



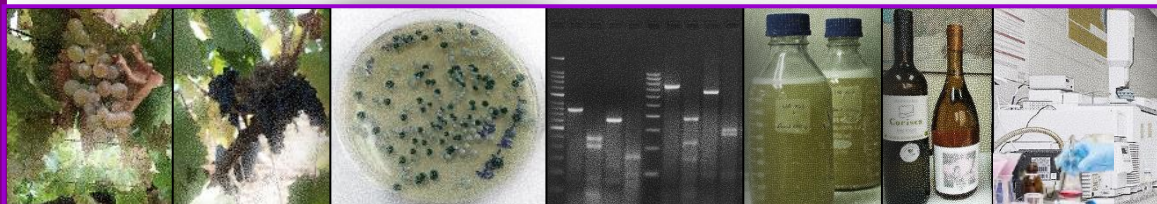
universidad
de león

- TESIS DOCTORAL -
PhD thesis (international mention)

Estudio de la diversidad de levaduras en uva de cultivo ecológico y convencional en Galicia: patrones biogeográficos e influencia en las características químicas y sensoriales del vino

David Castrillo Cachón

Study of yeast diversity in organic and conventional grapes from Galicia: biogeographic patterns and influence on the chemical and sensory characteristics of wine



- INGENIERÍA DE BIOSISTEMAS -

Directora: **Dra. Pilar Blanco Camba**

Tutor: **Dr. Juan José Rubio Coque**

León, 2018



universidad
de león

- TESIS DOCTORAL -
PhD thesis (international mention)

Pilar Blanco Camba, Doctora en Biología e Investigadora en la Estación de Viticultura e Enología de Galicia (EVEGA-AGACAL)

HAGO CONSTAR que esta tesis doctoral titulada "*Estudio de la diversidad de levaduras en uva de cultivo ecológico y convencional en Galicia: patrones biogeográficos e influencia en las características químicas y sensoriales del vino*" y realizada por David Castrillo Cachón bajo mi dirección en la EVEGA-AGACAL dentro del programa de doctorado *Ingeniería de Biosistemas*, está finalizada y autorizo su presentación para la defensa y obtención del título de Doctor.

En Leiro (Ourense) a 8 de octubre de 2018

Fdo: Pilar Blanco Camba

*A todos los que
como yo en su momento
no pudimos iniciar
una tesis,*

*Y a los que alguna vez quiebran tus alas
y sugieren
que no lo conseguirás.*

A mi familia, especialmente
a Aida y Dani

A mi buen amigo Sergio
Vélez por ser la razón de
iniciar este camino

A mi directora Pilar y a
todos aquellos que hemos
compartido tiempo y
conocimiento en la EVEGA:
a mi amigo desde entonces
Rodrigo por su talento, a
Eva, Noemi, Mónica, Mar,
María... Por su gran apoyo
y trabajo en micro. A los
doctores/as Yoli, Emilia,
Emiliano, Jose... A los/las de
química: Dani, Mónica,
Pilar, Elvira, Mariajo... A
los/las de viticultura,
campo y bodega: Ángela,
María, Pili, Tino, Mikel,
Manuel... A Maria José,
Mimi y Juan... A Andrea, a
mis amigos y a todos
aquellos que he conocido
dentro y fuera de la EVEGA,
en las estancias nacionales e
internacionales (Marco,
Lorenzo, Alice, Laura,
Mikhayla, Vasilis, Mar...)
por su afecto y ayuda.

Thanks to Bauer FF. and
Varela C. for drawing up the
report for international
mention.

Este estudio fue financiado por el proyecto RTA2012-00021-C03-01 del INIA (Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agroalimentaria) cofinanciado con fondos FEDER. David Castrillo agradece al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), a la Axencia Galega de Calidade Alimentaria AGACAL, al Fondo Social Europeo y al Fondo Europeo de Desarrollo Regional su contrato predoctoral FPI. Gracias a los productores Esther Teixeira Lemos, Roberto Regal, Cooperativa Cume do Avia, Víctor Diéguez, Begoña Troncoso, María del Carmen Álvarez, José Luis Mateo y José dos Santos Diz por permitirnos recoger muestras en sus explotaciones y a las bodegas de producción ecológica Adega Beatriz, Corisca, Cume do Avia, Diego de Lemos, Pazo de Vieite y Quinta da Muradela, por permitirnos tomar muestras en sus instalaciones. Gracias a los Consellos Reguladores de las Denominaciones de Origen Monterrei, Rías Baixas, Ribeira Sacra, Ribeiro Valdeorras y a las bodegas que amablemente facilitaron las muestras de vino.

Abreviaturas

Alb: variedad de uva Albariño
Bra: variedad de uva Brancellao
Con: convencional, de producción convencional
DO: Denominación de Origen
DOs: Denominaciones de Origen
Eco: ecológico, de producción ecológica
FA: fermentación alcohólica
Fi: fase inicial de la fermentación
Ff: fase final de la fermentación
FML: fermentación maloláctica
Ft: fase tumultuosa de la fermentación
Men: variedad de uva Mencía
Mo: Denominación de Origen Monterrei
NLV/mL: número de levaduras viables por mililitro
Org: ecológica/o (del inglés organic)
Ri: Denominación de Origen Ribeiro
RB: Denominación de Origen Rías Baixas
RS: Denominación de Origen Ribeira Sacra
Trx: variedad de uva Treixadura
UFC/mL: unidades formadoras de colonia por mililitro
VD: Denominación de Origen Valdeorras

Codificación UNESCO

Conforme a lo establecido en el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, el código UNESCO en el que mejor se puede englobar esta tesis doctoral es: 330992 BIOQUÍMICA Y MICROBIOLOGÍA DE LOS PROCESOS FERMENTATIVOS.

Índice

Abreviaturas	5
Codificación UNESCO	5
Summary; PhD thesis (international mention)	10
Introduction	10
Justification and aims	13
Methodology	14
Results and discussion	19
Conclusions	32
Prospects for the future	34
Acknowledgments	34
References	35
Resumen	38
1. Introducción	41
1.1. La vitivinicultura ecológica en la actualidad	41
1.1.1. La vitivinicultura ecológica en el mundo, Europa y España	41
1.1.2. Particularidades de la vitivinicultura ecológica y legislación vigente	42
1.2. Efectos de la producción ecológica en la vitivinicultura	43
1.2.1. Efecto de la producción ecológica sobre la diversidad microbiana de la uva	44
1.2.2. Efecto de la producción ecológica sobre la composición química y la calidad del vino	45
1.2.3. Efecto de la producción ecológica sobre las propiedades saludables del vino y la percepción de los consumidores	47
1.3. Papel de las levaduras en la elaboración de los vinos	48
1.3.1. Origen de las levaduras presentes en la vinificación	48
1.3.2. Dinámica de la población de levaduras en la vinificación	51
1.3.3. Transformaciones bioquímicas e interacciones de microorganismos en la vinificación	53
1.3.4. Efecto de la fermentación espontánea o dirigida por levaduras autóctonas sobre las características químicas y sensoriales del vino	55
1.4. Perfil aromático y sensorial de los vinos	56
1.4.1. Principales compuestos aromáticos de la uva y el vino	58
1.4.2. Metabolismo de las levaduras: contribución al perfil aromático y sensorial de los vinos	59
1.4.3. Contribución de la microbiota oral a la percepción del aroma del vino	66
1.5. La diferenciación, tipicidad y calidad de los vinos	66
1.5.1. Las levaduras como recurso microbiano en la diferenciación de los vinos	66
1.5.2. Contribución de las levaduras no- <i>Saccharomyces</i> a la calidad y tipicidad de los vinos	67
1.5.3. Particularidades de la inoculación de cepas no- <i>Saccharomyces</i>	70
1.5.4. El concepto de terroir microbiano y la tipicidad de los vinos	71
1.5.5. Levaduras alterantes de la calidad de los vinos	73
1.6. La viticultura ecológica y el sector del vino en Galicia	74
1.6.1. Principales variedades de vid de cultivo tradicional en Galicia	75
2. Justificación y objetivos	79
3. Material y métodos	82

3.1. Origen de las uvas y diseño del muestreo	82
3.1.1. Datos climatológicos de las zonas de muestreo	82
3.1.2. Selección y características de las parcelas	84
3.2. Procesamiento de las muestras y análisis realizados	86
3.3. Análisis microbiológico	87
3.3.1. Medios de cultivo	87
3.3.2. Recuento y aislamiento de levaduras en uva, mosto y fermentación procedentes del viñedo	88
3.3.3. Recuento y aislamiento de cepas de <i>S. cerevisiae</i> en bodegas de producción ecológica	89
3.3.4. Caracterización tecnológica de las cepas de <i>S. cerevisiae</i> aisladas en bodegas de producción ecológica	90
3.3.5. Análisis microbiológico de vinos ecológicos y convencionales de las cinco DOs de Galicia	90
3.3.6. Identificación genética de las levaduras	91
3.4. Análisis químico	94
3.4.1. Análisis químico de la riqueza fenólica de la uva (Cromoenos)	94
3.4.2. Análisis químico de los mostos	95
3.4.3. Análisis químico de los vinos	95
3.4.4. Análisis de compuestos volátiles en vinos por cromatografía de gases (detección FID-MS)	95
3.5. Fermentaciones	97
3.5.1. Fermentaciones espontáneas naturales de mosto ecológico y convencional	97
3.5.2. Diversidad de levaduras <i>S. cerevisiae</i> en bodegas de producción ecológica	98
3.5.3. Fermentación de mosto Treixadura con levaduras no- <i>Saccharomyces</i> autóctonas de Galicia	99
3.5.4. Fermentación en bodega con las cepas de las levaduras seleccionadas	100
3.6. Análisis sensorial de los vinos	100
3.6.1. Análisis sensorial de vinos ecológicos y convencionales	100
3.6.2. Fichas de cata y proceso de evaluación	102
3.6.3. Análisis de las propiedades sensoriales de los vinos elaborados en EVEGA mediante inoculación secuencial de levaduras no- <i>Saccharomyces</i> y <i>Saccharomyces</i>	105
3.7. Análisis estadístico.	105
3.7.1. Análisis de varianza (ANOVA de una vía).	105
3.7.2. Índices de biodiversidad (H', 1-D, E)	106
3.7.3. Análisis de similaridad (ANOSIM de una y dos vías)	106
3.7.4. Análisis de porcentajes de similaridad (SIMPER)	107
3.7.5. Análisis no paramétrico PERMANOVA (NPMANOVA) de una y dos vías	107
3.7.6. Análisis de Componentes Principales (ACP) y Análisis de Correspondencias (AC)	108
3.7.7. Análisis de Coordenadas Principales (ACoP)	108
3.7.8. Análisis de Correspondencia Canónica (ACC)	108
3.7.9. Análisis de correlación (Pearson) y regresión lineal de mínimos cuadrados (PLS)	109
3.7.10. Análisis de conglomerado jerárquico: dendrogramas y árboles filogenéticos	109
3.7.11. Análisis estadístico de los compuestos volátiles	109
3.7.12. Análisis estadístico de los datos obtenidos en el análisis sensorial	110
4. Resultados y discusión	113
4.1. Influencia del sistema de producción sobre las características de los mostos	113
4.1.1. D.O. Monterrei: variedades Treixadura y Mencía	113
4.1.2. D.O. Ribeiro: variedades Treixadura y Brancellao	114
4.1.3. D.O. Ribeira Sacra: variedad Mencía	115
4.1.4. D.O. Rías Baixas: variedades Albariño y Treixadura	116

4.1.5. Caracterización fenólica de uvas tintas de cultivo ecológico y convencional	118
4.2. Diversidad de levaduras en uva, mosto y fermentación: influencia del sistema de producción	122
4.2.1. Influencia del sistema de cultivo en la población de levaduras en mostos: evaluación cuantitativa	122
4.2.2. Influencia del sistema de cultivo en la riqueza de especies de levadura	126
4.2.3. Diversidad de levaduras a nivel cualitativo: presencia de las distintas especies	131
4.2.4. Frecuencia de las especies de levadura en uva y mosto: índices de biodiversidad y distribución biogeográfica	135
4.2.5. Contribución de las distintas especies de levaduras a la diversidad: análisis SIMPER	143
4.2.6. Influencia de los factores año, variedad, DO y sistema de cultivo sobre la población de levaduras	146
4.2.7. Representación gráfica de la distribución de las levaduras (ACP) y (ACoP)	155
4.2.8. Influencia de las condiciones climáticas sobre la diversidad de levaduras	161
4.3. Cinética fermentativa y de la dinámica de la población de levaduras en fermentaciones naturales de mosto de producción ecológica y convencional.	169
4.3.1. DO Monterrei	169
4.3.2. DO Ribeiro	173
4.3.3. DO Ribeira Sacra: variedad Mencía	176
4.3.4. DO Rías Baixas	178
4.4. Análisis de los vinos obtenidos mediante fermentación natural de mostos de producción ecológica y convencional	185
4.4.1. DO Monterrei: variedades Treixadura y Mencía	185
4.4.2. DO Ribeiro: variedades Treixadura y Brancellao	186
4.4.3. DO Ribeira Sacra: variedad Mencía	187
4.4.4. DO Rías Baixas: Albariño y Treixadura	188
4.5. Diversidad de levaduras en fermentaciones espontáneas en bodegas gallegas de producción ecológica	192
4.5.1. Frecuencia de las distintas cepas de <i>S. cerevisiae</i> en las bodegas	198
4.5.2. Contribución de las distintas cepas de <i>S. cerevisiae</i> a la diversidad: análisis SIMPER	200
4.5.3. Distribución de las cepas de <i>S. cerevisiae</i> en las distintas bodegas; análisis gráficos	201
4.5.4. Dinámica de la población de levaduras durante la fermentación en Cume do Avia/PV	203
4.5.5. Carácter killer y producción de ácido sulfhídrico de las cepas de <i>S. cerevisiae</i>	208
4.6. Análisis sensorial de vinos comerciales ecológicos y convencionales	210
4.6.1. Análisis sensorial de los vinos de las distintas Denominaciones de Origen.	210
4.6.2. Análisis sensorial de los vinos de 2014: particularidades de una campaña climatológicamente desfavorable	214
4.6.3. Análisis microbiológico de los vinos sometidos a evaluación sensorial	216
4.7. Fermentación de mostos de la variedad Treixadura con levaduras no- <i>Saccharomyces</i> autóctonas de Galicia	217
4.7.1. Caracterización enológica preliminar de levaduras no- <i>Saccharomyces</i> autóctonas	217
4.7.2. Ensayo de inoculación secuencial en bodega	222
4.7.3. Caracterización química de los vinos	225
4.7.4. Caracterización aromática de los vinos	227
4.7.5. Evaluación sensorial de los vinos	240
5. Conclusiones/Conclusions	252
6. Perspectivas de futuro	256
7. Producción científica	259
8. Referencias/References	264

Summary; PhD thesis (international mention)

Summary; PhD thesis (international mention)

Study of yeast diversity in organic and conventional grapes from Galicia: biogeographic patterns and influence on the chemical and sensory characteristics of wine

David Castrillo Cachón, 2018

Keywords: *organic vineyard, yeast diversity, microbial terroir, biogeographic patterns, non-Saccharomyces yeasts, wine typicality, sensory analysis.*

Introduction

Nowadays there is a global trend towards an increase in organic vitiviculture which is of great importance not only in environmental terms but also as a generator of added value. These practices contribute to obtain more sustainable and healthy products. Spain is the country with the largest vineyard in the world (which accounts for 14% of the world's total vineyard surface area and 30% of the European Union's total) and the third largest wine producer in the world (OIV, 2017). In addition, Spain has the largest area of organic vineyards in the world, and it experienced the highest sustainable growth in the last decade (European Commission, 2017). Galicia (NW Spain) is one of the most important viticultural regions in Spain where agricultural activity is of great importance, not only because of the socio-economic value it generates, but also because of the empowerment of rural environments and the role it plays in environmental conservation. However, despite the recognized boom of organic products, only in 78.2 ha organic production is certified (CRAEGA, 2017); that is, in less than 0.3% of the total vineyard in Galicia. Climatology of this region favours development of fungal diseases. In addition, orography, geology and soils are quite heterogeneous within this region, even at plot level. All these factors hinder production of organic grapes in the Galician community. On the other hand, Galicia owns many autochthonous grapevine varieties: most of them are of minority culture, but they constitute a great potential in the production of white and red wines.

Organic production requires specific agronomic practices, techniques of soil management, fertilization and pest control that differ from conventional production (REGULATIONS (EU) 2018/848; EU n° 203/2012; (EC) n° 889/2008; (EC) No. 834/2007). Organic farming has effect at different levels on biodiversity, the microbial population and the quality of the grapes obtained in the vineyard. At the winery, organic practices during the vinification process influence the chemical and sensory characteristics of the wine.

Microorganisms are the most abundant living beings on Earth with a central role in basic ecological processes of the ecosystems. Therefore, their diversity must be conserved. Yeasts are essential in winemaking, and their knowledge plays an important role in the differentiation of the final product.

More than 100 different genera of yeasts are known; however, wine yeasts present significantly in the grape, must, and proper environments of wine elaboration represent less than twenty genera. These include *Aureobasidium*, *Hanseniaspora/Kloeckera*, *Metschnikowia*, *Candida*, *Starmerella*, *Pichia*, *Hansenula*, *Issatchenkia*, *Torulaspota*, *Rhodotorula*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Brettanomyces/Dekkera*, *Cryptococcus*, *Saccharomyces*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* and *Zygosaccharomyces*. Their activity during fermentation determines the chemical and sensory quality of the final product. It is known that the microbial community of the grapes, yeasts especially, is influenced by multiple factors, including climatic conditions, grape variety, maturation degree, grape sanitary status, harvest and the use of phytosanitary products (Barata et al., 2012; Martins et al., 2014). Moreover, depending on the culture system, certain differences in the yeast community have been observed between organic and conventional samples. In this context, the vineyard could be a reservoir of autochthonous yeasts of wine interest, especially in organic production where greater biodiversity has been reported (Cordero-Bueso et al., 2011). The presence or absence of some genera and/or species and their proportion varied depending on the culture system (Comitini & Ciani, 2008; Drumonde-Neves et al., 2017), and even an intraspecific diversity has been found in organic samples (Milanović et al., 2013).

Likewise, organic vitiviniculture is reinforced with the use of native cultivars adapted to edaphoclimatic conditions and native yeasts, which are better adapted to the particular must conditions and winery environment of each region (Bokulich et al., 2016). This allows quality wine production while preserves their typicality and uniqueness, characteristics that are especially appreciated in organic wines. Therefore, study of native yeast communities of vineyards and wineries, particularly in organic production, is an important step towards the preservation of the native genetic resources. Induced fermentations generate a large replacement of native yeasts and result in the loss of wine identity, but native strains of *Saccharomyces cerevisiae* can lead the fermentation process to the end. The production system also influences the healthy characteristics and differentiation of wine, which directly affects the assessment of consumers from a socio-economic perspective (Callejon et al., 2010).

Yeasts produce a large number of metabolites such as alcohols, CO₂, glycerol, acids and other volatile substances that can affect wine quality. However, the effect on organic grapes is little-known. Formation of volatile compounds during grape must fermentation depends on several factors such as the type and concentration of the compounds initially present in the grape and must, yeast's ability to transform them and winemaking conditions. But the production system can also influence. Organic vines suffer more biotic stress than conventional vines and a longer period of maturation; in response they must produce higher concentrations of secondary metabolites. In addition, diversity and proportion of yeast species during vinification and relationships between them can influence the fermentation kinetics and wine chemical and sensory characteristics (Swiegers et al., 2005).

Usually, and particularly in Galicia, in organic wineries fermentations are carried out spontaneously; that is, with yeasts from grapes, resident winery yeasts or by means of a certain control with the addition of *pie de cuve* from initiated fermentations. Even, in the most prestigious wineries, by the addition of selected autochthonous yeast strains.

Spontaneous fermentation has a significant intraspecific biodiversity within the *S. cerevisiae* species, but also of the non-*Saccharomyces* species present during fermentation. Therefore, yeast population in spontaneous fermentations consists of different strains which, in proportion to their relative abundance, influence the aromatic properties of the wine. Different *S. cerevisiae* strains generate variable amounts of fermentative by-products, with desirable or undesirable effects on the wine aroma. Only a few *S. cerevisiae* strains are able to lead the final stages of fermentation. Some prevalent *S. cerevisiae* strains could be implanted in spontaneous fermentations in the same winery (Blanco et al., 2011), which implies some strain-cellar and even strain-vineyard correlation. In addition, some *S. cerevisiae* strains isolated from different wineries in the same region could be very similar, emphasizing a correlation between strain and oenological region.

During spontaneous fermentations a succession of different yeast species is involved. Non-*Saccharomyces* yeast appears mainly in the initial phase of alcoholic fermentation (AF); but as fermentation progresses, these species are substituted by *S. cerevisiae* which has a more effective fermentative power and tolerance to alcohol content. On the other hand, it has been shown that some strains of *Candida* or *Torulaspota* are able to satisfactorily complete the fermentation process to acceptable levels (Canonico et al., 2016).

In the same way, there is a great interest in the elaboration of wines with specific characteristics linked to a production area. This tendency has led to a rediscovery of the fermentation directed by native yeasts to obtain differentiated quality wines (Capozzi et al., 2015). The continued use of commercial strains (*S. cerevisiae*, but also non-*Saccharomyces*) can lead to the loss of complexity and the wines standardization, together with the decrease of yeast species diversity in the winemaking environments. In fact, there is evidence that non-*Saccharomyces* yeasts constitute a significant part of the wine's microbial population during fermentation, which contributes to desirable wine sensory attributes (such as taste and aroma) due to their production of volatile secondary metabolites (such as esters, higher alcohols, acids, thiols and extracellular enzymes). Contribution of organic production to wine peculiarities during fermentation is less pronounced in comparison with the spontaneous fermentations. In addition, it has been shown that in spontaneous, mixed or sequential fermentation with *S. cerevisiae*, non-*Saccharomyces* species can produce aroma compounds and other metabolites such as ethanol, volatile acidity or glycerol, but its production is strain-dependent (Ciani et al., 2010).

Hence, the knowledge of yeast distribution patterns and the factors that influence their structure and diversity are of great importance. Geographical differences found in yeasts diversity from vineyards probably influence the distinctive regional differences in wine style and character. Natural yeast diversity shows a unique composition, correlated with each specific *terroir*, which represents a great resource for the production of differentiated wine (Capozzi et al., 2015; Tofalo et al., 2013).

Bokulich et al. (2014 and 2016) studied *microbial terroir* patterns closely related to the production area and metabolic profiles of the wines obtained, conditioned by cultivar, harvest and climate.

On the other hand, from around one thousand volatile compounds that have been identified in wines, more than 400 are produced by yeast during fermentation. Their nature and concentration are yeast strain dependent. Some of them such as higher alcohols, acetates and esters provide positive notes to the wines. Other compounds have negative effects on wines, for instance acids, phenols, aldehydes, ketones, lactones and sulfur compounds. Many biochemical pathways are involved in the formation of wine aroma by yeasts. They are significantly influenced by several factors such as must composition and pH, fermentation temperature, must treatments and skin contact time. However, the contribution of the different yeast strains to the uniqueness of the wine aroma will depend on the fermentation ecology and the factors that determine it. Thus, it is necessary to know the influence of these autochthonous *S. cerevisiae* and non-*Saccharomyces* strains on the chemical characteristics and the aromatic and sensory profiles of the wines obtained.

Finally, as far as we know, there are no studies that jointly address in detail the influence of the cultivation system on the regional yeast diversity. In addition, knowledge of interactions between different yeast strains and their influence on wine characteristics is another challenge of current interest.

Justification and aims

Despite actual global tendencies to increase organic production and the importance of the wine industry in Galicia, very few producers applied this culture system here, mainly due to very heterogeneous and sometimes adverse climatic conditions. In addition, data available about the impact of organic production on yield and grape quality are scarce.

On the other hand, organic production has an influence on the yeast diversity of grapes and wineries. In Galicia, very little information is known about yeast population associated with grapes. However, there are several studies about different grapevine characterization, influence of different *S. cerevisiae* strains in wine quality, but none about application of non-*Saccharomyces* yeasts.

This doctoral thesis, carried out in the Estación de Viticultura e Enoloxía de Galicia (EVEGA-AGACAL), addresses for the first time a comparative study on the diversity of yeasts in grapes and musts from organic and conventional production in four Denominations of Origin (DOs) from Galicia. In addition, to our knowledge, it is also the first work in which the existence of biogeographic patterns of yeast population in NW Spain vineyards is verified. The influence of organic production on fermentation and wine quality is also evaluated. Finally, the oenological potential of indigenous non-*Saccharomyces* was tested at experimental winery scale.

Considering the previous background, the **main objective** of this doctoral thesis was to evaluate the influence of the organic and conventional grape cultivation on yeast diversity and their biogeographical patterns in Galicia and to determine their influence on the chemical and sensory characteristics of wine. For this purpose, the following **specific objectives** have been proposed:

1. To isolate and identify yeasts from grapes and must from organic and conventional vineyards of different DOs from Galicia.
2. To determine the role of organic production on yeast population diversity in grapes and must.
3. To establish the importance of the different yeast species and to confirm the existence of biogeographic patterns in the yeast population (*microbial terroir*) as a concept of regional differentiation able to contribute a unique quality and typicality to wines.
4. To study the yeast population dynamic in spontaneous fermentations (at laboratory scale) from organic and conventional grape musts and its influence on the wines.
5. To characterize the *S. cerevisiae* strain diversity in organic wineries from Galicia and to establish their distribution pattern.
6. To compare commercial organic and conventional wines from Galicia at sensory level in order to obtain a general view of the quality and preference for organic wines by tasters.
7. To evaluate the oenological potential of autochthonous non-*Saccharomyces* yeasts in sequential fermentation tests: fermentation kinetics, implantation ability and influence on the chemical, aromatic composition and sensory characteristics of the wine.

Methodology

Origin of grapes and sampling design

Grapes were harvested from vineyards within four Denominations of Origin from Galicia during three consecutive years (2013-2015) (Figure i). Representative grapevine varieties grown in Galicia were chosen: Treixadura and Mencía in Monterrei DO; Brancellao and Treixadura in Ribeiro DO; Mencía in Ribeira Sacra DO and Albariño and Treixadura in Rías Baixas DO. For each variety, plots bordering or close to each other, but employing different farming systems (organic and conventional) were selected; therefore, they presented similar microclimatic conditions and agronomic characteristics. In each plot, three representative random blocks were established. About 4 kg of grape bunches per variety were collected from at least 8 to 10 vines from each block. Climatological data were collected from the two closest climatological stations. In addition, diversity of *S. cerevisiae* strains present in five organic wineries of production from Galicia was studied. Samples were collected directly from the fermentation tanks in those wineries at different stages of fermentation.

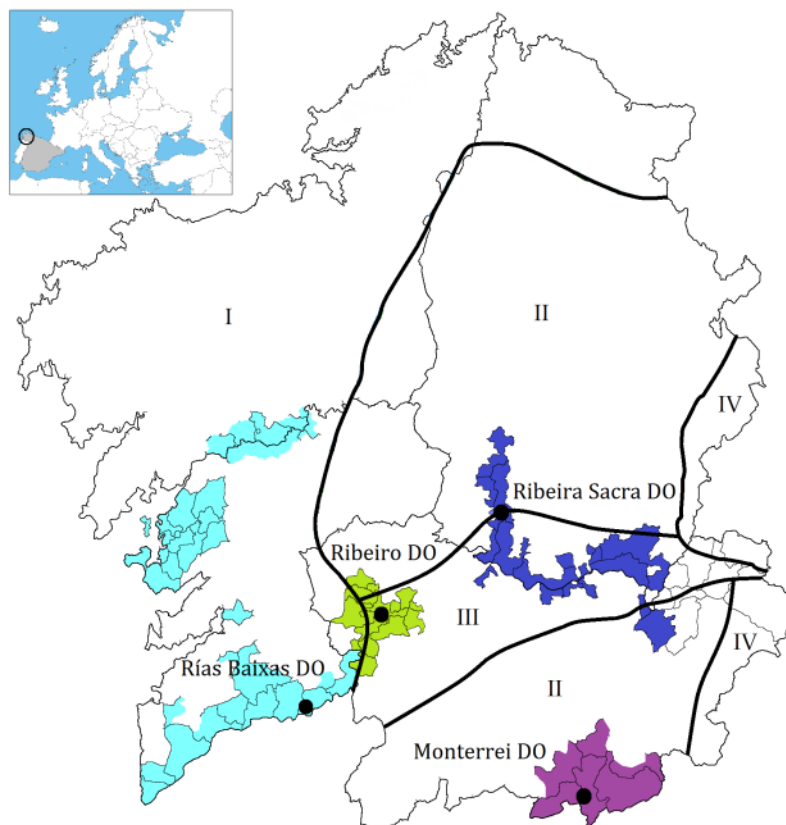


Figure i. Location of vineyards sampled in different Denominations of Origin and climatic zones from Galicia (NW Spain): I, coastal oceanic climate; II, inland oceanic climate; III, Mediterranean oceanic climate; IV, mountain oceanic climate.

Sample processing and yeast isolation

Grape samples (total = 42 samples/year) were collected, transported to the laboratory in individual plastic bags and processed within 2 h. To isolate yeast from grapes (only in 2015) 20 healthy whole berries were aseptically separated from random bunches in the sample. Then, grapes were placed into sterile flasks with 100 mL of peptone water and incubated in an orbital shaker at 120 rpm for 2 h to dislodge yeast cells from the grape berries surface. To obtain must, the grapes were aseptically hand-destemmed and crushed. From the obtained must, samples were separated for different analyses: i) yeast diversity; ii) natural fermentation; iii) chemical analysis. For the red varieties (Brancellao and Mencía) phenolic richness of grapes was also determined. In this case approximately 1 kg of random bunches of whole grapes were collected for each block.

For microbiological analysis the samples were adequately diluted and 100 μ L were homogeneously spread in duplicate on WL Nutrient Agar medium (Scharlau Microbiology) supplemented with 200 μ g/mL of biphenyl to suppress moulds. Plates were incubated at 28 °C until visible colonies appeared and those containing between 20 and 200 colonies were used for quantification of total viable cells. From each sample a representative number of colonies were isolated in YEPD medium based on their colony aspect and frequency (10-20 for each sample). The isolates obtained were maintained at -80 °C in YEPD with 15% (v/v) glycerol until further identification.

Yeast identification

Yeast identification at species level was performed by PCR amplification of the 5.8S rRNA gene and the two internal (non-coding) ITS1 and ITS2 spacers using the ITS1 and ITS4 primers. PCR amplification and sequencing of D1/D2 region of 26S rDNA gene was used to confirm yeast identity. The D1 and D2 domains were amplified using NL-1 and NL-4 primers. The same primers were used for sequencing using a BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) and a 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Sequences similarities were obtained using GenBank BLASTN search facilities. The identification was considered correct when gene sequences identity was 98% or higher. Analysis of mtDNA restriction pattern (mtDNA-RFLPs) was used to differentiate *S. cerevisiae* strains.

In addition, a hierarchical cluster analysis (dendrograms and phylogenetic trees) was performed on the 66 strains of *S. cerevisiae* found in organic wineries applying the Ward method and data standardization.

Chemical analysis

Several parameters were determined in must samples. °Brix, sugars, pH, total acidity, L-malic acid and Cu were determined using the OIV official methods (OIV 2012); tartaric acid by colorimetry; the yeast assimilable nitrogen (YAN) according to the Sørensen method and gluconic, acetic acid and glycerol by enzymatic methods (TDI-Tecnología Difusión Ibérica, S.L.). In addition, phenolic richness analysis of the red grapes was carried out using the Cromoenos method. The following parameters were determined: total and extractable anthocyanins, total tannins, degree of maturity of the tannins through the phenolic maturity index (IMF), probable stable colour (CPE) and probable total polyphenol index (TPI).

Wines were analysed in the chemistry laboratory of EVEGA using official methods (OIV, 2012). The following general parameters were determined: alcoholic degree, glucose + fructose, total acidity, volatile acidity, tartaric acid, malic acid, lactic acid, pH, glycerol, free and total SO₂.

Volatile compounds were determined following the methodology described by Bouzas-Cid et al. (2018): major aromatic compounds (higher alcohols, acetaldehyde and ethyl acetate) were quantified in an Agilent model 7890A (Palo Alto, CA, USA) chromatograph with flame ionization detector (FID); concentration of minor volatile compounds was determined by Agilent 6890N GC-MS.

Natural spontaneous fermentations of organic and conventional must

Red grapes were manually destemmed and skins, juice and pulp were transferred to 2 L bottles. White grapes were manually pressed and the sifted grape juice was transferred to bottles of 1 L capacity. Winemaking was carried out at a controlled temperature of 18 °C and 24 °C (white and red wines, respectively).

Fermentation kinetics was monitored by daily measurement of °Brix and temperature. In 2013 and 2014 not all samples fermented correctly. Therefore, to ensure the complete fermentation, in 2015 musts were allowed to start spontaneously. When density decreased around 2 °Brix, sequential inoculation was carried out with the commercial strain *S. cerevisiae* EC1118 (Lallemand) of organic or conventional production, according to the type of must. Moreover, at the beginning of the fermentation (Fi) and at the end (Ff) a sample was taken to follow the evolution of yeast population during the process. The wines obtained were centrifuged, sulphited with 25 mg/L of SO₂ and stored until their chemical analysis.

Oenological characterization of non-Saccharomyces autochthonous strains

A phenotypic characterization of 32 autochthonous strains from Galician vineyards, which were identified and conserved during the thesis, was carried out. Strains from the main non-*Saccharomyces* species with oenological importance were selected according to the current bibliography: *Starmerella bacillaris*, *Lachancea thermotolerans*, *Metschnikowia pulcherrima* and *Torulasporea delbrueckii*. 70 mL of pasteurized must were fermented in duplicate using a pure culture of each strain. The fermentative ability was determined (measurement of the weight by CO₂ loss) and production of glycerol, malic acid, lactic acid, volatile acidity, total acidity, glucose + fructose, alcoholic strength, pH, higher alcohols, ethanal and ethyl acetate were evaluated. A weighting was performed for each parameter according to its relative importance. The best punctuated strain of each species was selected for winemaking: Sb474, Lt93, Mp278 and Td315.

Fermentation of Treixadura musts with S. cerevisiae and non-Saccharomyces autochthonous strains

Treixadura must was fermented in triplicate (5L x 3) at 16 °C by sequential inoculation of a non-*Saccharomyces* strain (Sb474, Lt93, Td315 or Mp278) and *S. cerevisiae* ScXG3. Non-*Saccharomyces* strain was first added (10⁸ CFU/mL) and, once the fermentation started and density decreased 10-15 g/L, *S. cerevisiae* was inoculated. Furthermore, a control of *S. cerevisiae* ScXG3 pure culture and spontaneous fermentation process were performed. Evolution of fermentation was followed by the daily measurement of density and temperature. In the initial (Fi), tumultuous (Ft) and final (Ff) phases, samples were taken to control the implantation of the inoculated yeasts. Yeast influence on chemical and sensory characteristics of wines was studied.

Sensory analysis of organic and conventional wines

A comparative sensory evaluation of 62 organic and conventional commercial wines from 5 Galician DOs (vintages 2011 to 2015) was carried out. Wines were obtained directly from producers, wineries and/or Regulatory Councils. Descriptive wine-tasting sheets for Galician white and/or red wines designed by a panel of experts in EVEGA were used. Glossary was composed of 25 and 26 descriptors in white and red wines respectively, including visual phase, olfactory phase, gustative phase and global quality.

Sensory evaluation was carried out in the tasting room of EVEGA in several sessions divided by DOs and by types of wine (white or red).

The judges group included 10-20 experts in Galician wines (35-50% women, 50-65% men; ages between 25 and 64). A constant volume of 30 mL of each wine presented in transparent tasting glasses at 12 °C was evaluated. Prior to tasting, wines were served in each tasting station, coded with a numerical code and arranged randomly. One wine in random repetition was used as a control sample. During the analysis, tasters evaluated different wines and indicated the different descriptors perceived. Intensity of each descriptor was rated on a scale from 0 (not present) to 9 (more intense). In addition, the tasters assigned a preference for the wines.

Statistical analysis

Significant differences between samples were tested by variance analysis (ANOVA) and Duncan/Tukey tests ($p < 0.05$) using SPSS (v.18.0) software.

Yeast species diversity was estimated using different classical ecology indexes: species richness (S; number of species), Shannon-Wiener index (H'), Simpson's diversity index (1-D; was calculated to evaluate yeast species dominance ($D = \text{Simpson's index}$), and Equitability (E; similarity or evenness of the different species abundance).

Differences in yeast population due to DOs, production system, varieties and years were tested by one-way and two-way Bray Curtis-ANOSIM (non-parametric analysis of similarity) and one-way and two-way Euclidean-PERMANOVA (Permutational Multivariate Analysis of Variance Using Distance Matrices). In addition, similarity percentages breakdown (SIMPER) test between production systems/DOs was calculated to assess the average percent contribution of individual variables to dissimilarity. Principal Component Analysis (PCA), Principal Coordinate Analysis (PCoA), Canonical Correlation Analysis (CCA) and a bilateral Pearson correlation were carried out using the species frequencies and richness species to separate samples according to DOs (or winery), culture systems, varieties, years and influence of climatic conditions. These statistical analyses were performed using PAST (v.3.20) software (2018).

PCA, PCoA, CCA and Pearson were also applied to determine the influence and relation of the volatile compounds and sensory descriptors in wines fermented with non-*Saccharomyces* native strains. Descriptors were classified for each wine made with the different non-*Saccharomyces* strains by comparing the percentage of the geometric means ($\%GM = \sqrt{[\%Intensity \cdot \%Frequency]}$, Vilanova et al., 2010). PCA and Pearson analysis was applied between all sensory descriptors ($GM > 30\%$) and all volatile compounds analysed. To show the relationship between the significant sensory variables of the aroma with a $GM > 30\%$ and significant volatile compounds with $OAV > 1$, a partial least squares regression (PLS) was applied. To estimate the synergies of the aromatic compounds an evaluation of the overall fermentative aroma of the wines was carried out; all volatile compounds (also with $OAV < 1$) were grouped into seven different aromatic series, according to its similar smell descriptors.

Results and discussion

Influence of the production system on must characteristics

The chemical composition of musts showed differences between organic and conventional cultivation, depending not only on the variety and DO, but also on the harvest. In general, sugar content and, in some cases, total acidity were higher in organic musts compared to conventional ones, but still maintaining a balanced sugar/acidity ratio, probably due to a lower production. These differences between both types of cultivation became more pronounced during campaigns with unfavourable climatic conditions. It should be mentioned that musts in 2014 had the lowest value of sugar content because a premature harvest was carried out to avoid grapes damage due to September rain. Consequently, significant differences were observed in gluconic content that year, an indicative parameter of grapes sanitary status. Gluconic concentration was higher in organic musts, which could be explained by a more severe attack of fungal diseases under these conditions.

On the other hand, malic acid content was lower in must from organic farming than in conventional ones, except in the Mencía from Monterrei DO and in Albariño (Rías Baixas DO). Concentration of L-malic acid within the berry decreases during and after veraison. In this study, the lowest concentration of malic in organic musts cannot be related to the warmer environmental conditions of 2013. High acidity in the grapes can be explained by unusually cold seasons, poor vineyard locations, non-optimal cultivar selections or poor viticultural practices for that region.

Regarding phenolic characterization of the red grapes from Monterrei and Ribeiro DOs, they presented higher total polyphenols index (TPI), probable stable colour (PSC) and tannins under organic farming than conventional production, with significant differences in some samples. However, in Mencía from Ribeira Sacra DO, TPI, PSC and tannins were higher in conventional grapes, although without significant differences. Similar results were found for anthocyanins concentration, but differences were significant only in Ribeira Sacra DO. Usually, phenolic maturity index (PMI) was slightly higher in conventional culture. TPI values obtained in this study from Brancellao (37.2-48.5) coincide with those typically described for this variety, although range values in Mencía were higher (44.3-62.3), which confirms a variety influence on this parameter over the area and/or harvest. Thus, Brancellao presented a lower TPI, PSC and content of anthocyanins and tannins than Mencía. In turn, within the Mencía variety it was found that anthocyanins concentration and PSC was higher in Ribeira Sacra grapes than in Monterrei grapes, indicating an effect of the area.

Yeast diversity in grapes, musts and fermentation: influence of the production system

The influence of cultivation system (organic versus conventional) on yeast population was quantitatively and qualitatively evaluated in musts and berries.

Overall, quantitatively, musts from organic farming had a higher number of viable yeasts than those of conventional origin, with some exceptions, for example in 2013 in Ribeiro DO, although these differences were not always statistically significant. The values observed varied between 10^3 and 10^7 , similar to the typical counts for organic must (10^4 - 10^6) (Bagheri et al., 2015; Patrignani et al. 2017). Yeast population oscillates along the maturation stages of grape, and also depends on grape health status (Martins et al., 2014; Renouf et al., 2005). In fact, the presence of higher amounts of yeast in the 2014 samples was related to unfavourable climatic conditions close to harvest that caused sanitary problems in the grapes. No clear relationship was found between varieties/DO and proportion of viable cells.

Qualitatively, 46 yeast species belonging to 22 genera were identified: 40 species in must and grapes together, 38 in must, 24 in grapes, 4 exclusively at Fi and 2 more only at final stage (Ff) of natural fermentations. The results showed that total species richness (S) was 22.5% greater in the samples of organic origin than in conventional ones. Thus, 38 species were found (95.0%) in organic samples compared to 29 species (72.5%) identified in the conventional ones. These differences increased to 29.7% when grapes were also taken into account. In addition, the number of species identified was greater in must than in grapes. However, some exceptions to this general trend were found for the richness and proportion of species in musts and grapes among DOs, varieties and years (Figure ii). The greatest diversity of yeasts was observed in Rías Baixas and Ribeira Sacra DOs. In contrast, in Ribeiro and Monterrei DOs yeast diversity was much lower. Our results agree with the greater diversity found in organic farming for other vineyards (Bagheri et al., 2015; Cordero-Bueso et al., 2011; Martins et al. 2014). On the contrary, other authors observed a lower diversity in organic musts (Grangeteau et al., 2017; Milanović et al. 2013). This could be explained by possible interactions between microorganisms, the use of fungicides, grape variety and possible interactions microorganisms - grapevine (Barata et al., 2012; Comitini and Ciani, 2008; Martins et al., 2014; Renouf et al., 2005; Schmid et al. 2011).

Regarding the occurrence of different yeasts, the predominant species were *Aureobasidium* spp., *Metschnikowia* spp., *Hanseniaspora uvarum* and *Cryptococcus* spp. both in musts and grapes samples (as confirmed by SIMPER analysis). Grape yeast population, both in organic and conventional cultivation, was dominated by the ascomycete fungus *Aureobasidium* spp. and by basidiomycete yeasts such as *Cryptococcus* spp., *Rhodotorula* spp. and *Sporobolomyces* spp. However, the weakly fermentative yeast species *H. uvarum* and *Metschnikowia* spp. were also identified in grape samples at high proportion (up to 42.1%). *H. uvarum* was found in almost all must samples; however, in grapes, this species was detected in samples of the Ribeira Sacra and Rías Baixas DOs, but to a lesser extent in Monterrei DO. Species of the genus *Cryptococcus* were found mainly in Ribeiro DO, in organic grapes and some conventional musts. The culture system also had an effect on the distribution of minority yeast species. Organic samples presented higher diversity of minor strains than conventional ones.

During the Fi of spontaneous fermentation species richness was approximately half of that identified in musts and grapes. Natural fermentation of musts evidenced that *H. uvarum* and *Metschnikowia* spp. were also the predominant species at the initial phases. As

expected, a logical correspondence was observed between yeast species found in musts and those responsible for fermentation beginning. However, some species which had not been isolated from musts were identified during fermentation; for instance, *Kluyveromyces dobzhanskii*, *Candida pimensis*, *Metschnikowia af. chrysoperlae*, *Hanseniaspora clermontiae* and *Saccharomyces ludwigii*. This was probably due to the fact that the number of viable cells present was not enough to be detected until the fermentation conditions favoured their growth. Furthermore, to our knowledge, *C. pimensis* and *Sporobolomyces ruberrimus* were found for the first time as inhabitants of grapes or wine related environments.

Frequency of yeast species in grapes and musts: biodiversity indexes and biogeographical distribution

Indexes of biodiversity (Shannon-Wiener index [H'], Simpson index [1-D] and equitability [E]) were higher in the musts and grapes from organic production than in samples from conventional origin; whereas dominance (D) was lower. Statistical analysis of the results indicated the existence of significant differences among the yeast communities from different geographical origin. Among the predominant species, the frequency of *Aureobasidium* spp. was higher in conventional samples from Monterrei and Ribeiro DOs than in the remaining DOs. In contrast, the frequency of *Metschnikowia* spp. and *H. uvarum* appeared to be higher in organic musts than in conventional ones. *Metschnikowia* spp. was more linked to Monterrei DO whereas *H. uvarum* appeared in greater proportion in Ribeira Sacra and Rías Baixas DOs. *Cryptococcus* spp. was associated with musts from Ribeiro DO. Moreover, regional differences were established in the minority species. *L. thermotolerans* appeared frequently in Monterrei DO and, to a lesser extent, in Ribeiro DO, exclusively in organic must. On the other hand, *Starm. bacillaris*, *Issatchenkia terricola*, *Zygoascus hellenicus/meyerae* and different species of *Candida*, *Pichia* and *Zygosaccharomyces* genera, were associated with Ribeira Sacra and Rías Baixas DOs.

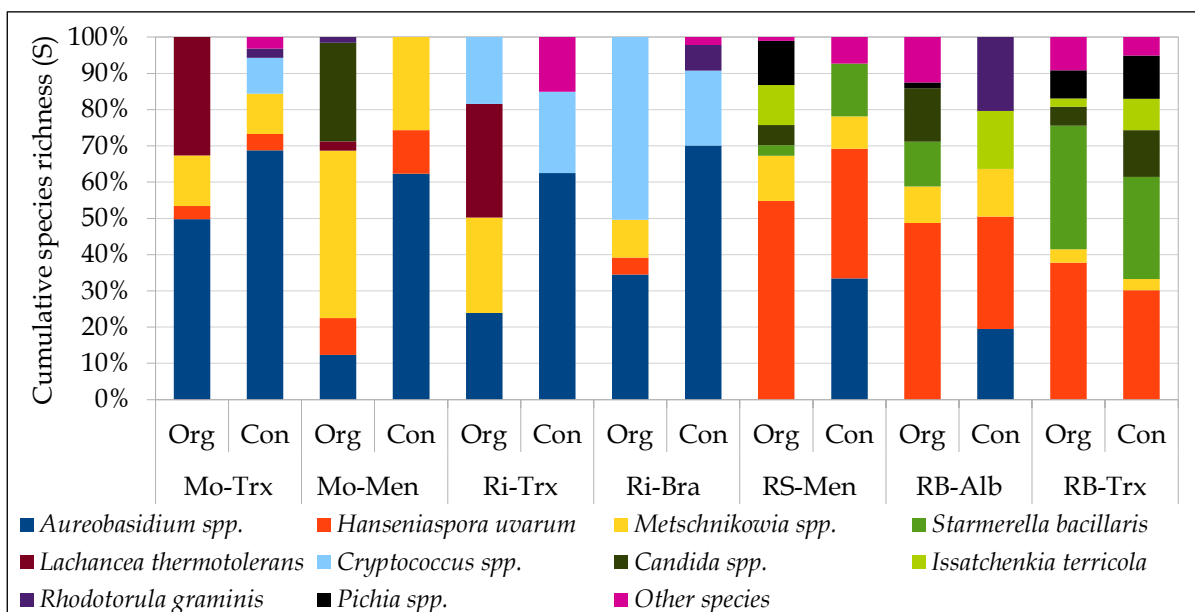


Figure ii. Frequencies of yeast species in organic and conventional musts from different Galician DOs (Mo: Monterrei DO, Ri: Ribeiro DO, RS: Ribeira Sacra DO, RB: Rías Baixas DO) and grape vines (Trx: Treixadura, Men: Mencía, Bra: Brancellao, Alb: Albariño).

Regarding cultivation system, *Starm. bacillaris* was mainly related to conventional culture in Ribeira Sacra DO, but to organic musts in Rías Baixas DO. Therefore, the most important differences were established in the minority species, which were found mainly in organic farming. These results evidenced the existence of differences in yeast communities related to culture system, but also according to their geographical origin (Figure ii).

Differences in yeast distribution have also been found for grapes (Drumonde-Neves et al., 2017; Grangeteau et al., 2017). Such variations have been attributed to several factors, such as harvest, location, grape cultivation and phytosanitary treatments. Our results showed a very heterogeneous distribution of predominant yeasts at the regional level as described by some authors (Barata et al., 2012). Different patterns were found not only between the same variety in different DO but also between different varieties within the same DO. In addition, certain species predominated in a specific cultivation system. For example, *Rhodotorula graminis* appeared in musts from all varieties, but mainly in conventional cultivation. Data showed that, although predominant species are common in all regions, their frequency is different and the minority species are also associated to zones and/or varieties. Species such as *Candida apicola* and *Wickerhamomyces anomalus* (syn. *Pichia anomala*) were barely found, although more notably in organic samples. These results are in contrast with those found by Bagheri et al. (2015) who demonstrated that species *W. anomalus* dominated the fermentations in conventional-integrated samples. Variability in the proportion of yeast species in grapes has also been previously reported (Drumonde-Neves et al., 2017; Grangeteau et al., 2017).

Statistical analysis confirms these differences. ANOSIM and PERMANOVA were used to evaluate differences in yeast population (species richness and frequency) between campaigns, varieties, DOs and culture systems. **Species richness** presented significant differences among years (campaigns) ($p_{\text{ANOSIM}} = 0.0113$ - $p_{\text{PERMANOVA}} = 0.0501$, $R = 0.2199$; $F = 1.745$). However, no differences were observed between grapevine varieties for this parameter. The low values of R and F showed a greater weakness of the variety factor than of the year factor in terms of their influence on the richness of species in grapes and musts. In contrast, the DO factor showed significant differences between regional species richness ($p = 0.0021$ - 0.0066 , $R = 0.4656$; $F = 5.217$), greater than year and variety factors; Rías Baixas and Ribeira Sacra DOs compared to Monterrei and Ribeiro DOs binomials had the highest dissimilarity ($R = 1$ in both cases). On the other hand, the cultivation system factor did not show significant differences for global species richness ($p_{\text{PERMANOVA}} = 0.118$). However, the PERMANOVA test presented significant differences when the farming system and DO were grouped together.

Regarding the influence of the different factors on **species frequency** in musts and grapes, significant differences were obtained in global ANOSIM and PERMANOVA tests for all factors and their clusters (DO, culture system and grapevine variety). For example, significant differences ($p = 0.0001$) and the highest F statistic values were obtained in the organic samples of Ribeira Sacra and Rías Baixas DOs in comparison with the conventional DOs Monterrei and Ribeiro ($F=58.51$ - 86.21 in musts). In musts, no significant differences were found between Ribeira Sacra and Rías Baixas DOs. Even more, we found similarity

between them (low R and F statistic values), but they differed from the other two DOs: Ribeiro and Monterrei (high R and F values). In addition, significant differences were found between organic and conventional production system for all DOs. The culture system strongly influenced yeast community in Ribeiro DO and, to a lesser extent, in Ribeira Sacra DO. Tests made in musts for the DO and variety clustering showed high values of R and F in Ribeiro and Monterrei DOs in comparison with Ribeira Sacra and Rías Baixas DOs for Mencía, Albariño and Treixadura varieties. When the production system and variety clustering was evaluated, important differences were observed between the organic Brancellao-conventional Albariño, organic Brancellao-organic Mencía as well as conventional Brancellao-organic Mencía. In grapes, differences in the yeast population were less noticeable.

When the two-way ANOSIM and two-way PERMANOVA were applied, which allows the simultaneous study of two factors effects, the results showed significant differences in all the factors (DO, culture system and grapevine variety) for the frequency data. However, they only revealed significant differences for DOs when the species richness data were used. This indicates that the DO factor is stronger and more influential on the diversity of yeasts than the culture system. Moreover, the species frequency found in each region is more important than the number of species identified during the three years.

PCoA and PCA allowed a graphic representation of the influence of cultivation system, region, year and variety on the richness and frequency of species. Graphics showed a clear separation between DOs and culture system. Furthermore, it was observed that dispersion of yeast species in organic musts was lower than in the conventional ones. PCoA showed a greater similarity in the yeasts richness between varieties of the DO Monterrei and Ribeiro with respect to those of the other two DOs. Regarding year influence on the species richness, PCoA showed a high correspondence between samples of 2013 and 2014, separated from those of 2015. PLS test confirmed a clear separation between regions in two groups: Rias Baixas-Ribeira Sacra DOs and Monterrei-Ribeiro DOs.

Different varieties have different sensitivity to fungal diseases, bunches characteristics and peculiar secondary metabolites, some of them with antimicrobial properties that could influence quantitatively and qualitatively the composition of the grape microbiome. This could explain why all grape cultivars share a different fraction of minority yeasts.

Some environmental parameters such as wind, relative humidity (RH) or rainfall are of great importance due to their relationship with yeast presence on grapes because of interactions with fungi, diseases and must release (Barata et al., 2012; Cordero-Bueso et al., 2011; Schmid et al., 2011). Climatic conditions documented in Galicia during 2013-2015 have been very heterogeneous depending on the area and harvest. The greatest differences between variable climatic were found in rainfall/RH. There was a significant increase in rainfall in 2014, especially closed to harvest dates. These conditions favour fungal diseases such as mildew or botrytis. The amount of UFC/mL in musts was higher in 2014 compared to 2013 and 2015, but yeast diversity was greater in 2015, a year with lower rainfall.

Instead, Rías Baixas DO, the region with the highest precipitation, presented the greatest yeast diversity. Some yeast genera, such as *Candida* were predominant in Rías Baixas DO, usually related to the presence of certain filamentous fungi. Difference in yeast proportion according to the harvest could be related to differences in temperature and precipitation (RH) between vintages during the flowering and harvest period, as pointed out by Grangeteau et al. (2017), but these data were not confirmed in this study. In the CCA triplot, a relationship of the environmental variables with yeast diversity in different zones and years was observed. A positive correspondence was observed between biodiversity due to the average temperature and the maximum RH and precipitation in the Rías Baixas DO. In Ribeira Sacra DO the correspondence was greater with minimum rainfall, average RH and higher wind speed. Regarding biodiversity in Monterrei DO, a correspondence between the minimum RH was observed. Some authors have reported that in years with greater precipitation near the harvest nutrients availability on grapes surface is favoured and, therefore, the proliferation of microorganisms. However, in Ribeiro DO, rainfall was also high and there was no greater species richness than in the Ribeira Sacra DO with lower rainfall. Therefore, it cannot be deduced as a general rule that yeast diversity increases with rainfall; although a beneficial influence relationship was observed between the average and maximum HR as opposed to the minimum HR and highest altitude and temperature. Regarding fungicides and cultivation system, rainfall increase implies more fungicidal treatments that affect the yeast population (Grangeteau et al., 2017; Milanović et al., 2013; Schmid et al., 2011). CCA also confirmed that there was a correspondence between the wettest years and Cu concentration in must. Yeast diversity was higher in musts with lower Cu concentration.

All these results support the existence of biogeographic patterns in the yeast populations associated with a *microbial terroir* that can be linked to the wine typicality. This concept implies the influence of *terroir* factors such as climate, soils, grape varieties, viticulture and oenological practices of each region on these different microbial populations. Recent studies highlight the contribution of soil microorganisms and grapes to the winemaking process and its influence on wine typicality (Belda et al., 2017; Bokulich et al., 2016; Knight et al., 2015; Mezzasalma et al., 2018). In addition, human practices in vineyards and wineries have been correlated with the grape microbiota and confirmed the interdependence between the anthropogenic factor and the microbiological bases of the *terroir* (Drumonde-Neves et al., 2016; Grangeteau et al., 2017a). The incidence of non-*Saccharomyces* fermentative yeast species, particularly in organic samples, showed that such yeasts are well adapted to these areas as a *microbial terroir* that probably contributes to the complexity and distinctive characteristic of their wines.

Fermentative kinetics and dynamic of yeast population in natural fermentations

Yeast population present in musts from organic and conventional origin determined the evolution of natural fermentations in the laboratory. *Hanseniaspora* and *Metschnikowia* were the main fermentative yeasts genera identified at the beginning of alcoholic fermentation; these species were predominant in all samples, but other non-*Saccharomyces*

were also found. As fermentation progressed, these species were replaced by *S. cerevisiae*, which successfully ended the process.

When this yeast replacement did not occur, fermentations were stuck, sugar was not fully consumed by yeasts, and, in some cases the volatile acidity increased. Thus, in 2015 “guided” fermentations were carried out. That is, vinifications were allowed to start spontaneously, but once they began, the commercial strain *S. cerevisiae* EC1118 was added to complete the fermentation. Therefore, despite a variable delay at the beginning, in this campaign the evolution of fermentation was similar and faster than previous ones.

Vinification with Treixadura musts from **Monterrei DO** showed a typical fermentation kinetic, although certain differences in the fermentation speed and between the organic and conventional processes were observed. Usually, conventional musts had a longer (4-6 days) latency period than organic ones; but once they started, fermentation was faster. Mencía fermentations showed a typical evolution with a rapid fermentation speed in both culture systems; the final phase was reached in 6 days. It was noticeable the presence of *L. thermotolerans* in both varieties, especially in conventional samples, and *Meyerozyma guilliermondii* in Treixadura. A phenomenon of codominance of different strains of *S. cerevisiae* was observed at the end in organic fermentations.

In contrast, fermentations of Treixadura from **Ribeiro DO** did not show homogeneous kinetics in 2013. Only one organic and two conventional samples completed the process. In 2014 all samples finished the fermentation, but the evolution varied between them. Fermentation speed was higher in organic musts, related to a higher yeast population. *L. thermotolerans* was also found in the initial phases of AF but non-*Saccharomyces* were not replaced by *S. cerevisiae* in some fermentations. *S. cerevisiae* strains were different in organic and conventional musts. In some conventional musts, two strains fermented in codominance. Fermentations in 2015 took longer to start and fermentations with organic must evolved slower. Non-*Saccharomyces* species were still present at the end of fermentation. Regarding Brancellao fermentations, all red samples showed a typical evolution with consumption of sugars below 2.0 g/L. Organic musts fermentations were more homogeneous than conventional ones. Once started, the process took less than 10 days to complete. Different yeast species were observed at the beginning of the fermentation including *L. thermotolerans*, *Me. guilliermondii*, *Pichia kudriavzevii* and, in some cases *S. cerevisiae*. At the end different strains of *S. cerevisiae* were identified depending on the campaign and culture system.

Fermentation kinetics of Mencía from **Ribeira Sacra DO** was also very heterogeneous. Few samples completed the fermentation in 2013; organic must fermentations showed a typical evolution in 2014, but those of conventional must did not consume the sugars. In 2015, fermentations showed a normal evolution, as expected. The strain of *S. cerevisiae* added was implanted in all of them. In the stuck fermentations, a high diversity of non-*Saccharomyces* yeast was identified: *Metschnikowia* and *H. uvarum* as predominant species, and other yeasts with lower fermentative capacity such as *Candida californica*, *Starm. bacillaris* and *Zygosaccharomyces* in organic or *L. thermotolerans*, *Pichia kluyveri* and *Me. guilliermondii* in conventional samples. In addition, the presence of bacteria was observed at different stages of fermentation.

Finally, in fermentations of Albariño from **Rias Baixas DO**, organic musts were completely fermented but conventional ones fermented slowly and sugars were not consumed. In 2014 all winemaking showed a normal fermentative kinetics. *S. cerevisiae* appeared in samples that consumed the sugars, while other species such as *I. terricola* and *Candida* spp. (in addition to *Metschnikowia* spp. and *H. uvarum*) were present in the other fermentations. The dominant *S. cerevisiae* strain differed among fermentations. Treixadura fermentations in 2013 showed a heterogeneous evolution. Organic must took more days to start fermenting and had a slow fermentation. Fermentation kinetics with conventional musts was more uniform with a greater diversity of yeasts at the beginning of the process. In 2014 and 2015 all Treixadura fermentations presented a similar evolution. Fermentations started with different yeast species including *Metschnikowia* spp., *H. uvarum*, *Starm. bacillaris*, *I. terricola*, *Candida* spp., *Debaryomyces hansenii* and *Pichia* spp., which were replaced by *S. cerevisiae* at the end of the process; although some yeasts of the initial phase such as *Metschnikowia* spp., *Starm. bacillaris* and *P. kudriavzevii* were still present. In fermentations with organic musts, dominant *S. cerevisiae* strain was the same and in one sample a codominance phenomenon of different yeasts was observed.

These differences observed at the microbiological level explained the results obtained in wine analysis. In general, organic wines showed a higher alcohol concentration than conventional ones, both in natural fermentations and when *S. cerevisiae* was added after spontaneous start of fermentation. Some wines presented residual sugar, especially those derived from spontaneous processes when only non-*Saccharomyces* fermented. Wines of the spontaneous organic fermentations did not show higher levels of reducing sugars than those of guided fermentation. Treixadura wines presented a higher fermentative yield than the other varieties, but in many cases also had higher volatile acidity. However, volatile acidity was lower in all organic wines and always within the maximum values established by the Regulatory Councils. This showed that, although some spontaneous fermentations of organic musts became sluggish and lasted for several weeks (such as Treixadura from Ribeiro DO), dry wines were obtained with an acceptable concentration of volatile acidity. Total acidity, pH and lactic acid did not show a defined pattern in terms of their differentiation between spontaneous and guided fermentations nor between production systems; although there was a trend towards greater total acidity in conventional samples and higher in white than red varieties. On the other hand, glycerol concentration was, in general, higher in organic wines than in conventional ones, especially in those wines whose fermentations had greater presence of non-*Saccharomyces* yeast.

S. cerevisiae strain diversity in organic wineries from Galicia

Diversity of *S. cerevisiae* strains present in five organic wineries from Galicia was studied during 2013-2015. All of them applied spontaneous fermentation for wine elaboration. A representative number of colonies from each one were isolated and 863 different colonies were characterized at strain level. Results evidenced the existence of 66 different strains of *S. cerevisiae*. This is in agreement with the expected microbial diversity present in wineries and in spontaneous fermentations (Scholl et al., 2016). Biodiversity

indexes were high with a total value of $H' = 3.56$ (Table i). It should also be noted the high value of $H' = 3.14$ of PV winery with low dominance.

These values of diversity are higher than those found in previous studies (Blanco et al., 2006; Tello et al., 2011) and confirm that spontaneous fermentation and the absence of LSA enhance yeasts diversity in the cellar. Strain richness ranged between 6 (Corisca, 4 fermentations) and 46 (PV, 14 fermentations) (Table i). However, in the QM winery a lower richness (34 strains) than PV was found although more fermentations were sampled (18). On the other hand, statistical analysis and phylogenetic trees did not evidence a strain-winery relationship. Most strains were found in two or more wineries. Thus, strains R7, R9, R14 and R46 were identified in 4 of the 5 wineries studied. The genetic profile of R7 strain had already been identified in spontaneous fermentations in the experimental cellar of EVEGA (Blanco et al., 2006) and it coincides with a commercial yeast.

Table i. *S. cerevisiae* strain diversity in organic wineries from Galicia.

Denomination of Origin	Winery	Fermentations	N° of isolates	Diversity	
				N° strains	H'
Monterrei	Quinta da Muradella (QM)	18	262	34 (52%)	2.70
	Adega Beatriz (AB)*	4	42	16 (24%)	2.51
Ribeiro	Pazo Vieite (PV)*	14	452	46 (70%)	3.14
	Diego de Lemos (DL)	9	80	8 (12%)	1.73
Rías Baixas	Corisca*	4	27	6 (9%)	1.12
Total		49	863	66 (8%)	3.56

Diversity is indicated as the number of *S. cerevisiae* strains identified in each winery and % (respect to the total number of strains). *Samples were collected only in 2013 and 2014.

In AB winery where commercial inoculum had never been used, R7 was not found. The other common strains were present in three or two wineries. Nevertheless, certain strains of *S. cerevisiae* were exclusive to some wineries: 1 strain in DL, 2 in Corisca and AB, 12 in QM and 17 in PV.

Wide geographical distribution of a given strain indicates a good adaptation to the musts characteristics of different zones as well as to the winery environment. Yeasts with *killer* phenotype could facilitate its prevalence in the environment and its dominance during the fermentation. We observed that 22 *S. cerevisiae* strains were *killer* (33.3%), 7 (10.7%) were neutral and the remaining strains presented sensitive phenotype. Some *killer* strains were found in more than one winery, being predominant only in two of them. Moreover, the ability of sensitive strains to predominate and to accomplish a successful fermentation has been described (Blanco et al., 2011). In all wineries studied, yeasts with a *killer* character were isolated, coexisting with sensitive yeasts.

According to SIMPER analysis, the ten majority strains showed a cumulative contribution percentage greater than 55% of the total *S. cerevisiae* diversity. In 2013, 16 *S. cerevisiae* strains were identified among all wineries, but only 4 of them appeared with a frequency > 5%. In 2014, up to 38 different strains were identified, with predominance of R68 (frequency > 20%), with *killer* character. Finally, in 2015, 52 strains were found, 6

appeared in a proportion > 5% and R14 was the predominant one. PERMANOVA and ANOSIM showed that differences in strains frequency between wineries were significant.

Nevertheless, no differences were observed between years ($p_{\text{PERMANOVA}} = 0.849$, $F = 0.707$ and $p_{\text{ANOSIM}} = 0.613$, $R = -0.029$). According to CA and PCA, a large number of strains had a clear distribution among wineries. In addition, PCA evidenced that some strains associated to a particular winery appear in greater frequency; for example, R79 in Corisca in 2013, R68 in QM in 2014 or R14 in DL in 2015. Considering year factor and *S. cerevisiae* strains diversity, PCA and PCoA separated three groups: PV-QM-AB, DL and Corisca; but diversity in Corisca was very different from the rest of the wineries. Likewise, PERMANOVA ($F = 3.533$) and ANOSIM ($R = 0.604$) results showed significant differences $p = 0.0001$ for the diversity of yeasts between the different wineries. Similar results have been reported in the compositions of strains *S. cerevisiae* between wineries, and also between cultivars by Scholl et al. (2016).

Additionally, in Pazo de Vieite, the population dynamic throughout organic fermentation was studied taking samples at different stages of the fermentation. It should be noted that this winery also elaborates conventional wine using commercial yeasts. The results evidenced the presence of different strains and a codominance phenomenon of *S. cerevisiae* strains in all phases of organic spontaneous fermentation. Dominant strains in white must vinification were different from those predominant in red grapes fermentation. *S. cerevisiae* diversity varied between 4-16 and 7-14 different strains in fermentations with red and white grape must, respectively. Moreover, the highest strain diversity was found in musts; then, it decreased slightly and changed as the fermentation progressed. Usually, the same dominant strains were present in the three phases sampled with frequent occurrence. In some cases, strain frequency increased in Ft and decreased again at the end of process; in other cases, some strains that had not been detected in the musts, increased up to 20% in Ff. Therefore, in addition to differences in diversity and strains frequency, a substitution of strains was observed during the process. Nevertheless, despite the high strains diversity, only two or three were codominant during the process. The high strains diversity could explain the codominance phenomenon in most fermentations. In contrast, in conventional elaborations a clear implantation of the inoculated commercial yeasts was observed. Comparing commercial strain profiles with those found in spontaneous vinification, we found that certain commercial profiles were similar to those identified in organic fermentations. This indicates that some strains resident in the winery are capable of dominating fermentation although they have not been inoculated. However, its prevalence in the winery did not affect the yeast diversity during the spontaneous organic vinification. Moreover, other strains such as R8 and R18 showed higher occurrence, competing successfully with commercial resident yeasts in the winery.

Sensory analysis of organic commercial wines from Galicia

Organic wines from Galicia available in the market were submitted to sensory analysis and compared to conventional wines. Results showed significant differences for some descriptors between organic and conventional wines. **Albariño** organic wines (Rías Baixas DO) stood out for their persistence in mouth and notes of dried fruit. Conventional

wines scored higher for floral descriptors, fresh fruit and were preferred by tasters. **Ribeiro DO** white wines were generally more appreciated than red wines at tasting. At global level, significant differences were found in the intensity of colour and aroma between them, as well as in some descriptors, both in the nose and in the mouth. Organic wines were better valued, standing out for floral and fruit notes, structure and persistence (Figure iii). The best valued red wine was from conventional production, with lactic, vegetable and red fruits aromas. However, organic wines presented better quality in the mouth and high persistence and aromatic intensity. Organic red wines from **Ribeira Sacra DO** reached the highest score in almost all descriptors, and they highlighted by notes of black fruits and good structure in mouth. However, the conventional wine that only stood out due to overall quality in mouth was preferred by tasters. Among white Ribeira Sacra wines evaluated, no significant differences were observed for most descriptors, except in the overall quality in the mouth, persistence and some fruity notes. Conventional wines obtained better scores in gustatory phase descriptors, aromatic intensity and persistence, but similar percentages of preference by the tasters. Sensory profile of white **Monterrei DO** wines revealed a clear differentiation between them, although tasters did not show a clear preference. For the red wines of this DO no notable differences were appreciated in mouth; organic wine showed greater aromatic intensity and stood out by notes of black fruits. In **Valdeorras DO**, organic red wines stood out for their notes of red fruits, while the conventional wines presented black fruits notes and reached the best score in global quality. The tasters preferred the organic wines. In addition, differences among vintages were observed. Among white wines of 2012, biological ones presented a greater persistence compared to the conventional wines that stood out for their floral aroma and fresh fruit. In 2013, organic red wines stood out for aromatic intensity and red fruits; conventional ones presented greater astringency and tannins.

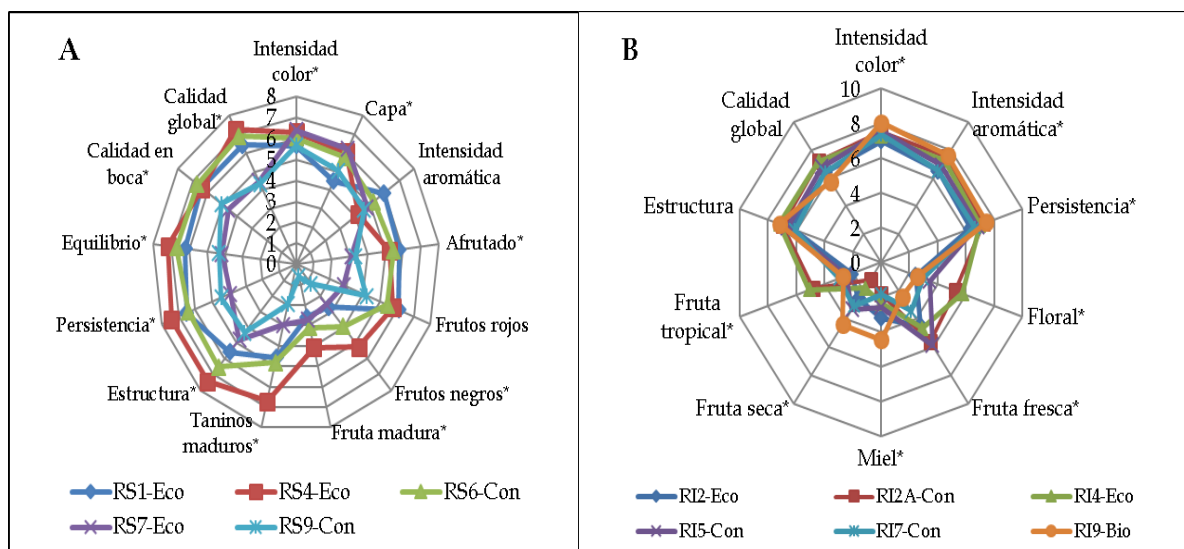


Figure iii. Sensory profile of Ribeira Sacra DO red wines (A) and Ribeiro DO white wines (B); Eco: organic wines, Con: conventional wines. *Indicates significant differences for that descriptor.

As mentioned earlier, 2014 was a climatologically unfavourable season with abundant rainfall; fungal attacks affected the sanitary status of the grapes and the microbial

population of the must. Tasters showed, in general, a greater preference for conventional rather than for organic wines, especially in white ones.

The lower score in the sensory analysis of organic wines in 2014 was associated with sensory defects in some of them. For example, in some organic red wines, tasters detected the presence of descriptors related to 4-ethylphenol, a metabolic product of *Brettanomyces*, considered negative. The microbiological tests performed on those wines confirmed the presence of this yeast. It was found in 5 red wines of 2014 of different DO, all of them from organic production.

Overall, sensory analysis showed differences between organic and conventional wines. Therefore, we can consider that organic farming favours the differentiation and diversification of wines. In addition, organic wines obtained similar scores to those of conventional production in preference tests and, in some cases, they were preferred by the tasters. However, this was not the case with wines produced in climatically unfavourable seasons, being differences between conventional and organic wines strongly marked by the campaign. On the other hand, taking into account that organic wine elaboration does not differ in excess from conventional one (with acceptable limits of the maximum content of SO₂), most of the differences observed are due to the quality of grapes obtained by cultivation system.

Application of autochthonous non-Saccharomyces yeast from Galicia to ferment Treixadura

After a preliminary study of 32 yeast strains, evaluating their fermentative and oenological abilities in monoculture at laboratory scale, four non-*Saccharomyces* yeast strains were selected: *L. thermotolerans* Lt93, *T. delbrueckii* Td315, *Starm. bacillaris* Sb474 and *M. pulcherrima* Mp278. The oenological potential of these strains was evaluated by sequential inoculation in the experimental winery of EVEGA. Fermentations kinetics varied among yeast inoculum, especially at the beginning of fermentation: ScXG3 and Td315 took 2 days to start the process; Sb474, 3 days; Lt93 and spontaneous process, 6 days, and, finally, Mp278 was the strain that had a slower onset; until 9th day no fermentative activity was observed. After sequential addition of *S. cerevisiae* ScXG3, fermentations evolved normally until the end. The free-run must contained 1.2×10^4 CFU/mL. At a qualitative level, *H. uvarum*, *M. af. fructicola*, *L. thermotolerans* and *D. hansenii* were present. After inoculation, certain differences were observed among fermentations. In general, microbial population increased in Ft and decreased slightly in Ff with some exceptions. With Td315, the number of yeasts was high at Fi and decreased in Ft and Ff. With ScXG3 the opposite occurred, yeast population increased throughout the process until the end. In Sb474 fermentations, yeast population was higher in all phases, compared to the other fermentations. Regarding implantation control of the inoculated yeast, ScXG3 appeared as 100% dominant yeast when it was added as monoculture. In the spontaneous process, up to 15 different strains of *S. cerevisiae* were identified, with predominance of two of them in codominance (46% and 25%, respectively). The second corresponded to ScXG3 profile. Percentage of implantation of Td315 and Sb474 (once ScXG3 was added) was high until the end of the fermentation. However, Mp278 was replaced by ScXG3 after Fi. Finally, Lt93 appeared in all fermentation stages, but showing low occurrence (< 20%), so it was not able

to direct fermentation; and neither was ScXG3 in this fermentation; moreover, different strains of *S. cerevisiae* were identified in codominance with ScXG3, as in spontaneous fermentation. On the contrary, in the remaining sequential fermentations ScXG3 was the dominant strain in Ft and Ff.

Chemical analysis showed significant differences among the resulting wines for all determined parameters. Alcoholic degree was higher in wines from spontaneous fermentation and the one inoculated with *S. cerevisiae* ScXG3. Sb474 and Td315 produced wines with slightly lower alcohol than pure ScXG3, but Td315 presented residual sugars. In addition, it is worth to mention that differences in some chemical parameters were found between wines elaborated with Lt93 and ScXG3, despite the low implantation of Lt93. Besides, Sb474 and Mp278 increased glycerol concentration up to 9.3 and 8.0 g/L, respectively; Sb474 and Td315 also increased total acidity. Therefore, Sb474 had a lower pH, according to other studies (Englezos et al., 2016 y 2017). This can be beneficial in wines with low acidity generated as a result of the effects of climate change. These results confirmed the ability of the non-*Saccharomyces* strains analysed to influence the classical oenological parameters determining the quality of the final wine.

In addition, wine fermentative aromas were determined by **GC-FID** and **GC-MS**. Twenty-one compounds belonging to five groups were quantified: 85% of them presented significant differences at $p < 0.001$; that is, most of the higher alcohols and all the acids, esters and acetates. A high homogeneity of the volatile composition was found for all the wines and compounds analysed. 15 of the 21 quantified volatile compounds reached a concentration above their odour threshold ($OAV > 1$) at least in one strain. In addition, 12 compounds reached a concentration with $OAV > 1$ in all wines from this assay. These volatiles are, therefore, potential contributors to the overall aroma of wine. Among the compounds quantified the highest OAV were exhibited by ethyl octanoate (fruity aroma, apple) and isoamyl acetate (banana flavour), both in the wine made with Mp278. Regarding higher alcohols, Mp278 and Td315 showed the highest concentration of total higher alcohols (exceed 300 mg/L considered the maximum desirable value). However, it was not decisive in the assessment of global quality by tasters because Mp278 was the best scored wine, while Td315 obtained the worst evaluation; both had high concentrations of isobutanol and 3-methyl-1-butanol. Sb474 strain produced wines with the highest concentration of propanol, with synergistic effects that reinforce the fruity aroma. Wines elaborated with Mp278 produced a higher concentration of volatile fruit compounds improving their aromatic profile with respect to *S. cerevisiae* ScXG3 control as well as other authors concluded (Liu et al., 2017; Varela et al., 2016). Autochthonous strains ScXG3 and Mp278 produced wines with a higher content of acetates, esters and long chain fatty acids being preferred by tasters. For example, 2-phenylethyl acetate (floral aroma) was found at concentrations above OAV in the wines made with Mp278, ScXG3 and in the spontaneous fermentation. Another important fraction of the volatile quantified was accounted by acids, especially octanoic acid in Mp278 wines. The aromatic profile obtained by summing the intensities of all volatile compounds (including $OAV < 1$) belonging to the same aromatic series reduced the differences between the least valued wines. As for the sensory descriptors, sensory attributes defined non-*Saccharomyces* wines aroma as fruity and floral.

Finally, significant correlations (Pearson and PLS) were observed between several aromatic compounds and sensory descriptors. PCA, PCoA and CCA (71-98% co-variance) confirmed separation of samples in three strains groups: Mp278-ScXG3, spontaneous-Lt93 and Sb474-Td315 (Figure iv). These results confirmed the potential of autochthonous non-*Saccharomyces* yeasts to enhance wine aroma and to obtain quality wines, as it has been validated by other authors (Azzolini et al., 2015; Englezos et al., 2016 y 2017; Gobbi et al., 2013; Liu et al., 2017; Varela et al., 2016).

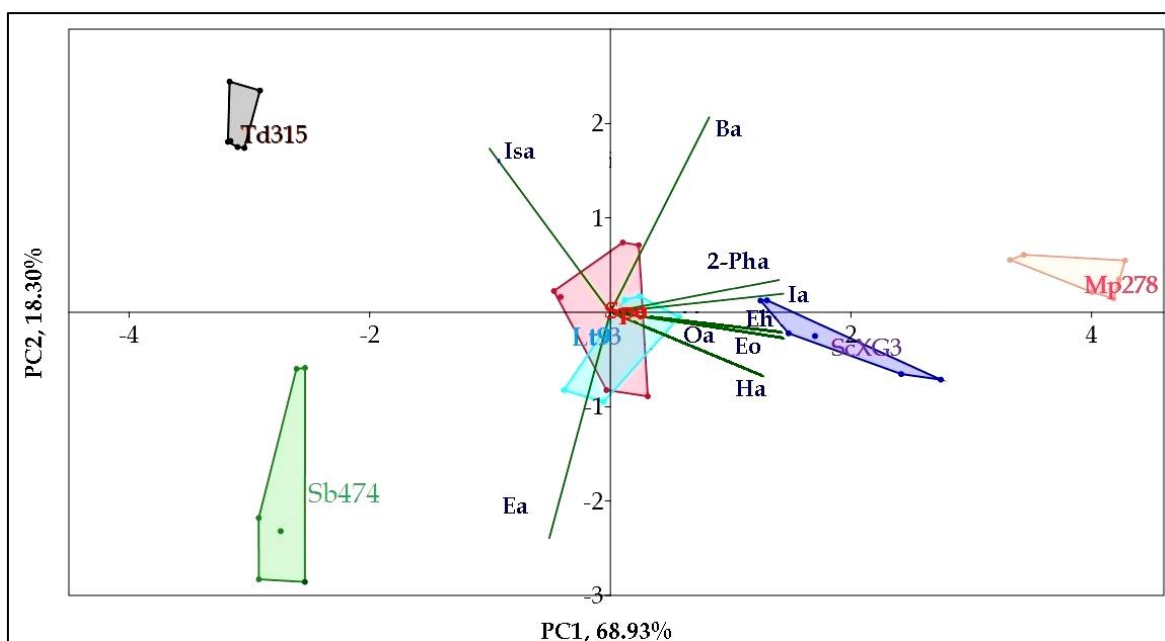


Figure iv. PCA of aromatic compounds with OAV > 1 of wines made with different autochthonous strains. 2-Pha: 2-Phenylethyl acetate, Ba: butyric acid, Ea: ethyl acetate, Eh: ethyl hexanoate, Eo: ethyl octanoate, Ha: hexanoic acid, Ia: isoamyl acetate, Isa: isobutyric acid, Oa: octanoic acid. Spo: spontaneous fermentation.

Conclusions

From the results obtained in this work the following conclusions may be drawn:

1. The influence of the culture system (organic versus conventional) on chemical characteristics of musts was grapevine variety and vintage dependent. Usually organic red grapes presented higher phenolic richness.
2. Organic farming leads to an increase in the yeast population of musts at quantitative and qualitative level. Most organic samples owned higher yeast species richness; some of them with oenological relevance. Therefore, organic vineyards are important reservoirs of yeast diversity.

3. Dominant yeast species (*Aureobasidium* spp., *Metschnikowia* spp., *H. uvarum* and *Cryptococcus* spp.) were similar between culture systems and DOs, but their proportion varied among them. In addition, most differences were found (both in number and frequency) for minor yeast species depending on the cultivation system and DO; *L. thermotolerans* was associated with Ribeiro and Monterrei DOs, whereas *Starm. bacillaris*, *Candida* spp. and *I. terricola* appeared in Rías Baixas and Ribeira Sacra DOs.
4. Richness and proportion of yeast species was mainly influenced by geographical location, but also by culture system, vintage and, to a lesser extent, by grapevine variety: species frequency was more important than species richness on yeast diversity. Thus, yeast population patterns (*microbial terroir*) could be established, which influence wine typicality at regional level.
5. During natural vinification, non-*Saccharomyces* yeast started the fermentation, but they were substituted by *Saccharomyces* strains at the end, which were able to complete the process. When this substitution did not occur, fermentations get stuck. Success of the fermentations was higher in organic musts.
6. Organic wineries from Galicia presented a high diversity of *S. cerevisiae* strains, although only few of them were widespread and appeared at relevant frequency. In addition, we did not find a defined geographical pattern between strains and wineries. Nevertheless, some strains were associated with a particular winery, so they could contribute to its wine typicality.
7. Organic wine elaboration allowed obtaining differentiated wines that were well appreciated at sensory level by tasters. Even in some cases they were preferred over conventional ones.
8. Sequential fermentation of Treixadura musts with autochthonous non- *Saccharomyces* and *S. cerevisiae* strains showed differences in fermentation kinetics, yeast population dynamics and implantation rates of inoculated strains.
9. Autochthonous non-*Saccharomyces* species applied by sequential fermentation contribute distinctive chemical and sensory characteristics to wines. Best rated wines were those made with *M. pulcherrima* Mp278 and *S. cerevisiae* ScXG3 which had higher concentration of desirable acetates and esters. Another species showed potential to reduce alcohol content and to increase acidity in wines such as *Starm. bacillaris* Sb474 and *T. delbrueckii* Td315. Sb474 and Mp278 increased glycerol concentration.

Prospects for the future

The conclusions drawn from this work open the door to new perspectives for the future. Further research is required on the application of the large collection of native yeast strains of *S. cerevisiae* and non-*Saccharomyces* identified during this thesis which may have great oenological potential. The fermentation of monovarietal musts or mixtures, coming from native grape varieties in mixed or sequential co-inoculation of one or even several species *S. cerevisiae*/non-*Saccharomyces* and the knowledge about their interactions and biocontrol activity is fascinating; it could provide technical solutions and surprising results improving quality and wine typicality. Likewise, the behaviour of these combinations, especially in the case of red wines, should be studied together with new strains of lactic acid bacteria (BAL) including species such as *Lactobacillus plantarum*, in line with new challenges and demands (palliate the effects of climate change, production of organic or special wines, etc.). Justified optimal results would need to be studied on an industrial winery scale in order to verify their behaviour and real viability. And even conclude with the marketing of the strains with the best differentiated oenological aptitude. Finally, this can economically stimulate the production of organic vineyards that maintain the regional yeast diversity and the wine particularity. But also, this natural reservoir of diversity is a valuable resource with potential use even in non-oenological fields. For example, species never before cited as inhabitants in wine-related environments such as *Sp. ruberrimus* are being researched for use in biochemical industry and agro-industrial waste treatments (Kot et al., 2018). The study and preservation of this regional biodiversity reservoir is important since it can harbour new strains with potential application not only in oenology but also in other industrial uses beyond the oenological domain.

Acknowledgments

This study was funded by the RTA2012-00021-C03-01 project of INIA (Instituto Nacional de Tecnología Agraria y Alimentaria) co-financed with FEDER funds (European Regional Development Fund). David Castrillo wishes to thank INIA and the European Social Fund for his FPI predoctoral contract. We would like to thank the producers: Esther Teixeira Lemos, Roberto Regal, Cooperativa Cume do Avia, Víctor Diéguez, Begoña Troncoso, María del Carmen Álvarez, José Luis Mateo and José dos Santos Diz, for allowing us to collect samples from their farms. Thanks to wineries of organic production: Adegas Beatriz, Corisca, Cume do Avia, Diego de Lemos, Pazo de Vieite and Quinta da Muradela for allowing us to take samples in their facilities. Thanks to the Regulatory Councils of the Monterrei, Rías Baixas, Ribeira Sacra, Ribeiro and Valdeorras Denominations of Origin and to the wineries that kindly provided the commercial wine samples.

References

1. Azzolini et al. 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.
2. Bagheri et al. 2015. The Diversity and Dynamics of Indigenous Yeast Communities in Grape Must from Vineyards Employing Different Agronomic Practices and their Influence on Wine Fermentation. S. Afr. J. Enol. Vitic. 36:2, 243–251.
3. Barata et al. 2012. The microbial ecology of wine grape berries. Int. J. Food Microbiol. 153, 243–259.20.
4. Belda et al. 2017. From Vineyard Soil to Wine Fermentation: Microbiome Approximations to Explain the “terroir” Concept. Front. Microbiol. 8: 821.
5. Blanco et al. 2006. Genetic diversity of wine *Saccharomyces cerevisiae* strains in an experimental winery from Galicia (NW Spain). A. Van Leeuw. J. Microb. 89, 351–357.
6. Blanco et al. 2011. Survival of commercial yeasts in the winery environment and their prevalence during spontaneous fermentations. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 38, 235–239.
7. Bokulich et al. 2014. Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. P. Natl. Acad. Sci. USA. 111:1, E139–E148.
8. Bokulich et al. 2016. Associations among wine grape microbiome, metabolome, and fermentation behavior suggest microbial contribution to regional wine characteristics. mBio. 7:3, art. no. e00631–16.
9. Bouzas-Cid et al. 2018. Effects of irrigation over three years on the amino acid composition of Treixadura (*Vitis vinifera* L.) musts and wines, and on the aromatic composition and sensory profiles of its wines. Food Chem. 240, 707–716.48.
10. Callejon et al. 2010. Volatile and sensory profile of organic red wines produced by different selected autochthonous and commercial *Saccharomyces cerevisiae* strains. Anal. Chim. Acta. 660: 1–2, 68–75.
11. Canonico et al. 2016. Sequential fermentation with selected immobilized non-*Saccharomyces* yeast for reduction of ethanol content in wine. Frontiers Microbiol. 7: 278.
12. Capozzi et al. 2015. Microbial terroir and food innovation: The case of yeast biodiversity in wine. Microbiol. Res. 181, 75–83.264.78.
13. Ciani et al. 2010. Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. FEMS Yeast Res. 10, 123–133.
14. Comitini & Ciani. 2008. Influence of fungicide treatments on the occurrence of yeast flora associated with wine grapes. Ann. Microbiol., 58:3, 489–493.
15. Cordero-Bueso et al. 2011. Influence of the farming system and vine variety on yeast communities associated with grape berries. Int. J. Food Microbiol. 145, 132–139.
16. Drumonde-Neves et al. 2017. Association between Grape Yeast Communities and the Vineyard Ecosystems. PLoS ONE 12:1.
17. Englezos et al. 2016. *Starmerella bacillaris* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed fermentations to reduce ethanol content in wine. Appl. Microbiol. Biotechnol. 100, 5515–5526.
18. Englezos et al. 2017 *Starmerella bacillaris* in winemaking: opportunities and risks. Curr. Opin. Food Sci. 17, 30–35.
19. Gobbi et al. 2013. *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: A strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine. Food Microbiol. 33, 271–281.
20. Grangeteau et al. 2017. Wine microbiology is driven by vineyard and winery anthropogenic factors. Microb. Biotechnol. 10:2, 354–370.
21. Knight et al. 2015. Regional microbial signatures positively correlate with differential wine phenotypes: Evidence for a microbial aspect to terroir. Sci. Rep. 5, art. no. 14233.
22. Kot, A. M., Błażej, S., Gientka, I., Kieliszek, M., Bryś, J. 2018. Torulene and torularhodin: “new” fungal carotenoids for industry? Microb. Cell. Fact. 17: 49.
23. Liu et al. 2017. Impact of sequential co-culture fermentations on flavour characters of Solaris wines. Eur. Food Res. Technol. 243, 437–445.
24. Martins et al. 2014. Metabolic changes of *Vitis vinifera* berries and leaves exposed to Bordeaux mixture. Plant Physiol. Biochem. 82, 270–278.

25. Mezzasalma et al. 2018. Geographical and Cultivar Features Differentiate Grape Microbiota in Northern Italy and Spain Vineyards. *Front. Microbiol.* 9: 946.
26. Milanović et al. 2013. Grape berry yeast communities: Influence of fungicide treatments. *Int. J. Food Microbiol.* 161:3, 240-246.
27. Patrignani et al. 2017. Characterization of yeast microbiota, chemical and sensory properties of organic and biodynamic Sangiovese red wines. *Ann. Microbiol.* 67:1, 99-109.
28. Renouf et al. 2005. Understanding the microbial ecosystem on the grape berry surface through numeration and identification of yeast and bacteria. *Aust. J. Grape Wine Res.* 11, 316-327.
29. Schmid et al. 2011. Functional and structural microbial diversity in organic and conventional viticulture: Organic farming benefits natural biocontrol agents. *Appl. Environ. Microb.* 77:6, 2188-2191.
30. Scholl et al. 2016. Composition of *Saccharomyces cerevisiae* strains in spontaneous fermentations of Pinot Noir and Chardonnay. *Aust. J. Grape Wine R.* 22, 384-390.
31. Swiegers et al. 2005. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavor. *Aust. J. Grape Wine R.* 11, 139-173.
32. Tello et al. 2011. Genetic diversity in commercial wineries: effects of the farming system and vinification management on wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.*, 112: 2, 302-315.
33. Tofalo, et al. 2013. Biogeographical characterization of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast by molecular methods. *Front. Microbiol.* 4:166, 1-13.
34. Varela et al. 2016. Volatile flavour profile of reduced alcohol wines fermented with the non-conventional yeast species *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum*. *Food Chem.* 209, 57-64.
35. Vilanova, et al. 2010. Volatile composition and sensory properties of *Vitis vinifera* red cultivars from North West Spain: Correlation between sensory and instrumental analysis. *Anal. Chim. Acta.* 720, 104-111.

Resumen

Resumen

En Galicia el vino constituye un sector muy importante no solo por el valor socioeconómico que genera, sino también por la potenciación del medio rural que implica. Sin embargo, a pesar del auge actual de la producción ecológica, sólo un porcentaje muy pequeño de viticultores apuestan por este tipo de producción. La existencia de una gran heterogeneidad en las condiciones climáticas y orográficas no siempre facilita el cultivo ecológico del viñedo. Por otra parte, los datos disponibles sobre el impacto de la producción ecológica en la viña y el vino son muy escasos. Con esta tesis, llevada a cabo en la Estación de Viticultura e Enología de Galicia (EVEGA-AGACAL), se aborda por primera vez un estudio comparativo sobre la diversidad de levaduras en uvas y mostos de producción ecológica frente a producción convencional en diferentes zonas de Galicia, así como su influencia sobre el perfil químico y sensorial de los vinos. Además, se ha evaluado el potencial enológico de algunas levaduras no-*Saccharomyces* autóctonas.

La diversidad de levaduras en uva y mosto de viñedos ecológicos y convencionales de las variedades de cuatro Denominaciones de Origen (DO) de Galicia se estudió durante tres campañas consecutivas (2013-2015) en las variedades Treixadura, Albariño, Mencía y Brancellao. A nivel cuantitativo, los mostos de origen ecológico presentaron mayor cantidad de levaduras que los convencionales. En total se identificaron 46 especies distintas pertenecientes a 22 géneros. En general, al igual que con la cantidad de levaduras, la riqueza total de especies (S) también fue más alta en las muestras de origen ecológico que en las convencionales. Teniendo en cuenta las distintas DOs, la diversidad de especies fue más alta en las DOs Rías Baixas y Ribeira Sacra que en Ribeiro y Monterrei. En cuanto a la distribución de las distintas levaduras, las especies predominantes *Aureobasidium* spp., *Metschnikowia* spp., *Hanseniaspora uvarum* y *Cryptococcus* spp. fueron las mismas en todas las muestras, pero se encontraron diferencias en la frecuencia de las distintas especies entre ambos tipos de cultivo y en las distintas DOs. Además, se establecieron diferencias regionales en las especies minoritarias, que se encontraron principalmente en el cultivo ecológico. *Lachancea thermotolerans* apareció en las DOs Monterrei y, en menor medida, Ribeiro, principalmente en mosto ecológico. En contraste, *Starmerella bacillaris*, *Issatchenkia terrícola*, diferentes especies de *Candida* y otras especies minoritarias estaban asociadas a las DOs Ribeira Sacra y Rías Baixas. Estos resultados permitieron establecer un patrón geográfico en la distribución de las levaduras.

En cuanto a los índices de diversidad (de Shannon-Wiener [H'], Simpson [1-D] y equitabilidad [E]) fueron mayores en producción ecológica, y más altos en las DOs Rías Baixas y Ribeira Sacra y la dominancia (D) fue menor. El análisis estadístico de los datos mediante SIMPER corroboró la contribución de las distintas especies a esa diversidad. Además, las pruebas ANOSIN y PERMANOVA, así como la representación gráfica de los datos mediante ACP y ACC confirmaron la existencia de patrones biogeográficos de las poblaciones de levaduras asociados a la uva (*terroir microbiano*) que pueden vincularse a la tipicidad del vino. De hecho, el factor DO fue mucho más influyente que el tipo de cultivo, el año o la variedad sobre la riqueza y frecuencia de especies de levadura.

Las bodegas que elaboran vino ecológico en Galicia utilizan procesos de fermentación espontánea. El análisis de la diversidad de cepas de *S. cerevisiae* en diversas bodegas mostró la existencia de una elevada diversidad de cepas (66) durante la fermentación. En este caso no se observó una clara asociación cepa-bodega. Algunas cepas estaban ampliamente distribuidas entre las distintas bodegas, aunque sí se encontraron otras cepas que fueron propias de cada bodega. En todas las fermentaciones se apreció un fenómeno de co-dominancia de varias cepas; este hecho favorece la complejidad y diferenciación de los vinos.

El análisis sensorial de vinos ecológicos comerciales de Galicia puso de manifiesto que la producción ecológica permite la obtención de vinos de calidad diferenciada. Incluso, en algunos casos, fueron preferidos frente a los convencionales por los catadores. Sin embargo, en campañas climatológicamente desfavorables los resultados no fueron tan favorables para los vinos ecológicos.

Los resultados de la aplicación secuencial en bodega de distintas levaduras autóctonas no-*Saccharomyces* con *S. cerevisiae* ScXG3 mostraron diferencias en la cinética de fermentación, la dinámica de implantación de las distintas cepas, y las características químicas y sensoriales de los vinos. Los vinos mejor valorados fueron los elaborados con *M. pulcherrima* Mp278 y con ScXG3, que presentaron una mayor concentración de ésteres y acetatos. Otras especies como *Starm. bacillaris* Sb474 y *T. delbrueckii* Td315 mostraron potencial para reducir el grado alcohólico y aumentar la acidez total de los vinos. Además, Sb474 y Mp278 aumentaron la concentración de glicerol del vino.

Estos hallazgos mostraron que el viñedo es un importante reservorio de la diversidad de levaduras, especialmente en cultivo ecológico, que debe ser preservado como un recurso con potencial uso para mejorar la calidad y tipicidad de los vinos frente a los nuevos retos y necesidades e incluso más allá del campo enológico.

Palabras clave: viñedo ecológico, diversidad de levaduras, *terroir* microbiano, bodegas ecológicas, cepas de *S. cerevisiae*, análisis sensorial, levaduras no-*Saccharomyces*

1. Introducción

1. Introducción

1. Introducción

1.1. La vitivinicultura ecológica en la actualidad

1.1.1. La vitivinicultura ecológica en el mundo, Europa y España

En la actualidad existe una tendencia mundial hacia un incremento de la producción ecológica, incluida la vitivinicultura, de gran importancia no sólo en términos medioambientales, sino también como generador de valor socioeconómico añadido y por contribuir a una producción más sostenible y saludable (Azabagaoglu et al., 2007; D'Amico et al., 2016; Fragoulis et al., 2009; Mariani y Vastola, 2015; Provost y Pedneault, 2016). Las uvas son el segundo cultivo permanente en importancia por superficie de la producción ecológica en Europa después de la aceituna.

España es el mayor viñedo del mundo (14% y 30% de la superficie mundial y de la Unión Europea, respectivamente) y el tercer productor de vino mundial (OIV, 2017). Además, España es el país con la mayor superficie de viñedo ecológico del mundo y que ha experimentado el mayor crecimiento durante la última década (European Comission, 2016; Willer y Lernoud, 2018) (Figura 1.1). Paralelamente, la evolución de la producción y demanda de los productos ecológicos, y de los vinos biológicos en particular, ha aumentado considerablemente en las últimas décadas en España, que también es el primer productor mundial de vinos ecológicos (MAPAMA, 2017). Esto puede deberse a una mayor conciencia, conocimiento, aceptación y valoración general por parte de los consumidores con respecto a la calidad, la salud y el medio ambiente (Laureati y Pagliarini, 2016).

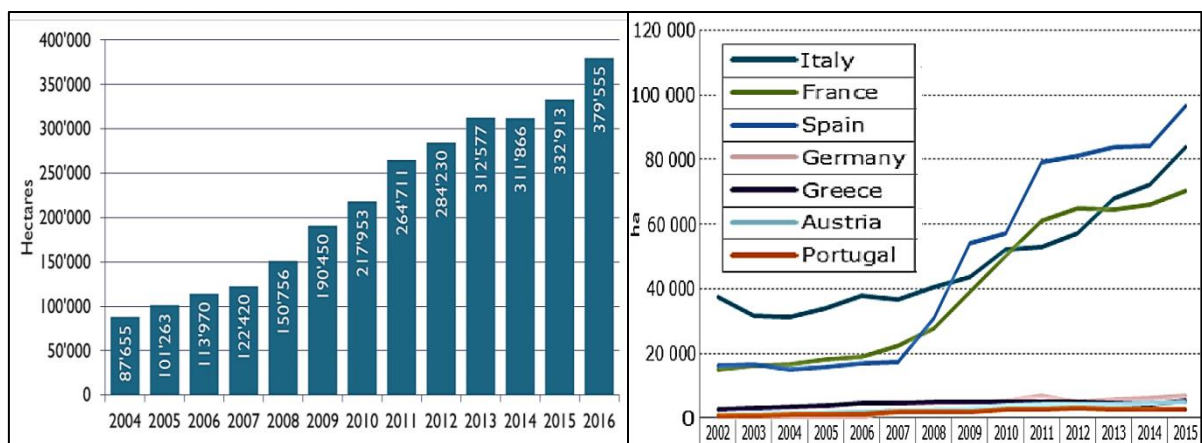


Figura 1.1. Aumento de la superficie cultivada de viñedo ecológico en el mundo (izquierda) y en Europa (derecha).

1.1.2. Particularidades de la vitivinicultura ecológica y legislación vigente

La elaboración y etiquetado de vino ecológico requiere que la uva proceda de producción ecológica y se restringen además los productos y sustancias autorizados en la elaboración del vino. Se exige que se respeten ciertas prácticas en el viñedo y en la bodega, de acuerdo con lo establecido en los siguientes Reglamentos actualmente vigentes:

- Reglamento (CE) n° 834/2007 del Consejo de 28 de junio de 2007 sobre producción y etiquetado de los productos ecológicos y por el que se deroga el Reglamento (CEE) n° 2092/91.
- Reglamento (CE) n° 889/2008 de la Comisión de 5 de septiembre de 2008 por el que se establecen disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) n° 834/2007 del Consejo sobre producción y etiquetado de los productos ecológicos, con respecto a la producción ecológica, su etiquetado y su control.
- Reglamento de Ejecución (UE) n° 203/2012 de la Comisión de 8 de marzo de 2012 que modifica el Reglamento (CE) n° 889/2008, por el que se establecen disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) n° 834/2007 del Consejo, en lo que respecta a las disposiciones de aplicación referidas al vino ecológico.
- Reglamento de Ejecución (UE) 2016/673 de la Comisión de 29 de abril de 2016 que modifica el Reglamento (CE) n° 889/2008.

La producción de uva y vino ecológico deberá perseguir, entre otros objetivos generales, asegurar un sistema viable de gestión vitícola que respete los sistemas y los ciclos naturales, preservando el equilibrio entre organismos contribuyendo a alcanzar un alto grado de biodiversidad. Estará basada en principios como el diseño y la gestión adecuados de los procesos biológicos y en sistemas ecológicos que utilicen recursos naturales propios del sistema como organismos vivos y métodos de producción mecánicos, y que excluyan el uso de OMG y productos producidos a partir de o mediante OMG. Se prohíbe la utilización de plaguicidas (herbicidas, fungicidas, insecticidas...) y fertilizantes de síntesis en el viñedo (Reglamento (CE) n° 834/2007).

Entre las prácticas exigidas en la bodega, el vino ecológico debe producirse exclusivamente con materias primas, productos y sustancias ecológicas autorizadas. Hay que destacar la utilización de levaduras derivadas de materias primas ecológicas, al igual que la adición de taninos o clarificantes naturales como albúmina de huevo, gelatina alimentaria o goma arábiga que no podrán proceder de la producción convencional (RE UE n° 203/2012). Sin embargo, el contenido máximo de anhídrido sulfuroso no es restrictivo comparativamente con las concentraciones requeridas para una elaboración convencional, ya que en la mayor parte de los vinos no superará los 100 mg/L en los vinos tintos y 150 mg/L en los vinos blancos (anexo I.B, parte A, del Reglamento (CE) n° 606/2009) con un contenido de azúcar residual inferior a 2 g/L. Para todos los demás vinos, se reducirá en 30 mg/L el contenido máximo de anhídrido sulfuroso.

En el artículo 20 del Reglamento (CE) n° 834/2007 se establece además que, para la producción de levadura ecológica, solo se utilizarán sustratos producidos ecológicamente.

Otros productos y sustancias únicamente podrán utilizarse en la medida en que hayan sido autorizados para su uso en la producción ecológica de conformidad con el artículo 21 de dicho Reglamento. En los vinos ecológicos no podrá haber simultáneamente levadura ecológica y levadura no ecológica.

Por otra parte, aunque actualmente existen en el mercado levaduras comerciales procedentes de producción ecológica, el uso de levaduras propias es una práctica que da un valor añadido al producto final. Los vinos obtenidos mediante los métodos tradicionales de fermentación espontánea son más apreciados por los consumidores por su estructura y complejidad aromática y se ha demostrado que las prácticas de cultivo ecológico y la vinificación espontánea favorecen la diversidad de las levaduras autóctonas (Blanco et al., 2013; Guzzon et al., 2011; Tello et al., 2011).

El 22 de mayo de 2018, el Consejo de la Unión Europea ha adoptado el nuevo Reglamento (UE) 2018/848 sobre producción ecológica y etiquetado de productos ecológicos que deroga el Reglamento 834/2007 (que regula de momento la agricultura ecológica) y que entrará en vigor el 1 de enero de 2021. La nueva normativa contempla las necesidades del sector, para mantener una producción ecológica realmente sostenible, limitando el uso de prácticas y productos y considerando al suelo como un organismo vivo que no consista sólo en sustituir insumos convencionales por otros ecológicos.

1.2. Efectos de la producción ecológica en la vitivinicultura

Durante los últimos años se ha observado una creciente demanda del vino ecológico (producido según el Reglamento de Implementación de la Comisión Europea (UE) nº 203/2012). La producción ecológica requiere una serie de prácticas agronómicas, técnicas de manejo del suelo, fertilización y control de plagas que difieren de la producción convencional. El cultivo ecológico tiene efectos sobre la biodiversidad (incluida la población microbiana) y la calidad de la uva obtenida en el viñedo y sobre el proceso de vinificación en la bodega. Por tanto, influye en las características químicas y sensoriales del vino resultante (Cordero-Bueso et al., 2011b; Lambrechts y Pretorius, 2000; Schmid et al., 2011; Tello et al., 2011).

Un enfoque exitoso de la viticultura ecológica debe basarse en la implementación de un sistema de producción donde exista un equilibrio entre viña y el resto de organismos que mantenga una biodiversidad rica para contribuir a minimizar la presión de plagas y enfermedades. De esta forma se reduce el uso de plaguicidas como fungicidas a base de cobre, sin comprometer la productividad del viñedo (Sivčev et al., 2010; Thies y Tschardtke, 1999). Las pruebas agronómicas, microbiológicas y químicas mostradas por algunos autores indican que la respuesta de la viña cultivada usando un enfoque ecológico puede ser comparable o mejor al de las viñas cultivadas de manera convencional. Las investigaciones de Guzzon et al. (2015) demostraron que el cultivo biodinámico de la vid (compatible con el cultivo ecológico por ser además más restrictivo), puede ser sostenible incluso en condiciones difíciles (como las encontradas en Galicia), lo que representa una alternativa interesante a los enfoques vitivinícolas tradicionales.

1.2.1. Efecto de la producción ecológica sobre la diversidad microbiana de la uva

Algunas prácticas enológicas, como la utilización masiva de levaduras comerciales y la consecuente colonización de las bodegas, pueden contribuir a reducir la biodiversidad de las levaduras nativas. En este contexto, el viñedo constituye un reservorio de levaduras autóctonas de interés enológico. Las fermentaciones inducidas en estudios realizados por Cordero-Bueso et al. (2011a y 2011b) generaron un gran reemplazo de levaduras nativas.

Es conocido que la comunidad microbiana de la uva, especialmente las levaduras, está influenciada por múltiples factores como la precipitación, la temperatura, el grado de maduración, el estado sanitario de la vendimia y el uso de productos fitosanitarios, que además varían significativamente dependiendo del sistema de cultivo (Barata et al., 2012; Martins et al., 2014; Nemcová et al., 2015; Nisiotou y Nychas, 2007; Patrignani et al., 2017).

La viticultura convencional es uno de los sistemas agrícolas que más plaguicidas y compuestos químicos de síntesis consume (Provost y Pedneault, 2016). Muchos plaguicidas tienen actividad microbicida. Su uso intensivo junto con otras actividades antrópicas, puede desencadenar la acumulación de resistencia sistémica a las plagas (Leroux et al., 2002) e impactar negativamente con una reducción sistemática de la biodiversidad microbiana incluso en producción ecológica (Comitini y Ciani, 2008; Cordero-Bueso et al., 2014; Grangeteau et al., 2017b; Martins et al., 2014). En este contexto, la reducción de pesticidas en viticultura y el mayor despliegue de la viticultura ecológica se vuelven sumamente valiosos. Por el contrario, otras investigaciones mostraron un impacto menor de los fungicidas en la composición de la comunidad de levaduras asociada con las uvas (Čadež et al., 2010; Coppola et al., 2011; Guzzon et al., 2015). Drumonde-Neves et al. (2016), observaron una mayor biodiversidad en los entornos vitivinícolas y viñedos activos donde se produce una intervención humana regular en comparación con los abandonados. Sin embargo, las condiciones óptimas de cultivo de un viñedo ecológico debieran diferir en gran medida de un viñedo abandonado, no cultivado o en semiabandono. Los cultivos bajo manejo ecológico muestran una mayor riqueza de levaduras silvestres y bacterias a nivel cuantitativo (número) y cualitativo (diversidad de especies) que pueden contribuir a la fermentación del vino, incluidas las especies no-*Saccharomyces* (Cordero-Bueso et al., 2011a, 2011b y 2011c; Tofalo et al., 2011). La presencia de cobre también puede afectar significativamente a la cinética de fermentación de las levaduras *S. cerevisiae* de una manera cepa-dependiente (Ferreira et al., 2006). Milanović et al. (2013) encontraron que *S. cerevisiae* mostró menos diversidad intraespecífica en las muestras ecológicas que en muestras convencionales.

En relación con los herbicidas, agroquímicos y manejo del suelo, Cordero-Bueso et al. (2011b) han demostrado que el suelo desnudo por labranza podría ser una alternativa sostenible debido al uso reducido de agroquímicos y a la alta biodiversidad de levaduras resultante. Estos autores también mostraron que la presencia de herbicidas en el viñedo tiene un impacto menor en la diversidad de las comunidades de levaduras asociadas a la uva. Sin embargo, los resultados de estas investigaciones realizadas en climas semiáridos podrían no ser viables en las regiones gallegas de cuantiosas precipitaciones anuales.

La vitivinicultura ecológica se ve reforzada con la utilización de cultivares autóctonos adaptados a las condiciones edafoclimáticas y cepas de levaduras nativas, que están mejor adaptadas a las condiciones de la bodega y de los mostos. Esto permite la elaboración de vinos de calidad conservando su tipicidad y singularidad (Tofalo et al., 2016), características especialmente apreciadas en un vino de producción ecológica (Drumonde-Neves et al., 2017). Las distintas variedades de uva pueden presentar una biodiversidad microbiológica diferente (Brandt y Mølgaard, 2001; Cordero-Bueso et al., 2011a y 2011c; Guzzon et al., 2015), especialmente por la relación singular planta-suelo de la rizosfera (Sivčev et al., 2010). También influyen el año y el sistema de conducción, que pueden modular con éxito la intensidad de las enfermedades fúngicas y plagas y, por tanto, la competencia microbiológica entre ellas (Keller et al., 2015; Nemcová et al., 2015). Por todo ello, en el contexto de la viticultura ecológica, la selección óptima de las variedades de vid autóctonas o tradicionales mejor adaptadas supone una ventaja (Pedneault y Provost, 2016; Sivčev et al., 2010).

Muchos autores han mostrado por distintos métodos (dependientes e independientes de cultivo, metagenómicos, pirosecuencia) la existencia de diferencias significativas en las poblaciones de levaduras encontradas en uvas de origen ecológico (incluido biodinámico) cuando se compararon con uvas convencionales (Bagheri et al., 2015; Cordero-Bueso et al., 2011a y 2014; Grangeteau et al., 2017; Martins et al., 2014; Setati et al., 2012 y 2015; Tello et al., 2011). Confirmaron que el viñedo menos tratado mostró una riqueza de especies significativamente mayor, incluidas muchas levaduras con potencial uso como biocontrol; es decir, que los tratamientos fitosanitarios en el viñedo afectaron negativamente a la microbiota de la uva o el mosto.

Por todo ello, el estudio de las comunidades de levaduras autóctonas de viñedos y bodegas es un paso importante hacia la preservación de los recursos genéticos nativos.

1.2.2. Efecto de la producción ecológica sobre la composición química y la calidad del vino

Las levaduras producen una gran cantidad de metabolitos como alcoholes, CO₂, glicerol, ácidos y otras sustancias volátiles que afectan a la calidad del vino (Ugliano y Henschke, 2009; Vernocchi et al., 2015). Sin embargo, aunque numerosos estudios han descrito los efectos del cultivo ecológico de la uva sobre la calidad final y los atributos sensoriales del vino (Comuzzo et al., 2013; Granato et al., 2014; Martin y Rasmussen, 2011; Mulero et al., 2010; Muñoz-Bernal et al., 2013; Parpinello et al., 2015; Tassoni et al., 2014), se dispone de poca información sobre la evolución de la población de levaduras durante los procesos vitivinícolas ecológicos y su influencia sobre estos aspectos (Patrignani et al., 2017).

Es de aceptación general que la formación de compuestos volátiles durante la fermentación del mosto de uva depende de varios factores como la naturaleza y la concentración de los compuestos inicialmente presentes en el mosto (sus proporciones también difieren de una variedad de uva a otra), la capacidad de la levadura inoculada para transformarlos y las condiciones de la vinificación (Blanco et al., 2013; Patrignani et al., 2017). Pero también puede influir el sistema de producción y, se sabe que las vides ecológicas sufren más estrés biótico que las convencionales.

En respuesta, las plantas de producción ecológica producen mayores concentraciones de metabolitos secundarios, incluidos los compuestos fenólicos (Provost y Pedneault, 2016). Cozzolino et al. (2009) pudieron discriminar los espectros de infrarrojo de vinos ecológicos y no ecológicos dando como resultado diferentes perfiles fenólicos. Por su parte, Núñez-Delicado et al. (2005) señalaron que las muestras ecológicas de uva mostraron mayores tasas de actividad de polifenol oxidasas en comparación con las uvas convencionales. La elaboración de vinos tintos de calidad requiere también disponer de uva con una adecuada concentración en compuestos fenólicos, especialmente antocianos y taninos (madurez fenólica) (Ribéreau-Gayon et al., 2003).

En cuanto al efecto del cultivo ecológico sobre la riqueza fenólica de la uva, cabe mencionar que la producción, rendimiento, gestión de la vegetación y otros aspectos relacionados directamente con el sistema de cultivo, pueden influir en la maduración y por tanto en los compuestos fenólicos (Provost et al., 2016; Soto et al., 2012). La cantidad y extractabilidad de los compuestos fenólicos aumenta durante la maduración por lo que su concentración suele ser mayor en uvas ecológicas debido a una mayor prolongación de la maduración (Brandt y Mølgaard, 2001; Laureati et al., 2014). Estudios previos indican que la predicción de la riqueza fenólica de las uvas permite no solo evaluar el potencial enológico de las variedades sino también optimizar los protocolos de vinificación en bodega (González-Neves et al., 2010).

Así, la adecuación de una variedad a un lugar determinado es crucial en la producción ecológica. Se basa en su capacidad para alcanzar la madurez tecnológica, es decir, una óptima relación entre el contenido en azúcar y la acidez. Recientemente, en dos sistemas de cultivo similares e independientemente de la vinificación realizada, Patrignani et al. (2017) encontraron en vinos biodinámicos una mayor acidez volátil, mientras que una mayor acidez total, polifenoles totales y materia seca caracterizaron los vinos ecológicos. Por su parte, Parpinello et al. (2015) observaron en un estudio comparativo similar que el vino ecológico mostró un perfil de aroma más complejo durante el primer año. Otros autores encontraron diferencias entre estos y otros parámetros químicos y sensoriales (Granato et al., 2004; Laureati et al., 2015; Parpinello et al. 2015). Martín y Rasmussen (2011) determinaron que el análisis sensorial del vino ecológico no mostró una diferencia notoria en el aspecto visual, intensidad y calidad del aroma, ni en el sabor respecto a los convencionales.

Por otra parte, aunque las cepas de levadura difieren en su capacidad de producir sulfitos, la composición del mosto y las condiciones ambientales también influyen en su producción (Vernocchi et al., 2015). Se ha descrito que muchos vinos ecológicos contienen menores cantidades de anhídrido sulfuroso que los vinos convencionales (Guerrero y Cantos-Villar, 2015). En los vinos convencionales se añade una alta concentración de SO₂ en todas las fases de la elaboración que repercute en la microbiota y en las características organolépticas del vino. Sin embargo, en las elaboraciones de vino ecológico se tiende a reducir la concentración de SO₂ en el vino, y se estudia su efecto a nivel sensorial. Balboa-Lagunero et al. (2013) encontraron que algunas cepas de levaduras con altas tasas de consumo de aminoácidos (precursores de los atributos de oxidación en el vino), redujeron con éxito la aparición de aldehídos relacionados con la oxidación, así como la intensidad de

los sabores desagradables en vino ecológico no sulfitado. Comuzzo et al. (2013) realizaron un estudio sobre mil vinos ecológicos procedentes de seis países europeos de 2006 a 2008 cuyos parámetros de control de calidad generalmente estuvieron de acuerdo con los valores detectables para los vinos convencionales (SO_2 total < 120 mg/L).

En cuanto a la concentración de cobre, en los vinos convencionales oscila entre 0.02 y 3 mg/L, pero debe mantenerse por debajo de 0.5 mg/L para evitar reacciones indeseables como pardeamiento, quiebras o turbidez (da Costa et al., 2014). A pesar del importante uso del cobre utilizado en la protección fitosanitaria del viñedo ecológico, utilizado en ocasiones de forma sistemática junto con el azufre, se ha observado que su nivel en uvas y vinos ecológicos puede mantenerse por debajo de los niveles máximos de 50 mg/kg de uva y 1 mg/L de vino (Provenzano et al., 2010; Reglamento (CE) 396/2005).

1.2.3. Efecto de la producción ecológica sobre las propiedades saludables del vino y la percepción de los consumidores

El sistema de producción influye no solo a nivel medioambiental sino también sobre las características saludables del vino, lo que repercute directamente sobre su valoración por parte de los consumidores. Por lo tanto, su aceptación en el mercado debe tenerse en cuenta también desde un enfoque económico.

Laureati y Pagliarini (2016) apuntaron que el vino ecológico tiene cualidades nutricionales comparables o mejores que el vino convencional, de acuerdo con algunos autores que detectaron una mayor actividad antioxidante y niveles de compuestos fenólicos totales significativamente mayores en vinos ecológicos que en convencionales (Martin y Rasmussen, 2011; Vinković Vrček et al., 2011). Aunque, según un estudio de Mulero et al. (2009), las diferencias en la concentración de antocianinas y trans-resveratrol no se encontraron a largo plazo (6 meses) en los perfiles fenólicos de vinos ecológicos y convencionales. Sin embargo, los vinos ecológicos sí mantuvieron un nivel significativamente mayor de derivados hidroxicinámicos beneficiosos para el organismo, comparados con los convencionales. Otros autores como Zafrilla et al. (2003) encontraron diferencias en la actividad antioxidante en vinos blancos ecológicos frente a los convencionales, aunque no así en tintos. Parpinello et al. (2015) detectaron un efecto de las prácticas de manejo en viñedo biodinámico sobre flavonoides y otros antioxidantes en comparación con el convencional.

En cuanto a componentes nocivos, Comuzzo et al. (2013) observaron que la concentración de ocratoxina A estaba por debajo del límite legal europeo en el 95% de los vinos ecológicos analizados. Por otro lado, encontraron altas concentraciones de aminas biógenas en muchos vinos, posiblemente debido a un mal manejo de la fermentación maloláctica (FML). Otros trabajos mostraron que la mayoría de los pesticidas son eliminados durante la vinificación, dejando cantidades insignificantes de residuos en el vino convencional (Bonn et al., 2015; Cabras y Angioni, 2000; González-Rodríguez et al. 2009). Sin embargo, algunos estudios descubrieron que extraordinariamente pueden permanecer fungicidas en el vino (Plana, 2013).

En cuanto a la composición de metales, Vinković Vrček et al. (2011) no encontraron diferencias significativas entre vinos ecológicos y convencionales. Ahora bien, su presencia residual puede alterar el crecimiento de levaduras y/o alterar la calidad sensorial final del vino (González-Rodríguez et al., 2009).

Los resultados sobre seguridad alimentaria y calidad sensorial son escasos y, a veces contradictorios, impidiendo extraer conclusiones generales sobre si el vino ecológico es de mejor calidad que el vino convencional. Sin embargo, los recientes resultados de Schäufele y Hamm (2018) coinciden con Laureati y Pagliarini (2016) en la observación de una actitud positiva general con una mayor proporción de gasto en el vino ecológico en los países europeos y extraeuropeos, principalmente por razones de salud y una preferencia por productos medioambientalmente sostenibles. Pero también porque los consumidores están interesados en ayudar a los productores que adoptan estas innovaciones mostrando fuertes actitudes proambientales.

Se cree que es posible lograr una mayor predisposición a pagar un precio más elevado por el vino ecológico aumentando la participación del consumidor en cuestiones de sostenibilidad, que también incluye aspectos sociales, a través de la barrera de la información que debe ser solventada (Laureati y Pagliarini, 2016; Schäufele y Hamm, 2018). No obstante, para el grupo de consumidores de bajos ingresos, el precio del vino ecológico parece ser una traba a pesar de sus actitudes positivas hacia el ecologismo (Schäufele y Hamm, 2018). Asimismo, puede constituir una ventaja comercial para los vinos ecológicos que muchos de ellos contengan menores cantidades del alérgeno SO₂, ftalatos y otros compuestos nocivos que los vinos convencionales (Costanigro et al., 2014; Guerrero y Cantos-Villar, 2015).

1.3. Papel de las levaduras en la elaboración de los vinos

1.3.1. Origen de las levaduras presentes en la vinificación

Los microorganismos que intervienen en el proceso de fermentación proceden de la uva, de la propia bodega o bien tienen un origen externo mediante inóculos de levaduras y/o bacterias comerciales.

1.3.1.1. Levaduras procedentes del viñedo (presentes en las bayas)

La ecología microbiana en la superficie de las uvas es compleja. En ella cohabitan gran diversidad de bacterias, hongos filamentosos y levaduras que influyen en las características de los mostos, el desarrollo de la fermentación y, por tanto, en las propiedades del vino resultante. Tradicionalmente se ha considerado a las uvas como la primera fuente de microorganismos que participan en la vinificación, pudiendo ser detectados en las bayas desde el inicio de la maduración (Barata et al., 2012; Lafon-Lafourcade, 1983).

Algunos investigadores opinan que los vectores que permiten el transporte y diseminación de las levaduras y otros microorganismos de interés enológico hasta los racimos pueden ser el viento (Carrascosa et al., 2005), insectos como abejas, avispa o *Drosophila* (Bisson et al., 2017; Mortimer y Polsinelli, 1999; Zacchi y Vaughan-Martini, 2002), gotas de lluvia o granizo (Barata et al., 2012) o pájaros migratorios (Francesca et al., 2012). La población de levaduras encontrada en uva suele ser del orden de 10^3 a 10^5 células/baya, dependiendo de su grado de madurez (aumentando a lo largo de la maduración), del estado físico y sanitario de la uva (Barata et al., 2012; Martins et al., 2014; Renouf et al., 2005), de las condiciones climatológicas en el viñedo como lluvia, humedad, viento o temperatura (Combina et al., 2005; Rementería et al., 2003) y de los tratamientos sanitarios aplicados (Fleet, 2008; Hidalgo, 2003). Otros factores que determinan la diversidad de las levaduras presentes sobre la superficie de las bayas son el suelo, la variedad de uva y las técnicas culturales empleadas en el viñedo (Renouf et al., 2005 y 2006). Además, se ha observado que la distribución de especies varía entre zonas geográficas, métodos de cultivo y entre vendimias sucesivas (Belda et al., 2017b; Bokulich et al., 2014 y 2016; Jolly et al., 2003a).

La integridad de las bayas afecta cuantitativa y cualitativamente a la ecología microbiana de las uvas (Barata et al., 2012). Así, en las uvas sanas e intactas se detectan levaduras Basidiomycota de los géneros *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* o *Rhodosporidium* y la especie dimórfica de hongo filamentoso-levadura *Aureobasidium pullulans*, habitualmente presentes en las hojas y partes verdes de la vid (Bagheri et al., 2015; Barata et al., 2012; Prakitchaiwattana et al., 2004). Debido al debilitamiento de la epidermis de la uva durante la maduración, a que pueden aparecer microfisuras por el envejecimiento o deshidratación, o a causa de daños físicos mediados por insectos, pájaros u hongos invasivos, se libera mosto y azúcares sobre la superficie de la baya. En la medida en que esto sucede, se favorece el aumento del número de especies Ascomycota oxidativas o con metabolismo débilmente fermentativo, pertenecientes a los géneros *Candida*, *Hanseniaspora*, *Metschnikowia* o *Pichia* (Barata et al., 2012; Fleet et al., 2002; Prakitchaiwattana et al., 2004). Cuando las bayas tienen la cutícula claramente dañada la disponibilidad de azúcares es mayor, permitiendo el desarrollo de especies con mayor capacidad fermentativa, como *Zygoascus hellenicus* y otras del género *Pichia*, así como especies con capacidad para alterar los mostos y los vinos como *Zygosaccharomyces bailii* (Barata et al., 2012).

En numerosos estudios llevados a cabo en condiciones de vendimia real (sin discriminar entre uvas sanas y dañadas), las levaduras apiculadas del género *Hanseniaspora* son dominantes (especialmente la especie *Hanseniaspora uvarum* y su anamorfo *Kloeckera apiculata*) que pueden llegar a constituir hasta un 50%-99% de las levaduras aisladas en las bayas (Beltran et al., 2002; Combina et al., 2005; Hierro et al., 2006). *Metschnikowia pulcherrima* y *Candida stellata* son otras especies mayoritarias sobre las uvas (Bisson et al., 2017; Clemente-Jiménez et al., 2004). También se pueden encontrar, aunque en menor proporción otras especies de *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Hansenula* o *Brettanomyces* (Barata et al., 2012). La especie *Saccharomyces cerevisiae* rara vez se ha aislado en uvas utilizando las técnicas habituales de muestreo para levaduras (Fleet y Heard, 1993; Van der Westhuizen et al., 2000). En la superficie de las bayas aparece en

porcentajes inferiores al 0.1% del total de la biodiversidad de levaduras, por lo que no suele detectarse (Mercado et al., 2007; Povhe Jemec et al., 2001; Prakitchaiwattana et al., 2004; Van der Westhuizen et al., 2000). En mostos biodinámicos (antes de la fermentación), *S. cerevisiae* estuvo presente en niveles bajos o por debajo de la detección, representando un máximo del 3-5% de la población total de levadura (Bagheri et al., 2015). Sin embargo, al aumentar la disponibilidad de azúcares y nutrientes con la liberación de mosto, por ejemplo, en uvas dañadas, *S. cerevisiae* es detectada en mayor proporción (Bisson et al., 2017; Mortimer y Polsinelli, 1999). En este sentido, Schuller et al. (2005) identificaron esta especie en las uvas de un viñedo de la región de Vinho Verde (territorio portugués muy próximo a Galicia y climatológicamente similar) en cantidad suficiente como para llevar a cabo la fermentación alcohólica (FA).

Por otro lado, las interacciones entre microorganismos también inducen variaciones poblacionales de levaduras. El desarrollo del hongo *Botrytis* provoca un incremento en tres órdenes de magnitud en la población superficial de levaduras (Nisiotou y Nychas, 2007). Más recientemente, Guzzon et al. (2014) observaron que algunos géneros presentes en la uva como *Hanseniaspora*, *Metschnikowia* e *Issatchenkia* podrían actuar como agentes de biocontrol frente al hongo *Botrytis cinerea* causante de podredumbre en las uvas, protegiéndolas de su proliferación.

1.3.1.2. Levaduras presentes en la bodega

El equipamiento, la maquinaria y las instalaciones de la bodega albergan levaduras que pueden intervenir en la vinificación por transferencia cruzada del mosto o vino mediante contacto o a través del aire. Algunos autores apuntan a que estas poblaciones están formadas mayoritariamente por *S. cerevisiae* (Fleet y Heard, 1993; Martini, 2003; Pretorius, 1999 y 2000). Sin embargo, otros estudios han demostrado la presencia e incluso que la mayoría de levaduras aisladas sobre las superficies de la bodega eran no-*Saccharomyces* de los géneros *Candida*, *Pichia*, *Hansenula*, *Brettanomyces*, *Issatchenkia* o *Rhodotorula* (Renouf et al., 2007a; Sabaté et al., 2002). Las especies que se pueden encontrar en las bodegas proceden de vendimias y fermentaciones alcohólicas realizadas anteriormente en esas instalaciones. Estas levaduras pueden ser diferentes a las identificadas en las uvas y son capaces de permanecer en ambientes aerobios o en restos de vino o mosto que no se hayan eliminado completamente durante la limpieza (Guillamón, 1998; Jolly et al., 2003b). Así, Renouf et al. (2007a) comprobaron la presencia en la superficie de barricas y depósitos de géneros de levaduras que anteriormente habían detectado en las uvas, como *Cryptococcus*, siendo capaces de sobrevivir y establecerse en el ecosistema de la bodega a pesar de que no se desarrollaron en el mosto o en el vino.

Por otro lado, se ha comprobado la presencia de cepas de *S. cerevisiae* encontradas en la fermentación del año anterior en la misma instalación en las superficies (Sabaté et al., 2002). La limpieza y la naturaleza de las superficies en las instalaciones influyen en la cantidad y diversidad de levaduras residentes en la bodega. Así, superficies irregulares o materiales no pulidos albergarían un mayor número de levaduras (Pretorius, 2000). Esto es más relevante en bodegas donde se elaboran vinos artesanalmente, como en algunas bodegas de producción ecológica, especialmente en barricas y equipamiento antiguos.

1.3.1.3. Levaduras comerciales

Por último, una fuente importante de las levaduras ligadas a la fermentación son las levaduras comerciales. La mayor parte de las levaduras utilizadas en la elaboración de vino actualmente son levaduras de origen natural, seleccionadas y multiplicadas a escala industrial. Garantizan la pureza de la cepa y la concentración inicial del inóculo. Existen varios tipos de levaduras de producción industrial siendo la levadura seca activa (LSA) la más utilizada ya que es una levadura deshidratada y comercializada herméticamente cuya ventaja es permitir su conservación a medio plazo. Su vida es mucho más larga que la levadura fresca. Requiere una rehidratación y condiciones especiales de activación. Otras presentaciones como levadura seca instantánea, levadura fresca, etc. no suelen utilizarse en la industria enológica. En cualquier caso, las levaduras comerciales han sido seleccionadas por sus propiedades enológicas y suelen presentar una buena adaptación a las condiciones de bodega. Así, suelen prevalecer en las bodegas de unas campañas a otras (Blanco et al., 2011). Incluso en algunas regiones, en bodegas familiares, puede utilizarse el pie de cuba o trasiego de mosto a partir de un tanque en fermentación.

Por último, hay que decir que la demanda y las posibilidades de aplicación han permitido la existencia de un catálogo de cepas comerciales de levaduras ecológicas.

1.3.2. Dinámica de la población de levaduras en la vinificación

La diversidad de especies de levaduras varía no solo en el viñedo sino también durante el proceso de vinificación. Durante la fermentación pueden intervenir de forma secuencial distintas levaduras pertenecientes a diferentes géneros. *S. cerevisiae*, típicamente alcohógena, es la principal levadura que lleva a cabo la FA, pero pueden intervenir otras especies en el proceso, especialmente en la fermentación espontánea. Esta otra diversidad de especies es conocida como el grupo de levaduras no-*Saccharomyces*, que inician el proceso e intervienen principalmente en la fase inicial de la FA (Jolly et al., 2003a; Romano et al., 2003).

Se conocen más de 100 géneros distintos de levaduras. Sin embargo, las levaduras presentes de manera significativa en la uva, el mosto y los ambientes propios de la elaboración del vino relacionados con el proceso de la vinificación, o que son capaces de desarrollar alteraciones en el vino, representan no más de una veintena de géneros. Entre ellos destacan *Aureobasidium*, *Hanseniaspora/Kloeckera*, *Metschnikowia*, *Candida*, *Pichia*, *Hansenula*, *Torulaspora*, *Rhodotorula*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Brettanomyces/Dekkera*, *Cryptococcus*, *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Schizosaccharomyces* y *Zygosaccharomyces* (Fleet, 2003 y 2008; Hidalgo, 2003; Kurtzman y Robnett, 1998; Romano et al., 2003). La inoculación del mosto se produce espontáneamente con las levaduras que se encuentran en el hollejo de la uva (viñedo) y con las presentes en el aire, equipamiento y maquinaria (transporte y bodega) (Pretorius et al., 1999). Se puede hacer distinción además entre levaduras autóctonas y "alóctonas" (transitorias o fortuitas) en los dos ecosistemas (viñedo y bodega) que podrán coexistir dependiendo del entorno y su grado de especialización.

Sin embargo, en el proceso fermentativo, las presiones selectivas sobre las diferentes levaduras favorecen a las que presentan el sistema catabólico fermentativo más eficiente, como la especie *S. cerevisiae*.

Por otro lado, se ha demostrado que algunas cepas de géneros como *Candida* o *Torulaspota* son capaces de completar satisfactoriamente el proceso de fermentación (Belda et al., 2017b; Clemente-Jiménez et al., 2004; Tello et al., 2011).

Durante el proceso fermentativo se puede encontrar una gran diversidad de especies de levaduras, de las que sólo unas pocas participan de forma notable pudiéndose considerar como levaduras fermentativas (Bagheri et al., 2015; Fleet et al., 1984; Querol et al., 1994; Romano et al., 2003). En las primeras horas, tras el encubado de la vendimia, las levaduras fermentativas o débilmente fermentativas prevalecen sobre las oxidativas en el mosto, se multiplican y cuando alcanzan una población en torno a 10^5 - 10^6 UFC/mL se inicia el proceso de FA (Fleet, 2003; Fleet y Heard, 1993). Estas levaduras predominan durante las fases inicial y tumultuosa de la FA, alcanzando hasta 10^6 - 10^9 UFC/mL (Bagheri et al., 2015; Fleet y Heard, 1993). A medida que avanza el proceso estas levaduras son rápidamente reemplazadas por la especie *S. cerevisiae*, que conduce la FA hasta su final, siendo la levadura mayoritaria y a menudo la única especie detectable en esta última etapa (Capece et al., 2012; Fleet, 2003; Nissen et al., 2003). Las principales levaduras no-*Saccharomyces* que se desarrollan en la fase inicial de la fermentación espontánea son apiculadas del género *Kloeckera/Hanseniaspora* (Fleet y Heard, 1993; Jolly et al., 2003b), pero también pueden aparecer otras especies de los géneros *Candida*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Zygoascus*, *Issatchenkia* y *Torulaspota* (Albertin et al., 2014; Bagheri et al., 2015; Fleet, 2003). Ocasionalmente se han encontrado otros géneros como *Brettanomyces*, *Kluyveromyces*, *Rhodotorula*, *Schizosaccharomyces* y *Zygosaccharomyces* (Clemente-Jiménez et al., 2004).

Hay que tener en cuenta que algunos géneros identificados en las uvas pueden no ser fácilmente detectados durante la fermentación debido a que las condiciones del mosto no son favorables para su óptimo desarrollo (temperatura, pH, disponibilidad de oxígeno o nitrógeno fácilmente asimilable, presión osmótica, presencia de SO_2) o debido a otros aspectos como el factor *killer*, la competencia o la interacción negativa entre la microbiota. Sin embargo, Jolly et al. (2003b) han propuesto que en el mosto puede detectarse una mayor diversidad de levaduras que en las uvas.

La utilización en enología de las actuales técnicas moleculares cada vez más potentes de detección de microorganismos ha demostrado que la ecología del proceso de fermentación es más compleja de lo conocido en décadas pasadas (Andorrà et al., 2011; Ghosh et al., 2015; Ivey y Phister, 2011; Setati et al., 2015). Algunas levaduras no-*Saccharomyces* con bajo poder fermentativo pueden alcanzar poblaciones de 10^6 - 10^7 UFC/mL en las primeras fases de la fermentación, comparables a las de *S. cerevisiae* (Ciani y Maccarelli, 1998; Englezos et al., 2015). La influencia de las levaduras no-*Saccharomyces* puede verse incrementada en fermentaciones alcohólicas llevadas a cabo a baja temperatura en las que su sensibilidad al etanol disminuye, pudiendo así identificarse al final de la fermentación poblaciones similares a las de *S. cerevisiae* (Bisson et al., 2017; Fleet, 2003).

También se ha demostrado la necesidad de una concentración suficiente de oxígeno para la supervivencia de *Torulaspora delbrueckii* y *Kluyveromyces thermotolerans* durante la FA (Hansen et al., 2001), así como el efecto de las interacciones célula-célula y de la acumulación de compuestos tóxicos en la prevalencia de las levaduras no-*Saccharomyces* (Nissen et al., 2003; Pérez-Nevado et al., 2006).

La participación de cepas no-*Saccharomyces* ha sido descrita por diversos estudios también en fermentaciones inoculadas (Combina et al., 2005; Garofalo et al., 2016; Zott et al., 2008). En algunos casos, la inoculación con *S. cerevisiae* (LSA) no suprime totalmente a las levaduras no-*Saccharomyces*, ya que especies como *H. uvarum*, *C. stellata*, *Starmerella bacillaris* (sinónimo de *Candida zemplinina*), etc. pueden estar presentes en varias fases de la fermentación (Englezos et al., 2017; Mannazzu et al., 2007). Además, tampoco la cepa inoculada se impone siempre sobre la microbiota autóctona puesto que su implantación depende de factores como la cantidad y viabilidad del inóculo, de su forma de uso, de las características metabólicas y fisiológicas de la levadura inoculada, de las condiciones de la vinificación y de la tecnología empleada en la misma (Blanco et al., 2013; Ciani et al., 2010). Estudios realizados mediante métodos moleculares independientes de cultivo (por ejemplo, PCR-DGGE), han corroborado la identificación de cepas indígenas de no-*Saccharomyces* durante la FA (Prakitchaiwattana et al., 2004; Xufre et al., 2006). Incluso en el caso de la adición de LSA, las levaduras no-*Saccharomyces* afectan a las características sensoriales del vino, por lo que su importancia en la fermentación no puede ser ignorada (Albertin et al., 2014).

Otros autores, como Pina et al. (2004) han comprobado que algunas levaduras como *Hanseniaspora guilliermondii*, pueden presentar una resistencia al etanol similar a la de *S. cerevisiae*, con una presencia más prolongada en la FA y por tanto mayor influencia en las características del vino elaborado. En esta y otras especies se ha estudiado además la influencia de la concentración inicial de nitrógeno (Lage et al., 2014). De igual forma, algunos autores han observado la permanencia de especies como *H. uvarum*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Issatchenkia terricola* o *Starm. bacillaris* en fases avanzadas de la fermentación, una vez que *S. cerevisiae* se impuso como especie mayoritaria (Englezos et al., 2016a y 2016b; Wang et al., 2012).

Estos trabajos demuestran que la fermentación vínica es un proceso microbiológico y bioquímico muy complejo donde coexisten y tiene lugar una sucesión de levaduras no-*Saccharomyces* y *Saccharomyces*, no solo a nivel de género y especie, sino también en cuanto a diferentes cepas dentro de cada especie. Ha desaparecido también la creencia de la contribución negativa sobre el aroma y el sabor de los vinos por parte de algunas especies no-*Saccharomyces*, consideradas levaduras alterantes, como por ejemplo la producción de elevada acidez volátil por parte de *Kl. apiculata* (Jolly et al., 2003b).

1.3.3. Transformaciones bioquímicas e interacciones de microorganismos en la vinificación

La microbiota final del mosto de uva está determinada por diferentes factores como la interacción entre las distintas especies (adaptación por determinantes ecológicos y parámetros tecnológicos), el método de vendimia y transporte de las uvas, el procesado en la bodega (tiempos, temperaturas, tratamientos del mosto o higiene), etc. Al mismo tiempo,

las elevadas concentraciones de nutrientes del mosto, su bajo pH, su alto contenido en azúcares y, en su caso, la adición de SO₂ como agente antioxidante y antimicrobiano, ejercen una presión selectiva (particularmente contra microbios oxidativos indeseables) en la que sólo proliferan una cantidad limitada de especies microbianas, especialmente levaduras (Bisson et al., 2017). La disponibilidad de nitrógeno fácilmente asimilable del mosto también favorece el desarrollo de las levaduras.

Además de la importante diversidad de levaduras, durante la fermentación coexisten simultáneamente bacterias y hongos cuyas interacciones levadura-levadura, levadura-hongo filamentoso y levadura-bacteria, generan complejas transformaciones bioquímicas sobre el mosto de uva (Ciani et al., 2010; Fleet, 2003). De éstas, las más importantes en la obtención de vino de calidad son la FA y la FML, dirigidas por diversos géneros y especies de dicha microbiota que influyen en el proceso y por tanto en el producto final (Pretorius, 2000). Sin embargo, la FA conducida por levaduras es la única imprescindible en la elaboración de los vinos.

En condiciones enológicas, las levaduras son responsables de la transformación de los azúcares fermentables procedentes de la uva (principalmente glucosa y fructosa) en alcohol etílico, CO₂ y cientos de otros metabolitos secundarios que afectan a la calidad final del vino y a sus características organolépticas (Blouin y Peynaud, 2004). A medida que la FA progresa, los azúcares reductores son transformados en etanol, la concentración de nutrientes se reduce y aparecen condiciones de anaerobiosis; el entorno se vuelve más selectivo impidiendo el desarrollo o eliminando las especies microbianas sensibles y la población de levaduras alcohol-sensibles también disminuye (Fleet y Heard, 1993; Nissen et al., 2003). Dicha disminución ocurre de manera diferente para cada especie debido principalmente a su sensibilidad al etanol, a su capacidad de prosperar en condiciones enológicas de escasez de nutrientes, y a las interacciones bioquímicas y los metabolitos producidos en el mosto-vino durante la fermentación (Ciani et al., 2010; Pina et al., 2004; Rossouw y Bauer, 2009). Es entonces cuando se produce, aunque no siempre, el desarrollo de la FML. Esta fermentación secundaria es una descarboxilación impulsada por cepas de bacterias ácido-lácticas (BAL) transformadoras del ácido L-málico en ácido L-láctico y CO₂, que en su mayoría pertenecen a *Oenococcus oeni* y a especies de *Lactobacillus* como *L. plantarum* (Cappello et al., 2008 y 2017; Lerm et al., 2011).

Durante la FML las BAL consumen el azúcar residual, impidiendo que quede disponible para microorganismos alterantes que podrían afectar a las propiedades organolépticas del vino. Por lo tanto, la FML generalmente mejora la acidez del vino y favorece la estabilidad microbiana (Cappello et al., 2017; du Toit y Pretorius, 2000). La vinificación puede incluir, además de las fermentaciones anteriores, procesos de conservación y envejecimiento, así como tratamientos de estabilización, filtración y embotellado. Durante estas etapas pueden desarrollarse microorganismos, incluidos diferentes géneros y especies de levaduras alterantes, hongos y bacterias que afectan a la calidad final del vino.

La muerte y autólisis de las propias levaduras libera factores de crecimiento y nutrientes para las bacterias lácticas. El etanol se vuelve apreciablemente inhibitorio para las bacterias a partir del 10%. La FML es, por consiguiente, más difícil en vinos con

volumen alcohólico elevado. No obstante, el factor más importante es el pH. En el rango de 3 a 4, cuanto más elevado sea el pH, más próspero es el medio para el crecimiento bacteriano. Por debajo de pH 3 (en vinos muy ácidos), la FML es particularmente difícil, pero esto significa que, a mayor pH, mayor es la variedad de bacterias capaces de multiplicarse. Aunque *O. oeni* es la especie predominante durante la FML en vinos de pH elevado, pueden desarrollarse otras especies que también transforman el ácido málico en láctico. En estos vinos, donde la selección es menos eficaz, los pH se acercan a menudo a 4 al final de la FML permitiendo el desarrollo de *Lactobacillus* o *Pediococcus* indeseables.

Por otro lado, algunas levaduras producen toxinas capaces de matar a otras cepas, pero ante las que ellas son inmunes (carácter *killer*). En los procesos de fermentación espontánea varias de las levaduras implicadas pueden poseer capacidad *killer*. Una levadura con buenas propiedades enológicas y carácter *killer* puede dominar sobre el resto de la población de levaduras en las fases iniciales de la fermentación (Marquina et al., 2002; Pérez et al., 2001).

1.3.4. Efecto de la fermentación espontánea o dirigida por levaduras autóctonas sobre las características químicas y sensoriales del vino

Las fermentaciones espontáneas tienen la particularidad de la ausencia de inóculo ya que son las levaduras presentes en la uva, el mosto, así como la microbiota indígena asociada a las superficies e instalaciones de la bodega las que conducen las fermentaciones naturales (Pretorius, 2000). Una gran parte de las fermentaciones realizadas en las bodegas de producción ecológica en general, y particularmente en Galicia, se realizan espontáneamente con la microbiología propia de la uva de los viñedos cercanos. O también, mediante cierto control con la adición de pies de cuba de fermentaciones ya iniciadas e incluso, en las bodegas más prestigiosas, mediante la adición de cepas autóctonas de levaduras seleccionadas.

Durante los últimos años se ha puesto de manifiesto que, junto con la variabilidad de especies, la fermentación espontánea posee una significativa biodiversidad intraespecífica dentro de la especie *S. cerevisiae* presente durante la fermentación (Cocolin et al., 2001; Morgan et al., 2017; Rossouw y Bauer, 2016; Tofalo et al., 2014; Vigentini et al., 2009 y 2015). En otras palabras, la población de levaduras relacionadas con fermentaciones espontáneas consiste en cepas genotípicamente diferentes, generalmente con propiedades fenotípicas distintas y, por lo tanto, capaces de influir en proporción a su abundancia relativa, en las propiedades aromáticas del vino (Romano et al., 2003).

Generalmente, solo unas pocas cepas de *S. cerevisiae* son capaces de dominar las fases finales del proceso (Blanco et al., 2011; Vincenzini et al., 2005). La diversidad de cepas de *S. cerevisiae* genera cantidades variables de subproductos fermentativos, con efectos deseables o no deseados en el aroma del vino (Capece et al., 2012; Pretorius, 2000; Romano et al., 2003). Algunas cepas predominantes de *S. cerevisiae* podrían implantarse a lo largo de un año en fermentaciones espontáneas en una misma bodega lo que supone alguna correlación cepa-bodega e incluso cepa-viñedo. Además, algunas cepas de *S. cerevisiae* aisladas de distintas bodegas de la misma región podrían ser muy similares, enfatizando una correlación entre cepa-región enológica (Vigentini et al., 2015).

Actualmente existe un gran interés por los vinos con características vinculadas al área de producción que ha conducido a un redescubrimiento de la fermentación dirigida por levaduras autóctonas (Francesca et al., 2012). De hecho, hay evidencias de que las levaduras no-*Saccharomyces* constituyen una parte significativa de la población microbiana del vino durante la fermentación pudiendo contribuir a los atributos sensoriales deseables del vino y produciendo metabolitos secundarios como compuestos aromáticos volátiles, enzimas extracelulares y manoproteínas (Domizio et al., 2014; Pérez-Nevado et al., 2006; Viana et al., 2008).

La contribución a las peculiaridades del vino de la fermentación dirigida en producción ecológica es menos pronunciada en comparación con las fermentaciones espontáneas (Patrignani et al., 2017). Algunos autores encontraron en la fermentación espontánea o secuencial con *S. cerevisiae* que, aunque *H. uvarum* y otras especies no-*Saccharomyces* pueden contribuir a la producción de compuestos volátiles en el vino, algunas características enológicas tales como el etanol, la acidez volátil o la producción de metabolitos son cepa-dependientes (Patrignani et al., 2017; Tristezza et al., 2016). También observaron diferencias significativas con valores más altos en las fermentaciones espontáneas que en las inoculadas en cuanto a complejidad de aroma y sabor. Aunque el perfil sensorial se vio afectado por la gestión de la vinificación en lugar de por el manejo del viñedo, los vinos ecológicos y espontáneos obtuvieron mayores puntuaciones que las inoculadas.

Por otro lado, aunque las levaduras no-*Saccharomyces* poseen algunas características enológicas específicas que están ausentes en *S. cerevisiae* con efectos aditivos sobre el sabor y aroma del vino (Viana et al., 2008), las características de las cepas de *S. cerevisiae* pueden tener un papel clave en los perfiles sensoriales del vino. Callejon et al. (2010) compararon la composición volátil de vinos tintos ecológicos producidos por diferentes cepas autóctonas y comerciales de *S. cerevisiae*. La cepa influyó en la concentración de la mayoría de compuestos volátiles; las mayores concentraciones se encontraron en vinos producidos por cepas autóctonas que produjeron vinos de mayor calidad organoléptica. Blanco et al. (2013) encontraron resultados similares a nivel sensorial comparando los resultados de las fermentaciones utilizando dos cepas autóctonas y una comercial de *S. cerevisiae* y una fermentación espontánea, según la cepa y variedad de uva. Los vinos procedentes de las cepas autóctonas y la fermentación espontánea fueron los más apreciados.

1.4. Perfil aromático y sensorial de los vinos

El aroma y sabor del vino son las propiedades más influyentes entre las preferencias del consumidor. Están determinados principalmente por los compuestos volátiles derivados de los procesos bioquímicos y tecnológicos durante la fermentación (Sánchez-Palomo et al., 2012). La formación de compuestos volátiles iniciada en la uva, va cambiando durante el procesado del mosto, la fermentación, la maduración y el envejecimiento-almacenamiento. La cantidad y el tipo de compuestos químicos que influyen en el aroma y sabor del vino dependen de muchos factores, como el origen de la

uva, la variedad, la madurez, el suelo, el clima, la levadura utilizada durante la fermentación y otras prácticas enológicas (Kotseridis y Baumes, 2000; Spranger et al., 2004).

Los compuestos volátiles responsables del aroma del vino pueden detectarse a concentraciones mucho más bajas que los compuestos de sabor (10^{-4} - 10^{-12} g/L) tanto en orthonasal (al oler la copa) como en retronasal (mientras se prueba la muestra). El aroma del vino contiene cientos de compuestos volátiles que pertenecen a grupos muy heterogéneos, aunque solo un subconjunto contribuye activamente al sabor (Francis y Newton, 2005; Vilanova et al., 2010a). Los compuestos no volátiles interactúan con compuestos aromáticos química, física o perceptivamente. Y también los compuestos aromáticos interactúan o se combinan entre ellos modificando el sabor o el aroma mediante una relación específica, en ocasiones ocasionado enmascaramiento, supresión o interacciones aditivas (Escudero et al., 2004; Robinson et al., 2009). Por otro lado, los sentidos humanos no pueden identificar más de tres o cuatro componentes volátiles en una misma mezcla (Livermore y Laing, 1996), aunque se pueden discernir diferencias en intensidades de numerosos atributos de aroma relacionados con la presencia o ausencia de odorantes en una mezcla (Bult et al., 2002).

Además, el análisis sensorial, especialmente el análisis cuantitativo descriptivo realizado por un panel de catadores entrenados, es una herramienta que permite la detección y descripción de los factores cualitativos y cuantitativos de los componentes sensoriales del vino (Meilgard et al., 1999; Murria et al., 2001; Stone et al., 1998). Sin embargo, no es suficiente para realizar un estudio objetivo completo. Se requiere la investigación de las relaciones entre los dos tipos diferentes de herramientas, datos sensoriales e instrumentales, cuya información es muy importante para establecer la calidad del vino (Francis y Newton, 2005; Vilanova et al., 2010b). Para correlacionar dichos datos es necesario conocer los compuestos activos. Un compuesto puede estar presente en una elevada cantidad en el vino, pero si su umbral de percepción es alto, no contribuirá significativamente al aroma; necesitará una concentración muy elevada para ser detectado. Por el contrario, un compuesto con un umbral de percepción bajo (como el de algunos terpenos), a una baja concentración, probablemente dominará el aroma (Vilanova et al., 2010a). Además, algunos compuestos pueden tener un efecto sinérgico o antagónico en su percepción que, además, varía entre las personas (capítulo 1.4.3).

Para cuantificar los compuestos químicos que influyen en las características sensoriales en el vino se requiere información sobre la composición volátil y las propiedades sensoriales, así como el umbral de detección o percepción de los sentidos para cada compuesto (Francis y Newton, 2005). La contribución de cada compuesto volátil en el aroma final del vino depende de que su concentración esté presente por encima del umbral de percepción. El valor de actividad del olor OAV permite calcular el impacto odorífero de un compuesto en función de su concentración y del umbral de percepción en la misma matriz vínica (Ferreira et al., 2000; López et al., 2003).

El análisis mediante cromatografía de gases permite identificar y cuantificar los componentes volátiles del aroma del vino; sin embargo, la fracción volátil del vino es extremadamente compleja, principalmente debido a la gran cantidad de compuestos que la forman de diferentes clases químicas, que cubren una amplia gama de solubilidad, polaridades y volatilidades (Sánchez-Palomo et al., 2012). Algunos compuestos volátiles

como los alcoholes superiores se encuentran en cantidades importantes. Pero, otros como algunos ácidos, ésteres, acetatos o terpenos están presentes en cantidades mínimas. Por ello, para su identificación y cuantificación, se requiere un método de enriquecimiento antes del análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS).

Existen diversas metodologías que pueden ser aplicadas solas o por combinaciones de sus propiedades basadas en la solubilidad de los compuestos en disolventes orgánicos, en su volatilidad o en función de su capacidad de adsorción/desorción en fases poliméricas. De entre estas últimas, la extracción en fase sólida (SPE) es uno de los métodos más comúnmente utilizados para el análisis de compuestos volátiles en el vino por la posibilidad de utilizar diferentes eluyentes. La SPE es una técnica robusta y muy selectiva que permite la determinación de una amplia gama de compuestos volátiles, donde los analitos se unen a sitios activos en la superficie del material adsorbente, que además requiere cantidades más pequeñas de solventes orgánicos y menor tiempo (Ferreira et al., 2000).

1.4.1. Principales compuestos aromáticos de la uva y el vino

Los principales compuestos volátiles del vino responsables de su aroma son alcoholes, ácidos, acetatos, ésteres, aldehídos, cetonas y terpenos. Su concentración depende de múltiples factores como la variedad de uva, climatología, composición del suelo, orografía, orientación y sistema de conducción, prácticas de cultivo, variedad, estado de maduración, microbiota, proceso de vinificación y condiciones de crianza y almacenamiento, (Lambrechts y Pretorius, 2000; Molina et al., 2007; Rapp y Versini, 1991; Robinson et al., 2009; Sánchez-Palomo et al., 2012). Varios autores clasifican los compuestos volátiles del vino según su origen en varietales, prefermentativos, fermentativos y postfermentativos (Etiévant, 1991; Francis y Newton, 2005).

Compuestos de origen varietal

Proceden directamente de la baya. Entre los compuestos presentes en la uva de forma natural destacan los terpenos y los C-13 norisoprenoides que, aunque están en baja concentración, aportan aromas florales, afrutados y herbáceos. En la uva se han identificado en torno a 40 compuestos terpénicos entre los que destacan linalol, α -terpineol, nerol, geraniol y citronelol (Ribéreau-Gayon et al., 2000). Los C-13 norisoprenoides, entre los que destaca la β -damascenona, provienen de la degradación oxidativa de los carotenoides.

Compuestos prefermentativos

Son compuestos volátiles procedentes de la uva y derivados de un precursor no volátil generado durante el procesado. Los compuestos aromáticos prefermentativos son todos aquellos originados desde la vendimia hasta antes de la FA originados durante su transporte, estrujado, despalillado, prensado, etc. Se generan por ruptura de las bayas y sus células, y son producto de las oxidaciones e hidrólisis que sufren los compuestos intracelulares. Están formados por diferentes familias. Los constituidos por compuestos de 6 átomos de carbono, tales como aldehídos y alcoholes (hexanoles y hexenoles), aportan al vino aroma y sabor herbáceo.

Compuestos de origen fermentativo

Proceden del metabolismo de levaduras y bacterias y son generados durante la FA y FML. Se han identificado en vinos en torno a un millar de compuestos volátiles de los que más de 400 son producidos por las levaduras durante los procesos de fermentación (Nykänen, 1986). Su naturaleza y concentración depende de las levaduras que realicen el proceso fermentativo. Algunos como los alcoholes superiores, acetatos y ésteres aportan notas positivas al vino, pero también se pueden formar compuestos que confieren notas negativas como ácidos, aldehídos, cetonas, lactonas y compuestos azufrados (Rapp y Versini, 1991). La singularidad de la contribución de las diferentes levaduras al vino dependerá de la ecología de fermentación y de los factores que determinen dicha ecología (Fleet et al., 2002).

Compuestos de origen postfermentativo

Se forman durante la conservación, envejecimiento o almacenamiento del vino debido a una serie de transformaciones biológicas y físico-químicas que pueden sufrir algunos compuestos aromáticos. Dan lugar a un aroma más complejo y, si se emplea madera, al enriquecimiento con matices a vainilla, especias y tostados. A este nuevo aroma se le conoce como “bouquet” y puede ser de oxidación (propio de los vinos criados en contacto con oxígeno; por ejemplo, en barrica) o de reducción (propio de los vinos criados sin contacto con el aire; por ejemplo, en botella) (Balboa et al., 2013).

1.4.2. Metabolismo de las levaduras: contribución al perfil aromático y sensorial de los vinos

El metabolismo de la fermentación de azúcares por las levaduras comprende dos etapas. El metabolismo primario es esencial para el crecimiento, la división celular y la supervivencia, produciendo metabolitos como etanol, glicerol, acetaldehído y ácido acético. El metabolismo secundario no es esencial para el crecimiento y produce una gama de metabolitos volátiles que caracterizan cada vino. Estos metabolitos, que derivan del metabolismo del azúcar y de los aminoácidos, son muy importantes desde el punto de vista sensorial y comprenden alcoholes superiores, ésteres, acetatos, ácidos grasos volátiles y compuestos de azufre (Swiegers et al., 2005).

Aunque algunos compuestos aromáticos volátiles surgen directamente de los componentes químicos de las uvas, muchos compuestos derivados de uva se liberan y/o modifican por la acción de la levadura y una parte esencial de las sustancias aromatizantes del vino resulta de su actividad metabólica (Etiévant, 1991; Guth, 1997; Lambrechts y Pretorius, 2000; Ribéreau-Gayon et al., 2000; Simpson, 1979). Por esta razón, el vino tiene más sabor que el mosto del que se produce. Por lo tanto, las levaduras (con mayor importancia que las bacterias) son fundamentales en el origen del aroma y sabor del vino. En una FA, la contribución de una levadura a las características organolépticas finales de un vino puede ser debida a varios aspectos diferentes (Ugliano y Henschke, 2009): i) utilización de los constituyentes sólidos del mosto, ii) producción de etanol y otros solventes que ayudarán a la extracción de los componentes aromáticos contenidos en la uva o en la formación de alcoholes superiores, iii) producción de enzimas capaces de transformar compuestos aromáticamente neutros (precursores) de la uva, en compuestos

de gran aromaticidad, iv) producción de cientos de metabolitos secundarios aromáticos, y v) degradación autolítica de las levaduras muertas y liberación de manoproteínas.

Los compuestos fermentativos constituyen el grupo mayoritario de compuestos volátiles de los vinos entre los que destacan los alcoholes superiores, ácidos volátiles, ésteres y acetatos que presentan descriptores aromáticos diversos (Cortés y Blanco, 2011; Nykänen, 1986). Por otra parte, en la formación del aroma del vino por las levaduras están involucradas muchas rutas bioquímicas (Figura 1.2) que se ven afectadas por diversos factores como la composición y pH del mosto, las características y temperatura de la fermentación, los tratamientos del mosto y el tiempo de contacto con el hollejo, que influyen significativamente en el aroma final (Boulton et al. 1996; Lambrechts y Pretorius 2000). Estas presiones selectivas favorecen a las levaduras con el catabolismo fermentativo más eficiente, normalmente las cepas de *S. cerevisiae*, por lo que esta especie es la preferida universalmente para iniciar la FA.

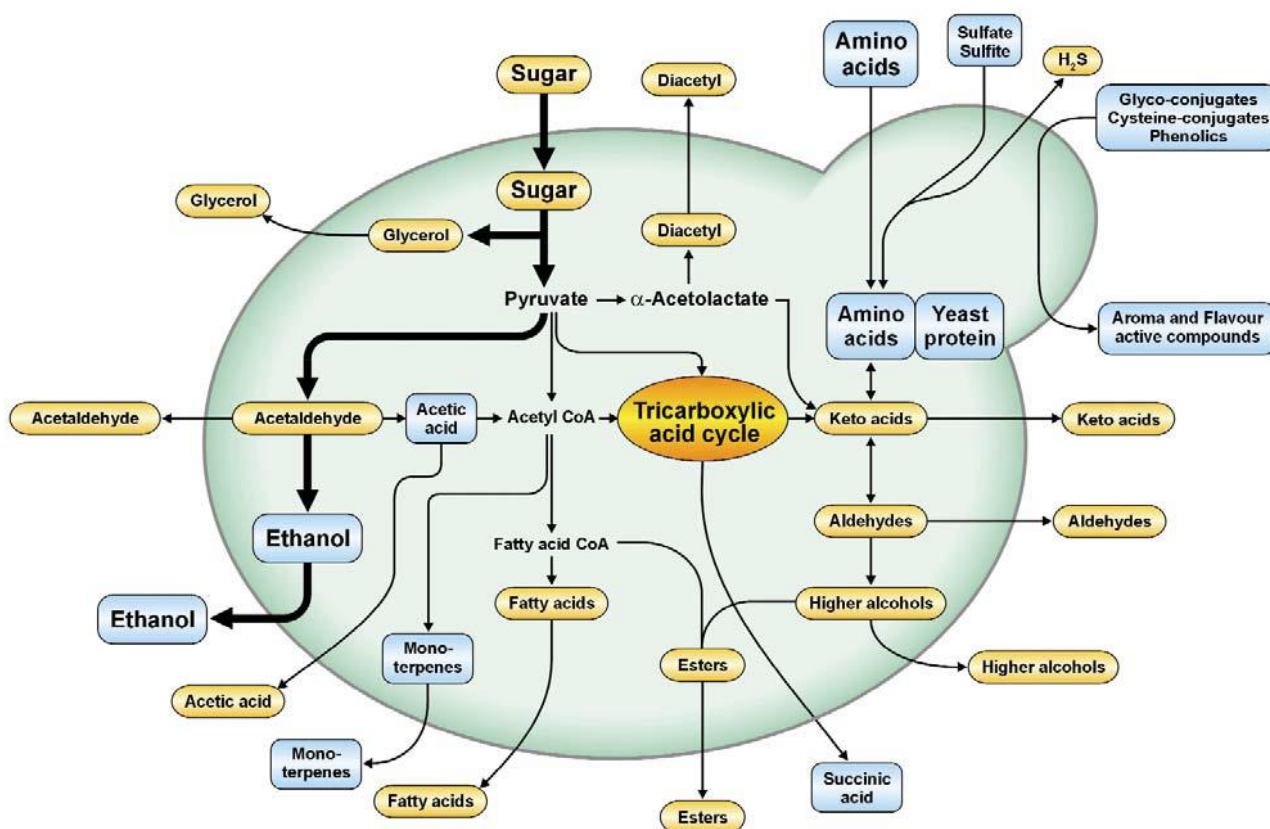


Figura 1.2. Representación esquemática de la síntesis bioquímica de compuestos con aroma y sabor activo por las levaduras durante la elaboración del vino. Fuente: Swiegers et al., 2005.

Las levaduras deben catalizar la conversión rápida, completa y eficiente de los azúcares de la uva a etanol, CO₂ y otros metabolitos menores sensorialmente importantes, sin el desarrollo de compuestos indeseables (Pretorius 2000). Además, secundariamente, las levaduras tienen la función de modificar componentes derivados de la uva, como los conjugados de glicocolato y cisteína, que mejoran el carácter varietal de los vinos. En este apartado se presta especial atención a la contribución de los ácidos, alcoholes, compuestos de carbonilo, fenoles, acetatos, ésteres, compuestos de azufre y monoterpenoides originados por las levaduras durante la fermentación al perfil aromático y sabor del vino.

1.4.2.1. Alcoholes

El mosto de uvas maduras proporciona una considerable concentración de azúcar que conduce a la producción de altos niveles de etanol que pueden superar el 15% (v/v) en el vino. El etanol producido en la fermentación es esencial para mejorar los atributos sensoriales de otros componentes del vino, pero en exceso, produce picor y enmascara su aroma y sabor (Guth, 1997).

El **glicerol** es un poliol incoloro, inodoro y viscoso producido en la FA en concentraciones que varían de 5 a 14 g/L, típicamente más altas en vinos tintos (Killian y Ough, 1979). Aunque este triol no volátil no tiene impacto directo en el aroma del vino, a partir de 5 g/L tiene un efecto notable sobre la dulzura aparente y aporta sensación grasosa en boca (Noble y Ebeler, 2002). El metabolismo del glicerol por las levaduras es importante durante la fermentación debido a que proporciona precursores de fosfolípidos vitales para el crecimiento de las levaduras; ayuda a mantener el equilibrio redox de la célula (generación de energía mediante ATP y crecimiento celular) y la protege del estrés osmótico causado por las altas concentraciones de azúcar.

Razones como la salud, legislación, conducción o tasas impositivas han aumentado la demanda de vinos con menor concentración de alcohol, particularmente en regiones cálidas donde los efectos del cambio climático han aumentado la concentración de azúcar en las bayas. La eliminación o reducción de alcohol en el vino mediante procesos físico-químicos es efectiva pero costosa; además, en algunas regiones están restringidos y pueden producir pérdida o modificación de compuestos de aroma y sabor. Se conocen soluciones biológicas para superar algunas de estas limitaciones utilizando distintas especies y/o cepas de levaduras.

Los **alcoholes superiores** (alifáticos y aromáticos) son metabolitos secundarios de las levaduras que pueden tener impacto positivo o negativo sobre el aroma y el sabor del vino. Este importante grupo de compuestos contribuye a la formación del resto de compuestos aromáticos volátiles como ésteres, ácidos y acetatos (Ugliano et al., 2007). Los alcoholes alifáticos incluyen propanol, butanol, isobutanol, alcohol isoamílico (3-metil-1-butanol) y alcohol amílico activo (2-metil-1-butanol). El 2-fenil-etanol y el tirosol son alcoholes aromáticos. La producción de alcoholes superiores es cepa dependiente y su concentración en el vino depende de los aminoácidos y compuestos nitrogenados (precursores) presentes en el mosto (Guymon, 1964). La concentración de etanol, temperatura de fermentación, pH y composición del mosto, aireación, nivel de sólidos, variedad de uva, madurez y tiempo de contacto con los hollejos también influyen en la concentración de alcoholes superiores en el vino (Fleet y Heard, 1993). La concentración de estos compuestos en el vino oscila entre 140 y 420 mg/L (Robinson et al., 2009); si su concentración supera los 300 mg/L, su contribución al aroma del vino puede resultar negativa (producen olor y sabor fuerte y picante), y a niveles óptimos (< 300 mg/L), imparten caracteres afrutados, aromas vegetales, sensaciones de dulzor, suavidad y complejidad al vino (Nykänen, 1986; Ugliano et al., 2007). Los alcoholes alifáticos como propanol, butanol e isobutanol aportan olor alcohólico; el 3-metil-1-butanol y el 2-metil-1-butanol aportan aroma a mazapán o plátano. El alcohol aromático 2-fenil-etanol aporta aroma floral (Lambrechts y Pretorius, 2000).

La síntesis de alcoholes superiores implica la síntesis de α -cetoácidos que se forman a través de la vía catabólica o de Ehrlich (a partir de los aminoácidos de cadena ramificada leucina, isoleucina y valina presentes en el mosto) o de una vía anabólica que implica la síntesis de aminoácidos de cadena ramificada a partir de la glucosa. Otra vía de síntesis de alcoholes superiores es a través de actividades enzimáticas (Large, 1986).

1.4.2.2. Acetatos

El **acetato** (éster del ácido acético) es producido por la levadura como intermediario en la reacción en que el piruvato es convertido en acetil-CoA por la enzima piruvato deshidrogenasa (PDH) a través de una serie de reacciones catalizadas por otras enzimas. De entre ellas, la reacción catalizada por la acetaldehído deshidrogenasa (ALDH) convierte el acetaldehído en ácido acético y forma acetato oxidando el acetaldehído producido a partir del piruvato durante la fermentación (Swiegers et al., 2005). Los **acetatos de alcoholes superiores** se forman a partir de la esterificación entre los alcoholes superiores y el ácido acético. Generalmente aportan aromas frutales al vino (excepto el acetato de etilo; de olor similar a pegamento) y su formación está relacionada con la cantidad de nitrógeno asimilable en el mosto (Rojas et al., 2003), ya que los alcoholes superiores proceden del metabolismo de los aminoácidos. Los más significativos son: acetato de isoamilo, acetato de hexilo, acetato de 2-feniletanol, acetato de isobutilo, y acetato de 2-metilbutilo.

1.4.2.3. Ésteres

La producción de ésteres por las levaduras durante la fermentación tiene un efecto variable pero muy significativo que contribuyen favorablemente al sabor y aroma afrutado y floral de los vinos blancos (Falqué et al., 2002).

Hay dos clases de ésteres con impacto potencial en el perfil sensorial: ésteres de acetato y ésteres etílicos de ácidos grasos de cadena media. La síntesis de **ésteres de acetato** (1.4.2.2) por las levaduras se produce principalmente por el metabolismo de los ácidos grasos y acetil-CoA de la levadura (Killian y Ough, 1979). En los **ésteres etílicos** el grupo alcohol es etanol y el grupo acilo se deriva de ácidos grasos de cadena media (MCFA) (Lambrechts y Pretorius, 2000). Los intermedios de MCFA se liberan del complejo citoplasmático de la ácido graso sintasa (FAS) lo que desencadena la síntesis de ésteres etílicos (Ugliano y Henschke, 2009). Los más significativos son: butanoato de etilo, hexanoato de etilo y octanoato de etilo.

Algunas levaduras no-*Saccharomyces* contribuyen a la producción de ésteres en el vino. Además, la producción de ésteres puede verse influenciada por la variedad de la uva cuando son sintetizados por la levadura a partir de precursores de la uva y también difieren entre los tipos de vino; parece haber una sinergia entre el metabolismo de la levadura y la uva (Ugliano y Henschke, 2009).

1.4.2.4. Ácidos

Los **ácidos grasos volátiles** se producen durante una parada de fermentación o una fermentación excesivamente lenta motivadas por diferentes causas como escasez de nutrientes, mostos muy desfangados, altas temperaturas de fermentación, pH bajo o competencia con bacterias lácticas al final de la FA. Su formación está relacionada con el metabolismo de la Malonil-CoA a partir de Acetil-CoA. Los ácidos grasos volátiles lineales de cadena corta (C_2 - C_6 ; como el ácido butírico, isobutírico, isovalérico y hexanoico), media (C_6 - C_{10} ; como el ácido octanoico y decanoico) y larga ($> C_{10}$; como el ácido dodecanoico) y los ramificados (2-metil-propanoico, 2-metil-butanoico, etc.) son tóxicos para las levaduras y conducen a un estado fisiológico deficiente para terminar la fermentación. A medida que aumenta la longitud de su cadena, su volatilidad disminuye y el olor cambia de ácido a rancio con implicaciones organolépticas defectuosas: originan aromas de queso de cabra, cuadra, jabón, detergente o cera ardiendo. Los ácidos grasos de cadena corta C_2 - C_5 influyen negativamente en la calidad aromática del vino a concentraciones elevadas (Hidalgo, 2003). Sin embargo, estos ácidos grasos de cadena corta son la base de los ésteres afrutados y por tanto tienen una influencia importante en el aroma del vino (Moreira et al., 2008).

La **acidez volátil** está formada por ácidos orgánicos volátiles que están presentes en el vino a una concentración de entre 0.5-1 g/L (10-15% del contenido total de ácido). El ácido acético constituye aproximadamente el 90% de los ácidos volátiles (Henschke y Jiranek, 1993). El resto de los ácidos volátiles, principalmente los ácidos propiónico y hexanoico, se producen como resultado del metabolismo de los ácidos grasos de la levadura y las bacterias. Aunque *Saccharomyces* puede producir ácido acético, las concentraciones excesivas en el vino son en gran parte el resultado del metabolismo del etanol por las bacterias aeróbicas de ácido acético. El ácido acético a concentraciones > 0.7 g/L genera en el vino un carácter similar al vinagre, siendo la concentración óptima 0.2- 0.7 g/L (Dubois, 1994).

1.4.2.5. Compuestos del grupo carbonilo

El **acetaldehído** es el principal compuesto carbonilo. Se encuentra en el vino a concentraciones en torno a 10-75 mg/L y tiene un umbral de percepción sensorial de 100 mg/L (Etiévant, 1991). Los aldehídos pueden ser un signo de oxidación del vino y contribuyen al sabor con descriptores como manzana magullada y nuez. El acetaldehído es uno de los principales intermediarios metabólicos en la fermentación y último precursor antes de que se forme el etanol. El piruvato (producto final de la glucólisis), se convierte en acetaldehído a través de las enzimas piruvato descarboxilasa. El acetaldehído se convierte luego en etanol a través de enzimas alcohol deshidrogenasa, que es un paso crucial para mantener el equilibrio redox en la célula.

La acumulación de acetaldehído durante la fermentación depende de las condiciones de fermentación, pero desciende a un nivel bajo al final del proceso. Sin embargo, se ha demostrado que la cantidad de acetaldehído puede aumentar con el tiempo debido a la oxidación del etanol, la actividad de levaduras de flor (que incluyen algunas especies de *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Hansenula*, *Debaryomyces*...) y la aireación (Fleet y Heard, 1993). La concentración de acetaldehído varía (de 6 a 190 mg/L) según la cepa de levadura.

Además, una alta concentración de SO₂ en el mosto produce una acumulación de acetaldehído por la levadura que se incrementa cuando la cepa es resistente a sulfitos (Swiegers et al., 2005).

El **diacetilo** es otro compuesto carbonilo importante en el vino que produce un aroma a mantequilla o caramelo. A bajas concentraciones puede describirse como de nuez o tostado, pero es indeseable a concentraciones entre 1 y 4 mg/L. Aunque las levaduras sintetizan diacetilo en el vino (0.2-0.3 mg/L), la mayor parte proviene del metabolismo de las bacterias ácido lácticas (Belda et al., 2017a; Cappello et al., 2017).

1.4.2.6. Fenoles volátiles

Los fenoles volátiles (formados a partir de los precursores de ácido hidroxicinámico en el mosto) tienen un umbral de detección bajo y se detectan fácilmente. Pueden estar presentes en el mosto, pero son fundamentalmente producidos por las levaduras durante la fermentación. Aunque los fenoles volátiles pueden contribuir positivamente al aroma de algunos vinos, a altas concentraciones aportan sabores extraños como cuero o establo (Dubois, 1994). Los vinilfenoles, especialmente el 4-vinilguaiacol y el 4-vinilfenol, producen un olor farmacéutico, particularmente en los vinos blancos (Ribéreau-Gayon et al., 2000). Los etilfenoles predominantes son 4-etilguaiacol y 4-etilfenol que se forman a partir de precursores naturales presentes en los mostos de uva como el ácido p-cumárico y el ácido ferúlico respectivamente, mediante descarboxilación enzimática y posterior reducción enzimática. La etapa de descarboxilación ha sido descrita en muchas especies de bacterias, levaduras y hongos; sin embargo, la etapa de reducción se considera más específica de los géneros *Brettanomyces/Dekkera*. Los ácidos fenólicos e hidroxicinámicos no flavonoides se descarboxilan por *S. cerevisiae* para formar fenoles volátiles. *S. cerevisiae*, a diferencia de otros organismos, no usa la descarboxilasa como su única defensa contra la toxicidad del ácido fenólico, explicando así su baja actividad en la mayoría de las cepas.

1.4.2.7. Compuestos de azufre

Los compuestos que contienen azufre suelen aparecer a concentraciones muy bajas en el vino, pero tienen umbrales de detección muy bajos y generalmente le confieren una connotación sensorial negativa. Se dividen en cinco categorías: sulfuros, polisulfuros, compuestos heterocíclicos, tioésteres y tioles que varían ampliamente en sus propiedades sensoriales. Muchos compuestos de azufre están asociados con descripciones negativas (repollo, huevo podrido, sulfuroso, ajo, cebolla y caucho), mientras que algunos pueden aportar aromas positivos al vino (fresa, maracuyá y pomelo). El desarrollo de compuestos de azufre por levaduras incluye la degradación de aminoácidos y plaguicidas que contienen azufre, así como la liberación y/o metabolismo de los precursores que contienen azufre derivados de la uva (Mestres et al., 2000).

Probablemente el compuesto de azufre más conocido en el vino es el tiol volátil **sulfuro de hidrógeno** (H₂S), que genera aroma de huevo podrido con un umbral de percepción muy bajo (50-80 µg/L). Su presencia disminuye mediante la adición o presencia de Cu en el mosto (por formación de sulfuro de cobre) o aireación (por oxidación del sulfuro). No obstante, las sales de Cu en la bodega y la presencia de compuestos de azufre

oxidado relacionados con el carácter reductivo del vino embotellado no son deseables. El H₂S se forma metabólicamente por la levadura a partir de compuestos de S inorgánico (sulfato y sulfito) u orgánico (cisteína y glutatión) cuya concentración varía con la disponibilidad de compuestos de azufre y nitrógeno, la cepa de levadura y las condiciones de fermentación (Henschke y Jiranek, 1993; Mendes-Ferreira et al., 2001). Las levaduras también metabolizan los aminoácidos metionina, homocisteína y cisteína pudiendo formar mercaptanos como metionol (olor a coliflor/repollo) (Mestres et al., 2000).

Por otro lado, los **tioles** volátiles son potentes compuestos de aroma; algunos imparten aromas negativos, otros contribuyen positivamente. El furfuriltiol aporta aroma tostado y su presencia en el vino se debe principalmente a la transformación por la levadura del furfural liberado de las duelas de roble tostado durante la fermentación. Los tioles también pueden producir en los vinos etanotiol en una reacción no deseada entre el H₂S y el etanol (olor a cebolla o puerro cocido). Otros tioles volátiles (4MMP, 3MH y 3MHA) tienen importancia en el aroma del vino con umbrales de percepción extremadamente bajos (3-60 ng/L) por su carácter varietal (aromas de árbol y frutas exóticas). Los tioles volátiles son casi inexistentes en el mosto de uva y solo se desarrollan durante la fermentación por las levaduras, incluidas las no-*Saccharomyces* (Anfang et al., 2009; Zott et al., 2011).

1.4.2.8. Terpenos

Los terpenos, así como otros compuestos volátiles como norisoprenoides, contribuyen a mejorar el aroma del vino y pueden aparecer como formas libres en las uvas o formando complejos glucosídicos inertes no volátiles. Los monoterpenoides son compuestos muy aromáticos que son producidos por plantas superiores como *V. vinifera*, algas, hongos, incluidas algunas levaduras, a partir del precursor geranil pirofosfato (GPP). Algunas cepas de *Saccharomyces* podrían contribuir al aroma floral del vino mediante la síntesis de monoterpenos, y esta contribución podría aumentar bajo ciertas condiciones de fermentación (mostos con mayor concentración de nitrógeno asimilable y fermentación microaeróbica) (Swiegers et al., 2005). Existen precursores volátiles que representan una fuente importante de compuestos fragantes. Algunos terpenoles (linalool, nerol, geraniol, α -terpineol y citronelol), alcoholes (hexanol, el 2-feniletanol, los C13-norisoprenoides) y fenoles volátiles (vainillina) pueden actuar como precursores de agliconas que contribuyen al aroma varietal (Fernández-González et al., 2003; Park y Noble, 1993). Durante la vinificación, los terpenoides unidos pueden liberarse por la acción de las enzimas glucosidasas que son producidas por la planta, las levaduras y las bacterias. La actividad β -glucosidasa de las levaduras permite intensificar los aromas primarios de los vinos mediante la hidrólisis de precursores aromáticos de origen terpénico y, con ello, la liberación de terpenos durante la fermentación. Esto es posible porque, a diferencia de la glucosidasa procedente de las uvas, la enzima producida por las levaduras no es inhibida por la glucosa del mosto.

1.4.3. Contribución de la microbiota oral a la percepción del aroma del vino

La percepción sensorial durante la ingesta de vino es diferente para cada persona; no solo depende de la composición volátil del vino, sino que se producen diferentes procesos en la cavidad oral influenciados por diversos factores fisiológicos humanos a nivel interindividual. De entre ellos, la influencia de la compleja microbiota oral formada por más de 1000 taxones no es bien conocida. La formación de biofilms bacterianos influenciados por la saliva y alimentos como fuente de nutrientes, sugiere su interacción con los precursores aromáticos glucosídicos, que da como resultado la liberación de compuestos de aroma volátiles libres. Sin embargo, la producción de moléculas odorantes por enzimas relacionadas con la microbiota oral a partir de precursores no odorizantes requiere más investigación, aunque sugiere un impacto significativo en la generación de aroma y la percepción personal durante el consumo de vino (Belda et al., 2017a).

1.5. La diferenciación, tipicidad y calidad de los vinos

La diferenciación de los vinos es un factor importante a considerar como estrategia comercial que puede incrementar su valor en el mercado actual. Los consumidores, ante la gran cantidad de vinos, ya no solo buscan alta calidad, sino también que el producto sea diferente, típico, único y que además sea saludable y respetuoso con el medio ambiente. La viticultura ecológica tiene una gran importancia en este sentido como generadora de productos con valor añadido.

1.5.1. Las levaduras como recurso microbiano en la diferenciación de los vinos

El aprovechamiento de los recursos microbiológicos autóctonos mejor adaptados a la fermentación de un mosto de uva particular, puede ser beneficioso para la producción de vinos de calidad diferenciada (Drumonde-Neves et al., 2017; Masneuf-Pomarede et al., 2016; Rossouw y Bauer, 2016). En este contexto, el viñedo ecológico puede contribuir a preservar la biodiversidad como un ecosistema equilibrado con un impacto positivo en la calidad del vino (Provost y Pedneault, 2016). La contribución de las levaduras no *Saccharomyces* nativas a las propiedades químicas y sensoriales típicas de los vinos de una región en particular, es de gran interés en el actual mercado mundial del vino (Ciani y Comitini, 2015; Drumonde-Neves et al., 2017; Liu et al., 2017; Nemcová et al., 2015; Varela et al., 2016). Como resultado, el análisis y la preservación de la biodiversidad autóctona es esencial, no sólo por su importancia como reservorio natural (Sun et al., 2009; Tello et al., 2011), sino también como un recurso económico para elaborar nuevos estilos de vinos más competitivos (Azabagaoglu et al., 2007).

La idea de que la diversidad y frecuencia de las comunidades de levaduras en las uvas y mostos están influenciadas por diferentes factores vitivinícolas está muy extendida. Así, influyen las prácticas agronómicas y antropogénicas (sistema de cultivo, manejo del suelo, edad y ubicación del viñedo, cultivar de vid, orientación y sistema de formación, momento de maduración, aplicación de agroquímicos...), las condiciones climáticas, los

factores bióticos, el suelo, la composición química del mosto (Belda et al., 2017b; Comitini y Ciani, 2008; Drumonde-Neves et al., 2016; Garofalo et al., 2016; Grangeteau et al., 2017a; Nemcová et al., 2015) y factores geográficos que engloban distintos de estos aspectos conjuntamente (Bokulich et al., 2014). Además, la aplicación de plaguicidas o el manejo de la vegetación y sus interacciones también pueden afectar a la diversidad de microorganismos presentes en las bayas de uva y, por tanto, en el mosto y el vino (Bagheri et al., 2015; Grangeteau et al., 2017b; Nemcová et al., 2015; Setati et al., 2012; Tello et al., 2011; Tofalo et al., 2011).

1.5.2. Contribución de las levaduras no-*Saccharomyces* a la calidad y tipicidad de los vinos

La práctica del uso de cepas seleccionadas de *Saccharomyces*, extendida en todas las zonas vitivinícolas del mundo, ha contribuido a un mejor control de la vinificación, pero también simplifica las comunidades microbianas presentes en las fermentaciones. Este hecho puede propiciar la pérdida de complejidad y la estandarización de los vinos así elaborados, junto con la disminución de la diversidad de especies de levaduras en los ambientes de elaboración del vino (Capozzi et al., 2011 y 2015; Garofalo et al., 2016).

Sin embargo, algunas especies de levaduras no-*Saccharomyces* son de interés enológico porque pueden contribuir de forma relevante a la calidad y complejidad aromática del vino debido a su actividad metabólica que modifica la composición química y sensorial (Ciani et al., 2010; Pérez-Nevedo et al., 2006). Algunas de estas especies han sido estudiadas en profundidad con el enfoque de complementar así la actividad de *S. cerevisiae*. La inoculación mixta de cepas de levaduras no-*Saccharomyces*/*Saccharomyces* se ha propuesto para simular la fermentación natural, en condiciones más controladas, y conferir mayor complejidad al vino sin producir compuestos negativos (Ciani et al., 2010; Esteve-Zarzoso et al., 1998; Milanović et al., 2012; Romancino et al., 2008). El empleo de un iniciador mixto de este tipo como alternativa a las fermentaciones espontáneas, permite aprovechar su capacidad para mejorar las características químicas y organolépticas del vino, evitando el riesgo de fermentaciones estancadas y minimizando el deterioro por contaminación microbiana (Capozzi et al., 2015; Ciani et al., 2006; Combina, 2005; Fleet, 2008; Jolly et al., 2006; Rojas et al., 2003; Romano et al., 2003; Tristezza et al., 2013).

La acidez es uno de los parámetros más importantes del vino. El ajuste químico de la acidez del vino generalmente implica aumentar la acidez total, o más críticamente, disminuir el pH mediante la adición de ácido tartárico, málico o cítrico, según la legislación. Sin embargo, la mayoría de las levaduras pueden utilizar concentraciones significativas de ácido málico con porcentajes que oscilan entre un 3-45% (*S. cerevisiae*) hasta la mayoría de las cepas de *Schizosaccharomyces pombe*, *Schizosaccharomyces malidevorans* e *Issatchenkia orientalis* que pueden degradarlo casi por completo a etanol y CO₂. Así, *Sch. pombe* e *I. orientalis* se han utilizado en inoculación secuencial con *S. cerevisiae* para impulsar la catálisis del ácido málico de las uvas en el vino mediante fermentación maloalcohólica, aumentando el pH final del vino (Benito et al., 2013; Comitini et al., 2011; Kim et al., 2008). Por otro lado, *Saccharomyces uvarum* pueden producir ácido málico y succínico, y otras especies como *Starm. bacillaris* y *L. thermotolerans* también tienen efecto sobre la acidez (Englezos et al., 2015 y 2017; Gobbi et al., 2013; Jolly et al., 2014).

Otro parámetro importante para el vino es la acidez volátil. Las cepas de *S. cerevisiae* producen ácido acético en un amplio rango influenciado por el pH, el azúcar y la concentración de nitrógeno (Fleet y Heard, 1993); tienden a producir concentraciones bajas de ácido acético para los vinos secos y valores más altos para los vinos dulces (Masneuf-Pomarede et al., 2016). Las levaduras no-*Saccharomyces* producen ácido acético en concentraciones variables, pero algunos géneros pueden producir bajas cantidades de ácido acético (Fleet y Heard, 1993; Renault et al., 2009). En la microvinificación de mosto ecológico, algunas cepas de no-*Saccharomyces* mostraron buenos rendimientos de fermentación, baja producción de ácido acético y una capacidad parcial para degradar el ácido málico (Tofalo et al., 2011). Las cepas de especies criotolerantes como *Saccharomyces bayanus* y *S. uvarum*, producen menos ácido acético que *S. cerevisiae* (Gobbi et al., 2014; Magyar y Tóth et al., 2011). Otros autores también encontraron una disminución significativa de la acidez volátil con respecto a *S. cerevisiae* en estudios realizados con *M. pulcherrima* (Comitini et al., 2011), *T. delbrueckii* (Azzolini et al., 2015) o *Starm. bacillaris* (Magyar y Tóth, 2011; Rantsiou et al., 2012).

T. delbrueckii y *Starm. bacillaris* han sido levaduras no-*Saccharomyces* muy estudiadas en los últimos años por su posible uso en la fermentación de mostos con elevada concentración de azúcar. *T. delbrueckii* fermenta lentamente y produce niveles medios de etanol, aunque sobrevive a concentraciones elevadas (14%) (Bely et al., 2008; Gobbi et al., 2014). Algunas cepas de *Starm. bacillaris* tienen carácter fructofílico (capacidad para producir menos etanol del azúcar consumido) que podrían ser útiles para equilibrar el carácter glucolítico de *Saccharomyces* y evitar fermentaciones lentas o paradas fermentativas (Englezos et al., 2016a; Magyar y Tóth, 2011; Mills et al. 2002); se puede encontrar en el mosto de uva antes y también durante la fermentación (Sipiczki, 2003; Tofalo et al., 2012; Zott et al., 2008). *Starm. bacillaris* parece presentar diferencias fisiológicas pequeñas entre cepas de diferentes países y una alta uniformidad en su vigor de fermentación y producción de etanol (Englezos et al., 2017).

En cuanto a los alcoholes, las distintas cepas de levaduras *S. cerevisiae* y no-*Saccharomyces* utilizadas durante la fermentación generan perfiles con diferencias considerables en las concentraciones de alcoholes superiores (Guymon, 1964). *S. cerevisiae*, produce una mayor cantidad de alcohol isoamílico que las especies no-*Saccharomyces*, que representa la mayor parte del contenido total de alcoholes superiores (Moreira et al., 2008; Rojas et al., 2003; Viana et al., 2008). Sin embargo, esta característica específica de la cepa (Romano et al., 2003) es generalmente indetectable en cultivos mixtos no-*Saccharomyces*/*S. cerevisiae*, aunque existan diferentes especies (Moreira et al., 2008). Por ejemplo, la fermentación mixta con *Pichia fermentans*/*S. cerevisiae* aumenta la concentración de 1-propanol, n-butanol y 1-hexanol comparado con la fermentación solo con *S. cerevisiae* (Clemente-Jiménez et al., 2004). Las fermentaciones con *Pichia* spp. pueden aportar al vino acetaldehído, acetato de etilo, 1-propanol, n-butanol, 1-hexanol, octanoato de etilo, 2,3-butanodiol y glicerol (Anfang et al., 2009; Clemente-Jiménez et al., 2004) o una concentración elevada de polisacáridos, con una consecuente mejoría del sabor del vino (Domizio et al., 2011).

S. cerevisiae generalmente produce una gran cantidad de ésteres y compuestos aromáticos que surgen de su actividad metabólica e imparten un olor en su mayoría agradable. Sin embargo, es conocido que otras especies no-*Saccharomyces* mejoran las características sensoriales o bouquet final del vino ya que pueden producir compuestos aromáticos en cantidades significativas (Albertin et al., 2017; Ciani et al., 2010; Jolly et al., 2006; Viana et al., 2008). Por ejemplo, las fermentaciones de cultivos mixtos por levaduras silvestres, como *H. guilliermondii* y *Pichia anomala*, junto con *S. cerevisiae* mostraron concentraciones de ésteres de acetato elevadas en comparación con las fermentaciones solo con *S. cerevisiae*, sin afectar significativamente al acetaldehído, ácido acético, glicerol y alcoholes superiores totales (Rojas et al. 2003). *M. pulcherrima* también se caracteriza por producir elevadas concentraciones de ésteres (Rodríguez et al., 2010; Sadoudi et al., 2012); en particular, de octanoato de etilo (Clemente-Jiménez et al., 2004; Lambrechts y Pretorius, 2000). Otros autores encontraron en los vinos producidos con fermentaciones de *Starm. bacillaris*/*S. cerevisiae* un aumento significativo de terpenos y lactonas y una disminución de las concentraciones de ésteres de acetato y aldehídos (Jolly et al., 2014; Sadoudi et al., 2012). *T. delbrueckii* es capaz de potenciar el aroma del vino mediante la hidrólisis de precursores presentes en el mosto y en algunos trabajos produjo menos compuestos volátiles indeseables que algunas cepas de *S. cerevisiae* (Bely et al., 2008; Moreno et al., 1991; Renault et al., 2009).

Algunas especies no-*Saccharomyces*, en comparación con *S. cerevisiae*, producen mayor cantidad de enzimas (carbohidrolasas, glucosidasas, proteasas, lipasas, descarboxilasas, sulfito reductasas, β -glucanasas o estereras) (Esteve-Zarzoso et al., 1998). Las enzimas liberadas al medio fermentativo pueden interactuar con compuestos de la uva y degradar los polisacáridos mejorando los procesos de extracción, clarificación, filtración, estabilidad y color de los vinos, así como producir compuestos aromáticos activos que contribuyen al aroma del vino resultante (Hernández-Orte et al., 2008; Lambrechts y Pretorius, 2000). Por ejemplo, algunas levaduras no-*Saccharomyces* se describen como fuentes potenciales de glucosidasas útiles en la formación de compuestos volátiles deseables (Fernández-González et al., 2003; Mendes-Ferreira et al., 2001). Otras especies no-*Saccharomyces* producen poligalacturonasa y β -D-xilosidasa (Manzanares et al., 1999). Las cepas nativas de *S. cerevisiae* originan una pequeña concentración de los terpenos existentes en los vinos (aunque algunas cepas son capaces de una producción significativa). Pero, la actividad β -glucosidasa, ha sido encontrada de forma más significativa en otras especies. Entre ellas están *P. anomala* (Mendes-Ferreira et al., 2001; Spagna et al., 2002), *Kl. apiculata* (y su forma asexual *H. uvarum*), *M. pulcherrima*, *Debaryomyces hansenii* y *Candida molischiana* (Fernández-González et al., 2003), *Kluyveromyces lactis*, *T. delbrueckii* y *Ambrosiozyma monospora* que contribuyen a la formación de terpenos siendo algunas capaces de hidrolizar los terpenoides y norisoprenoides (Fernández-González et al., 2003; Swiegers et al., 2005).

Además de su influencia en la concentración de terpenos, la presencia de *M. pulcherrima*, debido a la arabino furanosidasa secretada, también puede influir en la cantidad de tioles volátiles (Capozzi et al., 2015; Patrignani et al., 2017). Otras cepas de especies no-*Saccharomyces* como *K. thermotolerans*, *Pichia* spp. y *T. delbrueckii* pueden incrementar la concentración de tioles volátiles varietales durante la fermentación (Belda et al., 2017a; Clemente-Jiménez et al., 2004; Zott et al., 2011).

Por otro lado, algunas cepas de *Kl. apiculata* y especies de los géneros *Candida*, *Cryptococcus* y *Kluyveromyces* tienen actividad proteolítica y pectinolítica que favorece la clarificación (Esteve-Zarzoso et al., 1998). Además, algunos géneros han demostrado que poseen varias de estas propiedades deseables. Por ejemplo, *Hanseniaspora* y *Torulaspora* pueden producir concentraciones aceptables de enzimas como β -glucosidasa, pectinasas, proteasas y xilanasas (Maturano et al., 2012). De hecho, algunas cepas de *I. terricola* están especialmente dotadas de una glucosidasa extracelular que aumenta la cantidad de monoterpenos libres durante la vinificación (González-Pombo et al., 2011).

Las recientes líneas de investigación que profundizan en el conocimiento del comportamiento enológico de estas cepas y sus interacciones permitirán la aplicación de las levaduras no-*Saccharomyces* no solo para mejorar la calidad de los vinos sino en el contexto de nuevos retos como el de mitigar los efectos del cambio climático que afecta a numerosas regiones vitivinícolas, incluida Galicia.

1.5.3. Particularidades de la inoculación de cepas no-*Saccharomyces*

A pesar de las características beneficiosas que aportan, la FA no suele ser conducida únicamente por levaduras no-*Saccharomyces* en la elaboración del vino de calidad. Pueden producirse problemas como fermentaciones lentas o paradas de la fermentación (Bagheri et al., 2015; Rojas et al., 2003) con producción concomitante de metabolitos indeseados en el vino (ácido sulfhídrico, ácido acético, acetaldehído, acetoína, acetato de etilo, etc.). Esto es debido a su baja capacidad fermentativa, baja producción de alcohol etílico y baja resistencia al SO_2 (Capozzi et al., 2011 y 2015). Por tanto, para evitar estos riesgos, no se utilizan estas levaduras como único cultivo iniciador (Ciani et al., 2006; Fleet, 2008; Jolly et al., 2006; Romano et al., 2003); se han observado resultados satisfactorios en fermentaciones mixtas (coinoculación), multistarter o inoculación secuencial con *S. cerevisiae* (Benito et al., 2013; Ciani et al., 2006 y 2010; Lleixà, 2016; Moreira et al., 2008; Suzzi et al., 2012).

El estudio de fermentaciones con estas levaduras bajo diferentes condiciones de vinificación ha favorecido la selección de nuevos cultivos no-*Saccharomyces* capaces de conducir la FA junto con *S. cerevisiae* (Andorrà et al., 2010; Anfang et al., 2009; Azzolini et al., 2015). Ciertas cepas de *H. uvarum*, *H. vineae* y *H. guilliermondii* tienen bajo poder fermentativo, pero en coinoculación o inoculación mixta con *S. cerevisiae* producen un alto nivel de compuestos volátiles deseables y más enzimas extracelulares que las cepas de *Saccharomyces* (Capece et al., 2005; Mendoza et al., 2007; Moreira et al., 2008; Wang et al., 2015).

Por otra parte, se ha comprobado la influencia en el desarrollo de la fermentación y en la composición del vino mediante la inoculación de varias especies no-*Saccharomyces* que simulen condiciones de vinificación distintas como la fermentación natural o la maceración prefermentativa (Boto et al., 2014; Zott et al., 2011). Así, Ciani et al. (2006) optimizaron el cultivo formado por *T. delbrueckii*, *K. thermotolerans* y *S. cerevisiae*. Otros estudios han intentado recuperar métodos de cultivo de tradición centenaria. Es el caso de las investigaciones sobre el madreo realizadas por Boto et al. (2014) en la DO Tierra de León. La madre formada por racimos de uva enteros, seleccionados en campo durante la vendimia, se añaden al mosto y se mantienen con éste durante toda la FA (junto con la

diversidad microbiana natural que estos contienen), y más allá, sobre el vino, hasta que se realiza el trasiego. La evaluación sensorial de estos vinos fue positiva (> 75 puntos sobre 100) con opiniones dispares, pero atribuyendo una alta diferenciación con respecto a los normalmente catados. Además, los vinos obtenidos fueron muy diferentes entre sí, concluyendo que los vinos de madreo presentaron diferencias notables respecto a los vinos rosados de elaboración convencional. Este tipo de vinos encaja perfectamente con el perfil actual de vinos ecológicos demandados.

Sin embargo, es crítico conseguir el equilibrio correcto entre las cepas de *S. cerevisiae* y las cepas de no-*Saccharomyces*. Si el número de células viables de estas últimas es mucho mayor que las de *S. cerevisiae* existe el riesgo de producirse paradas o estancamientos de la fermentación, mientras que en el caso inverso donde *S. cerevisiae* sea superior se puede minimizar el impacto positivo de las no-*Saccharomyces*. Conseguir una fase larga de latencia de *S. cerevisiae* permitiría el desarrollo suficiente de las cepas no-*Saccharomyces* durante esa etapa a la vez que *S. cerevisiae* asegura que la fermentación finaliza (Albertin et al., 2014). Englezos et al. (2016a y 2016b) encontraron que las fermentaciones secuenciales de *Starm. bacillaris*/*S. cerevisiae* con 48 h de retraso, permitieron el crecimiento suficiente de su población. Este protocolo dio lugar a vinos con las características beneficiosas de etanol, acidez y glicerol antes mencionadas para esta especie, en contraposición con los vinos producidos por cultivos puros de cepas de *S. cerevisiae* que presentaron una composición química más deficiente. Además, en este contexto, debe encontrarse un emparejamiento adecuado de las cepas no-*Saccharomyces* y *S. cerevisiae* en la fermentación secuencial, ya que las relaciones entre especies tienen impacto en el vino.

Las posibilidades de aplicación de levaduras no-*Saccharomyces* son tales que existen varias cepas comerciales de *T. delbrueckii*, *K. thermotolerans*, *M. pulcherrima*, *Pichia kluyveri* y *Sch. pombe* disponibles en el mercado para su uso en fermentaciones secuenciales o cultivos mixtos que permiten aportar diferentes características al vino final (Jolly et al., 2014).

1.5.4. El concepto de terroir microbiano y la tipicidad de los vinos

La fermentación espontánea, donde coexisten hongos filamentosos, levaduras y bacterias nativas, puede representar un riesgo mayor de producción de vinos con defectos organolépticos y/o fermentaciones estancadas (Bagheri et al., 2015; Provost y Pedneault, 2016). Sin embargo, a pesar de los riesgos asociados con la fermentación espontánea, la complejidad aportada por la diversidad de levaduras podría ser una ventaja competitiva en los mostos ecológicos. Así, la explotación de la biodiversidad mediante caracterización y selección de cepas autóctonas con fenotipos propios podría contribuir a la producción de vinos con características únicas asociadas a la región de donde proceden (Belda et al., 2017b; Capece et al., 2010; Grieco et al., 2010; Provost y Pedneault, 2016; Tristezza et al., 2014). Estos vinos presentan un sabor más complejo y aromático, presumiblemente debido a que las especies no-*Saccharomyces* involucradas tienen una fuerte influencia en su calidad y perfil organoléptico (Capozzi et al., 2015, Ciani y Comitini, 2015; Drumonde-Neves et al., 2017; Grangeteau et al., 2017a; Tello et al., 2011; Tofalo et al., 2013 y 2016).

La Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) define el *terroir* como el concepto referido a "un área en la que se desarrolla el conocimiento colectivo de las interacciones entre los entornos físicos y biológicos identificables y las prácticas vitícolas y enológicas aplicadas, dando características distintivas para los productos procedentes de esta área". Esta definición representa la base de la Denominación de Origen (DO), con impacto en las elecciones del consumidor y el mercado del vino (Garofalo et al., 2016). Diferentes estudios han resaltado el papel de la microbiota asociada con el *terroir* donde se cultivan las uvas, capaz de impartir una calidad única al vino (Csoma et al., 2010; DiMaio et al., 2012).

Se han encontrado diferencias geográficas en la diversidad de levaduras en viñedos como un *terroir microbiano*, que probablemente influyen en las diferencias regionales distintivas en el estilo y carácter de los vinos (Belda et al., 2017b; Drumonde-Neves et al., 2017; Setati et al., 2015). Bokulich et al. (2014 y 2016) estudiaron el *terroir microbiano* relacionando estrechamente los patrones microbianos con la región de producción y los perfiles metabólicos de los vinos obtenidos, condicionados por el cultivar, la vendimia y el clima. La diversidad natural de levaduras muestra una composición única, correlacionada con cada *terroir* específico, lo que representa un gran recurso para la elaboración de vino diferenciado (Capozzi et al., 2015; Tofalo et al., 2013). Durante las últimas décadas ha habido una creciente demanda de microorganismos y levaduras iniciadoras autóctonas. De hecho, determinadas cepas están mejor adaptadas a las características químicas del mosto de una variedad de uva y área de producción concretas (Drumonde-Neves et al., 2016 y 2017; Gilbert et al., 2014; Lopes et al., 2002; Tofalo et al., 2013 y 2016; Torija et al., 2001).

Sobre la base anterior, un creciente número de investigaciones científicas han centrado la atención en la diversidad microbiológica de la fermentación espontánea, para seleccionar cepas autóctonas con propiedades tecnológicas positivas que permitan su aplicación en fermentaciones industriales para la obtención de vinos de calidad (Capozzi et al., 2010; Cappello et al., 2008; Garofalo et al., 2016; Grieco et al. 2010; Tristezza et al., 2012, 2013 y 2014). La diversidad de cepas autóctonas (de levaduras y otros microorganismos) contribuyen de manera importante en el carácter regional de este *terroir microbiano* único en el vino y a crear una identidad de firma para los vinos ecológicos de áreas específicas (Drumonde-Neves et al., 2017; Schuller et al., 2012; Setati et al. 2015; Tofalo et al., 2013 y 2016; Valero et al., 2007). Tofalo et al. (2013) atribuyeron una caracterización biogeográfica de la levadura *S. cerevisiae* indicando que las prácticas agrícolas tales como los sistemas de cultivo (ecológico frente a convencional) y de manejo del suelo, han seleccionado diferentes poblaciones dentro de esta especie que son filogenéticamente distintas. Tofalo et al. (2014) también identificaron que más de un 3% de levaduras aisladas al final de la fermentación espontánea exhibían patrones de restricción característicos, inusuales y diferentes de los típicos de la especie *S. cerevisiae*.

Por todo ello, seleccionar cultivos iniciadores autóctonos con diferente comportamiento enológico, permitirá innovaciones sostenibles, coherentes y seguras de aplicación ante los diferentes retos del sector favoreciendo la diferenciación regional de los vinos (Capozzi et al., 2015).

1.5.5. Levaduras alterantes de la calidad de los vinos

Tradicionalmente, las especies de levaduras no-*Saccharomyces* se han asociado a la producción de acidez volátil, sabores desagradables y defectos que pueden afectar negativamente a la calidad del vino. Entre estas levaduras se incluyen especies de los géneros *Brettanomyces*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Pichia* y *Zygosaccharomyces* (Du Toit y Pretorius, 2000), y también *Kluyveromyces*, *Saccharomycodes*, *Schizosaccharomyces* y *Torulaspota* (Romano et al., 2003). Estas levaduras pueden encontrarse en la fermentación y también durante el envejecimiento y conservación del vino.

No es sencillo elaborar una definición científica precisa para una levadura alterante. Cualquier levadura capaz de cambiar las características sensoriales del vino puede ser considerada como levadura alterante (Loureiro y Malfeito-Ferreira, 2003). La coexistencia de especies durante la FA productoras de un elevado número de compuestos dificulta la separación entre actividad beneficiosa y alterante. Por este motivo, las levaduras alterantes se buscan durante el almacenamiento, envejecimiento y embotellado, y raramente durante la fermentación (Bisson et al., 2017).

En la actualidad, estas levaduras tienen relevancia debido a la tendencia a reducir el uso de conservantes como el SO₂ y a las nuevas tecnologías de procesado. Las uvas con cierto grado de podredumbre pueden llevar consigo cantidades elevadas de levaduras de los géneros *Brettanomyces* y *Zygosaccharomyces* (Loureiro y Malfeito-Ferreira, 2003). Dentro de la bodega, las levaduras alterantes proliferan en los mostos, vinos, superficies y materiales en función de la higiene y de las características de cada vino. Los efectos más comunes de alteración son la producción de gases, la formación de velos, enturbiamientos, precipitados o compuestos que generan sabores y olores desagradables. Loureiro y Malfeito-Ferreira (2003) clasificaron las levaduras potencialmente contaminantes del vino en tres tipos: levaduras aerobias que no tienen capacidad para desarrollarse y alterar el vino (*Rhodotorula* spp., *Cryptococcus* spp., *D. hansenii* y *A. pullulans*); levaduras de metabolismo aerobio o débilmente fermentativo formadoras de velo (*Pichia membranifaciens*, *P. anomala* y *Candida* spp.) que colonizan rápidamente superficies con residuos de vino debido a su metabolismo oxidativo (indicadoras del nivel de higiene de la bodega); y levaduras peligrosas para los vinos como *Dekkera/Brettanomyces* spp., *Zy. bailii* y *Saccharomycodes ludwigii*. Algunos estudios han demostrado que estas últimas son contaminantes de equipos y vinos embotellados, tanto jóvenes como envejecidos en bodega (Renouf et al., 2007a y 2007b).

Las levaduras del género *Zygosaccharomyces* se relacionan con la alteración de vinos ácidos con azúcares fermentables por lo que no contaminan habitualmente las bodegas productoras de vinos secos. *Zy. bailii* está asociada a uvas con podredumbre ácida y que sobreviven a la fermentación con *S. cerevisiae* (Barata et al., 2008), debido a su tolerancia al etanol, carácter osmófilo, resistencia al SO₂ y a su capacidad refermentadora (Kurtzman et al., 2011). La especie *Dekkera bruxellensis* (forma anamorfa de *Brettanomyces bruxellensis*), identificada en uva, bodega y vinos, genera importantes pérdidas económicas en el sector enológico debido a su capacidad para producir fenoles volátiles desagradables (Loureiro y Malfeito-Ferreira, 2006) que conllevan la aparición de olores fenólicos y animales que recuerdan al cuero, sudor, caucho o establo, defecto conocido como “carácter Brett”

(Chatonnet et al., 1992; du Toit y Pretorius, 2000). Durante la última década estas levaduras han sido objeto de numerosos estudios para tratar de entender su metabolismo alterante y establecer medidas de control (Suárez et al., 2007). Se desarrolla principalmente durante la crianza en bodega de los vinos.

1.6. La viticultura ecológica y el sector del vino en Galicia

Galicia es una de las regiones vitícolas más importantes de España. La viticultura en los territorios del sur de la Comunidad Autónoma de Galicia es una actividad agrícola de gran importancia, no solo por el valor socioeconómico que genera, sino también por la potenciación del medio rural que supone y el papel que desempeña en la conservación forestal y medioambiental. La superficie destinada al cultivo del viñedo en Galicia ocupa 25.950 ha (MAPAMA, 2017), de las cuales, 9.273 ha (35.7%) están ocupadas por viñedos amparados bajo Denominaciones de Origen (DOs), con una producción total de vino calificado de 41.6 millones de litros y un valor económico estimado de 209 millones de €. A pesar de ello se trata de un sector muy fragmentado y minifundista que cuenta, solo con respecto al vino calificado por DO, con 15.532 viticultores y 459 bodegas o industrias vitícolas inscritas (Consellería do Medio Rural de la Xunta de Galicia, 2017). En Galicia existen cinco DOs: Rías Baixas, Ribeiro, Ribeira Sacra, Valdeorras y Monterrei. Además, hay cuatro indicaciones geográficas protegidas (IGP) con una superficie total de aproximadamente 40 ha: Betanzos, Barbanza e Iria, Valle del Miño-Ourense y Ribeiras do Morrazo.

Sin embargo, a pesar del reconocido auge de los productos ecológicos, solo en 78.2 ha se aplican métodos de producción ecológica certificados (CRAEGA, 2017); es decir, en menos del 0.3% de la superficie total de viñedo de Galicia. Además, la elaboración de vinos ecológicos certificados no está extendida. Estos datos contrastan sobremanera si se comparan con comunidades como Castilla-La Mancha donde el cultivo de viñedo ecológico supera el 12% del total (54.512 ha), o con Murcia, Cataluña o la Comunidad Valenciana, que mantienen respectivamente el 34%, 21% y 16% de su superficie de viñedo en cultivo ecológico (OEMV, 2017; MAPAMA, 2017).

El clima fundamentalmente oceánico-atlántico de Galicia, caracterizado por la regularidad de las precipitaciones de 900 a 1.600 mm anuales (MeteoGalicia, 2018) y las temperaturas suaves con baja oscilación durante el año, favorecen el desarrollo de enfermedades fúngicas (Blanco-Ward et al., 2007) y no siempre facilitan el cultivo y la producción ecológica de uva. Estas condiciones climáticas generales varían además en las cinco DOs de la comunidad gallega donde es posible identificar diferencias de microclima no solo a nivel de región o zona (Figura 3.1), sino a nivel de parcela, donde intervienen factores como la orientación de ladera, la altitud, la umbría, la niebla, etc. Inclusive, las DOs gallegas están a su vez subdivididas en numerosas subzonas: Val do Salnés, Condado do Tea, O Rosal, Soutomaior y Ribeira do Ulla, en la DO Rías Baixas; o Amandi, Chantada, Quiroga-Bibeí, Ribeiras do Miño o Ribeiras do Sil en la DO Ribeira Sacra, por citar algunas.

Ligado a esta heterogeneidad, Galicia posee además una gran diversidad de variedades de vid (Díaz-Losada et al., 2013); algunas son de cultivo mayoritario en las distintas zonas, pero otras son de cultivo minoritario y están adaptadas a condiciones específicas. Por otro lado, también la edafología varía enormemente en Galicia debido a su especial distribución geológica y relieve, pudiéndose encontrar varios cambios en la tipología del suelo en una misma parcela. Hay que añadir, además del clima y la edafología, la dificultad que conlleva la producción debida a la orografía de ciertas zonas montañosas. En la práctica, en estas zonas la mecanización está casi ausente, especialmente en la DO Ribeira Sacra (conocida por ello como viticultura heroica) y en la DO Ribeiro. Este contexto favorece la proliferación de patógenos de la vid, rendimientos poco fiables, problemas con el manejo de plagas y dificultad en las operaciones de cultivo (Cancela et al., 2016; Fernández-González et al., 2012; Fraga et al., 2014; Provost y Pedneault, 2016).

Todo ello implica que la implementación de la viticultura biológica en la mayoría de las regiones gallegas sea difícil y costosa. En este ámbito, el sector vitícola está interesado en la reducción de fitosanitarios sintéticos en la viña (Provost y Pedneault, 2016), hecho que también conlleva una compensación de costes, entre otros beneficios, ya que en años climáticamente desfavorables pueden llegar a realizarse hasta 10-15 tratamientos fitosanitarios en Galicia. Sin embargo, únicamente un pequeño número de productores y bodegas gallegos siguen estas prácticas. Así, en 2018 solo constan 36 operadores inscritos en el Consello Regulador de Agricultura Ecolóxica de Galicia (CRAEGA): 29 productores de uva y 16 bodegas elaboradoras de vino. Las provincias gallegas con mayor superficie de viñedo y mayor producción de vino ecológico son Ourense y Pontevedra con un 54% y 27% del total respectivamente (CRAEGA, 2017).

1.6.1. Principales variedades de vid de cultivo tradicional en Galicia

En Galicia se cultiva un gran número de variedades de vid. De ellas, la mayoría son de cultivo minoritario, pero representan un gran potencial enológico. A continuación, se indican las principales variedades de *Vitis vinifera* L. cultivadas tradicionalmente en Galicia (Díaz Losada et al., 2011) y se describen con detalle las utilizadas en este estudio.

Las **variedades blancas** de cultivo más extendido en Galicia son Albariño, Treixadura y Godello.

El **Albariño** ocupa una superficie de cultivo en Galicia de 5.650 ha, la mayoría de ellas en la DO Rías Baixas (4.027 ha). Es una variedad vigorosa de brotación precoz, baja producción y maduración media que tiene sensibilidad alta al oídio, moderada al mildiu y baja a *Botrytis cinerea*. La cepa presenta pámpanos de densidad y pigmentación media. Las hojas son pentagonales con tres lóbulos de color verde y tamaño medio. El racimo es cónico de longitud corta, anchura y compacidad media y con presencia de 1 o 2 alas (Figura 1.3). La baya es pequeña. Los vinos elaborados con la variedad Albariño son apreciados, con graduación elevada (entre 8.6-14.2%) y alta acidez (entre 7.2-14.3 g/L), caracterizado por sus aromas afrutados.

La **Treixadura** se cultiva en 995 ha en Galicia. Es la variedad predominante en la DO Ribeiro, pero también está presente en el resto de denominaciones gallegas. Se cultiva en suelos frescos y drenados, de composición granítica. Es una variedad de vigor medio, brotación y maduración tardía, de producción media, moderadamente sensible al oídio, mildiu y *Botrytis*. De fertilidad media es productiva y de alto potencial cualitativo. El pámpano nuevo tiene densidad media sin pigmentación. La hoja es pentagonal con cinco lóbulos, de color verde y tamaño medio. El racimo es cónico, de longitud, ancho y compactidad media y con presencia de 1 o 2 alas (Figura 1.3). El pedúnculo es de longitud corta y las bayas son medianas de hollejo grueso. Los vinos elaborados con Treixadura son equilibrados con una graduación entre 12.1-15.5% y acidez entre 5.4-6.5 g/L. Tradicionalmente con esta variedad se elaboran vinos dulces con uvas pasificadas bajo cubierta durante varios meses denominados “tostados”.

La variedad **Godello**, con una superficie de cultivo de 832 ha está extendida por todas las DOs gallegas.



Figura 1.3. Cepas de la variedad Treixadura en cultivo convencional (DO Ribeiro; imagen izquierda) y Albariño en ecológico (DO Rías Baixas; imagen derecha).

Las **variedades tintas** más extendidas en Galicia son Mencía y Garnacha tintorera. Otras variedades tintas de cultivo tradicional en las DOs gallegas son Brancellao, Tempranillo, Sousón, Merenzao y Caiños (tinto, bravo y longo).

Mencía es la principal variedad tinta en Galicia y ocupa una superficie de 3.270 ha mayoritariamente cultivadas en las DOs Valdeorras, Monterrei y Ribeira Sacra. Es una variedad adaptada a terrenos cálidos y ligeramente secos, de producción medio-alta. Es de brotación y maduración media, es sensible al oídio y presenta una sensibilidad moderada al mildiu y *Botrytis*. En regiones altas y lluviosas, se aconseja aumentar la densidad de plantación para incrementar la competencia y mejorar así la calidad de la uva. Produce vinos con alto potencial enológico, con graduaciones de 12.2-13.3% y baja acidez de 4.07-4.91 g/L, con tonos violáceos, aromas afrutados y notas especiadas. La cepa es de vigor medio con la hoja verde medio, pentagonal con cinco lóbulos de tamaño medio y glabra. El racimo es cónico de tamaño medio-pequeño, largo, de compactación media y con presencia de 1 o 2 alas (Figura 1.4). El pedúnculo es corto y las bayas de color azul-negro presenta forma elíptica, son de tamaño medio y hollejo más grueso que Brancellao. Se le atribuye carácter mineral aportado por el suelo.

La variedad **Brancellao** se cultiva mayoritariamente en las DOs Ribeira Sacra, Ribeiro, Valdeorras y Rías Baixas. Ampliamente cultivada en Galicia se vio afectada en el siglo XIX debido al oídio. Actualmente se extiende entre viejos y nuevos viñedos por las laderas de las cuencas de los ríos Sil, Avia y Miño. Es una variedad fértil, de brotación y maduración tardía, de vigor alto y rendimiento medio, elevada sensibilidad al oídio y de intensidad media al mildiu. Produce vinos equilibrados de graduaciones entre 13.14-13.82% y acidez total de 4.01-5.43 g/L, con reflejos violáceos intensos y notas frutales y vegetales. Se adapta a suelos graníticos, francos y bien drenados. La cepa presenta hojas de color verde oscuro pentagonales con cinco lóbulos, tamaño mediano y con pelos entre los nervios medios. El racimo es cónico, de longitud y anchura media con 1 o 2 alas y compacidad suelta (Figura 1.4). El pedúnculo es de longitud media. Las bayas son de tamaño medio de color rojo-violeta oscuro. Utilizada para complementar otras variedades aporta una mayor carga aromática. El color de sus vinos es de capa baja.



Figura 1.4. Cepas de las variedades Brancellao en cultivo convencional (DO Ribeiro; imagen izquierda) y Mencía en ecológico (DO Ribeira Sacra; imagen derecha).

2. Justificación y objetivos

2. Justificación y objetivos

En la actualidad la producción ecológica está en auge por ser más respetuosa con el medio y dar lugar a productos más saludables. El sector vitivinícola no es ajeno a esta tendencia y, en concreto, España es el primer productor mundial de vinos ecológicos.

En Galicia el vino constituye un sector muy importante, no solo por el valor socioeconómico que genera, sino también por la potenciación del medio rural que supone y el papel que desempeña en la conservación medioambiental. Sin embargo, la existencia de una gran heterogeneidad en las condiciones climáticas y orográficas, que no siempre facilitan el cultivo ecológico del viñedo, hace que un porcentaje muy pequeño de viticultores apuesten por este tipo de producción. Los datos disponibles sobre el impacto de la producción ecológica sobre la producción de uva, las características del mosto, la diversidad microbiana y las características químicas y sensoriales de los vinos ecológicos en Galicia son muy escasos.

Con esta tesis, llevada a cabo en la Estación de Viticultura y Enología de Galicia (EVEGA), se aborda por primera vez un estudio comparativo sobre la diversidad de levaduras en uvas y mostos de producción ecológica frente a producción convencional en un contexto biogeográfico de cuatro Denominaciones de Origen de Galicia. Además, aunque hay constancia de algunos estudios previos sobre microbiología del viñedo gallego, hasta nuestro conocimiento también es el primer trabajo en el que se constata la existencia de un patrón biogeográfico de la población de levaduras presentes en viñedo en el Noroeste de España. Los resultados, por tanto, aportarán conocimiento sobre la diversidad regional de levaduras en producción biológica y convencional del viñedo, y su influencia en la fermentación y calidad del vino. Asimismo, se investigó si la producción ecológica en el viñedo favorece la conservación de la biodiversidad microbiana autóctona para preservar el *terroir microbiano* que caracteriza la tipicidad de los vinos.

En cuanto a los vinos gallegos, existen diversos estudios sobre la caracterización y composición aromática de las distintas variedades (Díaz-Losada et al., 2013; Vilanova et al., 2010a y 2013), sobre la diversidad de levaduras (Longo et al., 1991), sobre la influencia de distintas cepas de *S. cerevisiae* sobre el perfil químico y sensorial de los vinos (Blanco et al., 2013; Cortés y Blanco, 2011; Vilanova et al., 2005b). Por otro lado, recientemente se está trabajando en la aplicación de levaduras no-*Saccharomyces* por su papel sobre la calidad de los vinos y de cara a mitigar algunos efectos ligados al cambio climático. Esta tesis también nos ha permitido, utilizando el importante reservorio regional de levaduras, la selección y evaluación del potencial enológico de levaduras no-*Saccharomyces* autóctonas en bodega experimental, un estudio sin precedentes en Galicia.

En base a estos antecedentes el **objetivo general** de esta tesis doctoral fue evaluar la influencia del cultivo ecológico y convencional del viñedo sobre la diversidad de levaduras en distintas zonas de Galicia y determinar su influencia en las características químicas y sensoriales del vino.

Para ello se han propuesto los siguientes **objetivos específicos**:

1. Aislar e identificar levaduras a partir de uva y mosto procedentes de viñedo ecológico y convencional de distintas Denominaciones de Origen de Galicia.
2. Determinar el papel de la producción ecológica sobre la diversidad de la población de levaduras en uva y mosto.
3. Establecer la importancia cuantitativa de las distintas especies de levaduras y valorar la existencia de patrones biogeográficos en la población de levaduras (*terroir microbiano*) como concepto de diferenciación regional capaz de impartir una calidad y tipicidad únicas a los vinos.
4. Estudiar la dinámica de la población de levaduras en fermentaciones espontaneas realizadas en laboratorio a partir de mosto de uva de producción ecológica y convencional y su influencia en los vinos.
5. Caracterizar las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* presentes en bodegas de producción ecológica de Galicia y establecer su patrón de distribución.
6. Comparar a nivel sensorial vinos comerciales de Galicia para dar una visión general de la calidad y preferencia de los vinos ecológicos frente a los convencionales.
7. Evaluar el potencial enológico de levaduras no-*Saccharomyces* autóctonas en ensayos de fermentación secuencial: cinética fermentativa, capacidad de implantación e influencia en la composición química y las características sensoriales del vino.

3. Material y Métodos

3. Material y métodos

3.1. Origen de las uvas y diseño del muestreo

3.1.1. Datos climatológicos de las zonas de muestreo

La comunidad gallega se caracteriza por unas condiciones climáticas muy heterogéneas que no siempre facilitan el cultivo ecológico. Así, en la DO Rías Baixas el clima es atlántico costero con temperaturas suaves y abundantes precipitaciones (1.300 mm de media) durante todo el año. Las demás DO se caracterizan por un clima de transición.

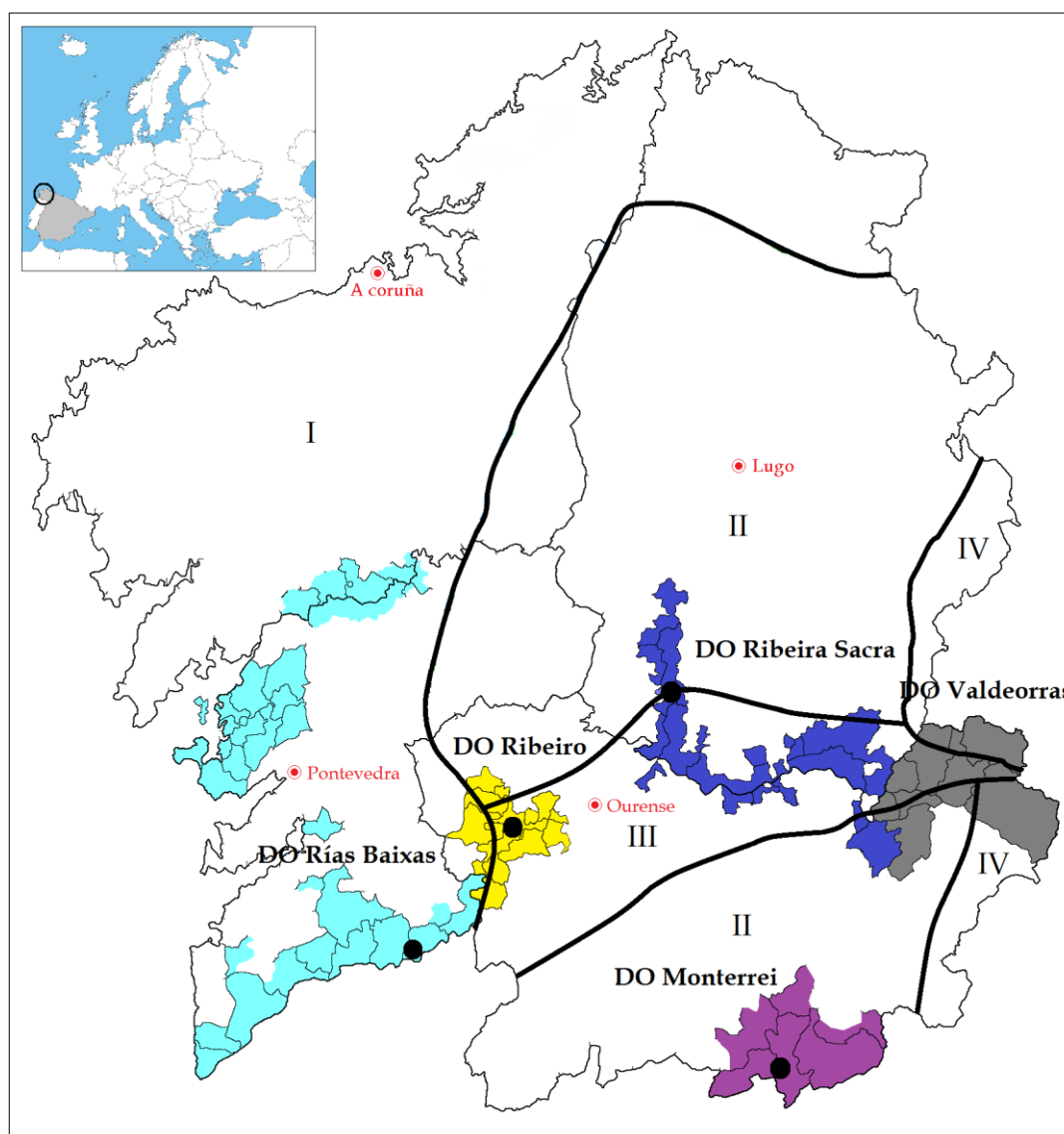


Figura 3.1. Ubicación de los puntos de muestreo (•) de las distintas Denominaciones de Origen y zonas climáticas de Galicia: I, clima oceánico costero; II, clima oceánico de interior; III, clima oceánico mediterráneo; IV, clima oceánico de montaña.

En la Figura 3.1 se muestran las áreas amparadas bajo las cinco Denominaciones de Origen de Galicia y las diferentes zonas climáticas de Galicia en las que se realizaron los muestreos. La DO Ribeiro presenta cierto carácter mediterráneo y de interior, pero suavizado por la influencia atlántica. La precipitación media anual es de 950 mm y las temperaturas son templadas con importantes oscilaciones térmicas entre el día y la noche. En la DO Ribeira Sacra la influencia atlántica es más débil que la mediterránea al sur y de interior al norte, pero propicia el mantenimiento de temperaturas y humedades relativas moderadas durante el periodo de maduración de las uvas. Esta DO se caracteriza además por fuertes pendientes que pueden superar el 40%. La DO Monterrei presenta un clima mediterráneo templado con tendencia continental, con veranos calurosos y secos mientras que sus inviernos son fríos. Finalmente, la DO Valdeorras con influencia de clima de montaña se caracteriza por inviernos fríos, veranos cálidos y otoños y primaveras suaves, con temperaturas mínimas de 8 °C y máximas de 33 °C. La temperatura media es de 11 °C con precipitaciones entre 850 y 1.000 mm anuales (Cancela et al., 2016; Fernández-González et al., 2012; Fraga et al., 2014; Trigo, 2016).

Para este trabajo se realizó un estudio climatológico y geológico de los tres años 2013, 2014 y 2015 en los que se recogieron las muestras para la investigación. En el estudio fueron considerados los años agronómicos correspondientes al ciclo vegetativo de la vid tomando como inicio y fin la vendimia, es decir, al período comprendido entre los meses de septiembre a septiembre del siguiente año. Se analizaron los factores climatológicos medios más importantes que influyen en el viñedo: pluviometría, temperatura, humedad relativa (HR) y velocidad del viento. Estos factores, así como el sistema de cultivo repercuten en el desarrollo de plagas y enfermedades y pueden afectar a la diversidad de levaduras. Un resumen de los datos climatológicos recogidos se muestra en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Datos climáticos medios calculados a partir de las dos estaciones meteorológicas más cercanas a cada parcela para cada año agronómico (MeteoGalicia, 2018).

Denominación de Origen (Estaciones climatológicas)		Velocidad del viento (km/h)	Temperatura mensual (°C)	Humedad relativa mensual (%)	Pluviometría (L/m ²)
Ribeiro (Prado-EVEGA)	2013	2.2-4.3	7.5-14.3-23.4	62-76-92	0-244-1211
	2014	2.2-4.4	6.0-14.4-21.2	67-79-91	17-291-1351
	2015	1.8-3.6	5.8-14.5-22.9	62-76-90	2-193-752
Rías Baixas (Meder-Cequeliños)	2013	2.5-10.8	8.2-14.8-23.2	63-78-97	0-350-1489
	2014	2.2-13.0	7.2-14.9-20.8	64-79-96	23-361-1649
	2015	2.2-10.0	7.0-15.1-21.5	62-75-93	6-284-1071
Ribeira Sacra (Millara-San Fiz)	2013	2.9-10.1	6.8-13.5-23.9	63-78-93	2-215-1075
	2014	1.4-10.8	6.2-13.7-20.5	69-80-91	13-263-1197
	2015	1.8-7.9	5.7-13.8-21.8	65-79-92	7-197-719
Monterrei (Verín-Vilela)	2013	3.96-6.9	5.6-12.7-22.3	65-77-91	0-166-787
	2014	2.5-6.2	3.6-12.8-20.2	68-79-90	7-171-928
	2015	3.2-6.5	3.4-13.0-21.9	64-77-92	0-150-595
		mín-máx	mín-media-máx	mín-media-máx	mín-media-máx

3.1.2. Selección y características de las parcelas

Las muestras de uva utilizadas en esta tesis doctoral fueron recogidas de viñedos dentro de cuatro Denominaciones de Origen de Galicia (Tabla 3.2) durante tres años consecutivos (2013, 2014 y 2015). Se eligieron variedades de vid tradicionalmente cultivadas en dichas zonas: Albariño y Treixadura como variedades blancas y Brancellao y Mencía como tintas. Las principales características de los viñedos muestreados en cada DO se muestran en la Tabla 3.2, Tabla 3.3 y Tabla 3.4.

Tabla 3.2. Variedades de vid y características de las parcelas (ubicación, elevación y precipitación anual) muestreadas en las diferentes DOs.

Denominación de Origen	Variedad de vid		Coordenadas	Elevación (m)	Pluviometría media anual* (L/m ²)
DO Monterrei	Treixadura	Eco	41°52'11.9" N, 7°25'49.7" O	406	770
		Con	41°52'12.8" N, 7°25'54.5" O	402	
	Mencía	Eco	41°52'11.0" N, 7°25'51.9" O	404	
		Con	41°52'12.5" N, 7°25'56.9" O	399	
DO Ribeiro	Brancellao	Eco	42°19'24.8" N, 8°6'07.8" O	270	1105
		Con	42°19'22.3" N, 8°5'51.7" O	290	
	Treixadura	Eco	42°19'27.6" N, 8°6'02.0" O	278	
		Con	42°19'22.0" N, 8°5'52.4" O	289	
DO Ribeira Sacra	Mencía	Eco	42°34'11.5" N, 7°43'3.4" O	243	997
		Con	42°34'11.4" N, 7°43'3.5" O	244	
DO Rías Baixas	Albariño	Eco	42°5'47.9" N, 8°21'18.1" O	74	1403
		Con	42°5'46.8" N, 8°21'16.9" O	72	
	Treixadura	Eco	42°5'48.2" N, 8°21'15.1" O	75	
		Con	42°5'46.2" N, 8°21'17.7" O	71	

* Precipitación media anual durante los tres años de estudio (2013, 2014 y 2015), calculada a partir de las dos estaciones meteorológicas más cercanas a cada parcela (MeteoGalicia, 2018) para cada año agronómico: de septiembre a septiembre.

Se eligieron parcelas limítrofes o cercanas entre sí (Figura 3.2), con las mismas condiciones climáticas, edafológicas y características agronómicas similares en la medida de lo posible (año de plantación, sistema de conducción, orientación, etc.), pero empleando diferentes sistemas de cultivo: ecológico y convencional. Los diferentes puntos de muestreo en cada parcela se justifican debido a la heterogeneidad de los factores climáticos en las diferentes zonas, unido a las diferentes tipologías de suelo y orografía.

Tabla 3.3. Características orográficas y geológicas de las fincas seleccionadas.

DO	Orografía y pendiente	Características geológicas
Rías Baixas	Orografía acentuada. Sin pendiente.	Granitos preasincinemáticos. Granito de feldespato alcalino de grano medio a fino. Estructuras flebiticas. Metatexitas.
Ribeiro	Orografía montañosa. Pendiente < 10%.	Precámbrico-Tremadoc. Esquistos grafitosos, micaesquistos, roca de grano fino, poco foliada, con pirita. Pizarras muy grafitosas.
Monterrei	Plana. Sin pendiente.	Ordovícico inferior. Esquistos con intercalaciones cuarcíticas y pizarras negras con metamorfismo de contacto.
Ribeira Sacra	Orografía montañosa. Pendiente > 30%.	Precámbrico. Cuarzitas y esquistos. Cuarzo, feldespato potásico, plagioclasa y biotita. Granodiorita cataclástica/adamellita.

Fuente: Mapa Geológico Nacional (MAGNA); IGME, Hojas 1: 50.000.

Tabla 3.4. Características agronómicas de las fincas seleccionadas.

Denominación de Origen	Varietal de uva	Características
DO Rías Baixas	Albariño Treixadura	Localización: Sela (Arbo, Pontevedra) Marco de plantación: 3 x 2 m Sistema de conducción: pérgola con un número medio de 4 brazos por planta Sistema de poda: pulgar y vara.
DO Ribeiro	Brancellao Treixadura	Localización: Eira do Mouros, San Andrés (Ribadavia, Ourense) Marco de plantación: 2.10 x 1 m Sistema de conducción: espaldera Sistema de poda: guyot y cordón
DO Monterrei	Treixadura Mencia	Localización: Quinta da Muradella (cultivo ecológico) y O Chamborro (convencional) Tamaguelos, Verín (Ourense) Marco de plantación: 2.20 x 0.80 m (Con); 50 x 0.80 m (Eco) Sistema de conducción: espaldera Sistema de poda: guyot (Eco) y cordones modificados (Con)
DO Ribeira Sacra	Mencia	Localización: Horta da Cal y Portutide, Mourellos (O Saviñao, Lugo) Edad: 35 años Marco de plantación: 1.20 x 1.30 m Sistema de conducción: vaso modificado a espaldera Sistema de poda: pulgar y vara de 5 o 6 yemas



Figura 3.2. Distribución de las parcelas de muestreo en las distintas DOs: en verde se muestran los viñedos de cultivo ecológico y en púrpura los de producción convencional.

Se seleccionaron parcelas reales (no viñedos de ensayo) donde las condiciones de viñedo ya estaban establecidas por los viticultores locales. En cada parcela, se establecieron tres bloques experimentales aleatorios representativos de la finca. En cada bloque se marcaron entre 5 y 10 plantas dependiendo de la parcela de estudio. Se recogieron aproximadamente 4 kg de racimos de uva por variedad de las 5-10 cepas de cada bloque. Las uvas se recogieron, casi siempre, momentos antes de la vendimia local.

3.2. *Procesamiento de las muestras y análisis realizados*

Cada año se recolectaron un total de 42 muestras de uva: tres muestras por cada una de las variedades, sistema de producción (ecológico y convencional) y DO que se muestran en la Tabla 3.2. En 2014 solo se recolectaron 36 muestras debido a que no fue posible recoger la variedad Mencía de la DO Monterrei en cultivo convencional. Las muestras se transportaron al laboratorio de la EVEGA en bolsas de plástico individuales y se procesaron en un tiempo máximo de 2 h. Cada muestra se procesó como se indica a continuación:

- *Procesado de uvas enteras para evaluar la diversidad de levaduras en las bayas (2015).*

Se separaron asépticamente 20 bayas enteras sanas de las partes inferior, central y superior de racimos aleatorios en la muestra. Los pedicelos de las bayas se cortaron uno por uno con tijeras previamente esterilizadas con etanol 70% para obtener uvas enteras evitando la liberación de mosto. Las uvas se introdujeron en matraces Erlenmeyer con 100 mL de agua de peptona esterilizada (VWR BDH Chemicals) y se incubaron en un agitador orbital a 120 rpm durante 2 h para separar las levaduras de la superficie de las bayas de uva.

- *Procesado de las uvas para obtención del mosto (muestras de 2013, 2014 y 2015).*

En el laboratorio, los racimos se despallaron y las uvas se estrujaron y prensaron manualmente de forma aséptica en las mismas bolsas de transporte para obtener el mosto yema. En los ensayos con uva blanca se utilizó mosto solo, sin hollejos, semillas, etc., mientras que en los de uva tinta se utilizó la masa completa. Del mosto obtenido se separaron muestras para los distintos análisis:

- A) Muestra para análisis microbiológico (apartado 3.3).
- B) Muestra para análisis químico (apartado 3.4).
- C) Muestra para fermentación natural (apartado 3.5).
- D) En las variedades tintas se determinó además la riqueza fenólica de las uvas (Brancellao de la DO Ribeiro y Mencía de las DOs Ribeira Sacra y Monterrei). En este caso se recogieron aproximadamente 1kg de racimos aleatorios de uvas enteras por cada bloque (apartado 3.4.1).

3.3. Análisis microbiológico

3.3.1. Medios de cultivo

Para el recuento de células viables, el aislamiento y la multiplicación de levaduras se utilizaron diferentes medios de cultivo. A continuación, se indica su composición y el modo de preparación. Si no se especifica otro método, los medios se esterilizaron en autoclave (121 °C, 20 minutos).

3.3.1.1. Medio Wallerstein agar (WL)

El WL Wallerstein agar (Scharlau Microbiology) es un medio diferencial que se utilizó para la enumeración total de levaduras presentes en las muestras y para su diferenciación en base a la morfología y coloración que las colonias presentan al crecer sobre él. El medio fue suplementado con 200 µg/mL de bifenilo para suprimir el crecimiento de mohos.

3.3.1.2. Medio YEPD o YPD (Yeast Extract-Peptone-Dextrose)

El medio complejo YEPD se usó para el aislamiento en cultivo puro, mantenimiento y conservación de las cepas en fresco o congeladas. Su composición es (p/v): extracto de levadura, 1%; peptona, 2% y glucosa, 2%. Para la obtención de medio sólido se añadió agar al 2%. Como medio sólido en placa se utilizó para el aislamiento de colonias de levaduras en cultivo puro y su mantenimiento en fresco. Como medio líquido (sin agar) el YEPD se empleó de modo rutinario para el crecimiento de preinóculos de las levaduras. Para la conservación de las levaduras a -70 °C se añadió 15% de glicerol al YEPD líquido.

3.3.1.3. Lysine Medium

El medio Lysine Medium (Oxoid) es un medio selectivo que permite el crecimiento de las levaduras, excepto *Saccharomyces*. Este medio contiene el aminoácido lisina como única fuente de nitrógeno y *S. cerevisiae* no es capaz de utilizarlo. Se prepara siguiendo las instrucciones del fabricante. No se autoclava.

3.3.1.4. Medio para la detección de actividad killer (YPD-MB)

Para la detección de actividad *killer* de las diferentes cepas de *S. cerevisiae* se utilizó YEPD preparado en tampón citrato-fosfato a pH 4.2 a partir de ácido cítrico (0.1 M) y Na₂HPO₄ (0.2 M) suplementado con azul de metileno (0.02%).

3.3.1.5. Nickerson Agar (BiGGY Agar)

El medio BiGGY Agar (Bismuth Glucose Glycine Yeast Agar) se empleó para estimar la capacidad de las levaduras de producir H₂S. Algunas cepas pueden reducir la sal de bismuto a bismuto metal y el sulfito a sulfuro, mediante un proceso de reducción de sustrato. El bismuto y el sulfuro se combinan dando lugar a un precipitado de color amarronado a negro que tiñe las colonias y puede difundirse en el medio. El medio se prepara siguiendo las instrucciones de la casa comercial y no se autoclava.

3.3.2. Recuento y aislamiento de levaduras en uva, mosto y fermentación procedentes del viñedo

Tabla 3.5. Listado de muestras de uva y mosto.

Denominación de Origen	Vendimia*	Variedad de vid	Sistema de producción	Código
Monterrei	2013, 2014, 2015	Treixadura	Ecológico Convencional	Mo-13/14/15-Trx-Eco Mo-13/14/15-Trx-Con
	2013, 2015	Mencia	Ecológico Convencional	Mo-13/15-Men-Eco Mo-13/15-Men-Con
Ribeiro	2013, 2014, 2015	Brancellao	Ecológico Convencional	Ri-13/14/15-Bra-Eco Ri-13/14/15-Bra-Con
	2013, 2014, 2015	Treixadura	Ecológico Convencional	Ri-13/14/15-Trx-Eco Ri-13/14/15-Trx-Con
Ribeira Sacra	2013, 2014, 2015	Mencia	Ecológico Convencional	RS-13/14/15-Men-Eco RS-13/14/15-Men-Con
Rías Baixas	2013, 2014, 2015	Albariño	Ecológico Convencional	RB-13/14/15-Alb-Eco RB-13/14/15-Alb-Con
	2013, 2014, 2015	Treixadura	Ecológico Convencional	RB-13/14/15-Trx-Eco RB-13/14/15-Trx-Con

Todas las muestras se analizaron por triplicado. *El muestreo de uvas solo se realizó en 2015.

Las muestras resultantes del procesado de las uvas (Tabla 3.5) (42 suspensiones de uvas agitadas en agua de peptona en 2015, 42 mostos de uva estrujada en 2013 y 2015 y 36 mostos de uva estrujada en 2014) se utilizaron para el recuento, aislamiento e identificación de levaduras. Para el análisis microbiológico se homogeneizaron las muestras y se utilizó 1 mL de la suspensión de agua de peptona en el caso de las uvas tras la agitación y 1 mL directamente recogido de las bolsas zip en el caso del mosto yema estrujado. Para el recuento y aislamiento de levaduras las muestras se agitaron y 1 mL se diluyó en serie decimal en tubos de ensayo con 9 mL de agua de peptona. De cada dilución adecuada se sembraron por extensión 100 µL en medio WL Nutrient Agar suplementado con 200 µg/mL de bifenilo por duplicado. Las placas se incubaron a 28 °C hasta que aparecieron colonias visibles y aquellas que contenían entre 20 y 200 colonias se usaron para el recuento y la cuantificación de células viables totales. Los resultados se expresaron como el logaritmo decimal de unidades formadoras de colonias por mililitro (log UFC/mL) o número de levaduras viables por mililitro (log NLV/mL). Después de la incubación, las placas se almacenaron en refrigeración a 5-7 °C para limitar el crecimiento de microorganismos mesófilos. Se comprobaron las placas en que pudiera observarse un desarrollo favorable de posibles levaduras psicotolerantes tal y como citan otros autores (Grangeteau et al., 2017a; Sipiczki, 2003; Vaz et al., 2011; Zott et al., 2010), para evitar perder esta fracción de biodiversidad. Los aislados puros se sembraron en Lysine Medium para su diferenciación en levaduras de tipo *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*. Posteriormente las colonias diferenciadas en placa se observaron al microscopio óptico para identificar la morfología de las células.

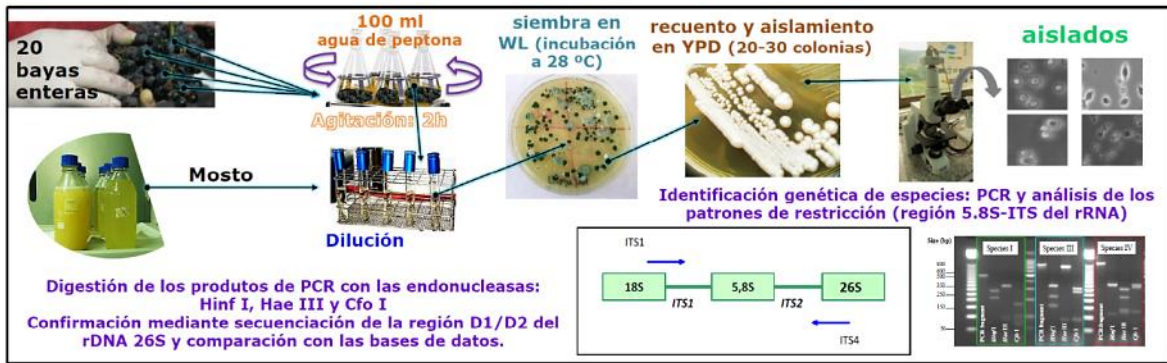


Figura 3.3. Proceso de aislamiento e identificación de levaduras.

La Figura 3.3 muestra un esquema del proceso de aislamiento e identificación de levaduras. En función del aspecto de la colonia (color, textura, tamaño, forma, margen y borde), se estimaron las frecuencias de cada tipo de levadura. Después se aisló un número representativo de colonias, proporcional a su frecuencia (10-20 para cada muestra) en medio YEPD. Los aislados se sembraron de nuevo para garantizar la obtención de un cultivo puro y para su mantenimiento; después se procedió a su congelación a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su conservación hasta posteriores análisis o identificación.

3.3.3. Recuento y aislamiento de cepas de *S. cerevisiae* en bodegas de producción ecológica

Además de la diversidad de levaduras en las muestras del viñedo se estudió la diversidad de cepas de la especie *S. cerevisiae* presentes en distintas bodegas de producción ecológica (Tabla 3.6). Las muestras se recogieron directamente de los depósitos en fermentación de las bodegas en distintas fases de la fermentación: mosto y fases inicial (Fi), tumultuosa (Ft) y final (Ff). El recuento se realizó por duplicado y de cada muestra se aislaron 20 colonias representativas como se describe en el apartado 3.3.2. La identificación de las cepas de *S. cerevisiae* se efectuó como se describe más adelante en el apartado 3.3.6.3.

Tabla 3.6. Bodegas de producción ecológica y fermentaciones muestreadas (2013 a 2015).

Bodega	Denominación de Origen (DO)	Vendimias	Número de fermentaciones	
			Blanco	Tinto
Corisca*	Rías Baixas	2	4 (3+1)	
Adega Beatriz (AB)*	Ribeiro	2	2 (1+1)	2 (1+1)
Pazo de Vieite (PV)§	Ribeiro	3	8 (1+1+6)	6 (1+1+4)
Diego de Lemos (DL)	Ribeira Sacra	3	3 (1+1+1)	6 (2+2+2)
Quinta da Muradella (QM)	Monterrei	3	5 (2+2+1)	14 (1+5+8)

* Las muestras fueron recogidas solo en 2013 y 2014. § En esta bodega se elabora el vino ecológico de la Cooperativa Cume do Avia.

La diversidad de cepas se presenta como el número de cepas diferentes identificadas en cada bodega, y como el % respecto al número total de cepas encontradas.

3.3.4. Caracterización tecnológica de las cepas de *S. cerevisiae* aisladas en bodegas de producción ecológica

Se determinó el carácter *killer* y la capacidad de producción de ácido sulfhídrico en cepas *S. cerevisiae* en bodegas de producción ecológica.

Para la detección de actividad *killer* de las diferentes cepas de *S. cerevisiae* se utilizó el medio *killer* (apartado 3.3.1.4). Como controles se utilizó la cepa sensible *S. cerevisiae* CECT 1890, la cepa *killer* positiva *S. cerevisiae* EX73 y la cepa *killer* negativa *S. cerevisiae* EX33 (cedidas amablemente por Ramírez, M. de la Universidad de Extremadura). La cepa sensible se sembró en césped y sobre ella se añadió una gota de un cultivo de las cepas a evaluar. Las placas se incubaron a 24 °C durante 2-4 días. Las levaduras *killer* presentaron alrededor un halo de inhibición del crecimiento de la cepa sensible (Figura 3.4).



Figura 3.4. Utilización de algunos medios selectivos; de izquierda a derecha: agar lysine, medio *killer* y agar Biggy.

La producción de H_2S ocurre principalmente durante la fermentación alcohólica, constituye un defecto grave (aporta olor a huevo podrido) y acarreará una pérdida de calidad del vino. Dependiendo de la cepa y factores ambientales, sobre todo de la concentración de nitrógeno asimilable, la producción de H_2S ocasionada por la levadura variará. Para la determinación de la capacidad de producción de ácido sulfhídrico de las diferentes cepas de *S. cerevisiae*, éstas se sembraron sobre el medio Agar Biggy tal y como se describe en Caridi et al. (2002). Se cuantificó la producción de H_2S sobre el medio agar BiGGY incubado a 25 °C durante 48 h en tres niveles; la oscuridad del color en el agar BiGGY está en proporción directa con la producción de H_2S (Figura 3.4):

- Tono 1 (-): H_2S negativo; color crema-blanco.
- Tono 2 (+/-): baja producción de H_2S ; color marrón claro-avellana.
- Tono 3 (+): H_2S positivo; color marrón oscuro-negro con brillo.

3.3.5. Análisis microbiológico de vinos ecológicos y convencionales de las cinco DOs de Galicia

Se realizó un control microbiológico de algunos vinos comerciales de las 5 DOs de Galicia para establecer si había relación entre la evaluación sensorial y la presencia de levaduras alterantes entre los vinos de cultivo ecológico y convencional. Para ello se filtraron 100 mL de cada vino a través de una membrana de 0.22 μm utilizando un equipo de filtración Milliflex™ de Millipore. La membrana se depositó sobre una placa con WL nutrient agar y se incubó a 28 °C hasta la aparición de colonias visibles que fueron contadas y aisladas. El tipo de microorganismo presente (bacteria o levadura) se identificó mediante

observación al microscopio óptico Nikon E-400 de las colonias crecidas en placa. En aquellos vinos calificados por los catadores como defectuosos por la presencia de fenoles volátiles no deseables (como el 4-etilfenol y 4-etilguayacol responsables de aroma a establo, cuero, etc.), atribuidos a levaduras del género *Brettanomyces/Dekkera*, las membranas de filtración se incubaron sobre el medio selectivo DBDM (Agrovin). Los aislados se identificaron genéticamente como se indica en 3.3.6.1.

3.3.6. Identificación genética de las levaduras

3.3.6.1. Identificación de las levaduras a nivel de especie: análisis del polimorfismo de restricción de la región 5.8S-ITS (RFLP-5.8S-ITS)

La identificación de las levaduras a nivel de especie se realizó mediante la amplificación por PCR del gen 5.8S rRNA y los dos espaciadores ITS1 e ITS2 internos (sin codificación) utilizando los primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Figura 3.5) de acuerdo con la metodología descrita por Esteve-Zarzoso et al. (1999). La mezcla de reacción empleada para amplificación contenía (volumen final de 100 μ L):

- Cebador ITS1 (20 μ M) 2.5 μ L
- Cebador ITS4 (20 μ M) 2.5 μ L
- dNTPs 10 mM 2.0 μ L
- PCR buffer 10x + MgCl₂ (15 mM) 10.0 μ L
- Taq polimerasa (2.5 U/ μ L) 0.5 μ L
- Agua (Milli-Q) 82.5 μ L
- ADN total (se añadieron células directamente a la mezcla de reacción).

Las condiciones de amplificación empleadas en el termociclador (Biorad iCycler Thermal Cycler 582BR) se indican en la Figura 3.5.

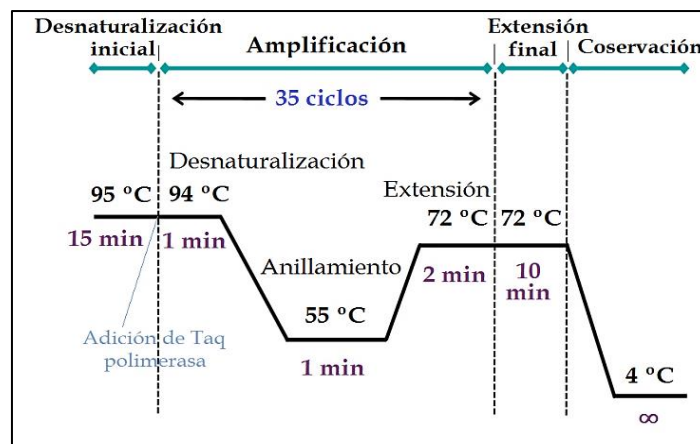


Figura 3.5. Condiciones de amplificación mediante PCR de la región 5.8S-ITS.

Para obtener los RFLP (polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción) del gen de rRNA ITS-5.8S, los productos de PCR se digirieron con las enzimas de restricción *HinfI*, *HaeIII* y *CfoI* (o su homóloga *HhaI*) en reacciones separadas a 37 °C durante 2 h. La mezcla de reacción empleada para la digestión contenía (volumen final de 20 μ L):

- Producto PCR 16.0 µL
 - Enzimas de restricción (*Hinfl*, *HaeIII* o *CfoI*) (10 U/µL) 2.0 µL
 - Tampón 10x para cada enzima 2.0 µL
- A las muestras con las enzimas *HaeIII* o *CfoI* se añadieron 4.0 µL de tampón de carga.

Visualización del ADN mediante electroforesis en geles de agarosa

Los productos de la PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (p/v) en tampón TAE 1x (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH 8.5). Como controles de peso molecular se utilizaron los marcadores de 50 y 100 pb (Takara). La separación electroforética se realizó a 90V (80-100 mA; 2-4 V/cm) durante 2 h. Para la separación de los productos de restricción de la PCR se utilizó un gel de agarosa al 3% durante 3 horas. La tinción del gel se realizó con el agente intercalante bromuro de etidio, EtBr (0.5 µg/mL). La carga de cada muestra se facilitó con la adición de tampón de carga 6x. El patrón de bandas se visualizó mediante un equipo de documentación de geles acoplado a un transiluminador (luz UV) Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ (BIO-RAD) y se fotografió para su análisis. Los tamaños del amplificado y la calidad de éste (cantidad-intensidad, número de bandas, etc.) se estimaron por comparación con los marcadores de peso molecular.

3.3.6.2. *Confirmación de la identidad de las levaduras mediante secuenciación de los dominios D1-D2 del ADNr 26S*

Para confirmar la identificación de las levaduras se procedió a la secuenciación de la región D1/D2 del gen 26S ADNr (Figura 3.6) (White et al., 1990). La secuencia de los dominios D1-D2 es altamente específica para cada una de las especies de levaduras. Los dominios D1 y D2 se amplificaron usando los cebadores NL-1 y NL-4 como describen Kurtzman y Robnett (1998): NL1: 5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3'; NL4: 5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3'.

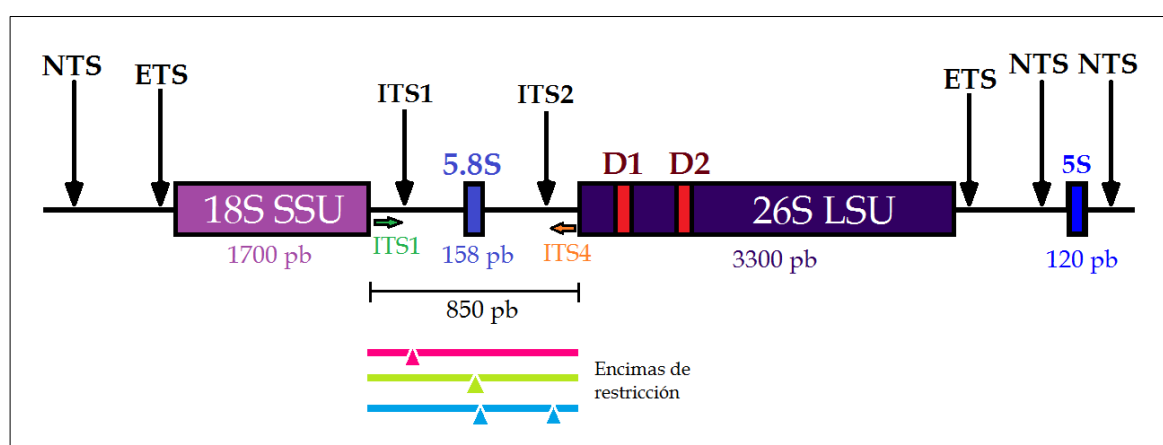


Figura 3.6. Esquema de la organización de los genes ribosomales en una levadura.

La mezcla de reacción de PCR empleada para la amplificación mediante PCR de la región D1/D2 contenía (volumen final de 30 μ L):

- Cebador NL1 (1.2 pmol, 5 μ M) 2.4 μ L
- Cebador NL4 (1.2 pmol, 5 μ M) 2.4 μ L
- dNTP's (10 mM) 1.6 μ L
- Taq polimerasa (2.5 U/ μ L) 0.2 μ L
- Tampón 10x + MgCl₂ (15 mM) 3.0 μ L
- Agua ultra pura (Milli-Q) 19.4 μ L
- ADNtotal (se añadieron células directamente a la mezcla de reacción).

Las condiciones de amplificación del termociclador se muestran en la Figura 3.7.

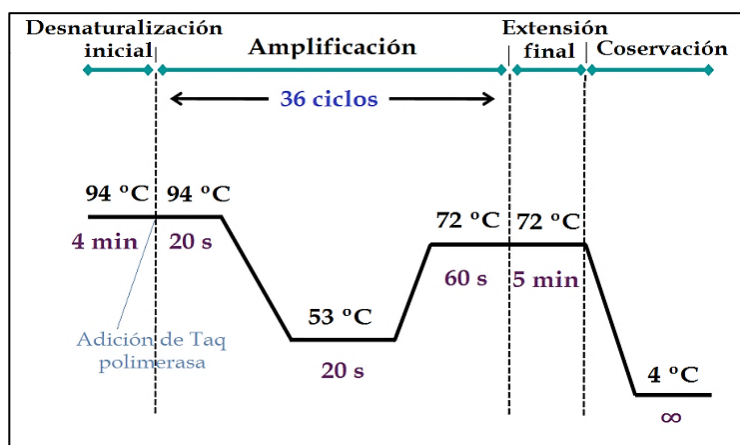


Figura 3.7. Condiciones de amplificación de la región D1/D2.

Los productos de PCR (10 μ L) se visualizaron en un gel de agarosa al 1% (p/v) con tampón TAE 1x utilizando los marcadores de 50 y 100 pb como se indica en el apartado 3.3.6.1. Los productos de PCR se enviaron a secuenciar a un servicio externo, donde se purificaron utilizando el kit PCR Extract Mini (5PRIME) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Para la secuenciación se utilizó el Kit BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) y un Analizador genético 3130xl (Applied Biosystems). Las secuencias obtenidas se compararon con las presentes en las bases de datos empleando las facilidades online de BLASTN de GenBank (Altschul et al., 1990). La identificación se consideró correcta cuando la identidad de las secuencias de genes fue del 98% o superior.

3.3.6.3. Identificación de cepas de *S. cerevisiae* en bodegas de producción ecológica

Los aislados puros identificados en Lysine Medium como *Saccharomyces* se caracterizaron a nivel de cepa mediante la técnica de análisis de los patrones de restricción del ADNmt (mtDNA-RFLPs) según el protocolo descrito por Querol et al. (1992) con algunas modificaciones. Las cepas se multiplicaron en 5 mL de medio YEPD líquido durante 24 h y se centrifugaron durante 3 min a 3.000 rpm. El sobrenadante fue retirado y las células se lavaron con 1 mL de agua Milli-Q y se centrifugaron durante 2.5 min a 5.000 rpm en viales de 1.5 mL. Se retiró de nuevo el sobrenadante y las células se resuspendieron en 0.5 mL de sorbitol 1 M-EDTA 0.1 M, pH 7.5. Seguidamente se añadieron 20 μ L de una solución de Zymolyase (7.5 mg/mL en tampón Tris 50 mM pH 7.5). La mezcla se

resuspendió y los viales se incubaron con agitación cada 7 min en baño de agua a 37 °C durante 45 min para obtener los esferoplastos. Los esferoplastos se sedimentaron durante 3 min a 5.000 rpm y se suspendieron en 0.5 mL de Tris-HCl 50 mM-EDTA 20 mM, pH 7.4. Después de la suspensión, se añadieron 50 µL de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10% y la mezcla se incubó a 65 °C durante 10 minutos. Inmediatamente después, se añadieron 0.2 mL de acetato potásico 5 M y los tubos se sometieron a shock térmico colocándolos en hielo picado durante 10 min. Luego se centrifugaron a velocidad máxima (13.200 rpm) a 4 °C durante 10 min. El sobrenadante (aproximadamente 0.7 mL) se transfirió a un nuevo microtubo y se introdujo durante 5 min a -20 °C. Posteriormente se centrifugó a 4 °C durante 10 min a máxima velocidad. El ADN se precipitó mediante la adición de 1 volumen de isopropanol (0.7 mL aprox.). Las muestras se dejaron reposar durante 5 min a temperatura ambiente y se centrifugaron de nuevo a 4 °C durante 10 min a máxima velocidad. Se retiró el sobrenadante y el ADN se lavó con 1 mL de etanol al 70%. Los viales con el ADN se dejaron secar en un incubador de aire caliente a 37 °C durante 1 h. Posteriormente cada muestra de ADN se resuspendió en 40 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7.5) junto con 0.6 µL de RNAsa. Las muestras se mantuvieron en refrigeración a 5 °C hasta su digestión. La mezcla de digestión contenía: 15 µL de la muestra de ADN + 2 µL de la endonucleasa *HinfI* + 3 µL del tampón del enzima (10x) + 10 µL de H₂O Milli-Q. Se incubó durante 2 h de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para la separación y análisis de los fragmentos de ADN se empleó la técnica de electroforesis como se indica en el apartado 3.3.6.1. utilizando en este caso un gel de agarosa al 0.8% (p/v) en tampón TAE 1x. La separación electroforética se realizó a 90V durante 3 h. Los tamaños del amplificado y la calidad de éste se estimaron por comparación con los marcadores de peso molecular 1 kb utilizados como controles.

3.4. Análisis químico

Todos los análisis químicos se realizaron en los laboratorios de química y cromatografía de la EVEGA.

3.4.1. Análisis químico de la riqueza fenólica de la uva (Cromoenos)

Para el análisis de la riqueza fenólica de las uvas tintas Brancellao y Mencía se utilizó el método Cromoenos (Gracia-Romero, 2002). El método Cromoenos reduce el tiempo de maceración de 4 h a 2 minutos y permite obtener directamente el contenido en antocianos (totales y extraíbles) y taninos totales de las uvas. Además, proporciona el grado de madurez de los taninos, mediante el índice de madurez fenólica (IMF), y predice el color estable probable después de la fermentación alcohólica y maloláctica (CPE), así como el índice de polifenoles totales (IPT) probable. Los parámetros determinados fueron: antocianos totales y extraíbles, taninos totales, IMF, CPE e IPT. A partir de 100 bayas trituradas, una fracción del triturado se sometió a maceración en el termo extractor Cromoenos. Se centrifugó y el sobrenadante fue tratado con los reactivos Cromoenos.

Finalmente, se efectuó la lectura de absorbancia a las longitudes de onda de 280, 420, 520 y 620 nm. Los resultados obtenidos fueron tratados con un software específico para la obtención de los valores. El método Cromoenos presenta un coeficiente de correlación razonable entre el color predicho y el que se obtiene en los vinos (Kountoudakis et al., 2009).

3.4.2. Análisis químico de los mostos

En los mostos se analizaron los siguientes parámetros químicos: °Brix, azúcares reductores, pH, acidez total, ácido L-málico, ácido tartárico, nitrógeno fácilmente asimilable (NFA), glucónico, ácido acético y glicerol. °Brix, azúcares reductores, pH, acidez total y ácido L-málico fueron determinados utilizando los métodos oficiales establecidos por la OIV (2012). El ácido tartárico se determinó por colorimetría, la concentración de NFA según el método de Sørensen (índice de formol) y el glucónico, ácido acético y glicerol por métodos enzimáticos (TDI-Tecnología Difusión Ibérica, S.L.). Estos tres últimos parámetros están relacionados con el estado sanitario de la vendimia.

3.4.3. Análisis químico de los vinos

Los vinos obtenidos durante este estudio se analizaron una vez acabadas las fermentaciones y estabilizados (finales de octubre-noviembre). Se determinaron los siguientes parámetros químicos: grado alcohólico, azúcares reductores, extracto seco, acidez total, acidez volátil, ácido málico, ácido láctico, pH, glicerol, sulfuroso libre y sulfuroso total. Para ello se utilizaron los métodos oficiales (OIV, 2012). También se determinó el ácido tartárico mediante colorimetría.

3.4.4. Análisis de compuestos volátiles en vinos por cromatografía de gases (detección FID-MS)

La determinación de algunos compuestos aromáticos volátiles presentes en los vinos se realizó por duplicado. Se determinaron compuestos volátiles de varias familias de aromas fermentativos; es decir, cuya producción es atribuible a las levaduras durante la fermentación alcohólica. No se analizaron compuestos de origen varietal, prefermentativos (originados durante el procesado de la uva) ni postfermentativos (resultantes de transformaciones ocurridas durante la conservación y envejecimiento de los vinos). Durante los ensayos de calibración y pruebas preliminares no se encontraron diferencias significativas para algunos de estos compuestos, como terpenos, probablemente debido a que se utilizó el mismo mosto y el tiempo de almacenamiento en botella fue mínimo hasta su análisis, sin envejecimiento y en condiciones óptimas de conservación.

Se determinaron 21 compuestos volátiles utilizando dos cromatógrafos de gases:

❖ **Los compuestos aromáticos mayoritarios (alcoholes superiores, acetaldehído y acetato de etilo)** se cuantificaron en un equipo Agilent modelo 7890A (Palo Alto, CA, USA) con detector de ionización de llama (FID). Los compuestos determinados fueron: metanol, propanol, isobutanol, 1-butanol, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, acetaldehído (etanal) y acetato de etilo (etanoato de etilo).

La concentración de los compuestos volátiles mayoritarios se evaluó mediante inyección directa, con división “split” 1:30 y con adición de 4-metil-2-pentanol (50 mg/L; Merck, Madrid, España) como patrón interno (5 g/L; preparado en matriz hidroalcohólica al 50% de etanol). Para ello, previo filtrado de la muestra, se tomaron 5 mL de vino y se añadieron 50 µL del patrón interno. Se mezclaron por agitación y se inyectaron 2 µL de esta mezcla en el cromatógrafo a una temperatura del inyector de 275 °C y del detector de 300 °C. La curva de temperatura del horno para la separación fue: inicio a 40 °C durante 5 min, aumentando 4 °C/min hasta 200 °C, que se mantienen durante 15 min. El cromatógrafo utilizado contiene una columna CPWAX 57 CB (Chromopack, Agilent, Palo alto, CA, USA) de dimensiones 50 m x 0.32 mm x 0.20 µm. Se empleó hidrógeno como gas portador, con un flujo de 3.3 mL/min, y nitrógeno como gas auxiliar, con un flujo de 30 mL/min. Las velocidades de flujo en el detector para el hidrógeno y el aire fueron de 40 y 400 mL/min, respectivamente.

❖ **Los compuestos aromáticos minoritarios (acetatos, ácidos y ésteres)** se analizaron en un equipo Agilent 6890N (Palo Alto, CA, USA) acoplado a un detector selectivo espectrómetro de masas (MS) Agilent 5973N con analizador de cuadrupolo simple. Se determinaron los siguientes compuestos: butanoato de etilo, acetato de isoamilo, hexanoato de etilo, acetato de hexilo, octanoato de etilo; ácido isobutírico, ácido butírico, decanoato de etilo, ácido isovalérico; acetato 2-feniletilo, dodecanoato de etilo; ácido hexanoico, ácido octanoico, ácido decanoico y ácido dodecanoico.

Para la extracción de los compuestos volátiles minoritarios (µg/L) aportados por las diferentes levaduras a la composición aromática de los vinos, se empleó la metodología descrita por Bouzas-Cid et al. (2018) con ligeras modificaciones. Este método de extracción en fase sólida (SPE) se divide en diferentes etapas:

Acondicionamiento. Para la obtención de los extractos se requiere una activación previa del cartucho Isolute ENV+ SPE (1 g) (Biotage, UK) con el paso a través de él de 15 mL de metanol (calidad GC residue analysis) y 20 mL de agua desmineralizada con un flujo de extracción de 4-5 mL/min.

Preparación de la muestra. Se filtraron 50 mL de cada vino en un matraz aforado de 100 mL que se enrasó con agua destilada y se adicionó 1 mL de 1-heptanol como patrón interno (462 ppm; 0.213 g/L).

Paso por el cartucho. Los 100 mL del vino diluido se pasaron por el cartucho de resina a un flujo de 4-5 mL/min. Tras el paso de la muestra la columna se lavó con 15 mL de agua desmineralizada (no se recoge) y seguidamente se eluyó la fracción aromática libre con 30 mL de diclorometano previamente destilado (calidad GC residue analysis; Scharlau, Barcelona, España) que fue recogida en un matraz con tapón roscado.

Concentración e inyección. Sobre este eluido se añadieron 60 mL de n-penteno previamente destilado (calidad GC residue analysis; Scharlau) y sulfato de sodio anhidro (Scharlau) hasta eliminar totalmente la fase acuosa arrastrada. Se trasvasó el resultado a un matraz de corazón a través de un filtro de pliegues de celulosa. El matraz se colocó en baño termostático a 40 °C acoplado a una columna Vigreux añadiendo unos granos de piedra

pómez para favorecer la ebullición del extracto. El extracto se concentró hasta 0.5 mL. Los analitos de dichos extractos se inyectaron en el cromatógrafo CG-MS:

Condiciones cromatográficas (ácidos grasos, acetatos y ésteres). Se empleó una columna capilar de polietilenglicol HP-Innowax (30 m x 0.25 µm x 0.25 mm d.i.; Agilent) y He (99.999%) como gas portador con un flujo de 1.3 mL/min. Las condiciones fueron las siguientes: la inyección de los extractos (3 µL) se llevó a cabo en modo split (relación 1:10) a 230 °C. El horno cromatográfico se programó de la siguiente manera: una temperatura inicial de 45 °C constante durante dos minutos; a continuación, un gradiente de 3 °C/min hasta 230 °C, e isoterma durante 10 minutos. La línea de transferencia se mantuvo a 220 °C, mientras que la temperatura de la fuente de ionización y del cuadrupolo se fijaron en 230 °C y 150 °C, respectivamente, y el voltaje del multiplicador fue de 70 eV. Los cromatogramas en full scan se registraron en un intervalo comprendido entre 25 y 220 unidades de m/z.

La concentración de los distintos compuestos se calculó mediante la integración de los picos (cálculo de área) en base a los patrones internos de concentración y área conocidos.

3.4.4.1. Valor de la actividad aromática (OAV)

Para evaluar la contribución de cada compuesto químico al aroma del vino se determinó el valor de la actividad aromática (OAV) como la ratio entre la concentración de cada compuesto individual del vino (Cx) y el umbral de percepción (Ax) encontrado en la literatura (Francis y Newton, 2005):

$$\text{OAV} = \frac{C_x}{A_x}$$

El umbral de percepción (*odour threshold*; µg/L) es el umbral olfatorio o concentración de cada compuesto que resulta suficiente para reconocerlo por su olor. El OAV es por tanto una medida de importancia de un compuesto específico al aroma de una muestra (Vilanova et al., 2010b). Los compuestos volátiles se corresponden a su vez con descriptores de olor descritos en la bibliografía (Etiévant, 1991; Ferreira et al., 2000; Francis y Newton, 2005; Guth, 1997; Romano et al., 2008).

3.5. Fermentaciones

3.5.1. Fermentaciones espontáneas naturales de mosto ecológico y convencional

3.5.1.1. Microvinificaciones

El producto obtenido de las uvas de cultivo ecológico y convencional destinado a las microvinificaciones (apartado 3.2) fue transferido a botellas de fermentación, reservando unos 250 mL de mosto para los análisis químicos (apartado 3.4.2):

- Las uvas tintas se despalillaron manualmente y el mosto, hollejos y pulpa se transfirieron a botellas de 2 L de capacidad.

- Las uvas blancas se prensaron manualmente y el mosto tamizado fue transferido a botellas de 1 L de capacidad.

3.5.1.2. Evaluación de la cinética fermentativa

Las fermentaciones se llevaron a cabo en el laboratorio de microbiología de forma espontánea (natural, sin adición de anhídrido sulfuroso ni levaduras; únicamente con las levaduras naturalmente presentes en el mosto), a una temperatura controlada de 18 °C para los mostos blancos y de 24 °C para las muestras de uva tinta.

La cinética de la fermentación alcohólica se monitorizó mediante medida diaria del °Brix y la temperatura. Al inicio de la fermentación (Fi) y al final (Ff) se tomó una muestra para ver la evolución de la población de levaduras durante el proceso. En el caso de la fermentación con variedades tintas a los 10 días el vino se descubó y la fermentación se mantuvo unos días más hasta la finalización del proceso (concentración de azúcares en el mosto < 2 g/L). El vino obtenido se centrifugó, se sulfitó con 25 mg/L de SO₂ y se guardó hasta su análisis físico-químico.

3.5.1.3. Dinámica de la población de levaduras durante la fermentación

La diversidad de la población de levaduras se estudió en el mosto, en las etapas inicial, y final de la fermentación conforme a la metodología establecida en el apartado 3.5.1.2. Los resultados obtenidos en 2013 y 2014 demostraron que, en algunos casos, no todos los ensayos fermentaron correctamente, por ello, en la campaña del 2015 se modificó el protocolo. Para asegurar el acabado de la fermentación se permitió a las muestras arrancar espontáneamente y, una vez empezado el proceso (cuando la densidad disminuyó en torno a 2 °Brix), se realizó la inoculación secuencial con la cepa comercial *S. cerevisiae* EC1118 (Lallemand) de producción ecológica o convencional según el tipo de mosto. Cuando no arrancaron al cabo de 5 días se inocularon igualmente para favorecer el proceso. Esto también permitió estudiar la diferencia entre las fermentaciones espontáneas y guiadas con *S. cerevisiae*.

3.5.2. Diversidad de levaduras *S. cerevisiae* en bodegas de producción ecológica

Para el estudio de la diversidad de cepas de levaduras de *S. cerevisiae* en bodegas de producción ecológica se tomaron muestras durante distintas etapas de las vinificaciones en bodegas que elaboran vino ecológico dentro de las distintas Denominaciones de Origen de Galicia. El nombre de la bodega, la DO a la que pertenece, la campaña de muestreo, el tipo de uva y el número de fermentaciones muestreadas se resumen en la Tabla 3.6. En todas ellas se llevaron a cabo procesos de fermentación espontánea, aunque en algún caso hayan utilizado levaduras comerciales puntualmente. En cada una de ellas se tomaron muestras de los distintos tanques en fermentación con el fin de determinar la diversidad de levaduras propia de cada bodega.

Las muestras de las fermentaciones indicadas se recogieron en recipientes estériles y se trasladaron al laboratorio de la EVEGA para su procesado.

En la bodega Pazo de Vieite (DO Ribeiro) se elaboraron vinos con uva de cultivo convencional, y también vinos con uva de producción ecológica procedente de la Cooperativa Cume do Avia (DO Ribeiro). También se determinó la implantación de levaduras comerciales en las fermentaciones convencionales y su posible impacto en los procesos espontáneos ecológicos. El proceso de elaboración de vino a partir de uva ecológica se realizó de forma separada con material dedicado exclusivamente a esta elaboración, como establece la legislación vigente.

3.5.3. Fermentación de mosto Treixadura con levaduras no-*Saccharomyces* autóctonas de Galicia

3.5.3.1. Caracterización enológica de las cepas: selección previa

Se realizó una caracterización fenotípica previa de diferentes cepas de las principales especies no-*Saccharomyces* con importancia enológica de acuerdo con la bibliografía actual que pudieran aportar tipicidad a los vinos: *Starm. bacillaris* (anteriormente *C. zemplinina*), *L. thermotolerans* (anteriormente *K. thermotolerans*), *M. pulcherrima* y *T. delbrueckii*. Se seleccionaron un total de 30 cepas autóctonas procedentes de los viñedos gallegos (tanto de producción ecológica como convencional) que fueron aisladas, identificadas y conservadas durante la tesis ampliando así la colección de cepas de la EVEGA. Los ensayos preliminares se llevaron a cabo por duplicado mediante la fermentación de 70 mL de mosto natural pasteurizado de uva blanca. En ellos se inoculó un cultivo puro de las distintas cepas. Además de la capacidad fermentativa (medición de la pérdida de peso por pérdida de CO₂) se analizaron diferentes parámetros químicos y volátiles en el vino resultante. Se evaluó la formación de compuestos de relevancia enológica como glicerol, ácido málico, ácido láctico, acidez volátil, acidez total, azúcares reductores, grado alcohólico, pH, alcoholes superiores, etanal y acetato de etilo.

Además, se realizó una ponderación por tramos de los vinos obtenidos, es decir, en función de las cepas pertenecientes a cada especie. Para el cálculo de la ponderación de cada parámetro se calculó la diferencia entre el valor máximo y mínimo entre todos los vinos (cepas) elaborados con cada especie. El resultado se dividió entre 10 para obtener la fracción decimal de cada tramo o especie. A continuación, se restó al valor de cada parámetro el menor valor de todos los de su mismo tramo (vinos elaborados con cepas de la misma especie). El resultado se dividió entre la fracción decimal antes mencionada. Se obtiene así para cada vino y parámetro un valor de referencia comprendido entre 0 y 10. Este valor de referencia fue ajustado en función de si el parámetro es deseable o indeseable por encima de una determinada concentración en el vino.

De acuerdo con su aptitud fermentativa y la puntuación máxima obtenida se seleccionó una cepa de cada una de las especies no-*Saccharomyces*: *T. delbrueckii* Td315 (Treixadura convencional-DO Ribeiro), *L. thermotolerans* Lt93 (Mencía ecológica-DO Monterrei), *M. pulcherrima* Mp278 (Treixadura convencional-DO Ribeiro), *Starm. bacillaris* Sb474 (Treixadura ecológica-DO Ribeiro). La cepa de *S. cerevisiae* utilizada fue ScXG3, previamente seleccionada y conservada en la colección de la EVEGA (Blanco et al., 2006).

3.5.4. Fermentación en bodega con las cepas de las levaduras seleccionadas

Se evaluó el efecto de la aplicación de levaduras no-*Saccharomyces* en la elaboración de vino con la variedad blanca Treixadura. Los inóculos se prepararon como se indica en Blanco et al. (2013).

Las fermentaciones se llevaron a cabo mediante inoculación secuencial: primero se añadió la cepa no-*Saccharomyces* y, una vez iniciada la fermentación, se inoculó *S. cerevisiae* ScXG3. Además, se realizó una fermentación control solo con *S. cerevisiae* ScXG3 y un proceso de fermentación espontánea.

3.5.4.1. Procesado de la uva, inoculación y cinética fermentativa

La uva Treixadura se vendimió en la finca de la EVEGA y se trasladó a la bodega, donde se procesó para la obtención del mosto. Las uvas se despalillaron y prensaron en una prensa hidráulica a baja presión hasta obtener el mosto yema. Durante este proceso se añadió Antiox Aromas (20 g/hL) y Zymolyase Clar FCE (2 g/hL) para evitar oxidaciones y facilitar el desfangado en frío durante 24 horas. A continuación, el mosto se distribuyó en depósitos de acero inoxidable de 5 L. Se recogieron 50 mL de cada muestra para su análisis químico: el mosto tenía 231.8 g/L de azúcares y 5.1 g/L de acidez total. Los ensayos se realizaron por triplicado y la fermentación se llevó a cabo en la bodega experimental de la EVEGA en una cámara fría con temperatura controlada a 16 °C, inoculando 1×10^8 UFC/mL de cada una de las levaduras en los depósitos correspondientes (en el control de fermentación espontánea no se inoculó levadura). En las fermentaciones con levaduras no-*Saccharomyces*, se inoculó además *S. cerevisiae* ScXG3 de forma secuencial (1×10^8 UFC/mL) cuando la densidad bajó 10-15 g/mL. La evolución de las fermentaciones se siguió mediante la medida diaria de la densidad y la temperatura. Se tomaron muestras en la Fi, Ft y Ff de la fermentación para el control de implantación de las levaduras inoculadas. Una vez terminada la fermentación, los vinos se trasegaron y sulfitaron (50 mg/L de SO₂), se estabilizaron por frío, y se embotellaron para los análisis posteriores.

3.5.4.2. Control microbiológico e identificación de levaduras durante las fermentaciones

Con el objetivo de comprobar que las levaduras inoculadas estaban presentes en las fermentaciones y estudiar el resto de la población de levaduras existentes, las muestras de mosto-vino durante la fermentación se diluyeron de forma adecuada y se sembraron en medio WL. El aislamiento y la identificación se realizaron como se indica en los apartados 3.3.2, 3.3.3 y 3.3.4.

3.6. Análisis sensorial de los vinos

3.6.1. Análisis sensorial de vinos ecológicos y convencionales

Se realizó una evaluación sensorial comparativa de 62 vinos ecológicos y convencionales comerciales de las cinco Denominaciones de Origen de Galicia de las

añadas 2011 a 2015. En diciembre de 2014 se llevó a cabo el análisis sensorial de vinos de las campañas de 2011, 2012 y 2013. En julio de 2016 se cataron los vinos de las campañas de 2014 y 2015, y algún tinto de 2012. Para la valoración sensorial de las añadas de 2012 y 2013 se seleccionaron 29 vinos (16 blancos y 13 tintos): 13 de producción ecológica, 1 de producción biodinámica y 15 de producción convencional. En 2016 se cataron 33 vinos (16 blancos y 17 tintos): 16 ecológicos, 2 de producción biodinámica y 15 de elaboración convencional. Los vinos se obtuvieron directamente de los productores, bodegas y/o Consejos Reguladores. En la Tabla 3.7 y en la Tabla 3.8 se indica el código y tipo de vino (blanco o tinto), el tipo de producción de la uva de la que procede (ecológica o convencional) y el año de elaboración del vino, así como la DO a la que pertenece.

Tabla 3.7. Listado de los 29 vinos ecológicos y convencionales utilizados en la evaluación sensorial en 2014 (vinos de 2011, 2012 y 2013).

DO	Código	Vino	Producción	Año	DO	Código	Vino	Producción	Año
Rías Baixas	RB1	B	Ecológica	2012	Ribeira Sacra	RS1	T	Ecológica	2012
	RB3	B	Ecológica	2011		RS3	B	Ecológica	2013
	RB4	B	Convencional	2012		RS4	T	Ecológica	2011
	RB5	B	Convencional	2013		RS5	B	Convencional	2013
	RB6	B	Convencional	2012		RS6	T	Convencional	2013
	RI1	T	Ecológica	2012		RS7	T	Ecológica	2012
Ribeiro	RI2	B	Ecológica	2012	RS8	B	Convencional	2013	
	RI2A	B	Convencional	2013	RS9	T	Convencional	2013	
	RI3	T	Ecológica	2013	MO1	B	Convencional	2013	
	RI4	B	Ecológica	2013	MO2	T	Convencional	2013	
	RI5	B	Convencional	2013	MO3	B	Ecológica	2011	
	RI6	T	Convencional	2013	MO4	T	Ecológica	2011	
	RI7	B	Convencional	2013	VD3	T	Convencional	2013	
	RI8	T	Convencional	2013	VD4	T	Ecológica	2013	
	RI9	B	Biodinámica	2011					

T: vino tinto; B: vino blanco.

Tabla 3.8. Listado de los 33 vinos ecológicos y convencionales utilizados en la evaluación sensorial en 2016.

DO	Código	Vino	Producción	Año	DO	Código	Vino	Producción	Año
Rías Baixas	RB1	B	Ecológica	2014	Ribeira Sacra	RS1	T	Ecológica	2014
	RB3	B	Ecológica	2014		RS3	B	Ecológica	2014
	RB5	B	Convencional	2014		RS4	T*	Ecológica	2013
	RB6	B	Convencional	2014		RS5	T	Convencional	2015
Monterrei	MO1	B	Convencional	2014		RS6	T	Ecológica	2015
	MO2	T	Convencional	2014		RS7	T	Ecológica	2014
	MO3	B	Ecológica	2014		RS8	T	Convencional	2015
	MO4	T	Ecológica	2012		RI1	T*	Ecológica	2014
	MO5	B	Ecológica	2014	RI2	B	Convencional	2014	
	MO6	T	Ecológica	2014	RI3	T	Ecológica	2014	
	MO7	B	Convencional	2014	RI4	B	Ecológica	2014	
	MO8	T	Convencional	2012	RI5	B	Convencional	2014	
Valdeorras	VD1	T	Ecológica	2014	RI6	T	Convencional	2014	
	VD2	T	Convencional	2014	RI7	B	Convencional	2014	
	VD3	T	Convencional	2015	RI9	B	Biodinámica	2014	
	VD4	T	Ecológica	2015	RI10	B	Biodinámica	2014	
				RI11	B	Convencional	2014		

T: vino tinto; T* vino tinto envejecido en barrica de madera; B: vino blanco.

En la Figura 3.8 se muestra el número y proporción de los distintos vinos ecológicos y convencionales comerciales analizados.

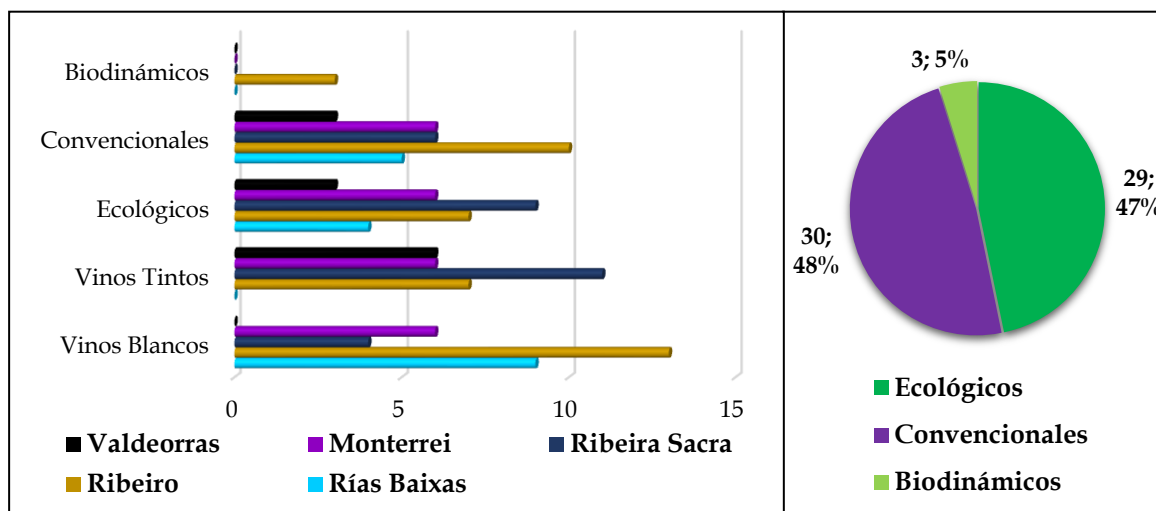


Figura 3.8. Número total y tipo de vinos analizados (2011-2015) según el sistema de cultivo en las distintas DOs (izquierda); Porcentaje global del tipo de vino según el sistema de cultivo (derecha).



Figura 3.9. Algunos vinos blancos (izquierda) y tintos (derecha) de producción convencional y ecológica catados.

3.6.2. Fichas de cata y proceso de evaluación

Para la evaluación sensorial se utilizaron las fichas descriptivas de cata para vinos blancos y tintos gallegos diseñada por un panel de expertos en la EVEGA (Tabla 3.9 y Tabla 3.10). Las fichas descriptivas de cata incluyeron tanto valoraciones cualitativas como los descriptores seleccionados que mejor caracterizan los vinos de Galicia. El glosario estaba compuesto por 25 descriptores en vinos blancos (4 en fase visual, 14 en fase olfativa, 6 en fase gustativa y calidad global) y 26 en vinos tintos (6 en fase visual, 10 en fase olfativa, 9 en fase gustativa y calidad global).

La valoración sensorial fue llevada a cabo en la sala de catas de la EVEGA en varias sesiones divididas por DOs y por tipos de vino (blancos o tintos), realizada por un grupo de catadores expertos en vinos gallegos de entre 10 y 20 miembros de diferentes sexos (35-50% mujeres; 50-65% hombres) y edades comprendidas entre 25 y 64 años. Se evaluó un volumen constante de 30 mL de cada vino presentados en copas de cata transparentes a 12 °C. Los vinos fueron servidos en los instantes previos a la cata orthonasal, codificados en cada puesto de cata con un código numérico y dispuestos de modo aleatorio.

Tabla 3.10. Ficha de cata de vinos tintos gallegos.

CATA DE VINOS TINTOS

Proyecto RTA2012-00021-C03-01

Código del Vino

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9

Año

OBSERVACIONES

FASE VISUAL

Intensidad color										
Capa										
Tono violeta										
Tono granate										
Tono cereza-picota										
Tono rubí										

FASE OLFATIVA

Intensidad aromática										
Floral										
Afrutado										
Frutas rojas (frambuesa, fresa)										
Frutos negros (mora, casis)										
Fruta madura/compota										
Láctico-mantequilla										
Vegetal -pimiento verde										
Especiado										
Otros										

FASE GUSTATIVA

Alcohol										
Acidez										
Astringencia										
Taninos verdes										
Taninos maduros/suaves										
Amargor										
Estructura										
Persistencia										
Calidad global en boca										

Calidad global del vino

Otras observaciones

Fecha:

Catador

Edad:

Sexo:

En todas las catas se utilizó una repetición aleatoria de uno de los vinos empleado como muestra control. Durante el análisis, los catadores evaluaron los diferentes vinos e indicaron si percibían los diferentes descriptores. La intensidad de cada descriptor se calificó en una escala desde el valor 0 (no presente) al 9 (más intenso). Los catadores tuvieron agua a disposición que usaron entre las muestras. Además, los catadores asignaron un orden de preferencia a los vinos catados cuyos datos fueron tratados con y sin ponderación. En los primeros se tuvieron en cuenta los vinos preferidos en primer lugar. En los datos de las catas de los vinos en que se aplicó la preferencia ponderada se tuvieron en cuenta, en cada sesión, los vinos preferidos en 1º, 2º y 3º lugar, asignándoles 3, 2 y 1 puntos respectivamente.

Por otro lado, se recogieron las observaciones de los catadores conforme a las particularidades percibidas en algunos de los vinos que se utilizaron para su correlación y comprobación con los datos sensoriales (y cromatográficos en el caso de los vinos elaborados con las cepas no-*Saccharomyces*). También se estudiaron los aspectos relevantes en los vinos preferidos por los catadores. Así mismo se establecieron referencias con los diferentes comentarios en torno a los descriptores.

*3.6.3. Análisis de las propiedades sensoriales de los vinos elaborados en EVEGA mediante inoculación secuencial de levaduras no-*Saccharomyces* y *Saccharomyces**

Se procedió como se indica en el capítulo 3.6.1 con las siguientes particularidades:

La evaluación sensorial de los vinos fue desarrollada por un panel de 11 catadores expertos con dilatada experiencia en la cata de vinos de la variedad Treixadura (miembros de la asociación de enólogos de Galicia, del consejo regulador de la DO Ribeiro y de la propia EVEGA). Los catadores indicaron también el orden de preferencia por los vinos.

Para interferir lo menos posible en los descriptores aromáticos no se realizaron procesos de clarificación o filtración de los vinos más allá de los naturales producidos en los trasiegos y estabilización tartárica por precipitación durante la conservación a 4 °C. Por ello, los descriptores de color fueron omitidos en la cata por considerarse no relevantes en la diferenciación entre cepas y haberse visto afectado más propiamente por el proceso de microvinificación.

3.7. Análisis estadístico.

3.7.1. Análisis de varianza (ANOVA de una vía).

Para detectar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre parámetros se realizó un análisis de varianza (ANOVA de una vía; $p < 0.05$) utilizando el software PASW Statistic SPSS 18.0 y 25.0. Este test se aplicó en los siguientes casos: en la población de levaduras a nivel cuantitativo, en el análisis químico de uvas, mostos y vinos procedentes de cultivo ecológico y convencional, en los componentes volátiles de los vinos elaborados utilizando las distintas cepas de levaduras no-*Saccharomyces* y en el análisis sensorial de los vinos.

3.7.2. Índices de biodiversidad (H' , 1-D, E)

La diversidad de especies/cepas de levaduras se estimó utilizando diferentes índices de ecología clásica. El **índice de Shannon-Wiener (H')** (Shannon, 2001) se calculó de la siguiente manera:

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \ln(p_i)$$

Donde S es la riqueza de especies/cepas (número de especies/cepas encontradas) y $p_i = n_i/N$ es la abundancia relativa de especies/cepas, calculada como la proporción de individuos de la especie/cepa i con respecto al total de individuos (N), en función del recuento de colonias y la frecuencia. De esta forma, el índice considera el número de especies/cepas presentes en las muestras (riqueza de especies/cepas de levadura) y el número relativo de individuos de cada especie (abundancia de cada levadura).

Además, el **índice de diversidad de Simpson (1-D)** se utilizó para evaluar la dominancia de las especies/cepas de levadura, considerando la probabilidad de que dos levaduras aisladas aleatoria e individualmente pertenezcan a diferentes especies/cepas. Se calculó mediante la aplicación de la siguiente ecuación (Simpson, 1949):

$$1 - D = 1 - \sum_{i=1}^S (p_i)^2 = 1 - \sum_{i=1}^S \left(\frac{n_i(n_i-1)}{N(N-1)} \right)$$

Donde $D = \sum (p_i)^2$ es el índice de Simpson o índice de dominancia.

Finalmente, para calcular la similitud o la uniformidad de la abundancia de las diferentes especies/cepas, se calculó una medida de equidad o equitabilidad (E) como se indica a continuación (Pielou, 1969):

$$E = H/\ln(S) = H/H_{m\acute{a}x}$$

La equitabilidad es 1 cuando hay proporciones similares de todas las especies/cepas de levaduras, pero el valor disminuye cuando la frecuencia difiere entre las distintas especies/cepas.

3.7.3. Análisis de similaridad (ANOSIM de una y dos vías)

Las diferencias en la población de levaduras entre muestras se analizaron mediante un ANOSIM (análisis no paramétrico de similitud de una vía), utilizando el software PAST 3.16 (2017). Esta prueba indica la probabilidad de observar diferencias significativas por casualidad en la población de levaduras entre dos grupos usando permutaciones basadas en cualquier medida de distancia (Clarke, 1993). El ANOSIM se realizó para los factores y grupos de factores más relevantes: año, variedad, sistema de cultivo, DO y bodega. Las distancias se convierten en una matriz de similitud de Bray-Curtis para crear distribuciones nulas. El análisis devuelve el valor del estadístico R y una significación asociada (p). Un valor de R cercano a 1 indica una alta separación entre los niveles de su factor (por ejemplo, DO frente a sistema de producción), mientras que el valor R cercano a 0 indica que no hay separación. Si el valor R es bajo (por ejemplo, 0.2) esto significa que su factor tiene un efecto pequeño en sus variables y no es realmente importante. R positivo grande (hasta 1) significa diferencia entre grupos. El cálculo se realizó mediante la permutación de la pertenencia al grupo, con 9999 repeticiones. Los ANOSIM entre todos los pares de grupos

o binomios se proporcionan como una prueba post-hoc. Se han considerado las comparaciones significativas cuando $p < 0.05$. Además, se aplicó la corrección de Bonferroni que multiplica los valores de p con el número de comparaciones. Esta corrección es muy conservadora (produce valores p grandes). Se ejecutó el ANOSIM de dos vías para determinar las diferencias significativas entre dos grupos de factores (DO, sistema de cultivo, año, variedad y bodega).

3.7.4. Análisis de porcentajes de similaridad (SIMPER)

Mediante el software PAST 3.16, (2017) también se calculó el procedimiento de descomposición por porcentajes de similaridad (SIMPER, similarity percentages analysis) (Clarke, 1993). El análisis SIMPER permitió evaluar la contribución porcentual promedio de las variables individuales a la disimilaridad entre los factores estudiados en la matriz de Bray-Curtis. Por tanto, identifica las principales variables que contribuyen a cualquier diferencia detectada por ANOSIM entre grupos.

3.7.5. Análisis no paramétrico PERMANOVA (NPMANOVA) de una y dos vías

Se utilizó el estadístico NPMANOVA (MANOVA no paramétrico, también conocido como PERMANOVA) para comparar la abundancia de los diferentes taxones (especies de los mostos y uvas y cepas de *S. cerevisiae* de las muestras en la bodega) así como la interacción entre ellos (disimilaridad). El PERMANOVA (Permutational Multivariate Analysis of Variance Using Distance Matrices) es una prueba no paramétrica de diferencia significativa entre dos o más grupos (binomios), basada en cualquier medida de distancia (Anderson, 2001). Este análisis multivariante tiene en cuenta la abundancia de cada taxón y no solo la abundancia total. Para este análisis se utilizó la función Euclidiana. Para todos los análisis se estableció $p < 0.05$ como límite para valores significativos. Se calcularon las comparaciones significativas NPMANOVA por parejas entre todos los grupos de pares como una prueba post-hoc. Al igual que ocurrió con el ANOSIM se hizo necesario aplicar la corrección de Bonferroni para el p -valor que se muestra en el triángulo inferior de la matriz en los casos que presentaban diferencias altamente significativas. De esta forma se apreciaron mejor las relaciones entre grupos. Con esta corrección se asegura que la probabilidad de obtener al menos un falso positivo entre todas las comparaciones (family-wise error rate) es $\leq \alpha = 0.05$. Permite por lo tanto contrastar una hipótesis nula general (la de que todas las hipótesis nulas testadas son verdaderas) de forma simultánea.

El PERMANOVA unidireccional calcula un valor F en analogía con ANOVA. De hecho, para los conjuntos de datos univariados y la medida de distancia euclidiana, NPMANOVA es equivalente a ANOVA y da el mismo valor de F . La significación se calculó mediante la permutación de la pertenencia al grupo, con 9.999 repeticiones. El valor F es la medida de precisión que tiene el test. Análogamente a R en ANOSIM, cuanto más alto sea F , más están relacionadas las variables, lo que significa que las medias de la variable dependiente difieren o varían mucho entre los grupos de la variable independiente. Se ejecutó el PERMANOVA de dos vías para determinar las diferencias significativas entre dos grupos de factores (DO, sistema de cultivo, año, variedad, bodega).

3.7.6. *Análisis de Componentes Principales (ACP) y Análisis de Correspondencias (AC)*

Se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP; calculado mediante software PAST 3.16, 2017) para estudiar la presencia de variables hipotéticas (componentes) que explican la mayor cantidad posible de la varianza en los datos (Davis, 1986). Estas nuevas variables son combinaciones lineales de las variables originales. El análisis ACP permitió reducir el conjunto de datos a solo dos variables o componentes principales, hipotetizando que los componentes más importantes estaban correlacionados con otras variables subyacentes (Cozzolino et al., 2009). Los valores dan una medida de la varianza explicada por los vectores correspondientes (componentes). Se comprobó que la mayor parte de la varianza estuviera explicada por los dos componentes principales para confirmar la validez o el éxito del ACP. Se ejecutó ACP a diferentes grupos de datos: especies/cepas de levaduras, DOs, bodegas, compuestos químicos y atributos sensoriales.

El análisis de correspondencias (AC; calculado mediante software PAST 3.16, 2017) es otro método de ordenación. Se utilizó para comparar asociaciones de recuentos de las cepas no-*Saccharomyces*, ya que el AC utiliza un algoritmo más apropiado que el ACP (Greenacre, 2010). Además, AC es más adecuado cuando se espera que las especies tengan respuestas unimodales a los parámetros subyacentes, es decir, que favorezcan un cierto rango del parámetro, haciéndose raro para valores cada vez más bajos (esto es en contraste con ACP, que asume una respuesta lineal).

3.7.7. *Análisis de Coordenadas Principales (ACoP)*

En algunos casos se realizó un Análisis de Coordenadas Principales (ACoP; calculado mediante software PAST 3.20, 2018) como otro método de ordenación (algoritmo de Davis, 1986). El ACoP encuentra los valores propios y vectores propios de una matriz que contiene las distancias o similitudes entre todos los puntos de datos. Se utilizó la medida de distancia Euclidiana ya que otras como la medida de Gower arrojan resultados similares a ACP. La varianza contabilizada por los vectores propios o coordenadas se dieron en los gráficos para las dos coordenadas más importantes (% de varianza). Se comprobó que la suma de dichos porcentajes tuviera un valor suficientemente elevado como para confirmar la validez o el éxito del ACoP. Los valores de distancia de similitud se elevaron al exponente de transformación estándar $c = 2$ antes del análisis propio. Se ejecutó ACoP a diferentes grupos de datos: especies/cepas de levaduras, DOs, bodegas y compuestos químicos aromáticos.

3.7.8. *Análisis de Correspondencia Canónica (ACC)*

Por otro lado, se realizó un Análisis de Correspondencia Canónica (Legendre y Legendre, 1998) (ACC; calculado mediante software PAST 3.16, 2017) para estudiar la correspondencia de los factores o variables y su influencia o correspondencia sobre el elemento evaluado. Los ejes de ordenación son combinaciones lineales de las variables.

Por lo tanto, el ACC es un ejemplo de análisis de gradiente directo, donde el gradiente en las variables (por ejemplo, variables climáticas) se conoce a priori y el elemento correspondiente o influenciado (abundancia de especies) se considera una respuesta a este gradiente. Se aplicaron ACC a dos bloques diferenciados. Por un lado, se estudió la correspondencia de las variables ambientales incluida la concentración de Cu en el mosto sobre la diversidad (riqueza y frecuencia de especies) de levaduras. Se consideró que cada DO presenta diferentes valores para una o más variables climáticas en cada año (Tabla 3.1 del estudio climático). Por otro lado, se evaluó la correspondencia entre la concentración de compuestos aromáticos de los vinos elaborados con distintas cepas de no-*Saccharomyces* y los descriptores sensoriales (apartados 3.7.11 y 3.7.12).

Se realizaron varios ACC utilizando las distintas combinaciones de los datos obtenidos en función de las diversas clasificaciones posibles agrupando los factores. Posteriormente se ha realizado una edición de los gráficos proporcionados por el software aunando las escalas tipo 1 y 2 de Legendre & Legendre (1998) donde la escala 2 enfatiza las relaciones entre especies. De esta forma un mismo gráfico representa las dos escalas.

3.7.9. Análisis de correlación (Pearson) y regresión lineal de mínimos cuadrados (PLS)

Se realizó un análisis de correlación según Pearson para establecer la correlación entre los distintas variables y elementos analizados. A continuación, se realizó un análisis de regresión lineal (PLS) para aproximar la relación de dependencia entre la variable dependiente Y y las variables independientes. Previamente los datos fueron transformados mediante la función (x-media) / desv estándar. Así se estandarizaron aproximadamente a la misma escala lo que garantiza una equidad de los datos en aquellas variables o factores con diferentes valores en distintas unidades.

3.7.10. Análisis de conglomerado jerárquico: dendrogramas y árboles filogenéticos

Se realizó un análisis de conglomerado jerárquico a las 66 cepas de *S. cerevisiae* encontradas en bodegas de producción ecológica aplicando el método de Ward y estandarización de los datos. Este método aglomerativo permite identificar valores del tamaño de banda cercanos y similares entre si y agruparlos en bloques por distancias de similitud. Además, se realizó un árbol filogenético de tipo dendrograma de distancias para observar la relación genética entre cepas y un segundo árbol filogenético en formación de constelación para estudiar la relación o distribución de las cepas con respecto a las bodegas en las que fueron identificadas.

3.7.11. Análisis estadístico de los compuestos volátiles

Los datos instrumentales fueron analizados utilizando el software XLstat-Pro (Addinsoft, 2018) y SPSS (PASW Statistics 25). Además de ANOVA, se aplicó un test de Duncan de comparaciones múltiples para determinar el efecto estadísticamente significativo de los parámetros con un valor de $p < 0.05$.

Para la interpretación de los resultados se aplicó un ACP sobre los compuestos volátiles (OAV > 1) de los vinos obtenidos con las distintas cepas.

El ACP fue utilizado como herramienta para agrupar los datos aromáticos y sensoriales posiblemente correlacionadas en un nuevo conjunto de variables no correlacionadas o componentes principales (Cozzolino et al., 2009).

Se comprobó que la mayor parte de la varianza estuviera explicada por los dos componentes principales para confirmar la validez o el éxito del ACP.

En el ACC realizado en los vinos elaborados con distintas cepas no-*Saccharomyces*, la valoración de los parámetros sensoriales se considera una respuesta a la concentración de los compuestos aromáticos. Los compuestos aromáticos se trazan como correlaciones con las puntuaciones de las distintas cepas. Esto permite obtener una relación de correspondencia aproximada entre los diferentes compuestos y los parámetros de la valoración sensorial producidos por las diferentes cepas de levadura.

Se aplicó un análisis de correlación (Pearson) entre todas las valoraciones sensoriales (MG > 30%) calculado como se indica en 3.7.12 y todos los compuestos volátiles analizados. Para mostrar la relación entre las variables sensoriales significativas del aroma con una valoración MG > 30% y los compuestos volátiles significativos con OAV > 1 se aplicó una regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS). Esto permite establecer correlaciones entre los atributos sensoriales de los vinos y las variables instrumentales (compuestos volátiles). PLS muestra la relación entre la variable independiente X (compuestos volátiles) y la variable dependiente Y (descriptores sensoriales). Los datos de los compuestos aromáticos se utilizan activamente para estimar las variables latentes a fin de garantizar que los primeros componentes sean los más relevantes para predecir la variable Y (compuestos sensoriales). Esta técnica reduce las variables X a un conjunto de factores no correlacionados que describen la variación en los datos. El ACC y el PLS son métodos muy utilizados para el análisis de datos multivariantes del vino aplicado al análisis de uva y vino (Vilanova et al., 2013).

3.7.12. Análisis estadístico de los datos obtenidos en el análisis sensorial

Para el tratamiento estadístico de los datos obtenidos en el análisis sensorial se utilizó el software Big Sensory Soft 1.02 (BSS; Centro Studi Assagiatori) (Odello et al., 2007). En el análisis estadístico de los vinos elaborados con cepas autóctonas se realizaron análisis ANOVA, Duncan, ACP, ACC, Pearson y PLS.

Los descriptores se clasificaron para cada vino elaborado con las distintas cepas de levaduras no-*Saccharomyces* mediante la comparación de las medias geométricas (MG). La frecuencia (F), intensidad (I) y media geométrica (MG) de los diferentes descriptores se calcularon para cada parámetro sensorial. El porcentaje de la media geométrica (%MG) se calculó como la raíz cuadrada del producto de los porcentajes de la intensidad relativa (%I) y la frecuencia relativa (%F). Los valores de MG se usaron para clasificar los descriptores permitiendo eliminar aquellos cuyas medias geométricas eran relativamente bajas (Vilanova et al., 2010a y 2010b). Este método permitió tener en cuenta los descriptores que rara vez se mencionaron (baja frecuencia), pero que son muy importantes en términos de intensidad percibida, y los descriptores con baja intensidad percibida, pero que se mencionan a menudo (Dravnieks y Bock, 1978).

Un ACP se usó para la reducción de muestras a un conjunto más pequeño. Se comprobó que el ACP sobre los descriptores de aroma (MG > 30%) tuviera un alto porcentaje para los dos componentes principales. En el análisis PLS los descriptores sensoriales que contribuyeron significativamente al aroma (MG > 30%) se eligieron como variables Y y compuestos volátiles con alta actividad de olor (OAV > 1) como variables X.

Por último, para estimar las sinergias de los compuestos aromáticos, se realizó una evaluación del aroma fermentativo global de los vinos elaborados con las distintas cepas de levaduras no-*Saccharomyces*, agrupando todos los compuestos volátiles en siete clases diferentes (series aromáticas), de acuerdo con sus descriptores de olor similares, como el enfoque aplicado por otros autores (Cortés-Diéguez et al., 2015; Gómez García-Carpintero et al., 2012). Un compuesto con varios descriptores puede pertenecer a diferentes series. El valor total en cada serie resulta de la suma de los OAV individuales de los compuestos volátiles que se incluyen en cada clase. En base a los efectos sinérgicos, los compuestos con OAV < 1 también se incluyeron en la suma.

4. Resultados y discusión

4. Resultados y discusión

4.1. Influencia del sistema de producción sobre las características de los mostos

4.1.1. D.O. Monterrei: variedades Treixadura y Mencía

Los resultados de las características de los mostos de Treixadura se muestran en la Tabla 4.1. Los parámetros glicerol y glucónico mostraron diferencias significativas entre sistemas de cultivo en 2013 y el cobre en 2015. Los mostos ecológicos alcanzaron un grado alcohólico probable más alto y tuvieron menor acidez total y pH más elevado que los convencionales en 2013 y 2015. Sin embargo, en 2014 ocurrió lo contrario; pero en ninguna campaña las diferencias encontradas fueron estadísticamente significativas.

Tabla 4.1. Características de los mostos procedentes de Treixadura (Trx) de cultivo ecológico (Eco) y convencional (Con) en la DO Monterrei en las campañas de 2013 a 2015 (Mo13, Mo14 y Mo15).

Parámetro*	Mo13-Trx		Mo14-Trx		Mo15-Trx	
	Eco	Con	Eco	Con	Eco	Con
Acidez Total (g tart./L)	5.6±0.4	5.7±0.06	4.8±0.6	4.6±0.4	5.7±0.6	5.9±0.2
Ácido L-málico (g/L)	2.1±0.4	2.3±0.1	2.3±0.4	2.4±0.2	2.6±0.3	2.4±0.2
Ácido Tartárico (g/L)	7.4±0.3	7.1±0.1	7.3±0.3	7.2±0.4	7.4±0.3	7.5±0.2
Azúcares (g/L)	261.9±14.3	245.2±3.8	223.0±15.3	235.8±10.7	254.6±14.1	240.2±9.0
Grado alcohólico (%vol.)	15.6±0.8	14.6±0.2	12.8±0.8	13.5±0.6	14.0±0.9	13.3±0.6
NFA (mg/L)	178±9	202±14	206±5	216±26	208±25	207±6
pH (-)	3.51±0.05	3.47±0.03	3.72±0.11	3.76±0.10	3.56±0.08	3.46±0.03
Acético (g/L)	0.01±0.01	0.00±0.00	0.05±0.00	0.05±0.00	-	-
Glicerol (g/L) ¹	0.18±0.05	0.05±0.02	0.43±0.30	0.17±0.06	-	-
Glucónico (g/L) ¹	0.07±0.01	0.02±0.01	0.30±0.20	0.10±0.00	-	-
Cu (mg/L) ³	1.13±0.42	1.73±0.50	0.10±0.00	0.10±0.00	0.10±0.00	0.54±0.05

Los datos son la media de tres repeticiones ± desviación estándar. NFA: nitrógeno fácilmente asimilable. * Los superíndices ¹ y ³ indican que existen diferencias significativas (p < 0.05) entre cultivo ecológico y convencional para ese parámetro en 2013 o 2015, respectivamente.

Tabla 4.2. Características de los mostos procedentes de Mencía (Me) de cultivo ecológico (Eco) y convencional (Con) en la DO Monterrei en las campañas de 2013 a 2015 (Mo13, Mo14 y Mo15).

Parámetro*	Mo13-Me		Mo14-Me	Mo15-Me	
	Eco	Con	Eco**	Eco	Con
Acidez Total (g tart./L) ^{1,3}	4.2±0.4	4.9±0.25	3.3±0.3	4.2±0.2	5.1±0.2
Ácido L-málico (g/L)	2.0±0.1	1.8±0.3	2.3±0.6	2.5±0.3	2.2±0.2
Ácido Tartárico (g/L) ³	6.2±0.2	6.5±0.3	6.7±0.1	6.4±0.2	7.1±0.1
Azúcares (g/L) ^{1,3}	240.8±6.6	194.7±24.2	212.2±5.5	249.8±0.0	226.0±3.0
Grado alcohólico (%vol.) ^{1,3}	14.3±0.4	11.6±1.4	12.1±0.3	13.8±0.0	12.5±0.2
NFA (mg/L)	117±30	144±13	156±45	130±23	152±24
pH (-) ^{1,3}	3.74±0.17	3.47±0.03	3.99±0.2	3.81±0.07	3.57±0.04
Acético (g/L)	0.02±0.01	0.00±0.00	0.05±0.00	-	-
Glicerol (g/L) ¹	0.32±0.07	0.090±0.05	0.40±0.02	-	-
Glucónico (g/L) ¹	0.18±0.04	0.04±0.02	0.23±0.06	-	-
Cu (mg/L) ³	1.53±0.23	1.67±0.23	0.10±0.00	0.12±0.01	0.54±0.19

Los datos son la media de tres repeticiones ± desviación estándar. NFA: nitrógeno fácilmente asimilable. * Los superíndices ¹ y ³ indican que existen diferencias significativas (p < 0.05) entre cultivo ecológico y convencional para ese parámetro en 2013 o 2015, respectivamente. ** En 2014 no se recogió muestra de uva de cultivo convencional.

Al contrario que en la variedad blanca Treixadura, los resultados de los mostos de la variedad tinta Mencía mostraron diferencias significativas tanto en la acidez como en el contenido en azúcar en las campañas estudiadas (Tabla 4.2). Los mostos ecológicos presentaron menor acidez total que los de uva convencional. Sin embargo, el pH, los azúcares residuales y, por consiguiente, el grado alcohólico probable fueron significativamente mayores en los mostos ecológicos de las dos campañas. Bagheri et al. (2015) también encontraron en un estudio similar en la variedad tinta Cabernet Sauvignon menor acidez y mayor pH y concentración de azúcar en mostos de producción biodinámica que en convencionales. Este hecho, sumado a que la disponibilidad de nitrógeno fue menor podría implicar riesgos de paradas fermentativas. No se encontraron diferencias significativas en el contenido de ácido L-málico, pero sí en el de ácido tartárico en 2015, que explicaría la mayor acidez en el mosto convencional. En 2013, en el mosto ecológico se observaron valores significativamente más altos de glicerol y glucónico, relacionados con un peor estado sanitario de la uva. En 2015 el contenido en cobre fue significativamente mayor en los mostos convencionales; sin embargo, las concentraciones encontradas en 2014 y 2015 fueron unas tres veces menores que las de 2013. En cuanto a la variedad, en general, los mostos blancos presentaron menor pH y mayor acidez, azúcares y NFA que los tintos.

4.1.2. D.O. Ribeiro: variedades Treixadura y Brancellao

Los resultados obtenidos con la variedad Treixadura cultivada en la DO Ribeiro se muestran en la Tabla 4.3. El contenido de azúcares y la acidez total del mosto fueron mayores en cultivo ecológico, aunque las diferencias fueron solo significativas en los azúcares en 2013. En cuanto a la disponibilidad de nitrógeno siempre fue significativamente mayor en los mostos de origen convencional. De nuevo, este hecho debe tenerse en cuenta a la hora de la fermentación para evitar posibles paradas fermentativas. Por otra parte, la presencia de cobre fue superior en mostos ecológicos en 2013 y 2014, pero no en 2015. En 2014 se observó un alto contenido de glicerol y glucónico, mayor en cultivo ecológico, acorde con los problemas sanitarios de la vendimia ese año.

Tabla 4.3. Características de los mostos procedentes de Treixadura (Trx) de cultivo ecológico (Eco) y convencional (Con) en la DO Ribeiro en las campañas de 2013 (Ri13), 2014 (Ri14) y 2015 (Ri15).

Parámetro*	Ri13-Trx		Ri14-Trx		Ri15-Trx	
	Eco	Con	Eco	Con	Eco	Con
Acidez Total (g tart./L)	5.7±1.0	4.8±0.4	7.1±1.3	5.5±0.2	6.4±0.6	5.8±0.4
Ácido L-málico (g/L) ^{2,3}	1.9±0.6	2.3±0.1	3.4±0.6	2.5±0.1	1.7±0.3	2.8±0.1
Ácido Tartárico (g/L)	7.4±1.1	6.3±0.2	8.1±1.2	7.8±0.3	7.6±0.3	7.1±0.2
Azúcares (g/L) ¹	259.6±1.3	225.2±16.6	201.1±11.3	187.8±3.5	261.8±9.0	249.8±5.0
Grado alcohólico (%vol.) ¹	15.4±0.1	13.4±0.9	11.5±0.6	10.7±0.2	14.4±0.6	13.7±0.3
NFA (mg/L) ^{1,3}	168±15	229±28	183±53	218±17	106±32	259±15
pH (-)	3.41±0.26	3.60±0.08	3.26±0.23	3.49±0.05	3.22±0.18	3.58±0.12
Acético (g/L)	0.00±0.00	0.00±0.00	0.01±0.00	0.01±0.01	-	-
Glicerol (g/L)	0.22±0.11	0.16±0.03	0.37±0.06	0.27±0.11	-	-
Glucónico (g/L)	0.08±0.03	0.09±0.01	0.17±0.06	0.10±0.00	-	-
Cu (mg/L) ^{1,2,3}	3.60±0.35	2.27±0.46	2.54±0.41	1.80±0.10	0.21±0.05	0.57±0.04

Los datos son la media de tres repeticiones ± desviación estándar. NFA: nitrógeno fácilmente asimilable. * Los superíndices ¹, ² y ³ indican que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre cultivo ecológico y convencional para ese parámetro en 2013, 2014 o 2015, respectivamente.

Tabla 4.4. Características de los mostos procedentes de Brancellao (Br) de cultivo ecológico (Eco) y convencional (Con) en la DO Ribeiro en las campañas de 2013 (Ri13), 2014 (Ri14) y 2015 (Ri15).

Parámetro*	Ri13-Br		Ri14-Br		Ri15-Br	
	Eco	Con	Eco	Con	Eco	Con
Acidez Total (g tart./L) ¹	6.2±0.3	5.3±0.3	6.0±0.1	6.0±0.6	6.7±0.5	6.1±0.4
Ácido L-málico (g/L) ^{1,3}	1.4±0.5	2.5±0.3	1.7±0.4	2.3±0.3	1.4±0.3	2.4±0.4
Ácido Tartárico (g/L) ^{1,3}	9.1±0.3	6.5±0.8	8.0±0.2	7.7±0.5	9.2±0.3	7.9±0.4
Azúcares (g/L)	211.5±2.8	210.5±33.9	204.9±9.2	190.1±17.3	199.7±3.1	201.6±3.5
Grado alcohólico (%vol.)	12.5±0.1	12.5±2.0	11.7±0.6	10.9±1.0	12.4±0.1	12.5±0.1
NFA (mg/L) ²	170±21	131±26	202±25	118±14	163±12	133±27
pH (-) ³	3.37±0.05	3.50±0.08	3.32±0.01	3.36±0.06	3.26±0.02	3.43±0.08
Acético (g/L)	0.00±0.00	0.00±0.00	< 0.05±0.00	< 0.05±0.00	-	-
Glicerol (g/L)	0.11±0.03	0.18±0.16	0.23±0.06	0.20±0.17	-	-
Glucónico (g/L)	0.05±0.01	0.06±0.03	0.10±0.00	0.13±0.06	-	-
Cu (mg/L) ¹	4.13±0.12	2.53±0.12	1.33±0.10	1.43±0.28	0.95±0.12	0.64±0.22

Los datos son la media de tres repeticiones ± desviación estándar. NFA: nitrógeno fácilmente asimilable. * Los superíndices ¹, ² y ³ indican que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre cultivo ecológico y convencional para ese parámetro en 2013, 2014 o 2015, respectivamente.

Las características de los mostos de la variedad tinta Brancellao de la DO Ribeiro se recogen en la Tabla 4.4. La acidez (total, ácido tartárico y ácido málico) y el Cu de los mostos ecológicos fueron mayores en 2013 y 2015 con diferencias significativas en 2013 y en 2015 en los ácidos tartárico y málico. Sin embargo, no presentaron diferencias significativas en el contenido de azúcar en ninguna de las campañas. En contraste con la variedad blanca Treixadura, el contenido de NFA fue mayor en cultivo ecológico en todas las campañas con diferencias significativas en 2014. Finalmente, las concentraciones de acético, glicerol y glucónico indicaron un estado sanitario de la uva adecuado para las dos modalidades de cultivo. En cuanto al tipo de variedad, en general, los mostos de la variedad blanca presentaron mayor concentración de azúcares, pH y NFA y menor acidez (total y ácido tartárico) que la tinta.

4.1.3. D.O. Ribeira Sacra: variedad Mencía

El análisis de los mostos Mencía de las tres campañas 2013-2015 de la DO Ribeira Sacra reveló una concentración de azúcares (y grado probable) mayor en las muestras de producción convencional con respecto a las ecológicas con diferencias significativas en 2014 (Tabla 4.5). El contenido de ácido L-málico fue significativamente más alto en el cultivo convencional en 2013 mientras que en 2014 y 2015 lo fue en el cultivo ecológico. Posiblemente estuvo relacionado con la mayor producción en ecológico de las cepas de esta parcela y el estado de maduración, especialmente en 2014 por la pronta cosecha (Blanco et al., 2014b; Jackson y Lombard, 1993). La concentración de ácido L-málico dentro de la baya se reduce durante y tras el envero por disminución de su biosíntesis junto con su degradación por respiración; se diluye debido a la afluencia de agua durante la expansión de las bayas en la segunda fase de crecimiento (Volschenk et al., 2006). Sin embargo, el ácido tartárico fue significativamente mayor en el mosto de uva ecológica en 2013. No hubo diferencias en la acidez total y pH, excepto en 2015, que la acidez fue menor y el pH mayor en cultivo convencional.

Tabla 4.5. Características de los mostos procedentes de Mencía (Me) de cultivo ecológico (Eco) y convencional (Con) en la DO Ribeira Sacra en las campañas de 2013 a 2015 (RS13, RS14 y RS15).

Parámetro*	RS13-Me		RS14-Me		RS15-Me	
	Eco	Con	Eco	Con	Eco	Con
Acidez Total (g tart./L) ³	4.1±0.3	4.1±0.6	4.1±0.3	3.6±0.3	4.6±0.1	3.9±0.1
Ácido L-málico (g/L) ^{1,2}	1.2±0.2	1.7±0.1	1.9±0.3	1.3±0.2	1.4±0.1	1.0±0.5
Ácido Tartárico (g/L) ¹	5.9±0.1	5.8±0.0	6.6±0.1	6.6±0.2	6.2±0.1	6.5±0.1
Azúcares (g/L) ²	216.7±8.7	225.5±18.1	209.5±2.9	219.5±3.4	231.9±6.0	251.0±8.0
Grado alcohólico (%vol.)	12.9±0.5	13.4±1.0	11.9±0.1	12.1±0.6	12.8±0.5	13.9±0.5
NFA (mg/L)	69±8	89±15	103±20	80±20	85±19	50±19
pH (-) ³	3.47±0.02	3.56±0.11	3.75±0.05	3.74±0.07	3.55±0.01	3.71±0.02
Acético (g/L)	0.02±0.01	0.05±0.02	0.05±0.01	0.05±0.00	-	-
Glicerol (g/L)	1.24±0.20	1.72±0.13	0.30±0.00	0.20±0.00	-	-
Glucónico (g/L)	0.10±0.06	0.17±0.06	0.47±0.15	0.30±0.10	-	-
Cu (mg/L) ^{2,3}	0.14±0.13	0.22±0.13	6.23±2.03	0.15±0.07	9.07±3.66	0.65±0.07

Los datos son la media de tres repeticiones \pm desviación estándar. NFA: nitrógeno fácilmente asimilable. * Los superíndices ¹, ² y ³ indican que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre cultivo ecológico y convencional para ese parámetro en 2013, 2014 o 2015, respectivamente.

La acidez total de los mostos Mencía de la DO Monterrei fue superior en la mayoría de los casos a los de la DO Ribeira Sacra. En la DO Ribeira Sacra se obtuvieron valores de Cu mayores en los mostos ecológicos en 2014 y 2015. Por otro lado, el bajo contenido en glucónico, acético y glicerol de la campaña de 2013 indicó una adecuada sanidad de la uva, a pesar de que en esta campaña se produjeron condiciones ambientales idóneas para la afectación de la uva por *Botrytis cinerea*. En cuanto a la disponibilidad de nitrógeno en 2013 fue mayor en las muestras de origen convencional, aunque en ambos tipos de producción estuvo por debajo del límite recomendado para los requerimientos nutricionales de las levaduras responsables de la fermentación (Hidalgo, 2003).

4.1.4. D.O. Rías Baixas: variedades Albariño y Treixadura

En la DO Rías Baixas se observaron pocas diferencias significativas para los parámetros determinados en los mostos de Albariño de cultivo ecológico y convencional (Tabla 4.6). Aun así, los mostos ecológicos tuvieron mayor acidez en las tres campañas y menor cantidad de azúcar en 2013 y 2014. Si bien en 2013 se obtuvieron valores comunes de acidez en esta variedad y para la zona de cultivo, en la campaña 2014 los bajos valores del contenido en azúcares fueron indicativos de falta de madurez de la uva, sobre todo en los mostos ecológicos. En 2014 se observaron diferencias significativas en el contenido de glucónico, parámetro relacionado con el estado sanitario de las uvas, que fue mayor en el mosto de origen ecológico y que puede ser explicado por el ataque de las enfermedades fúngicas sufrido en 2014 (Blanco et al., 2014c y 2016).

Al contrario que lo observado en Albariño, con la variedad Treixadura se obtuvieron diferencias significativas entre los mostos ecológicos y convencionales en las tres campañas (Tabla 4.7). Se mantiene la tendencia de mayor contenido en azúcares en el cultivo ecológico de Treixadura observada en las DOs Monterrei (2013 y 2015) y Ribeiro (2013) de manera significativa. Por tanto, el grado probable fue más alto. Acorde con esto, la acidez total fue menor en ecológico y el pH mayor.

Tabla 4.6. Características de los mostos procedentes de Albariño (Alb) de cultivo ecológico (Eco) y convencional (Con) en la DO Rías Baixas en las campañas de 2013 (RB13), 2014 (RB14) y 2015 (RB15).

Parámetro*	RB13-Alb		RB14-Alb		RB15-Alb	
	Eco	Con	Eco	Con	Eco	Con
Acidez Total (g tart./L)	8.3±0.7	7.1±0.5	10.2±0.9	8.8±0.3	9.1±1.0	7.9±0.3
Ácido L-málico (g/L)	3.5±0.9	2.6±0.2	5.8±1.0	5.3±0.3	4.0±1.0	3.1±0.3
Ácido Tartárico (g/L)	8.3±0.2	8.2±0.4	8.4±0.3	8.4±0.2	9.2±0.3	9.1±0.3
Azúcares (g/L)	203.2±7.8	216.3±14.7	180.7±20.7	188.9±6.3	242.6±7.0	237.8±7.0
Grado alcohólico (%vol.)	12.1±0.5	12.9±0.81	10.3±1.2	10.8±0.3	13.4±0.4	13.2±0.4
NFA (mg/L)	180±12	178±9	181±18	187±14	179±4	163±17
pH (-) ¹	3.21±0.05	3.35±0.08	3.15±0.07	3.22±0.02	3.15±0.08	3.22±0.02
Acético (g/L)	0.00±0.00	0.00±0.00	0.05±0.00	0.05±0.00	-	-
Glicerol (g/L) ²	0.04±0.04	0.02±0.02	1.13±0.11	0.17±0.06	-	-
Glucónico (g/L) ²	0.04±0.02	0.02±0.01	0.60±0.26	0.20±0.00	-	-
Cu (mg/L)	21.6±4.14	21.2±6.12	20.3±8.54	35.8±7.21	3.79±0.33	12.1±5.0

Los datos son la media de tres repeticiones ± desviación estándar. NFA: nitrógeno fácilmente asimilable. * Los superíndices ¹ y ² indican que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre cultivo ecológico y convencional para ese parámetro en 2013 o 2014, respectivamente.

En cuanto al contenido en NFA fue superior en cultivo convencional. En 2013 y 2014 la concentración de Cu fue muy elevada, aunque siempre inferior al límite máximo permitido por el vigente Reglamento 396/2005 (50 mg/kg de uva). En 2014 el mosto ecológico presentó mayor concentración de glucónico, como se indicó en el apartado anterior para la variedad Albariño. El contenido de cobre fue muy superior en los mostos ecológicos, excepto en 2015. Respecto a la variedad, en general en la DO Rías Baixas, los mostos de la variedad Albariño presentaron mayor acidez (total y ácido tartárico), azúcares y menor pH y NFA que la variedad Treixadura.

Tabla 4.7. Características de los mostos procedentes de Treixadura (Trx) de cultivo ecológico (Eco) y convencional (Con) en la DO Rías Baixas en las campañas de 2013 (RB13), 2014 (RB14) y 2015 (RB15).

Parámetro*	RB13-Trx		RB14-Trx		RB15-Trx	
	Eco	Con	Eco	Con	Eco	Con
Acidez Total (g tart./L) ^{1,2}	5.3±0.4	6.9±0.6	8.1±0.1	9.7±0.2	6.6±0.8	7.1±0.1
Ácido L-málico (g/L) ²	3.5±0.6	3.5±0.9	5.2±0.2	6.2±0.3	3.8±0.8	4.2±0.7
Ácido Tartárico (g/L)	5.9±1.1	6.3±0.8	6.8±0.1	6.9±0.5	6.7±0.3	6.9±0.2
Azúcares (g/L) ^{1,2,3}	257.6±10.2	207.5±14.9	174.5±5.8	141.1±4.6	236.6±16.1	193.3±9.0
Grado alcohólico (%vol.) ^{1,2,3}	15.3±0.6	12.3±0.9	9.9±0.3	8.1±0.3	13.1±1.1	10.7±0.6
NFA (mg/L) ^{1,2,3}	189±30	218±8	196±19	236±15	158±27	229±12
pH (-) ^{1,2}	3.69±0.05	3.33±0.11	3.39±0.02	3.28±0.04	3.56±0.07	3.49±0.02
Acético (g/L)	0.01±0.01	0.03±0.02	0.11±0.03	0.20±0.16	-	-
Glicerol (g/L)	0.27±0.16	0.57±0.19	0.73±0.11	0.60±0.30	-	-
Glucónico (g/L) ²	0.15±0.11	0.44±0.22	1.06±0.23	0.77±0.47	-	-
Cu (mg/L) ^{2,3}	9.6±2.11	5.26±2.31	9.56±1.61	3.30±0.98	1.62±0.07	3.47±0.66

Los datos son la media de tres repeticiones ± desviación estándar. NFA: nitrógeno fácilmente asimilable. * Los superíndices ¹, ² y ³ indican que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre cultivo ecológico y convencional para ese parámetro en 2013, 2014 o 2015, respectivamente.

Por otra parte, cabe destacar que en campañas climatológicamente desfavorables las diferencias entre sistemas de cultivo se hicieron más acusadas. Se debe mencionar que en la campaña de 2014 los mostos de cultivo convencional presentaron el menor valor de contenido en azúcares. Esto se produjo, muy posiblemente, como consecuencia de la vendimia temprana antes de que la uva se dañara excesivamente; especialmente en la DO Rías Baixas determinó que a fecha de vendimia no se alcanzara la madurez adecuada.

Además, en 2014 se observaron diferencias significativas en el contenido de glucónico, parámetro indicativo del estado sanitario de las uvas, que fue mayor en el mosto de origen ecológico. Este resultado puede ser explicado por el ataque de enfermedades fúngicas en esa campaña (Blanco et al., 2016). Por otro lado, teniendo en cuenta todas las DOs, en algunos mostos procedentes de cultivo ecológico se encontró una menor concentración de ácido málico que en los convencionales. Además de la producción y el estado de madurez, se puede relacionar la menor concentración de ácido málico de los mostos ecológicos, especialmente en 2013, debido a que las condiciones ambientales más cálidas de este año con respecto a los otros dos años sucesivos afectaron a este sistema de producción. La disminución de la concentración de ácido L-málico es mayor en ambientes cálidos resultando en uvas en la cosecha que contienen un bajo contenido de acidez titulable y alto pH. Los mostos Albariño suelen presentar acidez elevada (Blanco et al., 2013; Vilanova et al., 2005b). La alta acidez en las uvas también puede ser explicada por temporadas inusualmente frías, suelos pobres, selección de cultivares no óptimos o prácticas vitícolas deficientes para la zona concreta de implantación del viñedo (Volschenk et al., 2006).

Conforme al conjunto de resultados, podemos concluir que la composición química de los mostos en cultivo ecológico y convencional dependió de la variedad de uva, de la zona de cultivo y también de la campaña. Sin embargo, estas diferencias no se produjeron en todos los casos. En general, se obtuvieron mayores valores para el contenido en azúcares y en algunos casos también mayor acidez en los mostos de cultivo ecológico, pero mantuvieron una relación azúcar/acidez equilibrada, debido probablemente a una menor producción (datos no mostrados; Blanco et al., 2014a, 2014b, 2014c y 2016).

4.1.5. Caracterización fenólica de uvas tintas de cultivo ecológico y convencional

Brancellao (DO Ribeiro)

Las uvas de la variedad Brancellao en la DO Ribeiro presentaron mayor IPT probable en cultivo ecológico que en convencional en las campañas de 2013 y 2014, siendo estas diferencias significativas el primer año (Tabla 4.8). De igual forma, la concentración de antocianos (tanto totales como extraíbles) fue superior en las uvas de producción ecológica, aunque en ninguna de las campañas esas diferencias fueron significativas. También el contenido de taninos fue más alto en uvas de cultivo ecológico en 2013, pero no en las otras dos campañas.

El índice de madurez fenólica (IMF) fue ligeramente superior en cultivo convencional los tres años. Este índice está relacionado con la facilidad de extracción de los antocianos y con la madurez de los taninos. Por último, el color probable estable (CPE) fue mayor en las uvas de procedencia ecológicas en todos los casos. El rango de valores de IPT obtenidos en este estudio (37.2-48.5) se mantuvo en los valores descritos para Brancellao en estudios previos en la DO Ribeiro (Río Segade et al., 2008; Soto et al., 2012) incluso cuando se tuvieron en cuenta uvas de distintas zonas, si bien el intervalo de valores en este último caso fue más alto (44.3-62.3). Por lo tanto, se confirma la influencia de la variedad en el IPT por encima de la zona y/o la campaña. En cuanto al contenido de antocianos en uva (entre

1079-1466 mg/L) fue más alto que el descrito en otros estudios (< 620 mg/kg uva en la DO Ribeiro; 729 mg/kg uva en otras zonas) (Río Segade et al., 2008; Soto et al., 2012).

Tabla 4.8. Parámetros de color en uva de la variedad Brancellao procedente de cultivo ecológico y convencional en la DO Ribeiro durante las campañas 2013, 2014 y 2015.

Parámetro	Ecológico	Convencional	Sig.*
	2013		
IPT probables	48.5±2.2	38.4±3.7	*
Antocianos en uva (mg/L)	1466.40±291.41	1078.80±256.06	n. s.
Antocianos extraíbles (mg/L)	554.85±97.49	475.24±78.26	n. s.
Taninos (g/L)	1.29±0.05	1.05±0.08	*
Índice de madurez (IMF)	2.3±0.4	2.5±0.7	n. s.
CPE	13.68±0.61	9.73±1.12	*
2014			
IPT probables	39.5±3.9	37.2±4.42	n. s.
Antocianos en uva (mg/L)	1250.17±342.86	1140.40±347.19	n. s.
Antocianos extraíbles (mg/L)	526.11±105.97	500.18±97.38	n. s.
Taninos (g/L)	1.07±0.09	1.02±0.11	n. s.
Índice de madurez (IMF)	2.2±0.3	2.4±0.5	n. s.
CPE	12.19±1.52	10.47±2.07	n. s.
2015			
IPT probables	41.7±8.0	46.8±5.2	n. s.
Antocianos en uva (mg/L)	1431.60±521.33	1462.50±185.92	n. s.
Antocianos extraíbles (mg/L)	582.76±157.78	561.72±54.12	n. s.
Taninos (g/L)	1.10±0.20	1.23±0.11	n. s.
Índice de madurez (IMF)	2.1±0.4	2.2±0.2	n. s.
CPE	12.20±2.82	10.46±0.53	n. s.

Los datos son la media de tres repeticiones ± desviación estándar. * Indica diferencias significativas a $p < 0.05$; n. s. indica que no hay diferencias significativas.

Mencía (DO Ribeira Sacra)

En la DO Ribeira Sacra la uva Mencía de cultivo convencional presentó valores más altos en los parámetros de color que la ecológica, aunque las diferencias entre ambas modalidades de cultivo no fueron significativas (Tabla 4.9). El contenido de antocianos, así como el IPT fueron superiores a los descritos para uva Mencía en la DO Ribeiro; sin embargo, los valores de antocianos extraíbles fueron similares y también los de IPT coincidían con los encontrados en vino (Río Segade et al., 2008; Soto et al., 2012). La predicción del color (CPE) de los vinos es superior a la intensidad encontrada para esta variedad bajo distintas técnicas de vinificación (Soto et al., 2012).

Mencía (DO Monterrei)

A diferencia de lo ocurrido en la DO Ribeira Sacra, la uva Mencía de cultivo ecológico en la DO Monterrei presentó mayor contenido de compuestos fenólicos y CPE que la de cultivo convencional (Tabla 4.10). Estas diferencias fueron significativas en las dos campañas (excepto el CPE de 2013). El CPE también fue más alto en la Mencía de la DO Monterrei que en la DO Ribeira Sacra en el cultivo ecológico. Los datos obtenidos para la uva ecológica se aproximaron a los encontrados en la Mencía de la DO Ribeira Sacra.

Tabla 4.9. Parámetros de color en uva de la variedad Mencía procedente de cultivo ecológico y convencional en la DO Ribeira Sacra durante las campañas 2013, 2014 y 2015.

Parámetro	Ecológico	Convencional	Sig.*
	2013		
IPT probables	42.34±6.70	48.76±6.07	n. s.
Antocianos en uva (mg/L)	1766.80±391.17	1888.40±253.96	n. s.
Antocianos extraíbles (mg/L)	722.88±115.56	714.59±64.94	n. s.
Taninos (g/L)	1.14±0.16	1.29±0.15	n. s.
Índice de madurez (IMF)	1.63±0.12	1.73±0.07	n. s.
CPE	13.88±2.75	15.79±2.06	n. s.
2014			
IPT probables	42.52±2.30	43.51±0.84	n. s.
Antocianos en uva (mg/L)	1747.60±131.84	1902.00±43.80	n. s.
Antocianos extraíbles (mg/L)	706.34±48.77	770.38±17.15	n. s.
Taninos (g/L)	1.15± 0.06	1.17±0.02	n. s.
Índice de madurez (IMF)	1.63±0.07	1.54±0.03	n. s.
CPE	13.30±1.35	14.15±0.52	n. s.
2015			
IPT probables	43.29±6.81	47.61±2.89	n. s.
Antocianos en uva (mg/L)	1799.15±309.78	2009.95±17.36	n. s.
Antocianos extraíbles (mg/L)	724.14±85.25	780.95±32.59	n. s.
Taninos (g/L)	1.16±0.15	1.23±0.06	n. s.
Índice de madurez (IMF)	1.62±0.06	1.59±0.10	n. s.
CPE	11.65±1.10	12.52±0.14	n. s.

Los datos son la media de tres repeticiones ± desviación estándar. * Indica diferencias significativas a $p < 0.05$; n. s. indica que no hay diferencias significativas.

Tabla 4.10. Parámetros de color en uva de la variedad Mencía procedente de cultivo ecológico y convencional en la DO Monterrei durante las campañas 2013 y 2015.

Parámetro	Ecológico	Convencional	Sig.*
	2013		
IPT probables	55.59±4.37	40.99±4.02	*
Antocianos en uva (mg/L)	2197.20±172.00	1316.40±276.00	*
Antocianos extraíbles (mg/L)	794.24±42.73	539.04±80.23	*
Taninos (g/L)	1.47±0.11	1.11±0.09	*
Índice de madurez (IMF)	1.69±0.04	2.15±0.25	*
CPE	16.62±1.62	12.72±2.46	n. s.
2015			
IPT probables	45.21±4.16	36.65±1.53	*
Antocianos en uva (mg/L)	1753.53±211.22	1334.35±14.32	*
Antocianos extraíbles (mg/L)	684.42±60.82	572.54±6.78	*
Taninos (g/L)	1.20±0.10	1.00±0.00	*
Índice de madurez (IMF)	1.74±0.08	1.86±0.06	n. s.
CPE	12.12±1.13	9.38±0.28	*

Los datos son la media de tres repeticiones ± desviación estándar. * Indica diferencias significativas a $p < 0.05$; n. s. indica que no hay diferencias significativas.

La uva de origen convencional presentó una riqueza fenólica más próxima a la presentada por esta variedad en la DO Ribeiro (Soto et al., 2012). Otros autores también encontraron más polifenoles totales en vino ecológico que en convencional (Martin y Rasmussen, 2011; Tassoni et al., 2014).

El IMF fue menor en ecológico, aunque en ambos casos ($IMF < 2.0$) indicó una buena extractabilidad de los antocianos y la presencia de taninos maduros en la uva.

Tabla 4.11. Parámetros de color en uva de las variedades Brancellao y Mencía procedente de distintas Denominaciones de Origen en las campañas 2013 a 2015.

Parámetro	Brancellao	Mencía	Mencía
	DO Ribeiro	DO Ribeira Sacra	DO Monterrei
IPT probables	42.05	44.67	44.61
Antocianos en uva (mg/L)	1306.21* a/a/ac	1852.32* b/ac/b	1650.37* ab/bc/bc
Antocianos extraíbles (mg/L)	533.49	736.55	647.56
Taninos (g/L)	1.13	1.19	1.19
Índice de madurez (IMF)	2.27	1.62	1.86
CPE	11.46	13.55	12.71

Los datos son la media de los tres años de muestreo para cada variedad y DO. * Indica diferencias significativas entre muestras ecológicas y convencionales separadamente y entre todos los datos de ambos sistemas de cultivo conjuntamente (ANOVA; $p < 0.05$). Diferentes letras indican diferencias significativas entre grupos en el sistema de cultivo (convencional / ecológico / ambos sistemas).

Considerando los tres años de muestreo para cada una de las variedades y zonas los resultados obtenidos en este estudio confirman que la riqueza fenólica está ligada a la variedad (Tabla 4.11). Así, Brancellao presentó un IPT y CPE más bajos y menor contenido de antocianos y taninos que Mencía. A su vez, dentro de la variedad Mencía se comprobó que la concentración de antocianos y CPE fue más elevada en las uvas de la DO Ribeira Sacra que en las de la DO Monterrei, indicando un efecto de la zona. También se observó que hubo diferencias significativas entre antocianos de las muestras ecológicas y convencionales separadamente y entre todos los datos de ambos sistemas de cultivo conjuntamente para los tres años (ANOVA; $p < 0.05$). Diversos estudios apoyan nuestros resultados demostrando que las variaciones debidas a estos factores son menos importantes que las existentes entre las distintas variedades de uva (Romero-Cascales et al., 2005). Otros estudios realizados con distintas variedades tintas gallegas confirman la influencia de los distintos factores, incluida la propia variedad, en su madurez tecnológica y fenólica (Letaief et al., 2007; Río Segade et al., 2008 y 2009; Soto et al., 2012).

Además de a las cualidades saludables (cardiovasculares y anticancerígenas) y sensoriales (amargura y astringencia) de los vinos, los polifenoles contribuyen a la resistencia a los patógenos debido a esta potente astringencia y su función como fitoalexina (Martín y Rasmussen, 2011). Algunos autores mostraron una mayor concentración de polifenoles totales, particularmente la concentración de resveratrol, para los mostos ecológicos en comparación con los de la convencional (Vinković Vrček et al., 2011; Martín y Rasmussen, 2011). La mayor formación de compuestos fenólicos durante la maduración en las cepas de producción ecológica puede ser explicada porque suelen tener un período de maduración más largo en comparación con las de cultivo convencional, debido a la liberación más lenta de los nutrientes suministrados en su producción (Brandt y Mølgaard, 2001; Laureati et al., 2014). Sin embargo, además de las prácticas culturales y la variedad, la riqueza fenólica de las uvas depende de muchos factores como las condiciones climáticas e hídricas de la planta y las características del suelo (Cacho et al., 1992; Gil y Yuste, 2004). La riqueza fenólica de la uva condiciona la composición del vino y la evolución del color durante el proceso de crianza y envejecimiento.

Para que un vino tinto pueda someterse a crianza debe tener un IPT y unas concentraciones mínimas de antocianos y taninos. Los valores medios obtenidos para Brancellao y Mencía en los tres años indican que el IPT superó el mínimo aconsejable (40), aunque en ambos casos está muy por debajo del valor óptimo (> 60). El contenido de taninos está por debajo de los valores aconsejables (2), mientras que el de antocianos extraíbles supera el mínimo (400) pero tampoco alcanza el valor óptimo (> 800) para someter vinos derivados de estas variedades a envejecimiento (González-Neves et al., 2010). Sin embargo, estudios previos realizados en EVEGA han puesto de manifiesto que otras variedades tintas gallegas como Sousón o Ferrón sí reúnen los requisitos exigidos para crianza (Río Segade et al., 2008 y 2009; Soto et al., 2012) por tanto, Mencía y Brancellao podrían utilizarse en mezclas con otras variedades más adecuadas aportando complejidad al vino envejecido.

Teniendo en cuenta todos los resultados en conjunto se puede afirmar que el sistema de cultivo y la variedad influyeron en la concentración de compuestos fenólicos, aunque tuvo una mayor influencia la región o DO, mientras que el año no tuvo una influencia significativa.

4.2. Diversidad de levaduras en uva, mosto y fermentación: influencia del sistema de producción

La influencia del sistema de cultivo (ecológico y convencional) sobre la población de levaduras se evaluó a nivel cuantitativo y cualitativo en mostos y bayas de uva.

4.2.1. Influencia del sistema de cultivo en la población de levaduras en mostos: evaluación cuantitativa

Los resultados del efecto del sistema de producción aplicado en el cultivo del viñedo sobre la población de levaduras viables en mosto obtenidos para cada DO y variedad a nivel cuantitativo se presentan en la Figura 4.1 hasta la Figura 4.7. Los datos mostrados son la media de tres repeticiones \pm desviación estándar. En general, los mostos procedentes de cultivo ecológico presentaron mayor cantidad de levaduras viables que los de origen convencional, con algunas excepciones como en el año 2013 en la DO Ribeiro, aunque no siempre esas diferencias fueron estadísticamente significativas. Los valores observados variaron entre 10^3 y 10^7 , similares a los recuentos típicos para el mosto de uva fresca (10^4 - 10^6) (Bagheri et al., 2015; Combina et al., 2005; Zott et al., 2008).

En la DO Rías Baixas, se encontraron diferencias significativas en la cantidad de levaduras del mosto de la variedad Albariño en las campañas 2014 y 2015 (Figura 4.1), que fue mayor en las muestras ecológicas; sin embargo, en 2013 la población fue similar en los mostos de ambos sistemas de producción. Los mostos de la variedad Treixadura de esta DO siguieron la misma tendencia, aunque en este caso las diferencias no fueron significativas (Figura 4.2). Incluso, en 2013, en el mosto convencional de Treixadura se obtuvo un número más alto de levaduras que en el ecológico.

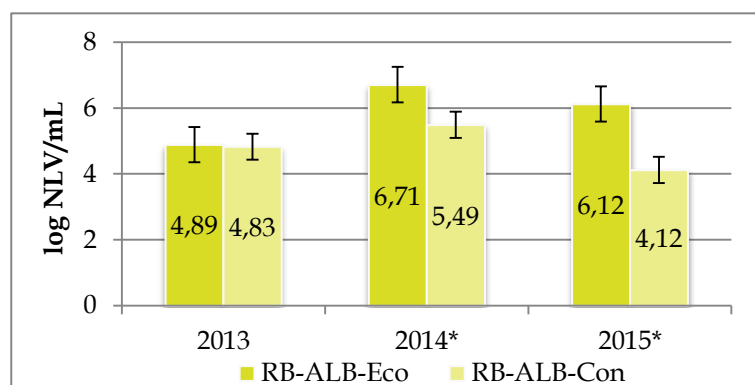


Figura 4.1. Cuantificación de la población de levaduras en mostos de Albariño de cultivo ecológico (Eco) y convencional (Con) en la DO Rías Baixas en las campañas 2013, 2014 y 2015. * Indica diferencias significativas ($p < 0.05$) entre sistemas de producción para esa vendimia.

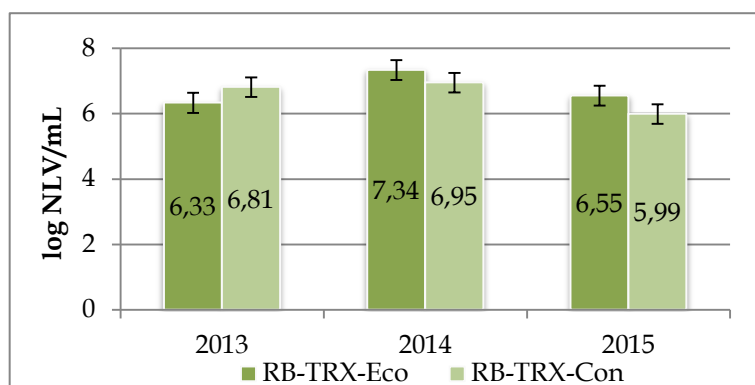


Figura 4.2. Cuantificación de la población de levaduras en mostos de Treixadura de cultivo ecológico (Eco) y convencional (Con) en la DO Rías Baixas en las campañas 2013, 2014 y 2015.

En la DO Ribeiro los datos mostraron lo contrario: la población de levaduras fue más alta en los mostos convencionales en 2014 y 2015, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas para ninguna de las variedades ni campañas muestreadas (Figura 4.3 y Figura 4.4).

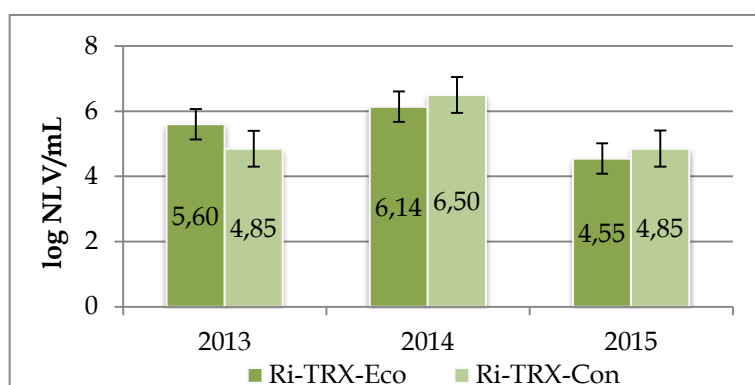


Figura 4.3. Cuantificación de la población de levaduras en mostos de Treixadura de cultivo ecológico (Eco) y convencional (Con) en la DO Ribeiro en las campañas 2013, 2014 y 2015.

El número de levaduras en la DO Ribeiro fue más bajo que en la DO Rías Baixas en las tres campañas. Por vendimias, en ambos casos la población de levaduras fue mayor en 2014, cuando las condiciones climatológicas fueron adversas y, en consecuencia, el estado sanitario de las uvas fue peor. En 2013 la población fue mayor en mosto ecológico.

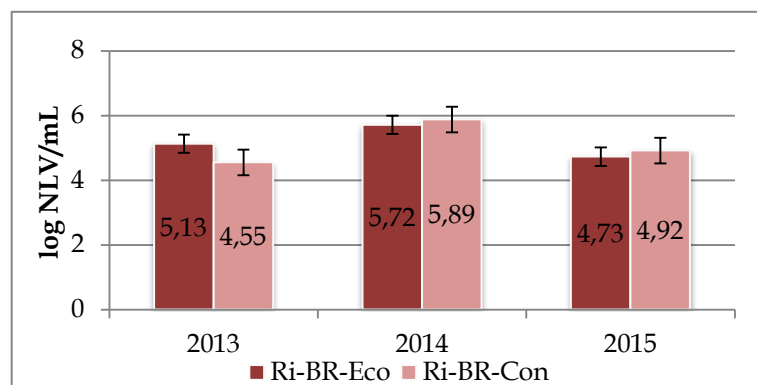


Figura 4.4. Cuantificación de la población de levaduras en mostos de Brancellao de cultivo ecológico (Eco) y convencional (Con) en la DO Ribeiro en las campañas 2013, 2014 y 2015.

En la DO Monterrei los mostos ecológicos de la variedad Treixadura presentaron mayor número de levaduras que los convencionales en las tres vendimias, siendo las diferencias significativas en 2014 (Figura 4.5). Se observó un comportamiento similar en los mostos de Treixadura de la DO Ribeiro en 2013 (Figura 4.3) y de la DO Rías Baixas en 2014 y 2015 (Figura 4.2). Además, se obtuvieron niveles más altos de la población de levaduras también en la campaña de 2014, probablemente debido a las condiciones climáticas adversas durante la cosecha que afectaron al estado sanitario de las uvas.

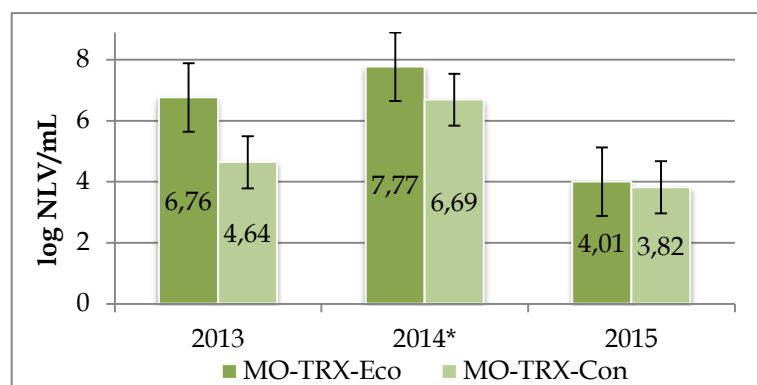


Figura 4.5. Cuantificación de la población de levaduras en mostos de Treixadura de cultivo ecológico (Eco) y convencional (Con) en la DO Monterrei en las campañas 2013, 2014 y 2015. * Indica diferencias significativas ($p < 0.05$) entre sistemas de producción para esa vendimia.

La variedad tinta Mencía mostró mayor población de levaduras en el mosto ecológico que en el convencional en 2015, pero no en 2013, en ambos casos de forma significativa (Figura 4.6). Los valores obtenidos para los dos años fueron similares a los encontrados para la misma variedad en la DO Ribeira Sacra (Figura 4.7). Sin embargo, comparada con la variedad Treixadura de esta DO Monterrei, la población de levaduras de los mostos de Mencía fue superior en 2015 y en los mostos convencionales de 2013, pero similar en los ecológicos de este último año (Figura 4.5).

Finalmente, en los mostos ecológicos de Mencía de la DO Ribeira Sacra también se observó un mayor número de levaduras viables con respecto a los convencionales en 2014 y 2015, éste último de forma significativa. En 2013 la población de levaduras fue mayor en los mostos de Mencía convencional (Figura 4.7).

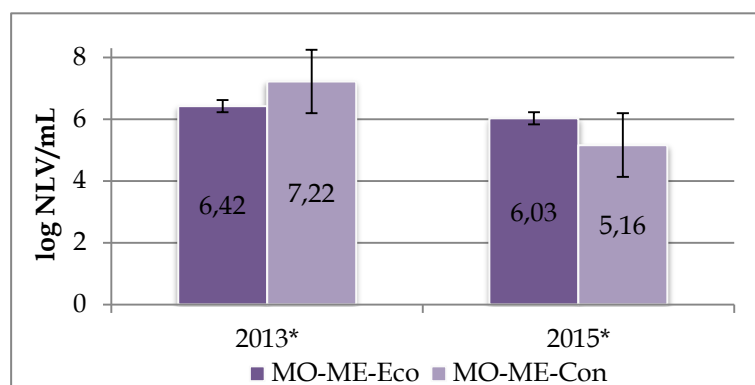


Figura 4.6. Cuantificación de la población de levaduras en mostos de Mencía de cultivo ecológico (Eco) y convencional (Con) en la DO Monterrei en las campañas 2013 y 2015. * Indica diferencias significativas para esa vendimia.

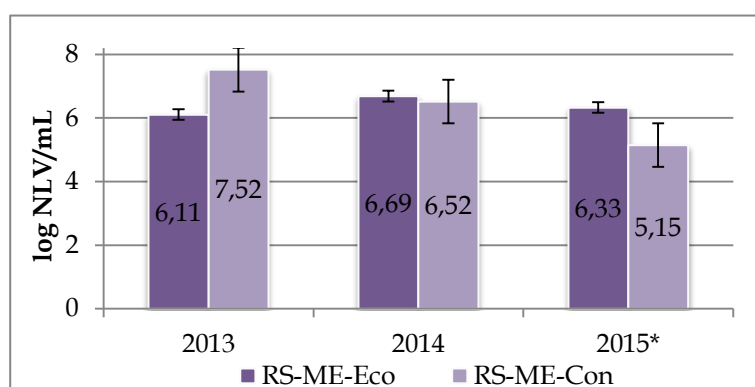


Figura 4.7. Cuantificación de la población de levaduras en mostos de Mencía de cultivo ecológico (Eco) y convencional (Con) en la DO Ribeira Sacra en las campañas 2013, 2014, y 2015. * Indica diferencias significativas ($p < 0.05$) entre sistemas de producción para esa vendimia.

Estos resultados confirman que la mayoría de las muestras de cultivo ecológico presentaron una mayor cantidad de levaduras viables que las convencionales, en concordancia con los datos publicados previamente por otros autores (Comitini y Ciani, 2008; Martins et al., 2014). En contraste, otros estudios encontraron valores más bajos para la población de levadura en producción biodinámica y en viñedos ecológicos en comparación con los tradicionales (Guzzon et al., 2015; Milanović et al., 2013). La producción biodinámica puede ser englobada en el conjunto de la producción ecológica ya que, a pesar de las condiciones más restrictivas impuestas por la certificadora privada Demeter, sus prácticas están permitidas y son compatibles con la legislación europea en materia de producción ecológica (Reglamentos CE 2007 y 2008 y UE 2018). En un estudio comparativo entre mosto ecológico y biodinámico, Patrignani et al. (2017) encontraron valores de no-*Saccharomyces* inferiores a los nuestros en mostos ecológicos (3-4 log UFC/mL) a los 3 días de fermentación espontánea.

La población de levaduras oscila a lo largo de las etapas de maduración de la uva y también depende de su estado sanitario (Martins et al., 2014; Renouf et al., 2005). De hecho, la presencia de mayor cantidad de levaduras en las muestras de 2014 estuvo relacionada con una climatología desfavorable en épocas próximas a vendimia que ocasionó problemas sanitarios en las uvas. En esas condiciones, aun cuando las uvas no estén visiblemente dañadas, hay un aumento en la disponibilidad de nutrientes en la superficie de la uva; por lo tanto, se favorece la proliferación de microorganismos (Combina et al., 2005).

4.2.2. Influencia del sistema de cultivo en la riqueza de especies de levadura

A nivel cualitativo, se identificaron las diferentes especies de levadura presentes en cada muestra. En total se identificaron 46 especies distintas (pertenecientes a 22 géneros): 40 en mosto y uvas conjuntamente (m+u), 38 en mosto (m), 24 en uvas (u), 4 diferentes exclusivamente en la Fi y 2 más solo en la Ff de la fermentación.

Los resultados mostraron que la diversidad de levaduras o riqueza total de especies (S) fue mayor en las muestras de origen ecológico que en las convencionales, tanto de uvas como de mostos (Figura 4.8). Así pues, se encontraron 38 especies (95.0% con respecto al número total de especies: 40) en muestras ecológicas en comparación con 29 especies (72.5%) identificadas en las convencionales. Es decir, la diversidad de levadura fue, en términos generales, un 22.5% más alta en cultivo ecológico. Además, el número de especies identificadas fue mayor en mosto que en uva, como también hallaron Jolly et al. (2003b). Las especies de levadura presentes en cada muestra (especificando variedad de uva, DO, sistema de producción, año y momento de la fermentación) se indican en la Tabla 4.12.

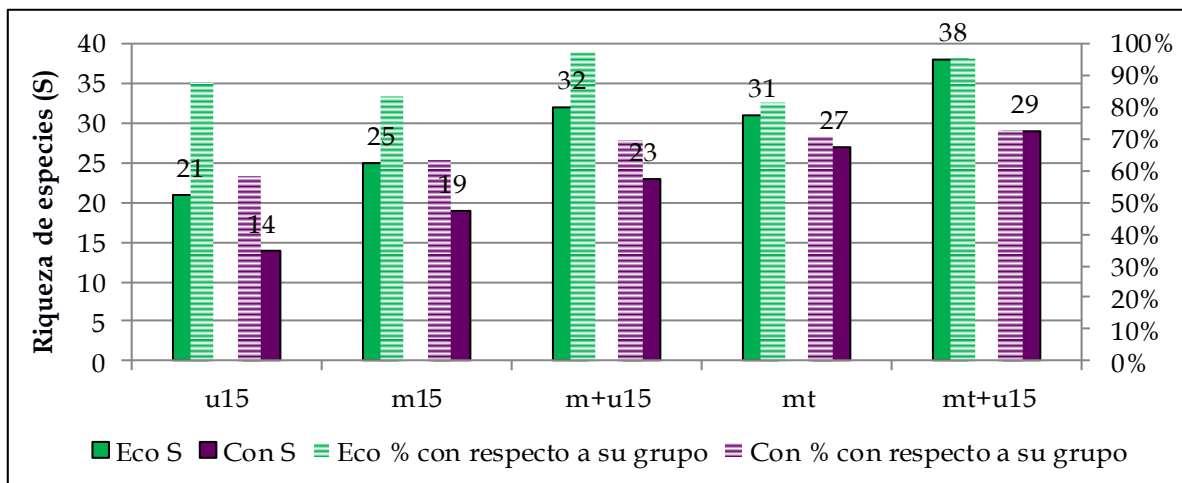


Figura 4.8. Riqueza global de especies de levaduras expresada como S (número de especies) y porcentajes (%) en muestras ecológicas y convencionales de uvas de 2015 (u15), mostos de 2015 (m15) y mostos de todas las cosechas (mt). Las barras con relleno sólido representan dos valores: la riqueza de especies, S, en el eje izquierdo y el % con respecto a la biodiversidad total de levaduras (40 especies) en el eje derecho. Las barras con trama rayada muestran el porcentaje con respecto a su grupo de muestras, también en el eje derecho.

Cuando se estudió la riqueza de especies en mosto y uva (campana de 2015), la biodiversidad fue un 27.3% mayor en producción ecológica, pero esta diferencia aumentó hasta el 29.2% cuando solo se consideraron las uvas (21 especies en uva ecológica y 14 en convencional). Estas diferencias no fueron tan marcadas cuando se consideraron los mostos de las tres cosechas conjuntamente, en las que se identificaron 31 especies de levaduras en ecológico, en comparación con 27 especies encontradas en los convencionales (diferencia del 10.5%) (Figura 4.8).

Tabla 4.12. Presencia de las diferentes especies de levaduras encontradas en uva y mosto de las distintas DOs, año, variedad y sistema de producción.

Especie↓, Cosecha→	DO Monterrei										DO Ribeiro										DO Ribeira Sacra					DO Rías Baixas																						
	Variedad→ Producción→					Treixadura					Mencia					Treixadura					Brancellao					Mencia					Albariño					Treixadura												
	Eco			Con		Eco			Con		Eco			Con		Eco			Con		Eco			Con		Eco			Con		Eco			Con														
	13	14	15	13	14	15	13	14	15	13	14	15	13	14	15	13	14	15	13	14	15	13	14	15	13	14	15	13	14	15	13	14	15	13	14	15	13	14	15	13	14	15	13	14	15	13	14	15
<i>Aureobasidium proteae</i>			um			u						m						m			m						m			u			um			u			u			u			u			
<i>Aureobasidium pullulans</i>	m		um	m	m	um	m		um	m	um	um			um			um	m		um	m		um			u	m		u	m		um			u	m		u	m		u			u			
<i>Candida apicola</i>									m																		m	um		m							m		m			m			m			
<i>Candida bentonensis</i>																														m																		
<i>Candida californica</i>																									mi	mi	m	i	mi				m	i			m	m	m	m	m	m						
<i>Candida oleophila</i>																												mi	m	i						um	m											
<i>Candida pimensis</i>															i																																	
<i>Candida pyralidae</i>																												m																				
<i>Candida cf. sorbosivorans</i>																														m																		
<i>Cryptococcus carnescens</i>			u						u						u			m																					u									
<i>Cryptococcus laurentii</i>															umi			m			m																											
<i>Cryptococcus stepposus</i>									u			u									m															u			u									
<i>Cryptococcus terrestris</i>						umi												um												u			u															
<i>Cryptococcus af. victoriae</i>															u												u												u									
<i>Cryptococcus victoriae</i>			u												um			m																														
<i>Cystofilobasidium macerans</i>						um												m									u																					
<i>Debaryomyces hansenii</i>							m																	umi				m		um							um		i									
<i>Hanseniaspora clermontiae</i>																											i																					
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	mi	mi	mi		i	mif	m	mi	umi	mi	mif	m	mf		m	mif	i	m	mi	mi	mi	m	i	mi	mi	umi	mi	mi	umi	mf	mif	umi	mi	m	umi	m	mi	umif	mi	mi	umif							
<i>Issatchenkia terricola</i>																												m	mi	i	if	mf	mi	i	umi	i	mi	mi										
<i>Kluyveromyces dobzhanskii</i>		i																																														
<i>Lachancea thermotolerans</i>	mf	mif	mif	mf	mi		mif	m	umi	mi			mf	mi	mf	f	i	i	mi		mi	i					i																					
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	mi	mi	mi	mi	mi	m	m	mi	umi	m	umi	m	mi	mi	m	mf	ui	mi	mi	umi	m	m	i	m	mi	umi	m	mi	umi	mi	mi	um	mi	m	mi	mi	mi	mi	um	m	mif	um						
<i>Metschnikowia af. chrysoperlae</i>						i																																										
<i>Metschnikowia af. fructicola</i>			i			i			m									i			i						m			u			i			m			m									
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	mi	m				mi						m																																				
<i>Naganishia difluens</i>																														m																		
<i>Pichia kluyveri</i>																											m	um	mi	mi	i			i	m		m			m			m	um	i	mi		
<i>Pichia kudriavzevii</i>																		i			if																		mf									

u: uva; m: mosto; i: fases iniciales de la fermentación; f: fase final de la fermentación.

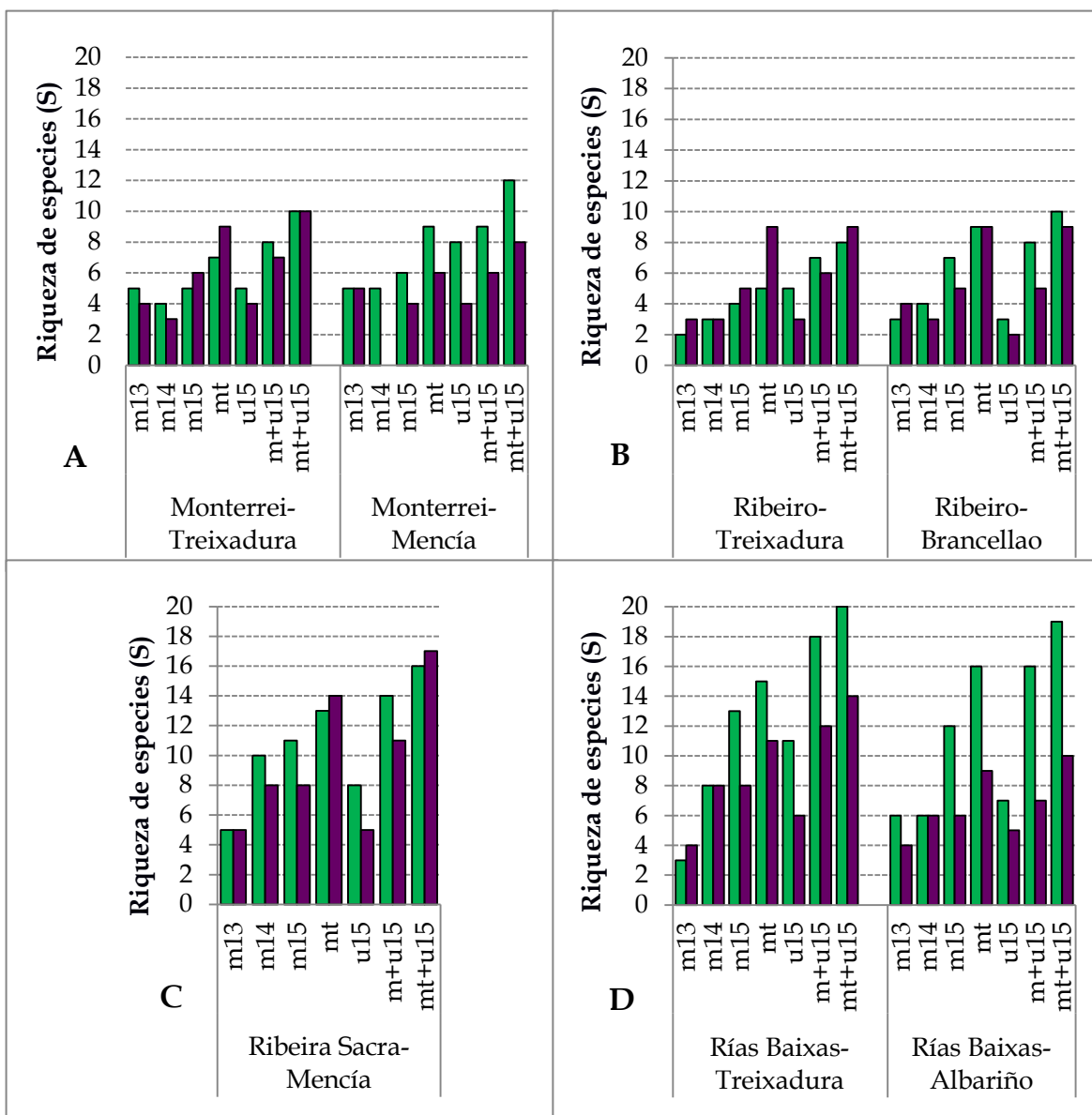


Figura 4.9. Riqueza de especies de levadura (S) en muestras de producción ecológica ■ y convencional ■ en uva de 2015 (u15), mostos de 2013, 2014 y 2015 (m13, m14 y m15, respectivamente) y mostos de todas las cosechas (mt) en diferentes variedades y DOs: A) Monterrei, B) Ribeiro, C) Ribeira Sacra y D) Rías Baixas.

Sin embargo, cuando se compararon las muestras de cultivo ecológico y convencional teniendo en cuenta las diferentes variedades de uva y Denominaciones de Origen, se encontraron algunas excepciones a esa tendencia general para la riqueza de especies en mostos y uvas (Figura 4.9).

La mayor diversidad de levaduras se observó en las DOs Rías Baixas y Ribeira Sacra. En contraste, en las DOs Ribeiro y Monterrei la diversidad de levaduras fue mucho menor. En la **DO Monterrei**, los mostos ecológicos de Treixadura presentaron mayor riqueza de especies que los convencionales en 2013 y 2014, pero no en 2015 (Figura 4.9A). Por el contrario, los mostos de la variedad Mencía mostraron un número mayor de especies de levadura en el cultivo ecológico en 2015. En cuanto a las uvas de la DO Monterrei, las muestras ecológicas presentaron una mayor riqueza para ambas variedades. Cuando se

consideraron todas las muestras (mosto + uva) no se encontraron diferencias para la variedad Treixadura, pero sí en Mencía.

En la **DO Ribeiro** se observó la tendencia opuesta a las demás DOs, especialmente para los mostos Treixadura (Figura 4.9B). La riqueza fue similar entre ambos sistemas de cultivo (2014) o superior en muestras convencionales (2013 y 2015). Pese a ello, los mostos de la variedad tinta Brancellao de esta DO mostraron una mayor riqueza en producción ecológica en 2014 y 2015, pero no en 2013. En las muestras de uva ecológica se identificó una mayor cantidad de especies que en las convencionales en ambas variedades.

El mosto y las uvas de Mencía de la **DO Ribeira Sacra** mostraron una mayor riqueza de especies de levadura en producción ecológica, excepto en 2013 cuando no se encontraron diferencias (Figura 4.9C) tal y como se describe para la misma variedad en la DO Monterrei. No obstante, la riqueza total fue mayor para las muestras convencionales.

Finalmente, en la **DO Rías Baixas**, en la uva y el mosto se encontró igual o mayor diversidad de especies de levaduras en las muestras procedentes del sistema de cultivo ecológico, excepto en el mosto de Treixadura de 2013 (Figura 4.9D). En 2014 se observó la misma riqueza en mostos ecológicos que en convencionales en las dos variedades, como también se describió anteriormente en Treixadura de la DO Ribeiro.

Además, los resultados mostraron que la mayor diversidad de levaduras en la DO Rías Baixas se obtuvo con las variedades Albariño y Treixadura en producción ecológica ($S = 19-20$ especies; 47.5-50% de S total, respectivamente). Las muestras de Mencía de la DO Ribeira Sacra también presentaron una alta riqueza de especies, pero similares en ambos sistemas de cultivo ($S = 16-17$; 40-42.5% en muestras ecológicas y convencionales, respectivamente). Sin embargo, en las muestras convencionales de la DO Rías Baixas, solo se encontraron 10 y 14 especies en Albariño y Treixadura (25% y 35%, respectivamente). En la DO Monterrei se observaron diferencias entre las dos variedades muestreadas y el tipo de producción. Así, en producción ecológica la riqueza de especies de levadura fue 12 en Mencía y 10 en Treixadura. No obstante, en el cultivo convencional, la diversidad fue mayor en Treixadura ($S = 10$) que en Mencía ($S = 8$). Finalmente, los valores más bajos de diversidad se observaron en la DO Ribeiro, siendo a su vez, mayores en la variedad tinta Brancellao ($S = 10$) que en Treixadura ecológica ($S = 8$), mientras que en cultivo convencional se identificó el mismo número de especies en ambas variedades ($S = 9$). Esta riqueza de especies no varió excesivamente cuando se consideraron solo los datos de mostos excluyendo la biodiversidad de las uvas. Únicamente en los mostos convencionales de las dos variedades de la DO Ribeiro, S permaneció sin cambios. En el resto de mostos la biodiversidad disminuyó entre 1 y 5 especies cuando solo se tuvieron en cuenta los mostos.

Por otro lado, en algunas variedades como por ejemplo Albariño, la riqueza de especies identificada durante los tres años (mt) fue muy superior a la media de los tres años lo que sugiere que la diversidad de especies varía con la campaña. Esto puede influir en la tipicidad del vino a nivel de añada tal como apuntaron Bokulich et al. (2014).

La influencia de los sistemas de cultivo (biodinámicos, ecológicos, convencionales y/o integrados) sobre la población de levaduras (riqueza y frecuencia de las especies) se ha

abordado en diferentes áreas vitícolas. Los resultados obtenidos variaron entre ellos y algunas veces fueron contradictorios.

En cuanto a la mayor diversidad de levaduras observada en este estudio, nuestros datos coinciden con los descritos en cultivo ecológico para otros viñedos en España (Madrid) (Cordero-Bueso et al., 2011; Tello et al., 2011). De manera similar, también se ha descrito una mayor diversidad en los viñedos biodinámicos que en los viñedos convencionales e integrados en Sudáfrica (Bagheri et al., 2015; Setati et al., 2012 y 2015). Las metodologías moleculares más robustas permitieron no solo la discriminación entre las prácticas agrícolas, sino también establecer una fluctuación espacial dentro de un viñedo (Setati et al., 2012). En cuanto a estudios realizados en Francia, Martins et al. (2014) confirmaron que los recuentos microbianos fueron más altos en las uvas de cultivo ecológico. Por otro lado, Comitini y Ciani (2008) en Italia demostraron que los efectos de los tratamientos fungicidas orgánicos (convencionales) aplicados en las uvas durante la maduración causan una reducción drástica en la población y diversidad de levaduras. En contraste, Grangeteau et al. (2017a) en Francia y Milanović et al. (2013) en Italia observaron que la protección del cultivo ecológico mediante plaguicidas de amplio espectro de origen natural como el cobre (permitido y ampliamente utilizado como fungicida en la viticultura ecológica junto con el azufre), podrían conducir a una menor diversidad de levaduras en las bayas en comparación con la protección convencional. Esta disminución de la diversidad de levaduras en las bayas también podría ser debida al uso de dosis altas de fungicidas inorgánicos.

La diferencia en la riqueza de especies entre sistemas de cultivo podría explicarse no solo por acción directa del fungicida, sino también por posibles interacciones entre microorganismos, ya que la presencia de ciertos hongos puede promover o inhibir el crecimiento de algunos géneros de levaduras (Angioni et al., 2007; Oro et al., 2014; Schmid et al., 2011; Sipiczki, 2016). Además, dichos microorganismos interactúan con los órganos de la planta y pueden influir en su nutrición, en el desarrollo, en la productividad y en las respuestas al estrés (Bacon y White, 2016; Barata et al., 2012; Renouf et al., 2005). Sin embargo, otras investigaciones mostraron que algunos fungicidas tuvieron un impacto menor en la composición de las comunidades de levaduras asociadas con las bayas de uva puesto que fue posible la colonización con levaduras después del intervalo de seguridad (Čadež et al., 2010; Coppola et al., 2011). Incluso, en algunos estudios, no se encontraron diferencias en la diversidad microbiana entre los viñedos biodinámicos y tradicionales, que parecía estar más relacionada con la variedad de uva que con las prácticas agronómicas (Guzzon et al., 2015).

Por tanto, nuestros resultados pusieron de manifiesto que el impacto de las prácticas de cultivo fue relevante en la diversidad de levaduras, en particular cuando se considera que las muestras procedían de viñedos vecinos similares y recogidas al mismo tiempo.

4.2.3. Diversidad de levaduras a nivel cualitativo: presencia de las distintas especies

Las especies identificadas en este estudio se conservaron en la colección de levaduras de la EVEGA. Tres aislados no pudieron ser caracterizados completamente; pero su perfil genético de rRNA ITS-5.8S permitió su diferenciación de las demás especies de la colección.

No fue posible secuenciarlos para confirmar su identidad debido a su baja viabilidad en los medios de laboratorio.

4.2.3.1. Diversidad de especies en mosto y uva

Las **especies mayoritarias** en todas las muestras de **uva y mosto** fueron *Aureobasidium* spp., *Metschnikowia* spp., *H. uvarum* y *Cryptococcus* spp. *Metschnikowia* spp. fue el género más ampliamente distribuido en los mostos y, en menor medida, en las uvas de producción ecológica y convencional. Dentro del género *Aureobasidium* la especie más importante por frecuencia de aparición fue *A. pullulans* y, en mucha menor proporción, *Aureobasidium proteae*. De igual forma, la especie más frecuente del género *Metschnikowia* fue *M. pulcherrima* y, en menor medida, *Metschnikowia* af. *fructicola*.

La población de levaduras en **uva**, tanto en el cultivo ecológico como convencional, estuvo dominada por el hongo-levadura ascomiceto *Aureobasidium* spp. (*A. pullulans* y *A. proteae*) y por levaduras basidiomicetos de los géneros *Cryptococcus*, *Rhodotorula* y *Sporobolomyces*. Estas especies, que fueron más abundantes en uvas que en mostos, se han descrito como microbiota dominante en ambos sistemas de cultivo asociada a las uvas sanas cosechadas después del envero y presentes en algunas partes verdes de la vid (Bagheri et al., 2015; Barata et al., 2012; Grangeteau et al., 2017a; Martins et al., 2014; Nemcová et al., 2015; Renouf et al., 2005; Setati et al., 2012). Todas ellas son levaduras oxidativas irrelevantes desde el punto de vista tecnológico (no tienen un efecto negativo en el vino) y están más relacionadas con enfermedades de origen fúngico e interrelaciones microbianas. Aunque, curiosamente, Verginer et al. (2010) atribuyeron componentes típicos detectados como producidos por *A. pullulans* que afectaron al sabor del vino, lo que podría explicar evaluaciones de diferenciación positivas en vinos ecológicos (Martin y Rasmussen, 2011; Pagliarini et al., 2013; Schmid et al., 2011). Las especies del género *Cryptococcus* se identificaron principalmente en muestras de uva ecológica. No obstante, algunas de ellas se aislaron de mostos convencionales.

H. uvarum estuvo presente en casi todas las muestras de **mosto**; sin embargo, en uva, se detectó mayoritariamente en dos DOs (Tabla 4.12). Particularmente *H. uvarum* es una levadura predominante en mostos y estados iniciales de la fermentación (Jolly et al., 2014; Pretorius, 2000). Patrignani et al. (2017) encontraron *H. uvarum* en una elevada proporción (84-90%) en muestras de producción ecológica-biodinámica. *Metschnikowia* spp. también aparece comúnmente, aunque en menor proporción (Bagheri et al., 2015; Setati et al., 2015; Suzzi et al., 2012; Zott et al., 2008). No obstante, las especies de levaduras débilmente fermentativas *H. uvarum* y *Metschnikowia* spp. también se identificaron en muestras de uvas en una alta proporción (hasta 42%). Estas especies se han asociado a uvas maduras o dañadas (Drumonde-Neves et al., 2017; Garofalo et al., 2016; Guzzon et al., 2014; Prakitchaiwattana et al., 2004; Sipiczki, 2016). Especies del género *Candida* y *Starm. bacillaris*, (antes *C. zemplinina*) también se han descrito con una cierta predominancia en uvas y mostos (Jolly et al., 2014; Setati et al., 2015; Zott et al., 2008). Patrignani et al. (2017) encontraron *Starm. bacillaris*, en proporciones < 5-10% en muestras de producción biodinámica-ecológica dominadas por *H. uvarum*. No obstante, en nuestro estudio no se

identificó *Starm. bacillaris* en las muestras de uva en ambos sistemas de cultivo. *P. kluyveri* se encontró mayoritariamente en mostos también en ambos sistemas de cultivo.

El sistema de cultivo también afectó a la distribución de especies minoritarias de levadura. *Cryptococcus victoriae* en 2015 y *D. hansenii* en 2013 y 2015 se identificaron casi únicamente en **muestras ecológicas**, mayoritariamente en mostos (Tabla 4.12). *Candida apicola*, *Candida oleophila*, *I. terricola*, *Lachancea thermotolerans*, *Z. hellenicus/meyerae* y *Zygosaccharomyces bisporus* aparecieron principalmente en muestras ecológicas. Otras especies minoritarias oxidativas y/o débilmente fermentativas como *Candida bentonensis*, *Candida pyralidae*, *Candida cf. sorbosivorans*, *Naganishia difluens*, *Pichia kudriavzevii*, *Pichia sporocuriosa*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Zy. bailii* y la especie PCR430 se aislaron siempre en muestras de mosto ecológico, aunque en una única cosecha (pudiendo aparecer en varias muestras, pero del mismo año, variedad y DO).

En cuanto a las **muestras convencionales** las especies *Cryptococcus carnescens*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus stepposus* y *Rhodotorula graminis* predominaron en este sistema de cultivo. *T. delbrueckii* y la especie PCR700, se aislaron solo en una única muestra de mosto convencional. Algunas especies como *T. delbrueckii* que no fueron recuperadas por métodos basados en cultivo suponían el 15.9% de la población en un estudio similar mediante secuenciación directa (Setati et al., 2015). Esto explicaría que algunas especies de relevancia enológica no se desarrollen favorablemente en las condiciones y medios clásicos de laboratorio cuando se encuentran en proporción limitada e, incluso, que aparezcan tras el inicio de la fermentación. En especies de otros géneros como *Rhodotorula* ocurrió lo contrario, las identificaron mediante métodos clásicos, pero no con secuenciación masiva. Tello et al. (2011), utilizando la misma metodología que en nuestro estudio encontraron especies como *T. delbrueckii*, *R. mucilaginosa* y *L. thermotolerans* en proporciones considerables (3-11%). Las razones para estas discrepancias podrían diferir de una especie a otra debido a sesgos de extracción de ADN, amplificación de PCR, mejor cultivabilidad y crecimiento rápido para algunas especies, etc.

Otras especies como *Candida californica*, *Cryptococcus terrestris*, *Cystofilobasidium macerans* (estado sexual anamórfico de *Cryptococcus macerans*), *Rhodotorula nothofagi* y *Sporobolomyces ruberrimus* se detectaron en uvas y/o mostos distribuidos de forma esporádica, sin un patrón definido en cuanto al sistema de cultivo. Por otro lado, *Cryptococcus af. victoriae* y *Sp. ruberrimus* solo se aislaron en uvas y, además, esta última especie se aisló solo en 2015 en Treixadura ecológica de dos DOs.

Nuestros datos demuestran que las levaduras Ascomycota son dominantes en el micobioma del mosto. Este argumento es coherente con las investigaciones de otros autores como Bokulich et al. (2014) en California (U.S.A.), Setati et al. (2015) en Stellenbosh (Sudáfrica) y también con estudios que han demostrado que los hongos endófitos de la vid comprenden principalmente hongos ascomicetos, mientras que la comunidad epifítica dominada por basidiomicetos en las bayas cambia a una comunidad dominada por ascomicetos en plena madurez (Prakitchaiwattana et al., 2004; Renouf et al., 2005 y 2007a). Cabe mencionar, además, que nuestros resultados no coincidieron con los descritos por Grangeteau et al. (2017a) en los que especies Basidiomycota se asociaron principalmente

con cultivo ecológico, y levaduras Ascomycota como *Saccharomyces*, *Metschnikowia* y *Hanseniaspora* se asociaron con la protección convencional.

Por otra parte, nuestros resultados confirmaron que la principal levadura del vino presente en las bodegas y durante la fermentación, *S. cerevisiae*, fue raramente aislada en uvas y mostos de ambos sistemas de cultivo. *S. cerevisiae* se encontró sólo en tres muestras de mosto convencional en 2014 y en dos muestras de uva tinta (ecológica y convencional) de 2015. Es un hecho ampliamente descrito que *S. cerevisiae* aparece con muy baja frecuencia en las uvas (10-10² UFC/g de uva o menos) y se encuentra raramente en bayas sanas (Bagheri et al., 2015; Fleet, 2003). Estas observaciones son la base de una gran controversia sobre su origen en la elaboración del vino (Martini et al., 2003; Mortimer y Polsinelli, 1999).

Por último, hay que decir que algunas especies de los géneros *Candida*, *Pichia* e *Issatchenkia* comunes en uvas y mostos tienen la capacidad de originar sabores desagradables en vino. Pese a ello, se puede prevenir su actividad con buenas prácticas de elaboración (Barata et al., 2012; Loureiro y Malfeito-Ferreira, 2003). Patrignani et al. (2017), también detectaron *P. kluyveri* e *I. terricola* como una de las principales especies en fermentaciones espontáneas de mosto ecológico, aunque su proporción fue inferior al 5%. Sin embargo, algunas cepas de *I. terricola* podrían ser importantes ya que secretan una glucosidasa extracelular que aumenta la cantidad de monoterpenoles durante la vinificación (Capozzi et al., 2015; González-Pombo et al., 2011). Además, casi no aparecieron otras levaduras típicamente relacionadas con defectos en el vino como *Brettanomyces*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspora* y *Zygosaccharomyces* (Du Toit y Pretorius, 2000; Romano et al., 2003), ni en uvas, ni en mostos, ni durante la fermentación (apartado 4.2.3.2). En este sentido se identificaron solo tres especies con mayor actividad fermentativa consideradas alterantes del vino (Barata et al., 2012): *P. kluyveri*, *Z. hellenicus/meyerae* y *Zygosaccharomyces* spp. en solo algunas muestras principalmente en uvas ecológicas. *Zy. bailii* es tecnológicamente relevante debido a su capacidad de formación de sedimentos y turbidez (Barata et al., 2012), pero solo se identificó en una muestra de mosto ecológico y dos muestras en la fase inicial de la fermentación. Esto afianza la posibilidad de realizar fermentaciones espontáneas.

4.2.3.2. Diversidad de especies en las fases inicial (Fi) y final (Ff) de la fermentación

Durante la fermentación inicial de los mostos se encontró una riqueza de especies en torno a la mitad de la riqueza total de especies identificadas. *H. uvarum* y *Metschnikowia* spp. también fueron las especies mayoritarias en las fases iniciales en casi todas las cosechas, variedades, DOs y sistemas de producción. *Candida* spp., *Starm. bacillaris* y *P. kluyveri* aparecieron en las DOs Ribeira Sacra y Rías Baixas, *I. terricola* y *Z. hellenicus/meyerae* solo en la DO Rías Baixas, *Zygosaccharomyces* spp. principalmente en la DO Ribeira Sacra. Sin embargo, *L. thermotolerans*, *Cr. victoriae* y *Cr. carnescens* estuvieron ligadas a las DOs Monterrei y Ribeiro mientras que *Cr. laurentii* se encontró exclusivamente en la DO Ribeiro. *M. af. fructicola* y *Meyerozyma guilliermondii* se encontraron en varias DOs. *C. californica* se identificó en 2013 y 2014 en la Fi de las fermentaciones ecológicas y convencionales en la variedad Mencía de la DO Ribeira Sacra, y esporádicamente en 2014 en la variedad

convencional Albariño de la DO Rías Baixas. Del mismo modo, otras especies se aislaron solo una o dos veces en la Fi (además de aparecer en uvas y/o mostos), en la producción ecológica: *C. oleophila*, *R. mucilaginosa*, *Z. hellenicus/meyerae*, *Zy. bailii* y *Zy. bisporus*; y en una proporción similar en la producción convencional: *C. oleophila*, *P. membranifaciens*, *Cr. laurentii*, *Cr. terrestris*, *D. hansenii*, *Z. hellenicus/meyerae* y *Zy. bisporus*. Cabe mencionar que, en particular, *Z. hellenicus*, *I. terricola* y *P. kudriavzevii* (*Issatchenkia kudriavzevii*) se pueden considerar indicadores cimológicos de la podredumbre ácida según Barata et al. (2012).

Como se esperaba, observamos una correspondencia lógica entre las muestras encontradas en la fase de fermentación inicial y la levadura encontrada en los mostos antes de la fermentación. Sin embargo, algunas especies aparecieron escasamente solo en la Fi, no identificándose en las muestras de uvas y mosto analizados antes de la fermentación (Tabla 4.12). Esto probablemente fue debido a que el número de células viables presentes no fue suficiente hasta que en las condiciones favorables del mosto el crecimiento fue óptimo. Por ejemplo, en las levaduras aisladas en 2014 en el viñedo ecológico: *Kluyveromyces dobzhanskii* (Treixadura, DO Monterrei); y en 2015 en el convencional: *Candida pimensis* (Treixadura, DO Ribeiro), *Hanseniaspora clermontiae* (Brancellao, DO Ribeiro) y *Metschnikowia af. chrysoperlae* (Treixadura, DO Monterrei). Lo mismo ocurrió para algunas especies encontradas exclusiva o casi exclusivamente en la Ff de la fermentación en producción ecológica: *Sac. ludwigii* y la levadura PCR570; y en muestras convencionales: *R. mucilaginosa* y *T. delbrueckii*. Sin considerar *S. cerevisiae*, solo *Starm. bacillaris*, *H. uvarum* y *L. thermotolerans* permanecieron significativamente hasta el final de la fermentación (Ff).

Algunos autores como Grangeteau et al. (2017a) encontraron una disminución de la población total de levaduras después del prensado en comparación con la proporción en las bayas con una posterior implantación de la flora residente en la bodega. No obstante, nuestros resultados no coinciden con tales argumentos ya que el mosto se obtuvo sin prensado y el despallado-estrujado manual se realizó en las mismas bolsas zip de manera aséptica. Nuestros argumentos sugieren que la liberación de las células de la piel de las bayas podría no haber sido en cantidad suficiente como para desarrollar colonias viables con efectividad, o incluso debido a su dificultad para crecer en agua de peptona y/o WL.

4.2.4. Frecuencia de las especies de levadura en uva y mosto: índices de biodiversidad y distribución biogeográfica

En 2015 se comparó la proporción de las diferentes especies de levadura presentes en las muestras de uva y mosto de los viñedos ecológicos y convencionales. Además, se calcularon los índices de biodiversidad: Shannon-Wiener (H'); Simpson (1-D) y equitabilidad (E). Los resultados se muestran en la Tabla 4.13 y Tabla 4.14.

Considerando los resultados globales para los **mostos ecológicos**, las tres especies predominantes *H. uvarum*, *Metschnikowia* spp. y *Aureobasidium* spp., mostraron una proporción similar (22.8%, 17.6% y 17.2%, respectivamente). *Candida* spp. también se encontraron en una alta frecuencia (14.6%) si consideramos el 7.1% de *Starm. bacillaris* (*C. zemplinina*) (Tabla 4.13). Esta última especie se identificó con una frecuencia importante en mostos ecológicos de las variedades Treixadura (34.1%) y Albariño (12.4%) de la DO Rías Baixas. Estas proporciones explican los altos valores de los índices de biodiversidad en los

mostos ecológicos. En los **mostos convencionales** se identificaron las mismas especies mayoritarias, pero su proporción fue diferente. Así, las tres principales especies *Aureobasidium* spp., *H. uvarum* y *Metschnikowia* spp. mostraron una frecuencia de 45.2%, 16.2% y 8.8%, respectivamente. De forma similar a la producción ecológica, la presencia de *Starm. bacillaris* también fue relevante en mostos convencionales (6.1% del total) con una frecuencia de 28.2% y 14.5% en Treixadura de la DO Rías Baixas y Mencía de la DO Ribeira Sacra, respectivamente (Tabla 4.13).

Estos resultados coinciden con estudios previos similares entre cultivo ecológico y convencional en los que *H. uvarum*, *M. pulcherrima* y *Starm. bacillaris* fueron las levaduras débilmente fermentativas más abundantes en todas las DOs, seguidas por otras levaduras fermentativas detectadas a niveles bajos como *Candida* spp., *Pichia* spp., *L. thermotolerans*, *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae* (Bagheri et al., 2015; Setati et al., 2015; Tofalo et al., 2011).

En cuanto a las Denominaciones de Origen, se observaron diferencias notables en la proporción de ciertas especies en los **mostos ecológicos**. Por ejemplo, *Aureobasidium* spp. se identificaron en alta frecuencia en las DOs Monterrei y Ribeiro (intervalo 12.3-49.8%) junto con *L. thermotolerans* (31.3%-32.6%). *Aureobasidium* spp. y *Cr. terrestris* contribuyeron en más de dos tercios (34.5% y 33.9%, respectivamente) a la riqueza de especies en los mostos Brancellao (Tabla 4.13). Sin embargo, el género *Aureobasidium* estuvo ausente en las DOs Ribeira Sacra y Rías Baixas. *Metschnikowia* spp. y *C. apicola*, que apareció exclusivamente en mosto ecológico, se encontraron en alta proporción (46.2% y 27.1%, respectivamente) en Mencía de la DO Monterrei. La presencia de *Metschnikowia* spp. también fue importante en Treixadura de la DO Ribeiro (26.3%). *Cr. victoriae* se aisló en Treixadura (18.4%) y Brancellao (13.0%) en la DO Ribeiro. En la variedad Albariño ecológico se encontraron algunas particularidades; fueron predominantes *H. uvarum*, *Starm. bacillaris*, *Metschnikowia* spp. y *Candida* spp.

Por el contrario, en los **mostos convencionales**, *Aureobasidium* estuvo presente en una proporción muy elevada, mayor que en los mostos ecológicos, y en todas las DOs (62.3%-70.1% en la DO Monterrei-Ribeiro y 33.4% en la DO Ribeira Sacra) excepto en la variedad Treixadura de la DO Rías Baixas donde no se identificó. *Metschnikowia* spp. se aislaron en todas las DOs, excepto en Ribeiro, encontrándose el porcentaje más alto en la variedad Mencía de la DO Monterrei (25.7%). La presencia de *Cr. laurentii* fue notable tanto en mostos convencionales blancos como en tintos de la DO Ribeiro (16.1% y 13.9%, respectivamente), así como *Cy. macerans* en Brancellao convencional (15.0%). La mayor frecuencia de *R. graminis* (20.4%) se obtuvo en la DO Rías Baixas (Tabla 4.13). Además, en Albariño también fueron predominantes *H. uvarum*, *R. graminis* e *I. terricola*.

Los mostos de las DOs Ribeira Sacra y Rías Baixas destacaron por la presencia de levaduras como *H. uvarum* (30.2-35.8% en mostos convencionales; 37.8-54.8% en mostos ecológicos) y también *I. terricola* y *Starm. bacillaris* con diferentes porcentajes entre las tres variedades y sistemas de producción (0-16.0% y 0-34.1%, respectivamente). Además, en estas DOs la proporción del género *Candida* fue significativamente mayor en los mostos ecológicos que en los convencionales, excepto de *C. californica* (2.2%-8.0%) para los mostos Treixadura.

Tabla 4.13. Proporción de especies (%) e índices de biodiversidad calculados en 2015 en mostos ecológicos (Eco) y convencionales (Con) de diferentes DOs y variedades.

DO-Varietalidad →		Mo-Trx		Mo-Men		Ri-Trx		Ri-Bra		RS-Men		RB-Alb		RB-Trx		Total, DO	
Especie↓	Producción →	Eco	Con	Eco	Con	Eco	Con	Eco	Con	Eco	Con	Eco	Con	Eco	Con	Eco	Con
<i>Aureobasidium</i> spp.		49.8	68.8	12.3	62.3	23.9	62.5	34.5	70.1		33.4		19.5			17.22	45.23
<i>Candida apicola</i>				27.1						5.1				1.5	4.9	4.82	0.69
<i>Candida bentonensis</i>												1.2				0.18	
<i>Candida californica</i>										0.4		2.0		2.2	8.0	0.66	1.15
<i>Candida oleophila</i>												7.5		1.5		1.28	
<i>Candida cf. sorbosivorans</i>												4.0				0.57	
<i>Cryptococcus carnescens</i>							6.4										0.91
<i>Cryptococcus laurentii</i>							16.1	3.5	13.9							0.50	4.29
<i>Cryptococcus stepposus</i>									6.7								0.96
<i>Cryptococcus terrestris</i>			9.9						33.9							4.84	1.41
<i>Cryptococcus victoriae</i>						18.4			13.0							4.50	
<i>Cystoflbasidium macerans</i>			3.2				15.0										2.60
<i>Debaryomyces hansenii</i>									2.2			4.7		3.5		1.17	0.31
<i>Hanseniaspora uvarum</i>		3.6	4.5	10.2	12.0			4.7		54.8	35.8	48.7	31.0	37.8	30.2	22.82	16.21
<i>Issatchenkia terricola</i>										11.0		16.0	2.4	8.7		1.91	3.52
<i>Lachancea thermotolerans</i>		32.6		2.6		31.3										9.51	
<i>Metschnikowia</i> spp.		14.0	11.2	46.2	25.7	26.3		10.4		12.4	8.9	10.1	13.1	3.7	3.1	17.59	8.84
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>												2.2				0.31	
<i>Pichia kluyveri</i>										7.3		1.6		7.8	11.9	2.38	1.70
<i>Pichia membranifaciens</i>										0.4						0.05	
<i>Pichia sporocuriosa</i>										4.5						0.64	
<i>Rhodotorula graminis</i>			2.5	1.6					7.1				20.4			0.22	4.28
<i>Rhodotorula nothofagi</i>											2.9						0.41
<i>Torulaspota delbrueckii</i>											3.2						0.45
<i>Starmerella bacillaris</i>										2.9	14.5	12.4		34.1	28.2	7.07	6.11
<i>Zygoascus hellenicus/meyerae</i>										0.6		2.8		2.0		0.76	
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>														2.0		0.28	
<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>										0.4	1.3	2.9		1.7	5.1	0.71	0.91
Índices de biodiversidad	$H' = -\sum^S p_i \ln(p_i)$	1.11	1.07	1.36	0.90	1.37	1.05	1.50	0.98	1.52	1.50	1.79	1.57	1.69	1.79	2.32	1.93
	$1 - D = 1 - \sum^S (p_i)^2$	0.62	0.50	0.69	0.53	0.74	0.56	0.74	0.48	0.66	0.73	0.73	0.78	0.73	0.80	0.87	0.75
	$E = H/\ln(S)$	0.80	0.60	0.76	0.82	0.99	0.76	0.83	0.61	0.63	0.77	0.72	0.97	0.68	0.86	0.74	0.67

Los valores son el promedio de seis datos.

Por otro lado, la evaluación de la ecología de la población de levaduras en **uvas biológicas y convencionales** mostró que la frecuencia de ciertas especies varió en comparación con las muestras de mostos, con una mayor presencia del género *Cryptococcus* (Tabla 4.14).

Los cuatro grupos de especies predominantes (*Aureobasidium* spp., *H. uvarum*, *Metschnikowia* spp. y *Cryptococcus* spp.) difirieron en su proporción dependiendo del sistema de cultivo, variedad y DO. Considerando los resultados globales para las uvas, el género *Aureobasidium* fue predominante (42.4% y 56.9%, respectivamente), con frecuencias más altas que en mosto. El género *Cryptococcus*, especialmente la especie *Cr. terrestris* contribuyó de forma importante a la riqueza de especies de la uva (21.9% y 13.4% en uvas ecológicas y convencionales, respectivamente). *H. uvarum* apareció con una proporción similar (en torno al 11.4%) en ambos sistemas de cultivo, mientras que *Metschnikowia* spp. presentó un porcentaje ligeramente superior en uvas convencionales (11.4%) que en ecológicas (7.7%). La elevada proporción de *H. uvarum* suele ser más evidente en el mosto tinto que en el blanco, posiblemente debido al mayor pH del primero (Jolly et al., 2014).

Por DOs, *Aureobasidium* spp. presentó una elevada frecuencia (67.4%-84.1%) en las DOs Monterrei y Ribeiro (Tabla 4.14). Sin embargo, de forma similar a lo encontrado en los mostos, en las uvas de la DO Ribeira Sacra y en la variedad Treixadura ecológica de la DO Rías Baixas este género se encontró en baja proporción o estuvo ausente. *H. uvarum* estuvo presente en casi todas las muestras de mosto. Sin embargo, aunque en uva también fue la especie de levadura predominante de la DO Ribeira Sacra (39.8 y 26.4% en uvas ecológicas y convencionales, respectivamente) y se detectó en la DO Rías Baixas (15-23.6% en uvas ecológicas y 0-53.1% en convencionales), casi no apareció en uvas de la DO Monterrei y no se aisló en la DO Ribeiro (Tabla 4.12). *M. pulcherrima* y *M. af. fructicola* se encontraron ampliamente distribuidas en uvas ecológicas y convencionales, pero con una mayor frecuencia en muestras convencionales. Además, hay que destacar que la proporción de *Metschnikowia* spp. aumentó con respecto a los mostos (42.1% y 28.0% en uvas convencionales y ecológicas, respectivamente). Las especies de *Cryptococcus* también aparecieron ampliamente distribuidas en uvas a diferentes frecuencias, especialmente *Cr. terrestris* en uva Brancellao ecológica (65.3%) de la DO Ribeiro, y en Mencía convencional de la DO Ribeira Sacra (27.2%). Sin embargo, *P. kluyveri* se registró únicamente en uvas ecológicas en la DO Ribeira Sacra (17.2%) y en muy baja frecuencia o ausente en Treixadura de la DO Rías Baixas. La presencia de *D. hansenii* fue muy importante (58.7%) en uvas ecológicas de la variedad Treixadura de la DO Rías Baixas. Es inusual encontrar elevadas proporciones de *D. hansenii* durante la fermentación, sin embargo, esta especie tiene actividad de biocontrol mediante la producción de toxinas *killer* frente a otros hongos y levaduras (Çorbacı y Uçar, 2017). Setati et al. (2012) también encontraron un mayor número de levaduras con potencial de biocontrol en cultivo biodinámico que en producción convencional.

Tabla 4.14. Proporción de especies (%) e índices de biodiversidad calculados en 2015 en uvas ecológicas (Eco) y convencionales (Con) de diferentes DOs y variedades.

DO-Variedad →		Mo-Trx		Mo-Men		Ri-Trx		Ri-Bra		RS-Men		RB-Alb		RB-Trx		Total, DO	
Especie ↓	Producción →	Eco	Con	Eco	Con	Eco	Con	Eco	Con	Eco	Con	Eco	Con	Eco	Con	Eco	Con
<i>Aureobasidium</i> spp.		70.5	78.4	71.3	80.7	75.9	67.4	22.5	84.1	6.7		44.9	58.0	5.3	29.9	42.44	56.91
<i>Candida apicola</i>										3.6						0.52	
<i>Candida oleophila</i>														1.4		0.21	
<i>Cryptococcus carnescens</i>		20.1		9.5		4.5								1.7		5.11	
<i>Cryptococcus laurentii</i>							27.9										3.98
<i>Cryptococcus stepposus</i>				3.2	4.1								25.2	6.1		1.33	4.19
<i>Cryptococcus terrestris</i>			9.3					65.3			27.2	16.2				11.65	5.22
<i>Cryptococcus af. victoriae</i>						2.2				2.2				3.7		1.16	
<i>Cryptococcus victoriae</i>		5.4				12.5										2.56	
<i>Cystofilobasidium macerans</i>			12.3							1.2						0.18	1.76
<i>Debaryomyces hansenii</i>								15.9				9.8		58.7		9.79	2.27
<i>Hanseniaspora uvarum</i>				1.4						39.8	26.4	23.6		15.0	53.1	11.41	11.36
<i>Issatchenkia terricola</i>														1.9		0.27	
<i>Lachancea thermotolerans</i>				3.2												0.46	
<i>Metschnikowia</i> spp.				6.3	12.1		4.8	12.2		28.0	42.1	2.3	12.1	5.4	8.7	7.72	11.40
<i>Pichia kluyveri</i>										17.2				0.9		2.58	
<i>Rhodotorula graminis</i>				3.2		4.8							4.7		5.5	1.14	1.46
<i>Rhodotorula nothofagi</i>												3.2				0.46	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>				1.8	3.1											0.26	0.44
<i>Sporobolomyces ruberrimus</i>		4.0												2.8		0.57	0.40
<i>Zygoascus hellenicus/meyerae</i>											4.3						0.61
<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>										1.2						0.18	
Índices de biodiversidad	$H' = -\sum^S p_i \ln(p_i)$	0.85	0.67	1.10	0.67	0.84	0.77	0.87	0.44	1.52	1.21	1.42	1.06	1.45	1.17	1.96	1.53
	$1 - D = 1 - \sum^S (p_i)^2$	0.46	0.36	0.48	0.33	0.40	0.47	0.51	0.27	0.73	0.68	0.71	0.58	0.62	0.62	0.77	0.64
	$E = H/\ln(S)$	0.62	0.61	0.53	0.48	0.52	0.70	0.79	0.63	0.73	0.87	0.79	0.77	0.63	0.73	0.65	0.61

Los valores son el promedio de seis datos.

La Tabla 4.13 y Tabla 4.14 también incluyen los índices de biodiversidad H' , $1-D$ y E . Los resultados globales confirmaron que la producción ecológica exhibió los mayores valores en los índices de biodiversidad de **Shannon-Wiener (H')** y **Equitabilidad (E)** en mostos ($H' = 2.32$ y $E = 0.74$) y uvas ($H' = 1.96$ y $E = 0.65$) en comparación con los viñedos convencionales ($H' = 1.93$ y $E = 0.67$ en mostos; $H' = 1.53$ y $E = 0.61$ en uvas). De manera similar, el índice de diversidad de **Simpson ($1-D$)** fue mayor en muestras ecológicas, es decir, la dominancia fue más baja ($D = 0.13$ y $D = 0.25$ en mostos ecológicos y convencionales, respectivamente; $D = 0.23$ y $D = 0.36$ en uvas ecológicas y convencionales, respectivamente). Sin embargo, considerando distintas DOs y variedades, no siempre los valores de los índices de diversidad fueron mayores en las muestras ecológicas. Aunque Shannon-Wiener (H') fue superior en muestras ecológicas, la Equitabilidad (E) y el índice de diversidad de Simpson ($1-D$) fueron más altos en algunos mostos y uvas convencionales. Estos fueron los casos para E y $1-D$ en los mostos de las dos variedades de la DO Rías Baixas y en Mencía (excepto el valor de $1-D$ en la DO Monterrei) y en la E de las uvas Treixadura de las DOs Ribeiro y Rías Baixas y Mencía de la Ribeira Sacra. La Equitabilidad es de suma importancia para preservar la estabilidad de la biodiversidad. Cabe destacar que estos valores en las muestras que exhibieron una E inferior en el cultivo ecológico son debidos a que, a pesar de la alta diversidad, la frecuencia de las distintas especies en las muestras ecológicas fue muy diferente, mientras que en cultivo convencional la frecuencia de especies fue más homogénea.

Los mayores índices de biodiversidad encontrados en las muestras ecológicas fueron ligeramente superiores a los observados previamente en uvas y mostos en España (Cordero-Bueso et al., 2011a; Tello et al., 2011) y cercanos a los descritos por Bagheri et al. (2015) en Sudáfrica. Por lo tanto, podemos afirmar que el viñedo ecológico constituye un gran reservorio natural de levaduras fermentativas de interés, con mayor cantidad y diversidad de cepas que el convencional como sugieren algunos autores (Cordero-Bueso et al., 2011b; Setati et al., 2015).

Cuando se representó de forma gráfica la frecuencia acumulativa de las distintas especies (Figura 4.10 y Figura 4.11), además de las diferencias entre muestras de cultivo ecológico y convencional, en la distribución se pudo apreciar un patrón biogeográfico característico a nivel regional. Como se indica en la Tabla 4.13, la frecuencia de *Aureobasidium* spp. fue mayor en los **mostos** convencionales de las DOs Monterrei y Ribeiro que en las otras dos DOs. Por el contrario, las levaduras fermentativas *Metschnikowia* spp. y *H. uvarum* aparecieron, en general, con una mayor frecuencia en mostos ecológicos que en convencionales y su distribución difirió entre las DOs. *Metschnikowia* spp. estuvieron más ligadas a la DO Monterrei y, en contraste, *H. uvarum* apareció en mayor proporción en las DOs Ribeira Sacra y Rías Baixas. *Cryptococcus* spp. se aisló en los mostos de la DO Ribeiro. En nuestro estudio, *H. uvarum* predominó sobre *Metschnikowia* spp. e incluso sobre *Aureobasidium* spp. en las DOs Rías Baixas y Ribeira Sacra. Sin embargo, en las DOs de Monterrei y Ribeiro, *Metschnikowia* spp. predominó sobre *H. uvarum* (Figura 4.10).

Gráficamente se aprecian las diferencias regionales en las especies minoritarias. Así, *L. thermotolerans* tuvo una contribución importante en las DOs Ribeiro y Monterrei, especialmente en mosto ecológico, mientras que *Starm. bacillaris*, *I. terricola*, *Z. hellenicus/meyerae* y diferentes especies de los géneros *Candida*, *Pichia* y *Zygosaccharomyces* estaban asociadas a las DOs Ribeira Sacra y Rías Baixas.

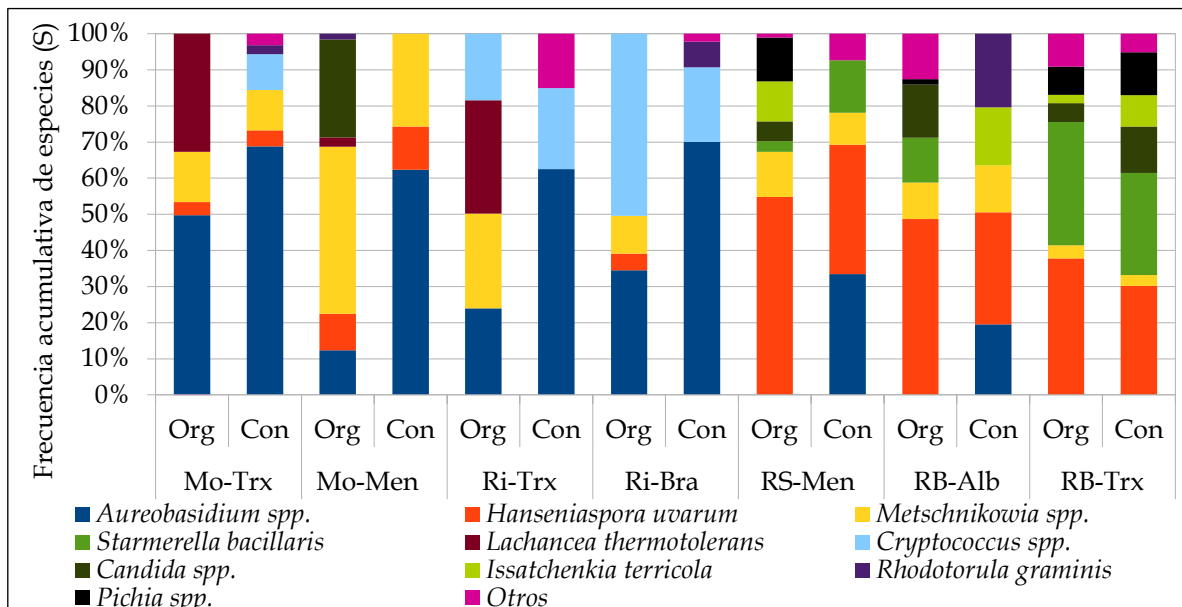


Figura 4.10. Frecuencia acumulativa de especies en mostos ecológicos y convencionales de 2015 en cuatro Denominaciones de Origen de Galicia.

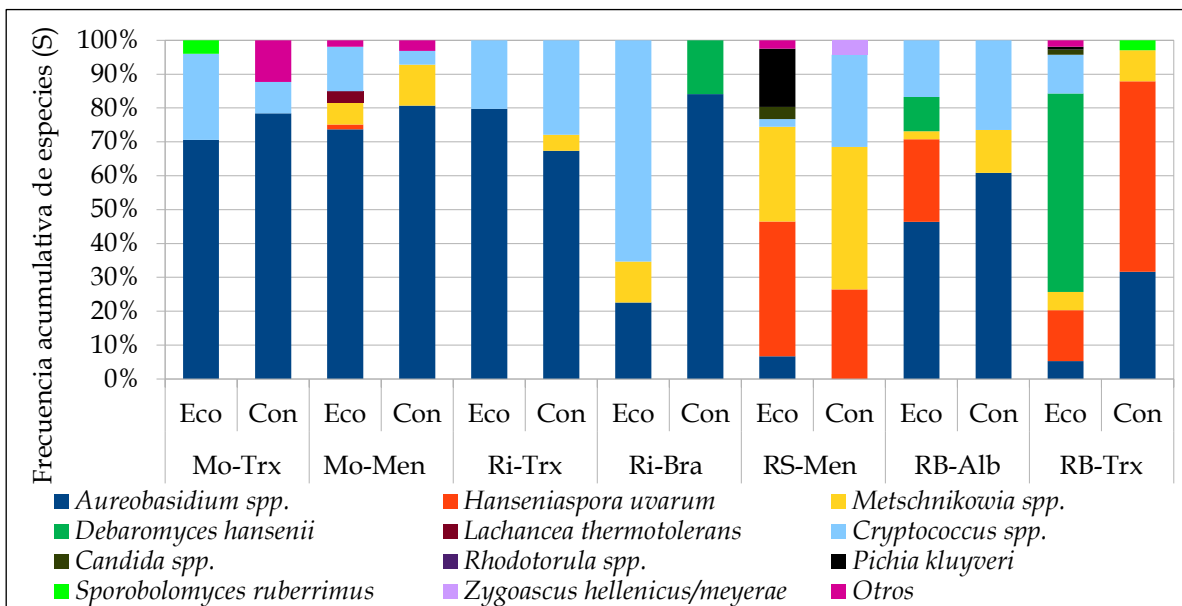


Figura 4.11. Frecuencia acumulativa de especies en uvas ecológicas y convencionales de 2015 en cuatro Denominaciones de Origen de Galicia.

En cuanto a las **uvas** se mantuvieron los patrones biogeográficos de las levaduras mayoritarias encontradas en los mostos con algunas diferencias (Figura 4.11). *Metschnikowia* spp. y *H. uvarum* aparecieron en mayor proporción en las DOs Ribeira Sacra y Rías Baixas y su frecuencia varió según el sistema de cultivo, la variedad y la DO. *Starm. bacillaris* e *I. terricola* no fueron significativas y en su lugar aparecieron otras especies

minoritarias. *D. hansenii* se encontró principalmente en uvas ecológicas de la DO Rías Baixas y *P. kluyveri* en la DO Ribeira Sacra también en uvas ecológicas. Además, en los mostos fue evidente un aumento tanto en el número como en la frecuencia de *Candida* spp. en comparación con las uvas.

La variabilidad en la frecuencia de distribución de *H. uvarum* y *Metschnikowia* spp. entre tipos de cultivo y zonas también se ha descrito para las uvas del Archipiélago de Azores (Drumonde-Neves et al., 2017), Eslovaquia (Nemcová et al., 2015) o Francia (Grangeteau et al., 2017a). Tales variaciones se han atribuido a varios factores, como la cosecha, la ubicación, el cultivar de uva y los tratamientos fitosanitarios. Los resultados demuestran que las levaduras mayoritarias presentan una distribución muy heterogénea y que su proporción varía significativamente a nivel regional tal como han descrito algunos autores (Barata et al., 2012; Loureiro y Malfeito-Ferreira, 2003). *R. graminis* apareció en mostos de todas las variedades en tres DOs a pesar de ser una especie minoritaria. También se encontraron patrones diferentes no solo entre la misma variedad en diferentes DOs sino entre variedades diferentes dentro de la misma DO.

Agrupando la frecuencia acumulativa de las especies encontradas en mosto + uva conjuntamente por DO se mantiene la diferenciación de los patrones biogeográficos. Los datos pusieron de manifiesto que, aunque las especies mayoritarias son comunes en todas las regiones, su frecuencia de distribución es diferente y, además, existen otras especies minoritarias asociadas a determinadas zonas, variedades y/o sistemas de cultivo. Especies como *C. apicola* y *Wickerhamomyces anomalus* apenas se encontraron, y cuando aparecieron, fue de forma más notable en muestras de origen ecológico. Por ejemplo, *W. anomalus* se aisló en las DOs Ribeiro y Ribeira Sacra solo en 2014 y solo en mostos de variedades tintas. Estos resultados no coinciden con los publicados por Bagheri et al. (2015), quienes demostraron que la especie *W. anomalus* dominó las fermentaciones de mosto procedente de viñedos de producción convencional integrada (que minimiza los insumos siendo más respetuosa que la agricultura convencional tradicional). Por el contrario, *Me. guilliermondii* se identificó en todas las variedades y DOs, especialmente en 2013, tanto en muestras ecológicas como convencionales.

La existencia de un patrón biogeográfico en la distribución de las levaduras está íntimamente relacionada con el concepto de *terroir microbiano*. El concepto de *terroir* implica una serie de factores que incluyen el clima, los suelos, las variedades de uva, la viticultura y las prácticas enológicas en una región determinada. Estudios recientes destacan la contribución de los microorganismos autóctonos al proceso de vinificación y su influencia en la tipicidad del vino que postula sabores y aromas en el vino propios de una región particular (Belda et al., 2017b; Bokulich et al., 2016; Gilbert et al., 2014; Knight et al., 2015). Además, las prácticas humanas en viñedos y bodegas se han correlacionado con la microbiota de uva y confirmaron la interdependencia entre el factor antropogénico y las bases microbiológicas del *terroir* (Drumonde-Neves et al., 2016; Grangeteau et al., 2017a). La incidencia de ciertas especies de levadura fermentativa no-*Saccharomyces*, especialmente en muestras ecológicas, puso de manifiesto que tales levaduras están bien adaptadas a estas áreas conformando un *terroir microbiano* que probablemente contribuya a la complejidad y característica distintiva de sus vinos.

Por último, cabe mencionar que estudios recientes revelaron diferencias en las comunidades de hongos a todas las distancias (de decenas a miles de kilómetros) (Bokulich et al., 2014; Mezzasalma et al., 2018; Miura et al., 2017; Thompson et al., 2017). Considerando la existencia de este *terroir microbiano*, es conveniente descubrir y cuantificar las similitudes entre la diversidad de las levaduras de las uvas con respecto a los hábitats controlados, como las bodegas de la misma zona. Morrison-Whittle y Goddard (2018) pusieron de manifiesto en viñedos, bodegas y bosques nativos cercanos de seis regiones vitícolas de Nueva Zelanda, una superposición entre las comunidades de levaduras de viñedos y las bodegas, incluidas las especies más abundantes tanto en mostos como en fermentaciones. También mostraron que las comunidades de levadura presentes en el mosto son similares a las uvas de la viña para cada región y que un tercio de las especies presentes en las fermentaciones se encuentran en los bosques nativos locales.

4.2.5. Contribución de las distintas especies de levaduras a la diversidad: análisis SIMPER

Para evaluar estadísticamente la contribución de las distintas especies a la diversidad global observada se realizó un análisis SIMPER (Tabla 4.15). La mayor contribución entre los mostos de cultivo ecológico y convencional se debió a *A. pullulans*, *H. uvarum* y *Metschnikowia* spp., previamente descritas como las especies dominantes. *Starm. bacillaris*, *L. thermotolerans*, *Cr. terrestris* y *C. apicola* también fueron importantes. Estas especies principales también fueron las contribuyentes fundamentales en las uvas, pero con un mayor porcentaje de *Cryptococcus* spp., y una notable presencia de *D. hansenii*.

Tabla 4.15. Contribución de las diez especies de levaduras mayoritarias (obtenida por análisis SIMPER): A) en mostos, B) en uva.

Especies (A)	Disimilaridad media	% Contribución	% Acumulativo	Media Eco	Media Con
<i>Aureobasidium pullulans</i>	16.950	24.620	24.62	0.1530	0.4220
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	10.810	15.700	40.32	0.2280	0.1620
<i>Metschnikowia</i> spp.	6.595	9.582	49.91	0.1740	0.0884
<i>Starmarella bacillaris</i>	5.090	7.396	57.30	0.0707	0.0611
<i>Lachancea thermotolerans</i>	4.755	6.909	64.21	0.0951	0.0000
<i>Cryptococcus terrestris</i>	2.922	4.246	68.46	0.0484	0.0141
<i>Candida apicola</i>	2.528	3.674	72.13	0.0482	0.0069
<i>Cryptococcus laurentii</i>	2.251	3.271	75.40	0.0050	0.0429
<i>Cryptococcus victoriae</i>	2.248	3.266	78.67	0.0450	0.0000
<i>Issatchenkia terricola</i>	2.221	3.227	81.89	0.0191	0.0352
Especies (B)					
<i>Aureobasidium pullulans</i>	17.290	28.510	28.51	0.3910	0.5410
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	8.399	13.850	42.36	0.1140	0.1140
<i>Cryptococcus terrestris</i>	7.167	11.820	54.18	0.1160	0.0522
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	5.654	9.324	63.50	0.0772	0.1110
<i>Debaryomyces hansenii</i>	5.504	9.076	72.58	0.0979	0.0227
<i>Cryptococcus carnescens</i>	2.555	4.214	76.79	0.0511	0.0000
<i>Cryptococcus stepposus</i>	2.421	3.992	80.78	0.0133	0.0419
<i>Aureobasidium proteae</i>	2.326	3.836	84.62	0.0339	0.0285
<i>Cryptococcus laurentii</i>	1.991	3.283	87.90	0.0000	0.0398
<i>Pichia kluyveri</i>	1.289	2.126	90.03	0.0258	0.0000

Cinco especies de las levaduras anteriormente mencionadas en los mostos ecológicos y cuatro en los convencionales explicaron más del 70% de su porcentaje acumulativo.

A. pullulans es una especie común del ecosistema de la vid a nivel global y se ha demostrado que está presente entre las comunidades de hongos endofíticos y epifíticos. En nuestro estudio, encontramos que este hongo dimórfico (filamentoso similar a la levadura) es el más abundante aislado de la superficie de la uva coincidiendo con los datos publicados por otros autores donde representaba más del 50% de los aislamientos de levadura (Setati et al., 2012 y 2015). *A. pullulans* se ha aislado comúnmente en mosto de uva después del estrujado (Wang et al., 2015). Además, se ha descrito previamente en mostos una disminución de las proporciones de *Aureobasidium* spp. y la presencia de algunos géneros que no habían aparecido en las uvas (Grangeteau et al., 2017a). Algunos investigadores han observado una mayor frecuencia de *Aureobasidium* spp. en los viñedos ecológicos que en los convencionales. Otros autores mostraron una distribución similar de *A. pullulans* en viñedo convencional, integrado y biodinámico. El predominio de este hongo en la superficie de la uva se ha atribuido a su resistencia a fungicidas, la capacidad de detoxificar CuSO_4 y la capacidad de competir contra otros hongos (Comitini y Ciani, 2008; Schmid et al., 2011; Setati et al., 2012).

Con respecto a la influencia del sistema de cultivo en la aparición de ciertas especies de levaduras, los datos disponibles difieren entre los distintos estudios. Por ejemplo, Martins et al. (2014) y Schmid et al. (2011), encontraron mayor abundancia de *Aureobasidium* en muestras ecológicas con diferencias estructurales y funcionales entre los dos sistemas agrícolas. Martins et al. (2014) correlacionaron negativamente el mayor contenido de cobre en el viñedo convencional como causa; constataron que los residuos de cobre inhiben la comunidad epífita de levaduras y hongos dimórficos *Aureobasidium* spp. Sin embargo, nuestros resultados mostraron frecuencias más elevadas y una distribución más amplia de *Aureobasidium* en muestras convencionales en consonancia con lo observado por Comitini y Ciani (2008). Curiosamente, *Aureobasidium* puede utilizar y, de este modo, detoxificar CuSO_4 y otros fungicidas inorgánicos a base de cobre o azufre (los únicos permitidos y típicamente utilizados en la agricultura ecológica pero que también son aplicados en los tratamientos fúngicos del viñedo convencional en Galicia). Además, *A. pullulans* es un potente antagonista bien estudiado de varios hongos patógenos cuyos mecanismos del antagonismo incluyen la competencia por los nutrientes y el espacio y la producción de enzimas que degradan la pared celular. Esta capacidad, junto con la menor disponibilidad de mosto, pueden explicar la menor diversidad de levaduras presentes en las bayas y el fuerte dominio de la especie *A. pullulans* en viñedos protegidos con fungicidas inorgánicos en ambos sistemas de cultivo. Comitini y Ciani (2008) demostraron en dos añadas consecutivas que *A. pullulans* fue la especie predominante, seguida por *Cryptococcus* spp. en viñedos en los que se usaron fungicidas orgánicos (además de la aplicación de fungicidas inorgánicos), mientras que las levaduras fermentativas apenas estuvieron representadas.

Por otro lado, el empleo de algunos plaguicidas de uso común en la gestión del viñedo convencional como el herbicida glifosato podría haber estimulado la aparición de poblaciones de levaduras (incluidas cepas fermentativas), ya que podrían haber usado este

glifosato como nutriente, así como un sustrato energético de acuerdo con las investigaciones de Cordero-Bueso et al. (2011b). Por el contrario, la diversidad, distribución y frecuencias de las especies del género *Cryptococcus* fueron más elevadas en producción ecológica (tratamiento con fungicidas inorgánicos), coincidiendo con lo descrito por Comitini y Ciani (2008) y más recientemente por Grangeteau et al. (2017a), probablemente ocupando el espacio dejado por los hongos negros levaduriformes *Aureobasidium* spp. Comitini y Ciani (2008) demostraron que los efectos de los tratamientos fungicidas orgánicos (convencionales) aplicados a las uvas durante la maduración reducen la cantidad y diversidad de levadura, favoreciendo el desarrollo de los géneros *Aureobasidium* o *Cryptococcus* en detrimento de otras especies.

H. uvarum mostró una alta frecuencia en mostos y uvas de viñedos bajo diferente manejo agronómico tal y como se ha recogido en otros trabajos (Bagheri et al., 2015; Milanović et al., 2013). Drumonde-Neves et al. (2017) encontraron *H. uvarum* y *Metschnikowia* spp. como especies principales, pero también identificaron *Pichia terricola* (sinónimo de *I. terricola*) y *Starm. bacillaris* a altas frecuencias. También se ha observado cierta resistencia de la especie *Starm. bacillaris* al cobre y de *Metschnikowia* spp. al azufre (Grangeteau et al., 2017b; Schmid et al., 2011). Los géneros *Metschnikowia* y *Hanseniaspora* se han asociado principalmente con la producción convencional en algunos casos (Grangeteau et al., 2017a; Milanović et al., 2013). Por el contrario, estos géneros se aislaron principalmente en parcelas controladas (no tratadas) y ecológicas por Comitini y Ciani (2008) quienes encontraron además que, en ausencia de tratamientos con fungicidas, *H. uvarum* fue la especie dominante, seguida de *M. pulcherrima*. La incidencia de *Metschnikowia* spp. en Galicia fue más baja en uvas ecológicas, pero no en los mostos. Como se discutió previamente, estas diferencias en la incidencia de ciertas especies se han atribuido al impacto de los tratamientos con dosis altas de fungicidas a base de cobre en viñedos ecológicos, pero también a una posible interacción entre microorganismos. En ese sentido, Setati et al. (2012) sugirieron que la producción ecológica implica un aumento en la riqueza de especies, incluidas muchas levaduras con potencial de control biológico como *H. uvarum*, *Metschnikowia* spp., *I. terricola* o *A. pullulans* (Guzzon et al., 2014; Raspor et al., 2010).

En este sentido, la presencia de especies débilmente fermentativas también puede explicarse debido a la disponibilidad de nutrientes relacionados con el exudado de azúcar en la superficie de la baya, que aumentó con la maduración de las uvas tal y como ha sido recogido en la bibliografía (Barata et al., 2012; Sipiczki, 2016).

En conclusión, nuestros resultados apoyan la hipótesis de que los fungicidas, especialmente los orgánicos aplicados sobre la superficie de la uva dan como resultado una reducción drástica de la población de levaduras y un cambio en las poblaciones hacia *A. pullulans*, pero también posiblemente debido a otros factores relacionados entre sí como el establecimiento de enemigos naturales y enfermedades, competencia con otros microorganismos, disponibilidad de nutrientes sobre las bayas, etc.

4.2.6. Influencia de los factores año, variedad, DO y sistema de cultivo sobre la población de levaduras

El análisis de similitud (ANOSIM) permitió evaluar la existencia de diferencias estadísticamente significativas en la población de levaduras entre años, variedades, DOs y sistemas de cultivo entre las muestras de mosto y uva. Los componentes de cálculo se realizaron por parejas (binomios).

Cuando se evaluó la **influencia del año** sobre la **riqueza de especies** se encontraron diferencias significativas en el análisis general ($p = 0.0113$, $R = 0.2199$), y entre los grupos 2013-2015 ($p = 0.0274$, $R = 0.3750$) y 2014-2015 ($p = 0.0273$, $R = 0.3333$), pero no entre 2013-2014 ($p = 0.7448$, $R = -0.1667$). Sin embargo, los valores de R no fueron elevados en ningún caso, lo que indica que el factor año no tiene una influencia fuerte sobre la riqueza de especies en el conjunto de muestras (uva y mostos) de todas las variedades y DOs.

Cuando se determinó la influencia del factor **variedad** no se observaron diferencias significativas en la riqueza de especies ($p = 0.4719$; $R = -0.01854$). Las variedades tintas Brancellao y Mencía entre sí mostraron la menor similitud en la riqueza de especies ($p = 0.1964$; $R = 0.2143$) mientras que el resto de variedades mostraron valores de R en torno a 0 (por ejemplo, en el binomio Albariño-Brancellao: $R = 0$, $p = 1$). Esto indica, si cabe, una mayor debilidad del factor variedad que el factor año en cuanto a su influencia sobre la riqueza de especies en uva y mostos que explicaría estos inesperados resultados.

El factor **DO** mostró diferencias significativas para la riqueza de especies y una fortaleza mayor que los factores años y variedad ($p = 0.0021$; $R = 0.4656$). Se encontraron diferencias significativas entre las DOs Rías Baixas y Ribeiro ($p = 0.0285$). El resto de DOs mostraron una significación similar con diferencias que se podrían considerar significativas en función del número de permutaciones aplicadas ($0.052 < p < 0.068$) a excepción del binomio DOs Ribeira Sacra-Rías Baixas que no presentaron diferencias significativas y valor R negativo ($p = 0.5302$; $R = -0.125$). Los binomios DOs Ribeira Sacra-Monterrei y Ribeira Sacra-Ribeiro tuvieron la menor similitud ($R = 1$ en ambos casos), seguido del ya mencionado Rías Baixas-Ribeiro y Rías Baixas-Monterrei con un valor de R similar ($R = 0.4844$ y $R = 0.4115$, respectivamente).

Curiosamente, el factor **sistema de cultivo** no mostró diferencias significativas ni similitud cuando se comparó el conjunto de datos de la riqueza de especies ($p = 0.1624$; $R = 0.07337$). Se hizo necesaria una agrupación de los datos para observar mejor las diferencias.

En cuanto a las agrupaciones de los factores **DO + sistema de cultivo** se encontraron diferencias significativas en el conjunto ($p = 0.0108$, $R = 0.3889$) pero no entre binomios; lo mismo ocurrió en la agrupación **DO + variedad** ($p = 0.0375$, $R = 0.3418$). Las agrupaciones con menos diferencias entre sí ($p = 1$) se establecieron entre las muestras de ambos sistemas de cultivo tanto de la DO Monterrei como de la DO Ribeiro y en el binomio DO Monterrei convencional-DO Ribeiro ecológico. La menor similitud se observó en los binomios DO Rías Baixas ecológico con la DO Monterrei de ambos sistemas de cultivo ($R = 1$). Las agrupaciones de DO y variedad con menos diferencias entre sí fueron las dos variedades de cada DO entre sí y las dos variedades que no tuvieron repetición en diferente DO (Albariño y Brancellao). Por lo tanto, la variedad Mencía de la DO Ribeira Sacra tuvo la

menor similitud (valor máximo de $R = 1$) con las dos variedades de la DO Ribeiro y de la DO Monterrei.

En cuanto a la agrupación de los factores **variedad + sistema de cultivo** no se encontraron diferencias significativas ($p = 0.6952$; $R = -0.125$). Las agrupaciones con menos diferencias entre sí ($p = 1$) fueron la variedad Mencía entre los dos sistemas de cultivo. De cualquier modo, la agrupación de los factores variedad y sistema de cultivo es muy débil en cuanto a su influencia sobre la riqueza de especies (todos los valores de $R < 0.1$).

Por otro lado, también se aplicó la prueba ANOSIM para evaluar la influencia de los distintos factores sobre la **frecuencia de las distintas especies** en el mosto de 2015. Se consideraron los valores con diferencias significativas en los que además R fue lo suficientemente alto como para considerar que ejerce un efecto sobre las variables y es realmente importante. Se encontraron diferencias significativas entre el **sistema de producción** ecológico y convencional para todas las DOs, excepto en la DO Ribeira Sacra, aunque el p -valor fue próximo al nivel de significación ($p = 0.067$) (Tabla 4.16). El sistema de cultivo influyó marcadamente en la comunidad de levaduras de la DO Ribeiro y, en menor medida, en la DO Ribeira Sacra. En las uvas, las diferencias en la población de levaduras no fueron tan notorias (Tabla 4.16B). En cuanto a la influencia del factor **DO**, en general, cuando se comparó la población de levaduras de los mostos de la DO Ribeira Sacra y de la DO Rías Baixas no se encontraron diferencias significativas al aplicar la corrección de Bonferroni; y, además, la prueba ANOSIM presentó similitud entre ambas (valores del estadístico R bajos), pero sí difirió de las otras dos DOs: Ribeiro y Monterrei (valores de R altos).

Tabla 4.16. ANOSIM de la frecuencia de especies entre DO y sistema de producción: en mosto (A) y uva (B) en 2015.

A (mostos)	Mo-Eco	Mo-Con	Ri-Eco	Ri-Con	RS-Eco	RS-Con	RB-Eco	RB-Con
Mo-Eco		0.2771	0.2925	0.5782	0.5641	0.2620	0.8301	0.5981
Mo-Con	0.0140		0.6165	0.6987	1	0.6355	1	0.8284
Ri-Eco	0.0084	0.0028		0.8754	1	0.7445	0.9996	0.8573
Ri-Con	0.0028	0.0028	0.0028		1	0.7483	1	0.9463
RS-Eco	0.0028	0.0056	0.0028	0.0028		0.5111	0.5278	0.1111
RS-Con	0.6972	0.0084	0.0028	0.0028	0.0644		0.4119	0.2503
RB-Eco	0.0028	0.0028	0.0028	0.0028	0.0476	0.0672		0.3637
RB-Con	0.0028	0.0028	0.0028	0.0028	1	0.9212	0.0028	
B (uvas)	Mo-Eco	Mo-Con	Ri-Eco	Ri-Con	RS-Eco	RS-Con	RB-Eco	RB-Con
Mo-Eco		0.1846	0.1766	0.3094	0.989	1	0.6572	0.3758
Mo-Con	0.2044		0.1856	0.2054	1	1	0.6507	0.5353
Ri-Eco	0.3416	0.252		0.241	0.6437	0.5617	0.4402	0.29
Ri-Con	0.0028	0.028	0.0672		1	1	0.6536	0.536
RS-Eco	0.0028	0.0056	0.0028	0.0028		0.4963	0.5072	0.5256
RS-Con	0.0056	0.0028	0.014	0.0028	0.0476		0.5573	0.6494
RB-Eco	0.0028	0.0028	0.0056	0.0028	0.014	0.0084		0.3776
RB-Con	0.0056	0.0028	0.042	0.0028	0.0952	0.0140	0.0308	

Los valores del estadístico R se muestran encima de la diagonal y el nivel de significancia (p -valor) con la corrección de Bonferroni se muestra debajo de la diagonal.

El ANOSIM realizado en mostos entre **DO y variedad** mostró diferencias significativas y valores altos de R (muy baja similitud) para la DO Ribeiro y, en menor medida para la DO Monterrei, en la comparación con las DOs Ribeira Sacra y Rías Baixas para todas las variedades (Tabla 4.17). El ANOSIM realizado con los datos de las uvas no

siguió la misma tendencia en la variedad Albariño de la DO Rías Baixas (valores de R más bajos comprendidos en el intervalo 0.2113-0.4639), pero mostró valores de R más elevados para la variedad Mencía de la DO Ribeira Sacra. Además, la variedad Albariño mostró un valor alto de R en la confrontación con la variedad tinta de la DO Ribeira Sacra.

Tabla 4.17. ANOSIM de la frecuencia de especies comparando DO y variedad: en mosto (A) y uva (B) en 2015.

A	Mo-Trx	Mo-Men	Ri-Trx	Ri-Bra	RS-Men	RB-Alb	RB-Trx
Mo-Trx		0.2192	0.2155	0.1841	0.4723	0.6939	0.8819
Mo-Men	0.0315		0.2729	0.3694	0.5785	0.6762	1
Ri-Trx	0.2352	0.0777		0.1513	0.7348	0.7973	1
Ri-Bra	0.1386	0.0084	0.735		0.6785	0.7908	0.979
RS-Men	0.0042	0.0042	0.0021	0.0042		0.1081	0.4721
RB-Alb	0.0021	0.0021	0.0021	0.0021	0.9492		0.5685
RB-Trx	0.0021	0.0021	0.0021	0.0021	0.0021	0.0021	
B							
Mo-Trx		0.5434	0.2901	0.286	0.9949	0.321	0.8237
Mo-Men	0.0021		0.2719	0.3007	0.9838	0.4639	0.8215
Ri-Trx	0.0042	0.0021		0.2163	0.9935	0.4474	0.8324
Ri-Bra	0.0105	0.0063	0.0987		0.6943	0.2113	0.5065
RS-Men	0.0021	0.0021	0.0021	0.0021		0.7674	0.5479
RB-Alb	0.0042	0.0021	0.0021	0.1806	0.0021		0.4913
RB-Trx	0.0021	0.0021	0.0021	0.0042	0.0021	0.0021	

Los valores del estadístico R se muestran encima de la diagonal y el nivel de significancia (p-valor) con la corrección de Bonferroni se muestra debajo.

El ANOSIM calculado en mostos entre **sistema de producción y variedad** solo mostró baja similitud entre Mencía ecológica y las variedades Albariño convencional ($R = 0.9259$) y Brancellao de ambos sistemas de cultivo ($R_{eco} = 0.7438$, $R_{con} = 0.8981$). De forma análoga ocurrió en uva para el mismo binomio que solo mostró una baja similitud entre Albariño con respecto a Brancellao para ambos sistemas de producción ($R = 0.7537$ - 0.9556) y también entre producción convencional y ecológica de las muestras de uva Albariño ($R = 0.863$).

Cuando se compararon todos los datos agrupados en bloques, las diferencias se dispararon. El análisis **DO/DO en mosto** solo mostró valores de R elevados (superiores a 0.4784), en la comparación de la DO Ribeiro con respecto a DO Rías Baixas y DO Ribeira Sacra ($R = 0.9017$ y $R = 0.7283$, respectivamente) y en la confrontación DO Monterrei con la DO Rías Baixas ($R = 0.7567$). De igual forma, el análisis **DO/DO en uva** solo mostró valores de R elevados (superiores a 0.4126), en la comparación de la DO Ribeira Sacra con respecto a DO Monterrei y DO Ribeiro ($R = 0.9843$ y $R = 0.7846$, respectivamente). En el análisis **variedad/variedad** solo en los mostos de la variedad Albariño con respecto a la variedad Brancellao tuvo valores de R superiores a 0.4184 ($R = 0.7908$). Así mismo, aunque las diferencias fueron significativas para el conjunto **sistema de producción** (ecológico/convencional), los valores globales de R fueron muy bajos (sin separación o sin influencia) en la prueba ANOSIM ($p = 0.0217$, $R_{mosto} = 0.0413$; $p = 0.0001$, $R_{uva} = 0.1739$).

Cuando el número de variables no es el mismo en cada grupo de muestras (ya que, por ejemplo, hay más muestras de Treixadura que del resto de variedades o de mosto que de uva) podría ocurrir que una parte del efecto atribuido a cada factor fuera debido a esta diferencia.

Tabla 4.18. ANOSIM de doble vía para los factores DO, sistema de cultivo y variedad en la frecuencia y riqueza de especies (S).

Two-way ANOSIM	Frecuencia (%)				Riqueza de especies (S)*			
	Variedad	Cultivo	DO	Cultivo	Variedad	Cultivo	DO	Cultivo
Permutación N: 9999								
R	0.16428	0.51302	0.60001	0.37741	-0.26471	0.85648	0.62037	0.6875
p	0.0006	0.0001	0.0001	0.0001	0.883	0.8004	0.0126	0.3365

* Se utilizaron datos de todas las muestras: mosto y uva de todos los años.

Cuando se aplicó el **ANOSIM de doble vía**, que permite estudiar simultáneamente los efectos de dos fuentes o factores de variación, los resultados mostraron diferencias significativas en todos los factores (DO, variedad y sistema de cultivo) para los datos de frecuencia (Tabla 4.18). Sin embargo, solo revelaron diferencias significativas para las DOs cuando se utilizaron los datos de la riqueza de especies. Esto confirma que el factor DO es más fuerte e influyente sobre la diversidad de levaduras que el sistema de cultivo y además la frecuencia de las diferentes especies encontradas en cada región es más importante que el número de especies identificadas durante los tres años. Los resultados aportados por ANOSIM están en consonancia con lo descrito previamente.

Las diferencias en la riqueza y frecuencia de especies debidas a los factores año, variedad, DO y sistema de producción, así como la interacción entre ellos se analizó también mediante *PERMANOVA*. *PERMANOVA* es mucho más robusto que ANOSIM para probar las diferencias en cuanto a las correlaciones y las varianzas heterogéneas (Anderson y Walsh, 2013). *PERMANOVA*, al contrario que ANOSIM, no se ve afectada en gran medida por la heterogeneidad ni por las diferencias en la estructura de correlación. Es, generalmente, más poderoso que ANOSIM para detectar cambios en la estructura de la comunidad. Las diferencias en la construcción subyacente de estos estadísticos resultan en diferencias en la naturaleza de la hipótesis nula, su sensibilidad a la heterogeneidad y su poder para detectar cambios en las comunidades ecológicas. Para diseños equilibrados, *PERMANOVA* identifica rigurosamente la disimilaridad. ANOSIM es una prueba de similaridad más "ómnibus", sensible a las diferencias en la ubicación, dispersión o estructura de correlación entre los grupos.

Cuando se evaluó la **influencia del año** sobre la **riqueza de especies** *PERMANOVA* mostró un valor superior que ANOSIM de $p = 0.0501$, que consideramos significativo entre el conjunto de todos los años con un valor $F = 1.745$. Al igual que ANOSIM mostró diferencias significativas entre los años 2013-2015 ($p = 0.0263$, $F = 2.078$) y no entre 2013-2014 ($p = 0.9125$, $F = 0.1690$). Sin embargo, en contraposición con ANOSIM tampoco devolvió diferencias significativas para la riqueza de especies entre 2014-2015 ($p = 0.120$, $F = 0.1817$). Además, *PERMANOVA* mostró si cabe una más alta similitud entre la riqueza de especies de 2013 y 2014.

El *PERMANOVA* aplicado al factor **variedad** no devolvió diferencias significativas. Los valores de significancia ($p = 0.4415$; $F = 0.9513$) fueron análogos a los obtenidos con el ANOSIM. También las variedades que mostraron una mayor disimilitud fueron las variedades tintas Brancellao y Mencía ($p = 0.1942$; $F = 0.2581$), sin embargo, fueron las variedades Albariño y Mencía (y no Albariño y Brancellao) las que mostraron una disimilitud menor en la prueba *PERMANOVA* ($p = 0.798$; $F = 0.388$). Como en el ANOSIM, los valores de F para el factor año y variedad no fueron elevados en ningún caso,

confirmando la debilidad del factor año y, si cabe, mayor debilidad del factor variedad, en cuanto a su influencia sobre la riqueza de especies en uva y mostos. Recientemente, Mezzasalma et al. (2018) tampoco encontraron una correlación significativa en el PERMANOVA realizado entre los cultivares y su perfil de microbioma ($p > 0.05$) considerando el panel de muestreo general. Sin embargo, detectaron una ligera estructuración de cultivares en cada localidad, incluyendo muestras de uva en España que mostraron una diferencia significativa entre el perfil de microbioma de las variedades Sauvignon Blanc y Cabernet Sauvignon.

Los factores **DO** y **sistema de cultivo** por separado mostraron en el PERMANOVA valores muy similares a los obtenidos con ANOSIM en todos los casos. Mostró diferencias significativas entre la riqueza de especies de cada región y una fortaleza mayor que los factores años y variedad ($p = 0.0066$; $F = 5.217$) pero no entre las muestras de origen ecológico y convencional ($p = 0.1168$; $F = 2.344$). Algunos autores también encontraron diferencias significativas entre los patrones biogeográficos del microbioma con los valores de F más altos para el factor geográfico, muy similares a los obtenidos por nosotros ($p < 0.001$; $F = 5.8$) en el PERMANOVA (Bokulich et al., 2014; Mezzasalma et al., 2018).

En la agrupación de los factores **DO + variedad**, al igual que en los resultados del ANOSIM, se encontraron diferencias significativas en el conjunto ($p = 0.0375$; $F = 2.962$) pero no entre binomios. Sin embargo, solo atribuyó un valor máximo de $p = 1$ entre la agrupación de las dos variedades de la DO Monterrei entre sí (Mencía y Treixadura), pero no entre las dos variedades de la DO Ribeiro ($p = 0.3349$) ni tampoco entre Albariño y Brancellao ($p = 0.335$). En cuanto a la agrupación de los factores **DO + sistema de cultivo** el PERMANOVA encontró diferencias significativas ($p = 0.0064$; $F = 5.052$) con valores similares a ANOSIM y también entre binomios. Igualmente, PERMANOVA coincidió con ANOSIM para la agrupación de los factores **variedad + sistema de cultivo** donde no encontró diferencias significativas ($p = 0.6476$; $F = 0.6752$).

Por lo tanto, se puede afirmar que la DO es el factor más influyente sobre la riqueza de especies, seguido, en menor medida, del sistema de cultivo, el año y la variedad.

En cuanto a la influencia de los factores sobre la **frecuencia de especies**, todos los PERMANOVA mostraron diferencias significativas con valores generales de $p = 0.0001$ y F en el rango 6-16 para todos los factores o grupos analizados corroborando los resultados de ANOSIM. Al igual que con ANOSIM se aplicó la corrección de Bonferroni para visualizar mejor las variaciones en las diferencias significativas entre algunos de los binomios. El valor F no se modifica.

Los mostos convencionales de las **DOs** Ribeira Sacra y Rías Baixas fueron los más parecidos cuyo valor de p fue el único > 0.05 cuando no se aplicó la corrección de la significación. Cuando se comparó la población de levaduras de los **mostos** de la DO Ribeira Sacra y de la DO Rías Baixas no se encontraron diferencias significativas al aplicar la corrección de Bonferroni para ambos sistemas de cultivo (Tabla 4.19A). El PERMANOVA tampoco mostró diferencias significativas entre los mostos convencionales de la DO Ribeira Sacra y los mostos de la DO Monterrei ni entre las frecuencias de los mostos ecológicos de la DO Monterrei y Ribeiro.

Tabla 4.19. PERMANOVA de la frecuencia de especies entre DO y sistema de producción en mostos (A) y uva (B) en 2015.

A	Mo-Eco	Mo-Con	Ri-Eco	Ri-Con	RS-Eco	RS-Con	RB-Eco	RB-Con
Mo-Eco		5.759	2.476	9.696	6.832	2.772	12.2	6.956
Mo-Con	0.0532		15.64	10.39	58.51	9.095	74.34	35.63
Ri-Eco	1	0.0028		21.77	18.43	5.941	26.87	14
Ri-Con	0.0056	0.0028	0.0028		70.65	12.71	86.21	42.4
RS-Eco	0.0056	0.0028	0.0056	0.0056		3.529	6.041	4.731
RS-Con	0.9044	0.154	0.0336	0.0728	0.574		4.034	2.359
RB-Eco	0.0028	0.0028	0.0028	0.0028	0.1288	0.308		4.826
RB-Con	0.0028	0.0028	0.0028	0.0028	0.0728	1	0.1596	
B	Mo-Eco	Mo-Con	Ri-Eco	Ri-Con	RS-Eco	RS-Con	RB-Eco	RB-Con
Mo-Eco		4.053	4.665	5.096	24.52	35.48	17.47	4.908
Mo-Con	0.2268		5.266	3.466	40.38	61.23	25.7	7.444
Ri-Eco	0.7504	0.714		6.445	8.499	7.508	7.75	3.787
Ri-Con	0.056	0.3444	0.1708		31.1	44.31	21.1	7.871
RS-Eco	0.0084	0.0056	0.0252	0.0028		4.387	7.267	4.828
RS-Con	0.0084	0.0056	0.084	0.0028	0.056		9.991	7.954
RB-Eco	0.0028	0.0056	0.0168	0.0056	0.0168	0.0028		5.406
RB-Con	0.0168	0.0028	0.5712	0.0028	0.3948	0.0616	0.1092	

Los valores del estadístico F se muestran encima de la diagonal y el nivel de significancia (p-valor) con la corrección de Bonferroni se muestra debajo de la diagonal.

En cuanto a la significación en las muestras de **uva** se encontraron algunas diferencias con respecto a los mostos. En general la significación en la uva convencional de la DO Ribeira Sacra fue la opuesta a los mostos. No hubo diferencias significativas entre las DOs Ribeiro y Monterrei para ambos sistemas de cultivo. Por otro lado, la prueba PERMANOVA, en consonancia con ANOSIM, presentó los valores del estadístico F más altos en **mostos y uvas ecológicos** de las DOs Ribeira Sacra (F = 58.51-70.65 en mostos y F = 40.38-31.10 en uvas) y Rías Baixas (F = 74.34-86.21 en mostos y F = 25.70-21.10 en uvas) en la comparación con las convencionales de las DOs Monterrei y Ribeiro, respectivamente. Además, F también tuvo valores elevados en los **mostos convencionales** de la DO Rías Baixas (F = 35.63-42.40) comparados con los de las DOs Monterrei y Ribeiro para el mismo sistema de cultivo; en las **uvas convencionales** también F fue elevado en las comparaciones entre las DOs Ribeira Sacra y la DO Monterrei (F = 24.52-61.23) para ambos sistemas de cultivo y entre uvas convencionales de la DO Ribeiro (F = 44.31). Los valores de F en el resto de muestras oscilaron en el rango 2.35-21.77.

Se observaron otras diferencias con ANOSIM. En la comparativa **DO-variedad** aplicando la corrección de Bonferroni cabe mencionar que no se encontraron diferencias significativas principalmente entre los mostos de las DOs Ribeiro y Monterrei para ambas variedades, excepto entre las variedades tintas entre sí; tampoco entre los mostos de Albariño y Mencía de las DOs Rías Baixas y Ribeira Sacra, respectivamente. En la comparativa **variedad-sistema de cultivo** no se encontraron diferencias significativas en la mayor parte de los binomios entre muestras. Esto confirma que el factor variedad es más débil que los factores DO y sistema de producción también en cuanto a su influencia sobre la frecuencia de especies encontradas. Los resultados del PERMANOVA sin aplicar esta corrección indicaron que únicamente no había diferencias significativas entre los mostos de las variedades Mencía y Treixadura de origen convencional. En las uvas estos resultados se acrecentaron aún más ya que PERMANOVA solo mostró diferencias significativas entre

Brancellao ecológico y Mencía ecológica y entre Mencía ecológica y Treixadura de ambos sistemas de cultivo. El valor más alto de $F = 106.10$, que destacó sobremanera sobre los demás ($F_{\text{medio}} = 9.03$), se encontró entre el mosto Albariño ecológico y Brancellao convencional; también fue de los mayores valores de F en uva. Otros valores altos de F se encontraron en la comparación entre mostos de Albariño y Brancellao de igual sistema de cultivo ($F_{\text{ecológico}} = 28.77$ y $F_{\text{convencional}} = 32.13$). Esto muestra cierta influencia del factor variedad más allá del sistema de cultivo sobre la frecuencia de especies. Además, la comparación entre los **dos sistemas de cultivo entre sí** de Brancellao mostraron un valor similar en mosto y uva ($F = 21.12$ y $F = 21.41$, respectivamente) e igualmente en Albariño ($F = 12.97$ y $F = 9.92$, respectivamente). Los mostos ecológicos de Brancellao con respecto a Mencía mostraron un valor de $F = 18.87$. El resto de valores de F entre variedades y sistemas de cultivo fueron muy inferiores tanto en mosto como en uva oscilando entre $F = 0.95$ - 12.73 .

Cuando los microorganismos alcanzan la baya, establecen y comienzan a interactuar con la piel del fruto, entre la capa cerosa externa de la baya que es útil para prevenir la pérdida de agua por evaporación y la capa de hipodermis (Mezzasalma et al., 2018). Se sabe que la cantidad de capas de piel de las bayas de uva y su grosor son específicas del cultivar, incluida la capa cerosa natural. Estas características físicas podrían influir en el contacto y la permeabilidad de la cutícula de la uva a diferentes microorganismos como se observa para algunos patógenos como *Botrytis cinerea* (Herzog et al., 2015). De acuerdo con los datos recogidos en La Misión Biológica (CSIC) y en Díaz Losada et al. (2011) Brancellao es extremadamente sensible al oídio, Albariño es muy sensible, Treixadura es moderadamente sensible y Mencía es sensible. En cuanto al mildiu, las cuatro variedades son moderadamente sensibles siendo Brancellao la menos sensible. Frente a la *Botrytis*, Treixadura y Mencía son moderadamente sensibles mientras que Brancellao y Albariño son poco sensibles. Albariño y Brancellao tienen una epidermis fina, pero con hollejo grueso y abundante pruina mientras que Treixadura y Mencía tienen epidermis, hollejo y cantidad de pruina medios. Nuestra hipótesis sugiere que esta variación que diferencia entre las variedades Albariño-Brancellao y Mencía-Treixadura, podría explicar parte de la influencia de la variedad sobre la diversidad de levaduras.

Por otra parte, también la aparición de antocianinas podría tener influencia sobre la microbiota de la uva debido a las propiedades antimicrobianas de este grupo de moléculas (Apolinar-Valiente et al., 2017). En este estudio, solo se analizaron los compuestos antocianínicos de los cultivares de uva tinta (apartado 4.1.5) ya que, en los vinos blancos, su presencia no es significativa. La variedad Brancellao tuvo una concentración inferior de antocianos que la variedad Mencía durante las tres campañas. Además, de entre las muestras de uva Mencía, las de la DO Ribeira Sacra (mayor diversidad de especies) presentaron mayor concentración que las de la DO Monterrei. En cuanto al sistema de cultivo las uvas de Brancellao y Mencía de la DO Monterrei ecológicas presentaron mayor concentración de estos compuestos que sus respectivas convencionales, mientras que en las uvas Mencía de la DO Ribeira Sacra fueron las convencionales las que tuvieron una mayor concentración de antocianos. Esto explicaría parte de las diferencias encontradas en los análisis ANOSIM y PERMANOVA, tal y como sugirieron Mezzasalma et al. (2018). Por ejemplo, el mayor valor de R y F entre las muestras de la Mencía de la DO Ribeira Sacra y

la variedad Brancellao de la DO Ribeiro que entre la variedad Mencía de la DO Ribeira Sacra y la DO Monterrei; el valor de R y F fue el mayor entre la variedad Mencía de la DO Ribeira Sacra y la variedad Treixadura (blanca con concentración de antocianinas despreciables) de la DO Ribeiro. Sin embargo, cuando solo se consideró el factor variedad, el mayor valor de R y F se encontró entre Mencía y Brancellao, pero no entre variedades tintas y blancas. Por otro lado, los menores valores de R y F se encontraron entre la variedad Mencía de la DO Ribeira Sacra y las variedades blancas de la DO Rías Baixas. La razón de estas discrepancias podría estar en que el factor variedad es mucho más débil que el factor DO (en el que influyen factores intrínsecos como la climatología, edafología, orografía, etc.). Del mismo modo, cualquier cultivar de vid muestra metabolitos secundarios peculiares, y la mayoría de estos se concentran en la baya. Algunos de estos metabolitos tienen propiedades antimicrobianas (Katalinić et al., 2010) y podrían influir cuantitativamente y cualitativamente en la composición del microbioma de la uva. Además, las diferencias no fueron significativas en las concentraciones de antocianos entre sistemas de cultivo ni tampoco en los análisis de similitud. En cualquier caso, atendiendo a las variedades tintas parece existir una relación entre la concentración de antocianos y la riqueza de especies. En todas las muestras (uva y mosto de los tres años) la variedad Brancellao presentó menos riqueza de especies que la Mencía y a su vez las muestras de Mencía de la DO Monterrei menos que las de la DO Ribeira Sacra. En cuanto al sistema de cultivo, esta relación se cumplió también para las muestras ecológicas (Brancellao de la DO Ribeiro y Mencía de la DO Monterrei tuvieron mayor riqueza de especie que las muestras convencionales) aunque no se cumplió en la Mencía convencional de la DO Ribeira Sacra. Mezzasalma et al. (2018) no detectaron una correlación significativa entre los cultivares y su perfil microbiano, aunque sí una ligera estructuración de los cultivares en cada localidad. Asimismo, también podrían influir otros factores como el tamaño y la compacidad de los racimos. Los cuatro cultivares mostraron diferentes densidades, tamaños y formas: Treixadura y Albariño presentan racimos de compacidad media a elevada, aunque el tamaño de los mismos es grande y pequeño, respectivamente, Brancellao tiene racimos de tamaño medio, de compacidad baja o suelta y Mencía de tamaño pequeño-medio y compacidad media.

Por lo tanto, el conjunto de todos estos factores (tamaño de la baya y del racimo, antocianinas, pruina, grosor de la epidermis y hollejos, volumen de pámpanos y hojas, etc.) pudieron tener una influencia en el acceso y la permeabilidad de las levaduras. Pero también podría influir en la respuesta de la población de levaduras a las condiciones ambientales y a las relaciones intermicrobianas. Sin embargo, teniendo en cuenta nuestros resultados, nuestra hipótesis está en línea con Mezzasalma et al. (2018) quienes sugirieron tras un ACoP que las características climáticas de los sitios de muestreo influyen más sobre la presencia de microorganismos en la superficie de las uvas que las características ampelométricas de las plantas. Probablemente, las condiciones ambientales locales combinadas con características de manejo agronómico sean más capaces de modificar el microbioma de las bayas que las características genéticas de las plantas. Esto podría explicar por qué todos los cultivares de uva de cada localidad comparten una fracción diferente de levaduras (Tabla 4.12, Tabla 4.13, Figura 4.13 y Figura 4.14).

Por otro lado, algunos factores podrían tener contrarrestado su efecto por la mayor influencia de otros factores sobre la riqueza y frecuencia de levaduras, difuminándose así las diferencias. Además, tal y como puede observarse en las variaciones obtenidas, los resultados merecen precaución debido a la existencia de factores no considerados (como la migración microbiana a través de salpicaduras de lluvia, vientos, polinizadores, etc. desde plantas y el suelo) (Belda et al., 2017b) y otras interacciones aún desconocidas entre las plantas y el medio ambiente tal y como concluyen Mezzasalma et al. (2018).

Expandiendo las comparaciones para grupos con los tres factores **DO + variedad + sistema de cultivo**, casi todas presentaron diferencias significativas entre todas las muestras. Los mayores valores de F se siguieron encontrando especialmente en las DOs Rías Baixas y Ribeira Sacra de cultivo ecológico en las comparaciones con las DOs Ribeiro y Monterrei de cultivo convencional.

Si se reducen los grupos al nivel de un solo factor por grupo, en general se resumen los resultados anteriores (Tabla 4.20).

Tabla 4.20. PERMANOVA; reducción de un grupo por factor DO, variedad y sistema de producción en mostos (A) y uva (B) en 2015.

A					A				
Mo	Ri	RS	RB		Trx	Men	Bra	Alb	
Mo		3.227	11.14	27.08	Trx		4.466	3.662	7.281
Ri	0.1368		16.63	36.5	Men	0.036		8.564	3.569
RS	0.0006	0.0006		2.512	Bra	0.0972	0.0006		19.30
RB	0.0006	0.0006	0.2682		Alb	0.0012	0.1314	0.0006	
					Eco	Con			
					Eco	10.05			
					Con	0.0001			
B					B				
Mo	Ri	RS	RB		Trx	Men	Bra	Alb	
Mo		3.074	57.69	17.73	Trx		4.211	3.786	1.338
Ri	0.2634		22.03	9.347	Men	0.0114		4.098	1.786
RS	0.0006	0.0006		8.762	Bra	0.0101	0.0217		2.715
RB	0.0006	0.0006	0.0006		Alb	0.2254	0.1551	0.0728	
					Eco	Con			
					Eco	3.6			
					Con	0.0174			

Los valores del estadístico F se muestran encima de la diagonal y el nivel de significancia (p-valor) con la corrección de Bonferroni se muestra debajo de la diagonal.

Se encontraron diferencias significativas en todos los casos, especialmente entre sistemas de cultivo, excepto entre los mostos y uvas de las DOs Ribeiro-Monterrei, los mostos de las DOs Rías Baixas-Ribeira Sacra, los mostos de Brancellao-Treixadura y Albariño-Mencía y las uvas de Albariño y el resto de variedades. Las mayores diferencias de acuerdo con el valor de F se encontraron entre los mostos y uvas de las DOs Rías Baixas y Monterrei, los mostos de las DOs Rías Baixas y Ribeiro, las uvas de la DO Ribeira Sacra con las DOs Monterrei y Ribeiro y entre las variedades Albariño y Brancellao.

Cuando se aplicó el PERMANOVA de doble vía los resultados fueron similares a los encontrados en el ANOSIM de doble vía. Mostraron diferencias significativas en todos los factores (DO, variedad y sistema de cultivo) para los datos de frecuencias (Tabla 4.21). Pero además de revelar diferencias significativas en el factor DO cuando se utilizaron los datos

de la riqueza de especies también mostraron diferencias significativas entre sistemas de cultivo ecológico y convencional. Sin embargo, el PERMANOVA tampoco presentó diferencias significativas en los grupos analizados conjuntamente variedad-sistema de cultivo para el número de especies identificadas durante los tres años.

Tabla 4.21. PERMANOVA de doble vía para los factores DO, sistema de cultivo y variedad en la frecuencia y riqueza de especies (S).

Two-way PERMANOVA		Frecuencia (%)				Riqueza de especies (S)*			
Permutación N: 9999	Variedad	Cultivo	DO	Cultivo	Variedad	Cultivo	DO	Cultivo	
F	48.774	86.021	19.376	16.941	0.29114	0.64286	4.267	34.286	
p	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.5719	0.206	0.0007	0.0153	

* Se utilizaron datos de todas las muestras: mosto y uva de todos los años.

De acuerdo con el conjunto de resultados podemos afirmar que los factores que más influyeron en la diversidad fueron la DO seguido del sistema de cultivo y en menor medida de la variedad y el año. Sin embargo, el valor de F devuelto por PERMANOVA realizado entre DO y sistema de cultivo para la riqueza de especies fue mayor en el sistema de cultivo. Por lo tanto, los análisis ANOSIM y PERMANOVA confirmaron la existencia de diferencias regionales en la población de levaduras entre sistemas de cultivo. Demostramos así la existencia de diferentes patrones biogeográficos en la distribución de las comunidades de levaduras entre los sistemas de cultivo ecológico y convencional con una marcada influencia regional entre las distintas DOs de Galicia. Esto permite asociar un *terroir microbiano* a regiones concretas que explicarían la tipicidad de sus vinos (Belda et al., 2017b; Bokulich et al., 2016; Knight, et al., 2015).

4.2.7. Representación gráfica de la distribución de las levaduras (ACP) y (ACoP)

Se evaluó gráficamente la influencia de los factores sistema de cultivo y DOs sobre la riqueza de especies entre las muestras de los diferentes años mediante un *análisis de componentes principales (ACP)*.

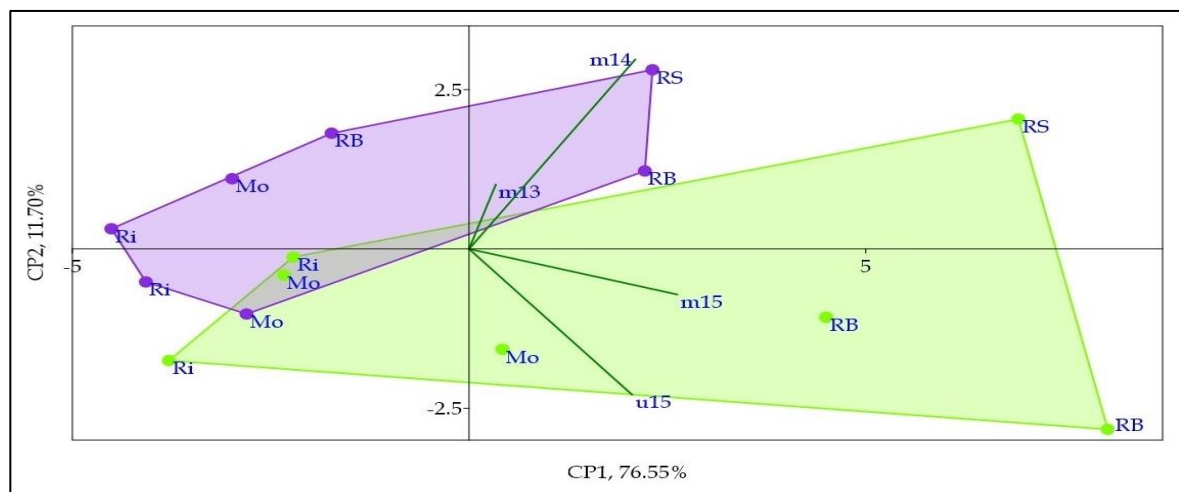


Figura 4.12. ACP de la riqueza de especies de levadura (S) en muestras de producción ecológica ■ y convencional ■ en uva de 2015 (u15) y mostos de 2013, 2014 y 2015 (m13, m14 y m15, respectivamente) en diferentes DOs: Mo (Monterrei), Ri (Ribeiro), RS (Ribeira Sacra) y RB (Rías Baixas).

(mostos convencionales de las DOs Ribeiro y Monterrei) y *H. uvarum* y *Starm. bacillaris* en el 4 (mostos de ambos sistemas de cultivo de las DOs Ribeira Sacra y Rías Baixas) (Figura 4.13). Complementando los resultados del ANOSIM y PERMANOVA, nuestros análisis sugieren que algunas variedades mostraron una frecuencia de especies diferente, especialmente en las especies minoritarias (Tabla 4.13 y Figura 4.14).

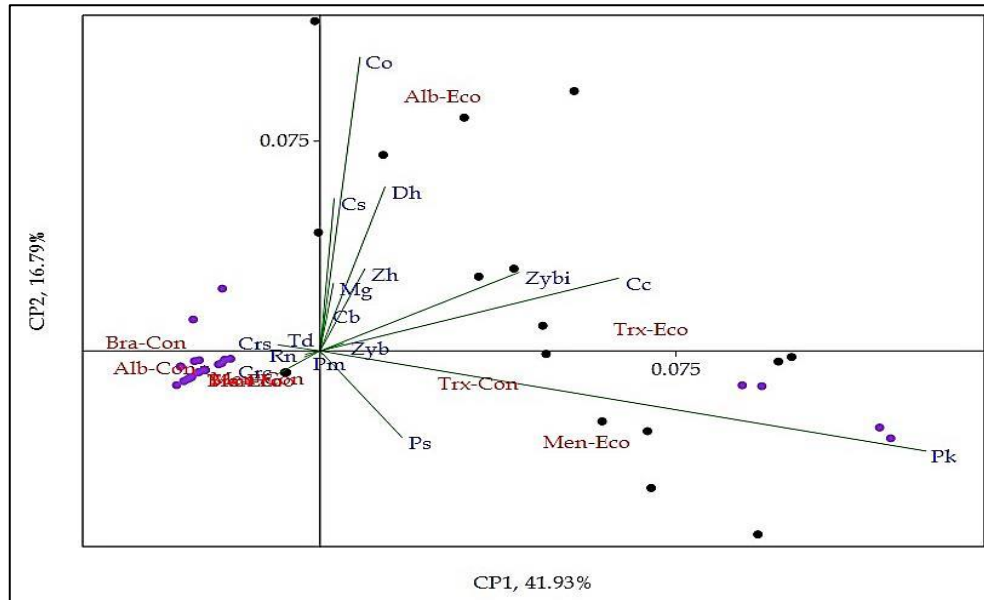


Figura 4.14. ACP de las muestras en mostos (2015) según variedad y sistema de cultivo en base a la frecuencia de especies de levadura minoritarias. Violeta: convencional, negro: ecológico; Biplot: Cb: *C. bentonensis*, Co: *C. oleophila.*, Cs: *C. cf. sorbosivorans*, Dh: *D. hansenii*, Mg: *Me. guilliermondii*, Cc: *C. californica*, Crs: *Cr. carnescens*, Crs: *Cr. stepposus*, Ps: *P. sporocuriosa*, Pk: *P. kluyveri*, Pm: *P. membranifaciens*, Rn: *R. nothofagi*, Td: *T. delbrueckii*, Zh: *Z. hellenicus/meyerae*, Zybi: *Zy. bailii*.

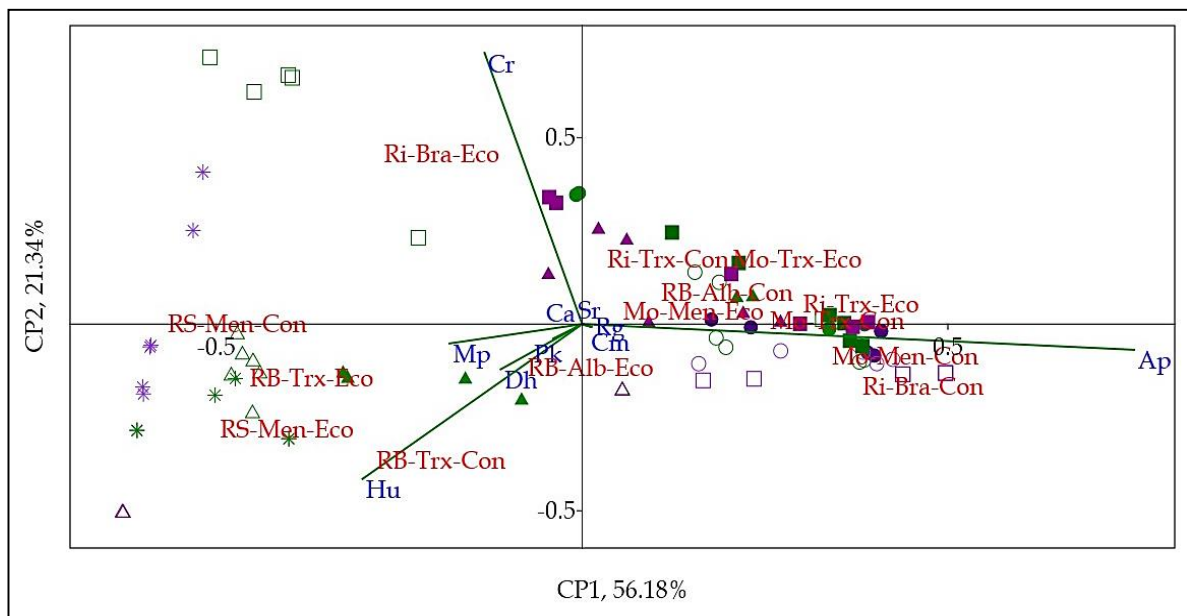


Figura 4.15. ACP de las muestras de uva ecológica (Eco) y convencional (Con) de diferentes DOs de Galicia en 2015 en base a la frecuencia de especies. Violeta: convencional, verde: ecológico; asterisco: DO Ribeira Sacra, círculo: DO Monterrei, cuadrado: DO Ribeiro, triángulo: DO Rías Baixas. Biplot: Ap: *Aureobasidium* spp., Ca: *Candida* spp., Cm: *Cy. macerans*, Cr: *Cryptococcus* spp., Dh: *D. hansenii*, Hu: *H. uvarum*, Lt: *L. thermotolerans*, Mp: *Metschnikowia* spp., Pk: *P. kluyveri*, Rg: *Rhodotorula* spp., Sr: *Sp. ruberrimus*.

En los mostos, *C. bentonensis*, *C. cf. Sorbosivorans*, *C. oleophila* y *Me. guilliermondii* aparecieron casi exclusivamente en Albariño ecológico; *R. graminis* e *I. terricola* en Albariño convencional; *C. oleophila*, *Cr. victoriae* y *Zy. bailii* en Treixadura ecológica; *Cr. carnescens* y *Cy. macerans* en Treixadura convencional; *C. apicola*, *P. membranifaciens* y *P. sporocuriosa* en Mencía ecológica; *R. nothofagi* y *T. delbrueckii* en Mencía convencional; *Cr. terrestris* en Brancellao ecológico y *Cr. Stepposus* en Brancellao convencional.

En el ACP realizado en uva las muestras se distribuyeron en diferentes cuadrantes teniendo en cuenta las mismas levaduras principales que en mostos (Figura 4.15). Este ACP también mostró una agrupación de las muestras por DOs (Ribeira Sacra-Rías Baixas y Monterrei-Ribeiro) similar a la obtenida para los mostos.

Por otra parte, debido a que PERMANOVA es sensible a las diferencias en la dispersión multivariante, para verificar si las dispersiones son significativamente diferentes se aplicaron *Análisis de Coordenadas Principales* (ACoP o MDS) para buscar patrones. El ACoP calcula los valores de disimilitud en sí mismos (en coherencia con la filosofía de PERMANOVA). La suma de los dos ejes principales de todos los ACoP fue del 67-88%, lo que garantiza su validez. El ACoP de la Figura 4.16 remarca la influencia del sistema de cultivo sobre la distribución de las muestras en base a la frecuencia de especies, especialmente minoritarias, en los mostos de 2015.

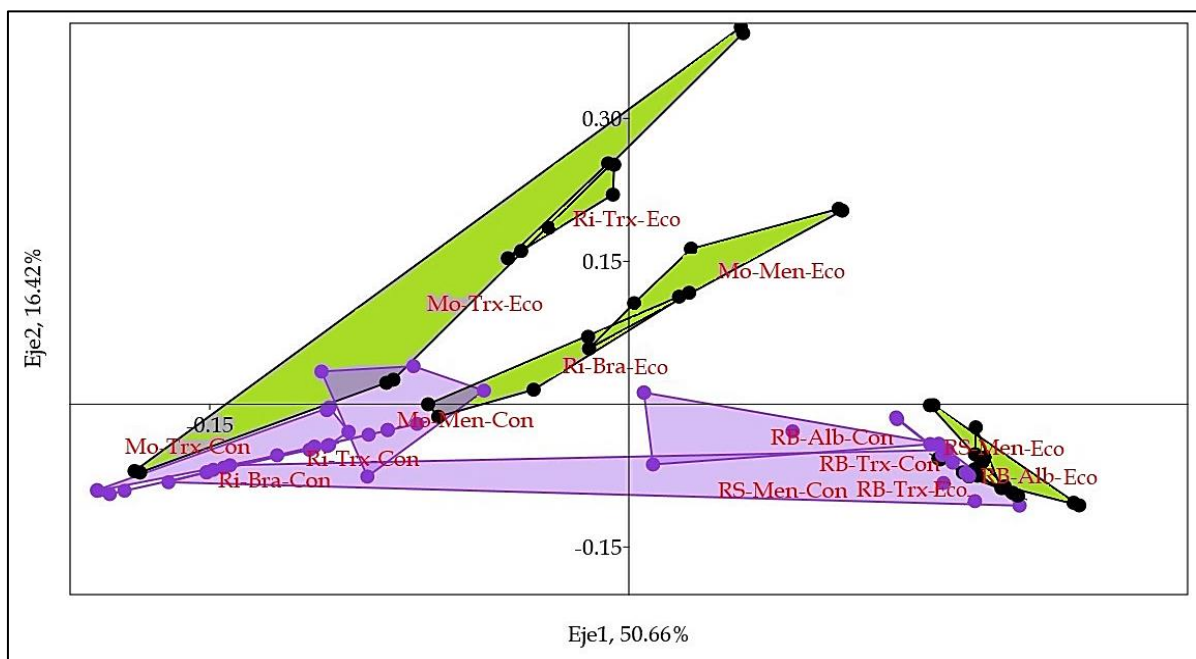


Figura 4.16. ACoP de las muestras de mosto ecológico (verde) y convencional (violeta) de 2015 en distintas DOs en base a la frecuencia de especies.

Muestra una separación entre los mostos de ambos sistemas de cultivo: los mostos ecológicos se agrupan en los cuadrantes superiores y los convencionales en los cuadrantes con valores negativos del eje Y. Los resultados obtenidos en las muestras de uvas de 2015 (gráfico no mostrado) fueron similares si bien la dispersión fue más marcada en las muestras de cultivo convencional. Esto indica que el sistema de cultivo influye significativamente sobre la diversidad de levaduras, especialmente en la proporción de las especies minoritarias.

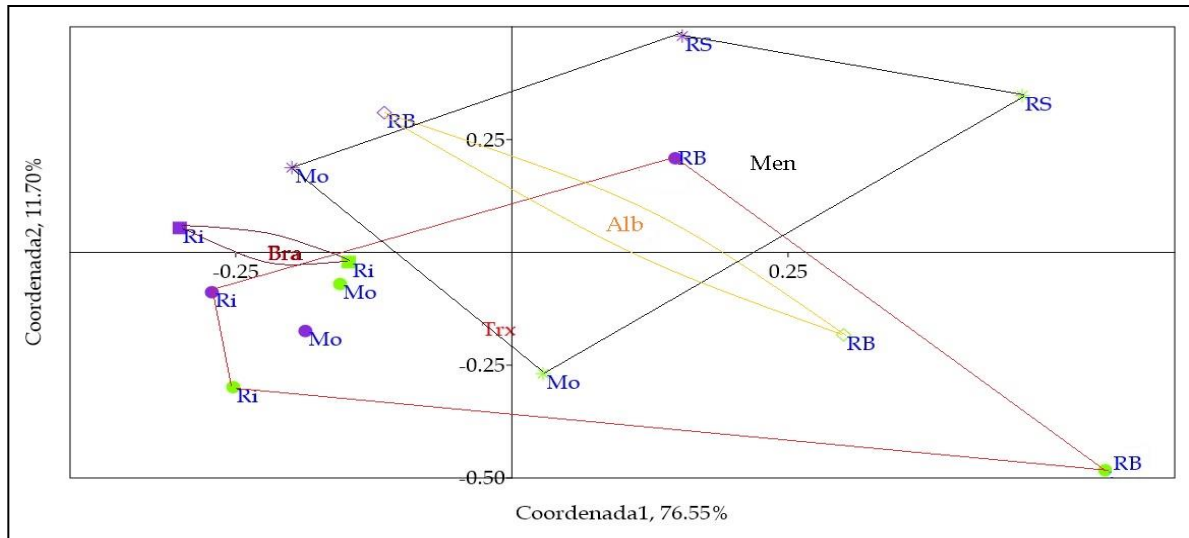


Figura 4.17. ACoP de los mostos (2013 a 2015) y uvas (2015) ecológicas (verde) y convencionales (violeta) en base a la riqueza de especies de las diferentes variedades (Treixadura: rojo, Trx; Albariño: amarillo; Alb; Brancellao: marrón, Bra; Mencía: negro, Men) y DOs (Mo: Monterrei; Ri: Ribeiro; RS: Ribeira Sacra; RB: Rías Baixas).

El ACoP de la Figura 4.17 remarca la influencia de la variedad sobre la riqueza de especies. Teniendo en cuenta que hay más muestras de la variedad Treixadura que de la variedad Mencía se observó una dispersión igual o superior, es decir, una mayor disimilitud, en la riqueza de especies en la variedad tinta. Sin embargo, entre la variedad Albariño y Brancellao con igual número de muestras se observó una dispersión mayor en la variedad blanca.

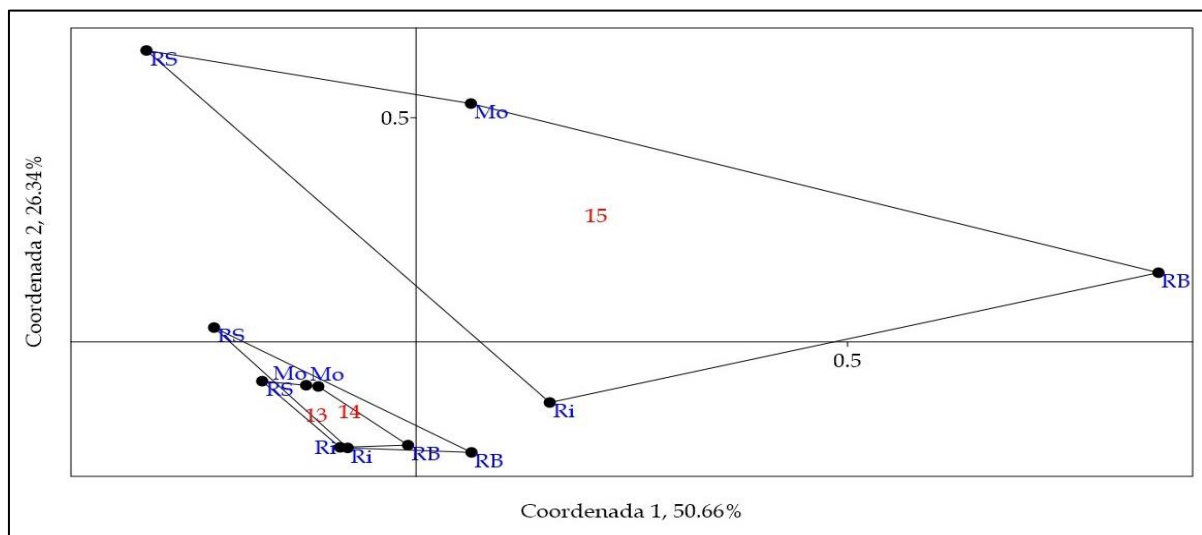


Figura 4.18. ACoP de los mostos y uvas ecológicas (verde) y convencionales (violeta) en base a la riqueza de especies de los diferentes años (2013 a 2015) y DOs (Mo: Monterrei; Ri: Ribeiro; RS: Ribeira Sacra; RB: Rías Baixas).

En cuanto a la influencia del año en la riqueza de especies, el ACoP de la Figura 4.18 remarca una correspondencia alta entre las muestras de 2013 y 2014, separadas de las de 2015 cuya campaña presentó, en general, una mayor riqueza de especies. También puede observarse que la dispersión de las muestras en 2015 fue mayor, ocupando tres cuadrantes con las muestras de las diferentes DOs separadas ampliamente entre sí.

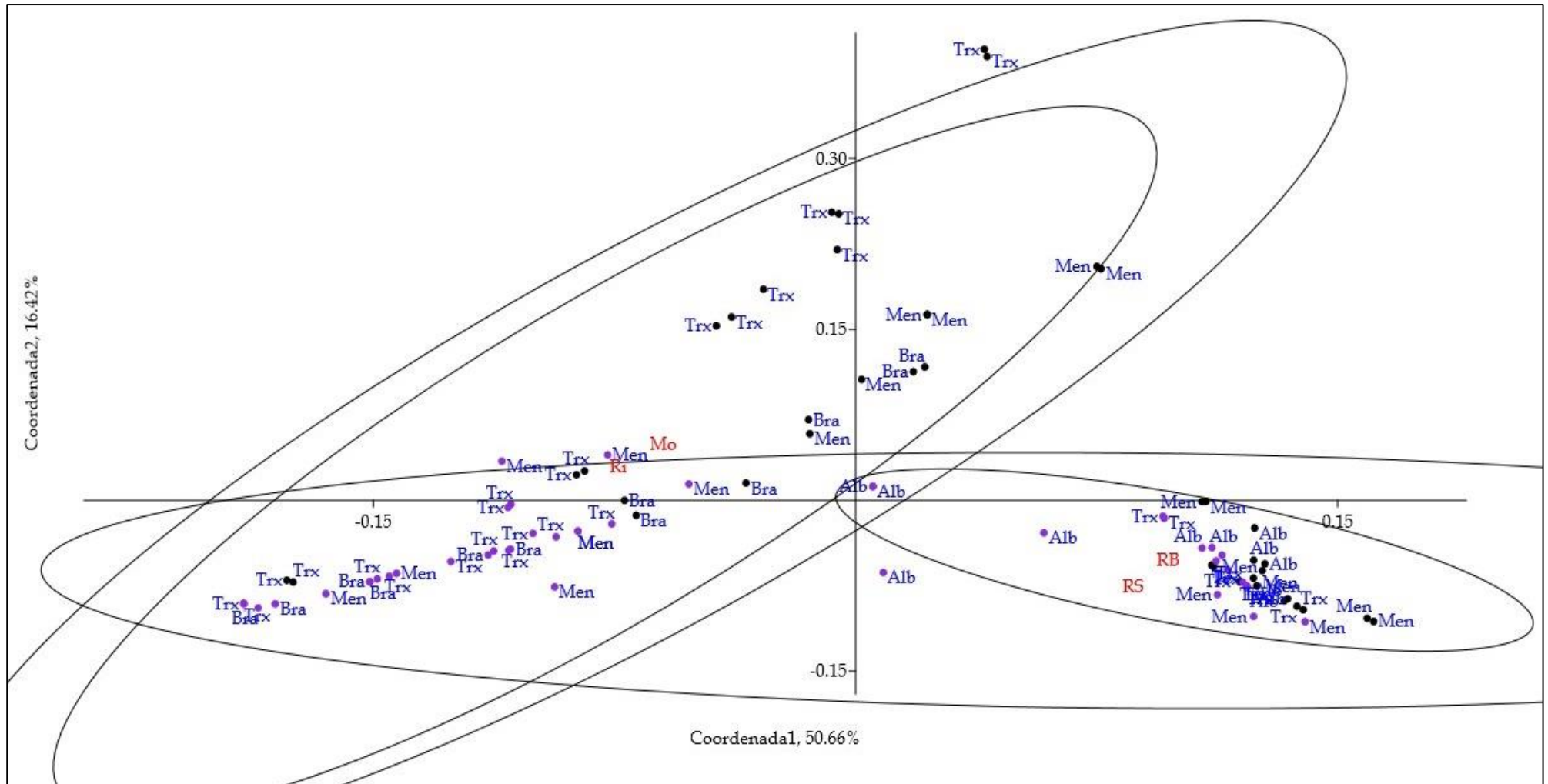


Figura 4.19. ACoP de la riqueza de especies (S) en mosto ecológico (negro) y convencional (violeta) en las distintas variedades (Alb: Albariño, Trx: Treixadura, Bra: Brancellao, Men: Mencía); agrupación elíptica por DO: Mo (Monterrei), Ri (Ribeiro), RS (Ribeira Sacra), RB (Rías Baixas).

El ACoP de la Figura 4.19 muestra una agrupación elíptica de la riqueza de especies de las muestras de las diferentes variedades. La riqueza de especies mostró una dispersión similar entre las DOs Monterrei y Ribeiro y una separación entre las muestras ecológicas y convencionales, aunque no entre variedades, ni entre blancas y tintas. La riqueza de especies de las variedades de las DOs Ribeira Sacra y Rías Baixas se agruparon separadas de las DOs Monterrei y Ribeiro, excepto la riqueza de especies de la Mencía ecológica de la DO Ribeira Sacra. Hay que destacar además que la riqueza de especies de las muestras tanto ecológicas como convencionales de la DO Rías Baixas mostró una menor dispersión que el resto, lo que indica una gran homogeneidad en todos los años y muestras, mayor incluso que la riqueza de especies de la DO Ribeira Sacra con la mitad de variedades y muestras.

En general, los ACP y ACoP apoyan en una representación gráfica los resultados obtenidos en las pruebas ANOSIM y PERMANOVA. Representan una separación entre las muestras en base a la diversidad y riqueza de especies de levadura presentes en uva y mostos influidos por los diferentes factores estudiados. Los patrones, tal y como ya apuntaron Mezzasalma et al. (2018) no se deben a una alta similitud dentro de las muestras, porque cuando analizamos diferentes factores se observó una estructuración en la que el factor geográfico fue el más importante.

4.2.8. Influencia de las condiciones climáticas sobre la diversidad de levaduras

Los microorganismos son esenciales para garantizar el equilibrio del ecosistema y son capaces de influir en las relaciones entre las plantas y elementos abióticos (por ejemplo, suelo, agua y luz solar) y bióticos (por ejemplo, otros microorganismos y seres vivos) (Mezzasalma et al., 2018). Estos microorganismos tienen como factores primordiales para su desarrollo las condiciones climáticas. Comprender qué factores ambientales influyen en el desarrollo microbiano que coloniza las uvas y sus interrelaciones es clave en el manejo del viñedo y su influencia en el vino. Este es, por otra parte, un tema desafiante de preocupación emergente (Morgan et al., 2017). Dicha información puede proporcionar objetivos biológicos para futuras aplicaciones biotecnológicas, así como información adicional para controlar la diversidad microbiana de campo. Se podrá así mejorar el rendimiento productivo del viñedo, especialmente en el cultivo ecológico, el proceso de fermentación del vino y actuar como firma de origen de la uva (Gilbert et al., 2015; Grangeteau et al., 2017a y 2017b; Jara et al., 2016). Estudios de ADN apoyaron que el microbioma de uva está relacionado además de con la ubicación, con las condiciones climáticas y otros factores asociados con el viñedo (Bokulich et al., 2014 y 2016).

Algunos parámetros ambientales tales como la velocidad del viento, la HR o la pluviometría tienen una gran importancia por su relación con la presencia de una mayor o menor diversidad de levaduras. Además, estos factores están estrechamente relacionados con el desarrollo de otros hongos y enfermedades que compiten con las levaduras y tienen la capacidad de deteriorar las uvas proporcionando la liberación de mosto. Se crea así un sustrato muy diferente a la superficie de la piel de las bayas y racimos sanos que está directamente relacionado con la biodiversidad de levaduras (Barata et al., 2012; Cordero-Bueso et al., 2011; Guzzon et al., 2014; Schmid et al., 2011).

Como ya se ha discutido, la diferencia de la comunidad de levaduras en uva y mosto fue mayor por DO que entre tipo de cultivo, año y variedad, probablemente debido a un gran número de factores variables no independientes (precipitación, viento, temperatura, enfermedades, plagas, prácticas vitícolas y plaguicidas, etc.), que influyen en la protección e integridad de la piel y pueden modificar la ecología de las bayas (Barata et al., 2012). Las condiciones climatológicas registradas en Galicia en el período de duración del proyecto han sido muy heterogéneas según el área y la añada (Tablas 3.1, 3.2 y 3.3; Figura 3.1). Durante nuestro estudio, hubo un aumento significativo de las precipitaciones en 2014, especialmente en las fechas cercanas a la cosecha. Estas condiciones son muy propicias para la incidencia de enfermedades fúngicas como el mildiu o la *Botrytis*, que determinaron una alerta continua en el tratamiento del viñedo. En la DO Ribeira Sacra la viña en ecológico se trató con azufre y cobre exclusivamente, mientras que en las DOs Ribeiro y Rías Baixas se utilizaron además diferentes soluciones hidroalcohólicas en épocas puntuales. En los viñedos convencionales se aplicaron también materias activas penetrantes y sistémicas, variando el número de tratamientos en función de la zona.

Dada la importancia de las condiciones climáticas en la población de levaduras se realizó un **análisis de correspondencia canónica (ACC)** para determinar la influencia de las variables climáticas sobre la abundancia de especies de levadura en las muestras ecológicas y convencionales de las distintas DOs.

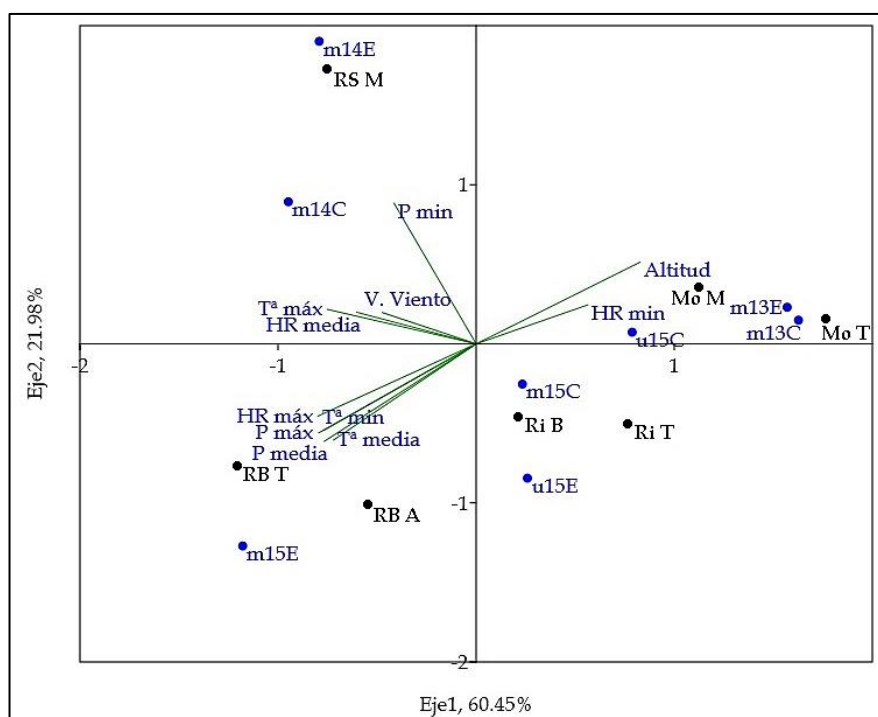


Figura 4.20. ACC de la influencia de las condiciones climáticas sobre la diversidad regional de especies. Denominaciones de Origen: Mo (DO Monterrei), Ri (DO Ribeiro), RS (DO Ribeira Sacra), RB (DO Rías Baixas); variedades de uva: A (Albariño), B (Brancellao), M (Mencia), T (Treixadura); abundancia de especies en las muestras: m (mosto), u (uva de 2015), mt (mosto de los tres años); año: 13 (2013), 14 (2014), 15 (2015); sistema de cultivo: E (ecológico), C (convencional); variables ambientales: V. viento (velocidad media del viento), HR (humedad relativa), Tª (temperatura media mensual durante el año agronómico del viñedo), P (pluviometría media mensual durante el año agronómico).

En el triplot del ACC (Figura 4.20) se observó la correspondencia de las variables ambientales con la diversidad en las distintas zonas y campañas. Teniendo en cuenta el conjunto de datos, se observó una correspondencia positiva entre el aumento de la diversidad de levaduras y la temperatura media y la precipitación y HR máximas en la DO Rías Baixas. En la DO Ribeira Sacra la correspondencia fue mayor con la precipitación mínima, la HR media y la mayor velocidad del viento. En cuanto a la biodiversidad en la DO Monterrei se observó una correspondencia entre la HR mínima y la altitud mientras que en la DO Ribeiro se encontró una correspondencia menos definida entre los factores ambientales estudiados y el aumento de la biodiversidad. La diversidad de levaduras fue mayor en la DO Rías Baixas, región con una mayor pluviometría/HR.

Los estudios previos dentro de esta área ya habían puesto de manifiesto un aumento significativo en el número de especies en las cosechas con más precipitaciones (Longo et al., 1991). Sin embargo, el aumento de diversidad no estuvo relacionado con años de mayor precipitación. Por ejemplo, en la DO Ribeiro donde se recogió mayor precipitación anual que en la DO Ribeira Sacra, el número de especies fue inferior; ni siquiera en la producción ecológica donde están prohibidos los tratamientos fitosanitarios orgánicos. Los datos sobre la diversidad de especies no son concluyentes en relación con las precipitaciones para las investigaciones a gran escala, ya que no demuestran ninguna relación entre las condiciones climáticas y la diversidad de levadura como indican Barata et al. (2012). En general, detectamos una mayor diversidad en 2015, el año de menor pluviometría. Rementeria et al. (2003) concluyeron que los años secos y calurosos aumentan la población de levaduras. Por lo tanto, no se puede deducir como norma general que únicamente la diversidad de levaduras aumente con la pluviometría; aunque sí se observó una mayor correspondencia entre la mayor HR y velocidad del viento y la mayor diversidad de levaduras. Se debe tener en cuenta que otros factores como la orografía, pendiente y orientación también pueden influir a nivel de microclima de parcela. La orografía y pendiente fue más acentuada en las parcelas de las DOs Ribeira Sacra y Ribeiro en menor medida. Sin embargo, cabe recordar que en la primera se utilizó azufre en la protección del viñedo, mientras que en la segunda las soluciones hidroalcohólicas de extractos de plantas utilizadas no son en sí mismas un fungicida sino más bien fitofortificantes. Al mismo tiempo, la parcela de la DO Ribeira Sacra linda con el río Sil, por lo que la HR fue mayor que en la DO Ribeiro, aunque tuviera una menor precipitación.

Como ya se ha discutido, el aumento de las lluvias implica más tratamientos fungicidas que afectan a la población de levaduras (Grangeteau et al., 2017 a y 2017b; Milanović et al., 2013; Schmid et al., 2011). El ACC de la Figura 4.21 confirmó que existió una correspondencia entre los años más lluviosos y la mayor concentración de Cu en el mosto (Figura 4.22). Se ha demostrado que existe una relación entre la cantidad de fungicidas aplicados a base de cobre y la presencia de este metal en las uvas, y por consiguiente en el mosto, no solo por la cantidad de cobre acumulado directamente sobre las bayas, sino también por absorción a través de las hojas, otras partes de la planta y el suelo (da Costa et al., 2014; Provenzano et al., 2010; Vázquez Vázquez et al., 2016). A partir del complejo arcillo-húmico del suelo, la planta puede absorber Cu metal procedente de campañas anteriores. Estos razonamientos explicarían la mayor cantidad de cobre encontrada en los mostos de 2015 en algunas DOs.

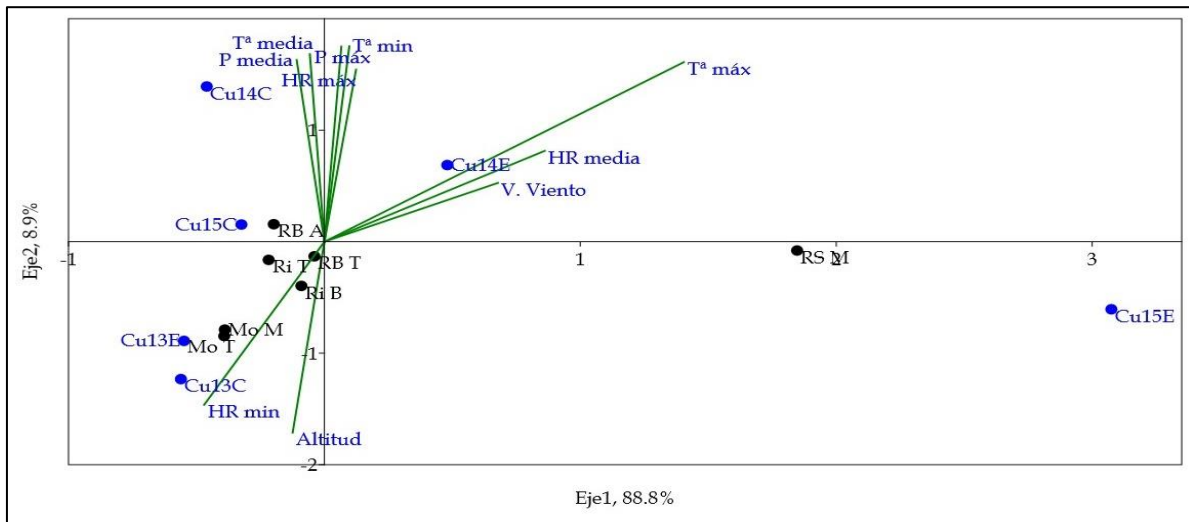


Figura 4.21. ACC de la influencia de la concentración de cobre en el mosto (Cu) y las condiciones climáticas sobre la diversidad regional de levaduras.

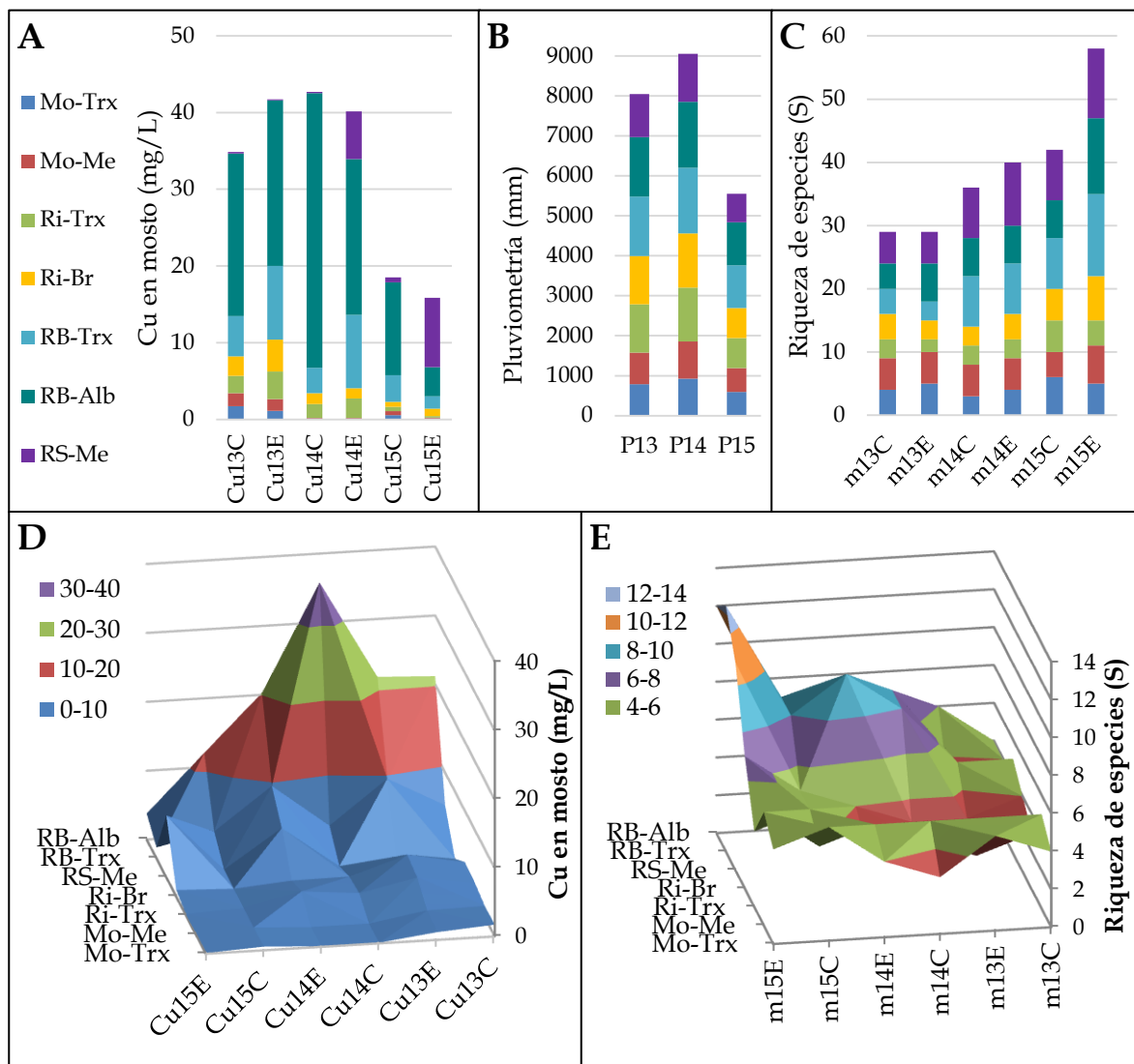


Figura 4.22. Concentración de Cu en el mosto (m; A y D), pluviometría (P; B) y riqueza de especies (C y D) entre los diferentes años (13: 2013, 14: 2014, 15: 2015) y sistemas de cultivo (E: ecológico; C: convencional).

Además, en 2015 se encontraron diferencias significativas en la concentración de Cu entre casi todos los mostos de origen ecológico y convencional (Tabla 4.1 a Tabla 4.7). En cuanto al sistema de cultivo, lógicamente las condiciones ambientales son las mismas entre las parcelas, por lo que los ACC fueron dispares (datos no mostrados) y no se encontraron agrupamientos entre ellas. Tampoco entre variedades.

Algunos autores han sugerido que las diferencias en la diversidad de levaduras entre añadas podrían explicarse por las variaciones climáticas (Drumonde-Neves et al., 2017; Grangeteau et al., 2017a). Cuando se analizó gráficamente esta correspondencia entre concentración de Cu en el mosto, condiciones climáticas y riqueza de especies se encontró una mayor riqueza de levaduras en los mostos con menor concentración de Cu (Figura 4.22). Así, para ambos sistemas de cultivo, una excesiva concentración de Cu en el mosto (> 10 mg/L), como las encontradas en 2013 y 2014, se correspondieron con una diversidad de levaduras inferior a la encontrada en 2015 cuando la pluviometría, HR y aplicación de fitosanitarios fue inferior. 2015 fue el año con la precipitación más baja y el más cálido ($> T^a$ media) de las tres campañas (Tabla 3.1), con una diferencia de pluviometría de aproximadamente -35% (DO Rías Baixas y Monterrei), -40% (DO Ribeira Sacra) y -45% (DO Ribeiro) con respecto al año anterior 2014.

Cabe mencionar las particularidades encontradas en algunas DOs. Por ejemplo, la concentración de Cu más elevada en la DO Ribeira Sacra se produjo en los mostos ecológicos de 2014 y 2015 (< 10 mg/L) con la menor precipitación en 2015 y la mayor riqueza de especies en 2014 y 2015. Por el contrario, en la variedad Albariño de la DO Rías Baixas la mayor concentración de Cu se obtuvo en los mostos convencionales de 2014 (> 35 mg/L) y 2015 (12 mg/L) siendo la riqueza de especies el doble en el mosto ecológico (4 mg/L de Cu). Sin embargo, en la variedad Treixadura de la DO Rías Baixas, donde las condiciones climatológicas fueron las mismas, la mayor concentración de Cu se produjo en los mostos ecológicos de los años de mayor precipitación 2013 y 2014 (9.6 mg/L en ambos casos), y fue menor en los mostos también ecológicos de 2015 (< 4 mg/L) cuando la riqueza de especies fue mucho mayor.

A la luz de estos resultados podemos afirmar que, en Galicia, las mayores diferencias entre los factores climáticos se encontraron en la precipitación/HR, siendo los factores más influyentes sobre la diversidad de las levaduras directa o indirectamente (por la aplicación de fitosanitarios o relaciones microbianas). En consecuencia, la cantidad de levadura en mostos fue más alta en 2014 en comparación con 2013 y 2015 (Figura 4.1 a Figura 4.7). Combina et al. (2005) también encontraron que los años con un aumento de las precipitaciones produjeron mayores recuentos de microorganismos. En este trabajo, teniendo en cuenta que en 2014 hubo un aumento significativo de las precipitaciones en épocas próximas a la vendimia, se observó un aumento en la cantidad de levaduras (UFC/mL) en todas las muestras (excepto en la variedad Mencía convencional de la DO Ribeira Sacra; Figura 4.1 a Figura 4.7).

Por lo tanto, nuestros resultados no coinciden con los aportados por Comitini y Ciani (2008) quienes encontraron conteos totales menores en años con alta precipitación. Sin embargo, en cuanto a la diversidad de levaduras solo en algunos casos se encontró una relación directa entre aumento de las precipitaciones y aumento de la riqueza de especies

(Figura 4.9). Como hemos mostrado, levaduras como *M. pulcherrima*, *H. uvarum* y *A. pullulans* están presentes en todas las campañas tanto en cultivo ecológico (sin tratamientos fungicidas orgánicos) como convencional, aunque existieran algunas diferencias en las proporciones de estos microorganismos (Tabla 4.13 y Tabla 4.14). El resto de las especies de levaduras no siempre aparecieron y lo hicieron con distinta frecuencia dependiendo de la DO. Algunas especies minoritarias observadas en las muestras de producción ecológica podrían explicarse por el uso de fungicidas contra *B. cinerea*. La presencia de *Starm. bacillaris* en la DO Ribeira Sacra podría explicarse por su resistencia al cobre (Grangeteau et al., 2017b).

La diferencia en la proporción de levaduras según la cosecha probablemente, estuvo relacionada con las diferencias climatológicas entre regiones durante el período de floración y posterior al envero y su influencia sobre la interacción entre microorganismos que podrían ser más relevantes que la climatología acaecida durante todo el año agronómico, tal y como apuntaron otros autores (Grangeteau et al., 2017a; Setati et al., 2012). Algunos géneros de levaduras parecen estar asociados con la presencia de ciertos hongos filamentosos. Por ejemplo, el género *Candida* ha sido encontrado con elevada frecuencia en las uvas botrizadas (Mills et al., 2002; Sipiczki, 2003). Este género se identificó en nuestro estudio en mayor proporción en las muestras ecológicas principalmente en la DO con mayor pluviometría y HR (Rías Baixas), y en las añadas en que el desarrollo del género *Botrytis* pudo ser mayor. Además, *H. uvarum*, que es conocida por su antagonismo con *B. cinerea* (Guzzon et al., 2014), apareció en mayor proporción en las regiones con mayor diversidad: las DOs Rías Baixas y Ribeira Sacra en 2015, campaña con las precipitaciones más bajas. Sin embargo, aunque *S. cerevisiae* es sensible al glucano producido por *B. cinerea* (Hidalgo, 2003), solo apareció en mostos en 2014, el año de mayor pluviometría. Esto podría ser debido a la mayor liberación de mosto dadas las condiciones climáticas desfavorables de esta campaña.

Por otro lado, se encontró una incidencia importante de *L. thermotolerans* y *Candida stellata* (genética y fenotípicamente cercana a *Starm. bacillaris*) en la zona vitivinícola de Madrid (Cordero-Bueso et al., 2011; Tello et al. al., 2011). Estos autores al igual que los trabajos de Comitini y Ciani (2008) también sugirieron que los tratamientos orgánicos favorecen la presencia de levaduras fermentativas. Nuestros resultados apoyan que la presencia de especies de levadura con interesante aptitud fermentativa fue mayor en muestras ecológicas. Por otra parte, hay que resaltar que la concentración de Cu en los mostos reveló diferencias significativas entre la cantidad de Cu aplicada en cultivo ecológico y convencional, especialmente en 2015. Por lo tanto, las diferencias entre sistemas de cultivo atribuibles a los fitosanitarios deben sugerirse por la aplicación de fungicidas orgánicos, pero también inorgánicos en elevadas concentraciones.

Finalmente, cabe mencionar que la mayor biodiversidad, en general, de levaduras y hongos del viñedo ecológico puede de hecho actuar como un elemento protector (Setati et al., 2015). La mayor presencia de levaduras conocidas por su antagonismo con *B. cinerea* sin interacción negativa con la vinificación, como *H. uvarum* (especialmente en la añada 2015 y en la variedad Treixadura), *Metschnikowia* spp., *D. hansenii*, *I. terricola*, *A. pullulans*, *Me. guilliermondii* (*Pichia guilliermondii*) y también la levadura comercialmente utilizada *C.*

oleophila debido a su alta actividad de control biológico (Çorbaci y Uçar, 2017; Guzzon et al., 2014; Raspor et al., 2010; Schmid et al., 2011) resultaron estar en igual o superior proporción en muestras ecológicas. Esto sugiere que la producción de vinos ecológicos, con un manejo adecuado de la agricultura biológica es viable y podría ser útil para contrarrestar enfermedades de la vid, reducir el impacto ecológico del cultivo de la vid y reducir los riesgos para la salud de los viticultores y consumidores de vino.

A la luz de esta tesis podemos sugerir también, como muestran autores como Setati et al. (2012), que existe una heterogeneidad significativa de especies entre las muestras en el mismo viñedo y que en el viñedo de producción ecológica (menos tratado), hay un aumento significativo en la riqueza de especies, incluidas muchas levaduras con potencial para el control biológico.

Además, se realizó un **análisis de correlación climática según Pearson**. En la Tabla 4.22, Tabla 4.23 y Tabla 4.24 se muestran las correlaciones significativas de las 11 variables ambientales utilizadas en el estudio y de las distintas agrupaciones de los factores sistema de producción, variedad y año con su correspondiente abundancia de especies en mosto y uva. Como es lógico, se observaron correlaciones positivas significativas entre la temperatura y la HR y entre la precipitación y la HR (Tabla 4.22). Entre las correlaciones negativas se observó que en las DOs de mayor altitud disminuyen la temperatura, pluviometría y HR y que la temperatura máxima está correlacionada con HR mínima.

Tabla 4.22 Correlación entre variables ambientales.

Parámetro climático	Altitud								
T ^a min	-.801**	T ^a min							
T ^a media	-.910**	.750**	T ^a media						
T ^a máx				T ^a máx					
HR min				-.746**	HR min				
HR media					.799**	HR media			
HR máx	-.779**	.652*					HR máx		
P min						.598*		P mín	
P media	-.891**	.778**	.813**				.755**		P media
P máx	-.717**	.716**	.632*				.663*	.577*	.935**

La correlación (bilateral) es significativa en el nivel a $p < 0.05$ (*) y a $p < 0.01$ (**). Variables ambientales: V. viento (velocidad media del viento), HR (humedad relativa), T^a (temperatura media mensual durante el año agronómico del viñedo), P (pluviometría media mensual durante el año agronómico).

En cuanto al sistema de cultivo y año los factores ambientales más importantes fueron velocidad del viento y HR media con correlaciones positivas entre las que hay que destacar un incremento de la diversidad especialmente en los mostos de 2014 y 2015. En los mostos de 2015, especialmente en los ecológicos, se observó una correlación negativa entre la altitud y la diversidad de especies (Tabla 4.23).

En cuanto a las distintas variedades de uva, se encontraron correlaciones positivas entre la riqueza de especies de las muestras de Treixadura: mostraron mayor diversidad cuanto mayor fue la HR y la precipitación. (Tabla 4.24). También la variedad Mencía aumentó su diversidad de levaduras con la precipitación mínima y media y con HR media.

Sin embargo, entre las correlaciones negativas, la diversidad en Treixadura y Mencía disminuyó cuanto mayor fue la altitud y en Brancellao cuanto mayor fue la velocidad del viento y la precipitación máxima

Tabla 4.23. Correlación (Pearson) entre variables ambientales y diversidad de levaduras en muestras de mosto y uva según el sistema de producción y año.

Parámetro climático	u15	m13	m14	m15	mC	m14C	m15C	m14E	m15E	u15E
V. viento	.785*	.598*	.763**	.624*	.497*	.806*			.773*	.794*
HR mín.		.548*								
HR media	.771*	.543*	.828**	.690**		.869*		.805*	.851*	.796*
HR máx				.670**					.879**	
P mín			.732**					.812*		
P media				.555*						
Altitud				-.611*					-.806*	

La correlación (bilateral) es significativa a $p < 0.05$ (*) y a $p < 0.01$ (**). Sistema de producción: E (ecológico); C (convencional). Abundancia de especies: m (mosto), u (uva); año: 13 (2013), 14 (2014), 15 (2015).

Tabla 4.24. Correlación entre variables ambientales y variedades en uva y mosto.

Parámetro climático	m+u T	mT	mB	mM
V. Viento		.727*	-.855*	
HR media	.828*	.940**		.713**
HR máx.	.874*	.874*		
P mín.	.819*			.753**
P media	.824*			.670*
P máx.	.820*		-.836*	
Altitud		-.488*		-.661*
Tª media				.756**

La correlación (bilateral) es significativa en el nivel a $p < 0.05$ (*) y a $p < 0.01$ (**). Variedades de uva: A (Albariño), B (Brancellao), M (Mencía), T (Treixadura); Abundancia de especies: m (mosto), u (uva), mt (mosto de los tres años 2013, 2014, 2015); año: 13 (2013), 14 (2014), 15 (2015).

Finalmente, como método de ordenación comparable con el ACP, pero con el objetivo de maximizar la covarianza entre los dos grupos de variables climáticas y correlacionarlos con la zona geográfica, se realizó un **análisis Parcial de Mínimos Cuadrados (PLS)**. La Figura 4.23 muestra los resultados del análisis de regresión PLS calculado para las distintas DOs en función de las variables ambientales para distintas agrupaciones de la abundancia de especies. Los resultados de la prueba PLS, junto con los análisis ACP, ACC y Pearson mostraron una clara separación entre regiones, aunque mostraron a su vez dos grupos entre las DOs Rías Baixas y Ribeira Sacra y las DOs Monterrei y Ribeiro.

En definitiva, los resultados obtenidos demuestran que la diversidad de levaduras asociadas a la uva y el mosto estuvo influenciada por las condiciones climatológicas (especialmente por la HR) asociadas a cada zona y año, las prácticas agronómicas en el sistema de cultivo y, en menor medida, por la variedad. Además, apoyamos la hipótesis de correlación entre las prácticas agronómicas humanas en los viñedos y la microbiota de la uva, lo que plantea una interdependencia entre las bases antropogénicas y microbiológicas del *terroir*.

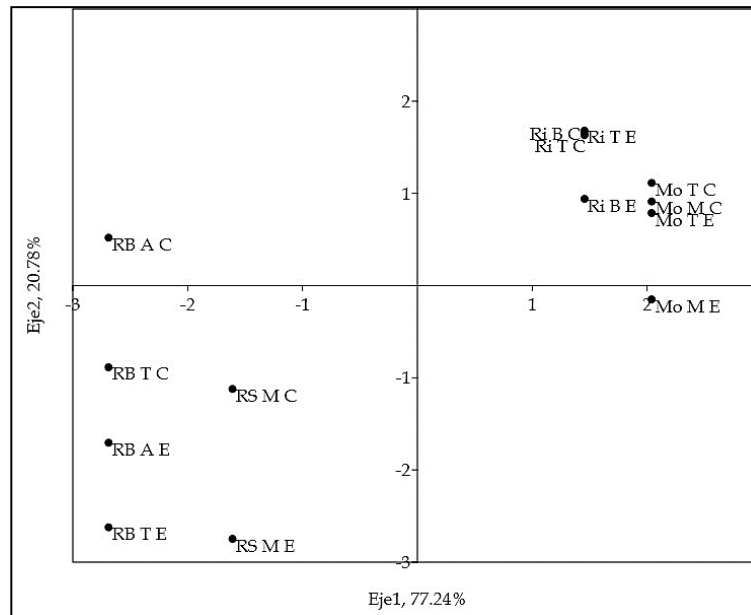


Figura 4.23. Análisis PLS entre variables climáticas, DO y sistemas de producción.

4.3. Cinética fermentativa y de la dinámica de la población de levaduras en fermentaciones naturales de mosto de producción ecológica y convencional.

Las levaduras presentes en el mosto (apartado 4.1) determinaron la evolución de las fermentaciones naturales en el laboratorio. Como era previsible, las fermentaciones guiadas en 2015 en las que se añadió la cepa comercial de *S. cerevisiae* EC1118 fueron más rápidas que las espontáneas. Patrignani et al. (2017) también encontraron resultados similares en la duración de las fermentaciones espontáneas y guiadas de mostos ecológicos y biodinámicos. Esto debe tenerse en cuenta en las bodegas que elaboran vino ecológico, y que normalmente fermentan de forma espontánea, para tomar las medidas necesarias que garanticen la obtención de un vino de calidad.

4.3.1. DO Monterrei

4.3.1.1. DO Monterrei: variedad Treixadura

Las vinificaciones de **Treixadura** de la DO Monterrei mostraron una cinética fermentativa típica con diferencias en la velocidad de fermentación de unas campañas a otras y, a veces, entre los procesos ecológicos y convencionales. En **2013** (Figura 4.24) la fermentación Eco1 presentó una menor velocidad de fermentación, especialmente al final del proceso, relacionado con una proporción menor de levaduras viables en esa fase.

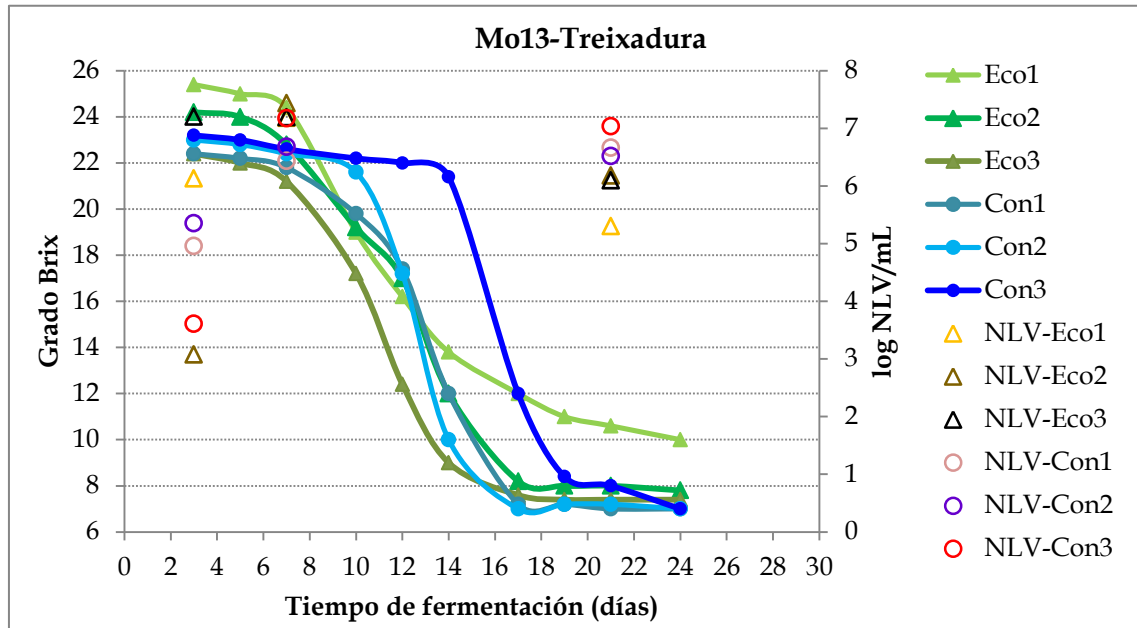


Figura 4.24. Evolución de fermentaciones naturales de mosto Treixadura de cultivo ecológico (Eco) y convencional (Con) en la DO Monterrei en la campaña de 2013.

Por su parte, la fermentación Con3 tuvo una fase inicial muy lenta, entrando en fase tumultuosa después de 10 días. En los procesos convencionales se identificaron *Metschnikowia* spp., *H. uvarum*, *L. thermotolerans* y *Me. guilliermondii* al inicio de la fermentación, que fueron sustituidas por *S. cerevisiae* durante el proceso. La cepa de *S. cerevisiae* presente en Con1 fue diferente de Con2 y Con3. En Con3 se encontraron bacterias en la fase inicial. En las fermentaciones con mosto ecológico también se identificaron distintas especies al inicio, incluida *S. cerevisiae* en Eco2. Al final la cepa que se implantó varió entre ellas, observándose un fenómeno de codominancia en Eco1.

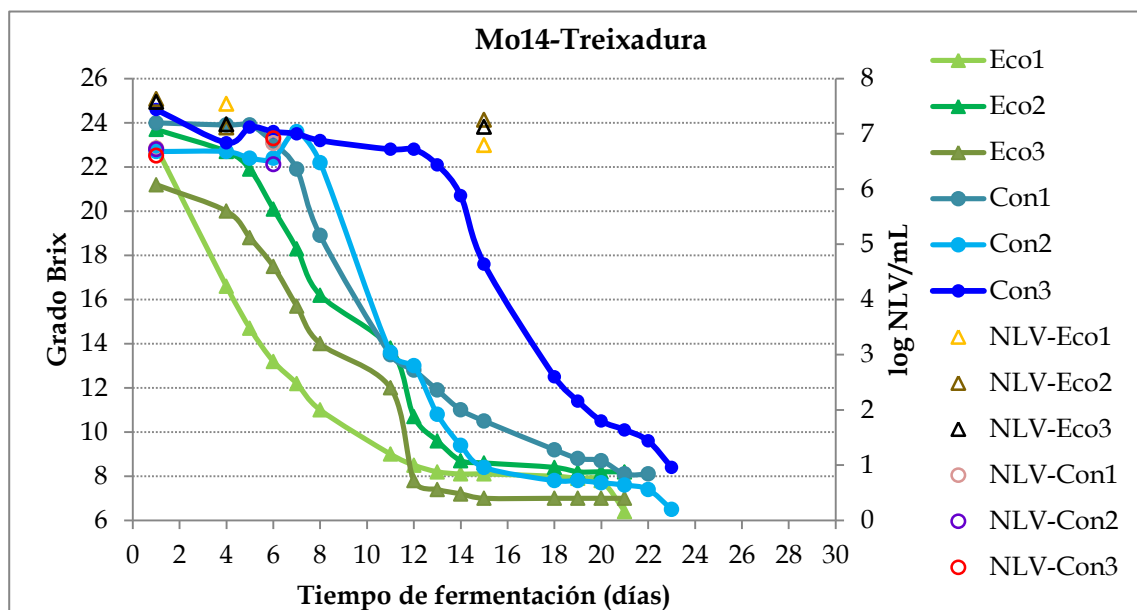


Figura 4.25. Evolución de fermentaciones naturales de mosto Treixadura de cultivo ecológico (Eco) y convencional (Con) en la DO Monterrei en la campaña de 2014.

En 2014 las curvas de fermentación fueron bastante heterogéneas (Figura 4.25), con una velocidad fermentativa mayor en el caso de las convencionales, aunque tardaron más en arrancar, especialmente Con3. Las fermentaciones se iniciaron con *Metschnikowia* spp., *H. uvarum*, *L. thermotolerans* y fueron sustituidas por *S. cerevisiae*. En las ecológicas Eco1 y Eco2 se implantó la misma cepa mientras que en Eco3 se observó una codominancia de dos cepas. En las fermentaciones convencionales Con1 y Con2 se implantó la misma cepa de *S. cerevisiae* y en Con3 una diferente.

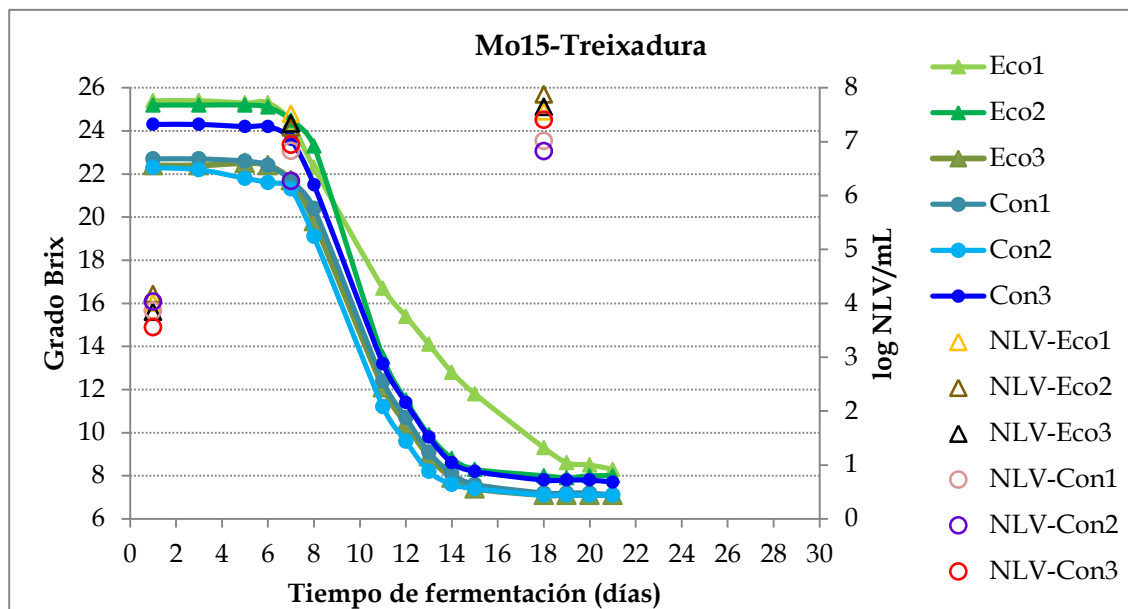


Figura 4.26. Evolución de fermentaciones naturales de mosto Treixadura de cultivo ecológico (Eco) y convencional (Con) en la DO Monterrei en la campaña de 2015.

En 2015 todas las fermentaciones tuvieron una evolución similar excepto Eco1 que mostró una velocidad de fermentación más lenta (Figura 4.26). En todas ellas se implantó la cepa *S. cerevisiae* EC1118 inoculada tras arrancar el proceso levaduras no-*Saccharomyces* como *Metschnikowia* spp., *L. thermotolerans* y *H. uvarum*.

4.3.1.2. DO Monterrei: variedad Mencía

Con la variedad tinta Mencía las fermentaciones mostraron una evolución típica en las dos campañas estudiadas, con una velocidad de fermentación rápida, ya que se alcanzó la fase final en 6 días (Figura 4.27 y Figura 4.28).

A nivel microbiológico en 2013 se observó que en la fase inicial de la fermentación ya estaban presente *S. cerevisiae*, aunque también se identificaron otras especies con menor capacidad fermentativa habituales en mostos como *L. thermotolerans*, *Metschnikowia* spp. y *H. uvarum*. Esto explica la rápida evolución de las fermentaciones. En las fermentaciones con mosto ecológico había dos cepas de *S. cerevisiae* actuando en codominancia, mientras que en las convencionales se encontró solo una cepa dominante.

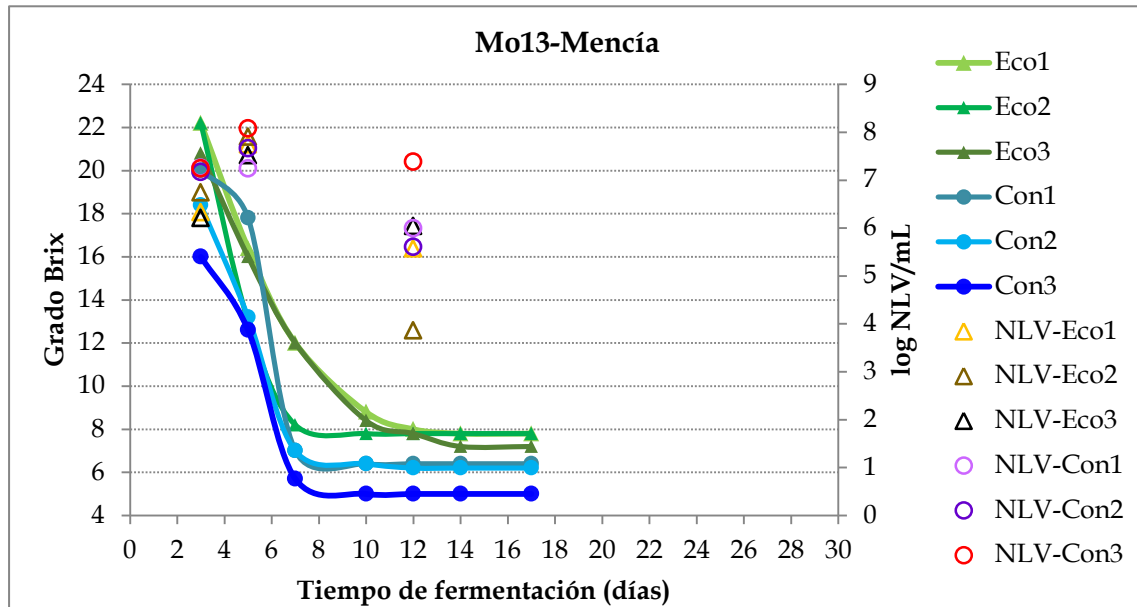


Figura 4.27. Evolución de fermentaciones naturales de mosto Mencía de cultivo ecológico (Eco) y convencional (Con) en la DO Monterrei en la campaña de 2013.

En 2015 las fermentaciones arrancaron con distintas levaduras incluida *Saccharomyces*, *L. thermotolerans*, *Metschnikowia* spp. y *H. uvarum*. En las convencionales al final se implantó la levadura comercial añadida, pero en las de mosto ecológico había diferentes cepas de *S. cerevisiae* al final del proceso.

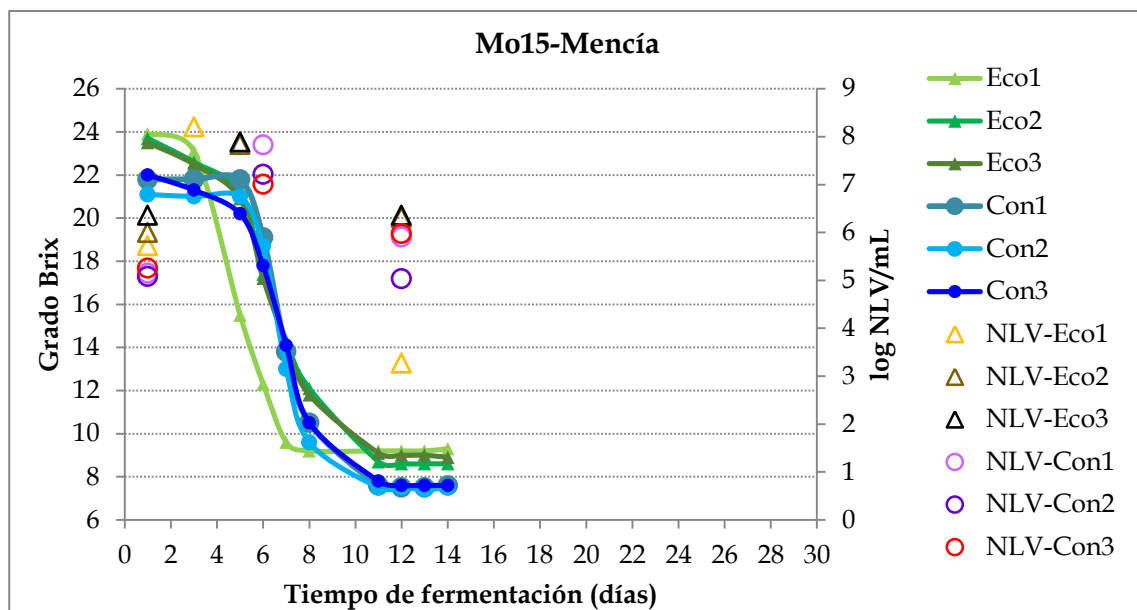


Figura 4.28. Evolución de fermentaciones naturales de mosto Mencía de cultivo ecológico (Eco) y convencional (Con) en la DO Monterrei en la campaña de 2015.

4.3.2. DO Ribeiro

4.3.2.1. DO Ribeiro: variedad Treixadura

Las fermentaciones con mosto de **Treixadura** no mostraron una cinética homogénea en 2013. En algunas fermentaciones (Con1, Con3 y Eco3) se consumió el azúcar dando lugar a un vino seco (Figura 4.29). Las fermentaciones arrancaron con las levaduras *Metschnikowia* spp., *H. uvarum* y *L. thermotolerans*, que fueron reemplazadas por *S. cerevisiae*, excepto en Eco1 y Con2. La cepa *S. cerevisiae* que se implantó fue diferente en Eco2, Eco3 y Con3. En Con1 fermentaron dos cepas en codominancia.

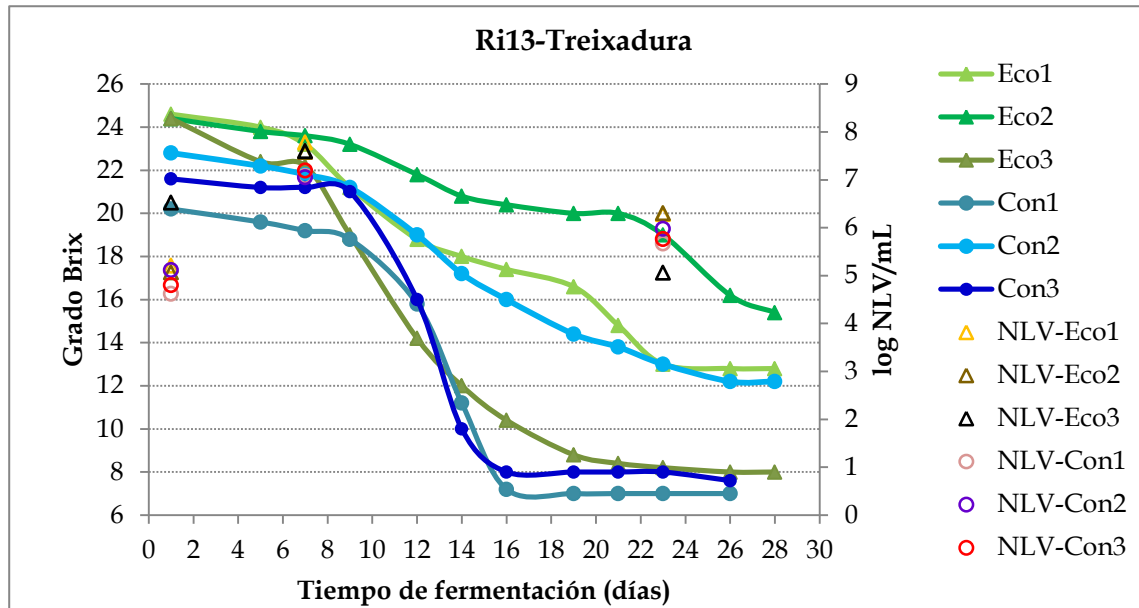


Figura 4.29. Evolución de fermentaciones naturales de mosto Treixadura de cultivo ecológico (Eco) y convencional (Con) en la DO Ribeiro en la campaña de 2013.

En 2014 todas las muestras acabaron la fermentación, pero la evolución de la misma varió entre ellas (Figura 4.30). La velocidad de fermentación fue mayor en los mostos ecológicos, relacionado con una población de levaduras también superior en las distintas fases del proceso. En todos los casos la fermentación se inició con distintas especies de levaduras como *Metschnikowia* spp., *H. uvarum* y también *L. thermotolerans*. En las fermentaciones ecológicas se implantó la misma cepa de *S. cerevisiae* en Eco1 y Eco2, pero en Eco3 y en las fermentaciones convencionales se encontró una cepa diferente.

En 2015 las fermentaciones tardaron más en empezar, pero una vez arrancadas e inoculadas con *S. cerevisiae*, la velocidad de fermentación fue rápida, especialmente en las muestras convencionales (Figura 4.31). Las fermentaciones con mosto ecológico evolucionaron de forma más lenta. Eco1 fue una excepción, ya que arrancó al segundo día y fermentó más despacio. Las fermentaciones con mosto ecológico se iniciaron con *Metschnikowia* spp., y *L. thermotolerans*; en las convencionales además aparecían las levaduras *H. uvarum* y *C. pimensis*. En todos los casos, estas especies fueron sustituidas por la cepa de *S. cerevisiae* inoculada la final de la fermentación, aunque seguían presentes algunas levaduras no-*Saccharomyces*.

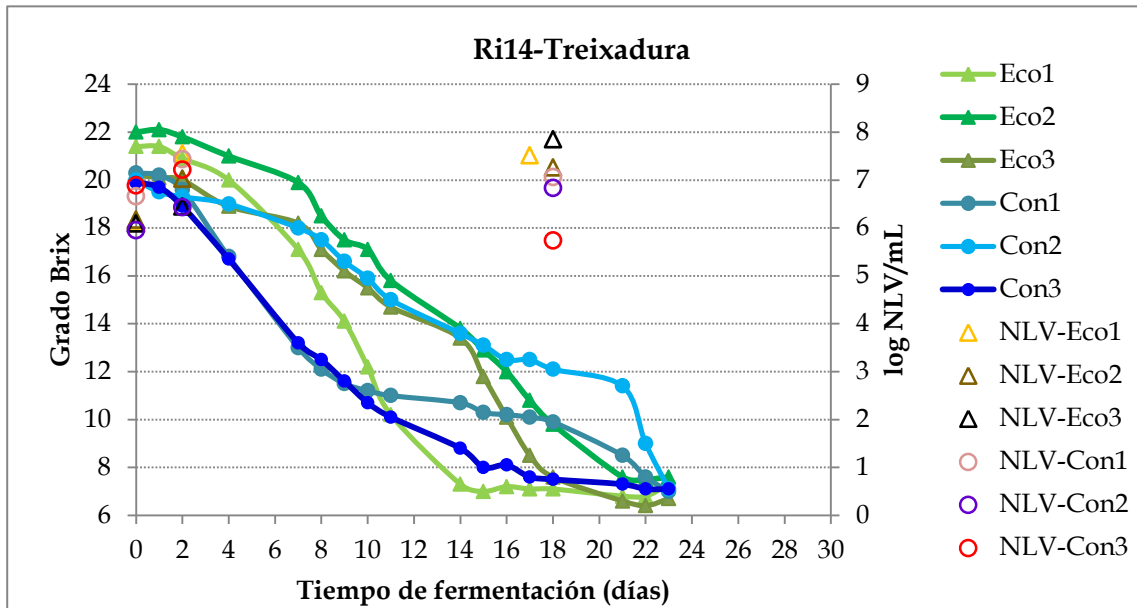


Figura 4.30. Evolución de fermentaciones naturales de mosto Treixadura de cultivo ecológico (Eco) y convencional (Con) en la DO Ribeiro en la campaña de 2014.

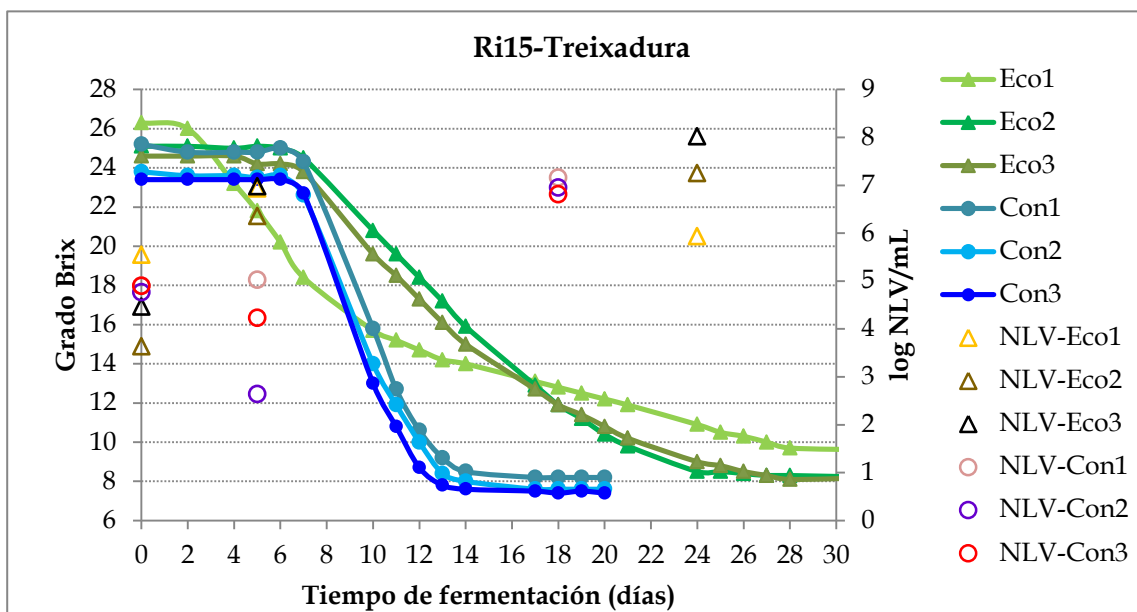


Figura 4.31. Evolución de fermentaciones naturales de mosto Treixadura de cultivo ecológico (Eco) y convencional (Con) en la DO Ribeiro en la campaña de 2015.

4.3.2.2. DO Ribeiro: variedad Brancellao

Todas las fermentaciones de la variedad tinta **Brancellao** mostraron una evolución típica con consumo de los azúcares por debajo de 2.0 g/L (aprox. 7 °Brix). En 2013, la fermentación con los mostos ecológicos fue más homogénea que con los convencionales (Figura 4.32). Con2 comenzó a fermentar en los dos primeros días, mientras que los otros dos mostos convencionales tardaron 3-4 días en arrancar. Una vez iniciado, el proceso tardó 9 días en finalizar. La población de levaduras aumentó en la fase tumultuosa y descendió al final, especialmente en Eco1. En esta campaña se observó la presencia de distintas especies de levaduras al inicio de la fermentación como: *L. thermotolerans*, *H.*

uvarum, *Me. guilliermondii*, *P. kudriavzevii* y *S. cerevisiae*. Esta última fue la levadura dominante al final de las fermentaciones y también al inicio en Con3. Se identificaron 4 cepas diferentes de *S. cerevisiae* en los procesos convencionales, pero solo una en los ecológicos.

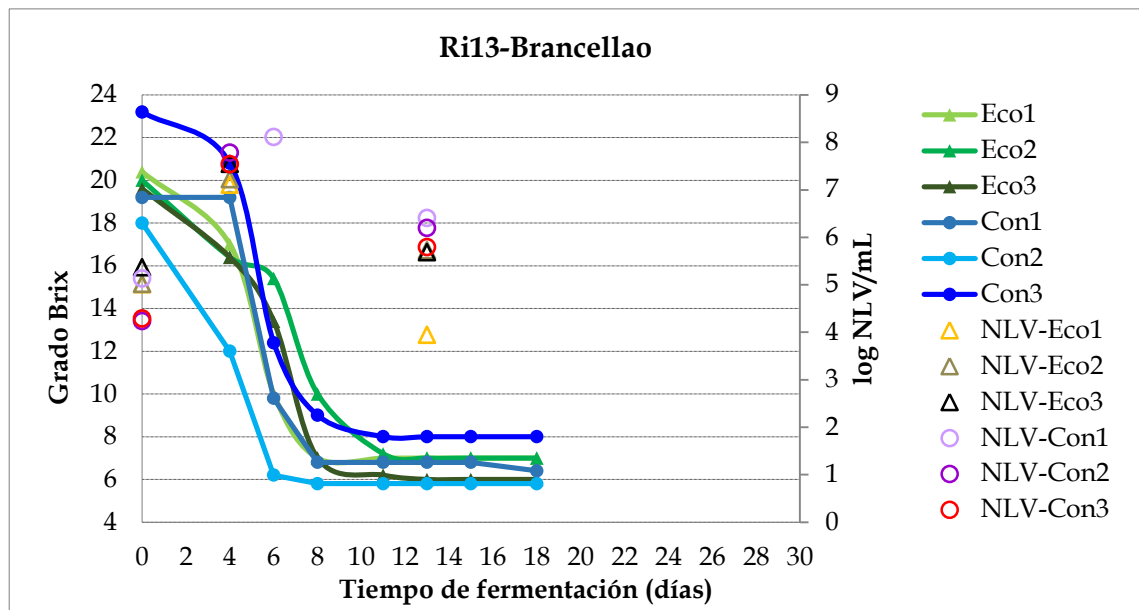


Figura 4.32. Evolución de fermentaciones naturales de mosto Brancellao de cultivo ecológico (Eco) y convencional (Con) en la DO Ribeiro en la campaña de 2013.

Las fermentaciones en 2014 también fueron bastante heterogéneas (Figura 4.33). Empezaron al tercer día y finalizaron 10 días más tarde. No se observó disminución en la población de levaduras al final, excepto en Con2 y Eco2. La dinámica de la población de levaduras en los mostos ecológicos fue similar a 2013 con diferentes especies al inicio que fueron sustituidas por una cepa dominante de *S. cerevisiae* durante el proceso. En las fermentaciones convencionales *Metschnikowia* spp. y *H. uvarum* fueron las especies mayoritarias al inicio, excepto Con2 que fue fermentada por *S. cerevisiae* desde el principio. Con1 terminó la fermentación con un solo tipo de *S. cerevisiae*, pero en Con3 se identificaron diferentes cepas al final del proceso.

En 2015 la cinética fermentativa fue similar en todas las muestras (Figura 4.34). Las fermentaciones de mostos ecológicos se iniciaron mayoritariamente con *Metschnikowia* spp., aunque también se detectó *H. uvarum* y *S. cerevisiae*. La levadura inoculada tras el inicio (*S. cerevisiae* EC1118) fue la cepa dominante al final. Sin embargo, en las fermentaciones con mosto convencional Con1 y Con3 se encontró una cepa mayoritaria diferente. En las fases iniciales se encontró *Metschnikowia* spp. y *H. uvarum*, pero también *D. hansenii* y *H. clermontiae*. En contraste con los procesos ecológicos, no se detectó *S. cerevisiae* durante el inicio espontáneo de las fermentaciones.

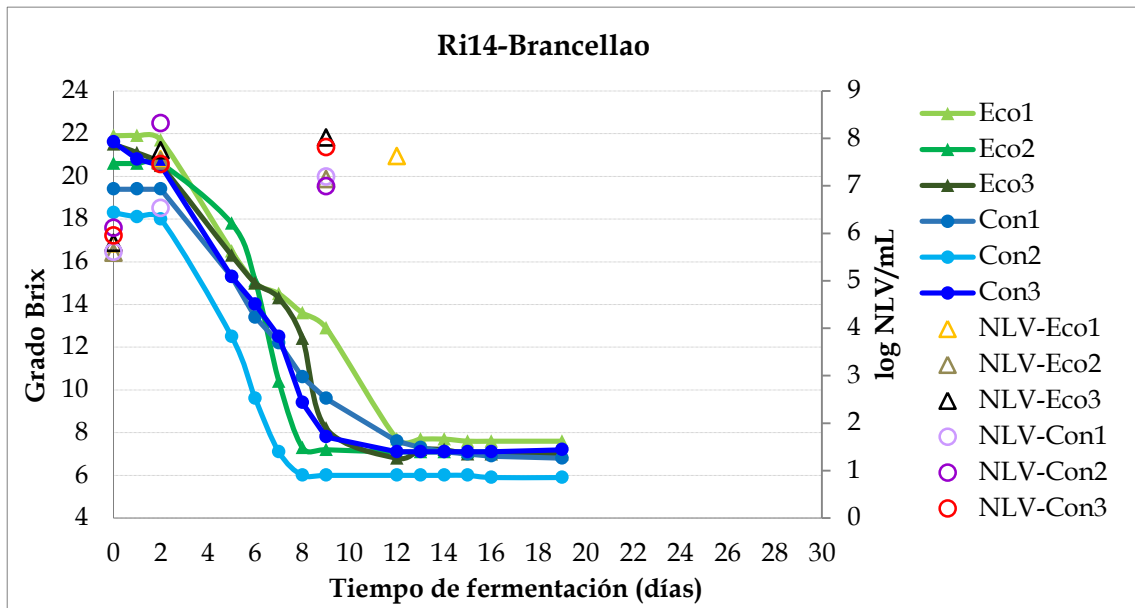


Figura 4.33. Evolución de fermentaciones naturales de mosto Brancellao de cultivo ecológico (Eco) y convencional (Con) en la DO Ribeiro en la campaña de 2014.

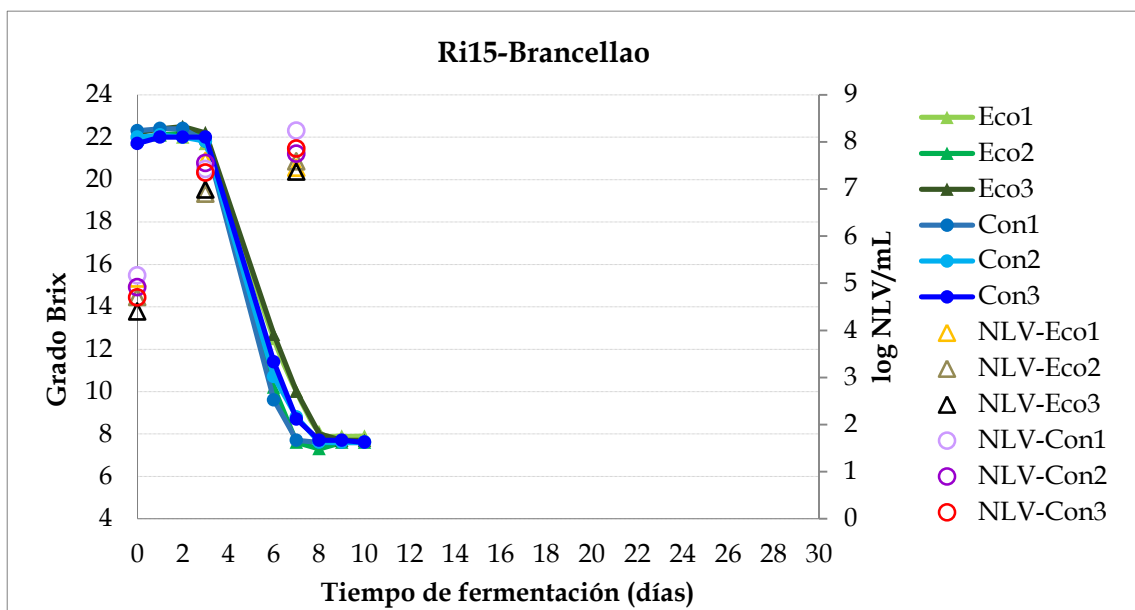


Figura 4.34. Evolución de fermentaciones naturales de mosto Brancellao de cultivo ecológico (Eco) y convencional (Con) en la DO Ribeiro en la campaña de 2015.

4.3.3. DO Ribeira Sacra: variedad Mencía

En 2013 la cinética de las fermentaciones con **Mencía** de la DO Ribeira Sacra fue muy heterogénea (Figura 4.35); solo los procesos Con2 y Eco3 completaron la fermentación. Las demás vinificaciones, aunque arrancaron rápido solo consumieron parte de los azúcares. La fermentación Con1 mostró una acusada disminución de °Brix al inicio, pero después se paró antes de los 10 días dejando azúcares residuales. En las fermentaciones restantes la disminución del °Brix fue gradual, estabilizándose a los 15 días.

A nivel microbiológico en las fermentaciones que consumieron los azúcares (Con2, Eco3 y Eco2) se observó un claro dominio de *S. cerevisiae* al final del proceso. En los otros ensayos se encontraron otras levaduras con menor capacidad fermentativa como *Metschnikowia* spp. o *H. uvarum* (especies mayoritarias), y también *Starm. bacillaris* y *Zy. bailii* en ecológico, *L. thermotolerans* en convencional o *C. californica*, en ambos sistemas. Además, se observó la presencia de bacterias en las distintas fases de la fermentación.

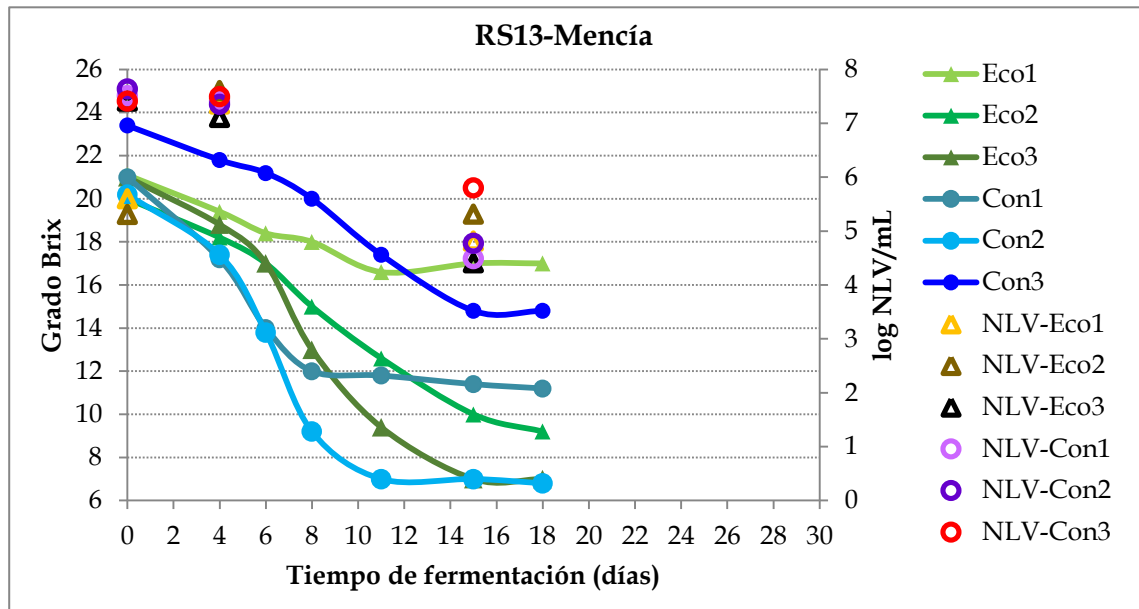


Figura 4.35. Evolución de fermentaciones naturales de mosto Mencía de cultivo ecológico (Eco) y convencional (Con) en la DO Ribeira Sacra en la campaña de 2013.

Las fermentaciones ecológicas en 2014 mostraron una evolución típica (Figura 4.36) con descenso a menos de 8 °Brix (azúcares < 2.0 g/L) y producción de alcohol (12.4% vol.). Por el contrario, en los mostos convencionales la fermentación no se completó, pararon muy rápido y no disminuyó el °Brix. Se detuvo en torno al intervalo 19-17 °Brix, dando lugar a vinos con azúcares residuales (138.5 g/L) y bajo contenido en alcohol (3.6% vol.) (Tabla 4.29). En 2015 las fermentaciones de Mencía de la DO Ribeira Sacra mostraron una evolución normal, como era de esperar ya que fueron inoculadas una vez iniciadas (Figura 4.37). Los mostos ecológicos iniciaron antes la fermentación, acorde con un número mayor de levaduras viables en el mosto. En todas ellas se implantó la cepa de *S. cerevisiae* añadida.

El estudio de la dinámica de la población de levaduras durante las fermentaciones de 2014 y 2015 indicó que las fermentaciones arrancaron (Fi) con las especies mayoritarias *H. uvarum* y *Metschnikowia* spp., aunque también se identificaron otras como *P. kluyveri* en convencional, *Zygosaccharomyces* spp. en ecológico y *Starm. bacillaris* y *C. californica* en ambos sistemas de cultivo (esta última solo en 2014). En los mostos ecológicos estas levaduras fueron reemplazadas durante la fermentación por *S. cerevisiae* que aparece como dominante al final del proceso. Sin embargo, en las fermentaciones con mosto convencional las especies de la Fi no fueron sustituidas por *S. cerevisiae*, aunque en alguna si había levaduras de esta especie, deteniéndose la fermentación y apreciándose la presencia de bacterias. Estas diferencias microbiológicas explican los datos obtenidos en los vinos (apartado 4.4.3).

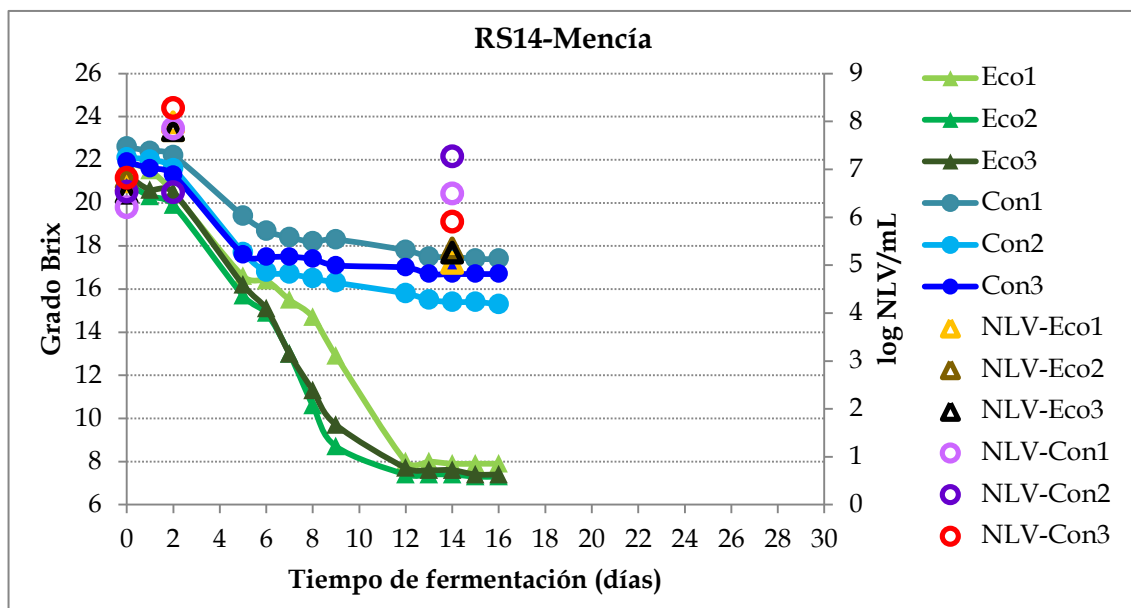


Figura 4.36. Evolución de fermentaciones naturales de mosto Mencía de cultivo ecológico (Eco) y convencional (Con) en la DO Ribeira Sacra en la campaña de 2014.

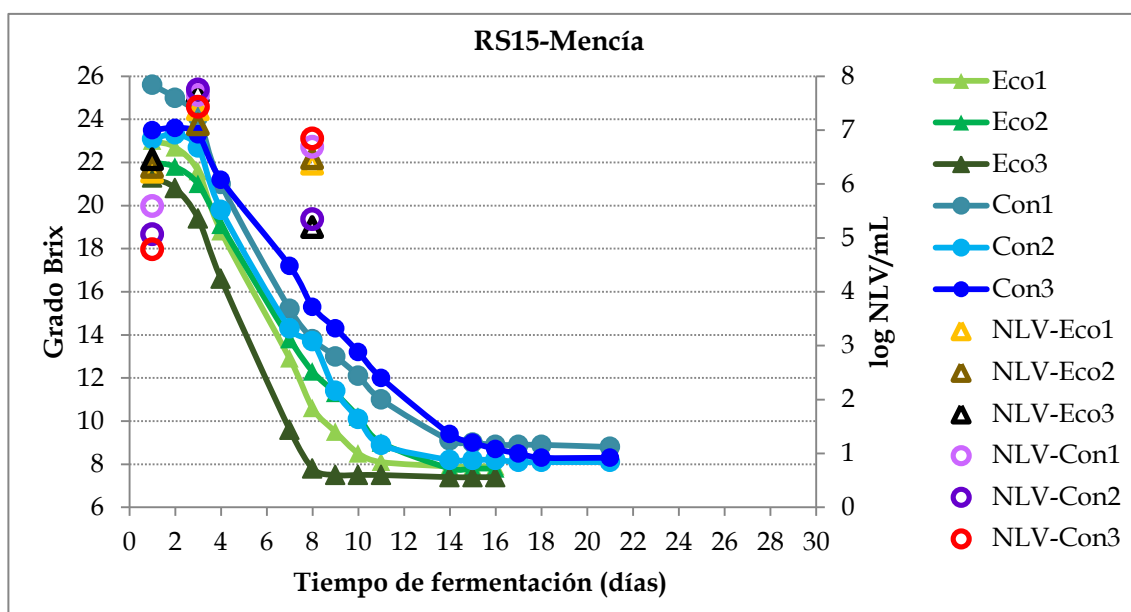


Figura 4.37. Evolución de fermentaciones naturales de mosto Mencía de cultivo ecológico (Eco) y convencional (Con) en la DO Ribeira Sacra en la campaña de 2015.

4.3.4. DO Rías Baixas

4.3.4.1. DO Rías Baixas: variedad Albariño

La cinética fermentativa de las fermentaciones de Albariño de la DO Rías Baixas en 2013 se muestra en la Figura 4.38. Los mostos ecológicos fermentaron completamente el azúcar disponible ($^{\circ}\text{Brix} < 7$), excepto uno de ellos, al igual que se observó para Treixadura en la DO Ribeiro (Figura 4.29). Sin embargo, los mostos convencionales fermentaron más lentamente y no se consumió todo en azúcar. La población de levaduras no mostró muchas diferencias a nivel cuantitativo, aumentando en la fase inicial (día 7) para disminuir

ligeramente al final del proceso (día 27). La identificación de las levaduras en las distintas fermentaciones mostró la presencia de *S. cerevisiae* en las que se consumieron los azúcares, mientras que otras especies como *Metschnikowia* spp., *H. uvarum*, *I. terricola* y *Candida* spp. con menor poder fermentativo estuvieron presentes en los demás ensayos.

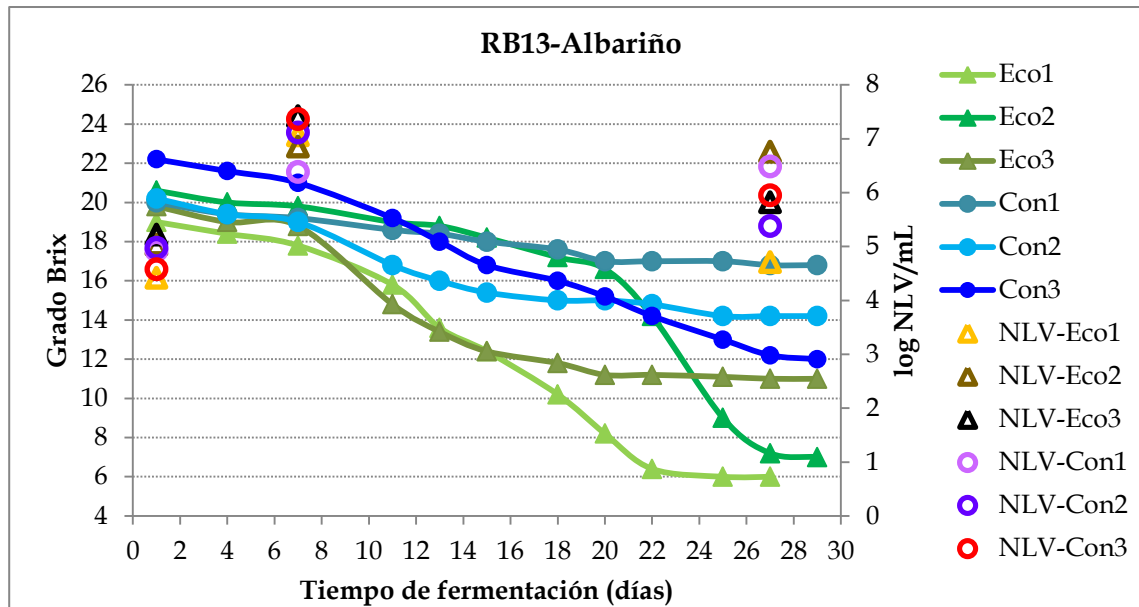


Figura 4.38. Evolución de fermentaciones naturales de mosto Albariño de cultivo ecológico (Eco) y convencional (Con) en la DO Rías Baixas en la campaña de 2013.

En 2014 todas las vinificaciones mostraron una cinética fermentativa normal, aunque las muestras de mosto convencional presentaron menor número de levaduras y tardaron más días en empezar a fermentar (Figura 4.39). Una vez iniciado el proceso la velocidad de fermentación fue rápida para ralentizarse de nuevo hacia el final. La población de levaduras en mosto fue superior a la anterior campaña, y también aumentó más durante la fermentación, alcanzándose del orden de 1.4×10^8 células/mL en las muestras ecológicas.

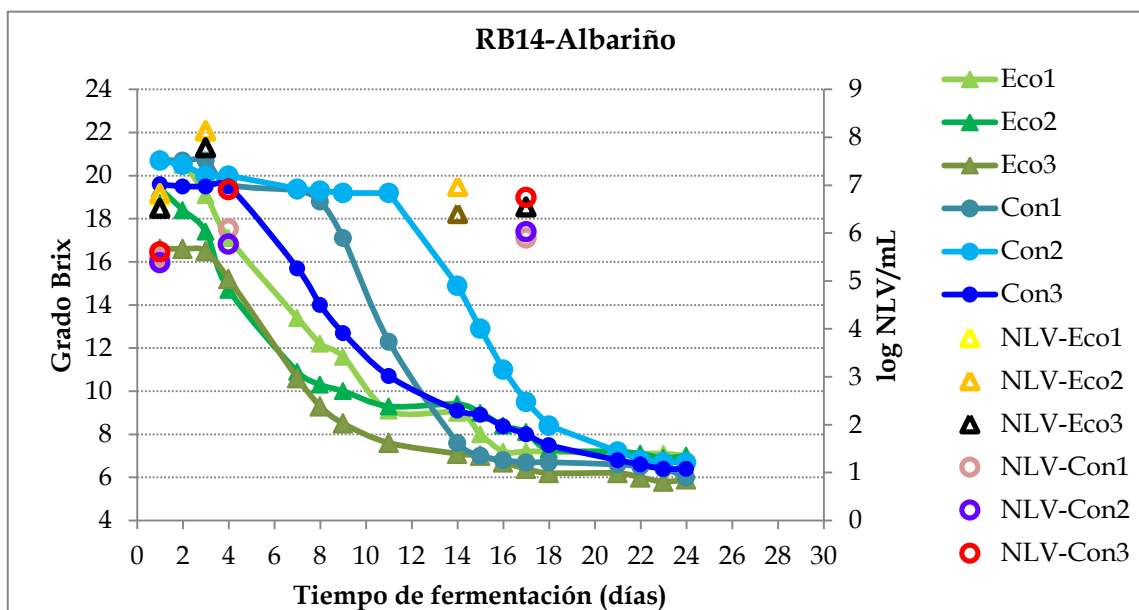


Figura 4.39. Evolución de fermentaciones naturales de mosto Albariño de cultivo ecológico (Eco) y convencional (Con) en la DO Rías Baixas en la campaña de 2014.

En las muestras ecológicas de 2014 la fermentación se inició con distintas especies no-*Saccharomyces* incluyendo *Metschnikowia* spp., *H. uvarum*, *I. terricola*, *Starm. bacillaris* y *Candida* spp., que fueron sustituidas por *S. cerevisiae* al final del proceso. La cepa de *S. cerevisiae* dominante fue diferente en las distintas fermentaciones. En las muestras convencionales también se identificaron distintas especies al inicio de la fermentación y *S. cerevisiae* como levadura dominante al final del proceso. En 2015 la cinética fermentativa fue muy regular, y similar en todas las fermentaciones (Figura 4.40), como era de esperar ya que fueron inoculadas con *S. cerevisiae* una vez arrancaron con las levaduras presentes en el mosto (*Metschnikowia* spp., *H. uvarum*, *Starm. bacillaris* y *Candida* spp.).

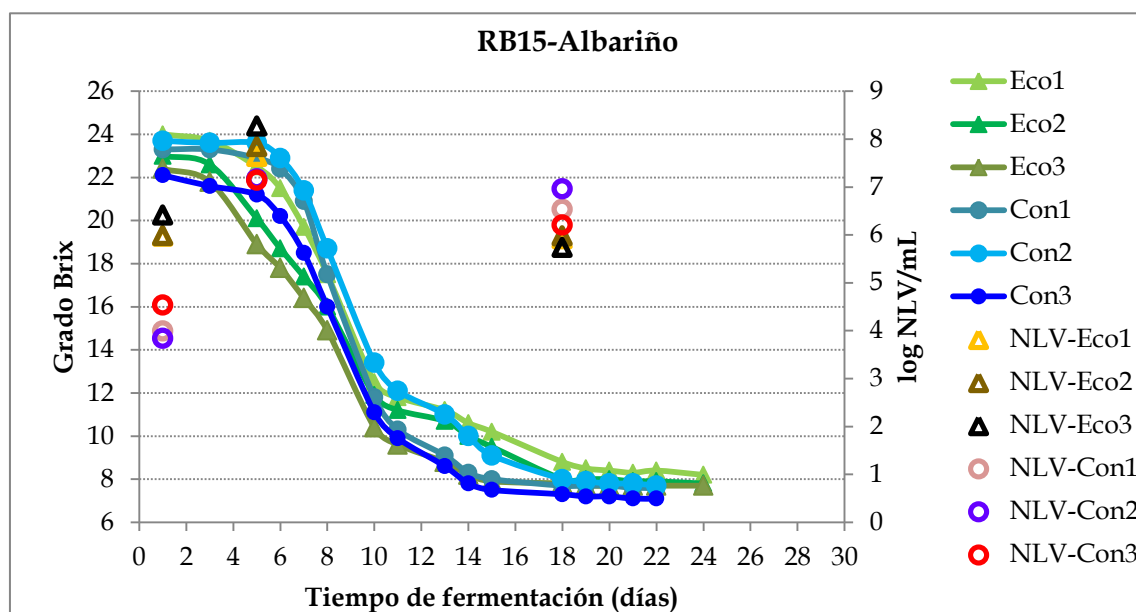


Figura 4.40. Evolución de fermentaciones naturales de mosto Albariño de cultivo ecológico (Eco) y convencional (Con) en la DO Rías Baixas en la campaña de 2015.

4.3.4.2. DO Rías Baixas: variedad Treixadura

Las fermentaciones de Treixadura en 2013 mostraron una evolución diferente entre ellas. Los mostos ecológicos tardaron más días en empezar a fermentar (especialmente Eco1) y Eco3 mostró una velocidad de fermentación más lenta (Figura 4.41). Las fermentaciones arrancaron con distintas especies incluyendo *Metschnikowia* spp. y *H. uvarum* que fueron sustituidas por *S. cerevisiae* al final del proceso. La cepa de *S. cerevisiae* dominante fue la misma en Eco1 y Eco3, pero diferente en Eco2. La cinética de las fermentaciones con mostos convencionales fue más uniforme con una mayor diversidad de levaduras al inicio del proceso. Las cepas dominantes de *S. cerevisiae* fueron diferentes en Con1 y Con2.

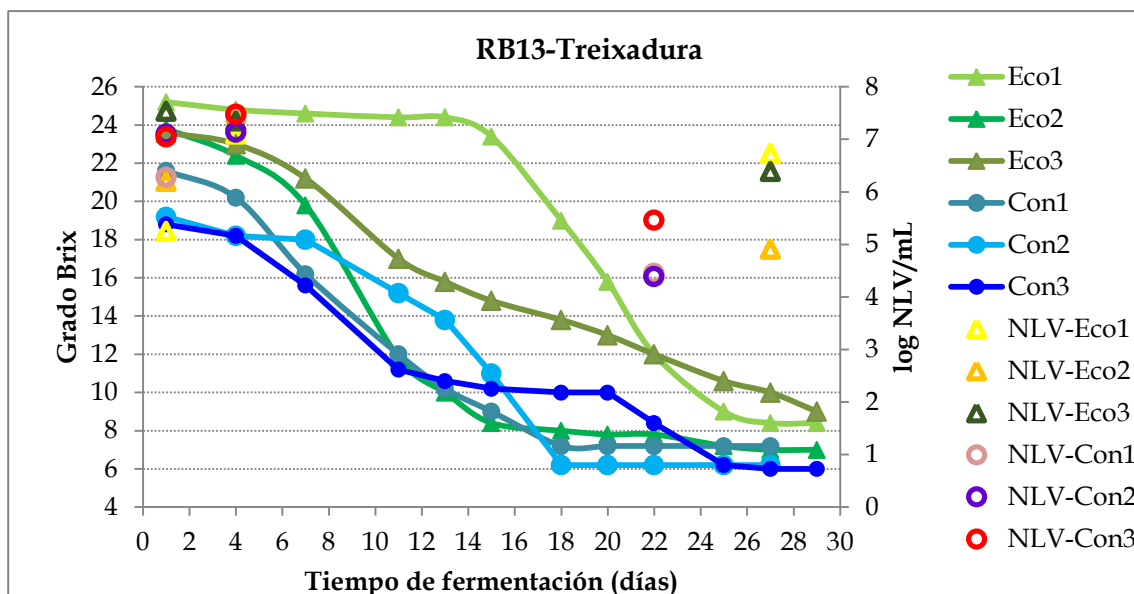


Figura 4.41. Evolución de fermentaciones naturales de mosto Treixadura de cultivo ecológico (Eco) y convencional (Con) en la DO Rías Baixas en la campaña de 2013.

En 2014 todas las fermentaciones de Treixadura presentaron una evolución similar, si bien las convencionales empezaron y terminaron antes que las ecológicas. Una vez iniciado el proceso, la velocidad de fermentación fue rápida llegando a la fase final en menos de 10 días, donde se ralentizó (Figura 4.42), acorde con una mayor población de levaduras viables en todas las fases del proceso. De nuevo, las fermentaciones arrancaron con distintas especies de levaduras incluyendo *Metschnikowia* spp., *H. uvarum*, *I. terricola*, *Starm. bacillaris*, *Candida* spp., *D. hansenii* y *Pichia* spp., que fueron sustituidas por *S. cerevisiae* al final del proceso; aunque seguían presentes algunas levaduras de la fase inicial como *Metschnikowia* spp. y *Starm. bacillaris*, y aparecieron otras como *P. kudriavzevii* que no había sido identificada al inicio de la fermentación. En las fermentaciones con mosto ecológico la cepa dominante de *S. cerevisiae* fue la misma en Eco2 y Eco3, mientras que en Eco1 se observó un fenómeno de codominancia de distintas levaduras.

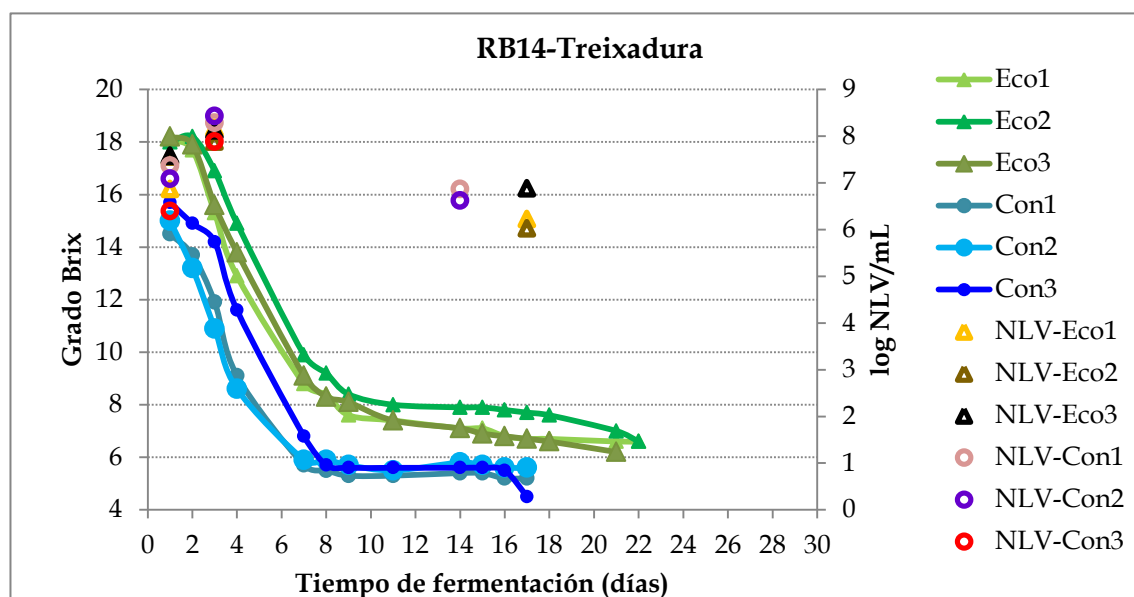


Figura 4.42. Evolución de fermentaciones naturales de mosto Treixadura de cultivo ecológico (Eco) y convencional (Con) en la DO Rías Baixas en la campaña de 2014.

En 2015 las fermentaciones fueron rápidas (10 días) y presentaron una evolución similar, excepto la Eco1 que mostró menor velocidad de fermentación y se prolongó hasta 20 días (Figura 4.43). Las levaduras *H. uvarum*, *I. terricola*, *Starm. bacillaris* y *P. kluyveri* iniciaron la fermentación y fueron sustituidas por *S. cerevisiae*. En todas las fermentaciones se implantó la cepa EC1118 de *S. cerevisiae* inoculada.

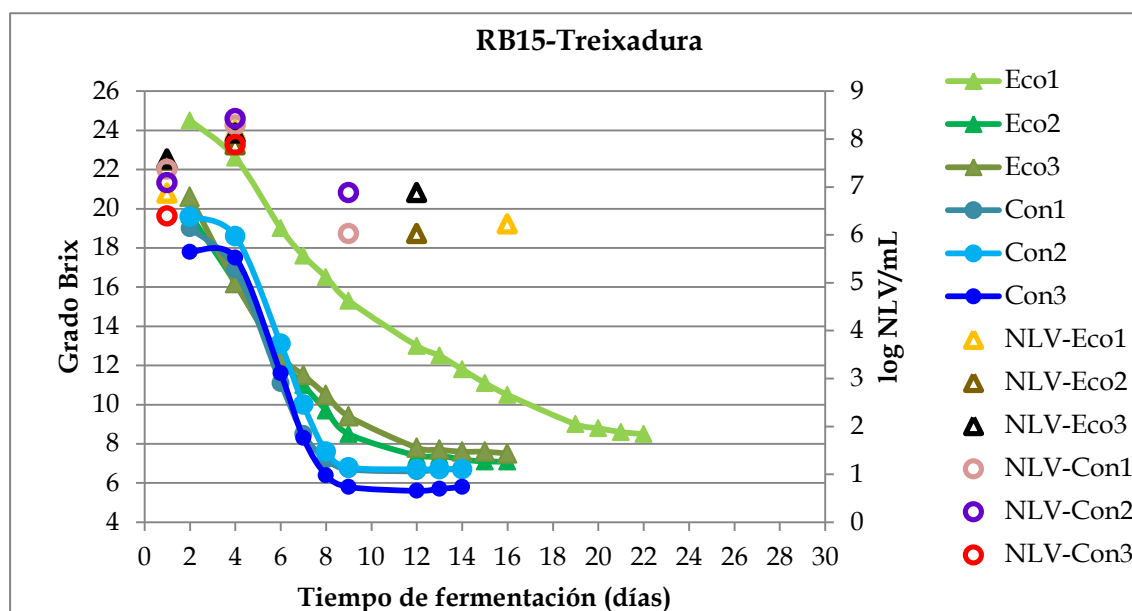


Figura 4.43. Evolución de fermentaciones naturales de mosto Treixadura de cultivo ecológico (Eco) y convencional (Con) en la DO Rías Baixas en la campaña de 2015.

Obviamente, la composición del mosto y la evolución de la fermentación repercuten en las características del vino. Por esta razón, la utilización de cultivos iniciadores mixtos autóctonos no-*Saccharomyces/Saccharomyces*, capaz de explotar la diversidad de cepas nativas, podría ser una alternativa válida para una fermentación estable que garantice o mejore las propiedades organolépticas del vino al disminuir la microbiota alterante (Comitini et al., 2011; Ciani y Comitini, 2015).

Nuestros resultados coinciden con los de otros autores en los que *Hanseniaspora*, *Metschnikowia* y *Candida* son los principales géneros de levaduras fermentativas detectados en los mostos de uva al comienzo de la FA, y en los que también se ha observado una gran variabilidad en la frecuencia de no-*Saccharomyces* (Capozzi, 2015; Combina et al., 2005; Fleet et al., 2003; Prakitchaiwattana et al., 2004; Oro et al., 2014). *H. uvarum* y *Metschnikowia* predominaron en todas las muestras, pero junto con las otras no-*Saccharomyces* fueron reemplazadas durante la fermentación por *S. cerevisiae* tal y como han concluido numerosos estudios (Canonico et al., 2016; Ciani et al., 2010; Povhe Jemec et al., 2001; Torija et al., 2001). *Metschnikowia* spp. tienen un comportamiento oxidativo y son parte de la microbiota asociada a la uva cultivada en climas húmedos y lluviosos (Longo et al., 1991). Además, *M. pulcherrima* tiene actividad antimicrobiana sobre otras levaduras del vino (Capozzi et al., 2015; Oro et al., 2014) debido a un efecto antagónico entre levaduras, incluida *S. cerevisiae*, es decir, un efecto *killer* diferente al de *S. cerevisiae*, relacionado con el pigmento pulcherrimina que produce (Jolly et al., 2014). Dicho efecto se produce, aunque la presencia de *M. pulcherrima* se limite a los primeros días de la FA debido a su baja

capacidad fermentativa y tolerancia al etanol (Milanović et al., 2013; Sadoudi et al., 2012). También se ha encontrado actividad antimicrobiana contra otras levaduras en algunas especies de *Pichia* y *Kluyveromyces* (Comitini et al., 2004; Middelbeek et al., 1980; Santos et al. 2009). Dependiendo de las diferentes regiones de muestreo, *Hanseniaspora* spp. (principalmente *H. uvarum* y *H. guilliermondii*) se han aislado al comienzo de la FA en un porcentaje que oscila entre 16 y 78% (Pramateftaki et al., 2000; Povhe Jemec et al., 2001; Combina et al., 2005). *H. uvarum* tiene baja potencia de fermentación, pero su presencia es importante en la producción de compuestos volátiles del vino. Así, la composición química de vinos elaborados con *Hanseniaspora* spp./*S. cerevisiae* difieren de la de vinos de referencia fermentados con solo *S. cerevisiae* (Mateo et al., 1991; Romano et al., 1997b; Lleixà et al., 2016). En algunos trabajos se ha observado, además, que el crecimiento inicial de *Hanseniaspora* tuvo un efecto retardante en el crecimiento posterior de *S. cerevisiae* (Jolly et al., 2014). Este fenómeno podría ser una causa adicional de las fermentaciones rezagadas o atascadas encontradas en algunas de las muestras. Por otra parte, algunas cepas de *Zygosaccharomyces* pueden reiniciar las fermentaciones atascadas debido a su naturaleza fructofílica, útil en mostos con altas concentraciones de azúcar donde la concentración de fructosa puede exceder la de glucosa al inicio de la fermentación afectando el crecimiento de *S. cerevisiae* (Jolly et al., 2014). También se han descrito toxinas *killer* (zymocins) producidas por *P. kluyveri* que pueden inhibir el crecimiento de ciertas cepas de *S. cerevisiae* (Middelbeek et al., 1980). *Zygosaccharomyces* spp. y *P. kluyveri* aparecieron principalmente en las fermentaciones de Mencía de la DO Ribeira Sacra y en menor medida en Treixadura de la DO Rías Baixas. Esto podría explicar la cinética fermentativa de algunas de dichas muestras.

Cabe resaltar que las levaduras oxidativas mayoritarias en algunas muestras de uva y/o mostos, incluyendo *A. pullulans* (todas las DOs), *Rhodotorula* spp. (DO. Rías Baixas) y *Cryptococcus* spp. (DO Ribeiro), fueron las primeras en declinar y no se detectaron durante la fermentación. Este comportamiento también fue observado por otros investigadores (Bagheri et al., 2015). Sin embargo, aunque con carácter simbólico, *R. mucilaginosa* se encontró en dos muestras (una en Fi y otra en Ff), persistiendo durante la fermentación tal y como han demostrado otros estudios (Diaz et al., 2013). Setati et al. (2012) y Cordero-Bueso et al. (2011a) encontraron *L. thermotolerans* en fermentaciones de mostos biodinámicos y convencionales. Bagheri et al. (2015) encontraron esta especie como predominante en las fermentaciones Fi-Ft de mostos convencionales. Por el contrario, en nuestras muestras *L. thermotolerans* se encontró principalmente en fermentaciones de mosto ecológico (DOs Ribeiro y Monterrei), como también hallaron Tello et al. (2011). *L. thermotolerans* es una especie común en muchas regiones del mundo. En 2015, la mayor concentración de *L. thermotolerans* se obtuvo con similar frecuencia (31%) en mosto ecológico de la misma variedad (Treixadura). En estas muestras la diversidad de no-*Saccharomyces* también fue similar, con baja proporción total (4-4.5 log UFC/mL, mayor en convencional) y sin especies fermentativas. *L. thermotolerans* se detectó en la Ff en la DO Monterrei donde las tres fermentaciones fueron exitosas mientras que solo apareció en Fi en las muestras de la DO Ribeiro que transcurrieron con lentitud prolongándose durante el doble de tiempo (hasta 25 días). Por lo tanto, pudieron influir también otros factores como los componentes del mosto. Los mostos, con una elevada concentración de azúcar (> 250 g/L) fueron muy similares a excepción de la concentración de NFA que pudo ser limitante

(Tabla 4.1 y Tabla 4.3); fue muy baja en los mostos de la DO Ribeiro (106 mg/L), aproximadamente la mitad que en los de la DO Monterrei. Sin embargo, los vinos secos obtenidos fueron sorprendentemente similares a excepción de una mayor concentración de glicerol en los vinos de la DO Monterrei (Tabla 4.25). No obstante, no se encontró *L. thermotolerans* en los mostos convencionales análogos que también fueron muy parecidos, incluso en el valor de Cu y de NFA que no fue limitante (> 200 mg/L) y presentaron una diversidad de levaduras similar. Por lo tanto, la dinámica fermentativa es compleja, en la que pueden influir numerosos factores de diversa índole. Se ha sugerido que la proporción de *L. thermotolerans* está influenciada por la densidad celular inicial, pero además por la competencia e interacciones entre levaduras (Bagheri et al., 2015). En un número significativo de fermentaciones se encontraron *L. thermotolerans* y *Starm. bacillaris* en la Ff lo que indica que estas especies sobreviven a elevadas concentraciones de etanol. Algunas no-*Saccharomyces* fueron detectadas en la Ff incluso en las fermentaciones guiadas tal y como ya apuntaron otros autores (Tofalo et al., 2011). Además, en algunos casos como en las DOs Ribeira Sacra y Ribeiro en 2013 y en Brancellao de 2014 la presencia de estas levaduras con capacidad fermentativa podría explicar una mejor evolución de la fermentación. Sin embargo, en otros casos no fue suficiente para garantizar una fermentación rápida como en el caso de las muestras convencionales de la DO Ribeira Sacra en 2014 o en el Albariño de 2013. En la misma línea, nuestros resultados también coincidieron con los obtenidos por Bagheri et al. (2015) en que *Starm. bacillaris* fue mayoritaria en la Fi-Ft de mostos de ambos sistemas de cultivo. Hay que destacar que en las DOs donde *Starm. bacillaris* apareció, se detectó una mayor frecuencia (Tabla 4.13 y Figura 4.10) en los mostos con el nivel de azúcar más alto (Tabla 4.1 a Tabla 4.7), lo cual es consistente con estudios previos que comúnmente han asociado esta levadura con uvas botrizadas (Mills et al., 2002) o mostos con alto contenido de azúcar (Setati et al., 2015; Tofalo et al., 2012). Esto sugiere que algunas de las diferencias de la diversidad de levaduras en las muestras de mostos se pueden atribuir en parte a las diferencias en los niveles de madurez. Sin embargo, no se identificó *Starm. bacillaris* en otros mostos de este trabajo con alto contenido en azúcar. Por otra parte, algunas de nuestras especies minoritarias como *I. terricola*, *C. apicola* o *P. anomala* también fueron encontradas durante el inicio de la fermentación por otros autores, generalmente en bajas proporciones en ambos sistemas de cultivo (Bagheri et al., 2015; Cordero-Bueso et al., 2011a; Setati et al., 2012; Tello et al., 2011).

En cuanto al NLV/mL (UFC/mL), Patrignani et al. (2017) y Tofalo et al. (2011) describieron valores inferiores a los nuestros de no-*Saccharomyces* (3-4 log UFC/mL) en fermentaciones espontáneas de mostos ecológicos a los 3 días. Sin embargo, los valores en fermentaciones guiadas de mostos ecológicos fueron similares (4-7 log UFC/mL). A grandes rasgos, nuestros resultados también coinciden con los de estos y otros autores en que durante la fermentación tumultuosa (4-10 días desde el inicio de la fermentación) la población de levaduras no-*Saccharomyces* mostró un notable aumento de 10^5 a 10^8 UFC/mL independientemente del tipo de fermentación (guiada o espontánea) y del sistema de cultivo; la población de *S. cerevisiae* se incrementó rápidamente a 10^7 - 10^8 UFC/mL y posteriormente se produjo el declive constante de levaduras hasta que la mayor parte del azúcar fue consumido (Bagheri et al., 2015; Patrignani et al., 2017a). En cuanto a la duración, la fermentación espontánea tardó más tiempo que la guiada, pero el alto número

de levaduras no-*Saccharomyces* no pareció afectar a la fermentación de *S. cerevisiae*, según el contenido de azúcar residual tal y como también concluyeron Tofalo et al., 2011. Además, la duración de la fermentación espontánea de los mostos ecológicos no fue, en general, superior a la de los convencionales. La carga de células de *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* decreció más rápidamente en las fermentaciones guiadas comparadas con las espontáneas. En algunos casos durante los tres años se observó un conteo similar de células viables en ambos sistemas de cultivo en Ft y Ff; sin embargo, en Fi la carga microbiana varió entre años.

4.4. Análisis de los vinos obtenidos mediante fermentación natural de mostos de producción ecológica y convencional

Las diferencias observadas durante la fermentación se reflejan y confirman con los datos de los vinos resultantes.

4.4.1. DO Monterrei: variedades Treixadura y Mencía

En 2013 no se pudieron estudiar las diferencias entre los vinos de **Treixadura** debido a los problemas encontrados en las fermentaciones. En la Tabla 4.25 se muestra la media de dos de las fermentaciones con mosto ecológico y un vino convencional; el grado alcohólico adquirido, la acidez total y el pH fueron similares en el vino ecológico y los convencionales. En 2014 se observaron diferencias significativas solo en el pH y en el contenido de cobre. Los vinos de mosto convencional presentaron mayor grado y acidez total, así como menor pH que los ecológicos. Por el contrario, en 2015 el grado fue mayor en cultivo ecológico, aunque esas diferencias no fueron significativas. Sin embargo, sí lo fueron en el contenido en cobre, mayor en cultivo convencional, como en 2014.

Tabla 4.25. Características de los vinos de la variedad Treixadura (Trx) obtenidos mediante fermentación natural de mostos de origen convencional (Con) y ecológico (Eco) en la DO Monterrei.

DO Monterrei	Trx-2013		Trx-2014		Trx-2015	
	Eco	Con	Eco	Con	Eco	Con
Grado alcohólico (%vol.)	14.5±0.8	14.1	13.5±0.9	14.2±0.5	14.9±1.1	13.8±0.7
Glucosa + fructosa (g/L)	0.5±0.0	0.1	1.5±0.8	3.7±3.1	0.8±0.8	0.6±0.0
Acidez total (g tart./L)	6.2±0.0	6.4	7.5±0.7	8.5±0.4	7.0±1.1	7.2±0.1
Acidez volátil (g acético/L)	0.45±0.40	0.29	0.63±0.23	0.65±0.18	0.34±0.09	0.36±0.15
Ácido láctico (g/L)	1.3±0.5	2.2	2.367	2.4±1.8	1.5±1.2	0.3±0.2
Ácido málico (g/L)	1.0±0.3	0.4	0.3±0.3	0.8±0.6	1.0±0.7	1.7±0.2
Ácido tartárico (g/L)	3.0±0.3	3.4	2.9±0.6	3.9±1.3	3.6±0.6	3.9±0.4
pH (-) ²	3.62±0.01	3.55	3.38±0.09	3.16±0.09	3.30±0.10	3.18±0.09
Extracto Seco Total (g/L)	24.8±1.1	22.2	25.8±2.4	29.0±4.8	21.6±1.8	21.1±0.5
Glicerol (g/L)	9.3±0.5	5.9	9.4±0.1	6.6±1.9	8.5±1.8	8.2±0.3
Cobre (mg/L) ²	0.10±0.00	0.10	0.11±0.02	27.45±5.59	0.10±0.00	0.29±0.16

Los datos son la media de tres repeticiones ± desviación estándar (excepto en 2013 Eco2 y Eco3-dos repeticiones; Con2-una fermentación). El superíndice ² indica que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre cultivo ecológico y convencional para ese parámetro en 2014.

Tabla 4.26. Características de los vinos de la variedad Mencía (Me) obtenidos mediante fermentación natural de mostos de origen convencional (Con) y ecológico (Eco) en la DO Monterrei.

DO Monterrei	Men-2013		Men-2015	
	Eco	Con	Eco	Con
Grado alcohólico (% vol.) ^{1,3}	12.9±0.2	10.6±1.3	13.6±0.2	12.3±0.3
Glucosa + fructosa (g/L)	0.2±0.2	0.0±0.0	0.3±0.1	0.2±0.0
Acidez total (g tart./L)	7.7±1.7	6.4±1.4	5.7±0.3	6.1±0.1
Acidez volátil (g acético/L)	0.48±0.12	0.39±0.19	0.53±0.31	0.31±0.15
Ácido láctico (g/L)	-	-	2.8±1.6	1.6±0.4
Ácido málico (g/L)	0.1±0.1	0.6±0.5	0.4±0.6	0.5±0.1
Ácido tartárico (g/L) ¹	2.9±0.1	3.4±0.3	3.4±0.3	4.0±0.3
pH (-) ³	4.28±0.31	3.82±0.08	4.20±0.18	3.73±0.07
Extracto Seco Total (g/L) ^{1,3}	34.3±2.2	26.3±2.6	36.7±3.8	29.1±1.5
Glicerol (g/L) ¹	7.7±1.0	5.7±0.4	8.5±1.8	8.2±0.3
Cobre (mg/L)	0.10±0.00	0.10±0.00	0.24±0.02	0.25±0.02

Los datos son la media de tres repeticiones ± desviación estándar. Los superíndices ¹ y ³ indican que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre cultivo ecológico y convencional para ese parámetro en 2013 y 2015, respectivamente.

Con la variedad **Mencía** solo se evaluaron las campañas de 2013 y 2015. Los resultados muestran que el grado y extracto seco fue significativamente mayor en cultivo ecológico en las dos campañas, y también el glicerol en 2013 (Tabla 4.26). El pH fue más alto en los vinos ecológicos. En casi todos los casos los vinos llevaron a cabo la FML, aunque algunos solo parcialmente.

4.4.2. DO Ribeiro: variedades Treixadura y Brancellao

En los vinos elaborados en 2013 con **Treixadura** (Tabla 4.27), no se consumieron los azúcares en todas las fermentaciones. Se han considerado Con1 y Con3, y Eco3. El grado obtenido fue mayor en ecológico mientras que la acidez fue más elevada en los vinos convencionales. En ambos casos los vinos iniciaron la FML.

Tabla 4.27. Características de los vinos de la variedad Treixadura (Trx) obtenidos mediante fermentación natural de mostos de origen convencional (Con) y ecológico (Eco) en la DO Ribeiro.

DO Ribeiro	Trx-2013		Trx-2014		Trx-2015	
	Eco	Con	Eco	Con	Eco	Con
Grado Alcohólico (% vol.) ^{2,3}	14.7	11.3±0.6	12.5±0.5	11.4±0.6	15.4±0.1	14.4±0.4
Glucosa + Fructosa (g/L) ²	1.1	0.5±0.1	1.3±1.1	8.9±4.5	1.7±0.3	1.0±0.4
Acidez Total (g tart./L) ^{2,3}	6.7	11.4±2.9	8.0±0.6	6.7±0.6	8.8±0.2	5.9±0.8
Acidez Volátil (g acético/L) ³	0.54	0.86±0.04	0.82±0.11	0.97±0.20	0.48±0.03	0.34±0.01
Ácido Láctico (g/L)	2.6	0.9±0.1	0.6±0.9	0.9±0.5	0.1±0.0	0.2±0.0
Ácido Málico (g/L) ³	0.8	0.9±0.4	1.7±0.6	0.9±0.7	0.9±0.3	1.9±0.1
Ácido Tartárico (g/L) ³	2.7	6.5±1.3	4.8±1.6	3.3±0.7	7.8±0.3	2.8±0.5
pH (-) ³	3.89	2.95±0.43	3.02±0.32	3.34±0.11	3.07±0.06	3.43±0.20
Extracto Seco Total (g/L)	27.3	36.0±5.4	24.7±1.9	27.7±5.4	24.4±0.4	22.8±2.1
Glicerol (g/L)	9.2	8.1±3.1	9.0±0.9	8.2±0.6	4.7±0.7	6.7±0.9
Cobre (mg/L)	0.1	0.10±0.00	0.38±0.28	0.15±0.08	*	*

Los datos son la media de tres repeticiones ± desviación estándar (Excepciones: en 2013 media de Con1 y Con3; Eco3. En 2015 Eco1 no se consideró para la media; Con1 hizo la FML y no se consideró para la media de ácido láctico y tartárico). Los superíndices ² y ³ indican que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre cultivo ecológico y convencional para ese parámetro en 2014 o 2015, respectivamente. * En 2015 no se determinó el cobre.

En 2014 los vinos convencionales presentaron más azúcares residuales y menor grado y acidez que los ecológicos. En 2015 (año más cálido), los vinos presentaron mayor grado que en las otras dos campañas. Eco1 no se consideró para la media porque presentaba azúcares, mayor acidez y glicerol y realizó la FML. También lo hizo la fermentación Con1. Se observaron diferencias significativas tanto en grado como en acidez total, volátil, ácido málico, tartárico y pH. El vino ecológico tuvo más grado y también mayor acidez total y contenido de ácido tartárico, pero menor pH que el convencional.

Con la variedad tinta **Brancellao** las fermentaciones terminaron con el consumo total de azúcares (Tabla 4.28). No se encontraron diferencias significativas en cuanto al grado adquirido entre los vinos ecológicos y convencionales, aunque sí se observó que en 2015 fue mayor en ambos casos. En esta última campaña se observaron diferencias en cuanto a la acidez total y contenido en ácido tartárico de los vinos, más alto en los ecológicos. De acuerdo a esto, el pH fue más bajo, como ocurrió también en 2013 en estos vinos. El contenido de tartárico también fue superior en 2014 en los vinos ecológicos.

Tabla 4.28. Características de los vinos de la variedad Brancellao (Br) obtenidos mediante fermentación natural de mostos de origen convencional (Con) y ecológico (Eco) en la DO Ribeiro.

DO Ribeiro	Br-2013		Br-2014		Br-2015	
	Eco	Con	Eco	Con	Eco	Con
Grado alcohólico (% vol.)	10.83±0.40	11.10±1.92	11.20±2.19	11.30±0.95	12.57±0.21	12.57±0.06
Glucosa + fructosa (g/L)	0.03±0.06	0.07±0.12	0.2±0.00	0.60±0.69	0.23±0.06	0.40±0.20
Acidez total (g tart./L) ³	5.9 [§]	6.57±1.19	6.13±0.06	6.10±0.62	7.30±0.52	6.10±0.26
Acidez volátil (g acético/L) ³	0.55 [§]	0.91±0.42	0.45±0.04	0.60±0.12	0.31±0.03	0.37±0.02
Ácido láctico (g/L)	-	-	0.67±0.15	0.90±0.62	0.20±0.10	0.10±0.00
Ácido málico (g/L) ³	0.27±0.21	0.27±0.29	0.67±0.06	1.27±0.57	0.97±0.21	2.13±0.31
Ácido tartárico (g/L) ^{2,3}	4.17±0.70	3.87±0.81	3.53±0.31	2.43±0.59	6.23±0.42	3.63±0.29
pH (-) ^{1,3}	3.63±0.09	3.88±0.06	3.39±0.05	3.48±0.19	3.24±0.04	3.70±0.09
Extracto Seco Total (g/L)	32.30±7.90	31.27±5.01	26.00±0.95	24.85±0.07	30.30±1.92	29.63±0.06
Glicerol (g/L)	5.07±0.93	4.60±0.56	10.20±1.57	8.30±1.25	7.80±0.40	7.83±0.06
Cobre (mg/L)	0.1	0.10±0.00	0.20±0.03	0.25±0.09	*	*

Los datos son la media de tres repeticiones ± desviación estándar. Los superíndices ^{1, 2 y 3} indican que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre cultivo ecológico y convencional para ese parámetro en 2013, 2014, o 2015 respectivamente. * En 2015 no se determinó el cobre. [§] Solo se consideró Eco3 para ese parámetro.

4.4.3. DO Ribeira Sacra: variedad Mencía

Las características de los vinos elaborados con uvas Mencía de la DO Ribeira Sacra de origen ecológico y convencional se muestran en la Tabla 4.29. En los ensayos en los que se consumió el azúcar con producción de alcohol como es de esperar en una fermentación controlada se observó que el vino de cultivo ecológico (Eco3) presentó mayor grado alcohólico, pero menor pH y acidez volátil que el convencional (Con2). En los demás ensayos el grado alcohólico varió de unas fermentaciones a otras, indicando diferencias en como las levaduras y/o bacterias habían metabolizado los azúcares. La fermentación natural de los mostos convencionales de 2014 condujo por tanto a la obtención de vinos con azúcares residuales y de elevada acidez. En 2013 se incluyen los datos de los vinos Eco1 y Con2; en las demás fermentaciones no se consumieron los azúcares, el grado alcanzado fue inferior a 9% y la acidez volátil muy elevada. Se comprobó además que, especialmente en

las variedades tintas, los vinos de 2015 tuvieron mayor graduación alcohólica que en los dos años precedentes.

Tabla 4.29. Características de los vinos de la variedad Mencía (Me) obtenidos mediante fermentación natural de mostos de origen convencional (Con) y ecológico (Eco) en la DO Ribeira Sacra.

DO Ribeira Sacra	Me-2013*		Me-2014		Me-2015	
	Eco1	Con2	Eco	Con	Eco	Con
Grado alcohólico (%vol.)	12.5	11.9	12.4±0.1	3.6±1.0	13.0±0.6	13.8±0.5
Glucosa + fructosa (g/L)	0.7	0.3	0.6±0.6	135.5±20.5	0.3±0.1	0.6±0.7
Acidez total (g tart./L)	6.0	6.0	5.8±0.1	29.5±3.8	5.9±0.1	5.9±0.2
Acidez volátil (g acético/L) ³	0.48	0.83	0.63±0.01	13.53±1.7	0.32±0.02	0.48±0.08
Ácido láctico (g/L)	-	-	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.1	0.1±0.0
Ácido málico (g/L)	1.7	1.0	1.6±0.3	14.9±1.9	1.3±0.1	1.7±0.4
Ácido tartárico (g/L)	2.8	2.8	2.5±0.3	12.2±1.7	3.7±0.1	3.1±0.4
pH (-) ³	3.69	3.82	3.69±0.07	2.94±0.15	3.61±0.02	3.75±0.09
Extracto Seco Total (g/L)	25.8	26.3	26.6±0.7	160.9±16.1	27.5±0.1	29.5±1.6
Glicerol (g/L)	8.1	8.8	9.5±0.5	14.8±0.7	9.0±0.4	8.3±0.4
Cobre (mg/L)	0.10	0.10	0.24±0.00	0.27±0.03	0.34±0.06	**

Los datos son la media de tres repeticiones ± desviación estándar. 2013-Eco1 y Con2. 2014-Eco-media de Eco2 y Eco3. El superíndice ³ indica que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre cultivo ecológico y convencional para ese parámetro 2015. * En 2013 se incluyen los datos de los vinos Eco1 y Con2. ** En 2015 no se determinó el cobre.

4.4.4. DO Rías Baixas: Albariño y Treixadura

Dada la evolución de las fermentaciones de **Albariño** de la campaña del 2013, en las muestras convencionales y en Eco3 se obtuvo un grado alcohólico bajo, elevada acidez volátil y > 60 g/L de azúcares (Tabla 4.30). Los vinos de las campañas 2014 y 2015 no mostraron diferencias significativas en grado, acidez ni pH, pero sí en el contenido de glicerol en ambas campañas, y en acidez volátil en 2015.

Tabla 4.30. Características de los vinos de la variedad Albariño (Alb) obtenidos mediante fermentación natural de mostos de origen convencional (Con) y ecológico (Eco) en la DO Rías Baixas.

DO Rías Baixas	Alb-2013*		Alb-2014		Alb-2015	
	Eco1 y 2	Con3	Eco	Con	Eco	Con
Grado alcohólico (%vol.)	10.8±0.9	9.0	11.7±0.4	10.9±1.3	13.4±0.6	13.7±0.6
Glucosa + fructosa (g/L)	1.0±0.7	67.3	1.1±1.4	0.3±0.1	1.0±0.7	1.1±0.5
Acidez total (g tart./L)	9.8±0.7	10	8.7±0.6	9.7±0.9	10.4±0.8	9.2±0.4
Acidez volátil (g acético/L) ³	0.47±0.11	2.41	0.60±0.30	0.99±0.06	0.79±0.12	0.36±0.06
Ácido láctico (g/L)	0.1±0.1	0.2	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0
Ácido málico (g/L)	1.5±0.2	3.2	3.4±0.3	3.7±0.8	2.4±0.7	2.3±0.3
Ácido tartárico (g/L)	6.0±0.7	6.3	4.6±0.3	5.2±0.7	6.5±0.6	5.9±0.3
pH (-)	2.95±0.04	3.16	3.16±0.04	3.30±0.25	2.98±0.05	3.02±0.04
Extracto Seco Total (g/L) ³	28.00±3.68	90.6	25.2±2.4	28.2±1.2	28.2±1.4	24.3±0.7
Glicerol (g/L) ^{2,3}	8.5±0.3	12.7	8.0±0.8	10.5±0.8	9.6±0.7	7.27±0.46
Cobre (mg/L)	9.15±12.37	0.2	15.92±7.01	9.83±7.12	**	**

Los datos son la media de tres repeticiones ± desviación estándar (excepto en 2013). Los superíndices ^{1,2} y ³ indican que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre cultivo ecológico y convencional para ese parámetro en 2013, 2014 o 2015, respectivamente. * En 2013 se muestran los resultados de la muestra Con3 y la media de Eco1 y Eco2. ** En 2015 no se determinó el cobre.

Sin embargo, con la variedad **Treixadura** sí se observaron diferencias significativas en el grado alcohólico, superior en los vinos ecológicos en todas las campañas (Tabla 4.31). En 2014 además de en el grado, los vinos se diferenciaron en la acidez total y el contenido de málico y tartárico, superiores en los vinos convencionales. En esta campaña las uvas aún no habían alcanzado el grado óptimo de madurez, como ya habíamos observado en las características del mosto. En todos los casos, excepto las vinificaciones convencionales de 2015, la acidez volátil fue muy elevada, especialmente en el segundo año, lo que indicó problemas durante la fermentación.

Tabla 4.31. Características de los vinos de la variedad Treixadura (Trx) obtenidos mediante fermentación natural de mostos de origen convencional (Con) y ecológico (Eco) en la DO Rías Baixas.

DO Rías Baixas	Trx 2013		Trx 2014		Trx 2015	
	Eco	Con	Eco	Con	Eco	Con
Grado alcohólico (%vol.) ^{1,2}	14.5±0.6	11.5±0.9	10.7±0.2	7.9±0.2	13.0±1.5	10.8±0.6
Glucosa + fructosa (g/L) ^{1,2}	1.0±0.3	0.2±0.1	2.2±1.2	0.2±0.0	1.2±1.8	0.3±0.1
Acidez total (g tart./L) ²	7.4±1.9	8.6±1.7	8.4±0.9	12.3±1.5	7.4±0.7	7.5±1.0
Acidez volátil (g acético/L) ³	1.02±0.05	1.31±0.35	1.43±0.87	3.49±1.32	0.80±0.04	0.48±0.19
Ácido láctico (g/L) ¹	0.7±0.2	0.4±0.2	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.1	1.2±1.2
Ácido málico (g/L) ²	2.1±0.3	2.2±0.4	3.7±0.8	6.3±1.2	2.9±0.7	1.5±1.2
Ácido tartárico (g/L) ^{2,3}	2.9±1.3	3.9±1.3	2.7±0.6	5.4±0.6	1.6±0.1	3.9±0.2
pH (-) ³	3.65±0.20	3.31±0.31	3.37±0.08	3.27±0.11	3.40±0.03	3.22±0.11
Extracto Seco Total (g/L) ³	29.0±4.8	25.8±2.9	26.7±1.3	27.6±1.5	27.7±0.3	23.2±2.7
Glicerol (g/L)	8.9±0.9	9.3±1.2	10.0±1.0	9.7±0.7	12.3±0.9	8.5±2.7
Cobre (mg/L)	0.25±0.07	0.30±0.17	0.82±0.41	0.15±0.10	*	*

Los datos son la media de tres repeticiones ± desviación estándar (excepto en eco 2013-dos repeticiones). Los superíndices ^{1, 2} y ³ indican que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre cultivo ecológico y convencional para ese parámetro en 2013, 2014 o 2015, respectivamente. * En 2015 no se determinó el cobre.

Los resultados obtenidos en los vinos fueron consistentes con las características de los mostos influenciados por la microbiota presente en ellos.

Cabe destacar que cuando se produjo una sustitución adecuada de las especies de levaduras durante la fermentación se obtuvieron vinos correctos. Los mostos de 2015 (fermentación guiada) y los ecológicos de 2013 (espontánea) presentaron mayor concentración de azúcar y por tanto produjeron mayor concentración de alcohol cuando *S. cerevisiae* se implantó correctamente. Además, estos fueron los años de mayor temperatura lo que pudo influir favorablemente en las muestras ecológicas. En algunas fermentaciones espontáneas, como Albariño o la Mencía de la DO Ribeira Sacra incluso se encontró una mayor concentración de alcohol en los vinos ecológicos que en los convencionales a pesar de que estos últimos tuvieran una cantidad superior de azúcar y sin presentar factores limitantes. Esto podría indicar que la diversidad de levaduras en estas muestras fue más eficiente en términos fermentativos. En comparación con la fermentación guiada, en general, las fermentaciones espontáneas generaron menos grado alcohólico aun cuando tuvieron similar concentración de azúcar. Los mostos de Treixadura presentaron un alto rendimiento de la fermentación, aunque con mayor concentración de alcohol en los mostos ecológicos que en los convencionales, tanto en las fermentaciones espontáneas como en las que se añadió *S. cerevisiae*.

En vinos obtenidos a partir de fermentación espontánea y guiada de mostos ecológicos de concentración de azúcares similar, Patrignani et al. (2017) también encontraron una alta concentración de alcohol (> 14%). En general, aunque eran fermentaciones de distintos años, los vinos de las otras variedades presentaron mayor diferencia en el rendimiento entre la fermentación espontánea y la guiada, con una menor concentración de alcohol en la espontánea. Una de las razones del mayor contenido de azúcar residual en vinificaciones espontáneas podría deberse a cepas silvestres de *S. cerevisiae* que no están dotadas de una alta tolerancia al alcohol. Es conocida la amplia variabilidad de la tolerancia al alcohol y la producción de ácido acético, también en relación con las condiciones de estrés durante la fermentación, en especies como *S. cerevisiae*; son deseables cepas que den lugar a una conversión eficiente de los azúcares de la uva en alcohol y bajos niveles de liberación de ácido acético en el vino (Pretorius, 2000; Vernocchi et al., 2015).

Asimismo, al contrario que lo descrito por Patrignani et al. (2017), los vinos de fermentaciones espontáneas de mosto ecológicos no mostraron niveles más altos de azúcares reductores que los de las guiadas, aunque sí ocurrió así en varios de los mostos convencionales. Esto demuestra que, aunque algunas de las fermentaciones espontáneas de mostos ecológicos como en Treixadura de la DO Ribeiro en las que la fermentación transcurrió lentamente y se prolongó durante varias semanas, pueden obtenerse vinos secos. Sin embargo, en cuanto a la acidez volátil nuestros resultados sí coinciden con los descritos por Patrignani et al. (2017), en los que la concentración fue mayor en las fermentaciones espontáneas que en las guiadas. La materia seca fue mayor en muestras convencionales. La acidez total, el pH y el ácido láctico tampoco mostraron un patrón definido en cuanto a su diferenciación entre fermentaciones espontáneas y guiadas ni tampoco entre sistemas de producción, aunque sí se observó una tendencia hacia una mayor acidez total en las muestras convencionales, que fue mayor en los vinos blancos que en los tintos. La concentración de ácido tartárico fue mayor en muestras ecológicas en ambos sistemas de fermentación. Además, los vinos de fermentación espontánea mostraron concentraciones más bajas de ácido tartárico en comparación con los de las fermentaciones guiadas, tal y como mostraron Patrignani et al. (2017). La capacidad de liberación de manoproteínas durante la fermentación y por autólisis de las distintas cepas de *S. cerevisiae* influye en la estabilidad tartárica (Vernocchi et al., 2015). Probablemente se debió al dominio de la fermentación espontánea por cepas dotadas de una menor capacidad para liberar manoproteínas, aunque las cepas no-*Saccharomyces* desempeñen un papel importante en la liberación de manoproteínas (Domizio et al., 2014). Si bien algunas características enológicas tales como etanol, producción de metabolitos o acidez volátil son cepa-dependientes (Patrignani et al., 2017). Algunos vinos alcanzaron un pH elevado (en torno a 4), pero esto no afectó significativamente a la tasa de crecimiento o la biomasa celular de las levaduras, hecho que también fue encontrado por Charoenchai et al., 1998.

Por otra parte, la baja frecuencia de *Hanseniaspora* spp. durante la fermentación se ha propuesto como una razón para la falta de complejidad aromática en vinos del norte de la península (Rementeria et al., 2003). Se han descrito vinos fermentados con *H. uvarum*/*S. cerevisiae* con mayores concentraciones de alcoholes superiores, acetatos, ésteres etílicos y ácidos grasos de cadena media (Andorrà et al., 2010; Moreira et al., 2008; Tristezza et al.,

2016). Otros aspectos del metabolismo de *Hanseniaspora* spp. implican la formación de aminas biogénicas no deseadas en el vino (Caruso et al., 2002) y la capacidad deseada de reducir los niveles de ocratoxina A (Angioni et al., 2007). Las levaduras apiculadas también son conocidas como altas productoras de ácido acético (0.75-2.25 g/L) y acetato de etilo (Rojas et al., 2003). Sin embargo, nuestros vinos no presentaron una elevada concentración de este compuesto debido a las levaduras; las muestras con elevadas concentraciones de ácido acético fueron contaminadas por bacterias. Se sabe que existe una alta variabilidad en la producción de ácido acético y algunos son comparables con los niveles producidos por *S. cerevisiae* (Romano et al., 1997b; Ciani y Maccarelli, 1998). Las cepas seleccionadas de levaduras apiculadas podrían, por lo tanto, favorecer la mejora de aroma y sabor en los vinos (Jolly et al., 2014).

L. thermotolerans produce vinos con mayores concentraciones de ácido láctico, glicerol y 2-feniletanol durante las fermentaciones mixtas (Comitini et al., 2011). Sin embargo, cuanto más tarde se inocula más ácido láctico y glicerol contendrá el vino final (Gobbi et al., 2013). No encontramos un incremento de ácido láctico en las muestras en que estuvo presente *L. thermotolerans*, aunque sí encontramos un incremento de la concentración de glicerol en algunos casos (por ejemplo, en la Mencía convencional de la DO Ribeira Sacra donde se alcanzaron concentraciones de glicerol superiores a los 14 g/L o en la Treixadura de la DO Monterrei, > 9 g/L). En fermentaciones en las que se ha coinoculado *Starm. bacillaris* junto con *S. cerevisiae*, Ciani y Ferraro (1998) y más recientemente Englezos et al. (2016a) han encontrado concentraciones de glicerol superiores a 12 g/L. Estos autores también coinciden con nuestros resultados en que *Starm. bacillaris* produjo una menor concentración de glicerol en la fermentación mixta que en cultivo puro. Por otro lado, la concentración de glicerol fue, en general, mayor en vinos ecológicos que en convencionales en ambos sistemas de inoculación, y en los vinos cuyas fermentaciones tuvieron mayor presencia de no-*Saccharomyces* productoras de elevadas concentraciones de glicerol como *Starm. bacillaris*.

Por otra parte, *M. pulcherrima* estuvo presente en algunas fermentaciones con elevado grado alcohólico. Esto es consistente con lo citado por otros autores, aunque casi no se encontró en Ff (Diaz et al., 2013; Torija et al., 2001). *M. pulcherrima* tiene capacidad de mejorar el perfil aromático de los vinos fermentados espontáneamente (Clemente-Jiménez et al., 2004; Varela et al., 2016) y posee propiedades antimicrobianas contra varias levaduras alterantes (Capozzi et al., 2015). *Zygosaccharomyces* spp. se consideran contaminantes de la bodega que producen altas cantidades de ácido acético (Loureiro y Malfeito-Ferreira, 2003). Esto explicaría las altas concentraciones de ácido acético encontradas en algunas de las fermentaciones de la DO Rías Baixas y DO Ribeira Sacra donde *Zygosaccharomyces* spp. estuvieron presentes. Sin embargo, algunas de estas muestras no presentaron una elevada concentración de ácido acético. Estudios que investigan una contribución positiva de *Zygosaccharomyces* spp. a la fermentación del vino incluyen una cepa *Zy. bailii* que mostró degradación de ácido málico, baja producción de H₂S y floculación (Romano et al., 1997a). Vinos elaborados por fermentación mixta *Zy. bailii*/*S. cerevisiae* han mostrado una mayor producción de polisacáridos, que pueden tener una influencia positiva en el gusto del vino (Domizio et al., 2011).

4.5. Diversidad de levaduras en fermentaciones espontáneas en bodegas gallegas de producción ecológica.

En este estudio, llevado a cabo durante tres cosechas en cinco bodegas diferentes, se caracterizaron genéticamente un total de 863 colonias diferentes de levaduras de las que se identificaron 66 cepas distintas de la especie *S. cerevisiae*. Esto está de acuerdo con la gran diversidad microbiana esperada en las bodegas (Pretorius, 2000; Renouf et al., 2007a) y más concretamente con la proporción de levaduras aisladas en fermentaciones espontáneas (Scholl et al., 2016). Las bodegas muestreadas elaboran vino mediante fermentación espontánea.

El número de aislados y fermentaciones analizadas en cada bodega varió dependiendo del tamaño de las bodegas y la campaña lo que influyó en la diversidad de cepas; en las DOs Monterrei y Ribeiro (Pazo de Vieite) se tomaron más muestras y la diversidad de cepas encontradas fue mayor (Tabla 4.32). Algunos de los perfiles obtenidos se muestran en la Figura 4.44.

Tabla 4.32. Análisis de la diversidad de levaduras en bodegas ecológicas de Galicia.

Denominación de Origen	Bodega	Fermentaciones	Nº aislados analizados	Diversidad* (nº cepas/%)
Monterrei	Quinta da Muradella (QM)	18	262	34 (52%)
	Adega Beatriz (AB)	4	42	16 (24%)
Ribeiro	Pazo Vieite (PV)	14	452	46 (70%)
Ribeira Sacra	Diego de Lemos (DL)	9	80	8 (12%)
Rías Baixas	Corisca	4	27	6 (9%)

* La diversidad está indicada como el número de cepas de *S. cerevisiae* identificadas en cada bodega y % respecto al número total de cepas.

En cuanto a los índices de biodiversidad, estos fueron elevados con un valor total de $H' = 3.56$ (Tabla 4.33). Cabe destacar además el alto valor de $H' = 3.14$ de la bodega PV, cercano al valor H'_{total} , donde se encontró la más alta diversidad y baja dominancia. Estos valores son más altos que los encontrados en estudios previos (19 cepas de un total de 446 levaduras analizadas) en la bodega experimental de la EVEGA (Blanco et al., 2006) y confirman que la práctica de fermentación espontánea y no usar LSA potencian la diversidad de levaduras en la bodega. Sin embargo, aunque superiores, estos resultados son más parecidos a los encontrados para la diversidad de cepas de *S. cerevisiae* en otros estudios de producción ecológica en España (Madrid) (Cordero-Bueso et al., 2011b; Tello et al., 2011).

Tabla 4.33. Índices de biodiversidad de cepas de *S. cerevisiae* en las distintas bodegas ecológicas.

Índices de biodiversidad	Total	Corisca	DL	AB	PV	QM
$H' = -\sum^S p_i \ln(p_i)$	3.56	1.12	1.73	2.51	3.14	2.70
$E = H/\log_2(S)$	0.85	0.63	0.89	0.91	0.82	0.77
$1 - D = 1 - \sum (p_i)^2$	0.96	0.53	0.79	0.90	0.94	0.90

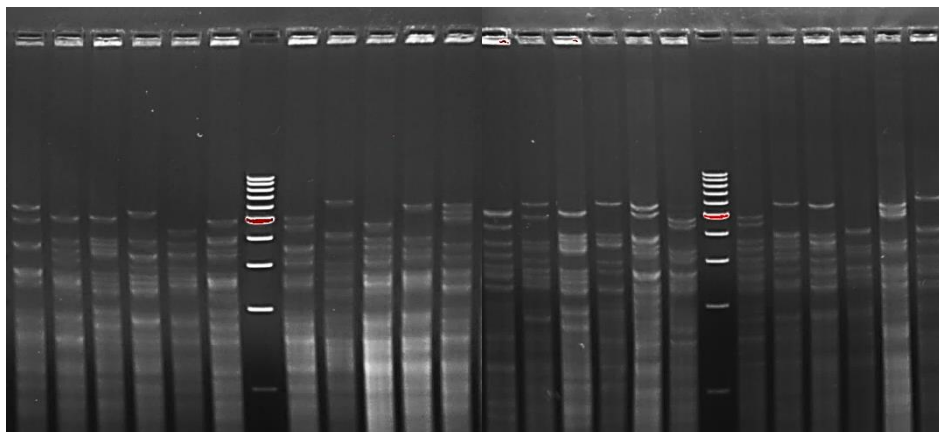


Figura 4.44. ADNmt-RFLPs de diferentes cepas de *S. cerevisiae* aisladas en fermentaciones espontáneas de uva ecológica en distintas bodegas. M: marcador de peso molecular 1kB (Promega).

La menor diversidad se obtuvo en la bodega Corisca ($H' = 1.12$) donde se identificaron 6 cepas diferentes de *S. cerevisiae*, ya que solo se muestrearon 4 fermentaciones (en dos campañas) y siempre de mosto blanco Albariño. La bodega DL tampoco presentó una diversidad muy alta (8 cepas; $H' = 1.73$). En este caso, se tomaron muestras durante las tres campañas tanto de fermentaciones de vino blanco como de tinto, pero los volúmenes de los depósitos fueron mayores. DL es la bodega que ha elaborado los primeros vinos certificados como ecológicos en Galicia (desde 2002), por ello es posible que existan levaduras residentes bien adaptadas a esta bodega que se implantan en las fermentaciones año tras año imponiéndose sobre las que llegan en la uva. La presencia de una elevada diversidad de cepas en fermentaciones espontáneas y el predominio de varias de ellas también fue observado en la bodega experimental de la EVEGA (Blanco et al., 2011, Blanco et al., 2013) y por otros autores (Guzzon et al., 2011). Además, se ha observado que esto contribuye positivamente a la complejidad de los vinos. La evaluación sensorial de los vinos ecológicos de la campaña del 2013 confirmó su aceptación por los catadores (apartado 4.6). Tello et al. (2011) encontraron desde solo 1 cepa hasta 23 distintas en algunas bodegas de la DO Vinos de Madrid. En AB la diversidad de especies fue un poco más alta, 16 cepas ($H' = 2.51$); en particular, aunque es una bodega muy pequeña, se elabora tanto vino blanco como tinto, y en ningún momento se han introducido levaduras comerciales. En QM y PV se muestrearon un número mayor de tanques y, por tanto, la diversidad encontrada fue mayor, con 34 y 46 cepas diferentes ($H' = 2.70$ y 3.14), respectivamente. Sin embargo, en la bodega QM se encontró una menor riqueza de cepas que en PV, aunque se muestrearon más fermentaciones (18).

En la Tabla 4.34 se muestran las cepas identificadas en cada una de las bodegas. Los resultados indican que algunas cepas estuvieron presentes en más de una bodega. Así, R7, R9, R14 y R46 se identificaron en cuatro de las 5 bodegas estudiadas; R7 no se encontró en AB, tampoco R9 y R14 en Corisca y R46 en DL. El perfil genético de la cepa R7 ya había sido identificado en fermentaciones espontáneas en la bodega experimental de la EVEGA (Blanco et al., 2006) y coincide además con el de una levadura comercial (Blanco et al., 2011). En la bodega donde nunca han utilizado inóculos comerciales (AB) no se encontró R7. R1, R15 y R71 aparecieron en tres bodegas: R1 en DL, AB y PV y R15 y R71 en QM, AB y PV.

Las demás cepas comunes estuvieron presentes en dos bodegas: R25 y R42 en DL y PV; R3 y R23 en Corisca y PV; R6, R12, R16, R18, R21, R28, R31, R39, R41, R44, R45, R66 y R77 en QM y PV; R17, R26, R29, R36, R40, R48 y R61 en AB y PV; R56 y R63 en QM y AB y R88 en QM y DL. Otros autores como Scholl et al. (2016) y Zhang et al. (2010) también encontraron en estudios realizados sobre fermentaciones espontáneas una composición de las cepas de *S. cerevisiae* diferente para cada bodega en cultivares diferentes.

Por tanto, los datos confirman que existen algunas cepas que son propias de cada una de las bodegas, mientras que otras levaduras presentan una distribución geográfica más amplia, estando presentes en bodegas de varias Denominaciones de Origen.

Tabla 4.34. Cepas de *S. cerevisiae* identificadas en cada una de las bodegas.

Corisca	Quinta da Muradella	Diego de Lemos	Adega Beatriz	Pazo Vieite
R3	R6	R50	R1	R1 R23 R44
R7	R7	R51	R7	R9 R3 R25 R45
R23	R9	R52	R9	R14 R5 R26 R46
R46	R12	R53	R14	R15 R6 R27 R47
R79	R14	R54	R25	R17 R7 R28 R48
R82	R15	R55	R42	R26 R9 R29 R61
	R16	R56	R59	R29 R11 R31 R66
	R18	R57	R88	R40 R12 R32 R67
	R21	R63		R46 R13 R33 R70
	R28	R66		R48 R14 R34 R71
	R31	R68		R56 R15 R37 R77
	R39	R71		R61 R16 R38 R80
	R41	R77		R63 R17 R39
	R44	R83		R71 R18 R40
	R45	R84		R75 R19 R41
	R46	R86		R78 R20 R42
	R49	R88		R21 R43

En negro se presentan las cepas que son comunes a más de una bodega. En color se destacan las cepas propias de cada bodega.

Los datos obtenidos en este estudio ponen de manifiesto una especial adaptación evolutiva de ciertas cepas que aparecen ligadas a bodegas de las distintas zonas, probablemente debido a los numerosos factores estresantes de los entornos de las bodegas, diferentes del viñedo (Liti et al., 2009). Constantí et al. (1997) comprobaron que en una bodega recién establecida algunas cepas de *Saccharomyces* se convirtieron en residentes de una campaña a otra, proliferando y participando activamente en los procesos de fermentación. Ciani et al. (2004) confirmaron que estas cepas autóctonas son aquellas que llevan a cabo el proceso fermentativo espontáneamente.

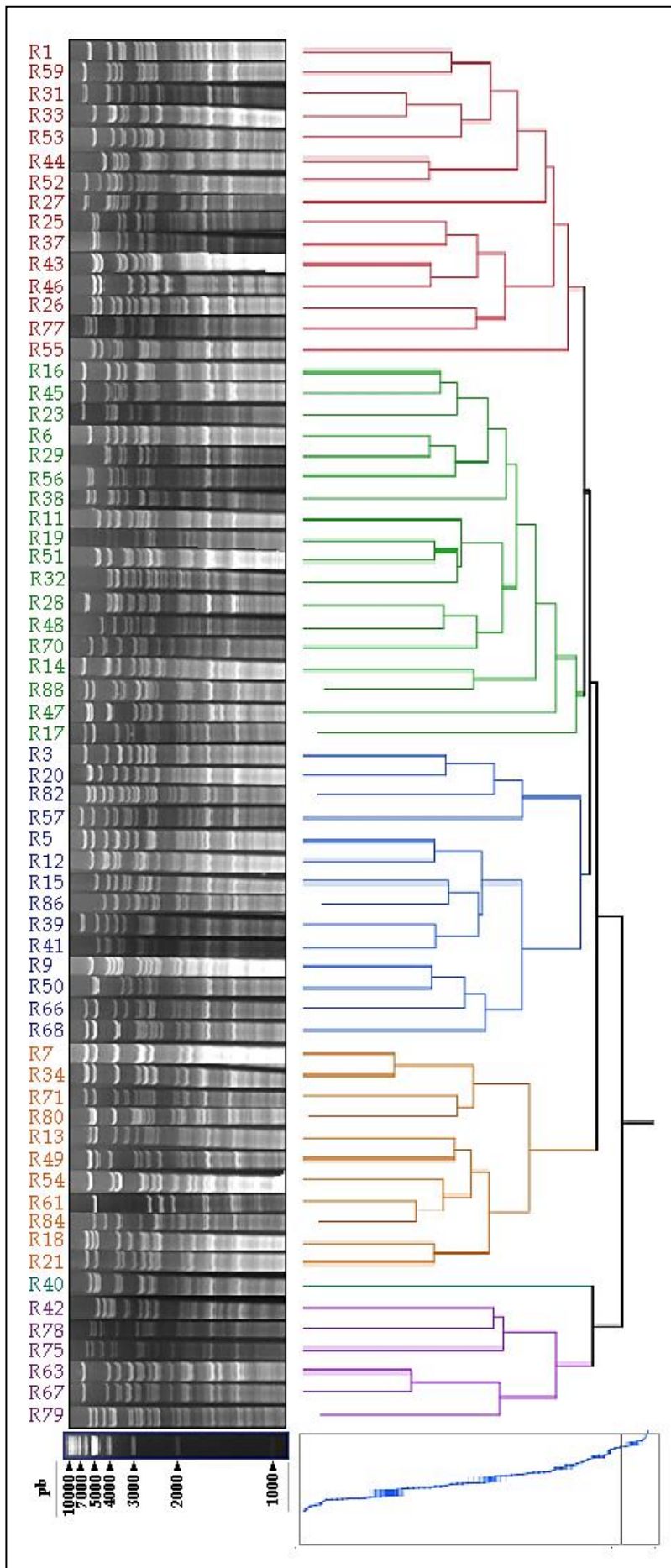


Figura 4.45. Dendrograma de distancias; árbol filogenético de las 66 cepas de *S. cerevisiae* identificadas durante las fermentaciones espontáneas.

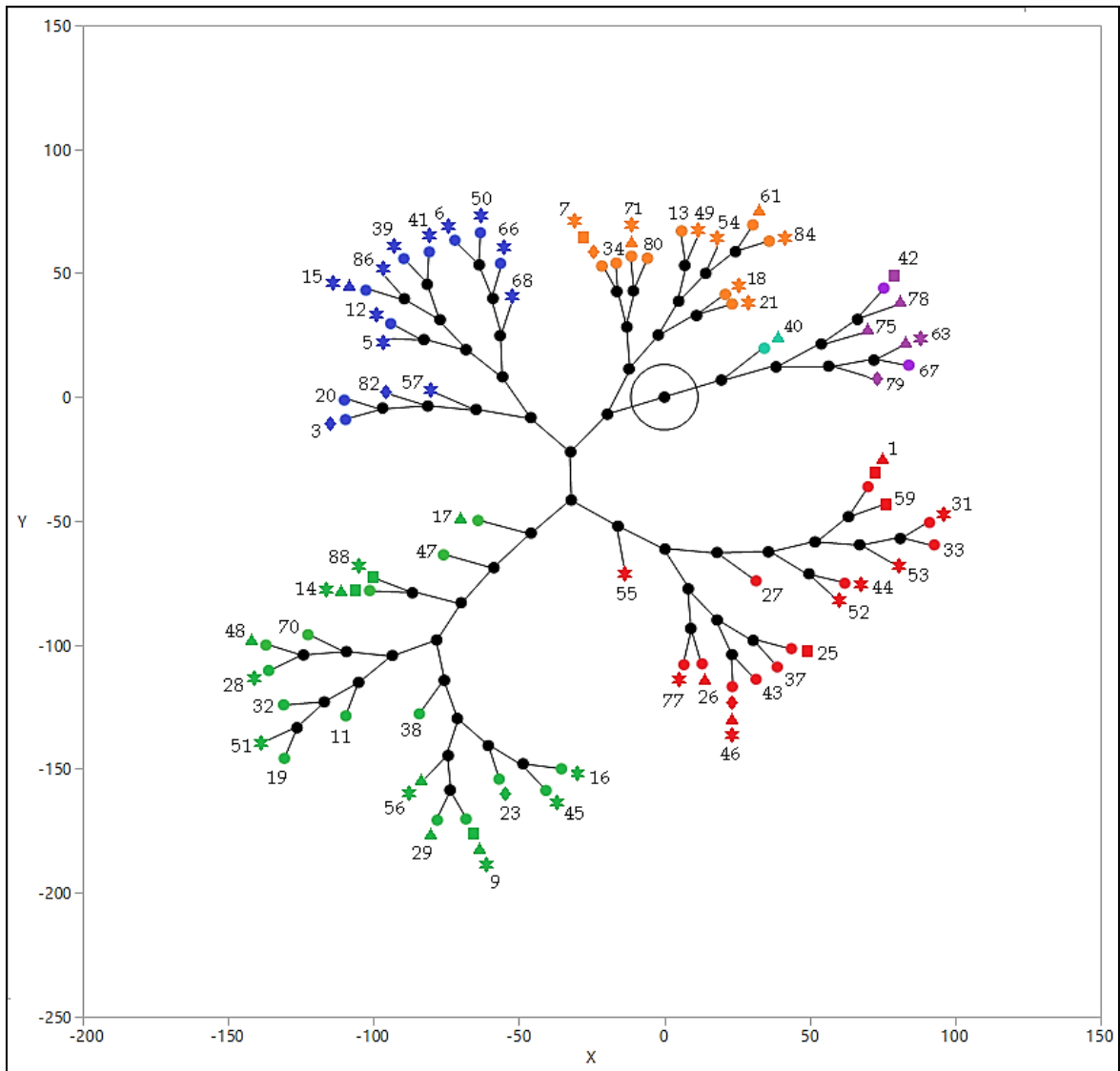


Figura 4.46. Árbol filogenético en formación de constelación con la distribución de cepas de *S. cerevisiae* en las distintas bodegas ecológicas de fermentación espontánea: rombo-Corisca; cuadrado-DL; triángulo-AB; círculo-PV; estrella-QM.

Las cepas nativas podrían sufrir una rápida selección ante la elevada presión que supone desarrollarse en un entorno fermentativo industrial (Liti et al., 2009). Se realizó un análisis de conglomerados jerárquico a las 66 cepas de *S. cerevisiae* encontradas cuyos resultados se muestran en la Figura 4.45 y Figura 4.46. Las cepas identificadas se agrupan en cinco clusters. Sin embargo, no se aprecia una correlación genética de las cepas pertenecientes a cada una de las distintas bodegas.

Tal y como se aprecia en el árbol filogenético (Figura 4.45), los perfiles de las cepas obtenidos dan información acerca de la similitud genética entre las mismas, pero las agrupaciones observadas no están relacionadas con las bodegas donde fueron aisladas, es decir, con la zona geográfica, de acuerdo con lo descrito por Tello et al. (2011). Si bien es cierto que en algunas bodegas hay una mayor presencia de algunas cepas, no se observa claramente un patrón biogeográfico (Figura 4.46). El hecho de que ciertas cepas aparezcan indistintamente en diferentes regiones puede deberse a la dispersión causada por agentes antrópicos, naturales o a procesos evolutivos simultáneos desde un antecesor común

(Versavaud et al., 1995). Así, las pocas levaduras presentes en uva evolucionarán hacia cepas diferentes en la bodega. Distintas variables como las técnicas de vinificación, la competencia con cepas comerciales y otros factores influirían en esta divergencia evolutiva (Álvarez Pérez, 2011).

Además, en los últimos años, las técnicas moleculares mejoradas para el análisis de poblaciones de levaduras han demostrado que, junto con la variabilidad de las especies, la fermentación espontánea posee una biodiversidad intraespecífica significativa (Cocolin et al., 2001; Morgan et al., 2017; Rossouw y Bauer, 2016), así como un polimorfismo genético de la población de *S. cerevisiae* (Tofalo et al., 2013; Vigentini et al., 2009 y 2015). Es decir, la población de levaduras correlacionada con fermentaciones espontáneas consiste en cepas genotípicamente diferentes, generalmente con diferentes propiedades fenotípicas y, por lo tanto, capaces de influir en proporción a su abundancia relativa, en las propiedades aromáticas del producto final del vino (Romano et al., 2003). Las cepas de *S. cerevisiae* muestran una diversidad genética que produce cantidades variables de subproductos fermentativos, con efectos deseables o indeseables en el aroma del vino (Capece et al., 2012; Pretorius, 2000; Romano et al., 2003). En general, solo unas pocas cepas de *S. cerevisiae* son capaces de dominar las etapas finales del proceso (Vincenzini et al., 2005). Pero algunas cepas predominantes de *S. cerevisiae* podrían aparecer en fermentaciones espontáneas en la misma bodega durante distintos años, asumiendo cierta correlación cepa-viñedo. Además, algunas cepas de *S. cerevisiae* aisladas de diferentes bodegas en la misma región podrían ser muy similares, destacando una correlación entre la cepa y región enológica (Knight et al., 2015; Schuller et al., 2012; Vigentini et al., 2015).

La existencia de diferentes poblaciones de *S. cerevisiae* en diferentes viñedos y el hecho de encontrar genotipos comunes a más de un viñedo fue descrito por Tello et al. (2011). También observaron en la fermentación algunos patrones inicialmente encontrados en los viñedos. La conexión entre viñedo, mosto y diversidad de *Saccharomyces* spp. se ha descrito tanto en viñedos como en bodegas (Barata et al., 2008 y 2012), de acuerdo con el análisis genético de poblaciones de *S. cerevisiae* que muestran los mismos genotipos presentes en el ambiente local y en las fermentaciones (Knight et al., 2015; Morrison-Whittle y Goddard, 2018). Además, el entorno de la bodega puede ser colonizado por levaduras comerciales utilizadas como agentes iniciadores en anteriores añadas, capaces de adaptarse a las condiciones de la bodega y permanecer en el equipamiento de unas campañas a otras (Blanco et al., 2011; Tello et al., 2011).

Por otro lado, en contraposición con algunos autores (Álvarez Pérez, 2011), nuestros resultados no pueden apoyar la hipótesis de la existencia de cepas autóctonas íntimamente relacionadas con la variedad de uva ya que se identificaron las mismas cepas en mostos de diferentes variedades y zonas.

Considerando la existencia del *terroir microbiano* (Bokulich et al., 2014 y 2016; Setati et al., 2015), que postula sabores y aromas en el vino típicos de una región particular debido en parte a la diversidad microbiana autóctona local, es adecuado descubrir y cuantificar las similitudes entre la diversidad de las levaduras de las uvas con respecto a los hábitats controlados, como las bodegas de la misma zona. Recientemente, Morrison-Whittle y Goddard, (2018) encontraron una superposición entre las comunidades de levaduras de

viñedos y las bodegas, incluidas las especies más abundantes tanto en mostos como en fermentaciones. También mostraron que las comunidades de levadura presentes en el mosto son similares a las encontradas en uvas en la viña para cada región, y que el 30% de las especies presentes en las fermentaciones se encuentran en los bosques nativos locales. La participación de distintas levaduras y cepas durante la vinificación contribuye a aumentar la complejidad de los vinos. Además, el hecho de que en cada bodega y zona se identifiquen cepas características y únicas puede influir en la diversificación y singularidad de los vinos elaborados (Ciani et al., 2004).

4.5.1. Frecuencia de las distintas cepas de *S. cerevisiae* en las bodegas

Además de la diferenciación de cepas de *S. cerevisiae*, este estudio también muestra la frecuencia de cada una de ellas durante las distintas campañas. En 2013 se identificaron un total de 16 cepas de *S. cerevisiae* entre todas las bodegas, pero solo 4 de ellas aparecían con una frecuencia > 5% (Tabla 4.35). En la campaña de 2014 se identificaron hasta 38 cepas diferentes, con predominio de una de ellas, R68, con una frecuencia > 20% con carácter *killer*. Finalmente, en 2015 la diversidad encontrada fue de 52 cepas, de las cuales 6 aparecieron en una proporción mayor del 5% y R14 fue la mayoritaria. La levadura neutra R44 estaba presente en las tres campañas y fue aislada con una frecuencia significativa en las bodegas PV y QM. Por tanto, aunque la diversidad de cepas encontrada fue elevada, solo un número reducido de ellas aparecían con mayor frecuencia y en varias campañas en las distintas bodegas.

Tabla 4.35. Número total de cepas por campaña y frecuencia de las cepas de *S. cerevisiae* mayoritarias.

Cepas con frecuencia > 5%	Campaña		
	2013	2014	2015
R3	-	3.1	7.7
R6	4.16	2.45	6.2
R7	-	2.45	6.0
R9	-	5.5	0.5
R14	-	9.8	14.2
R23	-	6.7	4.3
R28	12.5	1.2	2.6
R38	-	-	5.3
R44	16.7	7.4	8.43
R46	-	4.9	0.7
R56	8.3	-	0.5
R68	-	20.2	0.5
R79	12.5	-	-
Nº total de cepas	16	38	52

Las similitudes-disimilitudes en la abundancia de cada cepa respecto a los factores año y bodega, así como la interacción entre ellos se analizó mediante ANOSIM y PERMANOVA (Tabla 4.36).

Tabla 4.36. Análisis de similitud-disimilitud en la distribución de las cepas de *S. cerevisiae* entre las diferentes bodegas (ANOSIM y PERMANOVA)

ANOSIM		Corisca	DL	AB	PV	QM
Permutación N:	9999	Corisca	0.9167	1	1	1
Rango medio dentro:	26.13	DL	0.1037	0.3333	0.4444	0.3704
Rango medio entre-grupos:	57.83	AB	0.1002	0.1018	0.5926	0.5556
R:	0.6039	PV	0.0662	0.0256	0.0296	0.5556
p (global):	0.0001	QM	0.1045	0.1021	0.1008	0.0269
PERMANOVA		Corisca	DL	AB	PV	QM
Permutación N:	9999	Corisca	4.272	11.38	13.37	7.909
sdc total:	3.533	DL	0.0995	2.029	1.807	1.705
sdc entre-grupos:	1.406	AB	0.1003	0.102	2.77	2.623
F:	3.781	PV	0.0688	0.0813	0.0298	2.513
p (global):	0.0001	QM	0.0951	0.2008	0.0974	0.0285

Los valores del estadístico R y F se muestran encima de la diagonal y el nivel de significancia (p-valor) se muestra debajo de la diagonal; sdc: suma de cuadrados.

Los resultados de los análisis PERMANOVA ($F = 3.533$) y ANOSIM ($R = 0.604$) mostraron diferencias muy significativas $p = 0.0001$ para la diversidad de levaduras entre las distintas bodegas (Tabla 4.36). El ANOSIM mostró diferencias significativas entre PV y el resto de bodegas ($p_{\text{Corisca}} = 0.066$). PERMANOVA confirmó estos resultados excepto entre las bodegas PV-DL donde no mostró diferencias significativas ($p = 0.0813$). Los valores más altos de R y F se obtuvieron en la bodega Corisca con respecto a todas las demás. Scholl et al. (2016) también encontraron diferencias muy significativas mediante PERMANOVA en la composición de cepas de *S. cerevisiae* entre bodegas, pero también entre cultivares. Lamentablemente, en nuestro estudio no tenemos información detallada acerca de los cultivares empleados en las fermentaciones para realizar análisis estadísticos. Pero sí podemos sugerir que, puesto que en general las bodegas utilizaron mostos con variedades diferentes o al menos mezcla de cultivares con distintas proporciones, no se puede descartar la hipótesis de que parte de esta variación se deba también al cultivar. Esta hipótesis tendría en cuenta nuestros hallazgos sobre diversidad y *terroir microbiano* respaldada por las conclusiones de Torija et al. (2001) y Blanco et al. (2012), quienes también sugirieron que los cultivares de uva influyen en la composición de las especies de levadura en las fermentaciones espontáneas.

Por otro lado, no hubo diferencias significativas entre años para las frecuencias de la diversidad de cepas entre bodegas; $p_{\text{PERMANOVA}} = 0.849$, $F = 0.707$ y $p_{\text{ANOSIM}} = 0.613$, $R = -0.029$. Los resultados tampoco fueron significativos en el ANOSIM de dos vías cuando se analizaron los factores año y bodega conjuntamente; factor año: $p = 0.505$, $R = 1$; factor bodega: $p = 0.199$, $R = 1$. Ni siquiera se encontraron diferencias significativas utilizando el índice de similaridad de Bray Curtis (menos conservador). Sin embargo, cuando se aplicó PERMANOVA de dos vías sí se encontraron diferencias significativas: factor año: $p = 0.047$, $F = 1.878$; factor bodega: $p = 0.044$, $F = 3.762$; interacción: $p = 0.044$, $F = 1.866$. Generalmente se obtienen resultados similares entre ANOSIM y PERMANOVA, sin embargo, no ocurre así cuando el efecto del factor no es suficientemente fuerte. Esto sugiere que el factor año es débil, es decir, es influyente porque el valor de R de ANOSIM es máximo, pero no es el más determinante en la diversidad de cepas entre bodegas. Este argumento se sustenta además en que el valor F de PERMANOVA no es elevado. Con más de 2 factores, las

interacciones entre ellos influirán en los resultados, aunque PERMANOVA responde mejor con este tipo de problema. PERMANOVA es un análisis de distribución libre de varianza mientras que ANOSIM es un análisis de distribución libre de similitud por lo que no analizan las mismas propiedades de los datos (Anderson, 2001; Anderson y Walsh 2013). Cabe mencionar además que PERMANOVA y ANOSIM prueban si la distribución es única o no, no directamente si el factor es significativo o no.

Por último, hay que recordar que además del cultivar, la región o el año, existen otros numerosos factores que contribuyen a las diferencias en la composición de las cepas de *S. cerevisiae* entre bodegas; por ejemplo, la composición del mosto, el procesamiento de la uva, los protocolos de fermentación, la limpieza, la tolerancia al etanol de las cepas e incluso el factor *killer* (Díaz et al., 2013; Pérez et al., 2001; Pina et al., 2004). Además, la mayoría de las fermentaciones de nuestro estudio se realizaron en depósitos abiertos donde factores propios del ambiente de la bodega como vectores, aire, superficie, equipamiento, etc. ejercen una influencia importante en la transmisión de cepas (Ciani et al., 2004; Francesca et al., 2012). Aunque se requiere investigación adicional en esta área para establecer una fuerte interrelación de estos efectos en la composición de las cepas de *S. cerevisiae* (Scholl et al., 2016), nuestros resultados confirman la clara influencia de las cepas comerciales en fermentaciones en bodega tanto inoculadas como espontáneas.

4.5.2. Contribución de las distintas cepas de *S. cerevisiae* a la diversidad: análisis SIMPER

Para evaluar estadísticamente la contribución a la diversidad global de las cepas de *S. cerevisiae* en las distintas bodegas ecológicas se realizó un análisis SIMPER (Tabla 4.37). La mayor contribución entre bodegas se debió a la cepa R79 encontrada únicamente en Corisca, seguida de R42, R14, R1 y R44.

Tabla 4.37. Contribución de las veinte cepas de *S. cerevisiae* mayoritarias (obtenida por análisis SIMPER).

Cepa	Disimilaridad media	% Contribución	% Acumulativo	Media Corisca	Media DL	Media AB	Media PV	Media QM
R79	13.34	14.82	14.82	0.667	0.000	0.000	0.000	0.000
R42	6.59	7.32	22.14	0.000	0.325	0.000	0.009	0.000
R14	5.25	5.83	27.97	0.000	0.200	0.024	0.128	0.004
R1	4.40	4.89	32.86	0.000	0.163	0.024	0.115	0.000
R44	4.09	4.55	37.41	0.000	0.000	0.000	0.004	0.202
R46	3.67	4.08	41.49	0.037	0.000	0.167	0.007	0.004
R63	3.46	3.84	45.33	0.000	0.000	0.048	0.000	0.149
R56	3.41	3.79	49.12	0.000	0.000	0.167	0.000	0.008
R88	2.94	3.27	52.38	0.000	0.138	0.000	0.000	0.019
R7	2.82	3.14	55.52	0.111	0.013	0.000	0.022	0.073
R68	2.67	2.97	58.49	0.000	0.000	0.000	0.000	0.134
R26	2.54	2.82	61.31	0.000	0.000	0.119	0.016	0.000
R6	2.48	2.75	64.06	0.000	0.000	0.000	0.080	0.084
R9	2.45	2.72	66.79	0.000	0.113	0.024	0.009	0.004
R23	2.42	2.69	69.48	0.111	0.000	0.000	0.020	0.000
R3	2.36	2.63	72.10	0.037	0.000	0.000	0.100	0.000
R18	1.96	2.18	74.28	0.000	0.000	0.000	0.089	0.019
R29	1.95	2.17	76.45	0.000	0.000	0.095	0.004	0.000
R71	1.52	1.69	78.13	0.000	0.000	0.071	0.009	0.004
R15	1.49	1.66	79.79	0.000	0.000	0.071	0.007	0.004

Se consideran cepas dominantes aquellas que comprenden 10% o más de la abundancia relativa durante la fermentación (Sabaté et al., 1998). Las 20 cepas más aisladas en todas las bodegas contribuyeron casi en un 80% a la diversidad global. Estas cepas mayoritarias pertenecieron a diferentes bodegas. En la Figura 4.47 se representa gráficamente la frecuencia acumulativa de cepas de *S. cerevisiae* en cada bodega en la que puede observarse la contribución de cada una de ellas a las poblaciones totales, tal y como indica el análisis SIMPER.

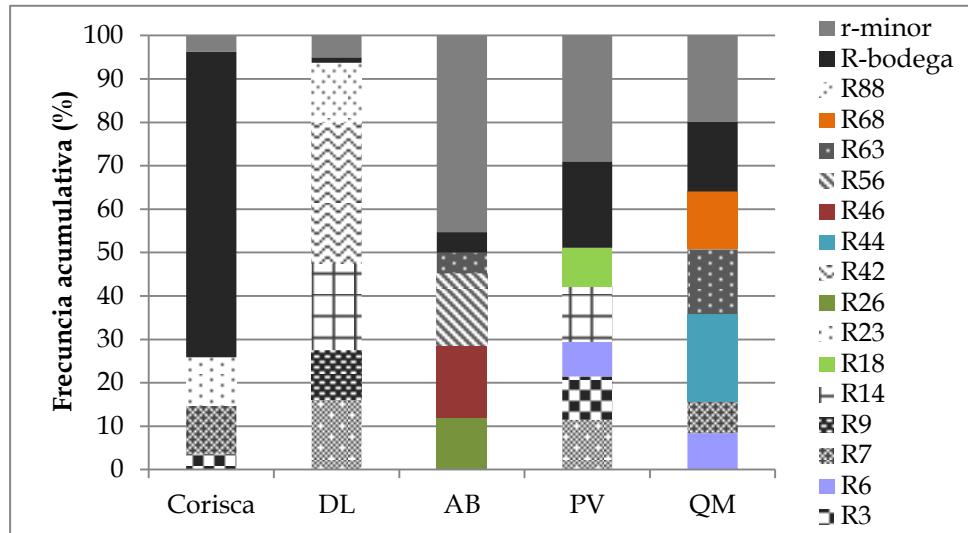


Figura 4.47. Frecuencia acumulativa de cepas de *S. cerevisiae* en cada bodega. R-bodega indica las cepas específicas de cada bodega y r-menor las cepas minoritarias que se encontraron en muy baja proporción.

4.5.3. Distribución de las cepas de *S. cerevisiae* en las distintas bodegas; análisis gráficos

Se realizó un **análisis de correspondencia (AC)** y un **ACP** para evaluar estadísticamente la distribución de las cepas de *S. cerevisiae* entre las distintas bodegas ecológicas. En el AC se muestra la correspondencia cepa-bodega (Figura 4.48). El biplot del ACP indica la importancia de esta correspondencia (Figura 4.49). En consonancia con los resultados del análisis SIMPER, es evidente el peso de la cepa R79 en la bodega Corisca ya que es exclusiva de esta bodega y además se encuentra en una gran proporción. Sin embargo, el AC y ACP permiten discernir gráficamente la correspondencia e importancia de otras cepas que aparecen en otras bodegas. Por ejemplo, la cepa R42 tiene relevancia en la bodega DL, R18 en PV, R44 en QM, R56 en AB y R63 en estas dos últimas (Figura 4.49).

Existe un gran núcleo de cepas que se encuentran en la parte central lo que indica que no presentan importancia desde el punto de vista de la diferenciación entre bodegas debido a su pequeño porcentaje o distribución. En cuanto a la agrupación, hay que decir, que cada bodega tiene una comunidad de cepas diferente, aunque algunas de ellas sean comunes ya que su proporción es diferente. Tanto en el AC como en el ACP las bodegas Corisca, DL y el grupo de QM y AB se encuentran en cuadrantes diferentes. La bodega PV se encuentra más cerca de QM en el AC probablemente debido a que el recuento de cepas es mayor (Figura 4.48). El AC hace una diferenciación mayor entre el grupo de cepas de QM-AB ya que en el ACP está muy próximo.

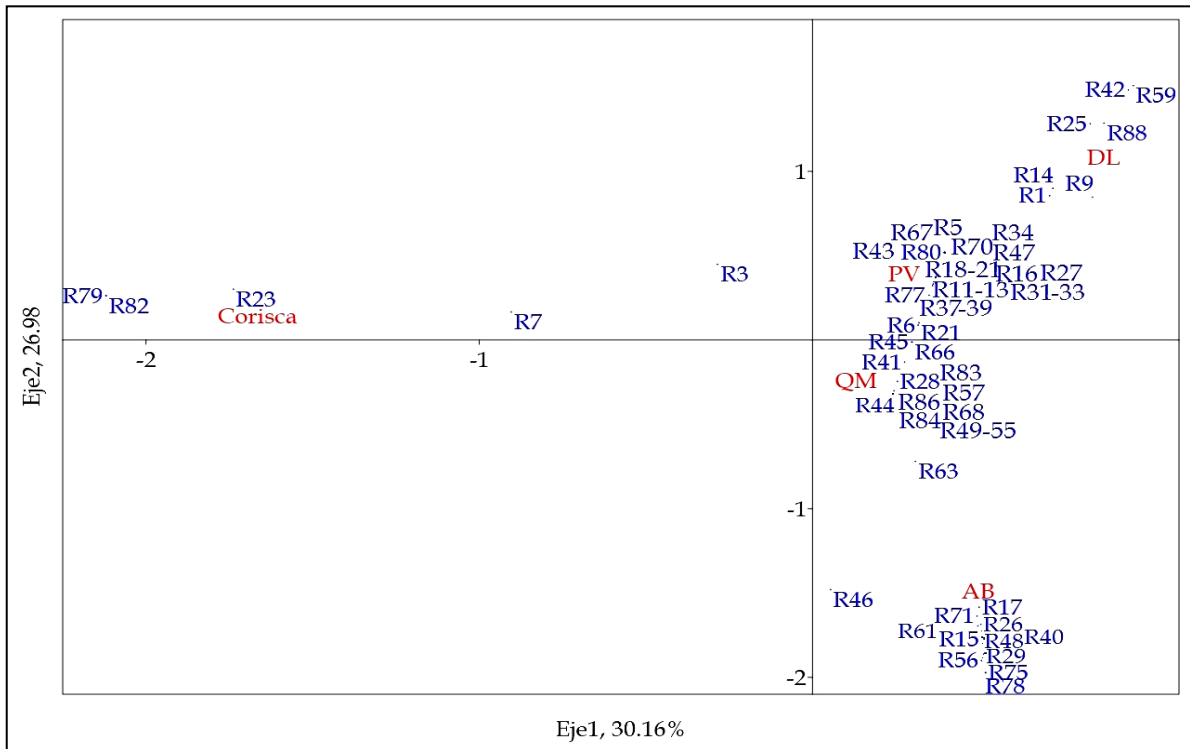


Figura 4.48. Análisis de correspondencia (AC) entre cepas de *S. cerevisiae* de las distintas bodegas.

En cuanto al ACP realizado para los distintos años se observa como la frecuencia de las cepas varía en función de la añada (Figura 4.50). Teniendo en cuenta, además, los datos del ACP de distribución de cepas por bodegas (Figura 4.49), se observa que algunas cepas asociadas a una bodega en particular aparecen en mayor frecuencia en determinados años como por ejemplo R79-Corisca-2013, R68-QM-2014 y R14-DL-2015. Considerando el factor años y la frecuencia de cepas de *S. cerevisiae*, el ACoP agrupó gráficamente las distintas bodegas por su diversidad (Figura 4.51). Las bodegas más parecidas en cuanto a su diversidad de cepas de *S. cerevisiae* según el año fueron PV, AB y QM. Se confirmó además que la diversidad en Corisca fue muy diferente al resto de las bodegas también por años.

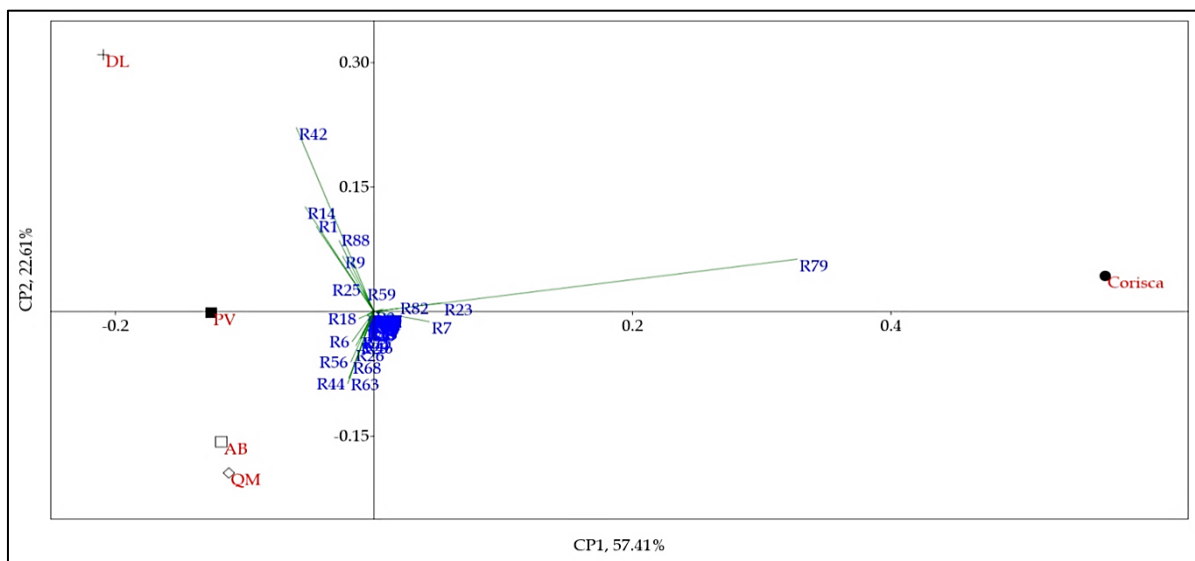


Figura 4.49. ACP de la distribución de cepas de *S. cerevisiae* entre las distintas bodegas ecológicas.

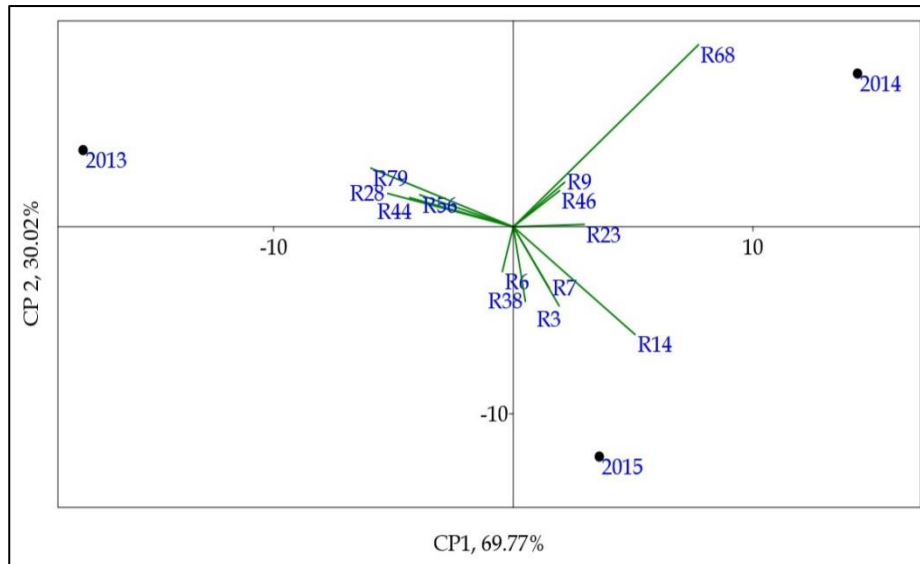


Figura 4.50. ACP de frecuencias de cepas de *S. cerevisiae* de las bodegas ecológicas entre distintos años.

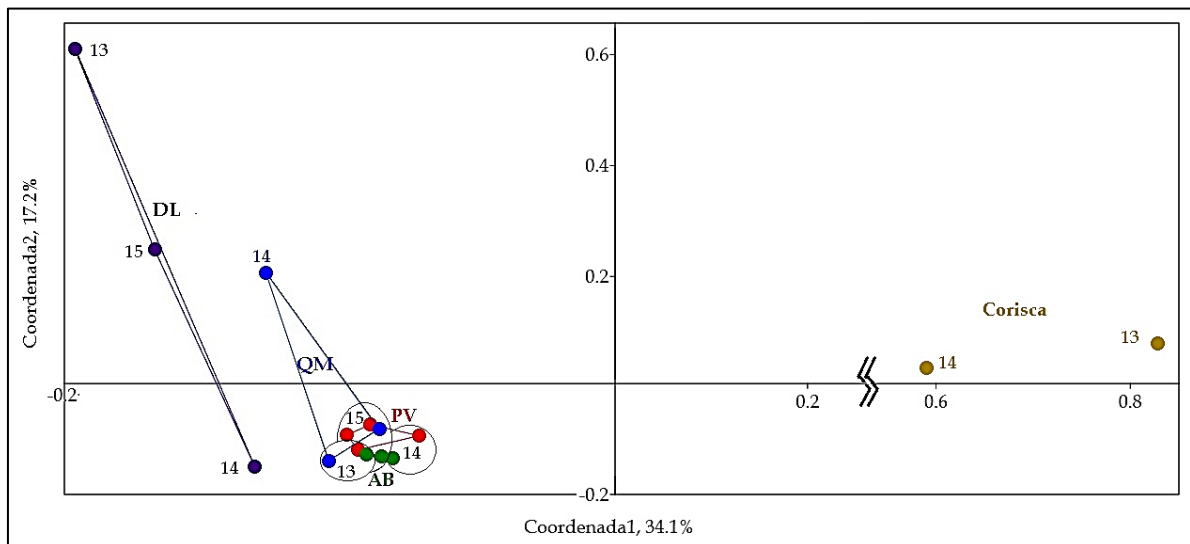


Figura 4.51. ACoP entre diversidad de cepas de *S. cerevisiae* para el factor año. Bodegas: AB (verde), Corisca (amarillo), DL (morado), QM (azul) y PV (rojo).

4.5.4. Dinámica de la población de levaduras durante la fermentación en Cume do Avia/PV

En bodegas que realizan estrictamente fermentaciones espontáneas, se cree que dominan las cepas indígenas o locales de una región vinícola, mientras que las cepas comerciales son aisladas con poca frecuencia (Díaz et al., 2013; Sabaté et al., 1998; Torija et al., 2001). En bodegas donde tienen lugar tanto fermentaciones espontáneas como inoculadas, se ha demostrado que las cepas comerciales de *S. cerevisiae* dominan sobre las cepas indígenas en fermentaciones espontáneas (Beltrán et al., 2002; Mannazzu et al., 2007; Scholl et al., 2016; Zhang et al., 2010). Las características sensoriales son, en parte, un reflejo de la diversidad y composición de las levaduras presentes durante la fermentación. Por ello es importante determinar si el uso continuo de cepas comerciales en una bodega afecta a la microbiota de las fermentaciones espontáneas. Puesto que las fermentaciones de la bodega ecológica Cume do Avia se realizaron en la bodega PV donde se elaboraban además vinos

de producción convencional con inoculación de levaduras comerciales, se profundizó en el estudio de las fermentaciones espontáneas.

Así, se tomó muestra en varias etapas de la fermentación encontrándose en todos los casos elevada diversidad de cepas de *S. cerevisiae*, aunque solo dos o tres eran mayoritarias y actuaron en codominancia durante el proceso.

En el caso de las vinificaciones con uva blanca dominaron la fermentación las cepas R3 y R8 con una frecuencia de 55% y 22%, respectivamente en la fermentación 1 (F1; Figura 4.52 y de un 28% y 26%, respectivamente en la F2 (Figura 4.53). En la primera de ellas la frecuencia de R3 fue mayor que la de R8, pero en la segunda la proporción de ambas cepas fue similar. Una mayor diversidad de cepas (14 en F2 frente a 7 en F1) podría explicar esta codominancia en F2.

En la fermentación F1 se observó una mayor diversidad de cepas (5) en el mosto, que fue disminuyendo ligeramente y cambiando a medida que avanzó la fermentación. La cepa dominante R3 estuvo presente en las tres fases muestreadas con elevada frecuencia (< 50%). La frecuencia de la cepa R8 aumentó en fase tumultuosa para disminuir de nuevo al final de la misma. En la Ft se encontró la cepa R10 que no estuvo presente en el mosto y aumentó hasta un 20% en la fase final (Figura 4.52).

De igual forma, en la fermentación F2 había mayor diversidad de cepas (9) en el mosto que en las demás fases (7 en fase Ft-Ff y 6 en la Ff). Las cepas dominantes fueron las mismas, R3 y R8. La frecuencia de R3 aumentó a medida que avanzaba la fermentación; sin embargo, R8 aumentó en Fi-Ft, pero disminuyó en la fase final, igual que ocurrió en la fermentación F1. En la fase final encontramos otra cepa diferente, R5, con una frecuencia > 15%; también se identificaron R15 y R21 que no aparecieron en las otras fases (Figura 4.53). Por tanto, además de encontrar diferencias en la diversidad y frecuencia de cepas, se observó una sustitución de cepas durante el proceso.

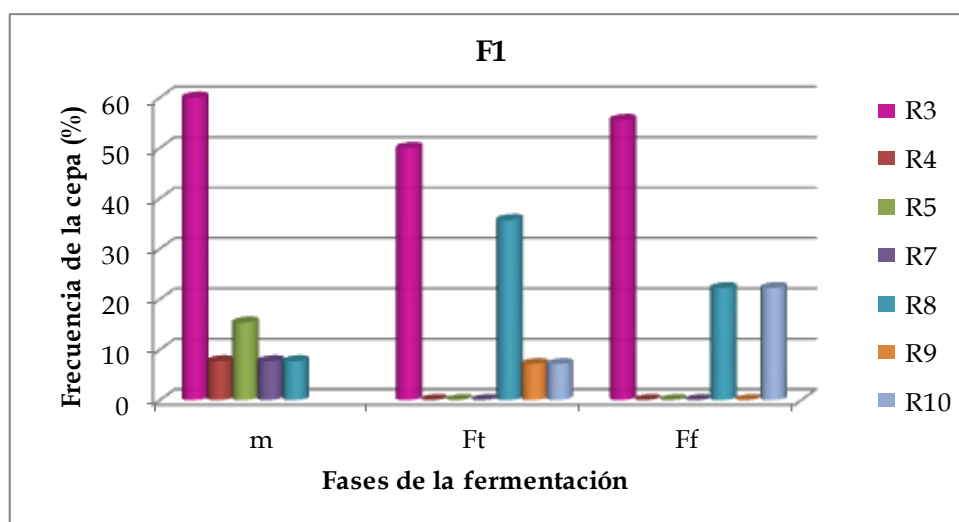


Figura 4.52. Evolución de la diversidad y frecuencia de cepas de *S. cerevisiae* durante la fermentación F1. m- mosto; Ft- fase tumultuosa; Ff- fase final.

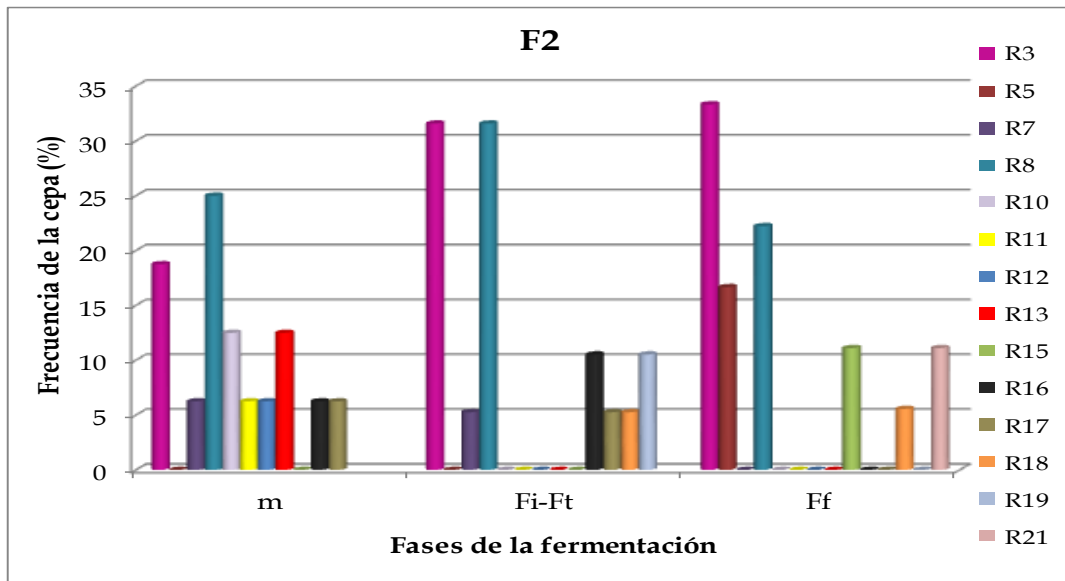


Figura 4.53. Evolución de la diversidad y frecuencia de cepas de *S. cerevisiae* durante la fermentación F2. m- mosto; Fi-Ft- fase inicial-fase tumultuosa; Ff- fase final.

Las fermentaciones F3 (Figura 4.54) y F4 (

Figura 4.55) se realizaron con mosto procedente de uva tinta de producción ecológica. En la primera de ellas (F3) se identificaron hasta 16 cepas diferentes, mientras que en F4 la diversidad fue menor (7 cepas). En ambas se tomó muestra en fase tumultuosa y final. En F3 la diversidad de cepas fue mayor en la fase tumultuosa (11 cepas) que al final de proceso (8 cepas) y se encontró una cepa dominante diferente en la Ft (R18) que en la fase final (R3) (Figura 4.54). Lo mismo se observó en F4, aunque en este caso la cepa dominante fue la R18 en ambas fases, alcanzando una frecuencia mayor del 50% en la final (

Figura 4.55). En esta última fermentación se observó una codominancia de R18 con R3 que alcanzaba también frecuencias superiores al 20%.

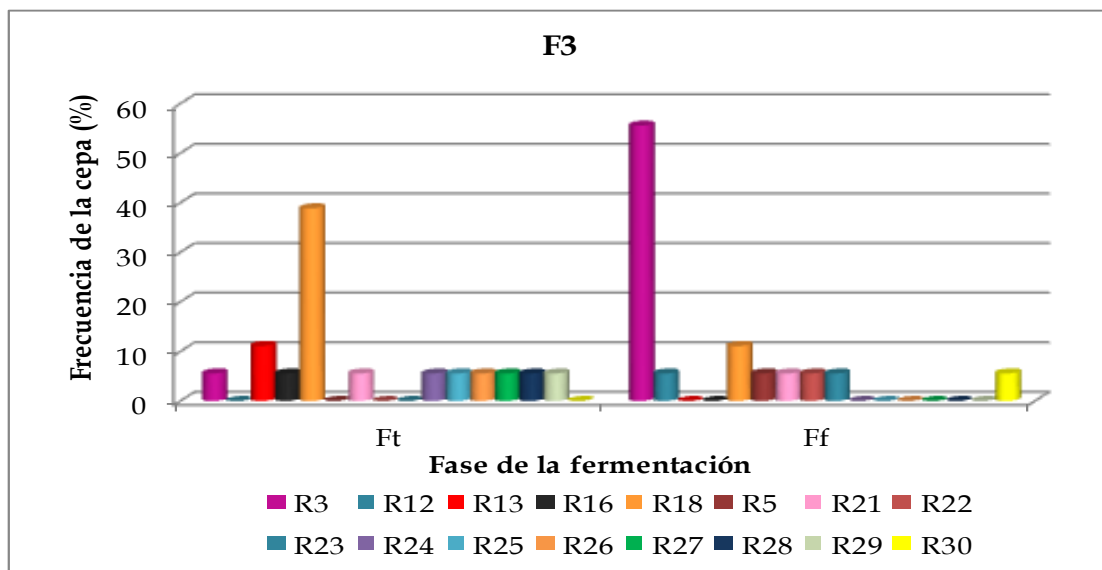


Figura 4.54. Evolución de la diversidad y frecuencia de cepas de *S. cerevisiae* durante la fermentación F3. Ft- fase tumultuosa; Ff- fase final.

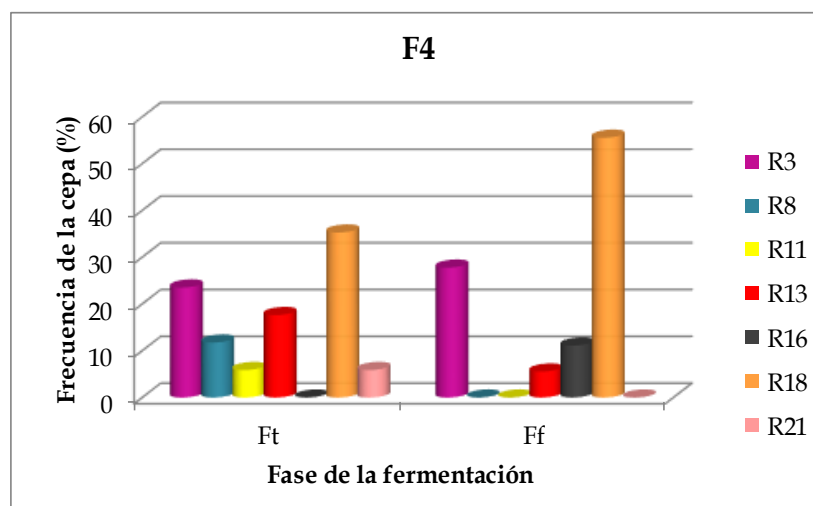


Figura 4.55. Evolución de la diversidad y frecuencia de cepas de *S. cerevisiae* durante la fermentación F4. Ft- fase tumultuosa; Ff-fase final.

En las fermentaciones con uva tinta destacaron como cepas mayoritarias R3, R13 y R18. La primera de ellas, R3, también fue dominante en las fermentaciones con uva blanca, pero la R18 apareció solo como dominante en las fermentaciones tintas. En F3 las cepas R3 y R18 presentaron una frecuencia de 30% y 25% respectivamente; sin embargo, en F4 la frecuencia de R18 fue mayor (45%) que la de R3 (25%), siendo también notable la participación de R13.

En las elaboraciones convencionales los análisis realizados demostraron una implantación clara de las levaduras comerciales inoculadas (Figura 4.56). Algunos estudios que también llevaron a cabo fermentaciones espontáneas en paralelo con fermentaciones inoculadas en bodegas, mostraron que las fermentaciones están influenciadas por la diversidad de cepas, y no por cepas comerciales (Gayevskiy y Goddard, 2012; Mortimer et al., 1999; Tello et al., 2011).

Algunos autores ilustraron una clara influencia de las cepas de LSA comerciales inoculadas sobre la composición de cepas de *S. cerevisiae* en fermentaciones espontáneas en bodegas que realizan fermentaciones tanto inoculadas como espontáneas (la mitad de las cepas de *S. cerevisiae* identificadas fueron comerciales) (Beltran et al., 2002; Scholl et al., 2016). Además, existen pocos estudios relativos a la población de *S. cerevisiae* en bodegas de producción ecológica. En bodegas de la DO Vinos de Madrid, Tello et al. (2011) demostraron que las prácticas ecológicas favorecían la diversidad y abundancia de levaduras en comparación con las técnicas convencionales. También encontraron que las fermentaciones con cepas comerciales inoculadas generaron un desplazamiento de las cepas autóctonas de *S. cerevisiae* en ocasiones de forma completa. Sin embargo, mostraron que, aunque son las levaduras residentes de las bodegas las que predominan en las vinificaciones, algunas cepas no comerciales fueron capaces de dirigir las fermentaciones hasta el final. En el caso de las fermentaciones espontáneas, se apreció una gran sustitución de diferentes cepas de *S. cerevisiae*, siendo más diversa a medida que avanzaba el proceso de fermentación. Al igual que ellos, en nuestro estudio hemos observado que algunas de las cepas más frecuentes (por su incidencia o por su distribución en la mayoría de bodegas

muestreadas) presentaban perfiles similares a levaduras comerciales contenidas en nuestra colección, pero otras no coincidían con las levaduras comerciales habitualmente utilizadas.

Se ha demostrado que las cepas comerciales dominantes se usaron previamente o concurrentemente en sus respectivas bodegas, lo que demuestra la capacidad de las cepas comerciales para establecerse como residentes de la bodega e implantarse en otras fermentaciones que ocurren en toda la bodega (Scholl et al., 2016). Sin embargo, al comparar los perfiles de las cepas comerciales con los encontrados en las vinificaciones espontáneas encontramos que el perfil A (comercial) fue similar al R3 (ecológico). Esto indica que algunas cepas son residentes en la bodega, capaces de implantarse sobre las demás en una fermentación, aunque no hayan sido inoculadas. Estudios previos realizados en la bodega experimental de la EVEGA confirman la buena adaptación de ciertas cepas a las condiciones de bodega (Blanco et al., 2011). Sin embargo, su prevalencia en la bodega no afectaba a la diversidad de levaduras durante las vinificaciones espontáneas ecológicas. Es más, otras cepas como R8 y R18 alcanzaron frecuencias elevadas compitiendo con éxito frente a las levaduras residentes en las distintas fases de la fermentación.

Por último, cabe mencionar que algunas cepas comerciales de *S. cerevisiae* podrían colonizar y persistir en el viñedo a través de la maquinaria, aguas residuales, aire, insectos, aves, etc. (Francesca et al., 2012; Schuller et al., 2005; Valero et al., 2007). En ocasiones presentan un largo plazo de supervivencia en diferentes partes de la vid o el suelo alrededor de la vid que pueden actuar como reservorio natural (Belda et al., 2017b; Cordero-Bueso et al., 2011c).

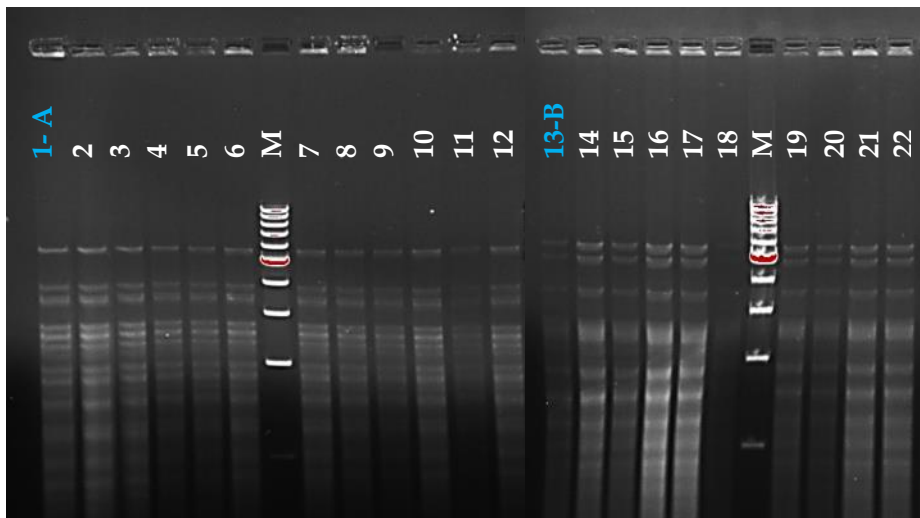


Figura 4.56. Caracterización genética mediante ADNmt-RFLPs de cepas de *S. cerevisiae* aisladas en fermentaciones convencionales inoculadas. Carril 1: perfil A; M- marcador de peso molecular 1kB (Promega); carril 13: perfil B; carriles 1 a 12 y 13 a 22: colonias aisladas de distintas fermentaciones.

Algunas cepas autóctonas de *S. cerevisiae* pueden ser capaces de sobrevivir junto con el resto de especies nativas hasta dominar la fermentación originando una disminución de las levaduras no-*Saccharomyces* lo que produce vinos con características químicas y sensoriales diferentes (Suzzi et al., 2012). Cordero-Bueso et al. (2011c), también encontraron que algunas cepas autóctonas de *S. cerevisiae* (cepas no comerciales originarias del viñedo) se encontraron en las etapas finales de la fermentación, aunque las levaduras residentes en las bodegas resultaran ser predominantes en el proceso.

Los diferentes grados de dominancia de las cepas pueden tener consecuencias positivas o negativas en la calidad del vino y deben considerarse. Aunque, en general, la presencia de diferentes levaduras se asocia con aumento de la complejidad y diferenciación de los vinos por lo que algunos enólogos prefieren fermentaciones espontáneas a inoculadas (Santamaría et al., 2005). Nuestros resultados indican que la utilización de cepas comerciales en otras fermentaciones de la bodega no afectó a la elaboración ecológica en cuanto a la diversidad de cepas encontradas durante la fermentación.

4.5.5. Carácter killer y producción de ácido sulfhídrico de las cepas de *S. cerevisiae*

El carácter *killer* y la capacidad de producción de H₂S sobre agar BiGGY de las diferentes cepas de *S. cerevisiae* identificadas en las fermentaciones espontáneas de las bodegas se resumen en la Tabla 4.38.

Tabla 4.38. Carácter *killer* y producción de ácido sulfhídrico de las cepas de *S. cerevisiae*

Cepa	Killer	H ₂ S	Tono agar BiGGY	Cepa	Killer	H ₂ S	Tono agar BiGGY
R1	S	+	3	R43	S	+	3
R3	S	+	3	R44	N	+/-	2
R4	S	+/-	2	R45	S	+	3
R5	S	+	3	R46	S	+	3
R6	S	+	3	R47	K	+	3
R7	S	+	3	R48	N	+/-	2
R9	S	+/-	2	R49	S	+	3
R11	S	+/-	2	R50	K	+	3
R12	K	+/-	2	R51	S	+	3
R13	S	+	3	R52	S	+/-	2
R14	K	+	3	R53	N	+/-	2
R15	S	+/-	2	R54	K	+	3
R17	S	+	3	R55	K	+	3
R18	S	+/-	2	R56	S	+	3
R19	S/N	-	1	R57	S	+	3
R20	K	+/-	2	R59	S	+	3
R21	S	+/-	2	R61	N	-	1
R23	K	+/-	2	R63	S	+/-	2
R25	K	+	3	R66	S	+	3
R26	K	+	3	R67	S	+/-	2
R27	S	+	3	R68	K	+	3
R28	S	+/-	2	R70	N	+/-	2
R29	S	+/-	2	R71	S	+	
R31	K	+	3	R75	K	+	3
R32	K	+	3	R77	S	+/-	2
R33	S	+	3	R78	K	+	3
R34	S	+/-	2	R79	K	+/-	2
R37	K	+/-	2	R80	K	+/-	2
R38	S	+/-	2	R82	K	+/-	2
R39	K	+	3	R83			
R40	S	+	3	R84	S	+	3
R41	S	+/-	2	R86	N	+/-	2
R42	K	+/-	2	R88	S	+	3

K, cepa *killer*; N, cepa *killer* neutra; S, cepa *killer* sensible; 1 (-): cepa H₂S negativo; 2 (+/-): cepa de baja producción de H₂S; 3 (+): cepa H₂S positivo.

La amplia distribución geográfica de una cepa indica una buena adaptación a las características de los mostos de distintas zonas, así como al ambiente de las bodegas. El carácter *killer* de las levaduras podría facilitar su prevalencia en el medio y su dominio durante la fermentación. Además, el uso de un iniciador con carácter *killer* puede suprimir levaduras indeseadas, mejorando notablemente la calidad del producto final (Pérez et al., 2001).

El estudio del fenotipo *killer* en las cepas de *S. cerevisiae* mostró que, de las 66 cepas analizadas, 22 fueron positivas (33.3% de las cepas), otras 7 resultaron ser neutras (sin presentar carácter *killer*, tampoco mostraron sensibilidad a la toxina; 10.6%) y el resto de cepas analizadas mostraron fenotipo sensible (56.1%). El carácter *killer* facilita a las cepas que lo presentan la implantación o predominando sobre el resto de las cepas presentes en el mosto durante la fermentación (Magliani et al., 1997; Marquina et al., 2002). De hecho, en algunas bodegas existió una relación entre la existencia de cepas mayoritarias que además poseían factor *killer*: R79 (Corisca), R42 (DL), R14 (DL y PV) o R26 (AB) tal como mostraron otros autores (Álvarez Pérez, 2011). Sin embargo, este hecho no necesariamente está asociado con su implantación. Algunas cepas *killer* se encontraron en más de una bodega, siendo solo en dos de ellas mayoritarias (Corisca-81.5%, DL-56.3%, PV-30.3%, QM-19.5% y AB-19.0%). En algunos casos se han descrito cepas con fenotipo sensible capaces de predominar y llevar a buen término las fermentaciones (Blanco et al., 2011). En todas las bodegas estudiadas se aislaron levaduras con carácter *killer* coexistiendo con levaduras sensibles. Por ejemplo, las cepas R1 (mayoritaria en las bodegas DL y PV), R88 (en DL), R46 y R56 (en AB) y R63 (en QM) son sensibles o R44 que presentó carácter neutro (mayoritaria en QM).

La relación existente entre células *killer* y sensibles no es determinante para su implantación con valores muy dispares en la bibliografía. Una proporción inicial del 2-6% de la población total de *S. cerevisiae* será suficiente para controlar las posibles levaduras sensibles presentes en el mosto con capacidad de disminuir la calidad del producto final (Pérez et al., 2001; Van Vuuren y Wingfield, 1986). Otros autores indican proporciones superiores al 50% (Petering et al., 1991). También son factores importantes en el carácter *killer* la presencia de sustancias capaces de absorber proteínas (como la bentonita utilizada en la clarificación), el tamaño del inóculo o la cantidad de nitrógeno disponible (Moreno et al., 1991) que no fueron tenidos en cuenta en el estudio. En las fermentaciones espontáneas de las bodegas muestreadas, donde participan las levaduras residentes en la bodega, no fue posible el desplazamiento de las levaduras sensibles por aquellas con carácter *killer* (poblaciones similares).

La cantidad de inóculo en una fermentación dirigida suele ser muy elevado (del orden de 10^6 UFC/mL) lo que dificulta la supresión de las células por las cepas *killer* que pudieran coexistir en una concentración más baja. Así, la levadura autóctona ScXG3 seleccionada previamente en Galicia por los trabajos de Blanco et al. (2006) presenta un fenotipo *killer sensible* con óptimos resultados en las pruebas realizadas en fermentaciones en bodega a escala piloto. De hecho, existen levaduras comerciales en el mercado con carácter sensible. Por todo ello, el fenotipo *killer* no debe ser excluyente si una cepa presenta propiedades enológicas adecuadas.

Por tanto, los resultados obtenidos fueron dispares dependiendo de la bodega, presentando distinta frecuencia de levaduras con factor *killer* que no fue determinante en la distribución de las cepas.

Por otro lado, la presencia de H₂S en el vino imparte sabores indeseables y aromas sulfurosos o de huevo podrido con un bajo umbral de percepción (10 a 80 mg/L) (Belda et al., 2017a). Las levaduras indígenas o seleccionadas tienen la capacidad de producir H₂S en mayor o menor cantidad (Guerrero et al., 2015). Así, la mayoría de las cepas fueron productoras moderadas de H₂S. Un buen manejo de la nutrición de la levadura como el aporte de oxígeno y la presencia de micro nutrientes (NFA) son factores clave para limitar la aparición de compuestos azufrados indeseables (Mestres et al., 2000).

4.6. Análisis sensorial de vinos comerciales ecológicos y convencionales

La producción ecológica puede aportar un valor añadido al vino que el consumidor valora positivamente. Pero, ¿se traduce esto en diferencias organolépticas reales detectables para un catador? El análisis sensorial comparando ambos tipos de vino mostró que existían diferencias entre los convencionales y los ecológicos.

4.6.1. Análisis sensorial de los vinos de las distintas Denominaciones de Origen.

De la **DO Rías Baixas** se cataron exclusivamente vinos blancos de uva Albariño. Los vinos de 2012 y 2013 presentaron diferencias significativas para la intensidad de color, pero no en la intensidad aromática ni en la calidad global.

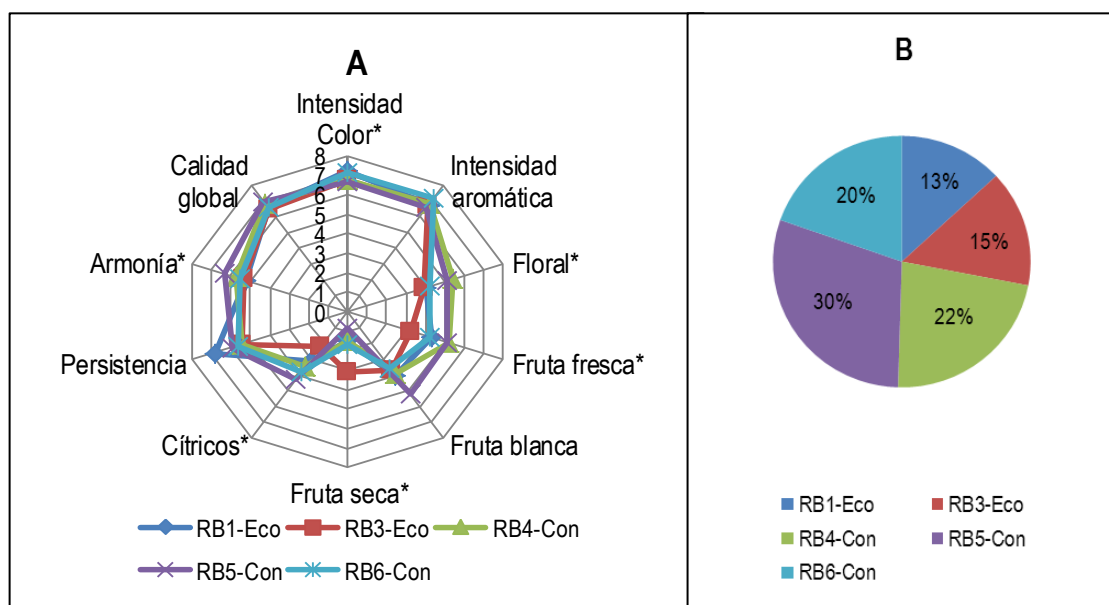


Figura 4.57. A) Perfil sensorial de los vinos de la DO Rías Baixas. B) Porcentaje de preferencia de los vinos catados. * Indica diferencias significativas entre los vinos para ese descriptor.

Sí se apreciaron diferencias en descriptores de la fase olfativa y/o gustativa. Así, el vino ecológico RB1 destacó por presentar mayor persistencia en boca; RB3, también elaborado con uva de cultivo ecológico sobresalió por sus notas a fruta seca. Los vinos convencionales RB4 y RB5 obtuvieron mayor puntuación para los descriptores floral y fruta fresca. Además, este último RB5, fue el vino preferido por los catadores (Figura 4.57).

En cuanto a los vinos de la **DO Ribeiro**, los vinos blancos fueron en general más apreciados que los tintos en la cata. A nivel global se encontraron diferencias significativas en la intensidad de color e intensidad aromática entre ellos, así como en algunos descriptores tanto en nariz como en boca. El vino ecológico RI4 fue el mejor valorado (39%), destacando por presentar notas florales y a fruta tropical. El segundo por orden de preferencia fue RI9 (25%) de producción biodinámica, que sobresalió por tener más estructura y persistencia en boca y una mayor intensidad aromática con matices a miel y fruta seca. Los vinos de producción convencional no destacaron especialmente salvo RI2A y RI5, que presentaron notas a fruta fresca (Figura 4.58). El análisis sensorial de los vinos tintos de la DO Ribeiro demostró que había diferencias en la fase visual, en nariz y en boca, pero no en la calidad global de los vinos. El vino tinto mejor valorado fue RI6, de producción convencional, con aromas a láctico y vegetal y notas a frutos rojos. Sin embargo, el vino ecológico RI3 presentó mejor calidad en boca y mayor persistencia, así como mayor intensidad aromática con menos carácter vegetal.

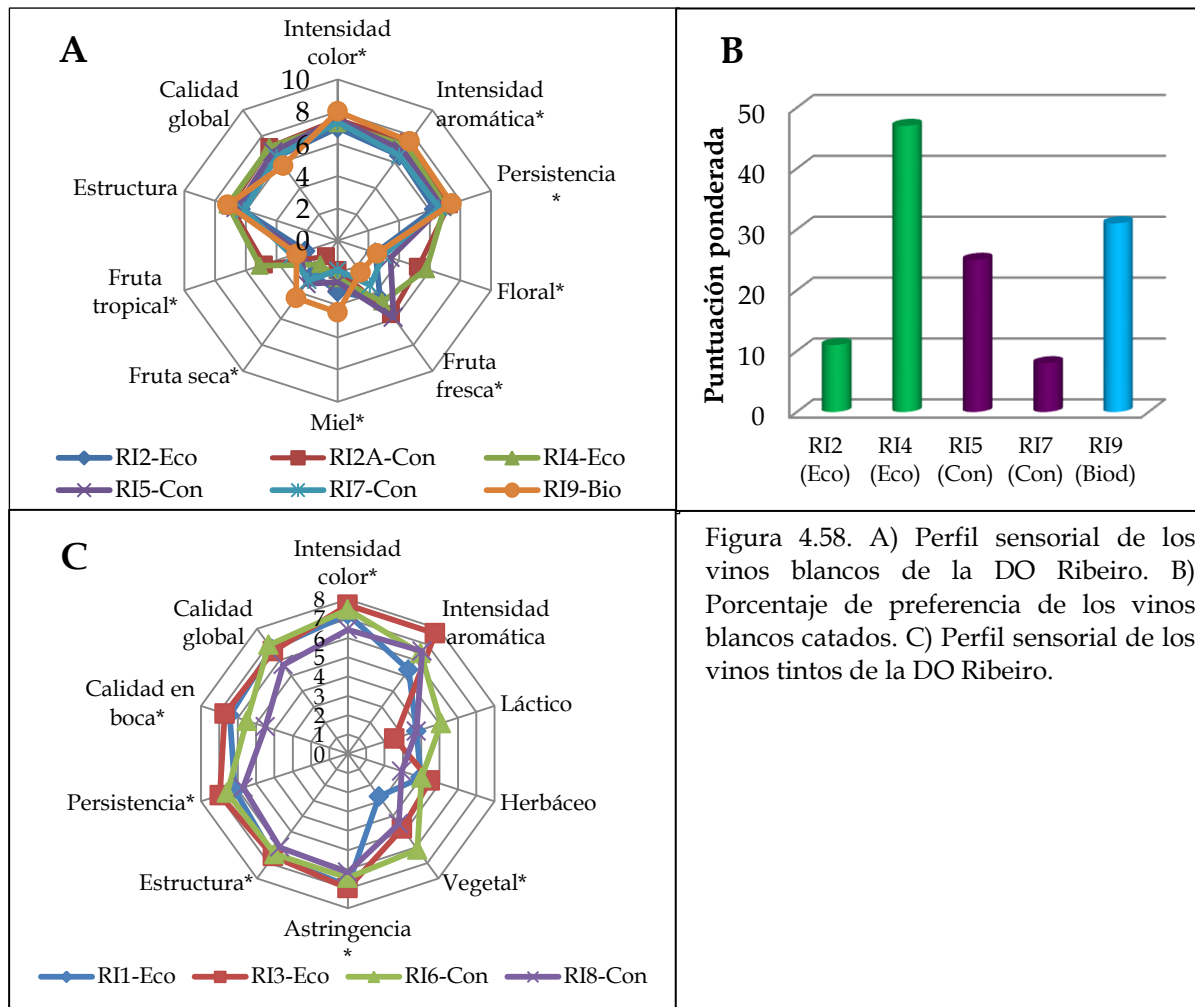


Figura 4.58. A) Perfil sensorial de los vinos blancos de la DO Ribeiro. B) Porcentaje de preferencia de los vinos blancos catados. C) Perfil sensorial de los vinos tintos de la DO Ribeiro.

A diferencia de las anteriores DOs, en la **DO Ribeira Sacra** fundamentalmente se elaboran vinos tintos. La cata de vinos ecológicos y convencionales de esta zona también mostró diferencias estadísticamente significativas (Figura 4.59), especialmente en boca, pero también a nivel global y para algunos descriptores de aroma. El vino ecológico RS4 alcanzó la mayor puntuación en casi todos los descriptores, destacando las notas a frutos negros y por estar bien estructurado en boca (Figura 4.59A). Sin embargo, el vino convencional RS6 que solo resaltó sobre los demás por su calidad global en boca, fue el preferido por los catadores (Figura 4.59B). El vino RS1, también ecológico, destacó por su carácter afrutado con un predominio de los frutos rojos y fue el segundo en el orden de preferencia. Los otros dos vinos tintos catados no alcanzaron puntuaciones tan altas.

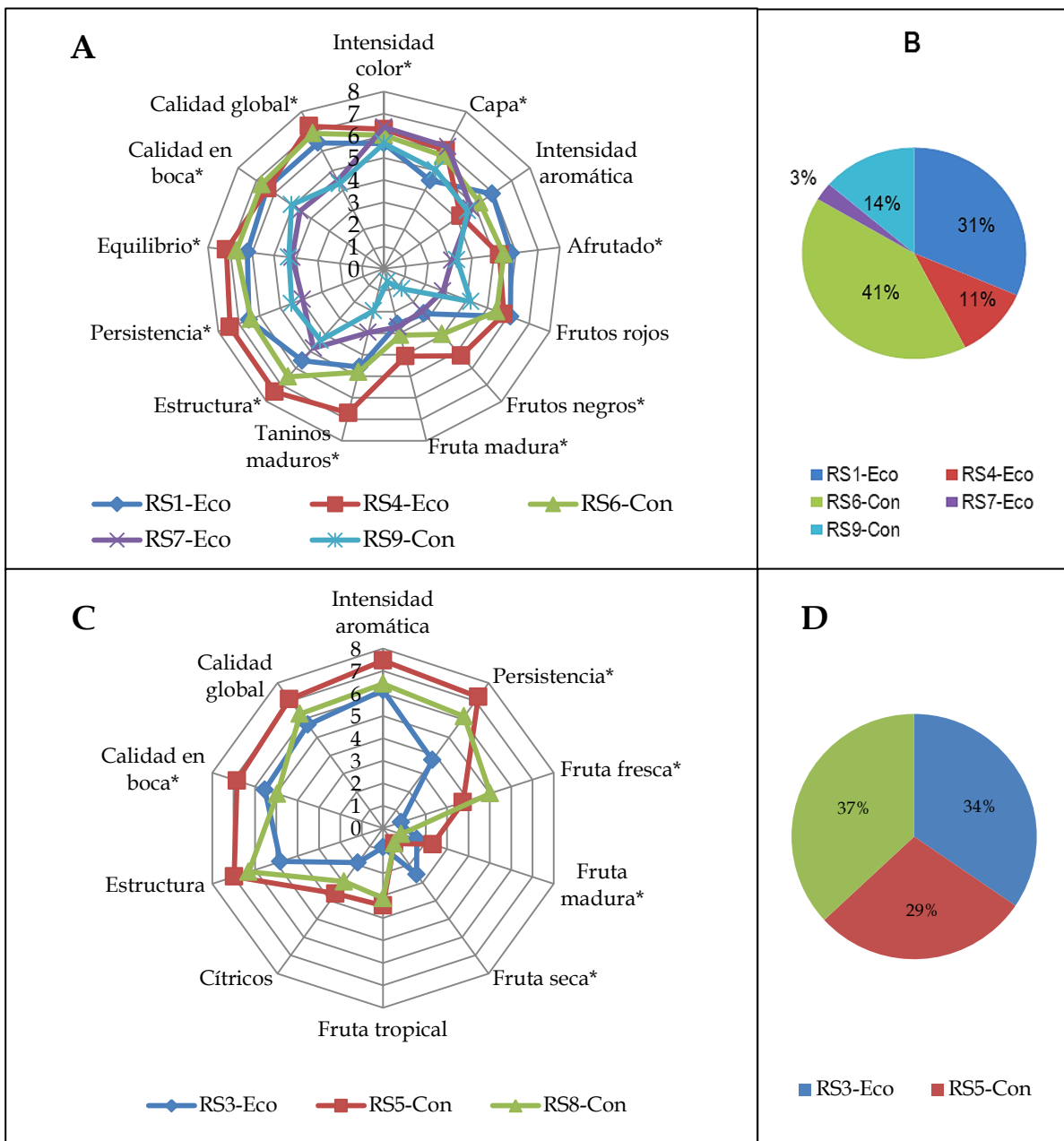


Figura 4.59. Perfil sensorial de vinos tintos (A) y blancos (C) de la DO Ribeira Sacra. Porcentaje de preferencia de vinos tintos (B) y blancos (D). * Indica diferencias significativas entre los vinos para ese descriptor.

Entre los vinos blancos evaluados de la DO Ribeira Sacra no se observaron diferencias significativas para la mayoría de los descriptores, aunque sí en la calidad global en boca, persistencia y algunas notas afrutadas (Figura 4.59C). El vino convencional RS5 obtuvo la mayor puntuación en los descriptores de la fase gustativa y también en intensidad aromática, persistencia y notas a fruta madura. El otro vino convencional, RS8, presentó notas a fruta fresca; mientras que el de origen ecológico, RS3, solo destacó en nariz por notas a fruta seca. El cuanto a la preferencia de los catadores, RS8 obtuvo un 37%, seguido por el vino ecológico (35%) (Figura 4.59D).

La **DO Monterrei** es la Denominación más reciente. En ella se elaboran vinos blancos y tintos y, a pesar de tener un clima más seco, solo hay un productor certificado como ecológico, por tanto, solo se cataron dos vinos blancos y dos tintos. El perfil sensorial de los vinos blancos reveló una clara diferenciación entre ellos, aunque los catadores no mostraron una preferencia clara por uno de ellos. El vino ecológico destacó por presentar notas a fruta madura, miel y fruta seca en nariz y ser dulce en boca (Figura 4.60A); por el contrario, el vino convencional fue calificado con notas a fruta fresca, cítricos y acidez en boca. Ambos obtuvieron cerca de un 50% en las preferencias de los catadores. Lo mismo ocurrió con los vinos tintos evaluados de esta Denominación. Aunque no se observaron diferencias notables en boca, el vino ecológico mostró mayor intensidad aromática y destacó sobre el convencional por notas a frutos negros; el vino convencional presentó más taninos maduros.

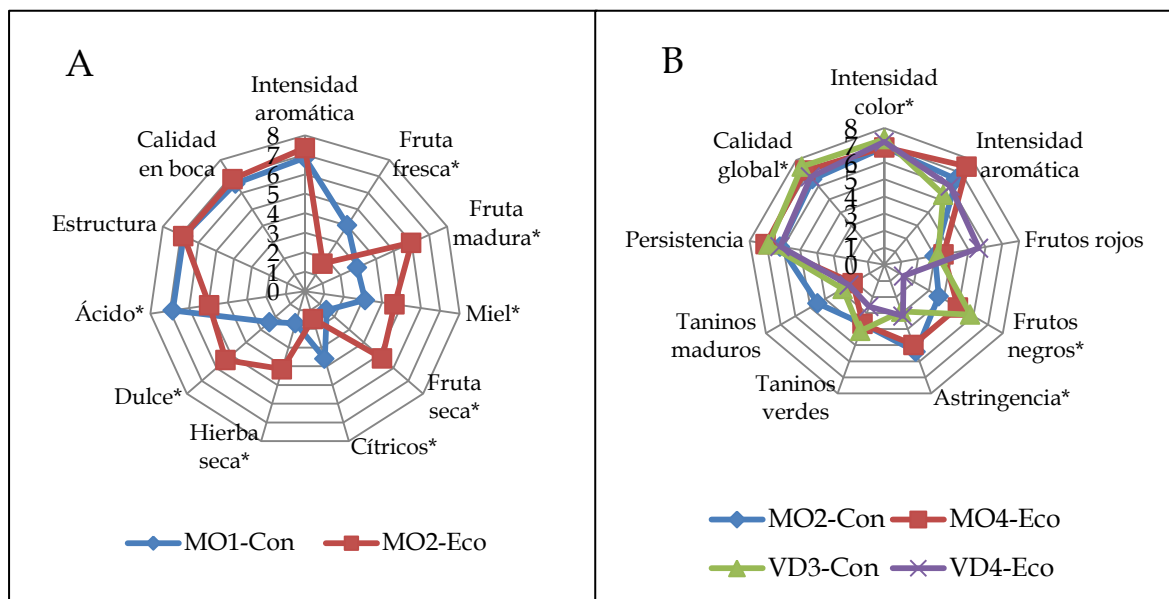


Figura 4.60. A) Perfil sensorial de los vinos blancos de la DO Monterrei. B) Perfil sensorial de los vinos tintos de Monterrei y Valdeorras. * Indica diferencias significativas entre los vinos para ese descriptor.

En la **DO Valdeorras** se elaboran vinos blancos (fundamentalmente con la variedad Godello) y tintos Mencía. Al igual que en la DO Monterrei, solo existe un productor biológico certificado que elabora sobre todo tinto. Por ello, solo se evaluaron vinos tintos, destacando el de producción ecológica por presentar notas a frutos rojos, mientras que el convencional sobresalió por sus notas a frutos negros y obtuvo la mejor puntuación en calidad global (Figura 4.60B). Los catadores prefirieron los vinos elaborados en producción ecológica.

Los resultados mostraron diferencias significativas entre vinos ecológicos y convencionales comerciales. Laureati et al. (2014) también identificaron diferencias pronunciadas entre vinos tintos ecológicos y convencionales: mayor concentración de compuestos fenólicos y sensación astringente en los vinos ecológicos; por el contrario, el vino convencional tenía una amargura más pronunciada. Pagliarini et al. (2013) encontraron diferencias similares en un amplio estudio de consumidores que no influyeron en el gusto, ya que los vinos ecológicos y convencionales fueron hedónicamente comparables. Aunque, curiosamente, el 61% de los encuestados estaría dispuesto a pagar más por los vinos producidos ecológicamente, sugiriendo buenas perspectivas de mercado para las prácticas ambientalmente sostenibles relacionadas con la calidad del vino.

4.6.2. *Análisis sensorial de los vinos de 2014: particularidades de una campaña climatológicamente desfavorable*

En términos generales se observaron diferencias al evaluar las distintas añadas. Entre los vinos blancos de 2012 fueron los biológicos los que presentaron una mayor persistencia frente a los convencionales que destacaron por su aroma floral y a fruta fresca. Sin embargo, en general en 2013, estos descriptores se invirtieron, siendo mayor en los vinos ecológicos el aroma floral y a fruta fresca y menor la persistencia y el aroma a cítricos. En 2013 los vinos tintos ecológicos destacaron especialmente por su intensidad aromática y frutos rojos, presentando los convencionales mayor astringencia y taninos.

La campaña de 2014, climatológicamente desfavorable con abundantes precipitaciones, algunas en etapas críticas del ciclo de la vid y/o justo antes de la vendimia, mostró resultados no tan prometedores para los vinos ecológicos como en las anteriores. En esta campaña los ataques fúngicos provocaron abundantes pérdidas no solo por descensos de la producción (Blanco et al., 2016), sino también de la calidad debido al estado sanitario de la uva, aún con la aplicación de repetidos tratamientos fitosanitarios.

En la evaluación sensorial de estos vinos los catadores mostraron, en general, una mayor preferencia por los vinos convencionales que por los de producción ecológica, especialmente en los blancos (Figura 4.61). La reciente campaña de 2016, similar a la de 2014 presentó también un gran descenso de los rendimientos, especialmente en el cultivo ecológico en Galicia. La menor puntuación en el análisis sensorial de los vinos ecológicos en 2014 se debió a que en algunos de ellos se encontraron defectos. Por ejemplo, especialmente en 2014, en algunos vinos tintos ecológicos los catadores apreciaron notas del compuesto 4-etilfenol a niveles superiores al umbral aceptado como negativo. Este compuesto es un producto metabólico de la levadura *Brettanomyces* que puede contaminar las barricas de las bodegas y otras partes de la bodega (Loureiro y Malfeito-Ferreira, 2006). La aparición de este defecto del vino caracterizado por el aroma a establo y a sudor de caballo debe prevenirse con una correcta limpieza y desinfección en la bodega. Por lo tanto, no debe confundirse la elaboración en ecológico o artesanal con prácticas no cuidadas en la higiene y desinfección de las bodegas.

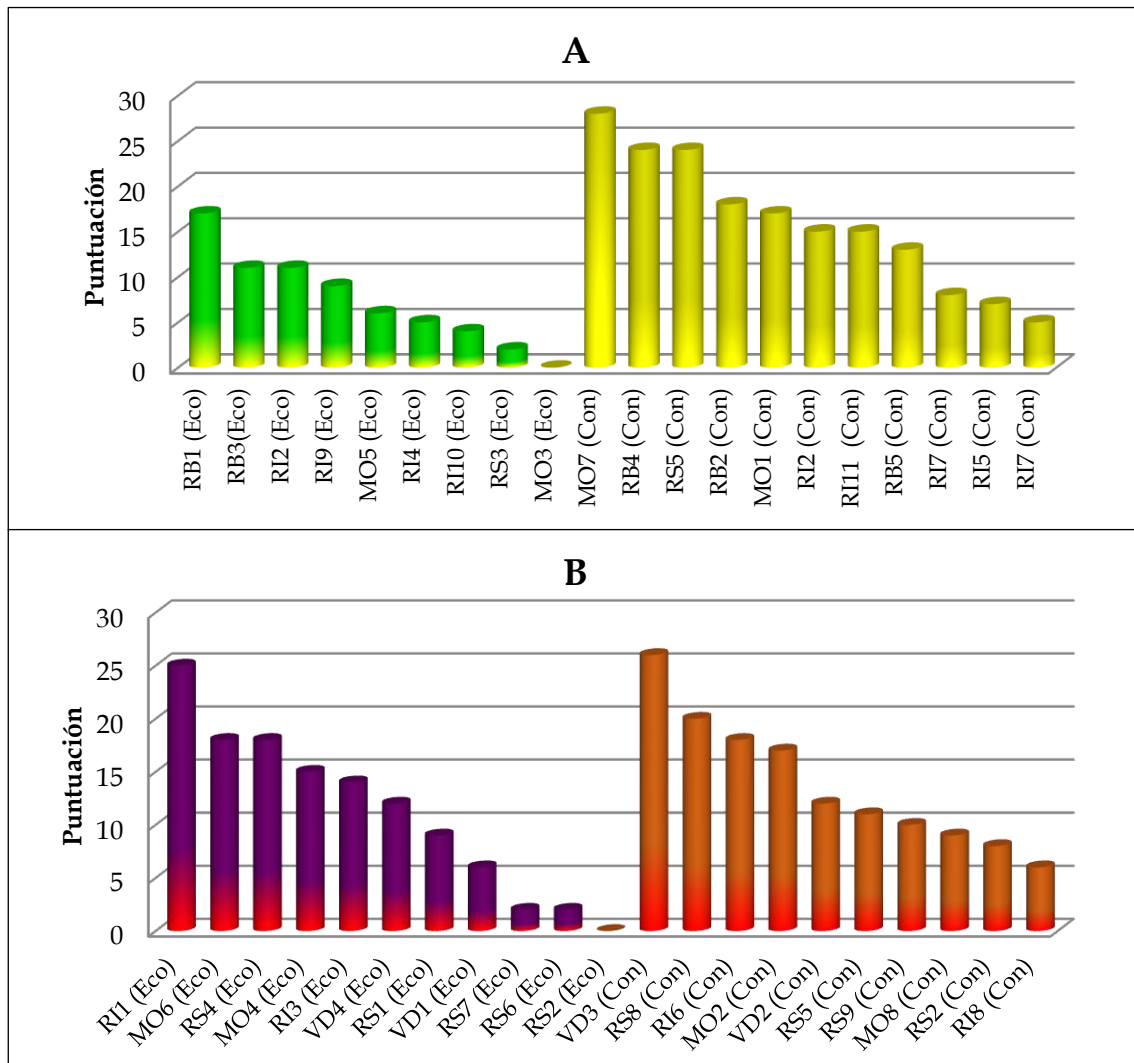


Figura 4.61. Puntuación por preferencia de los catadores de vinos blancos (A) y tintos (B) de 2014.

Los defectos sensoriales asociados directamente a Brett aparecen mayoritariamente en vinos tintos de calidad y las causas radican en la propia fisiología del microorganismo. La biosíntesis de fenoles volátiles se realiza a partir de ácidos hidroxicinámicos y en vinos tintos el contenido de estos compuestos es mayor. Además, al ser una levadura de crecimiento muy lento, la alteración se presenta principalmente durante el almacenamiento, acrecentándose el problema en las bodegas que utilizan barricas antiguas (Suárez et al., 2007).

La percepción olfativa de estos fenoles volátiles resulta controvertida ya que los descriptores sensoriales tipo animal se han considerado tradicionalmente como característicos de determinados vinos de crianza en madera. En pequeñas concentraciones, estos compuestos contribuyen a la complejidad aromática del vino, pero por encima de cierta concentración enmascaran completamente su perfil sensorial con sensaciones muy desagradables, considerándose un defecto (Romano et al., 2008). Por esta razón se confirmó microbiológicamente la presencia de *Brettanomyces* asociada a dichos compuestos aromáticos indeseables.

La especie *B. bruxellensis* fue encontrada en cinco vinos de diferentes Denominaciones de Origen en la cata realizada en 2016, todos ellos tintos y de producción ecológica: RS1, RS6 y RS7 (DO Ribeira Sacra), VD1 (DO Valdeorras) y RI1 (DO Ribeiro).

En conjunto, el análisis sensorial mostró diferencias entre los vinos ecológicos y convencionales; por tanto, se puede afirmar que el cultivo ecológico favorece la diferenciación y diversificación de los vinos comerciales elaborados en bodega a nivel industrial. Además, los vinos ecológicos obtuvieron valoraciones similares a los de producción convencional en los test de preferencia y, en algunos casos, fueron preferidos por los catadores. Sin embargo, no ocurrió así con los vinos elaborados en campañas climatológicamente desfavorables, estando las diferencias entre vinos convencionales y ecológicos fuertemente marcadas por la campaña. Por otro lado, teniendo en cuenta que la elaboración del vino ecológico con respecto al convencional no requiere procesos muy diferentes ni excesivamente condicionados (con límites aceptables del contenido máximo de SO₂), la mayor parte de las diferencias se encuentran en el cultivo del viñedo.

La producción de la uva ecológica requiere un especial cuidado y la aplicación del conocimiento basado en los equilibrios planta-suelo-clima sobre los que se fundamenta. En bodega implica un cuidadoso seguimiento del proceso de fermentación que suele realizarse con las levaduras propias del mosto. En estas condiciones, la obtención de un producto diferenciado de calidad, implica la aplicación de los saberes de antaño en simbiosis con los avances enológicos actuales. En años climatológicamente desfavorables elaborar un buen vino en Galicia supone un gran reto para los productores. Sin embargo, la credibilidad del vino ecológico pasa por conseguir que las botellas contengan además de una etiqueta, la calidad con la que se le asocia. Por último, hay que decir que la caracterización sensorial de los vinos permitió destacar además la singularidad y peculiaridad aromática entre las distintas Denominaciones de Origen aun con vinos elaborados con las mismas variedades.

4.6.3. Análisis microbiológico de los vinos sometidos a evaluación sensorial

El control microbiológico de los vinos mostró ausencia de microorganismos en casi todas las muestras analizadas de vinos blancos; sin embargo, en el caso de los vinos tintos sí se detectaron, tanto levaduras como bacterias. En la Tabla 4.39 se incluyen los vinos en los que había crecimiento positivo, indicando el tipo y concentración de microorganismos cuando fue posible recontarlos. De los vinos blancos analizados solo en 4 de ellos se observó la presencia de levaduras. Además, la concentración observada no afectó a la valoración de la fase visual del vino durante el análisis sensorial, ya que en ninguno de ellos se apreciaba turbidez.

Por el contrario, en casi todos los vinos tintos filtrados se detectó la presencia de bacterias a elevada concentración y, en algunos de ellos, también de levaduras. El hecho de que procediesen de elaboración ecológica o convencional no influyó en este aspecto, ya que está más relacionado con las prácticas enológicas en la bodega. Se confirmó la presencia de la levadura *Brettanomyces* en todas las muestras en las que los catadores encontraron aromas tipo animal (4-etilfenol), especialmente en los vinos tintos de 2014.

Tabla 4.39. Control microbiológico de los vinos.

Código	Tipo de vino*	Crecimiento microbiano		UFC/mL
		Levaduras	Bacterias**	
RB4	Blanco-Con	+	-	5.2×10^2
RI1	Tinto-Eco	+	-	césped
RI2	Blanco-Eco	+	-	2×10^0
RI3	Tinto-Eco	-	+	6.7×10^2
RI7	Blanco-Con	+	-	6×10^{-1}
RI8	Tinto-Con	+	+	2.4×10^0
RS2	Tinto-Con	+	+	9×10^{-2}
RS4	Tinto-Eco	-	+	césped
RS5	Blanco-Con	+	-	2.1×10^0
RS6	Tinto-Con	-	+	césped
RS7	Tinto-Eco	+	-	césped
RS9	Tinto-Con	+	+	8.3×10^2
MO2	Tinto-Con	-	+	césped
MO4	Tinto-Eco	-	+	césped
VD1	Tinto-Eco	+	+	césped
VD3	Tinto-Con	-	+	césped
VD4	Tinto-Eco	+	+	césped

*Con-convencional; Eco-ecológico. ** El crecimiento bacteriano observado fue tipo césped; no permitió el recuento de UFC/mL.

4.7. Fermentación de mostos de la variedad Treixadura con levaduras no-Saccharomyces autóctonas de Galicia

Este ensayo constituye un primer estudio de la influencia sobre las características químicas, aromáticas (compuestos volátiles) y sensoriales del vino elaborado con cepas autóctonas de 4 especies diferentes de levaduras no-Saccharomyces. Se utilizó la variedad Treixadura. Las cepas evaluadas se seleccionaron a partir de las levaduras aisladas en viñedos de producción ecológica y convencional durante el desarrollo de esta tesis. La fermentación se llevó a cabo mediante inoculación secuencial. Primero se añadió la cepa no-Saccharomyces seguida de la inoculación de *S. cerevisiae* ScXG3, una cepa también autóctona aislada y evaluada enológicas en investigaciones previas en la EVEGA (Blanco et al., 2006 y 2013).

4.7.1. Caracterización enológica preliminar de levaduras no-Saccharomyces autóctonas

Realizar un análisis con las más de 2000 levaduras identificadas durante la presente tesis resultaba inviable. Por tanto, se realizó una preselección de 30 cepas de cuatro especies no-Saccharomyces descritas en la bibliografía reciente con interés enológico (Canonico et al., 2016; Ciani et al., 2010 y 2015; Comitini et al., 2011): *T. delbrueckii*, *Starm. bacillaris*, *L. thermotolerans* y *M. pulcherrima*. De cada una de las especies relevantes anteriormente citadas, se seleccionaron entre 4 y 10 aislados de las diferentes Denominaciones de Origen tanto de cultivo ecológico como convencional (Figura 4.62). El hecho de utilizar cepas dentro de la misma especie aisladas en distintas DOs y en distintas parcelas y sistemas de cultivo permitió tener comportamientos enológicos distintos con el fin de seleccionar los más adecuados.

Las cepas en cultivo puro se inocularon con una concentración de 5×10^6 UFC/mL en mosto pasteurizado con las siguientes características: grado alcohólico probable: 11.5 % vol., acidez total: 6.3 g tart./L, ácido málico: 4.1 g/L, ácido tartárico: 3.1 g/L, azúcares: 188 g/L y SO_2 total: 15 mg/L. Los datos procedentes de los análisis químicos (Tabla 4.40) y aromáticos (Tabla 4.41) de los vinos obtenidos se evaluaron en una matriz de cuantificación (Tabla 4.42) valorando cada una de las características enológicas deseadas. Conforme a estos valores se escogieron las cepas mejor valoradas para cada una de las cuatro especies descritas al inicio de este párrafo.

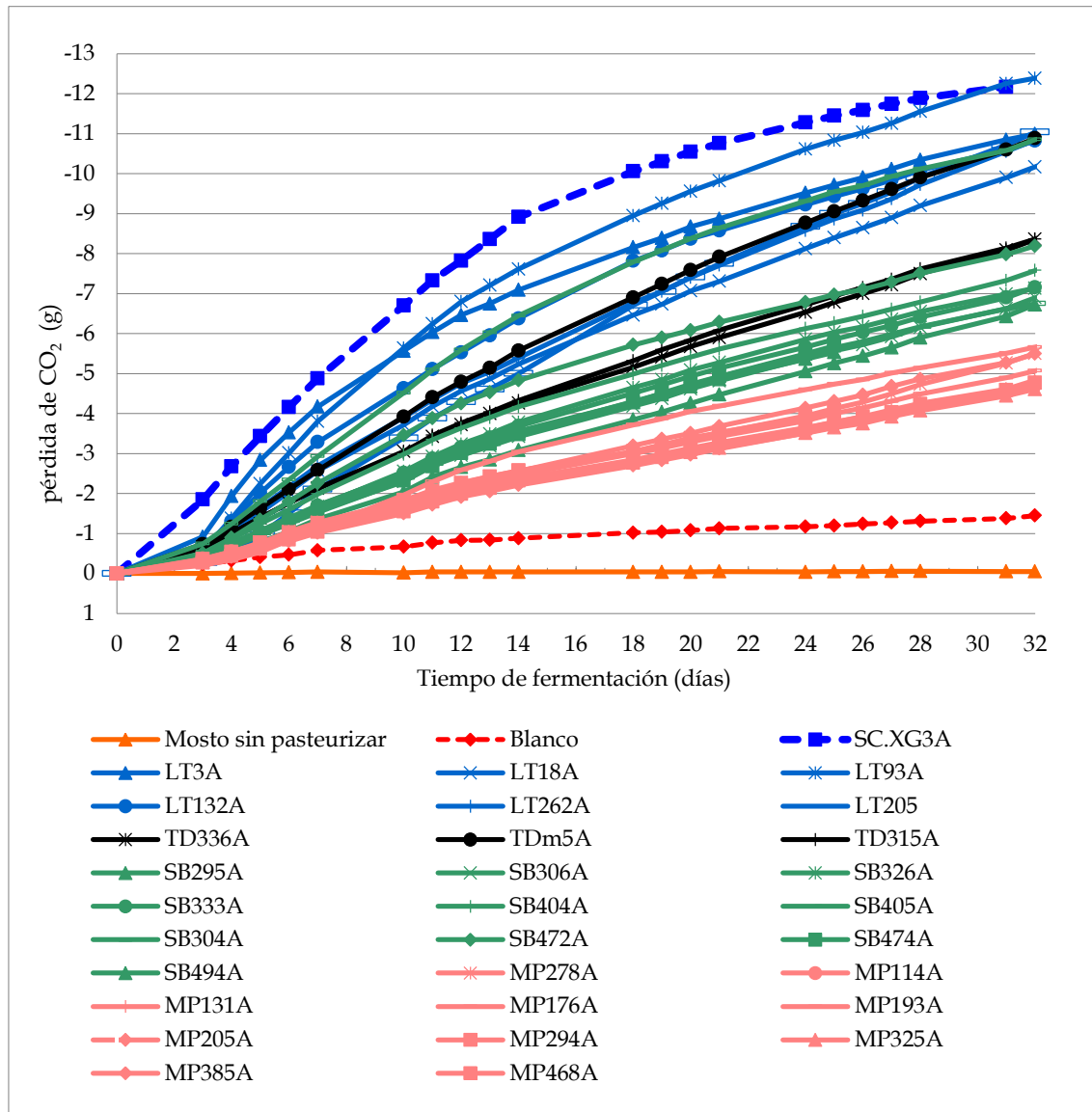


Figura 4.62. Capacidad fermentativa de distintas cepas de especies no-*Saccharomyces* (LT: *L. thermotolerans*, MP: *M. pulcherrima*, SB: *Starm. bacillaris*, TD: *T. delbrueckii*) y la cepa *S. cerevisiae* ScXG3.

La capacidad fermentativa de las diferentes cepas no-*Saccharomyces* en cultivo puro varió de unas cepas a otras, destacando *L. thermotolerans* y *T. delbrueckii* por sus altas tasas de fermentación tal y como demostraron otros trabajos (Ciani y Maccarelli, 1998; Ciani et al., 2010; Comitini et al., 2011; Englezos et al., 2015; González et al., 2013).

Tabla 4.40. Parámetros enológicos de los vinos elaborados con las cepas en cultivo puro.

Cepa	Acidez total (g tartárico/L)	Acidez volátil (g acético/L)	Ácido Láctico (g/L)	Ácido málico (g/L)	Azúcares* reductores (g/L)	Glicerol (g/L)	Grado alcohólico (%vol.)	pH
ScXG3	6.8±0.0	0.60±0.03	0.1±0.0	3.5±0.1	0.2±0.1	3.8±0.3	10.05±0.07	3.66±0.01
Lt3	7.9±0.1	0.39±0.06	1.7±0.6	2.6±0.3	6.1±7.6	5.6±1.0	9.12±0.40	3.58±0.09
Lt18	7.4±0.1	0.38±0.01	0.8±0.3	2.85±0.2	20.3±10.7	5.6±0.3	8.08±0.11	3.58±0.07
Lt93	8.0±0.0	0.43±0.01	2.6±1.0	2.3±0.3	0.8±0.9	6.1±0.2	9.02±0.11	3.53±0.08
Lt132	7.6±0.6	0.40±0.04	1.5±1.1	2.5±0.5	9.8±5.3	5.5±0.2	9.12±0.54	3.65±0.06
Lt262	6.9±0.1	0.36±0.03	0.5±0.0	3.0±0.0	6.5±8.3	4.9±0.5	8.71±0.22	3.68±0.04
Lt205	7.3	0.36	0.9	2.8	0.6	5.2	8.75	3.58
Td336	7.1±0.0	0.36±0.01	0.1±0.0	3.2±0.0	37.5±0.4	5.1±0.4	7.75±0.03	3.59±0.02
Tdm5	7.7±0.5	0.61±0.12	0.1±0.0	3.9±0.2	2.5±2.6	3.3±0.2	9.25±0.07	3.63±0.07
Td315	7.1±0.1	0.39±0.03	0.1±0.0	3.1±0.0	31.8±5.9	5.7±0.4	8.08±0.30	3.64±0.01
Sb295	6.8±0.3	0.50±0.01	0.1±0.0	3.5±0.1	55.5±4.7	16.7±0.5	6.60±0.36	3.85±0.01
Sb306	6.9±0.1	0.49±0.03	0.1±0.0	3.4±0.0	44.0±1.2	14.5±0.4	7.34±0.24	3.76±0.00
Sb326	6.5±0.0	0.41±0.30	0.1±0.0	3.4±0.4	67.4±40.7	16.7±2.3	6.22±1.70	3.82±0.06
Sb333	6.9±0.4	0.62±0.08	0.1±0.0	3.3±0.1	47.7±11.2	16.1±1.1	6.92±0.32	3.78±0.04
Sb404	6.2±0.4	0.54±0.04	0.1±0.0	3.0±0.5	29.8±14.4	13.4±1.8	7.84±0.67	3.71±0.06
Sb405	6.5±0.4	0.37±0.21	0.1±0.0	3.6±0.6	66.9±40.4	16.6±2.8	6.25±1.63	3.85±0.05
Sb304	7.1±0.1	0.50±0.04	0.1±0.0	3.2±0.1	0.3±0.1	7.0±0.3	9.70±0.57	3.58±0.04
Sb472	6.5±0.2	0.53±0.09	0.1±0.0	3.1±0.1	41.1±18.7	15.2±1.9	7.38±0.52	3.77±0.10
Sb474	6.8±0.2	0.39±0.25	0.1±0.0	3.5±0.4	65.9±40.4	17.0±3.0	6.35±1.66	3.92±0.11
Sb494	6.5±0.4	0.49±0.04	0.1±0.0	3.3±0.1	47.8±0.4	15.9±0.4	6.91±0.08	3.77±0.08
Mp278	6.7±0.4	0.42±0.01	0.6±0.1	1.6±0.0	78.5±10.6	11.6±1.1	4.16±0.51	3.69±0.07
Mp114	6.8±0.6	0.50±0.02	0.3±0.0	2.0±0.1	86.5±2.1	12.4±0.2	3.61±0.03	3.68±0.01
Mp131	6.3±0.3	0.52±0.03	0.3±0.0	1.6±0.4	83.5±7.8	12.9±1.1	3.71±0.36	3.72±0.00
Mp176	7.2±0.0	0.73±0.00	0.3±0.1	2.7±0.0	97.5±2.1	10.1±0.1	3.65±0.11	3.78±0.05
Mp193	6.8±0.1	0.46±0.01	0.4±0.0	2.0±0.3	83.5±2.1	10.8±0.6	4.10±0.08	3.64±0.03
Mp205	7.1±0.1	0.47±0.04	0.4±0.1	2.3±0.1	88.0±1.4	11.5±0.2	3.94±0.13	3.69±0.01
Mp294	6.6±0.1	0.44±0.00	0.2±0.1	2.8±0.3	92.5±17.7	11.3±0.4	3.66±0.20	3.64±0.03
Mp325	7.2±0.1	0.44±0.02	0.6±0.1	1.8±0.1	95.5±0.7	13.2±0.4	3.52±0.06	3.71±0.01
Mp385	6.5±0.3	0.58±0.16	0.4±0.1	2.0±0.1	83.8±3.9	11.3±0.4	3.99±0.27	3.63±0.12
Mp468	7.5±0.5	0.54±0.00	0.4±0.0	2.2±0.0	88.0±1.4	11.8±0.4	3.68±0.05	3.69±0.02

Los valores son la media de dos fermentaciones ± desviación típica. * Glucosa + fructosa.

Tabla 4.41. Compuestos volátiles mayoritarios y alcoholes superiores analizados en los vinos elaborados con las cepas no-*Saccharomyces* y ScXG3 en las microvinificaciones de 70 mL.

Cepa	Alcoholes superiores (mg/L)	Etanal (mg/L)	Metanol (mg/L)	Propanol (mg/L)	Isobutanol (mg/L)	1-butanol (mg/L)	2-metil-1-butanol (mg/L)	3-metil-1-butanol (mg/L)	Acetato de etilo (mg/L)
ScXG3	185.0±28.3	8.5±2.1	22.5±0.7	26.8±2.5	20.4±8.7	3.4±0.6	24.1±3.4	110.7±15.7	4.5±2.1
Lt3	136.5±57.3	24.5±12.0	25.5±4.9	24.8±12.1	19.1±10.0	2.9±3.6	23.7±4.9	73.2±35.1	4.7±1.0
Lt18	162.5±4.9	23.8±0.3	21.2±1.2	29.8±0.4	20.8±1.6	4.9±0.3	27.4±2.1	87.7±3.0	3.2±0.1
Lt93	159.4±46.2	33.5±6.4	25.5±6.4	28.1±8.0	21.4±8.1	2.7±3.3	24.8±2.8	88.2±34.2	4.3±1.0
Lt132	116.0±62.2	18.5±3.5	23.5±2.1	32.2±4.2	22.1±2.1	5.9	14.1±13.2	49.4±50.9	8.7±6.2
Lt262	154.9±4.5	25.5±4.9	22.0±0.0	28.3±2.7	17.3±3.4	4.6±0.4	25.6±0.5	85.4±5.9	4.8±1.1
Lt205	162	15	21	33.0	15.2	4.7	25.0	84.0	4
Td336	116.5±3.5	30.5±2.1	21.0±0.0	13.5±0.7	17.5±0.7	1.5±0.7	11.0±0.0	73.0±1.4	6.5±0.7
Tdm5	131.0±0.0	16.5±14.8	21.0±1.4	32.5±2.1	17.0±0.0	1.5±0.7	13.0±1.4	58.0±9.9	6.0±0.0
Td315	122.0±22.6	10.5±2.1	22.5±0.7	13.5±0.7	16.5±2.1	2.0±0.0	11.0±1.4	74.5±12.0	10.0±0.0
Sb295	80.5±0.7	16.5±6.4	15.0±8.5	19.7±0.5	46.0±0.7	-	3.3±0.6	11.3±1.1	8.5±3.5
Sb306	81.5±0.7	27.5±16.3	24.5±2.1	25.6±5.3	39.2±4.9	-	3.9±0.3	12.8±0.5	11.5±2.1
Sb326	66.0±41.0	16.5±2.1	23.5±3.5	25.0±8.0	27.2±25.1	-	4.3±1.3	10.1±5.4	8.5±3.5
Sb333	93.0±2.8	32.5±20.5	22.0±1.4	31.3±2.4	46.1±0.5	-	4.6±0.1	11.7±0.2	12.0±1.4
Sb404	77.5±4.9	22.5±6.4	21.0±1.4	26.8±0.9	33.4±2.7	-	4.6±0.1	12.5±1.0	6.5±4.9
Sb405	84.3±10.3	23.0±11.3	23.0±2.8	19.8±14.1	33.7±4.3	0.4±0.1	7.5±4.7	23.4±15.5	6.5±4.9
Sb304	60.0±24.0	17.5±3.5	23.5±3.5	24.9±6.8	21.2±13.4	-	4.1±0.1	9.2±4.5	8.5±2.1
Sb472	61.0±29.7	36.0±33.9	24.5±4.9	23.4±8.5	22.3±20.2	-	3.8±0.6	9.9±4.0	9.5±2.1
Sb474	139.0±58.0	20.5±0.7	22.0±1.4	33.7±10.3	32.5±26.6	6.2±0.9	15.4±14.4	52.1±53.0	6.5±4.9
Sb494	84.5±0.7	22.0±7.1	20.0±1.4	26.5±1.4	38.6±3.3	-	10.1±7.1	14.6±0.6	10.0±0.0
Mp278	110.2±0.6	21.5±2.1	18.0±1.4	9.9±0.5	47.0±7.1	0.9±0.2	8.4±1.5	43.9±6.4	12.0±1.4
Mp114	116.5±2.1	10.5±6.4	19.5±0.7	8.0±1.4	51.0±0.0	1.0±0.1	7.5±0.7	50.0±2.8	40.5±34.6
Mp131	109.0±8.5	10.5±0.7	20.5±0.7	10.0±1.4	49.0±5.7	1.0±0.0	8.0±0.0	42.0±1.4	201.0±41.0
Mp176	104.5±0.7	13.0±2.8	21.0±0.0	14.7±0.9	46.6±2.8	0.0±0.0	8.3±0.6	34.9±2.3	330.0±39.6
Mp193	122.0±24.0	8.5±0.7	20.5±0.7	9.0±0.0	54.5±7.8	0.0±0.0	6.5±0.7	51.5±14.8	55.0±9.9
Mp205	104.0±17.0	8.5±2.1	29.5±13.4	8.5±3.5	49.5±7.8	0.0±0.0	7.0±0.0	38.0±5.7	45.5±44.5
Mp294	117.0±15.6	13.0±1.4	33.5±0.7	11.5±2.1	58.5±9.2	0.0±0.0	7.0±0.0	39.5±4.9	89.5±74.2
Mp325	99.0±8.5	10.0±1.4	19.0±1.4	7.0±0.0	42.0±5.7	1.0±0.0	7.5±0.7	41.0±1.4	36.0±1.4
Mp385	159.0±1.4	45.0±4.2	15.5±3.5	13.3±1.1	72.9±6.4	-	5.7±0.1	67.3±5.6	133.0±100
Mp468	108.0	26.0	12.0	3.4	64.5	-	4.2	36.2	67.0

Los valores son la media de dos fermentaciones ± desviación típica.

Tabla 4.42. Resumen de puntuaciones y justificación de la elección de cepas no-*Saccharomyces*.

Parámetro	ScXG3	Lt3	Lt18	Lt93	Lt132	Lt262	Lt205	Td336	Tdm5	Td315	Sb295	Sb306	Sb326	Sb333	Sb404	Sb405	Sb304	Sb472	Sb474	Sb494	Mp278	Mp114	Mp131	Mp176	Mp193	Mp205	Mp294	Mp325	Mp385	Mp468
Acidez total (g tart./L)	9	8.5	4.5	9	5.5	1	4	8	3	8.5	6.5	6.5	4	7	2	4	8	4	6	4	3.5	4	1	6	3.5	5.5	2.5	5.5	2	7
Acidez volátil (g acético/L)	2	4	5	1	3.5	6.5	6	8	2	7.5	3	3	4.5	1	2.5	5.5	3	2.5	5	3.5	8	6	5.5	0	7	6.5	7	7.5	4	5
Ácido láctico (g/L)	0	2.5	0.5	4.5	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5.5	2	2	1.5	4	3.5	0.5	5.5	3.5	4
Ácido málico (g/L)	1	2.5	1	4	3	0	1	4	1	5	1.5	2	2	2.5	4	1.5	3	3.5	2	2.5	4	3	4.5	1	3	2	0.5	4	3	2
Azúcares* reductores (g/L)	7	5.5	2	7	5	5.5	7	0	6.5	1	3	4	2	3.5	5	2	7	4	2	3.5	5.5	4	4.5	1.5	4.5	3.5	2.5	2	4.5	3.5
Glicerol (g/L)	0.5	5	5.5	9	5	0	2	7	0.5	9	8	6.5	8	7.5	5	8	0	7	8.5	7.5	4	6.5	8	0.5	2	4	3.5	8.5	3.5	5
Grado alcohólico (%vol.)	6	4.5	0.5	4	4.5	2.5	3	0	6	1	2	3	1.5	2.5	3.5	1.5	5.5	2.5	1.5	2	4	1	1.5	1.5	3.5	2.5	1	0.5	3	1
pH	3	3.5	3	4.5	1.5	0.5	3	5	2.5	2.5	2	3	2.5	2.5	4	2	5.5	3	1	3	3	3	2	1	3.5	2.5	3.5	2	4	2.5
Alcoholes superiores	8	5.5	7.5	7.5	3.5	7	8	3.5	8	5	3	3	2	4	2.5	3.5	0	1.5	7	3	2.5	3.5	2	2	4.5	1.5	3.5	1	10	2
Etanal (mg/L)	6	3.5	4	1	5	3	6	0.5	3.5	5	5.5	4.5	5.5	3.5	4.5	5	5	3	5	4.5	4	5.5	5	5	6	5.5	5	5.5	0.5	3
Acetato de etilo (mg/L)	8	6.5	8	7	3.5	6.5	7	7	8	0	4	1	4	1	5	5	5	3	5	2	10	9	4.5	1	9	9	7.5	9	6.5	8
Puntuación ponderada	50.5	51.5	41.5	58.5	42	32.5	48	43	41	44.5	38.5	36.5	36	35	38	38	42	34	43	35.5	54	47.5	40.5	21	50.5	46	37	51	44.5	43

Los valores son la media de dos fermentaciones. * Glucosa + fructosa.

Estas levaduras fueron capaces de producir vinos con una mayor concentración de etanol y de consumir gran parte de los azúcares existentes en el mosto, en mayor medida que *Starm. bacillaris* y *M. pulcherrima* cuando se fermentaron en cultivo puro. Esto ocurrió a pesar de que se ha observado que *T. delbrueckii* y *L. thermotolerans* son menos tolerantes a niveles bajos de oxígeno lo que afecta más que la toxicidad por etanol a su crecimiento y conduce a su muerte durante la fermentación (Kurtzman et al., 2011). La concentración de glicerol obtenida por algunas cepas de *Starm. bacillaris* fue muy elevada ($Sb474 > 19\text{g/L}$) conforme a lo descrito por otros autores lo que aporta a los vinos untuosidad, volumen, leve dulzor y sensación de sedosidad en la boca (Ciani y Maccarelli, 1998; Englezos et al., 2016b y 2017).

4.7.2. Ensayo de inoculación secuencial en bodega

De acuerdo con la mayor puntuación ponderada de los vinos, en función de cada parámetro enológico relevante y su aptitud fermentativa, se seleccionaron las cepas no-*Saccharomyces*: Lt93, Td315, Sb474 y Mp278. Estas cepas se utilizaron para llevar a cabo fermentaciones secuenciales en bodega con mosto de la variedad Treixadura. Primero se añadió la cepa no-*Saccharomyces* seguida de la inoculación de la cepa también autóctona *S. cerevisiae* ScXG3.

4.7.2.1. Cinética fermentativa

La evolución de las fermentaciones varió de unas levaduras a otras, especialmente en el tiempo que tardaron en comenzar (Figura 4.63): *S. cerevisiae* ScXG3 y *T. delbrueckii* Td315 tardaron 2 días; *Starm. bacillaris* Sb474, 3 días; *L. thermotolerans* Lt93 y en el proceso espontáneo, 6 días, y, por último, *M. pulcherrima* Mp278 fue la cepa que tuvo un inicio más lento, hasta el 9º día no se observó actividad fermentativa en el depósito.

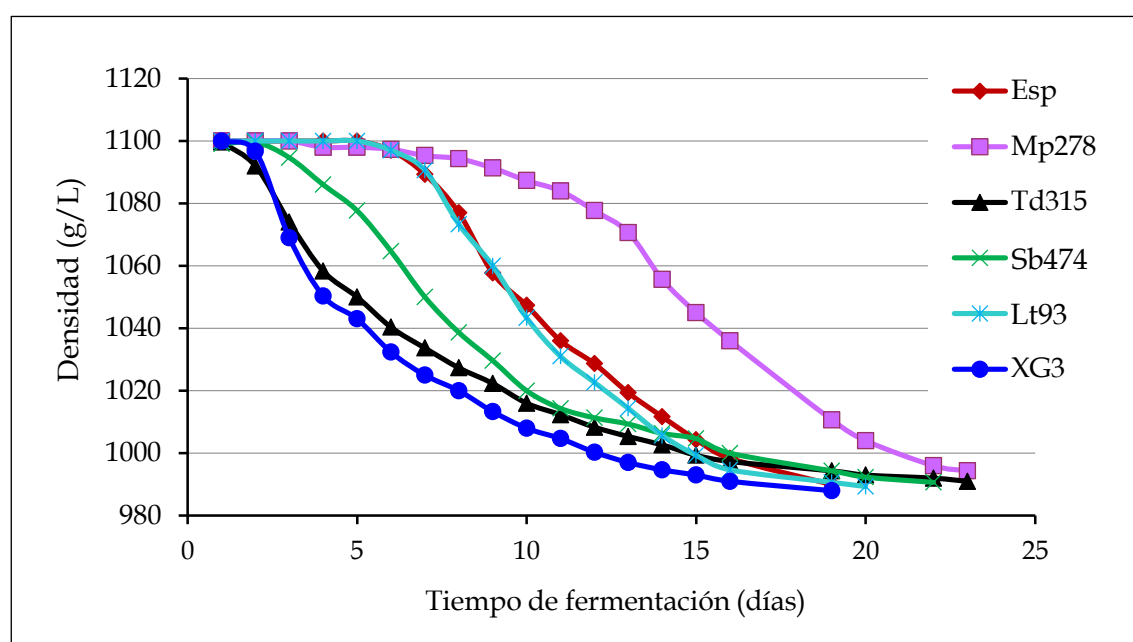


Figura 4.63. Evolución de las fermentaciones inoculadas secuencialmente con distintas cepas no-*Saccharomyces* y *S. cerevisiae* ScXG3.

Cuando bajó la densidad en torno a 10 g/L se añadió de forma secuencial *S. cerevisiae* ScXG3 y las fermentaciones evolucionaron normalmente hasta terminar.

4.7.2.2. Control microbiológico de las fermentaciones

La dinámica de la población de levaduras y el porcentaje de implantación del inóculo variaron entre las especies utilizadas. El mosto desfangado contenía 1.2×10^4 UFC/mL. A nivel cualitativo estaban presentes levaduras de las especies *H. uvarum*, *M. af. fructicola*, *L. thermotolerans* y *D. hansenii*. Tras añadir las levaduras a ensayar se observaron diferencias entre las fermentaciones (Figura 4.64). En general la población microbiana aumentó en fase tumultuosa y disminuyó ligeramente al final con algunas excepciones. Con Td315, el número de levaduras fue elevado al inicio del proceso (Fi) para ir disminuyendo en fase tumultuosa (Ft) y fase final (Ff). Con ScXG3 ocurrió lo contrario, la población aumentó a lo largo del proceso hasta el final. En las fermentaciones con Sb474 la población de levaduras fue mayor en todas las fases, respecto a los demás ensayos.

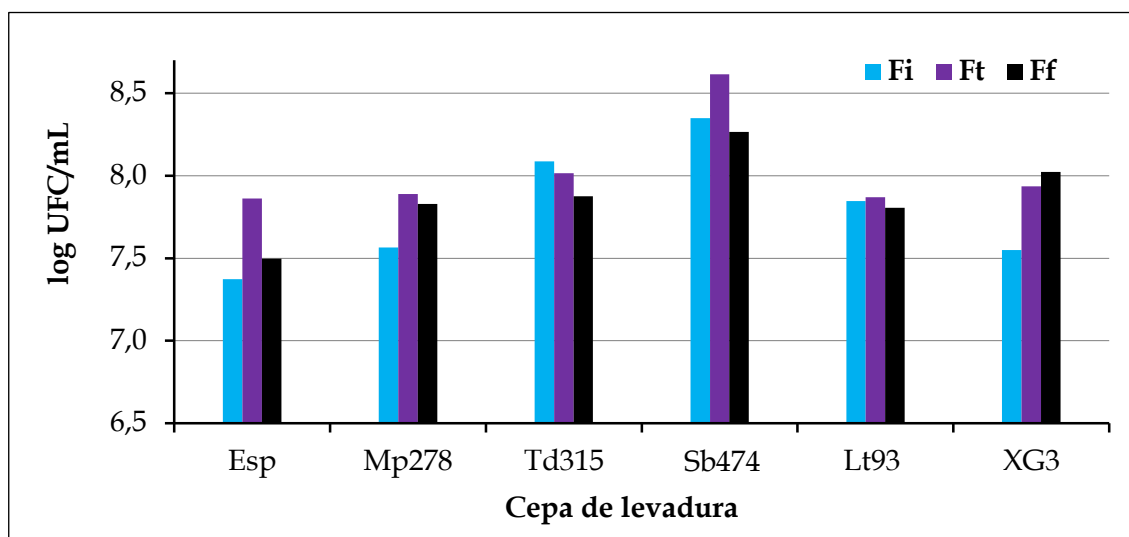


Figura 4.64. Evolución de la población de levaduras durante la fermentación con distintas cepas durante las distintas fases inicial (Fi), tumultuosa (Ft) y final (Ff).

En cuanto al control de implantación de la levadura inoculada, los resultados indicaron que *S. cerevisiae* ScXG3 aparecía como levadura dominante al 100% en la fermentación en la que fue el inóculo añadido. En el proceso espontáneo se identificaron hasta 15 cepas diferentes de *S. cerevisiae* (Figura 4.65), con predominio de dos de ellas que actuaron en codominancia (46% y 25%, respectivamente). La segunda corresponde a la cepa ScXG3.

Con las levaduras no-*Saccharomyces*, el porcentaje de implantación y su presencia una vez añadido el segundo inóculo varió de unas especies a otras (Figura 4.66). En la fermentación con Td315 y Sb474 la primera levadura inoculada estuvo presente en elevada proporción, > 85% y 77% respectivamente, hasta el final de la fermentación. *T. delbrueckii* y *Starm. bacillaris* toleran altas concentraciones de etanol en el vino y esta última además produce elevadas concentraciones de glicerol durante la FA (Bely et al., 2008; Englezos et al., 2016b; Renault et al., 2009; Suzzi et al., 2012). Sin embargo, la levadura Mp278 fue claramente desplazada por *S. cerevisiae*; estuvo presente al 100% al inicio de la

fermentación, disminuyó a menos del 2% en Ft y no se detectó en Ff. Por último, Lt93 apareció en todas las fases de la fermentación, pero en bajo porcentaje (< 20%) por lo que no se implantó adecuadamente ya desde Fi. Bagheri et al. (2015) afirmaron que una alta concentración inicial de células es crucial para permitir que *L. thermotolerans* se establezca durante la fermentación, pero también las relaciones levadura-levadura. Tampoco se implantó la cepa de *Saccharomyces* inoculada secuencialmente en esta fermentación.

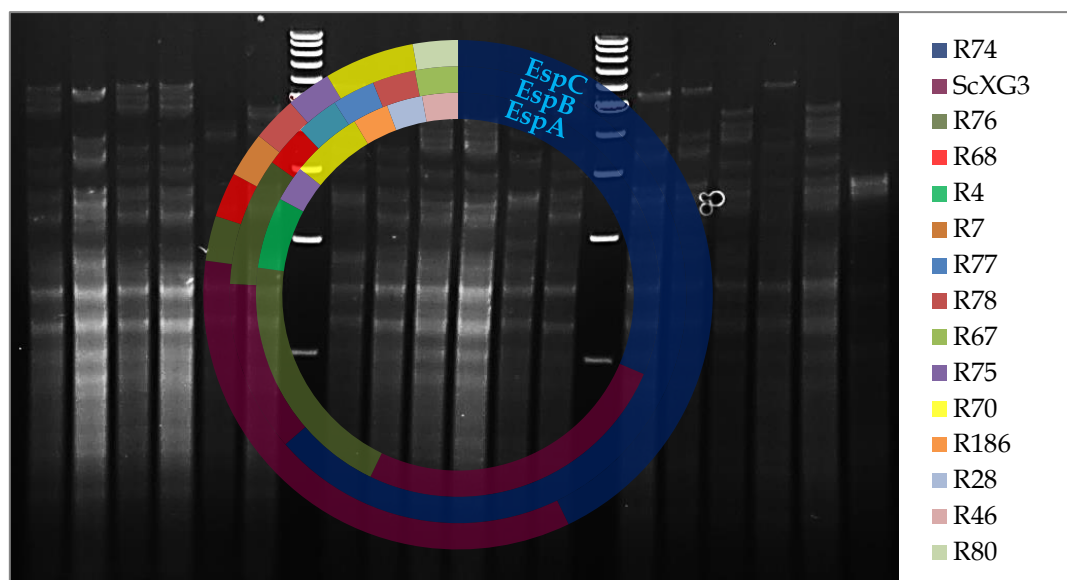


Figura 4.65. Cepas de *S. cerevisiae* implantadas en la fermentación espontánea de mosto Treixadura 2016.

Por el contrario, en las fermentaciones Td315, Mp278 y Sb474, la segunda levadura inoculada, ScXG3, fue la cepa de *S. cerevisiae* dominante en Ft y Ff. Sin embargo, en los procesos con Lt93 se identificaron distintas cepas de *S. cerevisiae* en codominancia además de ScXG3, al igual que en la fermentación espontánea.

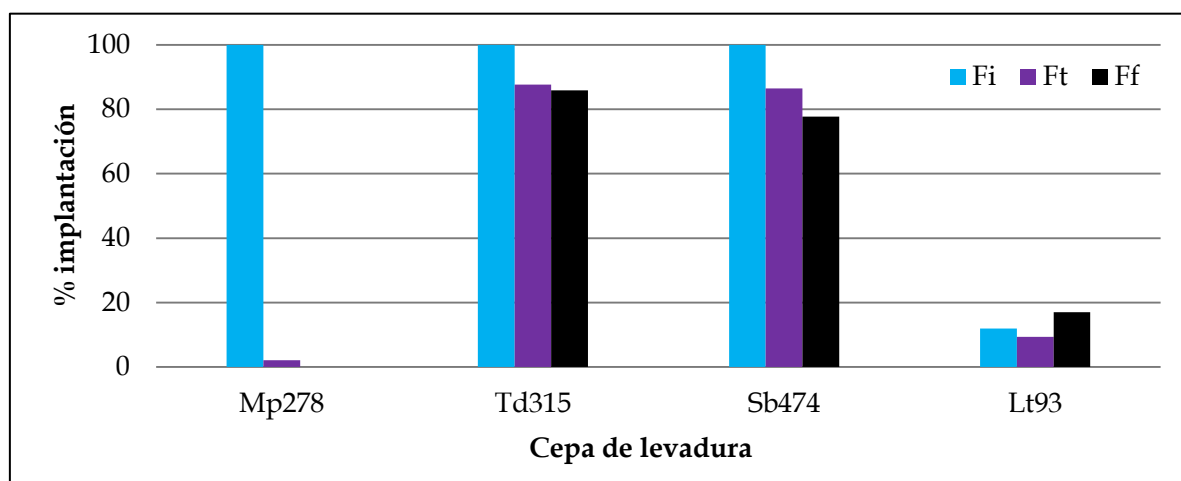


Figura 4.66. Porcentaje (%) de implantación de las levaduras no-*Saccharomyces* inoculadas en las distintas fases de la fermentación.

Starm. bacillaris es una levadura no-*Saccharomyces* común en el vino que se ha asociado con levaduras apiculadas ubicuas (*H. uvarum*) y que influye fuertemente en la composición analítica del producto final (Englezos et al., 2017). El hecho de que la cepa

Sb474 (*Starm. bacillaris*) prevaleciera más tiempo con elevada frecuencia que las demás especies durante la fermentación apoya los resultados encontrados por otros autores que indican que la mayoría de las cepas de esta especie son tolerantes a niveles relativamente altos de etanol y pueden sobrevivir y persistir hasta la fase intermedia del proceso fermentativo (Englezos et al., 2015 y 2016b; Rantsiou et al., 2012). La cepa Lt93 no se implantó en proporción óptima al inicio de la fermentación. Se ha demostrado un mecanismo de inhibición de contacto célula-célula en esta especie no-*Saccharomyces* en presencia de altas concentraciones de *S. cerevisiae* viables (Nissen et al., 2003). Sin embargo, excepto la cepa débilmente fermentativa Mp278 (que no suele prosperar en alta proporción más allá del 5-6 %vol. de alcohol en el mosto-vino), el resto de fermentaciones mostraron que las especies de levadura no-*Saccharomyces* persistieron durante más tiempo en la fermentación. Este hecho también ha sido descrito en fermentaciones espontáneas de mostos naturales con cepas no-*Saccharomyces* autóctonas (Bagheri et al., 2015).

4.7.3. Caracterización química de los vinos

Los resultados del análisis químico de los vinos obtenidos reflejaron el distinto comportamiento en fermentación de las cepas no-*Saccharomyces* mostrando diferencias significativas en todos los parámetros determinados (Tabla 4.43). El grado alcohólico fue más elevado en la fermentación espontánea y en la inoculada con *S. cerevisiae*. Con las levaduras no-*Saccharomyces* se redujo el grado alcohólico de los vinos, principalmente con las cepas *Starm. bacillaris* Sb474 y *T. delbrueckii* Td315. En menor medida disminuyeron el grado alcohólico las cepas *Metschnikowia* Mp278 y *L. thermotolerans* Lt93. Por otro lado, las cepas Sb474 y *Metschnikowia* Mp278 dieron lugar también a vinos con mayor glicerol y acidez volátil. Además, los vinos fermentados con Sb474 presentaron mayor acidez total y tuvieron, por tanto, un pH más bajo, coincidiendo con lo descrito en otros trabajos (Englezos et al., 2016a y 2016b). Con *T. delbrueckii* Td315 se obtuvieron vinos de menor grado que con *S. cerevisiae*, pero con presencia de azúcares y acidez total mayor.

Tabla 4.43. Parámetros químicos básicos de los vinos obtenidos por fermentación de mosto Treixadura con distintas especies de levaduras.

Parámetro	ScXG3	Lt93	Sb474	Td315	Mp278	Esp
Grado alcohólico (%vol.)	14.6±0.1 ^a	14.3±0.0 ^b	13.5±0.1 ^d	13.9±0.1 ^c	14.4±0.1 ^{ab}	14.6±0.1 ^a
Glucosa + fructosa (g/L)	0.6±0.4 ^d	0.3±0.1 ^d	0.2±0.0 ^d	4.8±0.5 ^a	1.7±0.4 ^c	2.7±0.3 ^b
Acidez total (g tart./L)	4.6±0.1 ^c	4.7±0.1 ^c	5.8±0.1 ^a	5.1±0.1 ^b	4.7±0.1 ^c	4.8±0.1 ^c
Acidez volátil (g _{acético} /L)	0.34±0.02 ^c	0.36±0.03 ^c	0.75±0.01 ^a	0.35±0.01 ^c	0.46±0.01 ^b	0.31±0.03 ^c
Ácido Láctico (g/L)	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.1	0.1±0.0	0.1±0.0
Ácido Málico (g/L)	1.7±0.0 ^b	1.7±0.1 ^b	2.1±0.1 ^c	1.6±0.1 ^{ab}	1.4±0.0 ^a	1.7±0.1 ^b
Ácido Tartárico (g/L)	1.1±0.0 ^{ab}	1.2±0.1 ^b	1.0±0.1 ^a	1.1±0.0 ^{ab}	1.1±0.0 ^{ab}	1.1±0.1 ^{ab}
pH (-)	3.46±0.0 ^b	3.46±0.02 ^b	3.42±0.0 ^c	3.49±0.01 ^b	3.53±0.0 ^a	3.48±0.01 ^b
Extracto seco total (g/L)	18.2±0.5 ^a	18.7±0.1 ^a	23.0±0.1 ^c	25.9±0.6 ^d	22.7±0.7 ^c	20.7±0.3 ^b
Glicerol (g/L)	6.2±0.2 ^{cd}	6.6±0.3 ^c	9.3±0.1 ^a	5.6±0.1 ^d	8.0±0.3 ^b	5.9±0.2 ^d
Sulfuroso libre (mg/L)	12.0±1.0 ^a	10.0±0.0 ^b	10.0±0.0 ^b	10.0±0.0 ^b	10.0±0.0 ^b	10.0±0.0 ^b
Sulfuroso total (mg/L)	85.7±3.5 ^{bc}	90.3±0.6 ^{bc}	60.0±0.0 ^a	72.7±3.2 ^{ab}	73.0±14.7 ^{ab}	92.7±3.5 ^c

* Los datos son la media de tres repeticiones ± desviación estándar. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas según Tukey (p < 0.05) para ese parámetro entre los vinos.

Conforme a la cinética fermentativa y en contraposición con lo observado en las fermentaciones con cultivo puro (4.7.1), en nuestro ensayo en la fermentación secuencial con *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae* no consumió todos los azúcares (4.8 g glucosa + fructosa/L); sí lo hicieron *Starm. bacillaris* y *L. thermotolerans* (0.2 y 0.3 g glucosa + fructosa/L, respectivamente). Aunque el grado alcohólico de los vinos obtenidos reflejó la distinta eficiencia de las cepas para producir alcohol, siendo superior incluso el de Td315 (13.9 %vol.) al del vino elaborado con la cepa Sb474, que consumió todos los azúcares (13.5 %vol.). Por otro lado, cabe destacar que, aunque el porcentaje de implantación de la cepa Lt93 fue muy bajo, aun así, generó diferencias en algunos parámetros químicos siendo significativas para el grado alcohólico con respecto a la levadura ScXG3 en cultivo puro.

En un vino son deseables unos niveles altos de glicerol ya que aporta ligeras notas dulces, suavidad y cuerpo. *S. cerevisiae* produce durante la fermentación una cantidad de glicerol que oscila normalmente entre 1 y 10 g/L, con valores medios de 7 g/L (Ciani y Maccarelli, 1998; Scanes et al., 1998; Swiegers et al., 2005). *Starm. bacillaris* puede producir altas concentraciones de glicerol durante la fermentación, hasta 14 g/L en cultivo puro (Ciani y Ferraro, 1998; Englezos et al., 2016a) aunque también se ha encontrado que esta especie puede aportar a los vinos elevadas concentraciones de acetato de etilo, ácido succínico y azufre (Ciani et al., 2010; Fleet et al., 1984; Tofalo et al., 2012). La elevada cantidad de glicerol encontrada en los vinos fermentados con *Starm. bacillaris* se ha explicado como una de las principales consecuencias de su bajo crecimiento y tasa de fermentación; consume fructosa preferentemente a la glucosa (al contrario que *S. cerevisiae*) y es considerada una levadura fructofílica (Di Maio et al., 2012; Magyar y Toth, 2011; Soden et al., 2000). Ciani y Ferraro (1998) encontraron, en un estudio similar (cultivos mixtos de *C. stellata* [reclasificada como *Starm. bacillaris*] y *S. cerevisiae* mediante inoculación secuencial) que en mosto con alta concentración de azúcar (270 g/L), los vinos obtenidos no mostraron azúcar residual debido a la utilización complementaria de fructosa y glucosa por ambas cepas. Esto explicaría el agotamiento de azúcares reductores del vino generado por Sb474 y su mayor cantidad de glicerol. *L. thermotolerans* y *T. delbrueckii* también se han descrito como altamente productoras de glicerol (Comitini et al., 2011; Renault et al., 2009); no obstante, el vino producido con la cepa Td315 tuvo la menor concentración de glicerol. Esto apoyaría la hipótesis de que la producción de glicerol es también cepa dependiente. Además, hay que decir que los valores de glicerol no fueron muy elevados. Los valores obtenidos para las dos cepas que destacaron por su mayor concentración de glicerol, fueron un 34.7% mayores en Sb474 (9.3 g/L) y un 24.1% en Mp278 (8.0 g/L) con respecto a la media del resto de cepas ($\bar{x} = 6.08 \pm 0.20$ g/L). La mayor producción de glicerol, desafortunadamente, suele estar vinculada a una mayor producción de ácido acético (Scanes et al., 1998). Por ello, estas dos cepas Mp278 y Sb474 son las que presentaron mayor acidez volátil, causada mayoritariamente por el ácido acético, que no es deseado a niveles elevados (Ribéreau-Gayon et al., 2000). Sin embargo, las concentraciones de acidez volátil en Sb474 (0.75 g acético/L) y Mp278 (0.46 g acético/L) entran dentro del rango permitido en vinos e influyen en la acidez total del vino, lo cual, puede ser beneficioso. La concentración máxima adecuada de ácido acético está comprendida entre 0.6 g/L y 1.1 g/L en función del tipo de vino y de la acidez total en torno a 5-10 g tartárico/L (Boulton et al., 1996; Ruffner, 1982).

T. delbrueckii produce baja cantidad de ácido acético, acetaldehído y acetato de etilo (Canonico et al., 2016; Renault et al., 2009). Por lo tanto, *T. delbrueckii* es útil en la producción de vinos con alto contenido de azúcar, por ejemplo, derivados de uvas botrizadas (Bely et al., 2008). La concentración de acidez total de Sb474 fue adecuada (5.8 g tartárico/L), y además 1 g tartárico/L mayor con respecto a la media del resto de cepas ($\bar{x} = 4.8 \pm 0.2$ g tartárico/L). Asimismo, Sb474 disminuyó ligeramente el pH del vino con respecto al resto de cepas. Estos datos confirman que *Starm. bacillaris* es capaz de consumir los azúcares obteniéndose vinos con un menor grado alcohólico, mayor acidez total y menor pH que el resto de cepas, de gran importancia para paliar los efectos del cambio climático que afectan a algunas zonas vitícolas (Englezos et al., 2016a y 2017).

En general, los datos obtenidos demuestran la capacidad de las diferentes cepas no-*Saccharomyces* analizadas para influir en los parámetros enológicos clásicos (acidez volátil, acidez total, glicerol, pH, azúcares, etc.) determinantes de la calidad del vino final (Swiegers et al., 2005).

Por todo ello, las cepas autóctonas de levaduras no-*Saccharomyces* han sido utilizadas durante las últimas décadas como cultivos únicos o mixtos en fermentaciones con *S. cerevisiae*. Estas cepas nativas están adaptadas a una región particular cuyo uso tiene una influencia positiva en el perfil del aroma del vino, que refleja la biodiversidad regional con su propia huella (Bokulich et al., 2014; Capozzi et al., 2015; Knight et al., 2015; Tofalo et al., 2016). Por esta razón, los cultivos naturales aplicados como una mezcla autóctona mixta no-*Saccharomyces*/*Saccharomyces* en la vinificación son una herramienta útil como alternativa válida a las fermentaciones espontáneas, capaces de reproducir la biodiversidad del vino, mejorando las características organolépticas y químicas del vino pero minimizando o evitando el riesgo de paradas fermentativas y deterioro por alteración microbiana (Ciani y Comitini, 2015; Grangeteau et al., 2017a; Tofalo et al., 2016). Este hecho ha sido reforzado a nivel de fenotipo-metaboloma por otros trabajos como Knight et al. (2015), Bokulich et al. (2016) y Belda et al. (2017a). Estas prácticas se deben enfocar combinando la complejidad de las fermentaciones espontáneas con la seguridad industrial de fermentaciones monitoreadas, preservando el *terroir* distintivo de cada vino con sus peculiaridades autóctonas (Belda et al., 2017b; Pretorius et al., 1999).

4.7.4. Caracterización aromática de los vinos

Además de los parámetros básicos de los vinos también se determinaron 21 compuestos de las cinco familias principales de aromas fermentativos: alcoholes superiores, acetato de etilo y acetaldehído mediante CG-FID y acetatos de alcoholes superiores, ésteres etílicos de ácidos grasos y ácidos grasos volátiles mediante CG-Masas.

En la Tabla 4.44 y Tabla 4.45 se recogen los descriptores utilizados, el umbral olfativo, la concentración y el OAV de los compuestos mayoritarios de los vinos elaborados con las distintas cepas no-*Saccharomyces*.

Tabla 4.44. Concentración (mg/L) de los compuestos volátiles mayoritarios de los vinos elaborados con cepas no-*Saccharomyces* y la cepa ScXG3 de *S. cerevisiae*. Valor de la actividad aromática (OAV).

Compuesto	Descriptor	Umbral olfativo (mg/L)	Cepa de levadura	Media (mg/L)	Desviación Típica	OAV
<i>Alcoholes superiores, acetato de etilo y acetaldehído</i>						
Metanol	Química, medicamentos	668 ^a	Sb474	33.00	5.20	< 1
			Esp	28.67	2.52	< 1
			Lt93	28.00	1.00	< 1
			Mp278	33.33	4.16	< 1
			Td315	28.67	0.58	< 1
			ScXG3	33.00	1.41	< 1
Propanol	Acre, duro, fruta madura, alcohol	0.83 ^a	Sb474	64.00	4.70	77.11
			Esp	23.71	0.82	28.57
			Lt93	28.20	2.51	33.98
			Mp278	33.58	1.36	40.45
			Td315	28.20	0.61	33.98
			ScXG3	15.99	1.61	19.27
Isobutanol (2-metil-1-propanol)	Vino, solvente, amargo, graso	40 ^a	Sb474	102.48	12.68	2.56
			Esp	61.01	3.12	1.53
			Lt93	57.37	5.79	1.43
			Mp278	133.41	4.36	3.34
			Td315	91.51	8.20	2.29
			ScXG3	47.34	1.63	1.18
1-butanol	Fusel, espirituoso, medicinal, fenólico	150 ^a	ScXG3	1.03	0.33	< 1
2-metil-1-butanol	Whisky, malta, quemado, áspero, esmalte de uñas	30 ^b	Sb474	17.83	2.02	< 1
			Esp	22.10	1.10	< 1
			Lt93	26.23	0.06	< 1
			Mp278	28.32	1.38	< 1
			Td315	24.77	1.29	< 1
			ScXG3	37.12	1.77	1.24
3-metil-1-butanol	Whisky, malta, quemado, áspero, esmalte de uñas	30 ^b	Sb474	162.81	19.13	5.43
			Esp	212.99	8.02	7.10
			Lt93	198.67	5.70	6.62
			Mp278	233.05	89.58	7.77
			Td315	274.17	9.83	9.14
			ScXG3	233.62	1.67	7.79
Acetato de etilo (etanoato de etilo)	Esmalte de uñas, afrutado, piña, disolvente	7.5 ^b	Sb474	26.00	5.29	3.47
			Esp	21.67	2.08	2.89
			Lt93	22.33	2.52	2.98
			Mp278	20.00	0.00	2.67
			Td315	20.00	0.00	2.67
			ScXG3	21.00	1.41	2.80
Etanal (acetaldehído)	Acre, manzana magullada, jerez, nuez	100 ^a	Sb474	46.67	5.51	< 1
			Esp	98.33	2.89	< 1
			Lt93	91.67	14.43	< 1
			Mp278	100.00	0.00	1.00
			Td315	75.33	7.02	< 1
			ScXG3	20.00	0.00	< 1

^aEtiévant, 1991; ^bGuth, 1997.

Tabla 4.45. Concentración ($\mu\text{g/L}$) de compuestos volátiles minoritarios de los vinos de la variedad Treixadura elaborados con las distintas cepas de levaduras no-*Saccharomyces* y la cepa ScXG3 de la levadura *S. cerevisiae*. Valor de la actividad aromática (OAV).

Compuesto	Descriptor	Umbral olfativo ($\mu\text{g/L}$)	Cepa de levadura	Media ($\mu\text{g/L}$)	Desviación Típica	OAV
<i>Acetatos de alcoholes superiores</i>						
A ₂ FET Acetato 2-feniletilo	Rosa, floral, miel, tabaco	250 ^a	Sb474	25	6	< 1
			Esp	285	27	1.14
			Lt93	160	20	< 1
			Mp278	422	44	1.69
			Td315	65	8	< 1
			ScXG3	316	21	1.27
Acetato de isoamilo	Plátano, floral	30 ^a	Sb474	190	20	6.33
			Esp	668	73	22.27
			Lt93	812	68	27.06
			Mp278	1672	230	55.72
			Td315	307	154	10.23
			ScXG3	1138	335	37.93
Acetato de hexilo	Fruta madura, dulce, perfumado	1500 ^b	Sb474	20	0	< 1
			Esp	42	19	< 1
			Lt93	38	10	< 1
			Mp278	13	8	< 1
			Td315	37	5	< 1
			ScXG3	0	0	< 1
<i>Ésteres etílicos de ácidos grasos</i>						
C ₆ C ₂ hexanoato de etilo (caproato de etilo)	Frutal, manzana verde, anís	14 ^c	Sb474	23	33	1.67
			Esp	55	46	3.93
			Lt93	103	37	7.38
			Mp278	215	30	15.36
			Td315	5	12	< 1
			ScXG3	155	72	11.07
C ₈ C ₂ octanoato de etilo	Frutal, pera, manzana, dulzón	5 ^c	Sb474	92	13	18.33
			Esp	187	23	37.33
			Lt93	250	16	50.01
			Mp278	290	213	58.00
			Td315	30	15	6.01
			ScXG3	255	115	51.02
C ₁₀ C ₂ decanoato de etilo	Dulce, afrutado, disolvente	200 ^b	Sb474	27	12	< 1
			Esp	32	8	< 1
			Lt93	42	10	< 1
			Mp278	45	15	< 1
			Td315	90	70	< 1
			ScXG3	121	79	< 1
<i>Ácidos grasos volátiles C₄</i>						
C ₄ Ácido butírico	Rancio, queso, sudor	173 ^c	Sb474	868	22	5.02
			Esp	1282	104	7.41
			Lt93	1278	92	7.39
			Mp278	1488	70	8.60
			Td315	1325	71	7.66
			ScXG3	1249	114	7.22
C ₄ Ácido isobutírico (ácido 2-metilpropanoico)	Rancio, mantequilla, queso	2300 ^b	Sb474	4910	257	2.13
			Esp	2565	233	1.12
			Lt93	2865	301	1.25
			Mp278	1845	141	< 1
			Td315	16023	1235	6.97
			ScXG3	3690	56	1.60

^aGuth, 1997; ^bFerreira et al., 2000; ^cEtiévant, 1991.

Tabla 4.45 (continuación). Concentración ($\mu\text{g/L}$) de compuestos volátiles minoritarios de los vinos de la variedad Treixadura elaborados con las distintas cepas de levaduras no-*Saccharomyces* y la cepa ScXG3 de la levadura *S. cerevisiae*. Valor de la actividad aromática (OAV).

Compuestos	Descriptor	Umbral olfativo ($\mu\text{g/L}$)	Cepa de levadura	Media ($\mu\text{g/L}$)	Desviación Típica	OAV
<i>Ácidos grasos volátiles C₅-C₁₂</i>						
C ₅ Ácido isovalérico (3-metilbutírico)	Ácido, rancio, piña	1000 ^d	Sb474	507	8	< 1
			Esp	702	16	< 1
			Lt93	848	57	< 1
			Mp278	523	48	< 1
			Td315	967	19	< 1
			ScXG3	1062	82	1.06
C ₆ Ácido hexanoico	Geranio, vegetal	420 ^c	Sb474	773	189	1.84
			Esp	850	127	2.02
			Lt93	842	188	2.00
			Mp278	1474	105	3.51
			Td315	510	268	1.21
			ScXG3	929	697	2.21
C ₈ Ácido octanoico	Sudor, queso, hierba fresca	500 ^b	Sb474	943	115	1.89
			Esp	1770	191	3.54
			Lt93	1997	141	3.99
			Mp278	3285	276	6.57
			Td315	590	61	1.18
			ScXG3	2941	360	5.88
C ₁₀ Ácido decanoico	Grasa, rancio	1000 ^c	Sb474	237	50	< 1
			Esp	482	42	< 1
			Lt93	432	19	< 1
			Mp278	1062	31	1.06
			Td315	173	29	< 1
			ScXG3	506	24	< 1
C ₁₂ Ácido dodecanoico	Jabonoso, ceroso	1000 ^e	Sb474	57	10	< 1
			Esp	60	13	< 1
			Lt93	53	8	< 1
			Mp278	155	27	< 1
			Td315	42	4	< 1
			ScXG3	157	76	< 1

^bFerreira et al., 2000; ^cEtiévant, 1991; ^dRomano et al., 2008. ^eFrancis y Newton, 2005.

El análisis mediante CG-FID y CG-MASAS de los vinos mostró diferencias significativas en 17 de los 21 compuestos analizados; el resultado del test de Duncan obtenido para cada parámetro analizado, así como los valores medios, la desviación estándar y el nivel de significación de la prueba ANOVA para el factor cepa en las dieciocho muestras analizadas se recogen en la Tabla 4.46. Tres alcoholes superiores y todos los compuestos aromáticos volátiles de las familias acetatos, ácidos y ésteres analizados mostraron diferencias significativas entre los vinos de las distintas cepas estudiadas. Estos compuestos volátiles se encuentran comúnmente en los vinos y derivan de la cepa de levadura en fermentación y del proceso de vinificación (Swiegers et al., 2005; Blanco et al., 2013). Solo el compuesto hexanoato de etilo para los vinos elaborados con las cepas Td315 y Sb474 mostró una desviación estándar σ más alta que su valor medio. No hubo una gran desviación típica entre el resto de las concentraciones de los compuestos aromáticos por lo que puede afirmarse que las tres réplicas de cada vino elaborado con cada inoculación secuencial de las diversas cepas no-*Saccharomyces* fueron homogéneas.

Tabla 4.46. Concentración de los compuestos volátiles determinados (media, \bar{X} y desviación típica, σ) en los vinos elaborados con distintas cepas no-*Saccharomyces* y significación de acuerdo a ANOVA de una vía.

Compuestos	Sb474		Esp		Lt93		Mp278		Td315		ScXG3		Sig.
	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	
<i>Alcoholes superiores (mg/L)</i>													
Metanol	33.00	5.20	28.67	2.52	28.00	1.00	33.33	4.16	28.67	0.58	33.00	1.00	ns
Propanol	64.00a	4.70	23.71d	0.82	28.20c	2.51	33.58b	1.36	28.20c	0.61	15.99e	1.14	***
Isobutanol (2-metil-1-propanol)	102.48b	12.68	61.01c	3.12	57.37cd	5.79	133.41a	4.36	91.51b	8.20	47.34d	1.15	***
2-metil-1-butanol	17.83e	2.02	22.10d	1.10	26.23bc	0.06	28.32b	1.38	24.77c	1.29	37.12a	1.26	***
3-metil-1-butanol	162.81b	19.13	212.99ab	8.02	198.67b	5.70	233.05ab	89.58	274.17a	9.83	233.62ab	1.18	ns
∑alcoholes superiores	347.03bc	33.58	319.81c	7.67	307.00c	7.81	428.36a	92.20	418.67ab	11.06	335.10c	2.66	*
<i>Acetaldehído (etanal)(mg/L)</i>													
Acetaldehído (etanal)(mg/L)	46.67c	4.92	98.33a	2.58	91.67a	12.91	100.00a	0.02	75.33b	6.28	20.01d	0.03	***
<i>Acetato de etilo (etanoato de etilo) (mg/L)</i>													
Acetato de etilo (etanoato de etilo) (mg/L)	26.00a	4.73	21.67ab	1.86	22.33ab	2.25	20.00b	0.01	20.00b	0.02	21.00b	0.76	ns
<i>Acetatos de alcoholes superiores (µg/L)</i>													
Acetato 2-feniletilo	25e	5	285b	27	160c	20	422a	44	65d	8	316b	21	***
Acetato de hexilo	20b	0	42a	19	38a	10	13b	8	37a	5	0c	0	***
Acetato de isoamilol	190d	20	668c	73	812c	68	1672a	233	307d	5	1138b	335	***
∑acetatos	235a	16	995b	104	1010b	68	2107c	272	410a	155	1454b	640	***
<i>Ésteres (µg/L)</i>													
Hexanoato de etilo	23e	33	55d	18	103c	12	215a	30	5e	12	155b	41	***
Octanoato de etilo	92e	13	187d	23	250c	15	290a	5	30f	15	255b	50	***
Decanoato de etilo	27d	12	32cd	8	42c	10	45c	15	90a	5	121b	13	***
∑ésteres	142a	35	273ab	58	395bc	49	550c	246	125a	90	531c	217	***
<i>Ácidos (µg/L)</i>													
Ácido butírico	868d	22	1282bc	104	1278bc	92	1488a	71	1325b	71	1249c	66	***
Ácido isobutírico	4910b	257	2565d	233	2865d	301	1845e	141	16023a	1235	3690c	66	***
Ácido hexanoico	773c	24	850c	127	842c	188	1474a	105	510d	50	929b	35	***
Ácido isovalérico	507e	8	702d	16	848c	57	523e	48	967b	19	1062a	31	***
Ácido octanoico	943d	114	1770c	191	1997c	146	3285a	276	590e	61	2941b	426	***
Ácido decanoico	237d	50	482c	42	432c	19	1062a	31	173d	29	506b	131	***
Ácido dodecanoico	57b	10	60b	13	53b	8	155a	27	42b	4	157a	86	***
∑ácidos cadena corta C4-C5	6285c	261	4548b	338	4992b	449	3857a	251	18315d	1299	6000c	216	***
∑ácidos cadena media-larga C6-C12	2010b	322	3162c	350	3342c	196	5987e	253	1145a	314	4580d	830	***
∑ácidos	8295a	235	7710a	325	8315a	471	9843b	175	19460c	1436	10580b	807	***

Valores con diferentes letras minúsculas (a-f) en la misma fila tienen diferencias significativas de acuerdo al test de Duncan ($p < 0.05$). Las notaciones, * y *** indican diferencias significativas entre las diferentes cepas de levadura a $p < 0.05$ y $p < 0.001$, respectivamente. La notación ns indica que no existen diferencias significativas a $p < 0.05$.

Esto significa que el perfil volátil de los vinos es muy estable para todas las cepas no-*Saccharomyces* utilizadas (Vilanova et al., 2010b). Además, puesto que el 85% de los volátiles mostraron diferencias significativas en la prueba ANOVA casi en su totalidad con un nivel de significación $p < 0.001$ y una amplia variación en el test de Duncan, también puede afirmarse que el efecto de las cepas de diferentes especies es muy importante sobre los aromas fermentativos. Así mismo, la respuesta de cada cepa en cuanto a la concentración de los distintos compuestos no puede ser atribuida a la variedad de uva o composición del mosto, ya que era el mismo. La Figura 4.67 representa los principales grupos de compuestos volátiles analizados. Las cepas ScXG3 y *M. pulcherrima* Mp278 presentaron un contenido mayor de acetatos, ésteres y ácidos grasos de cadena larga. Estos datos confirman el potencial de estas levaduras en la potenciación del aroma del vino (Blanco et al., 2014d; Canonico et al., 2016; Gobbi et al., 2013; Liu et al., 2017; Varela et al., 2016). Por otra parte, en este ensayo, *T. delbrueckii* Td315 dio lugar a una elevada concentración de ácido isobutírico en el vino.

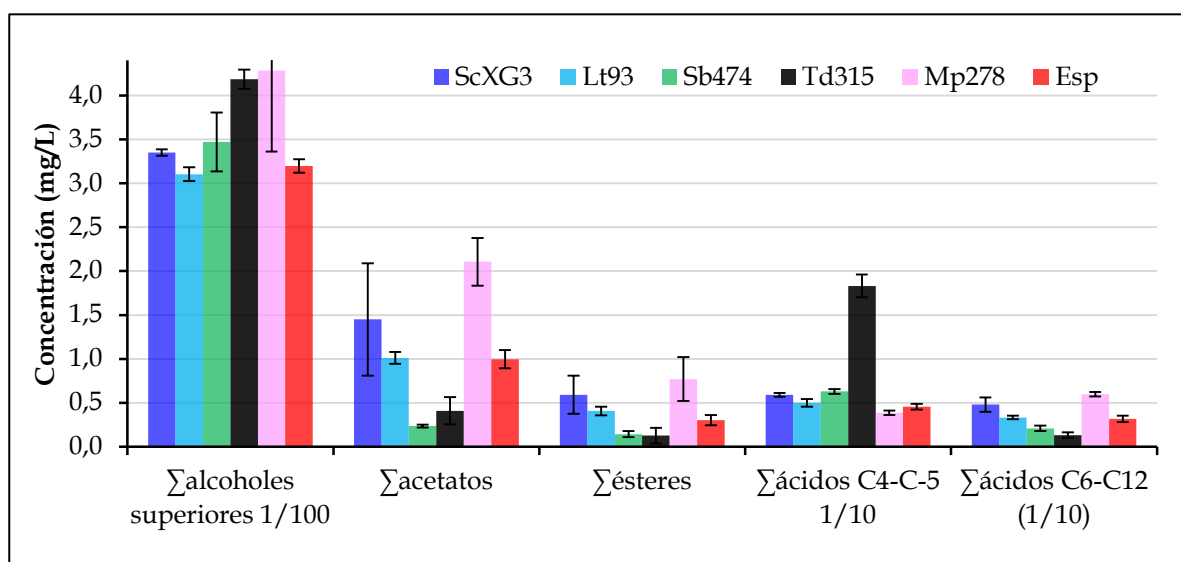


Figura 4.67. Concentración de los principales grupos de aromas fermentativos en los vinos elaborados con distintas levaduras.

Los compuestos seleccionados para su análisis son responsables del aroma secundario en el vino. La mayoría se producen durante la FA por las levaduras responsables del proceso, aunque su concentración depende de varios factores. En nuestro estudio, la temperatura de fermentación, el grado de aireación, el nitrógeno y el contenido de azúcar del mosto fueron los mismos. Sin embargo, variaciones en estos y otros parámetros utilizando las mismas levaduras podrían ser estudiados para encontrar nuevas relaciones o diferencias (Hansen et al., 2001; Lambrechts y Pretorius, 2000; Molina et al., 2007; Sadoudi et al., 2012).

Los resultados recogidos en la Tabla 4.44 y en la Tabla 4.45 muestran que 15 de los 21 compuestos volátiles cuantificados alcanzaron una concentración por encima del umbral de olor ($OAV > 1$) en al menos una cepa de levadura; además, 12 y 8 compuestos alcanzaron una concentración por encima del umbral de olor en al menos tres y/o en todas las seis cepas estudiadas. Estos volátiles son, por lo tanto, potenciales contribuyentes al

aroma global del vino. De entre los compuestos aromáticos volátiles para todos los vinos, los OAV más altos fueron exhibidos por el octanoato de etilo (aroma frutal, manzana) y acetato de isoamilo (aroma de plátano), ambos en el vino elaborado con la cepa Mp278 (OAV = 58.00 y 55.72, respectivamente). En cuanto a los alcoholes superiores, los vinos elaborados con la cepa Sb474 produjeron la mayor concentración del compuesto propanol (64 mg/L; OAV = 77.11), con efectos sinérgicos que refuerzan el aroma afrutado a concentraciones comprendidas en el intervalo 11-68 mg/L (Conde González et al., 2010; Cortés-Diéguez et al., 2015).

Los alcoholes superiores y ésteres, producidos durante la FA, juegan un papel importante en el sabor de los vinos (Nykänen, 1986). Dependiendo del tipo de compuesto y concentración, algunos alcoholes superiores son reconocidos por sus notas herbáceas (Gomez-Miguez et al., 2007). Los compuestos con notas positivas, ésteres y acetatos, presentaron mayor concentración en los vinos elaborados mediante inoculación secuencial con Mp278, y en menor medida en el vino obtenido con cultivo puro de ScXG3 y en los vinos resultantes de inoculación secuencial de Lt93 y la fermentación espontánea. Td315 produjo la mayor concentración de ácidos volátiles y alcoholes superiores, de estos últimos junto con el vino de ScXG3.

De acuerdo con la bibliografía (Belda et al., 2017a), en todos los vinos se encontraron concentraciones totales de alcoholes superiores y acetato de etilo consideradas como normales en vinos de calidad (140- 420 mg/L): metanol, 43-320 mg/L; 1-propanol, 11-68 mg/L; 1-butanol, 0.5-2.3 mg/L; isobutanol, 9-148 mg/L y acetato de etilo (41-180 mg/L); (Conde González et al., 2010; Etiévant, 1991; Large, 1986).

Los alcoholes superiores (1-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol) no presentan por si mismos un aroma agradable (con descriptores como alcohólico, hidrocarburos, químico...), pero en concentraciones moderadas (< 350 mg/L), como las encontradas en la mayor parte de los vinos del presente estudio, refuerzan el aroma del vino contribuyendo a su complejidad (Rapp y Versini, 1991; Ribéreau-Gayon et al., 1976). Los alcoholes evolucionan poco en el tiempo, aunque pueden aumentar débilmente debido a la hidrólisis de sus acetatos (Dubois, 1994). Los compuestos 1-propanol, isobutanol (2-metil-propanol) y 3-metil-butanol fueron los alcoholes superiores más abundantes y se consideran muy importantes en el aroma del vino (Cortés-Diéguez et al., 2015).

Las cepas Mp278 y Td315 produjeron la mayor concentración de **alcoholes superiores** totales (428.36 y 418.67 mg/L, respectivamente). Estas concentraciones, aunque están dentro de los valores normales, superan el valor de 300 mg/L considerado como máximo deseable. Sin embargo, no fue determinante en la valoración de la calidad global por los catadores en el caso de Mp278 que fue la mejor puntuada mientras que Td315 obtuvo la peor valoración; ambas presentaron elevadas concentraciones de isobutanol y 3-metil-1-butanol. Los compuestos propanol, isobutanol (2-metil-1-propanol), 2-metil-1-butanol y etanal (acetaldehído) mostraron diferencias significativas entre los vinos. La cepa Mp278 presentó mayor concentración de isobutanol, mientras que Td315 presentó la mayor concentración de 3-metil-1-butanol y las cepas Sb474 y ScXG3 las mayores concentraciones de propanol y 2-metil-1-butanol, respectivamente. *L. thermotolerans* y *Starm. bacillaris*, entre

otras especies, han sido descritas como productoras de elevadas concentraciones de alcoholes superiores tanto en cultivo puro como en fermentaciones mixtas con *S. cerevisiae* (Jolly et al., 2014). En cuanto a *T. delbrueckii*, los resultados son contradictorios a este respecto, dependiendo de la cepa y del protocolo de inoculación utilizado (Belda et al., 2017a; Comitini et al., 2011). No obstante, se desconoce si la diferencia en la concentración de alcoholes superiores se debe al metabolismo no-*Saccharomyces*, a las modificaciones de la regulación metabólica de *S. cerevisiae* (debido a su coexistencia), o a una suma de ambos factores (Jolly et al., 2014).

Otra importante fracción del volátil cuantificado fue contabilizada por los ácidos, destacando el ácido octanoico especialmente en los vinos generados por las cepas mejor valoradas como Mp278. Las concentraciones de los ácidos hexanoico e isobutírico fueron similares a las encontradas anteriormente para otras variedades autóctonas de Galicia de uva blanca (Vilanova et al., 2010a y 2010b) y tinta (Cortés-Diéguez et al., 2015). Ácidos como el hexanoico, octanoico y decanoico son ácidos grasos de cadena media (C₆-C₁₀) que pueden aportar aromas indeseables a mantequilla o queso (Francis y Newton, 2005); sin embargo, este impacto negativo sobre la calidad del vino solo se produce a concentraciones de 20g/L (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Por otra parte, hay que decir que, aunque las concentraciones de estos ácidos estuvieron muy por debajo de la concentración a la que se vuelven desagradables, la concentración de los ácidos hexanoico y octanoico estuvo presente a niveles por encima de su umbral de percepción. Además, en pequeñas cantidades, contribuyen al equilibrio aromático del vino, ya que contrarrestan la hidrólisis de sus ésteres (Swiegers et al., 2005).

Patrignani et al. (2017) observaron que moléculas como el éster etílico del ácido hexanoico y el acetato de etilo contribuyeron al agrupamiento de vinos biodinámicos, mientras que el 3-metilpropanol y el éster etílico del ácido decanoico agruparon el vino ecológico obtenido a través de fermentaciones espontáneas. Sus resultados mostraron además que la composición del vino se vio principalmente afectada por el proceso de vinificación y luego por el manejo de la uva. Esto apoya la idea de que una calidad no óptima del vino elaborado bajo vinificación ecológica no está asociada al sistema de cultivo.

Entre los **acetatos** y **ésteres** de etilo, los compuestos cuantitativamente más importantes fueron el acetato de isoamilo, el acetato 2-feniletilo y el octanoato de etilo. Algunos autores encontraron también que los ésteres etílicos octanoato de etilo y el hexanoato de etilo tenían el OAV más alto en vinos blancos jóvenes (Escudero et al., 2004; Gomez-Miguez et al., 2007; López et al., 2003). Los ésteres, generados principalmente por las levaduras durante la fermentación, contribuyen favorablemente al aroma del vino con notas afrutadas (Pretorius y Lambrechts, 2000). La cepa ScXG3 presentó valores muy similares de acetato de isoamilo (1.04 mg/L) y superiores de acetato 2-feniletilo (0.32 mg/L) a los encontrados por Vilanova et al. (2010a) en vinos de la misma variedad Treixadura (1.03 mg/L y 0.14 mg/L, respectivamente) fermentada con una cepa comercial de *S. cerevisiae*. Estos valores fueron aún mayores en los vinos obtenidos con la cepa mejor valorada Mp278 (1.67 mg/L) y, en algunos ésteres y acetatos, también en los vinos de fermentación espontánea y elaborados con Lt93. También fueron mayores cuando se

compararon con el resto de variedades de cultivo tradicional de Galicia (Vilanova et al., 2010a). Blanco et al. (2013) encontraron concentraciones similares de acetato 2-feniletilo en sus estudios previos sobre ScXG3 y otras cepas de *S. cerevisiae* autóctonas; sin embargo, obtuvieron concentraciones mayores de los acetatos de hexilo e isoamilo. El acetato de isoamilo presentó un OAV alto, con la mayor concentración en los vinos de las cepas Mp278, Lt93, ScXG3 y fermentación espontánea como también encontraron otros autores (Gobbi et al., 2013; Liu et al., 2017; Varela et al., 2016); sin embargo, Mp278 duplicó la concentración de estas últimas que tuvieron una concentración similar en torno a 0.75 mg/L. El acetato de isoamilo, que confiere aroma a plátano, se halló por encima de su umbral en todas las muestras y en algunos vinos en concentraciones elevadas. Esto indica que este compuesto también contribuyó al aroma afrutado general de los vinos de Treixadura, como ya había descrito Vilanova et al. (2010a). De entre los vinos elaborados con no-*Saccharomyces*, destacaron sobre los demás el vino fermentado con la cepa Mp278, en el cual se cuantificó el doble OAV = 55.72 que en el resto. Los vinos fermentados con las cepas que mostraron una menor concentración de acetato de isoamilo fueron Sb474 y Td315.

El acetato 2-feniletilo, que confiere aroma floral por encima de 0.25 mg/L (Guth, 1997), se encontró a concentraciones ligeramente superiores al nivel de detección en los vinos elaborados con las cepas Mp278, ScXG3 y en la fermentación espontánea (OAV = 1.69, 1.27 y 1.14 respectivamente). Tofalo et al., también describieron una el En el resto de cepas no había una concentración suficiente para alcanzar el umbral de detección, al igual que ocurrió con acetato de hexilo en el que ninguna cepa presentó una concentración destacable. Los acetatos se producen durante la fermentación, pero su contenido también se ha correlacionado con la variedad de uva empleada (Simpson, 1979). En este estudio con Treixadura la mayoría de las cepas autóctonas produjeron concentraciones de acetato de isoamilo más elevadas que las recogidas en otros estudios para otras variedades blancas y tintas de uva gallegas como Albariño, Loureira, Mencía o Torrentés, aunque la del acetato 2-feniletilo fuera similar (Vilanova et al., 2010a; Cortés-Diéguez et al., 2015).

Por otro lado, si los ésteres volátiles están presentes en cantidades demasiado altas, pueden enmascarar aromas varietales, disminuyendo la complejidad del vino (los vinos que contienen más de 90 mg/L de acetato de etilo o 200 mg/L de ésteres totales se consideran defectuosos (Belda et al., 2017a). El acetato de etilo se forma por las levaduras durante la fermentación, y normalmente se encuentra en concentraciones bajas, excepto en el caso de levaduras de tipo oxidativo. Su umbral de reconocimiento olfativo es de 150 mg/L, y según Ribéreau-Gayon et al. (1976) por encima de este umbral es muy negativo en el aroma, mientras que entre 50-80 mg/L puede ser favorable. En todas las cepas analizadas, la concentración de **acetato de etilo** fue inferior a 30 mg/L. Esto puede indicar además que las fermentaciones se realizaron en ausencia de bacterias alterantes, ya que cuando en su origen intervienen bacterias los niveles de acetato de etilo se incrementan. Los resultados sugieren que todas las cepas estudiadas son levaduras débilmente esterógenas, ya que formaron de 20 a 30 mg/L de acetato de etilo al abrigo del aire, lo que indica un potencial de mejora aromática (Rojas, 2003).

Los ésteres etílicos de ácidos grasos de cadena corta son unos de los compuestos volátiles más importantes en el vino. Su concentración depende de varios factores, como la

cepa de levadura, la temperatura de fermentación, la aireación y el contenido de azúcar (Perestrelo et al., 2006). Considerando que la aireación, contenido en azúcar y la temperatura de fermentación de 16 °C fueron óptimos para la formación y conservación en el vino su concentración puede atribuirse en gran medida a la influencia de la cepa de levadura (Killian y Ough, 1979; Molina et al., 2007). Los ésteres resultan de la combinación de alcoholes y ácidos orgánicos, y al igual que los acetatos aportan aromas afrutados y florales, pero son más aromáticos que los compuestos de los que proceden y que los aldehídos.

Se cuantificaron tres **ésteres etílicos** con diferencias significativas entre las levaduras, dos de ellos presentes en concentraciones muy altas que aportaron aromas frutales y a manzana. Las concentraciones de los tres ésteres de etilo analizados fueron inferiores a las encontradas por otros autores en la misma y otras variedades tradicionales de uva blanca de Galicia fermentados con cepas de *S. cerevisiae* autóctonas (incluida ScXG3) (Blanco et al., 2013) y comerciales (Vilanova et al., 2010a). Aun así, el hexanoato de etilo contribuyó directamente con notas afrutadas (manzana) al aroma de cuatro vinos, debido a que estuvo presente en concentraciones muy superiores al valor umbral de 0.014 mg/L (Etiévant, 1991). Las cepas Mp278, ScXG3 y Lt93 produjeron la mayor concentración de hexanoato de etilo (OAV = 15.36, 11.07 y 7.38, respectivamente) y de octanoato de etilo (OAV = 58, 51 y 50, respectivamente). Se sabe que *M. pulcherrima* produce altas concentraciones de ésteres (Bisson et al., 2017; Rodríguez et al., 2010; Sadoudi et al., 2012), especialmente el éster asociado al aroma de pera, octanoato de etilo (Lambrechts y Pretorius, 2000; Capozzi et al., 2015; Clemente-Jiménez et al., 2004). Por el contrario, la cepa Td315 produjo una concentración inferior al umbral de detección (OAV < 1) para el compuesto hexanoato de etilo y más de nueve veces inferior a las cepas de mayor concentración anteriormente citadas para el octanoato de etilo (OAV = 6). El decanoato de etilo se encontró en concentración inferior al umbral de detección en todas las cepas; sin embargo, fueron las cepas Td315 y ScXG3 las que presentaron una mayor concentración de este compuesto. Se comprueba, como muestra la literatura científica que, en general, las cepas no-*Saccharomyces* estudiadas pueden mejorar el perfil aromático de los vinos (Ciani et al., 2010).

Los **ácidos volátiles** como isobutírico, butírico o isovalérico tienen descriptores como "queso" y "rancio" (Francis y Newton, 2005), por lo que son compuestos indeseables en elevada concentración. Los ácidos, como el ácido isobutírico y el ácido decanoico, no están asociados con la calidad del vino, pero juegan un papel importante en la complejidad del aroma. De los siete ácidos cuantificados en el estudio, todos mostraron diferencias significativas entre los vinos, encontrándose las concentraciones más altas en los ácidos butírico e isobutírico. Este último especialmente en la cepa Td315, la cual, sin embargo, mostró una baja concentración del resto de ácidos en comparación con las demás cepas. Los ácidos butírico, isobutírico, isovalérico y decanoico variaron significativamente entre las muestras; sin embargo, el ácido isovalérico junto con el decanoico y dodecanoico se encontraron por debajo del umbral de detección (OAV < 1) en todas las muestras. Las concentraciones de ácido butírico fueron similares a las encontradas por Blanco et al. (2013) en vinos fermentados con ScXG3. Los ácidos butírico e isobutírico son indicativos del deterioro del vino y generalmente implican actividad bacteriana (Cortés-Diéguez et al.,

2015). La depreciación sensorial obtenida en la cata de los vinos elaborados con las cepas Td315 y Sb474 con altas concentraciones principalmente de ácido isobutírico que podría ser debida a un deterioro no atribuible a las levaduras (quizás debido al proceso y dimensión de la vinificación). Sin embargo, la cepa Sb474 tuvo la menor concentración de ácido butírico, similar a las concentraciones encontradas por otros autores en la misma y otras variedades gallegas (Vilanova et al., 2010a). Se puede sugerir por tanto que nuevos estudios utilizando las mismas cepas pudieran presentar concentraciones inferiores de estos ácidos y una mejor valoración. Además, durante el almacenamiento o un envejecimiento más prolongado de los vinos, los ácidos podrían esterificarse con los alcoholes superiores e incrementar el aroma afrutado. La cepa Mp278 destacó sobre las demás con mayor concentración de los ácidos hexanoico, octanoico y decanoico, este último con un valor muy próximo al umbral de detección.

Cuatro ácidos mostraron OAV > 1. Los ácidos grasos de menos de 5 átomos de carbono influyen negativamente en la calidad aromática. No obstante, los de cadena más larga (como el ácido hexanoico o el ácido octanoico encontrados en todas las cepas y con mayor concentración en los vinos elaborados con Mp278 y ScXG3) presentan aromas vegetales y herbáceos; aunque debido a su baja concentración apenas participan en el aroma de los vinos, son importantes por su participación en reacciones de hidrólisis para la formación de los correspondientes ésteres (Dubois, 1994). Por otro lado, Romano et al. (2008) encontraron como umbrales de percepción de los ácidos isobutírico e isovalérico (2.8 y 3.1 mg/L respectivamente) mayores que en la literatura convencional y aun así fueron más bajos que las cantidades encontradas en la mayoría de los vinos, lo que sugiere que estos valores podrían depender de la complejidad del vino.

De los **aldehídos** formados durante la fermentación el principal es el acetaldehído o etanal, cuya concentración debe mantenerse en los niveles más bajos posibles. Es el compuesto de carbonilo de vino volátil más importante y puede formarse biológicamente a través de la actividad de la levadura, pero también químicamente por oxidación del vino. Es una molécula pequeña, altamente reactiva con aroma a nuez, hierba verde o similar a manzana, muy volátil y activa del sabor (Nykänen, 1986). Todas las cepas se mantuvieron por debajo del umbral de percepción de 100 mg/L, con diferencias entre cepas; los vinos elaborados con Mp278 presentaron la mayor concentración de etanal (100 mg/L), mientras que en los fermentados con la cepa ScXG3 se encontró la menor concentración (20 mg/L). Esto indica que los vinos no se oxidaron y las diferencias pueden ser atribuidas al efecto de las levaduras. El acetaldehído es uno de los compuestos de unión de SO₂ más relevantes (el acetaldehído representa típicamente el 75% del SO₂ en los vinos blancos). Esto podría indicar además que las elaboraciones con las cepas Mp278 y Lt93 de mayor producción de etanal junto con la fermentación espontánea requerirían mayor concentración de SO₂ antes del embotellado. Por otro lado, las concentraciones más altas de acetaldehído están formadas por el metabolismo de las levaduras al principio de la FA. Después de alcanzar un valor máximo, el acetaldehído se vuelve a utilizar. Las cantidades producidas son variables (10-75 mg/L) y están afectadas por condiciones de la fermentación, la levadura dominante y la cepa (Swiegers et al., 2005). Pero es independiente de la cantidad de biomasa producida y en muchos casos, una cepa de levadura con la población más alta no es necesariamente una con la mayor producción de acetaldehído.

La elección de la cepa debe aunar los beneficios de ambos comportamientos, fermentativo-fenotípico y sensorial que no siempre están relacionados, especialmente en procesos fermentativos dirigidos que puedan ser de utilidad a escala de bodega industrial.

Los ACP facilitan la interpretación del análisis multivariante de reducción de datos y permiten identificar los compuestos volátiles y los descriptores que discriminaron mejor entre los vinos elaborados con distintas cepas no-*Saccharomyces*. Los ACP realizados sobre la concentración de los 12 compuestos aromáticos volátiles analizados en vinos con OAV > 1 con respecto a las diferentes cepas de levadura se recogen en las Figura 4.68 y Figura 4.69. Los altos porcentajes de variabilidad de los dos primeros componentes principales CP1 y CP2 (explican un 97.98% para alcoholes superiores y 87.23% para los compuestos aromáticos volátiles de la varianza total), aseguraron el éxito de los ACP, es decir, los mapas a partir de los dos primeros factores son una proyección de muy buena calidad. En cuanto a los alcoholes superiores (Figura 4.68), la mayor parte de ellos se concentraron en la parte positiva del primer componente (CP1). Para el segundo componente principal (CP2), el propanol e isobutanol mostraron valores altos positivos y el 3-metil 1-butanol valores negativos. Los diferentes vinos se distribuyeron entre los diferentes cuadrantes: Sb474 en el cuadrante 1 (caracterizado por una mayor concentración de propanol), Mp278 en el cuadrante 2 (mayor concentración de isobutanol y alcoholes superiores totales), Td315 en el tercer cuadrante (mayor concentración de 3-metil 1-butanol) mientras que el resto de vinos elaborados con las distintas cepas se agruparon en el cuarto cuadrante. Soden et al. (2000) también encontraron un alto aroma de acetato de etilo, concentraciones más altas de glicerol y ácido succínico, y una menor concentración de etanol que *S. cerevisiae* en fermentaciones mixtas *Starm. bacillaris/S. cerevisiae*. Los alcoholes superiores 3-metil 1-butanol e isobutanol están lejos del centro y son ortogonales, por lo que no están correlacionados. En cuanto a los compuestos minoritarios (Figura 4.69), el primer componente (CP1) se caracterizó por niveles altos de acetato 2-feniletilo, acetato de isoamilo, octanoato de etilo y ácido octanoico. Para el segundo componente principal (CP2), ácido butírico e isobutírico mostraron valores altos, positivos y negativos respectivamente.

Los resultados mostraron una separación clara entre los vinos elaborados con las distintas cepas. Los vinos obtenidos con la cepa Mp278 están alejados del resto en el cuadrante 2 donde el biplot señala las concentraciones más elevadas de acetatos. Los vinos elaborados con la cepa ScXG3 se distribuyeron en el área con mayor concentración de acetatos y ésteres, principalmente en el cuadrante 3. Los vinos de la cepa Lt93 y la fermentación espontánea se distribuyeron en la zona central mientras que los vinos elaborados con Sb474 y Td315 permanecieron en cuadrantes diferentes entre sí y entre los demás, alejados de los biplot correspondientes a compuestos deseables como ésteres y acetatos. Los compuestos aromáticos volátiles ácido octanoico, acetato de isoamilo y ácido isobutírico también están lejos del centro, sin embargo, los dos primeros están próximos uno al otro por lo que están positivamente correlacionados y no están correlacionados con el ácido isobutírico. El resto de compuestos están próximos al centro, y alguna información es transportada a otros ejes, por lo que cualquier interpretación podría resultar incorrecta.

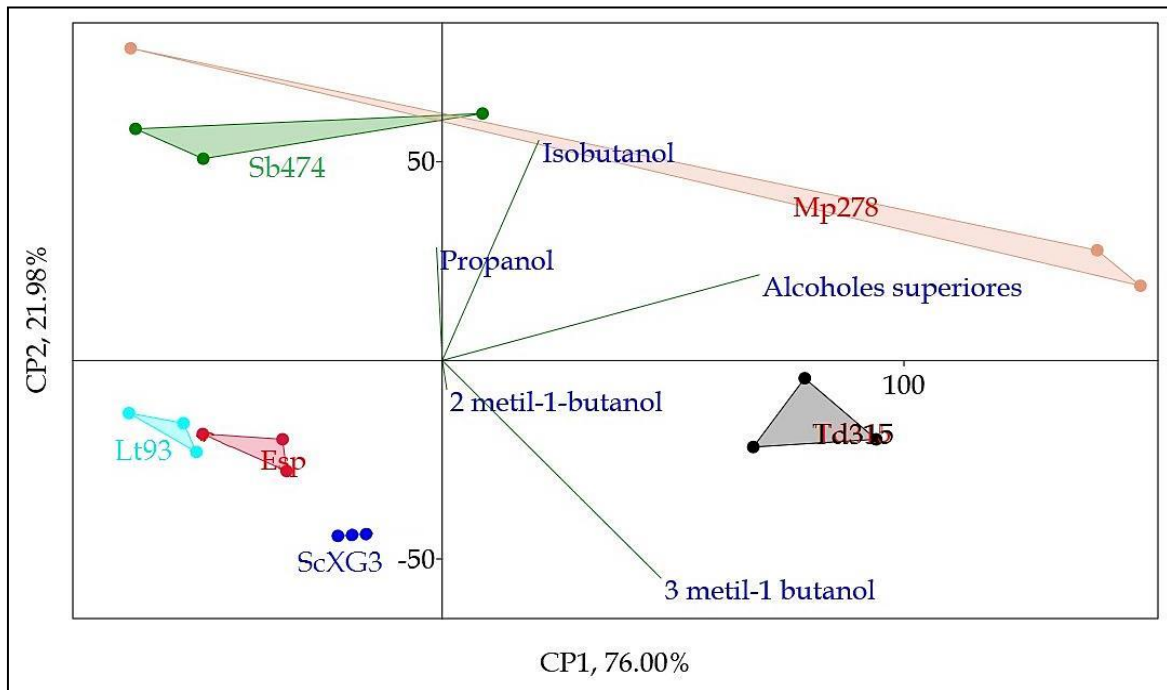


Figura 4.68. ACP de alcoholes superiores en vinos elaborados con distintas cepas autóctonas de no-*Saccharomyces*.

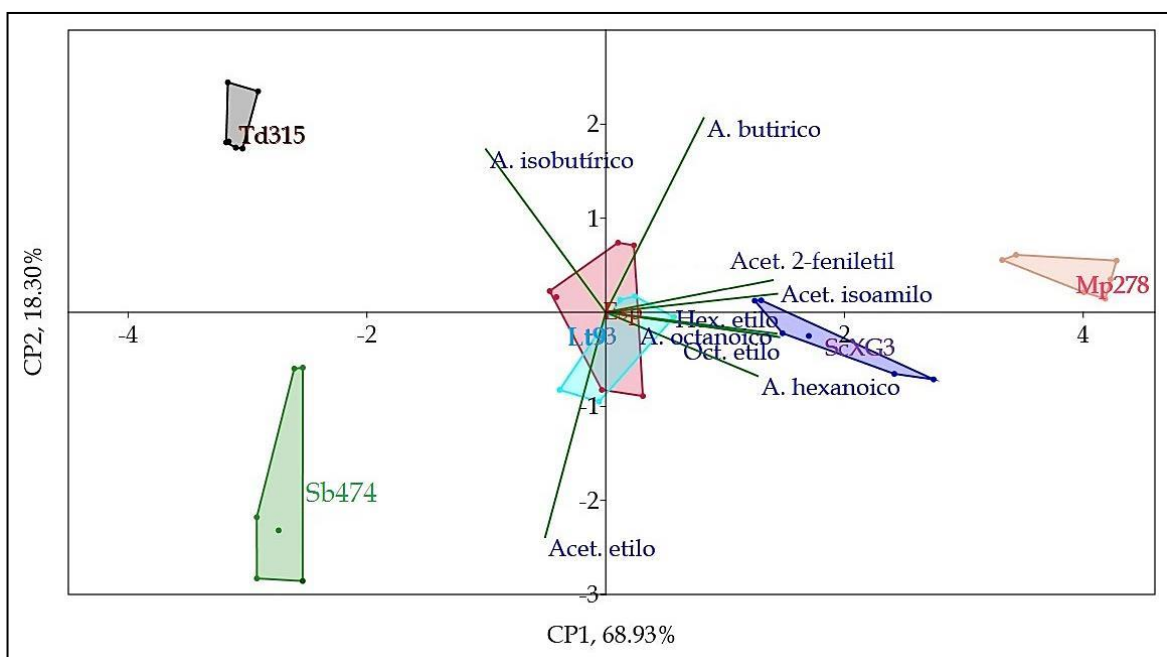


Figura 4.69. ACP de compuestos aromáticos volátiles con OAV > 1 de vinos elaborados con distintas cepas autóctonas no-*Saccharomyces*.

Los ACP y el ACoP de la Figura 4.70 confirman la agrupación de los vinos Mp278-ScXG3, Lt93-Esp, Sb474 y Td315 en diferentes cuadrantes.

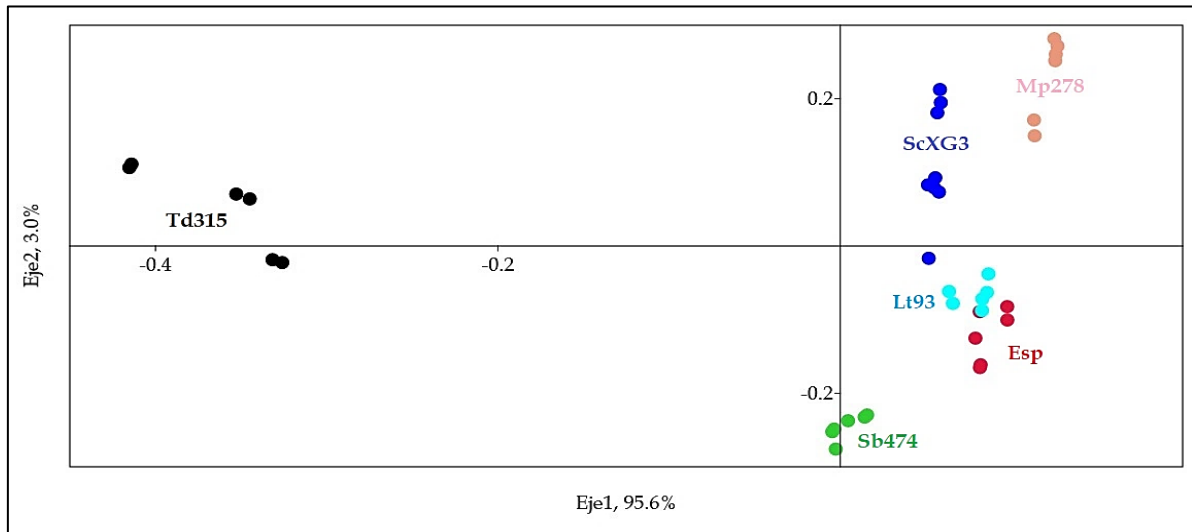


Figura 4.70. ACoP del conjunto de compuestos volátiles de los vinos elaborados con las distintas cepas autóctonas no-*Saccharomyces* y *S. cerevisiae* ScXG3.

4.7.5. Evaluación sensorial de los vinos

En el perfil sensorial destacó el vino elaborado con la cepa Mp278. El vino elaborado con la cepa de *S. cerevisiae* ScXG3 en cultivo puro, obtuvo mayor puntuación a nivel global y en intensidad aromática, con mayores notas afrutadas (a fruta de pepita) y florales que los demás, y fue menos amargo en boca (Figura 4.71A). Sin embargo, fue más apreciado el vino elaborado con la cepa Mp278 (Figura 4.72B).

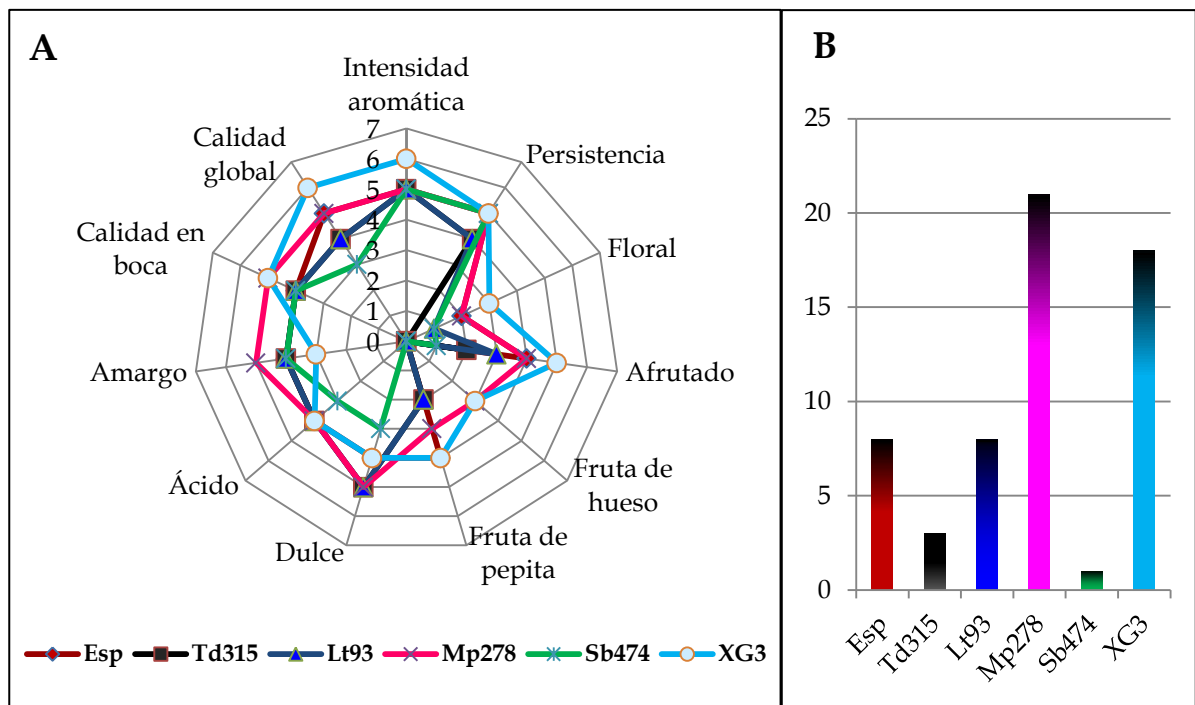


Figura 4.71. A) Perfil sensorial de los vinos Treixadura elaborados con distintas especies de levaduras; B) Preferencia de los catadores por los vinos.

Otros autores también obtuvieron puntuaciones de calidad superior a los vinos control (obtenidos por fermentación con *S. cerevisiae*) en vinos fermentados secuencialmente con *M. pulcherrima* y *S. cerevisiae* de otras variedades de uva blanca (Jolly et al., 2003b; Liu et al., 2017; Rodríguez et al., 2010; Varela et al., 2016). Ambos, que habían mostrado mayor contenido en ésteres y acetatos, fueron los vinos mejor valorados. Los vinos resultantes de la fermentación con Lt93 y espontánea también fueron apreciados, mientras que los dos restantes (Sb474 y Td315) solo fueron elegidos entre los tres primeros por uno o dos catadores, respectivamente.

Puesto que no se realizaron tratamientos de filtración o estabilización los descriptores visuales se omitieron en la cata por considerarse propios del proceso de vinificación y no por la influencia de las cepas para evitar así posibles variaciones en la calidad global o preferencia.

En aroma, la fermentación pura con la cepa *S. cerevisiae* ScXG3 presentó la mayor valoración en los descriptores intensidad y floral. La fermentación espontánea, y los vinos elaborados con ScXG3 y la inoculación secuencial con Mp278 presentaron la mayor puntuación en fruta de pepita y aromas afrutados (donde podría englobarse plátano, descriptor correlacionado con el acetato de isoamilo); estos dos últimos vinos además destacaron en fruta de hueso. En sabor, las cepas Td315 y Lt93 y Mp278 produjeron los vinos más dulces, aunque esta última con ligero amargor o astringencia. Los vinos más ácidos fueron los elaborados en inoculación secuencial con Mp278 y Lt93 y la cepa pura ScXG3. El descriptor alcohólico fue muy similar en todos los vinos. Los vinos mejor estructurados fueron los producidos mediante fermentación espontánea, con Lt93 y con Sb474. Sin embargo, los vinos con mejor calidad en boca fueron los fermentados con Mp278 y ScXG3 y en menor medida los fermentados con Lt93 y espontáneamente. Estas dos primeras fermentaciones junto con la espontánea obtuvieron la mayor valoración para el descriptor calidad global del vino. El parámetro sensorial afrutado fue significativamente diferente entre las cepas y presentó mayor valoración en las cepas Mp278 y fermentación espontánea que tuvieron una mayor concentración de ésteres y acetatos.

El orden de preferencia asignado por los catadores estuvo en consonancia con estos valores de los descriptores sensoriales, donde los vinos elaborados con las cepas Mp278, ScXG3 puro, Lt93 y la fermentación espontánea fueron los preferidos.

El resultado del test de Duncan obtenido para cada descriptor sensorial analizado, así como los valores de porcentaje de intensidad (%I), frecuencia (%F), media geométrica (%MG) y el nivel de significación de la prueba ANOVA para el factor cepa en un total de 19 descriptores (13 para el aroma y 6 para el gusto) y el valor global se recogen en la Tabla 4.47. El análisis de varianza (ANOVA) mostró que la percepción sensorial de los vinos producidos por las distintas levaduras por los catadores solo fue significativa ($p < 0.05$) para los descriptores aroma afrutado y calidad global. El descriptor fruta de pepita también presentó diferencias en la prueba de Duncan a $p < 0.05$ aunque la significación de la prueba ANOVA no fue significativa ($p = 0.26$). Sin embargo, junto con las diferencias entre las preferencias, una percepción general fue útil para caracterizar las diferencias entre las seis fermentaciones, ya que dichas puntuaciones coinciden con los atributos encontrados en el análisis instrumental.

Tabla 4.47. Frecuencia, intensidad, media geométrica (MG) y significación (ANOVA de una vía) de los descriptores sensoriales de los vinos de la variedad Treixadura elaborados con las diferentes cepas de levaduras no-*Saccharomyces*.

Descriptor	Intensidad (%)						Frecuencia (%)						Media geométrica (%)						Significación
	Esp	Td315	Lt93	Mp278	Sb474	ScXG3	Esp	Td315	Lt93	Mp278	Sb474	ScXG3	Esp	Td315	Lt93	Mp278	Sb474	ScXG3	
Intensidad aromática	63	53	57	61	56	65	100	100	100	100	91	100	79	72	75	78	71	80	ns
Persistencia	57	45	53	58	57	58	100	100	100	100	91	100	75	67	72	76	72	76	ns
Floral	22	11	15	25	13	23	64	36	36	64	55	55	38	20	23	40	27	36	ns
Miel	17	16	9	9	3	13	55	36	36	36	18	36	31	24	18	18	7	22	ns
Afrutado	41	26	32	39	12	40	100	73	73	82	55	82	64	44	48	57	26	57	*
Fruta de hueso	22	20	12	28	13	27	73	45	45	73	36	64	40	30	23	45	22	42	ns
Fruta de pepita	37	22	29	28	12	32	82	55	64	55	36	64	55	35	43	39	21	45	§
Fruta madura	15	19	24	19	11	12	36	45	64	36	27	36	23	30	39	26	17	21	ns
Fruta seca	12	19	13	13	16	11	27	36	27	27	45	18	18	26	19	19	27	14	ns
Fruta tropical	8	3	8	11	16	18	36	18	36	45	36	45	17	7	17	22	24	29	ns
Cítricos	12	7	18	15	17	13	45	27	45	45	45	36	23	14	29	26	28	22	ns
Herbáceo	15	14	13	14	14	15	55	36	36	27	36	36	29	23	22	20	23	23	ns
Hierba seca	16	18	11	8	9	9	45	45	27	27	27	18	27	29	17	15	16	13	ns
Alcohol	68	63	59	62	61	67	100	100	100	100	100	100	82	79	77	78	78	82	ns
Dulce	40	38	39	45	34	41	91	82	91	91	82	91	61	56	60	64	53	61	ns
Ácido	48	39	43	41	37	45	100	91	100	100	91	100	70	60	66	64	58	67	ns
Amargo	51	49	41	46	39	44	100	100	91	100	91	100	71	70	61	68	60	67	ns
Estructura	55	48	56	53	52	56	100	91	100	91	100	91	74	66	75	69	72	71	ns
Calidad en boca	46	39	46	53	39	49	91	91	91	91	91	91	65	60	65	69	60	67	ns
Calidad global	53	45	54	60	29	59	100	100	100	100	91	100	72	67	73	77	52	77	*

La notación * indica significancia en $p < 0.05$; ns indica diferencia no significativa. Prueba de Duncan: letras diferentes en negrita indican diferencias significativas entre cepas. § Presenta diferencias en la prueba de Duncan con ANOVA $p = 0.26$.

La mayor puntuación para la calidad global y el descriptor aroma afrutado fue para las cepas Mp278, ScXG3 y la fermentación espontánea; la menor puntuación fue para las cepas Td315 y Sb474. Esto podría ser debido a las altas concentraciones de ácidos como el ácido isobutírico encontradas en los vinos de estas dos últimas cepas y a las menores concentraciones en ésteres y acetatos. Soden et al. (2000) también encontraron en un estudio similar niveles más bajos que el control *S. cerevisiae* para los aromas florales y plátano en fermentaciones mixtas *Starm. bacillaris*/*S. cerevisiae*, pero fue similar en los aromas de "miel" y "chucrut". Del mismo modo, estos vinos fueron valorados como de menor calidad que los vinos de referencia de *S. cerevisiae*, a pesar de que los vinos de *S. cerevisiae* en cultivo puro mostraron concentraciones más bajas de ésteres (Jolly et al., 2003a). Nuestros resultados apoyan por tanto la hipótesis de Jolly et al. (2014) de que el uso de *Starm. bacillaris* para la producción de vino podría implicar un papel para aumentar su complejidad en lugar de aumentar la percepción de atributos sensoriales 'deseables' particulares.

O también como recurso biológico/tecnológico a utilizar para mejorar algunas de las características químicas de los vinos (glicerol, reducción de azúcares, incremento de la acidez, etc.).

Los descriptores con un valor MG > 30% para al menos un vino elaborado con las distintas cepas se consideraron los más contribuyentes en este estudio. Ocho atributos sensoriales con MG > 30% definieron el aroma de los vinos: afrutado, fruta de pepita, fruta de hueso, floral, frutas maduras, miel, persistencia e intensidad aromática. Estudios previos realizados con el cultivar Albariño mostraron resultados similares (Vilanova et al., 2005^a, 2005b y 2010b).

El análisis descriptivo reveló que los vinos elaborados con la mayoría de las cepas en inoculación secuencial presentaron aromas frutales y florales con la mayor frecuencia e intensidad. Los descriptores más frecuentes fueron: afrutado (100% para la fermentación espontánea y 82% para Mp278 y ScXG3), fruta de pepita (82% para la fermentación espontánea y 64% para Lt93 y ScXG3), fruta de hueso (73% para la fermentación espontánea y Mp278 y 64% para ScXG3) y flores (64% para la fermentación espontánea y Mp278 y 55% para Sb474 y ScXG3). Igualmente, la mayor intensidad se mostró para los descriptores de la fruta.

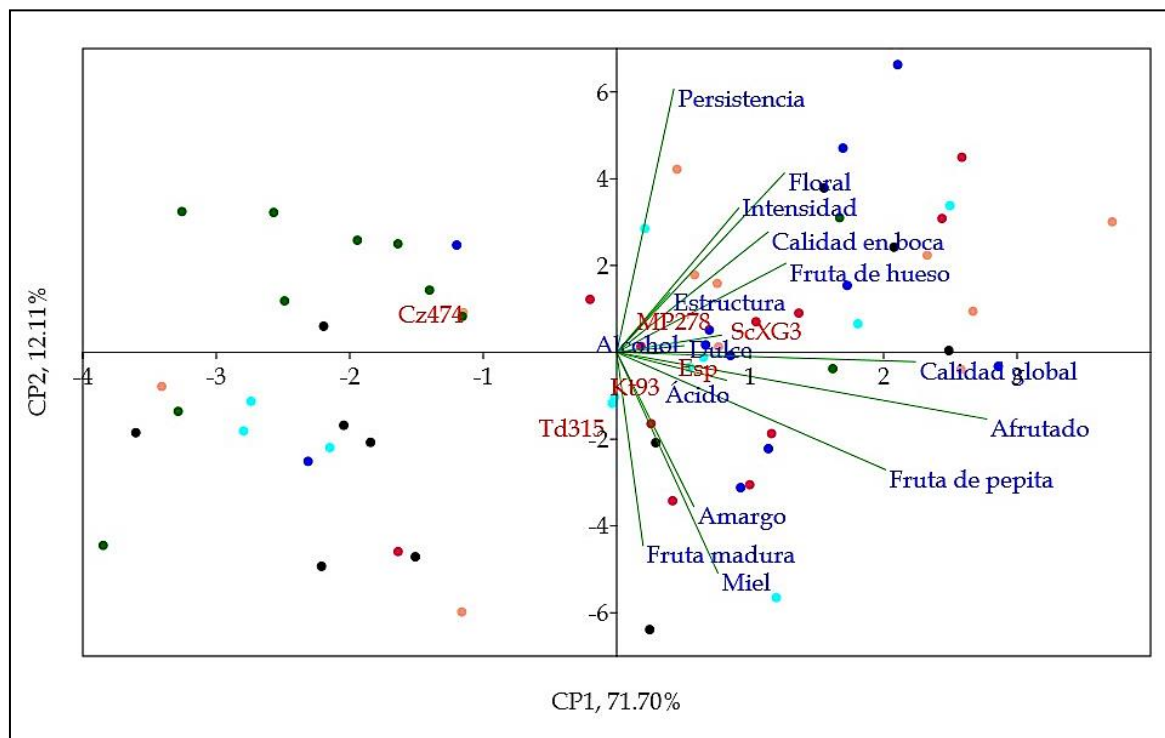


Figura 4.72. ACP de los atributos sensoriales de olfato y gusto. Azul oscuro: ScXG3, cian: Lt93, negro: Td315, rojo: fermentación espontánea, salmón: Mp278 y verde: Sb474.

Para reducir los datos sensoriales a un conjunto más pequeño de variables subyacentes basadas en patrones de correlación entre las variables originales se aplicó un ACP (Figura 4.72). Se utilizaron los datos de los 8 descriptores del análisis sensorial de los vinos elaborados con diferentes no-*Saccharomyces* con MG > 30%. De nuevo se confirma una separación entre las cepas Mp278-ScXG3, Esp-Lt93, Td315 y Sb474, estas dos últimas alejadas de los atributos sensoriales deseables como frutales, o intensidad.

Los primeros dos componentes principales, CP1 y CP2, representaron el 83.81% de la varianza total (71.70% y 12.11% respectivamente). El primer componente (CP1) se correlaciona positivamente con la calidad global y aromas afrutados. Para el segundo componente (CP2), el atributo persistencia y en menor medida floral e intensidad mostraron valores altos y positivos, mientras que fruta madura y miel contribuyeron al lado negativo. La Figura 4.72 muestra cuatro grupos. El primer grupo formado por los vinos elaborados con las cepas Mp278 y ScXG3 está más correlacionado con los descriptores floral, calidad en boca, intensidad y fruta de hueso y correspondió con los valores positivos de ambos componentes. Más cerca del origen y con valores negativos del CP2 se encontró el segundo grupo de vinos elaborados mediante fermentación espontánea y con la cepa Lt93. Los vinos fermentados con las cepas Td315 y Sb474 se situaron más alejados en valores negativos de CP1 y CP2 y en valores positivos de CP2 y negativos de CP1, respectivamente, y la influencia de los descriptores fue muy inferior al del resto (zona opuesta a los descriptores en el biplot). Sin embargo, de acuerdo con un ACP (datos no mostrados) en el que se incluyeron todos los descriptores los atributos fruta seca y hierba seca se mostraron más presentes en los vinos de las cepas Td315 y Sb474.

Algunos autores aseguran que los vinos elaborados empleando cepas autóctonas presentan mejores perfiles aromáticos que aquellos elaborados mediante fermentación espontánea o empleando levaduras comerciales (Callejon et al., 2010; Cortés y Blanco, 2011; Tofalo et al., 2016). Nuestros resultados están de acuerdo con estas afirmaciones, sin embargo, debemos aclarar que los vinos de la fermentación espontánea mostraron un óptimo perfil aromático. Esto es debido a numerosos factores que pueden intervenir durante un proceso fermentativo no controlado en los que las especies presentes influyen enormemente (Fleet, 2003). Por lo tanto, la fermentación espontánea puede ser una buena opción si se conoce la proporción de la población de levaduras y otra microbiota en la fase inicial haciendo el proceso más predecible y permitiendo la inoculación de no-*Saccharomyces/Saccharomyces* si se considera que esta población no es enológica adecuada. En la observación general de los resultados de los análisis químicos y sensoriales (Tabla 4.45, Tabla 4.47, Figura 4.69, Figura 4.72 y Figura 4.73) pudimos comprobar que los compuestos fermentativos que mayormente contribuían a la percepción sensorial de los vinos Treixadura elaborados con diferentes cepas no-*Saccharomyces* (valor de OAV > 1) fueron ésteres etílicos y acetatos que coinciden con los descriptores con MG > 30% (aromas afrutados y florales).

Se realizó un análisis de correspondencia canónica (ACC) (Figura 4.73) y un análisis de correlación lineal utilizando el coeficiente paramétrico de Pearson para comprobar la correlación entre compuestos aromáticos y parámetros sensoriales (Tabla 4.48) en la diferenciación de los vinos de las distintas cepas. La caracterización aromática y sensorial de los vinos experimentales obtenidos mediante fermentación con distintas cepas autóctonas permitió destacar grandes diferencias e influencia entre especies no solo a nivel químico y de las cinéticas de fermentación, sino también en el análisis aromático CG y sensorial, estableciendo correlaciones entre ambos, de acuerdo a lo descrito por otros autores (Álvarez-Pérez et al., 2012; Fleet 2003; Romano et al., 2003; Swiegers et al., 2005; Tofalo et al., 2016).

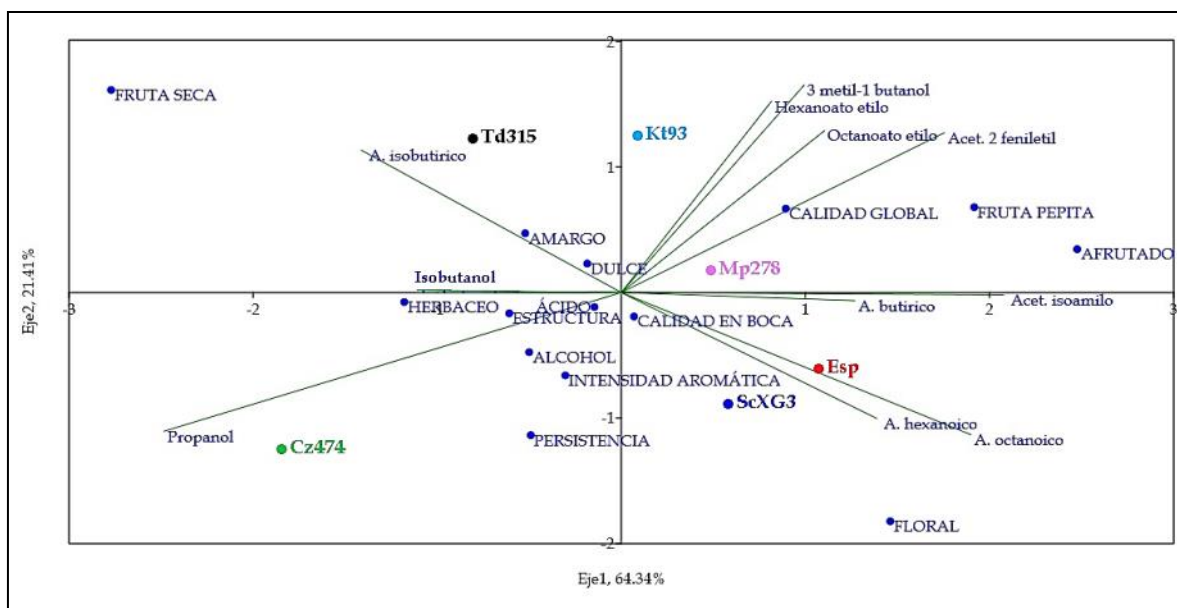


Figura 4.73. ACC entre compuestos aromáticos y características sensoriales (superior).

Se realizó un primer estudio de la correlación (Pearson) con todos los compuestos volátiles y descriptores sensoriales. Se observaron correlaciones positivas significativas entre varios compuestos aromáticos y descriptores sensoriales siendo las más relevantes: acetato de isoamilo y los ácidos hexanoico y octanoico con floral ($R = 0.914$, $R = 897$ y $r = 0.969$, respectivamente); estos compuestos también se correlacionaron positivamente con la calidad en boca y el ácido octanoico además con la intensidad aromática ($r > 0.869$). Por otro lado, se observó una correlación negativa entre el propanol y los descriptores afrutado y fruta de pepita ($R = -0.858$ y -0.910 , respectivamente).

Tabla 4.48. Correlación de Pearson entre compuestos aromáticos y descriptores sensoriales.

	Fruta pepita	Afrutado	Floral	Propanol	Acetato isoamilo	Ácido isobutírico	Ácido hexanoico	Ácido octanoico
Intensidad aromática			.880*					.888*
Persistencia						-.817*		
Floral					.914*		.897*	.969**
Afrutado	.972**			-.858*				
Fruta pepita				-.910*				
Calidad en boca			.909*		.979**		.886*	.869*
Calidad global	.897*	.909*		-.829*	.863*			
	Acetato de etilo	Acetato de isoamilo	Hexanoato de etilo	Octanoato de etilo	Ácido hexanoico			
3-metil-1-butanol	-.909*							
Octanoato etilo			.983**					
Acetato 2-feniletilo			.925**	.966**				
Ácido hexanoico		.909*						
Ácido octanoico		.908*					.915*	

La correlación (bilateral) es significativa en el nivel a $p < 0.05$ (*) y a $p < 0.01$ (**).

Cortés-Diéguez et al. (2015) encontraron resultados contrarios en vinos tintos de variedades de uva autóctonas de Galicia donde el 1-propanol mostró un alto valor de OAV que mejoró las notas afrutadas, sin embargo, no pareció contribuir individualmente al aroma del vino. La formación del propanol es compleja porque está ligada al metabolismo

azufrado de las levaduras y su concentración está correlacionada negativamente con la del ácido sulfhídrico (Large, 1986). A veces también puede formarse a partir del metabolismo de los azúcares (Henschke y Jiranek, 1992). También se encontró una correlación negativa del ácido isobutírico con la persistencia ($R = -0.817$). Estos resultados mostraron que no todos los descriptores sensoriales pueden explicarse por compuestos volátiles. Además, se encontraron algunas correlaciones positivas ($r > 0.880$) entre descriptores sensoriales (floral-intensidad aromática y calidad en boca; fruta de pepita-afutado y calidad global; afutado-calidad global) y entre compuestos aromáticos (acetato de isoamilo-ácido hexanoico y ácido octanoico; ácido hexanoico-ácido octanoico; hexanoato etilo-octanoato etilo y acetato 2-feniletilo y octanoato etilo-acetato 2-feniletilo). Es por tanto una afirmación consistente que existieron sinergias entre los compuestos aromáticos y que las correlaciones encontradas que relacionan compuestos químicos y descriptores sensoriales pueden atribuirse a las posibles relaciones entre ellos, a la presencia de otros compuestos producidos que no fueron analizados, o a algunas asociaciones entre los compuestos analizados (Vilanova et al., 2010b).

Algunos autores encontraron en vinos que algunos compuestos como el 2-fenil acetato de etilo, el acetato de hexilo, el propanol, el acetaldehído y el ácido decanoico no parecen contribuir individualmente al aroma del vino con $OAV < 1$; sin embargo, pueden mejorar algunos atributos mediante efectos de sinergia con otros odorantes activos (Cortés-Diéguez et al., 2015). Por ello, no se puede ignorar la contribución al aroma de los compuestos con OAV s casi unitarios, ya que pueden mejorar algunas notas existentes por sinergia con otros compuestos (López et al., 2003).

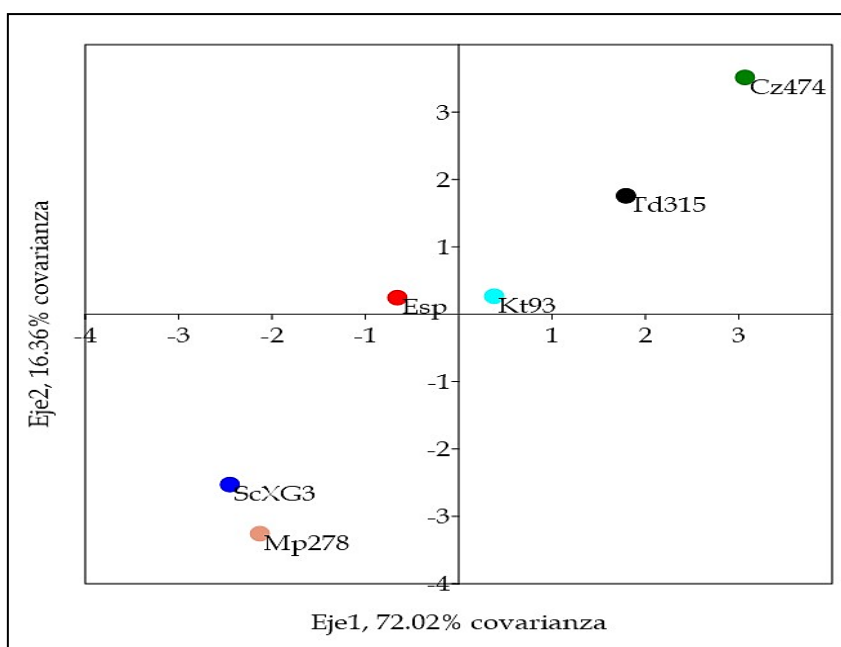


Figura 4.74. PLS entre los 12 compuestos aromáticos principales ($OAV > 1$) y los 6 descriptores sensoriales más importantes ($MG > 30\%$).

Por último, se realizó un análisis Parcial de Mínimos Cuadrados (PLS) como método de ordenación comparable con el ACP, pero con el objetivo de maximizar la covarianza entre los dos grupos de variables de la misma cepa (compuestos químicos y parámetros sensoriales). Es una de las técnicas multivariadas que se ha utilizado ampliamente para

investigar la relación entre los datos sensoriales y GC (Noble y Ebeler, 2002). El resultado del análisis de regresión PLS (Figura 4.74 y Figura 4.75), que se llevó a cabo entre los 12 compuestos volátiles con OAV > 1 y 6 descriptores sensoriales con MG > 30%, mostró la relación entre los componentes del sabor y las propiedades sensoriales de los vinos Treixadura elaborados con las diferentes cepas.

Los gráficos obtenidos con los programas Past3.19 y XLstat sugieren la conexión o existencia de una relación entre las variables de los descriptores sensoriales y compuestos volátiles en los vinos, en consonancia con lo encontrado en el test de correlaciones de Pearson. Se encontraron correlaciones positivas entre los descriptores afrutados y florales con los compuestos acetato de isoamilo y los ácidos hexanoico y octanoico. De acuerdo con el peso de carga, el aroma afrutado (plátano, melón y otras frutas distintas de frutas de hueso, frutas de pepita, fruta tropical y cítricos) fue predicho principalmente por el acetato de isoamilo.

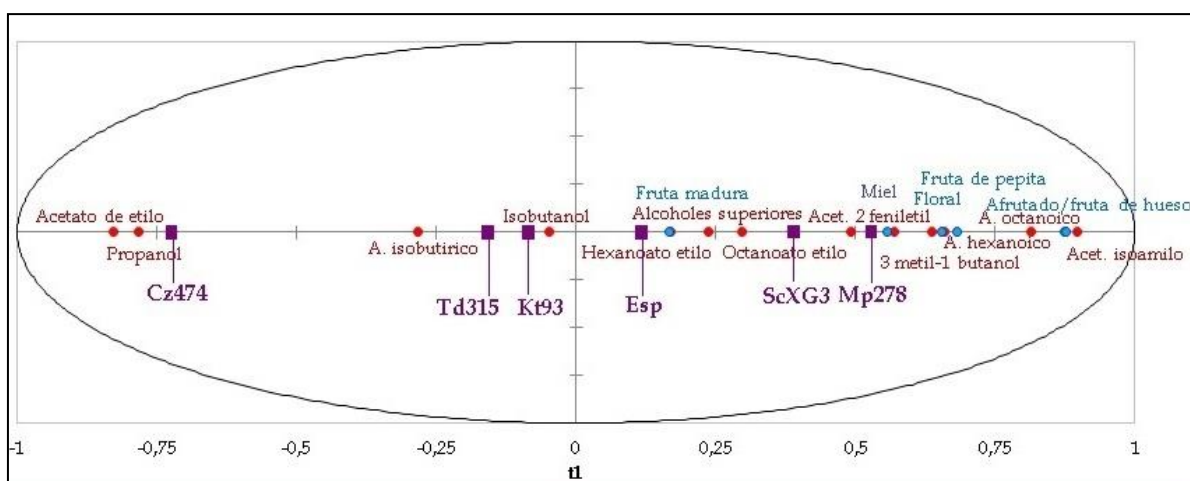


Figura 4.75. PLS entre los 12 compuestos aromáticos principales (OAV > 1) y los 6 descriptores sensoriales más importantes (MG > 30%).

Además del aporte de los compuestos con OAV superior a 1, no se puede ignorar la contribución al aroma de los compuestos con OAVs casi unitarios, ya que pueden mejorar algunas notas existentes por sinergia con otros compuestos (López et al., 2003).

Para estimar las sinergias de los compuestos aromáticos se realizó una evaluación del aroma fermentativo global de los vinos elaborados con las distintas cepas de levaduras no *Saccharomyces*. Todos los compuestos volátiles se agruparon en siete clases diferentes (series aromáticas), de acuerdo con sus descriptores de olor similares incluyendo aquellos con OAV < 1, como el enfoque aplicado por otros autores (Cortés-Diéguez et al., 2015; Gómez et al., 2012). La Figura 4.76 muestra el valor medio de cada serie aromática. Un compuesto con varios descriptores puede pertenecer a diferentes series. El valor total en cada serie resulta de la suma de los OAVs individuales de los compuestos volátiles que se incluyen en cada clase. La Figura 4.76 muestra el valor medio de cada serie aromática. En base a los efectos sinérgicos, los compuestos con OAV < 1 también se incluyeron en la suma.

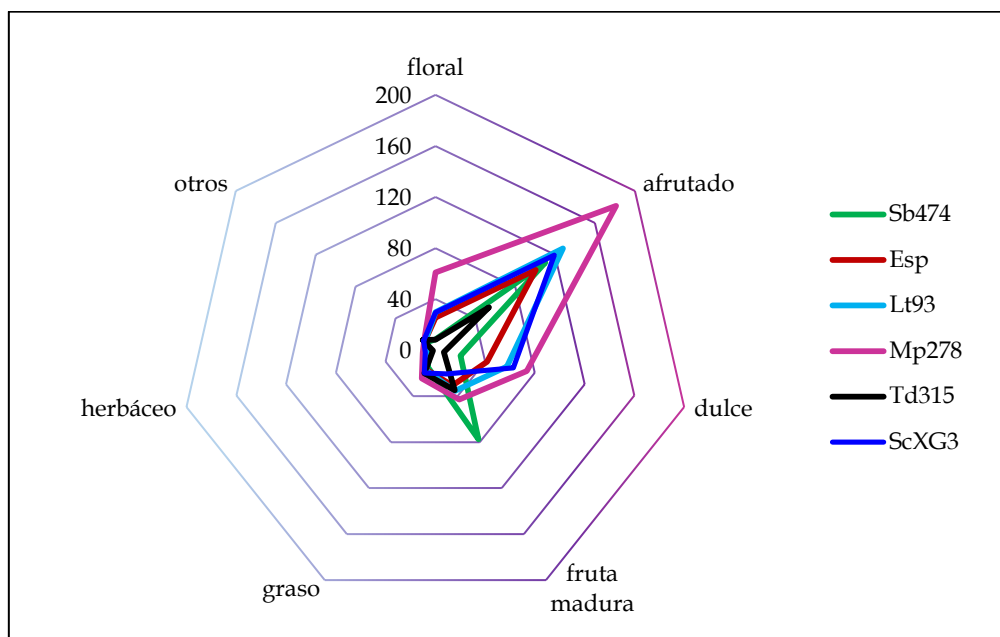


Figura 4.76. Valores medios de las series aromáticas para los vinos elaborados con las distintas cepas.

Los resultados mostraron que la serie aromática “afrutado” fue la más importante para describir los vinos generados por todas las cepas no-*Saccharomyces*, revelando una mayor intensidad en los elaborados con la inoculación secuencial de Mp278. “Floral” y “dulce” y “graso”, también fueron series aromáticas con una marcada influencia en el aroma general. Además, la serie aromática “fruta madura” presentó cierta relevancia en la cepa Sb474. Observando el efecto de las sinergias, se pudo comprobar como en los vinos elaborados con esta última cepa Sb474 que generó en ellos una mayor concentración de propanol, aumentó la intensidad de la serie aromática “afrutado” hasta niveles similares al resto de vinos mejor puntuados en el análisis sensorial y con mayor concentración de ésteres y acetatos (ScXG3 cultivo puro, fermentación espontánea e inoculación secuencial con Lt93). Estos últimos vinos también mostraron una mejor valoración probablemente debido al efecto sinérgico.

El perfil de aroma obtenido a través de la suma de las intensidades de los compuestos volátiles (OAV) individuales que pertenecen a la misma serie aromática (Figura 4.76) difería de los perfiles obtenidos con el valor medio de los descriptores sensoriales de aroma dados por el panel de cata. La influencia de los efectos sinérgicos, aditivos y antagonistas que se pueden producir entre los compuestos volátiles presentes en cada vino se sugiere como la razón principal de dicho razonamiento. Por ello, el perfil de aroma definido teniendo en cuenta únicamente los odorantes más activos (OAV) debe considerarse como provisional.

Cabe destacar en cuanto a las descripciones realizadas en las hojas de cata para los diferentes vinos que se pudieron aseverar los resultados anteriores. Algunos catadores percibieron para el vino de la fermentación espontánea notas herbáceas, astringentes; para el vino con Td315, manzanilla, aromas de oxidación-reducción-levadura; para el vino con Lt93, aromas vegetales; ScXG3: muy floral; ligeras notas astringentes en boca; Mp278, plátano, flor blanca, pera, melón, nectarina, almendra, manzanilla; Sb474, acetatos, ligera

oxidación, reducción, añadiendo que las notas negativas en nariz distorsionan la fase olfativa y las notas positivas quedan ensombrecidas, siendo diferente al resto de vinos.

Los resultados de la prueba PLS, junto con los análisis ACP, Pearson, ACC y series aromáticas demostraron que las diferentes cepas no-*Saccharomyces* influyeron en los distintos vinos, mediante la formación de diferentes compuestos. La inoculación secuencial de la cepa Mp278 aumentó la producción de compuestos aromáticos positivos con respecto a la cepa control autóctona *S. cerevisiae* ScXG3 sola; se debe tener en consideración que ScXG3 ha sido seleccionada en estudios previos (Blanco et al., 2013) por su óptimo comportamiento en la vinificación. No obstante, los vinos elaborados por estas dos cepas fueron los mejor valorados en la degustación, donde pudieron percibirse los aromas frutales y florales relacionados con los acetatos 2-fenil-etil y acetato de isoamilo y los ácidos hexanoico y octanoico. Un segundo grupo de vinos fueron los producidos por la fermentación espontánea y la inoculación secuencial con la cepa Lt93 con aptitudes suficientes para la vinificación que solo destacaron por su mayor concentración en algunos compuestos. La fermentación espontánea presentó elevadas concentraciones de los ésteres hexanoato y octanoato de etilo con notas a fruta madura. Un tercer grupo podría sugerirse para los vinos elaborados con las inoculaciones secuenciales de las cepas Td315 y Sb474 que fueron penalizados en la cata y mostraron las mayores concentraciones de ácido isobutírico y propanol, respectivamente quedando encuadradas en el grupo de aromas a fruta seca, herbáceo y sabor amargo. Esto pudo ser debido al proceso fermentativo y debería ser tenido en cuenta para la utilización de diferentes cepas en nuevos estudios futuros. De hecho, existen cepas comerciales de *T. delbrueckii* y *Starm. bacillaris* que pueden ser utilizadas por sus características enológicas y fenotípicas como aumento de la concentración de glicerol y en el contexto de la acidez y pH de los mostos (Englezos et al., 2017).

En definitiva, los resultados son consistentes con los encontrados en la bibliografía precedente y permiten afirmar que algunas cepas autóctonas de levaduras no-*Saccharomyces*, utilizadas mediante inoculación secuencial, pueden contribuir a la tipicidad y diferenciación de los vinos e incluso aumentar la aportación de compuestos aromáticos con valoración sensorial positiva. Estudios futuros en mayores volúmenes de mosto podrán confirmar los resultados positivos y descartar aquellos negativos que pudieran no ser atribuibles a las levaduras.

Asimismo, en cuanto a las cepas peor valoradas, siguiendo una estrategia coinoculada con *T. delbrueckii* o *Starm. bacillaris* y *S. cerevisiae*, varios autores obtuvieron vinos mejores que sus controles elaborados solo con *S. cerevisiae* (Jolly et al., 2003a; Englezos et al., 2016b). También se ha encontrado que la fermentación mixta *Starm. bacillaris*/*S. cerevisiae* en otras variedades produce vinos con concentraciones significativamente mayores de terpenoles, concentraciones reducidas de aldehídos y ésteres de acetato en Sauvignon Blanc (Sadoudi et al., 2012), mayor concentración de alcoholes superiores, ésteres etílicos y ácidos grasos de cadena corta en Macabeo (Andorrà et al., 2010) y baja intensidad del aroma para atributos sensoriales 'deseables', o altas intensidades para descriptores sensoriales "indeseable" en Chardonnay (Soden et al., 2000).

Esto indica que la cepa de levadura y la variedad de uva afectan al perfil volátil de los vinos fermentados.

Por esta razón, las bajas puntuaciones obtenidas en las cepas Td315 y Sb474 no son en absoluto una certeza de indeseables resultados de estas no-*Saccharomyces* en la mejora de la calidad de los vinos. Por lo tanto, sugerimos más investigación, con cepas diferentes e incluso mediante la aplicación de más de una no-*Saccharomyces* conjunta o secuencialmente antes de la inoculación de *S. cerevisiae*. Se podrá así evaluar los efectos sinérgicos positivos sobre la calidad del vino y en definitiva ampliar el conocimiento de las relaciones interespecíficas.

De acuerdo con esto, la combinación *T. delbrueckii*/*H. uvarum*, *W. anomalus*/*T. delbrueckii*, *Starm. bacillaris*/*H. uvarum* y *S. cerevisiae* se usaron en fermentaciones secuenciales con composiciones químicas y volátiles diferentes de los vinos de *S. cerevisiae*, en algunos casos mejorando los vinos (Andorrà et al., 2010; Jolly et al., 2014). Por ejemplo, la combinación *Starm. bacillaris*/*H. uvarum*/*S. cerevisiae* produjo vinos con las concentraciones más bajas de ácidos de cadena corta y ácidos grasos de cadena media (Andorrà et al., 2010). De acuerdo con la hoja de datos técnicos del fabricante de un producto comercial lanzado en 2003 a partir de *T. delbrueckii*/*L. thermotolerans* y *S. cerevisiae* en diferentes proporciones (*Viniflora*® HARMONY.nSac. CHR Hansen A/S, Bøge Allé, DK-2970 Hørsholm, Denmark), en inoculación simultánea mejora el sabor de vinos blancos y tintos con notas afrutadas. La proporción de las levaduras no-*Saccharomyces* a *S. cerevisiae* está en torno a 1: 14.

Por último, cabe mencionar que, en algunas DOs como en Ribeira Sacra se observó una mayor diversidad cuando se tiene en cuenta la riqueza especies de los mostos y uvas, lo cual indica que las especies existentes sobre las bayas son diferentes a las presentes en los mostos, es decir, una vez liberado el mosto estas especies no están presentes en cantidad suficiente como para tener influencia en el mosto debido a la competencia del resto de especies (Barata et al., 2012). Esto sugiere que una maceración previa de las uvas enteras podría ser utilizada para obtener un preinóculo natural que incrementara el desarrollo de la población de algunas de estas levaduras con influencia enológica como *T. delbrueckii*, *L. thermotolerans*, *Metschnikowia* spp., etc. como mostraron Boto et al. (2014) en técnicas de madreo. El manejo de las fermentaciones mixtas es más complejo que las de una sola especie (Jolly et al., 2014). Nuestra investigación está en la línea de contribuir en el mejor conocimiento de las especies no-*Saccharomyces* y sus relaciones entre especies y con *S. cerevisiae* que favorezca la comprensión de su papel y usos en fermentaciones espontáneas e inoculadas.

5. Conclusiones/Conclusions

5. Conclusiones/Conclusions

Conclusiones

1. La influencia del sistema de cultivo (ecológico frente a convencional) sobre las características químicas de los mostos dependió de la variedad de vid y de la cosecha. Generalmente las uvas tintas ecológicas presentaron una mayor riqueza fenólica.
2. el cultivo ecológico de la viña dio lugar a un aumento de la población de levaduras a nivel cuantitativo y cualitativo. La mayoría de las muestras ecológicas tuvieron una mayor riqueza de especies de levaduras; algunas de ellas con relevancia enológica. Por lo tanto, los viñedos ecológicos son importantes reservorios de la diversidad de levaduras.
3. Las especies de levadura dominantes (*Aureobasidium* spp., *Metschnikowia* spp., *H. uvarum* y *Cryptococcus* spp.) fueron similares entre sistemas de cultivo y DOs, pero su proporción varió entre ellas. Además, se encontraron diferencias importantes (tanto en número como en frecuencia) en las especies minoritarias dependiendo del sistema de cultivo y la DO; *L. thermotolerans* estuvo asociada con las DOs Ribeiro y Monterrei, mientras que *Starm. bacillaris*, *Candida* spp. e *I. terricola* aparecieron en las DOs Rías Baixas y Ribeira Sacra.
4. La riqueza y proporción de especies de levadura estuvo principalmente influenciada por la localización geográfica, pero también por el sistema de cultivo, el año y, en menor medida, por la variedad de uva. La frecuencia de especies afectó más que la riqueza de especies a la diversidad de levaduras. Así, se pudieron establecer patrones en la población de levaduras (*microbial terroir*) que influyen en la tipicidad del vino a nivel regional.
5. Durante la vinificación natural, las levaduras no-*Saccharomyces* iniciaron la fermentación, pero fueron sustituidas por cepas de *Saccharomyces* al final, que completaron el proceso. Cuando esta sustitución no se produjo, las fermentaciones se estancaron. El éxito de las fermentaciones fue mayor en los mostos ecológicos.
6. Las bodegas ecológicas de Galicia presentaron una elevada diversidad de cepas de *S. cerevisiae*, aunque sólo unas pocas estuvieron ampliamente distribuidas y aparecieron con una frecuencia relevante. Además, no encontramos un patrón geográfico definido entre cepas y bodegas. Sin embargo, algunas cepas se asociaron a una bodega en particular, por lo que podrían contribuir a la tipicidad de sus vinos.
7. El cultivo ecológico permitió obtener vinos diferenciados que fueron bien apreciados por los catadores a nivel sensorial. Incluso en algunos casos fueron preferidos frente a los convencionales.

8. La fermentación secuencial de los mostos de Treixadura con cepas autóctonas no *Saccharomyces* y *S. cerevisiae* mostró diferencias en la cinética de fermentación, en la dinámica de las poblaciones de levaduras y en las tasas de implantación de las cepas inoculadas.
9. Las especies autóctonas no-*Saccharomyces* aplicadas mediante fermentación secuencial aportan a los vinos características químicas y sensoriales distintivas. Los vinos mejor valorados fueron los elaborados con *M. pulcherrima* Mp278 y *S. cerevisiae* ScXG3, que tenían mayor concentración de acetatos y ésteres deseables. Otras especies mostraron potencial para reducir el contenido de alcohol y aumentar la acidez en vinos tales como *Starm. bacillaris* Sb474 y *T. delbrueckii* Td315. Sb474 y Mp278 aumentaron la concentración de glicerol.

Conclusions

From the results obtained in this work the following conclusions may be drawn:

1. The influence of the culture system (organic versus conventional) on chemical characteristics of musts was grapevine variety and vintage dependent. Usually organic red grapes presented higher phenolic richness.
2. Organic farming leads to an increase in the yeast population of musts at quantitative and qualitative level. Most organic samples owned higher yeast species richness; some of them with oenological relevance. Therefore, organic vineyards are important reservoirs of yeast diversity.
3. Dominant yeast species (*Aureobasidium* spp., *Metschnikowia* spp., *H. uvarum* and *Cryptococcus* spp.) were similar between culture systems and DOs, but their proportion varied among them. In addition, most differences were found (both in number and frequency) for minor yeast species depending on the cultivation system and DO; *L. thermotolerans* was associated with Ribeiro and Monterrei DOs, whereas *Starm. bacillaris*, *Candida* spp. and *I. terricola* appeared in Rías Baixas and Ribeira Sacra DOs.
4. Richness and proportion of yeast species was mainly influenced by geographical location, but also by culture system, vintage and, to a lesser extent, by grapevine variety: species frequency was more important than species richness on yeast diversity. Thus, yeast population patterns (*microbial terroir*) could be established, which influence wine typicality at regional level.

5. During natural vinification, non-*Saccharomyces* yeast started the fermentation, but they were substituted by *Saccharomyces* strains at the end, which were able to complete the process. When this substitution did not occur, fermentations get stuck. Success of the fermentations was higher in organic musts.
6. Organic wineries from Galicia presented a high diversity of *S. cerevisiae* strains, although only few of them were widespread and appeared at relevant frequency. In addition, we did not find a defined geographical pattern between strains and wineries. Nevertheless, some strains were associated with a particular winery, so they could contribute to its wine typicality.
7. Organic wine elaboration allowed obtaining differentiated wines that were well appreciated at sensory level by tasters. Even in some cases they were preferred over conventional ones.
8. Sequential fermentation of Treixadura musts with autochthonous non- *Saccharomyces* and *S. cerevisiae* strains showed differences in fermentation kinetics, yeast population dynamics and implantation rates of inoculated strains.
9. Autochthonous non-*Saccharomyces* species applied by sequential fermentation contribute distinctive chemical and sensory characteristics to wines. Best rated wines were those made with *M. pulcherrima* Mp278 and *S. cerevisiae* ScXG3 which had higher concentration of desirable acetates and esters. Another species showed potential to reduce alcohol content and to increase acidity in wines such as *Starm. bacillaris* Sb474 and *T. delbrueckii* Td315. Sb474 and Mp278 increased glycerol concentration.

6. Perspectivas de futuro

6. Perspectivas de futuro

Las conclusiones extraídas de este trabajo abren la puerta a nuevas perspectivas de investigación para el futuro. Se requiere conocimiento adicional sobre la aplicación de la gran colección de cepas de levaduras nativas de *S. cerevisiae* y no-*Saccharomyces* identificadas durante esta tesis que pueden tener un gran potencial enológico. Por ejemplo, en la fermentación de mostos monovarietales o mezcla, procedentes de variedades de uva autóctonas, especialmente de minoritarias como Loureira, Blanco Lexítimo, Torrentés, Monstruosa, Sousón, etc. en coinoculación mixta, secuencial o multistater con *S. cerevisiae*/no-*Saccharomyces*.

Asimismo, el comportamiento de estas combinaciones, especialmente en el caso de los vinos tintos, debe estudiarse junto con nuevas cepas de bacterias lácticas (BAL) no solo para mejorar la calidad de los vinos sino también en línea con los nuevos retos y demandas. Por ejemplo, en el contexto de paliar los efectos del cambio climático que sufren algunas regiones cuyos vinos requieren una disminución del grado alcohólico y del pH y un aumento de la acidez para mejorar su equilibrio sensorial y disminuir la susceptibilidad de deterioro microbiano (Lucio et al., 2017). La extendida práctica de la acidificación química es costosa y está estrictamente regulada por la legislación (Hidalgo, 2003; Lucio et al., 2017). Por el contrario, la selección de nuevas cepas de especies como *Starm. bacillaris* en inoculación mixta o secuencial con *S. cerevisiae* y BAL como *Lactobacillus plantarum*, permitirá conseguir una acidificación biológica efectiva de los vinos producidos en regiones de clima cálido (donde se produce un desequilibrio entre el estado fenológico y la madurez de la uva), aumentando la estabilidad microbiológica en la Ff de la fermentación incluso con una mejora en la calidad sensorial (Englezos et al., 2017; Lucio et al., 2017). También facilitará la producción de vinos con baja graduación y especiales. Los resultados óptimos justificados deberán ser estudiados a escala de bodega industrial para verificar su comportamiento y viabilidad real. E incluso concluir con la comercialización de las cepas con la mejor aptitud enológica diferenciada. Realizar un proceso a gran escala supone un mayor coste (económico y de recursos), pero puede generar beneficios si el respaldo de dichas investigaciones es el adecuado. Se han descrito métodos para producir inóculo viable de fácil empleo a bajo coste (Blanco et al., 2006), sin necesidad de preparación de cultivos secos activos (LSA).

Además, el conocimiento de estas interacciones microbianas es fascinante; puede aportar soluciones técnicas y resultados sorprendentes que mejoren la calidad y la tipicidad del vino. Se requieren nuevas investigaciones sobre cepas de especies minoritarias que podrían aportar mayores concentraciones de metabolitos deseables al vino como enzimas, manoproteínas, compuestos aromáticos, etc. (Masneuf-Pomarede et al., 2016; Maturano et al., 2012; Rossouw y Bauer, 2016; Tofalo et al., 2016). Desarrollar una investigación más amplia e integrada para probar qué variables tienen un papel efectivo en la composición y dinámica de las levaduras en el tiempo y el espacio son perspectivas que también permitirán una integración eficiente entre *terroir*, microbioma, metaboloma y características sensoriales íntimas de la uva y el vino (Belda et al., 2017b; Mezzasalma et al., 2018).

Otros campos de aplicación de la amplia diversidad de levaduras aisladas son igualmente interesante: SO₂, diversos clones de vid (Cortés-Diéguez et al., 2015), relaciones e interrelaciones de microorganismos, microoxigenación de la fermentación (Tronchoni et al., 2018), biocontrol contra plagas y enfermedades (Guzzon et al., 2014), fermentación de nuevos productos y bebidas en mezcla de mosto de uva o en aplicación directa como la cerveza, sidra o zumos de frutas (Gutiérrez et al. 2018), elaboración de materias panificables, industria alimentaria humana y animal en general.

Esto puede estimular económicamente el cultivo del viñedo, especialmente el ecológico, y con ello la preservación de la diversidad regional de levaduras y la tipicidad del vino. Pero también, el estudio de este reservorio autóctono puede contribuir al descubrimiento de posibles nuevas cepas o especies de levaduras con aplicación industrial. Por ejemplo, *Sp. ruberrimus* se ha encontrado distribuida en diferentes medios naturales en todo el mundo: ha sido identificada en el aire de Japón (Yamasaki y Fujii, 1950), en cursos de agua dulce de la Patagonia Argentina (Libkind et al., 2003), en plantas de hoja en Portugal (Inácio et al., 2009), en grano de cebada en Suecia (Olstorpe, et al., 2010), en harina de soja en Brasil (Griebeler et al., 2011) o en flores silvestres en Corea (Hyun et al., 2013). Sin embargo, especies como *Sp. ruberrimus* o *C. pimensis* (encontradas en varias muestras durante el desarrollo de esta tesis), hasta nuestro conocimiento, nunca antes han sido citadas como habitantes en entornos relacionados con el vino. No obstante *Sp. ruberrimus* está siendo investigada para su uso en la industria bioquímica para la obtención de lipasas multifuncionales, producción de ácidos grasos y carotenoides que reducen los costos de fabricación y residuos agroindustriales (Cardoso et al., 2016; Kot et al., 2018; Razavi et al., 2007; Rigoli et al., 2012). En la misma línea, otras especies del género *Rhodotorula* se han estudiado con resultados óptimos como una estrategia novedosa para la producción de lípidos mediante el acoplamiento de levaduras oleaginosas y métodos biológicos de lodo activado en aguas residuales (Zhang et al., 2018). Por otro lado, en 2016, en un estudio análogo encontramos la especie *Candida Glabrata* en mosto Treixadura ecológico procedente de la DO Ribeiro. Esta especie, ha sido descrita recientemente por su elevado potencial en la utilización en el tratamiento de aguas residuales (Hussein et al., 2014).

Estos hallazgos inspiran nuevos horizontes para la investigación sobre otras variables como el propio suelo que juegan un papel importante en la composición del microbioma y la predicción de su dinámica e influencia en el vino (Belda et al., 2017b). La diversidad de levaduras (y probablemente de otros microorganismos de la viña), se vislumbra por tanto como una importante herramienta en el futuro cercano que puede albergar cepas con aplicaciones potenciales no sólo en enología sino también como recurso valioso en otros usos más allá del dominio de la fermentación de bebidas.

7. Producción científica

7. Producción científica

Estancias internacionales continuadas de 3 meses en centros de investigación

Tipo: estancia de investigación predoctoral internacional

Centro: Dipartimento Scienze della Vita e dell'Ambiente, Univeristà Politecnica delle Marche, Ancona, Italia.

Investigador responsable: Ciani, Maurizio.

Fechas: 3 meses (01-03-2016 a 1-06-2016).

Tema de investigación: evaluación de la aptitud enológica de diferentes cepas de levaduras no-*Saccharomyces* inoculadas en microfermentaciones y análisis químico y cromatográfico de los productos de fermentación.

Tipo: estancia de investigación predoctoral internacional

Centro: Institute for Wine Biotechnology, Stellenbosch University, Stellenbosch, South Africa.

Investigador responsable: Setati, M. Evodia.

Fechas: 3 meses (01-03-2017 a 31-05-2017).

Tema de investigación: recogida, procesado y fermentación natural de muestras de producción ecológica y convencional, aislamiento e identificación de levaduras mediante técnica ARISA. Project: exploring and exploiting South African microbial diversity.

Tipo: estancia de investigación predoctoral internacional

Centro: Sezione di Scienze e Tecnologie Alimentari, Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari (DISAFA), Università degli Studi di Torino, Alba, Cuneo, Italia.

Investigador responsable: Río Segade, Susana; Rantsiou, Kalliopi; Cocolin, Luca.

Fechas: 3 meses (01-02-2018 a 30-04-2018).

Tema de investigación: estudio y redacción de artículo científico sobre las interacciones entre *Starmarella bacillaris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Oenococcus oeni*, y *Lactobacillus Plantarum*, impacto en la composición química y aromática de los vinos.

Estancias nacionales en centros de investigación

Tipo: estancia de investigación predoctoral nacional

Centro: Instituto de Investigación de la Viña y el Vino (IIVV)-Escuela Superior y Técnica de Ingeniería Agraria, Universidad de León, León.

Investigador responsable: Rubio Coque, Juan José.

Fechas: 1 mes (25-11-2017 a 25-12-2017).

Tema de investigación: Caracterización y tipado genético de cepas de levaduras vínicas de la especie *Saccharomyces cerevisiae* de interés enológico.

Artículos científicos en revistas de impacto internacional

Actualmente se está trabajando en la preparación de manuscritos para su publicación:

Castrillo, D., Blanco, P., et al. Diversity and biogeographical patterns of yeast communities in organic and conventional grapes and musts from Galicia (NW Spain): a three years' study. Food Microbiology. En preparación.

Castrillo et al. Brancellao wine from organic and conventional production: microbiological and chemical aspects. Food Chemistry. En preparación. (EVEGA-UVIGO).

Castrillo, D., Blanco, P. Sensorial and aroma profile of Treixadura wine is improved by sequential inoculation of autochthonous non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts. Macrowine 2018 issue in Food Research International. En preparación.

Castrillo, D., Blanco, P. Study of *S. cerevisiae* yeast strains diversity in organic wineries from Galicia. En preparación.

Castrillo, D., Blanco, P. Chemical and sensory properties of organic wines from Galicia. En preparación.

Artículos o capítulos de libro/digital

- David Castrillo, Mónica Cid, Alba Camesella, Elvira Soto y Pilar Blanco. 2015. Influencia de la población de levaduras en fermentaciones de mosto ecológico y convencional de la variedad Mencía en la DO Ribeira Sacra (Galicia). En: *Enología 2015 Innovación vitivinícola*. GIENOL 2015. Grupos de investigación enológica. 2ª Ed. ISBN: 978-84-8424-378-6. Págs. 158-161.
- David Castrillo, Mónica Cid, Alba Camesella, Pilar Blanco. 2015. Diversidad de levaduras en bodegas que elaboran vino ecológico en Galicia. En: *Enología 2015 Innovación vitivinícola*. GIENOL 2015. Grupos de investigación enológica. 2ª Ed. ISBN: 978-84-8424-378-6. Págs. 162-165.
- David Castrillo, Alba Camesella, Mónica Cid, María José Graña y Pilar Blanco. 2016. Evaluación microbiológica y sensorial de vinos ecológicos de Galicia. En: *Reuniones del Grupo de Trabajo de Experimentación en Viticultura y Enología - 2015, 30ª Reunión (25 y 26 de marzo de 2015)*. Vizcaya. MAGRAMA. ISBN: 978-84-491-1450-2. Págs. 207-215.
- D. Castrillo, M. Sánchez, P. Blanco. 2016. Diversidad de levaduras en uva y mostos de producción ecológica en Galicia. VI Congreso Internacional de Agroecología, en Simón, X., Copena, D., Pérez, D. (Eds.). *Construyendo Conocimiento Agroecológico. Cambiando os modelos de consumo para construir sistemas agroalimentarios sustentables*. Vigo: Grupo de Investigación en Economía Ecológica, Agroecología e Historia, Universidad de Vigo: 03.03. Págs. 258-259.
- David Castrillo, Emiliano Trigo, María José Graña y Pilar Blanco. 2016. Comparación a nivel sensorial de vinos ecológicos y convencionales de Galicia. XVII Congreso Nacional de Enólogos (26-28 mayo, Mérida). Cosejería de Medio Ambiente y Rural. Junta de Extremadura. Mérida. ISBN: 978-84-8107-090-3. Págs. 61-66.
- D. Castrillo, R. Otero y P. Blanco. 2017. La elaboración de vino ecológico mediante fermentación espontánea en una bodega industrial favorece la diversidad de levaduras. En: *Reuniones del Grupo de Trabajo de Experimentación en Viticultura y Enología - 2016, 31ª Reunión (12 y 13 de abril de 2016)*. Madrid. MAPAMA. ISBN: 978-84-491-1478-6. Págs. 155-163.
- P. Blanco, M. Sánchez, E. Díaz, D. Castrillo, E. Soto. 2017. Estudio de la riqueza fenólica en uvas de Brancellao y Mencía de cultivo ecológico y convencional en Galicia. En: *Reuniones del Grupo de Trabajo de Experimentación en Viticultura y Enología - 2016, 31ª Reunión (12 y 13 de abril de 2016)*. Madrid. MAPAMA. ISBN: 978-84-491-1478-6. Págs. 185-192.
- David Castrillo, Eva Rabuñal, Noemi Neira y Pilar Blanco. 2018. Fermentación de mostos de la variedad Treixadura con levaduras no-*Saccharomyces* autóctonas de Galicia. En: *Reuniones del Grupo de Trabajo de Experimentación en Viticultura y Enología - 2017, 32ª Reunión (19 y 20 de abril de 2017)*. Valladolid. MAPA. ISBN: 978-84-491-1505-9. Págs. 179-186.
- D. Castrillo, N. Neira, M.J., Lorenzo, E. Soto y P. Blanco. 2018. Levaduras no-*Saccharomyces* autóctonas para reducir el grado alcohólico de los vinos. GIENOL 2018- XIV Congreso Nacional de Investigación Enológica. Ciudad Real. En prensa.
- D. Castrillo, E. Rabuñal, N. Neira, P. Blanco. 2018. Caracterización de la diversidad de levaduras asociada a uvas de cultivo ecológico y convencional en Galicia. GIENOL 2018- XIV Congreso nacional de Investigación Enológica. Ciudad Real. En prensa.
- Pilar Blanco, David Castrillo, Noemi Neira, Daniel Fornos, Elvira Soto y María Graña. 2019. Coinoculación de levaduras y bacterias lácticas: influencia en las características químicas y sensoriales del vino. En: *Reuniones del Grupo de Trabajo de Experimentación en Viticultura y Enología - 2018, 33ª Reunión (24 a 26 de abril de 2018)*. Ourense. MAPAMA. En prensa.

Congresos y reuniones científicas internacionales

- D. Castrillo, M. Sánchez, P. Blanco. 16-06-2016. Comunicación y Póster. Diversidad de levaduras en uva y mostos de producción ecológica en Galicia. VI Congreso Internacional de Agroecología. Vigo.
- P. Blanco, D. Castrillo, E. Soto, E. Díaz. 16-06-2016. Comunicación y Póster. Influencia do cultivo ecolóxico na produción e características do mosto das variedades de vide Treixadura e Mencía na DO Monterrei. VI Congreso Internacional de Agroecología. Vigo.
- D. Castrillo, E. Rabuñal, N. Neira, P. Blanco. 28 a 31-5-2018. Organic viticulture improves yeast diversity in grape musts from Galicia. Póster. Macrowine 2018. Zaragoza.
- D. Castrillo, E. Rabuñal, N. Neira, P. Blanco. 28 a 31-5-2018. Potential of non-*Saccharomyces* yeasts to mitigate effects of climate change in wine making. Póster. Macrowine 2018. Zaragoza.
- D. Castrillo, D. Fornos., P. Blanco. 7 a 9-11-2018. Sensorial and aroma profile of Treixadura wine is improved by sequential inoculation of autochthonous non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts. International Congress on Grapevine and Wine Sciences - ICGWS2018., Logroño, La Rioja, Spain. Aceptado.
- D. Castrillo, P. Blanco. 7 a 9-11-2018. Yeast biogeography in organic and conventional grapes and musts from Galicia (NW Spain). International Congress on Grapevine and Wine Sciences - ICGWS2018. Logroño, La Rioja, Spain. Aceptado.

Contribuciones a congresos, reuniones científicas y jornadas técnicas nacionales

- David Castrillo, Alba Camesella, Mónica Cid, María José Graña y Pilar Blanco. 25 y 26-3-2015. Comunicación. Evaluación microbiológica y sensorial de vino ecológicos de Galicia. 30ª Reunión del Grupo de Trabajo de Experimentación en Viticultura y Enología (GTEVE). Bilbao.
- David Castrillo, Mónica Cid, Alba Camesella, Elvira Soto y Pilar Blanco. 9 a 12-6-2015. Póster. Influencia de la población de levaduras en fermentaciones de mosto ecológico y convencional de la variedad Mencía en la DO Ribeira Sacra (Galicia). XIII Congreso Nacional de Investigación Enológica GIENOL 2015. Tarragona.
- David Castrillo, Mónica Cid, Alba Camesella, Pilar Blanco. 9 a 12-6-2015. Póster. Diversidad de levaduras en bodegas que elaboran vino ecológico en Galicia. XIII Congreso Nacional de Investigación Enológica GIENOL 2015. Tarragona.
- D. Castrillo. 28-10-2015. Ponencia. Particularidades de la enología y viticultura ecológica en la actualidad en Galicia. Jornada Técnica Tendencias actuales en viticultura. Viabilidad del cultivo ecológico en Galicia. Estación de Viticultura y Enología de Galicia (EVEGA). Monterrei, Ourense.
- P. Blanco, M. Sánchez, E. Díaz, D. Castrillo, E. Soto. 12 y 13-04-2016. Comunicación. Estudio de la riqueza fenólica en uvas de Brancellao y Mencía de cultivo ecológico y convencional en Galicia. 31ª Reunión del Grupo de Trabajo de Experimentación en Viticultura y Enología (GTVE). Madrid.
- D. Castrillo, R. Otero, P. Blanco. 12 y 13-04-2016. Comunicación. La elaboración de vino ecológico mediante fermentación espontánea en una bodega industrial favorece la diversidad de levaduras. 31ª Reunión del Grupo de Trabajo de Experimentación en Viticultura y Enología. Madrid.
- D. Castrillo, E. Trigo, M. J. Graña y P. Blanco. 26-05-2016. Póster. Comparación a nivel sensorial de vinos ecológicos y convencionales de Galicia. XVII Congreso Nacional de Enólogos. Mérida.
- David Castrillo, Eva Rabuñal, Noemi Neira y Pilar Blanco. 19 y 20 de abril de 2017. Comunicación. Fermentación de mostos de la variedad Treixadura con levaduras no-*Saccharomyces* autóctonas de Galicia. 32ª Reunión del Grupo de Trabajo de Experimentación en Viticultura y Enología. Valladolid.

- P. Blanco, D. Castrillo, N. Neira, D. Fornos, E. Soto, M. Graña. 25 y 26-4-2018. Comunicación. Coinoculación de levaduras y bacterias lácticas: influencia en las características químicas y sensoriales del vino. 33ª Reunión Anual del Grupo de Trabajo de Experimentación en Viticultura y Enología. Ourense.
- D. Castrillo, N. Neira, MJ. Lorenzo, E. Soto y P. Blanco. 26 a 29-6-2018. Comunicación y póster. Levaduras no-*Saccharomyces* autóctonas para reducir el grado alcohólico de los vinos. GIENOL 2018 - XIV Congreso nacional de Investigación Enológica. Ciudad Real.
- D. Castrillo, E. Rabuñal, N. Neira, P. Blanco. 26 a 29-6-2018. Comunicación y póster. Caracterización de la diversidad de levaduras asociada a uvas de cultivo ecológico y convencional en Galicia. GIENOL 2018 - XIV Congreso nacional de Investigación Enológica. Ciudad Real.
- Castrillo D, Blanco P. 14 a 17-11-2018. El sistema agroecológico del viñedo: reservorio de la biodiversidad de levaduras para la adaptación al cambio climático. XIII Congreso de Agricultura Ecológica: "Sistemas alimentarios agroecológicos y cambio climático". Sociedad Española de Agricultura Ecológica (SEAE). La Rioja.

Publicaciones divulgativas

- Pilar Blanco, Emilia Díaz, David Castrillo y Elvira Soto. 16-04-2016. Producción de mostos de origen ecológico en Galicia. SeVi nº 3468: 470-476.
- David Castrillo, Emiliano Trigo, María José Graña y Pilar Blanco. 2016. Comparación a nivel sensorial de vinos ecológicos y convencionales de Galicia. XVII Congreso nacional de Enólogos. 26-28 mayo, Mérida. La Semana Vitivinícola. Págs. 31.
- David Castrillo, Noemi Neira y Pilar Blanco. 11-11-2017. Diversidad de levaduras en bodegas ecológicas. SeVi nº 3.506: 1926-1932.
- David Castrillo y Pilar Blanco. 2017. Vino ecológico en Galicia: Evaluación sensorial y consideraciones futuras. Eneo nº 5: 30-35.
- David Castrillo, Eva Rabuñal, Noemi Neira y Pilar Blanco. 4-8-2018. El cultivo ecológico del viñedo en Galicia favorece la diversidad de levaduras. SeVi nº 3524: 1399-1405.
- David Castrillo y Pilar Blanco. 2018. Producción ecológica de Albariño: efecto sobre el mosto, la diversidad de levaduras y la fermentación. Eneo nº 11: 18-22.
- David Castrillo, Eva Rabuñal, Noemi Neira y Pilar Blanco. 2018. Reducción del grado alcohólico del vino mediante aplicación de levaduras no-*Saccharomyces*. SeVi. En prensa
- Concurso 3MT 2017. Universidad de León. Diversidad de levaduras en Galicia: uva eco vs convencional e influencia en el vino.

8. Referencias /References

8. Referencias/References

A

1. Albertin, W., Chasseriaud, L., Comte, G., Panfili, A., Delcamp, A., Salin, F., Marullo, P., Bely, M. 2014. Winemaking and bioprocesses strongly shaped the genetic diversity of the ubiquitous yeast *Torulaspora delbrueckii*. PLoS One. 9: 4, 942-946.
2. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. J. of Mol. Biol. 215, 403-410.
3. Álvarez Pérez, J. M. 2011. Aislamiento y caracterización genética y enológica en levaduras vínicas autóctonas de uva Prieto Picudo y caracterización aromática de sus vinos (DO «Tierra de León»). Tesis doctoral. UniLeón.
4. Álvarez-Pérez, J. M., Campo, E., San-Juan, F., Coque, J. J. R., Ferreira, V., Hernández-Orte, P. 2012. Sensory and chemical characterisation of the aroma of Prieto Picudo rosé wines: The differential role of autochthonous yeast strains on aroma profile. Food Chem. 133: 2, 284-292.
5. Anderson, M. J. 2001. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. Austral. Ecol. 26, 32-46.
6. Anderson, M. J., Walsh, D. C. I. 2013. PERMANOVA, ANOSIM, and the Mantel test in the face of heterogeneous dispersions: What null hypothesis are you testing? Ecol. Monogr. 83: 4, 557-574.
7. Andorrà, I., Berradre, M., Rozès, N., Mas, A., Guillamón, J. M., Esteve-Zarzoso, B. 2010. Effect of pure and mixed cultures of the main wine yeast species on grape must fermentations. Eur. Food Res. Technol. 231, 215-224.
8. Andorrà, I., Monteiro, M., Esteve-Zarzoso, B., Albergaria, H., Mas, A. 2011. Analysis and direct quantification of *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora guilliermondii* populations during alcoholic fermentation by fluorescence in situ hybridisation, flow cytometry and quantitative qPCR. Food Microbiol. 28,1483-1491.
9. Anfang, N., Brajkovich, M., Goddard, M. R. 2009. Co-fermentation with *Pichia kluyveri* increases varietal thiol concentrations in Savignon Blanc. Aust. J. Grape Wine. R. 15, 1-8.
10. Angioni, A., Caboni, P., Garau, A., Farris, A., Orro, D., Budroni, M., Cabras, P. 2007. In vitro interaction between Ochratoxin A and different strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. J. Agric. Food Chem. 55: 5, 2043-2048.
11. Apolinar-Valiente, R., Gómez-Plaza, E., Terrier, N., Doco, T., Ros-García, J. M. 2017. The composition of cell walls from grape skin in *Vitis vinifera* intraspecific hybrids. J. Sci. Food Agric. 97, 4029-4035.
12. Azabagaoglu, M. O., Akyol, A., Ozay, A. 2007. The demand for organic wines and organic wine marketing. J. Environm. Prot. Ecol. 8, 171-178.
13. 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.

B

14. Bacon, C. W., White, J. F. 2016. Functions, mechanisms and regulation of endophytic and epiphytic microbial communities of plants. Symbiosis. 68, 87-98.
15. Bagheri, B., Bauer, F. F., Setati, M. E. 2015. The Diversity and Dynamics of Indigenous Yeast Communities in Grape Must from Vineyards Employing Different Agronomic Practices and their Influence on Wine Fermentation. S. Afr. J. Enol. Vitic. 36: 2, 243-251.
16. Balboa-Lagunero, T., Arroyo, T., Cabellos, J. M., Aznar, M., 2013. Yeast selection as a tool for reducing key oxidation notes in organic wines. Food Res. Int. 53, 252-259.
17. Barata, A., Seborro, F., Belloch, C., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V. 2008. Ascomycetous yeast species recovered from grapes damaged by honeydew and sour rot. J. Appl. Microbiol. 104: 4, 1182-1191.
18. Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V. 2012. The microbial ecology of wine grape berries. Int. J. Food Microbiol. 153, 243-259.
19. Belda, I., Ruiz, J., Esteban-Fernández, A., Navascués, E., Marquina, D., Santos, A., Moreno-Arribas, M. V. 2017a. Microbial contribution to wine aroma and its intended use for wine quality improvement. Molecules. 22: 2.
20. Belda, I., Zorraonandia, I., Perisin, M., Palacios, A., Acedo A. 2017b. From Vineyard Soil to Wine Fermentation: Microbiome Approximations to Explain the "terroir" Concept. Front. Microbiol. 8: 821.
21. Beltran, G., Torija, M. J., Novo, M., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamón, J. M., Rozès, N., Mas, A. 2002. Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: a six year follow up study. Syst. Appl. Microbiol. 25, 287-293.
22. 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.

23. Benito, S., Palomero, F., Calderón, F., Palmero, D., Suárez-Lepe, J. A. 2013. Selection of appropriate *Schizosaccharomyces* strains for winemaking. *Food Microbiol.* 42, 218-224.
 24. Bisson, L. F., Lucy Joseph, C. M., Domicio, P. 2017. Yeasts. König, H., Uden, G., Fröhlich, J. (Eds.), *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Springer Berlin Heidelberg, 2^a Ed., 65-103.
 25. Blanco, P., Ramilo, A., Cerdeira, M., Orriols, I. 2006. Genetic diversity of wine *Saccharomyces cerevisiae* strains in an experimental winery from Galicia (NW Spain). *A. Van Leeuw. J. Microb.* 89, 351-357.
 26. Blanco, P., Orriols, I., Losada, A. 2011. Survival of commercial yeasts in the winery environment and their prevalence during spontaneous fermentations. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38, 235-239.
 27. Blanco, P., Mirás-Avalos, J. M., Orriols, I. 2012. Effect of must characteristics on the diversity of *Saccharomyces* strains and their prevalence in spontaneous fermentations. *J. Appl. Microbiol.* 112: 936-944.
 28. Blanco, P., Mirás-Avalos, J. M., Pereira, E., Orriols, I. 2013. Fermentative aroma compounds and sensory profiles of Godello and Albariño wines as influenced by *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains. *J. Sci. Food Agr.* 93: 11, 2849-2857.
 29. Blanco, P., Díaz, E., Lamas, A., Trigo, E., Soto, E., Rego, F. 2014a. Cultivo ecológico das variedades de vide Treixadura e Brancellao no Ribeiro: produción e características do mosto. *Propostas agroecolóxicas ao industrialismo. Recursos compartidos e respostas colectivas*. ISBN 978-84-617-2311-9. Ed. X. Simón, D. 100-107.
 30. Blanco, P., Díaz, E., Lamas, A., Soto, E., Rego, F. 2014b. Evaluación del cultivo ecológico y convencional de la variedad Mencía en la DO Ribeira Sacra (Galicia). 29^a Reunión del GTEVE. 85-91.
 31. Blanco, P., Díaz, E., Mirás-Avalos, J. M., Lamas, A., Soto, E. 2014c. Evaluación de la producción y características del mosto en variedades gallegas bajo cultivo ecológico y convencional en DO Rías Baixas. *Actas de Horticultura: I Jornada del GTVE. Comunicaciones*. ISBN: 978-84-8125-657-8. 70, 262-267.
 32. Blanco et al. 2014d. Guía sobre la utilización de levaduras no-*Saccharomyces* en la elaboración de vino. Anexo a la 28^a Reunión del GTVE. Ed. Magrama. ISBN: 978-84-491-1382-6.
 33. Blanco, P., Díaz, E., Castrillo, D., Soto, E. 2016. Producción de mostos de origen ecológico en Galicia. *SeVi.* 3468, 470-476.
 34. Blanco-Ward, D., García Queijeiro, J. M., Jones, G.V. 2007. Spatial climate variability and viticulture in the Miño River Valley of Spain. *Vitis J. Grapevine Res.* 46: 2, 63-70.
 35. Blouin, C., Peynaud, É. 2004. *Enología Práctica. Conocimiento y elaboración del vino*. Ed. Mundi-Prensa.
 36. Bokulich, N. A., Thorngate, J. H., Richardson, P. M., Mills, D. A. 2014. Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 111: 1, E139-E148.
 37. Bokulich, N. A., Collins, T. S., Masarweh, C., Allen, G., Heymann, H., Ebeler, S. E., Mills, D. A. 2016. Associations among wine grape microbiome, metabolome, and fermentation behavior suggest microbial contribution to regional wine characteristics. *mBio.* 7: 3, art. no. e00631-16.
 38. Bonn, M. A., Cronin, J. J., Cho, M. 2015. Do Environmental Sustainable Practices of Organic Wine Suppliers Affect Consumers' Behavioral Intentions? The Moderating Role of Trust. *Cornell Hospitality Quarterly.*
 39. Boto, J. A., Cabezón, D., González, P. 2014. Elaboración de vino rosado, de madreo, con la variedad vinífera Prieto Picudo en la DO Tierra de León. *Wine Tech Plus.* 3, 23-25.
 40. Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F., Kunkee, R. E. 1996. *Principles and Practices of Winemaking*. Chapman and Hall, New York. 102-181, 244-273, 352-378.
 41. Bouzas-Cid, Y., Falqué, E., Orriols, I., Mirás-Avalos, J. M. 2018. Effects of irrigation over three years on the amino acid composition of Treixadura (*Vitis vinifera* L.) musts and wines, and on the aromatic composition and sensory profiles of its wines. *Food Chem.* 240, 707-716.
 42. Brandt, K., Mølgaard, J. P. 2001. Organic agriculture: does it enhance or reduce the nutritional value of plant foods? *J. Sci. Food Agric.* 81, 924-931.
 43. Bult, J. H. F., Schifferstein, H. N. J., Roozen, J. P., Boronat, E. D., Voragen, A. G. J., Kroeze, J. H. A. 2002. Sensory evaluation of character impact components in an apple model mixture. *Chem. Senses.* 27: 6, 485-494.
- C**
44. Cabras, P., Angioni, A. 2000. Pesticide residues in grapes, wine, and their processing products. *J. Agric. Food Chem.* 48, 967-973.
 45. Cacho, J., Fernández, P., Ferreira, V., Castells, J. E. 1992. Evolution of five anthocyanin-3-glucosides in the skin of the Tempranillo, Moristel and Garcnacha grape varieties and influence of climatological variables. *Am. J. Enol. Vitic.* 43, 244-248.
 46. Čadež, N., Zupan, J., Raspor, P. 2010. The effect of fungicides on yeast communities associated with grape berries. *FEMS Yeast Res.* 10, 619-630.
 47. Callejon, R. M., Clavijo, A., Ortigueira, P., Troncoso, A. M., Paneque, P., Morales, M. L. 2010. Volatile and sensory profile of organic red wines produced by different selected autochthonous and commercial *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Anal. Chim. Acta.* 660: 1-2, 68-75.

48. Cancela, J. J., Trigo-Córdoba, E., Martínez, E. M., Rey, B. J., Bouzas-Cid, Y., Fandiño, M., Mirás-Avalos, J. M. 2016. Effects of climate variability on irrigation scheduling in white varieties of *Vitis vinifera* (L.) of NW Spain. *Agr. Water Manage.* 170, 99-109.
49. Canonico, L., Comitini, F., Oro, L., Ciani, M. 2016. Sequential fermentation with selected immobilized non-*Saccharomyces* yeast for reduction of ethanol content in wine. *Frontiers Microbiol.* 7: 278.
50. Capece, A., Fiore, C., Maraz, A., Romano, P. 2005. Molecular and technological approaches to evaluate strain biodiversity in *Hanseniaspora uvarum* of wine origin. *J. Appl. Microbiol.* 98: 1, 136-144.
51. Capece, A., Romaniello, R., Siesto, G., Pietrafesa, R., Massari, C., Poeta, C., Romano, P. 2010. Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for Nero d'Avola wine and evaluation of selected starter implantation in pilot fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 144: 187-92.
52. Capece, A., Romaniello, R., Siesto, G., Romano, P. 2012. Diversity of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts associated to spontaneously fermenting grapes from an Italian "heroic vine-growing area". *Food Microbiol.* 31, 159-166.
53. Capozzi, V., Russo, P., Beneduce, L., Weidmann, S., Grieco, F., Guzzo, J., Spano, G. 2010. Technological properties of *Oenococcus oeni* strains isolated from typical southern Italian wines. *Lett. Appl. Microbiol.* 50: 3, 327-334.
54. Capozzi, V., Ladero, V., Beneduce, L., Fernández, M., Alvarez, M. A., Benoit, B., Laurent, B., Grieco, F., Spano, G. 2011. Isolation and characterization of tyramine-producing *Enterococcus faecium* strains from red wine. *Food Microbiol.* 28: 3, 434-439.
55. Capozzi, V., Garofalo, C., Chiriatti, M. A., Grieco, F., Spano, G. 2015. Microbial terroir and food innovation: The case of yeast biodiversity in wine. *Microbiol. Res.* 181, 75-83.
56. Cappello, M. S., Stefani, D., Grieco, F., Logrieco, A., Zapparoli, G. 2008. Genotyping by amplified fragment length polymorphism and malate metabolism performances of indigenous *Oenococcus oeni* strains isolated from Primitivo wine. *Int. J. Food Microbiol.* 127, 241-245.
57. Cappello, M. S., Zapparoli, G., Logrieco, A., Bartowsky, E. J. 2017. Linking wine lactic acid bacteria diversity with wine aroma and flavour. *Int. J. Food Microbiol.* 243, 16-27.
58. Cardoso, L. A. C., Jäckel, S., Karp, S. G., Framboisier, X., Chevalot, I., Marc, I. 2016. Improvement of *Sporobolomyces ruberrimus* carotenoids production by the use of raw glycerol. *Bioresource Technol.* 200, 374-379.
59. Caridi A., Cufari J. A., Ramondino, D. 2002. Isolation and clonal pre-selection of enological *Saccharomyces*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 48: 5, 261-267.
60. Carrascosa, A. V., Muñoz, R., González, R. 2005. *Microbiología del Vino*. AMV, Madrid (España).
61. Caruso, M., Capece, A., Salzano, G., Romano, P. 2002. Typing of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata* strains from Aglianico wine. *Lett. Appl. Microbiol.* 34: 5, 323-328.
62. Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J., Pons, M. 1992. The origin of ethylphenols in wines. *J. Sci. Food Agric.* 60, 165-78.
63. Charoenchai, C., Fleet, G. H., Henschke, P. A. 1998. Effects of Temperature, pH, and Sugar Concentration on the Growth Rates and Cell Biomass of Wine Yeasts. *Am J Enol Vitic.* 49, 283-288.
64. Ciani, M., Ferraro, L. 1998. Combined use of immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae* to improve the quality of wines. *J. Appl. Microbiol.* 85: 2, 247-254.
65. Ciani, M., Maccarelli, F. 1998. Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *World J. Microb. Biot.* 14, 199-203.
66. Ciani, M., Mannazzu, I., Marinangeli, P., Clementi, F., and Martini, A. 2004. Contribution of winery-resident *Saccharomyces cerevisiae* strains to spontaneous grape must fermentation. *A. Van Leeuw.* 85, 159-164.
67. Ciani, M., Beco, L., Comitini, F. 2006. Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeasts fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 108, 239-245.
68. Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., Domizio, P. 2010. Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Res.* 10, 123-133.
69. Ciani, M., Comitini, F. 2015. Yeast interactions in multi-starter wine fermentation. *Curr. Opin. Food Sci.* 1, 1-6.
70. Clarke, K. R. 1993. Non-parametric multivariate analysis of changes in community structure. *Aust. J. Ecol.* 18, 117-143.
71. Clemente-Jiménez, J. F., Mingorance-Cazorla, L., Martínez-Rodríguez, S., Las Heras-Vázquez, F. J., Rodríguez-Vico, F. 2004. Molecular characterization and oenological properties of wine yeast isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. *Food Microbiol.* 21, 149-155.
72. Cocolin, L., Heisey, A., Mills, D. A. 2001. Direct identification of the indigenous yeasts in commercial wine fermentations. *Am. J. Enol. Viticult.* 52: 1, 49-53.
73. Combina, M., Mercado, L., Borgo, P., Elia, A., Jofré, V., Ganga, A., Martinez, C., Catania, C. 2005. Yeasts associated to Malbec grape berries from Mendoza, Argentina. *J. Appl. Microbiol.* 98, 1055-1061.
74. Comitini, F., Ingeniis De, J., Pepe, L., Mannazzu, I., Ciani, M. 2004. *Pichia anomala* and *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxins as new tools against *Dekkera/Brettanomyces* spoilage yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* 238: 1, 235-240.

75. Comitini, F., Ciani, M. 2008. Influence of fungicide treatments on the occurrence of yeast flora associated with wine grapes. *Ann. Microbiol.*, 58: 3, 489-493.
76. Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., Ciani, M. 2011. Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.* 28: 5, 873-882.
77. Comuzzo, P., Kurtzut, D., Werner, M., Lagazio, C., Zironi, R., 2013. A survey on wines from organic viticulture from different European countries. *Food Control.* 34, 274-282.
78. Conde González, J. C., Rodríguez Delgado M. A., Rodríguez Bencomo J. J., Cabrera Valido H., Pérez Trujillo J. P. 2010. Determinación de volátiles mayoritarios en vinos tintos de las islas canarias. Delgado-Díaz S., editor. *Aportaciones al conocimiento del vino canario*. La Laguna: Editorial Instituto de Estudios Canarios.
79. Consellería do Medio Rural de la Xunta de Galicia. 2017. *Medio Rural. Anuario de estadística agraria*.
80. Constantí, M., Poblet, M., Arola, L., Mas, A., Guillamón, J. M. 1997. Analysis of Yeast Populations During Alcoholic Fermentation in a Newly Established Winery. *Am. J. Enol. Vitic.* 48, 339-344.
81. Coppola, L., Comitini, F., Casucci, C., Milanovic, V., Monaci, E., Marinozzi, M., Taccari, M., Ciani, M., Vischetti, C. 2011. Fungicides degradation in an organic biomixture: Impact on microbial diversity. *New Biotechnol.* 29: 1, 99-106.
82. Çorbacı, C., Uçar, F. B. 2017. Production and optimization of killer toxin in *Debaryomyces hansenii* strains. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 60, art. no. e170339.
83. Cordero-Bueso, G., Arroyo, T., Serrano, A., Tello, J., Aporta, I., Vélez, M. D., Valero, E. 2011a. Influence of the farming system and vine variety on yeast communities associated with grape berries. *Int. J. Food Microbiol.* 145, 132-139.
84. Cordero-Bueso, G., Arroyo, T., Serrano, A., Valero, E. 2011b. Influence of different floor management strategies of the vineyard on the natural yeast population associated with grape berries. *Int. J. Food Microbiol.* 148: 1, 23-29.
85. Cordero-Bueso, G., Arroyo, T., Serrano, A., Valero, E. 2011c. Remanence and survival of commercial yeast in different ecological niches of the vineyard. *FEMS Microbiol. Ecol.* 77: 2, 429-437.
86. Cordero-Bueso, G., Arroyo, T., Valero, E. 2014. Grape-berries yeast populations: Influence of vineyard management. Book chapter. *Grapes: Production, Phenolic Composition and Potential Biomedical Effects*, 27-45.
87. Cortés, S., Blanco, P. 2011. Yeast strain effect on the concentration of major volatile compounds and sensory profile of wines from *Vitis vinifera* var. Treixadura. *World J. Microb. Biot.* 27: 4, 925-932.
88. Cortés-Diéguez, S., Rodríguez-Solana, R., Domínguez, J. M., Díaz, E. 2015. Impact odorants and sensory profile of young red wines from four Galician (NW of Spain) traditional cultivar. *J. Inst. Brew.* 121, 628-635.
89. Costanigro, M., Appleby, C., Menke, S. D. 2014. The wine headache: consumer perceptions of sulfites and willingness to pay for non-sulfited wines. *Food Qual. Preference.* 31, 81-89.
90. Cozzolino, D., Cynkar, W. U., Shah, N., Damberg, R. G., Smith, P. A. 2009. A brief introduction to multivariate methods in grape and wine analysis, *Int. J. Wine Res.* 1, 123-130.
91. CRAEGA 2017. *Estadísticas. Memoria anual de actividades do ano 2015 do Consello Regulador da Agricultura Ecolóxica de Galicia*.
92. Csoma, H., Zakany, N., Capece, A., Romano, P., Sipiczki, M. 2010. Biological diversity of *Saccharomyces* yeasts of spontaneously fermenting wines in four wine regions: comparative genotypic and phenotypic analysis. *Int. J. Food Microbiol.* 140, 239-248.

D

93. da Costa, A., Delgadillo, I., Rudnitskaya, A. 2014. Detection of copper lead, cadmium and iron in wine using electronic tongue sensor system. *Talanta.* 129, 63-71.
94. D'Amico, M., Di Vita, G., Monaco, L. 2016. Exploring environmental consciousness and consumer preferences for organic wines without sulfites. *J. Clean. Prod.* 120, 64-71.
95. Davis, J. C. 1986. *Statistics and Data Analysis in Geology*. John Wiley & Sons.
96. Di Maio, S., Polizzotto, G., Di Gangi, E., Foresta, G., Genna, G., Verzera, A., Scacco, A., Amore, G., Oliva, D. 2012. Biodiversity of indigenous *Saccharomyces* populations from old wineries of South-Eastern Sicily (Italy): preservation and economic potential. *PLoS ONE* 7: e30428.
97. Diaz, C., Molina, A. M., Nahring, J., Fischer, R. 2013. Characterization and dynamic behavior of wild yeast during spontaneous wine fermentation in steel tanks and amphorae. *BioMed Res. Int.* Article ID 540465.
98. Díaz Losada, E., Orriols Fernández, I., Rego Martínez, F., Tato Salgado, A., Ramos Cabrer, A., Pereira Lorenzo, S. 2011. *A colección de vides da Estación de Viticultura e Enoloxía de Galicia*. Xunta de Galicia. Consellería do Medio Rural. ISBN 978-84-453-5003-4.
99. Díaz-Losada, E., Tato Salgado, A., Orriols, I., Ramos-Cabrer, A., Pereira-Lorenzo, S. 2013. New Synonyms and Homonyms for Cultivars from Northwestern Spain. *Am. J. Enol. Viticult.* ajev.2012.11097.

100. Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Comitini, F., Gobbi, M., Mannazzu, I., 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. *Int. J. Food Microbiol.* 147: 3, 170-180.
101. Domizio, P., Liu, Y., Bisson, L. F., Barile, D. 2014. Use of non-*Saccharomyces* wine yeasts as novel sources of mannoproteins in wine. *Food Microbiol.* 43: 5-15.
102. Dravnieks, A., Bock, F. C., 1978. Comparison of odours directly and through profiling. *Chem. Senses.* 191-225.
103. Drumonde-Neves, J., Franco-Duarte, R., Lima, T., Schuller, D., Pais, C. 2016. Yeast Biodiversity in Vineyard Environments Is Increased by Human Intervention. *PLoS ONE* 11: 8.
104. Drumonde-Neves, J., Franco-Duarte, R., Lima, T., Schuller, D., Pais, P. 2017. Association between Grape Yeast Communities and the Vineyard Ecosystems. *PLoS ONE* 12: 1.
105. Dubois, P. 1994. Les arômes des vins et leurs défauts. *Rev Française Enol.* 145, 27-40.
106. Du Toit, M., Pretorius, I. S. 2000. Microbial spoilage and preservation of wine: using weapons from nature's own arsenal – a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21, 74-96.

E

107. Englezos, V., Rantsiou, K., Torchio, F., Rolle, L., Gerbi, V., Cocolin, L. 2015. Exploitation of the non-*Saccharomyces* yeast *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) in wine fermentation: physiological and molecular characterizations. *Int. J. Food Microbiol.* 199, 33-40.
108. Englezos, V., Rantsiou, K., Cravero, F., Torchio, F., Ortiz-Julien, A., Gerbi, V., Rolle, L., Cocolin, L. 2016a. *Starmerella bacillaris* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed fermentations to reduce ethanol content in wine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 5515-5526.
109. Englezos, V., Torchio, F., Cravero, F., Marengo, F., Giacosa, S., Gerbi, V., Rantsiou, K., Rolle, L., Cocolin, L. 2016b. Aroma profile and composition of Barbera wines obtained by mixed fermentations of *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) and *Saccharomyces cerevisiae*. *LWT - Food Sci. Technol.* 73: 567-575.
110. Englezos V., Giacosa, S., Rantsiou, K., Rolle, L., Cocolin, L. 2017 *Starmerella bacillaris* in winemaking: opportunities and risks. *Curr. Opin. Food Sci.* 17, 30-35.
111. Escudero, A., Gogorza, B., Melús, M. A., Ortín, N., Cacho, J., Ferreira, V. 2004. Characterization of the aroma of a wine from Macabeo. Key role played by compounds with low odor activity values. *J. Agric. Food Chem.* 52, 3516-3524.
112. Esteve-Zarzoso, B., Manzanales, P., Ramón, D., Querol, A. 1998. The role of non-*Saccharomyces* yeasts in industrial winemaking. *Int. Microbiol.* 1, 143-148.
113. Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F. M., Querol, A. 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 329-337.
114. Etiévant, P. X. 1991. Wine, in *Volatile Compounds in Food and Beverages*, (Maarse, H. Ed.), Marcel Dekker, New York. 483-546.
115. European Commission, 2016. Facts and figures on organic agriculture in the European Union. *Agric. and Rural Dev. Eur. Comm.* 31-34.

F

116. Falqué, E., Fernández, E., Dubourdieu, D. 2002. Volatile components of Loureira, Dona Branca and Treixadura wines. *J. Agric. Food Chem.* 50, 538-543.
117. Fernández-González, M., Di Stefano, R., Briones, A. 2003. Hydrolysis and transformation of terpene glycosides from muscat must by different yeast species. *Food Microbiol.* 20, 35-41.
118. Fernández-González, M., Rodríguez-Rajo, F. J., Jato, V., Aira, M. J., Ribeiro, H., Oliveira, M., Abreu, I. 2012. Forecasting ARIMA models for atmospheric vineyard pathogens in Galicia and Northern Portugal: *Botrytis cinerea* spores. *Ann. Agr. Env. Med.* 19: 2, 255-262.
119. Ferreira, J., Toit, M. D., Toit, W. J. D. 2006. The effects of copper and high sugar concentrations on growth, fermentation efficiency and volatile acidity production of different commercial wine yeast strains. *Aust. J. Grape Wine Res.* 12, 50-56.
120. Ferreira, V., López, R., Cacho, J. 2000. Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties. *J. Sci. Food Agric.* 80, 1659-1667.
121. Fleet, G. H., Lafon-Lafourcade, S., Ribéreau-Gayon, P. 1984. Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. *Appl. Environm. Microbiol.* 48, 1034-1038.
122. Fleet, G. H., Heard, G. M. 1993. Yeast grown during fermentation. Fleet, G. H. (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland. 27-55.
123. Fleet, G. H., Prakitchaiwattana, G., Beh, A., Heard, G. 2002. The Yeast ecology of wine grapes. Ciani, M. (Ed.), *Biodiversity and Biotechnology of Wine Yeasts*. Research Signpost. 1-17.
124. Fleet, G. H. 2003. Yeast interactions and wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 11-22.
125. Fleet, G. H. 2008. Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast. Res.* 8, 979-995.

126. Fraga, H., Malheiro, A. C., Moutinho-Pereira, J., Cardoso, R. M., Soares, P. M. M., Cancela, J. J., Pinto, J. G., Santos, J. A. 2014. Integrated analysis of climate, soil, topography and vegetative growth in iberian viticultural regions. PLoS ONE. 9: 9, art. no. 0108078.
127. Fragoulis, G., Trevisan, M., Di Guardo, A., Sorce, A., van der Meer, M., Weibel, F., Capri, E. 2009. Development of a management tool to indicate the environmental impact of organic viticulture. J. Environ. Qual. 38: 2, 826-835.
128. Francesca, N., Canale, D. E., Settanni, L., Moschetti, G. 2012. Dissemination of wine-related yeasts by migratory birds. Environm. Microbiol. Reports. 4: 1, 105-112.
129. Francis, I. L., Newton, J. L. 2005. Determining wine aroma from compositional data. Aust. J. Grape Wine R. 11: 2, 114-126.

G

130. Garofalo, C., Tristezza, M., Grieco, F., Spano, G., Capozzi, V. 2016. From grape berries to wine: population dynamics of cultivable yeasts associated to "Nero di Troia" autochthonous grape cultivar. World J. Microb. Biot. 32: 4, 59, 1-10.
131. Gayevskiy, V., Goddard, M. R. 2012. Geographic delineations of yeast communities and populations associated with vines and wines in New Zealand. ISME Journal. 6: 7, 1281-1290.
132. Ghosh, S., Bagheri, B., Morgan, H. H., Divol, B., Setati, M. E. 2015. Assessment of wine microbial diversity using ARISA and cultivation-based methods. Ann. Microbiol. 65, 1833-1840.
133. Gil, M., Yuste, J. 2004. Phenolic maturity of tempranillo grapevine trained as goblet, under different soil and climatic conditions in the Duero valley area. J. Int. Sci. Vigne Vin. 38, 81-88.
134. Gilbert, J. A., van der Lelie, D., Zarraonaindia, I. 2014. Microbial terroir for wine grapes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 111: 1, 5-6.
135. Gobbi, M., Comitini, F., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., Ciani, M. 2013. *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: A strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine. Food Microbiol. 33, 271-281.
136. Gobbi, M., De Vero, L., Solieri, L., Comitini, F., Oro, L., Giudici, P., Ciani, M. 2014. Fermentative aptitude of non-*Saccharomyces* wine yeast for reduction in the ethanol content in wine. Eur. Food Res. Technol. 239, 41-48.
137. Gómez García-Carpintero, E., Sánchez-Palomo, E., Gómez-Gallego, M. A., González-Viñas, M. A. 2012. Characterization of impact odorants and sensory profile of Bobal red wines from Spain's La Mancha region, Flav. Fragr. J. 27, 60-68.
138. Gomez-Miguez, M. J., Cacho, J. F., Ferreira, V., Vicario, I. M., Heredia, F. J. 2007. Volatile components of Zalema white wines, Food Chem. 100, 1464-1473.
139. Gonzalez, R., Quirós, M., Morales, P. 2013. Yeast respiration of sugars by non-*Saccharomyces* yeast species: a promising and barely explored approach to lowering alcohol content of wines. Trends Food Sci. Technol. 29, 55-61.
140. González-Neves, G., Gil, G., Ferrer, M., Craramelo, D., Balado, J., Boichichio, R., Gatto, G., Tessore, A. 2010. Prediction of the color and polyphenolic composition of the young red wines from the phenolic potential of the grapes. Int. J. Food Sci. Technol. 45, 1843-1851.
141. González-Pombo, P., Fariña, L., Carrau, F., Batista-Viera, F., Brena, B. M. 2011. A novel extracellular β -glucosidase from *Issatchenkia terricola*: isolation, immobilization and application for aroma enhancement of white Muscat wine. Process. Biochem. 46: 1, 385-389.
142. González-Rodríguez, R. M., Cancho-Grande, B., Simal-Gándara, J. 2009. Efficacy of new commercial formulations to control downy mildew and dissipation of their active fungicides in wine after good agricultural practices. J. Sci. Food Agr. 89: 15, 2625-2635.
143. Gracia-Romero, J. P. 2002. Colorimetric method for determining the color of wine from the grape. European patent. EP 1324016, US patent 7, 301, 635.
144. Granato, D., Margraf, T., Brotzakis, I., Capuano, E., van Ruth, S. M. 2014. Characterization of conventional, biodynamic, and organic purple grape juices by chemical markers antioxidant capacity, and instrumental taste profile. J. Food Sci. 80, C55-C65.
145. Grangeteau, C., Roullier-Gall, C., Rousseaux, S., Gougeon, R. D., Schmitt-Kopplin, P., Alexandre, H., Guilloux-Benatier, M. 2017a. Wine microbiology is driven by vineyard and winery anthropogenic factors. Microb. Biotechnol. 10: 2, 354-370.
146. Grangeteau, C., David, V., Hervé, A., Guilloux-Benatier, M., Rousseaux, S. 2017b. The sensitivity of yeasts and yeasts-like fungi to copper and sulfur could explain lower yeast biodiversity in organic vineyards. FEMS Yeast Res. 17: 8.
147. Greenacre, M. 2010. Biplots in practice. Fundación BBVA.
148. Griebeler, N., Polloni, A. E., Remonato, D., Arbter, F., Vardanega, R., Cechet, J. L., Di Luccio, M., Oliveira, D., Treichel, H., Cansian, R. L., Rigo, E., Ninow, J. L. 2011. Isolation and screening of lipase-producing fungi with hydrolytic activity. Food Bioproc. Technol. 4, 578-586.
149. Grieco, F., Tristezza, M., Vetrano, C., Bleve, G., Panico, E., Mita, G., Logrieco, A. 2010. Exploitation of autochthonous micro-organism potential to enhance the quality of Apulian wines. Ann. Microbiol. 61, 67-73.

150. Guerrero, R. F., Cantos-Villar, E., 2015. Demonstrating the efficiency of sulphur dioxide replacements in wine: a parameter review. *Trends Food Sci. Technol.* 42, 27–43.
151. Guillamón, J. M., Sabaté, J., Barrio, E., Cano, J., Querol, A. 1998. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Arch. Microbiol.* 169, 387-392.
152. Guth, H. 1997. Quantitation and sensory studies of character impact odorants of different white wine varieties. *J. Agric. Food Chem.* 45, 3027–3032.
153. Gutiérrez, A., Boekhout, T., Gojkovic, Z., Katz, M. 2018. Evaluation of non-saccharomyces yeasts in the fermentation of wine, beer and cider for the development of new beverages. *J. I. Brewing*. Article in press
154. Guymon, J. F. 1964. Studies of higher alcohol formation by yeasts through gas chromatography. *Qual. Plant. Mater. Veg.* 11: 2-4, 194-201.
155. Guzzon, R., Widmann, G., Settanni, L., Malacarne, M., Francesca, N., Larcher, R. 2011. Evolution of Yeast Populations during Different Biodynamic Winemaking Processes. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 32: 2, 242–250.
156. Guzzon, R., Franciosi, E., Larcher, R. 2014. A new resource from traditional wines: Characterization of the microbiota of “Vino Santo” grapes as a biocontrol agent against *Botrytis cinerea*. *Eur. Food Res. Technol.* 239: 1, 117-126.
157. Guzzon, R., Gugole, S., Zanzotti, R., Malacarne, M., Larcher, R., von Wallbrunn, C., Mescalchin, E. 2015. Evaluation of the oenological suitability of grapes grown using biodynamic agriculture: The case of a bad vintage (Article). *J. Appl. Microbiol.* 120: 2, 355-365.

H

158. Hansen, E. H., Nissen, P., Sommer, P., Nielsen, J. C., Arneborg, N. 2001. The effect of oxygen on the survival of non-*Saccharomyces* yeasts during mixed culture fermentations of grape juice with *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Microbiol.* 91, 541-547.
159. Henschke, P. A., Jiranek, V. 1993. Yeasts-metabolism of nitrogen compounds. In *Wine Microbiology and Biotechnology*. Ed. Fleet, G. H. Chur, Switzerland: Harwood Academic.77–164.
160. Hernández-Orte, P., Lapeña, A. C., Peña-Gallego, A., Astrain, J., Baron, C., Pardo, I., Polo, L., Ferrer, S., Cacho, J., Ferreira, V. 2008. Biogenic amine determination in wine fermented in oak barrels. Factors affecting formation. *Food Res. Int.* 41, 697–706.
161. Herzog, K., Wind, R., Töpfer, R. 2015. Impedance of the grape berry cuticle as a novel phenotypic trait to estimate resistance to *Botrytis cinerea*. *Sensors.* 15, 12498–12512.
162. Hidalgo, T. J. 2003. *Tratado de Enología*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. ISBN: 84-8476-135-5.
163. Hierro, N., González, A., Mas, A., Guillamón, J. M. 2006. Diversity and evolution of non-*Saccharomyces* yeast populations during wine fermentation: effect of grape ripeness and cold maceration. *FEMS Yeast Res.* 6, 102-111.
164. Hussein, A. S., Inaam, N. A., Noor, N. B. 2014. Evaluate the efficiency of the two of species yeast *Candida dubliniensis* and *Candida glabrata* in reducing pollutants from wastewater using the batch system. *Int. J. of Adv. Res.* 2: 9, 546-550.
165. Hyun, S. H., Mun, H. Y., Lee, H. B., Kim, H. K., Lee, J. S. 2013. Isolation of yeasts from wild flowers in Gyonggi-do Province and Jeju island in Korea and the production of anti-gout xanthine oxidase inhibitor. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology.* 41: 4, 383-390.

I

166. Inácio, J., Ludwig, W., Spencer-Martins, I., Fonseca, A. 2009. Assessment of phylloplane yeasts on selected Mediterranean plants by FISH with group- and species-specific oligonucleotide probes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 71: 1, 61–72.
167. Ivey, M. L., Phister, T. G. 2011. Detection and identification of microorganisms in wine: A review of molecular techniques. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38, 1619–1634.

J

168. Jackson, D. I., Lombard, P. D. 1993. Environmental and Management Practices Affecting Grape Composition and Wine Quality- A Review. *Am. J. Enol. Vitic.* 44: 4.
169. Jara, C., Laurie, V. F., Mas, A., Romero, J. 2016. Microbial Terroir in Chilean Valleys: Diversity of Non-conventional Yeast. *Front. Microbiol.* 7: 663.
170. Jolly, N. P., Augustyn, O. P. H., Pretorius, I. S. 2003a. The effect of non-*Saccharomyces* yeasts on fermentation and wine quality. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 24: 2, 55-62.
171. Jolly, N. P., Augustyn, O. P. H., Pretorius, I. S. 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. *S. Afr. Enol. Vitic.* 24: 2, 35-42.
172. Jolly, N. P., Augustyn, O. P. H., Pretorius, I. S. 2006. The Role and Use of Non *Saccharomyces* Yeasts in Wine Production. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 27, 15-39.
173. Jolly, N. P., Varela, C., Pretorius, I. S. 2014. Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Res.* 14, 215–237.

K

174. Katalinić, V., Možina, S. S., Skroza, D., Generalić, I., Abramović, H., Miloš, M., Ljubenković, I., Piskernik, S., Pezo, I., Terpinč, P., Boban, M. 2010. Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). *Food Chem.* 119, 715–723.
175. Keller, M., Rogiers, S. Y., Schultz, H. R. 2015. Nitrogen and ultraviolet radiation modify grapevines' susceptibility to powdery mildew. *Vitis*. 42, 87–94.
176. Killian, R. E., Ough, C. S. 1979. Fermentation esters-formation and retention as affected by fermentation temperature. *Am. J. Enol. Vitic.* 30, 301-305.
177. Kim, D. H., Hong, Y. A., Park, H. D. 2008. Co-fermentation of grape must by *Issatchenkia orientalis* and *Saccharomyces cerevisiae* reduces the malic acid content in wine. *Biotechnol. Lett.* 30, 1633–1638.
178. Knight, S., Klaere, S., Fedrizzi, B., Goddard, M. R. 2015. Regional microbial signatures positively correlate with differential wine phenotypes: Evidence for a microbial aspect to terroir. *Sci. Rep.* 5, art. no. 14233.
179. Kot, A. M., Blažejak, S., Gientka, I., Kieliszek, M., Bryś, J. 2018. Torulene and torularhodin: "new" fungal carotenoids for industry? *Microb. Cell. Fact.* 17: 49.
180. Kotseridis, Y., Baumes, R. 2000. Identification of impact odorants in Bordeaux red grape juice, in the commercial yeast used for its fermentation, and in the produced wine. *J. Agr. Food Chem.* 48: 2, 400-406.
181. Kountoudakis, N., Canals, R., Esteruelas, M., Fort, F., Canals, Jm., Zamora, F. 2009. Maceración prefermentativa en frío. Aspectos tecnológicos en le elaboración de vinos de crianza. ACE: Revista de Enología. 105.
182. Kurtzman, C. P., Robnett, C. J. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *A. Van Leeuw.* 73: 4, 331-371.
183. Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T. 2011. The Yeasts: a taxonomic study definition, classification and nomenclature of the yeasts. Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T. (Eds.), *The Yeasts a Taxonomic Study*, 5th ed. Elsevier Science, Amsterdam, 3E9.

L

184. Lafon-Lafourcade, S., Carre, E., Ribéreau-Gayon, P. 1983. Occurrence of lactic acid bacteria during the different stages of vinification and conservation of wines. *Appl. Environ. Microb.* 46, 874–880.
185. Lage, P., Barbosa, C., Mateus, B., Vasconcelos, I., Mendes-Faia, A., Mendes-Ferreira, A. 2014. *H. guilliermondii* impacts growth kinetics and metabolic activity of *S. cerevisiae*: The role of initial nitrogen concentration. *Int. J. Food Microbiol.* 172, 62-69.
186. Lambrechts M. G, Pretorius I. S. 2000. Yeast and its importance to wine aroma-a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21, 97-129.
187. Large, P. J. 1986. Degradation of organic nitrogen compounds by yeasts. *Yeast*. 2, 1-34.
188. Laureati, M., Gaeta, D., Pagliarini, E. 2014. Qualitative and Sensory Evaluation of Sangiovese Red Wine Obtained from Organically and Conventionally Grown Grapes. *Ital. J. Food Sci.* 26, 355-362.
189. Laureati, M., Pagliarini, E. 2016. Sustainability and organic wine production (book chapter). wine safety, consumer preference, and human health. 43, 183-199.
190. Legendre, P., Legendre, L. 1998. *Numerical Ecology*. 2nd Ed. Elsevier. 1-853.
191. Lema, C., García-Jares, C., Orriols, I., Angulo, L. 1996. Contribution of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* populations to the production of some components of Albariño wine aroma. *Am. J. Enol. Vitic.* 47, 206-216.
192. Lerm, E., Engelbrecht, L., Du Toit, M. 2011. Selection and characterisation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* South African wine isolates for use as malolactic fermentation starter cultures. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 32, 280-295.
193. Leroux, P., Fritz, R., Debieu, D., Albertini, C., Lanen, C., Bach, J., Chapeland, F. 2002. Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Manag. Sci.* 58, 876–888.
194. Letaief, H., Rolle, L., Zeppa, G., Orriols, I., Gerbi, V. 2007. Phenolic characterization of grapevine cultivars from Galicia (Spain): Brancellao, Merenzao and Mencía (*Vitis vinifera* L.). *Ital. J. Food Sci.* 1: 19, 111-119.
195. Libkind, D., Brizzio, S., Ruffini, A., Gadanho, M., van Broock, M., Sampaio, J. P. 2003. Molecular characterization of carotenogenic yeasts from aquatic environments in Patagonia, Argentina. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 84:4, 313-322.
196. Liti, G., Carter, D. M., Moses, A. M., Warringer, J., Parts, L., James, S. A., Davey, R. P., Roberts, I. N., Burt, A., Koufopanou, V., Tsai, I. J., Bergman, C. M., Bensasson, D., O'Kelly, M. J. T., van Oudenaarden, A., Barton, D. B. H., Bailes, E., Nguyen, A. N., Jones, M., Quail, M. A., Goodhead, I., Sims, S., Smith, F., Blomberg, A., Durbin, R., Louis, E. J. 2009. Population genomics of domestic and wild yeasts. *Nature*. 458, 337-341.
197. Liu, J., Arneborg, N., Toldam-Andersen, T. B., Zhang, S., Petersen, M. A., Bredie, W. L. P. 2017. Impact of sequential co-culture fermentations on flavour characters of Solaris wines. *Eur. Food Res. Technol.* 243, 437-445.

198. Livermore, A., Laing, D. G. 1996. Influence of Training and Experience on the Perception of Multicomponent Odor Mixtures. *Journal of Experimental Psychology: Human Perception and Performance*, 22: 2, 267-277.
199. Lleixà, J., Martín, V., Portillo M. C., Carrau, F., Beltran G., Mas A. 2016. Comparison of Fermentation and Wines Produced by Inoculation of *Hanseniaspora vineae* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Front. Microbiol.* 7, 338.
200. Longo, E., Cansado, J., Agrelo, D., Villa, T. G. 1991. Effect of climatic conditions on yeast diversity in grape musts from Northwest Spain. *Am. J. Enol. Vitic.* 42, 141-144.
201. Lopes, C. A., van Broock, M., Querol, A., Caballero, A. C. 2002. *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast populations in a cold region in Argentinean Patagonia. A study at different fermentation scales. *J. Appl. Microbiol.* 93, 608-615.
202. López, R., Ortín, N., Pérez-Trujillo, J. P., Cacho, J. F., Ferreira, V. 2003. Impact odorants of different young white from the Canary Islands. *J. Agric. Food Chem.* 541, 3419-3425.
203. Loureiro, V., Malfeito-Ferreira, M. 2003. Spoilage yeasts in the wine industry. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 23-50.
204. Loureiro, V., Malfeito-Ferreira, M. 2006. Spoilage activities of *Dekkera/Brettanomyces* spp. Blackburn, C., editor. *Food spoilage microorganisms*. Cambridge: Woodhead. 354-398.
205. Lucio, O., Pardo, I., S., Heras, J. M., Krieger-Weber, Ferrer, S. 2017. Selection of *Lactobacillus* strains to induce biological acidification in low acidity wines. *LWT - Food Sci. Technol.* 73, 334-341.
- M**
206. Magliani, W., Conti, S., Gerloni, M., Bertolotti, D., Polonelli, L. 1997. Yeast killer systems. *Clin. Microbiol. Rev.* 10, 369-400.
207. Magyar, I., Tóth, T. 2011. Comparative evaluation of some oenological properties in wine strains of *Candida stellata*, *Candida zemplinina*, *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.* 28, 94-100.
208. Mannazzu, I., Angelozzi, D., Clementi, F., Ciani, M. 2007. Dominanza di starter commerciali nel corso di fermentazioni inoculate: analisi di trentasei vinificazioni industriali. *Vignevini.* 34, 61-64.
209. Manzanares, P., Ramón, D., Querol, A. 1999. Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the production of beta-Dxylosidase activity. *Int. J. Food Microbiol.* 46, 105-112.
210. MAPAMA. 2017. Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. Operaciones Estadísticas del Plan Estadístico Nacional. Anuario de Estadística 2017.
211. Mariani, A., Vastola, A. 2015. Sustainable winegrowing: Current perspectives. *Int. J. Wine Res.* 7: 1, 37-48.
212. Marquina, D., Santos, A., Peinado, J. M. 2002. Biology of killer yeasts. *Int. Microbiol.* 5, 65-71.
213. Martin, K. R., Rasmussen, K. K. 2011. Comparison of Sensory Qualities of Geographically Paired Organic and Conventional Red Wines from the Southwestern US with Differing Total Polyphenol Concentrations: A Randomized Pilot Study. *Food Nutr. Sci.* 2, 1150-1159.
214. Martini, A. 2003. Biotechnology of natural and winery-associated strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. Microbiol.* 6, 207-209.
215. Martins, G., Vallance, J., Mercier, A., Albertin, W., Stamatopoulos, P., Rey, P., Lonvaud, A., Masneaud-Pomarde, I., 2014. Influence of the farming system on the epiphytic yeasts and yeast-like fungi colonizing grape berries during the ripening process. *Int. J. Food Microbiol.* 177, 21-28.
216. Masneuf-Pomarede, I., Bely, M., Marullo, P., Albertin, W. 2016. The genetics of non-conventional wine yeasts: Current knowledge and future challenges. *Front. Microbiol.* 6: 1563.
217. Mateo, J. J., Jimenez, M., Huerta, T., Pastor, A. 1991. Contribution of different yeasts isolated from musts of monastrell grapes to the aroma of wine. *Int. J. Food Microbiol.* 14, 153-160.
218. Maturano, P. Y., Rodríguez Assaf, L. A., Toro, E. M., Nally, C. M., Vallejo, M., Castellanos de Figueroa, L. I., Combina, M., Vazquez, F. 2012. Multi-enzyme production by pure and mixed cultures of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts during wine fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 155, 43-50.
219. Meilgard, M., Civille, G. V., Carr, B. 1999. *Sensory Evaluation Techniques*, 3rd Ed. CRC, Boca Raton.
220. Mendes-Ferreira, A., Clímaco, M. C., Mendes Faia, A. 2001. The role of non-*Saccharomyces* species in releasing glycosidic bound fraction of grape aroma components—a preliminary study. *J. Appl. Microbiol.* 91: 1, 67-71.
221. Mendoza, L. M., Manca de Nadra, M. C., Fariás, M. E. 2007. Kinetics and metabolic behavior of a composite culture of *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* wine related strains. *Biotechnol. Lett.* 29, 1057-1063.
222. Mercado, L., Dalcerro, A., Masuelli, R., Combina, M. 2007. Diversity of *Saccharomyces* strains on grapes and winery surfaces: analysis of their contribution to fermentative flora of Malbec wine from Mendoza (Argentina) during two consecutive years. *Food Microbiol.* 24, 403-412.
223. Mestres, M., Busto, O., Guasch, J. 2000. Analysis of organic sulfur compounds in wine aroma. *J. Chromatogr. A.* 881, 569-581.
224. MeteoGalicia. 2018. Rede de estacións meteorolóxicas. Datos meteorolóxicos.

225. Mezzasalma, V., Sandionigi, A., Guzzetti, L., Galimberti, A., Grando, M. S., Tardaguila, J., Labra, M. 2018. Geographical and Cultivar Features Differentiate Grape Microbiota in Northern Italy and Spain Vineyards. *Front. Microbiol.* 9: 946.
226. Middelbeek, E. J., Stumm, C., Vogels, G. D. 1980. Effects of *Pichia kluyveri* killer toxin on sensitive cells. *A. Van Leeuw.* 46, 205-220.
227. Milanović, V., Comitini, F., Ciani, M. 2013. Grape berry yeast communities: Influence of fungicide treatments. *Int. J. Food Microbiol.* 161: 3, 240-246.
228. Mills, D. A., Johannsen, E. A., Cocolin, L. 2002. Yeast diversity and persistence in botrytis-affected wine fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4884-4893.
229. Miura, T., Sánchez, R., Castañeda, L. E., Godoy, K., Barbosa, O. 2017. Is microbial terroir related to geographic distance between vineyards? *Environ. Microbiol. Reports.* 9: 6, 742-749.
230. Molina, A. M., Swiegers, J. H., Varela, C., Pretorius, I. S., Agosin, E. 2007. Influence of wine fermentation temperature on the synthesis of yeast-derived volatile aroma compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77: 3, 675-687.
231. Moreira, N., Mendes, F., Guedes de Pinho, P., Hogg, T., Vasconcelos, I. 2008. Heavy sulphur compounds, higher alcohols and esters production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as a pure and mixed cultures in grape must. *Int. J. Food Microbiol.* 124, 231-238.
232. Moreno, J. J., Millan, C., Ortega, J. M., Medina, M. 1991. Analytical differentiation of wine fermentations using pure and mixed yeast cultures. *J. Ind. Microbiol.* 7, 191-190.
233. Morgan, H. H., du Toit, M., Setati, M. E. 2017. The grapevine and wine microbiome: Insights from high-throughput amplicon sequencing (Review). *Front. Microbiol.* 8: 820.
234. Morrison-Whittle, P., Goddard, M. R. 2018. From vineyard to winery: a source map of microbial diversity driving wine fermentation *Environ. Microbiol.* 20: 1, 75-84.
235. Mortimer, R., Polsinelli, M. 1999. On the origins of wine yeast. *Res. Microbiol.* 150, 199-204.
236. Mulero, J., Pardo, F., Zafrilla, P., 2009. Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant activity in conventional and organic red wines during storage. *Eur. Food Res. Technol.* 229, 807-812.
237. Mullis, K. B. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci. Am.* 262, 56-61.
238. Muñoz-Bernal, E., Rodríguez, M. E., Benítez, P., Fernández-Acero, F. J., Rebordinos, L., Cantoral, J. M. 2013. Molecular analysis of red wine yeast diversity in the Ribera del Duero D.O. (Spain) area. *Arch. Microbiol.* 195, 297-302.
239. Murria, J. M., Delahunty, C. M. A., Baxter, I. A. 2001. Descriptive sensory analysis: past, present and future, *Food Res. Int.* 34, 461-471.

N

240. Nemcová, K., Breierová, E., Vadkertiová, R., Molnárová, J. 2015. The diversity of yeasts associated with grapes and musts of the Strekov winegrowing region, Slovakia. *Folia Microbiol.* 60: 2, 103-109.
241. Nisiotou, A. A., Nychas, G.-J. E. 2007. Yeast populations residing on healthy or Botrytis-infected grapes from a vineyard in Attica, Greece. *Appl. Environ. Microb.* 73: 8, 2765-2768.
242. Nissen, P., Nielsen, D., Arneborg, N. 2003. Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell contact-mediated mechanism. *Yeast.* 20, 331-341.
243. Noble, A. C., Ebeler, S. E. 2002. Use of multivariate statistics in understanding wine flavor, *Food Rev. Int.* 18, 1-21.
244. Núñez-Delicado, E., Sánchez-Ferrer, A., García-Carmona, F. F., López-Nicolás, J. M. 2005. Effect of organic farming practices on the level of latent polyphenol oxidase in grapes. *J. Food Sci.* 70, C74-C78.
245. Nykänen, L. 1986. Formation and occurrence of flavor compounds in wine and distilled alcoholic beverages. *Am. J. Enol. Vitic.* 37: 1, 84-96.

O

246. Odello, L., Ugolini, A., Violoni, M. 2007. *Analisi Sensoriale. I test descrittivi.* Ed. Centro Studi Assaggiatori. Brescia (Italia).
247. OEMV. 2017. Observatorio Español del Mercado del Vino. Estadísticas CC-AA.
248. OIV. International Organisation of Vine and Wine. 2012. *Compendium of international methods of wine and must analysis.* Vol 1 y 2. Paris, France.
249. OIV. Organización internacional de la viña y el vino. Estadísticas 2017.
250. Olstorpe, M., Schnürer, J., Passoth, V. 2010. Microbial changes during storage of moist crimped cereal barley grain under Swedish farm conditions. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 156 :1-2, 37-46.
251. Oro, L., Ciani, M., Comitini, F. 2014. Antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima* on wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.* 116, 1209-1217.

P

252. Pagliarini, E., Laureati, M., Gaeta, D. 2013. Sensory descriptors, hedonic perception and consumer's attitudes to Sangiovese red wine deriving from organically and conventionally grown grapes. *Front. Psycho.* 4: 896.
253. Park, S. K., Noble, A. C. 1993. Monoterpenes and monoterpene glycosides in wine aromas. *ACS Sym. Ser.* 536, 98-109.
254. Parpinello, G. P., Rombolà, A. D., Simoni, M., Versari, A. 2015. Chemical and sensory characterisation of Sangiovese red wines: Comparison between biodynamic and organic management. *Food Chem.* 167, 1-8.
255. Patrignani, F., Montanari, C., Serrazanetti, D. I., Braschi, G., Vernocchi, P., Tabanelli, G., Parpinello, G. P., Versari, A., Gardini, F., Lanciotti, R. 2017. Characterization of yeast microbiota, chemical and sensory properties of organic and biodynamic Sangiovese red wines. *Ann. Microbiol.* 67: 1, 99-109.
256. Pedneault, K., Provost, C. 2016. Fungus resistant grape varieties as a suitable alternative for organic wine production: benefits, current knowledge, and challenges. *Sci. Hortic.* 208, 57-77.
257. Perestrelo, R., Fernandes, A., Albuquerque, F. F., Marques, J. C., Câmara, J. S. 2006. Analytical characterization of the aroma of Tinta Negra Mole red wine: Identification of the main odorants compounds. *Anal. Chim. Acta.* 563, 154-164.
258. Pérez, F., Ramírez, M., Regodon, J. A. 2001. Influence of killer strains of *Saccharomyces cerevisiae* on wine fermentation. *A. Van Leeuw.* 79, 393-399.
259. Pérez-Nevado, F., Albergaria, H., Hogg, T., Girio, F. 2006. Cellular death of two non-*Saccharomyces* wine-related yeasts during mixed fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.* 108, 336-345.
260. Petering, J.E., Symons, M.R., Langridge, P., Henschke, P.A., 1991. Determination of killer yeast activity in fermenting grape juice by using a marked *Saccharomyces* wine yeast strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 3232-3236.
261. Pielou, E. C. 1969. *An Introduction to Mathematical Ecology.* New York: Wiley.
262. Pina, C., Santos, C., Couto, J. A., 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 Microbiol.* 21, 439-447.
263. Plana, 2013. Situations particulières conduisant à des contaminations inattendues par des résidus de pesticides. *Laboratoire Excell, Pesticides dans les Vins: Etat des lieux, Stratégie de Réduction au Vignoble et Nouvelles Perspectives, Bordeaux-Lac, France.* 58-75.
264. Povhe Jemec, K., Cadez, N., Zagorc, T., Bubic, V., Zupec, A., Raspor, P. 2001. Yeast population dynamics in five spontaneous fermentation of Malvasia must. *Food Microbiol.* 18, 247-259.
265. Prakitchaiwattana, C. J., Fleet, G. H., Heard, G. M. 2004. Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Res.* 4: 8, 865-877.
266. Pramateftaki, P. V., Lanaridis, P., Typas, M. A. 2000. Molecular identification of wine yeasts at species or strain level: a case study with strains from two vine-growing areas of Greece. *J. Appl. Microbiol.* 89: 236-248.
267. Pretorius, I. S., Van der Westhuizen, T. J., Augustyn, O. P. H. 1999. Yeast Biodiversity in Vineyards and Wineries and Its Importance to the South African Wine Industry. *A Review, S. Afr. J. Enol. Vitic.* 20.
268. Pretorius, I. S. 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast.* 16, 675-729.
269. Provenzano, M. R., El Bilali, H., Simeone, V., Baser, N., Mondelli, D., Cesari, G. 2010. Copper contents in grapes and wines from a Mediterranean organic vineyard. *Food Chem.* 122, 1338-1343.
270. Provost, C., Pedneault, K. 2016. The organic vineyard as a balanced ecosystem: Improved organic grape management and impacts on wine quality. *Sci. Hortic.* 208, 43-56.

Q

271. Querol, A., Barrio, E., Huerta, T., Ramón, D. 1992. Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 9, 2948-2953.
272. Querol, A., Barrio, E., Ramón, D. 1994. Population dynamics of wine yeast strains in natural fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 21, 315-323.

R

273. Rantsiou, K., Dolci, P., Giacosa, S., Torchio, F., Tofalo, R., Torriani, S., Suzzi, G., Rolle, L., Cocolin, L. 2012. *Candida zemplinina* can reduce acetic acid production by *Saccharomyces cerevisiae* in sweet wine fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 1987-1994.
274. Rapp, A., Versini, G. 1991. Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds in wine, in *Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Vines, ASEV, Davis, CA,* 156-164.
275. Raspor, P., Miklič-Milek, D., Avbelj, M., Čadež, N. 2010. Biocontrol of grey mould disease on grape caused by *Botrytis cinerea* with autochthonous wine yeasts. *Food Technol. Biotechnol.* 48, 336-343.

276. Razavi, S. H., Mousavi, S. M., Yeganeh, H. M., Marc, I. 2007. Fatty acid and carotenoid production by *Sporobolomyces ruberrimus* when using technical glycerol and ammonium sulfate. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17: 10, 1591-1597.
277. Reglamento (CE) n° 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de febrero de 2005 relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal y que modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo. Texto pertinente a efectos del EEE.
278. Reglamento (CE) n° 834/2007 del Consejo de 28 de junio de 2007 sobre producción y etiquetado de los productos ecológicos y por el que se deroga el Reglamento (CEE) n° 2092/91.
279. Reglamento (CE) n° 889/2008 de la Comisión de 5 de septiembre de 2008 por el que se establecen disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) n° 834/2007 del Consejo sobre producción y etiquetado de los productos ecológicos, con respecto a la producción ecológica, su etiquetado y su control.
280. Reglamento (CE) n° 606/2009 de la Comisión de 10 de julio de 2009 que fija determinadas disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) n° 479/2008 del Consejo en lo relativo a las categorías de productos vitícolas, las prácticas enológicas y las restricciones aplicables.
281. Reglamento (UE) 2018/848 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 30 de mayo de 2018, sobre producción ecológica y etiquetado de los productos ecológicos y por el que se deroga el Reglamento (CE) n° 834/2007 del Consejo.
282. Reglamento de Ejecución (UE) n° 203/2012 de la Comisión de 8 de marzo de 2012 que modifica el Reglamento (CE) n° 889/2008, por el que se establecen disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) n° 834/2007 del Consejo, en lo que respecta a las disposiciones de aplicación referidas al vino ecológico.
283. Reglamento de Ejecución (UE) 2016/673 de la Comisión de 29 de abril de 2016 que modifica el Reglamento (CE) n° 889/2008.
284. Rementeria, A., Rodriguez, J. A., Cadaval, A., Amenabar, R., Muguruza, J. R., Hernando, F. L., Sevilla, M. J. 2003. Yeast associated with spontaneous fermentations of white wines from the "Txakoli de Bizkaia" region (Basque Country, North Spain). *Int. J. Food Microbiol.* 86, 201-207.
285. 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.
286. Renouf, V., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A. 2005. Understanding the microbial ecosystem on the grape berry surface through numeration and identification of yeast and bacteria. *Aust. J. Grape Wine Res.* 11, 316-327.
287. Renouf, V., Perello, M. C., Strehaiano, P., Lonvaud-Funel, A. 2006. Évolution de l'écosystème pendant la vinification. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* 40: 2, 101-116.
288. Renouf, V., Strehaiano, P., Lonvaud-Funel, A. 2007a. Yeast and bacteria analysis of grape, wine and cellar equipments by CPR-DGGE. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* 41: 1, 51-61.
289. Renouf, V., Perelló, M. C., Revell, G., Lonvaud-Funel, A. 2007b. Survival of wine microorganisms in the bottle during storage. *Am. J. Enol. Viticult.* 58: 3, 379-386.
290. Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, E., Ribéreau-Gayon, P., Sudraud, P. 1976. *Traite d'oenologie. Sciences et techniques du vin. Tome 3 Vinifications, transformations du vin.* Paris: Dunod. 289-314.
291. Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D. 2000. *Handbook of enology. The chemistry of wines, stabilization and treatments* (John Wiley: Chichester, England).
292. Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D. 2003. *Compuestos fenólicos. Tratado en Enología, Vol. 2: Química del vino. Estabilización y tratamientos.* Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires. 177-258.
293. Rigoli Ferraz, L., dos Santos de Oliveira, D. D., Fernandes Silva, M., Rigo, E., Di Luccio, M., Vladimir Oliveira, J., de Oliveira, D., Treichel, H. 2012. Production and partial characterization of multifunctional lipases by *Sporobolomyces ruberrimus* using soybean meal, rice meal and sugarcane bagasse as substrates. *Biocatal. Agr. Biotechnol.* 1: 3, 243-252.
294. Río Segade, S., Soto Vázquez, E., Díaz Losada, E. 2008. Influence of ripeness grade on accumulation and extractability of grape skin anthocyanins in different cultivars. *J. Food Comp. Anal.* 21, 599-607.
295. Río Segade, S., Orriols, I., Gerbi, V., Rolle, L. 2009. Phenolic characterization of thirteen red grape cultivars from Galicia by anthocyanin profile and flavonol composition. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* 43: 4, 189-198.
296. Robinson, A. L., Ebeler, S. E., Heymann, H., Boss, P. K., Solomon, P. S., Trengove, R. D. 2009. Interactions between Wine Volatile Compounds and Grape and Wine Matrix Components Influence Aroma Compound Headspace Partitioning. *J. Agr. Food Chem.* 57: 21, 10313-10322.
297. Rodríguez, M. E., Lopes, C. A., Barbagelata, R. J., Barda, N. B., Caballero, A. C. 2010. Influence of *Candida pulcherrima* Patagonian strain on alcoholic fermentation behaviour and wine aroma. *Int. J. Food Microbiol.* 138: 19-25.
298. Rojas, V., Gil, J. V., Piñaga, F., Manzanares, P. 2003. Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 181-188.
299. Romancino, D. P., Di Maio, S., Muriella, R., Oliva, D. 2008. Analysis on non-*Saccharomyces* yeast populations isolated from grape musts from Sicily (Italy). *J. Appl. Microbiol.* 105, 2248-2254.

300. Romano, A., Perello, M. C., Lonvaud-Funel, A., De Revel, G. 2008. Aspectos sensoriales del "carácter Brett". Nueva evaluación del umbral de percepción olfatoria de fenoles volátiles en vino tinto. *Int. J. Vitic. Enol.* 10: 3. Congreso "Wine Active Compounds", 27-29 marzo 2008, Beaune, Francia.
301. Romano, P. 1997a. Metabolic characteristics of wine strains during spontaneous and inoculated fermentation. *Food Technol. Biotech.* 35, 255-260.
302. Romano, P., Suzzi, G., Comi, G., Zironi, R., Maifreni, M. 1997b. Glycerol and other fermentation products of apiculate wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.* 82, 615-618.
303. Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., Capece, A. 2003. Function of yeast species and strains in wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 169-180.
304. Romero-Cascales, I., Ortega-Regules, A., Lopez-Roca, J. M., Fernandez-Fernandez, J. I., Gomez-Plaza, E. 2005. Differences in anthocyanin extractability from grapes to wines according to variety. *Am. J. Enol. Viticult.* 56, 212-219.
305. Rossouw, D., Bauer, F. F. 2009. Comparing the transcriptomes of wine yeast strains: Toward understanding the interaction between environment and transcriptome during fermentation. *Appl. Microbiol. Biot.* 84: 5, 937-954.
306. Rossouw, D., Bauer, F. F. 2016. Exploring the phenotypic space of non-*Saccharomyces* wine yeast biodiversity. *Food Microbiol.* 55, 32-46.
307. Ruffner, H. P. 1982. Metabolism of tartaric and malic acids in *Vitis*: a review - part B. *Vitis.* 21, 346-358.
- S**
308. Sabaté, J., Cano, J., Querol, A., Guillamón, J. M. 1998. Diversity of *Saccharomyces* strains in wine fermentations: analysis for two consecutive years. *Lett. Appl. Microbiol.* 26, 452-455.
309. Sabaté, J., Cano, J., Esteve-Zarzoso, B., Guillamón, J. M. 2002. Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. *Microbiol. Res.* 157, 267-274.
310. Sadoudi, M., Tourdot-Maréchal, R., Rousseaux, S., Steyer, D., Gallardo-Chacón, J.-J., Ballester, J., Vichi, S., Guérin-Schneider, R., Caixach, J., Alexandre, H. 2012. Yeast-yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts. *Food Microbiol.* 32: 2, 243-253.
311. Sánchez-Palomo, E., Gómez García-Carpintero, E., Gómez Gallego, M. A., González Viñas, M. A. 2012. The Aroma of Rojal Red Wines from La Mancha Region - Determination of Key Odorants, Gas Chromatography in Plant Science, Wine Technology, Toxicology and Some Specific Applications. Dr. Becorde Salih Ed. 8, 147-170.
312. Santamaría, P., Garijo, P., Lopez, R., Tenorio, C., Rosa Gutierrez, A. 2005. Analysis of yeast population during spontaneous alcoholic fermentation: effect of the age of the cellar and the practice of inoculation. *Int. J. Food Microbiol.* 103, 49-56.
313. Santos, A., San Mauro, M., Bravo, E., Marquina, D. 2009. PMKT2, a new killer toxin from *Pichia membranifaciens*, and its promising biotechnological properties for control of the spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. *Microbiology.* 155, 624-634.
314. Scanes, K. T., Hohmann, S., Prior, B. A. 1998. Glycerol Production by the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its Relevance to Wine: A Review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 19: 1, 17-24.
315. Schäufele, I., Hamm, U. 2018. Organic wine purchase behaviour in Germany: Exploring the attitude-behaviour-gap with data from a household panel. In *Food Quality and Preference.* 63, 1-11.
316. Schmid, F., Moser, G., Müller, H., Berg, G. 2011. Functional and structural microbial diversity in organic and conventional viticulture: Organic farming benefits natural biocontrol agents. *Appl. Environ. Microb.* 77: 6, 2188-2191.
317. Scholl, C. M., Morgan, S. C., Stone, M. L., Tantikachornkiat, M., Neuner, M., Durall, D. M. 2016. Composition of *Saccharomyces cerevisiae* strains in spontaneous fermentations of Pinot Noir and Chardonnay. *Aust. J. Grape Wine R.* 22, 384-390.
318. Schuller, D., Alves, H., Dequin, S., Casal, M. 2005. Ecological survey of *Saccharomyces cerevisiae* strains from vineyards in the Vinho Verde Region of Portugal. *FEMS Microbiol. Ecol.* 51: 2, 167-177.
319. Schuller, D., Cardoso, F., Sousa, S., Gomes, P., Gomes, A. C., Santos, M. A. S., Casal, M. 2012. Genetic diversity and population structure of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from different grape varieties and winemaking regions. *PLoS One.* 7: 2, 29, e32507.
320. Setati, M. E., Jacobson, D., Andong, U.-C., Bauer, F. 2012. The Vineyard Yeast Microbiome, a Mixed Model Microbial Map. *PLoS ONE*, 7: 12, e52609.
321. Setati, M. E., Jacobson, D., Bauer, F. F. 2015. Sequence-based analysis of the *Vitis vinifera* L. cv Cabernet Sauvignon grape must mycobiome in three South African vineyards employing distinct agronomic systems. *Front. Microbiol.* 6: 1358.
322. Shannon C. A. 2001. Mathematical Theory of Communication. *Mob. Comput. Commun. Rev.* 5, 3-55.
323. Simpson, E. H. 1949. Measurement of diversity. *Nature.* 163: 688.
324. Simpson, R. F. 1979. Some important aroma components of white wine, *Food Technol. Aust.* 31, 516-522.

325. Sipiczki, M. 2003. *Candida zemplinina* sp. nov., an osmotolerant and psychrotolerant yeast that ferments sweet botrytized wines. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 53, 2079–2083.
326. Sipiczki, M. 2016. Overwintering of vineyard yeasts: Survival of interacting yeast communities in grapes mummified on vines. *Front. Microbiol.* 7: 212.
327. Sivčev, B. V., Sivčev, I. L., Rankovic-Vasic, Z. Z. 2010. Natural process and use of natural matters in organic viticulture. *J. Agric. Sci.* 55, 195–215.
328. Soden, A., Francis, I., Oakey, H., Henschke, P. 2000. Effects of cofermentation with *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and composition of Chardonnay wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* 6, 21–30.
329. Soto Vázquez, E., Río Segade, S., Rego Martínez, F., Diaz Losada, E., Queimadelos Díaz, L. 2012. Estudio comparativo de ocho variedades tintas de la Denominación de Origen Ribeiro. *Alimentación. Equipos y Tecnología.* 265, 30-35.
330. Spagna, G., Barbagallo, R. N., Palmeri, R., Restuccia, C., Giudici, P. 2002. Properties of endogenous β -glucosidase of a *Pichia anomala* strain isolated from Sicilian musts and wines. *Enzyme Microb. Technol.* 31, 1036–1041.
331. Spranger, M. I., Clímaco, M. C., Sun, B., Eiriz, N., Fortunato, C., Nunes, A., Leandro, M. C., Avelar, M. L., Belchoior, P. 2004. Differentiation of red winemaking technologies by phenolic and volatile composition. *Anal. Chim. Acta.* 513: 1, 151-161.
332. Stone, H., Sidel, J. L. 1998. Quantitative descriptive analysis: developments, applications, and the future, *Food Technol. J.* 52, 48–52.
333. Suárez, R., Suárez-Lepe, J. A., Morata, A., Calderón, F. 2007. The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: a review. *Food Chem.* 102, 10–21.
334. Sun, H., Ma, H., Hao, M., Pretorius, I. S., Chen, S. 2009. Identification of yeast population dynamics of spontaneous fermentation in Beijing wine region, China. *Ann. Microbiol.* 59: 1, 69-76.
335. Suzzi, G., Arfelli, G., Schirone, M., Corsetti, A., Perpetuini, G., Tofalo, R. 2012. Effect of grape indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains on Montepulciano d'Abruzzo red wine quality. *Food Res. Int.* 46, 22-29.
336. Swiegers, J. H., Bartowsky, E. J., Henschke, P. A., Pretorius, I. S. 2005. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavor. *Aust. J. Grape Wine R.* 11, 139-173.

T

337. Tassoni, A., Tango, N., Ferri, M. 2014. Polyphenol and biogenic amine profiles of Albana and Lambrusco grape berries and wines obtained following different agricultural and oenological practices. *Food Nutr. Sci.* 5, 8–16.
338. Tello, J., Cordero-Bueso, G., Aporta, I., Cabellos, J. M., Arroyo, T. 2011. Genetic diversity in commercial wineries: effects of the farming system and vinification management on wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.* 112: 2, 302-315.
339. Thies, C., Tschamtkke, T. 1999. Landscape structure and biological control in agroecosystems. *Science.* 285, 893–895.
340. Thompson, L. R., Sanders, J. G., McDonald, D., Amir, A., Ladau, J., et al. 2017. A communal catalogue reveals Earth's multiscale microbial diversity. *Nature.* 551, 457-463.
341. Tofalo, R., Schirone, M., Telera, G. C., Manetta, A. C., Corsetti, A., Suzzi, G. 2011. Influence of organic viticulture on non-*Saccharomyces* wine yeast populations. *Ann. Microbiol.* 61: 1, 57-66.
342. Tofalo, R., Schirone, M., Torriani, S., Rantsiou, K., Cocolin, L., Perpetuini, G., Suzzi, G. 2012. Diversity of *Candida zemplinina* strains from grapes and Italian wines. *Food Microbiol.* 29: 1, 18-26.
343. Tofalo, R., Perpetuini, G., Schirone, M., Fasoli, G., Aguzzi, I., Corsetti, A., Suzzi, G. 2013 Biogeographical characterization of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast by molecular methods. *Front. Microbiol.* 4: 166, 1-13.
344. Tofalo, R., Perpetuini, G., Fasoli, G., Schirone, M., Corsetti, A., Suzzi, G. 2014. Biodiversity study of wine yeasts belonging to the "terroir" of Montepulciano d'Abruzzo "Colline Teramane" revealed *Saccharomyces cerevisiae* strains exhibiting atypical and unique 5.8S-ITS restriction patterns. *Food Microbiol.* 39, 7-12.
345. Tofalo, R., Patrignani, F., Lanciotti, R., Perpetuini, G., Schirone, M., Di Gianvito, P., Pizzoni, D., Arfelli, G., Suzzi, G. 2016. Aroma profile of Montepulciano d'Abruzzo wine fermented by single and co-culture starters of autochthonous *Saccharomyces* and Non-*Saccharomyces* yeasts. *Front. Microbiol.* 7: 610.
346. Torija, M. J., Rozès, N., Poblet, M., Guillamón, J. M., Mas, A. 2001. Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. *A. Van Leeuw.* 79, 345–352.
347. Trigo, E. 2016. Respuesta fisiológica y agronómica de variedades gallegas de vid a diferentes prácticas de cultivo: cubiertas vegetales y riego. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.
348. Tristezza, M., Vetrano, C., Blevé, G., Grieco, F., Tufariello, M., Quarta, A., et al. 2012. Autochthonous fermentation starters for the industrial production of Negroamaro wines. *J. Ind Microbiol. Biot.* 39, 81-92.

349. Tristezza, M., Vetrano, C., Bleve, G., Spano G., Capozzi, V., Logrieco, A., Mita, G., Grieco, F. 2013. Biosafety aspects of yeast strains characterized from vineyards and spontaneous fermentations in the Apulia region, Italy. *Food Microbiol.* 36, 335-342.
350. Tristezza, M., Fantastico, L., Vetrano, C., Bleve, G., Corallo, D., Grieco, F., Mita, G., Grieco, F. 2014. Molecular and technological characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from natural fermentation of Susumaniello grape must in Apulia, Southern Italy. *Int. J. Microbiol.* ID 897428, 1-11.
351. Tristezza, M., Tufariello, M., Capozzi, V., Spano, G., Mita, G., Grieco, F. 2016. The oenological potential of *Hanseniaspora uvarum* in simultaneous and sequential co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* for industrial wine production. *Front Microbiol* 7: 1-14.
352. Tronchoni, J., Curiel, J. A., Sáenz-Navajas, M. P., Morales, P., de-la-Fuente-Blanco, A., Fernández-Zurbano, P., Ferreira, V., Gonzalez, R. 2018. Aroma profiling of an aerated fermentation of natural grape must with selected yeast strains at pilot scale. *Food Microbiol.* 70, 214-223.

U

353. Ugliano, M., Rinaldi, A., Gambuti, A., Moio, L. 2007. The role of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast in the hydrolysis of glycoconjugated aroma precursors during winemaking (Conference Paper). *Acta Hort.* 754, 155-160.
354. Ugliano, M., Henschke, P. A. 2009. Yeasts and wine flavour (Book Chapter). *Wine Chemistry and Biochemistry.* 313-392.

V

355. Valero, E., Cambon, B., Schuller, D., Casal, M., Dequin, S. 2007. Biodiversity of *Saccharomyces* yeast strains from grape berries of wine producing areas using starter commercial yeasts. *FEMS Yeast Res.* 7, 317-329.
356. Van der Westhuizen, T. J., Augustyn, O. P. H., Pretorius, I. S. 2000. Geographical distribution of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strain isolated from vineyards in the coastal regions of the Western Cape in South Africa. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21: 1, 3-9.
357. Van Vuuren, H. J. J., Wingfield, B. D. 1986. Killer-yeasts - Cause of stuck fermentations in a wine cellar. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 7, 113-118.
358. Varela, C., Sengler, F., Solomon, M., Curtin, C. 2016. Volatile flavour profile of reduced alcohol wines fermented with the non-conventional yeast species *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum*. *Food Chem.* 209, 57-64.
359. Vaz, A. B. M., Rosa, L. H., Vieira, M. L. A., de Garcia, V., Brandão, L. R., Teixeira, L. C. R. S., Moliné, M., Libkind, D., van Broock, M., Rosa, C. A. 2011. The diversity, extracellular enzymatic activities and photoprotective compounds of yeasts isolated in Antarctica. *Braz. J. Microbiol.* 42: 3, 937-947.
360. Vázquez, F. A., Pérez Cid, B., Río Segade, S. 2016. Assessment of metal bioavailability in the vineyard soil-grapevine system using different extraction methods. *Food Chem.* 208, 199-208.
361. Verginer, M., Leitner, E., Berg, G. 2010. Production of volatile metabolites by grape-associated microorganisms. *J. Agric. Food Chem.* 58, 8344-8350.
362. Vernocchi, P., Patrignani, F., Ndagijimana, M., Chaves Lopez, C., Suzzi, G., Gardini, F., Lanciotti, R. 2015. Trebbiano wine produced by using *Saccharomyces cerevisiae* strains endowed with b-glucosidase activity. *Ann. Microbiol.* 65, 1565-1571.
363. Versavaud, A., Courcoux, P., Roulland, C., Dulau, L., Hallet, J. N. 1995. Genetic diversity and geographical distribution of wild *Saccharomyces cerevisiae* strains from the wine producing area of Charentes, France. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3521-3529.
364. Viana, F., Gil, J. V., Genovés, S., Vallés, S., Manzanares, P. 2008. Rational selection of non-*Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. *Food Microbiol.* 25, 778-785.
365. Vigentini, I., Fracassetti, D., Picozzi, C., Foschino, R. 2009. Polymorphisms of *Saccharomyces cerevisiae* genes involved in wine production. *Curr. Microbiol.* 58, 211-218.
366. Vigentini, I., De Lorenzis, G., Fabrizio, V., Valdetara, F., Faccincani, M., Panont, C.A., Picozzi, C., Imazio, S., Failla, O., Foschino, R. 2015. The vintage effect overcomes the terroir effect: A threeyear survey on the wine yeast biodiversity in Franciacorta and Oltrepò Pavese, two northern Italian vine-growing areas. *Microbiology (UK).* 161: 2, 362-373.
367. Vilanova, M., Masneuf-Pomarade, I. 2005a. Effect of three *Saccharomyces cerevisiae* strains on the volatile composition of Albariño wines, Ital. J. Food Sci. 2, 221-227.
368. Vilanova, M., Masneuf-Pomarède, I., Dubourdieu, D. 2005b. Influence of *Saccharomyces cerevisiae* strains on general composition and sensorial properties of white wines made from *Vitis vinifera* cv. Albariño. *Food Technol. Biotech.* 43: 1, 79-83.
369. Vilanova, M., Campo, E., Escudero, A., Graña, M., Masa, A., Cacho, J. 2010a. Volatile composition and sensory properties of *Vitis vinifera* red cultivars from North West Spain: Correlation between sensory and instrumental analysis. *Anal. Chim. Acta.* 720, 104-111.
370. Vilanova, M., Genisheva, Z., Masa, A., Oliveira, J. M. 2010b. Correlation between volatile composition and sensory properties in Spanish Albariño wines. *Microchem. J.* 95: 2, 240-246.

371. Vilanova, M., Escudero, A., Graña, M., Cacho, J. 2013. Volatile composition and sensory properties of North West Spain white wines. *Food Res. Int.* 54: 1, 562-568.
372. Vincenzini, M., Romano, P., Farris, G. A. 2005. *Microbiologia del vino*. Milan: Ed. Ambrosiana (Chapter 5).
373. Vinković Vrček, I., Bojić, M., Žuntar, I., Mendaš, G., Medić-Šarić, M. 2011. Phenol content, antioxidant activity and metal composition of Croatian wines deriving from organically and conventionally grown grapes. *Food Chem.* 124, 354-361.
374. Volschenk, H., Van Vuuren, H. J. J., Viljoen-Bloom, M. 2006. Malic acid in wine: origin, function and metabolism during vinification. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 27: 2, 123-136.

W

375. Wang, C., García-Fernández, D., Mas, A., Esteve-Zarzoso, B. 2015. Fungal diversity in grape must and wine fermentation assessed by massive sequencing, quantitative CPR and DGGE. *Front. Microbiol.* 6: 1156.
376. Wang, Q. M., Liu, W. Q., Liti, G., Wang, S. A., Bai, F. Y. 2012. Surprisingly diverged populations of *Saccharomyces cerevisiae* in natural environments remote from human activity. *Mol. Ecol.* 21, 5404-5417.
377. White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, in: *CPR Protocols. A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, C.A. 315-322.
378. Willer, H., Lernoud, J. 2018. *The World of Organic Agriculture. Statistics and Emerging Trends*. FiBL & IFOAM – Organics International. Frick and Bonn. 114-115.

X

379. Xufre, A., Albergaria, H., Inácio, J., Martins-Spencer, I., Gírio, F. 2006. Application of fluorescence in situ hybridization (FISH) to the analysis of yeast population dynamics in winery and laboratory grape must fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 108, 376-384.

Y

380. Yamasaki, I., Fujii, H. 1950. Studies on *Sporobolomyces* red yeast. Part 7. Classification of the genera *Sporobolomyces* and *Bullera*. *Agric. Chem. Soc. Jpn. Bull.* 24, 11-15.

Z

381. Zacchi, L., Vaughan-Martini, A. 2002. Yeasts associated with insects in agricultural areas of Perugia, Italy. *Ann. Microbiol.* 52, 237-244.
382. Zafrilla, P., Morillas, J., Mulero, J., Cay Auela, J. M., Martínez-Cachá, A., Pardo, F., López Nicolás, J. M. 2003. Changes during storage in conventional and ecological wine: Phenolic content and antioxidant activity. *J. Agr. Food Chem.* 51: 16, 4694-4700.
383. Zhang, H. Y., Lee, S. A., Bradbury, J. E., Warren, R. N., Sheth, H., Hooks, D. O., Richards, K. D., Gardner, R. C. 2010. Yeasts isolated from New Zealand vineyards and wineries. *Aust. J. Grape Wine R.* 16, 491-496.
384. Zhang, X., Liu, M., Zhang, X., Tan, T. 2018. Microbial lipid production and organic matters removal from cellulosic ethanol wastewater through coupling oleaginous yeasts and activated sludge biological method. *Bioresource Technol.* 267, 395-400.
385. Zott, K., Miot-Sertier, C., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., Masneuf-Pomarede, I. 2008. Dynamics and diversity of non-*Saccharomyces* yeasts during the early stages in winemaking. *Int. J. Food Microbiol.* 125: 197-203.
386. Zott, K., Claisse, O., Lucas, P., Coulon, J., Lonvaud-Funel, A., Masneuf-Pomarede, I. 2010. Characterization of the yeast ecosystem in grape must and wine using real-time CPR. *Food Microbiol.* 27, 559-567.
387. Zott, K., Thibon, C., Bely, M., Lonvaud-Funel, A., Dubourdiou, D., Masneuf-Pomarede, I. 2011. The grape must non-*Saccharomyces* microbial community: impact on volatile thiol release. *Int. J. Food Microbiol.* 151, 210-215.