

ORIGINAL

Uso de levaduras Killer *Torulaspora delbrueckii* en la elaboración de vino base y cava

Rocío Velázquez^{1*}, Emiliano Zamora², María L. Franco², Alberto Martínez¹ y Manuel Ramírez¹.

¹ Universidad de Extremadura (Facultad de Ciencias del Departamento de Ciencias Biomédicas del Área de Microbiología) Avda de Elvas s/n, Edificio Antiguo Rectorado, 06071 Badajoz.

² Junta de Extremadura (Estación Enológica). 06200 Almendralejo.

*Email: rociovelazquez@unex.es.

Recibido 15 de abril de 2020 / Aceptado 25 de junio de 2020 / Publicado 1 de septiembre de 2020

RESUMEN

Las estirpes killer de *Torulaspora delbrueckii* se pueden utilizar para mejorar la dominancia de esta levadura durante la fermentación. En este trabajo se analiza su utilidad para elaborar vino base y cava. La estirpe *T. delbrueckii* killer dominó mejor la fermentación del vino que las no killer y dejó los vinos secos. La espuma de los vinos base de *T. delbrueckii* fue muy baja comparada con los vinos de *Saccharomyces cerevisiae*. Se encontraron correlaciones positivas significativas de los parámetros de espuma con las cantidades de ésteres de etilo C₄-C₁₆ y proteínas, y negativas con algunos alcoholes antiespumantes. La calidad organoléptica de los vinos base *T. delbrueckii* se consideró inapropiada para elaborar cava. Mientras que *S. cerevisiae* (sola o mezclada con *T. delbrueckii*) completó la segunda fermentación para producir cavas secos con alta presión de CO₂, *T. delbrueckii* no completó esta fermentación, dejando los vinos dulces y con baja presión de CO₂. La muerte debida a la presión de CO₂ fue mucho mayor en *T. delbrueckii* que en *S. cerevisiae*, lo que hizo irrelevante cualquier efecto asesino de *S. cerevisiae* sobre *T. delbrueckii*. No obstante, la calidad organoléptica de los cavas inoculados con mezclas de las dos especies de levaduras fue mejor que la de vinos inoculados exclusivamente con *S. cerevisiae*, y no se observó deterioro en la calidad de la espuma.

PALABRAS CLAVES

Levadura, killer, *Torulaspora delbrueckii*, cava, crianza, autólisis, espuma, aromas.

ABSTRACT

The *Torulaspora delbrueckii* killer strains can be used to improve the dominance of this yeast during fermentation. The present work analyzes its usefulness for spar-

ling-wine making (base wine and cava). *T. delbrueckii* killer strain dominated base-wine fermentation better than non-killer yeasts and produced dried wines. The foam of *T. delbrueckii* base wines was very low compared to that of *Saccharomyces cerevisiae*. Significant positive correlations of foam parameters were found with the amounts of C₄-C₁₆ ethyl esters and proteins, and negative with some antifoam alcohols. The organoleptic quality of *T. delbrueckii* base wines was considered inappropriate for cava making. While *S. cerevisiae* (alone or mixed with *T. delbrueckii*) completed the second fermentation to produce dry sparkling wines with high CO₂ pressure, *T. delbrueckii* alone did not complete this fermentation, leaving sweet wines with low CO₂ pressure. Death due to CO₂ pressure was much higher in *T. delbrueckii* than in *S. cerevisiae*, making any killer effect of *S. cerevisiae* on *T. delbrueckii* irrelevant. However, the organoleptic quality of the cava inoculated with mixtures of the two yeast species was better than that of wine inoculated exclusively with *S. cerevisiae*, and no deterioration in the quality of the foam was observed.

KEYWORDS

Yeast, killer, *Torulaspora delbrueckii*, sparkling wine, aging, autolysis, foam, aroma.

INTRODUCCIÓN

¿Por qué usar levaduras killer *Torulaspora* en primera (vino base) y segunda fermentación (cava)?

El uso de levaduras no-*Saccharomyces* está siendo muy recomendado para la elaboración de vinos debido a que puede mejorar su complejidad organoléptica, concretamente *Torulaspora delbrueckii* es la especie de levadura no-*Saccharomyces* más utilizada después de *Saccharomyces cerevisiae* en la industria de vino. Se trata de

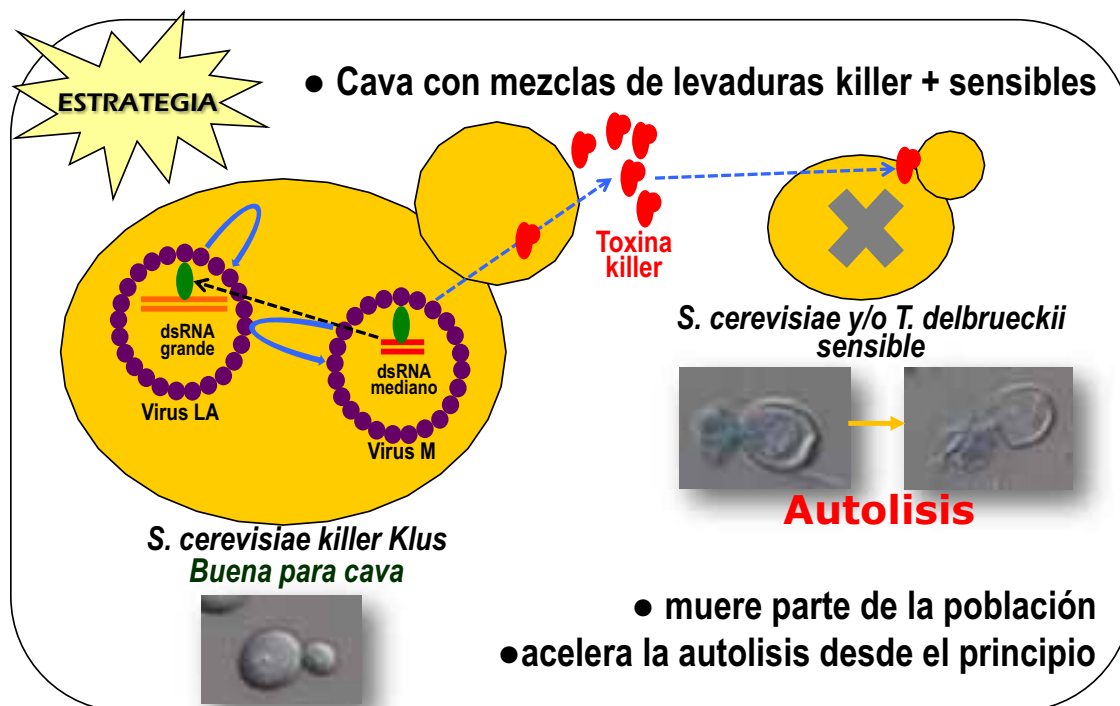


Figura 1. Esquema de la estrategia utilizada para acelerar la autólisis de levaduras de vino sensibles al fenotipo killer. El fenotipo asesino está codificado en virus de RNA de doble cadena ubicados en el citoplasma de las levaduras. Las levaduras asesinas secretan una toxina proteica que mata a levaduras sensibles. Esta estrategia parte de una hipótesis planteada en un estudio previo con levaduras *S. cerevisiae* (Velázquez et al., 2016).

una levadura en forma de torula que es más pequeña y crece algo más lenta respecto a *S. cerevisiae*, pero tiene ventajas tecnológicas interesantes para elaborar vinos tranquilos. Su utilidad ha quedado constatada en varios trabajos publicados, puede disminuir la acidez volátil y los niveles de acetaldehído de los vinos e incrementar algunos aromas interesantes a fruta seca y de pastelería (1-7). Además, recientemente se ha comprobado que la inoculación secuencial de *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae* incrementa la concentración de glicerol, reduce la acidez volátil y ejerce un efecto positivo en las propiedades de la espuma de los vinos bases para elaborar vinos espumosos (8).

En vinos espumosos como el cava, la formación y estabilidad de la espuma son características organolépticas muy importantes valoradas por los consumidores. Se ha descrito que la espuma del cava depende en gran medida de su contenido en proteínas y manoproteínas, fundamentalmente la estabilidad de la espuma (9, 10). También se ha descrito que la altura máxima de la espuma (HM) correlaciona negativamente con ácidos grasos C_8 , C_{10} y C_{12} , y positivamente con los ésteres etílicos de los ácidos grasos C_6 , C_8 y C_{10} (11). Estos estudios se han realizado con cavas elaborados íntegramente con levaduras *Saccharomyces*. Muy pocos estudios se han realizados con cavas elaborados con levaduras no-*Saccharomyces* como *Torulaspota* (8). Con carácter previo a este trabajo,

en un estudio realizado por el grupo de investigación MICROENO de la Universidad de Extremadura y la D.O. Ribera del Guadiana, se aislaron dos nuevos tipos de levaduras vínicas killer: las levaduras *S. cerevisiae* Klus, y *T. delbrueckii* Kbarr. Lo interesante de las toxinas de estas levaduras es que, al contrario del resto de toxinas conocidas de *S. cerevisiae*, tienen un espectro antifúngico mucho más amplio, matando incluso a especies de levaduras patógenas y contaminantes perjudiciales frecuentes en las fermentaciones industriales (12, 13). Además, las levaduras *T. delbrueckii* Kbarr tienen un fenotipo killer más intenso que todas las levaduras vínicas *S. cerevisiae* killer (K2 y Klus) analizadas. Estas características hacen pensar que estas levaduras killer puedan tener innovadoras aplicaciones en el control de las fermentaciones industriales de vinos espumosos, como ya ha sido demostrado para vinos tranquilos blancos y tintos (5, 7). El fenotipo killer está codificado fundamentalmente en virus de RNA de doble cadena ubicados en el citoplasma de las levaduras. Las levaduras killer secretan una toxina proteica que mata a levaduras sensibles. Una alternativa para acelerar la autólisis de las levaduras consiste en utilizar mezclas de levaduras killer y sensibles como inóculos en la segunda fermentación de cava. La toxina killer puede matar a las células sensibles y acelerar su autólisis (14). Esta estrategia no ha sido probada a nivel de bodega hasta muy recientemente (Fig.1). En este trabajo se

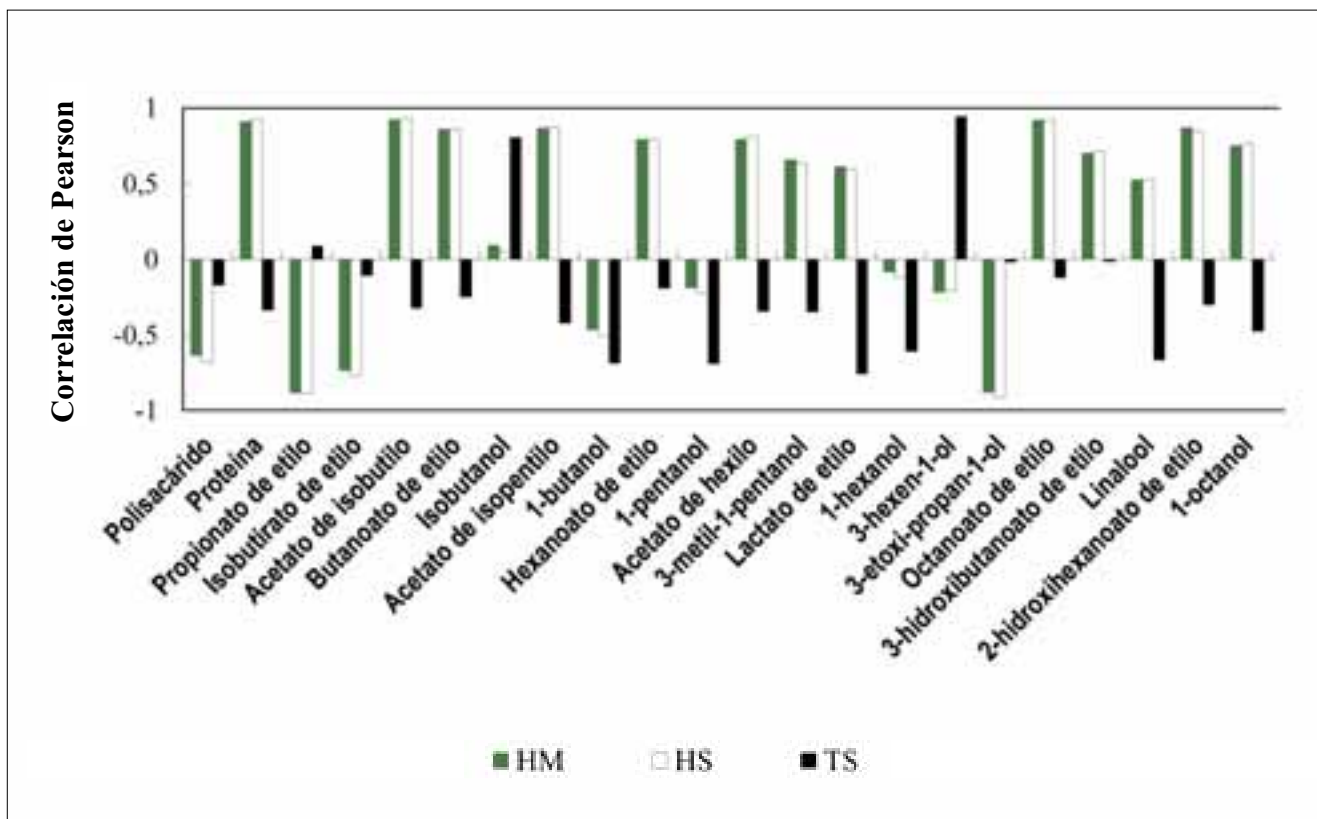


Figura 2. Coeficientes de correlación de Pearson con significación estadística entre polisacárido, proteínas y 42 compuestos aromáticos con los parámetros de espuma (HM, altura máxima; HS, altura de estabilidad; TS, tiempo de estabilidad) de los vinos base elaborados con levaduras *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii*. La correlación (bilateral) se consideró significativa al nivel 0,01 ó 0,05.

demonstró que la inoculación con cultivos mixtos de levaduras *S. cerevisiae* killer provoca la muerte celular y la autólisis temprana de las levaduras sensibles durante la elaboración de cava, sin afectar negativamente a la cinética de fermentación ni al consecuente incremento de presión, mejorando la espuma y la calidad organoléptica del cava (15). Con el objetivo de complementar estos resultados, es interesante analizar la utilidad de estirpes killer de *T. delbrueckii* Kbarr, que pueden dominar la fermentación del mosto (5, 7), para elaborar vino base y cava. Además, dado que el efecto killer puede mejorar la autólisis de la levadura y la calidad del cava (15), también procede analizar la utilidad de estirpes sensibles de *T. delbrueckii*. En este trabajo se analiza la capacidad de *T. delbrueckii* (killer y sensibles) para dominar y completar la fermentación del vino base, la capacidad de *T. delbrueckii* para realizar la segunda fermentación de vino espumoso a alta presión de CO₂, y el perfil aromático y las propiedades espumantes de vino base y cava elaborado con *T. delbrueckii* en comparación con *S. cerevisiae*.

MATERIAL Y MÉTODOS

En primer lugar, se elaboró vino base inoculando con estirpes killer y sensibles de *T. delbrueckii* o *S. cerevisiae*. Se utilizaron dos estirpes de *T. delbrueckii*, EX1180-11C4 (killer Kbarr-1 y resistente a cicloheximida, cyh^R), y EX1180-2K (no-killer, cyh^R), y dos de *S. cerevisiae*, E7AR1 (killer K2, cyh^R) y EX85R (no-killer, cyh^R). Las fermentaciones se realizaron con mosto muy bien desfangado (<100 NTU) de la variedad Macabeo. La segunda fermentación del cava se realizó con una mezcla de los vinos base elaborados con *S. cerevisiae*, inoculando con *S. cerevisiae* EX229 (killer Klus y sensible a cicloheximida, cyh^S), *T. delbrueckii* EX1180-2K y mezcla de las dos anteriores (EX229 + EX1180-2K). Previo al tiraje, las levaduras se crecieron en YEPD, se concentraron 10x y se adaptaron al crecimiento en vino base. Al vino base se le añadió 24 g/L de azúcar y 0,2 g/L de diamonio fosfato. Se realizó el tiraje en botellas de 0,75 L con obturador de plástico y tapón de corona, inoculando 1-4x10⁶ células/mL de *S. cerevisiae*, y/o 2-4x10⁷ de *T. delbrueckii*, y se incubaron

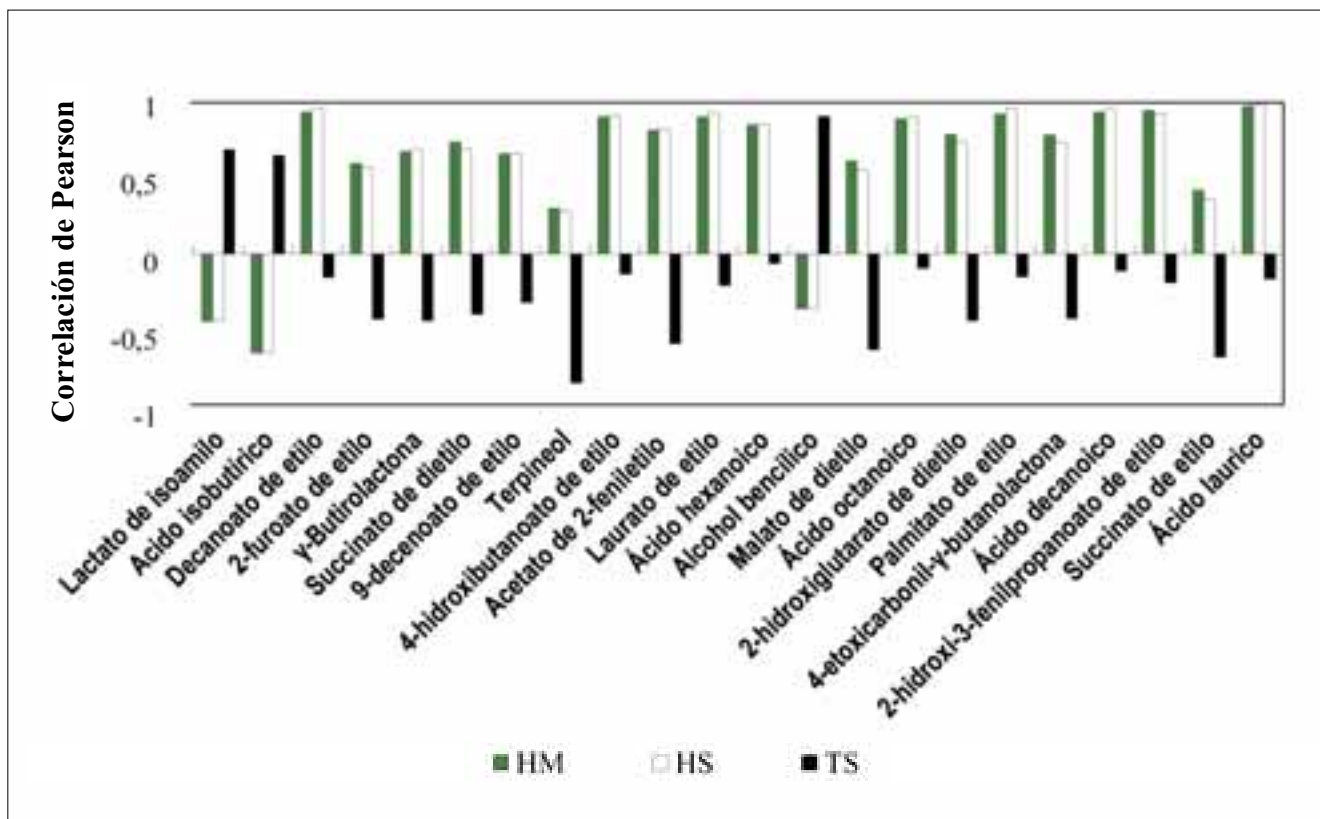


Figura 2 (continuación). Coeficientes de correlación de Pearson con significación estadística entre polisacárido, proteínas y 42 compuestos aromáticos con los parámetros de espuma (HM, altura máxima; HS, altura de estabilidad; TS, tiempo de estabilidad) de los vinos base elaborados con levaduras *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii*. La correlación (bilateral) se consideró significativa al nivel 0,01 ó 0,05.

a 18-19°C durante los primeros 15 días, para incrementar el efecto killer que es más efectivo a esta temperatura, y después a 12-14° C hasta los 9 meses. A lo largo de la segunda fermentación se midió la presión (expresada en atm a 20 °C) usando un afrómetro acoplado al cuello de la botella. Se monitorizó la población de cada levadura analizando su resistencia a cicloheximida (cyh^R) mediante réplica en placas de YEPD suplementado con cicloheximida. La proporción de muerte celular se determinó por tinción con azul de metileno, los polisacáridos con el método del fenol-ácido sulfúrico, la manosa con un método desarrollado previamente (16), y proteínas con el método Bradford. Los volátiles minoritarios se midieron por cromatografía gases-masas en el Servicio de Análisis Elemental y Molecular de la Universidad de Extremadura (17), y los parámetros de la espuma con equipo Mosalux. El análisis organoléptico se realizó por catadores expertos en la Estación Enológica de Almedralejo. El análisis estadístico de los datos se realizó con test paramétrico ANOVA (p<0.05), correlación de Pear-

son y test Duncan, empleando el software SPSS versión 20.0 para Windows (Chicago, IL).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Influencia de levaduras killer *T. delbrueckii* en la fermentación y calidad del vino base

La cinética de fermentación de las levaduras *T. delbrueckii* fue en general más lenta que la de *S. cerevisiae*. No obstante, los vinos bases inoculados con *T. delbrueckii* killer dominaron más fácilmente la fermentación que las *T. delbrueckii* no-killer y dejaron los vinos secos. Los vinos de *T. delbrueckii* fueron claramente distintos a los de *S. cerevisiae*. Los catadores prefirieron estos últimos por ser más intensos y afrutados, aunque las diferencias en valoración no fueron estadísticamente significativas. Los vinos de *S. cerevisiae* fueron más espumógenos, tuvieron más proteínas y mejor espumabilidad (HM) y espuma estable (HS). Los vinos de *T. delbrueckii* resultaron más especiados, con más notas de crianza, más polisacáridos y mejor tiempo de estabili-

Parámetros	Levaduras			p ^a
	Sc	Td	Sc+Td	
Alcohol (% v/v)	11.4–0.01a	10.6–0.15b	11.3–0.32a	0.050
pH	3.16–0.01a	3.57–0.04c	3.28–0.07b	0.010
Acidez total (g/L)	5.82–0.05a	5.15–0.05b	5.35–0.05b	0.010
Acidez volátil (g/L)	0.27–0.02a	0.47–0.01b	0.44–0.01b	0.010
Glucosa+fructosa (g/L)	0.06–0.0a	7.4–0.1b	0.07–0.01a	0.000
Densidad (g/L)	989–0.0a	998–0.0b	992–0.0a	0.007
Presión (atm)	6.1–0.05a	3.2–0.90b	6.05–0.05a	0.000
Preferencia (%)	65–0.00a	47–1.50b	78–2.50c	0.000

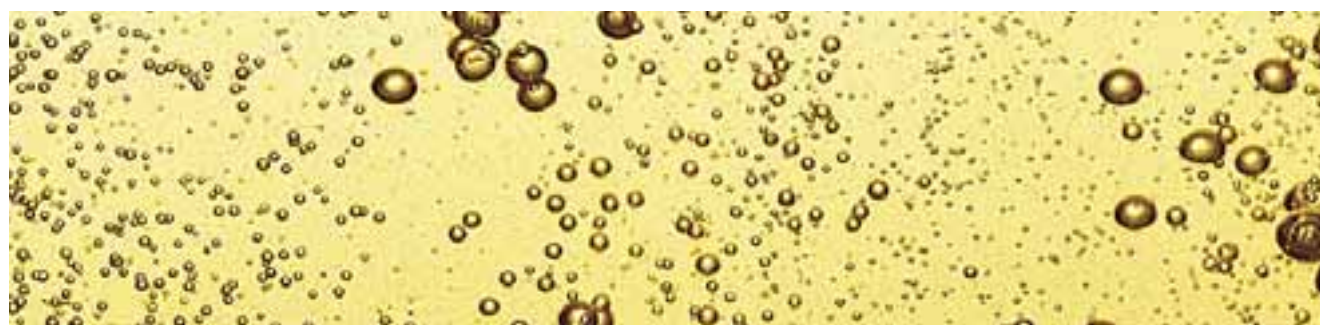
Tabla 1. Algunos parámetros relevantes y calidad organoléptica de los cavas elaborados con levaduras *S. cerevisiae* (Sc), *T. delbrueckii* (Td), o mezcla de ambas (Sc+Td). ^ap-Análisis de la varianza para estudiar el efecto de la inoculación del cava con distintas levaduras; a, b y c, indican diferentes grupos homogéneos con test Duncan, p≤0,05.

dad de la espuma (TS). La concentración de ésteres etílicos, ésteres de acetato, furanos, fenoles volátiles y ácidos orgánicos fue mayor en los vinos de *S. cerevisiae*, lo que explicaría su mayor intensidad aromática y su carácter más frutal. La mayor cantidad de proteínas también podría explicar su mayor espumabilidad, y su mayor cantidad de glicerol la menor estabilidad de la espuma. La mayor cantidad de alcoholes en vinos de *T. delbrueckii* puede explicar su menor espumabilidad, y su mayor cantidad de polisacáridos que la poca espuma que se forma sea más estable (datos no mostrados). En general, considerando todos los vinos en conjunto, hubo correlación positiva significativa de HM y HS con las proteínas y 31 compuestos aromáticos, fundamentalmente ésteres etílicos C₄-C₁₆; y del TS con varios alcoholes. La correlación de HM y HS con los polisacáridos fue negativa, al igual que del TS con otros 35 compuestos, fundamentalmente alcoholes (Fig. 2). Algunas

de estas correlaciones de la espuma con compuestos aromáticos ya ha sido descrita previamente para vinos espumosos, especialmente las correlaciones positivas con ésteres etílicos de C₄-C₁₆ (11, 15), poniendo de manifiesto que otros compuestos distintos a los polisacáridos y proteínas podrían estar implicados de forma importante en las propiedades de la espuma. Para continuar con la elaboración de cava, una mezcla de los vinos base de *S. cerevisiae* fueron utilizados para este fin. La calidad organoléptica de los vinos base de *T. delbrueckii* se consideró atípica para este propósito, no obstante estos vinos se consideraron de buena calidad y sin defectos.

Influencia de *T. delbrueckii* en la segunda fermentación y la calidad del cava

Las fermentaciones con *S. cerevisiae* (sola o mezclada con *T. delbrueckii*) fueron muy eficaces, alcanzando 6 o



Rocío Velázquez, Emiliano Zamora, María L. Franco, Alberto Martínez y Manuel Ramírez

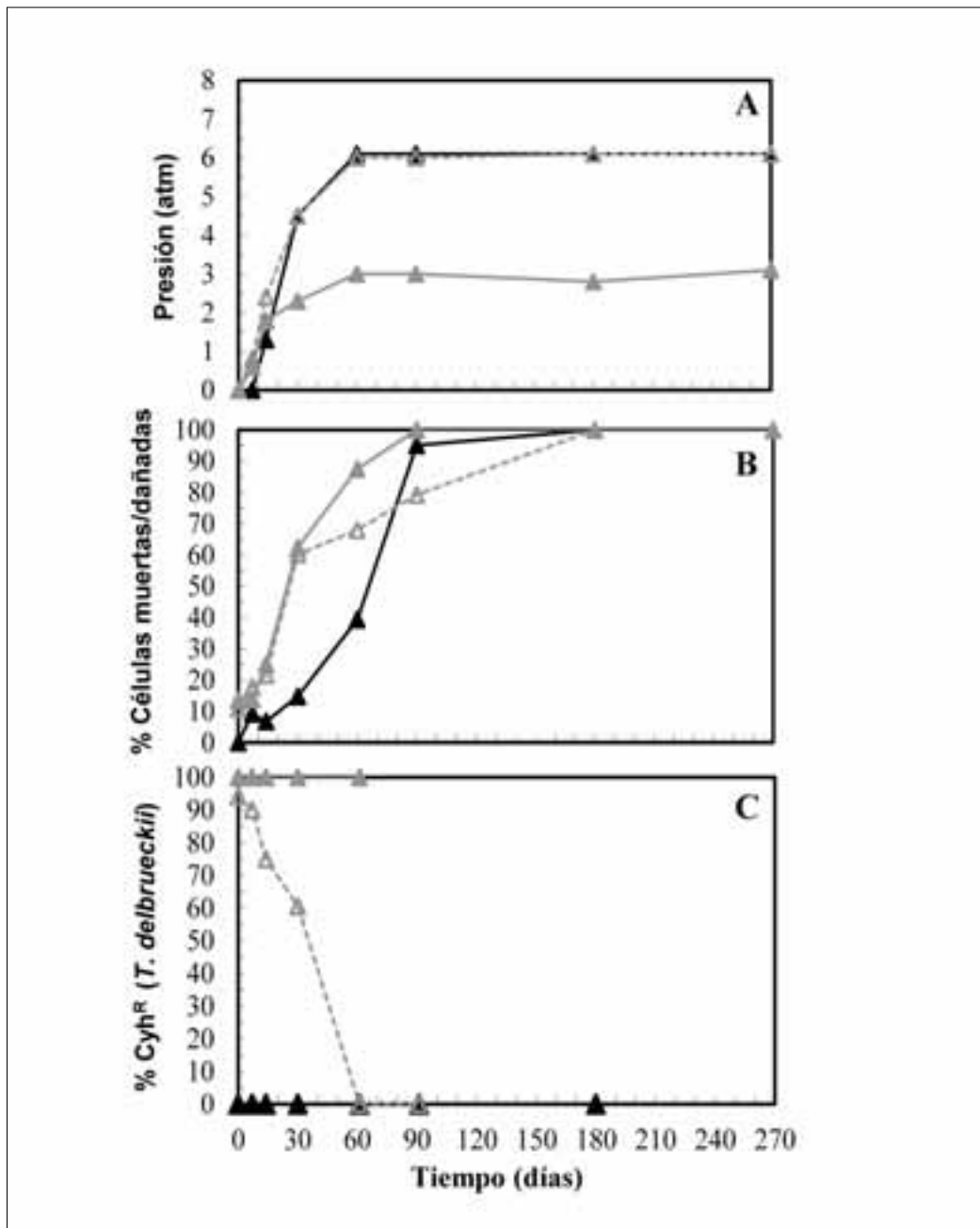


Figura 3. Evolución de la presión de CO₂ en botella (A), porcentaje de células muertas (B), y células *T. delbrueckii* resistentes a cicloheximida (C) de los cavas elaborados con levaduras *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii*. Símbolos: *S. cerevisiae* killer Klus (—▲—), *T. delbrueckii* sensible (—▲—), y *S. cerevisiae* killer Klus + *T. delbrueckii* sensible (—△—).

más atm de presión a los 60 días. Por el contrario, las levaduras *T. delbrueckii* mostraron poca viabilidad y no completaron la segunda fermentación en estas condiciones (Fig. 3A). El porcentaje de muerte celular fue siempre mayor en las fermentaciones con *T. delbrueckii*, sola o mezclada, y *S. cerevisiae* desplazó totalmente a *T. delbrueckii* a los 60 días (Figs. 3B y 3C). Los cavas de *S. cerevisiae* y *S. cerevisiae* + *T. delbrueckii* fueron vinos de

buena calidad, tal como indicaron los parámetros físico-químicos y el análisis organoléptico (Tabla 1). Los vinos con mezclas de *S. cerevisiae* + *T. delbrueckii* fueron además los más apreciados por su complejidad, mejor sensación en boca, notas de fruta pasificada, y agradable carácter envejecido. Por el contrario, los cavas de *T. delbrueckii* presentaron niveles bajos de presión, alcohol y acidez total, y mayores de acidez volátil, azúcares reduc-

tores y pH; lo que explica su baja puntuación en el análisis organoléptico (Tabla 1).

En general, los parámetros de espuma de los cavas fueron peores que los de vinos base (Fig. 4A). Los cavas de *S. cerevisiae* (sola o mezclada con *T. delbrueckii*) tuvieron el mejor HM, y los de *T. delbrueckii* (sola o mezclada con *S. cerevisiae*) mejor TS y mayor cantidad de polisacáridos totales y manano (Figs. 4A y B). Aunque no hubo diferencias en la cantidad de proteínas entre los tres tipos de cavas, en todos incrementó un 30% respecto al vino base (Fig. 4B). Estos datos sugieren que la cantidad de estos compuestos es menos relevante de lo que previamente se pensaba (9, 10), al menos en nuestras condiciones de trabajo. Tampoco se halló ninguna correlación entre las propiedades de la espuma y los compuestos aromáticos de los cavas, probablemente debido a que las diferencias de estos parámetros en estos cavas fue relativamente pequeña al provenir todos del mismo vino base. Por otro lado, sí hubo diferencias significativas en 15 de los 75 compuestos volátiles analizados: 7 compuestos más abundantes en cavas de *T. delbrueckii*, y 8 más abundantes en *S. cerevisiae* y *S. cerevisiae* + *T. delbrueckii*, principalmente ésteres etílicos responsables de aromas afrutados, y con un valor relevante de actividad odorante (VAO), como etil hexanoato, etil octanoato y β -damasce nona (Fig. 4C). Estos resultados son similares a lo previamente observado para vinos tranquilos (5, 7).

CONCLUSIONES

El fenotipo killer permitió a *T. delbrueckii* reducir o eliminar la presencia de levaduras silvestres durante la fermentación de mosto. No obstante, la menor calidad aromática y menor capacidad para formar espuma de sus vinos base hacen que esta levadura sea inapropiada para la elaboración de cava, aunque podría ser interesante para la elaboración de otro tipo de vinos. Además, la inoculación en exclusividad de *T. delbrueckii* no completó la segunda fermentación, lo que también desaconseja su uso para este propósito. Sin embargo, la inoculación mixta *S. cerevisiae* + *T. delbrueckii* en la segunda fermentación demostró ser una buena opción para mejorar la calidad organoléptica del cava, principalmente porque *T. delbrueckii* aumentó las cantidades de algunos compuestos interesantes y mejoró la estabilidad de la espuma.

AGRADECIMIENTOS

Proyectos GR18117 (Consejería de Economía, Ciencia y Agenda Digital, Junta de Extremadura), AGL2017-87635-

R (Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, Agencia Estatal de Investigación, Gobierno de España), y Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). Análisis de aromas realizado por el Servicio de Análisis Elemental y Molecular de la UEx (financiado por la UEx, Junta de Extremadura, MICINN, FEDER, and FSE).

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Azzolini, M., Fedrizzi, B., Tosi, E., Finato, F., Vagnoli, P., Scrinzi, C., Zapparoli, G., 2012. Effects of *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed cultures on fermentation and aroma of Amarone wine. *Eur. Food Res. Technol.* 235, 303–313.
- 2- Azzolini, M., Tosi, E., Lorenzini, M., Finato, F., Zapparoli, G., 2015. Contribution to the aroma of white wines by controlled *Torulaspora delbrueckii* cultures in association with *Saccharomyces cerevisiae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 31, 277–293.
- 3- Bely, M., Stoeckle, P., Masneuf-Pomarède, I., Dubourdieu, D., 2008. Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*–*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 122, 312–320.
- 4- Jolly, N.P., Augustyn, O.P.H., Pretorius, I.S., 2006. The effect of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 27, 15–39.
- 5- Ramírez, M., Velázquez, R., Maqueda, M., Zamora, E., López-Piñeiro, A., Hernández, L.M., 2016. Influence of the dominance of must fermentation by *Torulaspora delbrueckii* on the malolactic fermentation and organoleptic quality of red table wine. *Int. J. Food Microbiol.* 238, 311–319.
- 6- Renault, P., Miot-Sertier, C., Marullo, P., Hernández-Orte, P., Lagarrigue, L., Lonvaud-Funel, A., Bely, M., 2009. Genetic characterization and phenotypic variability in *Torulaspora delbrueckii* species: potential applications in the wine industry. *Int. J. Food Microbiol.* 134, 201–210.
- 7- Velázquez, R., Zamora, E., Alvarez, M.L., Hernández, L.M., Ramírez, M., 2015. Effects of new *Torulaspora delbrueckii* killer yeasts on the must fermentation kinetics and aroma compounds of white table wine. *Front. Microbiol.* 6, 1222.
- 8- González-Royo, E., Pascual, O., Kontoudakis, N., Esteruelas, M., Esteve-Zarzoso, B., Mas, A., Canals, J.M., 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. *Eur. Food Res. Technol.* 999–1012.

Rocío Velázquez, Emiliano Zamora, María L. Franco, Alberto Martínez y Manuel Ramírez

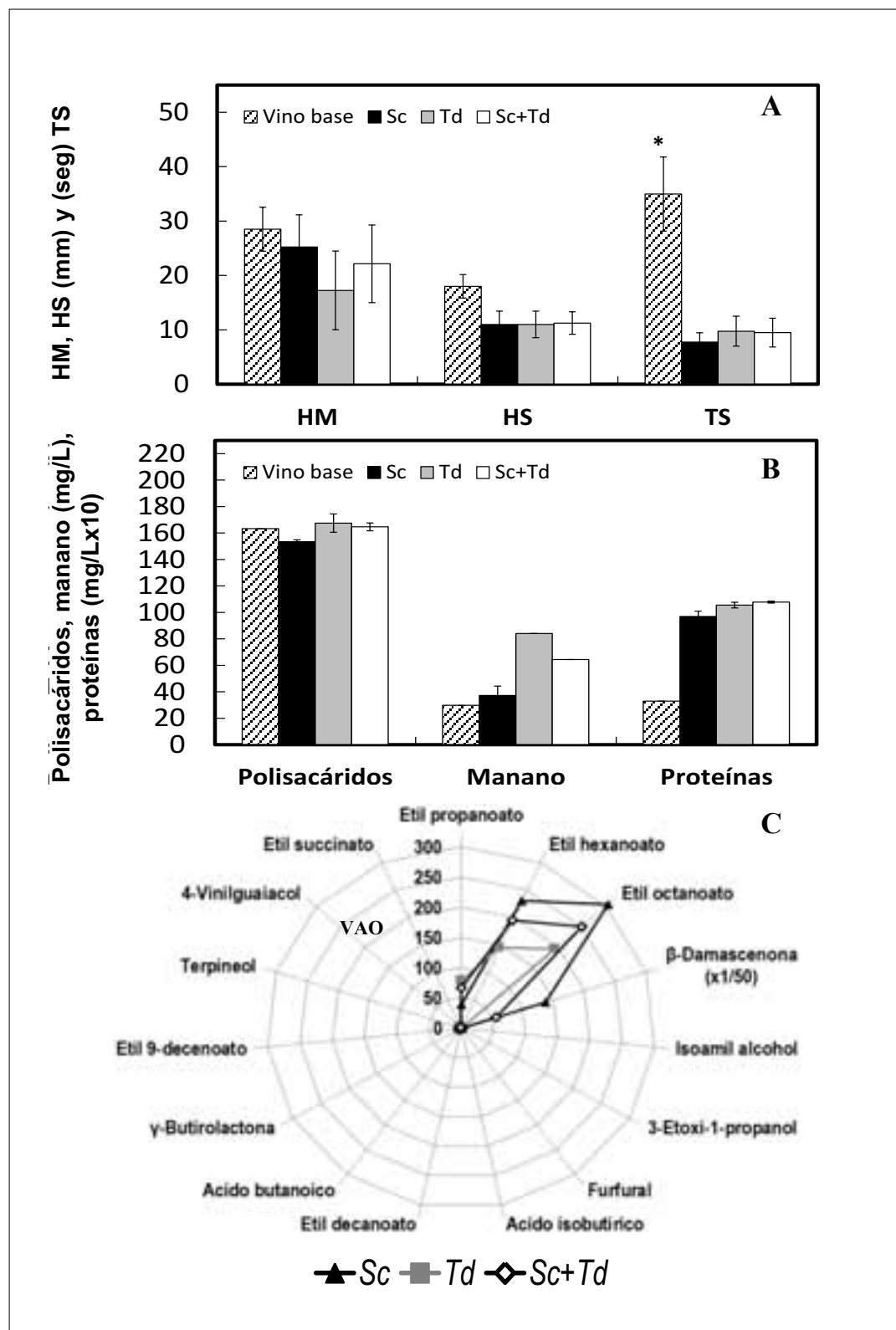


Figura 4. Análisis de los cavas elaborados con levaduras *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii*. (A) Parámetros de espuma. HM, altura máxima; HS, altura de estabilidad; TS, tiempo de estabilidad. *Valor TS del vino base dividido por diez. (B) Polisacáridos, manano y proteína. (C) Compuestos aromáticos para los que se encontraron diferencias significativas entre los vinos espumosos. Símbolos: *S. cerevisiae* killer Klus (\blacktriangle), *T. delbrueckii* sensible (\blacksquare), y *S. cerevisiae* killer Klus + *T. delbrueckii* sensible (\diamond).

Uso de levaduras Killer Torulaspora delbrueckii en la elaboración de vino base y cava

9- Brissonnet, F., and A. Maujean. 1993. Characterization of foaming proteins in a champagne base wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 44:297-301.

10- Vanrell, G., R. Canals, M. Esteruelas, F. Fort, J. M. Canals, and F. Zamora. 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.

11- Gallart, M., E. López-Tamames, G. Suberbiola, and S. Buxaderas. 2002. Influence of fatty acids on wine foaming. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:7042-7045.

12- Ramírez, M., Velázquez, R., Maqueda, M., López-Piñero, A., Ribas, J.C., 2015. A new wine *Torulaspora delbrueckii* killer strain with broad antifungal activity and its toxin encoding double-stranded RNA virus. *Front. Microbiol.* 6, 983.

13- Rodríguez-Cousiño, N., Maqueda, M., Ambrona, J., Zamora, E., Esteban, E., 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 1822-1832.

14- Todd, B. E., G. H. Fleet, and P. A. Henschke. 2000. 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.

15- Velázquez, R., Zamora, E., Álvarez, M.L., Álvarez, M.L., Ramírez, M., 2016. Using mixed inocula of new killer strains of *Saccharomyces cerevisiae* to improve the quality of traditional sparkling-wine. *Food Microbiol.* 59, 150-160.

16- Quiros, M., Gonzalez, R., Morales, P., 2012. A simple method for total quantification of mannoprotein content in real wine samples. *Food Chem.* 134, 1205-1210.

17- García-Carpintero, E.G., Sánchez-Palomo, E., González-Viñas, M.A., 2011. Aroma characterization of red wines from cv. Bobal grape variety grown in La Mancha region. *Food Res. Int.* 44, 61-70.

18- Velázquez, R.; Zamora, E.; Álvarez, M.L.; Ramírez, M. Using *Torulaspora delbrueckii* killer yeasts in the elaboration of base wine and traditional sparkling. *Int. J. Food Microbiol.* 2019, 289, 134-144.

BODEGAS VERUM. VINOS DE VERDAD.

Nuestros vinos son la fiel expresión de nuestra familia y de nuestra tierra, Castilla La Mancha. En Bodegas Verum sabemos que el esfuerzo, el trabajo honesto y el amor por lo auténtico son los mejores ingredientes para producir vinos de gran calidad, vinos de verdad.

VERUM
Hazlo de verdad

www.bodegasverum.com info@bodegasverum.com (+34) 926 511 404