

INFORME FINAL

Explotación do potencial de garda dun terroir histórico do Ribeiro con cultivo sustentable do viñedo

FEADER 2022/009A



Noviembre, 2024

FINALIDADE DO PROXECTO

A finalidade do proxecto “Explotación do potencial de garda dun terroir histórico do Ribeiro con cultivo sustentable do viñedo” foi utilizar os recursos varietais e microbianos propios da Granxa D’Outeiro para elaborar un viño de garda diferenciado de forte personalidade.

OBXECTIVOS DO PROXECTO

O obxectivo xeral deste proxecto foi elaborar un viño de garda diferenciado de forte personalidade no que destaquen a súa composición varietal e as achegas do terroir microbiano tanto na elaboración como na crianza posterior do viño. Para iso, tomamos vantaxe dos recursos varietais e microbianos propios da Granxa do Outeiro

Con ese fin propuxéronse os obxectivos específicos que se indican a continuación:

1. Caracterizar o potencial enolóxico de distintas variedades de uva e lévedos asociados.
2. Definir mesturas adecuadas para vela súa evolución nun proceso de crianza sobre lías
3. Avaliar a influencia do tipo de depósito para a crianza sobre lías finas sobre as características do viño. Estudaranse depósitos de distintos tipos de madeira e volume e depósitos inox.
4. Establecer un protocolo para a elaboración dun viño de garda propio (Granxa D’Outeiro)
5. Presentar o produto e dar a coñecer os resultados de interese para o seu aproveitamento polo sector e pola comunidade científica

RESULTADOS

1. Caracterizar o potencial enolóxico de distintas variedades de uva e lévedos asociados.

A) Caracterización del microbioma del suelo para definir el terroir microbiano de la finca de Granxa D’Outeiro

Para la caracterización del microbioma del suelo del viñedo de la finca de Granxa D’Outeiro se recogieron muestras de suelo en invierno (08 febrero 2023) y en verano (31 agosto 2023). Se recogieron 7 muestras en cada estación. Para cada una de las muestras se consideraron las zonas de las distintas variedades (Figura 1). De cada zona/variedad se recogieron entre 5 y 9 submuestras que se mezclaron para tener una muestra final compuesta que se envió a analizar a la empresa Biome Makers. Las muestras se tomaron en la capa superficial del suelo (aprox. 5 cm) en la línea de cepas a 40 cm de la cepa, previa retirada de la vegetación.



Figura 1. Esquema del viñedo de Granxa D'Outeiro especificando las variedades de uva plantadas en cada zona.

Los **resultados** mostraron diferencias en la población tanto de hongos como de bacterias en las distintas zonas de la explotación. En el caso de la comunidad de **bacterias** se separan (mediante análisis PCA): 1. La muestra de Moscatel de verano en el primer cuadrante; 2. Las muestras de suelo donde está el Caíño Blanco en el segundo cuadrante; 3. las muestras de suelo donde está cultivada la Treixadura y Godello en el tercer cuadrante, y 4. Las muestras de suelo donde están Loureira, Lado y Albariño se ubican en la parte positiva del PC2 las muestras de verano (V) y en la parte negativa las muestras de invierno (I) (Figura 2). Se observaron diferencias significativas entre las muestras de verano y de invierno en general ($p_{\text{ANOSIM}}=0.028$; $R=0.208$), pero no entre las muestras de cada variedad. Todas las muestras de invierno estaban localizadas en la parte negativa del PC2, excepto la recogida en la parte de suelo donde está plantada la variedad Caíño blanco. Las bacterias que contribuyeron en mayor medida esta diferenciación fueron *Udaeobacter sp.*, *Bradyrhizobium sp.*, *Rhodoplanes sp.*, *Pseudarthrobacter oxydans*, *Nocardioides sp.* y *Novibacillus thermophilus* que presentaron en mayor abundancia en las muestras de la parte positiva del PC2 donde se localizan las muestras de CB, y las de verano de LADO, ALB, MOS y LOU. En la parte negativa del PC2 están localizadas la mayoría de las muestras de suelo recogidas en invierno y destaca la abundancia de *Nitrosocosmicus sp.*, *Sphingomonas sp.*, *Bradyrhizobium japonicum*, o *Pseudarthrobacter*

polychromogenes. Otras bacterias abundantes en todos los suelos de Granxa D'Outeiro son *Conexibacter sp.*, *Solibacter sp.*, *Nitrosocosmicus oleophilus*, *Bacillus megaterium* y *Bacillus sp.*

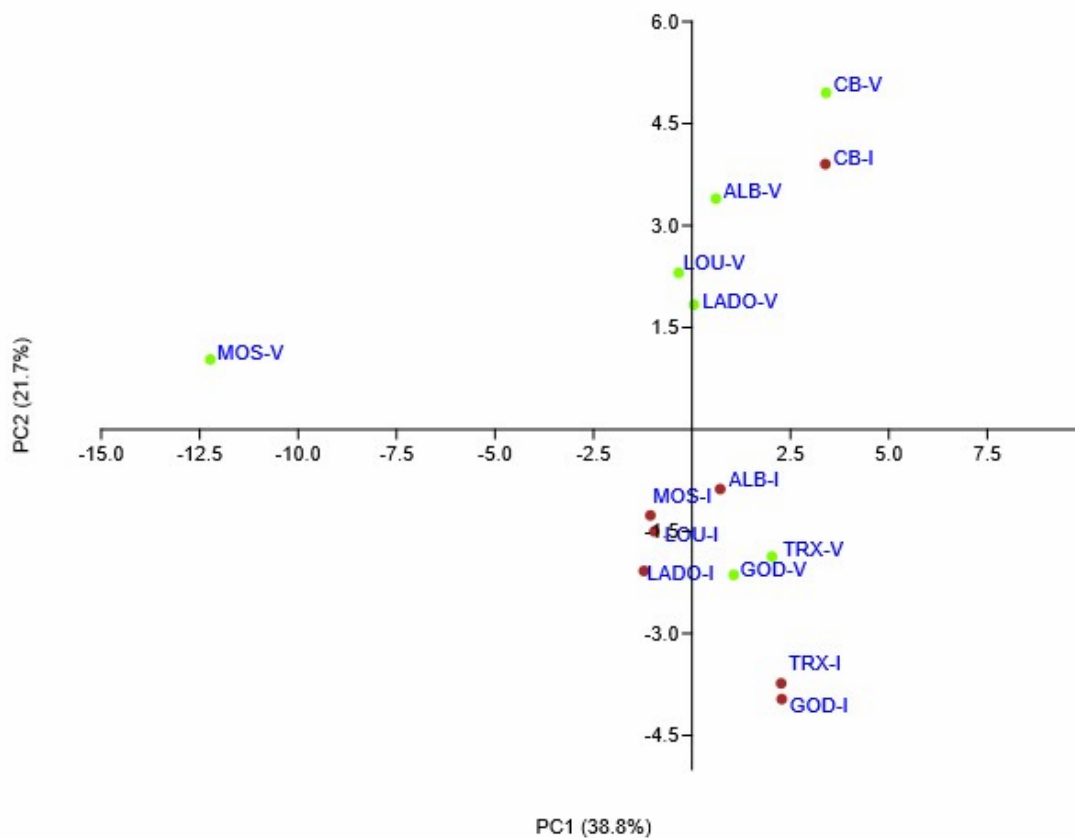


Figura 2. Distribución de las muestras de suelo en base a la población de bacterias.

En el caso de la **población de hongos** se separan (mediante PCA): 1. En zona central de la gráfica y en el primer cuadrante las muestras de suelo donde se ubican el Lado, Moscatel, Loureira y Albariño; 2. Las muestras de suelo donde está el Caíño Blanco en el segundo cuadrante; y 3. las muestras de suelo donde está cultivada la Treixadura y Godello en el tercer cuadrante (Figura 3). En general no se observaron diferencias significativas entre las muestras de verano y de invierno en general ($p_{\text{ANOSIM}}=0.264$; $R=0.043$), ni entre las variedades. Los hongos que contribuyeron en mayor medida esta diferenciación fueron *Curvularia trifolii*, *Mortierella rishikeshia*, *Umbelopsis vinacea*, *Alternaria eichhorniae*, *Solicoccozyma terrea*, *Penicillium simplicissimum*, *Lycoperdon pratense*, *Hormonema viticola*, *Humicola olivacea* y *Mortierella sp.*

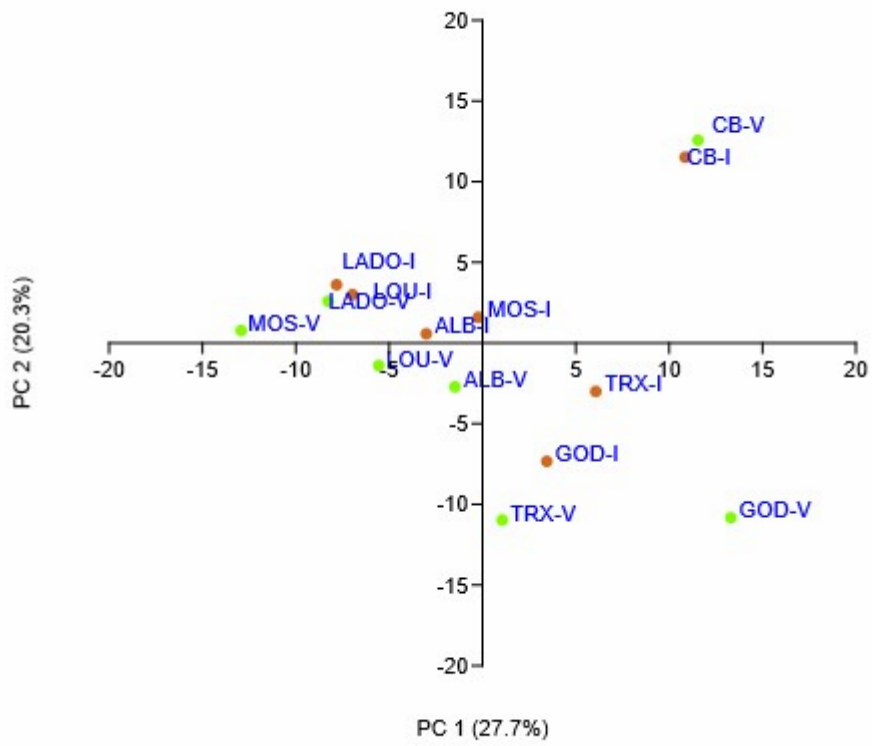


Figura 3. Distribución de las muestras de suelo en base a la población de hongos

B. Potencial enológico de las distintas variedades de uva

En cada campaña (2022 y 2023) se vinificaron por separado las distintas variedades, o en algunos casos se utilizaron mezclas de variedades. En la campaña de 2022 las fermentaciones se realizaron en la bodega experimental de la Evega con mosto de cada una de las variedades. En la campaña de 2023 ya estaba disponible la bodega de nueva construcción en la finca de Granxa D’Outeiro, por lo tanto, se vinificó en ella. Las fermentaciones realizadas en 2023 en la bodega de Granxa D’Outeiro incluyendo la variedad de uva, características del mosto y código se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Fermentaciones realizadas en 2023 en la bodega de Granxa D’Outeiro

Código	Variedad de Uva	Características del mosto		
		Acidez Total (g tartaric acid/L)	GAP* (% vol)	NFA ** (mg/mL)
G+T	Godello + Treixadura	5.8	12.5	
L+T	Loureira + Treixadura	5.2	12.9	188
CB+T	Caíño Branco + Treixadura	4.6	12.9	241
ALB	Albariño	5.9	13.4	193
TRX	Treixadura	4.5	12.4	250
LD	Lado	5.5	13.5	288
M+T	Moscatel + Torrontés	4.6	11.5	185
LOU	Loureira	6.6	12.8	
CB	Caíño blanco	6.9	13.2	177

*GAP: grado alcohólico probable; **NFA: Nitrógeno fácilmente asimilable

La fermentación se llevó a cabo a 17 °C de forma espontánea con las levaduras propias del mosto (sin adición de levaduras comerciales), y el proceso se controló mediante medida de la densidad y temperatura cada 12 h. Durante la fermentación se añadió bentonita y nutriente en distintas fases. Al inicio de la fermentación se añadió fosfato diamónico. Sobre densidad 1070 se añade Actimax Natura, un activador de fermentación. Sobre densidad 1050 se añadió bentonita (60g/hL). A densidad 1000 se hace un trasiego y se añade Actimax Vit (20g/hL). Al finalizar la fermentación se procede al descube y se añade Sulphur 6 (60mg/L).

Para el análisis químico de los vinos se utilizaron los métodos oficiales (OIV, 2022). En la Tabla 2 se muestran los resultados de la composición química básica de los vinos obtenidos en 2022.

Tabla 2. Características químicas básicas de los vinos elaborados en 2022

Vinos campaña 2022	GODELLO	TORRONTÉS	TREIXADURA	LADO	LOUREIRA	ALBARIÑO
Acidez total (g tart/L)	4,9	5,5	4,2	5	5,2	4,9
Acidez volátil (g acético/L)	0,44	0,19	0,31	0,27	0,29	0,29
Ácido Láctico (g/L)	0,3	0,1	0,5	0,4	0,3	0,5
Ácido Málico (g/L)	1,2	1,1	1,7	2,2	1,7	1,8
Ácido tartárico (g/L)	2,8	4,1	2,2	2,4	3,1	3
Azúcar (G+F) (g/L)	2,5	0,3	1,4	1,2	0,8	1,9
SO ₂ libre (mg/L)	47	38	26	27	32	37
SO ₂ total (mg/L)	113	100	91	93	91	107
Glicerol (g/L)	5,2	4,1	4,8	4,8	4,3	4,3

Grado Alcohólico (% vol)	13,1	11,2	13,7	14,2	13	13,1
pH	3,36	3,05	3,74	3,61	3,38	3,7

En la Tabla 3 se muestran los resultados de la composición química básica de los vinos obtenidos en 2023.

Parametro /vino	LGT*	L+T	CB+T	ALB	LD	M+T	LOU	CB
Acidez total (g tart/L)	4,6	5,1	5,2	5,9	4,9	4,6	5,7	7,0
Acidez volátil (g acético/L)	0,38	0,4	0,45	0,45	0,36	0,26	0,28	0,47
Ácido Láctico (g/L)	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2	0,3	<0,1	<0,1
Ácido Málico (g/L)	2,2	1,9	2	2,3	2,5	2	1,6	2,5
Ácido tartárico (g/L)	1,6	2,0	1,8	2,3	1,3	1,5	2,6	2,6
pH (-)	3,60	3,55	3,52	3,53	3,58	3,47	3,20	3,22
Azúcar (G+F) (g/L)	0,9	4,8	7,1	6,7	0,8	0,4	4	14,5
Glicerol (g/L)	4,3	4,4	4,5	4,7	4,4	4,7	4,4	4,9
Grado Alcohólico (% vol)	13,5	13,4	13,0	13,9	14,2	12,4	12,8	12,6
SO ₂ libre (mg/L)	24	22	27	23	<10	<10	18	11
SO ₂ total (mg/L)	115	122	128	126	42	56	63	68

Tabla 3. Características químicas básicas de los vinos elaborados en 2023

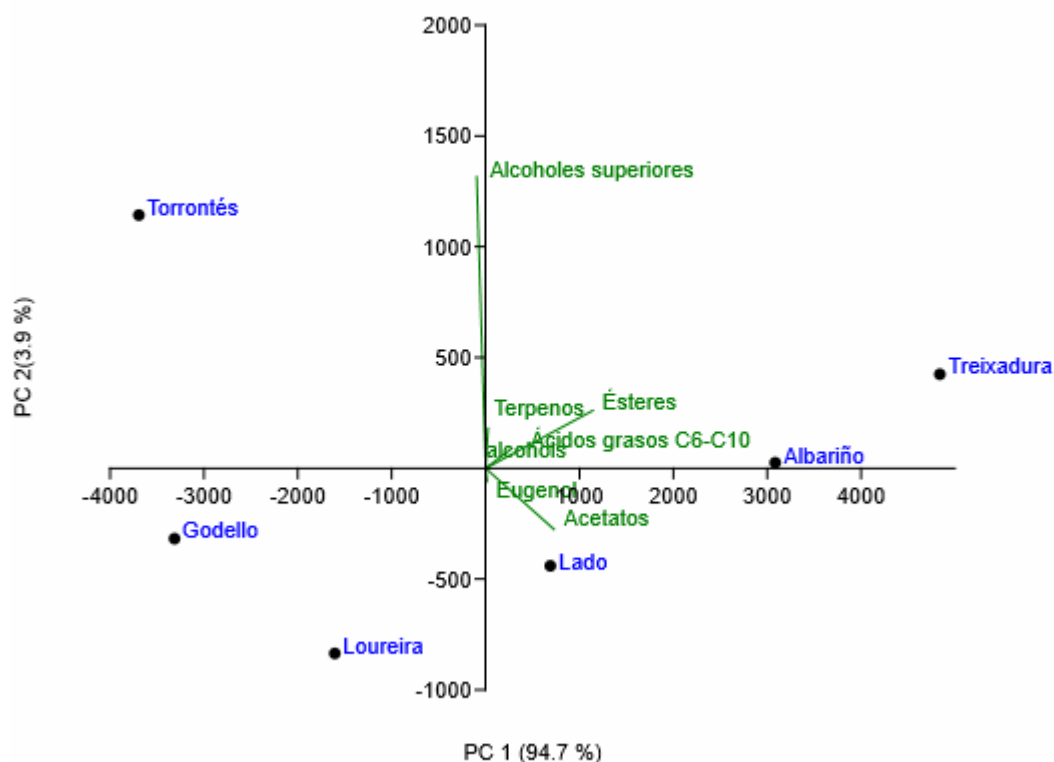
*LGT=mezcla G+T +LD

Caíño blanco destacó por su acidez y también Loureira y Albariño en 2023; el mayor grado se obtuvo con la variedad Lado en las dos anualidades. En las fermentaciones de 2023 algunos vinos aún tenían azúcares residuales.

El análisis de los perfiles aromáticos se llevó a cabo mediante cromatografía de gases con detector de masas CG-MS. En ambas anualidades en el análisis de componentes principales se diferenciaban claramente los vinos elaborados con las distintas variedades (Figura 4 y Figura 5)

En 2022 los vinos de Treixadura y Albariño presentaron una mayor concentración de acetatos, ésteres y ácidos grasos (Figura 4). El vino de la variedad Torrontés tenía un mayor contenido de alcoholes superiores, mientras que los vinos de Loureira destacaron por la presencia de compuestos terpénicos (particularmente el linalool) y eugenol. Los vinos de las variedades Lado y Torrontés presentaron un menor contenido de compuestos volátiles que los obtenidos con las otras variedades.

Figura 4. PCA de los vinos elaborados en 2022 con las distintas variedades de uvas cultivadas en



Graxa D’Outeiro según su composición aromática.

En la campaña de 2023 se confirmó en efecto varietal en los vinos. Así, los vinos elaborados con Treixadura se agruparon en la parte positiva del PC1 (Figura 5). Cada vino monovarietal se localizó en un cuadrante diferente. El Albariño se ubicó en el primer cuadrante caracterizado por un alto contenido de acetatos, ésteres y ácidos. El Lado se ubicó en el segundo cuadrante debido a su contenido de isobutanol y gamma-butirolactona. El vino elaborado con Caíño blanco no destacó por ningún compuesto volátil y apareció en el tercer cuadrante. Finalmente, el vino Loureira, el más aromático, se ubicó en el cuarto cuadrante caracterizado por el mayor contenido de 2-feniletanol, linalol, alcohol isoamílico y lactato de etilo.

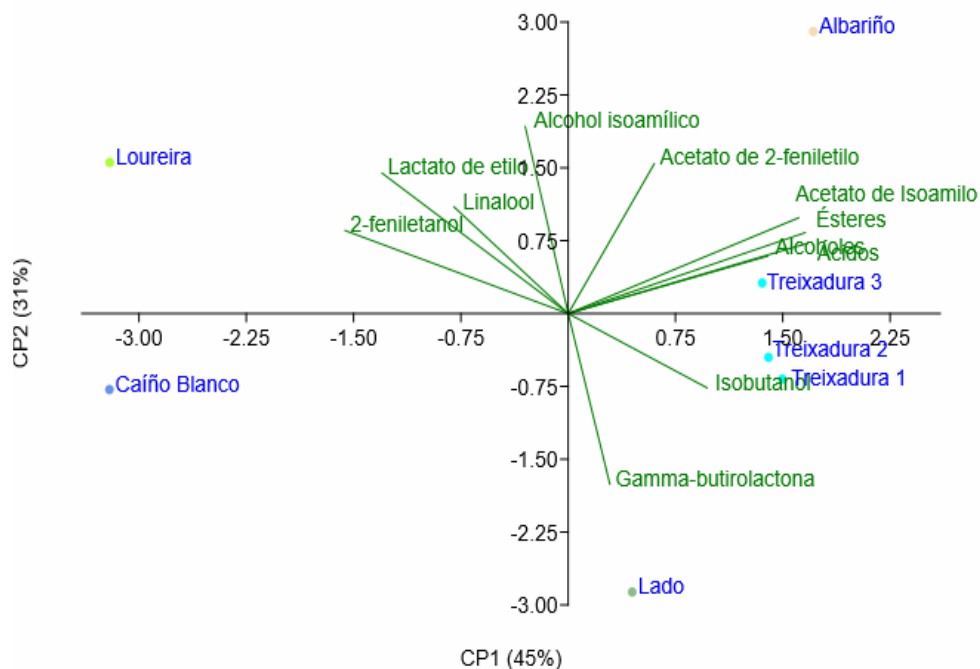


Figura 5. PCA de los vinos elaborados en 2023 con las distintas variedades de uvas cultivadas en Granxa D’Outeiro según su composición aromática.

C. Aislamiento y selección de levaduras propias

En la campaña de 2022 las fermentaciones se realizaron en la bodega experimental de la Evega. En la campaña de 2023 ya estaba disponible la bodega de nueva construcción en la finca de Granxa D’Outeiro, por lo tanto, se vinificó en ella. Presentamos los datos de esta última campaña, ya que serían estas levaduras las propias de la plantación.

METODOLOGÍA

Se llevó a cabo fermentación espontánea (sin adición de levaduras comerciales) con las levaduras propias del viñedo y/o de la bodega. A partir de mosto y durante las distintas etapas de la fermentación (inicio, tumultuosa y final) se aislaron levaduras para su caracterización. Primero se sembraron en medio Lysine Agar para diferenciación en levaduras tipo *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*. Estas últimas se caracterizaron a nivel de cepa mediante mtDNA-RFLP (Querol y col., 2022)

Para evaluar el potencial enológico de las distintas cepas de *S. cerevisiae* identificadas se llevaron a cabo ensayos de microvinificación, por duplicado, utilizando mosto de la variedad Treixadura congelado durante la vendimia. Las características químicas del mosto eran: grado alcohólico probable 11.8 % v/v, pH 3.59 y 37 mg/L de SO₂ total. Las fermentaciones se realizaron en botellas de 1 L con 900 mL de mosto. De cada cepa se preparó un inóculo, se añadió a una concentración de 1×10^6 cel/mL a las botellas correspondientes y se dejó fermentar a 18 °C en una cámara refrigerada. La

evolución de las fermentaciones se siguió mediante medida diaria del grado Brix. Una vez finalizado el proceso (repetición del grado Brix durante 3 días), los vinos se centrifugaron, se sulfitaron (25 mg/L SO₂ libre) y se guardaron para análisis químicos.

Para la valoración de las distintas cepas de *S. cerevisiae* se tuvieron en cuenta diversos criterios incluidos en la Resolución OIV-OENO 370-2012. Además, se evaluó la actividad killer de las cepas según el método descrito por Maqueda et al., (2012) y la producción de H₂S en medio Nickerson Agar (BiGGY agar). Finalmente, para seleccionar aquellas cepas con propiedades enológicas deseables para su uso en la bodega, se puntuaron de 1 a 5 los resultados de los distintos parámetros por rangos según se especifica en la Tabla 4. Además, se consideraron la actividad killer y la producción de H₂S aunque no se sumaron para la puntuación final de cada cepa.

Tabla 4. Puntuación establecida por rango de los diferentes parámetros utilizados en la selección de cepas de *S. cerevisiae*.

Parámetro	Puntuación				
	5	4	3	2	1
Acidez total (g tart/L)	5,6-5,2	5,2-4,8	4,8-4,4	4,4-4,0	4,0-3,6
Acidez volátil (g acético/L)	0,2-0,3	0,3-0,4	0,4-0,5	0,5-0,6	>0,6
Glucosa + Fructosa (g/L)	0,2-1,0	1,0-2,0	2,0-5,0	5,0-10,0	>10
Alcohol (% v/v)	>14	13,5-14	12,5-13,5	12-12,5	11,0-12
Glicerol (g/L)	>6	5,5-6,0	5,0-5,5	4,5-5,0	<4,5
Días de fermentación (Días)	22	23	24	25-26	29
Vigor fermentativo (g azúcar/día)	26,0-30,0	20,0-26,0	16,0-20,0	12,0-16,0	8,0-12,0

Diversidad de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* en la bodega de Granxa D'Outeiro

De un total de 473 colonias aisladas de *Saccharomyces cerevisiae* se identificaron 24 cepas diferentes denominadas A, B, ..., W. El número de aislados en cada fermentación, número de cepas encontradas y el índice de diversidad de Shannon (H) y la frecuencia de los perfiles más abundantes se incluyen en la Tabla 5.

Tabla 5. Diversidad de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* en las distintas fermentaciones

Fermentación	Número de aislados de <i>S. cerevisiae</i>	Número de cepas	H	Número de cepas y frecuencia		
				>25%	5-25%	<5%
G+T	54	9	0,95	1 (B)	1 (E)	7
L+T	52	8	1,19	1 (B)	2 (E,H)	5
CB+T	51	9	1,47	1 (B)	3 (D,E,H)	5
TRX	54	5	1,09	1 (B)	3 (C,D,H)	1
ALB	54	6	1,33	1 (B)	2 (D,E)	3
LD	49	13	2,07	1 (B)	3 (D,E,L)	9
M+T	53	11	1,90	1 (D)	4 (B,E,H,P)	6
LOU	53	6	1,01	1 (B)	2 (D,E)	3

CB	53	8	1,12	1 (B)	2 (C,H)	5
Total	473	24	1,71	1(B)	3 (D,E,H)	20

La diversidad de cepas de *S. cerevisiae* varió entre 13 cepas (H=2.07) en la fermentación de Lado (LD) y 5 cepas (H=1.09) con Treixadura (TRX) (Tabla 5). La cepa B fue la levadura dominante en todas las fermentaciones excepto en la vinificación M+T, controlada por la cepa D. Las proporciones de la cepa B variaron entre 29% y 80%. Las cepas D, E y H alcanzaron frecuencias entre 5 and 25%. La cepa L aparecía con una frecuencia <10% in la fermentación LD mientras que la proporción de la cepa C era > 7% en los ensayos de TRX y CB. La presencia de las demás cepas era anecdótica (< 5%); sin embargo, estas levaduras pueden poseer propiedades enológicas de interés. En la Figura 6 se muestra la frecuencia acumulada de las cepas de *S. cerevisiae* para cada fermentación. La cepa B era la levadura dominante (frecuencia > 50%) en la mayoría de las fermentaciones, pero con LD and M+T aparecía en codominancia con otras cepas.

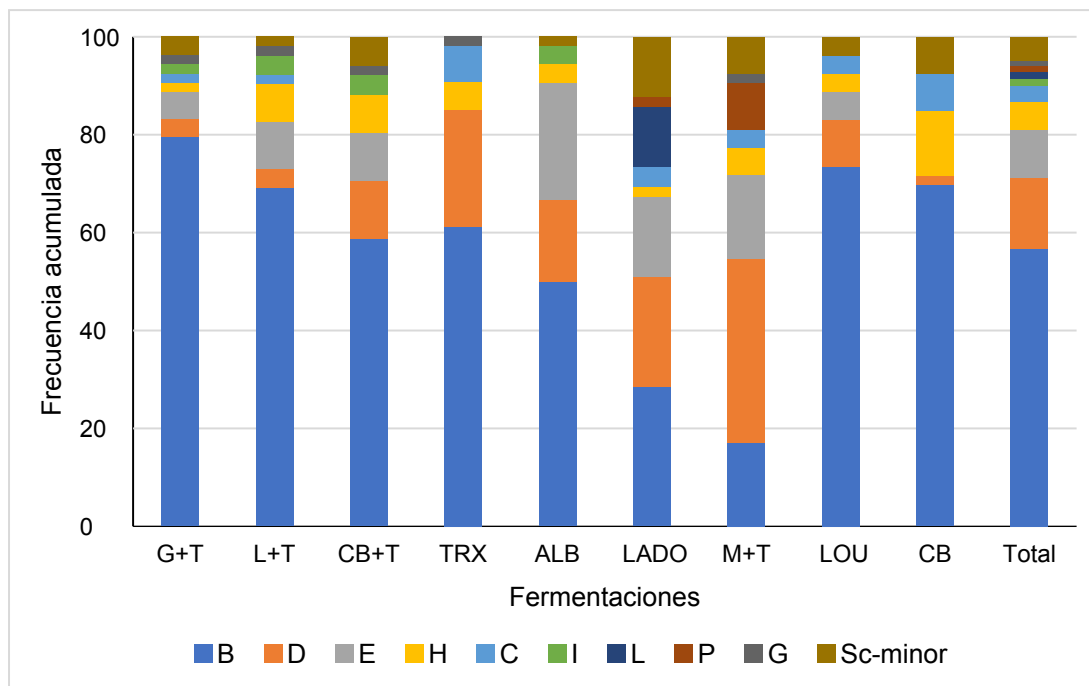


Figura 6. Frecuencia acumulada de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* aisladas de fermentaciones espontáneas en la bodega de Granxa D'Outeiro. Sc-minor: Σ frecuencias de cepas encontradas a < 5% en cada fermentación.

Potencial enológico de las cepas de *S. cerevisiae* de Granxa D'Outeiro

El estudio de la capacidad fermentativa de las distintas cepas de *S. cerevisiae* aisladas en Granxa D'Outeiro mostró diferencias entre ellas (Table 6). La duración de las fermentaciones estuvo entre 22 y 29 días; aunque algunas cepas no fueron capaces de completar el proceso, como indica la presencia de azúcares en los vinos resultantes. Acorde con esto, también variaba el vigor fermentativo, que osciló entre 8,6 y 29 g azúcar/día; siendo el consumo de azúcares > 35% en los tres primeros días de fermentación para algunas cepas. También se observaron diferencias significativas en la acidez total y volátil, así como en el grado y contenido en glicerol de los vinos obtenidos con las distintas cepas de levadura. Los valores de estos parámetros se puntuaron por

rangos como hemos indicado en la Tabla 4. La puntuación obtenida por las distintas cepas de *S. cerevisiae* se muestra en la Tabla 7. En cuanto a la actividad killer, la mayoría de las cepas producían esta toxina o eran neutras (Tabla 6); sólo la cepa J era sensible. Además, todas las cepas mostraron una moderada producción de H₂S. Teniendo en cuenta todos estos criterios alcanzaron la puntuación más elevada las cepas L, K, M y P (Tabla 7). Sorprendentemente, ninguna de estas cepas fue de las que encontramos como dominantes en las fermentaciones espontáneas de la bodega de Granxa D'Outeiro. Todas ellas fueron aisladas en la fermentación con la variedad Lado y presentaron una abundancia baja, excepto la cepa L que alcanzó hasta un 12%). La cepa P también aparecía en la fermentación M+T en una proporción del 10%.

Además de los parámetros incluidos en la Tabla 6, se cuantificaron los aromas fermentativos de los vinos elaborados con cada cepa. Los resultados de la concentración total de aromas y de las principales familias se representa en la Figura 7. En la gráfica podemos observar que las cepas B, C, Ñ y D son las que presentan una mayor concentración de aromas fermentativos, fundamentalmente debido a un contenido más alto de ésteres etílicos, compuestos que están relacionados con características sensoriales deseables en los vinos como notas afrutadas y florales. De esas levaduras, las cepas B y D fueron las levaduras predominantes en las fermentaciones de Granxa D'Outeiro. Sin embargo, precisamente con estas cepas no obtuvimos una buena puntuación en los ensayos de laboratorio. Por otra parte, los vinos resultantes de las cepas mejor puntuadas en laboratorio no presentaron un contenido de compuestos aromáticos tan elevado.

Tabla 6. Características químicas de los vinos elaborados con las distintas cepas de *S. cerevisiae* de Granxa D'Outeiro y otras propiedades tecnológicas

Cepas de <i>S. cerevisiae</i>	Acidez total (g tart/L)	Acidez volátil (g acético/L)	Glucosa + Fructosa (g/L)	Glicerol (g/L)	Alcohol (% v/v)	Días de fermentación	*Vigor Fermentativo (g azúcar / día)	Consumo de azúcar**	Rendimiento***	Fenotipo killer[§]	Producción de H₂S
A	4,4±0,0	0,50±0,03	5,0±0,1	4,8±0,3	12,8±0,1	26	14,9±0,8	21,4±1,0	15,8±0,2	K	3
B	4,7±0,1	0,57±0,01	10,9±1,8	4,9±0,8	12,2±0,4	26	13,9±2,7	20,3±3,3	15,9±0,1	K	3
C	4,1±0,0	0,42±0,06	3,1±1,8	3,9±0,1	11,9±0,2	25	9,9±9,7	15,7±15,5	15,6±0,2	K	3
D	3,6±0,0	0,23±0,02	0,5±0,1	3,8±0,1	12,1±0,1	23	18,7±1,7	29,7±3,1	15,6±0,0	K	2
E	4,1±0,0	0,36±0,02	1,5±0,3	4,8±0,1	11,7±0,0	22	19,6±4,6	31,6±7,4	15,8±0,0	N	3
F	4,8±0,1	0,55±0,11	1,0±1,1	5,6±0,3	11,5±0,1	22	21,9±5,9	35,8±9,2	15,8±0,2	N	2
G	4,5±0,0	0,74±0,10	1,4±0,1	5,2±0,1	11,2±0,0	22	18,0±0,5	30,8±0,6	15,6±0,1	N	3
H	4,3±0,1	0,40±0,03	0,8±0,0	5,0±0,3	11,2±0,0	22	17,9±0,8	30,4±1,4	15,7±0,1	K	2
I	4,2±0,1	0,28±0,01	1,8±0,1	5,8±0,1	13,7±0,1	26	17,6±0,3	23,8±0,3	16,0±0,0	K	3
J	4,8±0,2	0,80±0,10	3,3±1,7	5,5±0,2	13,8±0,1	29	23,0±6,8	30,6±8,7	16,0±0,2	S	3
K	5,0±0,1	0,20±0,00	0,4±0,1	5,5±0,3	14,5±0,1	26	29,0±1,1	37,7±0,6	15,8±0,4	K	3
L	5,6±0,0	0,20±0,00	0,4±0,0	5,4±0,1	14,5±0,0	24	29,0±0,6	37,4±0,3	16,0±0,2	K	2
M	5,1±0,3	0,32±0,01	0,6±0,3	5,3±0,0	12,9±0,6	22	25,0±1,7	36,2±0,9	15,9±0,1	K	3
N	4,4±0,3	0,46±0,01	1,6±0,3	5,2±0,3	12,1±1,0	23	21,5±5,4	33,3±5,5	15,8±0,1	N	3
Ñ	4,8±0,0	0,60±0,06	0,6±0,1	6,6±0,2	13,8±0,6	25	20,4±1,5	27,7±2,7	16,0±0,2	K	3
O	4,7±0,1	0,62±0,13	2,7±2,3	5,7±0,5	14,2±0,3	25	16,5±3,9	21,6±5,6	16,0±0,1	K	3
P	4,6±0,1	0,26±0,06	0,4±0,0	6,0±0,1	12,1±0,1	23	22,8±2,3	35,4±3,6	15,9±0,2	K	2

Q	4,7±0,0	0,22±0,00	2,2±0,3	5,2±0,1	12,1±0,1	25	8,6±2,1	13,4±3,3	15,8±0,2	K	1
R	4,3±0,2	0,43±0,01	0,2±0,0	5,1±0,2	11,4±0,2	23	13,8±1,9	24,9±3,3	14,5±0,4	K	2
S	4,4±0,0	0,56±0,01	8,3±1,3	4,2±0,1	12,2±0,1	29	11,3±0,5	16,9±0,8	15,6±0,2	K	3
T	4,6±0,3	0,55±0,11	9,4±8,4	4,6±0,1	13,5±0,5	29	12,6±2,6	16,8±3,5	15,9±0,0	K	3
U	4,6±0,0	0,54±0,01	3,7±3,9	5,4±0,6	13,9±0,1	29	13,5±4,0	18,1±5,3	15,8±0,3	N	3
V	4,6±0,2	0,66±0,02	2,3±0,6	5,8±0,6	13,0±0,7	23	18,0±4,8	25,8±5,3	15,8±0,2	N	2
W	4,7±0,0	0,51±0,19	1,9±2,5	5,4±0,1	12,8±0,1	25	22,5±7,0	32,9±10,2	15,8±0,2	N	3
Los datos son la media de dos repeticiones±SD. Se encontraron diferencias significativas para todos los parámetros a p<0.001											
* Vigor fermentativo (g azúcar/día) calculado al tercer día de fermentación											
**% de azúcar consumido después de 3 días de fermentación											
*** Rendimiento = gramos de azúcar requerido para producir un grado de alcohol											
§-K= actividad killer; N=neutra; S-sensible a la toxina killer											

Tabla 7. Puntuación obtenida por las cepas de *S. cerevisiae* para los distintos criterios de selección y puntuación total. Los criterios de selección fueron: Acidez total -TA; Acidez volátil -VA; Grado alcohólico-AC; Glicerol-Gly; Tiempo de fermentación-Ft and Vigor fermentativo-Fv.

Cepa de <i>S. cerevisiae</i>	TA	VA	G + F	AC	Gly	Ft	Fv	Puntuación
A	3	3	3	3	2	2	2	18
B	3	2	1	2	2	2	2	14
C	2	3	3	1	1	2	1	13
D	1	5	5	2	1	4	3	21
E	2	4	4	1	2	5	3	21
F	4	2	4	1	4	5	4	24
G	3	1	4	1	3	5	3	20
H	2	3	5	1	2	5	3	21
I	2	5	4	4	4	2	3	24
J	4	1	3	4	4	1	4	21
K	4	5	5	5	3	2	5	29
L	5	5	5	5	3	3	5	31
M	4	4	5	3	3	5	4	28
N	3	3	4	2	3	4	4	23
Ñ	4	2	5	4	5	2	4	26
O	3	1	3	5	4	2	3	21
P	3	5	5	2	5	4	4	28
Q	3	5	3	2	3	2	1	19
R	2	3	5	1	3	4	2	20
S	3	2	2	2	1	1	1	12
T	3	2	2	4	2	1	2	16
U	3	2	3	4	3	1	2	18
V	3	1	3	3	4	4	3	21
W	3	2	4	3	3	2	4	21

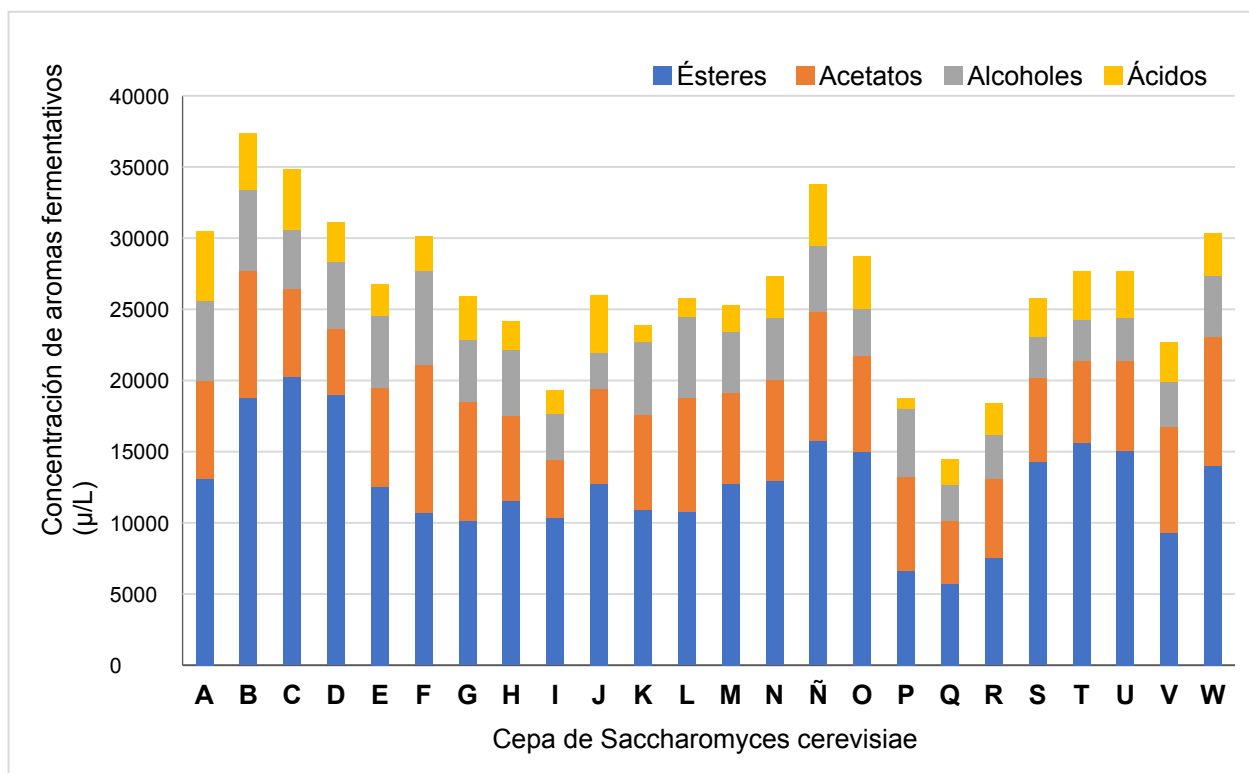


Figure 7. Concentración ($\mu\text{g/L}$) de las principales familias de aromas fermentativos en los vinos obtenidos con diferentes cepas de *S. cerevisiae* aisladas en la bodega de Granxa D’Outeiro.

Ensayo en bodega con las levaduras seleccionadas en la campaña de 2024

En base a estos resultados se prepararon inóculos de las cepas K y L para utilizar en la **campaña de 2024**.

Como en las campañas anteriores, la uva se vendimió de forma manual en cajas de 15 kg y se transportó a la bodega de la antes de 2h. En bodega la uva se procesó para obtención del mosto como se indica a continuación. La uva se despalilló y en la bomba de pasta se sulfitó con Sulfamol60 (24 mg SO_2/Kg uva), se añadió ácido tartárico (1g/Kg uva) y se transfirió a la prensa. En la bandeja de la prensa se sulfitó de nuevo (6 mg SO_2/Kg uva). El mosto se transfiere al depósito receptor para el desfangado estático durante 48 h a 13.4 °C y se añade enzima (Lysis VC 2 g/100L) y Phylia Cys 20g/100L. Tras 48 h se transfiere el mosto al depósito de fermentación.

Los mostos se inocularon con las cepas de *S. cerevisiae* K y L, y se utilizó como control una fermentación espontánea. Al inicio y al final de la fermentación se realizó un control microbiológico para evaluar la capacidad de implantación de las cepas añadidas. La fermentación se llevó a cabo a 17.5°C y el proceso se controló mediante medida de la densidad y temperatura cada 12 h. Durante la fermentación se añadió bentonita y nutriente en distintas fases. Al inicio de la fermentación se añadió fosfato diamónico. Sobre densidad 1070 se añade Actimax Natura, un activador de fermentación. Sobre densidad 1050 se añadió bentonita (60g/hL). A densidad 1000 se hace un trasiego y se añade Actimax Vit (20g/hL). Al finalizar la fermentación se procede al descube y se añade Sulphur 6 (60mg por

Los resultados mostraron que la cepa K no fue capaz de imponerse a las levaduras ya presentes en el mosto; sin embargo la cepa L si era la predominante en la fermentación donde fue añadida, y también era importante su presencia en el proceso espontáneo. Por lo tanto, esta levadura presenta

una buena adaptación e los mostos de Granxa D'Outeiro. La composición química básica de los vinos fue similar en los tres ensayos.

Aplicación de levaduras no-Saccharomyces y distintas variedades de uva para la diferenciación de los vinos

METODOLOGÍA

Para este objetivo se utilizó mosto de las variedades Lado y Albariño procedentes de la finca de Granxa D'Outeiro. Ambas son variedades de uva blanca tradicionales de Galicia. Lado es una variedad de uso minoritario, especialmente en la DOP Ribeiro. Albariño es una variedad blanca mayoritaria de Galicia. Las características del mosto se indican en la Tabla 8.

Las cepas de levaduras no-Saccharomyces utilizadas fueron *Metchnikowia fructicola* Mf278 (Colección de levaduras de Evega) y *Pichia kluyveri* Pk1 (Granxa D'Outeiro). Estas levaduras se añadieron como primer inóculo y la cepa *Saccharomyces cerevisiae* XG3 (Evega) como segundo inóculo. Los inóculos se prepararon como se indica en Blanco et al. (2013).

Los ensayos se realizaron por triplicado en depósitos de acero inoxidable de 5L en una cámara con temperatura controlada a 17°C, inoculando 1×10^8 cél/mL de la levadura No-Saccharomyces en los depósitos correspondientes (en el control de fermentación espontánea no se inoculó levadura). En las fermentaciones con levaduras no-Saccharomyces, una vez iniciada la fermentación se inoculó *S. cerevisiae* XG3 de forma secuencial. La evolución de las fermentaciones se siguió mediante la medida diaria de la densidad y la temperatura. Al inicio de la fermentación (Fi) y durante la fase tumultuosa (Ft) y final (Ff) se tomaron muestras para el control de implantación de las levaduras inoculadas. Una vez terminada la fermentación, los vinos se trasegaron y sulfitaron (50 mg/L), se estabilizaron por frío, y se embotellaron para posteriores análisis (químico y sensorial).

Para el control microbiológico las muestras de mosto y fermentación se diluyeron de forma adecuada y se sembraron en medio WL Nutrient Agar (Scharlau Microbiology). Las placas se incubaron a 28 °C hasta la aparición de colonias visibles, tras lo cual se procedió al recuento de levaduras y al aislamiento de un número representativo de colonias de cada muestra para su posterior identificación. Los aislados se crecieron en Lysine Medium (Oxoid) para su diferenciación en levaduras de tipo *Saccharomyces* y no-Saccharomyces. La identificación de las levaduras a nivel de especie se realizó mediante amplificación por PCR del gen 5.8S rRNA y dos espaciadores ribosomales internos (ITS) (Esteve-Zarzoso et al., 1999). Aquellos aislados identificados como *Saccharomyces* se caracterizaron a nivel de cepa mediante la técnica de análisis de los patrones de restricción del mtDNA (mtDNA-RFLPs) según el protocolo descrito por Querol et al. (1992).

Para el análisis del mosto y de los vinos se utilizaron los métodos oficiales (OIV, 2023). Se determinaron: grado alcohólico, azúcares reductores, acidez total, acidez volátil, pH, glicerol y sulfuroso libre y total. El análisis de los perfiles de aromas fermentativos se llevó a cabo mediante cromatografía de gases con detector de masas CG-MS. En la evaluación sensorial de los vinos participó un panel de 9 catadores con experiencia en vinos gallegos.

RESULTADOS

La **evolución de las fermentaciones** con Albariño y Lado se muestra en la **Figura 8**. Con la variedad Albariño la curva de los distintos ensayos era similar, aunque en los inoculados con las levaduras no-Saccharomyces el descenso rápido de la densidad en fase tumultuosa tenía lugar un día más tarde

(día 6). La fermentación espontánea y el control inoculado con *S. cerevisiae* mostraron una cinética muy parecida. La temperatura se mantuvo controlada a $17\pm 1^\circ\text{C}$ durante todo el proceso. La fermentación con la variedad Lado fue más irregular y se observó una ralentización del proceso sobre el día 7.

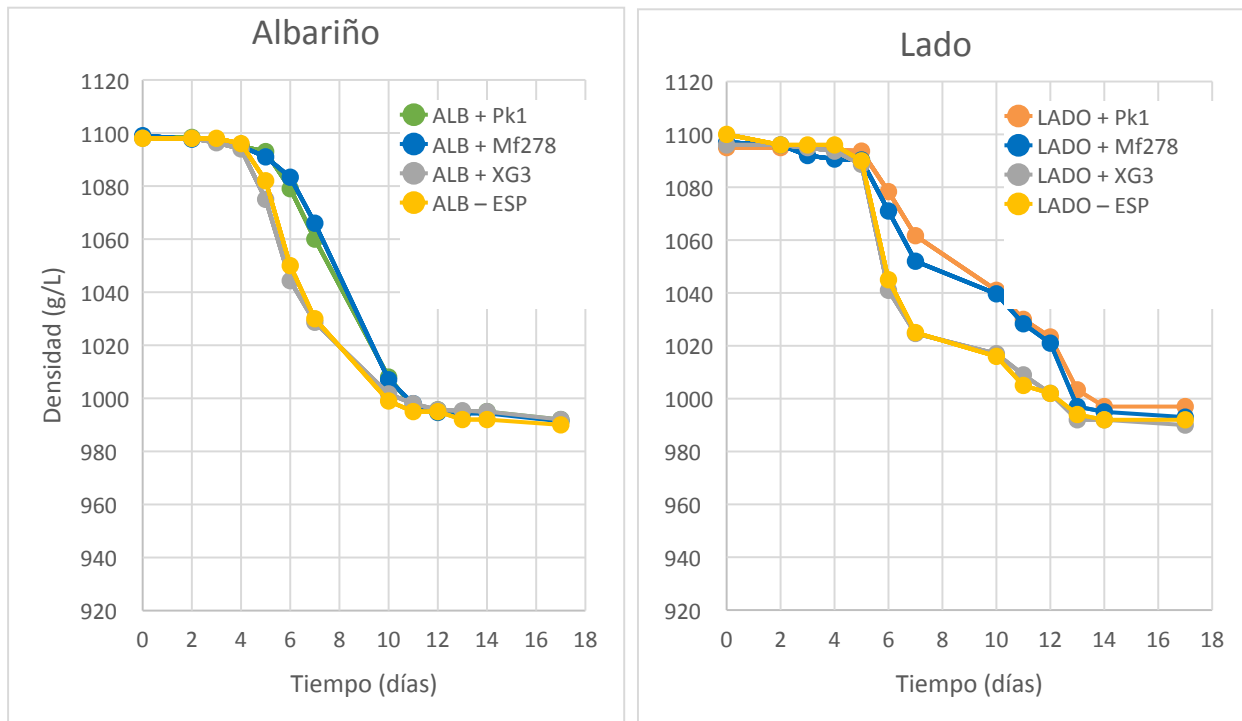


Figura 8. Evolución de las fermentaciones de Albariño y Lado inoculadas con distintas especies de levaduras.

El **seguimiento microbiológico** de las fermentaciones mostró que el mosto desfogado de Albariño y Lado contenía $9,2 \times 10^2$ y $3,3 \times 10^2$ cél/mL respectivamente, una cantidad bastante baja de levaduras. Este dato podría explicar porque incluso la fermentación inoculada tardó hasta 4 días en arrancar. En las fermentaciones con Albariño al inicio de fermentación la población había alcanzado $2,0 \times 10^7$, aumentó hasta $1,0 \times 10^8$ en fase tumultuosa para disminuir de nuevo hasta $4,0 \times 10^7$ cél/mL hacia el final. Con la variedad Lado la población media en las fermentaciones era de $2,7 \times 10^7$ en la fase inicial, aumentó hasta $5,7 \times 10^7$ en fase tumultuosa y descendía al final de fermentación hasta $3,3 \times 10^7$ cél/mL. A nivel cualitativo, *P. kluyveri* 1 y *M. fructicola* 278 eran las levaduras dominantes en la fase inicial de las fermentaciones donde fueron inoculadas. Como se esperaba, al añadir el segundo inóculo su presencia disminuyó de forma drástica. Así, en las fases tumultuosa y final fue *S. cerevisiae* la levadura predominante. En las fermentaciones monocultivo con XG3 esta cepa actuó en codominancia con otras *S. cerevisiae*. Sin embargo, cuando esta cepa se añadió como segundo inóculo no fue capaz de dominar sobre las levaduras presentes ya en el mosto, como se muestra en la Figura 9. En las fermentaciones con Albariño predominaron las cepas H, I y B; XG3 aparecía con una frecuencia $<10\%$. Con la variedad Lado las cepas mayoritarias fueron diferentes: B y C; XG3 estaba presente por encima del 20% en las fermentaciones con Mf278 y por encima del 10% en el caso de las vinificaciones con Pk1.

Figura 9. Presencia de diferentes cepas de *S. cerevisiae* en las fermentaciones de A) Albariño y B) Lado. Las letras A hasta P indican diferentes cepas de *S. cerevisiae*.

El **análisis químico básico** de los vinos Albariño mostró diferencias significativas entre las distintas levaduras en el contenido de azúcar (más elevado en las fermentaciones con XG3), acidez volátil (menor en los vinos de Mf278) y glicerol (mayor en los vinos de Mf278) (Tabla 1). El grado alcohólico era más elevado en la fermentación espontánea y las inoculadas con Pk1 y *S. cerevisiae* que en la llevada a cabo con MF278, aunque las diferencias no eran significativas. Con los vinos de la variedad Lado se observó la misma tendencia en la acidez volátil y glicerol con la levadura Mf278 (Tabla 1). Sin embargo, es este caso fue el vino fermentado con Pk1 el que quedó con azúcares sin fermentar.

Tabla 8. Características de los vinos obtenidos de la fermentación con distintas levaduras de mosto Albariño y Lado.

Variedad y parámetro	Mosto	Mf278	Pk1	XG3	ESP
ALBARIÑO					
Grado Alcohólico/probable (%vol)	13.4	12.5±0.6	12.9±0.7	12.7±0.4	13.5
Glucosa + Fructosa (g/L)/Brix*	22.9	0.2±0.0 ^a	1.6±0.6 ^a	3.3±1.4 ^b	0.3
Acidez Total (g tart/L)	5.9	5.6±0.1	5.5±0.1	5.7±0.1	5.8
Acidez Volátil (g acético/L)*		0.28±0.01 ^a	0.35±0.06 ^b	0.39±0.06 ^b	0.27
pH (-)	3.47	3.49±0.01	3.52±0.02	3.52±0.01	3.52
Glicerol (g/L)*		6.6±0.3 ^b	5.7±0.2 ^a	6.2±0.1 ^a	5.9
LADO					
Grado Alcohólico/probable (%vol)	13.3	13.3±0.6	12.9±0.4	13.1±0.6	13.4
Glucosa + Fructosa (g/L)/Brix *	22.8	2.7±0.8 ^a	7.9±2.6 ^b	0.8±0.3 ^a	3.2
Acidez Total (g tart/L)	6.0	6.1±0.1	6.1±0.2	6.2±0.0	6.3
Acidez Volátil (g acético/L) *		0.39±0.02 ^a	0.46±0.03 ^b	0.45±0.01 ^{ab}	0.34
pH (-)	3.47	3.46±0.00	3.44±0.02	3.45±0.00	3.43
Glicerol (g/L) *		6.7±0.1 ^b	5.7±0.2 ^a	5.7±0.2 ^a	5.6

*Los datos son la media de tres repeticiones ± SD (excepto la fermentación ESP). Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas para ese parámetro entre los vinos elaborados con las distintas levaduras y esa variedad.

El **perfil de aromas fermentativos** de los vinos permitió diferenciar entre los vinos elaborados mediante fermentación secuencial con las levaduras no-*Saccharomyces* de los inoculados solo con *S. cerevisiae*. En la Figura 10 se muestra el resultado del análisis de componentes principales de los vinos de Albariño y Lado teniendo en cuenta los compuestos que presentaron diferencias significativas entre los ensayos. Con ambas variedades los vinos inoculados con XG3 y la fermentación espontánea se localizaron en la parte izquierda del componente 1 caracterizados por un mayor contenido de hexanol y 2-feniletanol. Los vinos Albariño de Mf278 y Pk1 se agruparon en el tercer cuadrante y presentaban un mayor contenido de ácidos, acetatos y ésteres. Con la variedad Lado se separaban además los vinos elaborados con Mf278 (segundo cuadrante) de los obtenidos con Pk1 (tercer cuadrante). En este sentido los vinos de Mf278 se caracterizaban por su contenido de 2-feniletanol, acetato de etilo y butirato de etilo mientras que en los vinos de Pk1 destacaban por una mayor concentración de ésteres, ácidos y acetato de 2-feniletilo.

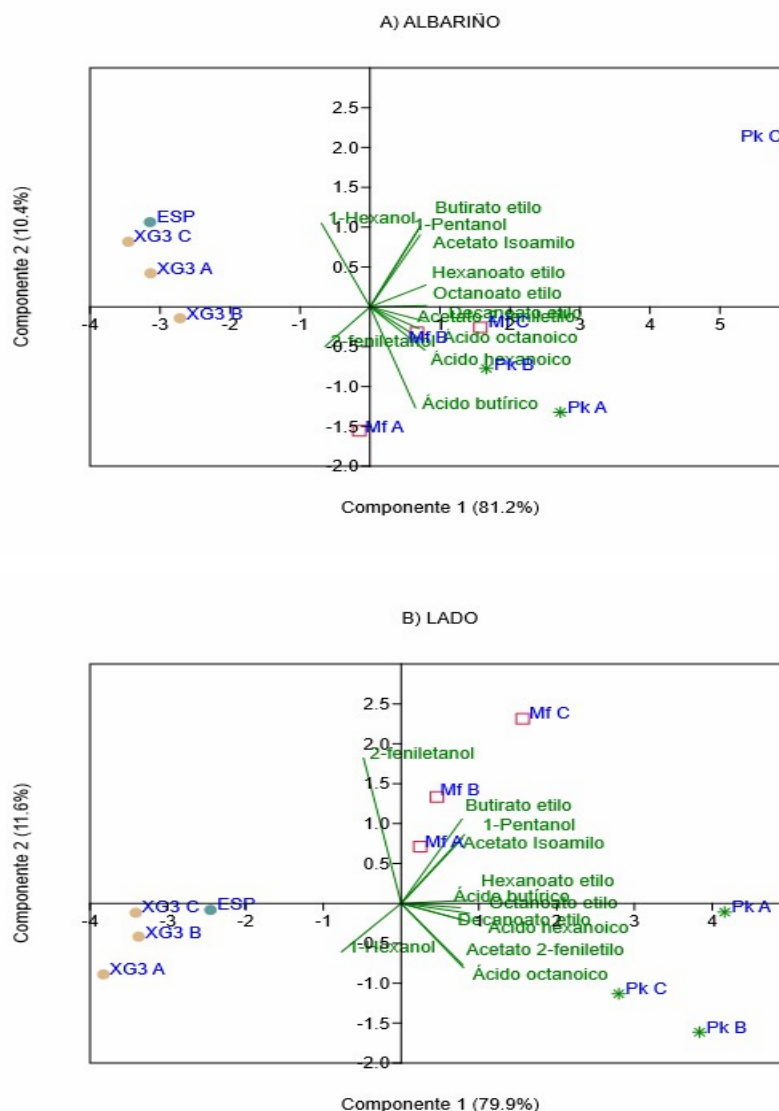


Figura 10. Análisis de componentes principales de los vinos de Albariño y Lado elaborados con distintas levaduras. Biplot de los dos primeros componentes para los aromas fermentativos que mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los ensayos realizados.

A **nivel sensorial** en los resultados de cata de los vinos elaborados con distintas levaduras destacaron los obtenidos mediante inoculación secuencial. En general, estos vinos presentaron mayor puntuación a nivel global y para distintos descriptores aromáticos como notas florales o a distintos tipos de fruta (Figura 11A y 11B). Además, también eran los vinos preferidos por los catadores (Figura 11C); el elaborado con Mf278 con la variedad Lado y el elaborado con Pk1 en el caso de la variedad Albariño.

Figura 11. Perfil sensorial de los vinos Lado (A) y Albariño (B) elaborados con distintas levaduras (se incluyen los descriptores con media geométrica mayor del 25% en al menos unos de los vinos. C). Preferencia de los catadores por los vinos.

Por tanto, el uso de las levaduras *Metchnikowia fructicola* Mf278 y *Pichia kluyveri* Pk1 mediante inoculación secuencial permitió modificar el perfil químico y sensorial de vinos de las variedades Albariño y Lado. Las levaduras no-*Saccharomyces* aportaron notas florales y afrutadas dando lugar a vinos más complejos que eran preferidos por los catadores.

2. Definir mesturas adecuadas para vela súa evolución nun proceso de crianza sobre lías

Las mezclas que se propusieron y que quedan refrendadas por los resultados son:

55% Treixadura

24% Albariño

12% Lado

8% Loureira

1% Godello

Este vino mezcla de distintas variedades será el que se utilice para poner en los distintos tipos de depósito que se indica a continuación en el punto

3. Avaliar a influencia do tipo de depósito para a crianza sobre lías finas sobre as características do viño. Estudaranse depósitos de distintos tipos de madeira e volume e depósitos inox.

El vino mezcla de los distintos monovarietales se transfirió a diferentes depósitos: acero inoxidable, barrica de madera de distintos tamaños (300 L y 500 L) para ver su evolución y la influencia en las características químicas y sensoriales del vino.

En la **Figura 11** se observan la evolución de los aromas de madera en las barricas. En cuanto a los fenoles volátiles, en los vinos procedentes del depósito de acero inoxidable solo se detectó la presencia de Vinilfenol y vinilguaicol a los seis meses (no se analizó a los 12 meses). En barrica la concentración de estos fenoles se duplicó al cabo de 12 meses. De igual forma la concentración de eugenol se incrementó al aumentar el tiempo de estancia en la barrica a doce meses. Una tendencia similar se observó para la vainillina en las barricas de 500L; sin embargo, en las barricas de 300 el contenido no era muy diferente en estos dos períodos. El contenido de whiskylactonas también incrementó tras un período de 12 meses en madera. En cuanto a los compuestos furánicos, el contenido de furfural disminuía a los 12 meses, pero el 5-metil furfural se mantenía, en el caso de la barrica de 300L, o aumentaba en la barrica de 500L.

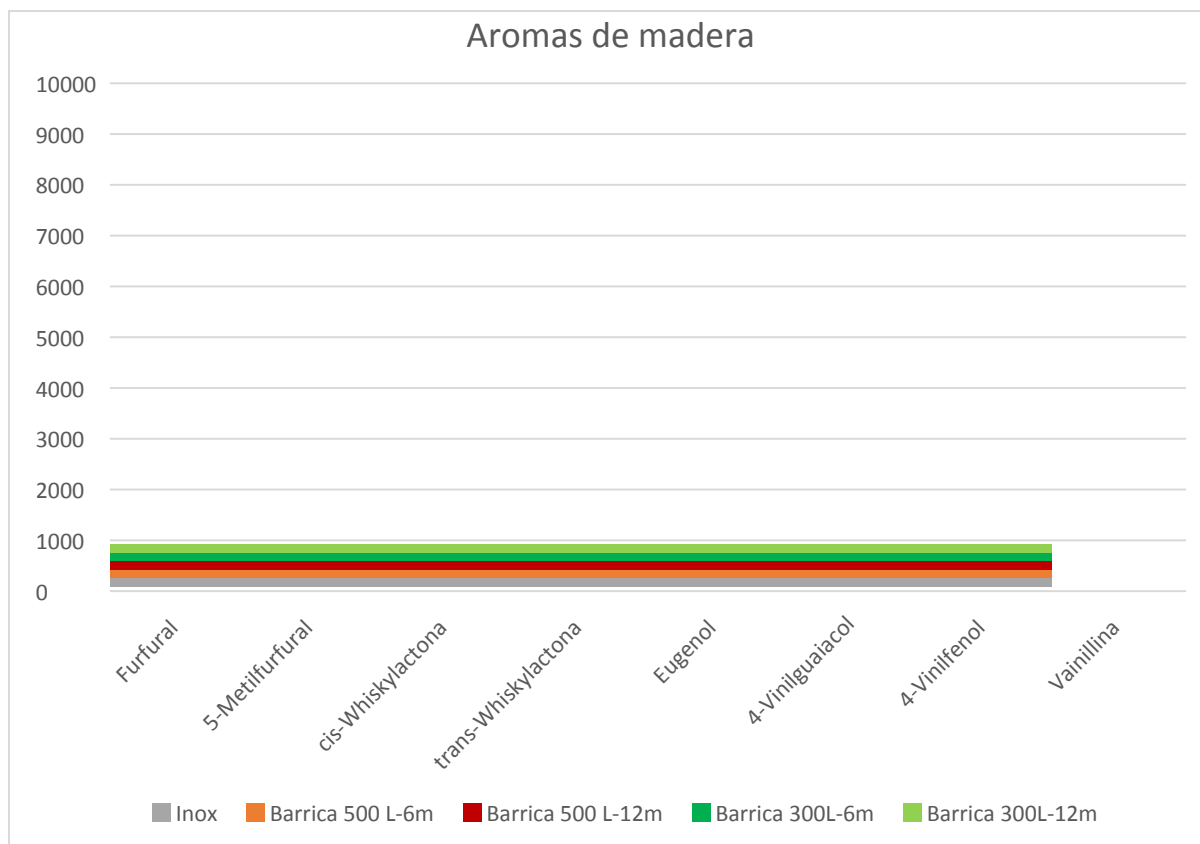


Figura 11. Aromas de madera en los vinos envejecidos en depósito de inox. y en barricas de madera de 300L y 500L de volumen durante 6 y 12 meses.

A nivel sensorial como se puede ver claramente los vinos se caracterizan por su carácter frutal manteniendo un aporte de componentes de la madera como la whiskylactona y el metil fufural. Además el tanino de la madera le aporta estructura y complejidad.

La mezcla de vinos monovarietales de 2022 se realizó en mayo (22/05/2023) y se conserva en depósitos de acero inoxidable en la E Vega.

4. Establecer un protocolo para a elaboración dun viño de garda propio (Granxa D’Outeiro)

Para estimar el momento óptimo del inicio de la vendimia para cada una de las variedades, se realizarán controles semanales de maduración desde el momento del envero hasta que se estime que ha alcanzado la madurez tecnológica en cada una de las campañas.

La vendimia se realiza de forma manual en cajas de 15 Kg y se transporta a bodega antes de las 2 horas para el procesado y la obtención del mosto.

Se despallilla y en la bomba de pasta se sulfita 24 mg de SO₂ por Kg de uva y si es necesario se corrige su acidez para tener un Ph estable, en torno a 3,3.

En la prensa, la pasta se macera durante un periodo de entre 1,5 horas a 3 horas, a una temperatura de entre 10 y 15 °C. Transcurrido este tiempo se prensa a un máximo de 1 Bar de presión y se añade en la bandeja de la prensa 6 mg de SO₂ por Kg de uva.

Se realiza análisis del mosto.

El mosto se transfiere a los depósitos añadiendo 2 Gr de enzimas pectolíticas cada 100 litros de mosto resultante, el mosto se mantiene durante 48 hr a 15 °C transcurridas las cuales se desfanga para llevarlo a los depósitos de fermentación donde se añaden 20 Gr/Hl de Glutatió n y se controla la temperatura a 17,5 °C.

Se realiza análisis del mosto.

La fermentación se controla cada 12 horas midiendo densidad y temperatura procediendo durante la fermentación ajustar las necesidades nutricionales de las levaduras en un primer momento con fosfato diamónico y en el momento de la multiplicación exponencial de las levaduras con nutrientes orgánicos procedentes de compuestos de levadura. Cuando el mosto en fermentación halla alcanzado una densidad próxima a 1040 se clarificará con bentonita en las dosis que nos indiquen los ensallos realizados durante las analíticas del mosto.

Hacia el final de la fermentación, se realizará una trasiega para mantener solo las lías finas en suspensión, para una vez finalizada la fermentación, trasegar los vinos a los depósitos de acero y a las barricas de Roble para su crianza sobre lías, durante un período no inferior a 3 meses.

5. Presentar o produto e dar a coñecer os resultados de interese para o seu aproveitamento polo sector e pola comunidade científica

Los resultados del proyecto se presentaron en distintas congresos relacionados con el sector del vino y se publicaron en revistas científicas de acceso libre. A continuación, se indican las comunicaciones y artículos publicados (Los trabajos completos están a disposición de las personas interesadas en Granxa D`Outeiro ; email: admon@granxadouteiro.com):

1. Pilar Blanco, Gloria Reinoso, Rebeca González, José Manuel M. Juste, Manolo Neira. Dynamics of *Saccharomyces cerevisiae* population in spontaneous fermentations from Granxa D`Outeiro terroir (DOP Ribeiro, NW Spain). Póster en II International Congress on Grapevine and Wine Science. 8-10 November 2023, Logroño, La Rioja, Spain. IVES Conference Series, ICGWS 2023.

Resumen

Dynamics of *Saccharomyces cerevisiae* population in spontaneous fermentations from Granxa D`Outeiro terroir (DOP Ribeiro, NW Spain)

Pilar Blanco^{1*}, Gloria Reinoso², Rebeca González², José Manuel M. Juste², Manolo Neira²

¹Estación de Viticultura e Enoloxía de Galicia (EVEGA-AGACAL), Ponte San Clodio s/n, 32428, Leiro-Ourense

² A Granxa D`Outeiro, Francelos, Ribadavia, Ourense, 32418-Coordenadas (42.2745221, -8.1626866)

e-mail: pilar.blanco.camba@xunta.gal

Granxa D`Outeiro is a recovered ancient vineyard located in the heart of DOP Ribeiro, where traditional white grapevine varieties are growing under sustainable management. Spontaneous fermentations using grape must from Treixadura, Albariño, Lado, Godello, and Loureira varieties were carried out at experimental winery of E Vega. Yeasts were isolated from must and at different stages of fermentation. Those colonies belonging to *Saccharomyces cerevisiae* were characterized at strain level by mDNA-RFLPs. General chemical parameters and aroma profile of wines were determined using official OIV methodology and GC analysis. The

microbiological control of fermentations revealed the presence of 5 to 15 different strains of *S. cerevisiae* depending on the variety. The highest diversity of yeast strains was found in Loureira fermentation. Strains named as G3 and G4 were the dominant yeasts in all processes, except Godello (controlled by strain G11); therefore, they are the main responsible for the fermentative aromas of the wines. The total acidity of wines ranged between 4,2 g/L with Treixadura and 5.2 g/L with Loureira, while the alcohol content ranged between 13 % (v/v) with Loureira and 14,2 % (v/v) with Lado. Treixadura wines showed the highest concentration of fermentative volatile compounds and this variety and Loureira reached the highest content of terpenes and eugenol. A blend of these monovarietal wines will allow to obtain an exclusive wine, which expresses the biodiversity from Granxa D'Outeiro terroir.

Keywords: Granxa D'Outeiro, traditional grapevine varieties, spontaneous fermentation, *Saccharomyces cerevisiae*, yeast strains, wine chemical composition

Acknowledgements: Project FEADER 2022/009A financed with funds from FEADER (75%), Xunta de Galicia (22.5%) and Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (MAPA) (2.5%)

Póster:

DYNAMICS OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* POPULATION IN SPONTANEOUS FERMENTATIONS FROM

GRANXA D'OUTEIRO TERROIR (DOP RIBEIRO, NW SPAIN)



Pilar Blanco¹, Gloria Reinoso², Rebeca González², José Manuel M. Juste², Manolo Neira²
¹Catedra de Viticultura e Enoloxía de Galicia (EVEGA-AGACAL), Ponte San Cibrán s/n, 32420, Lado-Ourense
²A Granxa D'Outeiro, Fozcalvos, Ribadavia, Ourense, 32416-Coordenadas (42.2745221, -8.1629999)
 e-mail: pilar.blanco@uvigo.es



Granxa D'Outeiro is a recovered ancient vineyard located in the heart of DOP Ribeiro (NW Spain), where traditional white grapevine varieties are growing under sustainable management. The project FEADER 2022/009A aims to take advantage of the varietal resources, sustainable management in the vineyard and the use of own yeasts to obtain an exclusive wine representative of the farm. Within the framework of this project, the objective of this work was to evaluate the population dynamics of *Saccharomyces cerevisiae* in spontaneous fermentations of grape must from different cultivars and their role on chemical parameters and aroma profile of the wines.



METHODOLOGY

Fermentations

At experimental winery of EVeGA
 Spontaneous fermentations (no yeast addition)
 Must from grape cultivars: Treixadura, Albariño, Lado, Godello, Loureira



Yeast Isolation and Identification

Daily monitoring of density and temperature
 Yeast isolation from must and at different stages of fermentation.
 Growth on Lysine medium (*S. cerevisiae* - negative)
 Identification of *S. cerevisiae* at strain level by mDNA-RFLPs



Wine chemical analysis

General chemical parameters
 ↓
 OIV methodology
 Aroma profile of wines- CG

RESULTS

Microbiological control of fermentations

The analysis of yeast isolated during fermentations by mDNA-RFLPs revealed the presence of 28 different profiles; that is, 28 strains of *S. cerevisiae* named as G1, G2, ... G29 (Figure 1)

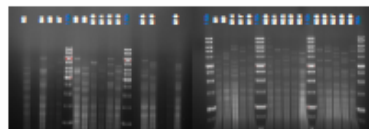


Figure 1. Diversity of *S. cerevisiae* strains in Granxa D'Outeiro fermentations.

Chemical characteristics of wines

The total acidity of wines ranged between 4.2 g/L with Treixadura and 5.2 g/L with Loureira, while the alcohol content ranged between 13 % (v/v) with Loureira and 14.2 % (v/v) with Lado (Table 1).

Table 1. Basic chemical characteristics of wines

Parameter/Wine	Godello	Treixadura	Lado	Loureira	Albariño
Total acidity (g tartaric acid/L)	4.9	4.2	5	5.2	4.9
Volatile acidity (g acetic acid/L)	0.44	0.31	0.27	0.29	0.29
Lactic acid (g/L)	0.3	0.5	0.4	0.3	0.5
Malic acid (g/L)	1.2	1.7	2.2	1.7	1.8
Tartaric acid (g/L)	2.8	2.2	2.4	3.1	3
Glucose + Fructose (g/L)	2.5	1.4	1.2	0.8	1.9
Free SO ₂ (mg/L)	47	26	27	32	37
Total SO ₂ (mg/L)	113	91	93	91	107
Glycerol (g/L)	5.2	4.8	4.8	4.3	4.3
Alcohol (% vol)	13.1	13.7	14.2	13	13.1
pH	3.36	3.74	3.61	3.36	3.7

Presence and abundance of yeast strains per fermentation

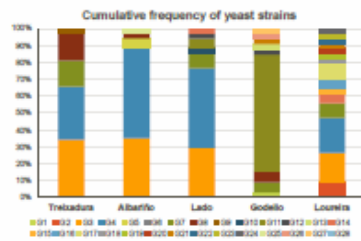


Figure 2. Frequency of *S. cerevisiae* strains in each fermentation.

In each fermentations 5 to 15 different strains of *S. cerevisiae* were identified depending on the variety (Figure 2). The highest diversity of yeast strains was found in Loureira fermentation. Strains named as G3 and G4 were the dominant yeasts in all processes, except Godello (controlled by strain G11); therefore, they are the main responsible for the fermentative aromas of the wines.

Aroma profile of wines

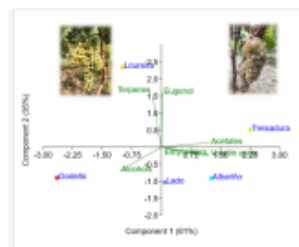


Figure 3. PCA of Granxa D'Outeiro wines.

Treixadura wines showed the highest concentration of fermentative volatile compounds. Loureira wines reached the highest content of terpenes and eugenol (Figure 3). Albariño, Lado and Treixadura wines had higher content of ethyl esters, acetates and volatile acids. Godello wines stood out for their alcohol content.

CONCLUSIONS

Grapevine variety and diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains in spontaneous fermentations influence the chemical profile of wines
 A blend of these monovarietal wines will allow to obtain an exclusive wine, which expresses the biodiversity from Granxa D'Outeiro terroir

Acknowledgements: Project FEADER 2022/009A "Explotación do potencial de garda dun terroir histórico do Ribeiro con cultivo sustentable do viñedo" financed with funds from FEADER (75%), Xunta de Galicia (22.5%) and Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (MAPA) (2.5%)



2. Estefanía García-Luque, Rebeca González, Rafael Cao y Pilar Blanco. 2024. Aplicación de levaduras no-*Saccharomyces* en la fermentación de mosto de Albariño y Lado. Comunicación en 36ª Reunión Del Grupo de Trabajo de Experimentación en Viticultura y Enología. Logroño 23-25 abril 2024. Comunicación

Aplicación de levaduras no-*Saccharomyces* en la fermentación de mosto de Albariño y Lado

FEADER 2022/009A “Explotación do potencial de garda dun terroir histórico do Ribeiro con cultivo sustentable do viñedo”




Colabora: Estación de Viticultura e Enoloxía de Galicia (EVEGA-AGACAL)




Financiado con fondos procedentes del FEADER (75%), del Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (2,5%) y de la Comunidad Autónoma de Galicia (22,5%)






3. Pilar Blanco, Estefanía García-Luque, Rebeca González y Rafael Cao. 2024. Biodiversidad de levaduras en la bodega de Granxa D’Outeiro (DOP Ribeiro, NO España): contribución al perfil químico y sensorial del vino. Póster. XVI Congreso Nacional de Investigación Enológica (GIENOL 2024). Zaragoza, 13-16 mayo 2024.



GIENOL
XVI CONGRESO NACIONAL
DE INVESTIGACIÓN ENOLÓGICA



ZARAGOZA
13-16 MAYO 2024

51. MB.P.9 Uso de levaduras *Lachancea thermotolerans* como estrategia para acidificar los vinos.
Alberto Martínez Brígido, Universidad de Extremadura, Badajoz

52. MB.P.10 Biodiversidad de levaduras en la bodega de Granxa D’Outeiro (DOP Ribeiro, NO España): contribución al perfil químico y sensorial del vino.
Pilar Blanco, Estación de Viticultura e Enoloxía de Galicia (Evega-Agacal), Leiro

BIODIVERSIDAD DE LEVADURAS EN LA BODEGA DE GRANXA D'OUTEIRO (DOP RIBEIRO, GALICIA):



CONTRIBUCIÓN AL PERFIL QUÍMICO Y SENSORIAL DEL VINO

Blanca, Estefanía García-Luque¹, Rubén González² y Rafael Cao³
¹Escuela de Viticultura e Enología de Galicia (EVVGA-UGAL), Rúa San Cibrao s/n, 22436, Leiro-Goreana
²Granxa D'Outeiro, Trabada, Ribadella, Ourense, 32411-Corredor de Ríos (C21715221, 41023880)
³evoga



Granxa D'Outeiro es una bodega pionera en el norte en recuperación desde 2010 localizada en el corazón de la DOP Ribeiro (Galicia, Noroeste de España). En esta explotación se cultivan bajo manejo sostenible variedades blancas de vid tradicionales de Galicia. El objetivo del proyecto FEDER 2022/2024 es aprovechar los recursos varietales y las levaduras propias para elaborar un vino exclusivo característico de esta variedad. Este trabajo presenta los resultados obtenidos sobre la diversidad de levaduras en la bodega de Granxa D'Outeiro, utilizado por primera vez en la campaña de 2023.



INSTALACIONES, MATERIAL Y MÉTODOS

Fermentaciones (Granxa D'Outeiro)

- > Variedades de uva: Traqueadura, Albariño, Loureiro, Lado, Callo Blanco
- > Dodega de Granxa D'Outeiro (1ª campaña)
- > Fermentación espontánea (sin añadir levaduras)
- > Medida diaria de la densidad y temperatura
- > Muestras de mosto y al inicio, mitad y final de la fermentación para control microbiológico



Azuleamiento e identificación de levaduras (Evoga)

- > Crecimiento en Lysine medium (Dextro) para diferenciación entre levaduras *Saccharomyces* y *Wickerhamomyces*
- > Identificación de *S. cerevisiae* a nivel de cepa: rDNA-SSLPs

Análisis químicos de los vinos (Evoga)

- > Parámetros básicos: Métodos oficiales CIV (2023)
- > Análisis fermentativos: cromatografía de gases



RESULTADOS

Control microbiológico de las fermentaciones: diversidad de levaduras

El análisis de las levaduras aisladas de tipo *Saccharomyces* mediante rDNA-SSLPs permitió identificar hasta 22 cepas diferentes de *S. cerevisiae* que se denominaron como A, B, ... W. En la Tabla 1 se indican el número de aislados, cepas y diversidad para cada fermentación con mostos monoclonales en la bodega.

Tabla 1. Diversidad de levaduras *S. cerevisiae* en la bodega de Granxa D'Outeiro. IP=Índice de diversidad de Shannon

Fermentación	Aislados	Muestras	Nº	Muestras de mosto (mosto y fermentado)		
				20%	50%	100%
Traqueadura	64	6	1,08	1,08	1,08	3
Albariño	64	6	1,33	1,33	2,00	3
Lado	48	11	1,04	1,04	2 (D,F,H)	7
Loureiro	63	6	1,01	1,01	0	6
Callo Blanco	63	6	1,12	1,08	1,04	6

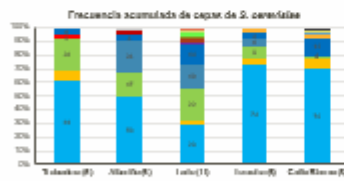


Figura 1. Frecuencia acumulada de cepas de *S. cerevisiae* en cada fermentación

En las fermentaciones con mostos monoclonales la diversidad de cepas de *S. cerevisiae* varió entre 5 y 11 dependiendo de la variedad (Tabla 1, Figura 1), siendo la cepa B la mayoritaria, aunque las cepas D, E, y H también presentaron frecuencias por encima del 10 % en algunos depósitos. Estas cepas se consideran que son las responsables de los aromas fermentativos de los vinos.

Caracterización química de los vinos

La acidez total de los vinos varió entre 4,9 g/L con la variedad Lado y 7,0 g/L con Callo Blanco, mientras que el contenido en alcohol estaba comprendido entre 12,8 % (v/v) con Callo Blanco and 14,2 % (v/v) con Lado (Tabla 2). Algunos vinos presentaron un contenido de azúcares residuales < 2 g/L.

Tabla 2. Parámetros químicos básicos de los vinos

Parámetro	Traqueadura	Albariño	Lado	Loureiro	Callo Blanco
Acidez Total (g/L)	6,7	6,8	4,9	5,7	7,0
Acidez Volátil (g/L)	5,40	5,48	5,18	5,38	5,47
Alcohol (g/L)	13,9	13,9	14,2	14,1	14,2
Alcohol (v/v)	13,9	13,9	14,2	14,1	14,2
Glucosa + Fructosa (g/L)	4,8	6,7	6,8	6,0	16,8
SO ₂ libre (mg/L)	33	33	<10	18	11
SO ₂ total (mg/L)	133	136	43	60	68
Cloruro (g/L)	4,8	4,7	4,7	4,6	4,9
Nitrato (g/L)	13,4	13,8	14,3	13,8	13,6
pH	3,68	3,63	3,68	3,70	3,70

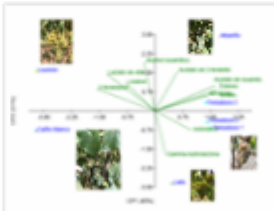


Figura 2. ACP de los vinos de Granxa D'Outeiro

Perfil aromático de los vinos

El análisis de componentes principales (ACP) de los vinos se separa los vinos de las distintas variedades variando en cuanto los aromas fermentativos. Los resultados indican que tanto las levaduras responsables de la fermentación como la variedad condicionan el perfil químico de los vinos y, por tanto, influyen en su perfil sensorial.

CONCLUSIONES

En la fermentación espontánea de mostos participan diferentes cepas de *S. cerevisiae*, en distinta proporción, dependiendo de la variedad de uva.

La diversidad de levaduras y la variedad de uva condicionan el perfil químico de los vinos.

La mezcla de vinos *espontáneos* permitirá obtener un vino exclusivo que expone la biodiversidad varietal y microbioma de Granxa D'Outeiro.

Agradecimientos: Este estudio ha sido financiado por el proyecto FEDER 2022/2024 "Explotación de potencial de gestión del sector histórico de Ribeiro con cultivos sostenibles de viñedos" cofinanciada con fondos de FEDER (78%), Xunta de Galicia (22,5%) y (MARN) (2,5%).



4. Blanco, P.; García-Luque, E.; González, R.; Soto, E.; Juste, J.M.M.; Cao, R. Diversity of *Saccharomyces cerevisiae* Yeast Strains in Granxa D'Outeiro Winery (DOP Ribeiro, NW Spain): Oenological Potential. *Fermentation* 2024, 10, 475. <https://doi.org/10.3390/fermentation10090475> (ver material suplementario)



Article

Diversity of *Saccharomyces cerevisiae* Yeast Strains in Granxa D'Outeiro Winery (DOP Ribeiro, NW Spain): Oenological Potential

Pilar Blanco ^{1,*}, Estefanía García-Luque ², Rebeca González ², Elvira Soto ¹, José Manuel M. Juste ² and Rafael Cao ²

¹ Estación de Viticultura e Enoloxía de Galicia (EVEGA-AGACAL), Ponte San Clodio s/n, 32428 Leiro-Ourense, Spain

² A Granxa D'Outeiro, Ctra. De Francelos a Filgueira s/n, Geographic Coordinates (42.2745221, -8.1626866), 32418 Ribadavia, Spain; martinezjuste@gmail.com (J.M.M.J.)

* Correspondence: pilar.blanco.camba@xunta.gal; Tel.: +34-988788092

Referencias bibliográficas

OIV. International Organization of Wine. 2022. Compendium of international methods of wine and must analysis. Vol. 1 y 2. Paris. <http://www.oiv.int>.

Querol, A.; Barrio, E.; Huerta, T.; Ramon, D. Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 1992, 58 (9), 2948–53. doi:10.1128/AEM.58.9.2948-2953.1992.

Resolución OIV-OENO 370-2012. Guidelines for the characterization of wine yeasts of the genus *Saccharomyces* isolated from vitivinicultural environments. Available online: <https://www.oiv.int/public/medias/1429/oiv-oeno-370-2012-en.pdf>

Maqueda, M.; Zamora, E.; Álvarez, M.L.; Ramírez, M. Characterization, ecological distribution, and population dynamics of *Saccharomyces sensu stricto* killer yeasts in the spontaneous grape must fermentations of South-western Spain. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012, 78, 735–743. doi:10.1128/AEM.06518-11

BLANCO, P.; MIRÁS-AVALOS, J.M.; PEREIRA, E.; ORRIOLS, I. 2013. Fermentative aroma compounds and sensory profiles of Godello and Albariño wines as influenced by *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains. *J Sci Food Agric.* 93: 2849–2857.

ESTEVE-ZARZOSO, E.; 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. *Int J Syst Bacteriol.* 49: 329-337