virus. Incluso, en el virus ScV-LAlus se puede apreciar otro codón ATG de inicio previo, que originaría otra ORF previa (ORF cercana al dominio Gag) también con la secuencia de la RNA-polimerasa en la misma fase de lectura que el dominio polimerasa de Gag-Pol (**Fig. III.19**), aunque quizás esté demasiado cercana al codón de STOP de la proteína de la cápsida como para ser un codón de inicio efectivo. La existencia de estas ORFs correspondientes exclusivamente a la secuencia de la RNA-polimerasa supondría que los ribosomas que no sufrieran el deslizamiento hacia atrás (-1) en el sitio de cambio de fase (frame-shift) podrían reiniciar la traducción en la segunda ORF para producir un polipéptido independiente con la secuencia completa de la RNA-polimerasa, asegurando así una cantidad extra de esta actividad para la replicación del virus. Curiosamente, el intervalo variable de aproximadamente 44 aminoácidos, cuya única función parece ser la separación física de estos dos dominios (**Fig. III.20**) y cuya secuencia no parece importante en la multiplicación de ScV-LA (Rodríguez-Cousiño et al., 2013), queda ubicado entre los codones de inicio (ATG) de estas dos supuestas ORFs, cercana y lejana al dominio Gag. El alto grado de identidad en las secuencias de estos tres virus LA, especialmente en los motivos más relevantes desde el punto de vista funcional, indica claramente que están filogenéticamente muy relacionados con un origen común cercano en su evolución.

Por otra parte, parece que en LAbarr falta la secuencia conservada 5'GAAAAA presente tanto en ScV-LA como en ScV-LAlus. Además de esto, curiosamente, la secuencia ensamblada de TdV-LAbarr tiene 14 nucleótidos extra en 5'-terminal, otros 17 nucleótidos no homólogos cercanos al 5'-terminal, y 17 nucleótidos más en el extremo 3' respecto a las secuencias de ScV-LA y ScV-LAlus (**Fig. III.19**). Se ha sugerido que el 5'GAAAAA terminal es la supuesta señal *cis* requerida para el inicio de la transcripción, como ocurre en otros virus de dsRNA, donde una región rica en pares A/U facilita la separación de las cadenas y el acceso de la RNA polimerasa a la cadena

molde para la transcripción conservativa. No obstante, estos tres virus contienen una región de unos 15 nucleótidos con casi o 100% de A/U que pueden ser responsables de facilitar esta separación de las dos cadenas de RNA.

La existencia de estas secuencias extras en (o cerca de) los teóricos extremos 5' y 3' podrían faltar en las secuencias de los dsRNA de los virus ScV-LA y ScV-LA_{us} secuenciados con otros métodos clásicos y en cuya ejecución se podrían haber perdido parte de las secuencias de los extremos de los dsRNA. Esto explicaría que, tras reiterados intentos, nunca se consiguiera realizar el *launching* de ScV-LA utilizando la secuencia publicada de este virus, como sí se ha realizado con otros virus de RNA más complejos como el de la gripe (Wickner et al., 2013). El *launching* consiste en poner el cDNA del virus en un plásmido, infectar levaduras con dicho plásmido, multiplicar el virus, retirar el plásmido y quedar el virus multiplicándose por sí mismo. Esto, según los expertos consultados, siempre hizo sospechar la falta de algunas secuencias terminales que podrían ser las que hemos encontrado en este estudio utilizando métodos de secuenciación de nueva generación, mucho más potentes y resolutivos que los utilizados previamente. También podría ocurrir que hubiéramos secuenciado ssRNA mensajero del virus, contaminante en nuestra preparación del dsRNA genómico, con secuencias adicionales que se hubieran podido añadir en “transcripción” (como ocurre con el extremo 5'-cap o poli-A en 3' de los mRNA eucariotas, o víricos (Fujimura and Esteban, 2011, 2013)), aunque parece que son muchos los nucleótidos adicionales para que se trate de esto último.

LA	AACCATAACAGGCTGTACAATCAGTTTTACTGACGACAACTGTTAGCTCAAATTATG	929
LAlus	AATCATAATCGACTTTACAACCAGTTCTATACGGCCGCTCAACTATTAGCTCAGATTATG	929
LAbarr	AATCACAACAGAGTGTACAATCACTTTGAAACTGCGGCGCAGATACTAGCACAGCTGATG	954
	** ** * . * . * * * * * * * * * * * * * * * * * * . * * * * * * * * * * * *	
LA	ATGAAACCTGTCCCTAAGTGGCTGAGGGCTACGCTTGGCTGATGCATGACGCATTGGTC	989
LAlus	ATGAAACCAGTACCTAAGTGGCTGAGGGCTACGCTTGGCTGATGCATGACGCATTGGTC	989
LAbarr	GTTAAGCCTTTGCCAATAACGCTGAGGGCAGCATGGTTACTACATGACCCGGTTGTG	1014
	. * * * . * * : * * * * * . : *	
LA	AATATACCAAAATTTGGGTCTATTCGAGGAAGGTACCCCTTTTTGTTATCAGGTGATGCA	1049
LAlus	AACCTGCGCAAGTTCGGGTCCGTTAGAGGGCGTTACCCGTTCTTACTTGCAGGTGACGCT	1049
LAbarr	AATATACCTAAGTTCGGGTGAGTTAGGGCAGATATCCGTTTACTCAGCGGTGAAGCT	1074
	** . : . *	
LA	GCGTTGATTCAGGCTACAGCCCTAGAAGACTGGTCTGCTATCATGGCAAACCCGAGCTG	1109
LAlus	GCCCTGATTGAGCAACAGCACTTGAAGACTGGTCTGCTATCATGGCAAACCCGAGCTG	1109
LAbarr	TCTTTGGTGAAGCAACAGCACTAGAAGATTGGTCTGCTATCATGGCAAACCCGAGCTG	1134
	* * * . *	
LA	GTGTTCACTTACGCGATGACAGTGTGAGTGTGAGTGTAAACACCGACTATACTTACGTCGC	1169
LAlus	ATTTTTACCTACGCTATGACAGTGTGAGTGTGAGTGTAAACACCGACTATACTTACGTCGC	1169
LAbarr	GTTTTTACCTATGACAGTGTGAGTGTGAGTGTAAACACCGACTATACTTACGTCGC	1194
	. *	
LA	GTTAAGAAAACAGGCTTCGGCACAACATATAGATGACAGCTATGAAGATGGAGCGTTTTTG	1229
LAlus	GTCAGAAAACAGGCTTCGGCACAACATATAGATGACAGCTATGAAGATGGAGCGTTTTTG	1229
LAbarr	ATCAAGAAAACAGGCTTCGGCACAACATATAGATGACAGCTATGAAGATGGAGCGTTTTTG	1254
	. *	
LA	CAACCGGAGACGTTTCGTTACAGCCGCTAGCATGTTTACCGGACAAGATGCGCCCTTA	1289
LAlus	CAACCTGAGACCTTCGTTACAGCCGCTAGCATGTTTACCGGACAAGATGCGCCCTTA	1289
LAbarr	TCACCTGAGACGTTTCGTTACAGCCGCTAGCATGTTTACCGGACAAGATGCGCCCTTA	1314
	. *	
LA	AATGGGATGTCAGATGTGTATGCTACTTATCCAGATCTTCTAGAATTTGATGCTGTACA	1349
LAlus	AACGGTATGCTGATGTGTATGCTACTTATCCAGATCTTCTAGAATTTGATGCTGTACA	1349
LAbarr	AACGGAATGTCAGACGCTTACGTATTTTATCCTCAATTTGTTGATCTCGACACTGTGACT	1374
	** *	
LA	CAAGTACCCATCAGGTCATTGAGCCGCTGGCTATAACATGTTGATGATCATTAGTG	1409
LAlus	CGTGTCCCTGTTACGCTACTAGAACCTGAAGGCTATAATATACAGGATGGCGCCTGGAA	1409
LAbarr	TATATACCTGCCAAGTTCGTTGAGCCGCTGGCTATAACATGTTGATGATCATTAGTG	1434
	. : . * * * * * . . . * * . : * * . * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
LA	GTTGTGGGTGTTACCTGTGGCATGTTACCATACATGATATTTCCAGTAGCTGCGTTTGAT	1469
LAlus	GTGACAGGTGTTCCGATTGCTGCTGCGCTTACATGATTTTCCCTGTGCGAGCTTTGAT	1469
LAbarr	GTTTTGGGATGTTTCCGATTGCTGCTGCGCTTACATGATTTTCCCTGTGCGAGCTTTGAT	1494
	* *	
LA	ACTGCAAACTCTACTGTGGGAATTTTGTCAATTAAGGCTGCTAACAAAGTATCTCCGTAAG	1529
LAlus	GAACTAACCCCTATTCTGGTAGTTTGTATTAAGCCTGCGCTGAAATACCTACGCAAA	1529
LAbarr	GATGCAAACTCTACTGTGGGAATTTTGTCAATTAAGGCTGCTAACAAAGTATCTCCGTAAG	1554
	. : *	
LA	GGTGCCGTGTATGATAAACTCGAAGCATGGAAGTTGGCTGGGCTGAGGGTAGCCGGG	1589
LAlus	GGTGCTGTATGCAAACTAGAGCCCTGGAAGCTGGCTGGGCTGAGGGTAGCCGGG	1589
LAbarr	AGGGCCGTTTATTACCATTCGAGCCCTGGAAGCTAGCCTGGGCGGCGAGAATCGCTGGG	1614
	. *	
LA	TATGACACTCACTTCAAAGTGTATGGCGATACACACGGCTTAACTAAGTTCTATGCTGAC	1649
LAlus	TACGACTCACTTCAAAGTGTATGGCGATACACACGGCTTAACTAAGTTCTATGCTGAC	1649
LAbarr	TATGATACTGCGTATCTATACCTGGCGACAATACCGGCTTATCTAAGCTATATGACGAC	1674
	** *	
LA	AACGGTGACACATGGACACACATACCTGAATTTGTCAGTACGCGTACGTTGATGGAAGTA	1709
LAlus	AATAGCGATAGTTGGACACACATACCGAATTCGTTAGTGTGAGAAGTTACCGGAAGTG	1709
LAbarr	AATGCCGATTCCTGGACTCACATACCGGACTCATTCTCAATCCTGAAGCAGAATTTATT	1734
	* *	
LA	TTCGTTACTGCCATCGAAGCAGAGCTAGACATTTGTTGAACTACCTAGACTGAATTC	1769
LAlus	TATGTAATAATTTGAAGCTAGAGCCAGACACTTTGTTGAACTACCTAGACTGAATTC	1769
LAbarr	TATGTGACTGATCTAGAGGAGGAGAAGGCCTTTATAGACTTCCGCAACATGACCAAT	1794
	* : * * * * * . *	

LA	CTATTCTCGCATATGCTCCTGACACTAAGTGAAAAATTTGTACCAATTTCTTGGATTCTA	2729
LAlus	CAATAATGACGTACGTACTCCTTTGGACGAAAAGTTTCATACCTTTGTTTCTAGACTCAC	2729
LABarr	CCATAATGTTGTATGCTCCTCACATCAAACGACACCACCGGCATTGTTCTAGATTCTA	2754
	* ** : * . ** ** * ** * : . . . * * . : . * : * ** * * * * * .	
LA	GAGCAATATGGGTCGGTGGCCTGGCCTGATGCTCTGACTGCACGCTCAAGGCCAGTA	2789
LAlus	GGACAATATGGCAGGTAGTAAAGGACCTGAAGAACTAACGCCAGACTCAAGAAGCGCA	2789
LABarr	AAGCTATATGGTCGAAGACTGACGGGAAGATGAATTATCTGACCGACTCAAGCGAGTA	2814
	. . . * : * * * * * * . . : * : * . : * : * . : * * * * * . * .	
LA	GTGGGCAGATCAAGAGCATAACACCGGCTGATTACGAACCACTCACTGAACATTCGAGT	2849
LAlus	GCGGGCAGATTAAGAGTGTTCATACAGCTGACTATGAGCCACTGACGGAACTGTTGAAAT	2849
LABarr	GCGGCAGATCAAGTCAATTCACACAAGTGAAGTGGAGCCTTTAACCGAGTTGTTGAGC	2874
	* ** * * * * * * * : . * : * * * . * * * . : * * * * : * * * * . * * * * .	
LA	TAGCAGTATTGATGAACCGAGGTGTTGGCCATGCTCTTGGCAAGCTGAAAAGGATCATC	2909
LAlus	TGGCTGTGCTCATGAACGAGGCGTTCGGGCATGTATCTCGGAAGACTGAAAAGAGACACA	2909
LABarr	TTCAGTCTTGTATGAACCGGGTATAGGACATGTTGACTGGAATGGGAAAAGACATAACA	2934
	* .	
LA	GCTTGAATCCCGACGTGGCTGTAGTTGATCAAGCAGGCTATATCTGTTGTGCGCGACA	2969
LAlus	GAGAGAATCCGGATGTAGCAAACGTTAATCAACAAGCACTCTACGCGTGCCTACGTGACA	2969
LABarr	GGACCAACCTAATACTGTGAATGTAGATCAAAGATGCTCTATAGTGTGTACCGGATA	2994
	* * * * * * * . * . * . : * : * * * * * . . . * * * * * * * * * * * * *	
LA	TGTTCAAGGATCAAGCAGAGCTATAAATATCCCTTTATGACGTGGGATGACTACACTG	3029
LAlus	TGTTCAAGGGGCCAAGCAGACTTATGATTATCCTTACATGACATGGGATGACTATACGT	3029
LABarr	TGTTTGAAGATTCTAAGCAATCGTACAATACCCGTATATGACATGGAACGACTATGCGG	3054
	* * * * * * * . * * * * * * * : *	
LA	CAAACAGATGGGAGTGGGTTCCAGGTGGCAGTGTCCACTCTCAATACGAAGAAGACAACG	3089
LAlus	CAAGTCGGTGGGAATGGGTGCTGGAGGAAGTGTTCATCTCAGTACTCCGAGGATGATG	3089
LABarr	ATAGTAGTGGGAATGGATACCTGGAGGTAGTGTACACTCGCAATACCCTCAGGATGATG	3114
	. : * . * . *	
LA	ATTATATCTATCCTGGTCACTAGTATACTAGGAACAAGTTCATAACTGTTAACAAAATGCCA	3149
LAlus	AATATATATTTCCAGGACAATATACTAGGAACAAGTTTATTACAGTCAACAAAATGCCA	3149
LABarr	AATACATAGTCCCTGGTCTCTACACCAGGAATAAGTTCATAACAGTAAACCTCATGCCGA	3174
	* : * * * * . : * : * * * * : *	
LA	AACACAAAATATCTAGAATGATAGCATCACCGCCTGAGGTACGAGCTTGGACGTGACGA	3209
LAlus	AGCATAAGATCCGCGGTATGATAGCATCTACGCTGAAGTTAGGGCATGGACCTCAACGA	3209
LABarr	AGAATAAGTTAGCCTCAATCCGCGCATCGAAACCAGAAGTCAGAGCATGGACATCAACTA	3234
	. . . * * : * . * . : * * . * * * * * . . . * * * * * * * * * * * * * *	
LA	AGTACGAATGGGCAAGCAACGTGCTATCTACGGGACGGATCTACGAAGTACACTGATAA	3269
LAlus	AGTATGAATGGGGTAAACAAAAGAGCTATATATGGCACAGACCTACGGAGCACACTTATCA	3269
LABarr	AATACGAGTGGGGAAACAGAGAGTATCTATGGAACGTACTGAGGAGCACTCTGATAA	3294
	* . * * * * * * * * * * * . : *	
LA	CTAACTTTGCAATGTTTCAGGTGCGAGGATGTTCTCACTCACAAGTTCAGTGGGCGAC	3329
LAlus	CTAACTTCGCTATGTTTCAGATGTGAAGATGTGTTAACACATAAAATTTCTGTAGGTGATC	3329
LABarr	CTAATTTGCGATGTTTCAGATGCGAGGACGTACTTAAACACAAGTTTCTGTTGGCGATC	3354
	* *	
LA	AGGCAGAGGCAAGGTGCACAAACGGGTGAACATGATGCTGGACGGTGCCTCTAGTT	3389
LAlus	AAGCTGAAGCTGCGAAGGTCCACAAACGTGCAACATGATGCTAGACGGTGCATCGAGTT	3389
LABarr	AAGCAGAAGCAAGTAAGTTTCATAAAAGGATTTCCATGATGCTAGGGAATGCGTCTAGTT	3414
	* . * : * * * * : . * * * * * * * * * * * . * : * * * * * * * . . * * * * * *	
LA	TCGCTTCGATTATGATGACTTCAATTCTCAGCATTCAATAGCTAGTATGTATACGGTTT	3449
LAlus	TCTGTTTTGATTACGACGACTTTAATTTCCAGCATTCAATAAGCAGCATGTACACAGTAC	3449
LABarr	TTGTTTTGATTATGACGACTTCAATTCTCAGCACTCTATTTTCGAGCATGTACACTGTGT	3474
	* *	
LA	TGTGCGCTTTCAGGGACACATTTAGTCGCAACATGCTGATGAACAAGCAGAGGCGATGA	3509
LAlus	TATGTGCTTTCAGAGACGCTTTCACACGTAATATGTCATTGAACAACCGGAGGCTATGG	3509
LABarr	TGTTGGCTTTCAGGGATGCTTACTCTCGTAATATGTCGCCAGCTCAGTTGCGTGGCATGG	3534
	* *	
LA	ACTGGGTGTGTGAGTCCGTCAGACACATGTGGGTACTAGATCCCTGATACCAAGGAGTGGT	3569
LAlus	ATTGGGTATGTGAGTCAAGCAGTGTGGGTTTTAGATCCGGATACTAAGACTTGGT	3569
LABarr	ATTGGGTATGTGAATCAACCAACATATGTATGCTAAGGACCCGGGACAAACGACTGGT	3594
	* *	


```

LA      TTGGGCAGGCTAGATATGCTATGCAAGCAGCCCTTGATAGTTCTGATCCACTCCGGGCAT 4529
LAlus  TCGGACAAGCTAGATTTGCGATGCAGGCGGCCTTAGATAGTTCCGATCCTTAAAGAGCAC 4529
LAbarr GAGGCGAGGGGCCATGGCAGTTAACGCTGCTATTGCGAGCGCCGATCCTCTGCGGGCAC 4554
      ** * . . . : ** . * . * * * * * : * . * * * * * : * . * * *
      * . * . . . : ** . * . * * * * * : * . * * * * * : * . * * *

LA      TACAGGTCATACTGT-AATTGCCAAAAGATAATGGGAATTACCCATATGC----- 4579
LAlus  TACAAATATCTTATTGAAGTGCICGAACGATGAGGGTTTTACCCATATGC----- 4580
LAbarr TTCAAATTCAGTATTAATCACTAGGGAAAGAGATGGATTTAATCCATAAAGCATACCACCT 4614
      * : * . * * * * * : : . * . . . : * * * * * : * * * * * : * * * * *
      * : * . * * * * * : : . * . . . : * * * * * : * * * * * : * * * * *
      Stop of Gag-Pol      Stem-loop for replication ( $\Delta G = -3.3$  kcal/mol)

LA      -----
LAlus  -----
LAbarr ATATCAGG 4622
    
```

Figura III.19. Secuencia de nucleótidos del cDNA de la cadena (+) del dsRNA de TdV-LAbarr y su homología con los dsRNAs de ScV-LA (original) y ScV-LAlus. Esta secuencia se muestra como DNA porque se obtuvo a partir del correspondiente cDNA. El análisis de homología se realizó con el programa ClustalW (Thompson et al., 2003). (*) indica nucleótidos idénticos. Doble punto (:) y punto (.) indican respectivamente transición y transversión de nucleótidos de ScV-LA por otros nucleótidos en ScV-LAlus o TdV-LAbarr. Los motivos relevantes del extremo 5' conservado de ScV-LA y ScV-LAlus, el codón ATG de comienzo (Gag y Gag-Pol, Pol ScV-LAlus?, y Pol ScV-LA, ScV-LAlus y TdV-LAbarr?) y los de final (stop de Gag y Gag-Pol), lugar del frame-shift, stem-loop asociado al frame-shift, stem-loop asociado a la encapsidación (VBS), y stem-loop asociado a la replicación (3'TRE) del virus se muestran en negrita y sombreados en gris. La región 5'-terminal rica en pares A/U se muestran subrayados.

Respecto a la secuencia de aminoácidos de la proteína Gag-Pol de TdV-LAbarr, muestra un 61% de homología con la de ScV-LA y un 62% con la de ScV-LAlus, mientras que las proteínas de ScV-LA y LAlus muestran una homología entre sí mucho mayor del 87%. Dada esta homología, es de esperar que la estructura tridimensional y la función de estas tres Gag-Pol sean muy similares. De hecho, en las tres proteínas se aprecia el aminoácido His154 de la proteína Gag involucrado en el 5'-cap-snatching (aunque en TdV-LAbarr está en la posición 153) más los cuatro residuos cruciales para el reconocimiento del 5'-cap (Tyr-150, Asp-152, Tyr-452 y Tyr-538) (Fujimura and Esteban, 2013), y los cuatro motifs conservados (A, B, C y D) en la región central del dominio Pol de las RdRps (100% de homología en las tres Gag-Pol) (Bruenn, 2003) (**Fig. III.20**).

LA	RAIWVGEPPDALTARLKASSGQIKSIHTADYEPLTELFELAVLMNRGVGHVSWQAEDKH	960
LAlus	RTIWQGSKGPEELTARLKKASGQIKSVHTADYEPLTELFELAVLMNRGVGHVSWKTEREH	960
LABarr	KAIWSKTGDELESDRLKRVSGQIKSIHTSELEPLTELFELQVLMNRGIGHVDWNGERHN	958
	::* * : * : * * * :*****:***: ***** * : * : :	
LA	RLNPDVAVVDQARLYSCVRDMFEGSKQTYKYPFMTWDDYTANRWEWVPGGSVHVSQYEEDN	1020
LAlus	RENPDVANVNQALYACVRDMFEGAKQTYDYPMYMTWDDYTSSRWEWVPGGSVHVSQYSEDD	1020
LABarr	RTNPNTVNVQDKMLYSVVRDMFEDSKQSYKYPMYMTWDDYADSRWEWVPGGSVHVSQYQDD	1018
	* * : . . * : * * : ***** : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :	
LA	DYIYPGQYTRNKFITVNKMPKHKISRMIAS <u>PPPEVRAWTSTKYEWGKORAIYGTDLRSTLI</u>	1080
LAlus	EYIFPGQYTRNKFITVNKMPKHKIARMIAS <u>TPPEVRAWTSTKYEWGKORAIYGTDLRSTLI</u>	1080
LABarr	EYIVPGLYTRNKFITVNLMPKNKLASIGAS <u>SKPEVRAWTSTKYEWGKORAIYGTDLRSTLI</u>	1078
	:** * * ***** * : * : : * * *****	
	▶ — A — ◀	
LA	<u>TNFAMFRCEDVLT</u> HKFPVGDQAEAAKVHKRVNMMLDGASSFCFDYDD <u>FNSQHSIASMYTV</u>	1140
LAlus	<u>TNFAMFRCEDVLT</u> HKFPVGDQAEAAKVHKRVNMMLDGASSFCFDYDD <u>FNSQHSISSMYTV</u>	1140
LABarr	<u>TNFAMFRCEDVLT</u> HKFPVGDQAEASKVHKRISMMLGNASSFCFDYDD <u>FNSQHSISSMYTV</u>	1138
	***** : * : ***** : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :	
	▶ — B — ◀	
LA	<u>LCAFRDFTSRNMSDEQAEAMNWVCE</u> SVRHHMVLDPDTKEWYRLOGTLL <u>SGWRLTTFMNTV</u>	1200
LAlus	<u>LCAFRDAFTRNMSIEQREAMDWVCE</u> SVKHHMVLDPDTKTWYQLKGTLL <u>SGWRLTTFMNTV</u>	1200
LABarr	<u>LCAFRDAYSRNMSPAQLRAMD</u> WVCESTKHMYAKDPGTNDWYELKGTLL <u>SGWRLTTFMNTV</u>	1198
	* * * * : : * * * * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :	
	▶ C ◀	
LA	<u>LNWAYMKLAGVFDLDDVODSVHNGDD</u> VMSLNRVSTAVRIMDAMHRINARAOPAKCNLS	1260
LAlus	<u>LNWAYKLAGVFDLDDVODSVHNGDD</u> VMSLNRVSTAVRIMDAMHRINARAOPAKCNLS	1260
LABarr	<u>LNWAYMKVAGVFDITDVEDSVHNGDD</u> VMSLNRVSTAVKIMERMRLINARAOPAKCNLS	1258
	***** : * : ***** : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :	
	▶ D ◀	
LA	<u>ISEFLRVEHGMSSGGDGLGAOYLSRSCATLVHSRIE</u> SNEPLSVVRVMEADQARLRDLANRT	1320
LAlus	<u>ISEFLRVEHGMSSGGDGLGAOYLSRSCATLVHSRIE</u> SNEPLSVVRVMEADKTRLRDLANRT	1320
LABarr	<u>ISEFLRVEHGMSTCKSGLGAOYLSRSCATLVHSRIE</u> SNEPLSVRLLEADKTRLRDLSDRT	1318
	***** : * : ***** : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :	
LA	RVQSAVTAIKEQLDKRVTKIFGVGDDVVRDIHTAHRVCGGISTDTWAPVETKIITDNEAY	1380
LAlus	NIKASVTEIEEQLDKRRVTSIFKVDREVVKAIHTAHRVCGGISTDPWAPVETKIITDNEAY	1380
LABarr	TREDVLVNIKYELDMRAVNVFGADYNVQDIYKSHRVCGGINDDKWGSVDTEIHTDSGAY	1378
	: : . : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :	
LA	EIPYEIDDDPSFWPGVNDYAYKVWKNFGERLEFNKIKDAVARGSRSTIALKRRKARITSKKN	1440
LAlus	EIPYEIDDDPSFWPGVNDYAYKVWQNFGERLEFNKIKDAVSKGRNTIALKRRKARISAVKN	1440
LABarr	QIPYEIDDDPSFWPGVNDYARKAYNILGEKLEFNKIKSAVARGSRRTIAMKRRRVRVSTPT	1438
	:* ***** * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :	
LA	EFANKSEWERTMYKAYKGLAVSYANLSKFMSIPPMANIEFGQARYAMQAALDSSDPLRA	1500
LAlus	DFVNKSEWERTMYKAYKGLAVSYANLSKFMSIPPMANIEFGQARFAMQAALDSSDPLRA	1500
LABarr	EFINIKQWERAMYRAFKGVAISYYSLSKFMAVPPISGLDRGEGAMAVNAATASADPLRA	1498
	: * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :	
LA	LQVIL 1505	
LAlus	LQIFL 1505	
LABarr	LQILV 1503	
	* : * : :	

Figura III.20. Comparación con el programa de alineamiento ClustalW de la secuencia de la proteína Gag-Pol codificada por los genomas dsRNA de los virus ScV-LA (original), ScV-LAlus y TdV-LAbarr. El punto de unión de los dominios Gag y Pol (sitio de cambio de fase) se muestra con puntas de flechas entre los aminoácidos 580 y 581 de la Gag-Pol de LA. Asterisco (*) indica aminoácidos idénticos. Doble punto (:) y punto (.) indican respectivamente sustitución del aminoácido de ScV-LA por otro aminoácido conservado y semi-conservado en ScV-LAlus o TdV-LAbarr. El aminoácido His154 involucrado en la unión del m⁷Gp durante el 5'-cap-snatching se muestra sombreado en negro, los cuatro residuos involucrados en el reconocimiento del 5'-cap (Tyr-150, Asp-152, Tyr-452 y Tyr-538) sombreados en gris oscuro, y la región involucrada en el 5'-cap-snatching subrayada con doble línea. La región central conservada del dominio Pol de las RdRps se muestran con subrayado sencillo e incluye los cuatro motifs conservados (A, B, C y D) con 100% de homología en las tres Gag-Pol. Los residuos importantes de estos motifs están sombreados en gris claro.

III.2.6.3.2. TdV-LBCbarr.

Como en el caso de TdV-LAbarr, la secuencia ensamblada tiene una longitud suficiente (4593 kb) como para justificar el tamaño aproximado de la banda de dsRNA

TdV-LAbarr estimado en electroforesis, y también parece estar bastante completa ya que muestra homología con toda la secuencia del dsRNA del virus ScV-LBC original (51,3%). Además contiene la ORF de la proteína de la cápsida, el sitio de cambio de fase para generar la molécula híbrida Gag-Pol idéntico al de ScV-LBC, la ORF de la proteína híbrida Gag-Pol, un posible stem-loop asociado a dicho cambio de fase, un posible stem-loop implicado en la encapsidación del virus, y otro posible stem-loop del extremo 3' implicado en la replicación del virus. A diferencia de TdV-LAbarr, la secuencia ensamblada contiene menos nucleótidos (22 bps) que la secuencia de ScV-LBC original (4593 bps vs 4615 bps respectivamente), y además, esta vez sí aparece la secuencia conservada 5'GAAATT (**Fig. III.21**). Tal como ocurría en los virus LA analizados en el apartado anterior, se aprecia otra ORF correspondiente exclusivamente a la secuencia de la RNA-polimerasa en la misma fase de lectura que el dominio polimerasa de Gag-Pol, pero en esta ocasión los codones ATG de inicio en ScV-LBC y TdV-LBCbarr no coinciden en una zona de secuencia conservada en ambos virus. La existencia de esta segunda ORF supondría que los ribosomas que no sufrieran el deslizamiento hacia atrás (-1) en el frame-shift podrían reiniciar la traducción en la segunda ORF para producir un polipéptido independiente con la secuencia completa de la RNA-polimerasa, asegurando así una cantidad extra de esta actividad para la replicación del virus quizás fuera de los viriones. No obstante, en ambos casos habría que demostrar la existencia de la RNA-polimerasa libre en el citoplasma de la levadura, como ya se hiciera para detectar la proteína de fusión Gag-Pol o la proteína de la cápsida utilizando anticuerpos específicos contra el dominio Pol o Gag en partículas de virus purificadas (Ribas and Wickner, 1998).

LBC **GAATTT**TCGGTG---AACCGGAATT**ATG**TCGTCTCTGTAAATTCATTACTACCAGAA 56
 LBCbarr **GAAAT**TAGCTGTAGCCAATCGATTGCC**ATG**TCTCAACTCTTAACAATTTACTACCCGAC 60
 :**: * ** .*: * .: . * **.: *:** :.*****. **
 5' conserved Start of Gag and Gag-Pol

LBC TATTTTAAACCTAAACTAATTTGAATATCAACTCTCTAGGGTCCAATATGGCTTTAAT 116
 LBCbarr ACTTTAAACCTCGTAAAGATTTTAACTTACTCACCATAGAAATTAATATGGTATGAT 120
 :.***:**.***.:.:. ***** **.: * . . .***. . ***** : * **

LBC GCTCGCATTGATATGCAGTATGAAGACGATAGTGGGACTAGAAAAGGCTCAAGACCCAAT 176
 LBCbarr GCCACATCAATTTTGATGTTTCTGACGACTTTGGAAAATATGAAGGTAACAGACCCGGT 180
 . * .*** .:** * * : * .:***** : ** .*.:.:.*** .: .***** .**

LBC GCATTTATGTCTAACACAGTTGCTTTTATAGGAACTATGAAGGTATTATTGTTGATGAC 236
 LBCbarr GCTTTTATGGAAATGAAGTATCTCTTTATGGTAATTATAATCTTATATCACGGATGAC 240
 : ***** : * * .***: * * **.:**:* ***. * : *:** . *****

LBC ATTCCGATATTGGATGGTCTTAGGGCCGACATTTTGTATCTCATGGTGACTTAGACATG 296
 LBCbarr GTGCCAATTTATGACGGTATGAGATCTGATGTGATCACTCCCGAGGGAGAGTTTCCAGCAT 300
 . * **.*:**: * ** * ** . * * . * : * . * . * * **.* ** . . .**:

LBC GGCCTCGTTGAGGATGCATTGTCTAAGAGTACCATGATTAGAAGGAATGTACCAACTTAT 356
 LBCbarr GAACTGGCTGAGCAAGTCTAAGTAAAGCAACATCGGACCGAGCATCCGCTCAGAAATC 360
 . . * * * ** * ** * : * . : * ** . . : * . : . * . . . * : * . * . : :

LBC ACTGCTTACGCGAGTGAATTACTGTATAAGAGAAACCTTACATCTCTATTTTACAATATG 416
 LBCbarr ACGCAACTTGGCATATAATGGAGGTATGCGTAATTGTGTATCTGTATTATACAACCTG 420
 ** .:** * * . : * : : : . . * : * . * : * * . * ** * ** * : * * * : **

LBC CTCGGTTTATACTACATTAATAAATGGGGCAGTATTAAGTATGAAAAAGATGCCATCTTT 476
 LBCbarr CTGCGTATGTATGTATGAATGAGTTTGGCGAGGTGGTCTATGACCCAAACGAAATATTC 480
 ** * ** . * . * : * * * * : * . * * * . . * . : * * * . . * . * . * . * . *

LBC TATGATAATGGCCACGCTGTCTTTTAAACAGGCAATGTTTCCAAAGTCTCGTGATGCT 536
 LBCbarr TACGACAAATGGACATGTGTGCATCAAAAACCATCAGATGTTTCCAAACATCTGGAGAA 540
 ** * * ** * * . * * * . * : * * * . . * . : * * * * * * * . . * * * . .

LBC TCTTTGGAATCAAG---CCTCTCTTTCGCTGAGGCTGAAATGCA-ATGCTTGATCCT-- 590
 LBCbarr AAATCACTAGCTAGGGCTGTGAGTACACTCCTGCTATGATCGAAGATGCGAGTACCTTG 600
 :. : * . : * * : * * * * * . * : * . * * . * * . : * * * . : * : * * *

LBC -GGCCTGGAATTTCCAGAAGAGGATGTGCCTGCAATTTTATGGCACGGCAGAGTGTATC 649
 LBCbarr TGGCGTGAAGGAGACATACCTGAATGT-CCTTCATGATTTGGACAGGATTTATG-CGTG 658
 * * * * . * . : * * * . : * * * * * * * * : * * * . . . * . : * * * . *

LBC CAGAGCAA-CGTGTATCTTAGGGCAAGCTTGCTCAGAGTTTCGCGCTCTGGCCCCCTTTT 708
 LBCbarr ATAAGCAAGCTACCATCGTCTCACGAGCAGCAGGCGGATTCGTCATAGGGCACCTTTTC 718
 :. : * * * * * * : * * * * . * . * * * : . . . * * * * . . . * * * * * *

LBC CGATTGCGCATTATTCACCAATGACGAGAAAATTTTGTCAATGCGCCCGCTGGGA 768
 LBCbarr GGGTCGCTCATGAGTCAAAAATCTTACTGAAAGATTAGGTATCATGGCAACTGGAGGAC 778
 * . * * * * * * * . * : * * . * * * * * * * * : * * * : * * . * * : * * . .

LBC TTGAGCCTAGCTCCGGG---CGGTATACTCACGAGGATGTAAAGATGCGATTACGATCC 825
 LBCbarr TCTCTAATGTAGAAGATTATAACTATGGGCCCTTCTGACATATGTTTCGCTCTTAACAAG 838
 * . . . * . . . * . . * * * . * . . * * . * * : . : * . * * . * : *

LBC TTGTGCTGCAAACAGGCTTATACGACTTTGAAGCAGCATACTTGATGCTTGCTCAA 885
 LBCbarr TAGTGACAGATAATGGGCTTACACTGACTTCACTTATGCTTATTTGATGTTGCTACAAG 898
 * : * * * : * . : * * . * * * * * * * . . : * : * * * * * * * * : * * . .

LBC CGTTGGTCTCACCTGTACCAGCACTGCCGAAGCAAGTGCATGGTTCATCAATGCTGGCA 945
 LBCbarr TATTAGTGTCTCTATACCAAGGTCTGCTGAAGCTGCGGCAATGGTTGTCGGTGTCCAGA 958
 . * . * * * * : * * * . * * * * : * * * * * * : . * * * * * . * * . * * . *

LBC TGGTCAATATGCCAACTTTGTCATGTGCAAAATGGTTATTATCCAGCACTGACCAATGCA 1005
 LBCbarr CGGTGCTTTACCTAGTTGGTAACTGACACAGGAAATATCCACAGTTATATCAGGGGA 1018
 * * * . : * : * * : * * * * . * : * . . . * * : * * : * * . . * . * * *

LBC ATCCTTACCACCGGCTAGACACATGGAAAGATACGTTAAATCATGGGTGGCTTATCCCG 1065
 LBCbarr AAGTCTATGCCAGTTTAAACGACTGGAAAGACTATGGCTAACCTTAGGGCATATCCTA 1078
 * : * * . * * * * : * * . . * * * * * * * * : * . . * * * * * * * * .

LBC ACATGCTGTTTACCATTAGTGGCAATGATTGAGAGCTG-CTATGTTGAACTCGGGAAT 1124
 LBCbarr AGTCATGTTTATTGCATAGTATTGTAGTGAATGA-AGCTGTTTATGTTGAGTTAAATAAT 1137
 * : . : * * * : * * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * . . . * * *

muestra como DNA porque se obtuvo a partir del correspondiente cDNA. El análisis de homología se realizó con el programa ClustalW. (*) indica nucleótidos idénticos. Doble punto (:) y punto (.) indican respectivamente transición y transversión de nucleótidos de ScV-LBC por otros nucleótidos en TdV-LBCbarr. Los motivos relevantes del extremo 5' conservado de ScV-LBC y TdV-LBCbarr, el codón ATG de comienzo (Gag y Gag-Pol, Pol de ScV-LBC?, y Pol de TdV-LBCbarr?) y los de final (stop de Gag y Gag-Pol), lugar del frame-shift, stem-loop asociado al frame-shift, stem-loop asociado a la encapsidación (VBS), y stem-loop asociado a la replicación (3'TRE) del virus se muestran en negrita y sombreados en gris. Los dos posibles stem-loops de replicación del extremo 3' se muestran subrayados.

Respecto a la secuencia de aminoácidos de la proteína Gag-Pol de TdV-LBCbarr, muestra un 42,5% de homología con la de ScV-LBC (**Fig. III.22**), mientras que no se observó prácticamente homología con las ScV-LA (23-24%), similar a la ya observada entre ScV-LBC y ScV-LA (25%) (datos no mostrados). Dada esta homología, al igual que ocurría con las Gag-pol de las LA, es de esperar que la estructura tridimensional y la función de las Gag-Pol también sean muy similares. De hecho, en estas dos proteínas también se aprecia el aminoácido His154 de la proteína Gag involucrado en el 5'-cap-snatching (aunque en ScV-LBC está en la posición 155 y en TdV-LBCbarr en la 156) más dos de los cuatro residuos cruciales para el reconocimiento del 5'-cap (Tyr-150, ahora Tyr152; y Tyr-452, ahora Tyr-449 en ScV-LBC o Tyr-452 en TdV-LBCbarr) (Fujimura and Esteban, 2013), y los cuatro motifs conservados (A, B, C y D) en la región central del dominio Pol de las RdRps con una homología cercana al 100% en las dos Gag-Pol (Bruenn, 2003) (**Fig. III.22**).

algunos stem-loops descritos previamente en varios virus M y relacionados con señales de replicación. Estas zonas se encontraron exclusivamente en la mitad 3' no-codificante pero no en el resto del dsRNA de TdV-Mbarr-1 (**Fig. III.23**). Esto sugiere la posibilidad de una estrecha relación filogenética entre los virus M de *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae* en esta zona 3' del genoma. Por otro lado, la región 5' codificadora podría tener un origen independiente, posiblemente una proteína de secreción codificada en el núcleo de la levadura hospedadora. De hecho, se ha descrito homología de amino ácidos entre la toxina Klus y la ORF de la proteína nuclear YFR020W de *S. cerevisiae* (Rodríguez-Cousiño et al., 2011). Probablemente, la región poliA central de todos los virus M conocidos hasta la fecha sea una reminiscencia de la cola 3' poli-A de los RNA mensajeros de estas hipotéticas proteínas de secreción del hospedador que, de alguna manera, se acoplaron a la región 5' del RNA viral con una evolución filogenética independiente.

Por otra parte, la secuencia teórica de aminoácidos de la ORF de la posible pre-pro-toxina Kbarr muestra una organización similar a la de otras pre-pro-toxinas killer como las de los virus ScV-M1, ScV-M2, ScV-M28, y ScV-Mlus. Contiene una señal de secreción N-terminal rica en aminoácidos hidrofóbicos, un sitio de corte de la peptidasa señal, varios sitios potenciales más o menos bien ubicados de procesamiento proteolítico Kex1p/Kex2p, y cuatro sitios potenciales de N-glicosilación (**Fig. III.23**). Todo esto sugiere que la toxina Kbarr-1, al igual que otras toxinas de *S.cerevisiae*, se sintetiza como una preprotoxina que pierde su péptido señal y se procesa proteolíticamente a lo largo de la ruta secretora pudiendo originar una heterotoxina madura con tres posibles subunidades como las toxinas K1 o K28 de los virus ScV-M1 o ScV-M28 {Magliani, 1997 #937;Schmitt, 2006 #342}.

Aparte de estos motifs más o menos comunes en todos los virus ScV-M, el dsRNA de TdV-Mbarr-1 no muestra homología con la secuencia de los dsRNAs de ninguno de estos virus M, qué tampoco son homólogas entre sí; y tampoco existe homología entre las secuencias de aminoácidos de las toxinas codificadas por todos estos virus, toxinas K1, K2, K28 y Klus, entre sí o con la nueva secuencia de la toxina Kbarr-1.

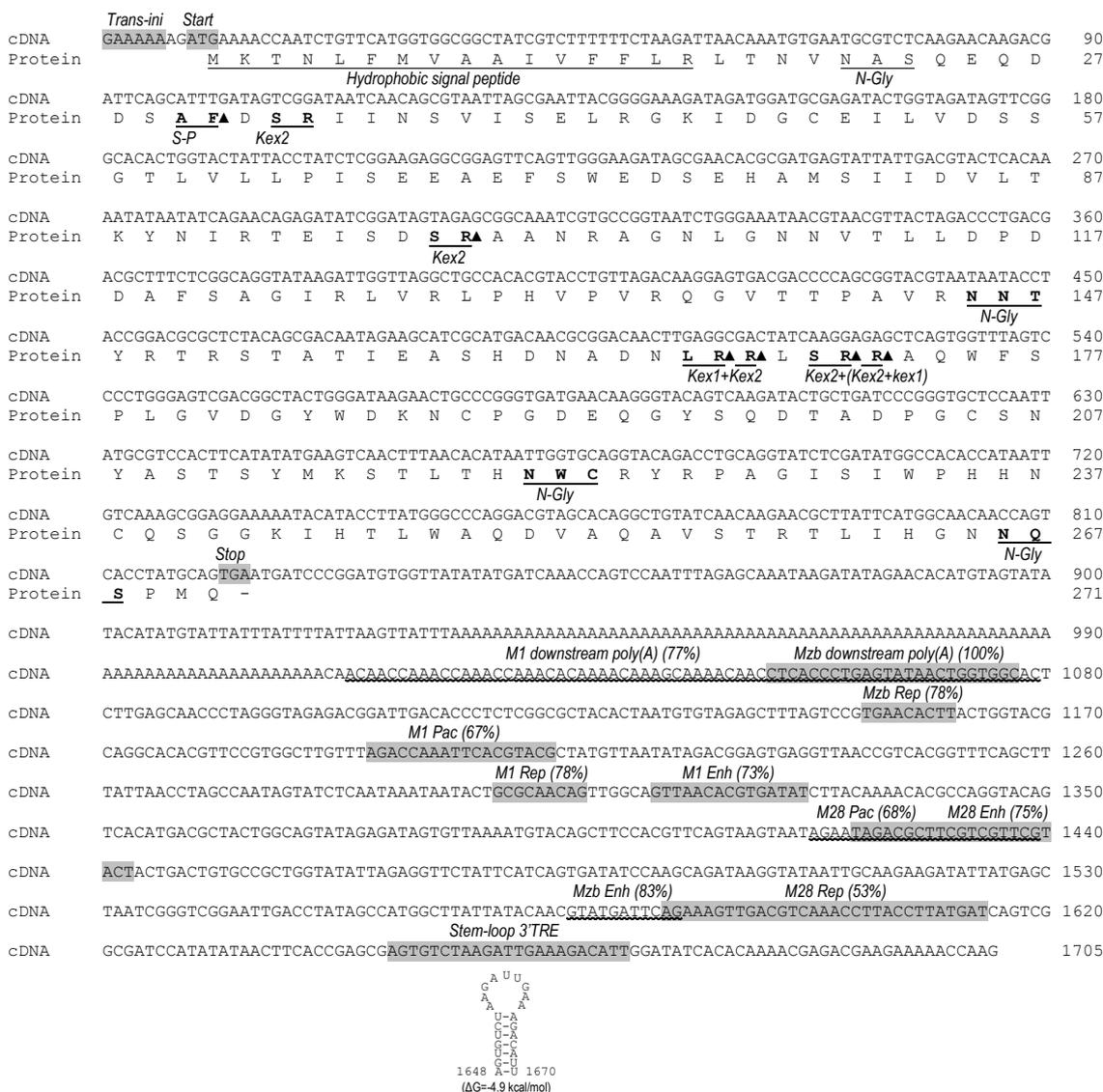


Figura III.23. Secuencia de nucleótidos del genoma de TdV-Mbarr-1 (cdNA) y secuencia teórica de aminoácidos de la toxina Kbarr-1. Esta secuencia se muestra como cdNA porque se obtuvo a partir del correspondiente cdNA del dsRNA del virus. Los motivos relevantes del extremo 5' conservado, probablemente necesario para el inicio de la transcripción (Trans-ini), el codón ATG de inicio (Start), y TGA de final de traducción (Stop) de síntesis de proteínas, el posible stem-loop asociado a la replicación próximo al extremo 3'(3'TRE) con una energía libre de $\Delta G = -4,9$ kcal / mol, y cuatro regiones homólogas con stem-loops relacionados con señales de replicación (R-S) de ScV-Mlus, ScV-M1, ScV-M28, o potenciador de replicación interna (Enh) de ScV-M28 con los porcentajes de homología en paréntesis, se muestran sombreados en gris. El péptido señal hidrofóbico, posible sitio de corte de la peptidasa señal (S-P), posibles sitios de procesamiento proteolítico de las proteasas Kex-1 y Kex-2, y posibles sitios de N-glicosilación (N-Gly) se muestran subrayados. (▲), sitio de corte.

III.2.7. Monitorización de las nuevas levaduras *Torulaspota*, killer y no-killer, durante la fermentación: uso de polimorfismos moleculares y de mutantes con marcadores genéticos.

Como ya hemos comentado, las nuevas levaduras *T. delbrueckii* killer contienen en su interior moléculas de tamaño mediano de dsRNA vírico características que permiten profundizar en su identificación si es necesario para diferenciar estas levaduras entre sí o de otras especies de levaduras vínicas como *Saccharomyces* (Fig. III.10). Adicionalmente, estas levaduras presentan un patrón característico de restricción del DNA mitocondrial (obtenido con la enzima *Rsa I*) que permite diferenciarlas fácilmente de otras levaduras vínicas como las habituales levaduras *Saccharomyces* (que muestran bandas de DNA de alto peso molecular no presentes en *T. delbrueckii*) o *Kluyveromyces* (que a su vez carecen de las intensas de tamaño medio presentes en las levaduras *Torulaspota*) (Fig.III.24).

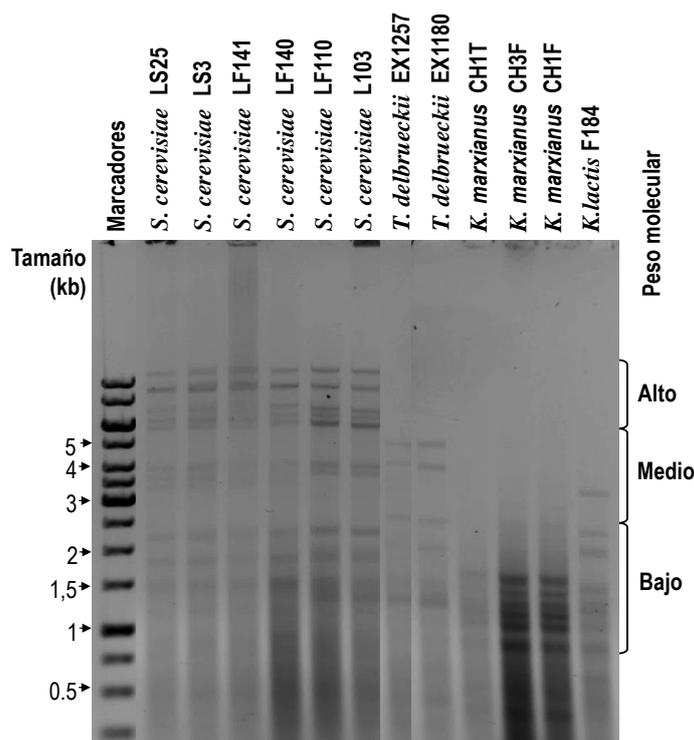


Figura III.24. Análisis de los fragmentos de restricción del mtDNA (RFLPs) obtenidos con la endonucleasa *RsaI* de distintas estirpes de levaduras *Torulaspota*, *Kluyveromyces* y *S. cerevisiae*. Marcadores: 1 kb DNA Ladder de Biotools.

El análisis de los RFLPs del mtDNA obtenidos con la endonucleasa *RsaI* permite diferenciar fácilmente distintas estirpes de *S. cerevisiae* (Maqueda et al., 2011b), al contrario de lo que ocurrió con las estirpes de *Torulaspota*. Sin embargo, fue posible diferenciar las estirpes de Kbarr-1 y Kbarr-2 de *Torulaspota* utilizando la enzima *Hinf I*

para digerir el mtDNA. Las levaduras Kbarr-1 poseen una banda de unos 2,2 kb que no aparece en las levaduras Kbarr-2 o en la *Torulaspota* no-Killer de la casa Lallemand (Fig. III.25).

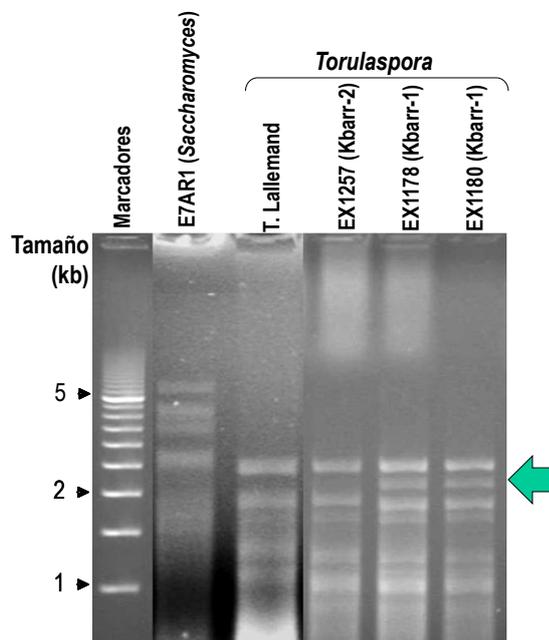


Figura III.25. Tipificación de levaduras silvestres utilizando los perfiles de RFLPs de mtDNA obtenidos con la endonucleasa de restricción *Hinf* I. Marcadores: 500pb Molecular Ruler de BioRad.

Cualquiera de estos métodos basados en el análisis de polimorfismos moleculares (dsRNA vírico o mtDNA) permite monitorizar las nuevas levaduras *Torulaspota* Kbarr durante la fermentación alcohólica y determinar su grado de participación respecto a las levaduras *S. cerevisiae*. No obstante, estas técnicas son relativamente caras, complejas y requieren de mucho tiempo como para ser utilizadas de forma rutinaria en bodegas comerciales.

Como alternativa hemos obtenidos mutantes espontáneos de las levaduras Kbarr resistentes a cicloheximida (CYH^R), que son muy fáciles de detectar en bodega, utilizando un método previamente descrito por nuestro grupo para *S.cerevisiae* (Pérez et al., 2000). La mayoría de estos mutantes conservan el virus TdV-Mbarr y el correspondiente fenotipo killer; solo algunos mutantes perdieron el virus y el fenotipo killer en presencia de cicloheximida. La pérdida del virus TdV-Mbarr en las levaduras *Torulaspota* resultó mucho menos frecuente que la pérdida de los virus ScV-M2 y ScV-Mlus en *S. cerevisiae* (Pérez et al., 2000; Rodríguez-Cousiño et al., 2011). Esta circunstancia nos brindó la oportunidad de analizar fácilmente la influencia del fenotipo Kbarr en la evolución de las poblaciones de levaduras durante la fermentación de mosto

(Apartado IV.2.1, Capítulo IV); ya que las estirpes de levaduras *Torulaspota* CYH^R (killer y no-killer) se pueden diferenciar muy bien de las levaduras *Torulaspota* originales sensibles a cicloheximida con un simple test de réplica en placas de YEPD-CYH (Fig. III.26).

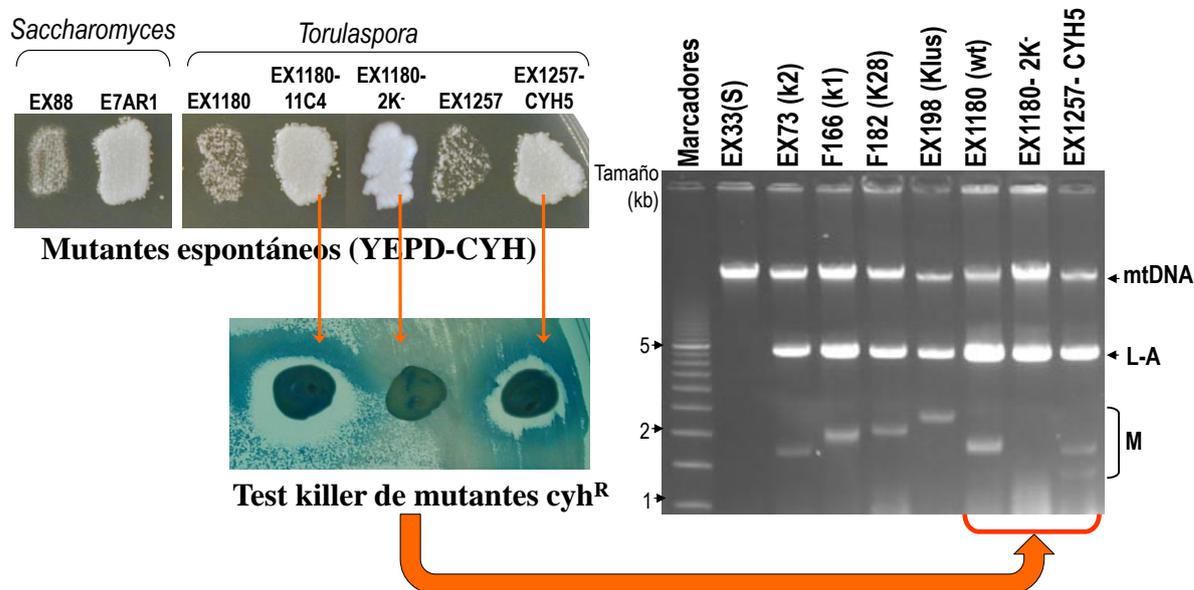


Figura III.26. Test de resistencia a cicloheximida y de fenotipo killer de las levaduras *Torulaspota* EX1180 (Kbarr-1) y EX1257 (Kbarr-2) y sus mutantes resistentes a cicloheximida (CYH^R) EX1180-11C4 (Kbarr-1, CYH^R), EX1180-2K⁻ (no-killer, CYH^R) y EX1257-CYH5 (Kbarr-2, CYH^R). Se muestra como referencia el resultado de dos levaduras *S.cerevisiae*, una sensible (EX88) y otra resistente (E7AR1) a cicloheximida. Marcadores: 500pb Molecular Ruler de BioRad.

III.2.8. Producción de las nuevas levaduras killer para vinificación en distintos medios de cultivo, a distintas temperaturas y con distintos tamaños de inóculo.

El uso de levaduras *Torulaspota* en la fermentación del mosto puede mejorar la calidad del vino (Azzolini et al., 2014; Belda et al., 2014). Estas levaduras son mucho más caras que las habituales levaduras *Saccharomyces*, fundamentalmente por el mayor costo de producción. En este apartado se analiza la producción de las nuevas estirpes vínicas de *Torulaspota* con distintos medios de cultivo. Se utilizó un esquema operativo similar al utilizado previamente para las levaduras *Saccharomyces* (Maqueda et al., 2011a) con el propósito de optimizar el rendimiento con vistas a una posible producción industrial y comercialización.

Se realizaron cultivos paralelos de las levaduras en medio YEPD (usual para la multiplicación de levaduras en el laboratorio), Melazas 1× (usual para la multiplicación de las levaduras en la industria) y Melazas 2× (medio con el doble de la cantidad usual de melazas para intentar suplir alguna posible carencia nutritiva en alguna de nuestras

levaduras). Se apreciaron diferencias en la evolución de la OD_{600nm} entre las distintas levaduras en todos los medios utilizados. Los valores alcanzados en los cultivos de todas las *Torulaspota* en los medios YEPD y Melaza 1× fueron siempre mayores que los correspondientes a *Saccharomyces*. Esta diferencia fue menos patente con Melazas 2×, alcanzando algunos cultivos de *Saccharomyces* valores similares a los de *Torulaspota* (Figs. III.27A, B y C). Sorprendentemente, esta diferencia entre las levaduras *Saccharomyces* y *Torulaspota* no se apreció en la evolución del número de células totales en ninguno de los medios utilizados, más bien al contrario, en varios puntos de muestreo el número de levaduras totales fue mayor en los cultivos de *Saccharomyces* que en los de *Torulaspota* (Figs. III.27D, E y F). Esto puede ser debido a que las levaduras *Torulaspota* tienen tendencia a flocular y depositarse rápidamente en el fondo de la cubeta (Fig. III.28), lo que puede originar una sobre-estimación de los valores de OD_{600nm} en estas levaduras. En general, los valores más altos de OD_{600nm} y de células totales se obtuvieron con Melazas 1×, especialmente después de 48 horas, y no se apreciaron diferencias importantes de rendimiento entre las nuevas levaduras *Torulaspota* killer Kbarr y la *Torulaspota* 291 (comercial no-killer de la casa Lallemand).

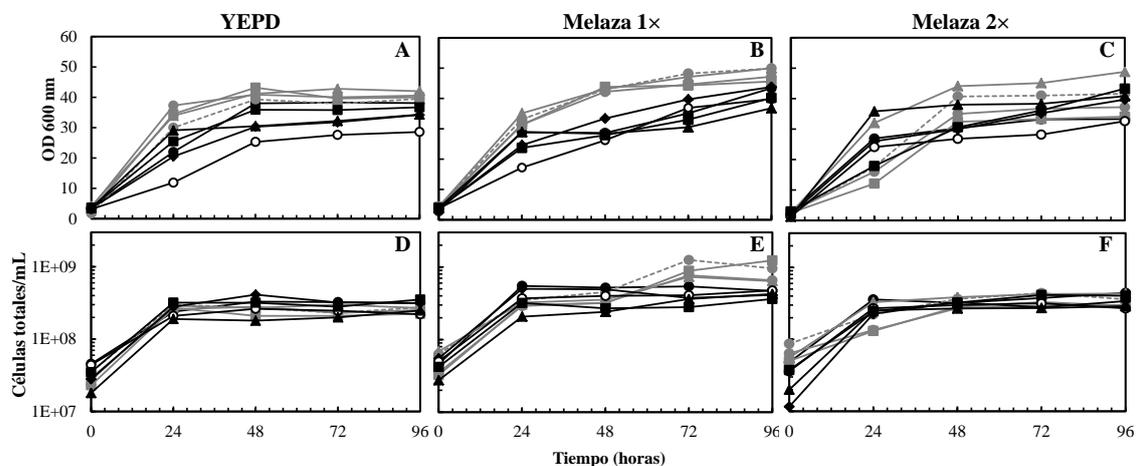


Figura III.27. Cinéticas de crecimiento de las levaduras *Saccharomyces* (EX85, E7AR1, Rod23-1B, EX229 y EX85R) y *Torulaspota* (EX1180, EX1180-11C4, EX1180-2K⁻ y *T. delbrueckii* 291 (Lallemand)) en medio YEPD, Melazas 1× y Melazas 2×. Símbolos: EX85 (—●—), E7AR1 (—◆—), Rod23-1B (—○—), EX229 (—▲—), EX85R (—■—), EX1180 (—□—), EX1180-11C4 (—●—), EX1180-2K⁻ (—▲—), y *T. delbrueckii* 291 (Lallemand) (—●—).

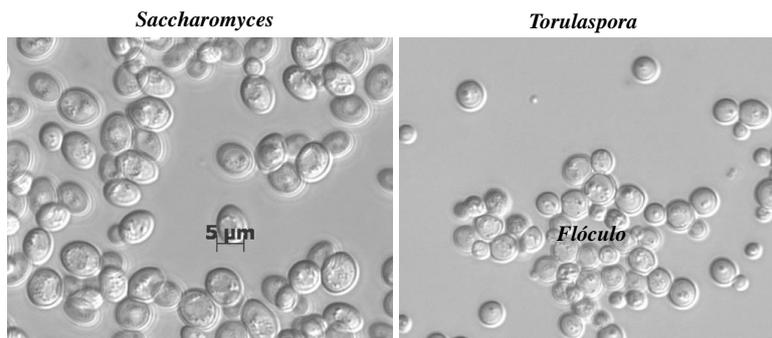


Figura III.28. Microfotografías (600×, Nomarski) de las levaduras *Saccharomyces* y *T. delbrueckii* cultivadas durante 48 horas en Melazas 1×.

En general, comparando los rendimientos de los tres medios de cultivo para el conjunto de las levaduras utilizadas, el mejor correspondió a Melaza 1×, aunque aumentó considerablemente la muerte celular respecto a YEPD. No obstante, también aumentó considerablemente el número de células viables antes y después del secado de las levaduras. Al aumentar la cantidad de nutrientes, Melaza 2×, disminuyó de forma decepcionante el rendimiento y la viabilidad de todas las levaduras (**Fig. III.29**). Esto podría ser debido a un posible incremento de la represión catabólica por exceso de azúcares (efecto Crabtree), o a la presencia de mayor cantidad de los compuestos tóxicos habitualmente presentes en las melazas.

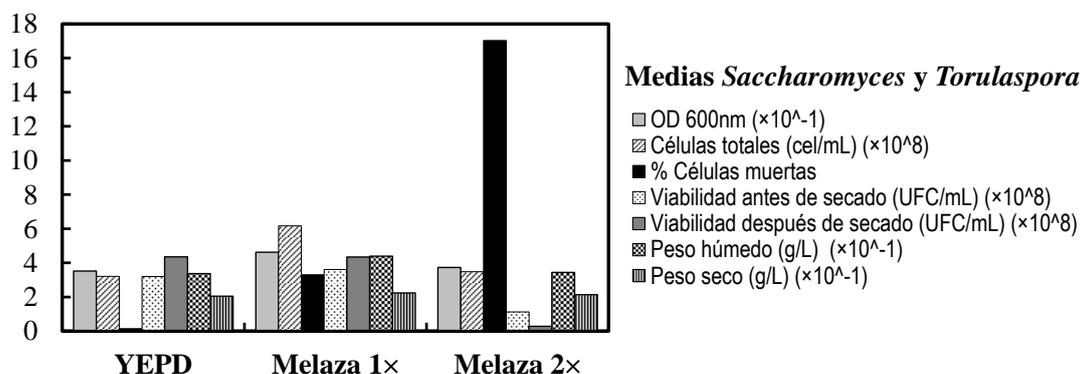


Figura III.29. Medias de los rendimientos del crecimiento de las levaduras *Saccharomyces* y *Torulaspora* en diferentes medios de cultivo.

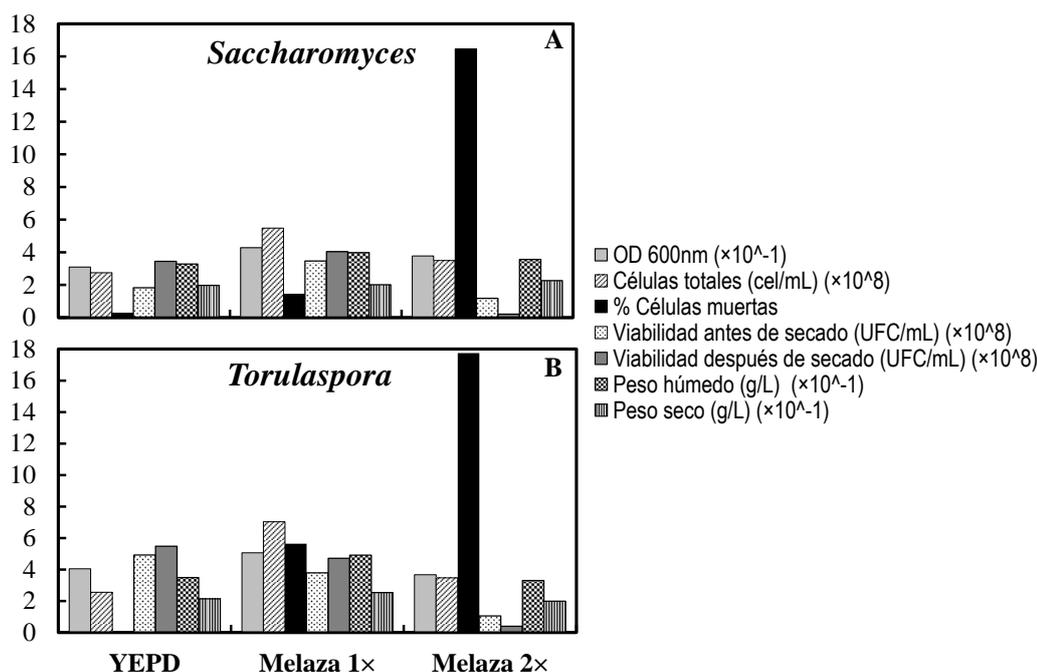


Figura III.30. Rendimientos del crecimiento de las levaduras después de 4 días en diferentes medios de cultivo. A, en *Saccharomyces*, y B, en *Torulaspota*.

Comparando los resultados en los tres medios de cultivo de las levaduras *Torulaspota* y *Saccharomyces* por separado, se observó que los rendimientos de los cultivos de *Torulaspota* fueron mejores que los de *Saccharomyces* después de 4 días de cultivo, tanto en YEPD como en Melaza 1x, a pesar de que hubo más células muertas en los cultivos de *Torulaspota* (Fig. III.30). Este incremento de la muerte puede ser debido a la mayor necesidad de oxígeno para un crecimiento óptimo en *Torulaspota* respecto a *Saccharomyces* (Hansen et al., 2001).

En resumen, la producción de levaduras *Torulaspota* en los medios habituales de laboratorio y la industria resultó más complicada que la de *Saccharomyces*, porque crecen más lentamente y pierden más viabilidad a medida que el cultivo envejece. El incremento de nutrientes en el medio no mejoró el rendimiento de la producción de levaduras *Torulaspota* ni *Saccharomyces*. La producción de levaduras *Torulaspota* resulta interesante si se alarga el tiempo de cultivo al menos hasta tres días, con el consiguiente incremento en los costes de producción.

III.3. BIBLIOGRAFÍA.

- Al-Aidroos, K., and Bussey, H. (1978). Chromosomal mutants of *Saccharomyces cerevisiae* affecting the cell wall binding site for killer factor. *Canadian Journal of Microbiology* 24, 228-237.
- Ambroña, J., Vinagre, A., Maqueda, M., Álvarez, M., and Ramírez, M. (2006). Rhodamine-pink as genetic marker for yeast populations in wine fermentations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 2977-2984.

- Ambroña, J., Vinagre, A., and Ramírez, M. (2005). Rapid asymmetric evolution of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts under apparently non-selective conditions. *Yeast* *16*, 1299-1306.
- Azzolini, M., Tosi, E., Lorenzini, M., Finato, F., and Zapparoli, G. (2014). Contribution to the aroma of white wines by controlled *Torulaspota delbrueckii* cultures in association with *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1-17.
- Ballou, C.E. (1990). Isolation, characterization, and properties of *Saccharomyces cerevisiae* mnn mutants with nonconditional protein glycosylation defects. *Methods in Enzymology* *185*, 440-470.
- Belda, I., Navascués, E., Marquina, D., Santos, A., Calderon, F., and Benito, S. (2014). Dynamic analysis of physiological properties of *Torulaspota delbrueckii* in wine fermentations and its incidence on wine quality. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1-12.
- Boone, C., Sommer, S.S., Hensel, A., and Bussey, H. (1990). Yeast *KRE* genes provide evidence for a pathway of cell wall beta-glucan assembly. *The Journal of Cell Biology* *110*, 1833-1843.
- Brown, J., North, S., and Bussey, H. (1993). SKN7, a yeast multicopy suppressor of a mutation affecting cell wall beta-glucan assembly, encodes a product with domains homologous to prokaryotic two-component regulators and to heat shock transcription factors. *Journal of Bacteriology* *175*, 6908-6915.
- Bruenn, J.A. (2003). A structural and primary sequence comparison of the viral RNA-dependent RNA polymerases. *Nucleic Acids Research* *31*, 1821-1829.
- Conti, S., Fanti, F., Magliani, W., Gerloni, M., Bertolotti, D., Salati, A., Cassone, A., and Polonelli, L. (1998). Mycobactericidal activity of human natural, monoclonal, and recombinant yeast killer toxin-like antibodies. *Journal of Infectious Diseases* *177*, 807-811.
- Corbacho, I., Olivero, I., and Hernández, L.M. (2005). A genome-wide screen for *Saccharomyces cerevisiae* nonessential genes involved in mannosyl phosphate transfer to mannoprotein-linked oligosaccharides. *Fungal Genetics and Biology* *42*, 773-790.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburul, F., and QueroI, A. (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology* *49*, 329-337.
- Flegelová, H., Novotná, D., Vojtíšková, K., and Janderová, B. (2002). Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants with a different degree of resistance to killer toxins K1 and K2. *FEMS Yeast Research* *2*, 73-79.
- Fujimura, T., and Esteban, R. (2011). Cap-snatching mechanism in yeast LA double-stranded RNA virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *108*, 17667-17671.
- Fujimura, T., and Esteban, R. (2013). Cap snatching in yeast L-BC double-stranded RNA totivirus. *Journal of Biological Chemistry* *288*, 23716-23724.
- Fujimura, T., and Wickner, R.B. (1989). Reconstitution of template-dependent in vitro transcriptase activity of a yeast double-stranded RNA virus. *Journal of Biological Chemistry* *264*, 10872-10877.
- Grey, M., and Brendel, M. (1992). Rapid and simple isolation of DNA from agarose gels. *Current Genetics* *22*, 83-84.
- Gulbinienė, G., Kondratienė, L., Jokantaite, T., Serviėne, E., Melvydas, V., and Petkuniėne, G. (2004). Occurrence of killer yeast strains in fruit and berry wine yeast populations. *Food Technology and Biotechnology* *42*, 591-163.
- Hansen, E., Nissen, P., Sommer, P., Nielsen, J., and Arneborg, N. (2001). The effect of oxygen on the survival of non-*Saccharomyces* yeasts during mixed culture fermentations of grape juice with *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Microbiology* *91*, 541-547.
- Häusler, A., Ballou, L., Ballou, C.E., and Robbins, P.W. (1992). Yeast glycoprotein biosynthesis: MNT1 encodes an alpha-1, 2-mannosyltransferase involved in O-glycosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *89*, 6846-6850.
- Hutchins, K., and Bussey, H. (1983). Cell wall receptor for yeast killer toxin: involvement of (1→6)-β-D-glucan. *Journal of Bacteriology* *154*, 161-169.

- Kurtzman, C. (2011). *Torulaspota* Lindner (1904). In *The Yeasts: A Taxonomic Study Fifth Edition*, C. Kurtzman, J. Fell, and T. Boekhout, eds. (London: Elsevier), pp. 867-874.
- Lussier, M., Sdicu, A.-M., Bussereau, F., Jacquet, M., and Bussey, H. (1997). The Ktr1p, Ktr3p, and Kre2p/Mnt1p Mannosyltransferases Participate in the Elaboration of Yeast O- and N-linked Carbohydrate Chains. *Journal of Biological Chemistry* 272, 15527-15531.
- Magliani, W., Conti, S., Gerloni, M., Bertolotti, D., and Polonelli, L. (1997). Yeast killer systems. *Clinical Microbiology Reviews* 10, 369-400.
- Maqueda, M., Pérez-Nevado, F., Regodón, J., Zamora, E., Álvarez, M., Rebollo, E., and Ramírez, M. (2011a). A low-cost procedure for production of fresh autochthonous wine yeast. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 38, 459-469.
- Maqueda, M., Zamora, E., Álvarez, M., and Ramírez, M. (2012). Characterization, ecological distribution, and population dynamics of *Saccharomyces* “sensu stricto” killer yeasts in the spontaneous grape-must fermentations of south-western Spain. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 735-743.
- Maqueda, M., Zamora, E., Rodríguez-Cousiño, N., and Ramírez, M. (2011b). Wine yeast molecular typing using a simplified method for simultaneously extracting mtDNA, nuclear DNA and virus dsRNA. *Food Microbiology* 27, 205-209.
- Marquina, D., Santos, A., and Peinado, J. (2002). Biology of killer yeasts. *International Microbiology* 5, 65-71.
- Naumova, E., Bulat, S., Mironenko, N., and Naumov, G. (2001). Differentiation of six sibling species in the *Saccharomyces* sensu stricto complex by multilocus enzyme electrophoresis and UP-PCR analysis. *Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology* 83, 155-166.
- Novotná, D., Flegelová, H., and Janderová, B. (2004). Different action of killer toxins K1 and K2 on the plasma membrane and the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research* 4, 803-813.
- Pagé, N., Gérard-Vincent, M., Ménard, P., Beaulieu, M., Azuma, M., Dijkgraaf, G.J., Li, H., Marcoux, J., Nguyen, T., and Dowse, T. (2003). A *Saccharomyces cerevisiae* genome-wide mutant screen for altered sensitivity to K1 killer toxin. *Genetics* 163, 875-894.
- Pérez, F., Ramírez, M., and Regodón, J. (2001). Influence of killer strains of *Saccharomyces cerevisiae* on wine fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek* 79, 393-399.
- Pérez, F., Regodón, J., Valdés, M., De Miguel, C., and Ramírez, M. (2000). Cycloheximide resistance as marker for monitoring yeasts in wine fermentations. *Food Microbiology* 17, 119-128.
- Pfeiffer, P., and Radler, F. (1984). Comparison of the killer toxin of several yeasts and the purification of a toxin of type K2. *Archives of Microbiology* 137, 357-361.
- Potgieter, A.C., Page, N.A., Liebenberg, J., Wright, I.M., Landt, O., and van Dijk, A.A. (2009). Improved strategies for sequence-independent amplification and sequencing of viral double-stranded RNA genomes. *Journal of General Virology* 90, 1423-1432.
- Ramírez, M., Pérez, F., and Regodón, J. (1998). A simple and reliable method for hybridization of homothallic wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Environmental Microbiology* 64, 5039-5041.
- Regodón, J. (1997). Obtención y caracterización de cepas autóctonas de levaduras para la elaboración estandarizada de vinos de calidad (Universidad de Extremadura, Spain).
- Ribas, J.C., and Wickner, R.B. (1998). The Gag Domain of the Gag-Pol Fusion Protein Directs Incorporation into the LA Double-stranded RNA Viral Particles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 273, 9306-9311.
- Rodríguez-Cousiño, N., Gómez, P., and Esteban, R. (2013). LA-lus, a new variant of the LA totivirus found in wine yeasts with Klus killer toxin-encoding Mlus double-stranded RNA: possible role of killer toxin-encoding satellite RNAs in the evolution of their helper viruses. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 4661-4674.
- Rodríguez-Cousiño, N., Maqueda, M., Ambrona, J., Zamora, E., Esteban, E., and Ramírez, M. (2011). A new wine *Saccharomyces cerevisiae* double-stranded RNA virus encoded killer toxin (Klus) with broad antifungal activity is evolutionarily related to a chromosomal host gene. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 1822-1832.

- Schmitt, M., and Radler, F. (1987). Mannoprotein of the yeast cell wall as primary receptor for the killer toxin of *Saccharomyces cerevisiae* strain 28. *Journal of General Microbiology* *133*, 3347-3354.
- Schmitt, M.J., and Tipper, J. (1990). K28, A Unique Double-Stranded RNA Killer Virus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* *10*, 4807-4815.
- Séguy, N., Polonelli, L., Dei-Cas, E., and Cailliez, J.C. (1998). XVIII. Effect of a killer toxin of *Pichia anomala* to *Pneumocystis*. Perspectives in the control of pneumocystosis. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* *22*, 145-149.
- Shimizu, K. (1993). Killer yeasts. In *Wine microbiology and biotechnology*, G. Fleet, ed. (Newark, N.J.: Harwood Academic Publishers), pp. 243-263.
- Thompson, J.D., Thierry, J.-C., and Poch, O. (2003). RASCAL: rapid scanning and correction of multiple sequence alignments. *Bioinformatics* *19*, 1155-1161.
- Van Vuuren, H., and Jacobs, C. (1992). Killer yeasts in the wine industry: a review. *American Journal of Enology and Viticulture* *43*, 119-128.
- Wickner, R.B., Fujimura, T., and Esteban, R. (2013). Viruses and prions of *Saccharomyces cerevisiae*. *Advances in Virus Research* *86*, 1.
- Yip, C.L., Welch, S.K., Klebl, F., Gilbert, T., Seidel, P., Grant, F.J., O'Hara, P.J., and MacKay, V.L. (1994). Cloning and analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* MNN9 and MNN1 genes required for complex glycosylation of secreted proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *91*, 2723-2727.

CAPÍTULO IV:
Elaboración de vinos tranquilos con
nuevas levaduras killer *Saccharomyces* y
Torulaspóra

IV.1. ANTECEDENTES.

El mayor problema del uso combinado de diferentes especies o estirpes de levaduras es la dificultad para prever los resultados de la fermentación porque la participación de cada levadura suele ser imprevisible, y puede afectar de forma indeseada a la composición química y aromática del vino. Se requiere conocer mejor las interacciones entre las distintas especies y estirpes para prever el grado de participación de cada levadura durante la fermentación (Ciani et al., 2010). A igualdad de eficacia biológica y vigor fermentativo entre las distintas levaduras de la mezcla, se pueden utilizar las interacciones debidas al fenotipo killer como una nueva herramienta biotecnológica para controlar el crecimiento de cada levadura durante la fermentación del mosto. Se ha descrito que menos del 10% de levaduras *S. cerevisiae* killer K2 al principio de la fermentación pueden desplazar al resto de levaduras sensibles de la misma especie con el mismo vigor fermentativo, y que este efecto depende de la cantidad de sólidos en suspensión capaces de adsorber la toxina killer (Pérez et al., 2001). Las nuevas levaduras *S. cerevisiae* killer Klus, aunque tienen un espectro de acción killer más amplio que las levaduras killer K2, presentan un fenotipo poco intenso y lento (Maqueda et al., 2012; Rodríguez-Cousiño et al., 2011). En consecuencia, no es previsible que desplacen fácilmente al resto de levaduras sensibles durante la fermentación del mosto, que suele ser un proceso relativamente rápido. Sin embargo, las nuevas levaduras *T. delbrueckii* killer Kbarr-1, además de tener un espectro de acción aún más amplio incluso que las levaduras Klus, presentan un fenotipo killer mucho más intenso que el resto de las levaduras vínicas killer descritas previamente (**Fig. III.2.3**). Sin embargo, estas levaduras Kbarr presentan menor vigor fermentativo y tolerancia a altas concentraciones de etanol que *Saccharomyces*. No obstante, podrían incrementar su grado de participación en fermentaciones inoculadas con mezclas de levaduras *Torulaspota/Saccharomyces* respecto al uso de levaduras *Torulaspota* no-killer. En este capítulo se analiza en primera instancia la influencia de las nuevas levaduras *T. delbrueckii* killer Kbarr y del grado de turbidez del mosto sobre el desarrollo de levaduras *S. cerevisiae* sensibles durante la fermentación; y posteriormente se evalúa la utilidad de estas levaduras killer Kbarr en la elaboración de vinos blancos y tintos.

IV.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

IV.2.1. Influencia del fenotipo killer en el desarrollo de las poblaciones de levaduras en vinificación de vinos tranquilos.

Las fermentaciones realizadas con mosto estéril de uva Cigüente y co-inoculadas inicialmente con mezclas de levaduras *T. delbrueckii* + *S. cerevisiae* transcurrieron de forma correcta en cuanto a cinética de fermentación y evolución de la población de levaduras totales y viables (**Fig. IV.1A-C**). Sólo las levaduras *Torulaspota* killer pudieron evitar ser desplazadas totalmente durante la fermentación por las *Saccharomyces*, mientras que las levaduras *Torulaspota* no-killer fueron desplazadas por las levaduras *Saccharomyces* durante la fermentación. Este desplazamiento fue muy rápido (un día) cuando la proporción de levaduras *Torulaspota* no-killer fue del 50%, y más lento cuando la proporción de levaduras *Torulaspota* no-killer fue del 90%, manteniéndose por encima del 50% de la población total durante los primeros cuatro días de fermentación. Por el contrario, las levaduras *T. delbrueckii* killer Kbarr desplazaron totalmente a las *S. cerevisiae* cuando se inocularon en una proporción inicial del 90%. Esta proporción inicial de levaduras *Torulaspota* killer requerida para desplazar a las levaduras *Saccharomyces* fue muy superior a la proporción de levaduras *Saccharomyces* K2 requerida para obtener tasas de similares de desplazamiento (menos del 10%) (Pérez et al., 2001). El desplazamiento fue más evidente en mosto filtrado sin partículas adsorbentes de las toxinas killer, aunque también se observó dominancia de *Torulaspota* en mosto desfangado con partículas adsorbentes cuando se inocularon en la misma proporción del 90%. Las levaduras *Torulaspota* no-killer no dominaron la fermentación en las mismas condiciones, siendo desplazadas totalmente por las levaduras *S.cerevisiae*, sensibles a la toxina Kbarr pero con más vigor fermentativo que las levaduras *Torulaspota*. En las fermentaciones inoculadas con 50% inicial *Torulaspota* (killer o no-killer), éstas fueron desplazadas rápidamente (un día) por *Saccharomyces* en mosto desfangado, aunque las levaduras *Torulaspota* killer permanecieron en mayor proporción que las no-killer durante varios días en mosto filtrado (**Fig. IV.1**).

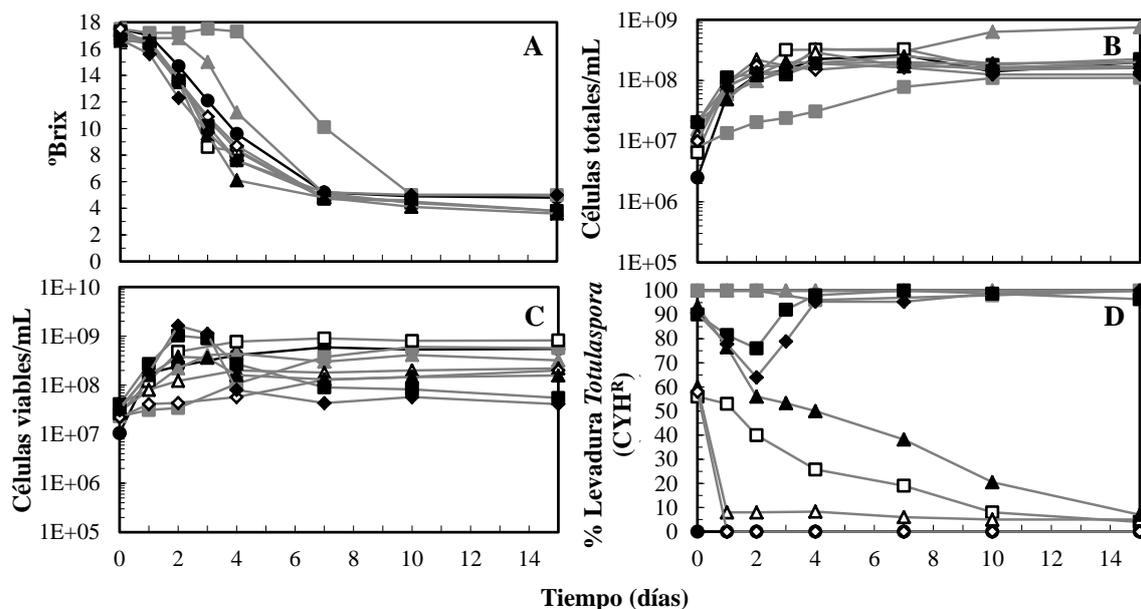


Figura IV.1. Evolución de las fermentaciones de mosto Cigüente estéril desfangado o filtrado inoculado con distintas levaduras. Estirpes de *S. cerevisiae*: EX85 (K2, CYH^S). Estirpes de *T. delbrueckii*: EX1180-11C4 (Kbarr-1, CYH^R) y EX1180-2K⁻ (no-killer, CYH^R). A: °Brix. B: Levaduras totales. C: Levaduras viables. D: Proporción de levaduras *Torulaspora* resistentes a cicloheximida (CYH^R). Símbolos: EX85 (—●—), EX1180-11C4 filtrado (—■—), EX1180-2K⁻ filtrado (—▲—), EX85 (50%)+EX1180-11C4 (50%) filtrado (—□—), EX85 (50%)+EX1180-11C4 (50%) desfangado (—◇—), EX85 (50%)+EX1180-2K⁻ (50%) filtrado (—△—), EX85 (10%)+EX1180-11C4 (90%) filtrado (—■—), EX85 (10%)+EX1180-11C4 (90%) desfangado (—◆—) y EX85 (10%)+EX1180-2K⁻ (90%) filtrado (—▲—).

Una vez conocida la capacidad de desplazamiento de las levaduras *S.cerevisiae* por las *T.delbrueckii* killer Kbarr durante la fermentación de mosto, procedimos a elaborar vino blanco con mosto Cigüente. La inoculación de las levaduras se realizó siguiendo las recomendaciones de las casas comerciales: inoculación secuencial, inicialmente con *Torulaspora* y dos días después con *Saccharomyces* más la adición de activador de fermentación para asegurar la viabilidad de las levaduras. Lamentablemente, en las vinificaciones realizadas de esta forma, las levaduras *Torulaspora* fueron frecuentemente desplazadas por las levaduras *Saccharomyces* en menos de un día después de la inoculación de estas últimas; y no se apreció ninguna mejora digna de destacar en la calidad organoléptica de los vinos inoculados con *Torulaspora*, probablemente debido a su baja participación en el proceso de fermentación. Por otra parte, cuando las levaduras *Torulaspora* no fueron desplazadas rápidamente, hubo frecuentemente problemas de final de fermentación y los vinos quedaron semisecos (no mostrado).

A la vista de estos resultados, decidimos analizar la elaboración de vino blanco con mosto Cigüente muy bien desfangado e inoculado únicamente con levaduras *T. delbrueckii* o *S. cerevisiae*. Todas las levaduras *Torulaspora* y *Saccharomyces*, killer y no-killer, dominaron fácilmente la fermentación debido a la baja proporción de levaduras *Saccharomyces* silvestres en el mosto clarificado (**Fig. IV.2**). No obstante, la cinética de las fermentaciones inoculadas con *Torulaspora* fue siempre más lenta que la correspondiente a *Saccharomyces*, y en algunos casos hubo problemas de final de fermentación, quedando los vinos semisecos. Aunque los catadores no apreciaron mejora evidente de la calidad de los vinos elaborados con *Torulaspora*, detectaron aromas característicos a fruta confitada/pastelería que no encontraron en los vinos elaborados con en los vinos *Saccharomyces*. Por otra parte, no hubo degradación importante de ácido málico en ninguno de los vinos, ni incremento de la cantidad de ácido láctico; en consecuencia, tampoco se apreciaron aromas lacteados en ningún vino. En estas condiciones, pH bajo (3,11-3,28) y mosto desfangado exhaustivamente, el desarrollo de bacterias lácticas es muy improbable; y las levaduras, tanto *Saccharomyces* como *Torulaspora*, no consumieron o consumieron muy poco de ácido málico.

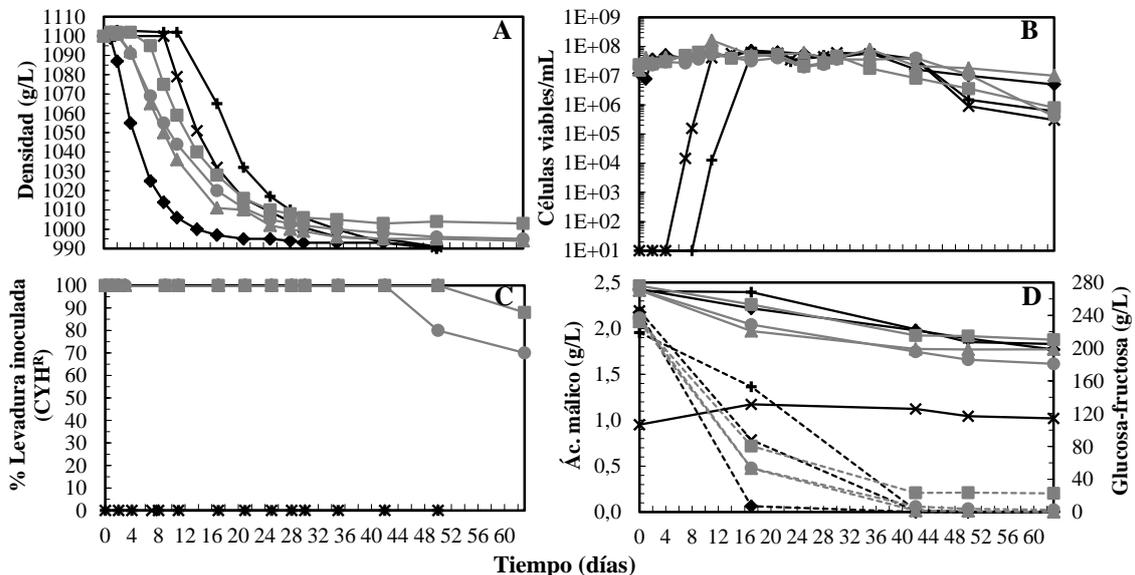


Figura IV.2. Evolución de las fermentaciones de mosto Cigüente desfangado estéril, suplementado o no con L-málico hasta 2,4 g/L, e inoculado con distintas levaduras exclusivamente en el encubado. Estirpes de *S. cerevisiae*: E7AR1 (K2, CYH^R). Estirpes de *T. delbrueckii*: EX1180-11C4 (Kbarr-1, CYH^R), EX1257-CYH5 (Kbarr-2, CYH^R) y TL3 (mutante CYH^R procedente de la *Torulaspora* 291 no-killer comercial de la casa Lallemand). A: Densidad. B: Levaduras viables. C: Proporción de levaduras inoculadas (CYH^R). D: Consumo de málico y azúcares. Símbolos: Sin inocular (—x—), sin inocular+L-málico (—+—), E7AR1+L-málico (—♦—), EX1180-11C4+L-málico (—■—), EX1257-CYH5+L-málico (—●—) y TL3+L-málico (—▲—). Glucosa-fructosa (---).

En resumen, la inoculación secuencial de levaduras *Torulaspota* y posteriormente de levaduras *Saccharomyces* no aseguró una participación importante de *Torulaspota* en el proceso de fermentación, y no resultó en mejora evidente de la calidad del vino blanco. En las fermentaciones co-inoculadas inicialmente con las dos levaduras, las levaduras *Torulaspota* killer Kbarr desplazaron a las levaduras *Saccharomyces* durante la fermentación del mosto cuando su proporción fue muy alta, 90%. Las levaduras *Torulaspota* no-killer fueron siempre desplazadas por las levaduras *Saccharomyces*, independientemente de su proporción inicial. El vigor fermentativo y la tasa de crecimiento fueron mayores en las levaduras *Saccharomyces*, lo que facilitó que desplazaran a las *Torulaspota*. Sin embargo, la inoculación inicial del mosto bien desfangado exclusivamente con levaduras *Torulaspota* permitió su dominancia durante la mayor parte de la fermentación, originando vinos característicos con distinto perfil aromático, aunque algunos quedaron semisecos. Esta última estrategia parece ser la más interesante para la elaboración de vinos con *Torulaspota*, especialmente si se trata de vinos semisecos.

IV.2.2. Vinificaciones de mosto blanco inoculado con levaduras *Saccharomyces* o *Torulaspota*. Efecto sobre el consumo de azúcares, fermentación maloláctica, y calidad organoléptica de los vinos.

Una vez establecido que la inoculación inicial del mosto exclusivamente con levaduras *Torulaspota* permite su dominancia durante la mayor parte de la fermentación, realizamos tres series de vinificaciones para confirmar la influencia de estas levaduras sobre el perfil aromático de los vinos blancos. Se utilizaron tres mostos Macabeo muy bien desfangados (<100 NTU), y de un grado probable relativamente bajo (menos de 11°Be) para intentar evitar el efecto tóxico del alcohol sobre las levaduras *Torulaspota* y propiciar que éstas completaran la fermentación sin problemas.

Las fermentaciones inoculadas con levaduras *Saccharomyces* fueron siempre las más rápidas en comenzar y terminar en todas las series de vinificaciones realizadas. Las inoculadas con *Torulaspota* arrancaron también rápidamente pero se fueron haciendo más lentas con el avance de la fermentación, y se hicieron indeseablemente lentas al final. Las fermentaciones control sin inocular fueron las últimas en arrancar, pero aceleraron una vez arrancadas y terminaron antes que las inoculadas con *Torulaspota* (Figs. IV.3A, B y C). El grado de imposición de las levaduras *Saccharomyces* inoculadas fue siempre del 100% durante toda la fermentación, mientras que el correspondiente a *Torulaspota* fue más variable y frecuentemente decreció con el

avance de la fermentación (**Figs. IV.3D, E y F**). Las levaduras *Torulaspora* killer Kbarr dominaron siempre la mayor parte de la fermentación, solo en un caso disminuyeron hasta el 75% de la población cuando la fermentación estaba casi concluida (densidad 1000 g/L), y hasta un 70% al final de la fermentación (**Fig. IV.3E**). Por el contrario, las levaduras *Torulaspora* no-killer (EX1180-2K⁻) fueron desplazadas fácilmente por las levaduras *Saccharomyces* silvestres del mosto, excepto una fermentación realizada con el mosto procedente de uva poco madura y con poca cantidad de levaduras silvestres *Saccharomyces* (<10¹ CFU/mL), donde todas las levaduras inoculadas dominaron la fermentación de principio a fin (**Fig. IV.3F**).

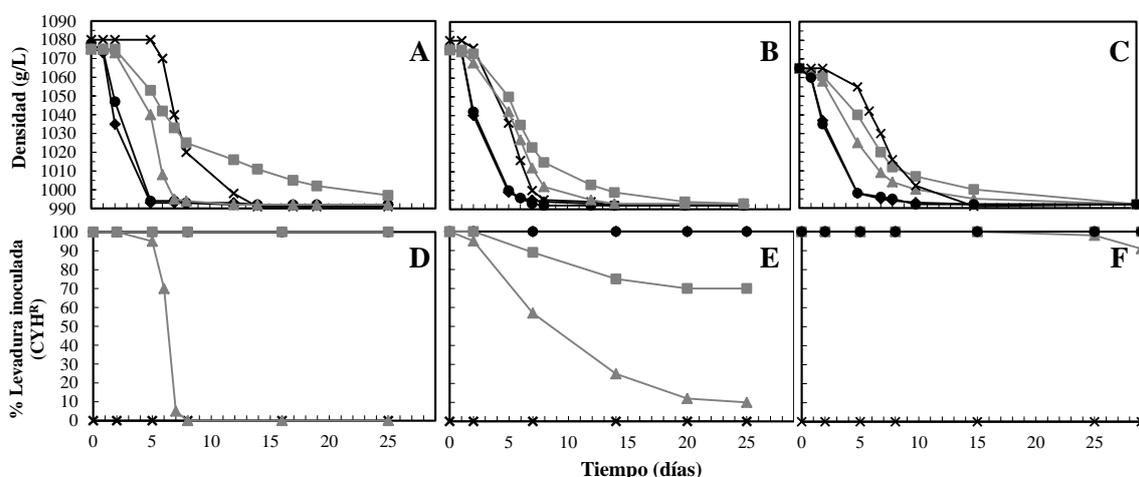


Figura IV.3. Evolución de las fermentaciones de tres series de vinificaciones de mostos Macabeo desfangados exhaustivamente (<100 NTU) (A y D, mosto de 2011; B y E, mosto de 2012; y C y F, mosto de 2013), suplementado con 3 g/L de tartárico (solo en los mostos de 2011 y 2012), y 0,3 g/L de activador de fermentación Actimax (Productos Agrovín S.A.). Se inoculó con cada levaduras exclusivamente en el encubado ($2-4 \times 10^6$ CFU/mL de las levaduras *Saccharomyces* E7AR1 (K2, CYH^R) o EX85R (no-killer, CYH^R), y $2-4 \times 10^7$ CFU/mL de *Torulaspora* EX1180-11C4 (Kbarr-1, CYH^R) o EX1180-2K⁻ (no-killer, CYH^R). A, B y C: Evolución de la densidad. D, E y F: Evolución del porcentaje de cada levadura inoculada (CYH^R). Símbolos: Sin inocular (—x—), E7AR1 (—♦—), EX85R (—●—), EX1180-11C4 (—■—) y EX1180-2K⁻ (—▲—).

En general, los vinos inoculados con *Torulaspora* quedaron abocados como consecuencia de la incapacidad de estas levaduras para completar la fermentación en un tiempo razonable (máximo de 15 días a 16-18°C). No obstante, cuando se dejaron reposar estos vinos durante más tiempo quedaron secos. Esto fue debido fundamentalmente a que en estas vinificaciones de *Torulaspora* hubo siempre una cierta cantidad de levaduras silvestres *Saccharomyces* al final de fermentación que pudieron completar la fermentación hasta producir vinos secos. Como es previsible en fermentaciones incompletas con T100 alto, los vinos de *Torulaspora* tuvieron menor grado alcohólico y acidez total, y mayor acidez volátil y pH que los vinos procedentes

de las fermentaciones más rápidas inoculadas con *Saccharomyces* o los controles sin inocular. Sin embargo, no se apreció consumo de ácido málico en ningún caso, probablemente porque los mostos se desfingaron exhaustivamente (poca cantidad de partículas de la uva y de microorganismos silvestres) y el pH estuvo siempre por debajo de 3,3. Estas condiciones son muy restrictivas para que se pueda producir consumo de málico o fermentación maloláctica durante la fermentación alcohólica aunque ésta sea muy lenta. A pesar de estas diferencias, los valores de todos estos parámetros permanecieron en un rango propio de vinos blancos de calidad. De todas estas diferencias entre los vinos de *Saccharomyces* y *Torulaspota*, solo resultaron estadísticamente significativas las correspondientes a T15, T100 y densidad, y marginalmente significativa para azúcares reductores (**Tabla IV.1**).

Tabla IV.1. Medias de los parámetros generales de vinos blancos (variedad Macabeo) elaborados con levaduras seleccionadas *Saccharomyces* o *Torulaspota*. Análisis de la varianza para estudiar el efecto de la inoculación del mosto con cada tipo de levadura.

Parámetro	Vinos		p ^a
	<i>Saccharomyces</i>	<i>Torulaspota</i>	
T15 (días)	1,75±0,23	5,13±0,60	0,000
T100 (días)	10±3,87	20,75±3,08	0,043
Aceptación (%)	64,38±4,67	56,73±3,79	0,128
Imposición en FT (%)	100±0,00	96,15±2,23	0,180
Imposición en FF (%)	100±0,00	86,83±7,49	0,172
Etanol (% v/v)	11,28±0,58	11,24±0,56	0,967
pH	3,07±0,07	3,20±0,05	0,165
Acidez total (g/L)	7,21±0,23	6,89±0,23	0,362
Acidez volátil (g/L)	0,26±0,05	0,36±0,07	0,366
Densidad (g/L)	990,7±0,41	994,6±1,25	0,026
Az. reductores (g/L)	1,24±0,15	5,98±2,15	0,091
Ácido málico (g/L)	1,47±0,12	1,45±0,16	0,926
Ácido láctico (g/L)	0,07±0,01	0,14±0,06	0,363

^ap, valores obtenidos con ANOVA para el efecto de la inoculación con levaduras. Los datos corresponden a la media ± error típico de 8 experimentos independientes de *Saccharomyces* y 12 de *Torulaspota*. FT, fermentación tumultuosa. FF, final de fermentación. T15, tiempo requerido para consumir el 15% del azúcar inicial del mosto. T100 tiempo requerido para consumir todos los azúcares del mosto hasta niveles no fluctuantes o inferiores a 2 g/L.

En general, los vinos mejor valorados fueron los inoculados con *Saccharomyces* (**Tabla IV.1**), fundamentalmente por la mayor intensidad de los aromas a fruta fresca, que fueron poco intensos en los vinos de *Torulaspota*. Los catadores encontraron notas de pastelería, fruta procesada (almíbar) y golosinas en los vinos de *Torulaspota*, aunque éstas fueron de menor intensidad que las percibidas durante la fermentación, y que

resultan muy raras en los vinos blancos frescos de nuestra región. Quizás por esta rareza, estos aromas fueron poco apreciados por los catadores locales y contribuyeron a que los vinos de *Torulaspota* fueran aún menos apreciados. No obstante, estos vinos blancos elaborados con *Torulaspota* fueron francos en nariz, de intensidad media, con aromas a frutas maduras (notas de melocotón, piña en almíbar y dulce de membrillo) y, en general: amables y equilibrados en boca. Dadas estas diferencias aromáticas y que las levaduras *Torulaspota* realizan fermentaciones relativamente lentas y frecuentemente incompletas, su uso podría resultar interesante desde un punto de vista tecnológico para elaborar vinos semisecos.

IV.2.2.1. Análisis de los compuestos aromáticos de los vinos blancos.

Considerando todas las series de vinificaciones en conjunto y agrupando las cantidades de los distintos compuestos por familias (Σ ésteres etílicos, Σ ésteres de acetato, Σ ácidos, Σ alcoholes, Σ monoterpenos, Σ furanos+fenoles volátiles, Σ lactonas, Σ norisoprenoides, Σ compuestos carbonílicos y Σ otros), tan solo se apreció diferencia significativa en Σ ácidos a favor de *Saccharomyces* (**Fig. IV.4**), lo que supuestamente debería haber influido negativamente en las características organolépticas de estos vinos si tuvieran una concentración de aproximadamente 20 mg/L para los tres ácidos grasos de cadena media (C_6 , C_8 y C_{10}) asociada a malos olores (*off-flavours*) en el vino (Muñoz-González et al., 2011; Shinohara, 1985). Esto se puede explicar porque el impacto negativo de Σ ácidos en el sabor del vino se considera generalmente despreciable, y por debajo del umbral de percepción contribuyen a la complejidad del bouquet del vino (Mallouchos et al., 2003). Sin embargo, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en 25 de los 75 compuestos aromáticos analizados independientemente. La cantidad de propionato de etilo (descriptor aromático: plátano, manzana), 3-etoxi propan-1-ol (frutal), ácido isobutírico (queso, rancio, agrio) y etoxi-gamma-butirolactona (coco, caramelo, tostado) fue mayor en los vinos de *Torulaspota* (**Fig. IV.5A**). Por el contrario, la cantidad de acetato de isobutilo (dulce, fruta, manzana, plátano), butanoato de etilo (frutal, verde, uva, tropical, piel de manzana, vinoso), acetato de isopentilo (plátano, fruta), hexanoato de etilo (plátano, manzana verde, vino, brandy), acetato de hexilo (verde, floral), 3-metil-1-pentanol (penetrante, cacao, verde, vinoso), octanoato de etilo (plátano, piña, pera, floral), 3-hidroxibutanoato de etilo (frutal, verde, uva, tropical, piel de manzana, vinoso), 1-octanol (cera, cítrico, floral, graso), decanoato de etilo (alcohólico, frutal, graso, dulce, cera, jabón), 9-decenoato de etilo (frutal), 4-hidroxibutanoato de etilo (uva, fruta, merengue), acetato de 2-feniletilo

(fruta, floral, rosa), laurato de etilo (cera, jabón, floral, lácteo, fruta, ron), ácido hexanoico (agrio, graso, queso), ácido octanoico (cera, grasa, rancio, aceitoso, vegetal, queso, áspero), 4-vinilguiacol (ahumado, madera, especiado), palmitato de etilo (cera, fruta, vainilla, balsámico), ácido decanoico (desagradable, rancio, agrio, cítrico, graso), ácido 9-decenoico (cera, graso, verde, fruta, mantequilla) y ácido láurico (suave, graso, coco, laurel, jabón) fue mayor en los vinos de *Saccharomyces* (**Fig. IV.5A**).

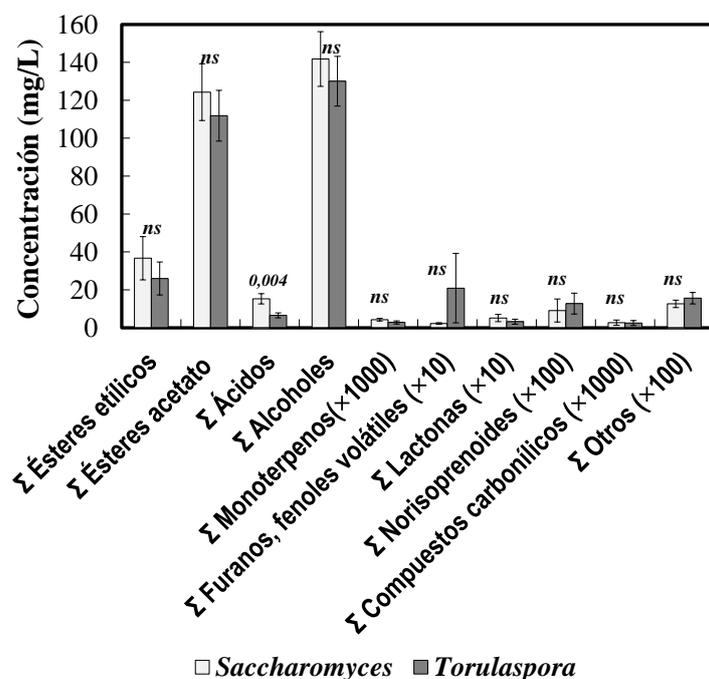


Figura IV.4. Composición aromática de los vinos blancos elaborados con *Saccharomyces* o *Torulaspota*. Los compuestos se agruparon por clases químicas. Los datos son la media (\pm error estándar) en mg/L de 23 experimentos independientes. En la parte superior se muestra el nivel de significación (p) correspondiente al análisis de la varianza. ns, no significativo.

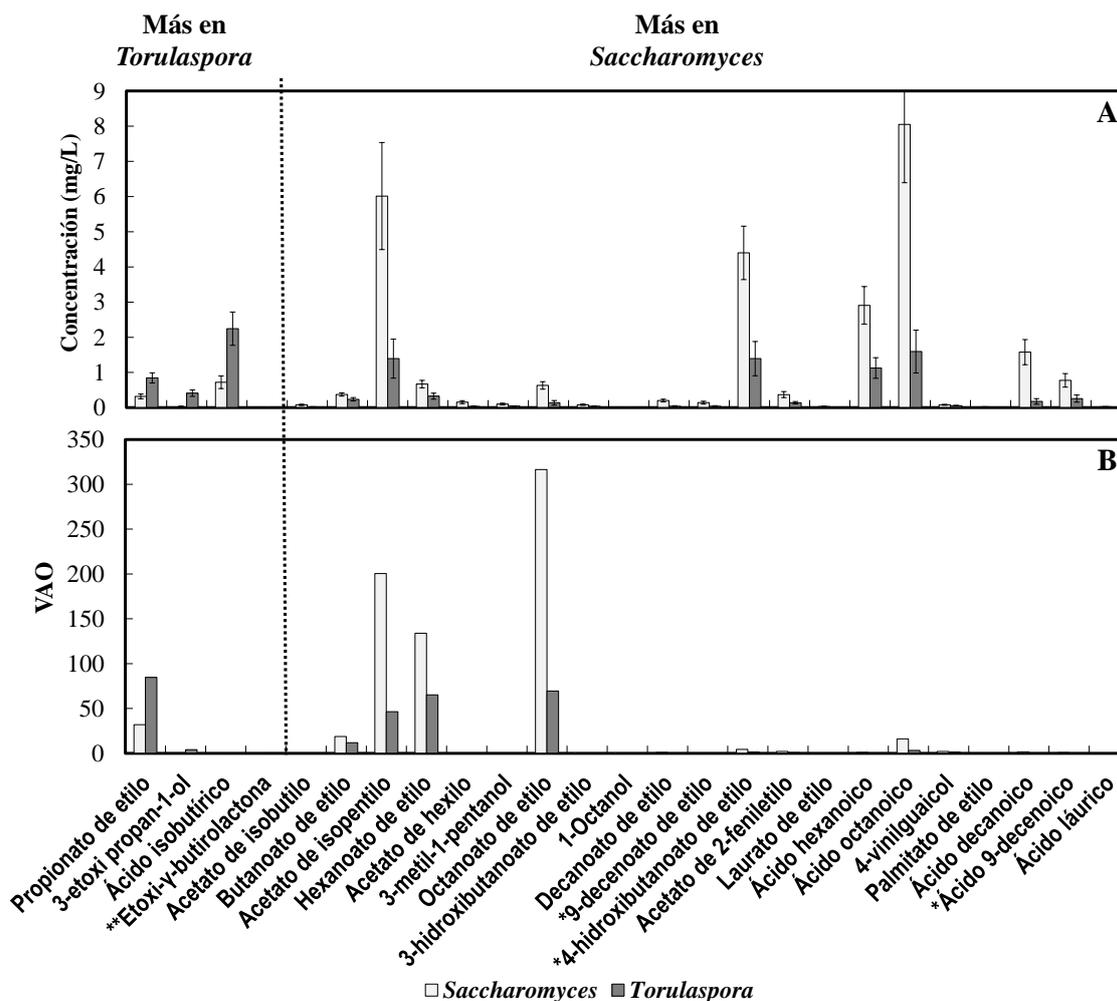


Figura IV.5. Compuestos aromáticos para los que se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las cantidades presentes en los vinos blancos inoculados con *Saccharomyces* o *Torulaspora*. A, concentración (mg/L). B, valor medio de actividad odorante (VAO). Los datos de mg/L corresponden a la media±error estándar de 11 experimentos independientes de *Saccharomyces* y 12 de *Torulaspora*. *, valor del umbral de detección desconocido; se ha tomado arbitrariamente el valor de 1 para el cálculo del VAO. **, valor de umbral de detección desconocido; para el cálculo del VAO se ha tomado arbitrariamente el valor de 0,035 mg/L correspondiente a la gamma-butirolactona.

La mayoría de los compuestos con descriptor aromático frutal fueron más abundantes en los vinos de *Saccharomyces* respecto a los de *Torulaspora*. Tan solo dos compuestos con descriptor frutal, propionato de etilo y 3-etoxi propan-1-ol fueron más abundantes en los vinos de *Torulaspora*. Esto explica la mayor intensidad de los aromas a fruta fresca detectada por los catadores en los vinos de *Saccharomyces*. La mayor cantidad de isobutanoico (=ácido isobutírico) en los vinos de *Torulaspora* podría explicar cierto toque agrio detectado en estos vinos, a pesar de que su acidez volátil no fue alta ($0,36 \pm 0,07$ g/L). En los vinos de *Torulaspora* sólo se apreciaron diferencias

significativas para un compuesto (etoxi-gamma-butilolactona) que pudiera ser responsables del característico aroma a pastelería, fruta procesada o golosinas encontrado en estos vinos, que normalmente se corresponden con lactonas (Azzolini et al., 2012; Azzolini et al., 2014; Hernandez-Orte et al., 2008; Jolly et al., 2014). En los vinos de *Saccharomyces* se detectó mayor cantidad de 4-hidroxibutanoato de etilo, que podría ser uno de los compuestos responsables de cierto aroma a pastelería (merengue) y que, sorprendentemente, no fue detectado por los catadores en estos vinos.

Estas posibles incongruencias se pueden explicar tras el análisis de estos mismos resultados teniendo en cuenta el umbral de percepción de cada uno de los compuestos aromáticos. En general, se observó que el VAO (valor de actividad odorante) de los compuestos aromáticos más abundantes en los vinos de *Torulaspota* fue mucho menor que el VAO de los compuestos más abundantes en los vinos de *Saccharomyces* (**Fig. IV.5B**). En concreto, la influencia de tan solo cuatro de los compuestos más abundantes en los vinos de *Saccharomyces* (butanoato de etilo, acetato de isopentilo, hexanoato de etilo y octanoato de etilo) sobre la percepción aromática de los catadores podría perfectamente eclipsar el posible efecto del resto de los componentes sobre el aroma de los vinos. Esto podría ser la causa de que la mayor cantidad de 4-hidroxibutanoato de etilo en los vinos de *Saccharomyces* no fuera detectado por los catadores como aroma a pastelería, aunque los ésteres polares como el 4-hidroxibutanoato de etilo contribuyen de forma insignificante al aroma del vino, más bien contribuyen a dar cuerpo al vino (Thurston et al., 1981). Por el contrario, dada la poca repercusión de los compuestos con carácter frutal sobre el aroma de los vinos de *Torulaspota*, los catadores pudieron detectar matices de fruta procesada o golosinas probablemente debido a la mayor presencia de pequeñas cantidades de etoxi-gamma-butirolactona en estos vinos ($0,00 \pm 0,00$ ppb en los vinos de *Saccharomyces* versus $15,00 \pm 3,40$ ppb en los de *Torulaspota*, $p < 0,01$); además de cierto toque agrio como consecuencia del incremento de ácido isobutírico en estos vinos.

Se ha descrito que el uso de *T. delbrueckii* al principio de la fermentación de mosto muy rico en azúcar (350-450 g/L) reduce la acidez volátil de los vinos dulces (Bely et al., 2008; Ciani et al., 2006; Ciani and Maccarelli, 1998; Comitini et al., 2011; Renault et al., 2015; Renault et al., 2012; Renault et al., 2009; Taillandier et al., 2014). En nuestro caso, trabajando con mosto con la concentración habitual para vinos de mesa secos, se produjo un ligero incremento no significativo en la acidez volátil de los vinos de *Torulaspota* respecto a los de *Saccharomyces* (**Tabla IV.1**). Esto es debido

probablemente al mayor T100 de las fermentaciones inoculadas con *Torulaspora* (20,75±3,08 días) respecto a las de *Saccharomyces* (10±3,87 días), lo que posibilita el desarrollo de bacterias u otras levaduras silvestres que puedan incrementar la acidez volátil.

A diferencia de lo descrito previamente (Anónimo, 2013; Taillandier et al., 2014), la producción de acetato de isopentilo (descriptor plátano, pera) fue menor en los vinos de *Torulaspora* respecto *Saccharomyces* (**Fig. IV.5**). Tal como indica la compañía Lallemand (Anónimo, 2011), es importante limitar la producción de notas amílicas (plátano, bombón inglés) relacionadas con el acetato de isopentilo, ya que podrían dominar sobre los delicados aromas afrutados y florales del vino; y esto se consiguió claramente en nuestros vinos de *Torulaspora*.

Se ha descrito previamente que *Torulaspora* produce cantidades insignificantes de ésteres etílicos de ácidos grasos saturados de C₆, C₈ y C₁₀ (Renault et al., 2009; Taillandier et al., 2014), similar a lo que ocurrió en nuestros vinos de *Torulaspora*. Por otro lado, según la compañía Lallemand, la fermentación con *T. delbrueckii* TD291@ (kit Level2@TD) revela un amplio rango de ésteres aromáticos en el vino, en particular de propionato de etilo y isoburitato de etilo, ambos con descriptor frutal. Estos resultados también coinciden con los nuestros, aunque en nuestro caso, las diferencias en las cantidades de isoburitato de etilo (descriptor fruta, cítrico) no fueron estadísticamente significativas, a pesar de ser más abundante en los vinos de *Torulaspora*. Sin embargo, la compañía Lallemand refiere un mayor contenido de butanoato de etilo y hexanoato de etilo que intensificarían las notas de fruta en los vinos de *Torulaspora* (Anónimo, 2012), mientras que nosotros encontramos lo contrario en la cantidad de estos dos compuestos en los vinos de *Torulaspora*. Por último señalar que, a pesar de que los VAOs resultaron mucho menores en los vinos blancos de *Torulaspora* respecto a *Saccharomyces*, los primeros vinos presentaron unas notas aromáticas positivas de “pastelería”, característica muy bien valorada por algunos catadores, y que no fueron percibidas en los vinos de *Saccharomyces*.

IV.2.2.2. Efecto de la turbidez del mosto sobre fermentación maloláctica y la calidad organoléptica de los vinos elaborados con levaduras *Torulaspora*.

Como hemos mencionado anteriormente, en ninguno de los vinos blancos elaborados previamente con mosto bien desfangado (<100 NTU) se detectó consumo de ácido málico, aunque algunas de las fermentaciones inoculadas con *Torulaspora* fueran inusualmente lentas al final de fermentación pudiendo favorecer el desarrollo de

bacterias lácticas. Sin embargo, cuando se realizó la fermentación con el mismo mosto Macabeo 2012 sin ajustar el pH con ácido tartárico por debajo de 3,3 (pH 3,58) y con un desfangado menos exhaustivo (250 NTU, usual en la zona para elaborar vino tranquilo de mesa), se produjo consumo de málico con la concomitante producción de ácido láctico en la fermentación inoculada con *Torulaspota* (**Fig. IV.6C**). Esto es explicable porque en estas condiciones (pH mayor de 3,5, mayor cantidad de microorganismos silvestres en los fangos del mosto, y disponibilidad de azúcares residuales en una fermentación con un final lento) el desarrollo de bacterias lácticas está muy favorecido. Sin embargo, en la fermentación inoculada con *Saccharomyces*, mucho más rápida que la inoculada con *Torulaspota*, los azúcares se agotaron muy rápidamente dificultando el desarrollo de las bacterias lácticas y el consumo de ácido málico. De hecho, se pudieron observar muchas bacterias en el vino de *Torulaspota*, tanto en el poso del vino como en medio MLO (más de 10^7 CFU/mL), mientras que se detectaron muy pocas bacterias (10^3 CFU/mL) en el vino de *Saccharomyces* (**Fig. IV.7**).

Coincidiendo con lo descrito previamente (Renault et al., 2009; Taillandier et al., 2014), se observó un incremento en la cantidad lactato de etilo (descriptor fresa) en el vino de *Torulaspota* respecto al de *Saccharomyces*, qué no se apreció en los vinos elaborados con mosto bien desfangado (**Apartado IV.2.2**). Este compuesto aporta sabor a fruta, notas cremosas y mantecosas, y contribuye a incrementar la sensación en boca (Cañas et al., 2015; Izquierdo Cañas et al., 2011; Lerm et al., 2010). La síntesis de este compuesto se produce durante la fermentación maloláctica e implica la actividad esterasa de las bacterias lácticas, aunque existen discrepancias sobre la influencia de la fermentación maloláctica sobre el contenido final de estos ésteres (Boido et al., 2009). En nuestro caso, solo detectamos incremento de lactato de etilo asociado a la existencia de fermentación maloláctica en el vino de *Torulaspota* elaborado con el mosto de más turbidez.

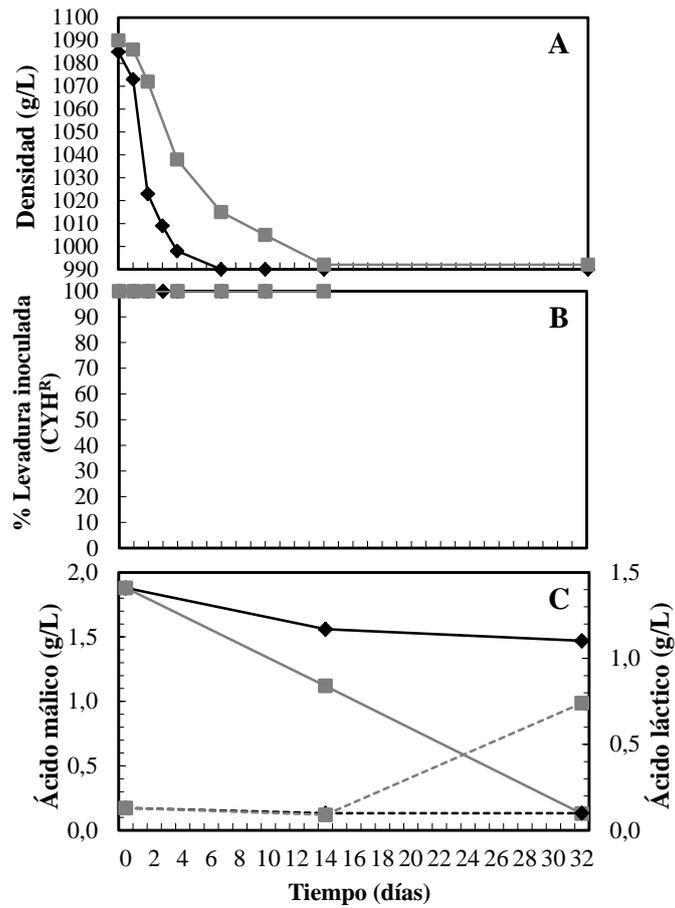


Figura IV.6. Evolución de las fermentaciones de mosto Macabeo 2012 desfangado (250 NTU) e inoculado exclusivamente con levaduras *Saccharomyces* E7AR1 (K2, CYH^R) o *Torulaspora* EX1180-11C4 (Kbarr, CYH^R) en el encubado. A: Densidad en g/L. B: Porcentaje de imposición de cada levadura inoculada marcada genéticamente con resistencia a cicloheximida (CYH^R). C: Evolución de la concentración de los ácidos málico y láctico. Símbolos: E7AR1 (—◆—) y EX1180-11C4 (—■—). Ácido láctico (---).

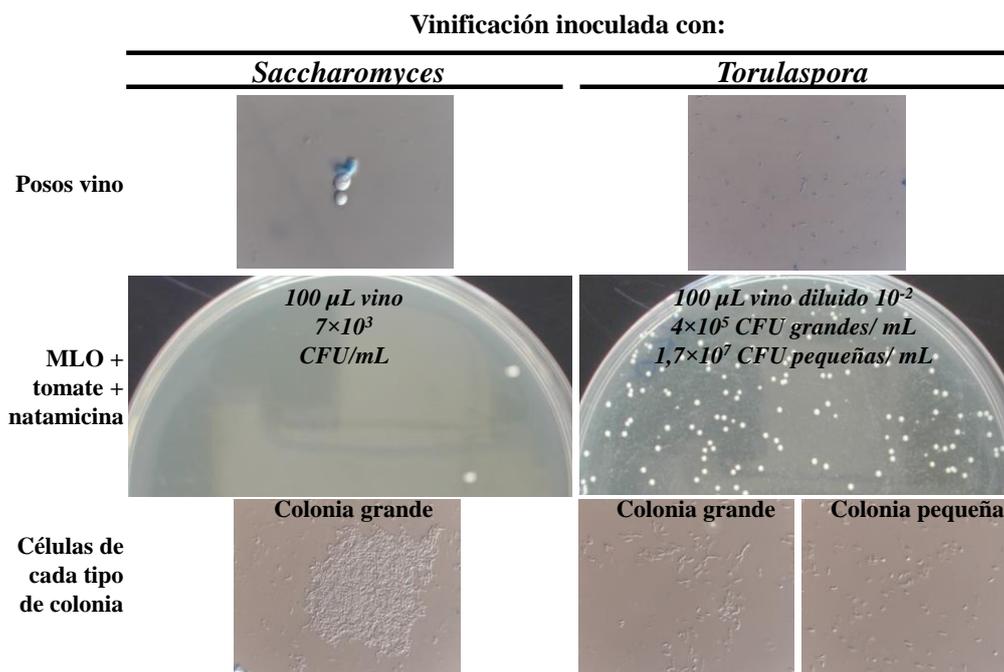


Figura IV.7. Presencia de bacterias al final de fermentación de los vinos Macabeo 2012 inoculados con levaduras *Saccharomyces* (E7AR1) o *Torulaspota* (EX1180-11C4). Micrografías de los posos del vino después del primer desfangado (día 52), fotografías de las bacterias viables en placas de MLO suplementado con jugo fresco de tomate y natamicina (10 mL/L de Fungisol) sembradas con 100 µL de vino o con 100 µL de vino diluido 10^{-2} veces en incubadas 15 días a 25°C en anaerobiosis, y micrografía (Nomarski, 1000×) de cada tipo de colonia aparecida en las placas de MLO.

El vino elaborado con *Saccharomyces* E7AR1 resultó franco y frutal con intensidad media-alta. Se apreciaron aromas tropicales, anisados y recuerdos florales, como cabría esperar por su mayor cantidad en ésteres etílicos de C₆-C₁₀, hexanoato de etilo (0,89 mg/L), octanoato de etilo (0,82 mg/L) y decanoato de etilo (0,27 mg/L) respecto al vino de *Torulaspota* (0,36, 0,066 y 0,022 mg/L, respectivamente). Fue muy agradable en boca, persistente y equilibrado (85% de aceptación), destacando su baja acidez volátil (0,20 g/L), baja cantidad de láctico (0,1 g/L, indicativo de no haber sufrido fermentación maloláctica), y cantidades bajas de isobutirato de etilo (0,078 mg/L), lactato de etilo (0,077 mg/L), lactato de isoamilo (0,00 mg/L), ácido isobutírico (0,68 mg/L) y succinato de etilo (4,9 mg/L). Por el contrario, una vez más, en el vino de *Torulaspota* EX1180-11C4 no aparecieron los intensos matices de frutas y flores del anterior, y se volvieron a detectar recuerdos a pastelería y vainilla. En boca resultó algo evolucionado y con recuerdos a requemados. En conjunto fue menos agradable que el vino de *Saccharomyces* (50% de aceptación), tuvo más acidez volátil (0,28 g/L), láctico (0,74 g/L), isobutirato de etilo (0,161 mg/L), lactato de etilo (1,40 mg/L), lactato de

isoamilo (0,131 mg/L), ácido isobutírico (3,26 mg/L) y succinato de etilo (16,57 mg/L) que el vino de *Saccharomyces*. El incremento de láctico y lactato de etilo en estos vinos es indicativo de haber sufrido fermentación maloláctica, aunque la cantidad de succinato de dietilo, también asociado a la fermentación maloláctica, fue mayor en *Saccharomyces* respecto *Torulaspota* (0,114 mg/L y 0,104 mg/L respectivamente). En su conjunto, el incremento de la acidez volátil y de algunos compuestos destacados anteriormente en los vinos de *Torulaspota* (láctico, lactato de etilo, lactato de isoamilo, ácido isobutírico y succinato de etilo) se corresponden con lo esperado en vinos que han sufrido una fermentación maloláctica poco controlada y algunos pueden perjudicar su calidad aromática, dando notas a yogur rancio, sudor, fósforos quemados y fruta podrida, y una pérdida de equilibrio y complejidad (Anónimo, 2014; Herraiz et al., 1990b; Maicas et al., 1999; Miranda-Lopez et al., 1992; Tofterup, 2012).

IV.2.3. Vinificaciones de uva tinta inoculadas con levaduras *Saccharomyces* o *Torulaspota*. Efecto sobre el consumo de azúcares, fermentación maloláctica, y calidad organoléptica de los vinos.

Al igual que hiciéramos con las vinificaciones de vino blanco, realizamos vinificaciones con pasta de uva tinta siguiendo las recomendaciones de las casas comerciales: inoculación secuencial, inicialmente con *Torulaspota* y dos días después con *Saccharomyces* más la adición de activador de fermentación para asegurar la viabilidad de las levaduras. Al igual que ocurriera con las vinificaciones de mosto blanco, las levaduras *Torulaspota* fueron frecuentemente desplazadas por las levaduras *Saccharomyces* en menos de un día después de su inoculación; y no se apreció ninguna mejora digna de destacar en la calidad organoléptica de los vinos inoculados con *Torulaspota*, probablemente debido a su baja participación en el proceso de fermentación. A diferencia de lo que ocurriera en las vinificaciones de mosto blanco, hubo muy pocos casos en los que las levaduras *Torulaspota* no fueran desplazadas rápidamente y siempre hubo levaduras *Saccharomyces* y nutrientes suficientes como para completar la fermentación sin finales extremadamente lentos, y casi todos los vinos quedaron secos (datos no mostrados).

En consecuencia, al igual que hiciéramos para los vinos blancos, decidimos inocular la pasta de uva exclusivamente con levaduras *Torulaspota*, sin inoculación posterior con *Saccharomyces*. Se realizaron ocho series de vinificaciones con uva de distintas variedades con un grado probable relativamente bajo (10,8-13,6 °Be) para

intentar evitar el efecto tóxico del alcohol sobre las levaduras *Torulaspota* y propiciar que éstas completaran la fermentación quedando los vinos secos. Las fermentaciones inoculadas con levaduras *Saccharomyces* fueron siempre las más rápidas en comenzar y terminar en todas las series de vinificaciones realizadas. Las inoculadas con *Torulaspota* arrancaron también rápidamente pero se fueron haciendo algo más lentas al final de fermentación, aunque no tanto como ocurriera con las fermentaciones de mosto blanco (**Apartado IV.2.2**), y nunca se observaron problemas de final de fermentación, quedando siempre los vinos secos. Las fermentaciones control sin inocular fueron las últimas en arrancar, aunque aceleraron una vez arrancadas y terminaron antes que las inoculadas con *Torulaspota* (**Figs. IV.8, IV.10, IV.13 y IV.15-17**). Las levaduras *Torulaspota* pudieron dominar la fermentación, aunque con más dificultad en la fase final que en las fermentaciones de vino blanco, probablemente porque en estas fermentaciones de tinto había muchas levaduras *Saccharomyces* silvestres procedentes de los hollejos. Esta dominancia fue mayor cuando se inocularon levaduras *Torulaspota* killer (EX1180-11C4 o EX1257-CYH5) respecto a las fermentaciones inoculadas con *Torulaspota* no-killer (TL3 o EX1180-2K). Sólo se apreció fermentación maloláctica y presencia de bacterias en los vinos inoculados con *Torulaspota* (**Figs. IV.10, IV.12, IV.13 y IV.15-17** para consumo de málico y **Fig. IV.14** para presencia de bacterias), y esto fue mucho más frecuente que en los vinos blancos de *Torulaspota*. En todas las fermentaciones inoculadas con *Torulaspota*, si había málico en la uva, se realizó fermentación maloláctica o maloalcohólica en la segunda mitad de la fermentación del mosto. Esto no ocurrió en las fermentaciones inoculadas con *Saccharomyces* ni en la gran mayoría de las fermentaciones control sin inocular. En consecuencia, la acidez volátil fue algo mayor en los vinos de *Torulaspota* que en el resto, aunque nunca llegó a ser inaceptablemente alta (media de $0,45 \pm 0,11$ g/L).

En general, y en contraste con lo ocurrido en vinos blancos, se apreciaron mejoras evidentes en algunos parámetros enológicos y en la calidad de los vinos de *Torulaspota* (**Tablas IV.2-IV.8**). Éstos resultaron más redondos en boca, con aromas a fruta confitada/pastelería, y tonos lacteados. En contraprestación, como es lógico, disminuyó la intensidad de los aromas frutales respecto a los vinos inoculados con *Saccharomyces* o control sin inocular, en los que no se produjo fermentación maloláctica. Los resultados fueron similares en las ocho series de fermentaciones realizadas con distintas variedades de uvas tintas (Cabernet-Sauvignon, Tempranillo, Pinot-Noir, y Garnacha). A continuación detallamos los pormenores de cada serie de vinificaciones realizadas, y

posteriormente se muestra un estudio conjunto para determinar la utilidad real de *Torulaspota* en la mejora de la calidad del vino tinto.

IV.2.3.1. Primera serie de vinificaciones de uva Cabernet-Sauvignon (2011-1).

La vinificación más rápida fue la inoculada con la levadura *S. cerevisiae* que dominó durante toda la fermentación en una proporción del 100%. Las fermentaciones inoculadas con levaduras *T.delbrueckii* fueron más lentas y la tasa de imposición de cada levadura fue bajando progresivamente desde el 100% hasta llegar al entorno del 10% a los 18 días del inicio. No obstante, las tres levaduras *Torulaspota* dominaron en una proporción superior al 70% durante la fase tumultuosa (días 2 a 4). La *Torulaspota* no-killer TL3 se impuso con una tasa ligeramente inferior a la correspondiente a las levaduras killer Kbarr EX1180-11C4 y EX1257-CYH5. La fermentación correspondiente al control espontáneo sin inocular fue la última en arrancar pero terminó antes que las inoculadas con *Torulaspota* (**Fig. IV.8**). En esta fermentación se detectaron levaduras silvestres con patrones de RFLP-mtDNA distintos a los de las levaduras inoculadas, algunos de los cuales también aparecieron en las fermentaciones inoculadas con las levaduras *T. delbrueckii*, incrementando su proporción a medida que avanzó la fermentación. Sin embargo, estas levaduras no se detectaron en la fermentación inoculada con *S. cerevisiae* E7AR1, que dominó la fermentación en una proporción del 100% de principio a fin (**Fig. IV.9**). Se observó una correlación muy alta entre la proporción de levaduras inoculadas medida con marcador genético (CYH^R) y medida con el análisis de los patrones de RFLP-mtDNA (**Figs. IV.8 y IV.9**).

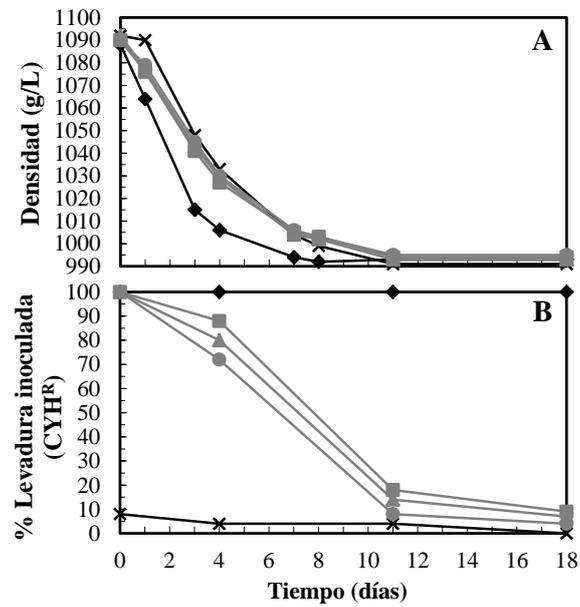


Figura IV.8. Evolución de las fermentaciones de uva Cabernet-Sauvignon 2011-1 inoculadas con distintas levaduras exclusivamente en el encubado. Estirpes de *S. cerevisiae*: E7AR1 (K2, CYH^R). Estirpes de *T. delbrueckii*: EX1180-11C4 (Kbarr, CYH^R), EX1257-CYH5 (Kbarr, CYH^R) y TL3 (no-killer, CYH^R). A: Densidad. B: Proporción de levaduras inoculadas (CYH^R). Símbolos: Sin inocular (—x—), E7AR1 (—◆—), EX1180-11C4 (—■—), EX1257-CYH5 (—●—) y TL3 (—▲—).

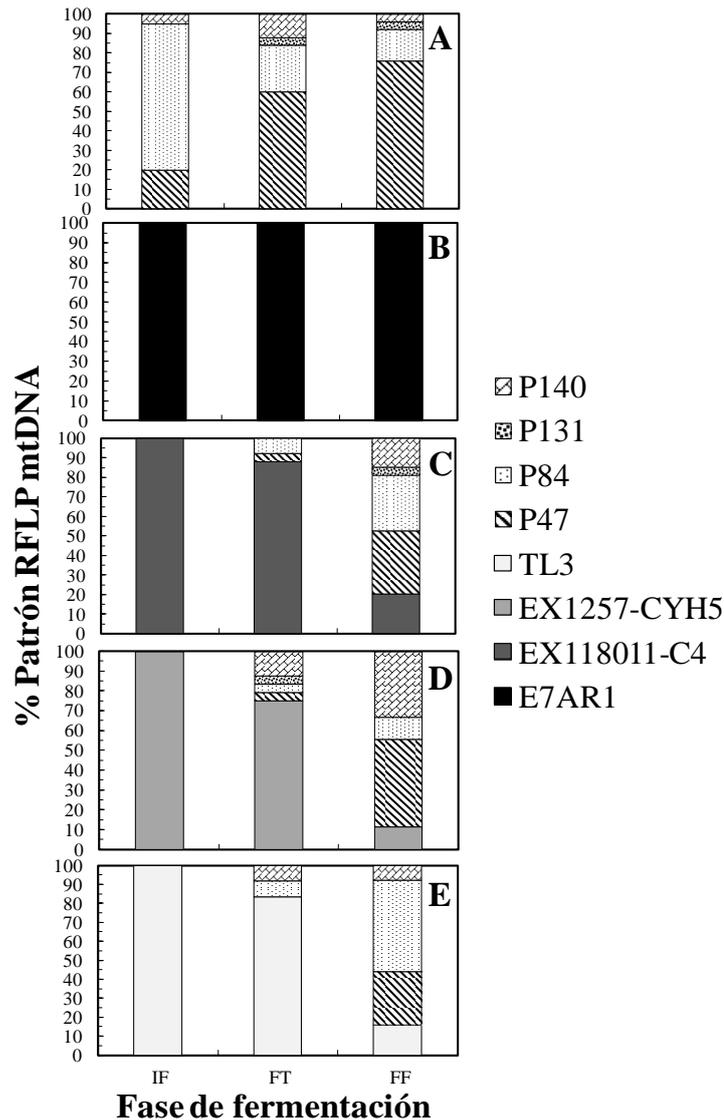


Figura IV.9. Evolución de las distintas poblaciones de levaduras durante las fermentaciones de uva Cabernet-Sauvignon 2011-1 sin inocular (A) o inoculadas con *S. cerevisiae* E7AR1 (B), *T. delbrueckii* EX1180-11C4 (C), *T. delbrueckii* EX1257-CYH5 (D) y *T. delbrueckii* TL3 (E). P47, P84, P131 y P140 son patrones de RFLP-mtDNA de levaduras silvestres presentes en el mosto. IF, inicio de fermentación (día 0). FT, fermentación tumultuosa (día 4). FF, final de fermentación (día 11).

Como consecuencia de un final de fermentación lento, los vinos de las tres vinificaciones inoculadas con *Torulaspora* quedaron con más azúcares que el inoculado con *Saccharomyces* o el control espontáneo. Esto debió facilitar la fermentación maloláctica incrementando la cantidad de láctico, el pH y la acidez volátil; a la vez que disminuyó la cantidad de málico y la acidez fija respecto al vino inoculado con *Saccharomyces* y el control espontáneo, en los que no se produjo fermentación maloláctica. Todos los vinos resultaron con mucho cuerpo y muy estructurados, como corresponde a una elaboración con 100% de Cabernet-Sauvignon. Los vinos elaborados

con las dos levaduras *T. delbrueckii* autóctonas, EX1180-11C4 y EX1257-CYH5, fueron los más apreciados por los catadores. El elaborado con la *Torulaspora* comercial TL3 fue menos apreciado junto con el vino control. El elaborado con *S.cerevisiae* E7AR1 quedó en una posición intermedia (**Tabla IV.2**). Los catadores destacaron la fase olfativa del vino inoculado con *Torulaspora* EX1180-11C4 como el más complejo de todos, aun siendo algo menos intenso que los de E7AR1 y EX1257-CYH5, con recuerdos a la variedad y aromas a frutas rojas, regaliz y ligeros lacteados. En cuanto a la fase gustativa, los vinos inoculados con *Torulaspora* presentaron en general una boca más agradable y equilibrada, probablemente debido a que tenían ligeros restos de azúcar (5,1 g/L para EX1180-11C4, 4,8 g/L para EX1257-CYH5 y 6,1 g/L para TL3), con una ligera sensación abocada y un mejor equilibrio final.

Tabla IV.2. Parámetros generales de las fermentaciones y vinos tintos Cabernet-Sauvignon 2011-1 elaborados con levaduras seleccionadas *Saccharomyces*, *Torulaspora* o sin inocular (control espontáneo).

Parámetro	Vino				
	Control	E7AR1	EX1180-11C4	EX1257-CYH5	TL3
T15 (días)	1,76	0,90	1,38	1,67	1,43
T100 (días)	10	8	11	11	11
Aceptación (%)	60	70	90	80	60
Imposición en FT (%, día 4)	4,0	100,0	88,0	72,0	80,0
Imposición en FF (%, día 11)	4,0	100,0	12,0	8,0	16,0
Etanol (% v/v)	14,2	13,5	13,3	13,3	13,8
pH	3,26	3,32	3,41	3,37	3,39
Acidez total (g/L)	8	8,8	7,3	7,6	7,2
Acidez volátil (g/L)	0,41	0,38	0,63	0,42	0,49
Densidad (g/L)	991	992	994	994	994
Az. reductores (g/L)	3,1	2,2	5,1	4,8	6,1
Ác. málico (g/L)	1,35	1,48	0,15	0,48	0,26
Ác. láctico (g/L)	0,14	0,11	0,76	0,64	0,66

Parámetros del mosto: densidad 1092 g/L, acidez total 8,9 g/L, pH 3,27, málico 1,6 g/L, láctico 0,1 g/L. La temperatura de fermentación fue 20-24°C. El descube se realizó el día 8 de fermentación (densidad 1000 g/L para todos los vinos excepto para el de E7AR1 que tenía 992 g/L) y el primer trasiego a los 11 días de fermentación. La temperatura almacenamiento fue 12°C. FT, fermentación tumultuosa. FF, final de fermentación.

IV.2.3.2. Segunda serie de vinificaciones de uva Cabernet-Sauvignon (2011-2).

Las cinéticas de fermentación repitieron básicamente el mismo esquema de la serie anterior. Las levaduras *Saccharomyces* fueron siempre las más rápidas en comenzar y terminar, las *Torulaspora* arrancaron también rápidamente pero se fueron

haciendo algo más lentas al final de fermentación, y la fermentación control fue la última en arrancar pero aceleró hasta terminar antes que las inoculadas con *Torulaspota*. La tasa de imposición de las levaduras *T.delbrueckii* fue bajando progresivamente desde el 100% hasta el 30% a los 18 días del inicio, no obstante dominaron en más del 90% en fase tumultuosa (días 2 a 4). La *Torulaspota* no-killer TL3 se impuso con una tasa bastante inferior a la correspondiente a las levaduras killer Kbarr EX1180-11C4 y EX1257-CYH5. En la fermentación control se detectaron levaduras silvestres con patrones de RFLP-mtDNA distintos a los de las levaduras inoculadas, algunos de los cuales también aparecieron en las fermentaciones inoculadas con las levaduras *T. delbrueckii*, incrementando su proporción a medida que avanzó la fermentación. Sin embargo, estas levaduras no se detectaron en la fermentación inoculada con *S. cerevisiae* E7AR1, que dominó la fermentación en una proporción del 100% de principio a fin (**Figs. IV.10B y IV.11B**). Se observó una correlación muy alta entre la proporción de levaduras inoculadas medida con marcador genético (CYH^R) y medida con el análisis de los patrones de RFLP-mtDNA (**Figs. IV.10B y IV.11C, D y E**). Sólo se apreció fermentación maloláctica en los vinos inoculados con *Torulaspota* (**Fig. IV.10C**).

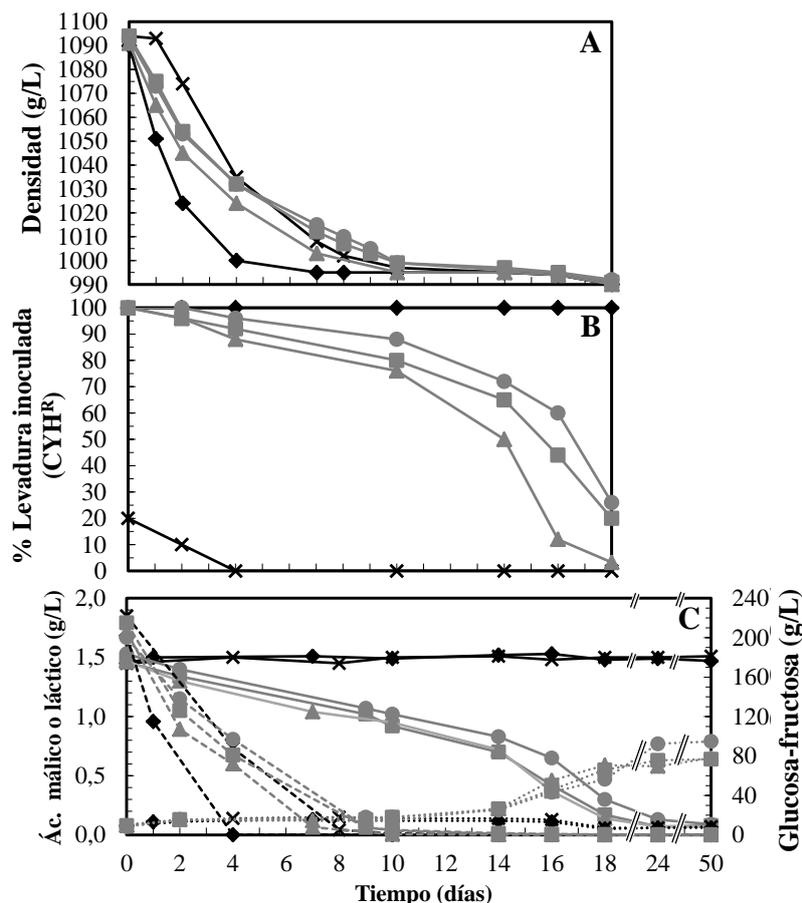


Figura IV.10. Evolución de las fermentaciones de uva Cabernet-Sauvignon 2011-2 inoculadas con distintas levaduras exclusivamente en el encubado. Estirpes de *S. cerevisiae*: E7AR1 (K2, CYH^R). Estirpes de *T. delbrueckii*: EX1180-11C4 (Kbarr-1, CYH^R), EX1257-CYH5 (Kbarr-2, CYH^R) y TL3 (no-killer, CYH^R). A: Densidad. B: Proporción de levaduras resistentes a cicloheximida (CYH^R) C: Consumo de ácido málico y azúcares, y producción de ácido láctico. Símbolos: Sin inocular (—x—), E7AR1 (—◆—), EX1180-11C4 (—■—), EX1257-CYH5 (—●—) y TL3 (—▲—). Glucosa-fructosa (g/L) (---) y ácido láctico (g/L) (···).

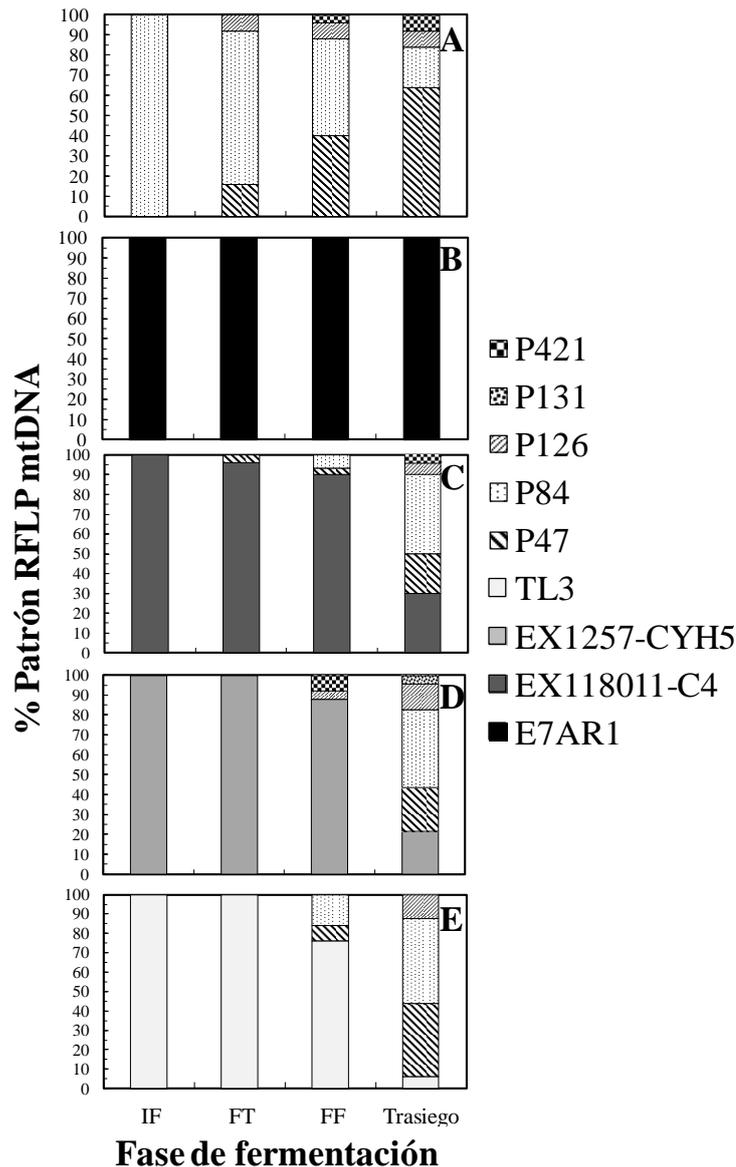


Figura IV.11. Evolución de las distintas poblaciones de levaduras durante las fermentaciones de uva Cabernet-Sauvignon 2011-2 sin inocular (A) o inoculadas con *S. cerevisiae* E7AR1 (B), *T. delbrueckii* EX1180-11C4 (C), *T. delbrueckii* EX1257-CYH5 (D) y *T. delbrueckii* TL3 (E). P47, P84, P126, P131 y P421 son patrones de RFLP-mtDNA de levaduras silvestres presentes en el mosto. IF, inicio de fermentación (día 0). FT (día 4), fermentación tumultuosa. FF, final de fermentación (día 10). Trasiego, realizado a los 18 días de inicio de fermentación.

Los vinos de *Torulaspora* quedaron con más azúcares, más ácido láctico, mayor pH, mayor acidez volátil, menos ácido málico y menos acidez fija que el vino inoculado con *Saccharomyces* o el control espontáneo, en los que no se produjo fermentación maloláctica. Todos los vinos resultaron con mucho cuerpo y muy estructurados, como corresponde a una elaboración con 100% de Cabernet-Sauvignon. Los vinos elaborados con las dos levaduras *T. delbrueckii* autóctonas, EX1180-11C4 y EX1257-CYH5, fueron otra vez los más apreciados por los catadores, pero esta vez junto al vino control.

El elaborado con la *Torulaspota* comercial TL3 fue menos apreciado, y el elaborado con *S. cerevisiae* E7AR1 volvió a quedar en una posición intermedia (**Tabla IV.3**). En el vino mejor evaluado de *Torulaspota*, EX1180-11C4, todos los catadores detectaron una agradable fase olfativa, con notas a frutas rojas y tonos lacteados que recordaban a yogur de fresa y frambuesa. Este vino no presentó toques vegetales que recordaran a la variedad, pero en boca fue el más equilibrado destacando menos la acidez que en los otros vinos, además de mostrar buena estructura y persistencia. Se apreciaron lacteados y frutales persistentes en vía retronasal. La fase olfativa de los dos vinos elaborados con *Saccharomyces*, control y E7AR1, resultó claramente diferenciada con matices frutales y vegetales que se asocian a la variedad y no presentaron notas de lacteados. Claramente, los vinos elaborados con levaduras *Torulaspota* pierden buena parte del carácter varietal y aparecen las notas lacteadas con diferente intensidad. En cuanto a la fase gustativa, los vinos presentaron en general características de vinos nuevos sin madurar con perfiles astringentes y ácidos que se presupone se redondearán con el tiempo. En el momento de las dos catas realizadas (aproximadamente al mes y a los dos meses del final de fermentación), el más agradable en boca fue siempre el vino elaborado con la levadura *Torulaspota* EX1180-11C4, habiendo mejorado muy claramente en la segunda cata el vino de EX1257-CYH5. Ambos resultaron por tanto más equilibrados y presentaron sensaciones astringentes más atenuadas que el resto, probablemente debido también al ligero contenido en azúcares reductores que contribuyó a mejorar esta sensación.

Tabla IV.3. Parámetros generales de las fermentaciones y vinos tintos Cabernet-Sauvignon 2011-2 elaborados con levaduras seleccionadas *Saccharomyces*, *Torulaspora* o sin inocular (control espontáneo).

Parámetro	Vino				
	Control	E7AR1	EX1180-11C4	EX1257-CYH5	TL3
T15 (días)	2,67	0,83	1,5	1,25	1,17
T100 (días)	8,0	4,0	9,5	9,5	9,0
Aceptación (%)	86	70	87	85	60
Imposición en FT (% , día 4)	0,0	100,0	88,0	94,0	88,0
Imposición en FF (% , día18)	0,0	100,0	20,0	26,0	3,25
Etanol (% , v/v)	13,2	12,6	13,0	13,0	12,9
pH	3,3	3,28	3,43	3,4	3,47
Acidez total (g/L)	8,5	8,6	7,1	7,2	6,4
Acidez volátil (g/L)	0,31	0,24	0,65	0,43	0,63
Densidad (g/L)	990	990	991	992	990
Az. reductores (g/L)	2,4	2,0	3,9	3,7	3,1
Ác. málico (g/L)	1,54	1,43	0,08	0,09	0,07
Ác. láctico (g/L)	0,07	0,06	0,64	0,79	0,65

Parámetros del mosto: densidad 1094 g/L, acidez total 8,8 g/L, pH 3,26, málico 1,6 g/L, láctico 0,08 g/L. La temperatura de fermentación fue 20-26°C. El descube se realizó el día 4 de fermentación para E7AR1, el día 7 para TL3, el día 8 para el Control, y el día 9 para EX1180-11C4 y EX1257-CYH5 (densidad 1000 g/L, 1003 g/L, 1002 g/L, 1003 g/L y 1005 g/L, respectivamente). El primer trasiego se realizó a los 18 días de fermentación. La temperatura almacenamiento fue 12°C. FT, fermentación tumultuosa. FF, final de fermentación.

IV.2.3.3. Tercera serie de vinificaciones de uva Cabernet-Sauvignon (2012-1).

Las cinéticas de fermentaciones repitieron básicamente el mismo esquema de las dos series anteriores. Las levaduras *Saccharomyces* dominaron con una tasa del 100% y fueron las más rápidas en comenzar y terminar, las *Torulaspora* arrancaron también rápidamente pero fueron haciéndose más lentas al final de fermentación. En esta ocasión no se realizó fermentación control sin inocular. La tasa de imposición de las levaduras *T.delbrueckii* bajó ligeramente desde el 100% hasta algo más del 80% a los 18 días del inicio, no obstante dominaron en más del 90% en fase tumultuosa (días 2 a 4). Sólo se apreció consumo de málico en los vinos inoculados con *Torulaspora*, y fermentación maloláctica solo en el inoculado con EX1180-11C4 (**Fig. IV.12**).

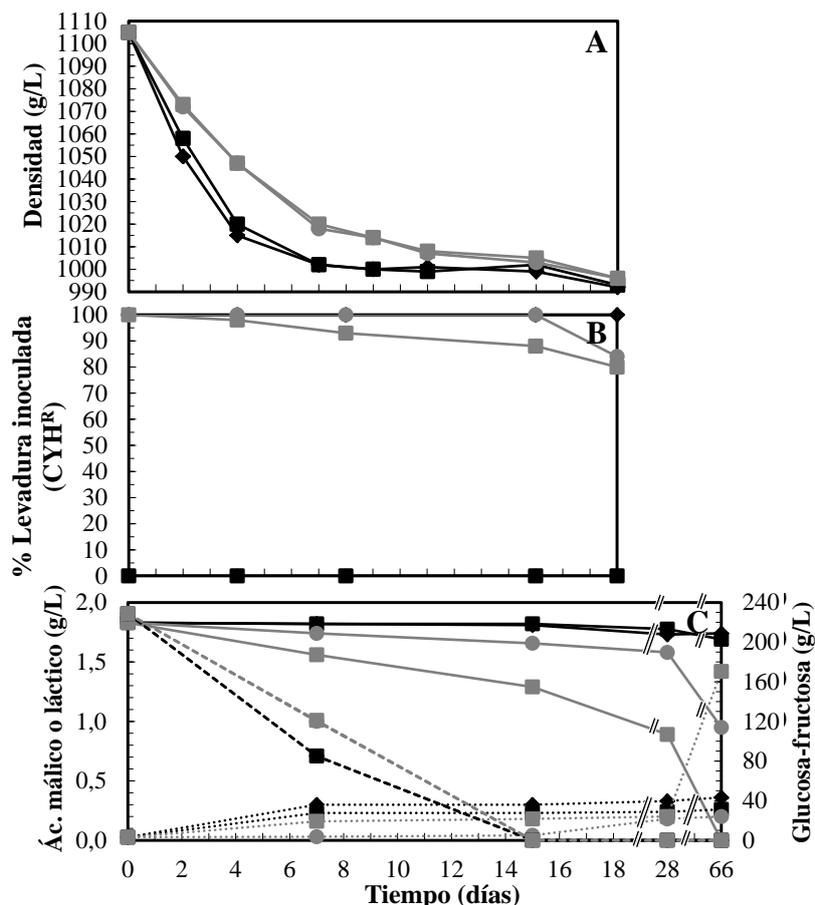


Figura IV.12. Evolución de las fermentaciones de uva Cabernet-Sauvignon 2012-1 inoculadas con distintas levaduras exclusivamente en el encubado. Estirpes de *S. cerevisiae*: EX73 (K2, CYH^R) y E7AR1 (K2, CYH^R). Estirpes de *T. delbrueckii*: EX1180-11C4 (Kbarr-1, CYH^R) y EX1257-CYH5 (Kbarr-2, CYH^R). A: Densidad. B: Proporción de levaduras resistentes a cicloheximida (CYH^R) C: Consumo de ácido málico y azúcares, y producción de ácido láctico. Símbolos: EX73 (—■—), E7AR1 (—◆—), EX1180-11C4 (—■—) y EX1257-CYH5 (—●—). Glucosa-fructosa (g/L) (---) y ácido láctico (g/L) (···).

Los vinos de *Torulaspora* quedaron con más azúcares, más láctico (sólo el de EX1180-11C4), mayor pH, mayor acidez volátil, menos málico y menos acidez fija que los vinos inoculados con *Saccharomyces*, en los que casi no se produjo consumo de málico. Todos los vinos resultaron con mucho cuerpo y muy estructurados, como corresponde a una elaboración con 100% de Cabernet-Sauvignon. Los vinos elaborados con las dos levaduras *T. delbrueckii* autóctonas, EX1180-11C4 y EX1257-CYH5, fueron otra vez los más apreciados por los catadores, especialmente el que realizó fermentación maloláctica, EX1180-11C4 (**Tabla IV.4**). Todos los vinos resultaron francos pero con ligeros matices que los diferenciaban muy bien. Los dos vinos de *Saccharomyces*, EX73 y E7AR1, se consideraron vinos secos, y los dos de *Torulaspora*, EX1180-11C4 y EX1257-CYH5, ligeramente abocados. En la segunda cata, realizada

aproximadamente a los dos meses desde el inicio de fermentación, en los vinos de *Saccharomyces* bajó la calificación final con respecto la primera valoración, aunque el resultado fue muy similar, destacando los aromas de frutas rojas maduras y vegetales propios de la variedad. En los dos vinos de *Torulaspota* las características fueron similares a las mencionadas en la primera cata, aunque en ambos casos mejoró ligeramente la valoración, especialmente para el vino de EX1180-11C4 donde aumentó claramente la calidad al acentuarse las notas lacteadas (debido a la fermentación maloláctica) y de frutos rojos manteniendo la presencia de un ligero toque a regaliz. Ambos vinos de *Torulaspota* resultaron por tanto más redondos en boca, maduros y con mejores características organolépticas que el resto, lo que los hacía aptos para ser consumidos ya en ese momento.

Tabla IV.4. Parámetros generales de las fermentaciones y vinos tintos Cabernet-Sauvignon 2012-1 elaborados con levaduras seleccionadas *Saccharomyces*, *Torulaspota*.

Parámetro	Vino			
	EX73	E7AR1	EX1180-11C4	EX1257-CYH5
T15 (días)	1,5	1,1	1,7	2,0
T100 (días)	11	11	15	15
Aceptación (%)	65	75	85	80
Imposición en FT (% día 4)	100	100	100	98
Imposición en FF (% día18)	100	100	84	80
Alcohol (% v/v)	14,8	14,5	14,6	14,6
pH	3,64	3,64	3,74	3,65
Acidez total (g/L)	7,4	6,9	5,1	5,7
Acidez volátil (g/L)	0,39	0,34	0,45	0,40
Densidad (g/L)	993	993	994	994
Az. reductores (g/L)	1,9	1,6	5,1	5,1
Ác. málico (g/L)	2,10	2,03	0,10	1,40
Ác. láctico (g/L)	0,19	0,19	1,52	0,21

Parámetros del mosto: densidad 1105 g/L, acidez 7,6 g/L, pH 3,63, málico 2,14 g/L, láctico 0,03 g/L. La temperatura de fermentación fue 16,5-24 °C. El descube se realizó el día 8 de fermentación para los vinos de *Saccharomyces* (EX73 y E7AR1, densidad 1000 g/L en ambos casos), y el día 9 para los de *Torulaspota* (EX1189-11C4 y EX1257-CYH5, densidad 1014 g/L en ambos casos). El primer trasiego se realizó a los 18 días de fermentación. La temperatura almacenamiento fue 12°C. FT, fermentación tumultuosa. FF, final de fermentación.

IV.2.3.4. Cuarta serie de vinificaciones de uva Cabernet-Sauvignon (2012-2).

Una vez más, las cinéticas de fermentaciones repitieron básicamente el mismo esquema que las series anteriores. Las levaduras *Saccharomyces* dominaron al 100% y

fueron siempre las más rápidas en comenzar y terminar, las *Torulaspora* arrancaron también rápidamente pero se fueron haciendo algo más lentas al final de fermentación, y el control fue el último en arrancar pero aceleró hasta terminar antes que las levaduras *Torulaspora*. La tasa de imposición de las levaduras *T.delbrueckii* bajó progresivamente desde 100% hasta a menos del 3% a los 18 días del inicio, no obstante dominaron en más del 70% en fase tumultuosa (días 2 a 4). Una vez más, la *Torulaspora* no-killer TL3 se impuso con una tasa bastante inferior a la correspondiente a las levaduras killer Kbarr EX1180-11C4 y EX1257-CYH5. Sólo se apreció consumo de málico y presencia destacada de bacterias ($3,4-5,2 \times 10^4$ CFU/mL) en los vinos inoculados con *Torulaspora*, aunque en ningún caso se produjo fermentación maloláctica (Figs. IV.13 y IV.14), probablemente debido a la alta acidez total y bajo pH de estos vinos.

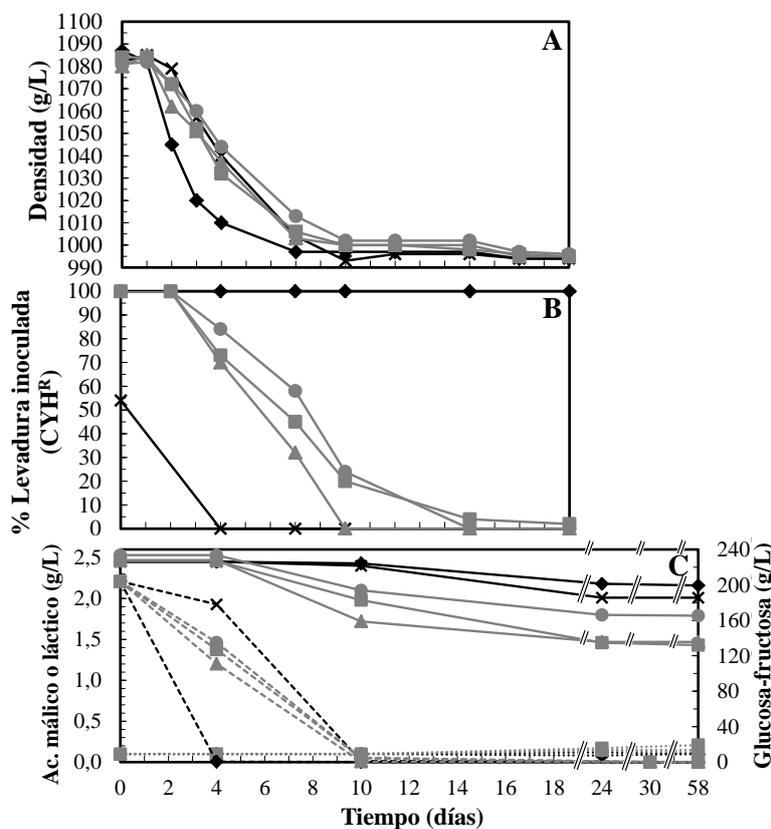


Figura IV.13. Evolución de las fermentaciones de uva Cabernet-Sauvignon 2012-2 inoculadas con distintas levaduras exclusivamente en el encubado. Estirpes de *S. cerevisiae*: E7AR1 (K2, CYH^R). Estirpes de *T. delbrueckii*: EX1180-11C4 (Kbarr, CYH^R), EX1257-CYH5 (Kbarr, CYH^R) y TL3 (no-killer, CYH^R). A: Densidad. B: Proporción de levaduras resistentes a cicloheximida (CYH^R) C: Consumo de ácido málico y azúcares, y producción de ácido láctico. Símbolos: Sin inocular (—x—), E7AR1 (—◆—), EX1180-11C4 (—■—), EX1257-CYH5 (—●—) y TL3 (—▲—). Glucosa-fructosa (g/L) (---) y ácido láctico (g/L) (...).

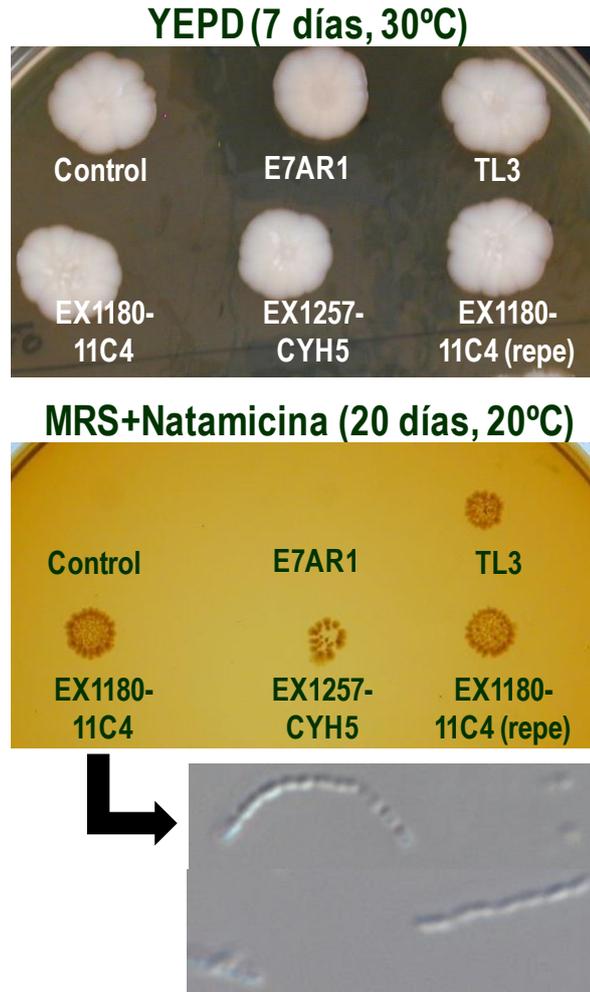


Figura IV.14. Presencia de levaduras y bacterias el día 72 desde encubado en los vinos Cabernet-Sauvignon 2012-2 inoculadas con distintas levaduras exclusivamente en mosto. Crecimiento de levaduras en placa de YEPD y de bacterias en placa de MRS+natamicina (10 mL/L de Fungiol). Se sembraron 20 μ L de cada vino. La placa de YEPD se incubó durante 7 días a 30 °C y la de MRS+natamicina 20 días a 20°C en anaerobiosis. Se muestra una micrografía (Nomarski, 1000 \times) de las bacterias viables procedentes de una colonia aislada en placa de MRS+natamicina inoculada con 100 μ L de vino EX1180-11C4. Estirpes de *S. cerevisiae*: E7AR1 (K2, CYH^R). Estirpes de *T. delbrueckii*: EX1180-11C4 (Kbarr, CYH^R), EX1257-CYH5 (Kbarr, CYH^R) y TL3 (no-killer, CYH^R).

Una vez más, los vinos de *Torulaspora* quedaron con más azúcares, y menos málico que el vino inoculado con *Saccharomyces* o el control espontáneo, en los que no se produjo consumo de málico. En esta ocasión no se apreciaron diferencias importantes en láctico, pH, acidez total o acidez volátil. Todos los vinos resultaron con mucho cuerpo y muy estructurados, como corresponde a una elaboración con 100% de Cabernet-Sauvignon. Los vinos elaborados con las dos levaduras *T. delbrueckii* autóctonas, EX1180-11C4 y EX1257-CYH5, fueron otra vez los más apreciados por los catadores, aunque esta vez junto al vino control. El elaborado con la *Torulaspora*

comercial TL3 fue menos apreciado, y el elaborado con *S. cerevisiae* E7AR1 volvió a quedar en una posición intermedia (**Tabla IV.5**). Al igual que ocurrió en las series de vinificaciones anteriores, los vinos resultaron francos con ligeros matices que los diferenciaban claramente. Esta diferencia se acrecentó en la segunda cata realizada aproximadamente a los dos meses desde el inicio de la fermentación. En la fase gustativa resultaron muy ácidos debido a la adición de ácido málico (1 g/L) en todos los mostos, lo que unido a la astringencia propia de los vinos tintos jóvenes 100% de Cabernet-Sauvignon, los hizo bastante duros en boca. Sólo los vinos de las *Torulaspota* EX1180-11C4 y EX1257-CYH5 resultaron más equilibrados, más redondos, algo más agradables en boca y aptos para consumir en ese momento. De nuevo, y como ya ocurriera en las vinificaciones anteriores, la intensidad de las notas vegetales y varietales fue mayor en los vinos de *Saccharomyces*, Control y E7AR1, siendo los vinos de *Torulaspota* de intensidad media con notas aromáticas de frutos rojos maduros y toques lacteados, que sin duda le aportaron cierta complejidad en la valoración final.

Tabla IV.5. Parámetros generales de las fermentaciones y vinos tintos Cabernet-Sauvignon 2012-2 elaborados con levaduras seleccionadas *Saccharomyces*, *Torulaspota* o sin inocular (control espontáneo).

Parámetro	Vino				
	Control	E7AR1	EX1180-11C4	EX1257-CYH5	TL3
T15 (días)	3,4	1,7	2,8	5	3,1
T100 (días)	9	7	16	16	16
Aceptación (%)	87	75	83	85	70
Imposición en FT (% , día 4)	0,00	100	73	84,1	70
Imposición en FF (% , día18)	0,00	100	2,00	0,00	0,00
Etanol (% , v/v)	14	13,7	13,6	13,8	13,8
pH	3,23	3,31	3,29	3,23	3,29
Acidez total (g/L)	8,8	9,3	8,7	9,3	8,5
Acidez volátil (g/L)	0,31	0,25	0,37	0,33	0,36
Densidad (g/L)	993	993	995	995	994
Az. reductores (g/L)	2,1	1,9	3,1	3,7	3,00
Ác. málico (g/L)	2,01	2,16	1,43	1,80	1,47
Ác. láctico (g/L)	0,10	0,08	0,21	0,12	0,15

Parámetros del mosto: densidad 1084 g/L, acidez 9,4 g/L, pH 3,24, málico 2,45 g/L, láctico 0,01 g/L. La temperatura de fermentación fue 16-26°C. El descube se realizó el día 7 de fermentación (densidades: Control 1004 g/L, E7AR1 997 g/L, TL3 1003 g/L, EX1180-11C4 1006 g/L y EX1257-CYH5 1002 g/L). El primer trasiego se realizó a los 23 días. La temperatura almacenamiento fue 12°C. FT, fermentación tumultuosa. FF, final de fermentación.

IV.2.3.5. Vinificaciones de uva Tempranillo (2012).

Una vez más, las cinéticas de fermentación repitieron el mismo esquema que las series anteriores. Las levaduras *Saccharomyces* dominaron al 100% y fueron siempre las más rápidas en comenzar y terminar; las levaduras *Torulaspota* arrancaron también rápidamente pero se fueron haciendo algo más lentas al final de fermentación; y el control fue el último en arrancar pero aceleró hasta terminar antes que las *Torulaspota*. La tasa de imposición de las levaduras *T.delbrueckii* bajó desde 100% hasta el 20% a los 15 días del inicio, no obstante dominaron al 100% en fase tumultuosa (días 2 a 4). En esta ocasión se apreció consumo de málico, fermentación maloláctica y presencia de bacterias en todos los vinos, aunque de manera más destacada en el inoculado con *Torulaspota* EX1180-11C4 (**Fig. IV.15**).

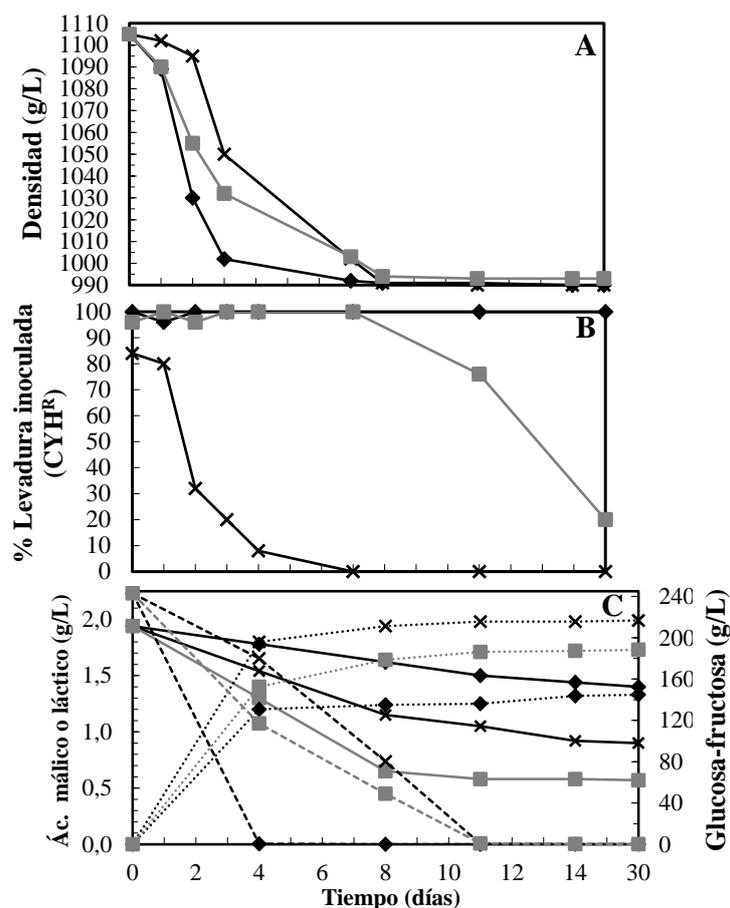


Figura IV.15. Evolución de las fermentaciones de uva Tempranillo 2012 inoculadas con distintas levaduras exclusivamente en el encubado. Estirpes de *S. cerevisiae*: E7AR1 (K2, CYH^R). Estirpes de *T. delbrueckii*: EX1180-11C4 (Kbarr-1, CYH^R). A: Densidad. B: Proporción de levaduras resistentes a cicloheximida (CYH^R). C: Consumo de ácido málico y azúcares, y producción de ácido láctico. Símbolos: Sin inocular (—x—), E7AR1 (—◆—) y EX1180-11C4 (—■—). Glucosa-fructosa (g/L) (---) y ácido láctico (g/L) (···).

Una vez más, el vino de *Torulaspora* quedó con algo más de azúcares, menos málico, más láctico, mayor pH, menos acidez total y más acidez volátil que el vino inoculado con *Saccharomyces* o el control espontáneo, aunque en esta ocasión las diferencias fueron mínimas porque en todos los vinos se produjo fermentación maloláctica. Probablemente, la relativamente baja acidez fija y alto pH de esta uva Tempranillo, procedente de viñedo sin riego y de vendimia muy tardía (5 de octubre), fue determinante para favorecer el crecimiento de bacterias lácticas. Lógicamente, estos vinos resultaron con menos cuerpo y menos estructurados que los correspondientes a las series anteriores de Cabernet-Sauvignon, como corresponde a una elaboración con 100% de Tempranillo. El vino más apreciado fue otra vez el elaborado con la levaduras *T. delbrueckii* autóctona EX1180-11C4, seguido del elaborado con la levadura *Saccharomyces* E7AR1 y del control, aunque en esta ocasión las diferencias fueron

relativamente pequeñas (**Tabla IV.6**). No obstante, los tres vinos de esta serie se consideraron nuevamente muy distintos según la levadura inoculada. El vino control resultó ser el típico vino tempranillo con aromas propios de su variedad, regaliz y frutas rojas; aunque en la segunda cata fue peor valorado tanto en calidad como en intensidad aromática. El vino inoculado con *Saccharomyces* E7AR1, como era de esperar, presentó más notas de carácter vegetal, con una fase olfativa de intensidad media-alta, aromas típicos de la variedad muy agradables, y un toque de regaliz que se acentuaba vía retronasal. En boca resultó agradable, de cuerpo medio y buena persistencia. Además, en general, las sensaciones de este vino se acercaban a la tipicidad de la variedad y mejoró claramente respecto al vino control. Por último, el vino elaborado con *Torulaspota*, aunque con igual valoración global que el de *Saccharomyces* E7AR1, presentó la típica sensación a “pastelería” descrita anteriormente y en la bibliografía (Anónimo, 2012; Azzolini et al., 2012), de frutas rojas muy dulces y maduras, y algo de regaliz en boca vía retronasal. En resumen, aunque los tres vinos de esta serie resultaron bastante bien valorados, el de *Torulaspota* resultó diferente una vez más, ligeramente más redondo y algo más evolucionado (maduro) en boca, aunque en fase olfativa fue mejor valorado el vino de *Saccharomyces* E7AR1.

Tabla IV.6. Parámetros generales de las fermentaciones y vinos tintos Tempranillo 2012 elaborados con levaduras seleccionadas *Saccharomyces*, *Torulaspota* o sin inocular (control espontáneo).

Parámetro	Vino		
	Control	E7AR1	EX1180-11C4
T15 (días)	2,7	1,3	1,5
T100 (días)	8	7	11
Aceptación (%)	72	74	76
Imposición en FT (% día 4)	0,0	100	100
Imposición en FF (% día 15)	0,0	100	20
Etanol (% v/v)	14,6	13,7	13,7
pH	4,00	3,96	4,05
Acidez total (g/L)	5,1	5,7	4,5
Acidez volátil (g/L)	0,30	0,25	0,32
Densidad (g/L)	990	991	993
Az. reductores (g/L)	1,5	1,5	4,7
Ác. málico (g/L)	0,92	1,44	0,57
Ác. láctico (g/L)	1,94	1,24	1,67

Parámetros del mosto: densidad 1105 g/L, acidez total 5,8 g/L, pH 4,29 (pH 3,78 tras la adicción de 1,5 g/l de tartárico), málico 1,94 g/L, láctico 0,00 g/L. La temperatura de fermentación fue 18-26°C. El descube se realizó el día 7 de fermentación (densidades: Control 1002 g/L, E7AR1 1001 g/L y EX1180-11C4 1003 g/L). El primer trasiego se realizó a los 21 días de fermentación. La temperatura almacenamiento fue 12°C. FT, fermentación tumultuosa. FF, final de fermentación.

IV.2.3.6. Vinificaciones de uva Pinot-Noir (2012).

Las cinéticas de fermentación repitieron una vez más el mismo esquema que en las series anteriores. Las levaduras *Saccharomyces* dominaron al 100% y fueron las más rápidas en comenzar y terminar, las *Torulaspota* arrancaron también rápidamente pero se fueron haciendo algo más lentas al final de fermentación, y el control fue el último en arrancar pero aceleró hasta terminar antes que las *Torulaspota*. La tasa de imposición de las levaduras *T.delbrueckii* se mantuvo en el 100% durante los 9 días que duró la fermentación, y posteriormente se mantuvieron por encima del 90% hasta los 18 días del inicio, incluso en la levadura no-killer EX1180-2K. En la fermentación control dominaron levaduras apiculadas silvestres resistentes a cicloheximida al principio de fermentación, y fueron decreciendo progresivamente hasta el 10% el día 9 del inicio. Se apreció consumo de málico, fermentación maloláctica y presencia de bacterias ($2-8 \times 10^3$ CFU/mL) en todos los vinos excepto en el inoculado con *Saccharomyces* E7AR1,

incluso en el control y el inoculado con *Torulasporea* EX1180-11C4 con adición de 60 mg/L de SO₂ (Fig. IV.16). Aunque la uva tenía poca cantidad de málico (0,67 g/L), la relativamente baja acidez total y baja graduación alcohólica pudo ser determinante para favorecer el crecimiento de bacterias lácticas en las fermentaciones más lentas.

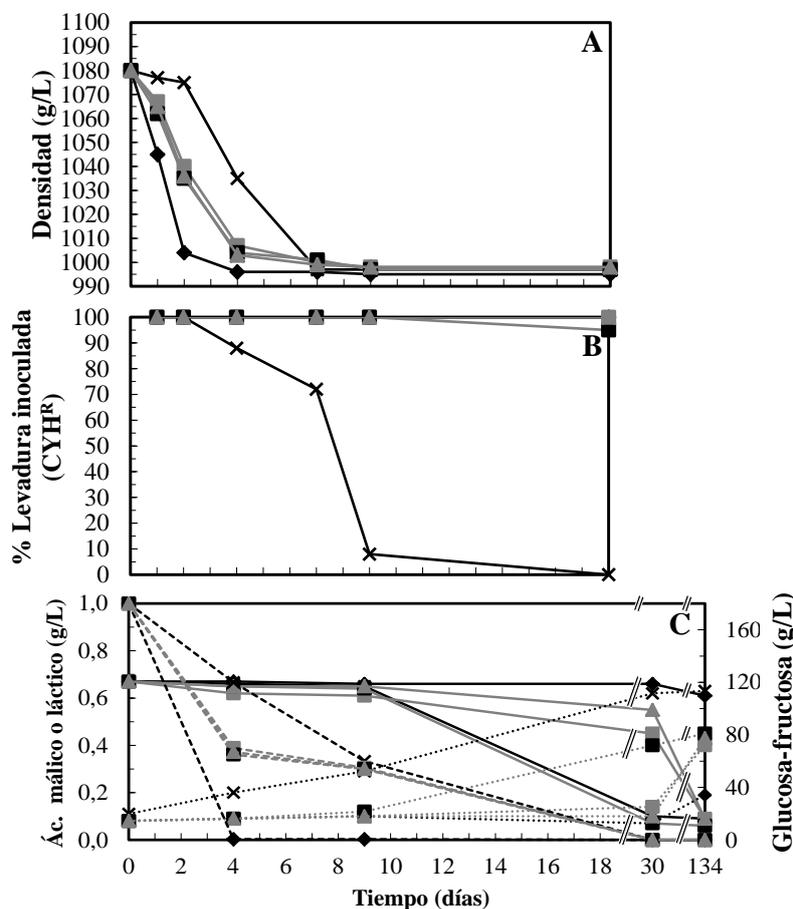


Figura IV.16. Evolución de las fermentaciones de uva Pinot-Noir 2012 inoculadas con distintas levaduras exclusivamente en el encubado. Estirpes de *S. cerevisiae*: E7AR1 (K2, CYH^R). Estirpes de *T. delbrueckii*: EX1180-11C4 (Kbarr-1, CYH^R) y EX1180-2K⁻ (no-killer, CYH^R). A: Densidad. B: Proporción de levaduras resistentes a cicloheximida (CYH^R) C: Consumo de ácido málico y azúcares, y producción de ácido láctico. Símbolos: sin inocular (—x—), E7AR1 (—♦—), EX1180-11C4 (—■—), EX1180-11C4+SO₂ (—◼—) y EX1180-2K⁻ (—▲—). Glucosa-fructosa (g/L) (---) y ácido láctico (g/L) (···).

Como en las series de vinificaciones anteriores, los tres vinos de *Torulasporea* quedaron con algo más de azúcares, menos málico, más láctico, mayor pH, menos acidez total y más acidez volátil que el vino inoculado con *Saccharomyces* E7AR1. El vino control, también con menos málico y más láctico que el vino de *Saccharomyces*, quedó más seco que los vinos de *Torulasporea*, pero con una acidez volátil preocupantemente alta, 0,61 g/L. Estos vinos resultaron con menos cuerpo y menos estructurados que los correspondientes a las series anteriores (incluyendo los elaborados

con uva Tempranillo), como cabría esperar de un vino elaborado con 100% de Pinot-Noir de nuestra región. El vino más apreciado fue otra vez el elaborado con la levaduras *T. delbrueckii* autóctona EX1180-11C4, aunque en esta ocasión las diferencias entre los vinos inoculados con levaduras seleccionadas volvieron a ser relativamente pequeñas (**Tabla IV.7**), como ya ocurrió con los vinos Tempranillo. El vino control fue el menos apreciado y estuvo cerca de la descalificación, probablemente por el impacto de la relativamente alta acidez volátil en el aroma de un vino con tan poca estructura para ser un tinto de la D.O. Ribera del Guadiana.

La tonalidad de estos vinos fue en general aceptable menos para el vino de *Torulaspota* EX1180-2K, que resultó evolucionado desde la primera cata. Todos los vinos presentaron muy poca intensidad comparada con los tintos elaborados en la comarca con las variedades de las vinificaciones anteriores, Cabernet-Sauvignon y Tempranillo. En nariz se volvieron a observar diferencias similares a las descritas en las vinificaciones previas entre los vinos de *Torulaspota* y el resto, pero los defectos encontrados en algunos vinos complicaron la valoración. No obstante, los vinos elaborados con *Saccharomyces* presentaron notas con recuerdo a regaliz rojo, y los de *Torulaspota*, concretamente el de EX1180-11C4, regaliz rojo dulce algo más evolucionado. En general, los vinos de esta serie presentaron desequilibrios de acidez y amargor tenue. Posiblemente esta falta de equilibrio se deba a la baja graduación de los vinos propios de esta variedad. Además, de la primera a la segunda cata, los vinos evolucionaron negativamente en todas las fases. En las vinificaciones anteriores, tal y como se ha comentado, se observó una evolución positiva en los vinos, manteniéndose la fase visual, olfativa y redondeándose (madurando) los vinos en boca. Esta última sensación no se observó en esta serie de vinos, debido posiblemente a la poca estructura y cuerpo que presentaban los vinos de Pinot-Noir desde su elaboración. Se puede concluir que la uva de la variedad Pinot-Noir no se vendimió en su momento óptimo; además, esta variedad necesitaría mejoras en el diseño y conducción del viñedo en el proceso de elaboración para obtener vinos tintos típicos de la comarca.

Tabla IV.7. Parámetros generales de las fermentaciones y vinos tintos Pinot-Noir 2012 elaborados con levaduras seleccionadas *Saccharomyces*, *Torulaspora* o sin inocular (control espontáneo).

Parámetro	Vino				
	Control	E7AR1	EX1180-11C4	EX1180-11C4 (+SO ₂)	EX1180-2K ⁻
T15 (días)	2,75	0,6	1,53	1,1	1,3
T100 (días)	7	7	9	9	9
Aceptación (%)	50	62	65	55	60
Imposición en FT (% (%, día 4)	88	100	100	100	100
Imposición en FF (% (%, día 9)	8	100	100	100	100
Etanol (% (%, v/v)	11,2	11,1	11	11,6	11,5
pH	3,47	3,51	3,57	3,60	3,59
Acidez total (g/L)	5,1	5,5	4,9	4,7	4,9
Acidez volátil (g/L)	0,61	0,36	0,35	0,35	0,35
Densidad (g/L)	994	993	994	995	993
Az. reductores (g/L)	1,7	1,7	3,4	3,3	3,1
Ác. málico (g/L)	0,09	0,61	0,09	0,07	0,09
Ác. láctico (g/L)	0,63	0,19	0,4	0,41	0,43

Parámetros del mosto: densidad 1080 g/L, acidez 5,7 g/L, pH 3,45, málico 0,67 g/L, láctico 0,08 g/L. La temperatura de fermentación fue 18-24 °C. El descube se realizó el día 7 de fermentación (densidades: Control, 997 g/L; E7AR1, 997 g/L; EX1180-11C4, 1000 g/L; EX1180-11C4 (+SO₂), 1001 g/L; y EX1180-2K⁻, 999 g/L). El primer trasiego se realizó a los 23 días. La temperatura de almacenamiento fue 12°C. FT, fermentación tumultuosa. FF, final de fermentación.

IV.2.3.7. Vinificaciones de uva Garnacha (2013).

Una vez más, las levaduras *Saccharomyces* fueron las más rápidas en comenzar y terminar, las *Torulaspora* arrancaron también rápidamente pero se fueron haciendo algo más lentas al final de fermentación, y el control fue el último en arrancar pero aceleró hasta terminar antes que las *Torulaspora*, excepto para EX1180-2K⁻ que fue algo más rápida que el control. La tasa de imposición de todas las levaduras inoculadas, *Saccharomyces* o *Torulaspora*, se mantuvo en el 100% durante toda la fermentación, incluso en la fermentación inoculada con levadura no-killer EX1180-2K⁻. En la fermentación control volvieron a dominar levaduras apiculadas silvestres resistentes a cicloheximida al principio de fermentación (como ya ocurriera con el control de Pinot-Noir), que fueron decreciendo progresivamente hasta desaparecer día 8 del inicio. Solo se apreció consumo destacado de málico en las fermentaciones inoculadas con *Torulaspora* (incluso en la inoculada con *Torulaspora* EX1180-11C4 con adición de 50 mg/L de SO₂), no se apreció consumo en el vino de *Saccharomyces*, y un consumo

intermedio en el vino control; aunque no se apreció fermentación maloláctica en ningún caso (**Fig. IV.17**). Una vez más, aunque la uva tenía poca cantidad de málico (1,3 g/L), se apreció fermentación maloalcohólica en las fermentaciones más lentas.

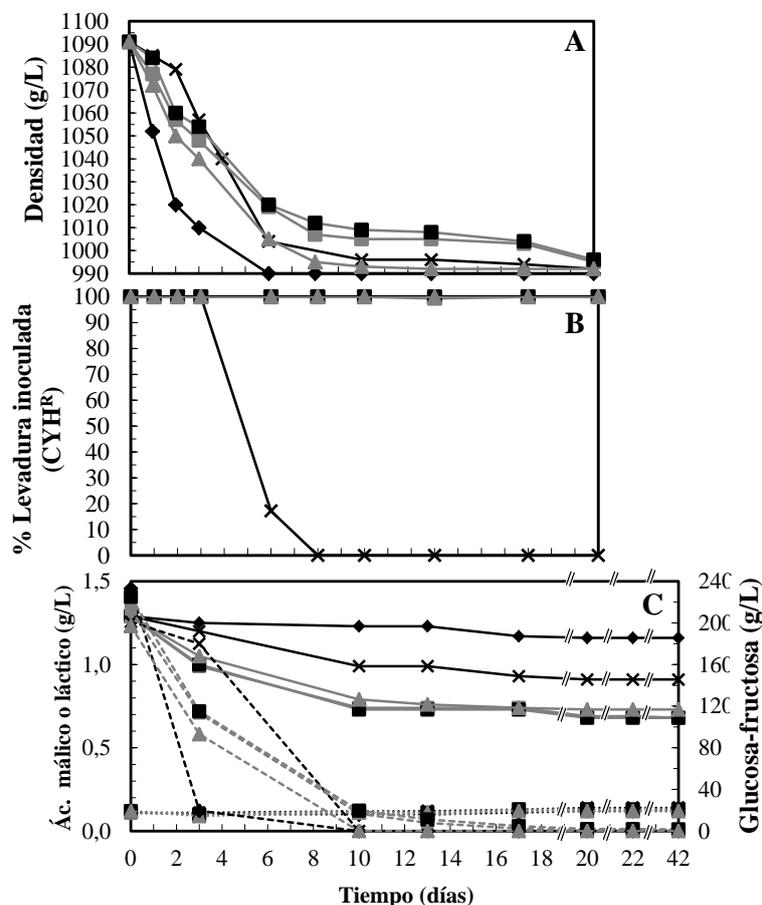


Figura IV.17. Evolución de las fermentaciones de uva Garnacha 2021 inoculadas con distintas levaduras exclusivamente en el encubado. Estirpes de *S. cerevisiae*: E7AR1 (K2, CYH^R). Estirpes de *T. delbrueckii*: EX1180-11C4 (Kbarr, CYH^R) y EX1180-2K⁻ (no-killer, CYH^R). A: Densidad. B: Proporción de levaduras resistentes a cicloheximida (CYH^R) C: Consumo de ácido málico y azúcares, y producción de ácido láctico. Símbolos: sin inocular (—x—), E7AR1 (—♦—), EX1180-11C4 (—■—), EX1180-11C4+SO₂ (—■—) y EX1180-2K⁻ (—▲—). Glucosa-fructosa (g/L) (---) y ácido láctico (g/L) (···).

Como en las series de vinificaciones anteriores, los tres vinos de *Torulaspora* quedaron con algo más de azúcares, menos málico, mayor pH, algo menos acidez total y más acidez volátil que el vino inoculado con *Saccharomyces* E7AR1. Estos vinos resultaron con menos cuerpo y menos estructurados que los de las series anteriores de Cabernet-Sauvignon y Tempranillo, como corresponde a una elaboración con 100% de Garnacha. Al contrario que en las series de vinificaciones anteriores, el vino más apreciado fue el elaborado con *Saccharomyces* E7AR1, y los elaborados con *T. delbrueckii* fueron menos apreciados (**Tabla IV.8**). En general, todos los vinos

presentaron una fase visual similar, con baja intensidad, sin evolución destacada, y resultaron muy cortos de capa para ser vinos tintos elaborados tradicionalmente. En la fase gustativa y olfativa, todos los vinos de esta serie presentaron claros defectos menos el elaborado con *Saccharomyces*, que además fue el mejor valorado: franco, de intensidad media con notas de frutas rojas como fresa y cereza, con recuerdo a regaliz rojo aunque en boca le faltó cuerpo, y ligeramente ácido. El resto de los vinos de *Torulaspota* presentaron defectos y no se apreciaron mejoras dignas de destacar, aunque se apreciaran las diferencias aromáticas descritas previamente relativas a aromas de pastelería y fruta procesada. La impresión general fue que los vinos eran muy cortos para ser vinos tintos, con poca intensidad aromática y poco coloreados.

Tabla IV.8. Parámetros generales de las fermentaciones y vinos tintos Garnacha 2013 elaborados con levaduras seleccionadas *Saccharomyces* y *Torulaspota*.

Parámetro	Vino			
	E7AR1	EX1180-11C4	EX1180-11C4 (+SO ₂)	EX1180-2K
T15 (días)	0,75	1,8	1,8	1,75
T100 (días)	8	17	13	8
Aceptación (%)	70	55	60	50
Imposición en FT (% día 4)	100	100	100	100
Imposición en FF (% día 20)	100	100	100	100
Etanol (% v/v)	14,23	14,2	14,34	14,27
pH	3,47	3,51	3,52	3,53
Acidez total (g/L)	6,4	6,2	6,4	5,9
Acidez volátil (g/L)	0,36	0,67	0,67	0,53
Densidad (g/L)	990	991	991	990
Az. reductores (g/L)	1,4	4,1	5,1	3,1
Ác. málico (g/L)	1,27	0,73	0,73	0,79
Ác. láctico (g/L)	0,13	0,12	0,13	0,12

Parámetros del mosto: densidad 1091 g/L, acidez 6,5 g/L, pH 3,65 sin corregir, pH 3,48 corregido con 1g/L de ácido málico, málico 1,3 g/L, láctico 0,11 g/L. La temperatura de fermentación fue 15-26 °C. El descube se realizó el día 8 de fermentación (densidades: Control, 1000 g/L; E7AR1 990 g/L, EX1180-11C4 1007 g/L y EX1180-11C4 (+SO₂), 1012 g/L; y EX1180-2K, 995 g/L). El primer trasiego se realizó a los 24 días. La temperatura almacenamiento fue 12°C. FT, fermentación tumultuosa. FF, final de fermentación.

En cuanto a la adición de SO₂ en algunos vinos de las series de Pinot-Noir de 2012 (60 mg/L en EX1180-11C4) y Garnacha de 2013 (50 mg/L en EX1180-11C4), no se apreciaron diferencias en la cinética de fermentación, ambas levaduras *Torulaspota*, con o sin SO₂ arrancaron rápidamente haciéndose algo más lentas al final de

fermentación (**Figs. IV.16** y **IV.17**). Además, tampoco observamos diferencias destacables respecto al consumo de málico y formación de láctico (**Tablas IV.7** y **IV.8**), por lo que las cantidades de SO₂ (50-60 mg/L) añadidas no fueron determinantes para inhibir el crecimiento de posibles bacterias lácticas que realizaron la fermentación maloláctica en el caso de la vinificación de Pinot-Noir, o bien la fermentación maloalcohólica que tuvo lugar en el caso de Garnacha, por lo que no hubo inhibición en la degradación de málico.

IV.2.3.8. Análisis de los compuestos aromáticos de los vinos tintos.

Considerando todas las series de vinificaciones de tinto en conjunto y agrupando las cantidades de los distintos compuestos por familias (Σ ésteres etílicos, Σ ésteres de acetato, Σ ácidos, Σ alcoholes, Σ monoterpenos, Σ furanos+fenoles volátiles, Σ lactonas, Σ norisoprenoides, Σ compuestos carbonílicos y Σ otros), no se encontraron diferencias estadísticamente en ningún caso entre los vinos elaborados con *Saccharomyces* o *Torulaspota* (**Fig. IV.18**). Sin embargo, sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas según la levadura inoculada en 29 de los 75 compuestos aromáticos analizados. La cantidad de propionato de etilo (plátano, manzana), lactato de etilo (mantequilla, fruta, fresa), 3-etoxi propan-1-ol (frutal), ácido isobutírico (queso, rancio, agrio), ácido butanoico (agrio, queso, rancio, mantequilla, fruta), gamma-hexalactona (herbáceo, coco, dulce, balsámico, tabaco), metionol (patata cocida, cebolla, heno cortado, vegetal) y etoxi-gamma-butirolactona (coco, caramelo, tostado) fue mayor en los vinos de *Torulaspota* (**Fig. IV.19A**). Repiten con respecto a los vinos blancos: propionato de etilo, 3-etoxi propan-1-ol, ácido isobutírico y etoxi-gamma-butirolactona en mayor cantidad en los vinos blancos de *Torulaspota* frente a los de *Saccharomyces*; sin embargo, la cantidad de lactato de etilo, ácido butanoico y gamma-hexalactona tuvo un comportamiento distinto en vinos blancos respecto a los tintos, fue mayor en los vinos blancos de *Saccharomyces* y en los tintos de *Torulaspota*. Por otra parte, la cantidad de isovalerato de etilo (dulce, fruta, especies, manzana verde, piña verde), acetato de isopentilo (plátano, fruta), hexanoato de etilo (plátano, manzana verde, vino, brandy), 3-metil-1-pentanol (penetrante, cacao, verde, vinoso), octanoato de etilo (plátano, piña, pera, floral), 3-hidroxibutanoato de etilo (frutal, verde, uva, tropical, piel de manzana, vinoso), blackberry tiofenona (azufre, fruta, baya), 2-hidroxihexanoato de etilo (piña, vino blanco), 1-octanol (cera, cítrico, floral, graso, rosa), decanoato de etilo (alcohólico, frutal, graso, dulce, cera, jabón), gamma-butirolactona (dulce, tostado, caramelo, débilmente agradable), 4-hidroxibutanoato de etilo (uva, fruta, merengue),

laurato de etilo (cera, jabón, floral, lácteo, fruta, ron), ácido hexanoico (queso), malato de dietilo (verde, frutal, caramelo), ácido octanoico (rancio, sudor, áspero), 2-hidroxiglutarato de dietilo (algodón de caramelo), 4-etoxycarbonil-gamma-butanolactona (coco, débilmente agradable), ácido decanoico (rancio, sudor), 2-hidroxi-3-fenilpropanoato de etilo (pimiento negro, frutal, cuero, fresa, paja seca, animal) y ácido 9-decenoico (cera, graso, verde, fruta, mantequilla) fue mayor en los vinos tintos de *Saccharomyces* (**Fig. IV.19A**). Repiten con respecto a los vinos blancos: acetato de isopentilo, hexanoato de etilo, 3-metil-1-pentanol, octanoato de etilo, 3-hidroxi-3-butanolactona de etilo, 1-octanol, decanoato de etilo, 4-hidroxi-3-butanolactona de etilo, laurato de etilo, ácido hexanoico, ácido octanoico, ácido decanoico, ácido 9-decenoico; y, isovalerato de etilo, 2-hidroxi-3-hexanoato de etilo, gamma-butirolactona, malato de dietilo, 2-hidroxiglutarato de dietilo, 4-etoxycarbonil-gamma-butanolactona y 2-hidroxi-3-fenilpropanoato de etilo también fueron mayores (aunque sin significación estadística en los siete últimos) en vinos blancos de *Saccharomyces* frente a *Torulaspora*. Solo la blackberry tiofenona se comportó de forma distinta en blancos y tintos, fue mayor en los vinos blancos de *Torulaspora* y en los tintos de *Saccharomyces*. También tuvieron un comportamiento distinto 4-vinilguaiacol y palmitato de etilo con significativamente más cantidad en blancos de *Saccharomyces* y menor cantidad (no significativa) en tintos de *Saccharomyces*.

Similar a lo que ya ocurría en vino blanco, estos resultados coinciden de nuevo con lo descrito previamente en vino sintético: la producción de hexanoato, octanoato y decanoato de etilo fue insignificante en *Torulaspora* respecto *Saccharomyces* (Renault et al., 2009; Taillandier et al., 2014).

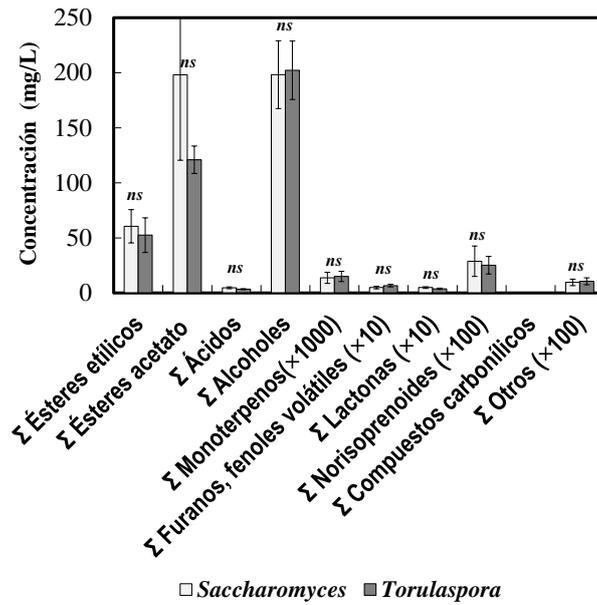


Figura IV.18. Composición aromática de los vinos tintos elaborados con *Torulaspora* o *Saccharomyces*. Los compuestos se agruparon por clases químicas. Los datos son la media (\pm error estándar) en mg/L de 34 experimentos independientes. En la parte superior se muestra el nivel de significación (p) correspondiente al análisis de la varianza. ns, no significativo.

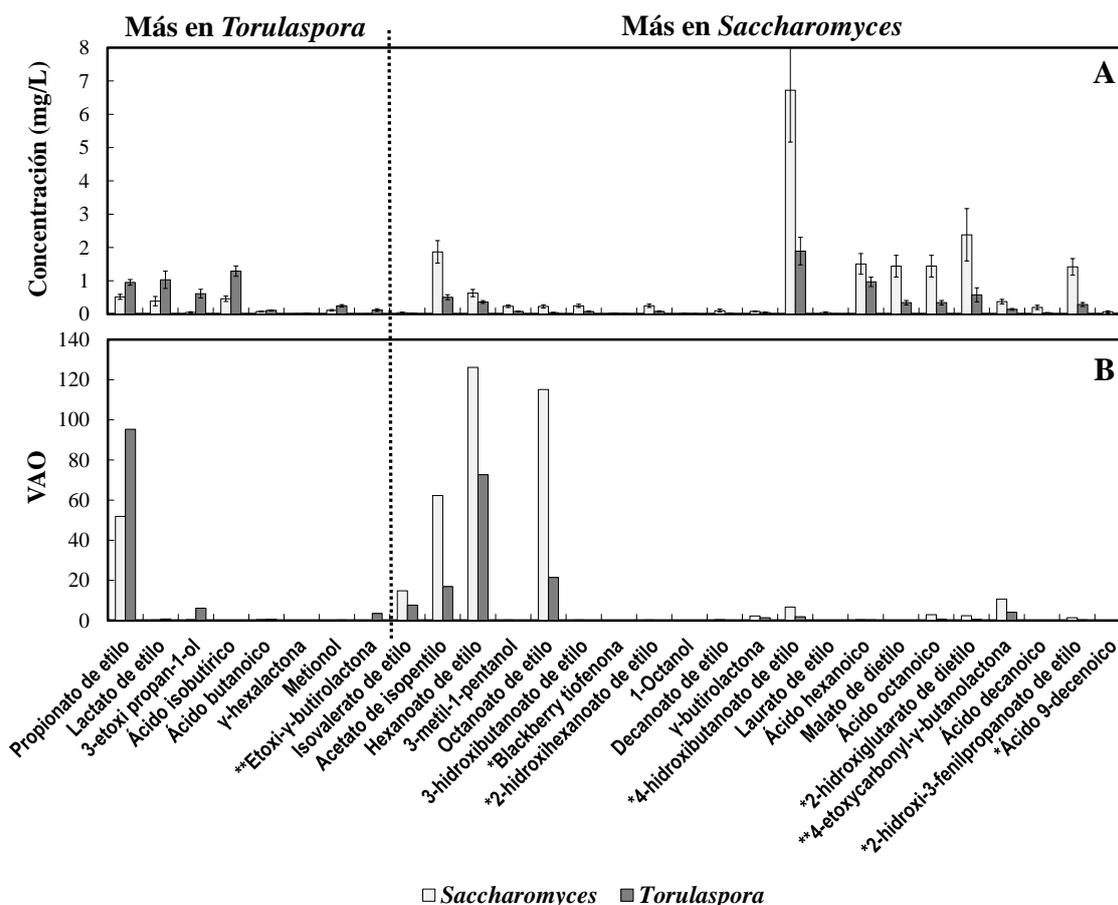


Figura IV.19. Compuestos aromáticos para los que se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las cantidades presentes en los vinos tintos inoculados con *Torulaspora* o *Saccharomyces*. A, concentración en mg/L. B, valor medio de actividad odorante (VAO). Los datos de mg/L corresponden a la media \pm error estándar de 20 experimentos independientes de *Saccharomyces* y 26 de *Torulaspora*. *, valor de umbral de detección desconocido; se ha tomado arbitrariamente el valor de 1 para el cálculo del VAO. **, valor de umbral de detección desconocido; para el cálculo del VAO se ha tomado arbitrariamente el valor de 0,035 mg/L correspondiente a la gamma-butirolactona.

Al igual que ocurría con los vinos blancos, las diferencias en las cantidades de estos compuestos pueden explicar la diferencia observada en la calidad organoléptica entre los vinos elaborados con *Torulaspora* o *Saccharomyces*. La mayoría de los compuestos con descriptor aromático frutal fueron más abundantes en los vinos de *Saccharomyces* respecto a los de *Torulaspora*. Tan solo tres compuestos con descriptor frutal (propionato de etilo, lactato de etilo y 3-etoxi propan-1-ol) fueron más abundantes en los vinos tintos de *Torulaspora*; mientras que en los vinos de *Saccharomyces* fueron once compuestos: isovalerato de etilo, acetato de isopentilo, hexanoato de etilo, octanoato de etilo, 3-hidroxi-butanoato de etilo, 2-hidroxi-hexanoato de etilo, decanoato

de etilo, 4-hidroxibutanoato de etilo, laurato de etilo, malato de dietilo, y 2-hidroxi-3-fenilpropionato de etilo. Esto explica la mayor intensidad de aromas a fruta fresca detectada por los catadores en los vinos de *Saccharomyces*. El toque agrio detectado previamente en los vinos blancos de *Torulaspota* fue casi imperceptible en los correspondientes vinos tintos, a pesar de que estos últimos tuvieron más acidez volátil ($0,36\pm 0,07$ g/L en vinos blancos versus $0,45\pm 0,11$ g/L en vinos tintos). Esto se puede explicar porque la cantidad de ácido isobutírico (=isobutanoico) fue menor en los vinos tintos que en los blancos de *Torulaspota* ($1,29\pm 0,15$ mg/L y $2,25\pm 0,47$ mg/L respectivamente), y al efecto de enmascaramiento de la matriz aromática de los vinos tintos que fue mucho más compleja que la de los vinos blancos. En esta ocasión, en los vinos de *Torulaspota* se apreciaron diferencias significativas para gamma-hexalactona (herbáceo, coco, dulce, balsámico, tabaco) y etoxi-gamma-butirolactona (coco, caramelo, tostado), más abundante en los vinos tintos de *Torulaspota* que en los de *Saccharomyces*, que pudieran ser responsable del característico aroma a pastelería, fruta procesada o golosinas encontrado en estos vinos, y que normalmente se corresponden con lactonas (Anónimo, 2012; Azzolini et al., 2012; Hernandez-Orte et al., 2008; Jolly et al., 2014). Sin embargo, se volvió a detectar mayor cantidad de 4-hidroxibutanoato de etilo en los vinos tintos de *Saccharomyces*, que podría ser un compuesto responsable de cierto aroma a pastelería (merengue) aunque fue casi imperceptible en estos vinos. No obstante, hemos de considerar que los ésteres polares como el 4-hidroxibutanoato de etilo, contribuyen de forma insignificante al aroma del vino, más bien contribuyen a dar cuerpo al vino (Thurston et al., 1981).

El análisis de estos mismos resultados teniendo en cuenta el umbral de percepción de cada compuesto aromático viene a confirmar lo dicho anteriormente. En general, el VAO de los compuestos aromáticos más abundantes en los vinos de *Torulaspota* fue menor que el VAO de los compuestos más abundantes en los vinos de *Saccharomyces* (**Fig. IV.19B**), aunque esta diferencia fue menor que en los vinos blancos (**Fig. IV.5B**). Una vez más, la influencia de tan solo cuatro de los compuestos más abundantes en los vinos de *Saccharomyces* (isovalerato de etilo, acetato de isopentilo, hexanoato de etilo y octanoato de etilo) parece ser determinante en la destacada percepción a fruta fresca de los catadores, pudiendo eclipsar el posible efecto del resto de los componentes sobre el aroma de los vinos. Esto podría ser la causa de que el impacto aromático del 4-hidroxibutanoato de etilo en los vinos de *Saccharomyces* no fuera detectado por los catadores como aroma a pastelería, igual que ocurrió en los correspondientes vinos

blancos. Por el contrario, dado el menor impacto (VAO) de estos cuatro compuestos con carácter frutal sobre el aroma de los vinos de *Torulaspota*, y a pesar del posible impacto del propionato de etilo, los catadores pudieron detectar matices de fruta procesada o golosinas; probablemente debido al significativo incremento de gamma-hexalactona ($5,0 \pm 2,84$ ppb en vinos de *Saccharomyces* vs $15,6 \pm 5,03$ ppb en *Torulaspota*, VAO de 0,0004 vs 0,0012 respectivamente) y de etoxi-gamma-butirolactona ($4,8 \pm 2,4$ ppb en vinos de *Saccharomyces* vs $120,0 \pm 39,8$ ppb en *Torulaspota*, VAO de 0,138 vs 3,5 respectivamente). Por el contrario, en los vinos tintos de *Torulaspota* no se apreció el evidente toque agrio detectado en los correspondientes vinos blancos, probablemente debido a que la VAO del ácido isobutírico fue considerablemente menor en los vinos tintos (0,04) respecto a los blancos (0,08), además del ya mencionado efecto de enmascaramiento que pudiera ejercer la mayor complejidad aromática de los vinos tintos en comparación con los blancos.

IV.2.4. Evaluación de la utilidad del uso de *Torulaspota* en la elaboración de vino tinto.

Como se ha descrito en los apartados previos, las levaduras *Torulaspota* fueron capaces de dominar la mayor parte de la fermentación alcohólica y originar vinos secos con distinto perfil aromático que los elaborados con levaduras *Saccharomyces*. En general, los vinos de *Torulaspota* destacaron por ser más maduros, suaves en boca, lacteados, con toques a pastelería, y frutas rojas muy dulces maduras o procesadas; y los vinos de *Saccharomyces* por la mayor intensidad de los aromas a fruta fresca y los toques vegetales que recuerdan a la variedad de uva. Estas diferencias organolépticas fueron claramente perceptibles tanto por catadores expertos como por consumidores habituales de vino. No obstante, aunque frecuentemente los vinos de *Torulaspota* fueron de calidad más apreciada, esta diferencia en las características aromáticas no siempre resultó en un incremento en la preferencia de los catadores.

Analizando por separado los vinos elaborados con Cabernet-Sauvignon y Tempranillo (secano), en general vinos de más graduación alcohólica, más ácidos, astringentes y estructurados, se apreció una mejora evidente en la preferencia de los catadores por los vinos de las levaduras *Torulaspota* EX1180-11C4 y EX1257-CYH5 respecto a los de *Saccharomyces*. Esta mejora se correspondió con una bajada de acidez total y ácido málico, y un incremento en la cantidad de ácido láctico respecto a los vinos de *Saccharomyces*, lo que debió mejorar la sensación en boca detectada por los

catadores en los vinos de *Torulaspota*. Adicionalmente, en estos vinos mejor evaluados quedaron pequeñas cantidades de azúcares reductores, en torno a los 4 g/L, lo que también pudo contribuir a suavizar estos vinos. Sorprendentemente, esta mejora no se observó en el vino de *Torulaspota* TL3 (procedente de la levadura comercial TD291 de Lallemand), más bien ocurrió lo contrario. Sin embargo, desde el punto de vista analítico, los vinos de *Torulaspota* TL3 fueron muy similares a los mejores vinos de las *Torulaspota* EX1180-11C4 y EX1257-CYH5, con la única diferencia de que las levaduras TL3 se impusieron menos en todas las fases de la fermentación (**Tabla IV.9**). No se encontraron diferencias significativas para la mayoría de los distintos compuestos analizados por familias o por separado. Esto podría deberse a la suma de mucho factores con diferencias interdependientes unos de otros y difíciles de determinar por análisis estadístico. No obstante, los vinos elaborados con *Torulaspota* TL3 presentaron mayor cantidad de alcoholes y ácidos en general, con mayor cantidad de ácido isobutírico, ácidos C₆-C₁₀ y acetato de etilo, asociados a malos olores y que podrían influir negativamente en las características organolépticas de estos vinos.

Tabla IV.9. Medias de los parámetros generales de las fermentaciones y vinos tintos elaborados con uva de las variedades Cabernet-Sauvignon o Tempranillo (vinos muy estructurados), inoculados con levaduras seleccionadas *Saccharomyces* o *Torulaspora*. Análisis de la varianza para estudiar el efecto de la inoculación del mosto con distintas levaduras.

Parámetro	Vinos				p ^a
	E7AR1	EX1180-11C4	EX1257-CYH5	TL3	
T15 (días)	1,22±0,12	1,84±0,26	2,41±0,87	1,90±0,60	0,336
T100 (días)	7,8±1,12	11,9±1,55	12,1±2,0	12±2,1	0,153
Aceptación (%)	70,7±1,9 AB	81,2±1,8 A	77,5±7,5 A	63,3±3,3 B	0,040
Imposición FT (%)	100±0,00 A	89,4±4,79 AB	87,53±6,13 AB	79,33±5,21 B	0,027
Imposición FF (%)	100±0,00 A	26,8±13,7 B	29,5±18,9 B	6,42±4,9 B	0,000
Etanol (% v/v)	13,8±0,3	13,6±0,3	13,7±0,4	13,5±0,3	0,938
pH	3,53±0,11	3,57±0,13	3,45±0,12	3,38±0,05	0,731
Acidez total (g/L)	7,78±0,6	6,66±0,7	7,3±0,8	7,37±0,61	0,673
Acidez volátil (g/L)	0,31±0,03 A	0,47±0,06 AB	0,41±0,02 AB	0,49±0,08 B	0,071
Densidad (g/L)	992±0,5	993±0,6	993±0,6	992±1,3	0,310
Az. reductores (g/L)	1,85±0,11 A	4,38±0,39 B	4,32±0,37 B	4,06±1,02 B	0,001
Ácido málico (g/L)	1,77±0,15 A	0,47±0,26 B	0,94±0,39 AB	0,60±0,44 B	0,014
Ácido láctico (g/L)	0,31±0,19	0,96±0,28	0,44±0,16	0,49±0,17	0,177

Los datos corresponden a la media ± error típico de 6 experimentos independientes de E7AR1, 5 de EX1180-11C4, 4 de EX1257-CYH5, y 3 de TL3. Valores seguidos de letras (A y B) indican diferentes grupos homogéneos obtenidos con el test de Duncan con un nivel de confianza del 95%. FT, fermentación tumultuosa. FF, final de fermentación.

Respecto a los vinos Pinot-Noir y Garnacha (menos ácidos, astringentes y estructurados que los vinos Cabernet-Sauvignon y Tempranillo), no se apreció ninguna mejora en la preferencia de los catadores por los vinos de *Torulaspora*, más bien lo contrario, prefirieron los vinos de *Saccharomyces*. En estos casos, las levaduras *Torulaspora* se impusieron al 100% en todas las fermentaciones, al igual que las *Saccharomyces* (**Tabla IV.10**), y pudieron agotar los azúcares del mosto antes de que las levaduras *Saccharomyces* pudieran desplazarlas al final de fermentación. Es decir, sorprendentemente, aunque la participación de las levaduras *Torulaspora* en la fermentación de estos vinos fue aún mayor que en los vinos más estructurados, no se apreció ninguna mejora en la preferencia de los catadores. Todo parece indicar que demasiada presencia de *Torulaspora* hasta el final de fermentación vence la estructura del vino deteriorándolo, mientras que muy poca presencia no aporta diferencias

apreciables en la calidad como ocurría con la inoculación secuencial de *Torulaspota* seguida de *Saccharomyces*. Lo más efectivo para mejorar la calidad del vino es una dominancia destacada de *Torulaspota* durante la mayor parte de la fermentación seguida de un declive drástico en favor de una dominancia de *Saccharomyces* antes del agotamiento de los azúcares, situación que se repite con facilidad en los vinos muy estructurados Cabernet-Sauvignon y Tempranillo. Aparte de esto, las diferencias en los parámetros analíticos de los vinos de *Torulaspota* respecto a los de *Saccharomyces* fueron similares a las observadas para los vinos más estructurados (**Tabla IV.10**), con la salvedad de que la acidez total y la cantidad de láctico fue significativamente menor y la imposición significativamente mayor en los vinos menos estructurados (**Tabla IV.11**). Lógicamente, la cantidad de láctico fue menor en los vinos menos estructurados porque la cantidad de málico en el mosto original también fue más baja, mientras que en los vinos más estructurados hubo más cantidad inicial de ácido málico y se produjo más fermentación maloláctica. Esta diferencia, junto con la menor necesidad de suavizar estos vinos (ya de por sí poco estructurados y astringentes) para mejorar la sensación en boca, pudo ser la causa de que los catadores no detectaran ninguna mejora en los vinos poco estructurados de *Torulaspota*.

Tabla IV.10. Medias de los parámetros generales de las fermentaciones y vinos tintos elaborados con uva de las variedades Garnacha o Pinot-Noir (vinos poco estructurados), inoculados con levaduras seleccionadas *Saccharomyces* o *Torulaspota*. Análisis de la varianza para estudiar el efecto de la inoculación del mosto con distintas levaduras.

Parámetro	Vinos				p ^a
	E7AR1	EX1180-11C4	EX1180-11C4 (+SO ₂)	EX1180-2K ⁻	
T15 (días)	0,68±0,07 A	1,67±0,13 B	1,45±0,35 AB	1,53±0,22 AB	0,106
T100 (días)	7,5±0,5	13±4,0	11±2,0	8,5±0,5	0,416
Aceptación (%)	66±4,0	60±5,0	57,5±2,5	55±5,0	0,408
Imposición FT (%)	100±0,0	100±0,0	100±0,0	100±0,0	-
Imposición FF (%)	100±0,0	100±0,0	100±0,0	100±0,0	-
Etanol (% v/v)	12,7±1,5	12,6±1,6	12,9±1,3	12,8±1,3	0,997
pH	3,49±0,02	3,54±0,03	3,56±0,04	3,56±0,03	0,431
Acidez total (g/L)	5,95±0,4	5,55±0,6	5,55±0,8	5,4±0,5	0,931
Acidez volátil (g/L)	0,36±0,0	0,51±0,1	0,51±0,1	0,44±0,1	0,796
Densidad (g/L)	991±1,5	992±1,5	993±2,0	991±1,5	0,885
Az. reductores (g/L)	1,55±0,15 A	3,75±0,35 B	4,2±0,9 B	3,1±0,00 AB	0,064
Ácido málico (g/L)	0,94±0,3	0,41±0,3	0,40±0,3	0,44±0,4	0,637
Ácido láctico (g/L)	0,16±0,03	0,26±0,14	0,27±0,14	0,28±0,16	0,901

Los datos corresponden a la media ± error típico de 2 experimentos independientes de E7AR1, 2 de EX1180-11C4, 2 de EX1180-11C4 (+SO₂), y 2 de EX1180-2K⁻. Valores seguidos de letras (A y B) indican diferentes grupos homogéneos obtenidos con el test de Duncan con un nivel de confianza del 95%. FT, fermentación tumultuosa. FF, final de fermentación

Tabla IV.11. Medias de los parámetros generales de las fermentaciones y vinos tintos muy estructurados (elaborados con uva Cabernet-Sauvignon o Tempranillo) y poco estructurados (elaborados con Garnacha o Pinot-Noir) inoculados con levaduras *Torulaspota*. Análisis de la varianza para estudiar el efecto de la inoculación del mosto con *Torulaspota*.

Parámetro	Vinos		p ^a
	Vinos estructurados	Vinos poco estructurados	
T15 (días)	2,04±0,32	1,55±0,12	0,304
T100 (días)	12±0,96	10,8±1,42	0,499
Aceptación (%)	75,5±3,9	57,5±2,14	0,002
Imposición FT (%)	86,25±3,1	100±0,00	0,007
Imposición FF (%)	22,6±8,4	100±0,00	0,000
Etanol (% v/v)	13,6±0,17	12,8±0,65	0,138
pH	3,48±0,07	3,55±0,015	0,439
Acidez total (g/L)	7,1±0,42	5,5±0,31	0,026
Acidez volátil (g/L)	0,46±0,03	0,49±0,06	0,657
Densidad (g/L)	993,33±0,45	992,33±0,8	0,255
Az. Reductores (g/L)	4,28±0,29	3,68±0,32	0,219
Ácido málico (g/L)	0,66±0,19	0,42±0,15	0,422
Ácido láctico (g/L)	0,67±0,14	0,27±0,06	0,077

Los datos corresponden a la media ± error típico de 12 experimentos independientes de vinos muy estructurados y 6 de vinos poco estructurados. FT, fermentación tumultuosa. FF, final de fermentación.

En conjunto, los únicos parámetros en los que destacaron significativamente los vinos mejor evaluados y más estructurados de *Torulaspota* fueron su mayor cantidad de azúcares reductores y láctico y menor cantidad de málico e imposición de la levadura inoculada, especialmente al final de la fermentación (**Tabla IV.12**).

Tabla IV.12. Medias de los parámetros generales de las fermentaciones y vinos tintos elaborados con uva de las variedades Cabernet-Sauvignon o Tempranillo (vinos muy estructurados), Garnacha o Pinot-Noir (vinos poco estructurados), inoculados con levaduras seleccionadas *Saccharomyces* o *Torulaspora*. Análisis de la varianza para estudiar el efecto de la inoculación del mosto con distintas levaduras.

Parámetro	Vinos				p ^a
	<i>Torulaspora</i>	<i>Saccharomyces</i>	<i>Saccharomyces</i>	<i>Torulaspora</i>	
	ME	ME	PE	PE	
T15 (días)	2,04±0,32 A	1,22±0,14 AB	0,68±0,08 B	1,55±0,12 AB	0,088
T100 (días)	12±0,96	7,83±1,11	7,5±0,5	10,83±1,42	0,055
Aceptación (%)	75,5±3,29 A	70,67±1,94 A	66±4,00 AB	57,5±2,14 B	0,005
Imposición FT (%)	86,26±3,1 B	100±0,00 A	100±0,00 A	100±0,00 A	0,002
Imposición FF (%)	22,6±8,38 B	100±0,00 A	100±0,00 A	100±0,00 A	0,000
Etanol (% v/v)	13,61±0,17	13,81±0,33	12,67±1,57	12,81±0,65	0,274
pH	3,48±0,07	3,53±0,11	3,49±0,02	3,55±0,02	0,894
Acidez total (g/L)	7,1±0,42 AB	7,78±0,56 A	5,95±0,45 AB	5,5±0,31 B	0,026
Acidez volátil (g/L)	0,46±0,03	0,31±0,03	0,36±0,00	0,49±0,06	0,052
Densidad (g/L)	993,33±0,45	992±0,52	991,5±1,5	992,33±0,8	0,262
Az. reductores (g/L)	4,28±0,29 A	1,85±0,12 B	1,55±0,15 B	3,68±0,32 A	0,000
Ácido málico (g/L)	0,66±0,19 B	1,77±0,15 A	0,94±0,33 B	0,42±0,15 B	0,001
Ácido láctico (g/L)	0,67±0,14	0,31±0,19	0,16±0,03	0,27±0,06	0,148

Los datos corresponden a la media ± error típico de 12 experimentos independientes de *Torulaspora* ME, 6 de *Saccharomyces* ME, 2 *Saccharomyces* PE, y 6 de *Torulaspora* PE. Valores seguidos de letras (A, B y C) indican diferentes grupos homogéneos obtenidos con el test de Duncan con un nivel de confianza del 95%. FT, fermentación tumultuosa. FF, final de fermentación. ME, vino muy estructurado. PE, vino poco estructurado.

Respecto a los compuestos aromáticos analizados por familias, solo se encontraron diferencias significativas en Σ ésteres acetato y Σ norisoprenoides (**Fig. IV.20**). Esto fue debido a la mayor cantidad significativa de acetato de etilo en los vinos poco estructurados (420,2 mg/L en *Saccharomyces* y 176,5 mg/L en *Torulaspora*) con respecto a los muy estructurados (99,9 mg/L en *Saccharomyces* y 90,6 mg/L en *Torulaspora*). Este compuesto es uno de los ésteres más abundantes en el vino y responsable en parte de las alteraciones de las propiedades sensoriales del mismo. Sin embargo, de acuerdo con algunos autores puede tener un efecto favorable en el aroma del vino a concentraciones por debajo de 80 mg/L (Ribereau-Gayon, 1978). Precisamente, en los vinos poco estructurados de Pinot-Noir se detectaron muchas levaduras apiculadas al principio de fermentación, que han sido descritas productoras de mucha cantidad de acetatos (Plata et al., 2003). En cuanto al Σ norisoprenoides, la cantidad de β -damascenona también fue mayor en los vinos poco estructurados (0,70 mg/L en *Saccharomyces* y 0,50 mg/L en *Torulaspora*) respecto a los muy estructurados (0,11mg/L en *Saccharomyces* y 0,13 mg/L en *Torulaspora*). Esto podría ser debido a

una mayor maceración en los vinos poco estructurados que permitiría aumentar el contenido de este compuesto descrito como potenciador de fruta (Pineau et al., 2007).

Analizando el resto de compuestos aromáticos por separado, casi ninguno de los 35 compuestos con diferencia significativa sigue un patrón que explique la secuencia de preferencia de la cata, excepto el butanoato de etilo (frutal, verde, uva, tropical, piel de manzana, vinoso) (0,59 mg/L en *To* ME > 0,49 mg/L en *Sc* ME > 0,31 mg/L en *Sc* PE > 0,24 mg/L en *To* PE, $p < 0,05$) y el lactato de isoamilo (fruta, lácteo, nuez) (0,22 mg/L en *To* ME > 0,14 mg/L en *Sc* ME > 0,07 mg/L en *Sc* PE > 0,05 mg/L en *To* PE, $p < 0,05$) (**Fig. IV.21**). No parece lógico que la preferencia de los catadores dependa de las diferencias en concentración para uno o dos compuestos, más bien cabría esperar que dependiera de varios compuestos aromáticos en combinación con la estructura del vino, la necesidad de suavizarlo para mejorar su sensación en boca, y de algunos parámetros generales relacionados con esta necesidad como la concentración de láctico y azúcar. Adicionalmente, esta preferencia se pudo ver penalizada en los vinos poco estructurados de *Torulaspota* por su menor cantidad de aromas a fruta fresca (ésteres, **Fig. IV.20**), mayor cantidad de ácido isobutírico (1,78 mg/L en *To* PE, 1,03 mg/L en *To* ME) respecto a los vinos de *Saccharomyces* (0,29 mg/L en *Sc* ME y 0,86 mg/L en *Sc* PE, **Fig. IV.21**), y su destacada cantidad de acetato de etilo (176,5 mg/L en *To* PE y 90,6 mg/L en *To* ME, **Fig. IV.21**). Curiosamente, la cantidad de β -damascenona fue muy superior en los vinos poco estructurados que fueron a su vez los menos apreciados (0,70 mg/L en *Saccharomyces*, 0,50 mg/L en *Torulaspota*) respecto a los muy estructurados (0,11 mg/L en *Saccharomyces* y 0,13 mg/L en *Torulaspota*). La β -damascenona tiene un umbral de percepción muy bajo (0,00005 mg/L) y parece ser un potenciador de otros aromas, influyendo así de forma indirecta sobre el impacto aromático de otros compuestos (Pineau et al., 2007). En nuestro caso podría tener un efecto negativo al potenciar el impacto del acetato de etilo más abundante en los vinos poco estructurados enmascarando la supuesta mejora que la β -damascenona realiza en otros vinos (Pineau et al., 2007) y ejerciendo un efecto positivo en nuestros vinos más estructurados con mayor cantidad de hexanoato de etilo y de ésteres etílicos en general.

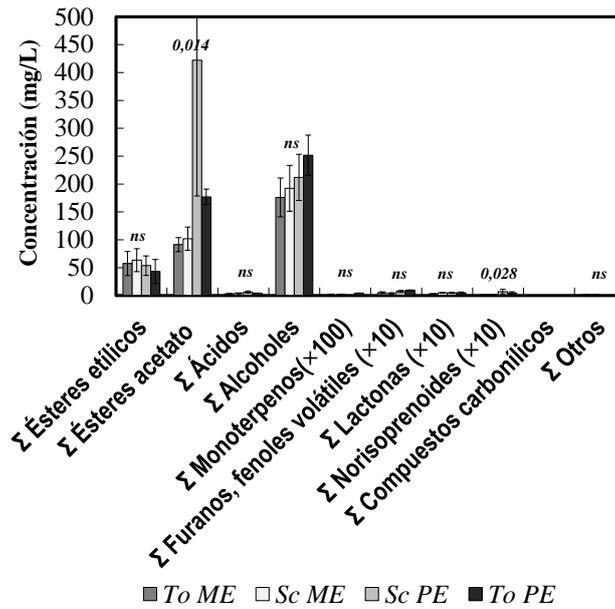


Figura IV.20. Composición aromática de los vinos tintos muy estructurados o poco estructurados elaborados con *Torulaspora* o *Saccharomyces*. Los compuestos se agruparon por clases químicas. Los datos son la media (\pm error estándar) en mg/L de 46 experimentos independientes. En la parte superior se muestra el nivel de significación (p) correspondiente al análisis de la varianza. ns, no significativo. To, *Torulaspora*. Sc, *Saccharomyces*. ME, vino muy estructurado. PE, vino poco estructurado.

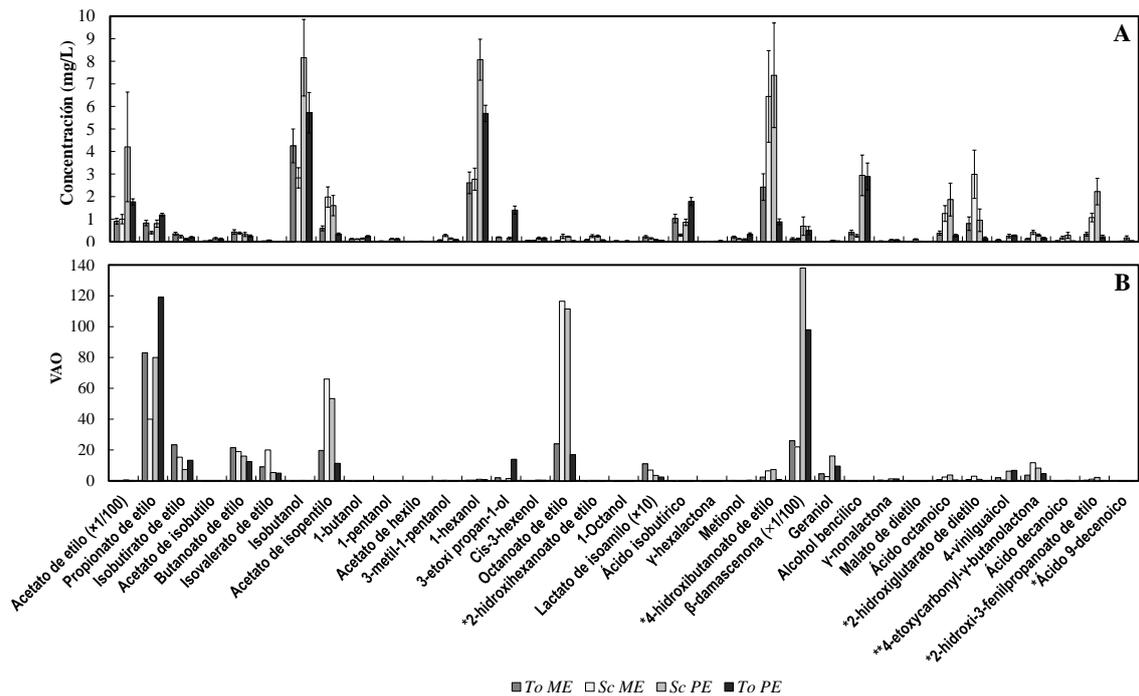


Figura IV.21. Compuestos aromáticos para los que se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las cantidades presentes en los vinos tintos muy estructurados (Cabernet-Sauvignon o Tempranillo) y poco estructurados (Pinot-Noir o Garnacha) elaborados con levaduras *Torulaspora* y *Saccharomyces*. A, concentración media en mg/L. B, valor medio de actividad odorante (VAO). Los datos de mg/L corresponden a la media±error estándar de 46 experimentos independientes. *, valor de umbral de detección desconocido; se ha tomado arbitrariamente el valor de 1 para el cálculo del VAO. **, valor de umbral de detección desconocido; para el cálculo del VAO se ha tomado arbitrariamente el valor de 0,035 mg/L correspondiente a la gamma-butirolactona.

En conclusión, la inoculación secuencial de levaduras *Torulaspora* seguida de *Saccharomyces* no aseguró una participación importante de *Torulaspora* en el proceso de fermentación y no resultó en mejoras evidentes de la calidad del vino blanco o tinto. La inoculación inicial y exclusiva del mosto con levaduras *Torulaspora* killer Kbar permitió la dominancia de estas levaduras durante toda o la mayor parte de la fermentación y originó vinos secos con distinto perfil aromático que los elaborados con levaduras *Saccharomyces*, que fueron de calidad más apreciada cuando se trató de vinos tintos muy estructurados elaborados con uva Cabernet-Sauvignon o Tempranillo. En los vinos tintos poco estructurados y blancos se detectaron notas de evolución excesiva que fueron consideradas negativas para la calidad del vino, probablemente debido a que demasiada presencia de *Torulaspora* hasta el final de fermentación de estos vinos venció su poca estructura hasta deteriorarlos. Las diferencias en la cantidad de varios

compuestos aromáticos entre los vinos de *Torulaspora* y *Saccharomyces* se correspondieron muy bien con las diferencias aromáticas encontradas por los catadores, aunque el grado de preferencia de los vinos solo se puede explicar si se toma adicionalmente en consideración algunos de los parámetros generales como concentración de málico, láctico y azúcar; además del efecto negativo de compuestos como el ácido isobutírico.

IV.3. BIBLIOGRAFÍA.

- Anónimo (2011). Level2®TD para la complejidad aromática, sensación en boca y la longevidad de los vino.
- Anónimo (2012). Inoculación secuencial con levaduras *Torulaspora delbrueckii* y *Saccharomyces cerevisiae*: El Siguiente Paso en Fermentación.
- Anónimo (2013). ZYMAFLORE® Alpha TD no-*Saccharomyces*. *Torulaspora delbrueckii*-El potencial de la biodiversidad.
- Anónimo (2014). Keys for a Successful Malolactic Fermentation.
- Azzolini, M., Fedrizzi, B., Tosi, E., Finato, F., Vagnoli, P., Scrinzi, C., and Zapparoli, G. (2012). Effects of *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed cultures on fermentation and aroma of Amarone wine. *European Food Research and Technology* 235, 303-313.
- Azzolini, M., Tosi, E., Lorenzini, M., Finato, F., and Zapparoli, G. (2014). Contribution to the aroma of white wines by controlled *Torulaspora delbrueckii* cultures in association with *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1-17.
- Bely, M., Stoeckle, P., Masneuf-Pomarède, I., and Dubourdieu, D. (2008). Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 122, 312-320.
- Boido, E., Medina, K., Fariña, L., Carrau, F., Versini, G., and Dellacassa, E. (2009). The effect of bacterial strain and aging on the secondary volatile metabolites produced during malolactic fermentation of Tannat red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 6271-6278.
- Cañas, P.I., García, A.P., and Romero, E.G. (2015). Enhancement of flavour properties in wines using sequential inoculations of non-*Saccharomyces* (*Hansenula* and *Torulaspora*) and *Saccharomyces* yeast. *Vitis-Journal of Grapevine Research* 50, 177.
- Ciani, M., Beco, L., and Comitini, F. (2006). Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 108, 239-245.
- Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., and Domizio, P. (2010). Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Research* 10, 123-133.
- Ciani, M., and Maccarelli, F. (1998). Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 14, 199-203.
- Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., and Ciani, M. (2011). Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology* 28, 873-882.
- Hernandez-Orte, P., Cersosimo, M., Loscos, N., Cacho, J., Garcia-Moruno, E., and Ferreira, V. (2008). The development of varietal aroma from non-floral grapes by yeasts of different genera. *Food Chemistry* 107, 1064-1077.
- Herraiz, T., Reglero, G., Herraiz, M., Martin-Alvarez, P.J., and Cabezudo, M.D. (1990). The influence of the yeast and type of culture on the volatile composition of wines fermented without sulfur dioxide. *American Journal of Enology and Viticulture* 41, 313-318.

- Izquierdo Cañas, P., García Romero, E., Huertas Nebreda, B., Gómez Alonso, S., Gómez-Alonso, S., Collins, V., Vauzour, D., Rodríguez-Mateos, A., and Corona, G. (2011). Enhancement of flavour properties in wines using sequential inoculations of non-*Saccharomyces*. *Vitis-Journal of Grapevine Research* 50, 177-182.
- Jolly, N.P., Varela, C., and Pretorius, I.S. (2014). Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Research* 14, 215-237.
- Lerm, E., Engelbrecht, L., and Du Toit, M. (2010). Malolactic fermentation: the ABC's of MLF.
- Maicas, S., Gil, J.-V., Pardo, I., and Ferrer, S. (1999). Improvement of volatile composition of wines by controlled addition of malolactic bacteria. *Food Research International* 32, 491-496.
- Mallouchos, A., Komaitis, M., Koutinas, A., and Kanellaki, M. (2003). Wine fermentations by immobilized and free cells at different temperatures. Effect of immobilization and temperature on volatile by-products. *Food Chemistry* 80, 109-113.
- Maqueda, M., Zamora, E., Álvarez, M., and Ramírez, M. (2012). Characterization, ecological distribution, and population dynamics of *Saccharomyces* “sensu stricto” killer yeasts in the spontaneous grape-must fermentations of south-western Spain. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 735-743.
- Miranda-Lopez, R., Libbey, L., Watson, B., and McDaniel, M. (1992). Identification of additional odor-active compounds in Pinot noir wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 43, 90-92.
- Muñoz-González, C., Moreno-Arribas, M., Martín-Álvarez, P.J., Bartra-Sebastian, E., Puig-Pujol, A., García-Cazorla, J., and Pozo-Bayón, M.Á. (2011). Volatile and sensory characterization of Xarel. lo white wines. *Flavour and Fragrance Journal* 26, 153-161.
- Pérez, F., Ramírez, M., and Regodón, J. (2001). Influence of killer strains of *Saccharomyces cerevisiae* on wine fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek* 79, 393-399.
- Pineau, B., Barbe, J.-C., Van Leeuwen, C., and Dubourdieu, D. (2007). Which impact for β -damascenone on red wines aroma? *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 4103-4108.
- Plata, C., Millan, C., Mauricio, J., and Ortega, J. (2003). Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts. *Food Microbiology* 20, 217-224.
- Renault, P., Coulon, J., de Revel, G., Barbe, J.-C., and Bely, M. (2015). Increase of fruity aroma during mixed *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae* wine fermentation is linked to specific esters enhancement. *International Journal of Food Microbiology*.
- Renault, P., Ehsani, M., and Bely, M. (2012). Phenotypic characterization of *Torulaspota delbrueckii* species in wine conditions. Application to mixed inoculation with *Saccharomyces cerevisiae*. Paper presented at: Oeno2011-Actes de colloques du 9e symposium international d'oenologie de Bordeaux: Actes de colloques du 9e symposium international d'oenologie de Bordeaux (Dunod).
- Renault, P., Miot-Sertier, C., Marullo, P., Hernández-Orte, P., Lagarrigue, L., Lonvaud-Funel, A., and Bely, M. (2009). Genetic characterization and phenotypic variability in *Torulaspota delbrueckii* species: potential applications in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology* 134, 201-210.
- Ribereau-Gayon, P. (1978). Wine aroma. *Flavour of foods and beverages Academic Press, New York*, 362-371.
- Rodríguez-Cousiño, N., Maqueda, M., Ambrona, J., Zamora, E., Esteban, E., and Ramírez, M. (2011). A new wine *Saccharomyces cerevisiae* double-stranded RNA virus encoded killer toxin (Klus) with broad antifungal activity is evolutionarily related to a chromosomal host gene. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 1822-1832.
- Shinohara, T. (1985). Gas chromatographic analysis of volatile fatty acids in wines. *Agricultural and Biological Chemistry* 49, 2211-2212.
- Taillandier, P., Lai, Q.P., Julien-Ortiz, A., and Brandam, C. (2014). Interactions between *Torulaspota delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* in wine fermentation: influence of inoculation and nitrogen content. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 30, 1959-1967.

- Thurston, P., Taylor, R., and Ahvenainen, J. (1981). Effects of linoleic acid supplements on the synthesis by yeast of lipids and acetate esters. *Journal of the Institute of Brewing* 87, 92-95.
- Tofterup, J. (2012). Evaluating the impact of *Torulaspora delbrueckii* on malolactic fermentation and wine aroma. In Department of Microbiology and Biochemistry Geisenheim Research (Geisenheim: University of Applied Sciences of Germany).

CAPÍTULO V:
Elaboración de cava con nuevas
levaduras killer *Saccharomyces* y
Torulaspóra

V.1. ANTECEDENTES.

La elaboración de cava es una actividad en continuo crecimiento en Extremadura y supone una alternativa para incrementar el valor añadido del vino, que se comercializa mayoritariamente a granel. La composición química y la calidad de los vinos espumosos dependen de muchos factores como la variedad de uva (Anderson et al., 2008), la gestión del viñedo (Pozo-Bayon et al., 2003), la calidad del vino base (Girbau-Sola et al., 2002b), o la estirpe de levadura inoculada en la segunda fermentación (Torrens et al., 2008). Sin embargo, la segunda fermentación y la crianza del vino con las lías de levaduras son factores claves en la calidad de los vinos espumosos. Durante este envejecimiento se produce la autólisis de las levaduras que realizaron la segunda fermentación, se hidrolizan los biopolímeros celulares y se liberan los compuestos intracelulares (péptidos, aminoácidos, ácidos grasos y nucleótidos) y de la pared celular (glucanos, manoproteínas) en el vino. Esto determina en gran medida las propiedades químicas y sensoriales del vino espumoso (revisado por (Alexandre and Guilloux-Benatier, 2006)). La autólisis natural de las levaduras es un proceso muy lento que puede durar varios años. Normalmente ocurre en células al final de la fase estacionaria de crecimiento y está asociada a la muerte celular (Babayan and Bezrukov, 1985a). Desde hace años se investiga la forma de acelerar este proceso. Una posibilidad consiste en utilizar mezclas de levaduras asesinas (killer) y sensibles como inóculos en la segunda fermentación. La toxina asesina mata a las células sensibles y acelera su autólisis (Charpentier et al., 1993). Aunque esta estrategia ha dado prometedores resultados en sistemas modelo en laboratorio, aún no se ha aplicado en la industria ni se ha analizado su efecto sobre las propiedades organolépticas de vinos espumosos. Estos estudios iniciales se realizaron cuando sólo se conocía un tipo de levaduras vínicas *Saccharomyces* killer, K2. Hoy disponemos, de nuevas levaduras K2 con buenas características enológicas (Ambrona et al., 2005a; Ambrona et al., 2006; Pérez et al., 2000; Ramírez et al., 1998; Ramírez et al., 1999a; Regodón et al., 1997), otro tipo de levaduras *Saccharomyces* killer, Klus (Rodríguez-Cousiño et al., 2011), y nuevas levaduras *Torulaspota* killer, Kbarr-1 y Kbarr-2 (este estudio). En este capítulo se estudia el fenotipo asesino de las distintas levaduras vínicas *Saccharomyces* y *Torulaspota* killer en las condiciones de elaboración de cava. El objetivo es utilizar levaduras killer durante la segunda fermentación del cava para acelerar o incrementar la autólisis de las levaduras y mejorar el proceso de crianza, el bouquet y la calidad de la espuma.

V.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

V.2.1. Utilidad de cepas autóctonas seleccionadas de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* en la elaboración de cava. Análisis preliminar.

Con carácter preliminar, se analizó la idoneidad para elaborar cava de varias levaduras *Saccharomyces cerevisiae* autóctonas comparándolas con levaduras comerciales de referencia. Se utilizaron 16 levaduras vnicas autóctonas seleccionadas y dos comerciales (IOC 18-2007 del Instituto Oenologique du Champagne, y levadura encapsulada Cremanti® de la compañía La Littorale Enología, S.L.). En este experimento en bodega no se incluyó ninguna levadura *Torulaspora* ya que era de esperar que no realizaran correctamente la segunda fermentación, como posteriormente se comprobó cuando las usamos como levaduras complementarias en los tirajes realizados con mezclas de levaduras killer (**Apartado V.2.4**).

Las fermentaciones se pudieron agrupar según la evolución del grado alcohólico, presión en la botella y consumo de azúcares (**Fig. V.1**). Según el grado alcohólico se establecieron tres grupos de fermentaciones: 1) Con concentraciones finales de alcohol superiores al 12% (v/v) (levadura Cremanti® y EX85R), 2) entre 12% y 11,75% (IOC 18-2007, EX229, EX73, y EX229-R1), 3) entre 11,75 y 11,5% (EX1, EX34, EX47, EX85, EX88, 7AR, E3AR1, E7AR1, SMR10-11D, SMR16-5AR, Rod23-1B, y Rod25-6D) (**Fig. V.1A**).

Según la máxima presión alcanzada en la botella se clasificaron en tres grupos: 1) Con presiones superiores a 8 atms (Cremanti®, IOC 18-2007, EX1, EX34, EX73, EX88, EX229, EX85R, EX229-R1, E3AR1, y SMR16-5AR), 2) entre 7 y 8 atms (EX47, EX85, 7AR, SMR10-11D), y menor de 7 atms pero siempre mayor de 6 atms (E7AR1, Rod23-1B, y Rod25-6D) (**Fig. V.1B**).

Según la cantidad de azúcares residuales en el cava se establecieron tres grupos: 1) Con concentraciones menores de 3 g/L (Cremanti®, EX1, EX229, EX229-R1, EX85R), 2) entre 3 y 6 g/L (IOC 18-2007, EX34, EX47, EX73, EX88, SMR16-5AR), y 3) entre 6 y 12 g/L (EX85, 7AR, E7AR1, E3AR1, SMR10-11D, Rod23-1B, Rod25-6D) (**Fig. V.1C**).

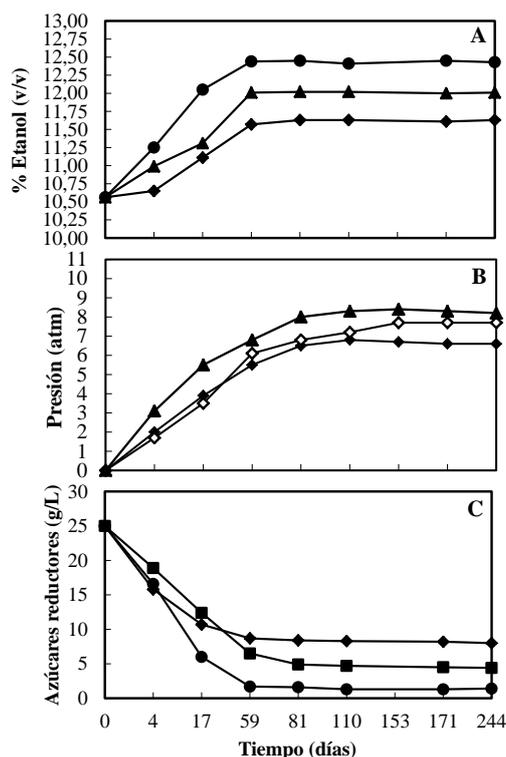


Figura V.1. Ejemplos de evolución de la concentración de etanol (A), presión en la botella (B), y consumo de azúcares reductores (C) a lo largo de la segunda fermentación y crianza en los cavas elaborados con las diferentes levaduras. EX88 (—■—), E7AR1 (—◆—), levadura comercial IOC 18-2007 (—▲—), levadura comercial encapsulada Cremanti® (—●—) y 7AR (—◇—).

Las levaduras comerciales estuvieron siempre en el primer o segundo grupo, con las mejores levaduras desde el punto de vista tecnológico. Prácticamente todas las levaduras autóctonas analizadas podrían ser utilizadas para la elaboración de cava al producir más de 6 atms de presión y dejar menos de 12 g/L de azúcar. Algunas levaduras acompañaron siempre a las levaduras comerciales entre las mejores (EX229, EX229-R1 y EX85R). Sin embargo, las mejores levaduras en base a la calidad organoléptica de los cavas fueron las autóctonas Rod23-1B, E7AR1 y E3AR1 (**Tabla V.1**) que, lamentablemente, estuvieron entre las más discretas en cuanto a sus cualidades tecnológicas.

Tabla V.1. Parámetros analíticos y análisis organoléptico de los cavas elaborados con distintas levaduras autóctonas y comerciales.

Levadura	Etanol (% v/v)	Presión (atm)	Az. reductores (g/L)	Acidez volátil (g/L)	Acidez total (g/L)	pH	Ácido málico (g/L)	Ácido láctico (g/L)	Extracto seco (g/L)	Aceptación (%)
EX88	11,76	7,9	4,4	0,35	4,2	3,36	0,09	0,87	23,2	60
Rod23-1B	11,6	6,3	8,3	0,38	4,1	3,38	0,09	1,94	27,9	85
Rod25-6D	11,63	6,9	8,1	0,38	4,1	3,39	0,09	0,89	26	70
SMR10-11D	11,66	7,8	7,4	0,39	4,1	3,42	0,09	0,9	26,1	50
SMR16-5AR	11,58	8,1	3,7	0,35	4,2	3,42	0,09	0,96	21,5	74
E7AR1	11,63	6,6	8	0,38	4,5	3,34	0,09	0,92	23,2	82
E3AR1	11,54	8,4	8	0,37	4,6	3,41	0,09	0,9	25,7	80
7AR	11,62	7,7	6,3	0,36	4,4	3,34	0,09	0,88	23	55
EX1	11,86	8,2	2,6	0,37	3,7	3,49	0,09	1,65	22,3	40
EX229-R1	11,99	8,3	2,8	0,34	4,1	3,56	0,09	0,92	24,9	42
EX34	11,83	8	3,8	0,36	4,2	3,36	0,09	0,93	21,3	72
EX47	11,79	7,9	4,3	0,4	4,3	3,37	0,09	0,99	21,2	75
EX73	11,97	7,3	4,6	0,4	4,2	3,4	0,09	0,97	22,8	66
EX85	11,78	7,1	7	0,4	4,7	3,29	0,09	0,93	22,3	76
EX229	12,03	8,6	2,2	0,36	3,9	3,42	0,09	1,2	20,4	71
EX85R	12,2	8,6	2,6	0,35	4,9	3,25	0,21	1,1	16	69
IOC 18-2007	12,01	8,2	3	0,36	4,4	3,37	0,09	1,24	19,9	72
Cremanti®	12,43	8,75	1,4	0,35	5,1	3,21	0,09	1,08	14,4	72

Los cavas con más presión tuvieron más grado alcohólico, menos azúcares residuales, más acidez volátil, más ácido láctico y mayor pH. Es decir, a más azúcares consumidos más etanol y CO₂ se generó, incrementando así la presión. Los cavas con más alcohol tuvieron menos extracto seco, ya que tenían menos azúcares residuales. Además, los cavas con más azúcares reductores presentaron más acidez volátil y más ácido láctico, probablemente porque los azúcares residuales potencien la actividad de bacterias lácticas. No encontramos explicación a la correlación entre la presión y mayor acidez volátil, mayor cantidad de ácido láctico o mayor pH. Los cavas con mayor acidez total fueron los preferidos por el comité de cata (**Tabla V.2**).

Tabla V.2. Coeficientes de correlación de Pearson entre los parámetros y la calidad del cava.

Parámetro	Etanol (%, v/v)	Presión (atm)	Az. reductores (g/L)	Acidez volátil (g/L)	Acidez total (g/L)	Ácido láctico (g/L)
% Aceptación	ns	ns	ns	ns	0,223(**)	ns
Etanol (% v/v)	1	0,932(**)	-0,918(**)	0,490(**)	0,231(**)	0,710(**)
Presión (atm)	0,932(**)	1	-0,960(**)	0,524(**)	ns	0,858(**)
Az. reductores (g/L)	-0,918(**)	-0,960(**)	1	-0,493(**)	ns	-0,850(**)
Acidez volátil (g/L)	0,490(**)	0,524(**)	-0,493(**)	1	0,180(*)	0,540(**)
Acidez total (g/L)	0,231(**)	ns	ns	0,180(*)	1	-0,205(*)
Ácido láctico (g/L)	0,710(**)	0,858(**)	-0,850(**)	0,540(**)	-0,205(*)	1
Extracto seco (g/L)	-0,282(**)	ns	ns	ns	-0,509(**)	0,271(**)

La correlación (bilateral) es significativa al nivel 0.01 (**) ó 0.05 (*). ns= no significativo.

En resumen, todas las levaduras autóctonas seleccionadas alcanzaron niveles de presión superiores a 6 atms, y consumieron los azúcares hasta niveles inferiores a 2,2 a 8,3 g/L. En consecuencia, se podrían utilizar para la elaboración de cavas brut (hasta 12 g/L), extra brut (hasta 6 g/L) y brut nature (hasta 3 g/L).

V.2.2. Análisis del fenotipo killer en las condiciones de elaboración de cava. Efecto de pH y temperatura.

Antes de elaborar cava con las distintas levaduras vínicas *Saccharomyces* y *Torulaspota* killer, se analizó su fenotipo killer en placas de MB en condiciones extremas, pH 3,2 y 12°C, distintas a las condiciones óptimas para la mayoría de las toxinas killer previamente conocidas, pero que coinciden precisamente con las condiciones óptimas y habituales para la elaboración de cava.

V.2.2.1. Objetivo: matar a *Saccharomyces* killer K2 y no-killer K2⁰.

Las levaduras *S. cerevisiae* Klus (EX229) o K2 (Rod23-1B) no mataron a las *S. cerevisiae* K2 a baja temperatura, 12°C. Sólo se apreció cierta actividad killer a 20°C. Las levaduras *Torulaspota* Kbarr-1 (EX1180 y EX1180-11C4) mataron a *S. cerevisiae* K2 EX85 en todas las condiciones ensayadas, incluso a temperatura y pH bajos, 12°C y pH 3,2. Sin embargo, las *Torulaspota* Kbarr-2 sólo fueron efectivas a 12°C y pH 4 y, como era de esperar, el fenotipo killer desapareció en la levadura desprovista del virus TdV-Mbarr-1, EX1180-2K⁻ (**Fig. V.2**). Resultados similares se obtuvieron frente a otra levadura K2, Rod23-1B; aunque en este caso la intensidad de fenotipo killer fue bastante menor que frente a EX85, excepto para las levaduras *Saccharomyces* EX229 Klus que mataron a la *S.cerevisiae* K2 Rod23-1B a 20°C y pH 4 con mayor intensidad (**Fig. V.3**).

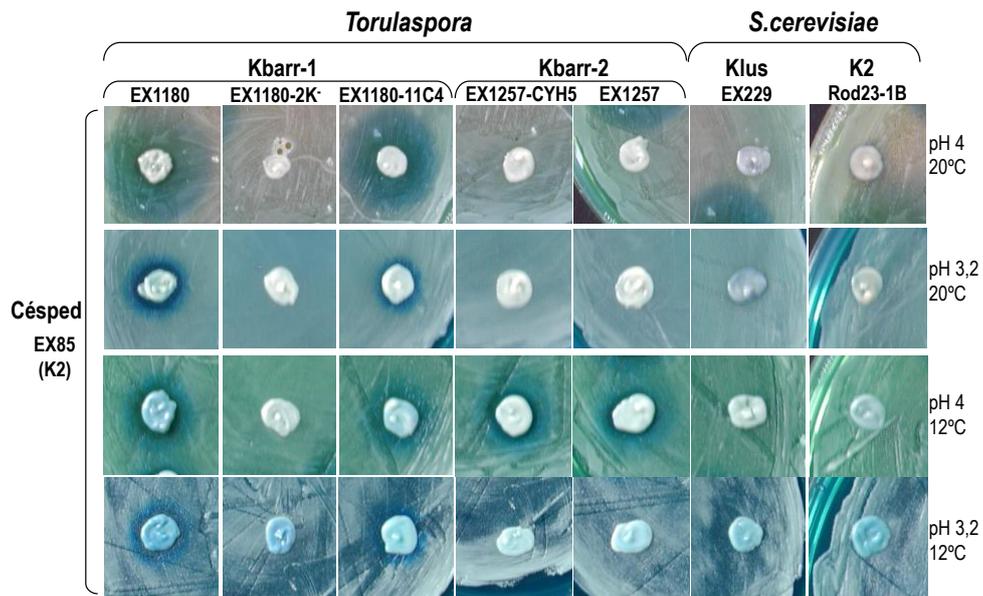


Figura V.2. Fenotipo asesino (killer) de las levaduras *Torulasporea* EX1180 (Kbarr-1, CYH^S), EX1180-11C4 (Kbarr-1, CYH^R), EX1180-2K⁻ (Kbarr-1⁰, CYH^R), EX1257 (Kbarr-2, CYH^S), EX1257-CYH5 (Kbarr-2, CYH^R) y *Saccharomyces* EX229 (Klus, CYH^S) y Rod23-1B (K2, ROD^{PC}, CYH^R) frente a césped de EX85 (K2, CYH^S) a pH 4 o 3,2, y temperatura de 12 o 20°C. Las condiciones de ensayo (césped, pH y temperatura) se muestran a los lados (izquierda o derecha) de cada foto.

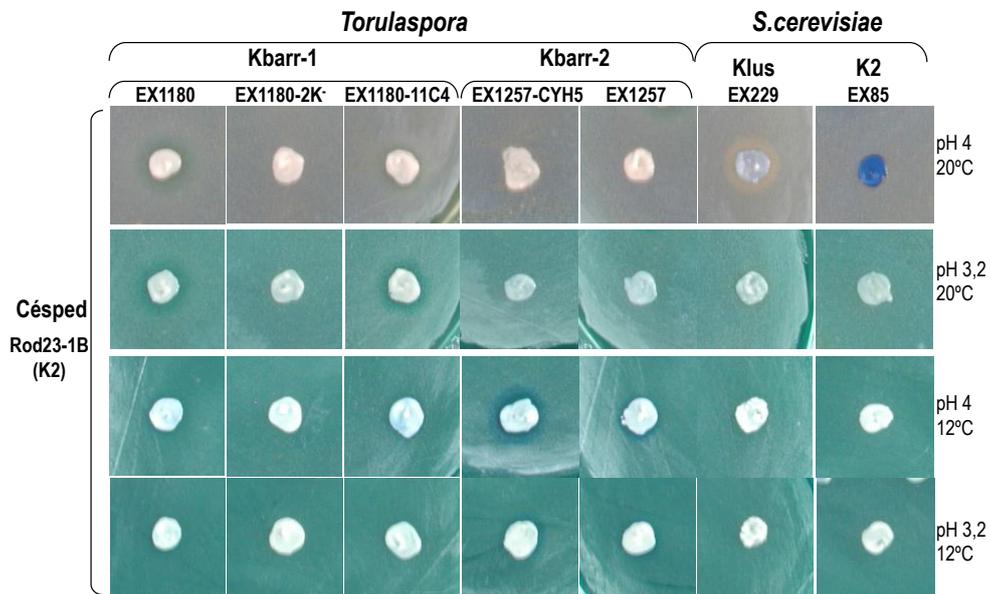


Figura V.3. Fenotipo asesino (killer) de las levaduras *Torulasporea* EX1180 (Kbarr-1, CYH^S), EX1180-11C4 (Kbarr-1, CYH^R), EX1180-2K⁻ (Kbarr-1⁰, CYH^R), EX1257 (Kbarr-2, CYH^S), EX1257-CYH5 (Kbarr-2, CYH^R) y *Saccharomyces* EX229 (Klus, CYH^S), EX85 (K2, CYH^S) y frente a césped de Rod23-1B (K2, ROD^{PC}, CYH^R) a pH 4 o 3,2, y temperatura de 12 o 20°C. Las condiciones de ensayo (césped, pH y temperatura) se muestran a los lados (izquierda o derecha) de cada foto.

Las levaduras *S. cerevisiae* K2 Rod23-1B y EX88 mataron a las K2⁰ (EX85R, que han perdido el virus ScV-M2 y el fenotipo K2) a baja temperatura, aunque el fenotipo killer siguió siendo más intenso a 20°C. Las levaduras Klus (EX229) sólo mostraron un fenotipo killer muy débil a 20°C (Fig. V.4). Sorprendentemente, la levadura K2⁰ (EX85R) fue más resistente a las *Torulaspora* Kbarr-1 que su parental K2 (EX85). Sin embargo, ocurrió lo contrario con la *Torulaspora* Kbarr-2, ya que se detectó actividad killer a 12°C y pH 3,2 frente a EX85R y no frente a EX85 (Figura V.4 y V.2).

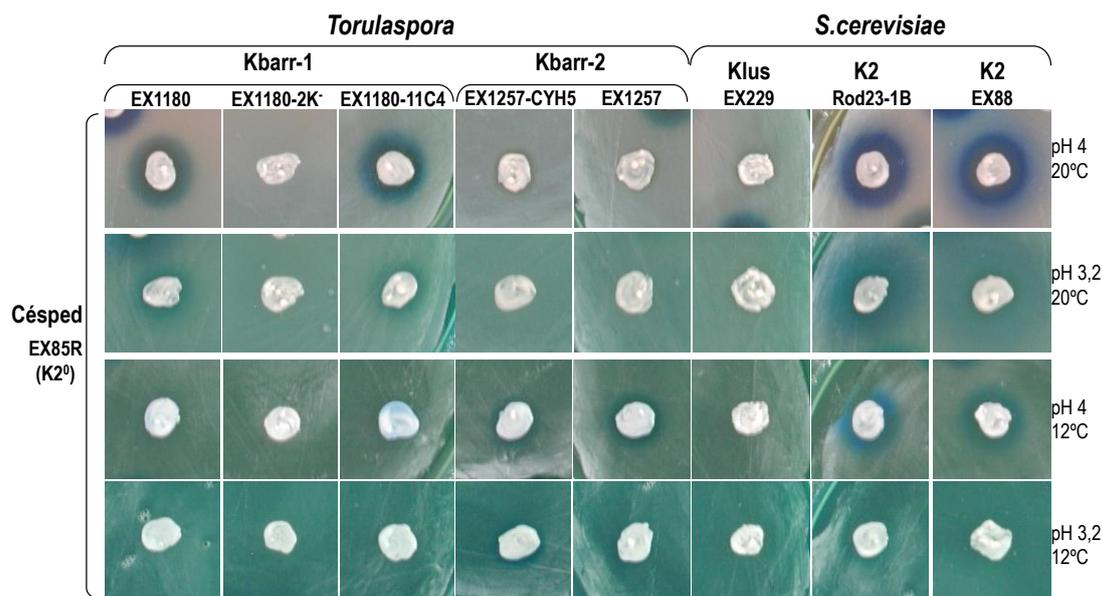


Figura V.4. Fenotipo asesino (killer) de las levaduras *Torulaspora* EX1180 (Kbarr-1, CYH^S), EX1180-11C4 (Kbarr-1, CYH^R), EX1180-2K (Kbarr-1, CYH^R), EX1257 (Kbarr-2, CYH^S), EX1257-CYH5 (Kbarr-2, CYH^R) y *Saccharomyces* EX88 (K2, CYH^S), Rod23-1B (K2, ROD^{PC}, CYH^R) y EX229 (Klus, CYH^S) frente a césped de EX85R (K2⁰, CYH^R) a pH 4 o 3,2, y temperatura de 12 o 20°C. Las condiciones de ensayo (césped, pH y temperatura) se muestran a los lados (izquierda o derecha) de cada foto.

V.2.2.2. Objetivo: matar a *Saccharomyces* killer Klus y Klus⁰.

Las levaduras K2 (EX85 y Rod23-1B) mataron débilmente a las Klus a pH 4 y 20°C. Las levaduras Kbarr-1 (EX1180 y EX1180-11C4) mataron más activamente a las Klus en las mismas condiciones anteriores y también a pH 3,2 y 20°C aunque más débilmente que a pH 4.

A 12°C sólo parece posible matar a las levaduras Klus con *Torulaspora* Kbarr-2, a pH 4 (Fig. V.5). De nuevo, el fenotipo killer desaparece en la levadura desprovista del virus TdV-Mbarr, EX1180-2K, como era de esperar.

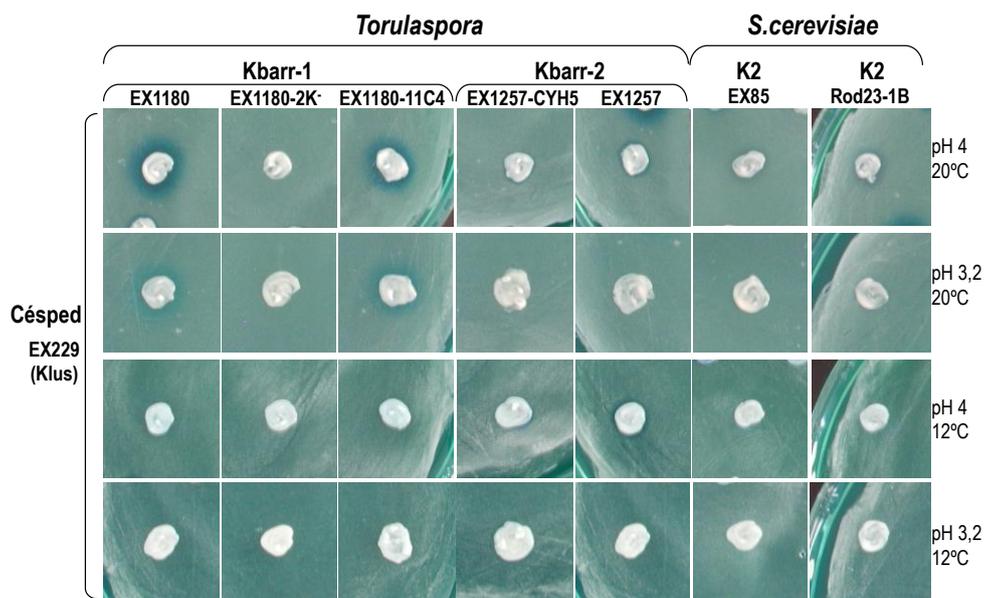


Figura V.5. Fenotipo asesino (killer) de las levaduras *Torulaspota* EX1180 (Kbarr-1, CYH^S), EX1180-11C4 (Kbarr-1, CYH^R), EX1180-2K⁻ (Kbarr-1⁰, CYH^R), EX1257 (Kbarr-2, CYH^S), EX1257-CYH5 (Kbarr-2, CYH^R) y *Saccharomyces* EX85 (K2, CYH^S) y Rod23-1B (K2, ROD^{PC}, CYH^R) frente a césped EX229 (Klus, CYH^S) a pH 4 o 3,2, y temperatura de 12 o 20°C. Las condiciones de ensayo (césped, pH y temperatura) se muestran a los lados (izquierda o derecha) de cada foto.

Las levaduras Klus casi no mataron a las Klus⁰ (carentes de fenotipo killer y virus ScV-Mlus). Sin embargo, las levaduras K2 mataron claramente a las Klus⁰, especialmente a 20°C (pH 4-3,2) y también a 12°C y pH 4 (**Fig. V.6**). En este caso, las Klus⁰ fueron más sensibles que sus parentales Klus (con fenotipo killer y virus ScV-Mlus), resultados más lógicos y contrarios a los obtenidos frente a las levaduras K2⁰ y sus parentales K2. Las levaduras *Torulaspota* Kbarr-1 mataron a *Saccharomyces* Klus⁰ en todas las condiciones, mejor a 20°C y pH 4, siendo las Kbarr-2 más efectivas a 12°C, aunque con un fenotipo muy débil.

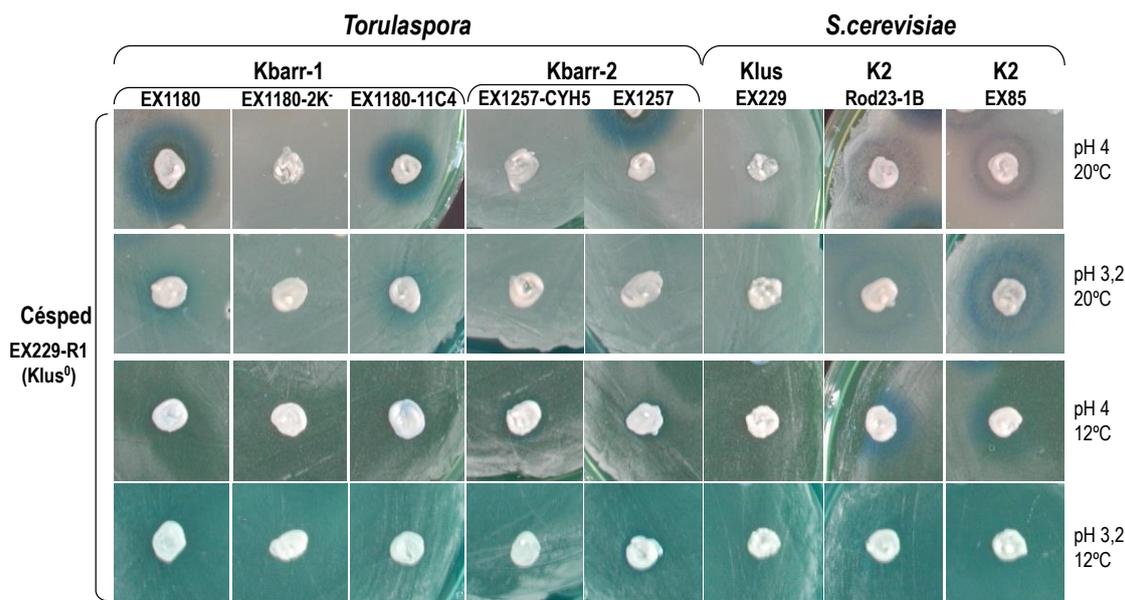


Figura V.6. Fenotipo asesino (killer) de las levaduras *Torulaspota* EX1180 (Kbarr-1, CYH^S), EX1180-11C4 (Kbarr-1, CYH^R), EX1180-2K⁻ (Kbarr-1, CYH^R), EX1257 (Kbarr-2, CYH^S), EX1257-CYH^S (Kbarr-2, CYH^R) y *Saccharomyces* EX229 (Klus, CYH^S), EX85 (K2, CYH^S) y Rod23-1B (K2, ROD^{PC}, CYH^R) frente a césped EX229-R1 (Klus⁰, CYH^R) a pH 4 o 3,2, y temperatura de 12 o 20°C. Las condiciones de ensayo (césped, pH y temperatura) se muestran a los lados (izquierda o derecha) de cada foto.

V.2.2.3. Objetivo: matar a *Torulaspota* killer Kbarr-1, Kbarr-2 y Kbarr-1⁰.

El efecto del pH y la temperatura sobre la sensibilidad de las levaduras Kbarr-1 y Kbarr-2 ya fue analizado en profundidad en el **Capítulo III, Apartado III.2.3**. Brevemente, las levaduras *Torulaspota* Kbarr-2 no mataron a la Kbarr-1; sin embargo, las levaduras *Torulaspota* Kbarr-1 sí mataron a la Kbarr-2 en algunas condiciones, mejor a 12°C, a pH 4 y pH 3,2. Las únicas levaduras *Saccharomyces* capaces de matar a Kbarr-1 y Kbarr-2 fueron las Klus a 20°C y pH 3,2, aunque muy débilmente, casi imperceptible para Kbarr-2 (**Fig. V.7**); y este fenotipo killer no se incrementó frente a las levaduras Kbarr-1⁰ (procedente de la Kbarr-1) EX1180-11C4 y desprovistas del virus TdV-Mbarr-1 (**Fig. V.8**). Por otro lado, las levaduras *Torulaspota* Kbarr-1 y Kbarr-2 mataron a la *Torulaspota* Kbarr-1⁰. Es decir, *Torulaspota* Kbarr-2 solo mata a Kbarr-1 si ésta pierde la molécula dsRNA Mbarr-1, y lo hace solo a 12°C y pH 4-3,2 (**Fig. V.8**). Por último, las levaduras *S. cerevisiae* K2 no mataron a ninguna *Torulaspota* en estas condiciones, provista o no de la molécula mediana de dsRNA Mbarr-1 (datos no mostrados).

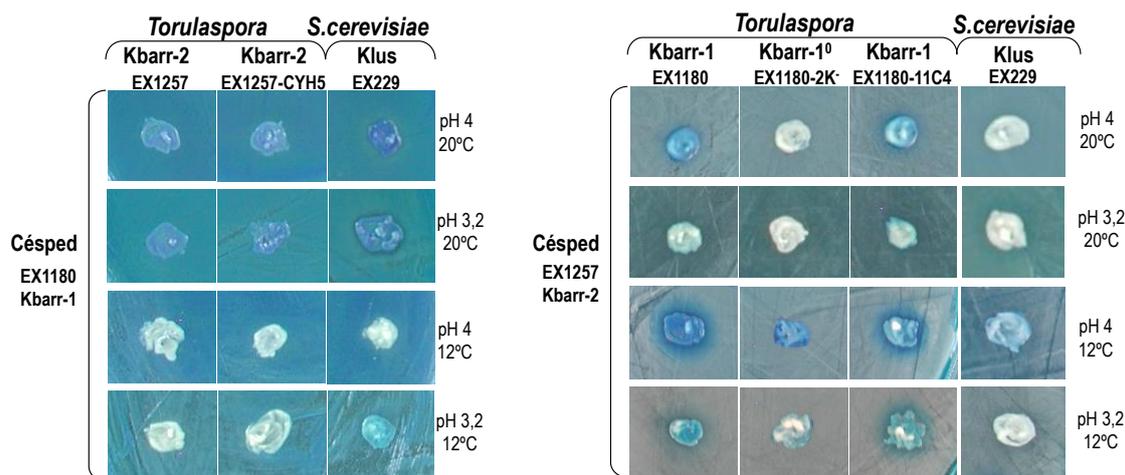


Figura V.7. Fenotipo asesino (killer) de las levaduras *Torulaspora* EX1180 (Kbarr-1, CYH^S), EX1180-11C4 (Kbarr-1, CYH^R), EX1180-2K⁻ (Kbarr-1⁰, CYH^R), EX1257 (Kbarr-2, CYH^S), EX1257-CYH5 (Kbarr-2, CYH^R) y *Saccharomyces* EX229 (Klus, CYH^S) frente a césped EX1180 (Kbarr-1, CYH^S) y EX1257 (Kbarr-2, CYH^S) a pH 4 o 3,2, y temperatura de 12 o 20°C. Las condiciones de ensayo (césped, pH y temperatura) se muestran a los lados (izquierda o derecha) de cada foto.

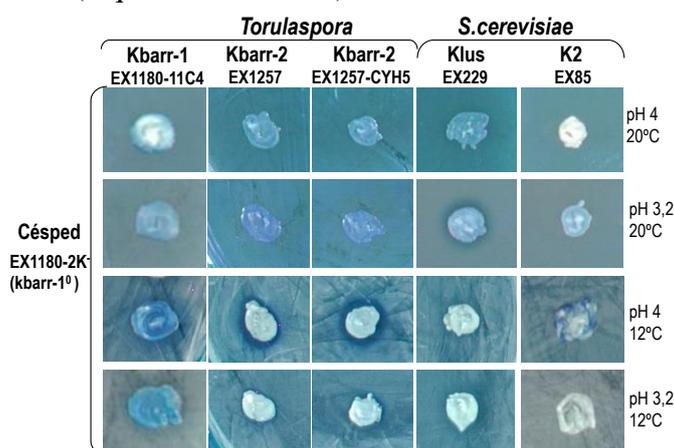


Figura V.8. Fenotipo asesino (killer) de las levaduras *Torulaspora* EX1180 (Kbarr-1, CYH^S), EX1180-11C4 (Kbarr-1, CYH^R), EX1180-2K⁻ (Kbarr-1⁰, CYH^R), EX1257 (Kbarr-2, CYH^S), EX1257-CYH5 (Kbarr-2, CYH^R) y *Saccharomyces* EX229 (Klus, CYH^S), EX85 (K2, CYH^S) frente a césped EX1180-2K⁻ (Kbarr1⁰, CYH^R) a pH 4 o 3,2, y temperatura de 12 o 20°C. Las condiciones de ensayo (césped, pH y temperatura) se muestran a los lados (izquierda o derecha) de cada foto.

En resumen, de todas las condiciones ensayadas para matar a las levaduras *S.cerevisiae*, el fenotipo killer fue menos intenso precisamente en las más cercanas a las condiciones habituales de elaboración de cava, pH 3,2 y 12°C. En base a la actividad killer detectada en estas condiciones extremas, la inoculación con mezclas de levaduras *S.cerevisiae* K2 con levaduras K2⁰ o Klus⁰ podría ser *a priori* la opción más viable para incrementar la proporción de levaduras muertas en la fase de tiraje del cava. La opción de utilizar EX229 (Klus) mezclada con Rod23-1B (K2) resulta en principio menos atractiva ya que sólo se encontró un efecto killer intenso a 20°C y pH 4. Si se trata de

matar a las levaduras *Torulaspota* Kbarr-1⁰, sólo las mataron las *Torulaspotas* killer a 12°C, Kbarr-1 a pH 4 y Kbarr-2 a pH 3,2-4; y entre las *Saccharomyces* sólo funcionaron bien las Klus (EX229) a 20°C y pH 3,2. En consecuencia, la inoculación con mezclas de levaduras *Torulaspotas* Kbarr-1 con levaduras Kbarr-1⁰ o Klus también podrían incrementar la proporción de levaduras muertas en la fase de tiraje del cava.

En base a estos resultados previos de cinéticas de segunda fermentación, presión alcanzada en botella, calidad organoléptica del cava y capacidad killer en condiciones similares a las de tiraje se preseleccionaron las levaduras *S.cerevisiae* EX85, EX85R, Rod23-1B, EX229, EX229-R1; y las *T.delbrueckii* EX1180, EX1180-11C4, EX1180-2K, EX1257 y EX1257-CYH5 para realizar sucesivos experimentos de elaboración de cava con distintos vinos base.

V.2.3. Elaboración de cava con inóculos mixtos de levaduras killer/no-killer en tubos de laboratorio a baja presión.

Antes de proceder a la elaboración de cava en botella, se realizaron varios experimentos con pequeño volumen en tubos de polipropileno con las levaduras preseleccionadas. En las primeras series de experimentos se apreció una contaminación de levaduras *Saccharomyces* en el vino base que desplazaron a las levaduras inoculadas en el tiraje, especialmente a las de menor vigor fermentativo como las levaduras *Torulaspota*, que además resultaron muy sensibles al tratamiento con Velcorín cuando éste se adicionó para contrarrestar el efecto de la contaminación. Por otro lado, cuando se inocularon mezclas de levaduras *Saccharomyces* y *Torulaspota* a partes iguales, las *Saccharomyces* siempre desplazaron a las *Torulaspota* independientemente del fenotipo killer o sensible de cada levadura. Es decir, en estas condiciones, el mayor vigor fermentativo de las levaduras *Saccharomyces*, killer o no-killer, fue suficiente para desplazar a las levaduras *Torulaspota* killer de menor vigor fermentativo. Esto nos permitió ajustar la proporción de levaduras a utilizar en las mezclas *Saccharomyces:Torulaspota* para optimizar el efecto killer de *Torulaspota*, que resultó ser una proporción inicial de 1:3 para este experimento.

Nuestro principal objetivo fue analizar el efecto killer entre las distintas levaduras preseleccionadas durante la segunda fermentación antes de seleccionar las estirpes que se usarían para los tirajes en botella, mucho más costosos y laboriosos.

Se utilizó el vino base-1 de la variedad Macabeo procedente de Bodegas López-Morena (**Tabla II.6**). Se realizaron 19 experimentos, 9 controles con una sola levadura

Saccharomyces y/o *Torulaspota* killer o no-killer, 10 con mezclas de levaduras killer y no-killer o de dos levaduras killer de distinto tipo (**Tabla V.3**). Se prepararon 10 tubos de tiraje para cada levadura o mezcla de dos, y se incubaron los 7 primeros días a 12°C, 7 días a 20°C con el objetivo de acelerar el efecto killer de las levaduras, y el resto a 12°C.

Tabla V.3. Levaduras y mezclas de levaduras inoculadas en los tirajes realizados en tubos de polipropileno con el vino base-1.

Tiraje	Levaduras	Fenotipo
1	EX85R (<i>Sc</i>)	K ⁻ , CYH ^R
2	Rod23-1B (<i>Sc</i>)	K2, ROD ^{PC} , CYH ^R
3	EX229 (<i>Sc</i>)	Klus, CYH ^S
4	EX85 (<i>Sc</i>)	K2, CYH ^S
5	EX1180 (<i>To</i>)	Kbarr-1, CYH ^S
6	EX1257 (<i>To</i>)	Kbarr-2, CYH ^S
7	EX1180-11C4 (<i>To</i>)	Kbarr-1, CYH ^R
8	EX1180-2K ⁻ (<i>To</i>)	K ⁻ , CYH ^R
9	EX229-R1 (<i>Sc</i>)	K ⁻ , CYH ^R
10	EX85 + EX229-R1 (<i>Sc</i> + <i>Sc</i>)	K2, CYH ^S + K ⁻ , CYH ^R
11	Rod23-1B + EX1180 (<i>Sc</i> + <i>To</i>)	K2, ROD ^{PC} , CYH ^R + Kbarr-1, CYH ^S
12	EX229 + Rod23-1B (<i>Sc</i> + <i>Sc</i>)	Klus, CYH ^S + K2, ROD ^{PC} , CYH ^R
13	EX229 + EX85R (<i>Sc</i> + <i>Sc</i>)	Klus, CYH ^S + K ⁻ , CYH ^R
14	EX85 + EX85R (<i>Sc</i> + <i>Sc</i>)	K2, CYH ^S + K ⁻ , CYH ^R
15	EX85R + EX1180 (<i>Sc</i> + <i>To</i>)	K ⁻ , CYH ^R + Kbarr-1, CYH ^S
16	EX229 + EX1180-11C4 (<i>Sc</i> + <i>To</i>)	Kbarr-1, CYH ^R + Klus, CYH ^S
17	EX85 + EX1180-2K ⁻ (<i>Sc</i> + <i>To</i>)	K2, CYH ^S + K ⁻ , CYH ^R
18	EX1180 + EX1180-2K ⁻ (<i>To</i> + <i>To</i>)	Kbarr-1, CYH ^S + K ⁻ , CYH ^R
19	EX1180-11C4 + EX1257 (<i>To</i> + <i>To</i>)	Kbarr-1, CYH ^R + Kbarr-2, CYH ^S

Sc, *Saccharomyces cerevisiae*. *To*, *Torulaspota delbrueckii*. K⁻, levadura no-killer; K2, levadura killer K2; Klus, levadura killer Klus; Kbarr-1, levadura killer Kbarr-1; Kbarr-2, levadura killer Kbarr-2; CYH^R, resistente a cicloheximida; CYH^S, sensible a cicloheximida; ROD^{PC}, levaduras color rosa claro en presencia de rodamina-6G y resistentes a cicloheximida.

V.2.3.1. Eficacia de las levaduras *Saccharomyces* y *Torulaspota* en la segunda fermentación en tubos de laboratorio a baja presión.

La eficacia de las levaduras para realizar la toma de espuma se determinó fundamentalmente considerando la cinética de la segunda fermentación. Para facilitar su análisis, los resultados se exponen separados en dos bloques. Por un lado los correspondientes a mezclas de levaduras *S. cerevisiae*, y por otro los correspondientes a mezclas de levaduras *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii*, en ambos casos comparando con los respectivos controles realizados con cada levadura por separado.

Todos los tirajes inoculados con *S. cerevisiae*, una levadura o mezclas, terminaron la segunda fermentación antes de 10 días (**Figs. V.9A y C**). De la misma manera, la mayoría de las mezclas de *Saccharomyces* y *Torulaspota* terminaron la segunda fermentación antes de 10 días o, como mucho, antes de 20 días. Los tirajes inoculados con una levadura *T. delbrueckii* EX1180, EX1180-11C4 o EX1180-2K⁻ terminaron la

fermentación mucho más tarde, a los 40 días; y dejaron del orden de 2-3 g/L de azúcar. La mezcla de dos levaduras *Torulaspora* fue algo más rápida porque se inoculó el doble de levaduras, y agotaron los azúcares totalmente (Figs. V.9B y D). El vino sin inocular y el tiraje de la *Torulaspora* EX1257 Kbarr-2 no terminaron la segunda fermentación y quedaron los vinos dulces (Fig. V.9).

En resumen, como ya se mencionó en el Capítulo IV, las cinéticas de las fermentaciones inoculadas con *T. delbrueckii* resultaron mucho más lentas que las inoculadas con *S. cerevisiae*, e incluso algunas de estas fermentaciones no llegaron a completarse totalmente.

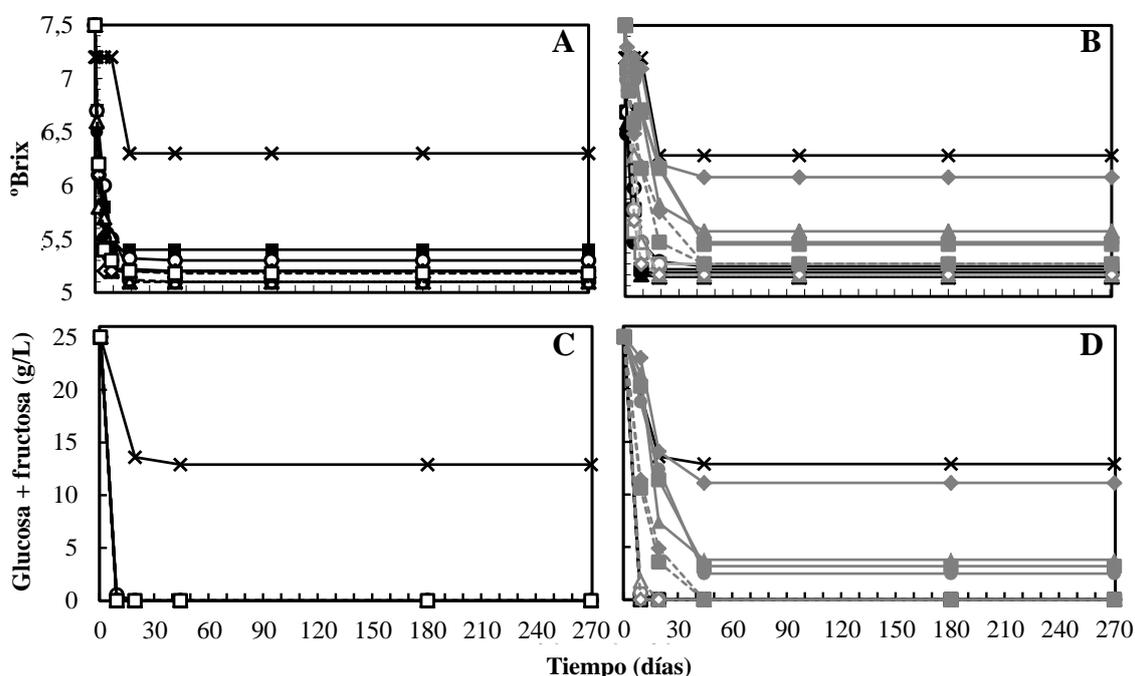


Figura V.9. Cinética de fermentación y evolución del consumo de glucosa+fructosa de los tirajes inoculados con mezclas de levaduras *S. cerevisiae* (A y C) y mezclas de *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii* (B y D) y sus correspondientes controles inoculados con cada levadura por separado. Símbolos: Sin inocular (—×—), EX85 (—●—), EX85R (—■—), Rod23-1B (—○—), EX229 (—▲—), EX229-R1 (—△—), EX85+EX229-R1 (—Δ—), EX229+Rod23-1B (—○—), EX229+EX85R (—◇—), EX85+EX85R (—□—), EX1180 (—■—), EX1257 (—◆—), EX1180-11C4 (—●—), EX1180-2K (—▲—), EX85R+EX1180 (—□—), Rod23-1B+EX1180 (—○—), EX229+EX1180-11C4 (—△—), EX85+EX1180-2K (—◇—), EX1180+EX1180-2K (—■—), EX1180-11C4+EX1257 (—◆—).

V.2.3.2. Evolución de la viabilidad celular de las levaduras *Saccharomyces* y *Torulaspora* en la segunda fermentación en tubos de laboratorio a baja presión.

Partiendo de un inóculo del orden de 10^7 ufc/mL, se alcanzaron poblaciones de 10^8 y 10^9 ufc/mL aproximadamente a los 7 días después de realizado el tiraje; y a partir del día 20 disminuyó la viabilidad progresivamente en todas las poblaciones, y fue más

acusada en las levaduras *T. delbrueckii* EX1180-11C4 y *S. cerevisiae* Rod23-1B que tendieron a morir antes que el resto de levaduras después del día 95 (Figs. V.10A y B). La cantidad de yemas también disminuyó progresivamente hasta desaparecer a los 60 días (Figs. V.10C y D). Sorprendentemente, a los 9 meses todavía se detectaron algunas células viables en todas las fermentaciones (de 10^2 - 10^5 ufc/mL), especialmente en la mezcla de *S. cerevisiae* EX229 (Klus) + *T. delbrueckii* EX1180-11C4 (Kbarr-1) con $3,97 \times 10^5$ ufc/mL. Las levaduras fueron capaces de sobrevivir en estas condiciones de bajo pH y baja temperatura, probablemente debido a la ausencia de presión en el tubo.

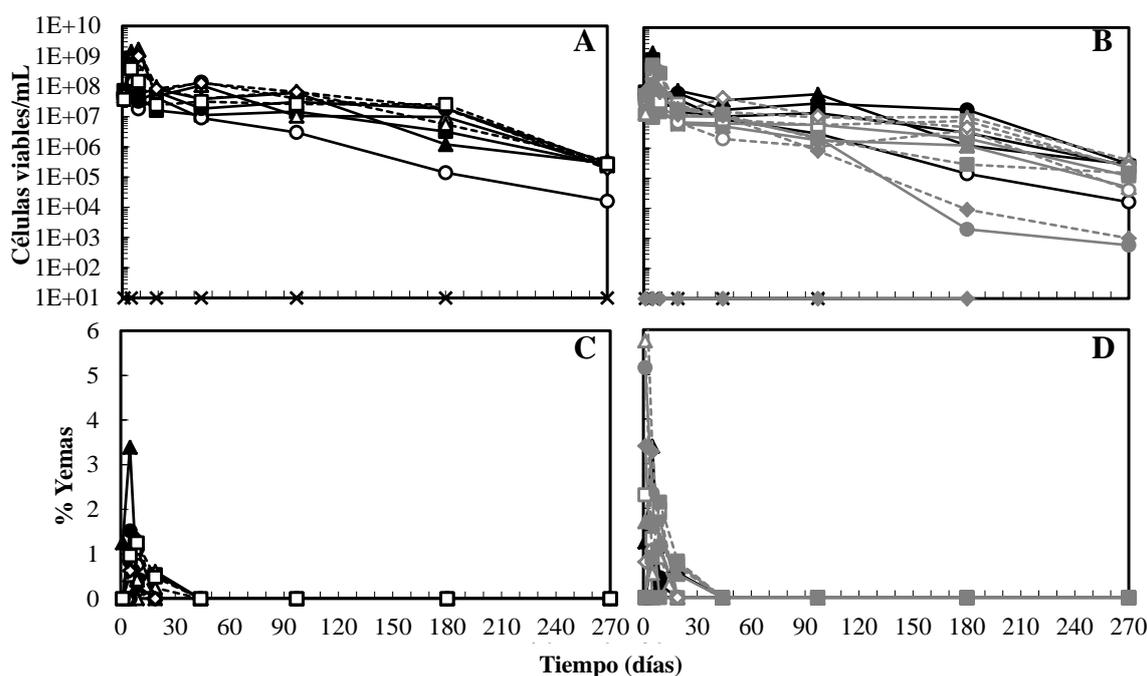


Figura V.10. Evolución de la viabilidad celular y del porcentaje de yemas en las fermentaciones inoculadas con mezclas de levaduras *S. cerevisiae* (A y C) y mezclas de *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii* (B y D) y sus correspondientes controles inoculados con cada levadura por separado. Símbolos: Sin inocular (—×—), EX85 (—●—), EX85R (—■—), Rod23-1B (—○—), EX229 (—▲—), EX229-R1 (—△—), EX85+EX229-R1 (—Δ—), EX229+Rod23-1B (—○—), EX229+EX85R (—◇—), EX85+EX85R (—□—), EX1180 (—■—), EX1257 (—◆—), EX1180-11C4 (—●—), EX1180-2K (—▲—), EX85R+EX1180 (—□—), Rod23-1B+EX1180 (—○—), EX229+EX1180-11C4 (—△—), EX85+EX1180-2K (—◇—), EX1180+EX1180-2K (—■—), EX1180-11C4+EX1257 (—◆—).

V.2.3.3. Desplazamiento de las levaduras sensibles por las levaduras killer y evolución de la muerte celular en la segunda fermentación en tubos de laboratorio a baja presión.

En todas las fermentaciones inoculadas con mezclas de levaduras se apreció desplazamiento de la levadura no-killer por la levadura killer de la misma especie (Figs. V.11 A y B). Los resultados se correspondieron bastante bien con los obtenidos en el

test en placa de fenotipo killer: la mayoría de las levaduras killer con fenotipo detectable en placa desplazaron a sus compañeras sensibles de la misma mezcla. En la mezcla de dos levaduras killer, mezcla EX229+Rod23-1B, la levadura Rod23-1B (K2) fue desplazada por EX229 (Klus) (**Fig. V.11A**). Aunque estas levaduras se mataron mutuamente en el test en placa (20°C, pH 4), el efecto killer de EX229 sobre Rod23-1B fue más intenso que a la inversa (**Figs. V.3 y V.5**). Además, la levadura Rod23-1B (junto a EX85R) mostró una tasa de crecimiento y fermentación de azúcar algo inferior al resto de las levaduras analizadas en estas condiciones de tiraje (12-20°C, pH 2,95; **Fig. V.9A**). Estas dos circunstancias pueden explicar que EX229 desplazara a Rod23-1B durante la fermentación del vino base en lugar de ocurrir lo contrario.

En las fermentaciones inoculadas con mezclas de *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii*, se apreció desplazamiento de una de las dos levaduras en todas las fermentaciones (**Fig. V.11B**). No obstante, en discordancia con los resultados del test de fenotipo killer en placa, siempre prevalecieron las levaduras *Saccharomyces*, aunque fueran sensibles a las *Torulaspota* killer. Además, el desplazamiento de las *Torulaspota* en las mezclas EX85R+EX1180, EX229+EX1180-11C4 y EX85+EX1180-2K⁻ fue más rápido de lo esperable dado su prevalencia en el test killer en placa sobre las mismas levaduras *Saccharomyces*, lo que hace sospechar que este desplazamiento no se debió realmente al fenotipo killer de las levaduras *Saccharomyces* (de hecho EX85R no es killer) sino más bien a su mayor tasa de crecimiento y fermentación. La única concordancia con este test fue la mezcla de dos levaduras *Torulaspota*, donde la levadura EX1180 (Kbarr-1) desplazó a la EX1180-2K⁻ (Kbarr⁰), como era de esperar dado que ambas tienen una tasa de crecimiento similar (**Fig. V.11B**).

El porcentaje de levaduras muertas fue aumentando a medida que progresó la segunda fermentación. Hasta los 6 meses, la mayoría de las fermentaciones inoculadas con mezclas de levaduras *Saccharomyces* (killer y no-killer, o dos levaduras killer de distinto tipo) presentaron mayor porcentaje de muerte que los correspondientes controles inoculados con cada levadura por separado, poniendo claramente de manifiesto la influencia del fenotipo killer durante la segunda fermentación en estas condiciones. A partir de los 6 meses no hubo diferencias significativas entre las mezclas y sus controles, debido a que la gran mayoría de las levaduras mueren independientemente de la existencia de toxinas killer. La excepción fue la fermentación inoculada con Rod23-1B, que presentó una proporción de células muertas cercana a la de las mezclas de levaduras killer y sensibles (**Figs. V.11C y D**). La evolución del

porcentaje de levaduras muertas en las fermentaciones inoculadas con mezclas de *Saccharomyces* y *Torulaspota* fue similar a la de los controles inoculados sólo con *Torulaspota*, y en ambos casos la proporción de células muertas fue mayor que en las fermentaciones control de *S. cerevisiae* (Figs. V.11C y D). Es decir, todo parece indicar que las levaduras menos eficaces para realizar la segunda fermentación, *S.cerevisiae* Rod23-1B y todas las *T. delbrueckii*, tienden a morir antes que los controles de levaduras *S. cerevisiae* más eficaces, independientemente de que sean killer.

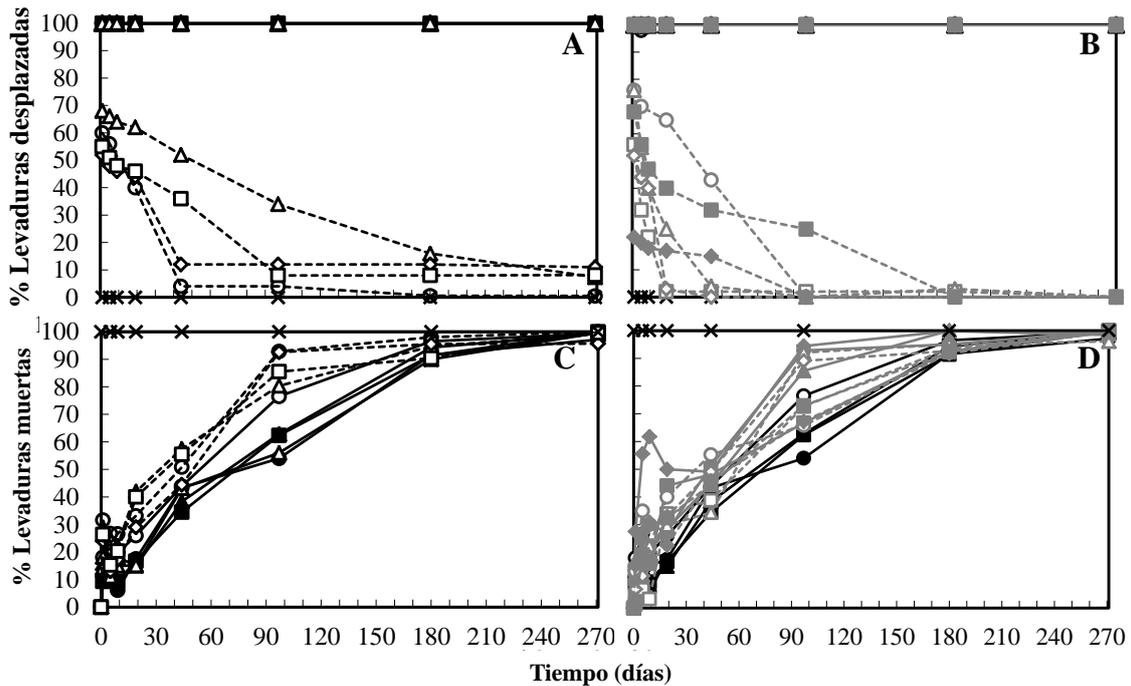


Figura V.11. Evolución del porcentaje de cada levadura inoculada, de la levadura desplazada en las mezclas de dos levaduras (killer+no-killer o killer+killer) y de levaduras muertas totales en las fermentaciones inoculadas con mezclas de levaduras *S. cerevisiae* (A y C) y mezclas de *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii* (B y D) y sus correspondientes controles inoculados con cada levadura por separado. El porcentaje de cada levadura inoculada y de la levadura desplazada en las fermentaciones inoculadas con mezclas de levaduras se calculó analizando distintos marcadores genéticos de las colonias aisladas de cada muestra: CYH^R (resistencia a cicloheximida) para EX85R, EX229-R1, EX1180-11C4, EX1180-2K⁻ y Rod23-1B; ROD^{PC} (levadura color rosa claro en presencia de rodamina-6B) para Rod23-1B; CYH^S (sensibilidad a cicloheximida), fenotipo killer y/o perfil de restricción del mtDNA (RFLPs) para EX229, EX85, EX1180 y EX1257. Símbolos: Sin inocular (—x—), EX85 (—●—), EX85R (—■—), Rod23-1B (—○—), EX229 (—▲—), EX229-R1 (—△—), EX85+EX229-R1[†] (—Δ—), EX229+Rod23-1B[†] (—◊—), EX229+EX85R[†] (—◊—), EX85+EX85R[†] (—◊—), EX1180 (—■—), EX1257 (—◆—), EX1180-11C4 (—●—), EX1180-2K⁻ (—▲—), EX85R+EX1180[†] (—◊—), Rod23-1B+EX1180[†] (—◊—), EX229+EX1180-11C4[†] (—Δ—), EX85+EX1180-2K⁻[†] (—◊—), EX1180+EX1180-2K⁻[†] (—■—), y EX1180-11C4+EX1257[†] (—◆—). El símbolo (†) indica la levadura que resultó desplazada en cada mezcla de dos levaduras y cuyo porcentaje se representa en la correspondiente gráfica.

V.2.3.4. Evolución del contenido en polisacáridos y proteínas en la segunda fermentación en tubos de laboratorio a baja presión.

El contenido en polisacárido y proteínas en todas las fermentaciones inoculadas con una levadura o mezclas de levaduras *Saccharomyces* aumentó respecto el vino base inicial (**Figs. V.12 y V.13**). El incremento medio de polisacáridos fue del 12% a los 30 días, 28% a los 180 días y 14% a los 270 días; y el de proteínas fue 55%, 70% y 73% respetivamente (**Fig. V.13**). En la mayoría de las fermentaciones inoculadas con mezclas de levaduras *S. cerevisiae* incrementó significativamente la cantidad de polisacáridos con respecto los controles de una sola levadura, con una media del 5% a los 30 días, 10% a los 180 días y 9% a los 270 días (**Fig. V.13**). Sin embargo, en general, la cantidad de polisacáridos disminuyó una media del 17% durante el envejecimiento del cava de 180 a 270 días (**Fig. V.13**). La disminución más acusada correspondió a la mezcla EX85+EX229-R1 (28,5%) y la menos acusada a la levadura control Rod23-1B (5,85%) (**Fig. V.12**). La cantidad de proteínas también aumentó de forma generalizada en los vinos de mezclas de *S. cerevisiae* con respecto los controles de una sola levadura, una media de 19% a los 30 días, 24% a los 180 días y 25% a los 270 días (**Fig. V.13**). A diferencia de lo que ocurrió con la cantidad de polisacáridos durante el envejecimiento de 180 a 270 días, la cantidad de proteínas aumentó de forma generalizada un 10%, con la excepción del vino de EX85R en el que disminuyó de 4,0 mg/L a 3,16 mg/L, que precisamente fue el vino con menor cantidad de proteína (**Fig. V.12**).

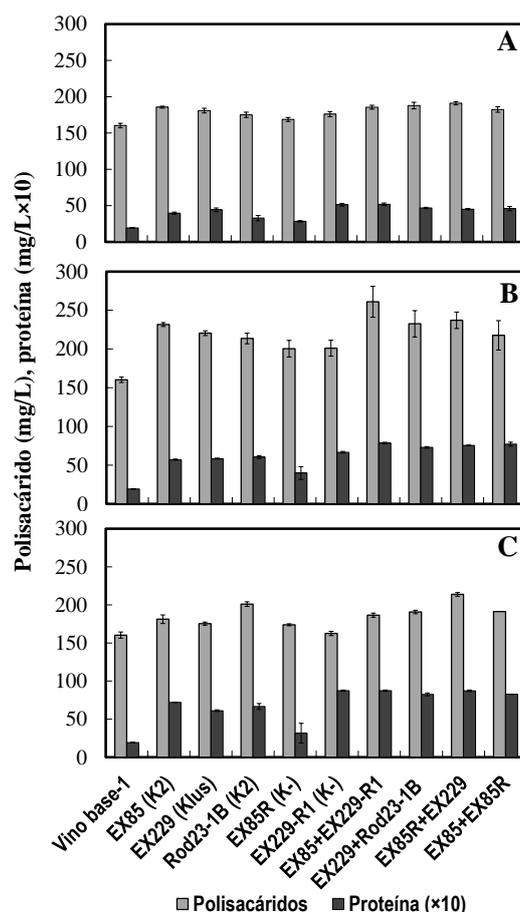


Figura. V.12. Concentración de polisacáridos (método fenol-sulfúrico) y de proteínas (método Bradford) a los 30 días (A), 180 días (B) y 270 días (C) de la segunda fermentación de cavas inoculados con *Saccharomyces* y mezclas de *Saccharomyces*+*Saccharomyces* (dos levaduras con distinto fenotipo killer).

En síntesis, el contenido de polisacáridos y proteínas totales incrementó significativamente a lo largo de las fermentaciones inoculadas con mezclas de levaduras *S. cerevisiae*, con efecto killer, respecto a las fermentaciones sin este efecto inoculadas con cada levadura en solitario (Fig. V.13A), hasta un 10% en la cantidad de polisacáridos y un 25% en la cantidad de proteínas.

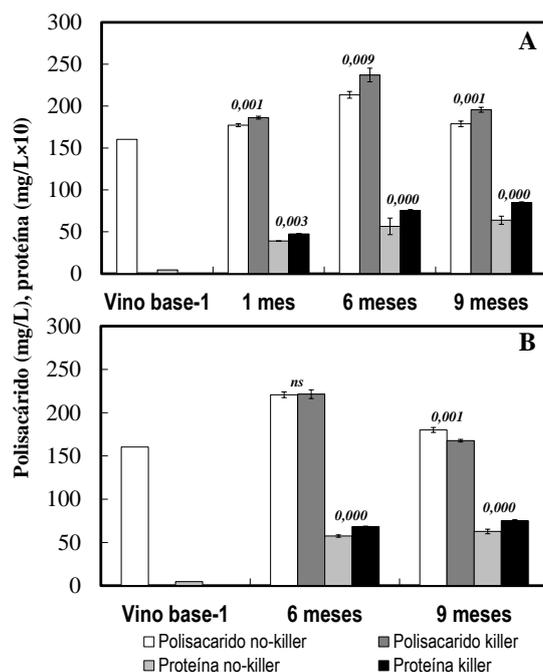


Figura V.13. Evolución de la concentración media de polisacáridos y proteínas durante la segunda fermentación de los cavas inoculados con: (A), una levadura *Saccharomyces* (no existe efecto killer), o mezclas de *Saccharomyces*+*Saccharomyces* (si existe efecto killer); y (B), una levadura *Saccharomyces* o *Torulaspota*, o mezclas de *Torulaspota*+*Torulaspota* o *Saccharomyces*+*Torulaspota*. En la parte superior se muestra el nivel de significación (p) correspondiente al análisis de la varianza.

La cantidad de polisacáridos y proteínas aumentó en todas las fermentaciones inoculadas con una levadura *Torulaspota* o con mezclas de levaduras *Torulaspota*+*Torulaspota* y *Torulaspota*+*Saccharomyces* respecto el vino base inicial. El incremento medio de polisacáridos fue del 28% a 180 días y 7% a 270 días, y el de proteínas de 73% los 180 o 270 días. Sin embargo, en las fermentaciones inoculadas con mezclas de *Torulaspota*+*Torulaspota* y *Torulaspota*+*Saccharomyces* no aumentó la cantidad de polisacáridos respecto los controles de una sola levadura, ni se apreciaron diferencias significativas entre el contenido de polisacárido dependiente de la existencia de efecto killer. No obstante, la cantidad de proteínas aumentó de forma significativa una media del 16% a los 180 días y del 17% a los 270 días con mezclas de *Torulaspota*+*Torulaspota* y *Torulaspota*+*Saccharomyces* respecto sus controles de una sola levadura (**Fig. V.13B**).

En resumen, las levaduras *T. delbrueckii* EX1180-11C4 y *S. cerevisiae* Rod23-1B perdieron la viabilidad antes que el resto de levaduras a partir del día 95 de fermentación, independientemente de la presencia de toxina killer, aunque esto ocurrió una vez realizada la mayor parte del desplazamiento debido al efecto killer en las

fermentaciones inoculadas con mezclas de estas levaduras. En las mezclas de levaduras *Saccharomyces*, hubo una evidente correspondencia entre efecto killer e incremento de la cantidad de polisacárido y proteína durante la segunda fermentación y envejecimiento, hasta el 10% y el 25% respectivamente. En las mezclas de levaduras *Torulaspora*+*Torulaspora* y *Torulaspora*+*Saccharomyces*, no se apreció ningún incremento en la cantidad de polisacárido, y sólo hubo un incremento medio de proteínas de hasta el 17% asociado a efecto killer. Probablemente, este incremento de proteínas fue menor que en las mezclas de *Saccharomyces* porque el incremento de la muerte celular fue generalizado en las poblaciones de *Torulaspora* con independencia del fenotipo killer. Además, *Torulaspora* no mató y desplazó a *Saccharomyces* en ningún caso, lo que hubiese podido resultar en la liberación de más proteínas y polisacáridos.

V.2.4. Elaboración de cava con inóculos mixtos de levaduras *Saccharomyces* y *Torulaspora* killer/no-killer en botella a alta presión.

Los resultados previos nos permitieron descartar algunas levaduras y mezclas de levaduras *Saccharomyces* y *Torulaspora* (la *Torulaspora* EX1257 por su ineficacia; y las mezclas EX85R+EX1180, EX229+EX1180-11C4 y EX85+EX1180-2K⁻ por la sospecha de que la rápida imposición de *Saccharomyces* sobre *Torulaspora* no se debió realmente al fenotipo killer de las levaduras *Saccharomyces*, sino más bien a su mayor tasa de crecimiento y fermentación), e introdujimos una nueva mezcla *Saccharomyces* killer + *Torulaspora* no-killer (EX229+EX1180-2K⁻) para analizar su eficacia en botella con presión (**Tabla V.4**). Los tirajes de levaduras *Saccharomyces* y mezclas de dos *Saccharomyces* se incubaron a 18°C durante los primeros 30 días de fermentación (series 1-8) para optimizar el efecto killer de estas levaduras que no funciona bien a 12-14°C (ver **Figs. V.2-V.6**), y posteriormente se pasaron a 12-14°C para continuar con la segunda fermentación y crianza, excepto los inoculados con *Saccharomyces* EX229 y Rod23-1B (serie 11 y 12), que fueron incubados a 12-14°C durante todo el tiempo. Los tirajes inoculados con *Torulaspora* se incubaron a 12-14°C (series 9, 10, 13, 14 y 15) desde el principio para mitigar en lo posible el efecto deletéreo de las condiciones de tiraje sobre estas levaduras, más sensibles al alcohol y la presión que *S. cerevisiae* (a mayor temperatura mayor sensibilidad al alcohol). En ambas condiciones se realizó un control sin inocular. Como ya se hiciera en las fermentaciones en tubos a baja presión, se volvió a incrementar aún más la proporción de levaduras *Torulaspora* en las mezclas

Saccharomyces: *Torulaspora* hasta 1:10 para optimizar el pretendido efecto killer de *Torulaspora* en estas nuevas condiciones en botella, en previsión del posible efecto deletéreo adicional de la presión sobre las levaduras *Torulaspora*. En total, se realizaron 15 tirajes con levaduras + 2 tirajes sin inocular a 18-12°C y 12°C, 7 controles con una sola levadura killer o no-killer, 7 mezclas de dos levaduras killer y no-killer, o dos killer de distinto tipo y 1 mezcla de cuatro levaduras *S. cerevisiae* killer y no-killer (**Tabla V.4**). Se utilizó el vino base-2 de la variedad Macabeo procedente de Bodegas López-Morena (**Tabla II.6**).

Tabla V.4. Levaduras y mezclas de levaduras inoculadas en los tirajes de cava realizados en botella con vino base-2.

Tiraje	Levadura	Fenotipo
1	EX85 (<i>Sc</i>)	K2, CYH ^S
2	EX85R (<i>Sc</i>)	K ⁻ , CYH ^R
3	EX229-R1 (<i>Sc</i>)	K ⁻ , CYH ^R
4	EX85 + EX85R (<i>Sc+Sc</i>)	K2, CYH ^S + K ⁻ , CYH ^R
5	EX85 + EX229-R1 (<i>Sc+Sc</i>)	K2, CYH ^S + K ⁻ , CYH ^R
6	EX229 + Rod23-1B (<i>Sc+Sc</i>)	Klus, CYH ^S + K2, ROD ^{PC} , CYH ^R
7	EX229 + EX85R (<i>Sc+Sc</i>)	Klus, CYH ^S + K ⁻ , CYH ^R
8	EX229+EX85+Rod23-1B+EX85R (<i>Sc+Sc+Sc+Sc</i>)	Klus, CYH ^S + K2, CYH ^S + K2, ROD ^{PC} , CYH ^R + K ⁻ , CYH ^R
9	EX1180-2K ⁻ (<i>To</i>)	K ⁻ , CYH ^R
10	EX1180 (<i>To</i>)	Kbarr-1, CYH ^S
11	EX229 (<i>Sc</i>)	Klus, CYH ^S
12	Rod23-1B (<i>Sc</i>)	K2, ROD ^{PC} , CYH ^R
13	EX1180 + EX1180-2K ⁻ (<i>To+To</i>)	Kbarr-1, CYH ^S + K ⁻ , CYH ^R
14	EX229 + EX1180-2K ⁻ (<i>Sc+To</i>)	Klus, CYH ^S + K ⁻ , CYH ^R
15	Rod23-1B + EX1180 (<i>Sc+To</i>)	K2, ROD ^{PC} , CYH ^R + Kbarr-1, CYH ^S

Sc, *Saccharomyces cerevisiae*. *To*, *Torulaspora delbrueckii*. Abreviaturas: K⁻, levadura no-killer; K2, levadura killer K2; Klus, levadura killer Klus; Kbarr-1, levadura killer Kbarr-1; CYH^R, resistente a cicloheximida; CYH^S, sensible a cicloheximida; ROD^{PC}, levaduras color rosa claro en presencia de rodamina-6G y resistentes a cicloheximida.

V.2.4.1. Eficacia fermentativa de las levaduras a alta presión.

Todas las levaduras *Saccharomyces* (mezclas o controles de una sola levadura) incubadas a 18°C terminaron la fermentación antes de 30 días (**Fig. V.14A**). De los tirajes incubados a 12°C, sólo terminaron la fermentación antes de 60 días los inoculados con *S. cerevisiae* EX229 (sola o mezclada con *Torulaspora* EX1180). La fermentación de los tirajes inoculados únicamente con *Torulaspora* se paró el día 60, excepto EX1180 que continuó lentamente hasta 270 días, probablemente debido a una contaminación presente en el vino base-2. La fermentación de *S. cerevisiae* Rod23-1B fue de nuevo más lenta que el resto de las levaduras *Saccharomyces*, probablemente debido a que esta levadura es de fermentación algo más lenta y en este caso fue además ralentizada por la baja temperatura y la presión (**Fig. V.14B**). Ningún control sin inocular realizó la segunda fermentación (**Figs.V.14A y B**).

Se observó una clara correlación entre la presión y el consumo de azúcares: a más consumo de azúcares, más presión. En los tirajes de *Saccharomyces* incubados a 18°C, con las cinéticas de consumo de azúcares más rápidas, se alcanzó una presión de 6 atm antes de 30 días (**Fig. V.14C**). Sin embargo, el tiraje de *S. cerevisiae* EX229 incubado a 12°C (sola o mezclada con la *Torulaspora* EX1180-2K⁻), tardó 60 días en alcanzar la misma presión. Los cavas de *Torulaspora*, solas o en mezclas, alcanzaron su máxima presión (1,4-3,3 atm) a los 60-90 días; sin embargo, el de *Torulaspora* EX1180 alcanzó una presión máxima de 5,6 atm debido a que continuó lentamente la fermentación hasta los 270 días, igual que ocurrió con *S. cerevisiae* Rod23-1B, poniendo nuevamente de manifiesto la relación entre presión y consumo de azúcares (**Fig. V.14D**). La presión se mantuvo prácticamente a 0 atm en los controles sin inocular durante toda la fermentación ya que no hubo consumo de azúcares (**Figs. V.14C y D**).

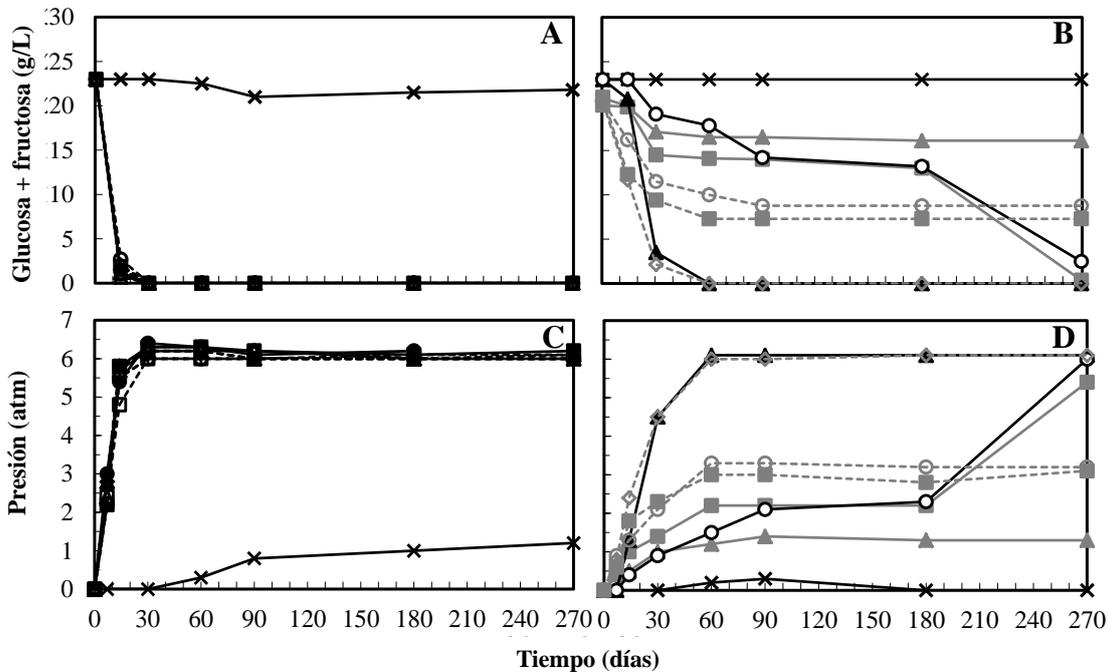


Figura V.14. Evolución del consumo de glucosa+fructosa (A y B) y presión (C y D) en función del tiempo de los tirajes realizados en botella con mezclas de *S. cerevisiae* o mezclas de *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii* y sus correspondientes controles inoculados con cada levadura por separado a 18°C y 12°C (A y C), o 12°C (B y D). Símbolos: Sin inocular (—x—), EX85 (—●—), EX85R (—■—), EX229-R1 (—△—), EX85+EX85R (—□—), EX85+EX229-R1 (—△—), EX229+Rod23-1B (—○—), EX229+EX85R (—◇—), EX229+EX85+Rod23-1B+EX85R (—+—), EX1180 (—■—), EX1180-2K⁻ (—▲—), EX229 (—▲—), Rod23-1B (—○—), EX1180+EX1180-2K⁻ (—■—), EX229+EX1180-2K⁻ (—◇—) y Rod23-1B+EX1180 (—○—).

V.2.4.2. Evolución de la viabilidad celular de las levaduras.

La población de levaduras aumentó un orden de magnitud, de 10^6 a 10^7 ufc/mL, a los 15-30 días en los tirajes de *Saccharomyces* (**Fig. V.15A**), incremento que no se

apreció en los tirajes de *Torulasporea*. Las levaduras *Torulasporea* murieron más rápidamente que las *Saccharomyces*, antes de 60-90 días, aun teniendo más yemas (Figs. V.15B y D). En general, las levaduras de estos tirajes en botella a alta presión murieron antes que las levaduras de los tirajes realizados en tubos a baja presión (Figs. V.10A y B). Por ejemplo: EX85 y EX229 habían muerto totalmente a los 6 meses en botella, mientras que en tubo a baja presión aún quedaban $1,86 \times 10^7$ ufc/mL y $1,2 \times 10^6$ ufc/mL respectivamente. La proporción de yemas de *Torulasporea* no disminuyó a medida que el cultivo fue envejeciendo con el agotamiento de los nutrientes, como sería de esperar (Fig. V.15D). Esto se podría explicar porque las levaduras mueren cuando se están dividiendo quedando las yemas unidas a la célula madre al dejar de crecer por agotamiento de nutrientes. En contraposición, las levaduras *Saccharomyces* permanecieron vivas más de 90 días, y algunas hasta los 180 o 270 días (EX229, EX229-R1, Rod23-1B y mezcla Rod23-1B+EX1180), y la cantidad de yemas disminuyó a medida que el cultivo envejeció por falta de nutrientes (Fig. V.15C).

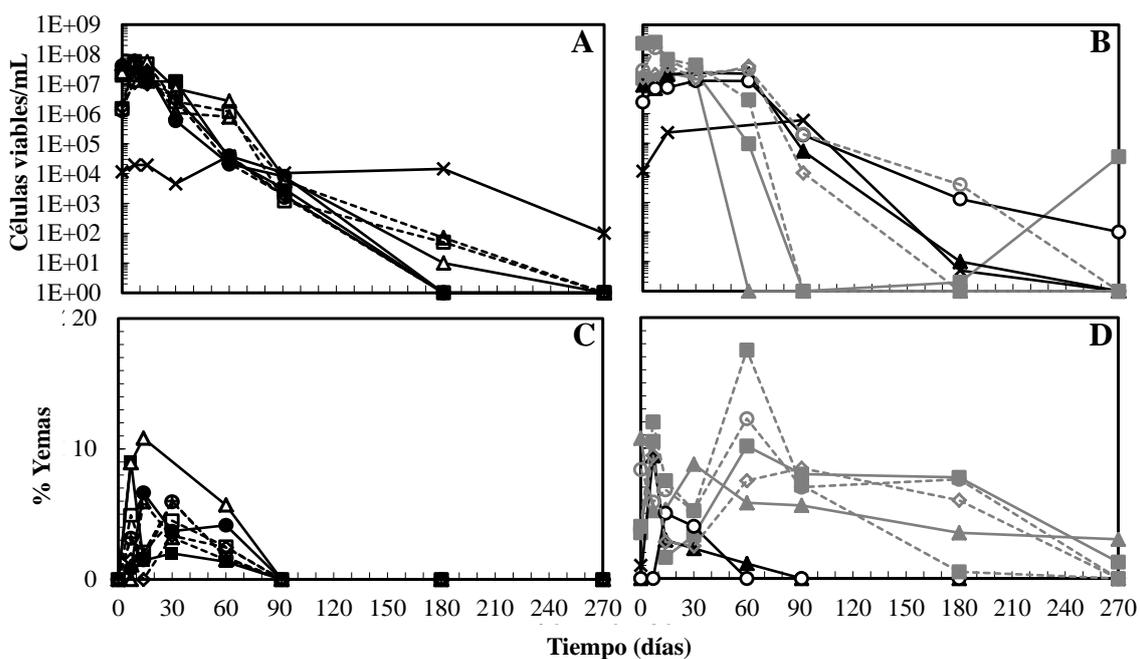


Figura V.15. Evolución de la viabilidad (A y B) y porcentaje de yemas (C y D) en función del tiempo de los tirajes realizados en botella con mezclas de *S. cerevisiae* o mezclas de *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii* y sus correspondientes controles inoculados con cada levadura por separado a 18°C y 12°C (A y C), o 12°C (B y D). Símbolos: Sin inocular (—x—), EX85 (—●—), EX85R (—■—), EX229-R1 (—Δ—), EX85+EX85R (—□—), EX85+EX229-R1 (—Δ—), EX229+Rod23-1B (—○—), EX229+EX85R (—◇—), EX229+EX85+Rod23-1B+EX85R (—+—), EX1180 (—■—), EX1180-2K⁻ (—▲—), EX229 (—▲—), Rod23-1B (—○—), EX1180+EX1180-2K⁻ (—■—), EX229+EX1180-2K⁻ (—◇—) y Rod23-1B+EX1180 (—○—).

V.2.4.3. Desplazamiento de las levaduras sensibles por las levaduras killer y evolución de la muerte celular.

En todas las mezclas de levaduras de la misma especie se observó desplazamiento de la levadura sensible por la levadura killer, más rápido a 18°C (**Fig. V.16A**) que a 12°C (**Fig. V.16B**). Esto no correlacionó con un incremento de la muerte celular a partir de los 30 días, probablemente debido a que en este punto la mayoría de las levaduras ya están muertas debido a que ya han agotado los azúcares y hay un efecto deletéreo de la presión sobre la viabilidad celular, especialmente sobre las levaduras *Torulaspota* (**Fig. V.16D**). Solamente se observó correlación entre el efecto killer y el incremento de la muerte celular en las mezclas de levaduras *S. cerevisiae* antes de 30 días (**Fig. V.16C**). En las mezclas de *Saccharomyces+Torulaspota* dominó siempre *Saccharomyces*, aunque esta fuera la estirpe sensible (**Fig. V.16B**). Esto mismo ya ocurrió en los tirajes realizados en tubos a baja presión, y es debido a la mayor tasa de crecimiento y vigor fermentativo de *Saccharomyces* respecto a *Torulaspota* (**Fig. V.11B**).

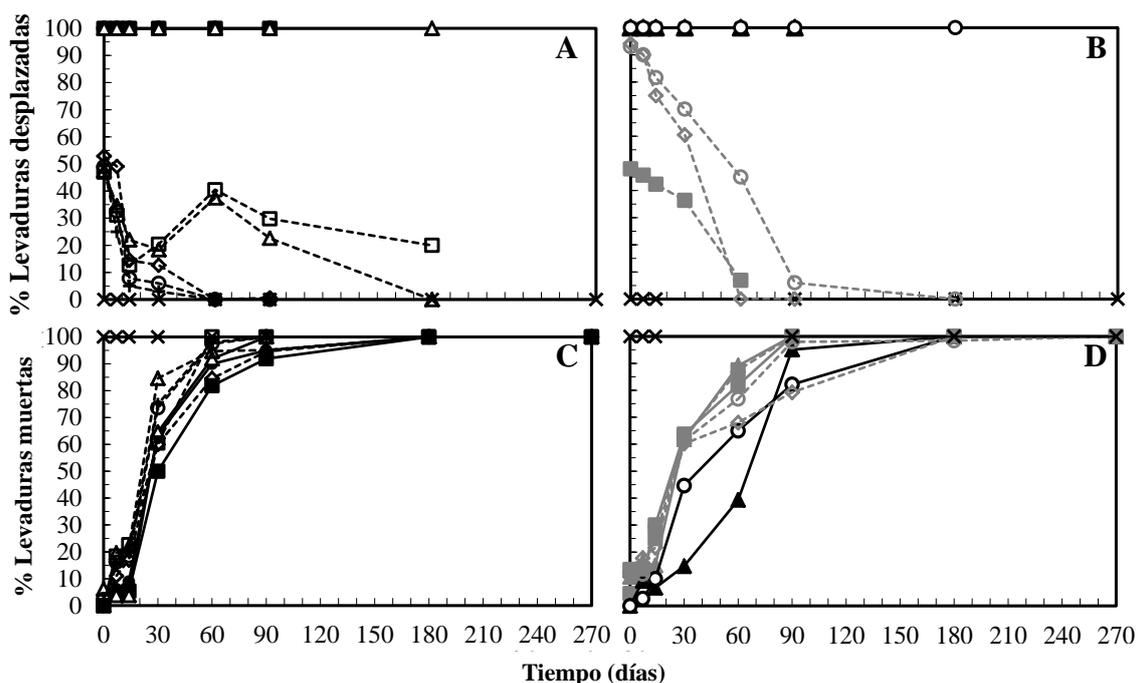


Figura V.16. Evolución del porcentaje de cada levadura inoculada, de la levadura desplazada en las mezclas de dos levaduras (killer+no-killer o killer+killer) (A y B) y de levaduras muertas totales (C y D) en función del tiempo de los tirajes realizados en botella con mezclas de *S. cerevisiae* o mezclas de *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii* y sus correspondientes controles inoculados con cada levadura por separado a 18°C y 12°C (A y C), o 12°C (B y D). El porcentaje de cada levadura inoculada y de la levadura desplazada en las fermentaciones inoculadas con mezclas de levaduras se calculó analizando distintos marcadores genéticos en las colonias aisladas de cada muestra: CYH^R (resistencia a cicloheximida) para EX85R, EX229-R1 y EX1180-2K⁻; ROD^{PC} (levadura color rosa claro en presencia de rodamina-6B) para Rod23-1B; CYH^S (sensibilidad a cicloheximida), fenotipo killer y/o perfil de restricción del mtDNA (RFLPs) para EX229, EX85, EX1180. Símbolos: Control sin inocular (—x—), EX85 (—●—), EX85R (—■—), EX229-R1 (—Δ—), EX85+EX85R[†] (—□—), EX85+EX229-R1[†] (—Δ—), EX229+Rod23-1B[†] (—○—), EX229+EX85R[†] (—◇—), EX229+EX85+Rod23-1B+EX85R[†] (—+—), EX1180 (—■—), EX1180-2K⁻ (—▲—), EX229 (—▲—), Rod23-1B (—○—), EX1180+EX1180-2K⁻ (—■—), EX229+EX1180-2K⁻ (—◇—) y Rod23-1B+EX1180[†] (—○—). El símbolo (†) indica la levadura que resultó desplazada en cada mezcla de dos levaduras y cuyo porcentaje se representa en la correspondiente gráfica.

En resumen, las levaduras *Saccharomyces* fueron muy eficaces alcanzando 6 o más atms de presión a los 30 días, excepto EX229 y Rod23-1B a 12°C que alcanzaron esta presión a los 60 y 270 días respectivamente. Además, el incremento de temperatura de 12 a 18°C durante los primeros 30 días fue determinante para acelerar la fermentación y el efecto killer en los tirajes de *Saccharomyces*. Por el contrario, las levaduras *Torulaspora* mostraron poco vigor fermentativo y poca viabilidad en estas

condiciones de alta presión y baja temperatura, y no completaron la segunda fermentación del cava sin la presencia de levaduras *Saccharomyces*.

El análisis organoléptico de todos los cavas se realizó a los 9 meses (270 días) del tiraje. Los inoculados exclusivamente con levaduras *Torulaspota* y el de *S. cerevisiae* Rod23-1B, cuya fermentación no fue completada correctamente, fueron descalifados por el comité de cata y por tanto descartados para continuar con el análisis de los parámetros espumantes, polisacáridos, proteínas (excepto Rod23-1B) y compuestos aromáticos de los vinos.

V.2.4.4. Análisis de la espuma de los cavas.

En línea con lo descrito previamente (Cilindre et al., 2010; Girbau-Sola et al., 2002b; Maujean et al., 1990a), los parámetros de la espuma (HM, HS y TS) no mejoraron respecto al vino base en la mayoría de los cavas, excepto en los dos elaborados con las mezclas EX229+Rod23-1B y EX229+EX85+Rod23-1B+EX85R, en los que además también mejoraron los parámetros de espuma respecto a los cavas elaborados con cada una de las levaduras por separado (**Fig. V.17**). Curiosamente, estos cavas se correspondieron con los tirajes donde hubo más cantidad de células destrozadas (indicativo de efecto killer real) al principio de la segunda fermentación (**Fig V.18**). Ambas mezclas incluían la levadura Rod23-1B, que crece más lentamente y tiene menor vigor fermentativo a alta presión que las otras levaduras de estas mezclas, y que es por tanto más susceptible al efecto de las toxinas killer. En conjunto, los parámetros de la espuma mejoraron significativamente en los cavas elaborados con mezclas de levaduras, donde hubo efecto killer, respecto a los cavas sin efecto killer elaborados con cada levadura por separado (HM 23,45±4,22 no-killer, 35,9±4,91 killer, p=0,062; HS 11,50±0,37 no-killer, 19,35±2,33 killer, p=0,002; y TS 11,95±1,99 no-killer , 288,2±89,74 killer, p=0,004) (**Fig. V.19**).

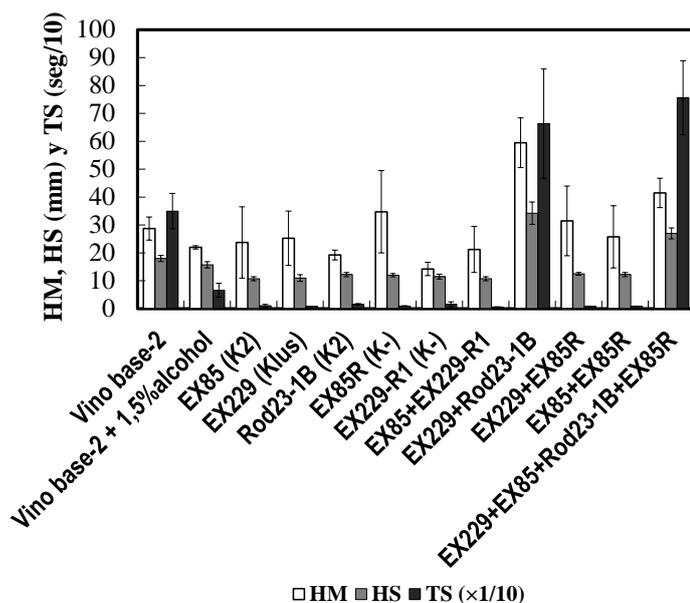


Figura V.17. Evolución de los parámetros de espuma de los cavas elaborados con levaduras *Saccharomyces* killer, no-killer o mezclas de levaduras *Saccharomyces* tras 9 meses de crianza respecto al vino base-2. HM, altura máxima de la espuma; HS, altura de la espuma estabilizada; TS, tiempo de mantenimiento de la espuma.

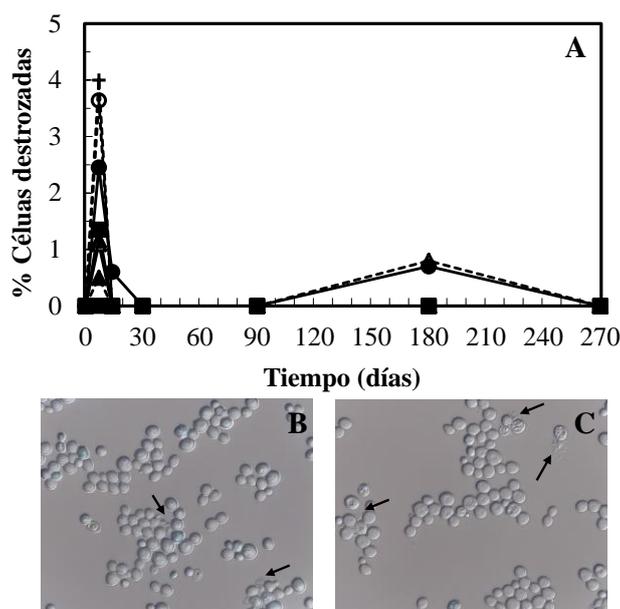


Figura V.18. Evolución del porcentaje de células destrozadas (A) de los cavas elaborados con levaduras *Saccharomyces* killer y no-killer y mezclas de levaduras *Saccharomyces* durante la segunda fermentación de cavas. Símbolos: Sin inóculo (—x—), EX85 (—●—), EX85R (—■—), EX229-R1 (—Δ—), EX85+EX229-R1 (--Δ--), EX229+Rod23-1B (--o--), EX229+EX85R (--◇--), EX85+EX85R (--□--), EX229+EX85+Rod23-1B+ EX85R (--+--). Microfotografías (600×, Nomarski y campo claro) de los cavas elaborados con EX229+Rod23-1B (B) y EX229+EX85+Rod23-1B+EX85R (C) del día 7 de fermentación, las flechas indican células destrozadas.

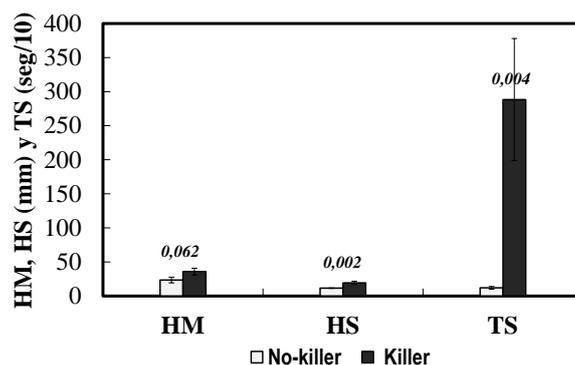


Figura V.19. Medias de los parámetros de espuma de los cavas inoculados con *Saccharomyces* (no existe efecto killer) y mezclas de *Saccharomyces*+*Saccharomyces* (si existe efecto killer). En la parte superior se muestra el nivel de significación (p) correspondiente al análisis de la varianza. HM, altura máxima de la espuma; HS, altura de la espuma estabilizada; TS, tiempo de mantenimiento de la espuma.

V.2.4.5. Evolución del contenido en polisacáridos, manano y proteínas durante la fermentación y envejecimiento del cava.

En general, la cantidad de polisacáridos disminuyó durante la fermentación una media del 26% a los 60 días, 7% a los 180 días y 5% a los 270 días respecto el vino base (**Fig. V.20**). El cava en el que más disminuyó fue EX229-R1 (6,76%) y en el que menos EX85+EX85R (3,66%). Es decir, los polisacáridos del vino base fueron degradados durante el crecimiento inicial de las levaduras y posteriormente repuestos en parte por la lisis de sus paredes a medida que fueron muriendo después de 2 meses de tiraje. No obstante, aunque la cantidad de polisacáridos disminuyera durante la crianza, la cantidad de manosa (que se mide para cuantificar el manano de la pared celular de la levadura) incrementó dos veces a los 270 días respecto el vino base; de forma similar a lo descrito previamente con un incremento de 3-4 veces durante el envejecimiento de los vinos espumosos en contacto con las lías (Caridi, 2006; Martínez-Lapuente et al., 2013; Moreno-Arribas and Polo, 2009). En la mayoría de los cavas elaborados con mezclas de levaduras *S. cerevisiae* incrementó ligeramente la cantidad de polisacáridos (media del 3%) respecto a los controles elaborados con una sola levadura, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Sin embargo, el contenido de manosa procedente de polisacáridos de la pared celular incrementó significativamente, un 31% en los cavas elaborados con las mezclas de levaduras respecto a los elaborados con una sola levadura, (**Figs. V.20 y V.21**). En cualquier caso, no se apreció correlación entre la cantidad de polisacáridos o de manano de los cavas con los parámetros de espuma (HM, HS o TS). Otros autores han descrito mejora de las propiedades de la espuma con el incremento en polisacáridos (Andrés-Lacueva et al., 1997; Andrés-Lacueva et al., 1996;

Girbau-Sola et al., 2002a; López-Barajas et al., 2001; López-Barajas et al., 1997; Moreno-Arribas et al., 2000), o mejora de la espuma debida al incremento de manoproteínas (manano) liberadas durante la autólisis (Abdallah et al., 2010; Coelho et al., 2011a; Nunez et al., 2005; Núñez et al., 2006).

A diferencia de lo ocurrido con los polisacáridos, la cantidad de proteínas de los cavas aumentó significativamente de forma generalizada respecto el vino base, una media del 16% a los 60 días y 70% a los 270 días (**Fig. V.20**). Esto es contrario a lo descrito previamente (Moreno-Arribas and Polo, 2009), con una caída constante del contenido proteico de los vinos espumosos respecto el vino base de partida debido a que las proteínas son hidrolizadas a compuestos de menor peso molecular durante la fermentación. También aumentó la cantidad de proteínas en los cavas elaborados con mezclas de levaduras (efecto killer) respecto los controles de una sola levadura (media del 2%, **Figs. V.20 y V.21**), aunque esta diferencia no resultó estadísticamente significativa. Como ocurriera con la cantidad de polisacáridos, tampoco se apreció correlación entre la cantidad de proteínas de los cavas con los parámetros de espuma (HM, HS o TS), al contrario de lo descrito previamente (Moreno-Arribas et al., 2000). Aunque otros autores, en consonancia con nuestros resultados, también han descrito que las diferencias en la concentración de proteínas no explica las diferencias en las propiedades espumantes de los vinos espumosos (Girbau-Sola et al., 2002a; Marchal et al., 2001).

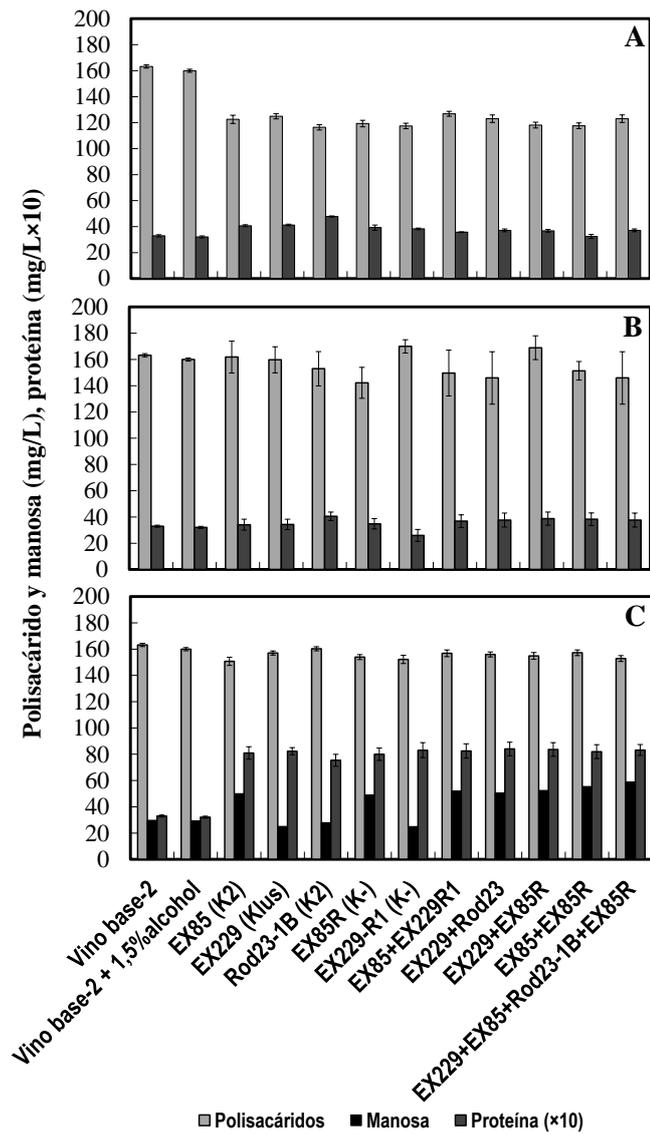


Figura V.20. Evolución de la concentración de polisacáridos, manosa (sólo a los 9 meses) y proteínas totales respecto al vino base-2 a los 60 (A), 180 (B) y 270 (C) días de los cavas elaborados con levaduras *Saccharomyces* killer, no-killer o mezclas de ambas.

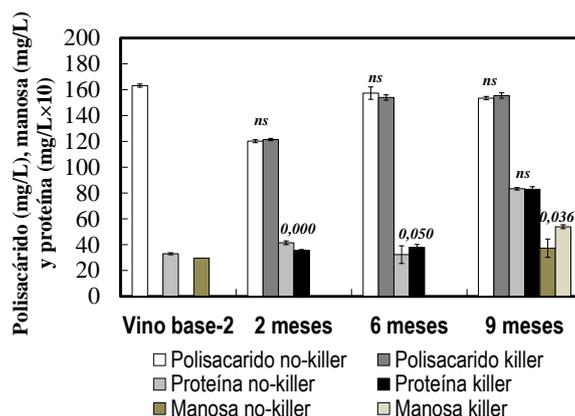


Figura V.21. Evolución de la concentración media de polisacáridos y proteínas durante la segunda fermentación, y manosa (sólo a los 9 meses) de los cavas inoculados con una levadura *Saccharomyces* (no existe efecto killer), o mezclas de *Saccharomyces*+*Saccharomyces* (si existe efecto killer). En la parte superior se muestra el nivel de significación (p) correspondiente al análisis de la varianza.

V.2.4.6. Análisis de compuestos aromáticos.

Considerando todos los cavas de *Saccharomyces* en conjunto y agrupando las cantidades de los distintos compuestos aromáticos por familias (Σ ésteres etílicos, Σ ésteres de acetato, Σ ácidos orgánicos, Σ alcoholes, Σ monoterpenos, Σ furanos+fenoles volátiles, Σ lactonas, Σ norisoprenoides, Σ compuestos carbonílicos y Σ otros), se apreció un aumento en Σ ácidos (4,26%), Σ monoterpenos (100%), Σ norisoprenoides (100%), Σ compuestos carbonílicos (100%) y Σ otros (100%) respecto el vino base-2.

El resto de familias de compuestos disminuyó una media del 63% en Σ ésteres etílicos (con la destacada excepción del succinato de dietilo que incrementó un 80% respecto a vino base), 95,6% en Σ ésteres de acetato, 62% en Σ alcoholes, 89% en Σ furanos y fenoles volátiles y 64% en Σ lactonas (**Fig. V.22**). La desaparición de ésteres etílicos en el cava podría deberse a un proceso de detoxificación de las levaduras, se ha descrito que los ésteres de ácidos grasos de cadena larga (C_8 - C_{14}) son tóxicos para la levadura, con una fuerte actividad antimicrobiana, que además se intensifica si son insaturados, los ésteres de cadena corta (C_2 - C_6) podrían ser producidos a través del mismo proceso de detoxificación (Bardi et al., 1998). La desaparición de los ésteres de acetato en relación con la crianza y la pérdida de aromas a fruta fresca en el cava respecto al vino base ya ha sido descrita previamente junto con el incremento de succinato de dietilo (Torrens et al., 2010), responsable de aroma de sobre-madurez frutal (Zea et al., 2007) formado durante el envejecimiento del cava en contacto con las

lías de la segunda fermentación (Bosch-Fusté et al., 2007), y el incremento de furfural, responsable de aroma a caramelo, tostado o fruta seca (Torrens et al., 2010).

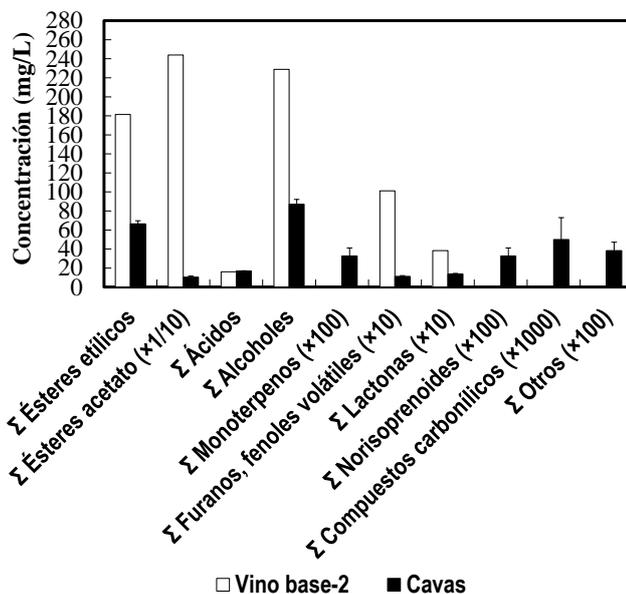


Figura V.22. Sumatorios de los distintos compuestos aromáticos agrupados por familias (Σ ésteres etílicos, Σ ésteres de acetato, Σ ácidos orgánicos, Σ alcoholes, Σ monoterpenos, Σ furanos+fenoles volátiles, Σ lactonas, Σ norisoprenoides, Σ compuestos carbonílicos y Σ otros) en el vino base-2 y los cavas inoculados con *Saccharomyces* y mezclas de *Saccharomyces*.

No se apreció correlación entre los sumatorios de las distintas familias de compuestos con los parámetros de espuma (HM, HS o TS). Tampoco se observó correlación de HM y HS con ningún compuesto analizado. No obstante, se apreció correlación negativa (-0,647, $p < 0,05$) del tiempo de permanencia de la espuma (TS) con la cantidad de ácido octanóico, y positiva (0,733 ppm, $p < 0,05$) con la cantidad del éster etílico del mismo ácido, octanoato de etilo. Algo similar ha sido descrito previamente pero con la altura máxima de la espuma (HM), en lugar de con el TS, que fue negativa con ácidos grasos C_8 , C_{10} y C_{12} , y positiva con los ésteres etílicos de los ácidos grasos C_6 , C_8 y C_{10} (Gallart et al., 2002). Adicionalmente, se observó correlación positiva del TS con 2-metilbutanoato de etilo (0,707, $p < 0,05$), gamma-butirolactona (0,729, $p < 0,05$) y 4-hidroxibutanoato de etilo (0,756, $p < 0,05$), y negativa con succinato de dietilo (-0,728, $p < 0,05$) y malato de dietilo (-0,693, $p < 0,05$).

No se apreció diferencia estadísticamente significativa en los sumatorios de los distintos compuestos de cada familia en relación con la existencia de fenotipo killer. Sin embargo, se encontró diferencia significativa para distintos compuestos en relación con el incremento de células destrozadas como consecuencia del efecto killer (Fig. V.23):

aumentó la cantidad de 2-metilbutanoato de etilo, octanoato de etilo, gamma-butirolactona y 4-hidroxibutanoato de etilo (que ya correlacionaron positivamente con la estabilidad de la espuma) y disminuyó la cantidad de succinato de dietilo, malato de dietilo y ácido octanoico (que ya correlacionaron negativamente con la estabilidad de la espuma). Esto podría explicar, junto con el incremento significativo de la cantidad de manosa y el no-significativo de la cantidad de polisacáridos y proteínas, la mejora de los parámetros de la espuma observada en los cavas elaborados con mezclas de levaduras (efecto killer) respecto a los elaborados con una única levadura (**Fig. V.21**).

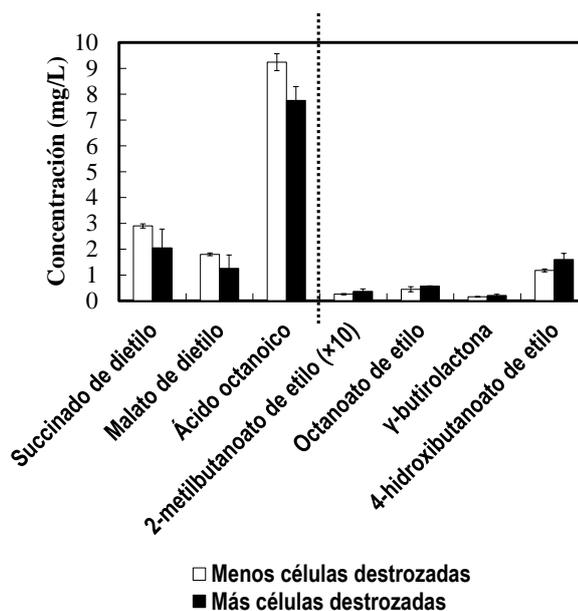


Figura V.23. Compuestos aromáticos estadísticamente significativos encontrados en menor o mayor cantidad en los cavas con más células destrozadas respecto a los cavas con menor o sin efecto killer (menos células destrozadas). Más células destrozadas, >3%. Menos células destrozadas, <2,5%.

Agrupando el vino base y los cavas en tres categorías según su capacidad para generar espuma (baja en los cavas EX229, EX85, EX85R, EX229-R1, EX85+EX85R, EX85+EX229-R1 y EX229+EX85R; media en el vino base-2; y alta en los cavas EX229+Rod23-1B y EX229+EX85+Rod23-1B+EX85R), se observó diferencia significativa en 38 compuestos de los 75 analizados. En la mayoría de los casos, la cantidad de estos compuestos fue mayor en el vino base (con media espuma), probablemente debido a la mayor complejidad de su matriz aromática, que disminuyó en los cavas (**Fig. V.24**). Solamente la cantidad de siete compuestos fue mayor en los cavas que en el vino base, pero solo la cantidad de uno de ellos, octanoato de etilo, fue mayor en los cavas con más espuma y más efecto killer (células destrozadas) que en los cavas con menos espuma y menos efecto killer, y a la vez mantuvo una concentración

intermedia en el vino base con una cantidad media de espuma y una composición muy distinta a la de los cavas (Fig. V.24). Este dato confirma el papel real del octanoato de etilo en la estabilidad de la espuma de estos cavas y descarta que las diferencias encontradas sean mera coincidencia casuística, como podría argumentarse para los seis compuestos restantes que se encontraron en muy poca cantidad en el vino base, que a su vez produjo más espuma y más estable (HS y TS) que varios cavas con mayor cantidad de estos compuestos, independientemente de la existencia de efecto killer.

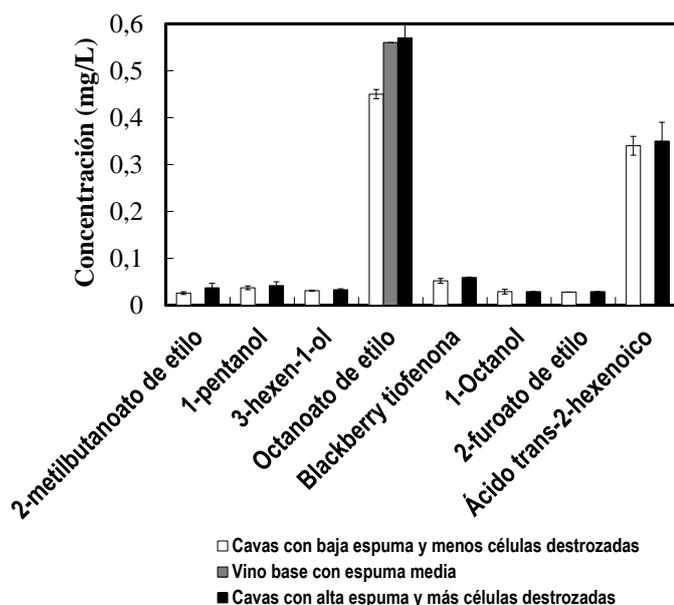


Figura V.24. Compuestos aromáticos estadísticamente significativos más abundantes en los cavas con alta espuma (HS y TS) y más células destrozadas respecto a los cavas con baja espuma y menos células destrozadas o sin efecto killer.

Por otro lado, la cantidad de polisacáridos fue ligeramente mayor en los cavas con poca espuma respecto a los de mucha espuma, lo que pone una vez más de manifiesto su poca contribución a la cantidad de la espuma del cava, quizás lo contrario. La cantidad de proteínas fue ligeramente mayor en los cavas con mucha espuma respecto a los de poca espuma, pero fue aún menor en el vino base con una cantidad media de espuma (Figs. V.17, V.20 y V.21). Esto indica que las proteínas podrían ser responsables de la cantidad de la espuma del cava solo en determinadas condiciones de composición bioquímica del vino. Es decir, podríamos seleccionar determinados vinos (en nuestro caso excluir el vino base de partida) y demostrar la existencia de una correlación positiva entre concentración de proteínas y calidad de la espuma, atribuir a las proteínas un papel fundamental en la calidad de la espuma del cava, pero no

necesariamente ser capaz de mejorar la espuma del cava simplemente incrementando la concentración de proteínas.

V.2.4.7. Análisis de la calidad organoléptica de los cavas.

Se observó diferencia significativa en la calidad organoléptica (sin considerar la espuma) de los vinos en relación con el efecto killer (74% de aceptación en cavas con killer vs 65% en no-killer, $p < 0,05$). Los dos vinos mejor evaluados, elaborados con las mezclas de levaduras killer y sensibles EX229+Rod23-1B y EX229+EX85+Rod23-1B+EX85R (**Tabla V.5**), fueron curiosamente los vinos con más cantidad espuma y de levaduras destrozadas durante el tiraje (**Fig. V.18**). Aparte de esto, la calidad organoléptica no correlacionó con la cantidad de las distintas familias de compuestos aromáticos (datos no mostrados).

Tabla V.5. Parámetros analíticos y análisis organoléptico de los cavas elaborados con inóculos mixtos de levaduras killer, no-killer o mezclas de ambas en botella a alta presión.

Levadura	Etanol (%, v/v)	Az. reductores (g/L)	Acidez volátil (g/L)	Acidez total (g/L)	pH	Masa volúmica (g/L)	Extracto seco (g/L)	Aceptación (%)
EX229	11,35	1,6	0,31	5,1	3,17	0,9887	14,5	65
EX85	11,31	1,5	0,25	5,3	3,14	0,9885	13,7	65
EX85R	11,35	1,4	0,24	5,3	3,18	0,9884	13,7	65
EX229-R1	11,32	1,4	0,29	5,2	3,16	0,9884	13,7	65
EX85+EX85R	11,35	1,4	0,25	5,3	3,17	0,9885	13,9	75
EX85+EX229-R1	11,29	1,3	0,28	5,2	3,2	0,9885	13,7	65
EX229+Rod23-1B	11,29	1,4	0,26	5,3	3,15	0,9884	13,4	85
EX229+EX85R	11,27	1,4	0,27	5,4	3,17	0,9885	13,7	65
EX229+EX85+Rod23-1B+EX85R	11,79	1,5	0,25	6,2	2,96	0,9875	12,6	80

En resumen, el efecto killer incrementó la cantidad y estabilidad de la espuma en los cavas mejorando su calidad organoléptica. Precisamente los dos cavas mejor evaluados mostraron más cantidad de células destrozadas durante el primer mes de tiraje y mayor cantidad de espuma que el resto de vinos. No se apreció correlación evidente entre los parámetros de la espuma con la cantidad de proteínas, polisacáridos o manosa procedente de polisacáridos hidrolizados. Aunque varios compuestos correlacionaron positiva o negativamente con la espuma, solo el octanoato de etilo parece estar realmente implicado en su estabilidad (TS).

V.2.5. Elaboración de cava con inóculos mixtos de levaduras *Saccharomyces killer/no-killer* en botella a alta presión con distintas concentraciones de fosfato di-amónico.

En base a la eficacia de las distintas levaduras para realizar la segunda fermentación en botella (**Apartado V.2.4**), se realizó una segunda selección de las levaduras *S. cerevisiae* (o sus mezclas) más eficaces y se descartaron todas las levaduras *T. delbrueckii* por su ineficacia. Se seleccionaron las mezclas de EX229 con Rod23-1B y EX85R por su cinética de fermentación y la rápida imposición de EX229. Además introdujimos una nueva mezcla de dos *Saccharomyces killer* (EX229+EX85) para probar la eficacia de un posible doble efecto killer en botella con presión (**Tabla V.6**). Con estas levaduras se realizó un nuevo tiraje en botella para analizar la influencia de la concentración de fosfato di-amónico (DAP, fuente de nitrógeno para las levaduras durante la segunda fermentación) sobre el efecto killer y la posible mejora en la calidad organoléptica y los parámetros de la espuma del cava. En total se realizaron 14 tirajes con levaduras más 2 tirajes sin inocular, 4 controles con una levadura killer o no-killer, 3 mezclas de levaduras killer+no-killer o dos killer de distinto tipo con alta concentración (0,02%, tirajes 1-7) o baja concentración (0,001%, tirajes 8-14) de DAP (**Tabla V.6**). Se utilizó el vino base-3, variedad Macabeo procedente de Bodegas López-Morena (**Tabla II.6**) y se pusieron las botellas en rimas a 12°C, temperatura habitual en las cavas comerciales.

Tabla V.6. Levaduras y mezclas de levaduras inoculadas en los tirajes realizados en botella con alta o baja concentración de DAP.

Tiraje	Concentración DAP (%)	Levadura (<i>Sc</i>)	Fenotipo
1	0,02	EX85 (<i>Sc</i>)	K2, CYH ^S
2	0,02	EX85R (<i>Sc</i>)	K, CYH ^R
3	0,02	EX229 (<i>Sc</i>)	Klus, CYH ^S
4	0,02	Rod23-1B (<i>Sc</i>)	K2, ROD ^{PC} , CYH ^R
5	0,02	EX229 + Rod23-1B (<i>Sc+Sc</i>)	Klus, CYH ^S + K2, ROD ^{PC} , CYH ^R
6	0,02	EX85R + EX229 (<i>Sc+Sc</i>)	K, CYH ^R + Klus, CYH ^S
7	0,02	EX85 + EX229 (<i>Sc+Sc</i>)	K2, CYH ^S + Klus, CYH ^S
8	0,001	EX85 (<i>Sc</i>)	K2, CYH ^S
9	0,001	EX85R (<i>Sc</i>)	K, CYH ^R
10	0,001	EX229 (<i>Sc</i>)	Klus, CYH ^S
11	0,001	Rod23-1B (<i>Sc</i>)	K2, ROD ^{PC} , CYH ^R
12	0,001	EX229 + Rod23-1B (<i>Sc+Sc</i>)	Klus, CYH ^S + K2, ROD ^{PC} , CYH ^R
13	0,001	EX85R + EX229 (<i>Sc+Sc</i>)	K, CYH ^R + Klus, CYH ^S
14	0,001	EX85 + EX229 (<i>Sc+Sc</i>)	K2, CYH ^S + Klus, CYH ^S

Abreviaturas: *Sc*, *Saccharomyces cerevisiae*; K, levadura no-killer; K2, levadura killer K2; Klus, levadura killer Klus; CYH^R, resistente a cicloheximida; CYH^S, sensible a cicloheximida; ROD^{PC}, levaduras color rosa claro en presencia de rodamina-6G y resistentes a cicloheximida.

V.2.5.1. Eficacia fermentativa de las levaduras.

Todas las fermentaciones con alta concentración de DAP terminaron antes de 30 días, excepto la inoculada con Rod23-1B, que aún tenían 0,50 g/L de azúcar y que acabaron posteriormente antes del día 60 (**Fig. V.25A**). Las cinéticas de las fermentaciones con baja concentración de DAP fueron algo más lentas en conjunto, aún quedaba algo de azúcar (0,48-0,89 g/L) en la mayoría de los tirajes a los 30 días, aunque todas terminaron también antes de 60 días (**Fig. V.25B**). Una vez más, la cinética del cava de Rod23-1B fue la más lenta, aunque con poca diferencia con el resto. No se apreciaron diferencias importantes en la evolución de la presión con poco o mucho DAP, en la mayoría de los casos se alcanzó la presión máxima en torno a 6 atm a los 30 días, con la excepción de Rod23-1B que fue ligeramente más lenta en ambas series llegando al máximo de presión a los 60 días (**Figs. V.25C y D**). Ningún control sin inocular realizó la segunda fermentación como ya ocurriera en el tiraje anterior (datos no mostrados).

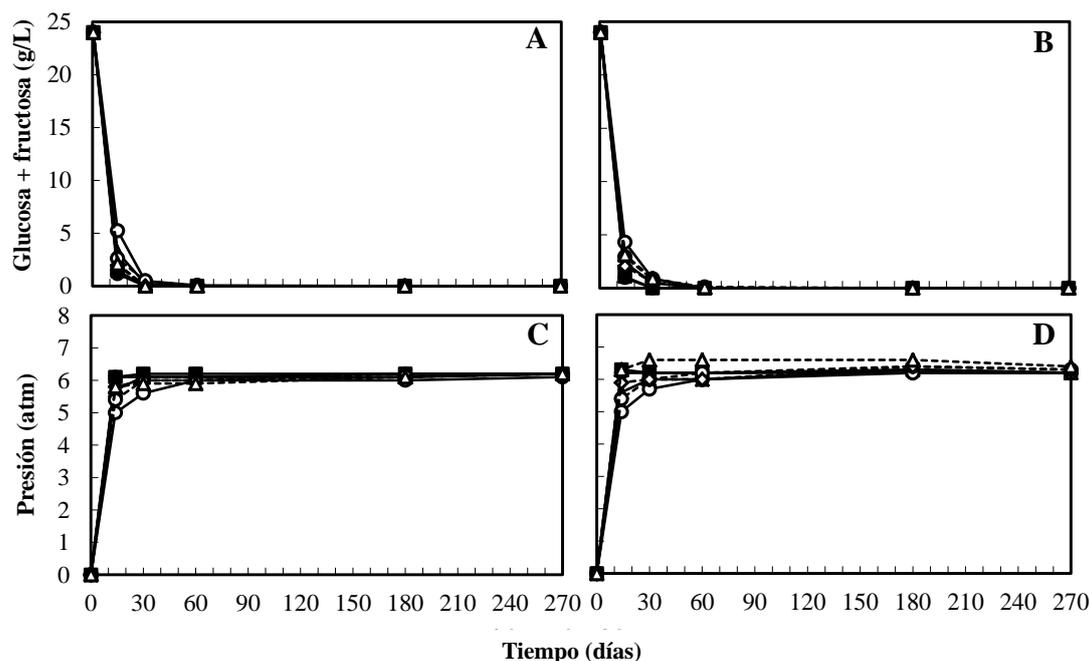


Figura V.25. Evolución del consumo de glucosa+fructosa (A y B) y presión (C y D) en función del tiempo de los tirajes realizados en botella con mezclas de *S. cerevisiae* y sus correspondientes controles inoculados con cada levadura por separado en presencia de mucho (0,02%) DAP (A y C) o poco (0,001%) DAP (B y D). Símbolos: EX85 (—●—), EX85R (—■—), EX229 (—▲—), Rod23-1B (—○—), EX229+ Rod23-1B (—○—), EX229+ EX85R (—◇—) y EX229+EX85 (—△—).

V.2.5.2. Evolución de la viabilidad celular de las levaduras.

La población de levaduras aumentó aproximadamente un orden de magnitud durante los primeros 15 días con mucho o poco DAP. Algunas levaduras murieron más

rápido con poco DAP, como EX85 y Rod23-1B (**Fig. V.26B**), ya no había viables de ninguna de las levaduras a los 6 meses, mientras que con mucho DAP aún quedaban viables en la fermentación EX229+EX85 (**Fig. V.26A**). En general, al igual que ocurrió en los experimentos en botella del apartado anterior, las levaduras murieron antes en estos tirajes que en los realizados en tubos a baja presión. Las células de EX85, EX85R y Rod23-1B murieron antes que las demás a partir del día 30, especialmente en las fermentaciones con poco DAP, donde ya no había células viables de EX85 ni de Rod23-1B a los 60 días, aunque la segunda fermentación concluyera correctamente (**Fig. V.26B**). La cantidad de yemas fue mayor con mucho DAP durante los primeros 30 días de fermentación y disminuyó en todos los casos a medida que el cultivo envejeció por falta de nutrientes (**Figs. V.26C y D**). La presión se mantuvo cercana a 0 atm en los controles sin inocular durante toda la fermentación, similar a lo ocurrido en el tiraje anterior (datos no mostrados).

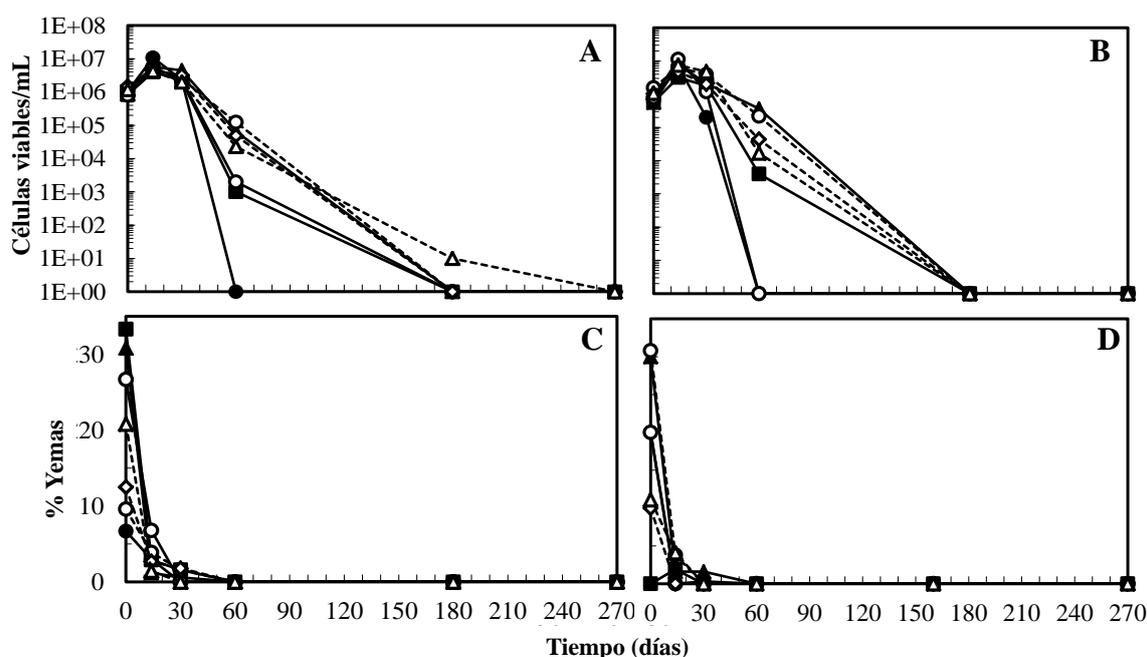


Figura V.26. Evolución de la viabilidad (A y B) y porcentaje de yemas (C y D) en función del tiempo de los tirajes realizados en botella con mezclas de *S. cerevisiae* y sus correspondientes controles inoculados con cada levadura por separado en presencia de mucho (0,02%) DAP (A y C) o poco (0,001%) DAP (B y D). Símbolos: EX85 (—●—), EX85R (—■—), EX229 (—▲—), Rod23-1B (—○—), EX229+ Rod23-1B (--○--), EX229+ EX85R (--◇--) y EX229+EX85 (--Δ--).

V.2.5.3. Desplazamiento de las levaduras sensibles por las levaduras killer y evolución de la muerte celular.

El desplazamiento de la levadura sensible por la killer fue casi total en las fermentaciones con mucho DAP (**Fig. V.27A**), y mucho menor en las de poco DAP

(**Fig. V.27B**), quizás porque las levaduras crecieron más con mucho DAP durante los primeros días (más células viables y yemas, **Fig. V.26C**) siendo así más susceptibles a las toxinas killer en las zonas de crecimiento de la pared celular (revisado por (Magliani et al., 1997)). La levadura EX229 dominó siempre en la mezcla EX229+Rod23-1B (ambas killer), probablemente debido al menor vigor fermentativo de Rod23-1B. También dominó siempre la levadura EX229 en la mezcla EX229+EX85 (ambas killer), probablemente debido a la baja tasa de viabilidad que EX85 tuvo en estas condiciones, mientras que en el test en placa (20°C, pH 4-3,2) se mataron mutuamente de forma débil (**Figs. V.2 y V.5**). Al contrario de lo observado en el experimento anterior (vino base-2) a 18-12°C con mucho DAP, no se observó correspondencia entre el desplazamiento de las levaduras sensibles en las mezclas de levaduras y el incremento de la cantidad de células destrozadas en ningún caso (datos no mostrados), quizás porque a 12°C el efecto killer de las toxinas fue menos completo, más lento, o más microbiostático que microbicida.

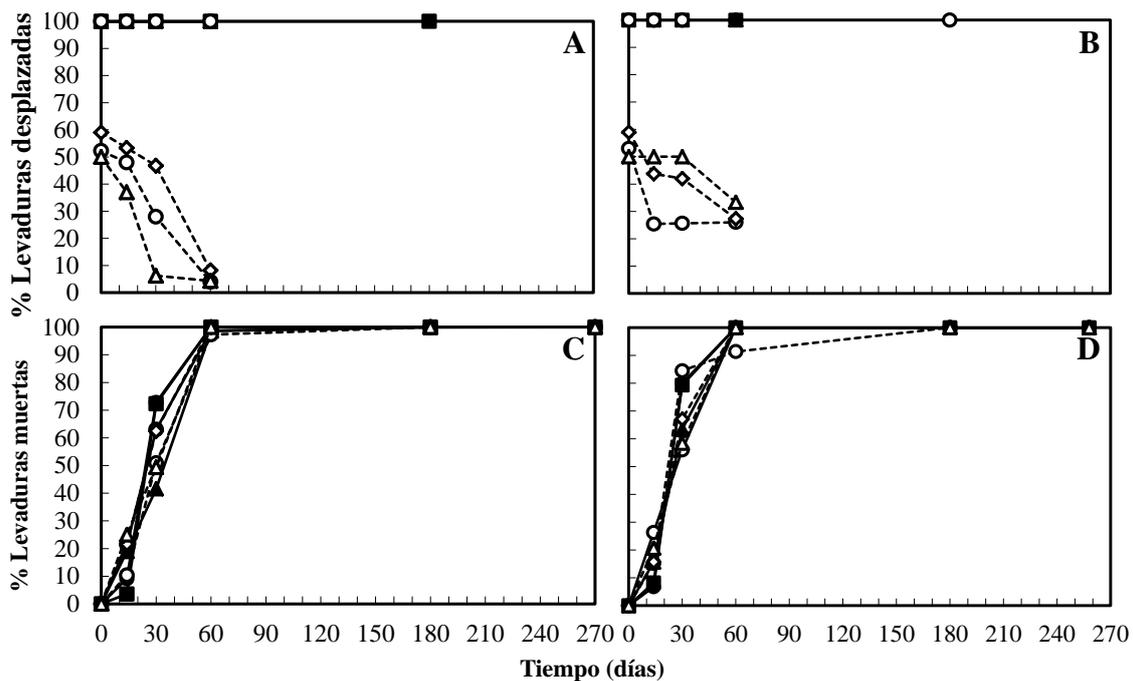


Figura V.27. Evolución del porcentaje de cada levadura inoculada, de la levadura desplazada en las mezclas de dos levaduras (killer+no-killer o killer+killer) (A y B) y de levaduras muertas totales (C y D) en función del tiempo de los tirajes realizados en botella con mezclas de *S. cerevisiae* y con cada levadura por separado en presencia de mucho (0,02%) DAP (A y C) o poco (0,001%) DAP (B y D). El porcentaje de cada levadura inoculada y de la levadura desplazada en las fermentaciones inoculadas con mezclas de levaduras se calculó analizando distintos marcadores genéticos en las colonias aisladas de cada muestra: CYH^R (resistencia a cicloheximida) para EX85R; ROD^{PC} (levadura color rosa claro en presencia de rodamina-6B) para Rod23-1B; CYH^S (sensibilidad a cicloheximida), fenotipo killer y/o perfil de restricción del mtDNA (RFLPs) para EX229 y EX85. Símbolos: EX85 (—●—), EX85R (—■—), EX229 (—▲—), Rod23-1B (—○—), EX229+Rod23-1B[†] (—○—), EX229+EX85R[†] (—◇—) y EX229+EX85[†] (—△—). El símbolo (†) indica la levadura que resultó desplazada en cada mezcla de dos levaduras y cuyo porcentaje se representa en la correspondiente gráfica.

En síntesis, la cinética de fermentación fue ligeramente más rápida cuando se aportó más cantidad de DAP durante el tiraje, aunque la presión evolucionó de forma muy similar con mucho o poco DAP. El efecto killer entre las poblaciones de levaduras fue más rápido y eficaz con el aporte extra de nitrógeno, aunque en ningún caso se apreció correspondencia del efecto killer con un incremento de la cantidad de células destrozadas.

V.2.5.4. Análisis de la espuma del cava.

En general, como en el experimento anterior a 18-12°C, los parámetros de la espuma no mejoraron en la mayoría de los cavas respecto al vino base-3, de acuerdo con lo descrito previamente (Cilindre et al., 2010; Girbau-Sola et al., 2002b; Maujean et al.,

1990a). Tampoco mejoró de forma generalizada la espuma en los cavas con efecto killer, elaborados con mezclas de levaduras, respecto a los cavas sin efecto killer, elaborados con cada levadura por separado. La única excepción fue la mejora marginalmente significativa ($p=0,154$) del TS del cava EX229+Rod23-1B elaborado con mucho DAP respecto el vino base (52%) y a los dos cavas elaborados con cada levadura por separado (media de 65,8%), lo que coincide con el experimento de 18-12°C. Sin embargo, la adicción extra de DAP mejoró la espuma del cava una media del 8% para HM, 14% HS y 50% TS respecto los mismos cavas con poco DAP, con diferencias estadísticamente significativas para HS y TS ($19,35\pm 0,64$ HS poco DAP, $22,89\pm 0,84$ HS con mucho DAP, $p=0,001$; $233,71\pm 50,46$ TS poco DAP, $461,76\pm 75,63$ TS con mucho DAP, $p=0,011$) (**Fig. V.28**).

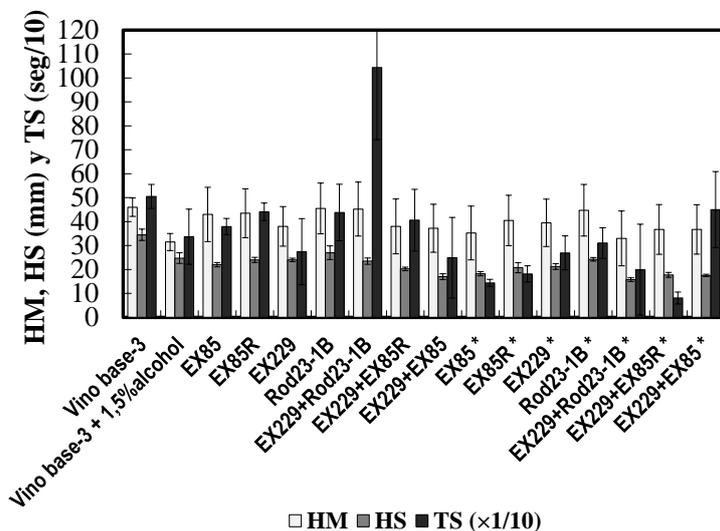


Figura V.28. Parámetros de espuma de los cavas elaborados con levaduras *Saccharomyces* killer, no-killer y mezclas de las mismas en presencia de mucho (0,02%) o poco (0,001%, * en la figura) DAP respecto al vino base-3 a los 9 meses de crianza. HM, altura máxima de la espuma; HS, altura de la espuma estabilizada; TS, tiempo de mantenimiento de la espuma.

V.2.5.5. Evolución del contenido en polisacáridos y proteínas.

En general, la cantidad de polisacáridos en las fermentaciones con mucho DAP, disminuyó progresivamente respecto el vino base un 1%, 13% y 18% a los 30, 180 y 270 días respectivamente. Sin embargo, con poco DAP disminuyó un 4% a los 30 días, aumentó un 13% a los 180 días y volvió a disminuir un 23% a los 270 días respecto el vino base (**Fig. V.29**). Al contrario de lo ocurrido en el tiraje del vino base-2 (**Apartado V.2.4**) a 18-12°C, aunque los polisacáridos del vino base fueron degradados durante el crecimiento inicial de las levaduras en ambos casos, esta vez no fueron repuestos posteriormente por la lisis de sus paredes celulares. También al contrario de lo ocurrido

en el tiraje anterior a 18-12°C, la cantidad de manosa disminuyó a los 270 días respecto el vino base (27,7% de media con poco y mucho DAP, 53,6% con poco DAP y 1,7% con mucho DAP), aunque la cantidad de glucosa incrementó 4 veces (datos no mostrados), similar al incremento de 3-4 veces descrito previamente durante el envejecimiento de los vinos espumosos en contacto con las lías (Caridi, 2006; Moreno-Arribas and Polo, 2009). Quizás en esta ocasión, dada la mayor cantidad de manosa en vino base-3 (53,9 mg/L) respecto al vino base-2 (29,7 mg/L), resulte más difícil apreciar la cantidad de manosa que se repone por la lisis de las paredes de las levaduras destrozadas que, además, en este caso fueron menos frecuentes que en los tirajes del vino base-2. La cantidad de polisacáridos y manosa disminuyó en la mayoría de los cavas elaborados con mezclas de levaduras respecto a los de una sola levadura, aunque las diferencias no fueron significativas. No obstante, en general, la adicción de DAP extra incrementó significativamente la cantidad de polisacáridos y de manosa respecto al cava elaborado con poco DAP (125,54±3,93 mg/L polisacáridos con poco DAP y 134,79±1,34 mg/L con mucho DAP, $p<0,05$; 25,02±1,29 mg/L manosa con poco DAP y 52,97±1,25 mg/L con mucho DAP, $p<0,001$) (**Fig. V.29 y V.30**). A pesar de todo esto y una vez más, no se apreció correlación entre la cantidad de polisacáridos o de manosa del cava con los parámetros de espuma (HM, HS o TS).

A diferencia de lo ocurrido con la cantidad de polisacáridos, la cantidad de proteínas disminuyó significativamente respecto el vino base-3 inicial tanto para los cavas con poco DAP (21% a los 30 y 4,35% a 180 días) y o mucho DAP (29% y 14% respectivamente), pero aumentó significativamente a los 9 meses tanto con poco DAP (25% de media) como con mucho DAP (20% de media) (**Fig. V.29**). Es decir, las proteínas del vino base también fueron degradadas durante el crecimiento inicial de las levaduras pero posteriormente repuestas con creces por la muerte y lisis de las levaduras, como ocurriera con los polisacáridos en el tiraje de 18-12°C (**Figs. V.20 y V.21**). La cantidad de proteínas también aumentó en los cavas elaborados con mezclas respecto los de una levadura, tanto con mucho (5%) como con poco (6%) DAP, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. En general, la adicción extra de DAP disminuyó la cantidad de proteínas del cava aunque la diferencia no fue significativa (12,93±0,24 mg/L con poco DAP, 12,24±0,45 mg/L con mucho DAP, **Fig. V.29 y V.30**); probablemente debido a que hubo más crecimiento celular con más consumo de proteínas al principio de la segunda fermentación y menos autólisis celular de unas células que mantuvieron mejor la viabilidad al final de crianza con mucho DAP

(Fig. V.26). Una vez más, tampoco se apreció correlación entre la cantidad de proteínas en los cavas con los parámetros de espuma (HM, HS o TS).

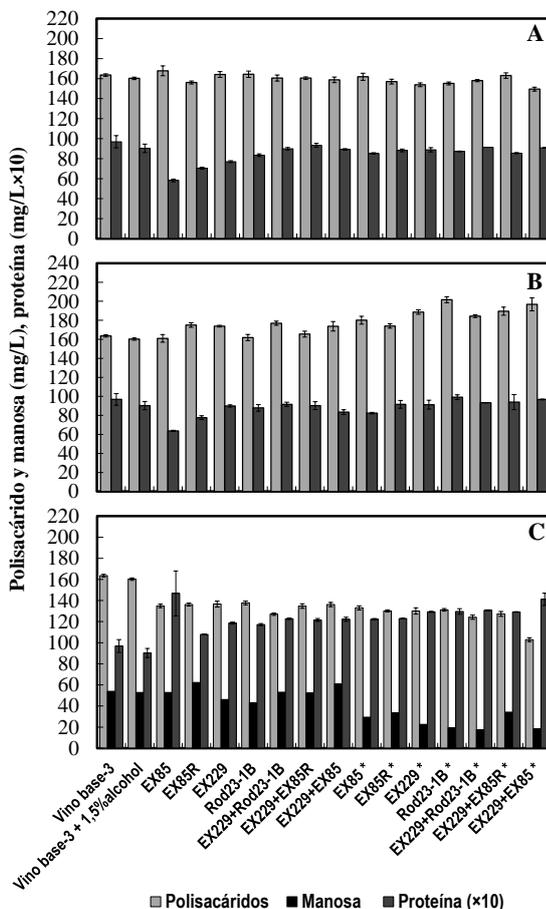


Figura V.29. Evolución de la concentración de polisacáridos, manosa (sólo 9 meses) y proteínas totales al mes (A), 6 meses (B) y 9 (C) meses de los cavas elaborados con vino base-3 y levaduras *Saccharomyces* killer, no-killer, o mezclas de las mismas en presencia de alta (0,02%) o baja (0,001%, * en la figura) concentración de DAP.

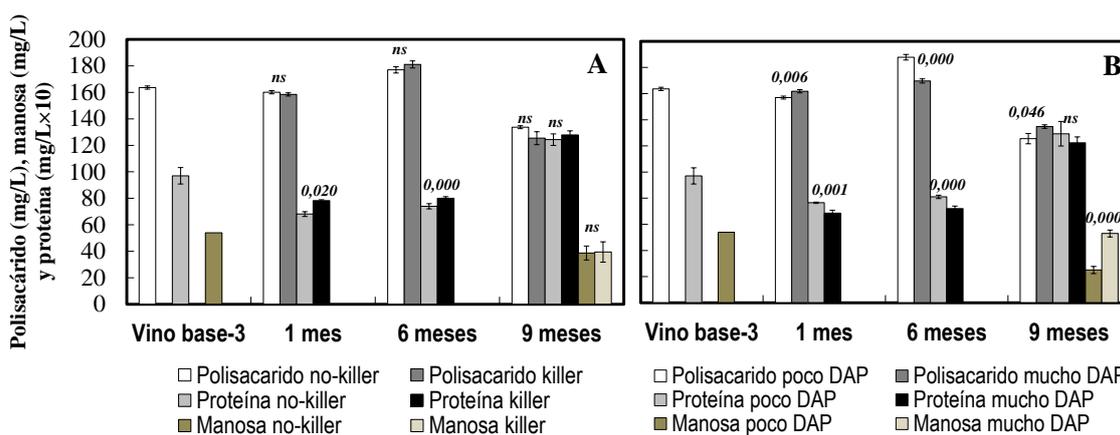


Figura V.30. Evolución de la concentración media de polisacáridos y proteínas durante la segunda fermentación, y manosa (sólo a los 9 meses) de los cavas inoculados con una levadura *Saccharomyces* (no existe efecto killer), o mezclas de *Saccharomyces*+*Saccharomyces* (si existe efecto killer) (A) y, de los cavas inoculados con levaduras *Saccharomyces* killer, no-killer, o mezclas de las mismas en presencia de alta (0,02%) o baja (0,001%) concentración de DAP (B). En la parte superior se muestra el nivel de significación (p) correspondiente al análisis de la varianza.

V.2.5.6. Análisis de compuestos aromáticos.

Considerando todos los cavas en conjunto, con poco y mucho DAP, y agrupando los compuestos aromáticos por familias, se apreció un incremento Σ ésteres etílicos (26%), Σ ésteres de acetato (6,7%), Σ monoterpénos (100%), Σ furanos+fenoles volátiles (62,5%), Σ lactonas (9,4%), y Σ otros (44%) respecto al vino base-3. El comportamiento de Σ ésteres etílicos, Σ ésteres de acetato y Σ lactonas fue inverso al observado en el experimento de vino base-2, probablemente debido a que el vino base-3 tenía muy poca cantidad de estos compuestos (**Tabla II.6**) que pudieron incrementar más fácilmente con el metabolismo de las levaduras durante la segunda fermentación. El resto de familias de compuestos disminuyó una media de 10% Σ alcoholes, 13% Σ ácidos orgánicos, y 21% Σ compuestos carbonílicos. El comportamiento de Σ compuestos carbonílicos también fue inverso al observado en el anterior experimento con vino base-2. La acetoína (o 3-hidroxiбутanona, único compuesto englobado en este sumatorio) tiene bajo impacto olfativo en la matriz aromática del vino espumoso (Torrens et al., 2010), aunque también se ha descrito que está implicado en el bouquet del vino y es un compuesto clave en la biosíntesis de diacetilo y 2,3-butanodiol (Romano and Suzzi, 1996). Las únicas diferencias entre los cavas elaborados con mucho o poco DAP respecto al vino base inicial fueron: Σ ésteres acetato que

disminuyó (8%) con mucho DAP y aumentó (18%) con poco DAP, Σ alcoholes que disminuyó (23%) con mucho DAP y aumentó (4%) con poco DAP, y Σ norisoprenoides que disminuyó (34%) con mucho DAP mientras que se mantuvo con poco DAP (**Fig. V.31**). Entre los compuestos más importantes para el aroma y a excepción de Σ ésteres etílicos que probablemente subió porque ya había muy poco en el vino base-3, Σ ésteres de acetato bajó (sólo en cavas con mucho DAP), y Σ furanos+fenoles volátiles subió de forma similar a lo observado en los cavas del vino base-2, y tal como se ha descrito previamente (Torrens et al., 2010).

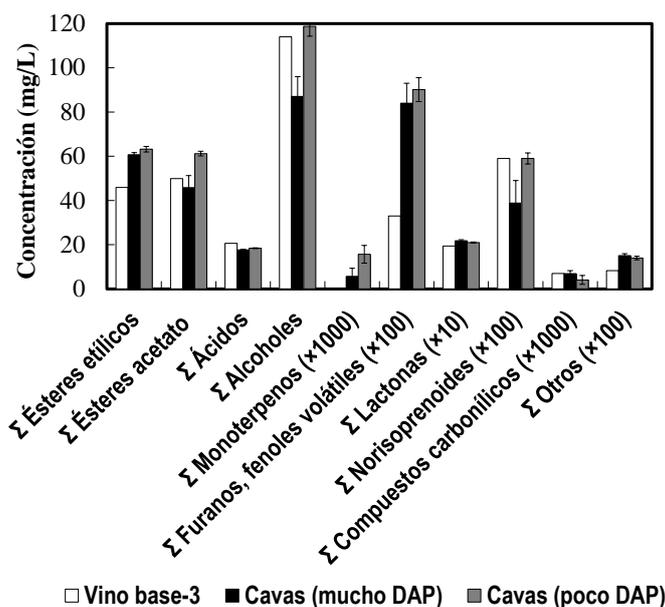


Figura V.31. Sumatorios de los distintos compuestos aromáticos agrupados por familias (Σ ésteres etílicos, Σ ésteres de acetato, Σ ácidos orgánicos, Σ alcoholes, Σ monoterpenos, Σ furanos+fenoles volátiles, Σ lactonas, Σ norisoprenoides, Σ compuestos carbonílicos y Σ otros, en el vino base-3 y los cavas inoculados con *Saccharomyces* y mezclas de *Saccharomyces* en presencia de mucho (0,02%) o poco (0,001%) DAP.

Se apreció correlación significativa negativa de Σ ácidos orgánicos con HM, HS y TS, tal como se ha descrito previamente para HM (Gallart et al., 2002). También hubo correlación significativa negativa de la espuma con 14 compuestos de los 75 analizados: acetato de isobutilo, 3-hidroxibutanoato de etilo, 2-hidroxihexanoato de etilo, lactato de isoamilo, ácido isobutírico, ácido butanoico, ácido isovalérico, 4-hidroxibutanoato de etilo, lactato de 2-feniletilo, ácido hexanoico, 2-hidroxiglutarato de dietilo y ácido 9-decenoico con HM; isoalerato de etilo, ácido isobutírico, 4-hidroxibutanoato de etilo, ácido hexanoico y ácido octanoico con HS; acetato de hexilo, 2-hidroxihexanoato de etilo, ácido isobutírico, 4-hidroxibutanoato de etilo, lactato de 2-feniletilo y ácido octanoico con TS. Sin embargo, sólo hubo correlación positiva para dos compuestos,

etoxi-gamma-butirolactona con HS y TS, y succinato de dietilo con TS. No obstante, al contrario de lo observado en los cavas elaborados con el vino base-2, no se observó la correlación esperada entre octanoato de etilo y TS, o cualquiera de los otros parámetros de espuma; y tampoco hubo diferencias significativas para ningún compuesto o familia de compuestos entre el cava con mejor espuma (EX229+Rod23-1B con mucho DAP) y el resto de vinos o el vino base. Esto ya indica que los datos de correlación para cada compuesto, a pesar de su significación estadística, no constituyen un argumento sólido para explicar las diferencias en la espuma de los cavas elaborados en estas condiciones experimentales.

El efecto killer de las mezclas de levaduras incrementó significativamente la cantidad de Σ ésteres (5%) y Σ ácidos orgánicos (4%), probablemente debido a que el daño de las toxinas killer en las células sensibles de las mezclas de levaduras provocaron la liberación de su metaboloma al medio extracelular.

V.2.5.7. Análisis de la calidad organoléptica de los cavas.

La calidad organoléptica (sin considerar la espuma) incrementó significativamente en los cavas con efecto killer elaborados con las mezclas de levaduras (62,38% no-killer, 74% killer, $p < 0,05$), que resultaron más complejos con sensaciones propias de la crianza (levaduras, pan, tostados) y con matices en boca más agradables que los cavas sin efecto killer. Sin embargo, la adición extra de DAP no mejoró la calidad organoléptica, más bien lo contrario, porque los catadores encontraron un toque a manzana fermentada (sidra), indeseable según su criterio, y ausente en los cavas elaborados con poco DAP; aunque esta diferencia no fue significativa (69,28% aceptación poco DAP, 65,43% mucho DAP, $p = 0,359$) (**Tabla V.7**). El incremento de este descriptor de manzana fermentada (sidra) coincidió con un incremento significativo en la concentración de succinato de dietilo y malato de dietilo, responsables de aromas a fruta sobremadura o fermentada (Zea et al., 2007). Aparte de esto, la calidad organoléptica no correlacionó con la cantidad de las distintas familias de compuestos aromáticos, con la excepción de Σ monoterpenos (0,568, $p < 0,05$); aunque se encontraron incrementos significativos de 24 compuestos en los cavas con poco DAP y de 9 en los cavas con mucho DAP (**Fig. V.32**). Los catadores prefirieron en general los cavas con poco DAP porque encontraron más intensidad a fruta fresca que en los cavas con mucho DAP, lo que puede explicarse por la mayor concentración de tres compuestos en estos cavas respecto a los de mucho DAP: lactato de etilo y octanoato de etilo (probablemente debido a una mayor liberación del metaboloma de las levaduras

que murieron antes en los cavas con poco DAP) y terpineol (compuesto con aromas a flores de origen varietal, libre o asociado a un azúcar (Mendes Ferreira et al., 2001), que podría liberarse por la actividad glucosidasa de las levaduras con poco DAP (**Fig. V.32**).

Tabla V.7. Parámetros analíticos y análisis organoléptico de los cavas elaborados con inóculos mixtos de levaduras killer/no-killer en botella a alta presión con mucho (0,02%) y poco (0,001%) DAP.

Levadura	Etanol (%, v/v)	Az. reductores (g/L)	Acidez volátil (g/L)	Acidez total (g/L)	pH	Masa volúmica (g/L)	Extracto seco (g/L)	Ácido láctico (g/L)	Aceptación (%)
EX85	11,65	1,5	0,28	6,1	3,03	0,9885	14,7	0,47	55
EX85R	11,63	1,6	0,27	6,1	3,04	0,9884	14,7	0,46	64
EX229	11,64	1,6	0,31	6,1	3,05	0,9884	14,5	0,46	67
Rod23-1B	11,65	1,6	0,28	6,2	3,02	0,9886	15,0	0,49	60
EX229+ Rod23-1B	11,61	1,6	0,29	6,2	3,06	0,9886	15,0	0,49	75
EX229+EX85R	11,63	1,5	0,3	6,2	3,04	0,9884	14,5	0,48	70
EX229+EX85	11,67	1,6	0,29	6,0	3,02	0,9886	15,1	0,47	67
EX85*	11,73	1,5	0,27	6,2	2,98	0,9881	13,9	0,47	57
EX85R *	11,77	1,5	0,27	6,2	2,99	0,988	13,9	0,47	65
EX229 *	11,71	1,5	0,29	6,2	3,00	0,9882	14,2	0,46	69
Rod23-1B *	11,77	1,6	0,27	6,2	2,99	0,9881	14,2	0,48	62
EX229+ Rod23-1B*	11,79	1,4	0,29	6,1	3,00	0,9884	15,0	0,47	80
EX229+EX85R *	11,71	1,5	0,28	6,3	2,98	0,9882	14,2	0,48	75
EX229+EX85 *	11,83	1,5	0,29	6,1	2,98	0,9883	15,0	0,49	77

*, poco DAP (0,001%).

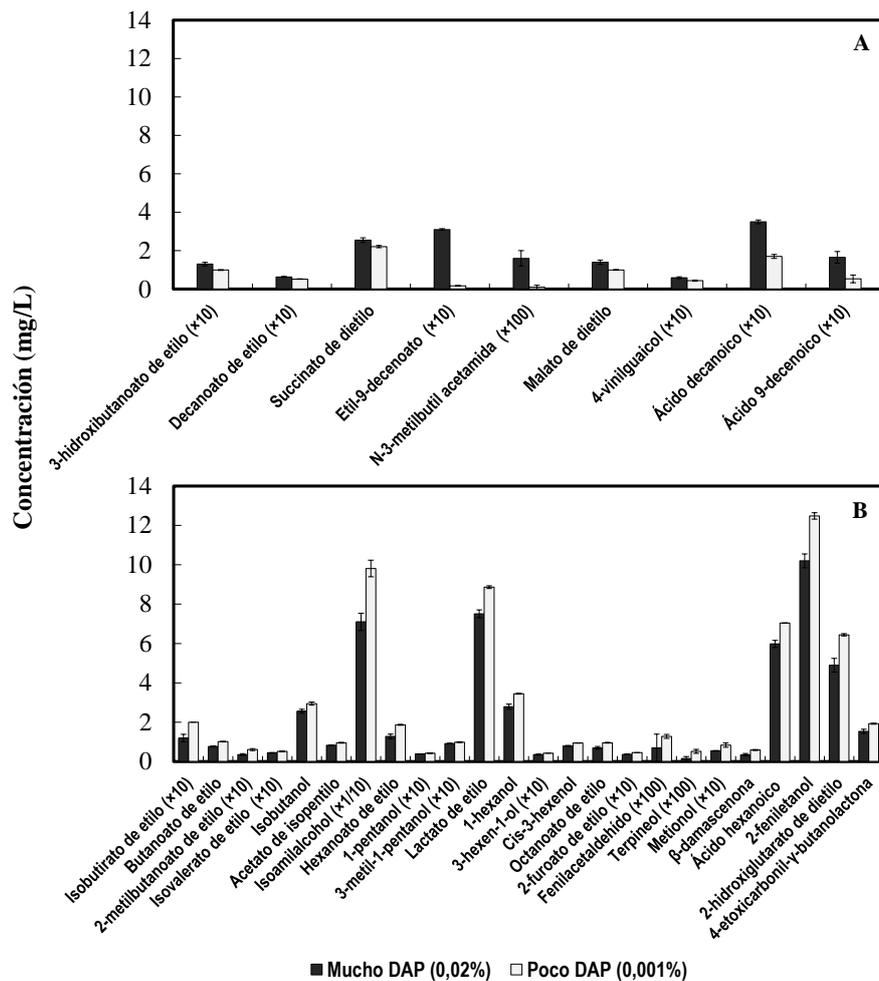


Figura. V.32. Compuestos aromáticos significativamente más abundantes en los cavas elaborados con mucho DAP (A) o con poco DAP (B).

En resumen, el efecto killer incrementó la cantidad de proteínas, la cantidad de algunas familias de compuestos aromáticos (ésteres y ácidos orgánicos) y la calidad organoléptica de los cavas. Sin embargo, y a diferencia del experimento realizado a 18-12°C con vino base-2, este efecto killer no incrementó la cantidad de células destrozadas durante el primer mes de fermentación ni la cantidad de espuma de forma generalizada respecto a los cavas sin efecto killer a 12°C. La adición extra de DAP incrementó la cantidad de polisacáridos, manosa (procedente de manano hidrolizado) y mejoró los parámetros de la espuma de forma generalizada; aunque la calidad organoléptica se vio penalizada al incrementar la concentración de succinato de dietilo y malato de dietilo (descriptor manzana fermentada). No se observó la correlación positiva entre octanoato de etilo y TS observada previamente en el experimento de 18°C.

Con los resultados mostrados hasta aquí, ya se vislumbra la posibilidad de que la espuma y la calidad organoléptica del cava dependan más de la liberación del

metaboloma de las levaduras dañadas/muertas que de la cantidad de proteínas o polisacáridos procedentes de la degradación de las paredes de las células muertas; y que esta liberación del metaboloma se puede incrementar o acelerar con la presencia de efecto killer durante la fermentación, efecto que mejora si la fermentación se realiza a 18°C durante el primer mes, provocando una liberación de compuestos variable según la composición del muy regulado metaboloma de las levaduras.

V.2.6. Elaboración de cava con inóculos mixtos de levaduras *Saccharomyces* killer, no-killer y mutantes afectados en las manoproteínas estructurales de la pared celular.

En base a los resultados previos de elaboración de cava (Apartados V.2.4 y V.2.5), se realizó un tercer tiraje con mezclas de levaduras killer y killer+no-killer para confirmar la mejora debida al uso de este fenotipo, y mezclas de levaduras *S. cerevisiae* killer+mutantes diploides de *S. cerevisiae* afectados en las manoproteínas de la pared celular (Mnn) para intentar optimizar esta mejora en la calidad organoléptica y los parámetros de la espuma. La obtención de mutantes Mnn diploides de *S. cerevisiae* se realizó por conjugación de dos estirpes de distinto tipo sexual (Apartado II.6.6).

Se realizaron 6 tirajes con levaduras: dos controles con sendas levaduras killer y no-killer, dos mezclas de levaduras killer+killer y killer+no-killer, y dos mezclas de levaduras killer+mutante con severos defectos en la pared celular (Tabla V.8). Además se realizó un tiraje sin inocular. Se utilizó el vino base-4, variedad Macabeo procedente de Bodegas López-Morena (Tabla II.6). Las botellas se incubaron a 18°C durante los primeros 17 días y posteriormente a 12°C.

Tabla V.8. Levaduras inoculadas en los tirajes realizados en botella con el vino base-4.

Tiraje	Levaduras (<i>Sc</i>)	Fenotipo
1	EX229 (<i>Sc</i>)	Klus, CYH ^S
2	EX229-R1 (<i>Sc</i>)	K ⁻ , CYH ^R
3	EX229 + Rod23-1B (<i>Sc+Sc</i>)	Klus, CYH ^S + K2, ROD ^{PC} , CYH ^R
4	EX229-R1 + Rod23-1B (<i>Sc+Sc</i>)	K ⁻ , CYH ^R + K2, ROD ^{PC} , CYH ^R
5	EX229 + Mnn6 (<i>Sc+Sc</i>)	Klus, CYH ^S + K ⁻ , CYH ^S
6	EX229 + Mnn9 (<i>Sc+Sc</i>)	Klus, CYH ^S + K ⁻ , CYH ^S

Sc, *Saccharomyces cerevisiae*. *To*, *Torulaspota delbrueckii*. K⁻, levadura no-killer; K2, levadura killer K2; Klus, levadura killer Klus; CYH^R, resistente a cicloheximida; CYH^S, sensible a cicloheximida; ROD^{PC}, levaduras color rosa claro en presencia de rodamina-6G y resistentes a cicloheximida.

V.2.6.1. Eficacia fermentativa de las levaduras.

Las fermentaciones fueron más rápidas que en el experimento anterior de vino base-3 a 12°C, y aproximadamente igual que el experimento de vino base-2 realizado a 18-12°C, tal y como cabría esperar. Todas las fermentaciones terminaron antes de 60

días, y algunas (EX229+Mnn6 y EX229+Mnn9) antes de 30 días. Las cinéticas fueron algo más lentas en los tirajes inoculados con una sola levadura (EX229 y EX229-R1) que en la mayoría de las mezclas en las que se inoculó el doble de levaduras, excepto en la mezcla EX229-R1+Rod23-1B, aunque las diferencias no fueron importantes (**Fig. V.33A**). En la mayoría de los cavas se alcanzó una presión máxima en torno a 6 atm a los 15 días. La mezcla EX229-R1+Rod23-1B y la levadura no-killer EX229-R1 tardaron más en llegar al máximo de presión, 30 días. El control sin inocular no realizó la segunda fermentación, por consiguiente la presión se mantuvo cercana a 0 atm durante toda la fermentación, similar al tiraje 2 y 3 (datos no mostrados).

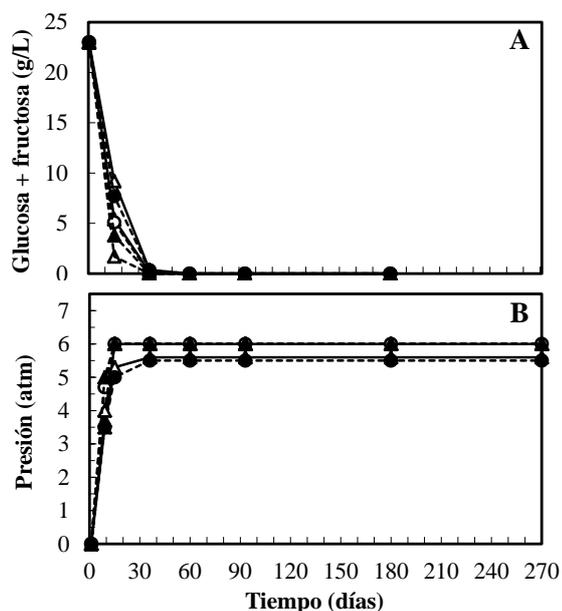


Figura V.33. Evolución del consumo de glucosa+fructosa (A) y presión (B) durante la segunda fermentación de los cavas elaborados en botella con *S. cerevisiae*, mezclas de *S. cerevisiae*, y mezclas de *S. cerevisiae*+mutantes defectuosos en la pared celular. Símbolos: EX229 (—▲—), EX229-R1 (—Δ—), EX229+Rod23-1B (--○--), EX229-R1+Rod23-1B (--●--), y EX229+Mnn6 (--Δ--), EX229+Mnn9 (--▲--).

V.2.6.2. Evolución de la viabilidad celular de las levaduras.

La población de levaduras no llegó a aumentar un orden de magnitud durante los primeros 15 días, como ya ocurriera en la mayoría de las fermentaciones de los experimentos anteriores, a excepción de la fermentación de EX229 y la mezcla con Mnn9 que aumentaron de 10^6 a 10^7 UFC/mL (**Fig. V.34A**). Una vez más y en general, las levaduras murieron antes que en los tirajes realizados en tubos a baja presión, antes de 90 días en casi todas las fermentaciones, y antes de 60 días en las mezclas EX229+Rod23-1B, EX229+Mnn6 y EX229+Mnn9. Solamente la mezcla de EX229-R1+Rod23-1B y su control EX229-R1 permanecieron vivas más de 90 días. La segunda

fermentación concluyó correctamente en todos los casos y la cantidad de yemas disminuyó a medida que el cultivo envejeció por falta de nutrientes (**Fig. V.34B**).

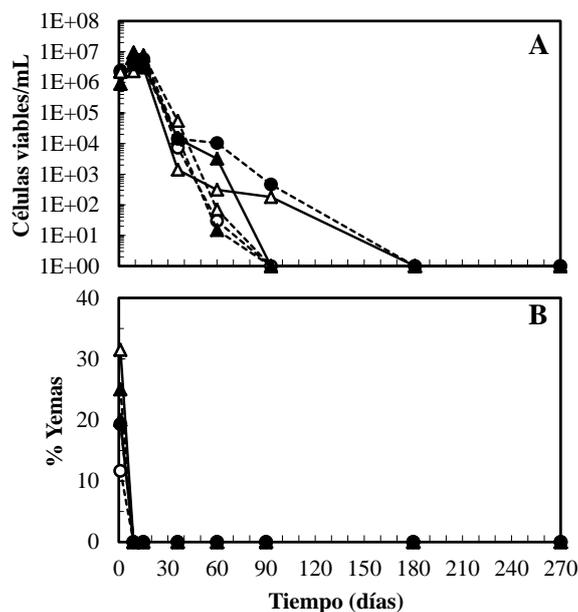


Figura V.34. Evolución de la viabilidad (A) y porcentaje de yemas (B) durante la segunda fermentación de los cavas elaborados en botella con *S. cerevisiae*, mezclas de *S. cerevisiae*, mezclas de *S. cerevisiae*+mutantes defectuosos en la pared celular. Símbolos: EX229 (—▲—), EX229-R1 (—△—), EX229+Rod23-1B (--○--), EX229-R1+Rod23-1B (--●--), y EX229+Mnn6 (--△--), y EX229+Mnn9 (--▲--).

V.2.6.3. Desplazamiento de las levaduras sensibles por las levaduras killer y evolución de la muerte celular.

Al igual que ocurrió en los tirajes anteriores con vino base-2 y -3 (**Apartados V.2.4 y V.2.5**), la levadura EX229 dominó en todas las mezclas en las que se incluyó, incluso en la mezcla EX229+Rod23-1B (ambas killer) debido al menor vigor fermentativo de Rod23-1B. El desplazamiento de la levadura killer-sensible fue más rápido que en el experimento anterior a 12°C con mucho DAP (**Apartado V.2.5**) y similar al experimento de vino base-2 a 18-12°C (**Apartado V.2.4**). El desplazamiento de la levadura sensible fue aún más rápido en las mezclas EX229+Mnn6 y EX229+Mnn9, probablemente debido a su mayor sensibilidad a las toxinas killer provocada por los defectos de pared celular de ambas levaduras sensibles (**Tabla III.4, Capítulo III**). Sin embargo, el desplazamiento de la levadura sensible EX229-R1 en la mezcla EX229-R1+Rod23-1B no fue total (**Fig. V.35A**), probablemente también debido al menor vigor fermentativo de la levadura killer Rod23-1B y a la alta tasa de viabilidad de la levadura sensible EX229-R1 en estas condiciones.

Una vez más, el desplazamiento de las levaduras sensibles no correlacionó con un incremento de la muerte celular a partir de los 60 días, probablemente debido a que, una

vez agotados los azúcares, la mayoría de las levaduras murieron debido al efecto deletéreo de la presión. Solamente se observó correspondencia entre efecto killer e incremento de muerte celular en las mezclas de levaduras antes de 30 días (**Fig. V.35B**). Al igual que en el experimento de vino base-2 a 18-12°C con mucho DAP, se observó correspondencia entre el desplazamiento de levaduras sensibles y la cantidad de células destrozadas en las mezclas EX229+Rod23-1B y EX229+Mnn6 (**Fig. V.36**).

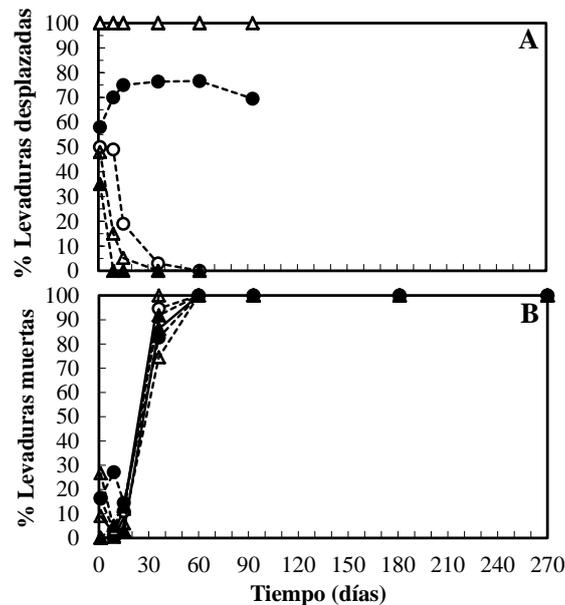


Figura V.35. Evolución del porcentaje de cada levadura inoculada, de la levadura desplazada en las mezclas de dos levaduras (killer+no-killer o killer+killer) (A) y de levaduras muertas totales (B) durante la segunda fermentación de los cavas elaborados en botella con *S. cerevisiae*, mezclas de *S. cerevisiae*, y mezclas de *S. cerevisiae*+mutantes defectuosos en la pared celular. El porcentaje de cada levadura inoculada y de la levadura desplazada en las fermentaciones inoculadas con mezclas de levaduras se calculó analizando distintos marcadores genéticos en las colonias aisladas de cada muestra: CYH^R (resistencia a cicloheximida) para EX229-R1; ROD^{PC} (levadura color rosa claro en presencia de rodamina-6B) para Rod23-1B; CYH^S (sensibilidad a cicloheximida), fenotipo killer y/o perfil de restricción del mtDNA (RFLPs) para EX229, MNN6 y MNN9. Símbolos: EX229 (—▲—), EX229-R1 (—Δ—), EX229+Rod23-1B[†] (--○--), EX229-R1+Rod23-1B[†] (--●--), EX229+MNN6[†] (--Δ--), y EX229+MNN9[†] (--▲--). El símbolo (†) indica la levadura que resultó desplazada en cada mezcla de dos levaduras y cuyo porcentaje se representa en la correspondiente gráfica, excepto para la mezcla EX229-R1+Rod23-1B[†] donde se indica la levadura Rod23-1B (no desplazada en este caso) para comparar mejor con la mezcla EX229+Rod23-1B[†] donde si fue desplazada esta misma levadura.

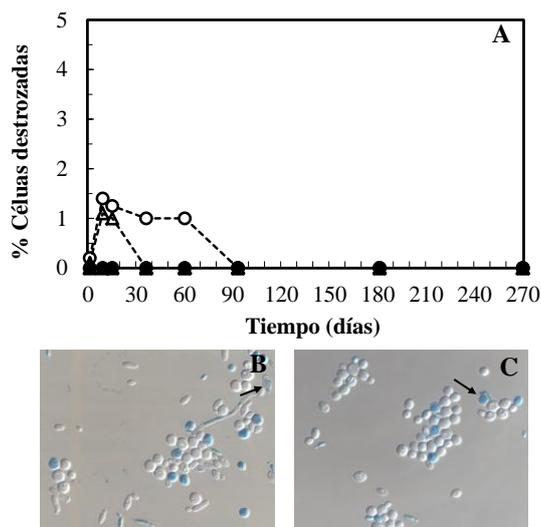


Figura V.36. Evolución del porcentaje de células destrozadas (A) durante la segunda fermentación de los cavas elaborados en botella con *S. cerevisiae*, mezclas de *S. cerevisiae*, y mezclas de *S. cerevisiae*+mutantes defectuosos en la pared celular. EX229 (—▲—), EX229-R1 (—△—), EX229+Rod23-1B (--○--), EX229-R1+Rod23-1B (--●--), EX229+Mnn6 (--△--), y EX229+Mnn9 (--▲--). Microfotografías (600×, Nomarski y campo claro) de los cavas elaborados con EX229+Rod23-1B (B) y EX229+MNN6 (C) del día 15 de fermentación, las flechas indican células destrozadas.

En resumen, las cinéticas de fermentación transcurrieron de forma correcta en todos los cavas alcanzándose 6 o más atms de presión a los 15 días, excepto en la mezcla EX229-R1+Rod23-1B y la levadura no-killer EX229-R1 que lo hicieron a los 30 días. El incremento de temperatura de 12 a 18°C durante las dos primeras semanas de fermentación fue determinante para acelerar la fermentación y potenciar el efecto killer. De nuevo, se apreció correspondencia del efecto killer con un incremento de la cantidad de células destrozadas en las mezclas EX229+Rod23-1B durante los primeros días de la segunda fermentación, al igual que ocurriera con el tiraje de vino base-2 incubado también a 18°C durante el primer mes. También se apreció esta correspondencia en el cava de EX229+Mnn6.

V.2.6.4. Análisis de la espuma del cava.

Como ocurriera con los cavas de experimentos anteriores y de acuerdo con lo descrito previamente (Cilindre et al., 2010; Girbau-Sola et al., 2002b; Maujean et al., 1990a), los parámetros de espuma no mejoraron en general respecto al vino base-4 con la excepción del HM que mejoró un 19% de media (**Tabla II.6**). Una vez más, el TS mejoró (21%) en los cavas de la mezcla EX229+Rod23-1B respecto el vino base-4, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa. El TS también mejoró (79%) significativamente ($p < 0,05$) en los cavas con efecto killer (con claro desplazamiento de la levadura sensible) respecto a los cavas sin efecto killer o

elaborados con cada levadura por separado; y la mejora más importante volvió a corresponder a la mezcla EX229+Rod23-1B (88,4%). Además, la espuma mejoró en el cava de la mezcla EX229+Rod23-1B (en presencia de la toxina Klus de EX229) respecto a la mezcla EX229-R1+Rod23-1B (en ausencia de la misma toxina, ya que EX229-R1 ha perdido el virus ScV-Mlus), 13% HM, 26% HS y 98% TS (**Fig. V.37**), aunque esta mejora solo fue estadísticamente significativa para TS. Estos resultados confirman la mejora del efecto killer sobre los parámetros de la espuma, aunque no siempre suponga una mejora adicional respecto a la espuma del vino base de partida.

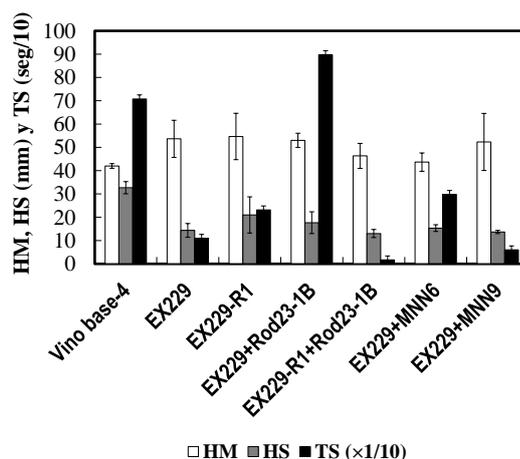


Figura V.37. Evolución de los parámetros de espuma de los cavas elaborados en botella con *S. cerevisiae*, mezclas de *S. cerevisiae*, y mezclas de *S. cerevisiae*+mutantes defectuosos en la pared celular. HM, altura máxima; HS, altura de estabilidad; TS, tiempo de estabilidad.

V.2.6.5. Evolución del contenido en polisacáridos y proteínas.

En general, a diferencia de lo ocurrido en los tirajes en botella anteriores (**Apartados V.2.4 y V.2.5**), la cantidad de polisacáridos de los cavas no disminuyó durante la crianza, aumentó un 23% a los 180 días y un 15% a los 270 días respecto el vino base-4 (**Fig. V.38**). Parece que fueran repuestos por la lisis de las paredes de las levaduras hasta los 180 días y después degradados de nuevo parcialmente. Quizás este aumento global de polisacáridos en estos cavas fue debido a que el vino base-4 tenía menos polisacáridos (99,7 mg/L) que los vinos bases de los experimentos anteriores (163,21 mg/L en vino base-2 y 163,6 mg/L en vino base-3). Además, la cantidad de manosa incrementó aproximadamente dos veces a los 270 días respecto el vino base-4, contrario al experimento anterior con vino base-3 (**Apartado V.2.5**), y similar al vino base-2 (**Apartado V.2.4**) y a lo descrito previamente con un incremento de 3-4 veces durante el envejecimiento de los vinos espumosos en contacto con las lías (Caridi, 2006; Martínez-Lapuente et al., 2013; Moreno-Arribas and Polo, 2009). Por otra parte, a

diferencia de lo ocurrido en los cavas del vino base-2 elaborados a 18-12°C (**Apartado V.2.4**) y de forma similar a lo ocurrido con los cavas del vino base-3 elaborados a 12°C (**Apartado V.2.5**), la cantidad de polisacáridos y manosa disminuyó en la mayoría de los cavas elaborados con mezclas de levaduras respecto a los de cada levadura por separado, aunque las diferencias no fueron significativas (**Fig. V.39**). Como ya indicamos anteriormente, el incremento de polisacáridos en los cavas elaborados con mezclas de levaduras de vino base-2 se puede deber al incremento de células destrozadas respecto a los cavas elaborados con cada levadura por separado.

La cantidad de proteínas de los cavas aumentó respecto al vino base-4 un 9% a los 180 días y un 18% a los 270 días, al igual que ocurrió a los 270 días en los experimentos previos a 18-12°C y a 12°C con mucho DAP (**Fig. V.38**), y al contrario de lo descrito previamente (Moreno-Arribas and Polo, 2009). Igualmente, la cantidad de proteínas aumentó en los cavas elaborados con mezclas respecto los de una levadura, aunque estas diferencias tampoco fueron estadísticamente significativas (**Fig. V.39**).

Como ya ocurriera en los experimentos anteriores en botella y al contrario de lo descrito previamente (Abdallah et al., 2010; Andrés-Lacueva et al., 1997; Andrés-Lacueva et al., 1996; Coelho et al., 2011b; Girbau-Sola et al., 2002a; López-Barajas et al., 2001; López-Barajas et al., 1997; Moreno-Arribas et al., 2000; Nunez et al., 2005; Núñez et al., 2006), no se apreció correlación entre la cantidad de polisacáridos, manosa o de proteína en los cavas con los parámetros de espuma (HM, HS o TS). Y en consonancia con otros autores para la cantidad de proteínas (Girbau-Sola et al., 2002a; Marchal et al., 2001).

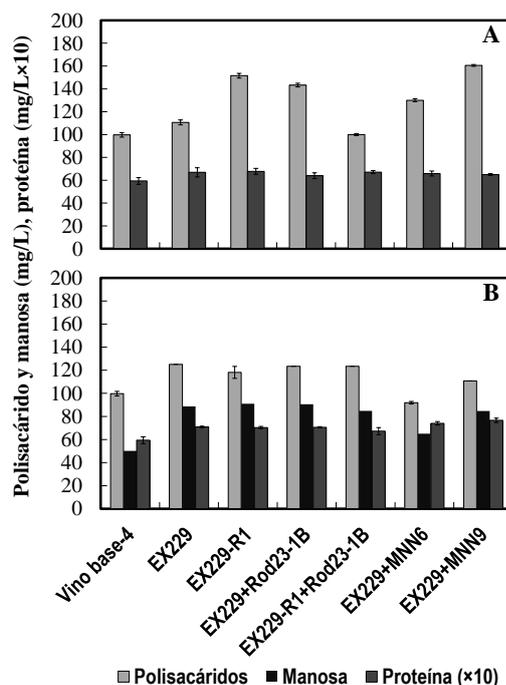


Figura V.38. Evolución de la concentración de polisacáridos, manosa (sólo a los 9 meses) y proteínas totales a los 180 días (A) y 270 días (B) meses durante la segunda fermentación de los cavas elaborados en botella con *S. cerevisiae*, mezclas de *S. cerevisiae*, y mezclas de *S. cerevisiae*+mutantes defectuosos en la pared celular.

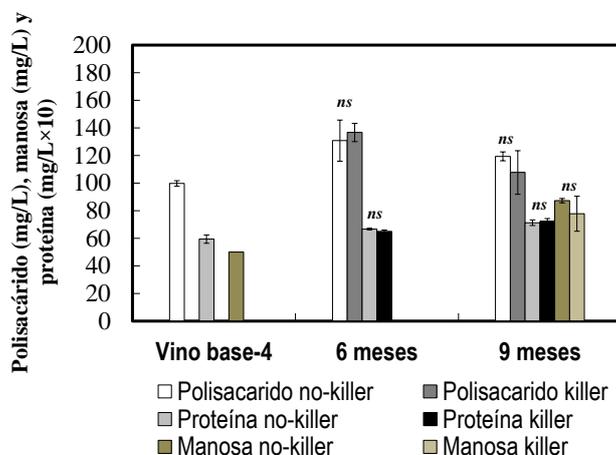


Figura V.39. Evolución de la concentración media de polisacáridos y proteínas durante la segunda fermentación, y manosa (sólo a los 9 meses) de los cavas inoculados con una levadura *Saccharomyces* (no existe efecto killer), o mezclas de *Saccharomyces*+*Saccharomyces* (si existe efecto killer). En la parte superior se muestra el nivel de significación (p) correspondiente al análisis de la varianza.

V.2.6.6. Análisis de compuestos aromáticos.

Considerando todos los cavas en conjunto y agrupando los compuestos aromáticos por familias, incrementó Σ ésteres etílicos (11%), Σ ésteres acetato (76%), Σ alcoholes (20%) y Σ monoterpenos (42%) respecto el vino base-4. Estos resultados son contrarios a los de los cavas del vino base-2 excepto para Σ monoterpenos, probablemente debido

a que el vino base-4 tenía aún menor cantidad de estos compuestos que los vinos base-2 y -3, y que incrementaron con el metabolismo de las levaduras durante la segunda fermentación. El resto de familias de compuestos disminuyó una media de 19% Σ ácidos (similar al tiraje de vino base-3 y contrario al de vino base-2), 14% Σ furanos+fenoles volátiles (similar al tiraje de vino base-2 y contrario al vino base-3), 36% Σ lactonas (contrario a vino base-3 y similar a vino base-2), 67% Σ norisoprenoides (similar al tiraje de vino base-3 y contrario al vino base-2) y un 46% Σ otros (contrario a los vinos base-2 y -3). No se detectaron cantidades de compuestos carbonílicos en los cavas elaborados con el vino base-4, mientras que aumentó en los cavas de vino base-2 y disminuyó en los de vino base-3 (**Fig. V.40**).

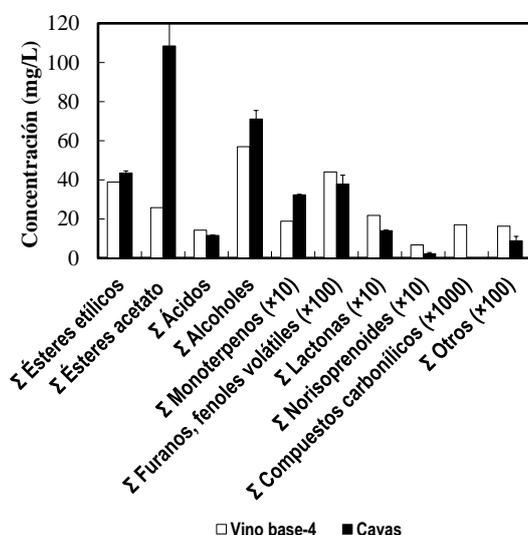


Figura V.40. Sumatorios de los distintos compuestos aromáticos agrupados por familias (Σ ésteres etílicos, Σ ésteres de acetato, Σ ácidos orgánicos, Σ alcoholes, Σ monoterpenos, Σ furanos+fenoles volátiles, Σ lactonas, Σ norisoprenoides, Σ compuestos carbonílicos y Σ otros en el vino base-4 durante la segunda fermentación de los cavas elaborados en botella con *S. cerevisiae*, mezclas de *S. cerevisiae*, y mezclas de *S. cerevisiae*+mutantes defectuosos en la pared celular.

Respecto a la espuma, se apreció correlación significativa en los siguientes casos: negativa de Σ alcoholes con HM, y positiva de Σ norisoprenoides (0,841, $p < 0,05$) con HM y Σ otros con TS. También hubo correlación significativa de la espuma con la cantidad de 19 compuestos: negativa de HM con isobutanol, isoamil alcohol, 1-hexanol, 2-feniletanol y 4-etoxicarbonil-gamma-butanolactona; positiva de HM con 3-etoxipropan-1-ol, furfural, 3-hidroxi-butanoato de etilo, 1-octanol, lactato de isoamilo, ácido isobutírico, ácido butanoico, terpineol, gamma-hexalactona, 4-hidroxi-butanoato de etilo, β -damascenona y laurato de etilo; y positiva de HS con furfural, 3-hidroxi-butanoato de etilo, linalol, 1-octanol, ácido isobutírico, fenilacetaldehido, ácido

isovalérico y ácido decanoico; y positiva de TS con linalol. A diferencia de lo ocurrido en los cavas de los vinos base-2 y -3, no hubo correlación negativa entre el ácido octanoico con TS, ni positiva entre octanoato de etilo y TS como ocurriera con los cavas del vino base-2.

Agrupando el vino base-4 y sus cavas en tres categorías según su capacidad para generar espuma (baja en los cavas EX229, EX229-R1+Rod23-1B y EX229+Mnn9; media en los cavas EX229-R1 y EX229+Mnn6; y alta en el vino base-4 y en el cava EX229+Rod23-1B), se observó diferencia significativa en Σ otros ($p=0,002$) y la cantidad fue mayor en el vino base-4 y los cavas con más espuma y más efecto killer (células destrozadas), seguido de una concentración intermedia en los cavas con una cantidad media de espuma, y menor en los cavas con menos espuma y menos efecto killer (Fig. V.41). Sólo se encontró diferencia significativa en 5 compuestos por separado, y correspondencia con la cantidad de espuma en la concentración de 1-pentanol, linalol y fenilacetaldehído.

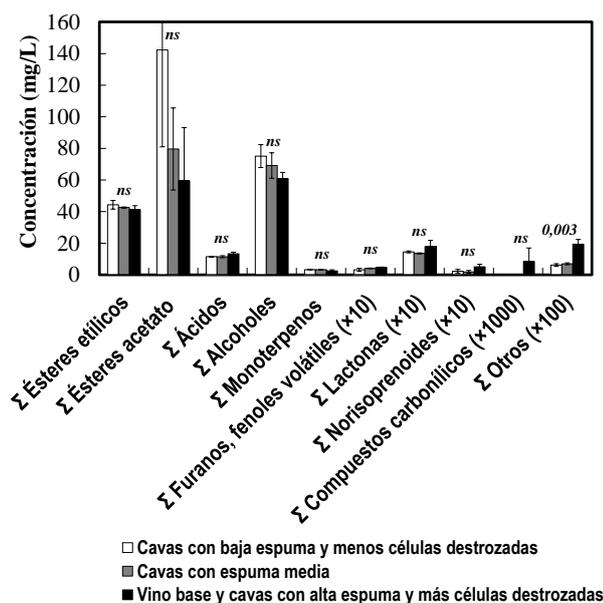


Figura V.41. Familia de compuestos aromáticos de los cavas con alta espuma y más células destrozadas respecto cavas con media espuma y cavas con baja espuma y menos células destrozadas o sin efecto killer. En la parte superior se muestra el nivel de significación (p) correspondiente al análisis de la varianza. ns, no significativo.

Considerando solo los cavas, el efecto killer de las mezclas de levaduras incrementó la cantidad de Σ furanos+fenoles volátiles (27%) y Σ otros (40%), aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Probablemente, este incremento fue consecuencia del daño de las toxinas killer en las células sensibles de las mezclas de levaduras que liberaron su metaboloma al medio.

V.2.6.7. Análisis de la calidad organoléptica de los cavas.

Se observó diferencia significativa en la calidad organoléptica de los vinos en relación con el efecto killer ($68,5\% \pm 1,5$ en killer, $58\% \pm 2,35$ en no-killer, $p < 0,05$). El vino mejor evaluado fue el elaborado con la mezcla de EX229+Mnn6, seguida de la mezcla EX229+Rod23-1B (Tabla V.9), y el peor evaluado el de la mezcla EX229-R1+Rod23-1B sin efecto killer. La calidad organoléptica no correlacionó con la cantidad de las distintas familias de compuestos aromáticos (datos no mostrados), aunque hubo correlación negativa con la cantidad de isobutirato de etilo, decanoato de etilo y ácido octanoico; y positiva con la cantidad de acetato de isopentilo y lactato de etilo.

Tabla V.9. Parámetros analíticos y análisis organoléptico de los cavas elaborados con inóculos mixtos de levaduras killer, no-killer o mezclas de ambas en botella a alta presión.

Levadura	Etanol (%, v/v)	Az. reductores (g/L)	Acidez volátil (g/L)	Acidez total (g/L)	pH	Masa volúmica (g/L)	Extracto seco (g/L)	Aceptación (%)
EX229	11,7	1,8	0,38	6,5	3,04	0,9890	16,2	56
EX229-R1	11,7	1,8	0,40	6,6	3,02	0,9891	16,4	56
EX229+Rod23-1B	11,7	1,5	0,37	6,4	3,05	0,9889	15,9	67
EX229-R1+ Rod23-1B	11,7	1,5	0,37	6,5	3,03	0,9889	15,9	55
EX229+Mnn6	11,3	1,4	0,29	6,2	3,01	0,9889	14,7	70
EX229+Mnn9	11,5	1,4	0,30	6,2	3,02	0,9887	15	65

En resumen, la espuma volvió a correlacionar con efecto killer real, cantidad de células destrozadas y liberación del metaboloma al medio extracelular, que en este caso también destacó en el tiraje inoculado con la mezcla EX229+Mnn6, indicando la posible utilidad de este mutante para mejorar la espuma del cava. Sin embargo y una vez más, la espuma no correlacionó con la concentración de la mayoría de los compuestos analizados agrupados en familias, ni con la cantidad de polisacáridos o proteínas del cava.

V.2.7. Análisis general del metaboloma celular de las levaduras *Saccharomyces* con y sin efecto killer en la elaboración de cava en el conjunto de todas las vinificaciones.

En un análisis global de todos los cavas elaborados para este estudio, de nuevo y en línea con lo descrito previamente (Cilindre et al., 2010; Girbau-Sola et al., 2002b; Maujean et al., 1990a), los parámetros de la espuma (HM, HS y TS) no mejoraron respecto al vino base en la mayoría de los cavas (HM $38,9 \pm 5,2$ vino base, $39,2 \pm 1,9$ cavas, $p = 0,959$; HS $28,3 \pm 5,2$ vino base, $18,2 \pm 1,1$ cavas, $p = 0,010$; y TS $561,1 \pm 108,2$ vino base, $287,3 \pm 50,1$ cavas, $p = 0,099$). Sin embargo, excluyendo los cavas de la vinificación realizada a 12°C y con distintas concentración de DAP, se apreció una

mejora de la espuma de forma generalizada en los cavas con efecto killer respecto a los cavas sin efecto killer, no significativa para HM ($34,7 \pm 5,3$ no-killer, $39,5 \pm 5,3$ killer, $p=0,546$), marginalmente significativa para HS ($12,6 \pm 0,5$ no-killer, $18,5 \pm 3,3$ killer, $p=0,082$) y significativa para TS ($57,6 \pm 27,8$ no-killer, $376,6 \pm 147,4$ killer, $p=0,041$). Además, en conjunto, los parámetros de la espuma mejoraron significativamente en los cavas donde hubo un claro efecto killer real, con más células destrozadas, respecto a los cavas sin efecto killer, con menos células destrozadas (HM $51,3 \pm 5,2$ más células destrozadas, $32,8 \pm 4,3$ menos células destrozadas, $p=0,050$; HS $26,3 \pm 4,8$ más células destrozadas, $12,1 \pm 0,3$ menos células destrozadas, $p=0,000$; y, TS $772,1 \pm 68,1$ más células destrozadas, $25,14 \pm 10,6$ menos células destrozadas, $p=0,000$).

La cantidad de polisacáridos disminuyó en la mayoría de los cavas elaborados con mezclas de levaduras respecto a los de una sola levadura, aunque las diferencias no fueron significativas ($135,1 \pm 3,3$ no-killer, $134,3 \pm 5,9$ killer, $p=0,899$). No obstante la cantidad de manosa procedente de polisacáridos de la pared celular, incrementó ligeramente (media del 1%) en los cavas elaborados con las mezclas de levaduras respecto a los elaborados con una sola levadura, aunque esta diferencia tampoco resultó significativa ($50,5 \pm 6,3$ no-killer, $51,0 \pm 5,3$ killer, $p=0,962$). Por otro lado, la cantidad de proteínas también aumentó ligeramente en los cavas elaborados con mezclas de levaduras (efecto killer) respecto los controles de una sola levadura (media del 2%), aunque esta diferencia no resultó estadísticamente significativa ($10,0 \pm 0,7$ no-killer, $10,2 \pm 0,7$ killer, $p=0,861$). No obstante, se apreció cierta correlación positiva entre HM y manosa ($0,516$, $p=0,003$) y entre HS y proteína ($0,438$, $p=0,018$), de acuerdo a lo descrito previamente (Moreno-Arribas and Polo, 1996; Moreno-Arribas et al., 2000; Núñez et al., 2006) y negativa entre HM y polisacáridos totales ($-0,506$, $p=0,004$) (**Tabla V.10**), contrario a lo descrito previamente (Girbau-Sola et al., 2002a). De forma global, la cantidad de polisacáridos fue ligeramente mayor en los vinos con poca espuma respecto a los de mucha espuma, y aún menor respecto a los cavas con una cantidad media de espuma. La cantidad de proteínas fue mayor en los cavas con mucha espuma respecto a los de poca espuma, pero fue aún menor en los cavas con una cantidad media de espuma.

Tabla V.10. Coeficientes de correlación de Pearson entre cantidad de polisacárido, manosa y proteína (mg/L) y los parámetros de espuma.

Parámetro	HM	HS	TS
Polisacárido (mg/L)	-0,506(**)	ns	ns
Manosa (mg/L)	0,516(**)	ns	ns
Proteína(mg/L)	ns	0,438(*)	ns

La correlación (bilateral) es significativa al nivel 0,01 (**) ó 0,05 (*).
ns= no significativo.

En relación a los cambios en las concentraciones de compuestos volátiles de los cavas respecto al vino base, se apreció un incremento de Σ monoterpenos (con un incremento del 60% en terpineol), Σ compuestos carbonílicos (incremento del 53% en acetoína) y Σ otros (96% en n-pentadecano, 100% en N-3-metilbutilacetamida y solerone y 46% en blackberry tiofenona). La liberación de alcoholes terpénicos (geraniol, terpineol, citroneol y farnesol) durante la autólisis ya ha sido descrita previamente (Kemp et al., 2014; Loyaux et al., 1981; Molnar et al., 1981), al igual que la implicación de la acetoína en el bouquet del vino (Romano and Suzzi, 1996). El resto de familias de compuestos disminuyó una media de 33% Σ ésteres etílicos, 90% Σ ésteres acetato, 4% Σ ácidos, 31% Σ alcoholes, 77% Σ furanos+fenoles volátiles, 33% Σ lactonas y 10% Σ norisoprenoides. La desaparición de ésteres de acetato en relación con la crianza y la pérdida de aromas a fruta fresca en el cava respecto al vino base ya ha sido descrita previamente (Torrens et al., 2010), junto con el incremento de succinato de dietilo (en nuestro caso un 70%, $p < 0,001$), responsable de aroma de sobre-madurez frutal (Zea et al., 2007) formado durante el envejecimiento del cava en contacto con las lías de la segunda fermentación (Bosch-Fusté et al., 2007). Y el incremento significativo (de un 97% de media en nuestro caso, $p < 0,001$) de furfural, perteneciente al Σ furanos+fenoles volátiles, responsable de aroma a caramelo, tostado o fruta seca (Torrens et al., 2010). La disminución de la cantidad de β -damascenona en el cava, perteneciente al Σ norisoprenoide, también ha sido descrita previamente en relación a la interacción con las manoproteínas secretadas por levaduras con compuestos volátiles (Chalier et al., 2007; Torrens et al., 2010).

Respecto a la espuma, se apreció correlación significativa negativa de Σ ésteres etílicos, Σ ácidos, Σ furanos+fenoles volátiles y Σ compuestos carbonílicos con HM, Σ ésteres acetato y Σ compuestos carbonílicos con HS; y correlación significativa positiva con Σ monoterpenos con HM y Σ lactonas con HS y TS. También hubo correlación

significativa negativa de la espuma con 30 compuestos de los 75 analizados: 22 con HM (acetato de isopentilo, acetato de hexilo, acetoina, 3-metil-1-pentanol, n-pentadecano, 3-hidroxi-butanoato de etilo, 2-hidroxi-hexanoato de etilo, lactato de isoamilo, 4-hidroxi-butanoato de etilo, acetato de 2-feniletilo, N-3-metilbutilacetamida, 2-feniletanol, ácido 2-transhexenoico, malato de dietilo, ácido octanoico, 4-vinilguaicol, ácido decanoico, 2-hidroxi-3-feniletilpropanoato de etilo, ácido 9-decenoico, succinato de etilo y 4-vinilfenol); 5 con HS (acetato de etilo, acetoina, succinato de dietilo, etil 9-decenoato y ácido 9-decenoico); y 3 con TS (malato de dietilo, 4-vinilguaicol y ácido 9-decenoico). Y correlación significativa positiva con 35 compuestos: 8 con HM (isobutirato de etilo, 2-metilbutanoato de etilo, isovalerato de etilo, 1-pentanol, 1-octanol, 2-furoato de etilo, terpineol y laurato de etilo); 15 con HS (butanoato de etilo, hexanoato de etilo, 1-hexanol, 3-hexén-1-ol, cis-3-hexenol, octanoato de etilo, blackberry tiofenona, 2-furoato de etilo, gamma-butirolactona, fenilacetaldehido, metionol, etoxi-gamma-butirolactona, alcohol bencílico, 2-hidroxi-glutarato de dietilo y 4-etoxicarbonil-gamma-butanolactona; y, 12 con TS (1-hexanol, 3-hexén-1-ol, cis-3-hexenol, octanoato de etilo, blackberry tiofenona, 2-furoato de etilo, gamma-butirolactona, fenilacetaldehido, metionol, etoxi-gamma-butirolactona, alcohol bencílico y 4-etoxicarbonil-gamma-butanolactona). De nuevo, como ya se vio anteriormente (**Apartado V.2.4, V.2.5 y V.2.6**), algunos ácidos grasos (de C₈ y C₁₀) correlacionaron negativamente con la espumabilidad (HM), mientras que algunos ésteres etílicos (isovalerato de etilo, 2-furoato de etilo y laurato de etilo) lo hicieron positivamente; otros ésteres etílicos también correlacionaron positivamente en nuestro estudio con la estabilidad de la espuma (HS) (butanoato de etilo, hexanoato de etilo, octanoato de etilo y 2-furoato de etilo) y con el tiempo de estabilidad (TS) (octanoato de etilo y 2-furoato de etilo), similar a lo descrito previamente (Gallart et al., 2002). Además, algunas lactonas correlacionaron positivamente con HS (gamma-butirolactona, etoxi-gamma-butirolactona y 4-etoxicarbonil-gamma-butanolactona) similar a lo descrito previamente (Pueyo et al., 1995) y también con el TS.

El efecto killer de las mezclas de levaduras incrementó significativamente la cantidad de Σ otros (50% de media), con un incremento medio significativo de 60% en n-pentadecano ($p < 0,05$). Probablemente debido a que el daño de las toxinas killer en las células sensibles de las mezclas de levaduras provocó la liberación de su metaboloma al medio. Puede que esta liberación del metaboloma al principio de la segunda fermentación aumente la concentración de muchos compuestos para igualarse

posteriormente durante la crianza sobre lías haciendo desaparecer las diferencias entre los distintos cavas a excepción del n-pentadecano. Quedaría pendiente analizar la evolución de los aromas y su posible correlación con la espuma a lo largo de la segunda fermentación y posterior crianza hasta los 9 meses, como ya se hiciera con la cantidad de polisacárido y proteínas, lo cual nos permitiría confirmar esta hipótesis.

De nuevo la calidad organoléptica (sin considerar la espuma) aumentó significativamente en los cavas con efecto killer elaborados con las mezclas de levaduras (61,9% no-killer, 73,15% killer, $p < 0,001$), que resultaron más complejos con sensaciones propias de la crianza (levaduras, pan, tostados) y con matices en boca más agradables que los cavas sin efecto killer. La calidad organoléptica no correlacionó con la cantidad de las distintas familias de compuestos aromáticos (datos no mostrados), aunque hubo correlación negativa con la cantidad de isovalerato de etilo; y positiva con la cantidad de 2-hidroxihexanoato de etilo, 4-hidroxibutanoato de etilo y ácido trans-2-hexenoico.

En síntesis global, nuestros resultados muestran la existencia de una mejora de la espuma y la calidad organoléptica del cava cuando se produce un efecto killer real (con un claro desplazamiento de las levaduras sensibles, mayor cantidad de células destrozadas y por ende mayor liberación del metaboloma al medio extracelular) entre las poblaciones de levaduras durante la fermentación, aunque esto no siempre suponga una mejora adicional respecto a la espuma del vino base de partida. Esta mejora es más patente con el aumento de temperatura de 12 a 18°C durante los primeros días de fermentación y mejora con un aporte extra de nitrógeno, aunque este último pudiera aumentar la cantidad de algunos compuestos relacionados con matices de sobremadurez frutal. No obstante, la correlación de la espuma con la concentración de los distintos compuestos, considerados individualmente o agrupados por familias, fue variable entre las distintas series de cavas realizados con cada vino base. Esto indica que los datos de correlación para cada compuesto, a pesar de la significación estadística encontrada en muchos casos, no constituyen un argumento suficientemente sólido para explicar las diferencias en la espuma de los cavas elaborados en estas condiciones experimentales. En general, la espuma no correlacionó con la cantidad de polisacáridos, más bien lo contrario, poniendo claramente de manifiesto su poca contribución a la cantidad de la espuma del cava. Sin embargo, la cantidad de proteínas podría ser responsable de la cantidad de la espuma del cava solo en determinadas condiciones de composición bioquímica del vino, y no necesariamente ser capaz de mejorar la espuma del cava

simplemente incrementando su concentración. Estos resultados sugieren la posibilidad de que la espuma y la calidad organoléptica del cava dependan más de la liberación del metaboloma de las levaduras dañadas/muertas que de la cantidad de proteínas o polisacáridos procedentes de la degradación de las paredes de las células muertas; y que esta liberación se puede incrementar o acelerar con la presencia de efecto killer durante la fermentación, efecto que mejora si la temperatura se eleva de 12 a 18°C durante el primer mes, provocando una liberación de compuestos variable según la composición del muy regulado metaboloma de las levaduras.

V.3. BIBLIOGRAFÍA.

- Abdallah, Z., Aguié-Béghin, V., Abou-Saleh, K., Douillard, R., and Bliard, C. (2010). Isolation and analysis of macromolecular fractions responsible for the surface properties in native Champagne wines. *Food Research International* 43, 982-987.
- Alexandre, H., and Guilloux-Benatier, M. (2006). Yeast autolysis in sparkling wine - a review. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 12, 119-127.
- Ambroña, J., Maqueda, M., Zamora, E., and Ramírez, M. (2005). Sulfometuron resistance as genetic marker for yeast populations in wine fermentations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 7438-7443.
- Ambroña, J., Vinagre, A., Maqueda, M., Álvarez, M., and Ramírez, M. (2006). Rhodamine-pink as genetic marker for yeast populations in wine fermentations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 2977-2984.
- Anderson, M., Smith, R., Williams, M., and Wolpert, J. (2008). Viticultural evaluation of French and California Pinot noir clones grown for production of sparkling wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 59, 188-193.
- Andrés-Lacueva, C., Lamuela-Raventós, R.M., Buxaderas, S., and de la Torre-Boronat, M.d.C. (1997). Influence of variety and aging on foaming properties of Cava (sparkling wine). 2. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 2520-2525.
- Andrés-Lacueva, C., López-Tamames, E., Lamuela-Raventós, R.M., Buxaderas, S., and de la Torre-Boronat, M.d.C. (1996). Characteristics of sparkling base wines affecting foam behavior. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 989-995.
- Babayan, T., and Bezrukov, M. (1985). Autolysis in yeast. *Acta Biotechnology*, 129-136.
- Bardi, L., Crivelli, C., and Marzona, M. (1998). Esterase activity and release of ethyl esters of medium-chain fatty acids by *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic growth. *Canadian Journal of Microbiology* 44, 1171-1176.
- Bosch-Fusté, J., Riu-Aumatell, M., Guadayol, J.M., Caixach, J., López-Tamames, E., and Buxaderas, S. (2007). Volatile profiles of sparkling wines obtained by three extraction methods and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis. *Food Chemistry* 105, 428-435.
- Caridi, A. (2006). Enological functions of parietal yeast mannoproteins. *Antonie van Leeuwenhoek* 89, 417-422.
- Cilindre, C., Liger-Belair, G., Villaume, S., Jeandet, P., and Marchal, R. (2010). Foaming properties of various Champagne wines depending on several parameters: Grape variety, aging, protein and CO₂ content. *Analytica Chimica Acta* 660, 164-170.
- Coelho, E., Reis, A., Domingues, M.R.M., Rocha, S.M., and Coimbra, M.A. (2011a). Synergistic effect of high and low molecular weight molecules in the foamability and foam stability of sparkling wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 3168-3179.
- Coelho, E., Rocha, S.I.M., and Coimbra, M.A. (2011b). Foamability and foam stability of molecular reconstituted model sparkling wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 8770-8778.

- Chalier, P., Angot, B., Delteil, D., Doco, T., and Gunata, Z. (2007). Interactions between aroma compounds and whole mannoprotein isolated from *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food Chemistry* 100, 22-30.
- Charpentier, C., Feuillat, M., and Fleet, G. (1993). Yeast autolysis. In *Wine Microbiology and Biotechnology* (Harwood Academic Publishers), pp. 225-242.
- Gallart, M., López-Tamames, E., Suberbiola, G., and Buxaderas, S. (2002). Influence of fatty acids on wine foaming. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 7042-7045.
- Girbau-Sola, T., López-Barajas, M., López-Tamames, E., and Buxaderas, S. (2002a). Foam aptitude of Trepát and Monastrell red varieties in cava elaboration. 2. Second fermentation and aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 5600-5604.
- Girbau-Sola, T., López-Tamames, E., Buján, J., and Buxaderas, S. (2002b). Foam aptitude of Trepát and Monastrell red varieties in cava elaboration. 1. Base wine characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 5596-5599.
- Kemp, B., Alexandre, H., Robillard, B., and Marchal, R. (2014). Review: Effect of production phases on bottle fermented sparkling wine quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- López-Barajas, M., López-Tamames, E., Buxaderas, S., Suberbiola, G., and De la Torre-Boronat, M. (2001). Influence of wine polysaccharides of different molecular mass on wine foaming. *American Journal of Enology and Viticulture* 52, 146-150.
- López-Barajas, M., Viu-Marco, A., López-Tamames, E., Buxaderas, S., and de la Torre-Boronat, M.C. (1997). Foaming in grape juices of white varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 2526-2529.
- Loyaux, D., Roger, S., and Adda, J. (1981). The evolution of champagne volatiles during ageing. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 32, 1254-1258.
- Marchal, R., Tabary, I., Valade, M., Moncomble, D., Viaux, L., Robillard, B., and Jeandet, P. (2001). Effects of *Botrytis cinerea* infection on Champagne wine foaming properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81, 1371-1378.
- Martínez-Lapuente, L., Guadalupe, Z., Ayestarán, B.n., Ortega-Heras, M., and Pérez-Magariño, S. (2013). Changes in Polysaccharide Composition during Sparkling Wine Making and Aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61, 12362-12373.
- Maujean, A., Poinssaut, P., Dantan, H., Brissonnet, F., and Cossiez, E. (1990). Etude de la tenue et de la qualité de mousse des vins effervescents. II: Mise au point d'une technique de mesure de la moussabilité de la tenue et de la stabilité de la mousse des vins effervescents. *Bulletin de l'OIV* 63.
- Mendes Ferreira, A., Climaco, M., and Mendes Faia, A. (2001). The role of non-*Saccharomyces* species in releasing glycosidic bound fraction of grape aroma components—a preliminary study. *Journal of Applied Microbiology* 91, 67-71.
- Molnar, I., Oura, E., and Suomalainen, H. (1981). Study of Volatile Substances Produced During the Autolysis of Champagne Yeast. *Acta Alimentaria* 10, 27-36.
- Moreno-Arribas, M.V., and Polo, M.C. (2009). *Wine chemistry and biochemistry* (Springer).
- Moreno-Arribas, V., and Polo, M. (1996). Peptides in musts and wines. Changes during the manufacture of cavas (Sparkling wines). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 3783-3788.
- Moreno-Arribas, V., Pueyo, E., Nieto, F., Martín-Alvarez, P., and Polo, M. (2000). Influence of the polysaccharides and the nitrogen compounds on foaming properties of sparkling wines. *Food Chemistry* 70, 309-317.
- Núñez, Y.P., Carrascosa, A.V., González, R., Polo, M.C., and Martínez-Rodríguez, A.J. (2005). Effect of accelerated autolysis of yeast on the composition and foaming properties of sparkling wines elaborated by a champenoise method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 7232-7237.
- Núñez, Y., Carrascosa, A., Gonzalez, R., Polo, M., and Martínez-Rodríguez, A. (2006). Isolation and characterization of a thermally extracted yeast cell wall fraction potentially useful for improving the foaming properties of sparkling wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 7898-7903.

- Pérez, F., Regodón, J., Valdés, M., De Miguel, C., and Ramírez, M. (2000). Cycloheximide resistance as marker for monitoring yeasts in wine fermentations. *Food Microbiology* 17, 119-128.
- Pozo-Bayon, M., Hernandez, M., Martin-Alvarez, P., and Polo, M. (2003). Study of low molecular weight phenolic compounds during the aging of sparkling wines manufactured with red and white grape varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 2089-2095.
- Pueyo, E., Martín-Alvarez, P.J., and Polo, M.C. (1995). Relationship between foam characteristics and chemical composition in wines and cava (sparkling wines). *American Journal of Enology and Viticulture* 46, 518-524.
- Ramírez, M., Pérez, F., and Regodón, J. (1998). A simple and reliable method for hybridization of homothallic wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Environmental Microbiology* 64, 5039-5041.
- Ramírez, M., Regodón, J.A., Pérez, F., and Rebollo, J.E. (1999). Wine yeast fermentation vigor may be improved by elimination of recessive growth-retarding alleles. *Biotechnology and Bioengineering* 65, 212-218.

CONCLUSIONES

1. Las nuevas levaduras *Torulaspota delbrueckii* killer Kbarr tienen un amplio espectro de acción. Matan a todos los tipos de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* conocidos, killer y sensibles, además de muchas otras especies de levaduras no-*Saccharomyces*, lo que las postula como útiles para eliminar levaduras contaminantes indeseables en la industria alimentaria y en la prevención de infecciones fúngicas.
2. Las levaduras *T. delbrueckii* killer con fenotipo más intenso fueron las Kbarr-1 frente a K2 a pH 4,7 y 12°C, que además resultaron ser las más resistentes a todas las demás levaduras killer ensayadas, por lo que podrían ser recomendadas para su uso en fermentaciones industriales en el caso de problemas frecuentes con levaduras killer silvestres. El receptor de la pared celular de las levaduras sensibles a la toxina Kbarr-1 parece ser el beta-glucano, igual que se ha descrito para las toxinas K1 y K2 y se ha sugerido para Klus de *S. cerevisiae*.
3. Las nuevas levaduras *T. delbrueckii* killer Kbarr contienen en su interior virus con genomas de dsRNA de tamaño mediano (TdV-Mbarr), cuya longitud varía de 1,3 a 1,7 kb, y poseen un patrón característico de restricción del DNA mitocondrial que permiten profundizar en su identificación mediante el análisis de polimorfismos moleculares. Esto es útil para su monitorización en bodega con la finalidad de determinar su grado de participación en las fermentaciones industriales.
4. El fenotipo killer de estas levaduras está codificado en el genoma de dsRNA de un virus M, TdV-Mbarr, con una parte no codificante con fragmentos de secuencias idénticas a las de otros virus M de levaduras, indicando un origen filogenético común. La secuencia teórica de aminoácidos de la pre-pro-toxina Kbarr-1 muestra una organización similar a la de otras pre-pro-toxinas killer. Esto sugiere que esta toxina, al igual que otras toxinas de *S. cerevisiae*, se sintetiza como una preprotoxina que pierde su péptido señal y se procesa proteolíticamente a lo largo de la ruta secretora pudiendo originar una heterotoxina madura con dos posibles subunidades como las toxinas K1 o K28. Este virus M se comporta como un virus satélite y acompaña siempre a un virus helper, TdV-LAbarr, que pertenece a la misma familia que el virus LA de *S. cerevisiae* o es una variante más del mismo virus.
5. La producción de levaduras *Torulaspota* en los medios habituales de laboratorio y la industria resultó más complicada que la de *Saccharomyces*, porque crecen más lentamente y pierden más viabilidad a medida que el cultivo envejece. La producción de levaduras *Torulaspota* resulta interesante si se alarga el tiempo de cultivo al menos hasta tres días, con el consiguiente incremento en los costes de producción.
6. Las levaduras *T. delbrueckii* killer Kbarr pudieron dominar la fermentación de vino blanco co-inoculadas con *Saccharomyces*, mientras que las mismas levaduras no-killer fueron fácilmente desplazadas por las levaduras *Saccharomyces* con mayor vigor fermentativo. La inoculación secuencial de levaduras *Torulaspota* seguida de *Saccharomyces* no aseguró una participación importante de *Torulaspota* en el proceso de fermentación y no resultó en mejoras

evidentes de la calidad del vino blanco o tinto. La inoculación inicial y exclusiva del mosto con levaduras *Torulaspota killer* Kbarr permitió la dominancia de estas levaduras durante toda o la mayor parte de la fermentación y originó vinos secos con distinto perfil aromático que los elaborados con levaduras *Saccharomyces*, que fueron de calidad más apreciada cuando se trató de vinos tintos muy estructurados elaborados con uva Cabernet-Sauvignon o Tempranillo. En los vinos tintos poco estructurados y blancos se detectaron notas de evolución que fueron consideradas negativas para la calidad del vino, probablemente debido a que demasiada presencia de *Torulaspota* hasta el final de fermentación de estos vinos venció su poca estructura hasta deteriorarlos.

7. Las diferencias en la cantidad de varios compuestos aromáticos entre los vinos de *Torulaspota* y *Saccharomyces* se correspondieron muy bien con las diferencias aromáticas encontradas por los catadores, aunque el grado de preferencia de los vinos solo se puede explicar si se toma adicionalmente en consideración algunos de los parámetros generales como concentración de málico, láctico y azúcar; además del efecto negativo de compuestos como el ácido isobutírico.

8. En la elaboración de cava, las levaduras *Saccharomyces* fueron muy eficaces alcanzando 6 o más atms de presión a los 30 días de segunda fermentación. El incremento de temperatura de 12 a 18°C durante los primeros 15-30 días y el aporte extra de nitrógeno, fueron determinantes para acelerar la fermentación y el efecto killer en los tirajes de *Saccharomyces*. La mezcla killer de levaduras *Saccharomyces* “EX229 (Klus) + Rod23-1B (K2)” resultó una buena estrategia para aumentar el número de células destrozadas (indicativo de efecto killer real) durante los primeros días de fermentación, con el consiguiente aumento de espuma y calidad organoléptica a los 9 meses de crianza. Por el contrario, las levaduras *Torulaspota* mostraron poco vigor fermentativo y poca viabilidad en estas condiciones de alta presión y baja temperatura, y no completaron la segunda fermentación del cava sin la presencia de levaduras *Saccharomyces*.

9. Parece que la espuma y la calidad organoléptica del cava dependan más de la liberación del metaboloma de las levaduras dañadas/muertas que de la cantidad de proteínas o polisacáridos procedentes de la degradación de las paredes de las células muertas y de los distintos compuestos aromáticos, tanto considerados individualmente como agrupados por familias; y que esta liberación se puede incrementar o acelerar con la presencia de efecto killer durante la fermentación, provocando una liberación anticipada de compuestos variables según la composición coyuntural del muy regulado metaboloma de las levaduras.

