



# UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

## TRABAJO FIN DE ESTUDIOS

Título

Estudio de la microbiota presente en la vinificación por maceración carbónica mediante espectrometría MALDI-TOF

Autor/es

NEREA ESTALAYO OCHOA

Director/es

LUCÍA GONZÁLEZ ARENZANA y ANA ROSA GUTIÉRREZ VIGUERA

Facultad

Facultad de Ciencia y Tecnología

Titulación

Grado en Enología

Departamento

AGRICULTURA Y ALIMENTACIÓN

Curso académico

2020-21



***Estudio de la microbiota presente en la vinificación por maceración carbónica mediante espectrometría MALDI-TOF***, de NEREA ESTALAYO OCHOA (publicada por la Universidad de La Rioja) se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported. Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.



# UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

Facultad de Ciencia y Tecnología

## TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Enología

Estudio de la microbiota presente en la vinificación por  
maceración carbónica mediante espectrometría MALDI-TOF

Study of the microbiota present in carbonic maceration  
winemaking using MALDI-TOF spectrometry

Realizado por:

Nerea Estalayo Ochoa

Tutelado por:

Ana Rosa Gutiérrez Viguera

Lucía González Arenzana

Logroño, julio, 2021

## ÍNDICE

Agradecimientos .....	4
Resumen.....	6
Abstract.....	6
1. Introducción.....	9
1.1. La vinificación por maceración carbónica. ....	9
1.2. Las levaduras presentes en vinificación.....	13
1.3. Identificación de levaduras mediante la técnica MALDI-TOF. ....	15
2. Objetivos .....	18
3. Materiales y Métodos.....	19
3.1. Vinificaciones.....	19
3.2. Seguimiento de las fermentaciones alcohólica y maloláctica. ....	21
3.3. Estudio de la población de levaduras y aislamiento de colonias. ....	21
3.4. Técnica de espectrofotometría de masas MALDI-TOF. ....	22
3.4.1. Preparación de las muestras .....	23
3.4.2. Reactivos utilizados .....	25
3.4.3. Interpretación de los resultados .....	25
3.5. Identificación de levaduras mediante secuenciación del ADN. ....	27
4. Resultados y discusión .....	28
4.1. Validación de la técnica MALDI-TOF para identificar levaduras enológicas. 28	
4.1.1. Identificación de levaduras enológicas.....	28
4.1.2. Optimización del protocolo de extracción.....	30
4.1.3. Comparación de los resultados con otros métodos de identificación. ....	31
4.2. Comparación de la población de levaduras presentes en las vinificaciones por maceración carbónica y por despalillado y estrujado, en los diferentes momentos de la elaboración.....	32
4.2.1. Especies de levaduras identificadas en el pie de cuba. ....	32
4.2.2. Especies de levaduras identificadas a las 24 horas del encubado.....	34
4.2.3. Especies de levaduras identificadas en fermentación alcohólica tumultuosa. ....	35
4.2.4. Especies de levaduras identificadas al final de la fermentación alcohólica. 39	
4.2.5. Especies de levaduras identificadas al final de la fermentación maloláctica. 40	
5. Conclusiones.....	43
6. Bibliografía .....	44



## Agradecimientos

Me gustaría agradecer a las siguientes personas la paciencia y dedicación que me han demostrado durante este último curso, en el que todos mis esfuerzos han ido dedicados a la realización de este Trabajo de Fin de Grado y con el que finaliza una etapa de mi vida tan importante para poder afirmar que, por fin, soy graduada en Enología por la Universidad de La Rioja.

En primer lugar, quiero agradecerles a mis tutoras, Ana Rosa y Lucía, la posibilidad de dejarme realizar este proyecto tan interesante junto a ellas. Gracias por la atención prácticamente de 24 horas al día, por guiarme en los momentos en los que estaba tan perdida, por hacerme sentir una más en el proyecto y por toda la enseñanza de la que me habéis hecho empapar durante todo este tiempo. A día de hoy, sé que no he podido elegir mejor a mis tutoras del TFG.

A Patri, Rosa, Ana Rosa, Lucía, Rocío, Pili, Juana, Isabel y a todo el grupo GESVIN. Por transmitirme sus conocimientos y dejarme aprender a su lado. Desde aquí me gustaría daros mi más sincera enhorabuena por los recientes premios que habéis logrado, sois todo un ejemplo a seguir. Me gustaría agradecer de forma especial a Patri, por todas las horas que pasamos juntas en el laboratorio. A todo el personal del ICVV y de la bodega experimental, por facilitarme los medios para realizar este proyecto. Gracias por hacerlo todo más sencillo.

A la Universidad de La Rioja, a todos esos profesores que han contribuido a aumentar mi amor por el mundo de la Enología, a los que me han empujado a seguir superándome día a día. A todos ellos gracias.

Al Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, a la Agencia Estatal de Investigación, por concedernos el proyecto a partir del cual he podido realizar este trabajo.

Gracias a todo el personal de laboratorio de la Universidad de La Rioja y al equipo técnico de Bruker por solucionar los contratiempos que nos surgían con el equipo MALDI-TOF.

A mis amigos y compañeros de la universidad, por la infinita paciencia que tenían conmigo en época de exámenes y por hacer que los momentos de disgustos sean superados con creces por los buenos ratos pasados. Pero sobre todo, gracias por hacer que estos años hayan sido inolvidables.

Finalmente, agradecer a toda mi familia, mi hermano Andrés y sobre todo a mis padres, Belén y Marcos por su apoyo en esta etapa. Por hacer que hoy pueda estar donde estoy, por la educación que me han dado y por el esfuerzo tan grande, que sé que han tenido que hacer, para que ahora pueda estar escribiendo estas palabras. Gracias por ser mi ejemplo de superación, mi impulso y mi motivación.

## Resumen

Este trabajo se centra en la técnica de identificación de microorganismos MALDI-TOF, enfocando su uso en la de levaduras enológicas y en concreto, comparando la población microbiana de la vinificación tradicional con la de la maceración carbónica.

Desde hace años el método de vinificación clásico comienza por el despalillado y estrujado de la uva; sin embargo, existe otra forma de elaboración, la llamada de maceración carbónica. Es un proceso protagonizado por el metabolismo anaerobio que ocurre en las bayas de uva intactas, sin estrujar, en ambientes enriquecidos en CO<sub>2</sub>.

La identificación de microorganismos presentes durante la vinificación permite tener un mayor control de las elaboraciones y por lo tanto, asegurar un producto final de calidad. La técnica de identificación microbiana MALDI-TOF se fundamenta en la espectrometría de masas y se basa la separación de iones formados de acuerdo con su relación masa/carga. El tiempo de vuelo de estos iones permite crear un espectro único basado en un perfil protéico para cada microorganismo.

El hecho de que la técnica MALDI-TOF esté enfocada al entorno sanitario, nos ha obligado a optimizar dicho equipo para su uso en levaduras enológicas. Por ello, el objetivo de este estudio se ha centrado en comprobar la efectividad de la técnica para la identificación de levaduras vínicas, complementándola con otra técnica identificativa ampliamente utilizada, como es la secuenciación, y a continuación observar si existen diferencias poblacionales entre la vinificación clásica y la vinificación por maceración carbónica.

Todo el proceso se ha llevado a cabo en el Instituto de las Ciencias de la Vid y el Vino (ICVV) y el Complejo Científico Tecnológico de la Universidad de La Rioja durante la Vendimia 2020. Gracias a este estudio, se ha concluido que MALDI-TOF es una técnica adecuada para la identificación de levaduras enológicas, por la alta efectividad y fiabilidad de los resultados, y por la rapidez con la que éstos se obtienen. Además, su precio por muestra es menor al de otras técnicas. Cabe resaltar, que la clave de estos buenos resultados es tener una base de datos completa y actualizada.

## **Abstract**

This work focuses on the MALDI-TOF microorganism identification technique, focusing its use on the identification of enological yeasts more specifically, comparing the microbial population of traditional winemaking with carbonic maceration.

For years, the classic winemaking method has started with the destemming and crushing of the grapes; however, there is another way of making it, the so called “carbonic maceration”. It is a process led by anaerobic metabolism that occurs in intact grape berries, without squeezing, in environments enriched in CO<sub>2</sub>.

The identification of microorganisms present during the vinification process allows to have a greater control of the elaborations, and therefore, to ensure a final quality product. The MALDI-TOF microbial identification technique is based on mass spectrometry and is based on the separation of ions formed according to their mass / charge ratio. The time of flight of these ions allows to create a unique spectrum based on a protein profile for each microorganism.

The fact that the MALDI-TOF technique is focused on the healthcare environment has forced us to optimize this equipment for use in enological yeasts. For this reason, the objective of this study has been focused on verifying the effectiveness of the technique for the identification of wine yeasts, complementing it with another widely-used identification technique such as sequencing, and observing if there are population differences between classic winemaking and winemaking vinification through carbonic maceration processes.

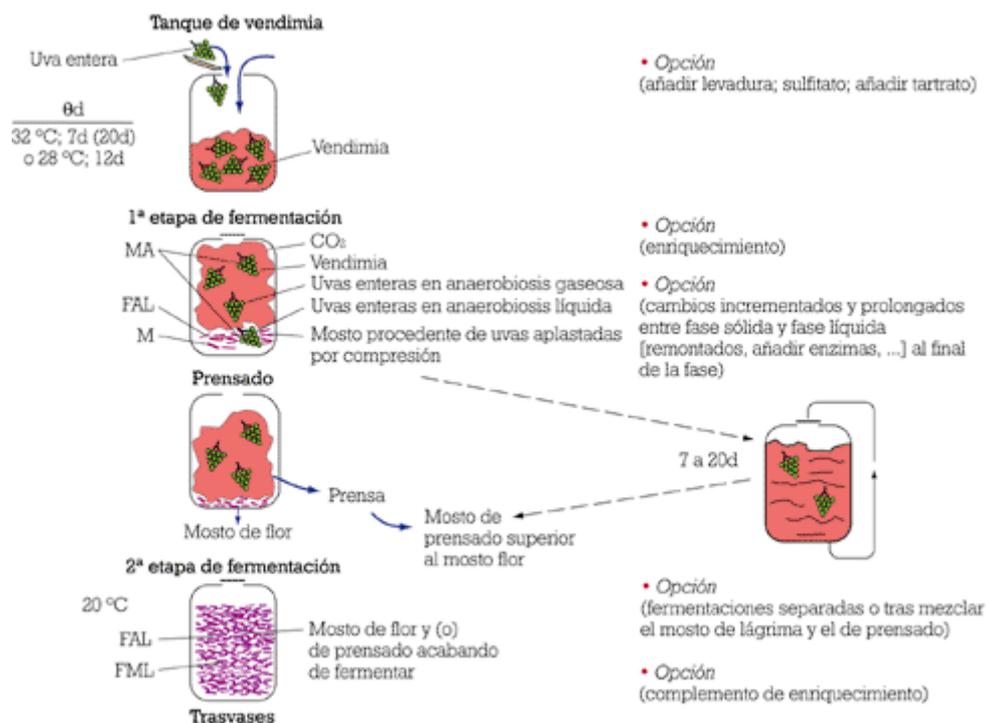
The entire process has been carried out at the Institute of Vine and Wine Sciences (ICVV) and the Technological Scientific Complex of the University of La Rioja during the 2020 Harvest. Thanks to this study, it has been concluded that MALDI-TOF is a suitable technique for the identification of enological yeasts due to their high effectiveness and reliability of results, the speed with which they are obtained, and their lower price per sample comparing it to other techniques. But it should be noted that the key to these successful results is having a complete and up-to-date database.



# 1. Introducción

## 1.1. La vinificación por maceración carbónica.

De forma general, se denomina “vinificación por maceración carbónica” al proceso que engloba los fenómenos químicos, físicos y microbiológicos que tienen lugar espontáneamente en las bayas de uva intactas, sin estrujar, en ambientes anaerobios. El conjunto de estos fenómenos se conoce como “metabolismo anaerobio” (MA) de las uvas, o como “fermentación intracelular (FI)” (Flanzy et al., 2010). Cuando nos referimos a dicha fermentación, estamos hablando de la producción de etanol y otros compuestos exclusivamente por las enzimas endógenas de las uvas, a partir de los metabolitos que contienen. La vinificación por maceración carbónica (MC) induce rápidamente este metabolismo en la uva, ya que aprovecha el enriquecimiento inicial con CO<sub>2</sub> de la atmósfera del depósito de vinificación lo que desencadena procesos diferentes a los que se presentan durante la respiración.



**Figura 1.-** Esquema de la vinificación por maceración carbónica. (Flanzy et al 2009). (MA=metabolismo anaerobio de la uva; FAL= fermentación alcohólica por levaduras; FML= fermentación maloláctica; M= maceración).

Según Flanzy et al. (2010), en el proceso de MC se establecen dos fases claramente diferenciadas que se pueden observar en la Figura 1. La primera fase comienza cuando la uva entera se vierte en los depósitos llenos de CO<sub>2</sub> (exógeno) sin prensado ni sulfato

previo. A partir de ese momento, las uvas del interior del depósito se presentan de tres formas: uvas enteras en la atmósfera gaseosa empobrecida en oxígeno, uvas que al caer o por el aplastamiento de la vendimia liberan mosto que es fermentado por levaduras y uvas enteras y raspones flotando o suspendidas en el mosto de las uvas estrujadas. Durante esta primera fase coexisten tres fenómenos diferentes: una FI de las uvas enteras que se encuentran en la atmósfera enriquecida en CO<sub>2</sub>, una fermentación del mosto por microorganismos y la maceración de las partes sólidas en el mosto en fermentación. Tras un tiempo variable de esta primera fase se obtiene “mosto yema” que en gran parte ya está fermentado,  $d=1000-1010$ , y la vendimia que todavía tiene azúcares y tras su prensado pasará a ser el “mosto prensa” con una alta densidad de entre 1020-1050.

En la segunda etapa tras el descube se producen las fermentaciones protagonizadas por microorganismos: la fermentación alcohólica (FA) por levaduras y la fermentación maloláctica (FML) por bacterias lácticas. Estas fermentaciones pueden llevarse a cabo en el mosto yema y prensa, aislada o conjuntamente.

En la Denominación de Origen calificada Rioja (D.O.Ca. Rioja) cada vez son más las bodegas que incluyen entre sus vinos los de MC, adaptando sus instalaciones a las necesidades de este tipo de vinificación. Además, ha despertado un gran interés entre productores de diferentes países con mayor o menor tradición vitícola. Se ha asentado la utilización de esta técnica en Francia (Beaujolais nouveau) y se ha empezado a implantar en países como Italia, Rumanía, Yugoslavia, Bulgaria, Japón, Canadá, USA, Australia, etc. (Flanzy et al. 2010). En cuanto a España, esta técnica ha existido en forma de MC no estricta como método tradicional de elaboración de vinos en Rioja, muy practicada por cosecheros o cooperativas principalmente en Rioja Alavesa.

En cuanto a las diferencias entre el sistema de vinificación de vinos tintos clásico y por MC, en el primero la vendimia se despallilla y estruja, esto conlleva que los granos se rompan quedando el mosto libre. Por ello, durante el encubado coexisten dos fenómenos: la maceración de los hollejos rotos en el mosto y la FA de éste por las levaduras. Una vez se agotan los azúcares es cuando se da por finalizada la FA, se descuba y se obtiene el vino yema y el vino prensa. A partir de ese momento las levaduras no vuelven a actuar. Por lo tanto, podemos destacar tres diferencias importantes entre las dos técnicas: en el sistema clásico no existe el MA, se aplica sulfuroso en el encubado y se estruja y despallilla. Además, en la vinificación por MC el vino prensa suele ser de mayor calidad que el vino yema, en el sistema clásico generalmente ocurre lo contrario.

### Primera etapa

Para que comience el MA es necesario reducir el contenido de O<sub>2</sub> en el depósito a niveles inferiores al 1%. De hecho, el nivel de CO<sub>2</sub> contenido en el depósito va a ser el principal desencadenante del MA. En este periodo de tiempo se producen fenómenos de síntesis y/o degradación (producción de etanol y compuestos secundarios, transformación de ácidos orgánicos, pectolisis, proteolisis, síntesis de compuestos aromáticos) y fenómenos de difusión de CO<sub>2</sub>, polifenoles y etanol. El CO<sub>2</sub> va a ser absorbido por las uvas, que lo transformarán en diferentes sustratos. Posteriormente, será compensado por el que expulsarán las bayas al realizar la fermentación intracelular.

Al igual que ocurre en la FA conducida por levaduras, en la FI se genera etanol y productos secundarios. Sin embargo, la concentración de etanol está limitada al 2% v/v. La acidez total de la uva disminuye en el MA, debido a la degradación de ácido málico sin aumento simultáneo del ácido láctico. El contenido en sustancias pécticas disminuye progresivamente con el MA, lo que conlleva una modificación de la estructura de la pared de la baya con la consiguiente pérdida de resistencia mecánica y liberación del mosto que incrementará la fase líquida del depósito. En cuanto a los compuestos nitrogenados, se produce un aumento de los aminoácidos libres, pero va acompañado de una desaparición muy acusada del amoníaco y de un descenso continuo del nitrógeno proteico. Ciertos metabolitos evolucionan, formando precursores de aromas que posteriormente serán transformados por el metabolismo microbiano. Las sustancias polifenólicas se difunden en mayor o menor medida, dependiendo del compuesto, desde el hollejo hacia la pulpa, observándose una extracción progresiva de color.

Todos estos fenómenos ocurren exclusivamente gracias al sistema enzimático de la uva. Pero como es lógico, hay relación entre el metabolismo de dentro de la baya y el medio que le rodea. Los factores que condicionan el MA son la temperatura de la vendimia, el tiempo y grado de hipoxia y por supuesto, la integridad de la cosecha.

Según Flanzky et al. (2010), las mejores condiciones para el desarrollo del MA son una temperatura comprendida entre los 30-32°C y una duración variable en función del producto a obtener entre 5-8 días.

De forma simultánea al MA o FI dentro de las uvas intactas, en el mosto liberado en el depósito se produce la FA por levaduras. La fermentación del mosto va a depender, ante todo, de la composición de éste, de los microorganismos presentes y de factores como el pH, temperatura u O<sub>2</sub> disuelto. El medio dentro del depósito se encuentra en continuo cambio, lo que hace que las levaduras y bacterias estén obligadas a adaptarse

al constante aporte de nutrientes y elementos de crecimiento por parte de las bayas que se van rompiendo. Hay que destacar por lo tanto esta diferencia entre la MC y la vinificación clásica, donde los nutrientes están prefijados desde el encubado.

Otro aspecto importante por tratar es el bajo contenido en  $O_2$  que hay en la MC. Aunque las levaduras y las bacterias lácticas sean anaerobias facultativas, necesitan al principio pequeñas cantidades de  $O_2$  para mantener su viabilidad (Ribéreau-Gayon et al. 2003). En la vinificación clásica las levaduras sintetizan gracias a aportes de  $O_2$  en los remontados ácidos grasos de cadena larga, que son considerados factores de supervivencia. Para solventar ese problema en la MC, las levaduras utilizan la pruina del hollejo de la uva, constituida principalmente por el ácido oleico.

### Segunda etapa

En la segunda etapa de vinificación, tras el descube, finalizarán las fermentaciones alcohólica y maloláctica.

El MA hace que la composición del mosto de uva que va a fermentar cambie, incrementándose el contenido en nutrientes, lo que hace que los mostos de MC tengan poblaciones de levaduras mayores que en la vinificación tradicional en el momento del descube. Además, el continuo enriquecimiento del medio líquido provoca diferentes condiciones de multiplicación celular, lo que puede producir una selección de microorganismos distinta. Esta cuestión va a ser el eje principal de estudio en este trabajo.

También se ha descrito un crecimiento elevado de bacterias lácticas, que se ven favorecidas por este tipo de vinificación (Flanzy et al., 2010).

Las dos circunstancias anteriores (mayor población de levaduras y bacterias en el descube) favorecen el acabado de ambas fermentaciones. La elevada presencia de bacterias lácticas además de favorecer la FML, que frecuentemente se superpone a la FA, puede provocar alteraciones lácticas si hay cantidades altas de azúcares. Cabe destacar que es una situación poco frecuente ya que el final de la FA se ve igualmente muy favorecido. Sin embargo, el aumento de bacterias lácticas puede conllevar un aumento de la acidez volátil.

Por todos los motivos anteriormente descritos, los vinos de MC tienen un acabado muy rápido tras el prensado, lo que favorece que se obtengan vinos estabilizados biológicamente mucho antes y, por lo tanto, puedan anticiparse en la salida al mercado.

### Características de los vinos de MC

En los vinos de MC el vino prensa suele ser de mayor calidad que el de yema. En general, los vinos de MC tienen menor densidad, extracto seco y azúcares reductores, aunque mayor pH y menor acidez total (Etaio et al., 2008). Esto se debe a la degradación del ácido málico en la primera etapa, a la mayor difusión de potasio y a que la FML se produce rápidamente. Por ello, son vinos redondos y de consumo rápido, lo que a su vez dificulta su envejecimiento. El CO<sub>2</sub> que sigue apareciendo en el vino durante un tiempo en forma de aguja, así como la gran carga aromática, hace que estos vinos sean muy característicos y diferenciables (González-Arenzana et al., 2020), describiéndose como florales y afrutados, con menores Índices de polifenoles Totales (IPT) que los de vinificación clásica, debido a un menor contenido en catequinas y procianidoles.

#### **1.2. Las levaduras presentes en vinificación.**

Actualmente, existen unos 100 géneros de levaduras y unas 700 especies, pero sólo 20 de ellas son importantes en el ámbito de la enología (Gil Gonzalo, 2019). Los criterios de clasificación taxonómica han pasado de estar basados en aspectos morfológicos a métodos basados en el análisis de ADN.

En las uvas la comunidad microbiana está integrada por mohos y al final de la fase de maduración empiezan a aparecer las levaduras. El 50-70% de las levaduras corresponden con especies apiculadas, pero éstas varían según el clima. La especie *Kloeckera (K.) apiculata* predomina en climas fríos y *Hanseniospora (H.) uvarum* lo hace en climas cálidos (Carrascosa et al., 2005). La población de la especie *Saccharomyces (S.) cerevisiae*, muy escasa en las uvas y el mosto inicial, va aumentando a medida que avanza el proceso fermentativo y acaba siendo la levadura predominante en la elaboración de vino. Las causas son claras, tiene un alto poder fermentativo, resiste las temperaturas elevadas, tolera el alcohol, también las condiciones anaerobias, y los sulfitos (Carrascosa et al., 2005).

Las levaduras se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, tanto en la superficie de las uvas como en el ambiente de la bodega (suelo, depósitos, prensas, etc). Sin embargo, la presencia de unas especies u otras van a ser características de la zona de producción, y de las condiciones generales de elaboración. Esto se debe a que factores como las condiciones meteorológicas, el grado de madurez de la vendimia, el uso de pesticidas y fungicidas son determinantes en la distribución espacial y temporal de las levaduras. Tradicionalmente las bodegas utilizaban esas levaduras autóctonas del ambiente, pero como no todas las cepas se adaptan igual a las diferentes condiciones de vinificación, en la actualidad la tendencia implica la inoculación de

levaduras secas activas (LSA) (Gutiérrez Fernández De Piérola, 2018). Este método permite seleccionar la cepa de levadura deseada para llevar a cabo la FA, reproducir las características del vino todos los años y evitar paradas de fermentación, asegurando una rápida puesta en marcha de ésta (Bauer y Pretorius, 2000; Fleet y Heard, 1993). En los últimos años se ha fomentado la selección de levaduras autóctonas de cada región para que el vino tenga unas características sensoriales propias de la zona vitivinícola.

Con el fin de fomentar la utilización de distintas especies de levaduras en el campo de la enología para dar identidad propia a los vinos se han realizado numerosos estudios sobre las levaduras no-*Saccharomyces* (Escribano-Viana et al., 2018). Estas especies tienen su mayor protagonismo al principio de la fermentación. Entre ellas nos encontramos a los géneros *Candida*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, *Hanseniaspora*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Torulaspota* y *Zygosaccharomyces* (Heard y Fleet, 1985). Tras crecer durante los 2-3 primeros días de fermentación acaban muriendo por intoxicación del etanol. A la vez que éstas van disminuyendo, las cepas de *S. cerevisiae* empiezan a multiplicarse hasta tomar todo el protagonismo de la FA. Sin embargo, aunque las levaduras no-*Saccharomyces* solo aparecen al principio de la fermentación, producen compuestos que pueden influir en gran medida en la calidad del vino (Fleet y Heard, 1993). La relación entre levaduras no-*Saccharomyces*/*Saccharomyces* es un indicador que nos permite observar los cambios químicos y sensoriales durante la fermentación. Algunos autores indican que la diferencia principal entre estos dos grupos de levaduras es la capacidad de las no-*Saccharomyces* para producir enzimas como estererasas, glicosidasas, lipasas,  $\beta$ -glucosidasas, proteasas o celulasas que interactúan con compuestos presentes en el vino (Carrascosa et al., 2005). Su presencia en la vinificación conllevaría un aumento del rendimiento de ciertas etapas de la vinificación (maceración, filtración y clarificación), además de un incremento de la extracción de color y aromas (Charoenchai et al., 1997). Cabe destacar que *S. cerevisiae* no es una gran productora de enzimas. Por lo tanto, fomentar este tipo de levaduras no-*Saccharomyces* nos permitiría reducir la adición de enzimas exógenas y obtener vinos más “naturales” con características organolépticas definidas.

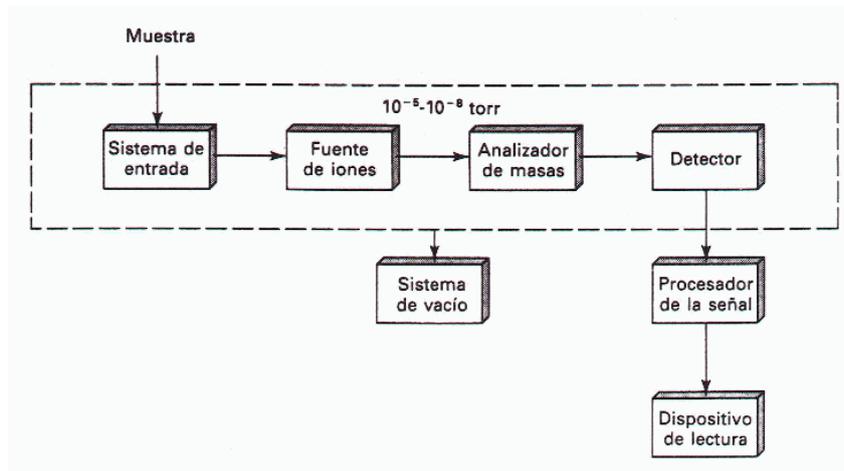
Las especiales condiciones de la MC podrían hacer que las levaduras que participan en la vinificación sean diferentes en número y especies. Es por ello interesante realizar una adecuada caracterización e identificación de las levaduras presentes en ambos métodos de vinificación.

### 1.3. Identificación de levaduras mediante la técnica MALDI-TOF.

Los primeros métodos que se empezaron a utilizar para caracterizar e identificar levaduras fueron los llamados métodos clásicos. Estos se apoyaban en la morfología de las colonias, su tipo de reproducción o sus propiedades fisiológicas, como la capacidad fermentativa, asimilación de azúcares y nitratos o resistencia a diferentes temperaturas (Carro y Piña, 2007). Sin embargo, estas características pueden cambiar según las condiciones de cultivo (Yamamoto et al., 1991). Posteriormente, se utilizaron técnicas basadas en las proteínas totales de las levaduras, patrones de isoenzimas y análisis de ácidos grasos por cromatografía de gases. Debido a su poca fiabilidad y reproducibilidad, ya que dependían del estado fisiológico de la levadura en cuestión, se acabaron sustituyendo por los métodos moleculares (Carrascosa et al., 2005). Éstas últimas técnicas basadas en el análisis del genoma son independientes del estado fisiológico de la célula. Estos métodos se dividen en dos grupos, los que identifican a nivel de cepa y los que lo hacen a nivel de especie. Algunos autores indican que es necesaria la utilización de varias de las técnicas para cerciorarse la identificación a nivel de cepa (Fernández-Espinar et al., 2001; Pramateftaki et al., 2000; Baleiras Couto et al., 1996).

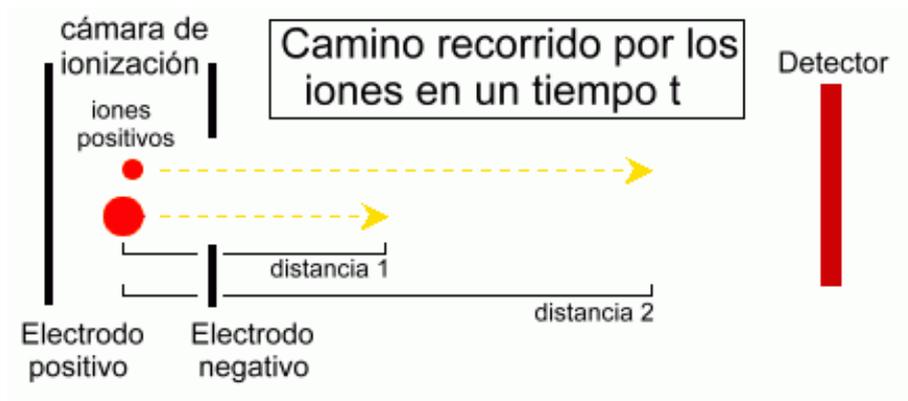
Recientemente se ha empezado a utilizar la espectrometría de masas para la identificación microbiana a nivel de especie, principalmente en el entorno sanitario, y cada vez más en la microbiología de los alimentos. En el campo de la enología son muy escasos los trabajos que utilicen esta tecnología para la identificación de levaduras y bacterias.

La espectrometría de masas es una técnica de identificación basada en la separación de los iones formados de acuerdo con su relación masa/carga ( $m/z$ ). Se genera una información bidimensional, denominada espectro de masas, determinado por la estructura química del compuesto analizado. El espectrómetro de masas debe ser capaz de volatilizar la muestra, originar iones a partir de esta, separarlos en función a su masa y carga y finalmente, detectarlos y registrar la información obtenida adecuadamente (Hoffmann y Stroobant, 2007). Como se muestra en la Figura 2 los espectrómetros de masas están formados por cuatro componentes: un sistema de inyección directo o por sistemas de entrada cromatográfico, una fuente de ionización formadora del haz de iones en estado gaseoso, un analizador de masas, responsable de la separación por su relación masa/carga, y un sistema detector y registrador que detecte, procese y amplifique de la señal.



**Figura 2.-** Esquema componentes espectrometría de masas (MS).

El elemento fundamental del espectrómetro de masas es el analizador. Los hay de varios tipos, pero el más utilizado en microbiología es el analizador de tiempo de vuelo o también llamado TOF (Time Of Flight). Su fundamento se basa en la aplicación de un potencial eléctrico a una muestra sólida que hace que se formen iones acelerados que viajarán por un tubo de vuelo en vacío hasta el detector. De esta forma, los iones de mayor masa se desplazarán más lentamente que los que tengan una menor masa y, por lo tanto, tardarán más en llegar al detector (Figura 3).



**Figura 3.-** Esquema analizador tiempo de vuelo (TOF).

Otro punto importante para el correcto funcionamiento de la espectrometría de masas es la desorción láser. Es la parte donde a través de un pulso láser de alta intensidad se generan iones que serán los que se analizarán en función de la masa. Tras años de investigación se llegó a la conclusión de que la técnica que mejores resultados obtenía

era utilizar un láser ultravioleta sumergiendo la muestra en una matriz (Karas et al. 1987). De esta forma se conseguía una ionización suave que proporcionaba fragmentos correctos para la identificación de moléculas lábiles (Croxatto et al., 2012).

En enología es muy interesante su utilización en la microbiología enológica para poder caracterizar levaduras y bacterias mediante su huella peptídica (Plamen et al., 1999). Esta huella se consigue mediante la hidrólisis de las proteínas del microorganismo a estudiar. De esta forma, se genera un espectro de masas único para cada microbio. Gracias a la base de datos del equipo, se puede comparar la huella objeto de estudio y así identificar la levadura o bacteria que se desee. Por lo tanto, hay que destacar que la técnica MALDI-TOF permite la identificación rápida y fiable de proteínas sin conllevar un coste elevado en comparación con otras técnicas.

## **2. Objetivos**

El Trabajo Fin de Grado de Enología que lleva por título “Estudio de la microbiota presente en vinificación por maceración carbónica mediante espectrometría MALDI-TOF” se planteó con los siguientes objetivos:

1. Optimizar la técnica de identificación de microorganismos MALDI-TOF en levaduras enológicas.
2. Comparar la eficacia de esta técnica con otras utilizadas habitualmente (secuenciación ADN).
3. Estudiar y comparar las levaduras presentes en la vinificación por MC y en la vinificación clásica mediante la técnica MALDI-TOF.

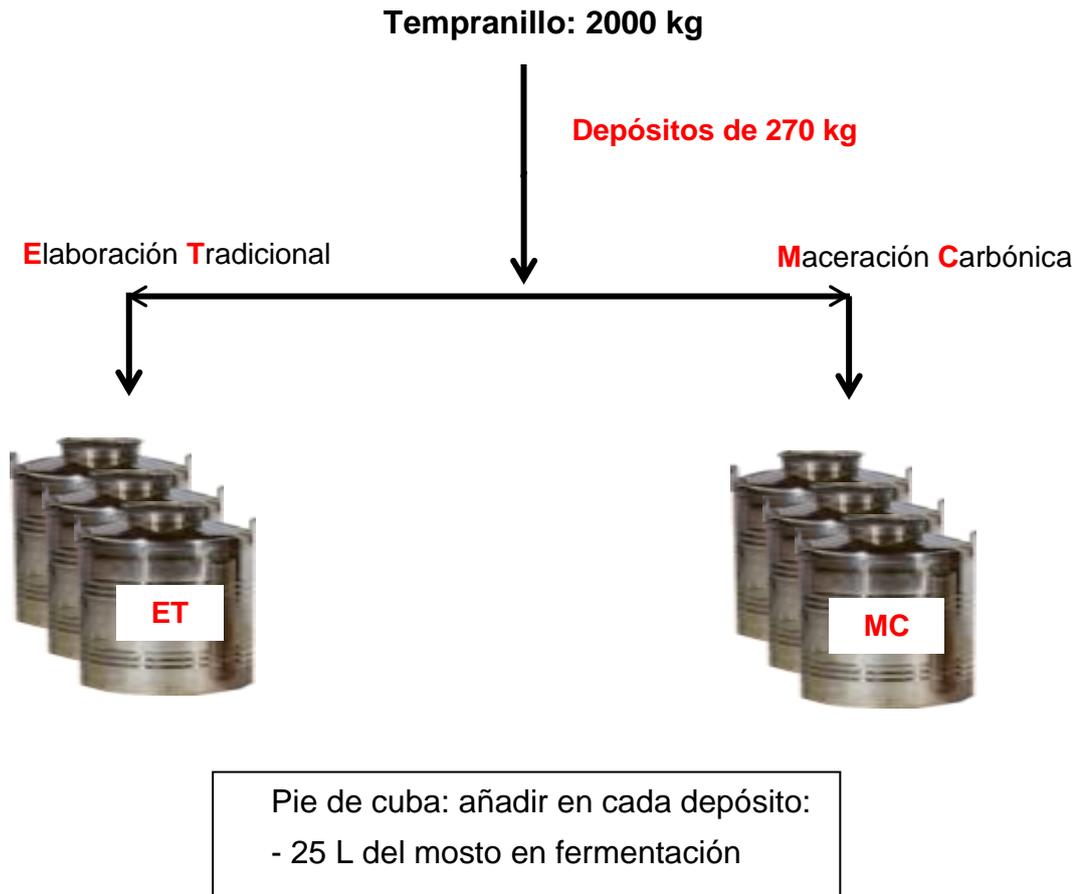
### **3. Materiales y Métodos**

#### **3.1. Vinificaciones.**

Las vinificaciones se llevaron a cabo con la uva de la variedad Tempranillo procedente de la parcela ubicada en la Finca La Grajera, propiedad del Gobierno de La Rioja. Se realizaron vinificaciones por triplicado ( $n=3$ ) por MC y por el método clásico o tradicional de despalillado estrujado.

El día 22 de octubre se realizó una prevendimia en la misma finca donde posteriormente se realizó la vendimia, con el fin de preparar un pie de cuba natural para inocular los depósitos. Se cosecharon 300 kg de uva (unas 20 cajas), que se estrujaron y despalillaron para después sulfitarlas con 20 mg/l de  $\text{SO}_2$  y colocarlas en depósitos a 25°C para favorecer la fermentación. El pie de cuba se utilizó para que las levaduras procedentes de la prevendimia que ya habían comenzado la fermentación arrancasen rápidamente los depósitos del ensayo sin necesidad de sembrar con levaduras comerciales. Esta idea surgió a partir de la experiencia del año anterior en este tipo de vinificaciones por MC a pequeña escala, en las que se observó una alteración en el proceso de vinificación debido al retraso en el arranque de la FA en el mosto del fondo de los depósitos de MC.

La vendimia se realizó el 25 de octubre de 2020 en cajas, obteniendo una cantidad final de 2.000 kg de uva (alrededor de 130 cajas). Las cajas de uva fueron distribuidas aleatoriamente en 6 lotes, tres de los cuales se destinaron a vinificación por MC, y los otros tres a vinificación clásica por despalillado y estrujado (Figura 4).



**Figura 4.-** Esquema depósitos de vinificación.

Los depósitos utilizados para las elaboraciones tenían una capacidad de 270 kg y eran específicos para la vinificación por MC, ya que la boca del depósito era más ancha para facilitar la entrada de los racimos enteros. Son depósitos de poca altura para evitar la excesiva rotura de las bayas por el peso de la vendimia y tienen una puerta de descube de mayor tamaño para facilitar la evacuación de las partes sólidas. Estos depósitos se llenaron manualmente con los racimos contenidos en las cajas correspondientes. Los depósitos para las vinificaciones clásicas se llenaron por gravedad con la pasta procedente de la despalilladora-estrujadora y se sulfitaron a razón de 40 mg/L. Tanto las uvas enteras como la pasta se adicionaron en los depósitos que contenían 25 L del pie de cuba preparado tres días antes y 2 cajas de uva estrujada y sulfitada a razón de 40 mg/L. Esta adición de uva estrujada en los depósitos de MC se realizó para simular la rotura de uvas que tiene lugar en las vinificaciones industriales por este sistema.

Una vez llenados los depósitos de MC, se realizaron remontados de homogeneización diarios a lo largo de todo el proceso de encubado, vaciando por la tubería inferior 30 litros de mosto en cubos y añadiéndolos por la superficie de los

depósitos. En los depósitos despalillados y estrujados la homogeneización se llevó a cabo mediante bazuqueo. Todos los depósitos se colocaron en cámara a 30°C.

### **3.2. Seguimiento de las fermentaciones alcohólica y maloláctica.**

En el caso de la FA, se midió diariamente la densidad y la temperatura para controlar la fermentación. En el caso de la MC se midió además la temperatura de la masa de racimos. En el momento en que el mosto de los depósitos alcanzó una densidad de 1.000, se dio por finalizada la primera etapa de vinificación. La elaboración tradicional se descubó, prensó y trasegó. En la MC se sangró el mosto-vino de lágrima y las partes sólidas se prensaron en prensa neumática vertical. Por lo tanto, en este caso los depósitos de la MC se dividieron en dos fracciones: prensa (MCP) y lágrima (MCL).

El vino de todos los depósitos se trasegó a depósitos de 30 y 50 L donde tuvo lugar la FML de forma espontánea. Se tomaron muestras una vez por semana para controlar el inicio de dicha fermentación, y una vez comenzó a degradarse el ácido málico por acción de las bacterias lácticas se muestreó cada dos días. El control de la FML se llevó a cabo mediante el análisis de los ácidos málico y láctico con el autoanalizador Miura One, TDI. Tras finalizar la FML, los depósitos se sulfitaron a razón de 40 mg SO<sub>2</sub>/ L de vino. Durante un mes, se estabilizó el vino manteniendo los depósitos entre 8-10°C y posteriormente se procedió al embotellado.

### **3.3. Estudio de la población de levaduras y aislamiento de colonias.**

En total se realizaron 5 muestreos: en el pie de cuba procedente de la prevendimia (Toma 0), a las 24 horas del encubado (Toma 1), en fermentación tumultuosa con densidad 1.025 (Toma 2), al final de la FA con densidad 1.000 (Toma 3) y tras la FML (Toma 4).

Se estudió la población de levaduras presentes en diferentes momentos de la elaboración en cada una de las vinificaciones. Se realizaron recuentos de levaduras en los 5 momentos citados anteriormente en cada una de las fermentaciones y se caracterizaron las diferentes especies de levaduras presentes mediante la técnica MALDI-TOF. En total se aislaron e identificaron 750 levaduras.

Para el recuento de levaduras utilizó el sistema de diluciones decimales sucesivas escogiendo diferentes diluciones de las muestras según el momento de elaboración en el que nos encontrábamos. De cada toma se recogía un tubo Falcon del cual se seriaban diluciones de hasta 10<sup>-5</sup> del mosto/vino. Se sembraron en superficie 100 µl de cada dilución en placas Petri que contenían medios de cultivo sólidos y estériles preparados en el laboratorio.

Para el aislamiento de levaduras totales se utilizó el medio GYP (glucosa 20 g/L, peptona 5 g/L, extracto de levadura 5 g/L, agar 20 g/L y 3 mL de cloranfenicol 25 g/L en etanol) en condiciones de aerobiosis a 25°C durante 2 días. Para las levaduras no-*Saccharomyces* se utilizó YPD (glucosa 20 g/L, peptona 20 g/L, extracto de levadura 10 g/L, agar 20 g/L) adicionado con cicloheximida (0,003 L de cicloheximida 25 g/L en etanol) para inhibir el crecimiento de *S. cerevisiae* y estudiar la presencia de levaduras no-*Saccharomyces*. Para detectar las levaduras del género *Brettanomyces* en los vinos terminados (Toma 4), se utilizó el medio DBDM (YNB 67 g/L, agar 20 g/L, etanol 0,06 L, cicloheximida 0,01 g/L, p-cumárico 0,1 g/L y verde bromocresol 0,022 g/L) en condiciones de anaerobiosis a 25°C durante 21 días. Una vez sembradas las diluciones, todas las placas se incubaron según las condiciones ideales para cada levadura.

Tras realizar los recuentos de la placa en la dilución que contenía entre 30 y 300 unidades formadoras de colonias (UFC), se aislaron 10 elegidas al azar en nuevas placas Petri con el mismo medio y encubando bajo las mismas condiciones, excepto en el pie de cuba, que se aislaron 25 en cada uno de los medios. Una vez se observó crecimiento en las placas tras sucesivas siembras y pases, que aseguraron cultivos puros de especies únicas aisladas y conservadas independientemente, se procedió a la identificación de los microorganismos mediante la técnica espectroscópica MALDI-TOF, MS.

#### **3.4. Técnica de espectrofotometría de masas MALDI-TOF.**

Para llevar a cabo esta técnica se utilizó el equipo de espectrometría de masas MALDI Biotyper de la casa comercial Bruker (Figura 5), que se encuentra en las instalaciones de la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad de La Rioja.



Figura 5.- Equipo MALDI Biotyper.

### 3.4.1. Preparación de las muestras

Para la identificación de las colonias de levaduras se pueden utilizar tres métodos para procesar los microorganismos aislados: transferencia directa placa, extracción corta con ácido fórmico en placa y la extracción larga en diferentes etapas con etanol y ácido fórmico.

Los dos primeros métodos citados siguen los mismos pasos en un principio. Se coloca una pequeña cantidad del material biológico (una película delgada de un cultivo de 24 horas) con la ayuda de un palillo, esterilizado previamente, en cada pocillo de los 96 que contiene la placa metálica (Figura 6). En el caso de la extracción corta en placa, se añade 1  $\mu\text{L}$  de ácido fórmico al 70% sobre el cultivo fresco que rompe la pared celular de las levaduras y así se consigue una extracción directa de las proteínas. Siempre se ha de dejar un pocillo libre para poner 1  $\mu\text{L}$  del patrón, muestra de *Escherichia coli* que sirve para calibrar el equipo. Seguidamente, se añade 1  $\mu\text{L}$  de matriz HCCA (incluido al patrón) sin dejar que transcurran 30 minutos. Finalmente se deja secar de nuevo y se analiza. Hay algunas especies que necesitan una extracción del cultivo previa a la preparación de la placa, por lo que se les realiza una extracción larga en diferentes etapas. En un tubo de centrifuga Eppendorf con 300  $\mu\text{L}$  de agua HPLC se introduce una

pequeña cantidad de la muestra con ayuda de un asa de siembra. Se agita con el vórtex hasta que la disolución sea homogénea. Posteriormente se adicionan 900  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto y se vortea de nuevo. A continuación, se introduce el tubo en la centrifuga durante 2 minutos a 13.000 rpm. De esta forma, las proteínas sedimentan en la parte inferior del tubo, por lo que se elimina el sobrenadante con ayuda de una micropipeta. Para cerciorarnos de que se evapora todo el etanol restante, se deja el tubo abierto mínimo 15 minutos. Trascurrido ese tiempo, se añaden 25  $\mu\text{L}$  de ácido fórmico al 70% y se mezcla bien con ayuda de la punta de la micropipeta y el vórtex. Posteriormente se adicionan 25  $\mu\text{L}$  de acetonitrilo y se centrifuga durante 2 minutos a 13.000 rpm. Se transfiere 1  $\mu\text{L}$  del sobrenadante al pocillo de la placa MALDI-TOF y se deja secar. Al igual que en los métodos anteriormente descritos, se deja un pocillo libre para poner 1  $\mu\text{L}$  del patrón. Para finalizar, se añade 1  $\mu\text{L}$  de la matriz HCCA (1  $\mu\text{L}$  extra al patrón) y se deja secar a temperatura ambiente.



**Figura 6.-** Placa metálica para equipo MALDI Biotyper.

Para evitar posibles confusiones durante la preparación de la tarjeta metálica, se utilizan unas plantillas con la numeración y distribución de cada pocillo. Tras los análisis es de gran importancia limpiar la placa meticulosamente con etanol al 70% y TFA al 80% siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 3.4.2. Reactivos utilizados

Se prepararon los siguientes reactivos:

- Etanol al 70%: se utiliza para la limpieza de la tarjeta MALDI.
- Ácido trifluoroacético (TFA) al 80%: es importante manejarlo en campana y con guantes, debido a su alto poder corrosivo. También se utilizó para la limpieza de la placa.
- Ácido fórmico al 70%: su función es extraer las proteínas con etanol/ ac. fórmico.
- Solvente orgánico: para su preparación (1,5 ml) se emplea 475  $\mu$ L de agua HPLC, 500  $\mu$ L de acetonitrilo y 25  $\mu$ L de TFA. Manejarlo siempre en campana y con guantes. Se utiliza para reconstruir la matriz y el patrón BTS.
- Solución matriz: ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico que está contenido en un tubo liofilizado al que se añade 250  $\mu$ L de solvente orgánico. Hay que conservarla en un lugar oscuro, envuelto en papel de aluminio para una total protección.
- Solución Bruker Bacterial Test Standard (BTS): es el patrón utilizado en este equipo. Se le añaden 50  $\mu$ L al tubo proporcionado por Bruker.

### 3.4.3. Interpretación de los resultados

Una vez preparada la placa, ésta se introduce en el aparato que hace el análisis y la identificación de forma automática. El software del MALDI Biotyper genera unos informes similares al que aparece en la Figura 7.

## Bruker MALDI Biotyper Identification Results



### Run Info:

Run Identifier: 200128-1314-1011010611  
 Comment:  
 Operator: Admin@FLEX-PC  
 Run Creation Date/Time: 2020-01-28T13:17:19.138  
 Number of Tests: 10  
 Type: Standard  
 BTS-QC: not present  
 BTS-QC Position:  
 Instrument ID: BA070067  
 Server Version: 4.1.80 (PYTH) 102 2017-08-226\_04-55-52

### Result Overview

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second-best match)	Score Value
E3 (+++)(A)	9E (Standard)	Candida neylandoides	2.33	Candida neylandoides	2.03
E4 (-)(C)	11E (Standard)	No Organism Identification Possible	1.60	No Organism Identification Possible	1.34
E5 (+++)(A)	19E (Standard)	Saccharomyces cerevisiae	2.22	Saccharomyces cerevisiae	1.81
E6 (+)(B)	22E (Standard)	Schizosaccharomyces pombe	1.95	No Organism Identification Possible	1.21
E7 (+)(B)	24E (Standard)	Zygosaccharomyces bailii	1.90	Zygosaccharomyces bailii	1.80
E8 (-)(C)	33E (Standard)	No Organism Identification Possible	1.33	No Organism Identification Possible	1.38
E9 (+++)(A)	34E (Standard)	Torulaspota delbrueckii	2.28	Torulaspota delbrueckii	2.06

*Result overview table—continued on next page*

Report created at 2020-01-28T13:28:44

Research Use Only

Page 1 of 14

**Figura 7.-** Informe de resultados de identificación MALDI Biotyper.

En estos informes se recoge información sobre la especie identificada (se dan dos opciones siendo la primera la más coincidente), el porcentaje con el que el software identifica la cepa comparándola con los espectros guardados en la base de datos, sugerencias de coincidencias en espectros diferentes e interpreta los resultados clasificándolos con ayuda de colores y símbolos.

Los resultados se muestran en verde cuando identifica un microorganismo en género y especie y el valor de puntuación de la identificación se encuentra entre 2,00-3,00. Significa, por lo tanto, que la identificación es de alta confianza y el símbolo que se representa es (+++). Si el valor de puntuación se encuentra entre 1,70-1,99 se muestra el microorganismo identificado en amarillo, con el símbolo (+), lo que indica que la identificación es de baja confianza. Por último, cuando el valor de puntuación está entre 0,00-1,69, con el símbolo (-) y en color rojo, aparece el texto “no es posible la identificación del organismo”. Si se detecta una puntuación de 0,00 significa que “no se encontraron picos” y por lo tanto no fue posible la identificación. En los dos últimos

casos, se optó en primer lugar por repetir la muestra, y si tampoco se obtenía identificación, por mandar el ADN del microorganismo a secuenciar.

### 3.5. Identificación de levaduras mediante secuenciación del ADN.

Las muestras que no se pudieron identificar mediante MALDI Biotyper se identificaron por secuenciación. Para ello, se procedió a amplificar la región D1/D2 del gen codificante del rRNA 26S mediante PCR usando los primers NL1 y NL4 (Cocolin, 2000). Para identificar las especies de levaduras se utilizaron los cebadores y condiciones descritos por Kurtzman et al. (1998) y que se detallan en la Tabla 1. Antes, se realizó la extracción y purificación del ADN: se prepararon tubos Eppendorf con 1 mL de solución salina, se inocularon con las muestras y con ayuda de un vortex se resuspendió la muestra. Tras introducir las muestras en una microcentrífuga 5 minutos a 13.000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se añadieron 250 µL de buffer de lisis ( $\beta$ -mercaptoetanol) a -20°C. Se dejó reposar durante 10 minutos y posteriormente se incubó a 100°C otros 10 minutos. A continuación, se vorteoó el tubo Eppendorf en caliente, se centrifugó durante 3 minutos a 13.000 rpm y se seleccionó el sobrenadante que se guardó en el frigorífico listo para ser secuenciado.

**Tabla 1.-** Cebadores y condiciones de la PCR universal de levaduras (Kurtzman *et al.*, 1998).

Cebadores (secuencia 5' → 3')	Fragmento amplificado (pb)	Condiciones de amplificación		
NL1 GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	580	94°C	3 min	1 ciclo
NL4 GGTCCGTGTTTCAAGACGG		94°C	1 min	
		52°C	45 s	36 ciclos
		72°C	2 min	1 ciclo
		72°C	4 min	

Los productos de PCR se purificaron y se secuenciaron por MacroGen Inc. Facilities (Seoul, South Korea), para determinar el género y especie de levadura. Las secuencias resultantes fueron comparadas en la base de datos GenBank del NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.org](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.org)) usando la BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para obtener la identificación correcta (>98%) de la especie de levadura a la que pertenecía cada colonia aislada.

## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Validación de la técnica MALDI-TOF para identificar levaduras enológicas.

#### 4.1.1. Identificación de levaduras enológicas.

Como ya se ha mencionado en la introducción (apartado 1.3), el método MALDI-TOF utiliza la huella peptídica de cada microorganismo para crear un espectro propio de cada especie que se compara con los espectros que conforman la base de datos del equipo MALDI Biotyper para dar así una identificación a nivel de especie. Con el objetivo de valorar la utilidad de esta técnica para el estudio de levaduras enológicas, se testaron 42 clones pertenecientes a 33 especies y a 19 géneros de levaduras asociadas a ambientes enológicos cuya identidad era conocida. Estas levaduras procedían, de forma mayoritaria, de la colección española de cultivos tipo (CECT), aunque algunas de ellas fueron aisladas por el grupo GESVIN formando parte del banco de levaduras del Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (ICVV). En la Tabla 2 se muestra la procedencia de cada una de las especies de levaduras y los resultados de identificación obtenidos con el método MALDI-TOF.

**Tabla 2.** Especies de levaduras enológicas testadas en el equipo MALDI-TOF.

Espece	Procedencia (código)	Resultado de la identificación
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	CECT (1009)	Correcta
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	ICVV	Correcta
<i>Candida glabrata</i>	CECT (1448)	Correcta
<i>Candida pararugosa</i>	ICVV	Correcta
<i>Candida sarbosa</i>	ICVV	Correcta
<i>Candida stellata</i>	CECT (11110)	Correcta
<i>Candida vini</i>	CECT (10053)	Correcta
<i>Citeromyces matritensis</i>	CECT (1073)	Correcta
<i>Cryptococcus albidus</i>	CECT (1073)	Correcta

<i>Cryptococcus magnus</i>	CECT (1103)	Correcta
<i>Debaryomyces hansenii</i>	CECT (10386)	Correcta
<i>Dekkera bruxellensis</i>	CECT (11045)	Correcta
<i>Dekkera bruxellensis</i>	CECT (1010)	Correcta
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	CECT (11027)	Correcta
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	CECT (1444)	Correcta
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	CECT (1446)	Correcta
<i>Lachancea thermotolerans</i>	ICVV	Incorrecta
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	CECT (10546)	Correcta
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	ICVV	Incorrecta
<i>Metschnikowia reukaufii</i>	CECT (10395)	Correcta
<i>Pichia anomala</i>	CECT (10590)	Correcta
<i>Pichia anomala</i>	CECT (1114)	Correcta
<i>Pichia fermentans</i>	CECT (1455)	Correcta
<i>Pichia kluyveri</i>	ICVV	Correcta
<i>Pichia kluyveri</i> var. <i>kluyveri</i>	ICVV	Correcta
<i>Pichia membranifaciens</i>	CECT (1115)	Correcta
<i>Saccharomyces bayanus</i>	CECT (1941)	Correcta
<i>Saccharomyces bayanus</i>	CECT (10013)	Correcta
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ICVV	Correcta
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ICVV	Correcta
<i>Saccharomyces paradoxus</i>	CECT (1939)	Correcta
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	CECT (1940)	Correcta
<i>Saccharomyces ludwigii</i>	ICVV	Correcta
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	CECT (1379)	Correcta

<i>Torulaspota delbrueckii</i>	CECT (10651)	Correcta
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	ICVV	Correcta
<i>Torulopsis glabatra</i>	ICVV	Correcta
<i>Williopsis spp.</i>	ICVV	Correcta
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ICVV	Correcta
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	CECT (11042)	Correcta
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	CECT (1232)	Correcta
<i>Zygosaccharomyces veronae</i>	ICVV	Correcta

Tal y como se puede observar en la Tabla 2, de las 42 levaduras testadas, solo dos especies no fueron identificadas por el equipo MALDI Biotyper, lo que equivalía a un 5% de ausencia de identificación inicial. En ambos casos, los resultados del análisis indicaban la presencia de picos, pero no era posible la identificación. El análisis de ambas cepas mediante secuenciación indicó que pertenecían a las especies *Lachancea (L.) thermotolerans* y *Metschnikowia (M.) pulcherrima*.

Al analizar la base de datos del equipo se observó que ninguna de las dos especies estaba incluida en la misma. Dada la importancia de estas levaduras no-*Saccharomyces* y su frecuente aparición en las vinificaciones, decidimos ampliar la base disponible con estos microorganismos.

Con el objetivo de incluir estas levaduras en la base de datos de Bruker MALDI Biotyper, el servicio de laboratorios de la Universidad de La Rioja, siguiendo las indicaciones del equipo técnico de la empresa Bruker, procedió a la inclusión de los espectros de ambas levaduras. Nuestra tarea en el proceso fue proporcionar extractos de 10 colonias de cada una de las especies anteriores, obtenidas según el método largo de extracción que se describe en esta memoria. De esta forma el equipo quedó optimizado para identificar dichos microorganismos en el caso que apareciesen entre los aislados de las muestras.

#### **4.1.2. Optimización del protocolo de extracción.**

Una vez completada y actualizada la base de datos para la identificación de las especies de levaduras enológicas más comunes, se puso a punto el protocolo de preparación de los aislados de levaduras.

Debido a la variabilidad entre los diferentes microorganismos que se pueden identificar por este método, existen protocolos diferentes de preparación de las muestras antes de su análisis (Bruker, 2015). Hay algunas especies que necesitan una extracción del cultivo previa a la preparación de la placa, otras en la que la extracción se hace directamente en la placa mediante la adición de 1  $\mu$ L de ácido fórmico al 70% sobre el cultivo fresco, y también hay microorganismos que no necesitan ningún tipo de extracción.

La inclusión directa de la colonia a identificar en la placa sin extracción es el método más sencillo y barato, ya que es más rápido y no utiliza ningún aditivo. La extracción directa en la placa mediante la adición de 1  $\mu$ L de ácido fórmico sobre el pocillo de la placa alarga y encarece un poco el proceso, y finalmente la extracción previa fuera de la placa y posterior colocación de 1  $\mu$ L de extracto en el pocillo de la placa alarga considerablemente el tiempo de preparación de las placas.

Se identificaron las levaduras del listado anterior por el método MALDI-TOF siguiendo las tres técnicas detalladas en el apartado de materiales y métodos (apartado 3, subapartado 3.1.1), los resultados obtenidos (datos no mostrados) indicaron que el análisis con la inclusión directa en placa del cultivo sin extracción no lograba identificar la totalidad de las levaduras. Sin embargo, tanto la extracción en placa con ácido fórmico como la extracción larga fuera de la placa si lo conseguían. Por ello, se eligió la extracción directa en placa con 1  $\mu$ L de ácido fórmico para la identificación de levaduras por el método MALDI-TOF, por ser un método más corto, barato e igualmente fiable que la extracción larga.

#### **4.1.3. Comparación de los resultados con otros métodos de identificación.**

En general, del total de las identificaciones llevadas a cabo, los resultados de identificación por MALDI-TOF aportaron un 85 % de identificaciones correctas, siendo un 15% de los aislados los que no pudieron ser identificados por dicha técnica. La identificación de ese 15% se llevó a cabo por secuenciación de ADN. Las cepas no identificadas pertenecían a las especies *Starmerella (St.) bacillaris*, *Trigonopsis (Tr.) cantarelli* y *Tr. variabilis*. Al analizar las levaduras presentes en la base de datos se pudo comprobar que ninguna de estas tres especies estaba incluida en la misma. Estas levaduras tampoco se incluyeron en el screening inicial debido a que no son especies habitualmente descritas en ecosistemas vínicos (Tabla 2).

Otro factor a tener en cuenta es la rapidez de este método de identificación. Entre la preparación de la placa y el análisis del equipo, analizar 96 muestras conllevan solamente unas 2-3 horas de trabajo. Sin embargo, otro método molecular de

identificación utilizado como la secuenciación conlleva días de trabajo: realizar la PCR, el envío de las muestras, el tiempo de análisis requerido por el laboratorio externo y la recepción e interpretación de los resultados.

En cuanto al precio por análisis en reactivos (calibrante: 0,02 €/muestra y matriz 0,26 €/muestra) se estima unos 0,28€ por muestra. A este valor habría que sumar la amortización de la placa reutilizable (470 €) y la amortización y mantenimiento del equipo de análisis. Por el contrario, la secuenciación alcanza unos 5 € por muestra.

Un inconveniente de este método es que no todas las muestras se identificaron en el primer análisis. Un 25% del total de las muestras identificadas por el método MALDI-TOF tuvieron que ser repetidas hasta su correcta identificación o ser analizadas por otros métodos.

En base a estos resultados, se puede afirmar que el método MALDI-TOF es una técnica rápida y eficaz en la identificación de un porcentaje elevado de levaduras enológicas. Otros autores (Lartigue, 2013) han llegado a resultados similares, mostrando que la técnica tiene un porcentaje de fallo que se puede compensar con la secuenciación genética posterior de las cepas no identificadas. En nuestro estudio hemos visto que todos los fallos estaban relacionados con la no inclusión de los microorganismos a identificar en la base de datos. Por ello, la técnica es muy adecuada, pero es requisito que las especies estén incluidas en la base de datos del equipo. En el caso del equipo disponible en la Universidad de La Rioja la solución pasaría por ir incluyendo en la base de datos nuevos microorganismos que se vayan identificando o en adquirir una nueva base de datos más completa.

#### **4.2. Comparación de la población de levaduras presente en las vinificaciones por maceración carbónica y por despalillado y estrujado, en los diferentes momentos de la elaboración.**

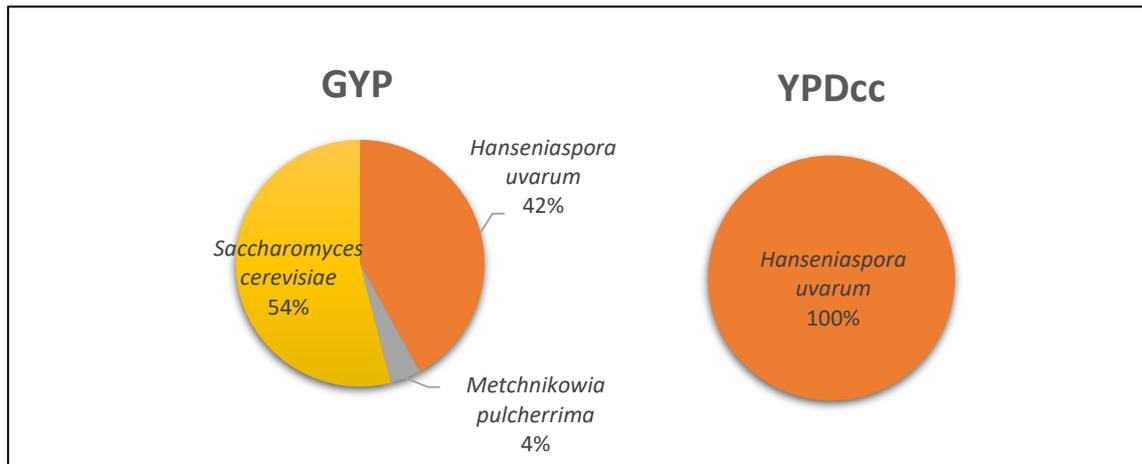
En total, se analizaron por esta técnica 750 colonias de levaduras de las cuales un 7% procedían de la toma 0 (pie de cuba), un 8% de la toma 1 (a las 24 h del encubado), un 28% de la toma 2 (en fermentación tumultuosa), un 17% de la toma 3 (a fin de FA) y un 40% de la toma 4 (tras la FML).

##### **4.2.1. Especies de levaduras identificadas en el pie de cuba.**

En la primera fase de muestreo (toma 0) se tomó una muestra del pie de cuba que se preparó para sembrar los vinos de MC. En esta etapa de la vinificación se emplearon dos medios de cultivos, GYP para detectar levaduras totales, e YPDcc para detectar levaduras no-*Saccharomyces*. La única diferencia entre ambos medios de cultivo es la

presencia de cicloheximida en el medio YPDcc. Las levaduras de la especie *S. cerevisiae* son muy sensibles a este compuesto. Por ello, en nuestro estudio lo adicionamos a uno de los medios con el objetivo de estudiar la diversidad de levaduras no-*Saccharomyces* presentes sin la interferencia de las levaduras *S. cerevisiae*.

En la Figura 8 se muestran los porcentajes de cada especie de levadura detectada en el pie de cuba en ambos medios de cultivo.



**Figura 8.-** Porcentaje medio de cada una de las especies de levaduras identificadas en GYP e YPDcc en el pie de cuba.

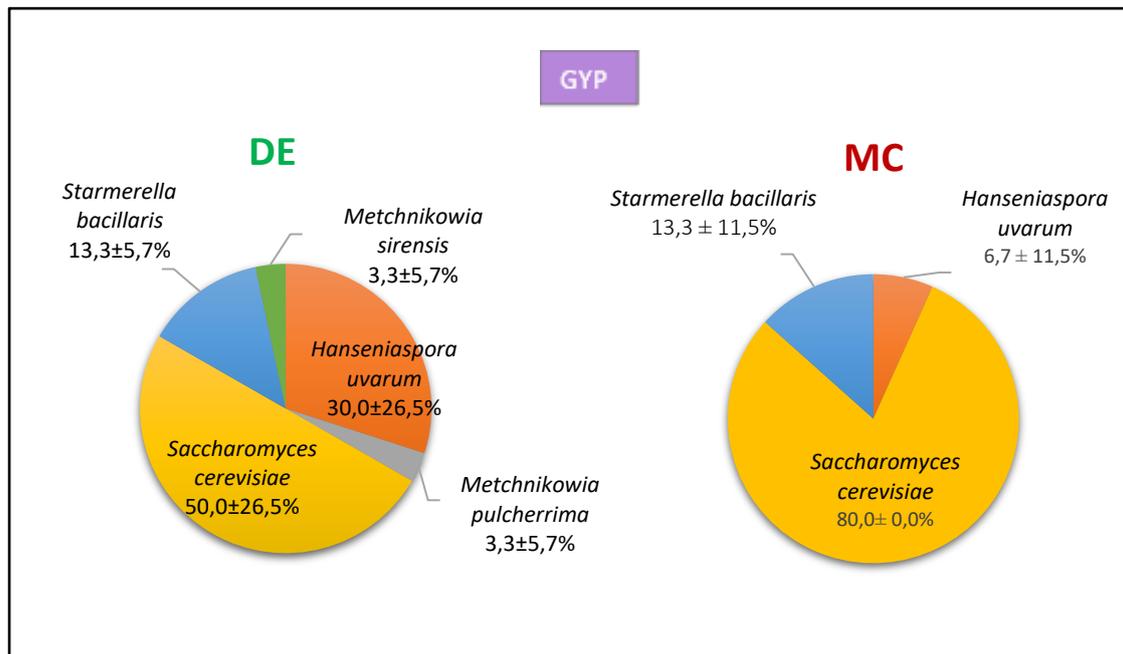
Como se puede observar en la Figura 8 en el medio de cultivo GYP se detectó un 54% de levaduras pertenecientes a la especie *S. cerevisiae*, un 42 % fueron identificadas como *H. uvarum* y el 4 % restante como *M. pulcherrima*. Sin embargo, en el medio YPDcc la totalidad de los aislados se identificó como *H. uvarum*.

Tal y como era previsible, en el pie de cuba *S. cerevisiae* suponía aproximadamente la mitad de la población de levaduras. Hay que tener en cuenta que el pie de cuba llevaba 3 días encubado y no hay que olvidar que esta especie en estadios iniciales no suele ser la mayoritaria. Además, se observó que *H. uvarum* era prácticamente la otra mitad poblacional, lo que coincide con lo establecido por otros autores (Ribereau-Gayon, 2003). Esta especie fue la única aislada en el medio para no-*Saccharomyces*, YPDcc. Por otro lado, en el medio GYP fue posible identificar un porcentaje pequeño (4 %) de otra especie no-*Saccharomyces*, *M. pulcherrima*, que habitualmente se detecta también en etapas iniciales de la FA (Heard y Fleet, 1985), sin embargo, dicha especie no se detectó en el medio YPDcc que recordamos se empleó precisamente para la detección de especies de levaduras no-*Saccharomyces*.

#### 4.2.2. Especies de levaduras identificadas a las 24 horas del encubado.

Tras 24 horas de encubado (toma 1) se recogieron muestras en los 6 depósitos que contenían las elaboraciones tradicional y MC, ambas por triplicado. En este caso todas fueron inoculadas en el medio GYP para detectar levaduras totales.

En la Figura 9 se muestran los porcentajes de cada especie de levadura detectada 24 h después del encubado en el medio GYP.



**Figura 9.-** Porcentaje medio y desviación estándar de cada una de las especies de levaduras identificadas a las 24 h del encubado en las elaboraciones de maceración carbónica (MC) y de elaboración tradicional por despalillado y estrujado (DE).

Como se puede observar en la Figura 9 en la elaboración tradicional (DE) *S. cerevisiae* fue el 50% del total de levaduras identificadas. Sin embargo, en la MC su porcentaje aumentó y pasó a ser el 80% de la población de levaduras aisladas identificada. En el DE se encontró más diversidad de levaduras no-*Saccharomyces*. Apareció *H. uvarum* en un 30%, *St. bacillaris* en un 13,3% y las levaduras *M. sirensis* y *M. pulcherrima* igualados con un 3,3 %. Por otro lado, en la MC estas dos últimas levaduras no se detectaron, mientras que *St. bacillaris* se mantuvo en un 13,3% y *H. uvarum* estuvo presente en un porcentaje cinco veces menor que en DE, un 6,7%.

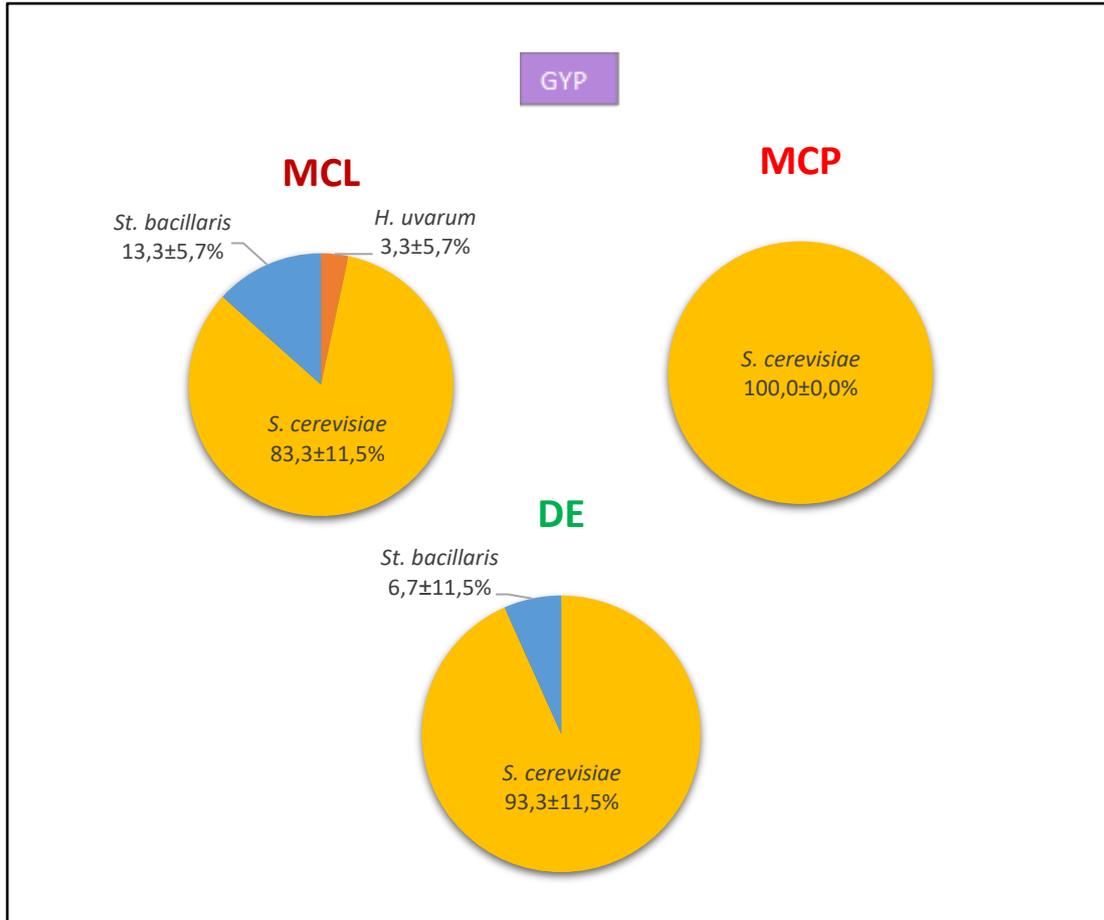
Los resultados de la elaboración tradicional coinciden con la teoría citada en la introducción en referencia a la presencia moderada del género *Saccharomyces* al inicio de la fermentación. Sin embargo, en la MC el porcentaje aumenta. Este hecho podría deberse a que en esta vinificación las condiciones de los depósitos en las primeras 24 horas (menos dosis de sulfuroso y menor dilución del pie de cuba, conllevando mayor proporción inicial de levaduras fermentadoras), favorecieron el desarrollo de las levaduras presentes en el pie de cuba, principalmente la especie fermentadora por excelencia *S. cerevisiae*. Por este motivo, la FA se produjo de forma rápida (datos no mostrados) tal y como indicaban Flanzky et al. (2010) por lo que también las levaduras *S. cerevisiae* fueron más abundantes en los depósitos de MC y la diversidad fue menor. Otro motivo de esa elevada presencia de *S. cerevisiae* en MC, podría ser que esta especie se adapta mejor a las condiciones de anaerobiosis que se encuentran en el depósito durante el encubado de la vinificación por MC.

#### **4.2.3. Especies de levaduras identificadas en fermentación alcohólica tumultuosa.**

Durante la FA (toma 2) se muestreó a densidad 1.025, pero en este caso se muestrearon 9 depósitos en total porque cada depósito vinificado por MC dio lugar a dos fracciones, lágrima (MCL) y prensa (MCP), además de la elaboración tradicional por despalillado y estrujado (DE).

Al fijar el muestreo de esta toma 2 a densidad 1.025, en DE y MCL las muestras se recogieron antes del descube mientras que los depósitos de MCP se muestrearon tras el descube. Todas las muestras se sembraron en el medio de cultivo GYP para detectar levaduras totales y en YPDcc para aislar levaduras no-*Saccharomyces*.

En la Figura 10 se muestran los porcentajes de cada especie de levadura detectada en FA tumultuosa en el medio de cultivo GYP.



**Figura 10.-** Porcentaje medio y desviación estándar de cada una de las especies de levaduras identificadas en fase tumultuosa de la FA en las elaboraciones de maceración carbónica lágrima (MCL), maceración carbónica prensa (MCP) y de vinificación tradicional por despalillado y estrujado (DE).

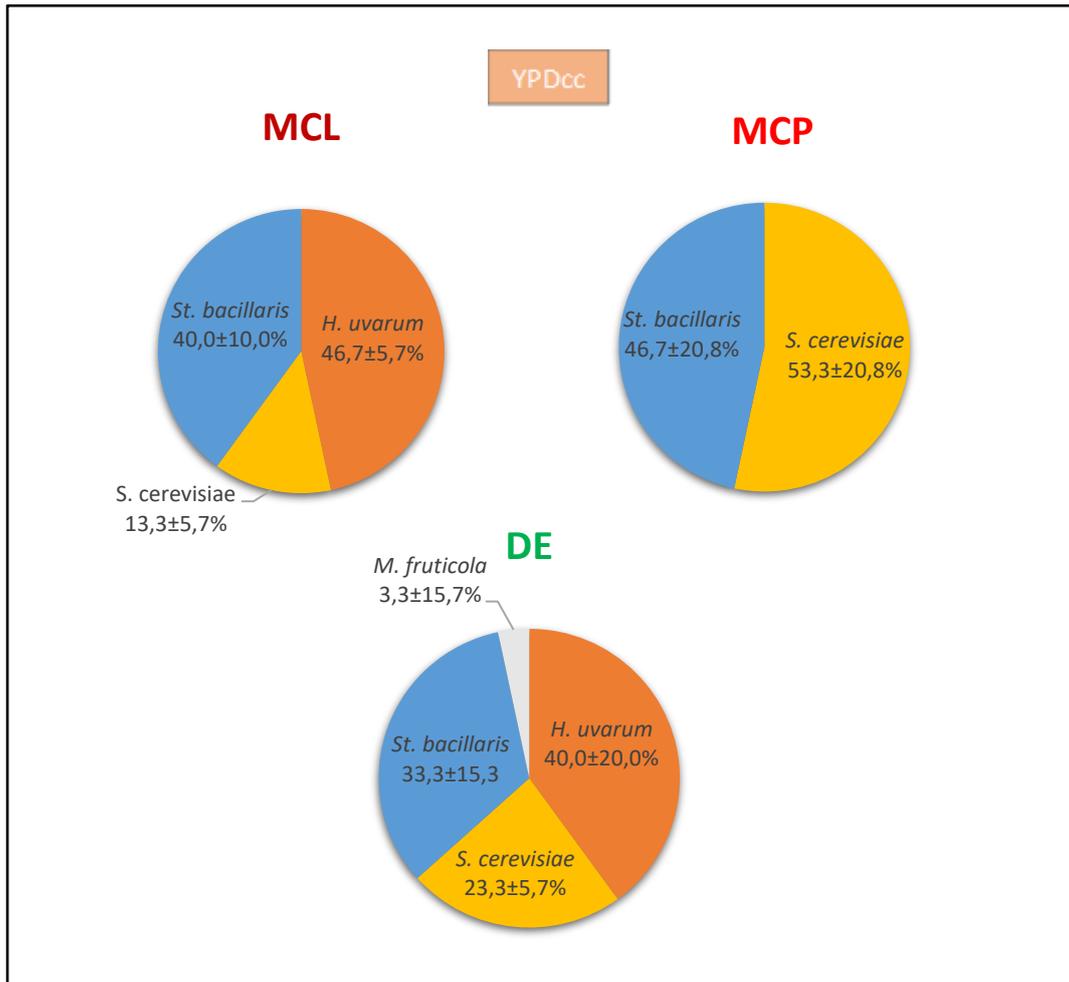
Tal y como era de esperar, en plena fermentación tumultuosa *S. cerevisiae* que es la levadura fermentadora por excelencia, fue la mayoritaria con el consiguiente descenso de las levaduras no-*Saccharomyces* respecto a los muestreos anteriores (Carrascosa et al., 2005). En la Figura 10 se puede apreciar que *S. cerevisiae* se identificó en un 83,3% en la MCL y aumentó a un 100% en la MCP. Sin embargo, en la vinificación tradicional (DE) el porcentaje fue de un 93,3%, intermedio entre las otras dos elaboraciones. En cuanto a las levaduras no-*Saccharomyces*, solo se detectaron dos especies en GYP, *St. bacillaris* en un 13,3% en MCL y en un 6,7% en DE y *H. uvarum* que solo aparecieron en un 3,3% en la MCL.

Las fracciones que en esta toma serían comparables son la DE y MCL porque en ambos casos el mosto analizado lleva los mismos días fermentando y en condiciones similares. Como se puede observar, la distribución de levaduras entre ambas vinificaciones es muy similar. Sin embargo, la fracción MCP se obtuvo posteriormente a

partir de la fermentación del mosto procedente de uvas enteras que dieron lugar a un mosto con alta concentración de azúcares. Estas diferencias se tradujeron en diversidades de especies diferentes, siendo *S. cerevisiae* la única identificada con GYP en la MCP.

Curiosamente, la diversidad de levaduras descrita anteriormente en los depósitos de MC de la toma 1, fue prácticamente la misma que la descrita en la FA tumultuosa de la MCL.

En la Figura 11, mostrada a continuación, se detallan los porcentajes de cada especie de levadura detectada en fermentación tumultuosa en el medio de cultivo YPDcc. A pesar de que la cicloheximida se utilizó para inhibir levaduras de la especie *S. cerevisiae*, podemos observar que se detectaron levaduras de esta especie, aunque en menor porcentaje que en el medio GYP. Ello podría deberse a diferencias en la resistencia a este compuesto dentro de los diferentes clones de *S. cerevisiae* presentes en el depósito de fermentación (Pozo Moreno, 1991).



**Figura 11.-** Porcentaje medio y desviación estándar de cada una de las especies de levaduras identificadas en YPDcc en fase tumultuosa de FA en las elaboraciones de maceración carbónica lágrima (MCL), maceración carbónica prensa (MCP) y de vinificación tradicional por despalillado y estrujado (DE).

Se apreció también que la identificación de especies no-*Saccharomyces* fue mucho mayor en el medio YPDcc que en el GYP, tal y como se esperaba, porque ese medio se empleó con esa finalidad.

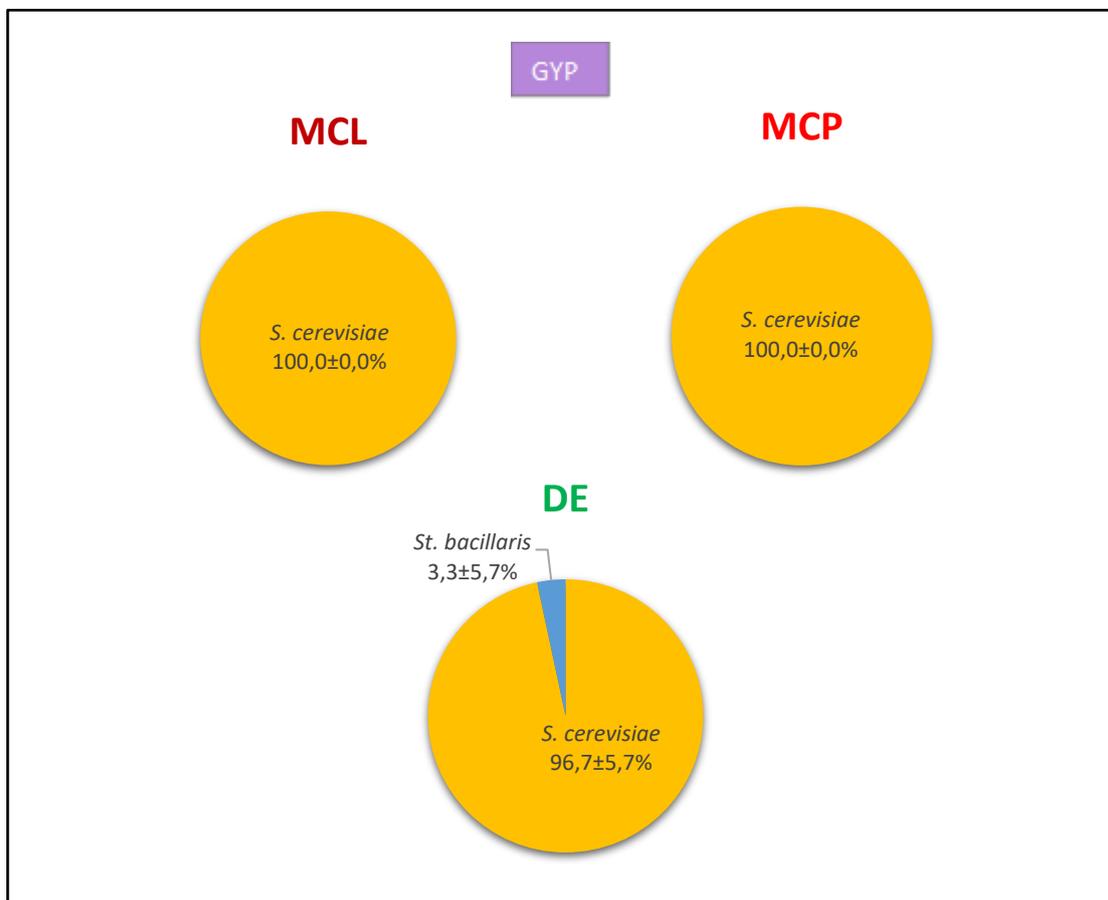
Si nos centramos en la Figura 11, se puede observar como *H. uvarum* predominó en las elaboraciones MCL (46,7%) y DE (40,0%), sin embargo, no se detectó esta especie en la MCP. *St. bacillaris* por el contrario, si apareció en las tres elaboraciones, en un 46,7% en la MCP, con un 40,0% en MCL y en un 33,3% en la elaboración tradicional. Solamente en esta última vinificación se identificó una nueva levadura, *Metschnikowia* (*M.*) *fruticola*, con un 3,3% de media.

En esta etapa de vinificación nos volvimos a encontrar con que la microbiota presente en DE y MCL fue similar y diferente a MCP. Las razones serían similares a las indicadas en el muestreo de 24 horas.

#### 4.2.4. Especies de levaduras identificadas al final de la fermentación alcohólica.

La toma 3 se realizó una vez terminada la FA en el medio GYP para detectar levaduras totales. Se muestrearon las vinificaciones de MC lágrima, prensa y despalillado/estrujado por triplicado.

En la Figura 12 se muestran los porcentajes de cada especie de levadura detectada en fin de FA en el medio de cultivo GYP.



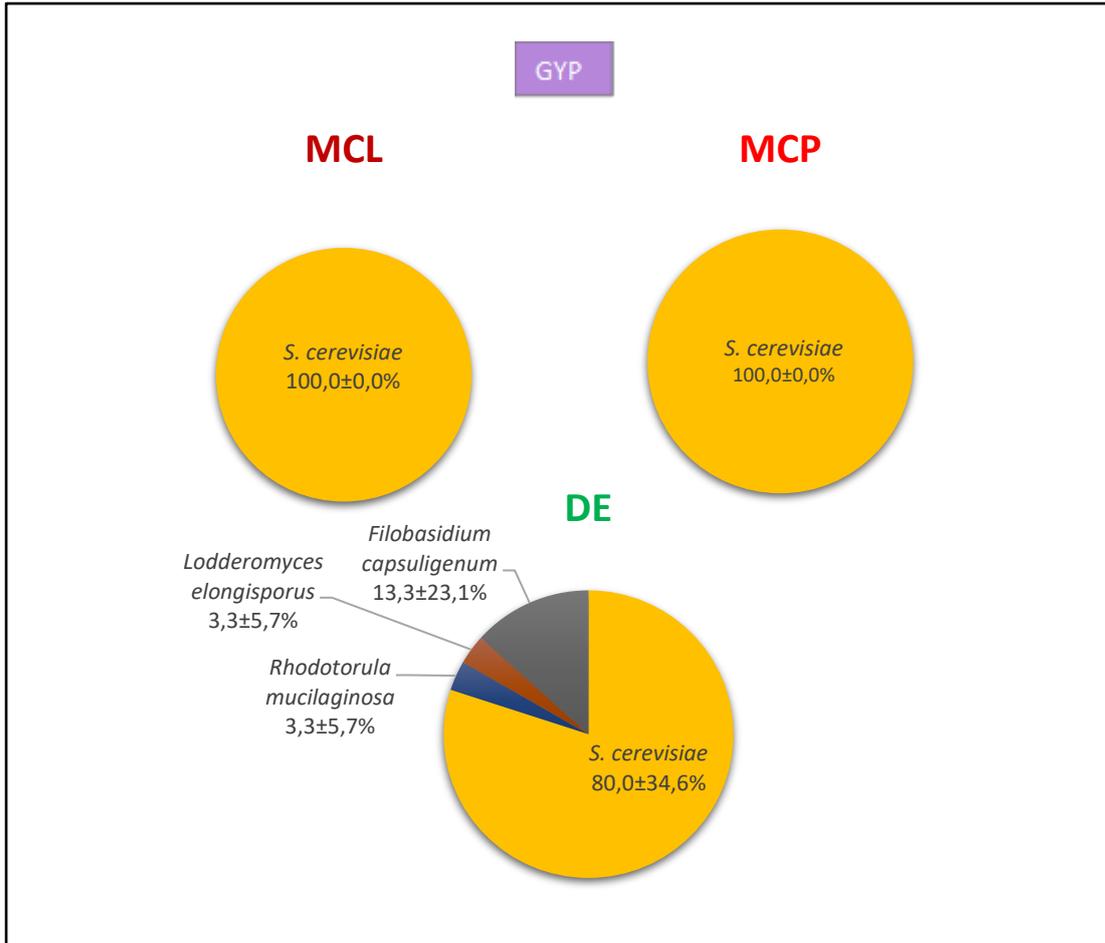
**Figura 12.-** Porcentaje medio y desviación estándar de cada una de las especies de levaduras identificadas en GYP en fase al final de FA en las elaboraciones de maceración carbónica lágrima (MCL), maceración carbónica prensa (MCP) y de vinificación tradicional por despalillado y estrujado (DE).

La totalidad de las cepas que se identificaron tras acabar la FA fueron *S. cerevisiae* en las muestras de MCL y MCP., excepto en la vinificación clásica (DE) donde se detectó un pequeño porcentaje de *St. bacillaris* (3,3%) que continúa acompañando a la levadura *S. cerevisiae*, que es el agente microbiológico encargado de completar la FA, de ahí su presencia mayoritaria en etapas fermentativas. Sin embargo, en este caso en particular, en la elaboración tradicional se detectó otra especie de levadura no-*Saccharomyces*, *St. bacillaris*, aunque con un porcentaje minoritario. Según algunos autores, el pequeño porcentaje de levaduras no-*Saccharomyces* que sobreviven y por lo tanto contribuyen a la fermentación, podrían influir de forma directa en la calidad organoléptica del vino final (Gutiérrez-López, 2017).

#### **4.2.5. Especies de levaduras identificadas al final de la fermentación maloláctica.**

En la última fase del muestreo (toma 4) se recogieron muestras de las tres vinificaciones por triplicado (maceración carbónica lágrima, prensa y despalillado y estrujado) una vez finalizada la FML. Las muestras se inocularon en el medio de cultivo GYP para detectar levaduras totales y en el medio DBDM para aislar *Brettanomyces*.

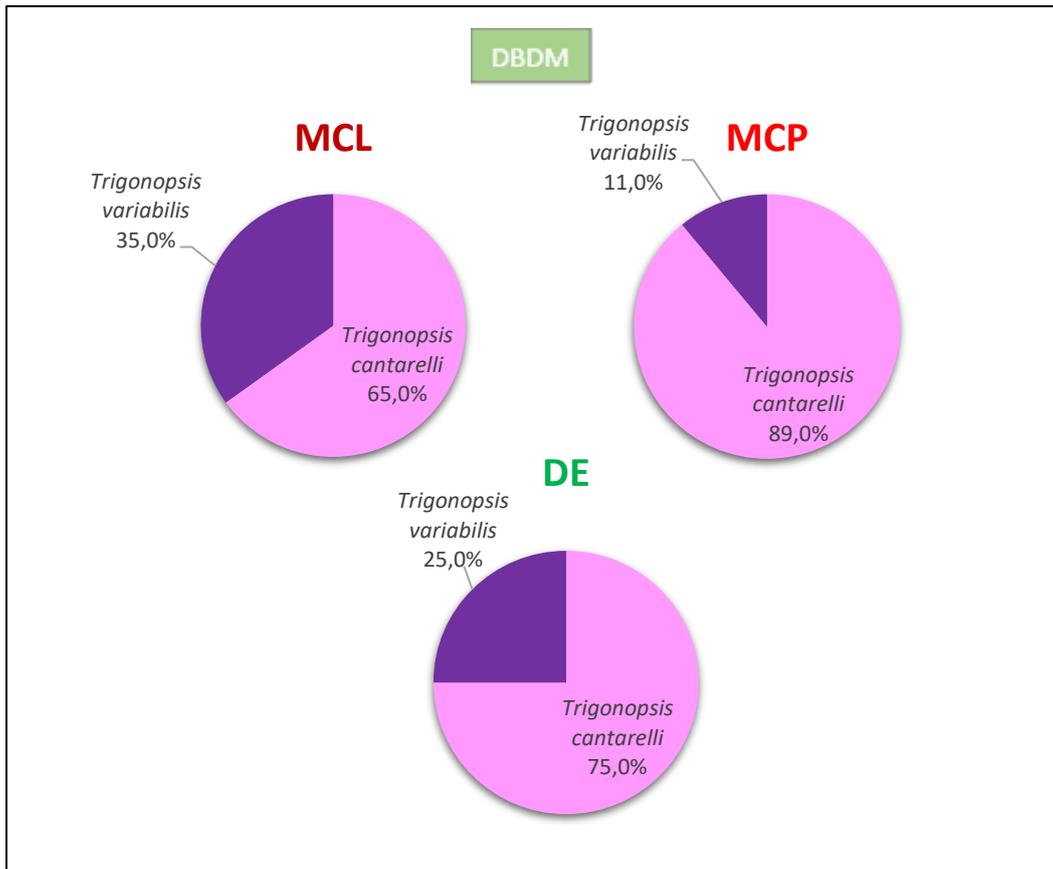
A continuación, en la Figura 13 se muestran los porcentajes de cada especie de levadura detectada en el pie de cuba en ambos medios de cultivo.



**Figura 13.-** Porcentaje medio y desviación estándar de cada una de las especies de levaduras identificadas en GYP al final fermentación maloláctica de maceración carbónica lágrima (MCL), maceración carbónica prensa (MCP) y de vinificación tradicional por despalillado y estrujado (DE).

Como se puede comprobar en la Figura 13, en el medio de cultivo GYP se detectó un 100% de levaduras *S. cerevisiae* en la MC tanto en la lágrima como en la prensa, exactamente igual que el resultado observado en la etapa anterior. Sin embargo, en la vinificación tradicional, *S. cerevisiae* fue un 80% de los aislados totales, apareciendo tres especies diferentes que no se habían detectado en todo el proceso de elaboración: *Filobasidium (F.) capsuligenum*, *Lodderomyces (L.) elongisporus* y *Rhodotorula (R.) mucilaginosa*. Ciertos autores destacan la importancia de estudiar estas especies poco convencionales no solo por el impacto que tienen en los vinos finales, sino también, por la alta tolerancia que tienen al alcohol o a los altos pHs como en es el caso de *L. elongisporus*, aspecto muy interesante teniendo en cuenta la subida de estos debido al cambio climático (Ruíz et al., 2019).

A continuación, se muestra en la Figura 14 se muestran los porcentajes de las levaduras identificadas en el medio de cultivo DBDM.



**Figura 14.-** Porcentaje medio de cada una de las especies de levaduras identificadas en DBDM al final FML de maceración carbónica lágrima (MCL), maceración carbónica prensa (MCP) y de vinificación tradicional por despalillado y estrujado (DE).

Como se puede observar en la Figura 14, en el medio de cultivo DBDM, selectivo para *Brettanomyces*, no se aisló ninguna cepa de dicha especie. Sin embargo, fueron dos las especies detectadas en este medio: *Trigonopsis (T.) cantarelli* y *Trigonopsis (T.) variabilis*. *T. cantarelli* identificada en un 65,0% en MCL, un 75,0% en MCP y con un 89,0% en DE. y *T. variabilis* aislada en un 35,0%, 25,0% y 11,0% respectivamente. Barbosa-Portugal (2012) afirma que *T. cantarelli* se ha relacionado con alteraciones sensoriales, desviaciones aromáticas y evoluciones a colores marrones en los vinos, pero en menor medida que *Brettanomyces*. Aunque no hay olvidar que su presencia no se detectó con el medio GYP, por lo que su importancia entre las levaduras totales no debía ser muy elevada, sino una mera presencia residual.

## 5. Conclusiones

Bajo las condiciones de trabajo en que se realizó este estudio, se pueden establecer las siguientes conclusiones:

1. El método MALDI-TOF es un sistema rápido, barato y eficaz para la identificación de levaduras enológicas debido al porcentaje tan elevado (85%) de levaduras identificadas. Cabe destacar que no todos los aislados fueron identificados en el primer análisis.
2. Para la identificación correcta de levaduras por el método MALDI-TOF es requisito indispensable que los microorganismos a identificar estén incluidos en la base de datos MALDI Biotyper.
3. El método más adecuado de preparación del cultivo de levaduras para su identificación por la técnica MALDI-TOF es la extracción directa en placa con ácido fórmico.
4. La diversidad de levaduras analizada por el método MALDI-TOF fue mayor en la elaboración tradicional que en las vinificaciones por maceración carbónica.

En términos generales, se podría concluir que la técnica de MALDI-TOF es perfectamente válida para el estudio de diversidad microbiológica de levaduras en la vinificación, siempre y cuando la base de datos sea completa y esté actualizada. El porcentaje de fallo se puede compensar con la secuenciación de las cepas no identificadas.

Al aplicar esta técnica a la comparación de levaduras presentes en la vinificación por maceración carbónica y por el sistema despalillado y estrujado, se pudo observar que la diversidad de levaduras fue mayor en la elaboración tradicional que en las vinificaciones por maceración carbónica, especialmente tras la fase de fermentación alcohólica tumultuosa.

## 6. Bibliografía

- . Baleiras Couto M.M., Eijmsa B., Hofstra H., Huis in't Veld J.H. y van der Vossen, J.M. **1996**. *Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among Saccharomyces cerevisiae strains*. Applied and Environmental Microbiology. 62: 41-46.
- . Barbosa-Portugal C, **2012**. *Detección y caracterización de Brettanomyces bruxellensis y Trigonopsis cantarellii en el contexto enológico*. Tesis doctoral. Dialnet. Recuperada de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=40441>
- . Bauer F. y Pretorius I., **2000**. *Yeast stress response and fermentation efficiency: how to survive the making of wine*. South African Journal of Enology and Viticulture. 21(1): 27-51.
- . Carro D. y Piña B., **2000**. *Identificación de cepas de levadura de interés enológico*. Instituto de Biología Molecular de Barcelona. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). ACE Revista de Enología.
- . Charoenchai C., Fleet G., Henschke P. y Todd B. **1997**. *Screening of non-Saccharomyces wine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes*. Australian Journal of Grape and Wine Research. 3(1): 2-8.
- . Bruker. *MALDI Biotyper Protocol Guide*. **2015**. Edition 3.
- . Carrascosa A.; Muñoz R. y González R. **2005**. *Microbiología del vino*. Madrid, AMV Ediciones.
- . Croxatto A., Prod'hom G. y Greub G. **2012**. *Applications of maldi-tof mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology*. FEMS Microbiology Reviews. 36(2): 380-407.
- . Escribano-Viana R., González-Arenzana L., Portu J., Garijo P., López-Alfaro I., López R., Santamaría P. y Gutiérrez A.R., **2018**. *Wine aroma evolution throughout alcoholic fermentation sequentially inoculated with non-Saccharomyces/Saccharomyces yeast*. Food Research International. 112: 17-24.
- . Etaio I.; Pérez-Elortondo F.J.; Albisu M.; Gaston E.; Ojeda M. y Schlich P. **2008**. *Effect of winemaking process and addition of white grapes on the sensory and physicochemical characteristics of young red wines*. Australian Journal of Grape and Wine Research. 14: 211-222.

- . Fernández-Espinar M., López V., Ramón D., Bartra E. y Querol A. **2001**. *Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques*. International Journal of Food Microbiology. 70: 1-10.
- . Flanzy C.; Flanzy M. y Benard P. **2010**. *La vinificación por maceración carbónica*. Madrid, AMV Ediciones.
- . Fleet G. y Heard G., **1993**. *Yeast-growth during fermentation*. In: *Wine, Microbiology and Biotechnology*. Fleet G.H editor. Lausanne, Harwood Academic. P: 27-54.
- . Gil-Gonzalo A. **2019**. *Espectrometría MALDI-TOF aplicada a levaduras enológicas: identificación*. Trabajo de Fin de Grado. Facultad de Ciencias. Universidad de Valladolid. Recuperado de <http://uvadoc.uva.es/handle/10324/38124>
- . González-Arenzana L.; Santamaría R.; Escribano-Viana R.; Portu J.; Garijo P.; López-Alfaro I.; López R.; Santamaría P.; Gutiérrez A. **2020**. *Influence of the carbonic maceration winemaking method on physicochemical, colour, aromatic and microbiological features of tempranillo red wines*. Food Chemistry. 319. 126569.
- . Gutiérrez Fernández De Piérola J., **2018**. *El papel de la selección de levaduras en la elaboración del vino*. Universidad de Salamanca. CT 10: 169-198.
- . Gutiérrez-López C. **2017**. *Taxonomía de levaduras de origen enológico por espectrometría de masas*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Complutense de Madrid. Recuperado de <https://eprints.ucm.es/id/eprint/42698/1/T38793.pdf>
- . Heard G. y Fleet G. **1985**. *Growth of natural yeast flora during the fermentation of inoculated wines*. Applied and Environmental Microbiology. 50: 727-728.
- . Hoffmann E. y Stroobant V. **2007**. *Mass Spectrometry: principles and applications*. Wiley, 3<sup>rd</sup> ed.
- . Karas M., Bachmann D., Bahr U. y Hillenkamp F. **1987**. *INT. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 78: 53-68.
- . Kurtzman C.P. y Robnett C.J. **1998**. *Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences*. Antonie Van Leeuwenhoek. 73: 331–371.
- . Lartigue M.F. **2013**. *Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for bacterial strain characterization*. Infection, Genetics and Evolution. 13:230-235.

- . Plamen D., Yeng-Peng H., Ryzhov V. y Fenselau C. **1999**. *Microorganism identification by mass spectrometry and protein database searches*. Anal. Chem. 71, 14: 2732-2738.
- . Pozo Moreno L., **1991**. *Determinantes genéticos de Resistencia a cicloheximida como marcadores de selección dominante en la transformación de Saccharomyces cerevisiae*. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- . Pramateftaki P.V., Lanaridis P. y Typas M.A. **2000**. *Molecular identification of wine yeasts at species or strains level a case study with strains from two vine-growing areas of Grece*. Journal of Applied Microbiology. 89: 236-248.
- . Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., Doneche B., Lonvaud A., Glories Y. y Maugean A. **2003**. *Tratado de Enología*. Buenos Aires, Hemisferio Sur.
- . Ruíz J., Ortega N., Martín-Santamaría M., Acedo A., Marquina D., Pascual O., Rozès N., Zamora F., Santos A., y Belda I. **2019**. *Occurrence and enological properties of two new non-conventional yeast (Nakazawaea ishiwadae and Lodderomyces elongisporus) in wine fermentations*. International Journal of Food Microbiology. 305: 108255.
- . Yamamoto Y., Miyashita M., Hughson R.L., Tamura S., Shinohara M. y Mutoh Y. **1991**. *The ventilatory threshold gives maximal lactate steady state*. European Journal of Applied Physiology. 63 (1): 55-9.

