



**Universidad de Valladolid**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN ENOLOGÍA, VITICULTURA Y  
SOSTENIBILIDAD**

**TESIS DOCTORAL**

**ESTUDIO DE LA BIODIVERSIDAD DE  
LEVADURAS PROCEDENTES DE UVA  
VERDEJO DE LA D.O. RUEDA**

Presentada por Lorena López Enríquez para optar al  
grado de Doctora por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:  
Josefina Vila Crespo  
José Manuel Rodríguez Nogales  
Violeta Ruipérez Prádanos



A Merce

A Carlos

A Oly

A Mercedes y Joaquín

A Oliva y Ramón



“Cuando creíamos que teníamos todas las respuestas, de pronto  
cambiaron todas las preguntas”

(Mario Benedetti)



# Agradecimientos

---

Mi más sincero agradecimiento a la bodega Belondrade, a su propietario Didier Belondrade Lerebours y a su directora técnica y enóloga Marta Baquerizo Mesonero-Romanos. Sin su aportación y su confianza en la investigación este trabajo no habría sido posible.

Muy agradecida también por haber sido guiada en esta experiencia por Josefina Vila, José Manuel Rodríguez, Encarnación Fernández y Violeta Ruipérez. Sin vuestra ayuda y sin vuestra paciencia en los momentos de desánimo no habría llegado este momento.

Muchas gracias a Rober, a Raquel, a María Simarro y al departamento de Microbiología ubicado en la sexta planta de la Facultad de Medicina. Me acogisteis con cariño y lo hicisteis todo mucho más fácil.

Gracias a toda la buena gente del Laboratorio y de los departamentos de Innovación y de Producción de la bodega Pago de Carraovejas. Estoy muy contenta con la experiencia profesional y personal que estoy viviendo.

Gracias Félix y gracias a INEA y a todo su equipo. Os habéis convertido en un apoyo enorme y en un reto constante.

Gracias a Julián, a mis Chicas ITACyL, a mis Andarinas y a mis Chicas QC. Sois alegría y lo mejor de mi experiencia vital en Valladolid.

Eternamente agradecida por la preciosa familia a la que pertenezco. ¡¡¡OS QUIERO!!!

Gracias a mi segunda familia pucelana por quererme y cuidarme incondicionalmente.

Gracias Nacho. ¡¡¡Eres luz!!!





# Índice

---

|   |           |
|---|-----------|
| Abreviaturas.....   | iii       |
| Resumen.....  | v         |
| <b>I-INTRODUCCIÓN.....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>1. ECOLOGÍA DE LEVADURAS VÍNICAS.....</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1. Origen de las levaduras en vinificación.....   | 1         |
| 1.1.1. El ecosistema viñedo.....  | 3         |
| 1.1.1.1. El suelo.....  | 3         |
| 1.1.1.2. La filosfera (corteza, hojas, uvas).....   | 5         |
| 1.1.2. El ecosistema bodega.....  | 7         |
| 1.1.2.1. El mosto.....  | 7         |
| 1.1.2.2. La fermentación.....   | 7         |
| 1.2. Dinámica de poblaciones y diversidad microbiana.....   | 11        |
| 1.3. Identificación de levaduras vínicas.....   | 17        |
| 1.3.1. Método de identificación de especies de levaduras vínicas: PCR-RFLP de la región ITS-5.8S del ADN ribosomal..... | 19        |
| 1.3.2. Método de diferenciación de cepas de <i>S. cerevisiae</i> : RFLP del ADN mitocondrial (RFLP-ADNmt).....          | 20        |
| 1.4. Índices ecológicos.....  | 23        |
| <b>2. LEVADURAS EN LA DIFERENCIACIÓN, TIPICIDAD Y CALIDAD DEL VINO.....</b>   | <b>26</b> |
| 2.1. Producción ecológica. Influencia en la diversidad, calidad y tipicidad.....  | 26        |
| 2.2. Contribución enológica de las levaduras <i>Saccharomyces</i> y no- <i>Saccharomyces</i> .....                      | 30        |
| 2.3. Aptitud enológica de las levaduras vínicas.....  | 34        |
| 2.4. Vino Verdejo.....  | 40        |
| <b>3. BIBLIOGRAFÍA.....</b>   | <b>43</b> |

|   |    |
|---|----|
| <b>II-OBJETIVOS</b> .....   | 53 |
| <b>III-COMPENDIO DE PUBLICACIONES</b> .....   | 57 |
| CAPÍTULO I. Estudio de la biodiversidad de las poblaciones de la levadura <i>S. cerevisiae</i> .....  | 59 |
| CAPÍTULO II. Estudio de la biodiversidad de las poblaciones de levaduras no- <i>Saccharomyces</i> .....   | 61 |
| CAPÍTULO III. Aplicación de levaduras nativas no- <i>Saccharomyces</i> y <i>S. cerevisiae</i> en la elaboración de vinos de la variedad Verdejo, en la D. O. Rueda..... | 63 |
| <b>IV-CONCLUSIONES</b> .....  | 67 |

# Abreviaturas

---

| Forma      | Equivalencia  |
|------------|---|
| – A        | Adenina   |
| – ADN      | Ácido desoxirribonucleico   |
| – ADNmt    | ADN mitocondrial  |
| – ADNr     | ADN ribosómico  |
| – ARN      | Ácido ribonucleico  |
| – C        | Citosina  |
| – C.R.D.O. | Consejo Regulador de la Denominación de Origen  |
| – D.O.     | Denominación de Origen  |
| – ETS      | <i>External Transcribed Spacer</i> (siglas en inglés)<br>(Espaciador transcrito externo en español)                                       |
| – G        | Guanina   |
| – H        | Índice de Shannon   |
| – HCDC     | Hidroxycinamato descarboxilasa  |
| – ITS      | <i>Internal Transcribed Spacer</i> (siglas en inglés)<br>(Espaciador transcrito interno en español)                                       |
| – kb       | Kilobases   |
| – LSA      | Levadura Seca Activa  |
| – 3MH      | 3-Mercaptohexan-1-ol  |
| – 3MHA     | Acetato de 3-mercaptohexilo   |
| – 4MMP     | 4-Mercapto-4-metilpentan-2-ona  |
| – NGS      | <i>Next Generation Sequencing</i> (siglas en inglés)<br>(Secuenciación de nueva generación en español)                                    |
| – NMDS     | <i>Nonmetric Multidimensional Scaling</i> (siglas en inglés)<br>(Escalamiento multidimensional no métrico en español)                     |
| – OIV      | Organización Internacional de la Viña y el Vino   |
| – OTU      | <i>Operational Taxonomic Unit</i> (siglas en inglés)<br>(Unidad taxonómica operativa en español)  |
| – pb       | Pares de bases  |
| – PCR      | <i>Polymerase Chain Reaction</i> (siglas en inglés)<br>(Reacción en cadena de la polimerasa en español)                                   |
| – RFLP     | <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (siglas en inglés)<br>(Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción en español) |
| – S        | Riqueza de especies   |
| – SR       | Sulfito Reductasa   |
| – T        | Tirosina  |
| – UFC      | Unidades Formadoras de Colonia  |

## Abreviaturas

---

- VPhR Vinilfenol Reductasa
- VOCs *Volatile Organic Compounds* (siglas en inglés)  
(Compuestos orgánicos volátiles en español)
- v/v volumen/volumen
- WMC *Wine Microbial Consortium* (siglas en inglés)  
(Consortio microbiano del vino en español)

# Resumen

---

El clima, las condiciones climatológicas anuales, la topografía de las parcelas, la diversidad genética del viñedo, el sistema de manejo vitícola y las prácticas enológicas son factores que influyen de forma directa sobre la diversidad de las especies de levaduras vínicas. Entender la interacción de estos factores con la microbiota asociada al proceso de vinificación y su contribución en la elaboración de vinos diferenciados y de calidad es un reto de actual interés.

Este trabajo se inició con el estudio molecular de 484 aislados de levaduras vínicas nativas obtenidas a partir de procesos de fermentación espontánea de uva de la variedad Verdejo, considerando tres parcelas de viñedo diferentes, dos añadas y cinco etapas a lo largo del proceso de vinificación. La caracterización molecular determinó la composición de las comunidades de levaduras asociadas a cada etapa del proceso fermentativo, demostrando una elevada variabilidad genética inter- e intraespecie. Además, permitió estudiar la biodiversidad de las poblaciones de levaduras asociadas a cada parcela y cada añada, demostrando una disminución de la diversidad a medida que avanza el proceso de fermentación, una estructura poblacional común marcada por la dominancia y la ubicuidad de algunos grupos genéticos, y poblaciones de levaduras características de cada parcela y añada.

La aplicación tecnológica del estudio de las poblaciones de levaduras nativas requiere evaluar la capacidad enológica de los diferentes grupos genéticos. Para ello se consideró tanto su comportamiento fermentativo como su perfil enzimático en relación a la producción de diversas enzimas de interés en los procesos de vinificación. Estos resultados probaron una importante variabilidad tecnológica intraespecie y subrayaron el potencial enológico de aislados de las especies *Saccharomyces cerevisiae* y *Wickerhamomyces anomalus*.

Teniendo en cuenta los resultados previos de identificación, caracterización y comportamiento tecnológico se seleccionaron cepas nativas, y se plantearon ensayos de fermentación mixta mediante inoculación secuencial de levaduras no-*Saccharomyces* y *S. cerevisiae*, utilizando mosto de uva de la variedad Verdejo. El desarrollo de las fermentaciones mixtas demostró una evolución cinética óptima y una correcta implantación de las levaduras utilizadas como cultivos iniciadores. El análisis de los compuestos orgánicos volátiles en los vinos obtenidos evidenció un perfil aromático propio, demostrando la influencia de la microbiota nativa en las características del producto final y su importancia en la calidad, tipicidad y singularidad de estos vinos.



# I-INTRODUCCIÓN

---





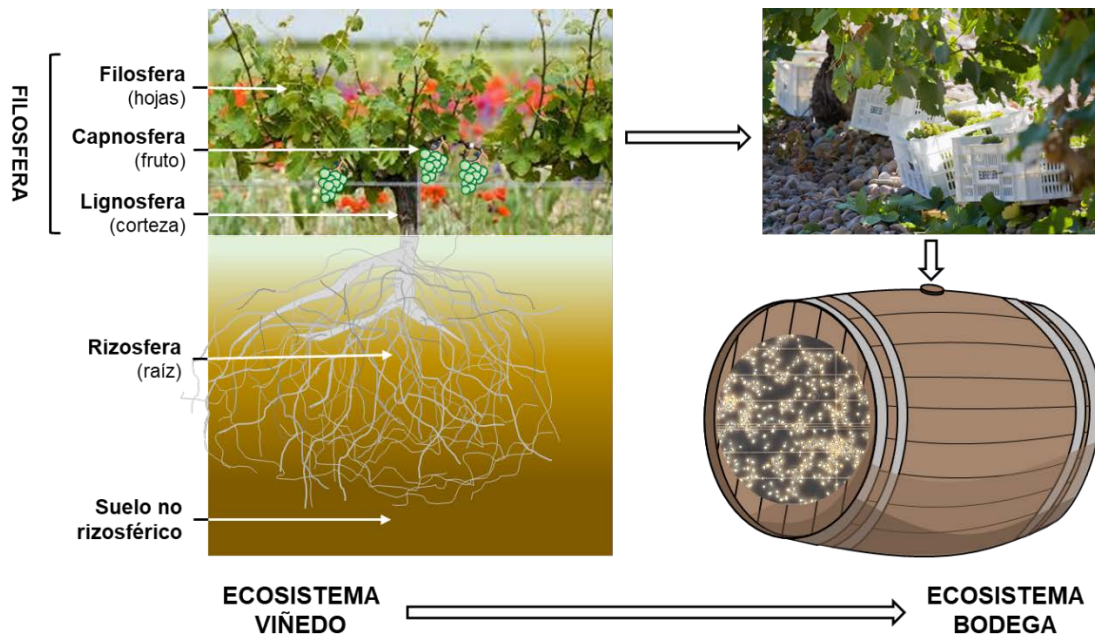
# I-INTRODUCCIÓN

## 1. ECOLOGÍA DE LEVADURAS VÍNICAS

### 1.1. Origen de las levaduras en vinificación

Desde un enfoque de ecología microbiana, tanto el viñedo como la bodega constituyen dos complejos ecosistemas, relacionados entre sí, que configuran un sistema de producción vitivinícola. Para considerar el origen de las levaduras en el proceso de vinificación, se plantea una revisión de los principales compartimentos que forman cada ecosistema (suelo, raíces, tronco, hojas, uvas, mosto y fermentación). Cada uno de ellos es un hábitat con diferentes características, ocupado por un conjunto de comunidades microbianas propias agrupadas bajo el término de microbiota. Para describir y entender la diversidad microbiana de cada uno de los componentes del sistema, no solo hay que tener en cuenta las diferentes especies que ocupan un hábitat concreto, sino que hay que aplicar un concepto integral denominado microbioma. Este término considera de forma conjunta la comunidad microbiana del hábitat (microbiota), su composición química y sus productos, su actividad funcional, y las interacciones de los microorganismos entre sí y de los microorganismos con el ambiente que ocupan (Griggs et al., 2021).

En primer lugar, en el ecosistema viñedo se distinguen dos elementos bien diferenciados, el suelo y la vid. A su vez, en cada elemento se diferencian varios compartimentos (Figura 1). El estudio de las comunidades microbianas del suelo se aborda atendiendo a dos hábitats bien diferenciados: el suelo mayoritario o suelo no rizosférico y la rizosfera. El término rizosfera define el hábitat diferencial que se establece como resultado de la interacción entre las raíces del viñedo, el suelo circundante y las poblaciones microbianas que lo ocupan, agrupadas en base a la funcionalidad que desempeñan (Liu et al., 2019). Continuando con la vid y desde una visión de ecología microbiana, la corteza del tronco, las hojas y el fruto (las uvas) se consideran los compartimentos más relevantes. Estas partes, atendiendo a su función como hábitat microbiano, se denominan lignosfera, filosfera y capnosfera; aunque de forma genérica se agrupan bajo la denominación común de filosfera (Griggs et al., 2021; Figura 1). Por último, en el ecosistema bodega se considera la contribución de los ambientes de la bodega a la microbiota del mosto y el hábitat especial que el propio proceso fermentativo determina. Ambos ecosistemas están relacionados con hábitats circundantes como otros cultivos diferentes al viñedo, linderas o masas de bosque, que pueden actuar de reservorio de diferentes microorganismos y que también sirven de reservorio y cobijo de vectores de transporte como insectos y pájaros, contribuyendo al intercambio de microorganismos entre los diferentes compartimentos del sistema viñedo-bodega (Griggs et al., 2021).



**Figura 1.** Esquema del sistema de producción vitivinícola. Se incluyen los componentes del ecosistema viñedo, desde un punto de vista de la ecología microbiana. De forma general, se denomina filosfera al conjunto de compartimentos aéreos (filosfera, capnosfera y lignosfera).

El conjunto de especies de levaduras y bacterias vnicas relacionadas con las propiedades organolépticas del vino, a través de su actividad y funcionalidad en el mismo, se define como consorcio microbiano del vino (WMC, siglas en inglés de *Wine Microbial Consortium*; Renouf et al., 2007). Teniendo en cuenta los objetivos de este estudio, solo se consideran los microorganismos fúngicos que componen el WMC, los cuales, atendiendo a sus requerimientos nutricionales y metabolismo (Barata et al., 2012) se clasifican en (Tabla 1):

- Oligotrofos. Levaduras Basidiomycota oxidativas (*Rhodotorula* spp.) y el hongo Ascomycota *Aerobasidium pullulans*. Se caracterizan por su metabolismo oxidativo y bajas necesidades nutricionales.
- Copiotrofos. Levaduras Ascomycota, cuyo metabolismo es oxidativo o ligeramente fermentativo (*Candida* spp., *Hanseniaspora* spp., *Pichia* spp. y *Metschnikowia* spp.), y se encuentran en ambientes ricos en nutrientes.
- Copiotrofos fermentativos. Levaduras Ascomycota con un metabolismo altamente fermentativo (*Saccharomyces* spp., *Torulaspora* spp., *Zygosaccharomyces* spp., *Lachancea* spp. y *Pichia* spp.).

Se diferencia una cuarta categoría de microorganismos que no puede ser agrupada siguiendo la clasificación descrita, pero que comparte hábitat con los anteriores. Se trata de un conjunto de hongos filamentosos Ascomycota (p. ej. *Botrytis* spp. y *Aspergillus* spp.) y el pseudohongo Oomycete *Plasmopara viticola*, ampliamente distribuidos en el ecosistema viñedo. Estos microorganismos patógenos son los principales agentes causales de diferentes enfermedades de

la vid (Tabla 1). Su metabolismo propio de organismos saprófitos y parásitos obligados no les permite desarrollarse en el vino, pero tienen un gran efecto sobre el mismo ya que su proliferación afecta al estado sanitario de las uvas y modifica las poblaciones microbianas presentes en su superficie (Barata et al., 2012).

Teniendo en cuenta esta clasificación, a continuación, se revisa la diversidad fúngica asociada a los diferentes hábitats del sistema viñedo-bodega, desde el suelo del viñedo hasta el vino (Tabla 1). Aunque estos grupos funcionales ayudan a establecer la evolución de las poblaciones microbianas, no son grupos que permitan definir unos límites concisos de diferenciación de cada conjunto, ya que la diversidad metabólica y la capacidad de adaptación de los microorganismos implica que especies de un mismo género puedan ser clasificadas en los tres grupos de metabolismos propuestos, como *Candida* spp. y *Pichia* spp. (Barata et al., 2012).

### **1.1.1. El ecosistema viñedo**

#### **1.1.1.1. El suelo**

El suelo es un complejo ecosistema que presenta una elevada diversidad microbiana y constituye una de las principales fuentes de microorganismos asociados a los diferentes ambientes del sistema viñedo-bodega (Bettenfeld et al., 2022). De forma general, las especies más abundantes que se encuentran en el suelo son mohos de origen ambiental, ampliamente distribuidos en cualquier hábitat. También actúa como reservorio de especies oportunistas cuya proliferación genera importantes enfermedades en la vid (Tabla 1) (Stefanini y Cavalieri, 2018). Además, en el suelo se encuentran numerosas comunidades de microorganismos conectadas por la funcionalidad que desempeñan en cada hábitat, y que en muchos casos está relacionada con la nutrición y la salud del viñedo.

En el suelo no rizosférico se identifican poblaciones microbianas cuya actividad determina la renovación cíclica de los nutrientes, a través de los ciclos biogeoquímicos del carbono, del nitrógeno, del fósforo, etc. La acción de estos microorganismos edáficos tiene un impacto directo sobre la fertilidad del suelo y, por lo tanto, sobre la disponibilidad de diferentes macro- y micronutrientes esenciales para el desarrollo del viñedo. Además, el crecimiento y desarrollo de estas poblaciones ejercen un efecto sobre el hábitat que ocupan, mediante la liberación de exudados extracelulares formados por diferentes compuestos orgánicos resultado de su metabolismo. Estos compuestos modifican las características fisicoquímicas del ambiente e intervienen en procesos de formación y estabilización de los agregados del suelo, afectando a la porosidad y permeabilidad del mismo (Griggs et al., 2021).

Con relación a la rizosfera, se establece un ecosistema específico marcado por la simbiosis que se origina entre la planta y las poblaciones microbianas asociadas a sus raíces. La principal fuente

de carbono, nitrógeno y energía que las poblaciones rizosféricas utilizan para su crecimiento son los diversos compuestos orgánicos (carbohidratos, aminoácidos, ácidos orgánicos, etc.), liberados como exudados a través de la raíz de las plantas y que proceden de su actividad fotosintética (Martins et al., 2013). El sustento de estas poblaciones microbianas, mediante el aporte de recursos metabólicos propios, revierte en importantes beneficios para las plantas. Por un lado, la actividad microbiana determina un importante aporte de nutrientes esenciales mediante su contribución en los ciclos biogeoquímicos, la solubilización de determinados compuestos como los fosfatos, o la captación de micronutrientes esenciales como el hierro y el cobre. Por otro lado, estas poblaciones son capaces de sintetizar factores de crecimiento vegetales, como las auxinas, fitohormonas reguladoras que intervienen en el desarrollo y crecimiento vegetal. También actúan como sistemas de defensa de la planta ante situaciones de estrés térmico o hídrico, o a través de la síntesis de sustancias antimicrobianas que permiten controlar la proliferación de microorganismos patógenos (Stefanini y Cavalieri, 2018). Adquiere especial importancia la asociación de la raíz con determinadas especies de hongos del filo *Glomeromycota*, dando lugar a la relación simbiótica conocida como micorrizas arbusculares (endomycorrizas). Además de contribuir a todas las funciones descritas, las micorrizas aumentan la extensión del sistema radicular, y por lo tanto su capacidad de absorción, suponiendo una ventaja adaptativa en situaciones de estrés (Sumbly et al., 2021).

Por todo lo expuesto, los microorganismos edáficos, a través de su función ecológica, tienen un impacto beneficioso en la nutrición y salud de la vid y, por lo tanto, en el desarrollo óptimo de las uvas. Estas poblaciones responden a diferentes factores determinados por el ambiente que ocupan, por las relaciones que se establecen con las raíces de la vid y por las relaciones entre las propias poblaciones microbianas. En primer lugar, factores propios de las características del suelo del viñedo, como la composición, la textura, el pH, etc. dirigen el desarrollo de la microbiota. En segundo lugar, factores ambientales variables como el contenido de agua y las temperaturas, relacionados a su vez con las condiciones climatológicas de la zona y con la topografía del viñedo (pendiente, altitud, orientación, etc.), determinan tanto el desarrollo como la dispersión de las comunidades microbianas. Desde un punto de vista nutricional, en el suelo no rizosférico también es variable la disponibilidad de fuentes de carbono y nitrógeno, lo cual es un factor limitante del crecimiento de los microorganismos. Esta disponibilidad está muy relacionada con el manejo del cultivo de la vid, como el abonado químico u orgánico, la utilización de cubiertas vegetales y el movimiento de la tierra mediante arado, entre otros aspectos. En la rizosfera de la vid no hay una limitación nutricional tan notable, pero sí hay una selección de poblaciones atendiendo a factores propios de la planta. Las variedades de uvas, la variabilidad genética de los portainjertos e injertos, la edad del viñedo y su estado fenológico anual son componentes que dirigen la colonización microbiana de las raíces y la evolución de las poblaciones asentadas a lo largo del ciclo vital del

viñedo. Esto se debe a cambios en la composición de los exudados liberados a través de la raíz y en la morfología de las propias raíces (Bettenfeld et al., 2022). Por último, las interacciones entre las diferentes especies que constituyen cada una de las poblaciones también suponen un elemento modulador en el desarrollo de las comunidades microbianas. La competencia entre las especies por los recursos nutricionales del suelo, la modificación de las condiciones fisicoquímicas del hábitat que ocupan las poblaciones en base a su propia actividad metabólica y la liberación de metabolitos secundarios que actúan como compuestos antimicrobianos son factores que ejercen una presión de selección sobre las propias poblaciones, que modula su evolución y su permanencia en los diferentes ecosistemas.

La evolución de los ecosistemas edáficos deriva de una interacción constante entre todos sus elementos (suelo, raíces y comunidades microbianas). Esta interacción se ve afectada por todos y cada uno de los factores abióticos, bióticos y antropogénicos que definen las características de cada ecosistema. Como resultado de esta evolución se constituye un microbioma edáfico local que contribuye al crecimiento, desarrollo y salud del viñedo, y le confiere ventajas adaptativas en situaciones de estrés como la sequía. Todo ello conduce a la obtención de uvas sanas y con un grado óptimo de maduración que proporcionan las características organolépticas adecuadas para la elaboración del vino.

#### **1.1.1.2. *La filosfera (corteza, hojas, uvas)***

Se denomina filosfera a todas las partes aéreas de la vid que pueden ser consideradas como hábitats de las diferentes poblaciones microbianas que colonizan su superficie. A continuación, se describen tres partes fundamentales relacionadas con la microbiota del vino: la corteza del tronco, las hojas y las uvas. A pesar de su proximidad en la estructura de la vid son ambientes muy diferenciados, cuyas características configuran la composición de las comunidades microbianas.

La corteza del tronco de la vid se caracteriza por ser un ambiente rico en nutrientes, que incluyen azúcares simples, almidón, exudados de la savia del xilema, celulosa, hemicelulosa, xilano y lignina. Por ello, presenta unas condiciones adecuadas para el desarrollo de microorganismos copiotrofos que se distribuyen de forma heterogénea en función de la presencia de partes vivas y muertas en la madera (Martins et al., 2013). Este compartimento de la vid adquiere especial importancia al actuar como reservorio, tanto de azúcares y nitrógeno como de poblaciones microbianas, durante el periodo de parada vegetativa del viñedo. Además, se considera como origen de dispersión de poblaciones microbianas hacia las hojas, flores y uvas (Bettenfeld et al., 2022).

Desde una perspectiva nutricional, la superficie de las hojas es un ambiente desfavorable, con poca disponibilidad de nutrientes. En este entorno, las levaduras Basidiomycota oxidativas y *A. pullulans*, ampliamente distribuidas en cualquier ambiente natural, constituyen las poblaciones más abundantes (Barata et al., 2012). La disposición de los haces vasculares y de los estomas genera una distribución irregular de las poblaciones microbianas, relacionada con una mayor cantidad de nutrientes y con el efecto de protección que proporcionan ante situaciones de estrés, como la ausencia de agua o la alta radiación ultravioleta (Griggs et al., 2021). A estas zonas más ricas en nutrientes se asocia la presencia de algunas especies de levaduras fermentativas (*Saccharomyces* spp., *Hanseniaspora* spp. y *Metschnikowia* spp.) (Stefanini y Cavalieri, 2018). Por otro lado, algunos compuestos polifenólicos de las hojas, como los estilbenos (resveratrol y derivados), actúan como sustancias antimicrobianas y suponen un efecto modulador de las poblaciones microbianas asociadas a este ambiente (Martins et al., 2013).

El fruto recolectado durante la vendimia constituye uno de los principales aportes de microbiota nativa de cada viñedo a los procesos de fermentación (Stefanini y Cavalieri, 2018; González et al., 2020). En el inicio del desarrollo de las bayas, su superficie es un ambiente de características semejantes al descrito para las hojas y, por lo tanto, asociado al mismo tipo de poblaciones microbianas, con concentraciones moderadas de levaduras, en el orden de  $10 - 10^3$  UFC/g (Barata et al., 2012; Griggs et al., 2021) (Tabla 1). El posterior proceso de maduración de las uvas (envero) conlleva una serie de cambios metabólicos y fisiológicos en las bayas, como la acumulación progresiva de azúcares, la disminución de la acidez asociada al descenso de ácidos orgánicos, la síntesis de compuestos fenólicos, la liberación de compuestos orgánicos volátiles, el aumento del peso y tamaño de las bayas y la disminución del espesor de la cutícula. Este conjunto de transformaciones supone modificaciones en la composición de las ceras de la cutícula y en los exudados asociados a su superficie. Por lo tanto, se produce un aumento de la disponibilidad de nutrientes en el hábitat microbiano, que determina la colonización de las uvas por poblaciones de levaduras Ascomycota oxidativas y fermentativas, las cuales tienen un papel relevante en los procesos de fermentación (Barata et al., 2012; Tabla 1). La sucesión poblacional de levaduras, en base al proceso de maduración, también supone un aumento en la densidad poblacional, alcanzando concentraciones de  $10^4 - 10^6$  UFC/g (Griggs et al., 2021).

La formación de grietas en la superficie de las bayas por aumento de la presión hidrostática en su interior y los diversos daños provocados por el desarrollo de enfermedades de la vid, vinculadas a la proliferación de microorganismos patógenos, suponen un aumento de las poblaciones de levaduras Ascomycota altamente fermentativas en la superficie de las uvas (*Pichia* spp., *Torulasporea* spp. y *Zygosaccharomyces* spp.; Tabla 1). Estas especies pueden llegar a convertirse en dominantes ante el incremento de la disponibilidad de nutrientes, relacionado con la pérdida del contenido de las bayas. Algunas de ellas se asocian a enfermedades concretas, como la

presencia de *Candida stellata* en uvas afectadas por la podredumbre gris causada por *B. cinerea* (Barata et al., 2012).

### **1.1.2. El ecosistema bodega**

#### **1.1.2.1. El mosto**

Este hábitat microbiano supone una mezcla de orígenes. Por un lado, concentra todos los microorganismos presentes en las uvas recolectadas y, por otro lado, la toma de contacto de las uvas con el equipamiento de la bodega hace posible que microorganismos residentes en la bodega pasen a formar parte del mosto obtenido (Stefanini y Cavalieri, 2018). Microorganismos ambientales (p. ej. *Aspergillus* spp.), oxidativos (p. ej. *Cryptococcus* spp. y *A. pullulans*) y diferentes especies de levaduras copiotrofas y copiotrofas fermentativas (no-*Saccharomyces* y *Saccharomyces*) procedentes de las uvas y de la bodega forman parte de la compleja mezcla de poblaciones microbianas del mosto (Tabla 1). Tanto las condiciones fisicoquímicas de este ambiente (pH, acidez total, concentración de azúcares y de nitrógeno, aplicación de antimicrobianos como el SO<sub>2</sub>, etc.), como las interacciones entre las diferentes especies de las comunidades microbianas, junto con las diferentes técnicas enológicas de elaboración aplicadas, determinan la selección de las poblaciones microbianas que constituyen el inóculo inicial del proceso de fermentación alcohólica (Englezos et al., 2022).

#### **1.1.2.2. La fermentación**

Durante la fermentación, se produce una sucesión múltiple y constante de especies de levaduras dirigida por la evolución de las condiciones de fermentación y por la adaptación de las especies presentes a estas condiciones. Los principales factores que determinan esta sucesión de poblaciones son: el aumento de la temperatura y de la tasa de fermentación, la disminución progresiva de la cantidad de azúcares y nitrógeno disponible, el aumento de la concentración de etanol, y la modificación de los valores de pH y de acidez total. Además de estos factores asociados a la propia evolución del proceso de fermentación, también hay que tener en cuenta los efectos derivados de la interrelación entre las especies coexistentes. Efectos sinérgicos o antagónicos que pueden establecerse entre las diferentes especies a través de contactos célula-célula, o bien por la producción de sustancias antimicrobianas como las toxinas *killer* o péptidos bioactivos de pequeño tamaño, pueden modificar los patrones poblacionales de la fermentación y su evolución (Swiegers et al., 2005; Englezos et al., 2022).

En las primeras etapas de la fermentación es habitual la presencia de varias especies no-*Saccharomyces*, como *Candida* spp., *Hanseniaspora* spp., *Metschnikowia* spp., *Pichia* spp. y *Torulaspota* spp. Estas etapas se caracterizan por una alta diversidad microbiana, definida por una elevada riqueza de especies (número de especies distintas) con una frecuencia moderada

(Stefanini y Cavalieri, 2018). A medida que avanza el proceso, la diversidad microbiana disminuye asociada a la dominancia progresiva de la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Se alcanzan concentraciones poblacionales muy elevadas de  $10^6$  a  $10^8$  UFC/mL, y además de *S. cerevisiae* se identifican otras especies de levaduras, como *C. zemplinina*, *Hanseniaspora* spp, *Metschnikowia* spp., y *Lachancea* spp. (Liu et al., 2019). Cabe destacar que la sucesión poblacional de *S. cerevisiae* ha sido estudiada a nivel de cepa, en muchos de los trabajos publicados. Sus resultados demuestran que, a pesar de la presencia de diferentes cepas, la dominancia descrita también se comprueba a este nivel, siendo una cepa mayoritaria la principal representante de la población de *S. cerevisiae* durante la fase de fermentación tumultuosa (Di Maio et al., 2012; Celis et al., 2019; Castrillo et al., 2020).

Además de las propias condiciones del proceso fermentativo, hay otros factores externos derivados de las prácticas enológicas habituales que modulan y en algunos casos modifican de forma importante la composición de las poblaciones de levaduras. Algunos de estos factores son: el empleo de cultivos iniciadores de levaduras seleccionadas, el enriquecimiento de poblaciones naturales mediante el uso de pies de cuba, la aplicación de maceraciones en frío, la utilización de  $\text{SO}_2$  u otros compuestos químicos antimicrobianos, el control de la temperatura durante la fermentación, la concentración de oxígeno, la corrección de pH y la suplementación con nutrientes (nitrógeno orgánico, fosfatos, levaduras inactivas, etc.) (Englezos et al., 2022; Mas y Portillo, 2022).

Son muchos los aspectos que influyen en la estructura y composición de las comunidades microbianas que forman parte de los diferentes ecosistemas del sistema viñedo-bodega. En este apartado se describen las poblaciones de levaduras desde un punto de vista metabólico y funcional. Estas comunidades no son estáticas, se adaptan y evolucionan en determinados hábitats, pero también sufren procesos de dispersión que permiten la colonización de nuevos ambientes. Entender estos factores desde una estrategia global, puede convertirse en una herramienta enológica que permita enfocar el manejo de los mismos para dar respuesta a nuevas necesidades en las técnicas de elaboración o para conseguir el diseño de nuevos productos (Pretorius, 2022).



**Tabla 1.** Diversidad y dispersión fúngica asociados a los diferentes hábitats del sistema viñedo-bodega. Tabla modificada actualizando el significado tecnológico de las especies de levaduras (Barata et al., 2012). En las fuentes, el color gris oscuro indica un origen principal, y el color gris claro refleja un origen menos frecuente.

| Metabolismo  | Género                              | Especies relevantes                                    | Fuentes * |    |    |    |    |    |    |    | Significado tecnológico | Referencias   |   |
|--|-------------------------------------|--|-----------|----|----|----|----|----|----|----|-------------------------|---|---|
|  |                                     |  | Su        | Co | Ho | Uv | Mo | Fe | Vi | In |                         |   |   |
| <b>Hongos filamentosos</b>   |                                     |  |           |    |    |    |    |    |    |    |                         |   |   |
| Parásitos obligados  | <i>Plasmopara</i>                   | <i>P. viticola</i>                                     |           |    |    |    |    |    |    |    |                         | Mildiu  | Barata et al., 2012   |
|  | <i>Erysiphe</i>                     | <i>E. necator</i>                                      |           |    |    |    |    |    |    |    |                         | Oídio   | Barata et al., 2012   |
| Mohos saprofitos   | <i>Botrytis</i>                     | <i>B. cinerea</i>                                      |           |    |    |    |    |    |    |    |                         | Podredumbre gris  | Barata et al., 2012   |
|  | <i>Aspergillus</i>                  | <i>A. alliaceus</i>                                    |           |    |    |    |    |    |    |    |                         | Podredumbre de <i>Aspergillus</i> , producción de micotoxinas (ocratoxina A, aflatoxina B1) | Barata et al., 2012   |
|  |                                     | <i>A. carbonarius</i>                                  |           |    |    |    |    |    |    |    |                         |   |   |
|  |                                     | <i>A. niger aggregate</i>                              |           |    |    |    |    |    |    |    |                         |   |   |
|  |                                     | <i>A. ochraceus</i>                                    |           |    |    |    |    |    |    |    |                         |   |   |
|  | <i>Penicillium</i>                  | <i>P. expansum</i>                                     |           |    |    |    |    |    |    |    |                         | Podredumbre de <i>Penicillium</i> (podr. azul), producción de patulina                      | Barata et al., 2012   |
|  | <i>Cladosporium</i>                 | <i>C. herbarum</i>                                     |           |    |    |    |    |    |    |    |                         | Podredumbre de <i>Cladosporium</i>  | Barata et al., 2012   |
|  | <i>Colletotrichum</i>               | <i>C. acutatum</i>                                     |           |    |    |    |    |    |    |    |                         | Podredumbre madura  | Barata et al., 2012   |
| <i>Greeneria</i>   | <i>G. uvicola</i>                   |  |           |    |    |    |    |    |    |    | Podredumbre amarga      | Barata et al., 2012   |   |
| <b>Basidiomycota: levaduras</b>  |                                     |  |           |    |    |    |    |    |    |    |                         |   |   |
| Oxidativo (oligotrofos)  | <i>Filobasidium</i>                 |  |           |    |    |    |    |    |    |    |                         | Actividad pectinolítica ( <i>F. capsuligenum</i> )  | Merín et al., 2013  |
|  | <i>Cryptococcus</i>                 |  |           |    |    |    |    |    |    |    |                         | Eliminación de ocratoxina A en vino ( <i>Cr. albidus</i> )                                  | Wang et al., 2024   |
|  | <i>Rhodotorula</i>                  |  |           |    |    |    |    |    |    |    |                         | Recurso biotecnológico en vinos ( <i>R. mucilaginosa</i> )                                  | Wang et al., 2017   |
| <b>Ascomycota: levaduras y hongo tipo-levadura <i>Aerobasidium</i></b> |                                     |  |           |    |    |    |    |    |    |    |                         |   |   |
| Oxidativo  | <i>Aerobasidium</i>                 | <i>A. pullulans</i>                                    |           |    |    |    |    |    |    |    |                         | Recurso biotecnológico en vinos   | Oneto et al., 2020  |
| Oxidativo o débilmente fermentativo (copiotrofos)                      | <i>Hanseniaspora/ Kloeckera</i>     | <i>H. uvarum</i> / <i>K. apiculata</i>                 |           |    |    |    |    |    |    |    |                         | Recurso biotecnológico en vinos   | Borren & Tian, 2021; Ciani et al., 2022; Maicas & Mateo, 2023 |
|  | <i>Candida</i> (formación biofilms) | <i>C. stellata</i> ( <i>Starmerella bombicola</i> )    |           |    |    |    |    |    |    |    |                         | Recurso biotecnológico en vinos   | Ciani et al., 2022; Maicas & Mateo, 2023                      |
|  |                                     | <i>C. zemplinina</i> ( <i>Starmerella bacillaris</i> ) |           |    |    |    |    |    |    |    |                         | Recurso biotecnológico en vinos   | Borren & Tian, 2021; Ciani et al., 2022                       |

## Introducción

| Metabolismo                                       | Género                             | Especies relevantes                                     | Fuentes * |    |    |    |    |    |    | Significado tecnológico | Referencias |  |  |   |   |
|---|------------------------------------|---|-----------|----|----|----|----|----|----|-------------------------|-------------|--|--|---|---|
|   |                                    |   | Su        | Co | Ho | Uv | Mo | Fe | Vi |                         |             | In   |  |   |   |
|   | <i>Candida</i>                     | <i>C. steatolytica</i> /<br><i>Zygoascus hellenicus</i> |           |    |    |    |    |    |    |                         |             |  |  |   |   |
| Oxidativo o débilmente fermentativo (copiotrofos) | <i>Metschnikowia</i>               | <i>M. pulcherrima</i>                                   |           |    |    |    |    |    |    |                         |             |  | Recurso biotecnológico en vinos            | Borren & Tian, 2021; Ciani et al., 2022; Maicas & Mateo, 2023 |   |
|   | <i>Wickerhamomyces</i>             | <i>W. anomalus</i> ( <i>Pichia anomala</i> )            |           |    |    |    |    |    |    |                         |             |  | Recurso biotecnológico en vinos            | Borren & Tian, 2021; Maicas & Mateo, 2023                     |   |
|   | <i>Pichia</i> (formación biofilms) | <i>P. membranifaciens</i>                               |           |    |    |    |    |    |    |                         |             |  |  | Biocontrol. Producción de toxinas <i>killer</i>               | Belda et al., 2017b   |
|   |                                    | <i>P. guilliermondii</i>                                |           |    |    |    |    |    |    |                         |             |  |  | Recurso biotecnológico en vinos                               | Ciani et al., 2022  |
|   |                                    | <i>P. kluyveri</i>                                      |           |    |    |    |    |    |    |                         |             |  |  | Recurso biotecnológico en vinos                               | Borren & Tian, 2021; Ciani et al., 2022; Maicas & Mateo, 2023 |
|   | <i>Debaryomyces</i>                | <i>D. hansenii</i>                                      |           |    |    |    |    |    |    |                         |             |  |  | Recurso biotecnológico en vinos                               | Van Wyk et al., 2020  |
|   | <i>Lachancea</i>                   | <i>L. thermotolerans</i>                                |           |    |    |    |    |    |    |                         |             |  |  | Recurso biotecnológico en vinos                               | Borren & Tian, 2021; Ciani et al., 2022; Maicas & Mateo, 2023 |
| <i>L. fermentati</i>                              |                                    |   |           |    |    |    |    |    |    |                         |             |  |  |   |   |
| Fermentativo (copiotrofos fermentativos)          | <i>Torulaspora</i>                 | <i>T. delbrueckii</i>                                   |           |    |    |    |    |    |    |                         |             |  | Recurso biotecnológico en vinos            | Borren & Tian, 2021; Ciani et al., 2022; Maicas & Mateo, 2023 |   |
|   | <i>Zygosaccharomyces</i>           | <i>Z. bailii</i>  |           |    |    |    |    |    |    |                         |             |  | Alterante. Recurso biotecnológico en vinos | Alonso et al., 2015; Ciani et al., 2022                       |   |
|   |                                    | <i>Z. bisporus</i>                                      |           |    |    |    |    |    |    |                         |             |  |  | Levadura alterante en vinos                                   | Barata et al., 2012; Alonso et al., 2015                      |
|   |                                    | <i>Z. rouxii</i>  |           |    |    |    |    |    |    |                         |             |  |  | Alterante. Recurso biotecnológico en vinos                    | Alonso et al., 2015; Escott et al., 2018                      |
|   | <i>Dekkera/ Brettanomyces</i>      | <i>B. bruxellensis</i>                                  |           |    |    |    |    |    |    |                         |             |  | Levadura alterante en vinos                | Barata et al., 2012   |   |
|   | <i>Saccharomyces</i>               | <i>S. cerevisiae</i>                                    |           |    |    |    |    |    |    |                         |             |  |  | Levadura fermentativa   | Barata et al., 2012; Nadai et al., 2019                       |
|   |                                    | <i>S. bayanus</i>                                       |           |    |    |    |    |    |    |                         |             |  |  | Levadura fermentativa   | Barata et al., 2012   |
|   |                                    | <i>S. paradoxus</i>                                     |           |    |    |    |    |    |    |                         |             |  |  | Recurso biotecnológico en vinos                               | Costantini et al., 2021                                       |
|   |                                    | <i>S. pastorianus</i>                                   |           |    |    |    |    |    |    |                         |             |  |  | Recurso biotecnológico en vinos                               | Dimopoulou et al., 2022                                       |
|   | <i>Schizosaccharomyces</i>         | <i>Sc. pombe</i>  |           |    |    |    |    |    |    |                         |             |  | Recurso biotecnológico en vinos            | Borren & Tian, 2021; Ciani et al., 2022; Maicas & Mateo, 2023 |   |
| <i>Saccharomycodes</i>                            | <i>S. ludwigii</i>                 |   |           |    |    |    |    |    |    |                         |             | Alterante. Recurso biotecnológico en vinos | Vejarano, 2018                             |   |   |

\* **Fuentes:** Suelo (Su), Corteza (Co), Hojas (Ho), Uvas (Uv), Mosto (Mo), Fermentación (Fe), Vino (Vi) e Insectos (In).

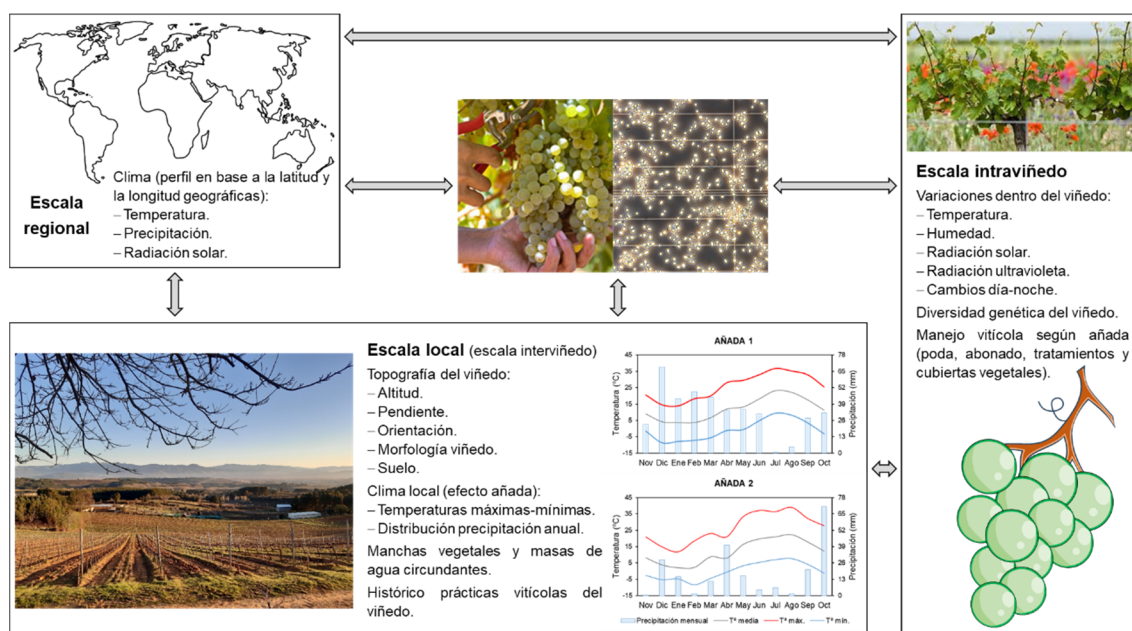
## **1.2. Dinámica de poblaciones y diversidad microbiana**

La diversidad de las comunidades microbianas en cualquier hábitat depende de una serie de circunstancias secuenciales. Por un lado, es necesario que se produzca la inoculación (el contacto), es decir, que microorganismos inmóviles como las levaduras sean transportados por diferentes agentes de dispersión (aire, agua, pájaros, insectos, manejo del viñedo, etc.). Los microorganismos llegan hasta donde los elementos de dispersión tienen capacidad de transporte o de arrastre. Por otro lado, hay que tener en cuenta el efecto de las condiciones propias de los diferentes hábitats (suelo, corteza, hojas y uvas), que actúan como agentes de selección (Martins et al., 2013), junto con el efecto de las condiciones externas (ambientales, manejo del viñedo, etc.). La inoculación de un microorganismo concreto, debida al aporte por alguno de los mecanismos de dispersión, no supone la proliferación de este microorganismo en el nuevo hábitat, ya que deben darse las condiciones adecuadas para que se produzca su desarrollo inicial y su posterior evolución. El resultado de la interacción de todos los factores sobre las comunidades microbianas y la repuesta de las mismas a su conjunto determinan las fuerzas que van a definir el microbioma de la vid y de las uvas y, por lo tanto, definen también el principal aporte de la microbiota natural a los procesos fermentativos (Liu et al., 2019; Bettenfeld et al., 2022).

La biogeografía microbiana vitivinícola consiste en el estudio de la localización geoespacial y temporal de los grupos microbianos asociados al sistema viñedo-bodega (Liu et al., 2019). Todos los factores que determinan la presencia de unas especies microbianas sobre otras, que definen la evolución de las comunidades formadas y que establecen las dinámicas de dispersión de especies entre hábitats, permiten explicar este concepto (Griggs et al., 2021). Atendiendo a su efecto geoespacial, estos factores se pueden agrupar en tres escalas: regional, interviñedo (local) e intraviñedo (Figura 2).

En una escala continental, nacional y regional, el estudio de la biogeografía microbiana de Gobbi et al. (2022) demuestra la relación entre la composición de las comunidades microbianas del suelo de los viñedos y las condiciones climatológicas, a partir del análisis de 252 muestras de suelo procedentes de 200 viñedos localizados a lo largo de cuatro continentes. Por otro lado, la comparación de las comunidades microbianas identificadas en varios viñedos ubicados dentro de una misma región, y también en regiones diferentes, demuestra en la escala local que las comunidades de levaduras son más parecidas cuanto más cercanas se encuentren. Por lo tanto, las diferencias están asociadas a la separación física de los territorios, probablemente vinculadas a la capacidad de dispersión de los vectores de transporte de los microorganismos (viento, agua, animales, actividad agrícola, etc.) (Morrison-Whittle & Goddard, 2018; Liu et al. 2019; Griggs et al., 2021). El tipo de hábitats considerados en función de las muestras analizadas es muy diverso,

e incluye muestras de suelo, de corteza del tronco, de fruto, de mostos y de diferentes fases de la fermentación.



**Figura 2.** Factores que afectan a la localización geoespacial y temporal de los grupos de microorganismos asociados al ecosistema viñedo atendiendo a las escalas regional, local (intervenido) e intraviñado.

Además, dependiendo de la amplitud de la escala de los estudios biogeográficos, también se examina la disposición de las comunidades microbianas a lo largo de los hábitats del sistema viñedo-bodega para valorar la escala intraviñado (Figura 2). De esta forma, se encuentra una mayor diversidad microbiana en los hábitats asociados al suelo (rizosfera y raíces) en comparación con los hábitats de la filosfera (Liu & Howell, 2021). También se describe el solapamiento de algunas especies de levaduras entre los hábitats del sistema, constituyendo un *core*<sup>1</sup> microbiano asociado a la vid (Liu & Howell, 2021; Bettenfeld et al., 2022). Las poblaciones compartidas por más de un compartimento del viñedo pueden proporcionar información sobre los flujos de poblaciones entre los diferentes ambientes y, por lo tanto, sobre la dinámica del microbioma viñedo-bodega y los posibles reservorios microbianos a partir de los cuales se produce la conservación de la diversidad microbiana y su dispersión (Morrison-Whittle & Goddard, 2018). Junto con el *core* microbiano se distinguen poblaciones propias formadas por especies raras, específicas de cada hábitat, que contribuyen a los cambios en la diversidad microbiana (Morrison-Whittle & Goddard, 2018; Liu & Howell, 2021). No obstante, hay que tener en cuenta que todos los datos de distribución de las comunidades microbianas con relación a los diferentes hábitats proporcionan visiones puntuales, asociadas a los momentos de muestreo

<sup>1</sup> **Core microbiano:** Es el conjunto de especies compartido por más de un hábitat que depende del alcance del estudio propuesto. Pueden ser el conjunto de especies comunes a las diferentes partes de una vid, o bien el conjunto de especies compartido por una parte concreta de la vid, comparando parcelas diferentes (Bettenfeld et al., 2022).

establecidos en cada trabajo de investigación. La progresión en el tiempo de estas visiones aporta la percepción de evolución y, por extensión, de dinámica dentro del sistema. Sin embargo, no supone una evidencia precisa de los flujos de poblaciones que se pueden establecer entre los diferentes hábitats, ya que la identificación de las especies comunes a los diferentes hábitats también puede estar relacionada con las especies más o menos abundantes pero ampliamente distribuidas en el ambiente (Morrison-Whittle & Goddard, 2018).

El suelo y el tronco de la vid son dos componentes perennes, dentro del ciclo vegetativo del viñedo, considerados como reservorios microbianos (Martins et al., 2013; Bettenfeld et al., 2022). Ambos presentan una estructura estable en el tiempo que actúa de protección frente a factores ambientales externos, especialmente en el momento de la parada vegetativa de la vid, en el que toda la parte aérea desaparece. Además, son hábitats con una elevada disponibilidad de nutrientes que favorecen el desarrollo de las comunidades microbianas (Vitulo et al., 2019).

En contraposición, se encuentran las estructuras anuales de la vid (hojas, flores y fruto), cuya presencia depende del ciclo fisiológico del viñedo. Las variedades de uvas cultivadas definen la morfología de las hojas y de las bayas (tamaño, forma, disposición, características de la cutícula, etc.), y son un elemento en la escala intraviñedo que determina la diversidad de las poblaciones de estos hábitats. Aunque, dada su exposición directa a los agentes externos, los cambios en las condiciones ambientales y el manejo vitícola son la principal fuente de variación de las comunidades microbianas de las hojas y las uvas (Griggs et al., 2021). Diferencias de temperatura, humedad y radiación solar a las que se encuentran sometidas, junto con las prácticas de manejo del viñedo (especialmente la poda y los tratamientos foliares), determinan una variabilidad significativa de las poblaciones de levaduras. Además, el inicio del crecimiento y desarrollo de las uvas supone una importante diferenciación de ambientes desde un punto de vista nutricional, que puede determinar una sucesión de microorganismos en detrimento de las comunidades microbianas foliares. De esta forma, las hojas suponen una fuente de inóculo de las uvas que se desarrollan más tarde (Stefanini & Cavalieri, 2018).

En general, *S. cerevisiae* demuestra una baja abundancia en cualquier ambiente no fermentativo considerado, incluyendo la superficie de las uvas maduras (10 – 100 UFC/g), relacionado con un comportamiento generalista que le permite adaptarse a hábitats muy diferentes (Barata et al., 2012; Goddard & Greig, 2015; González et al., 2020). Su presencia está asociada a cualquier compartimento del sistema viñedo-bodega, y se ha demostrado su incorporación al suelo a partir de las partes aéreas (racimos de uvas y hojas) que se depositan en diferentes momentos del manejo del viñedo (poda, vendimia, etc.). También se ha reflejado su conservación en hábitats reservorio como el suelo, la corteza del tronco de la vid o las masas forestales circundantes, tanto como célula vegetativa como en forma de resistencia (espora), y su asociación a vectores de transporte,

como aves, insectos, pequeños mamíferos y humanos (Cordero-Bueso et al., 2011; González et al., 2020; Di Paola et al., 2023). Todo ello son evidencias que permiten establecer teorías sobre la dinámica poblacional de *S. cerevisiae* en el microbioma del sistema viñedo-bodega, intentando establecer un flujo en el sentido viñedo-bodega conectado con el ciclo vegetativo de la vid, y con la idea de una situación cíclica anual de conservación en el momento de la parada vegetativa que se produce en invierno, seguido de momentos de dispersión y colonización de las partes aéreas emergentes (Cordero-Bueso et al., 2011; González et al., 2020). Un hecho notable es la elevada variabilidad genética que se encuentra dentro de las poblaciones de *S. cerevisiae* cuando se plantean estudios biogeográficos intraespecie (a nivel de cepa). Esta variabilidad define poblaciones de *S. cerevisiae* características de parcelas concretas y de compartimentos de la vid, y también permite establecer cambios en las mismas a lo largo de su ciclo de crecimiento anual, que reflejan un aumento notable de la diversidad desde la parada vegetativa en invierno (menor presencia de *S. cerevisiae*) hasta los momentos previos a la vendimia (máxima presencia) (González et al., 2020).

La adaptación de los viñedos a las condiciones climatológicas y edafológicas de una zona vitivinícola concreta es la base del concepto *terroir* (Liu et al., 2019). Factores como la temperatura, las precipitaciones, la radiación solar o la composición del suelo influyen sobre el comportamiento y el desarrollo de las variedades de uvas, y marcan las líneas principales del manejo de los cultivos de vid. Todo ello se refleja en la obtención de vinos con diferentes características organolépticas, asociadas a una región concreta (Liu et al., 2019; Gobbi et al., 2022). Otro aspecto a tener en cuenta es la contribución de las comunidades microbianas al estado sanitario del viñedo y a la calidad y tipicidad del vino. El proceso de elaboración del vino es un proceso biológico que no empieza en la bodega, si no que se inicia en el suelo y las raíces del viñedo. Las comunidades microbianas del suelo del viñedo y de la rizosfera participan activamente en la nutrición de la vid y en su protección ante enfermedades y situaciones de estrés. Un adecuado estado fisiológico y sanitario del viñedo asegura un desarrollo óptimo del ciclo fenológico de la vid y, por lo tanto, la correcta formación y maduración de las uvas que darán lugar al vino. A este estado, no solo contribuyen las comunidades del suelo y la rizosfera, si no que se entiende a la vid como un conjunto que funciona asociado a todas las poblaciones microbianas que habitan en sus compartimentos (raíz, tronco, hojas, flores y fruto) denominado holobionte (OIV-VITI 655-2021; Bettenfeld et al., 2022). Todos los factores que contribuyen al concepto *terroir* también afectan a la composición de las comunidades microbianas asociadas a cada planta de vid dentro de un viñedo. Por todo ello, teniendo en cuenta la interrelación entre los microorganismos y la planta de la vid (holobionte), parece lógico asociar la respuesta de las comunidades microbianas frente a las condiciones ambientales (climatológicas o de cultivo) a un efecto sobre la planta de la vid que se traduce en un efecto en las uvas y, por lo tanto, en el vino

producido. Esta asociación no es fácilmente demostrable, y menos desde un punto de vista experimental. Por un lado, estudiar la asociación de la microbiota del viñedo al concepto de *terroir*, asentando la variable de *terroir* microbiano, supone definir un *core* microbiano (Bettenfeld et al., 2022), es decir, un conjunto de especies característico de una región vitivinícola que se mantenga en el tiempo y que pueda ser enlazado con las características organolépticas del vino obtenido. Por otro lado, supone conocer los flujos de las poblaciones de levaduras y los componentes que actúan de reservorio a lo largo del sistema viñedo-bodega, ya que las uvas y parte de la estructura aérea de la planta de la vid son elementos anuales (Bettenfeld et al., 2022) y, asociada a su formación y crecimiento, se inicia la colonización microbiana, cuya evolución es modulada por los factores externos y los propios de la planta de la vid, configurando una microbiota anual que definirá el conjunto de poblaciones implicadas en el proceso fermentativo.

Todo lo descrito hasta el momento define una microbiota natural que llega a la bodega a través de la recolección de las uvas durante la vendimia. Nuevos aspectos que modifican la composición de las comunidades microbianas de las uvas deben de ser tenidos en cuenta a partir de este momento. En primer lugar, la entrada de las uvas en la bodega supone un contacto directo con todo el equipamiento que permite su procesado, atendiendo al tipo de vino que se elabore. La presencia de poblaciones de levaduras vínicas residentes en el ambiente de la bodega, y su toma de contacto con las uvas y con el mosto supone la inoculación de nuevas poblaciones diferentes de las procedentes del viñedo (Alexandre, 2020). Además, las prácticas enológicas aplicadas durante los procesos prefermentativos y la fermentación pueden modificar de forma notable la composición de las poblaciones iniciales de las uvas y el mosto y determinar su evolución. Los perfiles poblacionales nativos presentes en las uvas, asociados a todos los factores regionales, interviñedo e intraviñedo, pueden ser desplazados por las intervenciones posteriores en la bodega (Mas y Portillo, 2022). Las intervenciones enológicas como la utilización de cultivos iniciadores a partir de levaduras seleccionadas, o el enriquecimiento de poblaciones naturales mediante el empleo de pies de cuba, son críticas desde un punto de vista de la ecología microbiana. En ambos casos, independientemente de su naturaleza, se produce la adición de una población concreta de levaduras en elevadas concentraciones sobre las poblaciones iniciales del mosto, presentes en menor concentración. Ambas estrategias suponen un desplazamiento de las poblaciones iniciales del mosto, tanto por número como por competencia por los recursos nutricionales (Alexandre, 2020).

De esta forma, en el inicio del proceso de fermentación se encuentra una mezcla de poblaciones que atendiendo a su origen y naturaleza se pueden distinguir en: poblaciones nativas procedentes del viñedo y de la bodega, y poblaciones inoculadas obtenidas a partir de cultivos iniciadores de levaduras seleccionadas o del enriquecimiento de poblaciones naturales (pie de cuba). La evolución de todas estas poblaciones dependerá de múltiples factores, todos ellos relacionados

con las prácticas enológicas que se apliquen y con los factores internos propios del proceso de fermentación (ver apartado 1.1.2.2). Desde un punto de vista ecológico se producirá una sucesión de poblaciones microbianas dirigida por las intervenciones enológicas y por la capacidad de adaptación y supervivencia de las levaduras vínicas. Desde un punto de vista enológico, se producirá la elaboración del vino, con unas características organolépticas propias derivadas de las variedades de uvas y de la actividad metabólica de todas las poblaciones microbianas presentes.

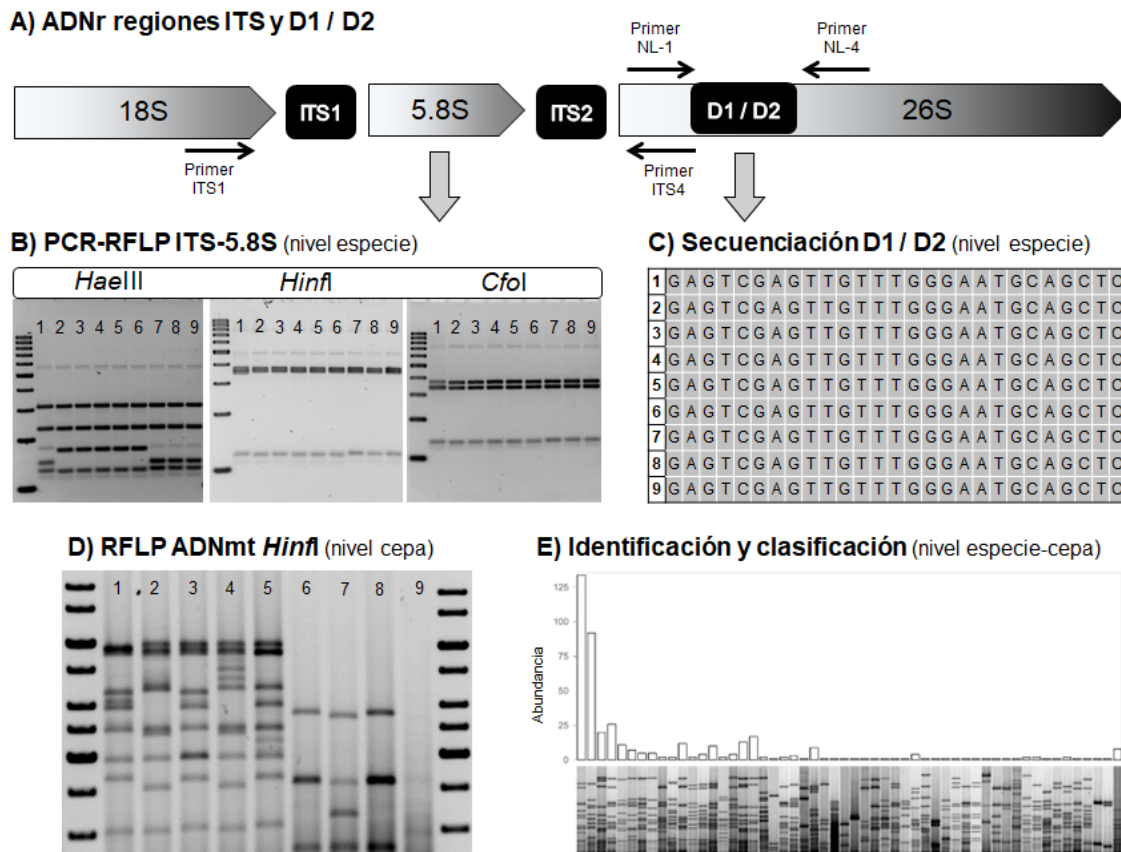
El conjunto viñedo-bodega es un sistema muy complejo sobre el que actúan múltiples factores que se pueden recoger en tres grandes grupos: climatológicos, propios de las características del viñedo y su manejo vitícola, y enológicos. El efecto directo de estos factores sobre la composición de la microbiota asociada no es fácil de medir, ya que no pueden ser considerados de forma independiente. En cualquier trabajo de biogeografía microbiana, el parámetro que permite valorar estos efectos es la identificación de la composición de las comunidades microbianas asociadas a diferentes hábitats del conjunto (suelo, rizosfera, filosfera, mosto y fermentación) y los cambios que en ellas se producen. El principal inconveniente es que la respuesta que ofrecen las comunidades microbianas es el resultado de la interacción de todos los factores que actúan sobre ellas y de su propia interacción. La contribución microbiana a todo el proceso de elaboración del vino, desde la salud del viñedo hasta el desarrollo del proceso biológico de fermentación, es clara y queda reflejada en todo lo expuesto hasta este momento, sin embargo, todavía no hay evidencias incuestionables con relación a la definición de *terroir* microbiano. En varios de los trabajos de biogeografía microbiana se muestran resultados que permiten valorar este concepto como un elemento más dentro del concepto *terroir*. En estos trabajos se describen patrones microbianos propios de una región y se demuestra una correlación entre estos patrones y las características organolépticas del vino obtenido (Knight et al., 2015; Bokulich et al., 2016; Morrison-Whittle & Goddard, 2018). Sin embargo, otros trabajos demuestran resultados contradictorios que plantean dudas sobre la aplicación del término *terroir* microbiano (Alexandre, 2020; Camilo et al., 2022). En todos los casos, se pueden observar diferencias en la escala del estudio biogeográfico (regional, local e intraviñedo) en la que se sitúan los estudios (Figura 2). También se reflejan diferencias en las dimensiones de la región que se establece como unidad de estudio y en los diseños experimentales del estudio (tipos y características de las muestras analizadas, forma de recogida de las muestras y periodicidad de muestreo) y, por supuesto, en la metodología de análisis utilizada. En relación con la metodología, el procedimiento de análisis utilizado determina el alcance de la identificación microbiana, es decir, poder determinar a nivel de género y/o especie, o bien poder alcanzar el nivel de cepa dentro de una especie. Pero hay un objetivo común a todos estos estudios: describir y comprender la ecología microbiana asociada al proceso de vinificación, sentando las bases del conocimiento necesario para convertirlo en un recurso fundamental para la elaboración de vinos singulares de alta calidad (Berbegal y col., 2017).



### **1.3. Identificación de levaduras vínicas**

La identificación microbiana tiene su origen en la caracterización fenotípica de cultivos puros. Esta caracterización se basa en la descripción morfológica de las colonias, tanto macro- como microscópica, y en sus características fisiológicas y metabólicas. Desde un punto de vista metabólico, los microorganismos son identificados mediante un perfil bioquímico que se fundamenta en la asimilación de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, y/o en la presencia de actividades enzimáticas concretas (Renouf et al., 2007). Tanto la caracterización morfológica como bioquímica implican la utilización de medios de cultivo de enriquecimiento, selectivos y diferenciales, que revelan las propiedades de los aislados objeto de estudio. La evolución de esta caracterización ha dado lugar al diseño de galerías miniaturizadas, que combinando un número determinado de ensayos permiten alcanzar una correcta asignación. En la actualidad, estas técnicas son poco utilizadas en la identificación de nuevos aislados, pero adquieren especial importancia en procesos de selección de levaduras (Escribano et al., 2017). En estos procedimientos, el objetivo es la descripción y clasificación de los aislados de levaduras, atendiendo a la presencia de determinadas actividades enzimáticas asociadas a propiedades tecnológicas concretas que tienen un impacto (beneficioso o perjudicial) sobre el perfil organoléptico del vino o los procesos de vinificación (clarificación, estabilización proteica, etc.) (OIV-OENO 370-2012). El principal inconveniente de estas técnicas es que necesitan un profundo conocimiento sobre las condiciones de crecimiento de las especies y de desarrollo de su actividad metabólica. Éstas deben de ser reproducidas en el laboratorio y deben de ser estandarizadas para alcanzar unas condiciones que garanticen el desarrollo y la evaluación bioquímica de las especies, cepas, aislados, etc. De forma general, cada una de las actividades enzimáticas estudiadas requiere el diseño de un medio de cultivo específico (Belda et al., 2016a; Belda et al., 2016b).

En los procesos de determinación de levaduras vínicas, los métodos moleculares basados en la detección de microorganismos a través de su ADN se instauran como herramientas rápidas y precisas, que no necesitan un conocimiento previo de los aislados para obtener una identificación inequívoca. Dentro de estos métodos se distinguen dos grupos en función de si son procesos dependientes o independientes de las técnicas de cultivo. Los métodos dependientes requieren la obtención de un cultivo puro, que supone varios pasos de aislamiento microbiológico previos, a partir del cual se realiza la identificación molecular. Los métodos independientes se aplican directamente sobre las muestras objeto de estudio, sin ningún tipo de aislamiento microbiológico inicial, y su punto de partida es la extracción de todo el material genético (ADN o ARN) de las muestras (Sumby et al., 2021).



**Figura 3.** Proceso de identificación y clasificación realizado en este trabajo. A) Regiones del ADNr (ITS-5.8S y 26S) amplificadas mediante PCR para la identificación de los aislados a nivel de especie. B) Patrones moleculares obtenidos con el método PCR-RFLP ITS-5.8S que permiten la clasificación de los aislados en grupos moleculares y una primera asignación a nivel de especie. C) Confirmación de los grupos moleculares obtenidos mediante secuenciación Sanger de la región D1/D2 del ADNr. D) Determinación del nivel de cepa, dentro de la especie *S. cerevisiae*, mediante el método RFLP del ADNmt utilizando la enzima de restricción *HinfI*. E) Identificación, clasificación y cuantificación del conjunto de grupos genéticos obtenidos a nivel de especie y a nivel de cepa.

La identificación y clasificación de la colección de levaduras vínicas utilizada en este trabajo se basa en dos métodos dependientes de cultivo, cada uno dirigido a un nivel de determinación: el nivel de especie para todo el conjunto de levaduras analizadas y el nivel de cepa dentro de la especie *S. cerevisiae* (Esteve-Zarzoso et al., 1999) (Figura 3). Los dos métodos utilizados, a pesar de su diferente finalidad, se basan en el Polimorfismo para la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP, siglas en inglés de *Restriction Fragment Length Polymorphism*). Esta técnica se fundamenta en la digestión enzimática de un determinado material genético, o de regiones concretas dentro del genoma de las levaduras, mediante el uso de endonucleasas de restricción. Estas enzimas se caracterizan por reconocer secuencias diana específicas a lo largo del genoma de las levaduras, que señalan puntos de corte en el ADN sobre los que actúa la enzima. El patrón de corte más o menos frecuente de cada enzima da lugar a una serie de fragmentos de ADN de diferente longitud, que son específicos de la secuencia nucleotídica de cada levadura. Estos fragmentos se separan y visualizan mediante técnicas de electroforesis en geles de agarosa,

revelando un perfil de bandas que representa un patrón molecular característico de la especie o cepa de levadura objeto de estudio. A continuación, se detallan los dos métodos utilizados.

### **1.3.1. Método de identificación de especies de levaduras vínicas: PCR-RFLP de la región ITS-5.8S del ADN ribosomal**

Las secuencias de las regiones ribosomales presentan una baja variabilidad intraespecie, pero un elevado polimorfismo interespecie, característica que las convierte en secuencias muy útiles para la identificación y clasificación de especies de levaduras vínicas. Los genes ribosomales 5.8S, 18S y 26S se disponen en tándem, constituyendo unidades de transcripción que se repiten a lo largo del genoma. Dichas unidades incluyen regiones no codificantes conocidas como espaciadores internos (ITS1 e ITS2) y externos (ETS) (Fernández-Espinar et al., 2005). El conjunto ribosomal constituido por el gen ribosomal 5.8S (región codificante y conservada) y las regiones ITS1 e ITS2 flanqueantes (regiones no codificantes y variables) es el más utilizado en la determinación de especies, ya que presenta una variabilidad interespecífica mayor que las secuencias de los genes ribosomales 18S y 26S (Esteve-Zarzoso et al., 1999) (Figura 3A).

Este método requiere la amplificación previa de la región ribosomal ITS-5.8S mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, siglas en inglés de *Polymerase Chain Reaction*). El producto de amplificación obtenido se somete a digestión enzimática utilizando las endonucleasas *CfoI*, *HaeIII*, *HinfI*, *DdeI* y *MboI* (OIV-OENO 408-2011). Cada especie da lugar a un perfil de bandas diferente asociado a una enzima concreta (Figura 3B). La coincidencia de patrones entre especies muy relacionadas entre sí requiere la utilización de más de una enzima de restricción para concluir la identificación de la especie. El procedimiento PCR-RFLP ITS-5.8S del ADNr es el principio de la primera base de datos de referencia en la identificación de levaduras vínicas, formada por 132 especies, pertenecientes a 25 géneros distintos (Esteve-Zarzoso et al., 1999). Esta base de datos fue completada por otros autores (Segura et al., 2010; Tofalo et al., 2014), y en la actualidad se encuentra disponible a través de una plataforma on-line (<http://yeast-id.com>), que recoge los patrones de restricción definidos por las endonucleasas *HaeIII*, *HinfI*, *CfoI* y *DdeI* para cada levadura registrada. La comparación de los patrones disponibles con los patrones objeto de estudio permite alcanzar la identificación de las especies.

Para tener éxito en las identificaciones por comparación de patrones moleculares, es necesario considerar las condiciones de análisis descritas en los trabajos de referencia (Esteve-Zarzoso et al., 1999). Son importantes las concentraciones de agarosa necesarias para separar fragmentos de restricción cuya longitud se diferencia en unas pocas pares de bases (pb), como p. ej. el patrón de *S. cerevisiae* obtenido con la enzima *HinfI* (125 + 365 + 375 pb) (Figura 3B). La separación de fragmentos de ADN con diferencias de tamaño de 10 pb, o menores, requiere una implementación adecuada de este método en el laboratorio. También es importante la incorporación de cepas de

referencia para valorar el comportamiento electroforético de patrones conocidos en las condiciones de trabajo de cada laboratorio. Estas condiciones influyen en la estimación de los tamaños de las bandas que pueden oscilar en un intervalo de  $\pm 20$  pb (Segura et al., 2010).

Una aplicación interesante de este método es la posibilidad de agrupación y clasificación que ofrece en los trabajos de ecología microbiana, que se inician con la obtención y caracterización de una extensa colección de aislados de levaduras vínicas. En estos trabajos, la clasificación del conjunto de aislados en grupos de trabajo de interés, en función de los objetivos del estudio, facilita el manejo de la colección de levaduras. Cada patrón molecular obtenido identifica a un grupo de aislados y posibilita su ordenación. El establecimiento de estos grupos también permite la confirmación de la identificación de especies realizada por comparación de patrones de restricción mediante otros métodos moleculares, como la secuenciación de Sanger de las regiones D1/D2 del extremo 5' del gen 26S del ADNr (Fernández-Espinar et al., 2011) (Figura 3A). De cada grupo genético de aislados establecido se selecciona un número reducido de aislados (en función del número total de aislados del grupo) como representantes, y mediante secuenciación se confirma la identificación de la especie asignada (Figura 3C). Esto es fundamental en el caso de obtener variaciones en los patrones moleculares, que pueden derivar de la variabilidad de la técnica asociada a cada laboratorio, o bien de diferencias genómicas no descritas en la secuencia amplificada que sean específicas de los aislados objeto de estudio. También es importante si la diversidad de patrones moleculares obtenida es muy elevada y no se dispone de cepas patrón que permitan validar los resultados, o si la agrupación realizada da lugar a grupos formados por un número muy reducido de aislados.

### **1.3.2. Método de diferenciación de cepas de *S. cerevisiae*: RFLP del ADN mitocondrial (RFLP-ADNmt)**

El análisis de restricción del ADN mitocondrial (ADNmt) destaca por ser el método más adecuado para establecer la variabilidad genética entre cepas de *S. cerevisiae* (López et al., 2001; Di Maio et al., 2012). El ADNmt de *S. cerevisiae* es una molécula circular de pequeño tamaño (65-80 kb). Su análisis mediante RFLP permite la caracterización de diferentes cepas basándose en el alto grado de polimorfismo que presenta, y en la estabilidad de la misma durante la multiplicación vegetativa (Ribéreau-Gayon et al., 2021).

Esta técnica requiere la obtención previa del ADN total de la levadura, el cual incluye el ADN nuclear y el mitocondrial, a partir de un cultivo puro del aislado (Querol et al., 1992). Posteriormente, el ADN total se somete a una digestión enzimática y el producto de la digestión se separa mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 3D). El fundamento de esta técnica reside en las diferentes proporciones de G+C y A+T entre el ADNmt y nuclear. La molécula de ADNmt se caracteriza por un elevado contenido en A+T (75%) pero, además, presenta unas 200

zonas ricas en G+C (Fernández-Espinar et al., 2005). La digestión del ADN total utilizando endonucleasas de restricción del tipo GCAT, que no reconocen ni secuencias ricas en GC ni secuencias ricas en AT, da lugar a una restricción diferencial entre el ADNmt y nuclear. De esta forma, el ADN nuclear es altamente digerido debido al elevado número de puntos de corte que presenta, dando lugar a fragmentos de restricción de pequeño tamaño que no pueden ser resueltos mediante electroforesis en gel de agarosa. Sin embargo, la digestión del ADNmt da lugar a fragmentos de longitud variable, en un número no muy abundante, cuya separación mediante electroforesis en geles de agarosa determina patrones de bandas que definen el perfil específico de una cepa (Figura 3D). Son varias las enzimas de restricción utilizadas (*HaeIII*, *HinfI*, *RsaI*, *EcoRV*, *AluI*), presentando diferente grado de polimorfismo en función de la especie de levadura considerada. En el caso de *S. cerevisiae* las enzimas de restricción recomendadas son *HinfI*, *HaeIII* y *RsaI* (Fernández-Espinar et al., 2005; OIV-OENO 408-2011). El método de diferenciación RFLP-ADNmt también puede ser utilizado en la caracterización de cepas pertenecientes a especies de levaduras no-*Saccharomyces* (Belloch et al., 1997; Fernández-Espinosa et al., 2011).

De forma general, cuando se realizan agrupaciones de aislados a partir de la identificación de patrones moleculares, en donde cada patrón distinto define un grupo genético, se pueden establecer unidades propias de clasificación que son funcionales dentro de los objetivos del trabajo realizado y que se conocen como unidades taxonómicas operacionales (OTU, siglas en inglés de *Operational Taxonomic Unit*) (González-Andrés, 2001; Yu et al., 2021). Así, todos los aislados que comparten los mismos perfiles PCR-RFLP ITS-5.8S y RFLP-ADNmt constituyen un grupo genético que puede ser definido como una unidad de clasificación en un estudio (OTU) (Figura 3D). Con toda probabilidad, a lo largo del trabajo, estos grupos son atribuidos a una especie e incluso a una cepa de levadura, pero en el momento de clasificación de la colección de aislados, donde el criterio de agrupación se establece a partir de sus patrones moleculares, son unidades de clasificación y trabajo propias del estudio. Esta asignación de unidades de estudio es ampliamente utilizada en los trabajos de ecología microbiana realizados mediante metagenómica<sup>2</sup>, en los que se denomina OTU a la agrupación de secuencias iguales que determinan la obtención de una secuencia consenso representativa de cada grupo genético establecido, a partir de la cual se realiza la identificación de los géneros o especies de levaduras (Belda et al., 2017a). El sentido de utilización del término OTU se ajusta a lo explicado, ya que son unidades del estudio formadas por conjuntos de secuencias idénticas, pero esto no lo convierte en un término de aplicación exclusiva a los trabajos de metagenómica.

---

<sup>2</sup> *Metagenómica* se refiere al estudio de comunidades microbianas, de cualquier ambiente natural (hábitat), mediante el análisis de su material genético.

La realización de estudios de metagenómica mediante técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS, siglas en inglés de *Next Generation Sequencing*) supone un cambio en el enfoque de la ecología microbiana. A partir de cualquier tipo de muestra (suelo, rizosfera, filosfera, mosto y fermentación) se obtiene el conjunto de ADN de todos los microorganismos presentes en la muestra y se procede directamente a su secuenciación también de forma conjunta, ya que las técnicas de nueva generación permiten desarrollar procesos de secuenciación masiva y de alto rendimiento a partir de millones de fragmentos de ADN. Estas técnicas evitan los sesgos de resultados derivados del fundamento de cualquier método dependiente de cultivo. En primer lugar, permiten la identificación del 25-50% de las especies de microorganismos que no son cultivables bajo condiciones de laboratorio (Stefanini & Cavalieri, 2018); teniendo especial interés en la determinación de microorganismos viables no cultivables que no se pueden recuperar mediante cultivos microbiológicos, pero que presentan actividades metabólicas de interés en el hábitat que ocupan (Renouf et al., 2007). En segundo lugar, evitan la ineludible selección que las condiciones de cultivo generales aplicadas en el laboratorio ejercen sobre las diferentes especies microbianas presentes de forma natural en las muestras objeto de estudio. Esta selección favorece la identificación de especies dominantes o de especies mejor adaptadas a las condiciones del laboratorio.

La equitatividad de las especies en los diferentes hábitats supone un inconveniente común a ambas metodologías. Las especies dominantes en un hábitat pueden llegar a ser 1.000 veces más abundantes que las especies minoritarias, lo que dificulta la identificación y estimación de las poblaciones poco abundantes. En el caso de los métodos dependientes de cultivo, se recurre a estrategias de enriquecimiento en las que no siempre se consigue que la presión de las especies dominantes permita la identificación de las especies minoritarias (Renouf et al., 2007). En el caso de los métodos independientes de cultivo, este inconveniente se traduce en la diferencia de representatividad del ADN de las especies minoritarias obtenida durante el proceso de extracción y la débil amplificación de las secuencias poco representadas (Sumby et al., 2021).

Por último, también hay que tener en cuenta los sesgos derivados de los métodos independientes de cultivo, como la incertidumbre asociada al propio proceso de amplificación de ADN o las variaciones en los resultados de identificación asociadas a la utilización de diferentes regiones específicas dentro de los genes ADNr 16S (bacterias) y los genes ADNr 26S, 18S y 5.8S, junto con las regiones ITS (levaduras), para la amplificación del ADN y su posterior secuenciación (Stefanini & Cavalieri, 2018). Otro sesgo a tener en cuenta es que las técnicas de secuenciación no diferencian entre el material genético procedente de microorganismos vivos y muertos, y adquiere especial relevancia en los análisis de metagenómica realizados a partir de muestras de suelo, el cual actúa como un reservorio de microorganismos vivos, pero también como un depósito de microorganismos muertos (Giraldo-Pérez et al., 2021).

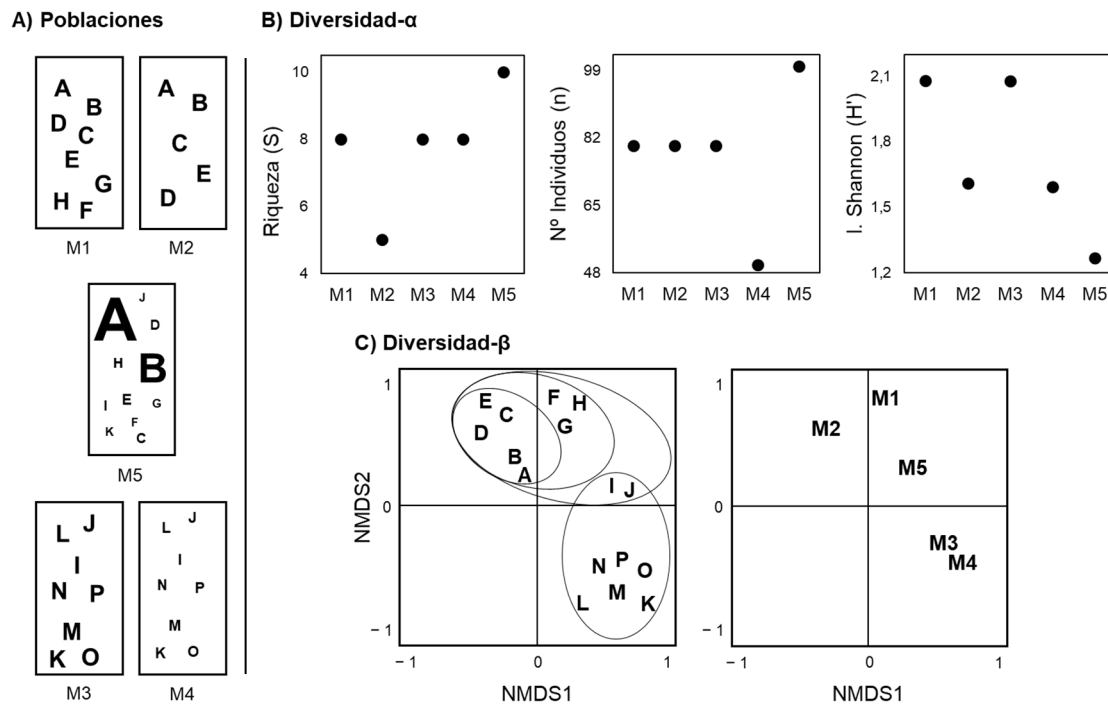
A pesar de la relevancia de las técnicas de secuenciación NGS, en base a la amplitud de posibilidades y la magnitud de resultados que ofrecen, hay un hecho importante que todavía no solventan y es el alcance de las identificaciones taxonómicas, es decir, el nivel de identificación al cual llegan. Dependiendo de la capacidad de resolución de las secuencias consenso obtenidas a partir de los conjuntos de secuencias iguales u OTUs, se realizan identificaciones a nivel de familia, de género o de especie, pero en ningún caso se puede alcanzar el nivel de cepa. Por ello, todos los estudios realizados a nivel de cepa deben de ser realizados mediante métodos dependientes de cultivo, los cuales sí permiten alcanzar este nivel taxonómico. Otra circunstancia relacionada con el nivel taxonómico en el cual se ofrecen los resultados es que dentro de una familia o de un género microbiano pueden encontrarse especies relevantes desde un punto de vista enológico, o bien otras especies ambientales carentes de interés. Por ello, la identificación realizada en niveles taxonómicos superiores puede no ser totalmente representativa de la comunidad microbiana estudiada ni de su efecto en el proceso de vinificación (Camilo et al., 2022).

De forma independiente al método o técnica utilizada, en el desarrollo de estudios de biogeografía microbiana es fundamental el planteamiento de un adecuado diseño experimental que defina un buen plan de muestreo (Sumby et al., 2021). El muestreo debe de ser representativo de los diferentes ecosistemas objeto de estudio y debe de considerar la evolución temporal de los ecosistemas e integrarla en el diseño experimental. Además, debe de contemplar la variabilidad existente dentro de los diferentes hábitats relacionados con el microbioma del viñedo, para que los resultados obtenidos no presenten sesgos derivados de la diferente distribución de las poblaciones microbianas dentro de una baya, de un racimo, de una planta de vid o de un viñedo, dependiendo del tipo de muestra considerado (Griggs et al., 2021). Estos sesgos también pueden estar asociados a la presencia de diferentes enfermedades en la vid (Barata et al., 2012), o bien ser consecuencia de un factor ambiental no valorado dentro de los objetivos del estudio.

#### **1.4. Índices ecológicos**

Para desarrollar estudios de biogeografía microbiana es necesario analizar la biodiversidad de los ecosistemas a diferentes niveles (Figura 4). La identificación de todas las especies que forman parte de cada comunidad y la determinación de su proporcionalidad son el inicio de cualquier estudio de ecología (Figura 4A). A partir de estos datos, y aplicando diferentes medidas o índices de biodiversidad, se definen la estructura y composición de las comunidades microbianas objeto de análisis. De esta forma, se pueden establecer comparaciones entre comunidades y valorar dinámicas y evolución de poblaciones con el fin de entender la complejidad del microbioma asociado al viñedo y de vincular la composición de las comunidades a su función en los ecosistemas, uno de los principales retos de la ecología microbiana (Bagheri et al., 2017). En el

desarrollo de este trabajo se contemplan dos niveles de diversidad: la diversidad-alfa ( $\alpha$ ) (intradiversidad) y la diversidad-beta ( $\beta$ ) (interdiversidad).



**Figura 4.** Determinación de la diversidad-alfa ( $\alpha$ ) y beta ( $\beta$ ) en este estudio. A) Representación de cinco poblaciones microbianas (M1, M2, M3, M4 y M5) compuestas por diferentes especies. Cada letra representa a una especie diferente y el tamaño de la letra se corresponde con el número de individuos (abundancia) de cada especie y en cada población. B) Diversidad- $\alpha$  determinada mediante el índice de Shannon. Representación del índice de Shannon (derecha) y de los dos parámetros que se consideran para su cálculo: la riqueza de especies (S, número de especies diferentes en cada población) (izquierda) y el número total de individuos (n) de cada población (centro). C) Diversidad- $\beta$  mediante NMDS considerando a las especies como objetos (izquierda) o como variables del análisis (derecha). Basado en el trabajo de Stefanini y Cavalieri (2018).

La diversidad- $\alpha$  establece la estructura de una comunidad microbiana asociada a un hábitat determinado, y se considera una medida de la diversidad local a nivel de comunidad (Figura 4B). El índice de Shannon (H) es una de las formas de cálculo de esta diversidad. Este índice relaciona la riqueza de especies (S; número total de especies diferentes identificadas en un muestreo) y la abundancia relativa de las mismas ( $p_i$ ; proporción del número de individuos de cada especie, respecto al número total de individuos estimados en el muestreo), mediante la siguiente fórmula:  $H = -1 \sum_{i=1}^S p_i \times \ln(p_i)$  (Castrillo et al., 2020; Sumbly et al., 2021). Los valores que aporta este índice se encuentran entre cero (valor mínimo) y un valor máximo, al que no se le confiere límite teórico (Shannon, 1948). Cuanto mayor sea el valor del índice, mayor será la diversidad- $\alpha$  estimada, aumentando en relación con dos variables: el aumento del número de especies y/o el aumento de la equitatividad de especies, es decir, el aumento del número de especies que presentan valores semejantes de abundancia (Figura 4B). Este valor de diversidad permite establecer comparaciones entre conjuntos de comunidades microbianas relacionadas con diferentes hábitats, como compartimentos del viñedo (suelo, rizosfera y filosfera) o parcelas



dentro de una misma región. También permite hacer comparaciones de comunidades a lo largo de una sucesión temporal en el mismo hábitat (fases de la fermentación alcohólica). En este tipo de diversidad, la identificación de especies proporciona los valores de número de especies diferentes y de número de individuos que forman parte de la misma especie, pero no es relevante la información relacionada con el tipo de especie.

La diversidad- $\beta$  permite establecer diferencias entre las comunidades microbianas atendiendo a la composición de las especies (Figura 4C). De este modo, se define la heterogeneidad de especies dentro de las comunidades comparadas en base a las especies compartidas por más de una comunidad y a las especies propias de cada una de ellas. Una de las formas de estimar esta diversidad es desarrollar análisis exploratorios multivariantes, dentro de los cuales se encuentra el escalamiento multidimensional no métrico (NMDS, siglas en inglés de *Nonmetric Multidimensional Scaling*). Este método de ordenamiento es reconocido como uno de los más adecuados para la representación de la diversidad- $\beta$ , establecida a partir de estudios moleculares de ecología microbiana basados en técnicas de determinación de polimorfismos de ADN, como las técnicas RFLP (Ramette, 2007). El NMDS permite el mapeo de un grupo de ítems en un espacio geométrico de dos dimensiones demostrando las relaciones existentes entre ellos. El punto de partida de este análisis es una matriz de datos que registra la abundancia de un conjunto de especies en relación con los diferentes factores de análisis (muestras) considerados en el estudio, como hábitat, añada, tratamientos aplicados, etc. (p.ej.: matriz especies  $\times$  hábitat). A partir de la matriz de datos se calcula una matriz de distancias, seleccionando una medida de distancias ecológicas, como la distancia de Bray-Curtis (Bray & Curtis, 1957), una de las medidas más utilizadas en ecología microbiana (Paliy & Shankar, 2016). Esta distancia determina la proximidad entre los ítems, haciendo comparaciones de la abundancia de las especies por pares de muestras (factores de análisis). Cuanto menor es la distancia calculada entre los ítems, mayor es su proximidad y, por lo tanto, mayor es su similitud. Aplicando el algoritmo NMDS sobre la matriz de distancias calculada se establece un rango de clasificación que determina la ordenación espacial que mejor representa las diferencias entre los ítems y que da lugar al mapeo en el espacio geométrico. De esta forma, se describe la relación entre la composición de la comunidad microbiana y los diferentes factores que son considerados en el análisis, como parcelas de viñedo o añadas. En función de cómo se defina el análisis, las especies que componen la comunidad microbiana pueden ser valoradas como objetos o como variables del estudio. Si son consideradas como objetos, los ítems representados en el espacio geométrico son las propias especies incluidas en el análisis, y su distribución en el espacio demuestra la relación de las mismas con los factores de análisis (añada, viñedo, etc.) mediante agrupaciones de especies que son comunes o específicas de una añada, de una parcela, o de la combinación de ambos factores (Figura 4C). Si, por el contrario, las especies son contempladas como variables del análisis, los ítems mapeados son las

parcelas y/o las añadas estudiadas y se mostrarán tanto más agrupadas cuanto mayor sea la similitud de composición de sus comunidades microbianas (Portillo et al., 2016; Alonso et al., 2019; Castrillo et al., 2020) (Figura 4C).

Es importante considerar que el término de biodiversidad incluye tanto la estructura y composición de las comunidades como su funcionalidad en el ecosistema. Determinar la diversidad- $\alpha$  y diversidad- $\beta$  es un paso fundamental para entender la función de las comunidades microbianas en su hábitat natural. El concepto de redundancia funcional define un conjunto formado por diferentes grupos taxonómicos que se agrupan en el mismo hábitat, formando parte de la misma comunidad microbiana al compartir una misma función metabólica (Griggs et al., 2021). Teniendo en cuenta este concepto, cambios en la composición de las especies dentro de una comunidad no necesariamente implican cambios en la funcionalidad del ecosistema; y la conservación de una función está asociada a la diversidad de la comunidad microbiana que se establece en base a ella (Griggs et al., 2021). Plantear un enfoque global en el estudio del microbioma del viñedo permite obtener información y herramientas en favor de su conservación y de su aplicación en la mejora de los procesos vitivinícolas.

## 2. LEVADURAS EN LA DIFERENCIACIÓN, TIPICIDAD Y CALIDAD DEL VINO

### 2.1. Producción ecológica. Influencia en la diversidad, calidad y tipicidad

Factores como la estabilidad estructural y funcional de los ecosistemas y su capacidad para adaptarse a los cambios (resiliencia<sup>3</sup>) se relacionan con valores elevados de biodiversidad. De la misma forma, como consecuencia de la obtención de ecosistemas equilibrados, determinados procesos relacionados con la nutrición y la salud de las plantas, como los ciclos biogeoquímicos de los nutrientes, la detoxificación del suelo o el control de plagas a través de la estabilidad poblacional de los ecosistemas, también se ven beneficiados (Giraldo-Pérez et al., 2021). Como resultado, se establece un ecosistema agrícola en el que la preservación de la biodiversidad se convierte en un elemento clave para obtener cultivos sanos y equilibrados nutricionalmente, en los que la demanda de fertilización y de tratamiento mediante plaguicidas será menor a lo largo del tiempo (Giraldo-Pérez et al., 2021). Ésta es la base de la producción ecológica de cualquier cultivo, incluido el viñedo, regulada por la aplicación de la normativa europea 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 desde el 1 de enero de 2022.

---

<sup>3</sup> El concepto de *resiliencia ecológica* se refiere a la capacidad de los ecosistemas para mantener su estructura y funcionalidad frente a diferentes cambios.

El viñedo y todo su entorno constituyen un agroecosistema. La producción ecológica tiene como objetivo favorecer la biodiversidad de especies (animales, vegetales y microorganismos) y el equilibrio de todos los ecosistemas asociados al viñedo mediante la aplicación de diferentes prácticas agrícolas. Para conseguirlo, la normativa establece una serie de requerimientos, como la aplicación de fertilización orgánica (estiércol, compost, restos de poda, etc.), el control natural de plagas y enfermedades, el aumento de la diversidad dentro y alrededor del viñedo (cubiertas vegetales entre líneas de vid, conservación de las linderas, mantenimiento de manchas de vegetación circundantes, etc.), y el control del rendimiento de la producción. También prohíbe el uso de fertilizantes y plaguicidas de origen químico. En relación con el control de plagas, cuando las prácticas preventivas no son suficientes, la normativa incluye un listado de sustancias permitidas entre las que se encuentran sustancias minerales como el azufre y el cobre, bioplaguicidas (*Bacillus thuringiensis*, *Trichoderma* sp., etc.), feromonas sexuales para la captura masiva de insectos, etc. En cuanto al proceso de elaboración, siempre dentro de la aplicación de buenas prácticas enológicas, la normativa también recoge un listado de aditivos permitidos y determina límites en la utilización del SO<sub>2</sub>, estableciendo concentraciones máximas permitidas dependiendo del tipo de vino considerado. Todas las prácticas de cultivo ecológico dirigidas a favorecer la diversidad en los ecosistemas tienen, de una forma directa o indirecta, efectos fundamentales sobre la salud y la nutrición del viñedo, y por lo tanto sobre la obtención de un vino de calidad (Sumbly et al., 2021).

Desde un punto de vista de ecología microbiana, las intervenciones realizadas sobre el viñedo suponen un factor de variación de las comunidades microbianas, tanto en la escala intra- como en la escala interviñedo. Empezando por el manejo del suelo, se demuestran diferencias significativas en la biodiversidad microbiana de los suelos gestionados bajo sistemas de producción ecológica que incluyen diferentes técnicas de fertilización orgánica (Morrison-Whittle et al., 2017). En cuanto a los tratamientos preventivos o curativos realizados frente a diferentes especies de hongos fitopatógenos, durante los periodos de formación y maduración de las uvas se evidencia que son más recurrentes en sistemas de producción convencionales (Morrison-Whittle et al., 2017; Giraldo-Perez et al., 2021; Sumbly et al., 2021). De forma general, se demuestra una mayor diversidad de levaduras en los sistemas de producción ecológicos frente a los sistemas de producción convencional. Dependiendo de los estudios, esta diferencia se sustenta o bien en el aumento de la frecuencia en especies minoritarias (Castrillo et al., 2019), o bien en el aumento de la riqueza de especies (Setati et al., 2012). Aunque también hay estudios que revelan un descenso de la diversidad de levaduras en muestras procedentes de sistemas ecológicos (Grangeteau et al., 2017). Este descenso se relaciona con la presencia de especies fitopatógenas que interaccionan con las especies de levaduras y modulan sus poblaciones, y con la aplicación de tratamientos fungicidas de cobre en dosis altas (Grangeteau et al., 2017). También

se establecen diferencias en la diversidad de poblaciones de bacterias, hongos y animales eucariotas a partir de muestras de suelo procedentes de sistemas de producción ecológicos y convencionales (Giraldo-Pérez et al., 2021). Sin embargo, el tamaño de las diferencias demostradas es moderado (menor del 10%) y no afectan por igual a los diferentes grupos poblacionales. Las poblaciones fúngicas no presentaron diferencias en cuanto a su composición, pero sí demostraron diferencias en relación con su abundancia, en una de las dos regiones incluidas en el estudio. En base a estos resultados, es importante señalar que el efecto sobre la biodiversidad, de cualquiera de los manejos realizados en un sistema de producción, está muy influenciado por el tipo de muestra (hábitat: suelo, uvas, mosto y fermentación) que se considere en el estudio (Morrison-Whittle et al., 2017).

Los tratamientos fungicidas utilizados en todos los sistemas de producción implican un efecto sobre la composición y estructura de las comunidades microbianas que constituyen el microbioma del viñedo (Morrison-Whittle et al., 2017). Entre los tratamientos más utilizados en viñedos de producción ecológica se encuentran los fungicidas con base mineral de cobre y azufre (Sumby et al., 2021). Estos fungicidas de amplio espectro evitan la aparición de resistencias, pero su falta de selectividad supone un efecto, en mayor o menor grado, sobre todas las poblaciones fúngicas presentes, tanto hongos fitopatógenos como levaduras. Dichos efectos dependen de la dosis, del número de tratamientos y de la especificidad que tienen algunos tratamientos sobre determinadas especies, p.ej., se demuestran efectos adversos de tratamientos fungicidas de cobre con relación a la diversidad de las poblaciones de levaduras en uvas (Grangeteau et al., 2017; Sumby et al., 2021). También se confirma la resistencia de *S. cerevisiae* y otras especies fermentativas al azufre (Cordero-Bueso et al., 2011; Sumby et al., 2021).

La composición de las comunidades de levaduras descrita en función del sistema de producción considerado es variable, dependiendo del trabajo consultado (Sumby et al., 2021). Algunas especies de levaduras Basidiomycota oxidativas, como *Cryptococcus* spp., se relacionan con viñedos de producción ecológicos (Castrillo et al., 2019). Otras especies, como *A. pullulans*, se describen como mayoritarias tanto en sistemas de producción ecológica, como en sistemas de producción convencional (Castrillo et al., 2019; Sumby et al., 2021). Estos hallazgos contradictorios pueden encontrar justificación en el diseño experimental, en los métodos de análisis utilizados, o en la subestimación de la interrelación de los factores objeto de estudio (sistema de producción, tratamientos, etc.), con otros factores como las condiciones climatológicas o la localización del viñedo (Sumby et al., 2021). Considerando un punto de vista ecológico, son numerosas las interacciones descritas entre diferentes especies del mismo hábitat (Setati et al., 2012; Grangeteau et al., 2017). La especie *A. pullulans* es reconocida como un potencial agente de biocontrol, por lo que su presencia podría inhibir a otras especies (Setati et al., 2012). Por otro lado, también se atribuyen efectos moduladores a nivel poblacional a varias

especies de levaduras (*H. uvarum* y *Metschnikowia* spp.) y a la presencia de hongos fitopatógenos (Grangeteau et al., 2017). Por todo ello, la diferencia de resultados obtenidos podría atribuirse a la interrelación de diferentes especies dentro de un mismo hábitat. También habría que tener en cuenta otras condiciones, como la falta de competencia en la disponibilidad de recursos nutricionales en hábitats con bajos valores de diversidad, o la diferente resistencia que ofrecen las especies en función del tipo de tratamiento aplicado (Sumbly et al., 2021). Estas dos últimas premisas permiten explicar las diferencias de diversidad encontradas al estudiar poblaciones de *S. cerevisiae* en muestras de uvas y de fermentación procedentes de viñedos convencionales y ecológicos (Börlin et al., 2020). La comparación demuestra escasas diferencias en la composición de las poblaciones de *S. cerevisiae* y un aumento de la abundancia de las poblaciones en uvas procedentes de viñedos de producción convencional.

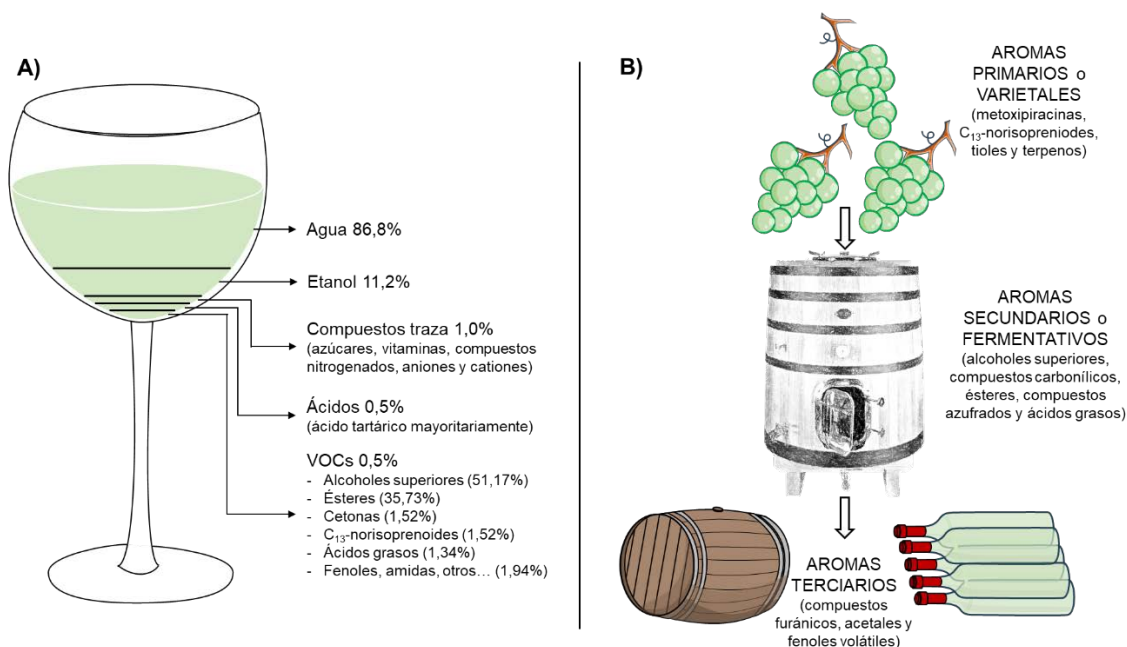
A pesar de ser uno de los objetivos principales de muchos trabajos de ecología microbiana, todavía no se ha alcanzado una decisión unánime en cuanto a la contribución del microbioma del viñedo al perfil sensorial del vino obtenido (Morrison-Whittle et al., 2017; Camilo et al., 2022). No hay ninguna duda de que todas las comunidades microbianas asociadas a las uvas entran en la bodega durante la vendimia. La composición y estructura de estas comunidades son el resultado de complejas interacciones entre las diferentes especies durante la maduración de las uvas, las cuales son dirigidas por múltiples factores externos, entre los que se encuentra el manejo del viñedo bajo un sistema concreto de producción. La recolección, la selección, el procesamiento inicial de las uvas en función del tipo de vino elaborado y el ambiente de la bodega suponen nuevos factores de modulación de las comunidades microbianas presentes en las uvas. De esta forma, el mosto obtenido presenta una compleja comunidad microbiana inicial, que es el inóculo de la fermentación alcohólica posterior. Cuanto mayor sea la diversidad microbiana presente en las uvas, mayor será la diversidad recogida en el mosto. La expresión de esta diversidad dependerá principalmente del manejo enológico que se plantee, siendo solo posible con el desarrollo de fermentaciones espontáneas o con la utilización de una selección de levaduras nativas procedentes del viñedo (Mas y Portillo, 2022).

Los sistemas de producción ecológica entienden la biodiversidad como el eje de funcionamiento del manejo de los viñedos. La biodiversidad asociada al suelo, a la vid y al ambiente del viñedo, de forma directa o indirecta, intervienen en la nutrición de la vid, en el desarrollo de su ciclo fenológico, en la defensa del viñedo frente a enfermedades o frente a situaciones de estrés como la sequía y, por lo tanto, en la correcta formación y maduración de las uvas (Bonanomi et al., 2016). La recolección de las uvas en un estado óptimo es uno de los principales factores que aseguran la calidad del vino que se va a elaborar. Alcanzar un perfil sensorial que distinga al vino como un producto singular depende de mantener la coherencia entre el manejo enológico en la bodega y las prácticas aplicadas en el viñedo. Cada una de las decisiones que se toma marca la

composición y evolución de las comunidades microbianas, definiendo las características que pueden dar lugar a la obtención de un vino único (Cordero-Bueso et al., 2018).

## 2.2. Contribución enológica de las levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*

La fermentación alcohólica es un proceso biológico que supone la sucesión de diferentes poblaciones de levaduras no-*Saccharomyces* y *Saccharomyces*. A partir del mosto, como resultado de la actividad metabólica de las levaduras, se obtiene una compleja matriz de compuestos químicos que determina las propiedades organolépticas (apariencia visual, olor, sabor y textura) del vino obtenido al final de la fermentación. Compuestos como el etanol, el glicerol y determinados ácidos, como el ácido acético o el ácido succínico, derivan del metabolismo primario de las levaduras. Después del agua, estos compuestos son los más abundantes y están relacionados con la textura (paladar, sensación en boca, cuerpo y estructura) y el sabor del vino (dulce, salado, ácido, amargo y umami). Otros compuestos, como alcoholes superiores, ácidos grasos, ésteres, compuestos carbonílicos (aldehídos), compuestos azufrados (SH<sub>2</sub>) y fenoles volátiles, proceden del metabolismo secundario de las levaduras y constituyen los principales componentes del aroma del vino. La composición y la concentración de todos los compuestos mencionados, junto con su interrelación en la matriz vínica, determinan el equilibrio de las características organolépticas de un vino y definen su calidad y singularidad (Swiegers et al., 2005; Romano et al., 2022; Figura 5).



**Figura 5.** Perfil químico y aromático de los vinos. A) Principales componentes de un vino y su proporción media expresada como porcentaje de peso por volumen (p/v) (Sumbly et al., 2010). B) Clasificación de los aromas del vino en función de su origen (Padilla et al., 2016; Romano et al., 2022).

Los compuestos orgánicos volátiles (VOCs, siglas en inglés de *Volatile Organic Compounds*) suponen el 0,5% de la composición química del vino y son los responsables de su aroma (Figura 5A). A pesar de ser compuestos minoritarios, se caracterizan por su fácil evaporación a temperatura ambiente y por presentar umbrales de percepción bajos, por lo que pueden contribuir de forma notable al aroma del vino (Sumbly et al., 2010). Estos compuestos se clasifican en tres grupos en función de su origen: aromas primarios, secundarios y terciarios (Figura 5B). Los aromas primarios o varietales son compuestos que se forman en la etapa de maduración de las uvas, como las metoxipirazinas, los C<sub>13</sub>-norisoprenoides, los compuestos azufrados volátiles (tioles) y los terpenos. Los aromas secundarios o fermentativos son aquellos derivados de la actividad metabólica de las levaduras durante la fermentación. Son los principales contribuyentes al aroma del vino y se corresponden con los compuestos asociados al metabolismo secundario de las levaduras. Por último, los aromas terciarios se forman durante los periodos de crianza del vino y están asociados a compuestos furánicos, acetales y fenoles volátiles (Padilla et al., 2016).

Tanto las levaduras no-*Saccharomyces* como las *Saccharomyces* intervienen en los procesos de formación de los VOCs, distinguiendo dos formas de obtención: una forma indirecta y una forma directa. En la primera, los compuestos aromáticos se encuentran en las uvas en forma de moléculas precursoras no volátiles, resultado de la unión de estos compuestos con azúcares, con el aminoácido cisteína o con el tripéptido glutatión (glutamato, cisteína y glicina). La liberación de la fracción volátil requiere la hidrólisis enzimática de los compuestos precursores, y da lugar a la formación de los aromas primarios. Precursores glicosídicos de monoterpenos y diterpenos, de 2-feniletanol y fenilmetanol o de C<sub>13</sub>-norisoprenoides, junto con precursores cisteinilados o glutationilados de tioles varietales (4-mercapto-4-metilpentan-2-ona, 4MMP; 3-mercaptohexan-1-ol, 3MH; y acetato 3-mercaptohexilo, 3MHA) forman parte de la composición química del mosto que inicia la fermentación, y requieren de la acción de enzimas glicosidasas y β-liasas para que se libere la fracción volátil con capacidad aromática. La presencia de estas enzimas se asocia a varias cepas de especies de levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*, y su actividad se desarrolla a lo largo del proceso de fermentación o de crianza, permitiendo la liberación de los compuestos aromáticos. En la forma directa de obtención de compuestos volátiles, como ya se ha comentado previamente, los VOCs son productos metabólicos obtenidos a partir de la actividad de crecimiento y desarrollo de las poblaciones de levaduras, e incluso de procesos metabólicos de detoxificación frente al acúmulo de metabolitos durante el proceso de fermentación (Padilla et al., 2016; Romano et al., 2022).

Atendiendo a los principales compuestos aromáticos obtenidos en el metabolismo primario y secundario de las levaduras, se detalla de forma breve su contribución al perfil aromático de los vinos. Los compuestos asociados al metabolismo primario no son relevantes por sí mismos en cuanto a su contribución al aroma, aunque sí son importantes desde una visión de interrelación

entre los diferentes compuestos aromáticos, p. ej., concentraciones elevadas de etanol en el vino, enmascaran la percepción de aromas florales y frutales (Romano et al., 2022).

Dentro de los VOCs obtenidos a partir del metabolismo secundario de las levaduras, los alcoholes superiores y los ésteres constituyen el 87% del total de los compuestos volátiles, siendo los dos grupos más importantes en cuanto a cantidad y actividad aromática (Figura 5A). Los alcoholes superiores, desde un punto de vista aromático, aportan complejidad al vino, y desde un punto de vista funcional, actúan como precursores de la síntesis de los ésteres. Uno de los alcoholes superiores más valorados en el aroma del vino es el 2-feniletanol asociado a notas florales (rosa).

Los ésteres son la familia de VOCs con mayor importancia aromática por su relación con notas afrutadas y florales. Se distinguen dos grupos en función de su composición: ésteres de acetato y ésteres etílicos. En ambos grupos se produce la unión (esterificación) de un alcohol y un ácido carboxílico, con pérdida de una molécula de agua. En el caso de los ésteres de acetato, tiene lugar la reacción entre un alcohol (etanol o alcoholes superiores) y el ácido acético (p. ej.: acetato de etilo (fruta), acetato de isoamilo (plátano), etc.); mientras que los ésteres etílicos se generan por la unión del etanol con diversos ácidos grasos de cadena corta, media o ramificados (p. ej.: butanoato de etilo (mango, piña), hexanoato de etilo (manzana), etc.). El acetato de etilo, formado por la esterificación de etanol y ácido acético, es el éster más común que se identifica en los perfiles aromáticos vínicos (Swiegers et al., 2005; Sumbly et al., 2010; Padilla et al., 2016; Romano et al., 2022).

Por último, los ácidos grasos y los aldehídos son grupos poco abundantes dentro del perfil aromático de un vino (Figura 5A). Los ácidos grasos tienen especial importancia como precursores de los ésteres, aunque también aportan complejidad en concentraciones bajas. Dentro de los aldehídos, destaca el acetaldehído como el compuesto de este grupo más abundante en el vino, y se relaciona con aromas frutales.

La contribución de todos los VOCs debe de ser entendida desde una perspectiva de equilibrio. En todas las familias mencionadas hay algunos compuestos cuya presencia siempre está asociada a una contribución positiva al perfil aromático del vino. Sin embargo, otros compuestos, o la propia familia en su conjunto, deben de contribuir de forma proporcionada al perfil aromático, ya que la diferencia entre aportar aromas frutales, florales o complejidad aromática, y aportar características aromáticas negativas (notas herbáceas, pegamento, disolvente, rancidez, etc.), solamente depende de alcanzar una concentración límite, propia de cada familia o de cada compuesto volátil; como concentraciones de alcoholes superiores mayores de 400 mg/L o concentraciones de acetato de etilo mayores de 150 mg/L (Swiegers et al., 2005; Sumbly et al., 2010).

Para determinar la contribución de los grupos de levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* al perfil aromático de un vino, se buscan correlaciones entre la presencia de determinadas



levaduras con la composición y concentración de VOCs obtenida. De este modo, la producción total de alcoholes superiores es variable en no-*Saccharomyces* en comparación con *S. cerevisiae*, que es reconocida como buena productora de compuestos de esta familia. Sin embargo, se distinguen algunas especies no-*Saccharomyces* por su producción de 2-feniletanol, como *L. thermotolerans*, *T. delbrueckii*, y varias especies del género *Hanseniaspora* spp. (*H. guilliermondii*, *H. osmophila* y *H. uvarum*) (Vejarano y Gil-Calderón, 2021; Ciani et al., 2022). En cuanto a la presencia de ésteres, destacan las levaduras no-*Saccharomyces*, aunque con diferencias notables en función de los compuestos considerados. Estas levaduras se suelen asociar a concentraciones significativas de acetato de etilo, pero también a niveles de ésteres de etilo más bajos en comparación con *S. cerevisiae*. Esto, a su vez, se relaciona con la producción de dos tipos concretos de ésteres: ésteres de acetato de alcoholes superiores y ésteres de etilo compuestos por ácidos grasos de cadena media. En cuanto a la familia de aldehídos, *S. cerevisiae* demuestra producciones elevadas de acetaldehído en comparación con no-*Saccharomyces*. Por último, las especies no-*Saccharomyces* muestran una mayor producción y variedad de enzimas hidrolíticas que permiten la liberación de aromas primarios a partir de sus precursores no volátiles (Padilla et al., 2016; Romano et al., 2022).

A pesar de que uno de los objetivos generales de muchos de los trabajos de investigación es entender y cuantificar el efecto que tiene cada levadura en el perfil de compuestos aromáticos de un vino, la realidad es que, hasta la fecha, todos los resultados obtenidos demuestran una gran variabilidad en el impacto que supone la actividad de cada levadura en el aroma del vino. Esta variabilidad reside en un conjunto de factores complejos y relacionados entre sí. En primer lugar, aunque se puedan establecer tendencias dentro de un grupo de levaduras o de una especie concreta, se reconoce que las características tecnológicas de una especie son dependientes de cepa. Por lo tanto, desde un punto de vista enológico, éste debe de ser el nivel de estudio y de evaluación de cualquier aislado antes de su aplicación a una escala industrial (Romano et al., 2022).

También se considera que las cepas de levaduras no desarrollan su crecimiento y actividad de forma aislada, sino que forman parte de un sistema en el que interactúan de forma pasiva o activa con otras especies o cepas de levaduras. La interacción pasiva se refiere a la competencia natural que se establece por la disponibilidad de nutrientes, oxígeno y espacio, mientras que la activa comprende la producción y liberación de determinadas sustancias (compuestos antimicrobianos, ácidos orgánicos, VOCs), así como el contacto célula a célula. Por lo tanto, la actividad de cada especie o cepa puede ser modulada, estableciéndose relaciones antagónicas o sinérgicas entre las diferentes levaduras de un mismo hábitat (Englezos et al., 2022).

Otro factor importante es el mosto, en función de su contenido y de sus características fisicoquímicas. La composición y concentración tanto del nitrógeno como de los azúcares disponibles determinan la actividad metabólica de las poblaciones de levaduras, junto con el pH del mosto y parámetros de fermentación como la temperatura y la aireación. Por último, también hay que tener en cuenta factores relacionados con el viñedo, como las diferentes prácticas vitícolas aplicadas, las variedades de uvas y el grado de maduración de la misma, que afectan a la composición del mosto y a la presencia de aromas varietales.

Este amplio conjunto de factores puede ser resumido en un binomio formado por la cepa de levadura considerada y todos los factores que pueden afectar a su crecimiento y desarrollo y, por lo tanto, a su actividad metabólica, que ofrece como resultado un perfil organoléptico característico. Por todo ello, el grado de contribución de cada especie o cepa debe de ser valorado desde el conjunto de especies que forman parte del proceso de fermentación, atendiendo a unas mismas condiciones de elaboración y teniendo en cuenta que las características del mosto de cada añada aportarán un grado de variabilidad importante en el proceso de elaboración del vino (Padilla et al., 2016).

### **2.3. Aptitud enológica de las levaduras nativas**

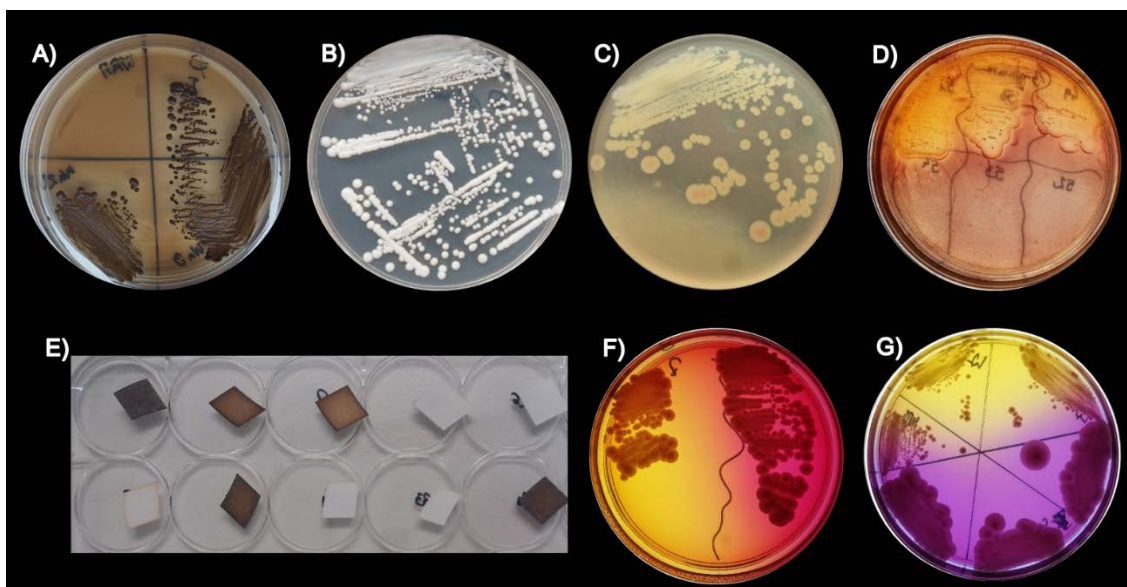
La diversidad de levaduras presente en cualquier ambiente natural relacionado con el viñedo y la bodega es una de las fuentes de búsqueda de soluciones a muchas de las demandas tecnológicas que puedan plantearse para mejorar el proceso de producción vitivinícola (Lappa et al., 2020). Por este motivo, los procesos de selección de levaduras tienen su origen en la microbiota nativa asociada a un viñedo, a un mosto o a un proceso fermentativo.

*S. cerevisiae* es la levadura mejor adaptada, tanto metabólicamente como ambientalmente, al proceso fermentativo. Es una levadura *Crabtree* positiva, por lo que, ante elevadas concentraciones de azúcares, aún en presencia de oxígeno, es capaz de regular su metabolismo del carbono hacia el desarrollo de la fermentación alcohólica. Esto le permite conseguir una conversión rápida y eficiente de los azúcares en etanol, CO<sub>2</sub> y otros compuestos minoritarios desde un punto de vista cuantitativo. Al mismo tiempo, es capaz de adaptarse a las condiciones cambiantes de la fermentación, principalmente al acúmulo de etanol generado. Por este motivo, se convierte en la levadura dominante de los procesos de fermentación y es el principal cultivo iniciador que se utiliza en las fermentaciones dirigidas (inoculadas) (Pretorius, 2022).

En la selección de cepas de *S. cerevisiae* se tienen en cuenta diferentes características tecnológicas que identifican a una cepa como buena candidata para obtener un cultivo iniciador. Las principales características consideradas incluyen un buen comportamiento fermentativo, el uso eficiente de las fuentes de nitrógeno, la tolerancia al estrés osmótico, a la presencia de SO<sub>2</sub> y al etanol, el

fenotipo *killer* y un crecimiento adecuado a la temperatura de trabajo de cada proceso de vinificación (Mas y Portillo, 2022). Además de estas propiedades, también se considera la presencia de determinadas actividades enzimáticas relacionadas con el perfil sensorial del vino o con la mejora del proceso productivo (OIV-OENO 370-2012).

Los aromas primarios, como los terpenos y los tioles, definen el perfil aromático específico de cada variedad de uvas. Estos compuestos se forman durante la maduración del fruto como precursores no volátiles (glicósidos de terpenos y cisteinilados de tioles), los cuales son liberados durante la fermentación por la acción de enzimas hidrolíticas glicosidasas y  $\beta$ -liasas (Swiegers, 2005; Belda et al., 2016b). La distribución de estas actividades enzimáticas en las poblaciones de levaduras vínicas es variable y dependiente de la especie y de la cepa de levadura considerada (Belda et al., 2016a). Las enzimas glicosidasas no son comunes entre las cepas *S. cerevisiae* (Suranská et al., 2016) aunque han sido detectadas en algunos trabajos de caracterización y selección de aislados de esta especie (Durcanská et al., 2018; Figura 6A). Sin embargo, estas enzimas se encuentran ampliamente distribuidas en diferentes especies de levaduras no-*Saccharomyces* (Belda et al., 2016a). De forma semejante, la actividad  $\beta$ -liasa se caracteriza por su elevada variabilidad intra- e interespecie, aunque su distribución general es más moderada (Padilla et al., 2016; Figura 6B). Cabe destacar que la  $\beta$ -liasa es una enzima intracelular que requiere que los conjugados azufrados penetren en el interior de las células de la levadura para que se produzca la liberación de los compuestos volátiles (Belda et al., 2016b).



**Figura 6.** Actividades enzimáticas valoradas en el análisis de los aislados de levaduras vínicas de este estudio. A)  $\beta$ -glucosidasa. B)  $\beta$ -liasa. C) Proteasa. D)  $\beta$ -glucanasa. E) Sulfito reductasa (SR). F) Hidroxicinamato descarboxilasa (HCDC). G) Aminoácido descarboxilasa.

Las enzimas proteasa y  $\beta$ -glucanasa, mediante su actividad hidrolítica, favorecen la degradación de moléculas estructurales propias de las uvas y de las levaduras (Escribano et al., 2017; Figura

6C y 6D). De forma general, estas enzimas extracelulares favorecen procesos tecnológicos de estabilización del vino, como la clarificación y la filtración (Tristeza et al., 2012). Además, y especialmente la enzima  $\beta$ -glucanasa, contribuyen a la liberación de polisacáridos y manoproteínas a partir de la pared celular de las levaduras muertas concentradas en las lías de fermentación o de crianza, mejorando las propiedades organolépticas del vino (volumen y cuerpo en boca, y estabilidad aromática) y aportando estabilidad tartárica y proteica (Englezos et al., 2022). La actividad proteasa se encuentra ampliamente distribuida en levaduras no-*Saccharomyces* y presenta una distribución intraespecie muy variable en *S. cerevisiae* (Tristeza et al., 2012; Belda et al., 2016a). Sin embargo, la actividad  $\beta$ -glucanasa es moderada tanto en no-*Saccharomyces* como en *S. cerevisiae* (Tristeza et al., 2012; Escribano et al., 2017).

El potencial tecnológico de un aislado de levadura reside tanto en las propiedades beneficiosas que puede aportar al vino, como en la ausencia de efectos no deseados. Por ello, en la caracterización de los aislados vínicos también es necesario valorar la confluencia de determinadas actividades enzimáticas perjudiciales. La producción de sulfuro de hidrógeno ( $\text{SH}_2$ ), de vinil- y etilfenoles o de aminas biógenas modifican de forma negativa las propiedades fisicoquímicas y sensoriales del vino, y pueden ser evaluadas a través de diferentes actividades enzimáticas asociadas a los aislados de levaduras vínicas. La producción de  $\text{SH}_2$  forma parte del metabolismo del azufre propio de las levaduras, mediante la acción de la enzima sulfito reductasa (SR), por lo que es una característica inherente a muchos aislados de levaduras (Figura 6E). Esta actividad debe de ser valorada desde el umbral de aceptabilidad de  $\text{SH}_2$  en vinos (80  $\mu\text{g/L}$ ) y confirmada en ensayos de fermentación, atendiendo a la composición química del mosto y a las condiciones de trabajo utilizadas, factores que influyen de forma notable en la producción de  $\text{SH}_2$  junto con la cepa seleccionada (Tristeza et al., 2012). Los vinil- y etilfenoles producen efectos sensoriales desagradables relacionados con aromas a disolvente o ahumados, y a aromas animales, respectivamente. A partir de los ácidos hidroxicinámicos ferúlico y p-cumárico, procedentes de la pared vegetal de las uvas, la actividad hidroxicinamato descarboxilasa (HCDC) da lugar a la formación de vinilfenoles. Y, mediante la acción de la enzima vinilfenol reductasa (VPhR) sobre los vinilfenoles se sintetizan los etilfenoles. La enzima HCDC se asocia a diferentes especies de levaduras no-*Saccharomyces* y también a *S. cerevisiae*. Sin embargo, la enzima VPhR es exclusiva del género *Brettanomyces/Dekkera* spp. (Escribano et al., 2017; Figura 6F). Por último, la acción de las enzimas descarboxilasas sobre varios aminoácidos naturales (arginina, histidina, leucina, lisina, ornitina, fenilalanina, tirosina y triptófano) da lugar a la síntesis de aminas biógenas (Figura 6G). Estos compuestos orgánicos nitrogenados no ejercen ningún efecto negativo en las características organolépticas del vino, pero su presencia en elevadas concentraciones puede tener consecuencias en la salud del consumidor (reacción alérgica más o menos severa) tras la ingesta de vino. La histamina es la amina biógena con mayor impacto en la

salud humana y su efecto puede verse agravado por la presencia de otras aminas habituales en el vino, como la tiramina y la cadaverina. La producción de enzimas amino descarboxilasas se asocia principalmente a la especie *S. cerevisiae* (Tristezza et al., 2012).

Atendiendo al impacto que producen en las propiedades fisicoquímicas y sensoriales de los vinos a través de su actividad metabólica, las levaduras no-*Saccharomyces* se presentan como una nueva herramienta que permite dar respuesta a necesidades tecnológicas emergentes (Lappa et al., 2020). El aumento de la complejidad del perfil aromático de un vino o la búsqueda de una mayor singularidad, pueden ser alcanzadas con el desarrollo de fermentaciones mixtas en las que se combinan una o dos cepas no-*Saccharomyces* con una cepa *S. cerevisiae* en diferentes estrategias de inoculación. La actividad metabólica de las cepas no-*Saccharomyces* aporta nuevos aromas secundarios, no vinculados a la actividad fermentativa de *S. cerevisiae*. Diversas cepas de la especie *T. delbrueckii* destacan por la producción de 2-feniletanol (rosa), acetato de isoamilo (plátano), acetato de isobutilo (plátano), acetato de 2-feniletilo (rosa), isobutirato de etilo (fresa y fruta roja), etc. También, otras cepas de las especies *L. thermotolerans* (2-feniletanol, propionato de feniletilo (rosa) y otros ésteres), *M. pulcherrima* (propionato de feniletilo), *P. kluyveri* (acetato de 2-feniletilo) y *H. vineae* (acetato de 2-feniletilo, acetato de isobutilo, etc.) son valoradas por la obtención de aromas florales y frutales (Vejarano y Gil-Calderón, 2021). Además, las levaduras no-*Saccharomyces* demuestran importantes actividades enzimáticas relacionadas con el aumento de aromas varietales (terpenos y tioles). Diversas cepas de *T. delbrueckii* presentan actividades glicosidasas y  $\beta$ -lialasa, que permiten la liberación de terpenos y tioles, respectivamente. Destaca también la especie *W. anomalus* por su elevada actividad glicosídica basada en diferentes enzimas ( $\beta$ -glucosidasas,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas,  $\alpha$ -L-ramnosidasas y  $\beta$ -D-xilosidasas; Maicas y Mateo, 2023). Todas estas actividades pueden favorecer la expresión de aromas varietales en cualquier variedad de uvas, aunque adquieren mayor relevancia en variedades neutras, con poca capacidad aromática (Vejarano y Gil-Calderón, 2021).

Las levaduras vínicas no-*Saccharomyces* tienen otros efectos sobre el perfil sensorial del vino, como el aumento de la producción de glicerol (*T. delbrueckii*, *L. thermotolerans* y *M. pulcherrima*) y de polisacáridos (*Sc. pombe*) que contribuyen a la textura (sensación en boca) y a la complejidad del vino. Es de especial interés la acción de la especie *L. thermotolerans* en el aumento de la acidez de los vinos mediante la producción de ácido láctico, constituyendo una alternativa biotecnológica a la progresiva pérdida de acidez que sufren los vinos de climas secos, como consecuencia del cambio climático (Vicente et al., 2022). También destaca la especie *M. pulcherrima*, ya que permite reducir el contenido de alcohol de los vinos, mostrándose como una herramienta enológica en la elaboración de vinos obtenidos a partir de uvas con una elevada concentración de azúcares, propias de climas secos; o bien como alternativa en el diseño de vinos con menor grado alcohólico (Vejarano y Gil-Calderón, 2021). Además, algunas levaduras como

*P. guilliermondii* y *T. delbrueckii* se relacionan con efectos en la composición fenólica de los vinos, mejorando el color en variedades tintas mediante el acúmulo de pigmentos en su pared celular (Englezos et al., 2022).

Asimismo, son importantes otros roles no fermentativos propios de las levaduras no-*Saccharomyces*. La producción de enzimas proteolíticas y pectinolíticas extracelulares vinculada a la presencia de especies como *Hanseniaspora* spp. y *Pichia* spp. favorece el equilibrio proteico del vino y puede ser considerada como una estrategia natural que permite reducir la aplicación o las dosis de tratamientos enológicos sintéticos de estabilización y clarificación de los vinos (Belda et al., 2016a; Maicas y Mateo, 2023). Por otro lado, la producción de metabolitos antimicrobianos activos y/o toxinas *killer* (*P. membranifaciens*, Belda et al., 2017b; *T. delbrueckii* y *W. anomalus*, Maicas y Mateo, 2023) plantea la posibilidad de nuevos enfoques en el control poblacional de los procesos de vinificación frente a levaduras alterantes como *Zygosaccharomyces* spp. y *B. bruxelensis*, especialmente en vinos de producción ecológica, biodinámica o vinos naturales, en los que se busca reducir la aplicación del aditivo sulfuroso.

Todas las características mencionadas señalan el elevado potencial de las levaduras no-*Saccharomyces* para convertirse en valiosas aplicaciones enológicas, mediante la obtención y comercialización de cultivos iniciadores. Varias cepas de diferentes especies de no-*Saccharomyces* ya se encuentran disponibles comercialmente, siendo *T. delbrueckii*, *L. thermotolerans* y *M. pulcherrima* las especies con una mayor oferta de productos (Vejarano y Gil-Calderón, 2021).

Tan importante como conocer las características enológicas de las cepas de levaduras que se van a utilizar, es valorar el tipo de fermentación a realizar. Se pueden plantear fermentaciones espontáneas y fermentaciones dirigidas (inoculadas) utilizando cultivos iniciadores que pueden incluir una única cepa seleccionada o más de una cepa, las cuales se adicionan en estrategia de coinoculación o de inoculación secuencial. Las fermentaciones espontáneas permiten la sucesión natural de las poblaciones de levaduras que se encuentran en el mosto inicial, cuyo principal aporte son las levaduras no-*Saccharomyces* presentes en la superficie de las uvas. Este tipo de fermentación, desde un punto de vista de diversidad ecológica es el más complejo, ya que las poblaciones iniciales son un conjunto heterogéneo de especies y cepas con mayor o menor abundancia que irán evolucionando en función de las condiciones del mosto, de las prácticas enológicas aplicadas y de las interrelaciones que se establecen entre las diferentes especies y cepas. La fermentación espontánea favorece una elevada variabilidad genética tanto de especies y cepas no-*Saccharomyces* como de cepas de *S. cerevisiae*, que se traduce en múltiples actividades metabólicas que dan como resultado matrices vínicas complejas y singulares. El inconveniente de este tipo de fermentaciones es la pérdida del control microbiológico, que puede

conducir a una ralentización de las cinéticas fermentativas y, por tanto, a una parada del proceso antes de llegar a término (Mas y Portillo, 2022).

Para asegurar el control microbiológico de las fermentaciones, una de las prácticas enológicas más habituales es el desarrollo de fermentaciones dirigidas a partir de cultivos iniciadores de *S. cerevisiae*. Existe una amplia selección de cepas de levaduras *S. cerevisiae* disponibles de forma comercial como levaduras secas activas (LSA) (ADY, siglas en inglés de *Active Dry Yeast*) de origen vínico. Además, cada vez es más variada la gama de cepas de diferentes especies de levaduras no-*Saccharomyces* (Vejarano y Gil-Calderón., 2021). La adición de cultivos iniciadores de *S. cerevisiae* permite dirigir microbiológicamente la fermentación alcohólica, ya que son aplicados en elevadas concentraciones y están compuestos por una cepa seleccionada que presenta una cinética fermentativa óptima. Además, *S. cerevisiae* se caracteriza por su buena adaptación natural a las condiciones fermentativas y determinadas intervenciones enológicas, como el uso de SO<sub>2</sub>, favoreciendo su dominancia. Todos estos factores permiten alcanzar una buena implantación de la cepa del cultivo iniciador desde las etapas iniciales de la fermentación, lo que asegura un desarrollo rápido y óptimo de la fermentación hasta el final del proceso. Otro efecto del cultivo iniciador es el importante desplazamiento de la microbiota nativa presente en el mosto. Este desplazamiento es positivo para evitar la proliferación de levaduras y bacterias alterantes del vino, pero la dominancia de una única cepa de *S. cerevisiae* desde el inicio de la fermentación alcohólica también supone la obtención de un perfil fisicoquímico del vino marcado por la actividad metabólica mayoritaria de la cepa que constituye el cultivo iniciador. El uso del mismo tipo de cultivo iniciador sobre mostos de características semejantes proporciona una homogeneidad del producto final que conduce a su estandarización (Mas y Portillo, 2022).

Una forma de conseguir vinos más singulares es la combinación de un cultivo iniciador basado en levaduras no-*Saccharomyces* junto con el cultivo iniciador de *S. cerevisiae*. Esta fórmula es una herramienta tecnológica que aúna tanto el control microbiológico de la fermentación, como el respeto a la sucesión natural que se produce en las fermentaciones espontáneas entre no-*Saccharomyces* y *S. cerevisiae*. Ambos cultivos pueden ser aplicados mediante coinoculación, es decir, pueden ser adicionados a la vez en el inicio de la fermentación; o bien en inoculación secuencial, añadiendo primero la cepa de la especie no-*Saccharomyces*, y a continuación, en un intervalo de 48-72 h en función de la evolución de fermentación, la cepa de *S. cerevisiae* que llevará a término la fermentación alcohólica. De esta forma, el perfil químico del vino refleja la actividad metabólica de ambas cepas, alcanzando un nivel de complejidad distinto al de las fermentaciones dirigidas en las que solo se utiliza un cultivo iniciador de *S. cerevisiae*. Independientemente del tipo de inoculación utilizado, factores como la dosis de inoculación de cada cepa y la ratio de las mismas, junto con la competencia que se establece por la utilización de

los recursos del medio, son determinantes en la evolución del desarrollo y actividad de los cultivos iniciadores (Englezos et al., 2022).

Finalmente, un mayor grado de complejidad y una mayor semejanza, en comparación con las condiciones naturales de una fermentación espontánea, pueden ser alcanzados aplicando una estrategia de cultivos múltiples. Estos cultivos contemplan la aplicación de más de una especie y/o cepa de levaduras no-*Saccharomyces* y de la levadura *S. cerevisiae*. Atendiendo a criterios de ecología microbiana, es una aproximación más real a la secuencia de poblaciones de levaduras que se produce en la fermentación espontánea, aunque es una situación complicada desde un punto de vista de equilibrio poblacional y de control de la contribución de cada una de las cepas seleccionadas utilizadas, en función de las interrelaciones que se pueden establecer entre ellas (Mas y Portillo, 2022).

La utilización de diferentes cultivos iniciadores como práctica tecnológica debe de tener en cuenta, por un lado, las características que aseguren un correcto desarrollo de la fermentación alcohólica y, por otro lado, las propiedades que permitan alcanzar el efecto deseado sobre las características organolépticas del vino. Algunas especies no-*Saccharomyces*, como *T. delbrueckii* y *H. vineae*, presentan una elevada capacidad fermentativa, alcanzando valores del 13% y del 11,9% de etanol (v/v), respectivamente. Pero, de forma general, el final de la fermentación alcohólica debe de asegurarse utilizando cultivos *Saccharomyces* compatibles con los cultivos no-*Saccharomyces* (Vejarano y Gil-Calderón, 2021). Atendiendo a las características finales del vino, hay que tener en cuenta que cada uno de los cultivos utilizados tendrá un efecto diferente y particular sobre el perfil metabolómico del producto final, y que este efecto también será distinto si se mezclan dos o más cultivos en el mismo proceso de fermentación. Además, los efectos asociados a la mezcla de cultivos no son aditivos en comparación con los perfiles metabolómicos propios del cultivo individual, sino que se pueden observar variaciones en la presencia o la ausencia de determinados compuestos químicos, como resultado de la interacción positiva y/o negativa que se establece en la mezcla de cultivos (Roullier-Gall et al., 2020).

### **2.4. Vino Verdejo**

*Vitis vinifera* L. var. Verdejo es una variedad blanca autóctona y la principal representante de la Denominación de Origen (D.O.) Rueda. Esta marca de calidad se localiza en la Meseta Superior que cruza la cuenca del Duero y sus afluentes Trabancos, Zapardiel y Adaja, fundamentalmente en la provincia de Valladolid y en pequeñas zonas de las provincias de Segovia y Ávila. Se encuentra entre 700 y 870 metros por encima del nivel del mar, bajo una influencia de clima continental, con temperaturas extremas tanto en invierno como en verano, primaveras cortas y baja pluviometría anual (300-500 L anuales). Sus primeras plantaciones en la zona datan de los siglos XI-XII (Consejo regulador de la Denominación de Origen Rueda [C.R.D.O. Rueda], 2024).



La vid se caracteriza por su porte horizontal y por su bajo vigor y baja fertilidad. La producción obtenida es media, relacionada con podas largas. Es una planta moderadamente resistente a la sequía, adaptada a terrenos poco fértiles y muy sensible a las infecciones por el hongo filamentoso *Erysiphe necator*, agente causante del oídio. Esta variedad produce racimos de tamaño pequeño a mediano, compactos y de pedúnculo corto. Sus bayas son medianas y uniformes, de color verde-amarillo, con forma acuminada, piel fina, y de consistencia blanda y jugosa (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación [MAPA], 2024).

Las uvas de la variedad Verdejo permiten elaborar vinos, principalmente monovarietales, muy aromáticos, con una acidez media-alta, con cuerpo y suavidad. Tanto sus características fisicoquímicas como sus atributos sensoriales definen una variedad de vino única y reconocible, muy apreciada por el consumidor. Una de las principales líneas de elaboración de esta variedad es la producción de vinos jóvenes, que se caracterizan por un color amarillo-verdoso y un perfil sensorial complejo con abundancia de aromas frescos, dulces, florales, frutales y herbáceos. La contribución de las diferentes series de aromas depende tanto de la composición química y aromática de las uvas y el mosto como de las diferentes técnicas de vinificación aplicadas. Tienen especial repercusión el contacto con los hollejos antes de la fermentación, o la utilización de tratamientos enzimáticos, favoreciendo ambos procesos el perfil aromático del vino (Sánchez-Palomo et al., 2010). Otras líneas de elaboración son las fermentaciones en barrica de roble o la crianza sobre lías, cada vez más presentes en la obtención de nuevos perfiles de vino (Losada et al., 2012; C.R.D.O. Rueda, 2024). Asimismo, la selección de levaduras nativas y su aplicación como cultivos iniciadores ofrece una nueva perspectiva en la expresión de la singularidad de esta variedad (Ruiz et al., 2018; Vázquez et al., 2023).

El perfil aromático de los vinos Verdejo jóvenes está compuesto por una amplia gama de aromas primarios. Son característicos de esta variedad los terpenos relacionados con notas florales ( $\beta$ -citronelol,  $\alpha$ -terpineol, terpinen-4-ol, linalol, nerol y alcohol bencílico), y los terpenos asociados a aromas cítricos (citronelal) y herbáceos ( $\alpha$ -pineno). También son representativos los compuestos C<sub>13</sub>-norisoprenoides ( $\alpha$ - y  $\beta$ -ionona) unidos a notas florales, y ésteres como el acetato de isoamilo, el acetato de hexilo y el butirato de etilo, vinculados con aromas frutales del vino (plátano, manzana, pera, piña, etc.; Rodríguez-Nogales et al., 2009; Sánchez-Palomo et al., 2015). Además, la variedad Verdejo es reconocida por su carácter tiólico expresado a través de aromas frutales tropicales (maracuyá, guayaba, pomelo, etc.) asociados a la presencia de tioles polifuncionales como la 4MMP, el 3MHA y el 3MH. En general, estos compuestos se encuentran en las uvas en formas conjugadas no volátiles y en bajas concentraciones, siendo fundamentales los bajos umbrales de detección que caracterizan a estos compuestos (3 a 60 ng/L) y la presencia de enzimas  $\beta$ -liasas, para su contribución en el aroma del vino (Ruiz et al., 2018).

En el año 2023, en la D.O. Rueda se recogieron 115.269.278 kg de uvas Verdejo, suponiendo el 88,36% de todas las variedades de uvas de la denominación. Desde el año 2000, la superficie de viñedo inscrita ha sufrido un incremento gradual, desde 2.955,73 ha registradas en el año 2000, hasta las 17.925,68 ha, en el año 2023. Los datos de comercialización de vinos blancos de la D.O. Rueda también demuestran un incremento semejante desde 24.183.360 L, en el año 2003, hasta 109.751.869 L, en el año 2022 (C.R.D.O. Rueda, 2024). Estos datos avalan la importancia del sector vitivinícola amparado bajo la D.O. Rueda, y el impulso económico y social que supone este sector en la zona.

### 3. BIBLIOGRAFÍA

- Alexandre, H. (2020). Wine yeast terroir: separating the wheat from the chaff—for an open debate. *Microorganisms*, 8(5), 787. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050787>
- Alonso, A., Belda, I., Santos, A., Navascués, E., & Marquina, D. (2015). Advances in the control of the spoilage caused by *Zygosaccharomyces* species on sweet wines and concentrated grape musts. *Food Control*, 51, 129-134. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.11.019>
- Alonso, A., de Celis, M., Ruiz, J., Vicente, J., Navascués, E., Acedo, A., Ortiz-Álvarez, R., Belda, I., Santos, A., Gómez-Flechoso, M. A., & Marquina, D. (2019). Looking at the origin: Some insights into the general and fermentative microbiota of vineyard soils. *Fermentation*, 5(3), 78. <https://doi.org/10.3390/fermentation5030078>
- Bagheri, B., Bauer, F. F., & Setati, M. E. (2017). The impact of *Saccharomyces cerevisiae* on a wine yeast consortium in natural and inoculated fermentations. *Frontiers in Microbiology*, 8, 294679. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01988>
- Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., & Loureiro, V. (2012). The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology*, 153(3), 243-259. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.025>
- Belda, I., Ruiz, J., Alastruey-Izquierdo, A., Navascués, E., & Santos, A. (2016a). Unraveling the enzymatic basis of wine “flavorome”: A phylo-functional study of wine related yeast species. *Frontiers in microbiology*, 7, 175613. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00012>
- Belda, I., Ruiz, J., Navascués, E., Marquina, D., & Santos, A. (2016b). Improvement of aromatic thiol release through the selection of yeasts with increased  $\beta$ -lyase activity. *International Journal of Food Microbiology*, 225, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.03.001>
- Belda, I., Zarraonaindia, I., Perisin, M., Palacios, A., & Acedo, A. (2017a). From vineyard soil to wine fermentation: microbiome approximations to explain the “terroir” concept. *Frontiers in Microbiology*, 8, 821. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00821>
- Belda, I., Ruiz, J., Alonso, A., Marquina, D., & Santos, A. (2017b). The biology of *Pichia membranifaciens* killer toxins. *Toxins*, 9(4), 112. <https://doi.org/10.3390/toxins9040112>
- Belloch, C., Barrio, E., Uruburu, F., Garcia, M. D., & Querol, A. (1997). Characterisation of four species of the genus *Kluyveromyces* by mitochondrial DNA restriction analysis. *Systematic and Applied Microbiology*, 20(3), 397-408. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(97\)80008-2](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(97)80008-2)
- Berbegal, C., Spano, G., Tristezza, M., Grieco, F., & Capozzi, V. (2017). Microbial resources and innovation in the wine production sector. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 38(2), 156-166. <http://dx.doi.org/10.21548/38-2-1333>
- Bettenfeld, P., I Canals, J. C., Jacquens, L., Fernandez, O., Fontaine, F., van Schaik, E., Courty, P. E., & Trouvelot, S. (2022). The microbiota of the grapevine holobiont: A key component of plant health. *Journal of Advanced Research*, 40, 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.12.008>
- 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), 10-1128. <https://doi.org/10.1128/mbio.00631-16>
- Bonanomi, G., De Filippis, F., Cesarano, G., La Stora, A., Ercolini, D., & Scala, F. (2016). Organic farming induces changes in soil microbiota that affect agro-ecosystem functions. *Soil Biology and Biochemistry*, 103, 327-336. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.09.005>

- Börilin, M., Claisse, O., Albertin, W., Salin, F., Legras, J. L., & Masneuf-Pomarede, I. (2020). Quantifying the effect of human practices on *S. cerevisiae* vineyard metapopulation diversity. *Scientific Reports*, *10*(1), 16214. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73279-7>
- Borren, E., & Tian, B. (2020). The important contribution of non-*Saccharomyces* yeasts to the aroma complexity of wine: A review. *Foods*, *10*(1), 13. <https://doi.org/10.3390/foods10010013>
- Bray, J. R., & Curtis, J. T. (1957). An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecological Monographs*, *27*(4), 326-349. <https://doi.org/10.2307/1942268>
- Camilo, S., Chandra, M., Branco, P., & Malfeito-Ferreira, M. (2022). Wine Microbial Consortium: Seasonal sources and vectors linking vineyard and winery environments. *Fermentation*, *8*(7), 324. <https://doi.org/10.3390/fermentation8070324>
- Castrillo, D., Rabuñal, E., Neira, N., & Blanco, P. (2019). Yeast diversity on grapes from Galicia, NW Spain: Biogeographical patterns and the influence of the farming system. *OENO One*, *53*, 573-587. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2019.53.3.2379>
- Castrillo, D., Neira, N., & Blanco, P. (2020). *Saccharomyces cerevisiae* strain diversity associated with spontaneous fermentations in organic wineries from Galicia (NW Spain). *Fermentation*, *6*(3), 89. <https://doi.org/10.3390/fermentation6030089>
- de Celis, M., Ruiz, J., Martín-Santamaría, M., Alonso, A., Marquina, D., Navascués, E., Gómez-Flechoso, M. A., Belda, I., & Santos, A. (2019). Diversity of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts associated to spontaneous and inoculated fermenting grapes from Spanish vineyards. *Letters in Applied Microbiology*, *68*(6), 580-588. <https://doi.org/10.1111/lam.13155>
- Ciani, M., Canonico, L., & Comitini, F. (2022). Improving white wine aroma and structure by non-*Saccharomyces* yeasts. In *White Wine Technology* (pp. 117-130). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823497-6.00020-X>
- Consejo Regulador de la Denominación de Origen Rueda. (2024). <https://www.dorueda.com/>
- Cordero-Bueso, G., Arroyo, T., Serrano, A., & Valero, E. (2011). Remanence and survival of commercial yeast in different ecological niches of the vineyard. *FEMS Microbiology Ecology*, *77*(2), 429-437. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01124.x>
- Cordero-Bueso, G., Izquierdo-Cañas, P. M., & Suzzi, G. (2018). Microorganisms for a sustainable viticulture and winemaking. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 2650. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02650>
- Costantini, A., Cravero, M. C., Panero, L., Bonello, F., Vaudano, E., Pulcini, L., & Garcia-Moruno, E. (2021). Wine fermentation performance of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* strains isolated in a Piedmont vineyard. *Beverages*, *7*(2), 30. <https://doi.org/10.3390/beverages7020030>
- Dimopoulou, M., Goulioti, E., Troianou, V., Toumpeki, C., Paramithiotis, S., Gosselin, Y., Dorignac, E., Papadopoulos, G., & Kotseridis, Y. (2022). Effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces pastorianus* co-inoculation on alcoholic fermentation behavior and aromatic profile of Sauvignon Blanc wine. *Fermentation*, *8*(10), 539. <https://doi.org/10.3390/fermentation8100539>
- Řurčanská, K., Muchová, L., Drtilová, T., Olejníková, P., Ženišová, K., & Furdíková, K. (2019). Characterization and selection of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from traditional and newly-bred vine varieties of Czech Republic and Slovakia. *Journal of Food and Nutrition Research*, *58*(1), 9-20.

- Englezos, V., Jolly, N. P., Di Gianvito, P., Rantsiou, K., & Cocolin, L. (2022). Microbial interactions in winemaking: Ecological aspects and effect on wine quality. *Trends in Food Science & Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.06.015>
- Escott, C., Del Fresno, J. M., Loira, I., Morata, A., & Suárez-Lepe, J. A. (2018). *Zygosaccharomyces rouxii*: Control strategies and applications in food and winemaking. *Fermentation*, 4(3), 69. <https://doi.org/10.3390/fermentation4030069>
- Escribano, R., González-Arenzana, L., Garijo, P., Berlanas, C., López-Alfaro, I., López, R., Gutiérrez, A. R., & Santamaría, P. (2017). Screening of enzymatic activities within different enological non-*Saccharomyces* yeasts. *Journal of Food Science and Technology*, 54, 1555-1564. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2587-7>
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., & Querol, A. (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49(1), 329-337. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-1-329>
- Fernández-Espinar, M. T., Barrio, E., & Querol, A. (2005). Identificación y caracterización molecular de levaduras vínicas. In A. V. Carrascosa, R. Muñoz & R. González (Eds.), *Microbiología del vino* (pp.148-184). Madrid: AMV EDICIONES.
- Fernández-Espinar, M. T., Llopis, S., Querol, A., & Barrio, E. (2011). Molecular identification and characterization of wine yeasts. In A. V. Carrascosa, R. Muñoz & R. González (Eds.), *Molecular wine microbiology* (pp. 111-140). New York: Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-375021-1.10005-0>
- Giraldo-Perez, P., Raw, V., Greven, M., & Goddard, M. R. (2021). A small effect of conservation agriculture on soil biodiversity that differs between biological kingdoms and geographic locations. *iScience*, 24(4). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102280>
- Gobbi, A., Acedo, A., Imam, N., Santini, R. G., Ortiz-Álvarez, R., Ellegaard-Jensen, L., Belda, I. & Hansen, L. H. (2022). A global microbiome survey of vineyard soils highlights the microbial dimension of viticultural terroirs. *Communications Biology*, 5(1), 241. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03202-5>
- Goddard, M. R., & Greig, D. (2015). *Saccharomyces cerevisiae*: A nomadic yeast with no niche?. *FEMS Yeast Research*, 15(3), fov009. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov009>
- González-Andrés, F. (2001). Caracterización morfológica. *Conservación y caracterización de recursos fitogenéticos. Publicaciones Instituto Nacional de Educación Agrícola. Valladolid, España*, 199-217.
- González, M. L., Sturm, M. E., Larena, M. C., Rojo, M. C., Chimeno, S. V., Combina, M., & Mercado, L. A. (2020). Persistence and reservoirs of *Saccharomyces cerevisiae* biodiversity in different vineyard niches. *Food Microbiology*, 86, 103328. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103328>
- Grangeteau, C., Roullier-Gall, C., Rousseaux, S., Gougeon, R. D., Schmitt-Kopplin, P., Alexandre, H., & Guilloux-Benatier, M. (2017). Wine microbiology is driven by vineyard and winery anthropogenic factors. *Microbial Biotechnology*, 10(2), 354-370. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12428>
- Griggs, R. G., Steenwerth, K. L., Mills, D. A., Cantu, D., & Bokulich, N. A. (2021). Sources and assembly of microbial communities in vineyards as a functional component of winegrowing. *Frontiers in Microbiology*, 12, 673810. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.673810>

- 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. *Scientific Reports*, 5(1), 14233. <https://doi.org/10.1038/srep14233>
- Lappa, I. K., Kachrimanidou, V., Pateraki, C., Koulougliotis, D., Eriotou, E., & Kopsahelis, N. (2020). Indigenous yeasts: Emerging trends and challenges in winemaking. *Current Opinion in Food Science*, 32, 133-143. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.04.004>
- Liu, D., Zhang, P., Chen, D., & Howell, K. (2019). From the vineyard to the winery: how microbial ecology drives regional distinctiveness of wine. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2679. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02679>
- Liu, D., & Howell, K. (2021). Community succession of the grapevine fungal microbiome in the annual growth cycle. *Environmental Microbiology*, 23(4), 1842-1857. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15172>
- López, V., Querol, A., Ramón, D., & Fernández-Espinar, M. T. (2001). A simplified procedure to analyse mitochondrial DNA from industrial yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 68(1-2), 75-81. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00483-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00483-4)
- Losada, M. M., López, J. F., Añón, A., Andrés, J., & Revilla, E. (2012). Influence of some oenological practices on the aromatic and sensorial characteristics of white Verdejo wines. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(9), 1826-1834. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03038.x>
- Maicas, S., & Mateo, J. J. (2023). The life of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts in drinking wine. *Microorganisms*, 11(5), 1178. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051178>
- 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(2), e30428. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030428>
- Mas, A., & Portillo, M. C. (2022). Strategies for microbiological control of the alcoholic fermentation in wines by exploiting the microbial terroir complexity: A mini-review. *International Journal of Food Microbiology*, 367, 109592. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109592>
- Martins, G., Lauga, B., Miot-Sertier, C., Mercier, A., Lonvaud, A., Soulas, M. L., Soulas, G., & Masneuf-Pomarède, I. (2013). Characterization of epiphytic bacterial communities from grapes, leaves, bark and soil of grapevine plants grown, and their relations. *PLoS ONE*, 8(8), e73013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073013>
- Merín, M. G., Mendoza, L. M., & Morata de Ambrosini, V. I. (2014). Pectinolytic yeasts from viticultural and enological environments: novel finding of *Filobasidium capsuligenum* producing pectinases. *Journal of Basic Microbiology*, 54(8), 835-842. <https://doi.org/10.1002/jobm.201200534>
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2024). *Material vegetal*. <https://www.mapa.gob.es/app/MaterialVegetal/fichaMaterialVegetal.aspx?idFicha=551>
- Morrison-Whittle, P., Lee, S. A., & Goddard, M. R. (2017). Fungal communities are differentially affected by conventional and biodynamic agricultural management approaches in vineyard ecosystems. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 246, 306-313. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.05.022>

- Morrison-Whittle, P., & Goddard, M. R. (2018). From vineyard to winery: a source map of microbial diversity driving wine fermentation. *Environmental Microbiology*, 20(1), 75-84. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13960>
- Nadai, C., Vendramini, C., Carlot, M., Andrighetto, C., Giacomini, A., & Corich, V. (2019). Dynamics of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from vine bark in vineyard: influence of plant age and strain presence during grape must spontaneous fermentations. *Fermentation*, 5(3), 62. <https://doi.org/10.3390/fermentation5030062>
- OIV. Resolución OIV-OENO 408-2011. (2024). *Herramientas de biología molecular para identificar la levadura de vinificación Saccharomyces cerevisiae y otras especies de levadura relacionadas con la vinificación*. <https://www.oiv.int/public/medias/1348/oiv-oeno-408-2011-es.pdf>
- OIV. Resolution OIV-OENO 370-2012. (2024). *Guidelines for the characterization of wine yeasts of the genus Saccharomyces isolated from vitivinicultural environment*. <http://www.oiv.int/public/medias/1429/oiv-oeno-370-2012-en.pdf>
- OIV. Resolution OIV-VITI 655-2021. (2024). *OIV recommendations about valuation and importance of microbial biodiversity in a sustainable vitiviniculture context*. <https://www.oiv.int/public/medias/8097/en-oiv-viti-655-2021.pdf>
- Onetto, C. A., Borneman, A. R., & Schmidt, S. A. (2020). Investigating the effects of *Aureobasidium pullulans* on grape juice composition and fermentation. *Food Microbiology*, 90, 103451. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103451>
- Padilla, B., Gil, J. V., & Manzanares, P. (2016). Past and future of non-*Saccharomyces* yeasts: From spoilage microorganisms to biotechnological tools for improving wine aroma complexity. *Frontiers in Microbiology*, 7, 185047. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00411>
- Paliy, O., & Shankar, V. (2016). Application of multivariate statistical techniques in microbial ecology. *Molecular Ecology*, 25(5), 1032-1057. <https://doi.org/10.1111/mec.13536>
- di Paola, M., Gori, A., Stefanini, I., Meriggi, N., Renzi, S., Nenciarini, S., Cerasuolo, B., Moriondo, M., Romoli, R., Pieraccini, G., Baracchi, D., Turillazi, F., Turillazi, S., & Cavalieri, D. (2023). Using wasps as a tool to restore a functioning vine grape mycobiota and preserve the mycobial “terroir”. *Scientific Reports*, 13(1), 16544. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-43541-9>
- Portillo, M. C., Franquès, J., Araque, I., Reguant, C., & Bordons, A. (2016). Bacterial diversity of Grenache and Carignan grape surface from different vineyards at Priorat wine region (Catalonia, Spain). *International Journal of Food Microbiology*, 219, 56-63. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.12.002>
- Pretorius, I. S. (2020). Tasting the terroir of wine yeast innovation. *FEMS Yeast Research*, 20(1), foz084. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foz084>
- Querol, A., Barrio, E. L. A. D. I. O., & Ramón, D. (1992). A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Systematic and Applied Microbiology*, 15(3), 439-446. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80219-5](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80219-5)
- Ramette, A. (2007). Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 62(2), 142-160. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00375.x>
- Renouf, V., Claisse, O., & Lonvaud-Funel, A. (2007). Inventory and monitoring of wine microbial consortia. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75, 149-164. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0798-3>

- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A., Darriet, P., & Towey, J. (2021). Handbook of Enology. John Wiley & Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119588320>
- 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. (2024). <https://www.boe.es/doue/2018/150/L00001-00092.pdf>
- Romano, P., Braschi, G., Siesto, G., Patrignani, F., & Lanciotti, R. (2022). Role of yeasts on the sensory component of wines. *Foods*, *11*(13), 1921. <https://doi.org/10.3390/foods11131921>
- Rodríguez-Nogales, J. M., Fernández-Fernández, E., & Vila-Crespo, J. (2009). Characterisation and classification of Spanish Verdejo young white wines by volatile and sensory analysis with chemometric tools. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *89*(11), 1927-1935. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3674>
- Roullier-Gall, C., David, V., Hemmler, D., Schmitt-Kopplin, P., & Alexandre, H. (2020). Exploring yeast interactions through metabolic profiling. *Scientific Reports*, *10*(1), 6073. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63182-6>
- Ruiz, J., Belda, I., Beisert, B., Navascués, E., Marquina, D., Calderón, F., Rauhut, D., Santos, A., & Benito, S. (2018). Analytical impact of *Metschnikowia pulcherrima* in the volatile profile of Verdejo white wines. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *102*, 8501-8509. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9255-3>
- Sánchez-Palomo, E., Gómez García-Carpintero, E., Alonso-Villegas, R., & González-Viñas, M. A. (2010). Characterization of aroma compounds of Verdejo white wines from the La Mancha region by odour activity values. *Flavour and Fragrance Journal*, *25*(6), 456-462. <https://doi.org/10.1002/ffj.2005>
- Sánchez-Palomo, E., Alonso-Villegas, R., & Viñas, M. G. (2015). Characterisation of free and glycosidically bound aroma compounds of La Mancha Verdejo white wines. *Food Chemistry*, *173*, 1195-1202. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.148>
- Segura, G., Luis, E., Kirchmayr, M. R., Flores, B., Ericka, P., Gschaedler, M., & Anne, C. (2010). PCR-RFLP de las regiones ITS-5.8S como herramienta de identificación de levaduras: ventajas y desventajas. *E-Gnosis*, *8*(2), 1-12.
- 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052609>
- Shannon, C. E. (1948). A mathematical theory of communication. *The Bell System Technical Journal*, *27*(3), 379-423. <https://doi.org/10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x>
- Stefanini, I., & Cavalieri, D. (2018). Metagenomic approaches to investigate the contribution of the vineyard environment to the quality of wine fermentation: potentials and difficulties. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 991. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00991>
- Sumby, K. M., Grbin, P. R., & Jiranek, V. (2010). Microbial modulation of aromatic esters in wine: Current knowledge and future prospects. *Food Chemistry*, *121*(1), 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.004>
- Sumby, K. M., Caliani, N. S., & Jiranek, V. (2021). Yeast diversity in the vineyard: how it is defined, measured and influenced by fungicides. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *27*(2), 169-193. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12479>
- Šuranská, H., Vránová, D., & Omelková, J. (2016). Isolation, identification and characterization of regional indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Brazilian Journal of Microbiology*, *47*, 181-190. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.010>



- Swiegers, J. H., Bartowsky, E. J., Henschke, P. A., & Pretorius, I. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(2), 139-173. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00285.x>
- 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 5.8 S-ITS restriction patterns. *Food Microbiology*, 39, 7-12. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.10.001>
- Tristezza, M., Vetrano, C., Bleve, G., Grieco, F., Tufariello, M., Quarta, A., Mita, G., Spano, G., & Grieco, F. (2012). Autochthonous fermentation starters for the industrial production of Negroamaro wines. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39(1), 81-92. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1002-z>
- Vázquez, J., Mislata, A. M., Vendrell, V., Moro, C., de Lamo, S., Ferrer-Gallego, R., & Andorrà, I. (2023). Enological suitability of indigenous yeast strains for ‘Verdejo’ wine production. *Foods*, 12(9), 1888. <https://doi.org/10.3390/foods12091888>
- Vejarano, R. (2018). *Saccharomycodes ludwigii*, control and potential uses in winemaking processes. *Fermentation*, 4(3), 71. <https://doi.org/10.3390/fermentation4030071>
- Vejarano, R., & Gil-Calderón, A. (2021). Commercially available non-*Saccharomyces* yeasts for winemaking: Current market, advantages over *Saccharomyces*, biocompatibility, and safety. *Fermentation*, 7(3), 171. <https://doi.org/10.3390/fermentation7030171>
- Vicente, J., Baran, Y., Navascués, E., Santos, A., Calderón, F., Marquina, D., Rauhut, D., & Benito, S. (2022). Biological management of acidity in wine industry: A review. *International Journal of Food Microbiology*, 375, 109726. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109726>
- Vitulo, N., Lemos, W. J. F., Calgaro, M., Confalone, M., Felis, G. E., & Nardi, T. (2019). Bark and grape microbiome of *Vitis vinifera*: Influence of geographic patterns and agronomic management on bacterial diversity. *Frontiers in Microbiology*, 9, 424892. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03203>
- Wang, X. C., Li, A. H., Dizey, M., Ullah, N., Sun, W. X., & Tao, Y. S. (2017). Evaluation of aroma enhancement for “Ecolly” dry white wines by mixed inoculation of selected *Rhodotorula mucilaginosa* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chemistry*, 228, 550-559. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.113>
- Wang, L., Cai, R., Zhang, J., Liu, X., Wang, S., Ge, Q., Zhao, Z., Yue, T., Yuan, Y., & Wang, Z. (2024). Removal of ochratoxin A in wine by *Cryptococcus albidus* and safety assessment of degradation products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 104(4), 2030-2037. <https://doi.org/10.1002/jsfa.13087>
- van Wyk, N., Pretorius, I. S., & von Wallbrunn, C. (2020). Assessing the oenological potential of *Nakazawaea ishiwadae*, *Candida railenensis* and *Debaryomyces hansenii* strains in mixed-culture grape must fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *Fermentation*, 6(2), 49. <https://doi.org/10.3390/fermentation6020049>
- Yu, C., Jiangzuo, Q., Tschopp, E., Wang, H., & Norell, M. (2021). Information in morphological characters. *Ecology and Evolution*, 11(17), 11689-11699. <https://doi.org/10.1002/ece3.7874>



## **II-OBJETIVOS**

---



# II-OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo consiste en conocer la ecología de las levaduras vínicas *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* presentes durante la fermentación alcohólica de uva ecológica de la variedad Verdejo de la Denominación de Origen (D.O.) Rueda. Este objetivo general conlleva abordar una serie de objetivos específicos que se enumeran a continuación:

## 2.1. Identificación de las levaduras vínicas

- 2.1.1. Establecer e identificar los grupos genéticos a nivel de especie de levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*.
- 2.1.2. Diferenciar a nivel de cepa los grupos genéticos de la especie *Saccharomyces cerevisiae*.
- 2.1.3. Estudiar las diferentes poblaciones de levaduras identificadas y su sucesión a lo largo del proceso fermentativo desde un punto de vista de ecología microbiana, atendiendo a la añada, la parcela de origen y las etapas de fermentación.

## 2.2. Caracterización tecnológica de las levaduras vínicas

- 2.2.1. Establecer el potencial enológico de los grupos genéticos identificados mediante el estudio de su perfil enzimático.
- 2.2.2. Estudiar la capacidad fermentativa de los diferentes grupos genéticos establecidos.

## 2.3. Aplicación tecnológica de las levaduras seleccionadas

- 2.3.1. Realizar microvinificaciones mixtas a escala de laboratorio, utilizando levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* seleccionadas.
- 2.3.2. Estudiar la implantación de las levaduras inoculadas en el proceso de fermentación alcohólica.
- 2.3.3. Comprobar el comportamiento fermentativo de las levaduras inoculadas, durante la microvinificación.
- 2.3.4. Evaluar la calidad de los vinos elaborados mediante parámetros fisicoquímicos.



# **III-COMPENDIO DE PUBLICACIONES**

---





# III-COMPENDIO PUBLICACIONES

## CAPÍTULO I

### **Estudio de la biodiversidad de las poblaciones de la levadura *S. cerevisiae*.**

López-Enríquez, L., Vila-Crespo, J., Rodríguez-Nogales, J. M., Fernández-Fernández, E., & Ruipérez, V. (2022). Screening and enzymatic evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* populations from spontaneous fermentation of organic Verdejo wines. *Foods*, *11*(21), 3448. <https://doi.org/10.3390/foods11213448>

## CAPÍTULO II

### **Estudio de la biodiversidad de las poblaciones de levaduras no-*Saccharomyces*.**

López-Enríquez, L., Vila-Crespo, J., Rodríguez-Nogales, J. M., Fernández-Fernández, E., & Ruipérez, V. (2023). Non-*Saccharomyces* yeasts from organic vineyards as spontaneous fermentation agents. *Foods*, *12*(19), 3644. <https://doi.org/10.3390/foods12193644>

## CAPÍTULO III

### **Aplicación de levaduras nativas no-*Saccharomyces* y *S. cerevisiae* en la elaboración de vinos de la variedad Verdejo, en la D. O. Rueda.**

López-Enríquez, L., Vila-Crespo, J., Rodríguez-Nogales, J. M., Fernández-Fernández, E., & Ruipérez, V. (2023). Modulation of the aromatic profile of Verdejo wine through sequential inoculation of *Wickerhamomyces anomalus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Fermentation*, *9*(11), 977. <https://doi.org/10.3390/fermentation9110977>



## CAPÍTULO I

# Screening and Enzymatic Evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* Populations from Spontaneous Fermentation of Organic Verdejo Wines

Lorena López-Enríquez, Josefina Vila-Crespo, José Manuel Rodríguez-Nogales, Encarnación Fernández-Fernández and Violeta Ruipérez

### Abstract

Microbial populations in spontaneous winemaking contribute to the distinctiveness and quality of the wines. In this study, molecular methods were applied to 484 isolated yeasts to survey the diversity of the *Saccharomyces cerevisiae* population in spontaneous fermentations of organic Verdejo grapes. Identification was carried out at strain level for samples from different vineyards and stages of the winemaking process over the course of two vintages, establishing 54 different strains. The number of isolates belonging to each strain was not homogeneous, as two predominant strains represented more than half of the isolates independent of vineyard or vintage. Regarding the richness and abundance, differences among the stages of fermentation were confirmed, finding the highest diversity values in racked must and in the end of fermentation stages. Dissimilarity in *S. cerevisiae* communities was found among vineyards and vintages, distinguishing representative groups of isolates for each of the populations analysed. These results highlight the effect of vineyard and vintage on yeast communities as well as the presence of singular strains in populations of yeasts. Oenologically relevant enzymatic activities,  $\beta$ -lyase, protease and  $\beta$ -glucanase, were detected in 83.9%, 96.8% and 38.7% of the isolates, respectively, which may be of interest for potential future studies.

**Keywords:** enzymatic activity; *Saccharomyces cerevisiae*; strain biotyping; Verdejo wine; wine quality; yeast diversity

<https://doi.org/10.3390/foods11213448>

*Foods* **2022**

Volume 11, Issue 21, 3448



---

## CAPÍTULO II

### Non-*Saccharomyces* Yeasts from Organic Vineyards as Spontaneous Fermentation Agents

Lorena López-Enríquez, Josefina Vila-Crespo, José Manuel Rodríguez-Nogales, Encarnación Fernández-Fernández and Violeta Ruipérez

#### Abstract

Currently, non-*Saccharomyces* yeasts are the subject of interest, among other things, for their contribution to the aromatic complexity of wines. In this study, the characterisation of non-*Saccharomyces* yeasts was addressed by their isolation during spontaneous fermentations of organic Verdejo grapes, obtaining a total of 484 isolates, of which 11% were identified by molecular techniques as non-*Saccharomyces* yeasts. Fermentative isolates belonging to the species *Hanseniaspora meyeri*, *Hanseniaspora osmophila*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia kudriavzevii*, *Torulaspora delbrueckii*, and *Wickerhamomyces anomalus* were analysed. Significant differences were found in the yeast populations established at the different fermentation stages. Interestingly, *W. anomalus* stood up as a widely distributed species in vineyards, vintages, and fermentation stages. Several of the strains studied stood out for their biotechnological potential in the production of Verdejo wine, showing the presence of relevant enzymatic activity for the release of varietal aromas and the technological improvement of the winemaking process. Three enzymatic activities were found in an important number of isolates,  $\beta$ -glucosidase, protease, and  $\beta$ -lyase, implicated in the positive aromatic impact on this style of white wine. In that sense, all the isolates of *W. anomalus* presented those activities. *T. delbrueckii* isolates were highlighted for their significant  $\beta$ -lyase activity. In addition, *T. delbrueckii* was outlined because of its potential to achieve an elevated fermenting power, as well as the lack of lag phase. The results obtained highlight the importance of maintaining the microbial diversity that contributes to the production of wines with unique and distinctive characteristics of the production region.

**Keywords:** yeast ecology; microbial diversity; enzymatic activity; wine quality; Verdejo wine.

<https://doi.org/10.3390/foods12193644>

*Foods* **2023**

Volume 12, Issue 19, 3644



## CAPÍTULO III

### Modulation of the Aromatic Profile of Verdejo Wine through Sequential Inoculation of *Wickerhamomyces anomalus* and *Saccharomyces cerevisiae*

Lorena López-Enríquez, Josefina Vila-Crespo, José Manuel Rodríguez-Nogales, Encarnación Fernández-Fernández and Violeta Ruipérez

#### Abstract

Two strains of *Saccharomyces cerevisiae* (Sc01 and Sc02) and one strain of *Wickerhamomyces anomalus* (Wa) were isolated from organic Verdejo spontaneous fermentations and used for the development of experimental winemaking. Sc01 and Sc02 represented 52.7% of the population of the *Saccharomyces* strains isolated throughout the fermentation process. *W. anomalus* appeared as the predominant species among the non-*Saccharomyces* yeasts. Wa turned out to be the strain of this species with the shortest lag phase and positive enzymatic activities, and it was selected for white wine production. Fermentations with unique inoculation of *S. cerevisiae* strains were compared with sequential inoculation with *W. anomalus*. The results showed that the sequential inoculations did not affect the fermentation kinetics or physicochemical characteristics of the wines compared with the unique inoculations. However, this study identified a significant impact on the aromatic profiles of the produced wines due to the sequential inoculations. This modification resulted in a similar new aromatic profile in both sequential inoculations, demonstrating common characteristics related to the contribution of *W. anomalus*. In general, the sequential fermentations were mainly characterized by lower levels of acetate esters and an increase in ethyl acetate levels, whereas lower levels of ethyl octanoate and ethyl dec-9-enoate were detected. Propan-1-ol and butan-1-ol showed an increase in the sequential fermentations, while 4-methylpentan-1-ol and 2-phenylethanol were found in lower concentrations. These results highlight the great influence that the presence of specific strains of native non-*Saccharomyces* yeasts exerts on the characteristics of elaborate wines.

**Keywords:** indigenous yeasts; sequential inoculation; non-*Saccharomyces*; aromatic profile; wine quality; Verdejo wine.

<https://doi.org/10.3390/fermentation9110977>

*Fermentation* **2023**

Volume 9, Issue 11, 977





# **IV-CONCLUSIONES**

---



# IV-CONCLUSIONES

El trabajo de investigación realizado ha permitido alcanzar las conclusiones que se detallan a continuación:

- El estudio molecular de los aislados de las especies no-*Saccharomyces* y *Saccharomyces cerevisiae* demuestra una elevada diversidad genética inter e intraespecie, en las vinificaciones realizadas a partir de uva ecológica de la variedad Verdejo de la D.O. Rueda.
- El estudio de biogeografía microbiana de las poblaciones de levaduras no-*Saccharomyces* y *S. cerevisiae* refleja una distribución geográfica y temporal propia de cada viñedo y añada consideradas.
- La evolución de las poblaciones de levaduras no-*Saccharomyces* y *S. cerevisiae* a lo largo del proceso de fermentación espontánea muestra una compleja progresión secuencial, con un descenso acusado de la diversidad en la etapa de fermentación tumultuosa asociado a la dominancia de grupos genéticos concretos.
- Los grupos genéticos Sc01 y Sc02 de la especie *S. cerevisiae* se revelan como dominantes, independientemente de la parcela o de la añada estudiadas.
- La especie *Wickerhamomyces anomalus* presenta una amplia distribución en las parcelas, añadas y etapas de fermentación analizadas.
- Los grupos genéticos identificados manifiestan una importante variedad de perfiles enzimáticos, relacionados con actividades relevantes desde un punto de vista enológico. Las actividades  $\beta$ -lialasa y proteasa se encuentran ampliamente distribuidas tanto en el conjunto de aislados de la especie *S. cerevisiae* como de las especies no-*Saccharomyces*. La actividad  $\beta$ -glucosidasa solo se relaciona con las especies no-*Saccharomyces* analizadas.
- El desarrollo de fermentaciones mixtas con las cepas nativas seleccionadas *W. anomalus* / *S. cerevisiae* Sc01 y *W. anomalus* / *S. cerevisiae* Sc02 demuestra un perfil aromático característico asociado a la presencia de *W. anomalus*, evidenciando la influencia de la microbiota nativa en las características del producto final.
- Las cepas nativas seleccionadas muestran una buena adaptación a las condiciones de fermentación, reflejada en los altos valores de implantación obtenidos, tanto en la inoculación única con *S. cerevisiae* como en las fermentaciones mixtas.
- Los perfiles aromáticos relacionados con la presencia de *W. anomalus* se distinguen por bajos niveles de ésteres de acetato y por el descenso de las concentraciones de octanoato de etilo, decanoato de etilo y de los alcoholes superiores 2-feniletanol y 4-metilpentan-1-ol; junto con

el aumento de los niveles de acetato de etilo y de los alcoholes superiores propan-1-ol y butan-1-ol.

Los resultados obtenidos en este trabajo abren nuevas líneas de investigación enfocadas en el estudio de la funcionalidad de las especies de levaduras vínicas en los ecosistemas microbianos naturales. Asimismo, en el análisis de las interrelaciones entre estas especies involucradas en los procesos de fermentación y todos los factores que afectan la biodiversidad microbiana. Entre estos factores, se destaca la importancia del sistema de manejo del viñedo y las técnicas de elaboración empleadas en la bodega

