



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

**Espectrometría MALDI-TOF aplicada a levaduras enológicas:
identificación.**

Autor:

Andrea Gil Gonzalo

Tutores:

Susana Blanco Rodríguez

Juan Carlos López Alonso

Gabriel Alberto March Rosselló

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a varias personas y entidades la ayuda que me han prestado en la realización de este Trabajo de Fin de Grado, con el que culmina mi formación como Graduada en Química por la Universidad de Valladolid.

En primer lugar quiero agradecer a mis tutores, Susana y Juan Carlos, por la implicación, orientación y paciencia que me han brindado a lo largo de todo este tiempo. A Gabriel, por dedicarnos su tiempo y sus conocimientos en microbiología.

A la Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León, por permitirnos realizar este trabajo gracias a la financiación obtenida a través del proyecto "*Identificación de Microorganismos de Interés Microbiológico y Alimentario mediante Desorción Láser y Espectrometría de Masas (MALDI-TOF)*" VA334U14.

La realización de este trabajo no habría sido posible sin la ayuda recibida por parte de la Familia Luis Cañas, en concreto de la Bodega Dominio de Cair, proveedora altruista de casi la totalidad de las muestras. Gracias a su equipo, Paco, Raúl, Eloy, Ana, David, Tere, Conchi, Zhuo y Juan Luis, por su compañerismo y buenos ratos hasta en las pesadas jornadas de vendimia. Pero en especial, quiero agradecer a Daniel Martínez, director técnico y enólogo de la bodega, excelente jefe y tutor, que ha sabido transmitirme sus conocimientos y crear en mí un interés por el mundo de la Enología.

A Carlos, a mis amigos y compañeros de Universidad, por hacerlo todo más sencillo y positivo.

Finalmente, me gustaría agradecer a mi hermana Sara, y sobretodo a mis padres, Juan Carlos e Inma, por su apoyo incondicional durante esta dura etapa. Vosotros habéis sido el principal impulso y motivación, que han conseguido que hoy esté aquí.

A todos, muchas gracias.

1 RESUMEN	5
2 ABSTRACT	6
3 INTRODUCCIÓN	7-16
3.1. Historia de la identificación de levaduras: métodos clásicos y moleculares.	7-8
3.2. Aspectos generales de la espectrometría de masas (MS).	8-10
3.2.1. Breve historia de la espectrometría de masas.	8-9
3.2.2. Fundamentos de la espectrometría de masas.	9-10
3.3. MALDI-TOF MS.	10-12
3.3.1. Analizadores: TOF.	10-11
3.3.2. Desorción Láser (LD).	11-12
3.4 Microbiología del vino.	12-16
3.4.1. Levaduras enológicas: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13-16
4 OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	17
5 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL Y MATERIALES	18-45
5.1 Toma de muestras.	18-21
5.2 Etiquetado, cultivo y aislamiento de cepas.	21-23
5.3 Conservación/congelación de viales.	23-25
5.4 Recuperación de viales (resiembra).	25-26
5.5 Adquisición y recuperación de cultivos liofilizados (CECT).	26-28
5.6 Preparación de reactivos.	28-30
5.7 Transferencia a la placa MALDI.	30-33
5.8 Registro del espectro de masas MALDI-TOF.	33-45
5.8.1. Fuente de ionización MALDI.	35-37
5.8.2. Analizador de masas TOF.	37-42
5.8.3. Detector de iones.	43
6 RESULTADOS	46-51
6.1 Procesado de espectros (recalibrado).	46-47
6.2 Generación de los MSP (<i>Main Spectrum Profile</i>).	47
6.3 Dendrograma.	48-49
6.4 Identificación (comparación con bases de datos).	50-51
7 CONCLUSIONES	52-53
8 ANEXOS	54-70
9 GLOSARIO	71-72

1. RESUMEN

La espectrometría de masas de desorción/ionización láser asistida por matriz con tiempo de vuelo, conocida en inglés como *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry* (MALDI-TOF MS), es una poderosa técnica que ha revolucionado el campo de la identificación microbiana en los últimos años.

La fácil obtención de un espectro único basado en el perfil proteico de los organismos, la ha convertido en una herramienta fundamental para los diagnósticos clínicos, por su precisión, rapidez y bajo coste.

Se ha demostrado que es una técnica fiable y efectiva en la identificación de bacterias, y aunque en la identificación de hongos filamentosos no lo es tanto, actualmente se está aplicando en la identificación de levaduras enológicas.

En la enología moderna es de vital importancia el reconocimiento de las levaduras, partícipes fundamentales del proceso de fermentación, para la producción adecuada y óptima de vino. Actualmente, existen numerosas técnicas de biología molecular, además de los métodos clásicos, capaces de proporcionar las identidades genéticas de las levaduras utilizadas en las vinificaciones.

Nuestro propósito en este trabajo de fin de grado, es determinar si la espectrometría de masas MALDI-TOF, es una técnica adecuada para la identificación de este tipo de levaduras. Para ello, analizaremos a lo largo de todo el proceso de vinificación diversas muestras obtenidas de la bodega Dominio de Cair, perteneciente a la Denominación de Origen Ribera del Duero, durante la vendimia del año 2016.

2. **ABSTRACT**

Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) is a powerful technique that has revolutionized the field of identification of microorganisms in recent years. This technique has become an essential tool for clinical diagnoses, due to its precision, speed and low cost by creating an unique mass spectrum based on the protein profile of microorganisms.

It has been shown that MALDI-TOF MS is an effective and reliable tool for the generation of high-quality bacterial mass spectra. Although the identification of filamentous fungi is not as efficient as bacterial ones, its application in the identification of wine yeast is a growing field.

In modern oenology, it is of vital importance the recognition of yeasts, which are fundamental participants in the fermentation process, for the appropriate and optimal wine production. Currently, in addition to conventional methods, there are numerous techniques of molecular biology capable of providing the genetic identities of the yeasts used in winemaking.

The purpose of this project is to prove if MALDI-TOF MS is a suitable technique for the identification of this type of yeasts. Several samples from Dominio de Cair winery, belonging to Ribera del Duero Origin Denomination, were analysed throughout the whole process of winemaking. The samples were taken during the grape harvest of 2016.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Historia de la identificación de levaduras: métodos clásicos y moleculares.

A lo largo del s. XX, se produjo un aumento significativo en el número de identificaciones y clasificaciones de las levaduras. Autores como Lodder (1952 y 1970), Kreger Van Rij (1952 y 1984), Fell (1998) o Kurtzman (2011) fueron algunos de los pioneros en plasmar sus avances en las sucesivas ediciones de "*The yeasts: a taxonomic study*".¹ En estos trabajos se estableció el concepto de levadura como: "hongo u organismo eucariota, unicelular, que se reproduce por gemación o fisión binaria".¹

Los primeros métodos de caracterización e identificación de levaduras, conocidos como métodos clásicos, se basaban en aspectos morfológicos como el tipo de reproducción o la forma de la colonia entre otros, así como también en propiedades fisiológicas, entre las que destacan su poder fermentativo, la asimilación de azúcares y nitratos o la resistencia a diferentes temperaturas.² Sin embargo, estos complejos procesos basados en pruebas fenotípicas, no son completamente fiables y reproducibles, y suelen conducir a identificaciones erróneas, además de conllevar un enorme gasto de tiempo.

A partir de los años 80, los métodos clásicos de identificación fueron sustituidos por los moleculares,³ dividiéndose en dos grupos principales, identificaciones a nivel de especie e identificaciones a nivel de cepa. Entre las identificaciones a nivel de especie podemos encontrar las recogidas en la *Tabla 1*:^{2,3,4}

Tabla 1-. Principales métodos moleculares de identificación a nivel de especie.

MÉTODOS MOLECULARES (identificaciones a nivel de especie)
Comparación de la composición de bases del ADN (<i>ácido desoxirribonucleico</i>).
Reasociación del ADN .
Secuenciación de genes ribosomales para generar relaciones filogenéticas.
RFLP (<i>polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción</i>): Análisis de perfiles de restricción de ADNr (<i>ADN ribosómico</i>).
Separación de las cadenas de ADN seguida de una amplificación de una región del genoma por PCR (<i>Reacción en cadena de Polimerasa</i>). Sometida posteriormente a una electroforesis en gel de poliacrilamida.
FISH (<i>Hibridación in situ fluorescente</i>), sondas de ADN o ARN marcados y un fluorocromo.

¹: Cletus P. Kurtzman , J. W. Fell, Teun Boekhout. *THE YEAST A TAXONOMIC STUDY*. Elsevier, 5th ed. (2011); Chapter 1.

²: David Carro, Benjamí Piña. *IDENTIFICACIÓN DE CEPAS DE LEVADURA DE INTERÉS ENOLÓGICO*. ACE Revista de Enología. (2007); 84.

³: Federico Castellucci. *HERRAMIENTAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR PARA IDENTIFICAR LA LEVADURA DE VINIFICACIÓN SACCHAROMYCES CEREVISAIE Y OTRAS ESPECIES DE LEVADURAS RELACIONADAS CON LA VINIFICACIÓN*. OIV, Resolución OIV-OENO. (2011); 408.

Por otro lado, dentro de las identificaciones a nivel de cepa, los métodos más destacados son los reflejados en la *Tabla 2*:^{2,3,4}

Tabla 2-. Principales métodos moleculares de identificación a nivel de cepa.

MÉTODOS MOLECULARES (identificaciones a nivel de cepa)
Cariotipo o separación de cromosomas en PFGE (<i>Electroforesis en gel de campos pulsados</i>).
Análisis de restricción de ADNmt (<i>ADN mitocondrial</i>).
RAPD-PCR (<i>Random Amplified Polymorphic ADN-PCR</i>), amplificar al azar secuencias mediante oligonucleótidos.
Amplificación de microsatélites.
Secuencias delta (δ), método no válido en levaduras no-Saccharomyces.
AFLP (<i>Amplified Fragment Length Polimorphism</i>), amplificación selectiva mediante PCR. Requiere una alta inversión.
Microarrays.
PCR a tiempo real.

Algunos de estos métodos se siguen utilizando en la actualidad, aunque el desarrollo constante de nuevas técnicas y mejoras ha supuesto que muchos otros caigan en desuso. Hoy por hoy disponemos de suficientes técnicas de biología molecular capaces de proporcionar una buena diferenciación y caracterización de levaduras.

3.2. Aspectos generales de la espectrometría de masas (MS).

3.2.1. Breve historia de la espectrometría de masas.

Los orígenes de la espectrometría de masas (MS) están ligados al desarrollo de la Física. Por ejemplo, en el año 1897, Joseph John Thomson realizó diversos experimentos que le llevaron al descubrimiento del electrón y su relación carga/masa. A partir de ahí, en 1912, construyó el primer espectrómetro de masas (denominado Espectrógrafo de parábola), con el que obtuvo los espectros de masas de O₂, N₂, CO, CO₂ y COCl₂. En él, los iones se separaban por sus distintas trayectorias parabólicas en campos electromagnéticos y la detección era registrada por los choques de los iones con una placa fotográfica. En los años siguientes, Francis W. Aston y A. J. Dempster, consiguieron mejorar la resolución del instrumento. Entre los tres, asentaron las bases de la teoría de la MS, que permitió posteriormente a químicos y biólogos, desarrollar mejoras en el diseño para satisfacer sus demandas.⁵

⁴. Antonio Palacios, David Carrillo, Jesús Iruzubieta, Stéphane Boutou, Antoine Fleury, Dominique Labadie, Pascal Chatonnet. *LAS EFICACES TÉCNICAS MOLECULARES DE IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS LEVADURAS ENOLÓGICAS*. Enólogos. (2009); 60:1-11.

⁵. Edmond de Hoffmann and Vicent Stroobant. *MASS SPECTROMETRY: principles and applications*. Wiley, 3rd ed. (2007); Introduction.

En el área de la Química, se precisaba un instrumento que tuviera la suficiente precisión como para ser capaz de analizar elementos químicos y pequeñas moléculas orgánicas. El objetivo, después de varias décadas, se consiguió gracias a los siguientes logros: 1) Los sectores magnéticos de doble enfoque (Aldres O.C. Nier); 2) el análisis por Tiempo de Vuelo (TOF) (William E. Stephens, 1946); 3) el filtro Cuadrupolo (Wolfgang Paul, 1950) acoplado a Cromatografía de Gases (CS) y Cromatografía de Líquidos (CL); 4) Los analizadores de masa por Transformada de Fourier de Resonancia Ion Ciclotrón (FTICR).^{6,7}

A pesar de todos los avances y mejoras de la precisión en la medición de los espectros de masas, durante muchos años esta técnica solo pudo emplearse para el análisis de compuestos termoestables, fácilmente volatilizables y de bajo peso molecular. No fue hasta el desarrollo de las técnicas de ionización suave MALDI (*Matrix-assisted laser desorption/ionization*) y ESI (*Electrospray ionization*), aproximadamente en la década de 1980, cuando esta técnica pudo empezar a utilizarse en el campo de la Biología.^{8,9} John B. Fenn,¹⁰ realizó los primeros análisis de biomoléculas mediante ESI/MS y Koichi Tanaka,¹¹ junto a Michael Karas y Franz Hillenkamp,¹² mediante MALDI. Ambas técnicas de ionización suave, han convertido a la MS, en una técnica de elevada utilidad en los experimentos biológicos tales como la secuenciación y análisis de proteínas de elevado peso molecular o la identificación y clasificación de microorganismos.

3.2.2. Fundamentos de la espectrometría de masas.

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.⁵ Para cumplir estas funciones, los espectrómetros de masas cuentan con cuatro elementos básicos:

⁶. Ayala Bretón Camilo de Regil Hernández Rubén. *SECUENCIACIÓN DE PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS*. (2004).

⁷. Douglas A. Skoog, F. James Holler, Stanley R. Crouch. *PRINCIPLES OF INSTRUMENTAL ANALYSIS*. 6th ed.(2007).

⁸. Elena Jordana-Llunch, Elisa Martró Català, Ausina Ruiz Vicente. *LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA*. Elsevier, Enferm Infecc Microbiol Clin. (2012); 30(10):635–644.

⁹. Ming Zhou, Timothy D. Veenstra. *MASS SPECTROMETRY: M/Z 1983-2008*. Biotechniques. (2008); 44(5):667–670.

¹⁰. John B. Fenn. *ELECTROSPRAY IONIZATION MASS SPECTROMETRY: HOW IT ALL BEGAN*. Journal of Biomolecular Techniques. (2002); 13:101-118.

¹¹. K. Tanaka, Y. Ido, S. Akita. *PROCEEDINGS OF THE SECOND JAPAN-CHINA JOINT SYMPOSIUM ON MASS SPECTROMETRY*. Mass Spectrom. (1988); 2, 151.

¹². M. Karas, U. Barh, F. Hillenkamp. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*. (1989); 92, 231.

- 1) Sistema de inyección: directa o por sistemas de entrada cromatográficos.
- 2) Fuente de ionización: formación del haz de iones en estado gaseoso.
- 3) Analizador de masas: responsable de la separación por su relación masa/carga.
- 4) Sistema detector y registrador: detección, procesamiento y amplificación de la señal.

En la *Figura 1* se representa un diagrama donde se recogen los pasos que tienen lugar en el análisis de muestras por espectrometría de masas.

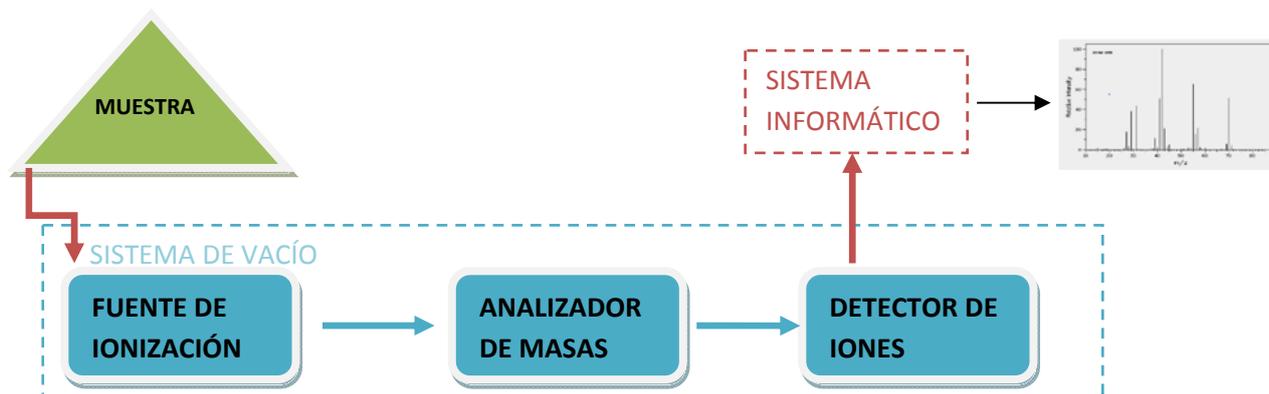


Figura 1. Esquema de las partes fundamentales que integran un espectrómetro de masas.

3.3. MALDI-TOF MS

3.3.1. Analizadores: TOF.

El analizador es el elemento fundamental del espectrómetro de masas. Los analizadores más utilizados son, el de tiempo de vuelo (*Time Of Flight*, TOF), el analizador de cuadrupolo (Q), la trampa de iones (*Ion Trap*, IT) y la resonancia de ión-ciclotrón con transformada de Fourier (*Fourier-Transform Ion Cyclotron Resonance*, FTICR). De todos ellos, el que tiene mayor peso en el área de la microbiología es el analizador tipo TOF.

Aunque la separación de partículas basada en el tiempo de vuelo tiene sus orígenes en 1897, no fue hasta 1946, cuando apareció la primera referencia de su uso gracias a Stephens.¹³ Un par de años después, Cameron y Eggars construyeron el primer espectrómetro de masas con tiempo de vuelo. La falta de resolución fue compensada en la década de los 50 por Wiley y McLaren, quienes diseñaron el primer espectrómetro de masas TOF lineal,¹⁴ como el que se representa en la *Figura 2*.

¹³. D. Holland Ricky., Lay Jr. Jackson O. *RAPID IDENTIFICATION OF BACTERIA BASED ON SPECTRAL PATTERNS USING MALDI-TOF MS*. *Methods in Molecular Microbiology*, (2000); 461.

¹⁴. B. A. Mamyrin. *TIME-OF-FLIGHT MASS SPECTROMETRY (CONCEPTS, ACHIEVEMENTS, AND PROSPECTS)*. *International Journal of Mass Spectrometry*, (2001); 206(3):251-266.

Su fundamento se basa, de forma sencilla, en la aceleración de los iones que provienen de la muestra por medio de la aplicación de un potencial eléctrico. Los iones pueden formarse de forma pulsada en la fuente, donde tras aplicarles el potencial de aceleración, viajan a través de un tubo de vuelo a vacío hasta el detector. Cuanto mayor es la masa del ión, más lentamente se desplaza y por lo tanto, más tarda en llegar al detector.

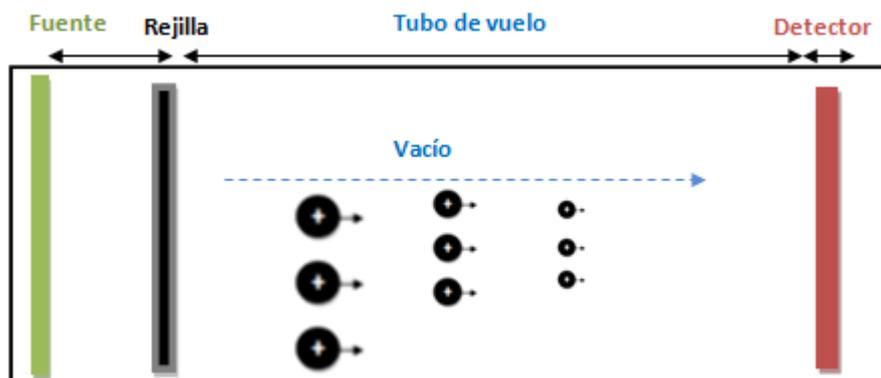


Figura 2. Diagrama de un espectrómetro de masas TOF lineal.

3.3.2. Desorción Láser (LD).

A principios de la década de los 60, comenzaron a realizarse los primeros experimentos con desorción láser (LD). Se demostró que era posible analizar en función de la masa, los iones generados por la aplicación de un pulso láser de alta intensidad a moléculas orgánicas de bajo peso molecular. El mayor inconveniente que presentaba este tipo de fuente de ionización, era que el peso molecular de los analitos no podía superar los 10 kDa.

Además, los pulsos de los láseres eran demasiado largos, lo cual podía provocar la descomposición de las moléculas térmicamente lábiles. En los años 70, se introdujeron avances tecnológicos en los láseres, disminuyendo la duración de sus pulsos (Q-switched), lo que mejoró la aplicabilidad de la técnica. Por último, la corta duración del destello iónico producido por el pulso láser, solo permitía la utilización del analizador de Tiempo de Vuelo (MS/TOF).

Los equipos fueron evolucionando en los siguientes años y finalmente en 1987, se observó que utilizando una fuente láser ultravioleta y embebiendo la muestra en una matriz,¹⁵ se conseguía una ionización "blanda" o "suave", que proporcionaba fragmentos adecuados para la identificación de moléculas lábiles.¹⁶

¹⁵ Karas M.; Bachmann D.; Bahr U.; Hillenkamp F. *INT. J. MASS SPECTROM. Ion Proc.* (1987), 78, 53-68.

¹⁶ Antony Croxatto, Guy Prod'hom, Gilbert Greub. *APPLICATIONS OF MALDI-TOF MASS SPECTROMETRY IN CLINICAL DIAGNOSTIC MICROBIOLOGY*. FEMS Microbiology Reviews. (2012); p.380-407.

Koichi Tanaka (1987) por un lado y Karas y Hillenkamp (1985) por otro, fueron los responsables del desarrollo de la técnica MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*).¹⁷ Los primeros descubrieron que la alanina podía ser más fácilmente ionizada si se mezclaba con triptófano y se irradiaba con un pulso de 266nm.¹⁸ Koichi Tanaka por su parte, recibió en 2002, el Premio Nobel de Química por su "*desarrollo de los métodos de identificación y análisis estructural de macromoléculas biológicas*".¹⁹ Tras diversos estudios, Karas y Hillenkamp consiguieron identificar proteínas con pesos moleculares superiores a los 100000 Da.²⁰

La técnica continuó los siguientes años, mejorando la resolución y aplicabilidad gracias el desarrollo de los sistemas de detección de vuelo, el tipo de láser y la matriz empleada, convirtiéndose en una herramienta elemental, especialmente en el campo de la medicina.²¹ La técnica MALDI-TOF MS es capaz de identificar de manera rápida y fiable proteínas, sin el elevado coste asociado al uso de otras técnicas como la cristalografía de rayos X u otros protocolos convencionales. Muy importante resulta también su empleo dentro de la microbiología, para la caracterización de hongos y bacterias, mediante el sistema denominado "*huella peptídica*".²² Las proteínas del microorganismo objeto de identificación, son hidrolizadas generándose un espectro de masas único para cada organismo. La comparación de esta huella, con la de otras semejantes ya presentes en la base de datos, permite la identificación del microorganismo e incluso la creación de nuevas bases de datos distintas a las comerciales.

3.4. Microbiología del vino.

La transformación de mosto de uva a vino es un proceso complejo que tradicionalmente se ha llevado a cabo mediante la utilización de levaduras presentes en el viñedo y en los equipos de las bodegas. Esta transformación conocida como "*fermentación alcohólica*", se produce generalmente de manera espontánea por la acción de levaduras endémicas.

¹⁷ Griffiths Jennifer. *A BRIEF HISTORY OF MASS SPECTROMETRY*. Anal. Chem. (2008); 80, 5678–5683.

¹⁸ Karas M.; Bachmann D.; Hillenkamp. *INFLUENCE OF THE WAVELENGTH IN HIGH-IRRADIANCE ULTRAVIOLET LASER DESORPTION MASS SPECTROMETRY OF ORGANIC MOLECULES*. Anal. Chem. (1985); 57, 2936-2939.

¹⁹ Koichi Tanaka. *THE ORIGIN OF MACROMOLECULE IONIZATION BY LASER IRRADIATION*. Nobel Lecture. (2002).

²⁰ Karas M.; Bahr U.; Hillenkamp F. *UV LASER MATRIX DESORPTION/IONIZATION MASS SPECTROMETRY OF PROTEINS IN THE 100000 DALTON RANGE*. INT. J. MASS SPECTROM. Ion Proc. (1989); 92, 231-242

²¹ Fátima Galán, Lidia García-Agudo, Inmaculada Guerrero, Pilar Marín, Ana García-Tapia, Pedro García-Martos, Manuel Rodríguez-Iglesias. *EVALUACIÓN DE LA ESPECTROMETRÍA DE MASSAS EN LA IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS DE INTERÉS CLÍNICO*. Elsevier, Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. (2015); 33(6): 372-378.

²² Plamen A. Demirev.; Yen-Peng Ho.; Ryzhov Victor.; Fenselau Catherine. *MICROORGANISM IDENTIFICATION BY MASS SPECTROMETRY AND PROTEIN DATABASE SEARCHES*. Anal. Chem. (1999); 71, 2732-2738.

Las levaduras son organismos que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, pero su población y tipo pueden estar determinados por factores como la temperatura, la lluvia, es decir, las condiciones meteorológicas en general, así como también el grado de madurez en la época de vendimia, el uso de pesticidas y fungicidas, o el daño de insectos y otros animales. Es precisamente esta distribución de las levaduras, determinada temporal y espacialmente, la que confiere al vino unas propiedades organolépticas típicas de la zona, que dejarían de ser características si se utilizara un inhibidor de cepas foráneas o se inocularan otras comerciales en mayor proporción. Sin embargo, la presencia de levaduras autóctonas puede ser beneficiosa o perjudicial para la calidad del producto final. Además de variar las propiedades organolépticas del vino, pueden también modificar la velocidad del proceso de fermentación,²³ pudiendo llegar a producirse, las indeseables "*paradas fermentativas*", ya que no todas las cepas son capaces de resistir las altas temperaturas alcanzadas durante el proceso fermentativo.

En los últimos años, las bodegas están tratando de disminuir al mínimo la utilización de productos externos al vino, dado que se cree que el uso de estos tratamientos comerciales y la falta de fuentes nitrogenadas, está relacionada con la formación de aromas azufrados (sulfhídrico). Además de la mejora de la calidad del vino (aromas y estructuras), la creación de una selección de levaduras propias generaría a la bodega un ahorro considerable, seguridad, automatización y control en el proceso del inóculo, y un importante impluso comercial. Por un lado, se busca promover la "*Enología de Mínima Intervención*",²⁴ pero por el otro, la renuncia a cualquier tipo de tratamiento externo durante el proceso de vinificación supone un riesgo altísimo que no todos los enólogos y bodegas están dispuestos a correr cuando la producción íntegra de una añada está en juego. Además, la falta de publicaciones sobre los efectos beneficiosos de la utilización de la flora nativa, el estricto control que debe realizarse sobre la microbiología de la uva y del vino, el tiempo y el presupuesto necesarios para realizar un proyecto de este tipo, hace que la posibilidad de crear un vino propio y único, quede limitada a ciertas bodegas.

3.4.1. Levaduras enológicas: *Saccharomyces cerevisiae*.

En los mostos y vinos existen diferentes tipos de microorganismos: mohos y levaduras pertenecientes al reino de los hongos y bacterias clasificadas dentro del reino monera. La mayor diferencia entre ambos radica en que las levaduras son microorganismos unicelulares, eucariotas muy simples (con pared celular, citoplasma, membrana citoplasmática y núcleo), frente a las bacterias procariontas.¹

²³ Fleet Graham H.. *YEAST INTERACTIONS AND WINE FLAVOUR*. International Journal of Food Microbiology, 86 (2003); 11-22.

²⁴ Carrau, F.M.. *LEVADURAS NATIVAS PARA ENOLOGÍA DE MÍNIMA INTERVENCIÓN. BIODIVERSIDAD, SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN*. Agrobiencia. (2005); Vol. IX N° 1 y N° 2 pág. 387-399.

Los primeros estudios químicos de la fermentación datan de finales del S. XVIII a manos de Lavoisier, continuados un siglo después por Gay-Lussac. En 1837, Charles Cagnard de La Tour caracteriza las levaduras como materia viva y las responsabiliza de la fermentación de azúcares. Un año después, Meyen emplea por primera vez el término *Saccharomyces*.²⁵ Sin embargo, la mayor evolución se produjo entre los años 1866 y 1876, cuando Louis Pasteur confirmó el papel de las levaduras en la fermentación del vino y la cerveza.²⁶ Demostró además la existencia de distintas cepas y especies de levaduras e intuyó su influencia en las propiedades organolépticas del vino. Desde entonces, sus teorías han sido apoyadas por numerosos estudios gracias a los avances en microbiología, genética y en biología molecular.²⁷

Actualmente la taxonomía reconoce la existencia de hasta 100 géneros de levaduras, distribuidos en más de 700 especies, de las cuales aproximadamente solo unas 20 son relevantes en el campo de la enología, pudiendo ser agentes de fermentación o contaminantes.^{24,28,29} Los criterios de clasificación utilizados por los taxonomistas han evolucionado a lo largo del tiempo. Comenzaron basándose en aspectos morfológicos (tamaño, esporas, forma...), pasando por caracteres fisiológicos (asimilación y fermentación) y en la actualidad están basados en criterios genéticos (similitud de enzimas, de ADN, test de hibridación de esporas).

Pese a que en los racimos la inmensa mayoría de microorganismos presentes son mohos, durante la fase final de maduración se pueden encontrar levaduras. Normalmente, entre el 50-70% corresponden a especies apiculadas como la *Kloeckera* (climas fríos) y *Hanseniaspora* (climas cálidos). El restante porcentaje se atribuye a la especie *Saccharomyces cerevisiae* y a otros géneros de *no-Saccharomyces*.³⁰ En la *Tabla 3* se han recogido las principales especies de levaduras que podemos encontrar en uva y vino, junto con su abundancia y localización.

El ambiente de la bodega es otro gran foco de proliferación de levaduras. Toda la maquinaria y el material que está en contacto con el mosto es susceptible de convertirse en una fuente de estos organismos en las sucesivas añadas, pese a la aplicación de una limpieza exhaustiva de las instalaciones.

²⁵ Meyen J. *Wiegmann Arch. Naturgesch.*(1838); 4, Bd. 2, 100.

²⁶ Louis Pasteur. *ÉTUDES SUR LA BIÈRE*. Gauthier-Villars. (1876).

²⁷ A. Barnett James. *A HISTORY OF RESEARCH ON YEASTS 2: LOUIS PASTEUR AND HIS CONTEMPORARIES, 1850-1880*. *Yeast*. (2000); 16: 755 - 771.

²⁸ N.P. Jolly.; O.P.H. Augustyn.; I.S.Pretorius. *THE ROLE AND USE OF NON-SACCHAROMYCES YEASTS IN WINE PRODUCTION*. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* (2006); Vol. 27; Nº 1.

²⁹ Helmut König.; Gottfried Uden.; Jürgen Fröhlich. *BIOLOGY OF MICROORGANISMS ON GRAPES, IN MUST AND IN WINE*. Springer. (2009).

³⁰ Fernández Espinar.; Llopis, S.; Querol, A.; Barrio, E. *MOLECULAR IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF WINE YEASTS*. Elsevier. (2009).

Aunque la presencia de *Saccharomyces cerevisiae* es escasa en la uva como bien hemos señalado antes, a medida que avanzamos en el proceso fermentativo, se convierte en la levadura dominante, sustituyendo a las demás.³¹ Esto se debe principalmente a su alta resistencia a las elevadas temperaturas fermentativas y a su gran tolerancia al alcohol, además de a la aplicación de sulfitos, levaduras comerciales y a las condiciones anaeróbicas presentes durante el proceso.

Tabla 3-. Especies y población de las principales levaduras en uva y vino.

GÉNERO	ESPECIE	HÁBITAT	ABUNDANCIA
Saccharomyces	<i>Cerevisiae</i>	Alta resistencia.	Rara en uva, predominante en fermentación avanzada y bodega.
	<i>Bayanus</i>	Finalización de la vinificación	
Hanseniaspora	<i>Uvarum</i>	Hollejo uva e inicio fermentación.	50-75%
Kloeckera	<i>Apiculata</i>	Hollejo uva e inicio fermentación.	50-75%
Hansenula	<i>Pichia anómala</i>	Hollejos y aireación. Uva, bodega e inicios fermentación.	Poco abund.
	<i>Pichia kluyveri</i>		
Pichia	<i>Membranifaciens</i>	Uva, bodega e inicio fermentación.	Poco abund.
Cándida	<i>Guilliermondii</i>	En mostos aireados, inicios de la fermentación.	Poco abund.
	<i>Krusei</i>		
	<i>Stellata</i>		
Cryptococcus	<i>Albidus</i>	Uva e inicio fermentación.	Poco abund.
Debaryomyces	<i>Hansenii</i>	-	-
Brettanomyces	<i>Anomalus</i>	Contaminante de vinos y barricas.	Poco abund.
	<i>Bruxellensis</i>		
	<i>Brettanomyces</i>		
Dekkera	<i>Bruxellensis</i>	Contaminante de vinos y barricas.	-
Kluyveromyces	<i>Marxianus</i>	Buena fermentadora. Uva e inicio fermentación.	Poco abund.
	<i>Thermotolerans</i>		
Metschnikowia	<i>Pulcherrima</i>	Uva e inicio fermentación.	Poco abund.
Rhodotorula	<i>Glutinis</i>	Uva e inicio fermentación.	Poco abund.
Saccharomycodes	<i>Ludwigii</i>	Uva.	-
Schizosaccharomyces	<i>Pombe</i>	Fermentan ác. málico a alcohol. Desacidificantes.	-
	<i>Japonicus</i>		
Torulaspora	<i>Delbrueckii</i>	Osmotolerantes.	Poco abund.
Zygosaccharomyces	<i>Bailii</i>	Contaminantes de mostos y vinos.	-
	<i>Florentinus</i>		
	<i>Bisporus</i>		

Origen: Elaborada a partir de ^{24, 31}.

La levadura *Sacharomyces cerevisiae* (hongo unicelular) constituye por lo tanto la levadura de mayor importancia dentro de la elaboración del vino, ya que puede producir etanol y metabolizar los azúcares presentes en el mosto, reduciendo el pH, incluso en condiciones anaerobias. Su degradación o metabolismo genera compuestos volátiles como acetatos, estéres y alcoholes, responsables del aroma y sabor de los vinos. Además posee el carácter *killer*,³² siendo capaz de controlar el desarrollo de otras levaduras no deseadas.

En 1996 se descubrió la secuencia del genoma de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*³³ y a día de hoy sigue siendo el genoma eucariota del que disponemos de mayor información. El pequeño tamaño de su genoma (aprox. 12.068 Kb),³⁴ con aproximadamente 6000 genes, ha facilitado su estudio por espectrometría de masas. En la *Figura 3*, se muestra la imagen de levaduras muertas de *Saccharomyces cerevisiae* por microscopía electrónica de barrido (SEM).

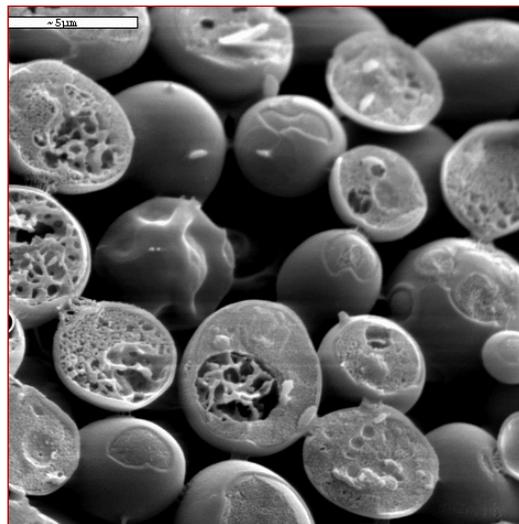


Figura 3. Microscopía electrónica LT-SEM de una cepa patentada de *Saccharomyces cerevisiae*. Fuente CSIC. Dr. A. V. Carrascosa. Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación CIAL.

³¹. Ribéreau-Gayon, P.; Dubourdieu, D.; Donèche, B.; Lonvaud, A. *TRATADO DE ENOLOGÍA. TOMO I: Microbiología del vino. Vinificaciones.* (2003).

³². A. R. Gutiérrez, S. Epifanio, P. Garijo, R. López, P. Santamaría. *KILLER YEASTS: INCIDENCE IN THE ECOLOGY OF SPONTANEOUS FERMENTATION.* Am. J. Enol. Vitic. (2001); 52: 352-356.

³³. A. Goffeau, BG Barrel, H Bussey, RW Davis[...]. *LIFE WITH 6000 GENES.* Science. (1996); 274(5287): 546+563-567.

³⁴. G. Giaever. *FUNCTIONAL PROFILING OF SACCHAROMYCES CEREVISIAE GENOME.* Nature. (2002); 418: 387-391.

4. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

El objetivo de este trabajo de fin de grado ha sido intentar comprobar si el empleo de la técnica espectroscópica MALDI-TOF MS, es una buena alternativa para el estudio e identificación de cepas enológicas, frente a las previas técnicas clásicas y moleculares.

Para conseguir este objetivo se han aislado **150** muestras (146 tomadas de viñedos y bodega y 4 certificadas adquiridas). La elevada cantidad de muestras aisladas y su semejanza entre sí, nos condujo a la selección de las más representativas para su posterior análisis, reduciendo el número de muestras a la mitad. En resumen, **75** muestras fueron procesadas en el MALDI. Durante el estudio se ha seguido el siguiente plan de trabajo:

- ❖ Toma de muestras en bodega y viñedos (tierra/uva/mosto/vino).
- ❖ Toma de muestras de **9** levaduras comerciales distintas.
- ❖ Etiquetado, cultivos y aislamiento de las cepas.
- ❖ Conservación/congelación en viales.
- ❖ Recuperación de viales (resiembrar).
- ❖ Adquisición y recuperación de **4** cultivos liofilizados (CECT).
- ❖ Preparación de reactivos.
- ❖ Transferencia de las muestras sobre la placa MALDI (directa y mediante extracción de proteínas).
- ❖ Calibrado y análisis de los espectros de masas (FlexAnalysis).
- ❖ Generación del espectro MSP (Main Spectrum Profile).
- ❖ Generación de la nueva base de datos (Maldi Biotyper).
- ❖ Creación del dendrograma.
- ❖ Comparación de las muestras con la base de datos (identificación).
- ❖ Conclusiones.
- ❖ Elaboración del informe.

5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL Y MATERIALES

A lo largo de este apartado, describiremos todos los materiales utilizados así como el procedimiento experimental y el fundamento de la técnica empleada.

5.1 Toma de muestras.

Casi la totalidad de las muestras utilizadas en este estudio, fueron proporcionadas por la Bodega Dominio de Cair, perteneciente a la Denominación de Origen Ribera del Duero. Todas ellas fueron aisladas durante la campaña del 2016, distribuyéndose su toma desde momentos previos, durante y posteriores al ejercicio de la vendimia de dicho año.

- **Muestras de viñedo (uva y tierra).** La primera toma de muestras se realizó en tres parcelas pertenecientes a la bodega, con características diferentes de orientación, tipo de tierra, temperatura y altitud, buscando conseguir una mayor diversidad en las especies. Todas ellas elegidas intencionadamente alejadas de carreteras y con poca frecuencia humana, para intentar evitar posibles contaminaciones. La *Tabla 4* recoge un resumen con las directas muestras tomadas, junto con su procedencia y denominación.

Tabla 4-. Muestras de uva y tierra de viñedos.

PARCELA	CARACTERÍSTICAS	MUESTRA	ESTADO
MC	Orientación sur, cálida, suelo arcilloso, ladera.	MC1	<i>Uva Tinta del País</i>
		MC2	Tierra
		MC3	<i>Uva Tinta del País</i>
		MC4	<i>Uva Albillo</i>
SJM	Orientación norte, fría, suelo arcilloso, ladera.	SJM1	<i>Uva Tinta del País</i>
		SM2	<i>Uva Tinta del País</i>
		SJM3	<i>Uva Tinta del País</i>
		SJM4	Tierra
LLE	Orientación norte, suelo arenoso, plana, meseta alta.	LLE1	<i>Uva Tinta del País</i>
		LLE2	<i>Uva Tinta del País</i>
		LLE3	<i>Uva Tinta del País</i>
		LLE4	Tierra

Todo el material utilizado durante la toma de muestras en viñedo, desde las bolsas a las tijeras, fue previamente esterilizado y correctamente almacenado y etiquetado, como se muestra en la *Figura 4*.



Figura 4. Toma de una muestra de uva variedad *Albillo*.

- **Muestras de mosto de depósitos sembrados con levaduras comerciales.** Se tomaron muestras de 9 depósitos diferentes. En el momento de la toma, cada uno había recibido una presiembra o siembra con una levadura de casas comerciales distintas entre sí. Se anotó la fecha exacta de la toma, la fecha de llenado del depósito, la procedencia de la uva, así como todos los productos añadidos hasta el momento de la toma y cualquier dato relacionado con la evolución del depósito y el protocolo llevado en este. Las levaduras comerciales utilizadas incluían tres tipos de especies: *Saccharomyces Cerevisiae*, *Torulaspota Delbrueckii* ó una mezcla de las dos anteriores con *Kluyveromyces Thermotolerans*. Un pequeño resumen de todas estas anotaciones aparece reflejado en la *Tabla 5*.

Tabla 5-. Muestras de mosto en depósitos y sus protocolos.

a) MUESTRA/DEP	b) FECHA S Ó PS	c) SIEMBRA/PRESIEMBRA	d) ESPECIE
DEP-26 ROSÉ	29/09/16	S	SC
DEP-13	06/10/16	PS	SC
DEP-1	08/10/16	PS	SC
DEP-17	08/10/16	PS	SC
T-3	11/10/16	S	SC+TD+KT
DEP-6	13/10/16	PS	TD
DEP-32	15/10/16	PS	SC
DEP-14	15/10/16	PS	SC
DEP-6.1	18/10/16	S	SC

a) Depósitos de la bodega; b) Fecha de inoculación de levadura comercial; c) Tipo de inoculación: Siembra (S) ó Presiembra (PS); d) Especie inoculada: *Saccharomyces Cerevisiae* (SC), *Torulaspota Delbrueckii* (TD) ó *Kluyveromyces Thermotolerans* (KT).

- **Muestras de levaduras comerciales puras.** Además de las muestras de mosto recogidas en el apartado anterior, las cuales habían sido sembradas con levaduras comerciales, también se tomaron muestras de dichas levaduras puras en estado sólido. El objetivo de estudio era poder comprobar si dichas levaduras puras se encontraban en las muestras de mosto recogidas tras su adición. En total, se tomaron 9 muestras de levaduras comerciales distintas, pertenecientes a 5 casas comerciales.

- **Muestras de mosto tomadas para el seguimiento de un depósito.** Con el propósito de estudiar la evolución de levaduras durante el proceso de fermentación, se recogieron muestras del mismo depósito durante diferentes puntos en el tiempo. En concreto, se produjo el seguimiento del depósito "DEP-12", que difiere del resto de depósitos, al tratarse de variedad *Merlot* y no, *Tinta del País*. El DEP-12 siguió el mismo protocolo que el DEP-13, consultar *Tabla 5*. Se establecieron cinco puntos temporales en la toma de estas muestras que aparecen recogidos en la *Tabla 6*:

Tabla 6-. Muestras del seguimiento del DEP-12.

MUESTRA	DESCRIPCIÓN	FECHA DE LA TOMA
DEP-12.1	Uva <i>Merlot</i>	20/10/16
DEP-12.2	Mosto tras AST*	20/10/16
DEP-12.3	Mosto tras AST+ENZIMA	20/10/16
DEP-12.4	Mosto tras presiembra SC	26/10/16
DEP-12.5	Mosto tras siembra SC	31/10/16

*AST: nombre comercial de un producto que contiene metabisulfito potásico.

- **Muestras de mosto en fermentación maloláctica.** Además de evaluar la presencia de levaduras durante el proceso de fermentación alcohólica (FOH), también se quiso estudiar la posible presencia de otras especies, como las bacterias responsables de la fermentación maloláctica (FML). En esta segunda fermentación que sufre el vino, el ácido málico se transforma en láctico con ayuda de bacterias lácticas (*Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Weissella*, y *Oenococcus*, entre las más frecuentes).³⁵ El etanol producido durante la primera fermentación y el SO₂ añadido para controlar la proliferación bacteriana, hace que su población sea muy baja. A pesar de ello, algunas resisten y estableciendo la temperatura adecuada, esta transformación puede producirse de forma espontánea. Algunas bodegas deciden prescindir de este paso y otras se ayudan de bacterias externas para finalizar el proceso satisfactoriamente. Para realizar este estudio se tomaron 3 muestras de dos depósitos diferentes (el depósito 4+5, siguió el mismo protocolo que el DEP-1, recogido en la *Tabla 5*):

- **DEP-M-A2:** fermentación maloláctica arrancada sin inocular **AUTÓCTONA**.
- **DEP-M-4+5i:** fermentación maloláctica arrancada con *Oenococcus Oeni* (bacteria comercial mostrada en la *Figura 5*). **INOCULADA**.
- **DEP-M-4+5:** maloláctica no arrancada.

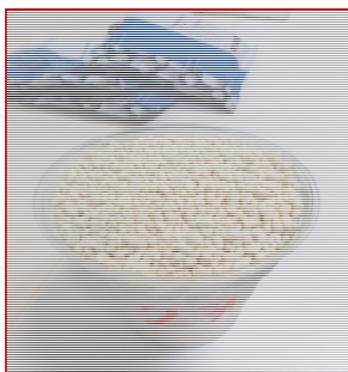


Figura 5. Aspecto de la Bacteria comercial *Oenococcus Oeni* antes de su aplicación.

³⁵. Bordons, Albert.; Reguant, Cristina. *BIOQUÍMICA DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS DEL VINO Y LA FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA*. ACE Revista de Enología (2011); 140.

Todas las muestras líquidas tomadas en las fechas señaladas eran recogidas en tubos de centrífuga Eppendorf Safe-Lock (1,5 mL) como el que se muestra en la *Figura 6*, previamente esterilizados y convenientemente etiquetados, y transportadas a bajas temperaturas, para su cultivo inmediato.



Figura 6. Tubo de centrífuga Eppendorf Safe-Lock de 1'5 mL.

5.2 Etiquetado, cultivo y aislamiento de cepas.

Una vez obtenidas las muestras y correctamente etiquetadas, se conservan a baja temperatura en un refrigerador. En un margen de tiempo no superior a 48h, cada una de las muestras debe ser sembrada por la técnica de aislamiento en cuatro zonas,³⁶ detallada en la *Figura 7*. Mediante esta técnica se pretende diluir la carga microbiana que se deposita en el medio de cultivo, de forma que, en los últimos trazos de la siembra, haya tan poco material, que cada microorganismo quede suficientemente separado entre sí y se puedan desarrollar colonias independientes.

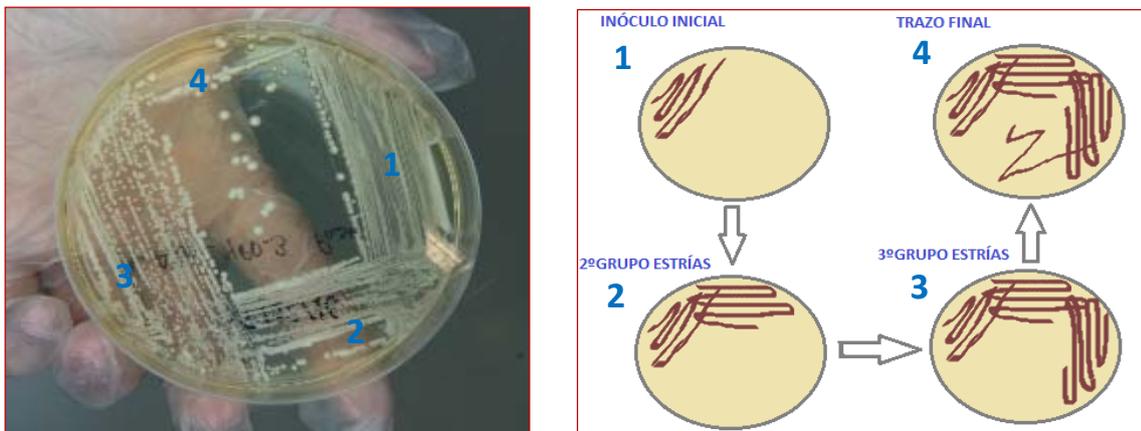


Figura 7. A la izquierda, placa sembrada por el método de siembra por estría y a la derecha, pasos de la técnica.

³⁶ Surinder Kumar. *TEXTBOOK OF MICROBIOLOGY*. First Edition (2012); 7: 64-70.

Para poder realizar los cultivos mixtos, se realizaron pruebas con diversas bases nutritivas, y así evaluar cual era la más apropiada para el crecimiento de cada tipo de microorganismo y su posterior utilización durante todo el proyecto. Estos son los medios de cultivo utilizados:³⁷

- Agar sangre (AS): medio sólido muy rico, crece casi todo, especialmente bacterias.
- Agar Sabouraud con cloroanfenicol (SAC): medio sólido, crecen levaduras. Selectivo, no crecen bacterias.
- Extracto de peptona-dextrosa agar (YPD): medio sólido, crecen levaduras. Más utilizado por su fácil preparación.
- Cerebro Corazón de Buey (CC): medio líquido, crece todo. No selectivo.
- Potato Dextrose Agar (PDA): medio sólido, crecen hongos y levaduras.

Pasos para el cultivo, aislamiento y materiales utilizados:

1. Preparación de placas YPD Agar.
2. Etiquetado de la placa.
3. Realizar siembra por estría con asa desechable de 10 µL.
4. Eliminación del asa en el contenedor estanco y sellado de la placa con Parafilm.
5. Incubación aprox. 35°C entre 48-72h. **SIEMBRA (GENERACIÓN CULTIVO MIXTO)**.

En estas placas se observan colonias diferentes, tanto en color, forma o tamaño. Para cada una de ellas se debe realizar un cultivo individualizado. Seleccionamos las más representativas y las marcamos como figura en el punto 6.

6. Buscar y marcar colonias aisladas. Realizar los puntos 7-9, para cada organismo que seleccionemos.
7. Realizar un pase con un asa desechable de 1 µL.
8. Eliminación del asa en el contenedor estanco y sellado de la placa con Parafilm.
9. Incubación aprox. 35°C entre 48-72h. **PASE 1 (GENERACIÓN CULTIVO ÚNICO)**.

10. Si en el pase crecido, observáramos varios tipos de microorganismos, deberíamos realizar un nuevo pase. **PASE 2 (CERCORAMIENTO)**. Si solo observamos un tipo de colonia, procederíamos a recoger la muestra y congelar.

³⁷. Barrero Cuevas, Laura. *MICROBIOLOGÍA CLÍNICA: medios de cultivo de microorganismos*. Editorial Síntesis. (2016); capítulo 2.

Toda la instrumentación y el material utilizado durante el cultivo y el aislamiento de las muestras, se refleja en la *Figura 8*.

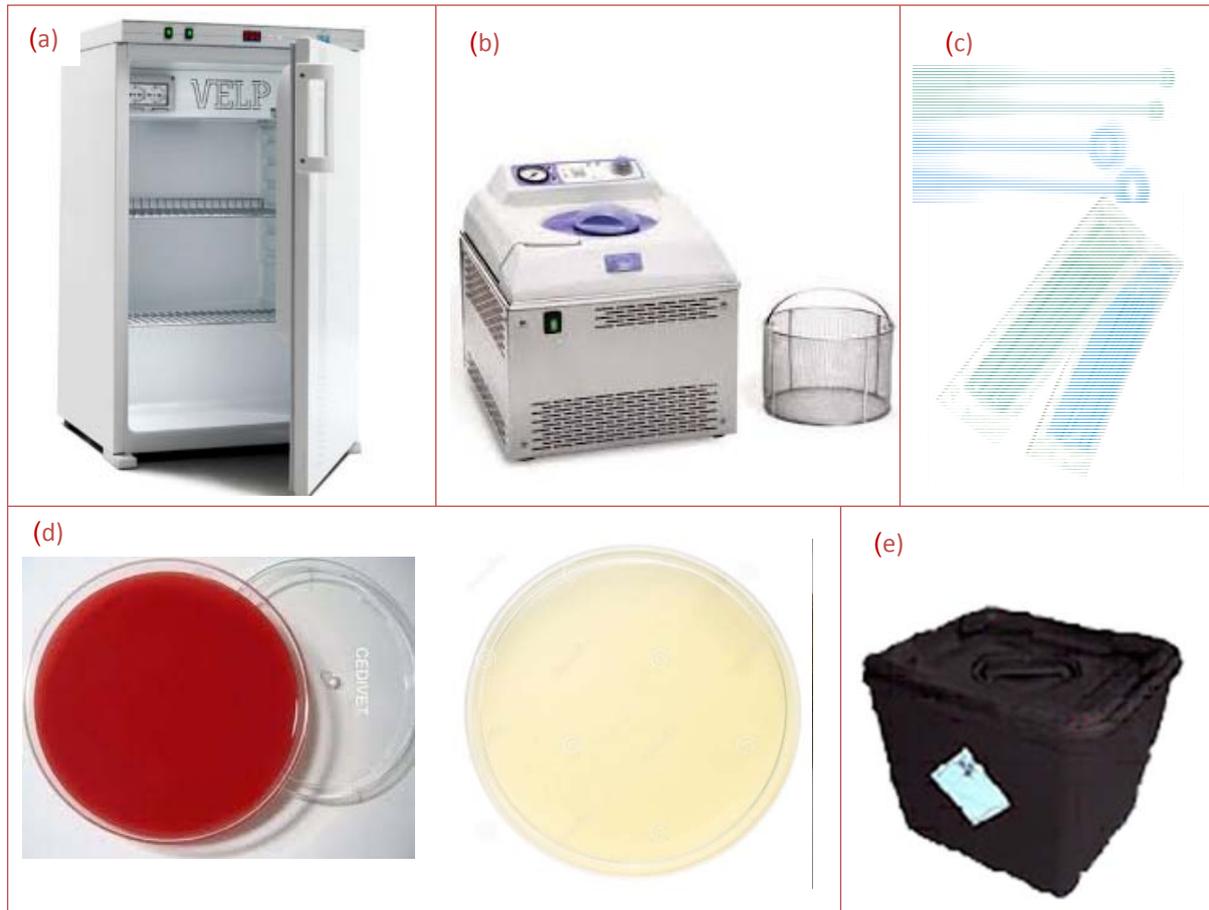


Figura 8. (a) Incubadora de laboratorio "FOC 120"; (b) autoclave eléctrico para esterilización "MED 12" y cesta para el material esterilizable; (c) asas desechables flexibles y estériles de 1 μ L (verde) y 10 μ L (azul); (d) placa de cultivo agar sangre y placa de YPD agar; (e) contenedor con cierre estanco para residuos biológicos.

5.3 Conservación/congelación de viales.

Una vez obtenidos los cultivos aislados, es decir, el momento en el que cada placa solo contiene una especie, debemos conservarlos mediante su congelación en viales específicos para tal fin. Estos viales contienen criobolas suspendidas en una solución de glicerol que actúa como conservante, donde se alojarán los microorganismos.

Pasos para la conservación de cepas:

1. Etiquetado del vial de conservación.
2. Utilización de un asa de 10 μ L para arrastrar gran cantidad del material orgánico presente en la placa de cultivo.

3. Introducir el asa en el vial y sacudir hasta que la muestra se desprende en el interior.
4. Agitado en vórtex para conseguir la homogenización del material biológico.
5. Eliminar el sobrenadante con una micropipeta y puntas esterilizadas.
6. Deshechar las asas, placa y puntas en el contenedor estanco.
7. Llevar la muestra al ultracongelador donde los microorganismos permanecen en estado de latencia a temperaturas del orden de $-70^{\circ}\text{C}/-80^{\circ}\text{C}$.

En la *Figura 9* se recogen todos los instrumentos utilizados durante el apartado de congelación/conservación de muestras.

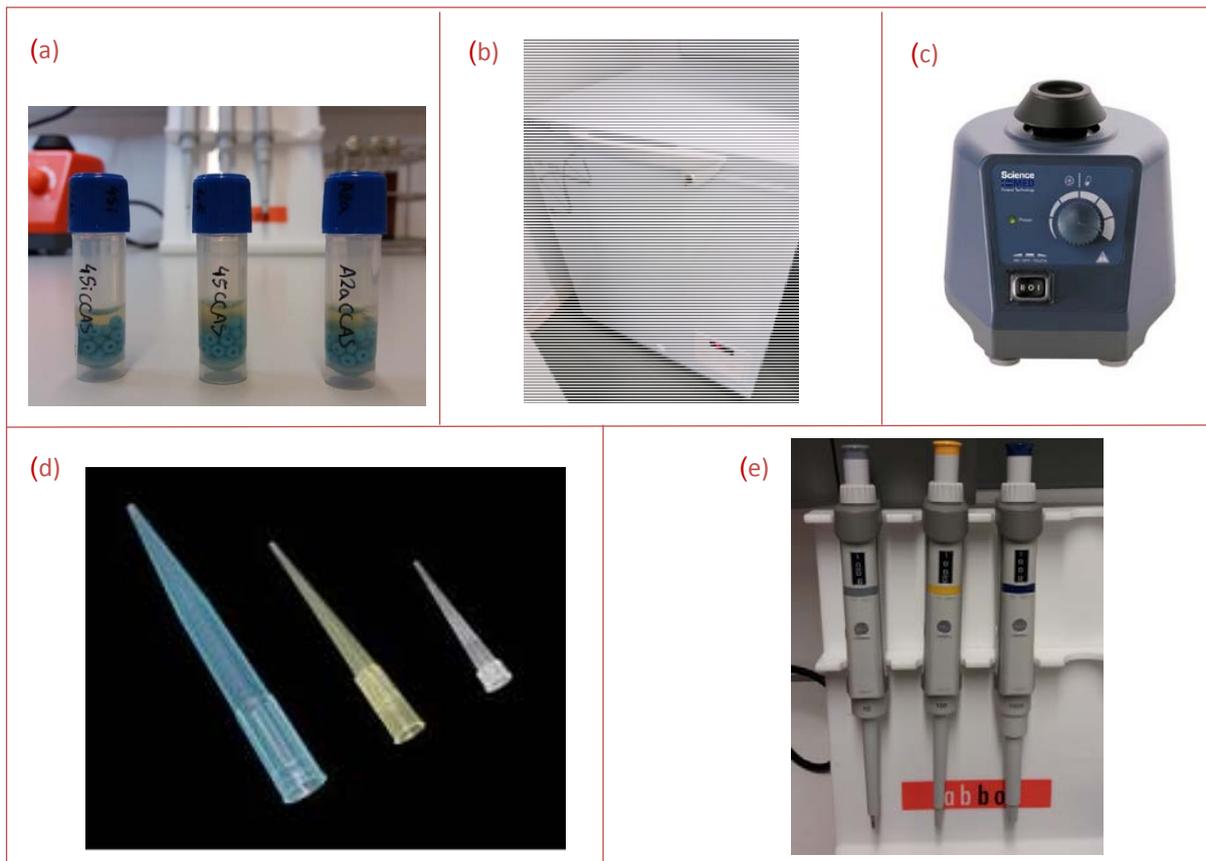


Figura 9. (a) Crioviales con perlas suspendidas en una solución conservante al 20% de glicerol; (b) ultracongelador; (c) agitador vórtex; (d) puntas Eppendorf dese; (e) micropipetas Eppendorf de diferentes tamaños (gris de 0,5-10 μL , amarilla de 10-100 μL y azul de 100-1000 μL).

Para llevar a cabo el punto 5 del proceso, la eliminación del sobrenadante del vial, es necesario utilizar puntas desechables que previamente han sido esterilizadas en el autoclave. Durante todo el trabajo experimental recurriremos a estas puntas que aparecen reflejadas en la *Figura 9.d*. El color de la punta se corresponde con el tamaño de la pipeta utilizada, color azul para pipetas de 100 a 1000 μL , amarillo para alícuotas entre 10 y 100 μL y puntas de color blanco para micropipetas de 1 a 10 μL .

El primer paso para conseguir la esterilización de estas puntas es introducirlas en cajas como la que se muestra en la *Figura 10*, selladas con una cinta adhesiva indicadora, la cual cambia de color al finalizar la esterilización. Una vez preparadas las cajas, se introducen en el autoclave, mostrado previamente en la *Figura 8(b)*, y se programa a 121°C durante 15 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, esperaremos a que la presión alcanzada en el interior del autoclave haya disminuido hasta que sea posible realizar la apertura de este de forma segura.

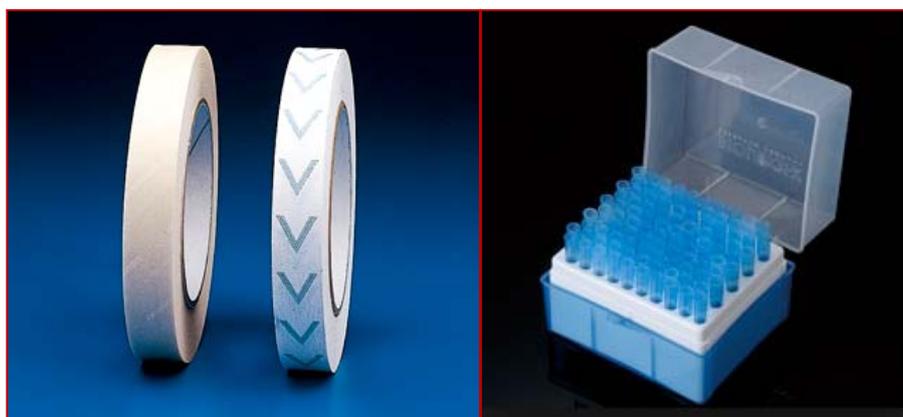


Figura 10. Cinta adhesiva indicadora (izq) y caja con puntas para esterilizar (dcha).

En el **ANEXO I**, se encuentran recogidos los 146 viales congelados, con sus respectivas denominaciones, fechas de congelación, observaciones y motivo de estudio.

5.4 Recuperación de viales (resiembra).

El siguiente paso llevado a cabo en el procedimiento experimental fue la recuperación de la muestras contenidas en los viales de congelación. Cada semana se estableció un calendario especificando el número de horas de trabajo disponibles, para determinar así el número de muestras que sería posible analizar en el MALDI y por lo tanto, el número de muestras a resembrar. De las 146 muestras congeladas, 71 fueron seleccionadas para su recuperación por ser las más representativas, como señalamos en el apartado de *Plan de Trabajo*, y su posterior análisis. Estas 71 muestras aparecen diferenciadas en el **ANEXO I** en color amarillo.

Realización de un pase a partir de muestras congeladas (Resiembra):

1. Etiquetado de la placa.
2. Extracción de una criobola con un asa de 10 µL esterilizada.
3. Realización de una siembra por estría en 4 zonas con la criobola. **RESIEMBRA.**
4. Incubación de la placa durante aprox. 48h, boca arriba.
5. Si los cultivos han crecido, realizamos un primer pase con un asa de 1 µL. **PASE 1.**
6. Incubamos el primer pase durante aprox. 48h.
7. Para asegurarnos de que sólo tenemos una especie, realizamos un segundo pase. **PASE 2.**

5.5 Adquisición y recuperación de cultivos liofilizados (CECT).

Con el fin de obtener espectros de referencia, se realizó la solicitud para la adquisición de 4 cepas de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), el único Centro de Recursos Microbianos (mBRC) público en España que actúa como depositario y proveedor de bacterias, arqueas, levaduras y hongos filamentosos.³⁸ En la *Tabla 7*, se especifican los datos técnicos de dichas cepas proporcionados por la CECT.

Tabla 7-. Cepas de la CECT adquiridas.

	NOMBRE	CONDICIONES DE CRECIMIENTO
CECT 1170	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Meyen ex E.C.Hansen, 1883</i>	26°C / 72h / atm.aeróbica / 138-148
CECT 1926	<i>Saccharomyces bayanus</i> <i>Saccardo, 1895</i>	26°C / atm.aeróbica / 140
CECT 1015	<i>Torulaspota delbrueckii</i> <i>Lindner, 1904</i>	26°C / atm.aeróbica / 138
CECT 1010	<i>Dekkera bruxellensis</i> Van del Walt, 1964	25°C / atm.aeróbica / 140 0,5% CaCO ₃

Una vez recibidos los cultivos liofilizados, ver *Figura 11*, se conservan protegidos de la luz en el frigorífico a 18°C (no deben congelarse). Tras leer las fichas técnicas proporcionadas por el centro y asegurarnos de disponer de todo el material necesario (medios de cultivo, temperatura de incubación y parámetros fisicoquímicos), se procede a su recuperación.³⁹

³⁸. Universidad de Valencia. *Buscador de cepas de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y sus fichas técnicas*. <https://www.uv.es/uvweb/coleccion-espanola-cultivos-tipo/es/catalogo-cepas/medios-cultivo/buscador-cepas-1285892802374.html>

³⁹. *INSTRUCCIONES PARA LA RECUPERACIÓN DE CULTIVOS LIOFILIZADOS*. Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).



Figura 11. Presentación de los liófilos en ampollas.

En primer lugar se procedió a la apertura de la ampolla, para ello fue necesario calentar el extremo fino de la cápsula en la llama de un mechero Bunsen durante unos 15 segundos. A continuación, se dejaron caer entre 1 y 4 gotas de agua destilada esterilizada sobre el vidrio para resquebrajarlo. Una vez eliminados los restos de este, con unas pinzas previamente flameadas, se extrajo el algodón que había en su interior.

El segundo paso es la resuspensión del liófilo y su siembra. Para realizarlo, con ayuda de una pipeta, tomamos 300 μL del medio líquido estéril recomendado para el crecimiento del microorganismo y lo añadimos a la ampolla abierta. Se resuspende cuidadosamente evitando la formación de burbujas. Seguidamente, esperamos entre 15 y 20 minutos para que se produzca la rehidratación completa.

A continuación, se utiliza toda la suspensión para sembrar una placa de Petri, convenientemente etiquetada y un tubo con 5-10 μL de medio líquido, ejemplos de ambos mostrados en la *Figura 12*. La siembra la realizamos con un asa de 10 μL y la suspensión restante la añadimos al tubo. Siguiendo las recomendaciones de la ficha técnica, dejamos incubar los cultivos el tiempo necesario. Se repitió el mismo proceso con las 4 cepas, realizando posteriormente un subcultivo.



Figura 12. M.140 líquido y sólido para la siembra de CECT 1926, junto con su subcultivo.

Finalmente se procedió a la conservación en viales de las cepas certificadas, según el protocolo recomendado por la CECT.⁴⁰ De cada una de ellas se prepararon 5 viales, más un criovial con solución de glicerol. En la *Figura 13* se pueden observar los 5 viales de tapa azul proporcionados por la CECT más el criovial de tapa blanca con solución de glicerol. Los viales deben conservarse en el ultracongelador a temperaturas iguales o inferiores a -20°C.

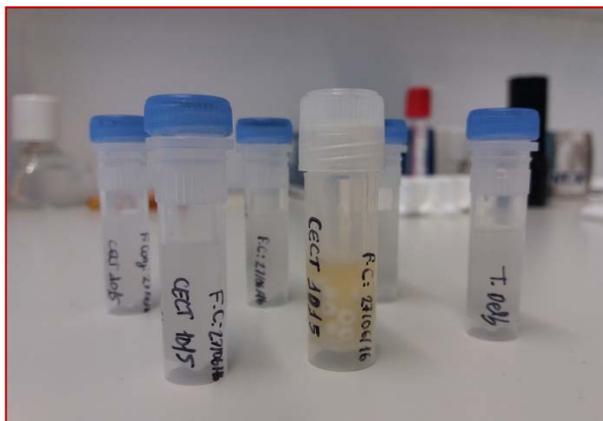


Figura 13. Viales de conservación de la CECT 1015.

5.6 Preparación de reactivos.

Para realizar el análisis de cepas en MALDI Biotyper se pueden llevar a cabo dos métodos que describiremos en los próximos apartados, la transferencia directa a la placa o la extracción previa de proteínas con etanol/ácido fórmico. Para llevar a cabo ambos procesos fue necesario tener preparados los siguientes reactivos:⁴¹

1. **Etanol al 70%**: con la ayuda de una probeta preparamos entre medio litro y un litro de la solución que conservamos en una botella de cristal estéril. Se utiliza para la limpieza de la tarjeta MALDI. Para la preparación de aproximadamente un litro:
 - 700 mL de etanol absoluto.
 - 300 mL de agua destilada.
2. **Ácido trifluoracético (TFA) al 80%**: este reactivo se fue preparando secuencialmente, según su consumo. Para preparar 1 mL se necesitaron:
 - 1 tubo Eppendorf de 1,5 mL.
 - 800 µL de TFA, manejado en campana y con guantes dado su carácter corrosivo.
 - 200 µL de Agua HPLC.

⁴⁰. INSTRUCCIONES VIALES DE CONSERVACIÓN (BACTERIAS Y LEVADURAS). Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

⁴¹. Francisco Soria Melguizo S.A. GUÍA RÁPIDA MALDI BIOTYPER 3.1.

Se agita en vórtex para homogenizar la solución. Como en el caso del etanol al 70%, está solución también se utilizó para la limpieza de la placa. Se puede conservar a temperatura ambiente durante un mes.

3. **Ácido fórmico al 70%:** para la preparación de 1 mL se emplean:
 - 1 tubo Eppendorf de 1 mL.
 - 700 μ L de ácido fórmico, manejado en campana y con guantes dado su carácter corrosivo.
 - 300 μ L de Agua HPLC.

Se agita en vórtex para homogenizar la disolución. Esta preparación es necesaria para la extracción de proteínas con etanol/ác.fórmico y se puede conservar a temperatura ambiente durante un mes.

4. **Solvente orgánico:** usamos un tubo Eppendorf de 1,5 mL. A este le añadimos:

- 475 μ L de Agua HPLC.
- 500 μ L de acetonitrilo en campana y con guantes.
- 25 μ L de trifluoroacético (TFA) también en campana y con guantes.

Se agita en vórtex y se utiliza para reconstruir tanto la matriz (HCCA) como el patrón BTS. Se conserva durante una semana a temperatura ambiente.

5. **Solución de Matriz:** ácido α -ciano-4-hidroxicinámico, cuya estructura química se muestra en la *Figura 14*. Se añade a un tubo de matriz liofilizada conservada a 2-8°C, 250 μ L de solvente orgánico. Agitamos en vórtex durante 2-3 minutos hasta su completa disolución, comprobando la ausencia de precipitados o cristales. La solución se conserva a temperatura ambiente durante una semana y en lugar oscuro, protegido con papel de aluminio.

En nuestro estudio, elaboramos mayor cantidad de solución matriz (5000 μ L) y la dividimos en alícuotas de aprox. 200 μ L. Utilizamos tubos de microcentrífuga y los conservamos en el ultracongelador a -80°C.

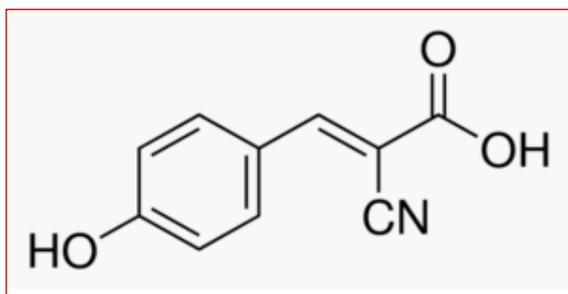


Figura 14. Estructura química del ácido α -ciano-4-hidroxicinámico.

6. **Solución Bruker Bacterial Test Standard (BTS):** para realizar medidas en el MALDI es necesario preparar un patrón. A un tubo de Bacterial Standard, tubo comercial adquirido a Bruker, se le añaden 50 μL de solvente orgánico. Con el objetivo de mezclar ambos compuestos uniformemente, se pipetea con una micropipeta arriba y abajo unas 20 veces. Una vez cerrado el tubo, se deja incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos y se repite la operación de pipeteo. Finalmente, con una centrifugadora como la mostrada en la *Figura 15*, se centrifuga 1 minuto a 13000 rpm a temperatura ambiente. Realizamos alícuotas de 10 μL y lo conservamos a -20°C .



Figura 15. Microcentrífuga SPECTRAFURGE 24D.

5.7 Transferencia a la placa MALDI.

En este punto, después de las sucesivas siembras y pases realizados previa y post congelación, se supone que ya no tenemos cultivos mixtos sino especies únicas aisladas, que han sido conservadas independientemente. En la *Figura 16*, se reflejan las diferencias entre un cultivo con varias especies y uno con una única cepa.



Figura 16. Fotografías tomadas de muestras en la primera siembra y el último pase.

Las especies revividas y cultivadas en los apartados 5.4 y 5.5, deben ser transportadas e introducidas en el MALDI mediante una placa o tarjeta metálica. La placa empleada para nuestro análisis fue una "MTP 384 polished steel BC", recomendada por la casa comercial Bruker⁴² y que se muestra en la Figura 17. En esta placa se disponen 24 x 16 pocillos circulares (384 en total) en forma de matriz.



Figura 17. MTP 384 polished steel BC.

Existen dos métodos de transferencia del cultivo microbiano sobre la placa metálica, la transferencia directa o la extracción previa de proteínas con etanol/ác.fórmico. En los primeros análisis utilizamos ambos métodos, para evaluar con cual de los dos conseguiríamos espectros de mayor calidad y con menor ruido de fondo. Las pruebas realizadas, junto con los estudios reflejados en numerosas publicaciones,^{43,44,45} nos condujeron a prescindir del método de transferencia directa de las colonias por no ser tan efectivo en levaduras, pese al ahorro considerable de tiempo y de reactivos que suponía esta vía.

Ambos métodos se realizaron conforme a las recomendaciones establecidas en el manual de uso de Bruker.⁴¹ A continuación, se describen los pasos a seguir en ambos procedimientos:

- Transferencia directa: con una punta morada desechable tocamos una colonia aislada del pase número 2 y de seguido tocamos el pocillo seleccionado haciendo círculos sin salirnos de la delimitación. Es importante hacer una distribución uniforme y con la menor cantidad de muestra posible para que los espectros generados sean más limpios. Cambiamos de punta y realizamos la misma operación tocando otro punto del cultivo, y repetimos hasta ocupar 9 pocillos. En el pocillo central, además de la muestra añadimos 1 μ L de BTS con la micropipeta gris. Esperamos entre 20-30 minutos y añadimos 1 μ L de matriz a cada pocillo, exceptuando al pocillo central al que añadiremos uno extra. Es muy importante, cambiar las puntas de la micropipeta y las asas cada vez que cambiamos de pocillo. También se puede añadir 1 μ L de ác. fórmico al 70% antes de la matriz, para conseguir una extracción directa de proteínas.

⁴² Bruker. INSTRUCTIONS FOR USE: MTP 384 POLISHED STEEL BC TARGETS. (2013).

- Extracción con Etanol/Ácido Fórmico:

1. Poner en un tubo de centrifuga Eppendorf de 1,5 mL, 300 µL de Agua HPLC.
2. Utilizar un asa de siembra verde de 1 µL, pasarla por el cultivo hasta cubrir la punta y suspenderla en el tubo girándola.
3. Repetir el paso 2, cambiando de asa.
4. Cerrar la tapa del tubo de microcentrifuga y agitar con ayuda del vórtex para asegurarnos de tener una disolución homogénea.
5. Añadir 900 µL de etanol absoluto.
6. Agitar en vórtex de nuevo.
7. Introducimos el tubo en la microcentrifugadora durante 2 minutos a 13000 rpm, para que las proteínas sedimenten en el fondo del tubo.
8. Nos deshacemos del sobrenadante decantándolo, para quedarnos con el pellet.
9. Para eliminar el exceso de etanol que pueda quedar, centrifugamos 1 minuto más.
10. Quitamos el sobrenadante con una micropipeta de 200 µL.
11. Si fuese necesario, dejar el tapón con el tubo abierto un mínimo de 15 minutos para evaporar completamente el etanol restante.
12. Añadir 25 µL de ácido fórmico al 70%. Resuspender el sedimento con una pipeta hasta completar la disolución.
13. Agitar en vórtex para mayor homogeneidad.
14. Añadir 25 µL de acetonitrilo y centrifugar 1 min a 13000 rpm.
15. Transferir 1 µL del sobrenadante a cada uno de los 9 pocillos.
16. Dejar secar.
17. Añadir a la posición central 1 µL de BTS.
18. Añadir 1 µL de matriz a los 9 pocillos más 1 extra al central.

El etanol se encarga de inactivar las bacterias, por eso es tan importante eliminarlo en su totalidad. Por otro lado, el ácido fórmico rompe la pared celular de las levaduras.⁸ El sobrenadante obtenido en el punto 15 contiene las proteínas de nuestro microorganismo. Por cada cepa llevada al MALDI realizamos 9 análisis, por eso distribuimos la misma muestra en 9 pocillos. Además, es necesario realizar un calibrado del MALDI-TOF antes del análisis de cepas, por lo que se pondrá en un pocillo aislado 1 µL de BTS + 1 µL de matriz.

⁴³. Carole Cassagne, Anne-Laure Cella, Pierre Suchon, Anne-Celine Normand, Sthephane Ranque & Renaud Piarroux. *EVALUATION OF FOUR PRETREATMENT PROCEDURES FOR MALDI-TOF MS YEAST IDENTIFICATION IN THE ROUTINE CLINICAL LABORATORY*. *Med. Mycol.* (2013); 51: 371-377.

⁴⁴. Tingting Zhang, Jie Lei, Hanijang Yang, Kun Xu, Rui Wang, Zhiying Zhang . *AN IMPROVED METHOD FOR WHOLE PROTEIN EXTRACTION FROM YEAST SACCHAROMYCES CEREVISIAE*. *Yeast.* (2011); 28: 795-798.

⁴⁵. Anne-Claire Silvestri, Jessica Sabatier, Julien Ducruet. *A NEW METHOD OF PROTEIN EXTRACTION FROM RED WINES*. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* (2013); 47(3): 213-220.

En este punto la placa ya estaría preparada para transportarla al LTI (Laboratorio de Técnicas Instrumentales), edificio en el que se encuentra el MALDI-TOF utilizado para el análisis. Para evitar confusiones durante la preparación de la placa, se elaboraron plantillas previas con la información del contenido y distribución de cada pocillo. En el **ANEXO II**, se muestra un ejemplo de la plantilla elaborada para el primer análisis en MALDI de 7 muestras de levaduras comerciales.

Una vez finalizado el análisis en el espectrómetro es necesario limpiar la tarjeta metálica. Para proceder con su limpieza es necesario seguir el protocolo⁴¹ recomendado por Bruker, utilizando etanol al 70% y ácido trifluoracético al 80%.

5.8 Registro del espectro de masas MALDI-TOF.

A diferencia de los dos primeros bloques del trabajo experimental, la recogida de muestras y preparación de cultivos, llevados a cabo respectivamente en la Bodega Dominio de Cair y en los laboratorios de la facultad de Ciencias de la Universidad de Valladolid, el análisis de cepas con MALDI-TOF MS se realizó en el LTI (Laboratorio de Técnicas Instrumentales).

En concreto, el instrumento que se ha utilizado es el MALDI-TOF Autoflex™ Speed de Bruker Daltonics⁴⁶ (ver *Figura 18*), un espectrómetro de masas desorción/ionización láser asistida por matriz con detector de tiempo de vuelo. Las especificaciones técnicas más relevantes se recogen en la *Tabla 8*, al final de esta página.

Tabla 8-. Especificaciones técnicas del equipo.

FABRICANTE	Bruker Daltonics Inc.
FUENTE DE IONES	Desorción/ionización láser asistida por matriz
LÁSER	3º armónico Nd:YAG 355nm + N ₂ 337nm
SOFTWARE	FlexControl 3.0
BASE DE DATOS	Maldi Biotyper 3.1
IDENTIFICACIÓN	Bacterias, levaduras y hongos filamentosos
PROTEÍNAS	2.000-20.000 Da
MATRIZ	1 µL α-ciano-4-hidroxicinámico (CHCA)
VELOCIDAD	96 muestras/h



Figura 18. MALDI-TOF MS Autoflex Speed. Fuente Bruker Daltonics.

⁴⁶ Bruker Daltonics Website, technical details. INSTRUMENTATION REPORT DOCUMENTATION.

Este espectrómetro de masas de tiempo de vuelo permite la identificación de numerosos microorganismos, ya que proporciona su denominada "*Huella Peptídica*" o "*Huella Molecular*", exclusiva para cada uno de ellos. Esta huella es una representación de la distribución característica de la masa de los péptidos en forma de espectro de masas. Después de ser comparada con las huellas de microorganismos conocidos y presentes en las bases de datos, se asocia estadísticamente con la más semejante, generando un resultado o "*score*" y logrando así su identificación.

Por otro lado, permite analizar una gran variedad de compuestos orgánicos con tamaños de hasta 20.000 Da, sin su destrucción durante la fase de ionización. Además, su relativo bajo coste, los resultados inmediatos proporcionados y la sencillez de preparación de la muestra, lo han convertido en una técnica fundamental de análisis en el campo de la Bioquímica y la Microbiología Cíclina. Entre las principales aplicaciones encontramos:

- Análisis de polímeros.
- Identificación de microorganismos.
- Análisis de fármacos.
- Análisis de muestras ambientales.
- Análisis de glicanos y glicoproteínas.
- Investigación de proteínas, principalmente ribosomales.

Se trata de una técnica en desarrollo, que puede ser aplicada en muchos otros campos. Sin embargo, en el ámbito de la Enología, todavía tiene muchas limitaciones, ya que son escasos los espectros de masas incluidos en las librerías comerciales.⁴⁷ Es por ello, por lo que el objetivo de este trabajo es evaluar si la técnica MALDI es adecuada para muestras enológicas.⁴⁸

Para describir el equipo empleado y la técnica MALDI-TOF de forma simple, realizaremos su descripción en tres bloques:⁸

1. Fuente de ionización MALDI (desorción/ionización láser asistida por matriz).
2. Analizador de masas TOF (tiempo de vuelo).
3. Detector de iones.

A continuación se describen brevemente estos tres bloques:

⁴⁷. Carla Agustini Bruna., Paulino Silva Luciano., Bloch Jr. Carlos., M.B.Bonfim Tania., Almeida da Silva Gildo. *EVALUATION OF MALDI-TOFF MASS SPECTROMETRY FOR IDENTIFICACION OF ENVIROMENTAL YEASTS AND DEVELOPMENT OF SUPPLEMENTARY DATABASE*. Appl Microbiol Biotechnol. (2014); 98:5645–5654.

⁴⁸. Julia C. Usbeck, Caroline Wilde, Dave Bertrand, Jürgen Behr, Rudi F.Vogel. *WINE YEAST TYPING BY MALDI-TOF MS*. Springer, Appl. Microbiol Biotechnol. (2014); 98: 3737-3752.

1. Fuente de ionización MALDI ó desorción/ionización láser asistida por matriz (Matrix-assisted laser desorption/ionization):

La fuente de ionización en nuestro equipo MALDI está constituida por dos tipos de láser. En primer lugar, un láser ultravioleta de Nd:YAG con una longitud de onda de 355 nm, acompañado de un segundo láser de N₂ con una longitud de onda de 337 nm. El empleo de ambos láseres produce la desorción e ionización de la muestra, es decir, crea un haz de iones en estado gaseoso cargados eléctricamente.⁴⁹ Esta ionización suave solo es posible si la muestra está acompañada de una matriz orgánica saturada. Para que se produzca la ionización, analito y matriz se depositan sobre una placa metálica, como la mostrada en la *Figura 17*, junto con un disolvente, y se ejerce vacío. Cuando este último se evapora, matriz y muestra cocrystalizan en la superficie de la placa y la segunda queda embebida en la primera. La utilización de una matriz es esencial para que la ionización ocurra de manera satisfactoria, ya que actúa absorbiendo la energía y aportando protones a la muestra, transformándola en un ión y permitiendo la vaporización de parte del sustrato. Los iones se extraen al ser sometidos a un campo eléctrico y dirigidos al tubo de vuelo o analizador TOF.

La elección de la matriz define la calidad del espectro obtenido en el análisis. Generalmente son sólidos cristalinos, con alta absorbancia y baja energía de ionización en la región del visible (UV ó IR), en la que opera el láser. Para facilitar la formación de la mezcla con el analito, la matriz debe ser polar y además, ácida, para que pueda ceder fácilmente protones durante la ionización de la muestra. Deben volatilizarse de manera sencilla cuando incide el láser, pero nunca llegar a evaporarse espontáneamente. Algunas de las matrices más utilizadas en MALDI se recogen en la *Figura 19* y son: el ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (HCCA) y su derivado el ácido 4-cloro- α -cianocinámico (CCA), el ácido 2,5-dihidroxi-benzoico (DBH), el ácido 3-metoxi-4-hidroxicinámico (FA) y el ácido sinapínico (SA).⁵⁰

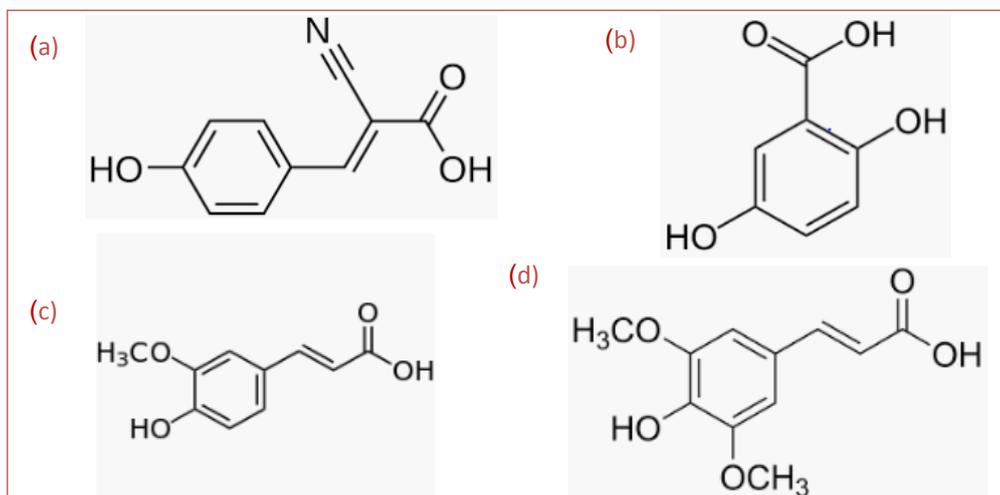


Figura 19. Representación esquemática del: (a) ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (HCCA); (b) ácido 2,5-dihidroxi-benzoico (DBH), (c) ácido 3-metoxi-4-hidroxicinámico (FA), (d) ácido sinapínico (SA).

Una vez preparada la placa y dentro del equipo, se realiza el vacío en el tubo de vuelo y a continuación, los cristales son irradiados con pulsos láseres. La irradiación se produce en un corto intervalo de tiempo para evitar que la muestra pueda dañarse o degradarse demasiado por un exceso de temperatura. El equipo nos permite elegir el depósito cristalino o pocillo, sobre el que actuará el láser pulsado, ya que dispone de una cámara que nos permite desplazarnos por la placa metálica. El láser que opera en la técnica MALDI lo hace en la región del visible. Entre los más utilizados tenemos⁵⁰ los de N₂ (337 nm), los de Er:YAG (2,94 μm), TEA-CO₂ (10,6 μm) y el de Nd:YAG (355 nm) de estado sólido.

Bruker ha aplicado la tecnología *SmartBeam*⁵¹ a su equipo MALDI-TOF MS AutoFlex Speed, que combina la flexibilidad de un láser de N₂ con la velocidad de los láseres de Nd:YAG.⁵² El uso de láseres de estado sólido está restringido a ciertos métodos de preparación de matrices, pero la suma de un láser de N₂, ha permitido obtener mejoras considerables en los espectros generados. Para conseguir combinar ambos láseres, todos los pulsos deben dirigirse hacia la misma trayectoria, para incidir de manera exacta sobre el analito. Para ello, el haz pasará por diversos elementos como un atenuador, un modulador, varias lentes y un diafragma. En la *Figura 20*, se muestran las mejoras de resolución en el espectro de una proteína, obtenido con un láser de N₂, y con la tecnología SmartBeam.

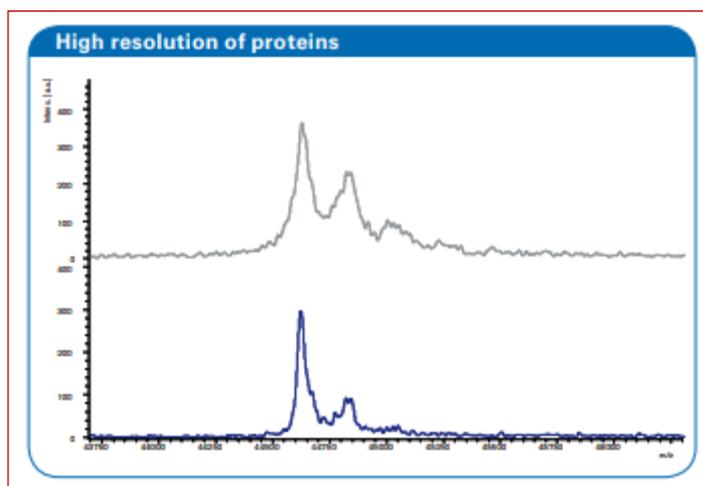


Figura 20. Espectro con láser N₂ (arriba), con Smartbeam (abajo). Fuente Bruker Daltonics.

⁴⁹ Lay Jr JO, Holland RD. *RAPID IDENTIFICATION OF BACTERIA BASED ON SPECTRAL PATTERNS USING MALDI-TOF MS*. *Methods Mol Biol*. (2000); 146:461-87.

⁵⁰ Andrew E. Clark, Erin J. Kaleta, Amit Arora, Donna M. Wolk. *MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION IONIZATION-TIME OF FLIGHT MASS SPECTROMETRY: A FUNDAMENTAL SHIFT IN THE ROUTINE PRACTICE OF CLINICAL MICROBIOLOGY*. *Clinical Microbiology Reviews*. (2013); 547-603.

⁵¹ Bruker Daltonics . *INNOVATIVE SMARTBEAM LASER TECHNOLOGY ENHANCES MALDI-TOF BASED PROTEOMICS APPLICATIONS*.

⁵² Armin Holle, Andreas Haase, Markus Kayser, Jens Höhndorf. *OPTIMIZING UV LASER FOCUS PROFILES FOR IMPROVED MALDI PERFORMANCE*. *J. Mass Spectrom*. (2006); 41: 705-716.

Como hemos explicado al inicio del subapartado, cuando el láser incide sobre los cristales de matriz y analito, rápidamente se produce la sublimación de estos (sin pasar por estado líquido), generando una nube de iones. El mecanismo es un poco complicado de explicar, pero como resumen podemos decir que se produce una doble ionización, en primer lugar la de las moléculas de la matriz tras la excitación fotónica, que desencadena en una segunda ionización, la del analito. En la *Figura 21*, mostrada a continuación, se refleja un esquema del proceso de formación de iones, desde la intrucción de la placa hasta el transporte de los iones al analizador.

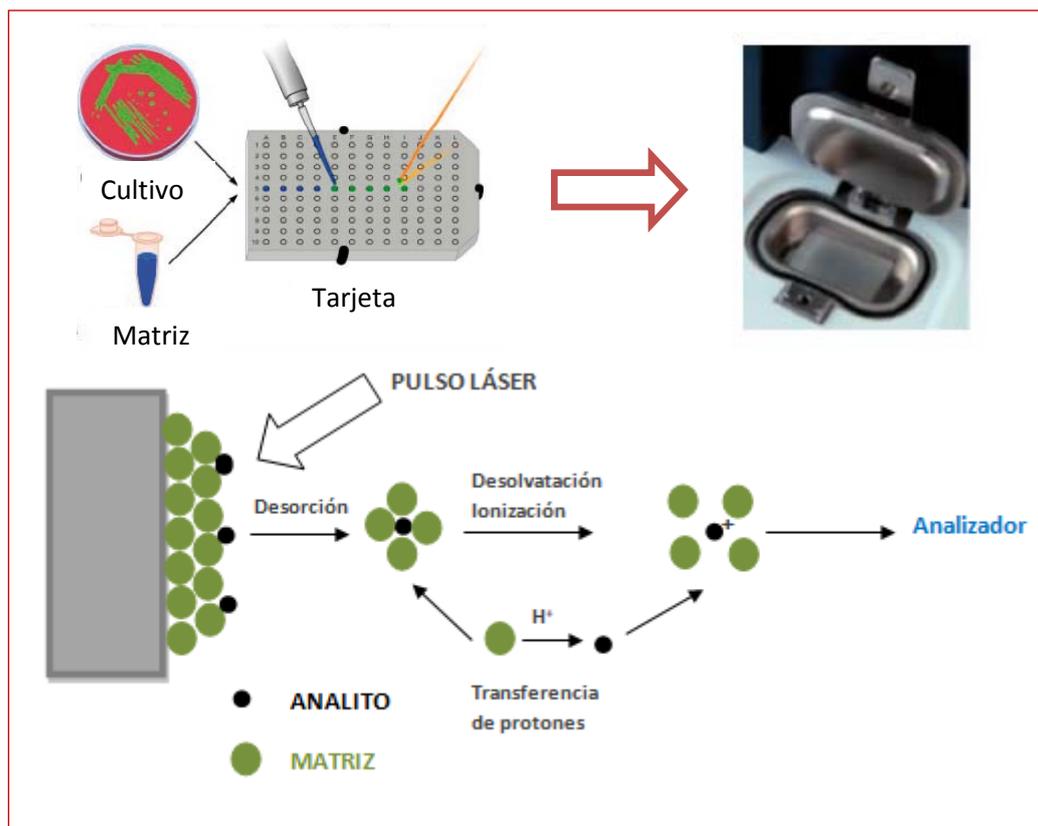


Figura 21. Mecanismo de ionización en MALDI.

2. Analizador de masas TOF (tiempo de vuelo):

Es el segundo componente del equipo, encargado de separar los iones por su relación masa/carga (m/z). Estas relaciones son medidas electrodinámicas de la velocidad con la que los iones se desplazan desde la tarjeta metálica hasta el detector, atravesando el tubo de tiempo de vuelo (TOF).⁵³

⁵³. Dra. Yuliya Zboromyska. *APLICACIONES DEL MALDI-TOF EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA*. Ed Cont Lab Clín. (2014); 20:87-98.

La primera función del analizador es la separación individual de toda la mezcla de iones procedentes de la ionización, y esto se consigue haciéndolos atravesar una rejilla, situada antes del tubo de vuelo. La aplicación de un campo eléctrico mediante un sistema de electrodos es lo que permite la aceleración de los iones y su desplazamiento. Una vez que cruzan esta placa, entran en el tubo de vuelo, una zona libre de campo eléctrico donde se mueven a velocidad constante. Ahora que todos los iones han adquirido la misma energía cinética, se desplazarán a mayor o menor velocidad en función de su relación m/z . Como casi todos los iones van a tener carga $+1$, la masa se convierte en el ratio determinante de la velocidad de transporte. De esta forma, los iones más pequeños se desplazarán más rápido, alcanzando el detector antes que los iones pesados.

A continuación describimos las ecuaciones del movimiento del TOF:⁵⁴

(1) Los iones desorbidos pasan a la región de aceleración, donde tras la aplicación de un potencial electrostático por los electrodos, adquieren energía cinética. Su relación se puede expresar como:

$$\frac{1}{2}mv^2 = zeV_1$$

donde m es la masa del ión; z su carga; v su velocidad; V la diferencia de potencial aplicada y e la carga del electrón.

(2) Si despejamos el valor de la velocidad obtenemos la siguiente expresión:

$$v = \sqrt{2zeV_1/m}$$

Vemos que el valor de la velocidad depende inversamente de la masa, por lo que la velocidad de los iones pesados será menor y por lo tanto, pasarán más tiempo en el tubo de vuelo.

(3) Como conocemos el valor de V , y podemos establecer la longitud del tubo como d , es posible estimar el tiempo t , que emplea el ión en atravesarlo y llegar al detector:

$$t = \frac{d}{v} = \frac{d}{\sqrt{2zeV_1}} = \frac{d\sqrt{m/z}}{\sqrt{2eV_1}} = K\sqrt{m/z}$$

Observamos que el tiempo de vuelo t , está relacionado directamente con la relación m/z , donde K es una constante que depende de d , e y V . Como se trata de una ionización suave, por lo general, solo se producirán iones monopositivos.

⁵⁴. Cristina Gutiérrez Lopez. *TAXONOMÍA DE LEVADURAS DE ORIGEN ENOLÓGICO POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid (2015); 1:27-28.

El método TOF lineal tiene una alta sensibilidad y eficacia analizando muestras en bajísimas concentraciones del orden de femtomolar (10^{-15} mol/litro) y attomolar (10^{-18} mol/litro), sin embargo, presenta ciertas limitaciones de resolución en masas altas.⁵⁴ La distribución espacial de las moléculas de analito sobre la superficie y la desigual distribución de energía del láser pulsado sobre esta, tienen como resultado que iones con la misma relación m/z , puedan tener diferentes energías cinéticas. De ser así, ya no se cumpliría correctamente la deducción de que los iones menos pesados llegan antes al detector que los de mayor masa y conduciría a mediciones erróneas. A continuación, se detallan los principales factores o distribuciones que condicionan la resolución del sistema.

La resolución del analizador TOF lineal es función de estas tres distribuciones iniciales:⁵⁵

$$f(\Delta t) = f(\Delta t_0), f(\Delta s_0), f(\Delta E_{c0})$$

- Temporal (Δt_0): iones que tienen la misma relación masa/carga y se forman en el mismo plano, pero en distintos momentos, por lo que se transportan con una diferencia de espacio y tiempo constante (Figura 22).

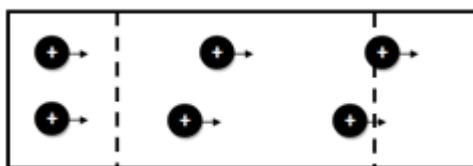


Figura 22. Iones que parten a diferentes tiempos.

- Espacial (Δs_0): iones con la misma relación masa/carga y la misma energía cinética, pero que se forman en lugares diferentes de la fuente. La energía cinética adquirida difiere entre sí y por lo tanto entran en el TOF con velocidades distintas (Figura 23).

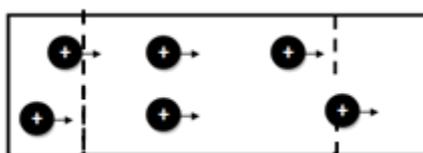


Figura 23. Iones que parten de diferentes puntos.

- Energía cinética (ΔE_{c0}): en este caso, se produce por las diferentes energías cinéticas iniciales que presentan los iones, de forma que sus velocidades también son diversas y llegan al detector sucesivamente (Figura 24).

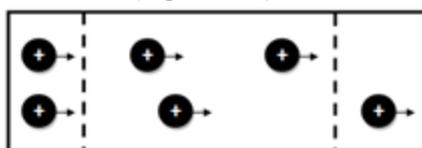


Figura 24. Iones con diferentes velocidades iniciales.

⁵⁵. Jürgen H. Gross. *MASS SPECTROMETRY: A TEXTBOOK*. Springer 1st ed. (2004); 4:113-128.

La resolución del analizador TOF podría empeorar con un nuevo factor si este no fuera lineal. Iones que tienen la misma relación masa/carga, se forman en el mismo plano y en el mismo momento, tomarían direcciones opuestas y no atravesarían el tubo (Figura 25).

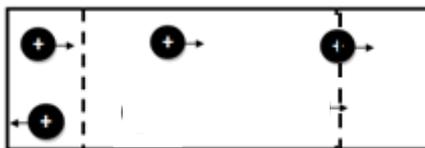


Figura 25. Iones con diferentes direcciones.

Para minimizar estos problemas de resolución se introdujeron mejoras en el analizador TOF. La extracción pulsada retardada (*DE, Delayed Extraction*), mejoraría la distribución temporal, el uso del reflectrón, la distribución de energía cinética y el diseño Wiley-McLaren el factor espacial, todos ellos explicados con detalle a continuación.⁵⁶

Una vez producida la ionización, en la **extracción pulsada retardada**,⁵⁷ se puede ejercer una pausa de unos cientos de nanosegundos antes de aplicar la diferencia de potencial. Durante esta pausa, los iones se mueven libremente por el espacio y aquellos con menor velocidad inicial, que se encuentran más cerca de la fuente, serán más acelerados que los que se encuentran lejos. Esto permite que los iones más lentos alcancen a los más veloces. Si se aplica correctamente este método, todos los iones con la misma relación m/z , llegan al detector a la vez. Así se consigue disminuir el leve ensanchamiento de picos producido por la distribución de energías cinéticas iniciales de los iones en la extracción en continuo. En la Figura 26, en la izquierda, se muestra un diagrama en el que se puede observar cómo dos iones alcanzan el detector a la vez gracias a la extracción pulsada retardada y en la derecha de la figura, vemos un espectro de masas con mayor ensanchamiento (extracción continua) que otro (extracción pulsada retardada).

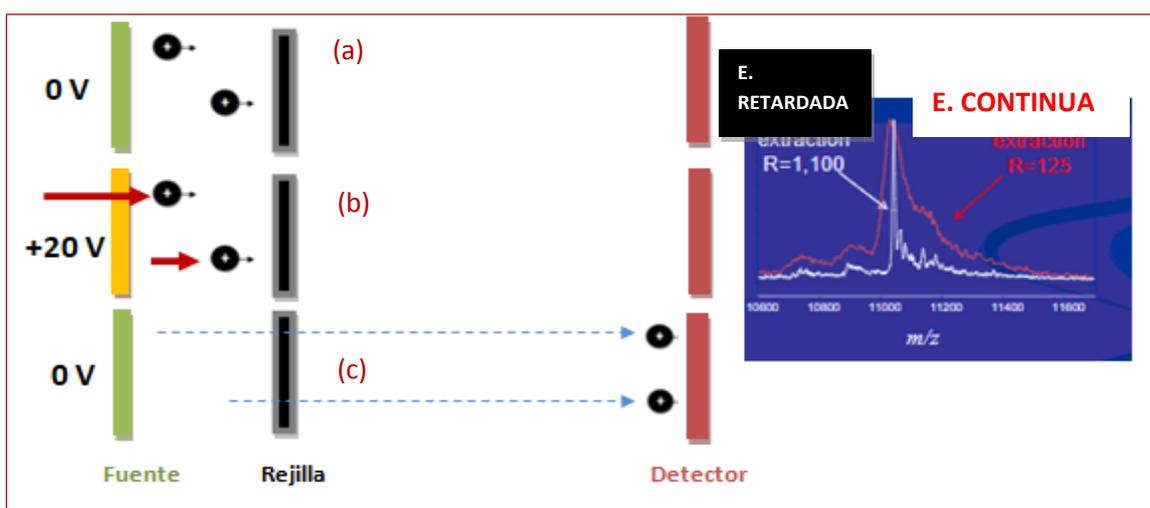


Figura 26. Diagrama y espectro comparativo de la extracción pulsada retardada. (a) "Delay Time", no se aplica campo eléctrico; (b) se aplica campo eléctrico, acelerando más a los iones lentos; (c) los iones lentos alcanzan a los rápidos en el detector.

⁵⁶ M. L. Vestal, P. Juhasz, S. A. Martin. *DELAYED EXTRACTION MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION TIME-OF-FLIGHT MASS SPECTROMETRY*. Rapid Communications in Mass Spectrometry. (1995); 9: 11.

El gradiente de potencial y el tiempo de demora (*delay time*), deben ser ajustados con el fin de obtener la máxima resolución para un rango de masas dado. Por lo general, cuanto menor es la relación masa/carga, menores voltajes y retrasos más cortos se requieren para enfocar iones de menor relación masa/carga.

Con el objetivo de disminuir la falta de resolución debido a la distribución desigual de energías cinéticas de los iones, aparece la figura del **reflectrón**.⁵⁷ Fue desarrollado por primera vez por Mamyryn en 1972.⁵⁸ El reflectrón constituye un elemento de enfoque situado en el extremo del tubo de vuelo, encargado de cambiar la dirección de desplazamiento de los iones. Este reflector electrostático está compuesto por una serie de lentes a las que se aplican potenciales crecientes. Como en el caso anterior, se crea un campo de retraso, en el que las lentes actúan como espejos desviando los iones y enviándolos de nuevo al tubo. Finalmente, el reflejo de los iones es recogido por el detector.

Los iones con mayor energía cinética penetrarán más en el reflectrón y pasarán más tiempo en él, que aquellos con menor velocidad, lo que permite igualar los tiempos de vuelo y disminuir el ensanchamiento de picos, mejorando la resolución. El mecanismo llevado a cabo por el reflectrón se visualiza en la *Figura 27*. Este diseño permite aumentar la trayectoria de vuelo sin aumentar las dimensiones del tubo.

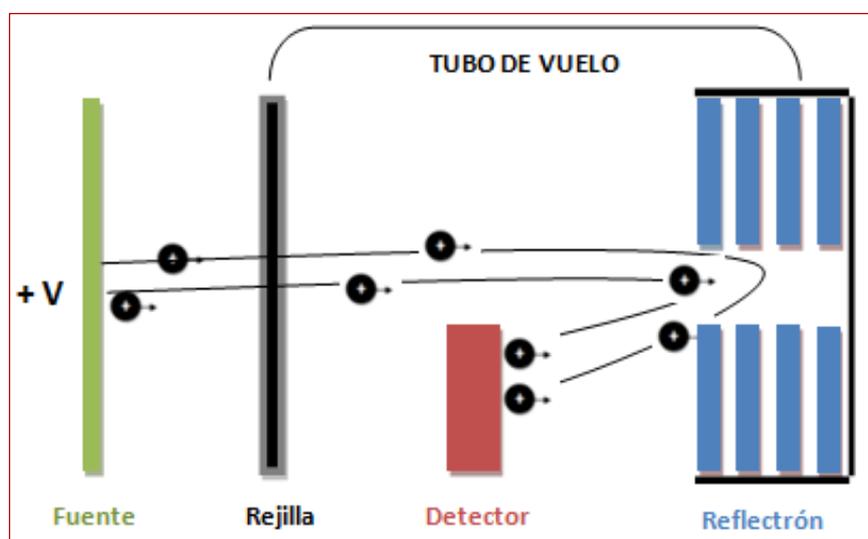


Figura 27. Diagrama del mecanismo de un TOF con reflectrón simple. Pese a partir con diferentes energías cinéticas, los iones iguales llegan al detector a la vez.

⁵⁷. Juaneka Monet Hayer, B.S. *DETECTION OF MICROORGANISMS USING MALDI AND ION MOBILITY MASS SPECTROMETRY*. Tesis Doctoral. Florida A&M University (2013).

⁵⁸. B. A. Mamyryn, V. I. Karataev, D. V. Shmikk, V. A. Zagulin. *THE MASS-REFLECTRON, A NEW NONMAGNETIC TIME-OF-FLIGHT MASS SPECTROMETER WITH HIGH RESOLUTION*. Zh. Eksp. Teor. Fiz. (1973); 64: 82-89.

A pesar de lograr una alta resolución, este método solo se puede emplear en masas bajas (<10kDa) y con baja sensibilidad, a diferencia de la extracción pulsada retardada que sí que mantiene una alta sensibilidad.

El reflectrón usado puede ser simple o de dos etapas.⁵⁹ El de dos etapas, corrige la distribución espacial inicial de los iones de la muestra mediante dos campos de retardo separados, con diferentes gradientes de potencial. Con el reflectrón de dos etapas conseguimos dispositivos más compactos gracias al gran proceso de desaceleración que se produce en su interior.

Para corregir la distribución espacial, el último de los factores que afecta a la resolución del tubo de vuelo tipo TOF, **Wiley y McLaren**⁶⁰ diseñaron en 1955 una **fuelle de iones** capaz de modificar la focal a las necesidades requeridas. Ambos cambiaron el diseño habitual de la fuente de dos placas, donde la distancia focal era fija, por una fuente de tres placas: repulsora, aceleradora y tierra. Este nuevo diseño permitía focalizar todos los iones, independientemente de que fueran iguales o no, en la posición del detector. En la *Figura 28*, se muestra el diagrama del diseño de tres placas Wiley-McLaren. Normalmente, las 3 placas se conectan a potenciales de 1900 V (repulsora), 1500V (aceleradora) y 0 V (tierra).⁶¹

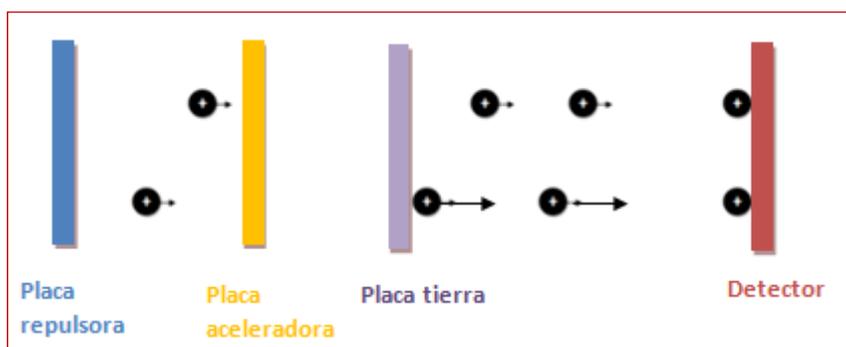


Figura 28. Diagrama del diseño de Wiley y Mclare.

Con estos tres diseños/mecanismos se han conseguido corregir los tres factores enumerados en la página 39, que limitaban la resolución del analizador de masas tipo TOF.

⁵⁹ Wayne A. Bryden, Richard C. Benson, Scott A. Ecelberger, Terry E. Phillips, Robert J. Cotter, Catherine Fenselau. *THE TINY-TOF MASS SPECTROMETER FOR CHEMICAL AND BIOLOGICAL SENSING*. Johns Hopkins apl Technical Digest, volume 16, number 3, (1995).

⁶⁰ Wiley, W.C. and McLaren, J.B. (1955) Rev. Sci. Instrum., 16, 1150

⁶¹ Rebeca de Nalda Mínguez. *FOTODISOCIACIÓN Y IONIZACIÓN DE MOLÉCULAS ORGÁNICAS CON PULSOS LÁSER DE DISTINTA DURACIÓN*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid (1991); 2:31.

3. Detector de iones:

Al final de la zona de vuelo, los iones impactan con el detector recogiendo toda la información necesaria para la elaboración de los espectros de masas de cada muestra analizada. Los espectros son representaciones gráficas de las masas de los diferentes iones, calculadas a partir de sus tiempos de vuelo. En el eje de las ordenadas se representa la relación m/z , mientras que en el de las abscisas la intensidad o el número de iones de una determinada m/z que ha impactado contra el detector.

El fundamento del detector del espectrómetro de masas se basa en un plato de microcanales⁶² (MCP, *Microchannel Plate*), que proporciona una señal eléctrica por cada grupo de iones que llega a él. Estas señales en forma de corriente eléctrica son enviadas a un registrador de transitorios u osciloscopio digital. Mediante un ordenador y un software previamente calibrado, el espectrómetro genera numerosos espectros de masas individuales, cuyo sumatorio nos proporciona el espectro de adición del analito problema. Cada microorganismo presentará una serie de picos característicos, y su comparación con las bases de datos ya existentes nos permitirá su identificación o comparación con otros semejantes.

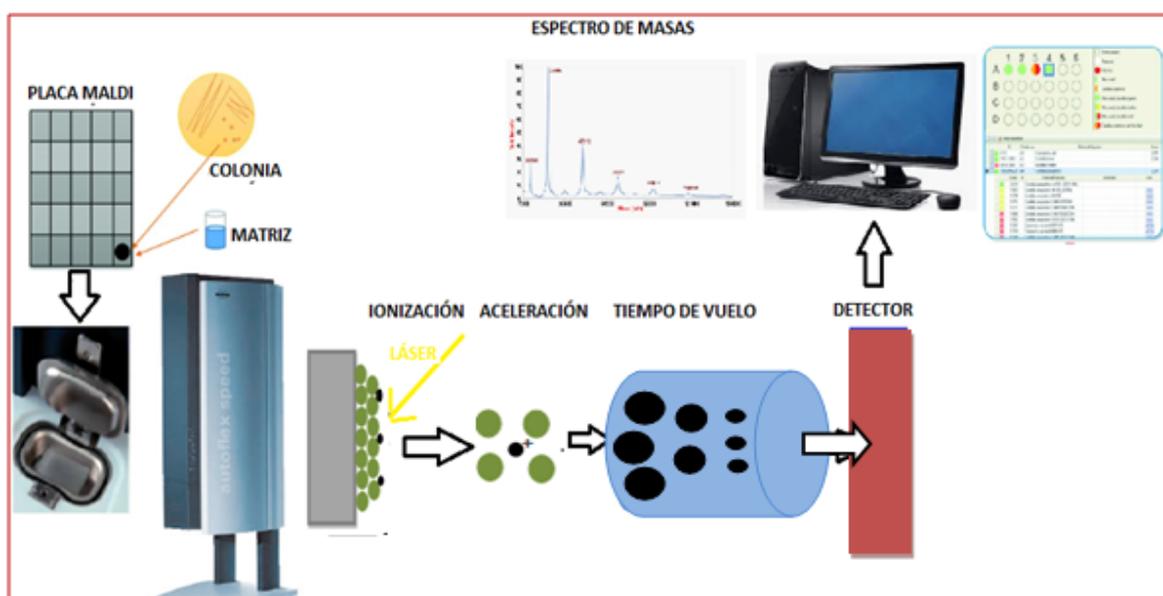


Figura 29. Esquema secuencial del proceso MALDI-TOF MS.

Todos los pasos comentados en este apartado aparecen simplificados en forma de diagrama en la *Figura 29*. Ahora que ya hemos explicado la instrumentación de nuestro MALDI-TOF Autoflex™ Speed y los fundamentos de la técnica empleada, proseguimos con el procedimiento experimental⁴¹.

⁶² Joseph Ladislav Wiza. *MICROCHANNEL PLATE DETECTORS*. Nuclear Instruments and Methods. (1979); 162(1979): 587-601.

Una vez tenemos la placa preparada e introducida en el MALDI, iniciamos el programa FlexControl y procedemos a la calibración del sistema mediante la medición del espectro de BTS (pocillo aislado). Para programar la calibración, seleccionamos el método MBT_FC, el cual contiene un listado de masas del BTS, y seleccionamos el pocillo que contiene el patrón. Tras haber seleccionado este, aplicamos de forma manual pulsos láser en diversas áreas del pocillo, hasta obtener un espectro con una intensidad mínima de 10^4 . La cámara que incluye el equipo nos permite desplazarnos por toda la tarjeta y ver el lugar exacto donde va a incidir el láser. Además, el programa nos permite también regular la intensidad del láser.

Una vez asignados automáticamente los picos y concluida la calibración, es decir, generado el espectro de masas del patrón (*Figura 30*), procedemos a guardar el método. Esta tarea debe realizarse cada vez que realicemos un nuevo análisis para obtener espectros de calidad.

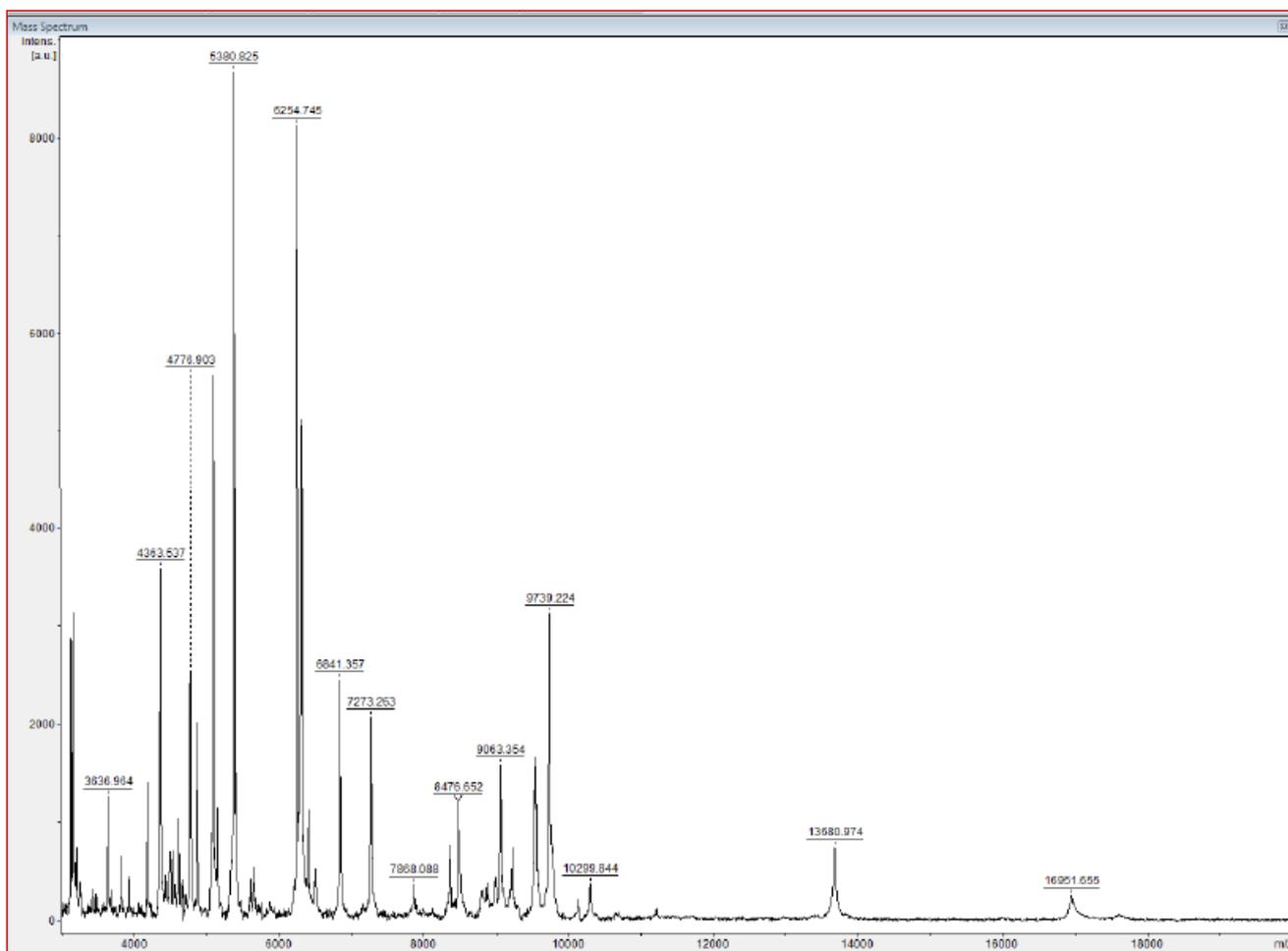


Figura 30. Espectro de BTS obtenido con MALDI.

Para realizar la lectura de nuestros microorganismos, seleccionamos y nombramos secuencialmente los spots o pocillos sobre los que queremos que incida el láser:

- Los 8 pocillos que contienen nuestra cepa. Se realizarán tres lecturas de cada uno de ellos, generando un total de 24 espectros.
- El pocillo central, que contiene la cepa y el BTS. Una única lectura que proporcionará un solo espectro.

En primer lugar, el láser actúa sobre el pocillo que contiene el BTS y después, sobre los 8 restantes. Sobre cada pocillo se realizan varios pulsos láser hasta obtener un intensidad mínima de 10^4 . Se espera hasta que el equipo termine de analizar todos los spots programados y genere sus espectros de masas, como el mostrado en la *Figura 31*. Como hemos señalado antes, estos son representaciones gráficas de la relación masa/carga frente a la intensidad.

A pesar de haber revivido 71 muestras para su análisis en MALDI-TOF, fueron finalmente 104 los análisis realizados. El motivo de este incremento, fue la comparación de diversas metodologías en una misma muestra para conocer cual era más efectiva (transferencia directa frente a extracción previa de proteínas o variaciones en la cantidad de BTS añadido, entre otras).

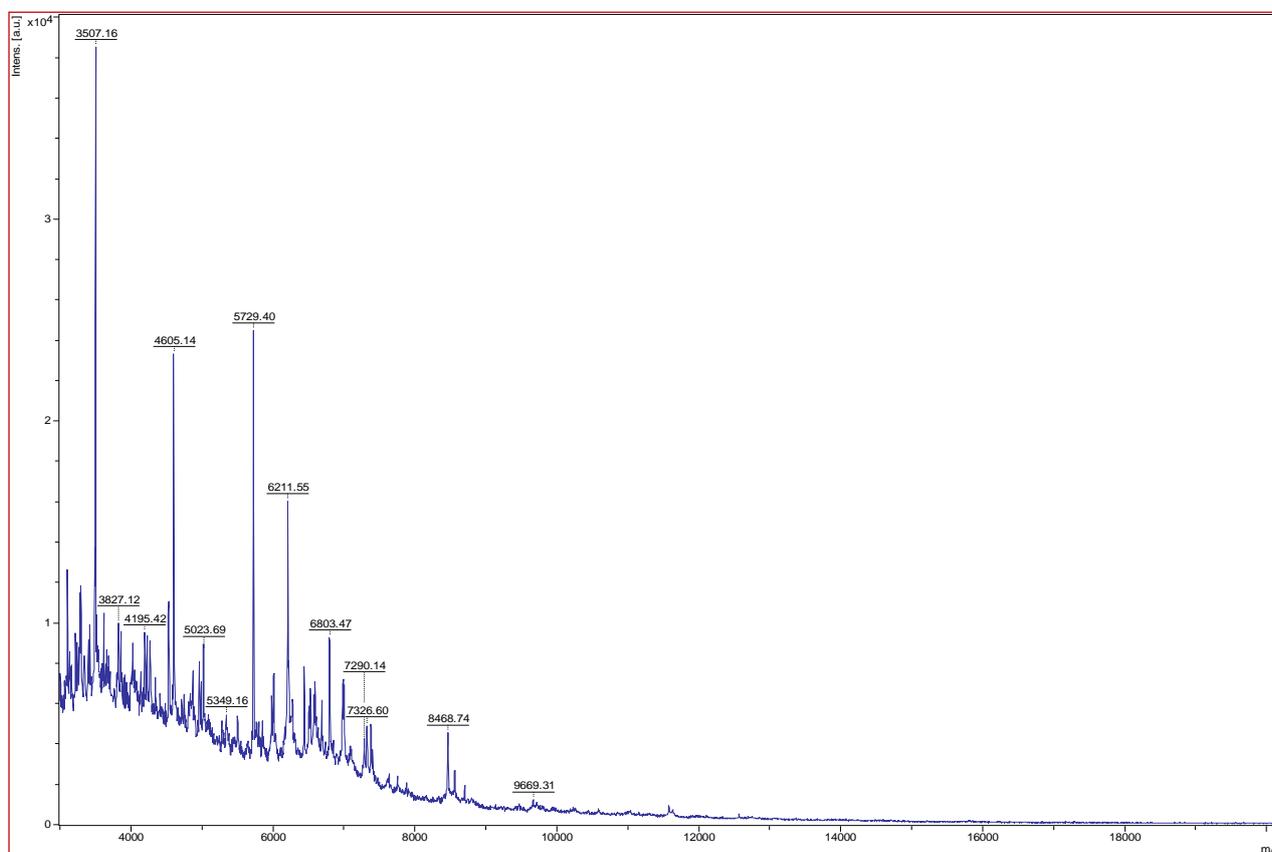


Figura 31. Espectro de la muestra D13-LP-YPD-EXT.

6. RESULTADOS

6.1. Procesado de espectros (recalibrado).

Una vez obtenidos los 24 espectros de cada colonia analizada, se realizó el procesado de estos con el programa FlexAnalysis. Además de estos 24 espectros, obtuvimos el del pocillo central que contenía una mezcla de proteínas de la colonia con el BTS. Este espectro individual es el que nos permite calibrar los 24 restantes y así generar su Perfil Patrón o MSP (*Main Spectrum Profile*). Si comparamos el espectro patrón del BTS con cualquier espectro de analito más patrón, encontramos picos comunes correspondientes al BTS y picos exclusivos del analito. Estos últimos son los que nos permiten identificarlo y diferenciarlo de otros microorganismos. Para realizar la recalibración seguimos los siguientes pasos en cada una de las muestras:

- Cargamos en FlexAnalysis el método MBT_StrandardFAMSMMethod, que contiene la librería de masas del BTS y el espectro de una muestra junto con el BTS (1 espectro).
- Suavizamos el espectro.
- Extraemos la línea base.
- Identificamos el pico con el valor de 6255,4 Da y lo recalibramos moviendo el espectro para que el pico correspondiente al BTS tome este valor.
- Cargamos los 24 espectros de la muestra más el espectro de la muestra con BTS (25 espectros). Cargamos el método de nuevo, suavizamos y extraemos sus líneas bases.
- En esta ocasión tenemos que buscar un pico en común en todos los espectros para realizar el recalibrado.
- Finalmente volvemos a abrir los espectros de la muestra, sin el espectro que contiene el BTS, ya recalibrados (24 espectros). Cargamos el método de nuevo, suavizamos y extraemos sus líneas bases.
- Los agrupamos y comprobamos si se superponen los unos con los otros. Si encontramos espectros de muy baja intensidad, casi planos o con picos sueltos, podemos eliminarlos, siempre y cuando al menos obtengamos 20 espectros válidos.

De los 104 análisis procesados, 91 espectros fueron calibrados correctamente y 13 fueron descartados por no ser válidos. Se comprobó que la transferencia directa de muestras (potencialmente levaduras) con administración de fórmico o sin él, no era una vía adecuada para su identificación. Solo se obtuvieron 2 espectros válidos de las 14 muestras analizadas con este sistema, por esta razón, en los sucesivos análisis solo se aplicó el método de extracción previa de proteínas. .

Una vez finalizados todos estos pasos, ya disponemos de espectros calibrados y podemos generar su MSP.

6.2 Generación de los MSP (*Main Spectrum Profile*).

Para elaborar una nueva base de datos mediante la creación de los MSP, empleamos el programa Maldi Biotyper, donde abriremos los espectros recalibrados de cada muestra (entre 20 y 24).

A continuación, el programa se encarga de transformar las señales continuas de los espectros iniciales en señales discretas, elaborando un único espectro que refleja los 70 picos más característicos de la colonia analizada. En la *Figura 32* podemos ver un ejemplo de un espectro MSP. Este espectro es el denominado *Espectro Patrón* del microorganismo, su "Huella Dactilar", específica para cada uno de ellos, que será utilizada posteriormente para otras identificaciones.

Una vez obtenidos los 91 MSP, se procede a elaborar el dendrograma (*Figura 33*).

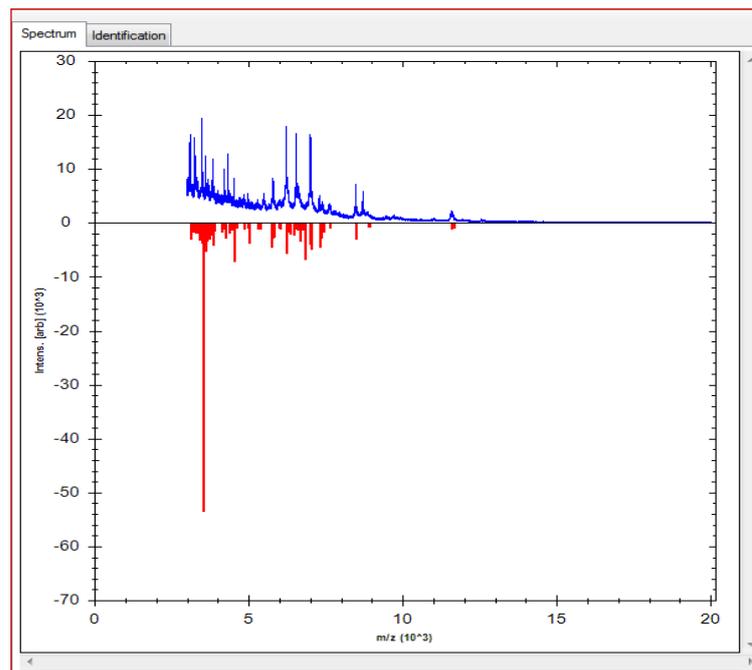


Figura 32. Ejemplo de un espectro MSP.

6.3 Dendrograma.

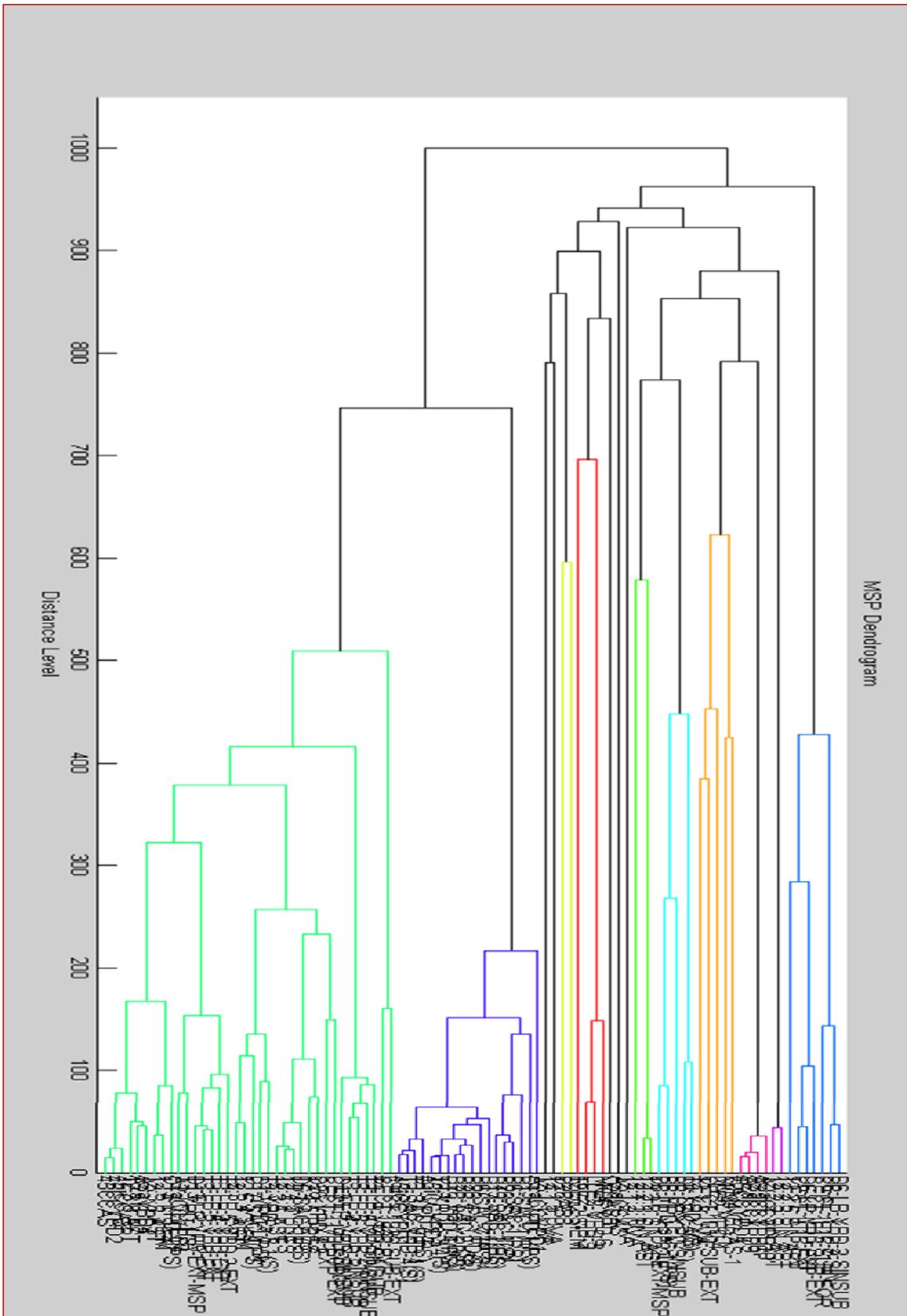


Figura 33. Dendrograma de las 91 muestras problema.

En la *Figura 33*, se muestra el dendrograma generado por Maldi Biotyper a partir de las 91 señales discretas de las muestras analizadas. Como el número de muestras es demasiado elevado para el tamaño de la página, los nombres aparecen superpuestos. Para una visualización correcta, en el **ANEXO III**, se muestra el diagrama dividido en varias páginas.

Un dendrograma es una representación gráfica basada en un procedimiento jerárquico de agrupamiento de datos, formando un diagrama en forma de árbol.⁶³ Los datos se van organizando en categorías, que a su vez se subdividen en otras subcategorías o familias, hasta alcanzar el nivel de clasificación deseado. En definitiva, las familias se establecen en función a similitudes o diferencias entre los espectros de las diferentes muestras. Cuanto más largo es el ramal del dendrograma, mayores diferencias existen entre los microorganismos analizados y viceversa.

A primera vista, en nuestro dendrograma observamos dos familias o clústers bien diferenciados. El inferior, más localizado, que a su vez se divide en dos subfamilias, la representada con color azul oscuro y la verde. El superior, mucho más disperso, contiene nueve subfamilias. La gran cantidad de clústers generados hace un poco difícil su estudio, pero con la localización de las CECT, podemos establecer criterios para la identificación.

Las CECT 1170 (*Saccharomyces cerevisiae*) y la CECT 1926 (*Saccharomyces bayanus*) se encuentran en el clúster verde inferior. Dentro de él también encontramos muestras de levaduras puras comerciales cuya base es la *Saccharomyces cerevisiae*, como las D13-LP-YPD-SINSUB o muestras de mosto con siembra y presiembra de esta levadura, D26-YPD-4.2, D1-YPD-1(PS), D17-SAC-4(PS). En este bloque también aparecen, muestras del seguimiento del DEP-12 en las fases en las que ya había sido inoculado con la misma levadura comercial que el DEP-13, como la 12.4.1 PRES o la 12.5.6 SIEM. La presencia de muestras tomadas durante la fermentación maloláctica en esta familia, puede indicar que las levaduras *Saccharomyces* no desaparecen en su totalidad al finalizar la primera fermentación.

La CECT 1015 (*Torulaspota delbrueckii*) aparece en la familia superior, próxima a muestras como las D6-LP-YPD-2SIN correspondiente a una levadura pura de una casa comercial cuya base es la *Torulaspota Delbrueckii*. Y pegada a la CECT 1010 (*Dekkera bruxellensis*), levadura perjudicial para la producción de vinos, aparecen las muestras de uva tomadas en los viñedos, en el bloque naranja.

Esta es parte de la información obtenida a partir del dendrograma, pero en el siguiente paso, la identificación una a una de cada espectro MSP por comparación con la base de datos, se muestra un estudio más detallado.

⁶³. José Luis Vicente Villardón, B.S. *INTRODUCCIÓN AL ANÁLISIS DE CLUSTER*. Departamento de Estadística. Universidad de Salamanca.

6.4 Identificación (comparación con bases de datos).

A partir de los MSP, se realizó una identificación de las 75 muestras problema por comparación con los espectros de masas disponibles en la librería. Además de los 5627 espectros recogidos en la base de datos proporcionada por Bruker Daltonics, también se cargó la librería con los 91 espectros analizados, haciendo un total de 5718 huellas peptídicas.

De cada uno de ellos se obtuvo un listado, donde aparecía el nombre de las cepas con mayor porcentaje de similitud, como el que se muestra en la *Figura 34*. El grado de similitud se refleja en los colores adjudicados, verde para altos scores (>2.0 identificación más allá del nivel de especie), amarillo (>1.7 identificaciones más allá del nivel de género) y rojos (<1.7 no identificaciones) para bajos. En la mayoría de las identificaciones los scores eran bajos, debido a que librerías comerciales de los espectrómetros no recogen levaduras de ámbito enológico.⁶⁴ En las celdas superiores siempre aparecía la muestra problema, cuyo espectro coincide 100% con el MSP recogido en la nueva base de datos, seguido de muestras con picos espectrales similares. En algunas muestras, se reflejaban relaciones con espectros disponibles en la base de datos comercial de Buker Daltonics y muchas de ellas guardaban semejanzas con las cepas certificadas.

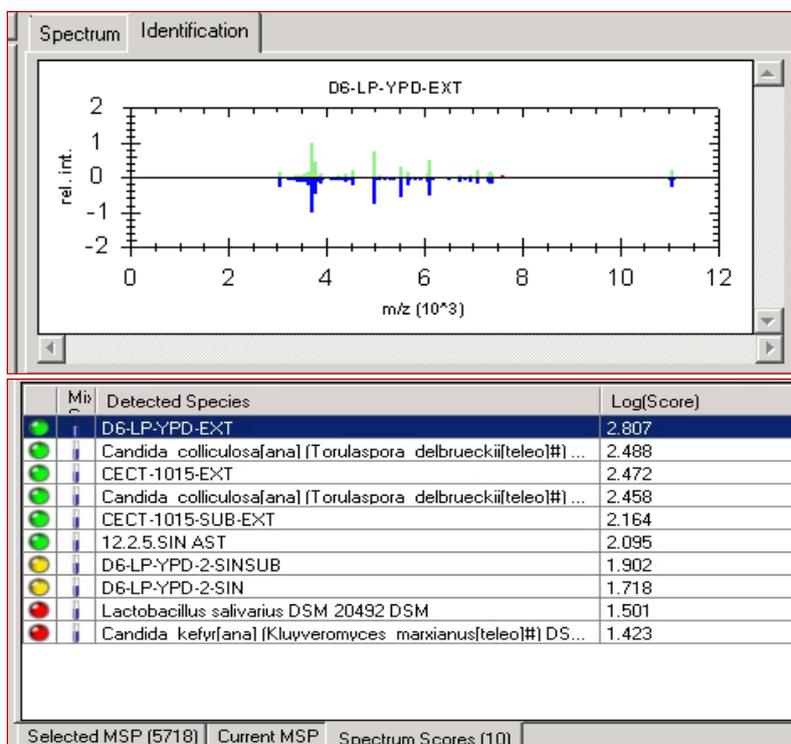


Figura 34. Ejemplo de identificación de la cepa D6-LP-YPD-EXT.

⁶⁴. Bruna Carla Agustini, Gildo Almeida da Silva, Tania M. B. Bonfim., Luciano Paulino Silva, Carlos Bloch Jr. EVALUATION OF MALDI-TOF MASS SPECTROMETRY FOR IDENTIFICATION OF ENVIROMENTAL YEASTS AND DEVELOPMENT OS SUPPLEMENTARU DATABASE. Appl. Microbiol. Biotechnol. (2014); 98: 5645-5654.

En la *Figura 34*, se muestra la identificación de la muestra D6-LP-YPD-EXT. Esta muestra corresponde a una levadura pura de *Torulaspota Delbrueckii* de una casa comercial, cultivada en YPD Agar y transferida a la tarjeta metálica previa extracción de proteínas. Entre las identificaciones de mayor score encontramos la CECT 1015, correspondiente a la TD analizada durante la realización de este trabajo y dos TD presentes en la base de datos comercial.

En la *Figura 35*, se observan las consecuencias de la aplicación de un producto que contiene metabisulfito potásico. Este es un antioxidante y antiséptico de amplio espectro de acción que se añade al mosto para, entre otras muchas funciones, inhibir las levaduras autóctonas.⁶⁵ La identificación a) corresponde a la muestra 12.2.1 SIN AST, (muestra tomada antes de la aplicación del producto), y la identificación b) a la muestra 12.3.1 AST (muestra de mosto tras el suministro de AST). En la segunda identificación se puede observar como las semejanzas con las cepas *Candida Pulcherrima* o la CECT-1010 *Dekkera Bruxellensis*, cepas no adecuadas para el proceso de fermentación, desaparecen.

(a)

Mix	Detected Species	Log(Score)
12.2.1.SIN AST	12.2.1.SIN AST	2.817
12.2.8.SIN AST	12.2.8.SIN AST	2.268
Candida pulcherrima[ana] [Metschnikowia pulcherrima]tele...	Candida pulcherrima[ana] [Metschnikowia pulcherrima]tele...	1.725
Candida pulcherrima[ana]# [Metschnikowia pulcherrima]tel...	Candida pulcherrima[ana]# [Metschnikowia pulcherrima]tel...	1.455
Candida lambica[ana] [Pichia fermentans ssp fermentans]...	Candida lambica[ana] [Pichia fermentans ssp fermentans]...	1.403
Lactobacillus inquilvei DSM 15946T DSM	Lactobacillus inquilvei DSM 15946T DSM	1.264
Pseudomonas syringae ssp syringae LMG 1247T HAM	Pseudomonas syringae ssp syringae LMG 1247T HAM	1.251
Pseudomonas mucidolens LMG 2223T HAM	Pseudomonas mucidolens LMG 2223T HAM	1.237
CECT-1010-SUB-EXT	CECT-1010-SUB-EXT	1.235
Lodderomyces elongisporus CBS 2605T CBS	Lodderomyces elongisporus CBS 2605T CBS	1.234

Selected MSP (5718) Current MSP Spectrum Scores (10)

(b)

Mix	Detected Species	Log(Score)
12.3.1 AST	12.3.1 AST	2.791
12.5.4 SIEM	12.5.4 SIEM	2.405
12.4.3 PRES	12.4.3 PRES	2.308
12.4.5 PRES	12.4.5 PRES	2.300
D6-SAC-5(PS)	D6-SAC-5(PS)	2.276
12.4.1 PRES	12.4.1 PRES	2.209
T3-YPD-a-3.1(S)	T3-YPD-a-3.1(S)	2.203
12.3.3 AST	12.3.3 AST	2.148
D26-YPD-4.2	D26-YPD-4.2	2.143
D13-YPD-1(PS)	D13-YPD-1(PS)	2.040

Selected MSP (5718) Current MSP Spectrum Scores (10)

Figura 35. Identificaciones previa y post adición de metabisulfito potásico.

En el **ANEXO IV**, se recogen los espectros y las identificaciones de las cuatro cepas certificadas como ejemplos complementarios de la etapa de identificación.

⁶⁵ C. S. Ough, E. A. Crowell. *USE OF SULFUR DIOXIDE IN WINEMAKING*. Journal of Food Science. (1987); 52(2).

7. CONCLUSIONES

La espectrometría de masas de desorción/ionización láser asistida por matriz con tiempo de vuelo, ha resultado ser una alternativa precisa y rápida para la identificación de microorganismos, frente a los protocolos tradicionales. La identificación de levaduras ambientales del campo enológico puede suponer un desafío, ya que el tipo de cepas analizadas no están incluidas en las bases de datos comerciales, conduciendo a identificaciones erróneas con especies relacionadas. Algunos de los resultados obtenidos durante la realización de este proyecto pueden resumirse en:

- La obtención de 91 espectros de masas de ámbito enológico.
- La utilización de un patrón en MALDI es esencial para obtener espectros representativos.
- Es conveniente realizar una extracción previa de proteínas en muestras de levaduras.
- Las muestras tomadas en los viñedos presentan picos comunes a la CECT 1010 *Dekkera Bruxellensis*, lo que puede demostrar la presencia de levaduras autóctonas no recomendables para el proceso fermentativo.
- Las muestras de levaduras comerciales puras de *Torulospora Delbrueckii* y *Saccharomyces cerevisiae*, aparecen en muestras de mosto de estados posteriores (etapas de siembra y presiembra) y guardan semejanzas con las CECT 1170 *Saccharomyces cerevisiae* y la CECT 1015 *Torulospora Delbrueckii*.
- Las colonias aisladas durante la fermentación alcohólica siguen apareciendo en la fermentación maloláctica.
- La aplicación de metabisulfito potásico ayuda a la eliminación de levaduras, bacterias y microorganismos endémicos en general. Se observa en los espectros de masas, una clara disminución de especies como *Bacillus Pumilus* (fungicida biológico de amplio espectro utilizado para la prevención de enfermedades en el viñedo como la Botrytis, Mildeu u Oidio), *Lactobacilus* (bacteria láctica responsable de las fermentaciones malolácticas espontáneas) o *Candidas* (levaduras con baja producción de alcohol aunque alta producción de compuestos volátiles no deseables).

Mediante la realización de este trabajo de fin de grado se ha comprobado que la espectrometría de masas MALDI-TOF es una técnica válida para la identificación de levaduras de interés enológico. La disminución en el tiempo de análisis, la fácil preparación de muestras y el bajo coste frente a otras técnicas tradicionales, justifican esta afirmación.

La mayor limitación que presenta esta técnica es la falta de espectros enológicos recogidos en las librerías comerciales, las cuales registran casi exclusivamente microorganismos de ámbito clínico. La ampliación de estas bases de datos mediante un desarrollo de estudios centrados en aislamientos ambientales, sería un proyecto necesario e interesante para mejorar el alcance de las identificaciones en este tipo de muestras.

Para las bodegas, el interés práctico del trabajo sería poder utilizar esta técnica como una vía rápida de identificación de las levaduras presentes en sus viñedos y en el proceso fermentativo. Además de permitir realizar estudios de dinámica poblacional y biodiversidad, o controles de calidad en la producción de levaduras seleccionadas, entre otros. Y como señalamos en la introducción, además de la mejora de la calidad organoléptica del vino, la creación de una selección de levaduras propias generaría a la bodega un ahorro considerable, seguridad, autocontrol y un importante impluso comercial.

8 ANEXOS ANEXO I

MUESTRAS CONGELADAS

Nº	FECHA CO	MUESTRA ORIGEN	NOMBRE CUAC	NOMBRE VIAL	NOMBRE FORM	OBSERVACIONES	ESTUDIO
1	10/10/2016	DEP.26 ROSÉ (27/09)	AS (1)	Pase mosto 1 ()	D26-AS-1	Grande, blanca.	Mosto rosé AST
2	10/10/2016	DEP.26 ROSÉ (27/09)	AS (3)	Pase mosto 2 ()	D26-AS-3	Rugosa, blanca.	Mosto rosé AST
3	10/10/2016	DEP.26 ROSÉ (27/09)	AS (5)	Pase mosto 3 ()	D26-AS-5	Pequeña, esquina.	Mosto rosé AST
4	03/10/2016	SJM4: tierra (22/09)	CC+AS	¿? ()	SJM4-CC-AS-1	Muy grande.	Tierra
5	27/10/2016	MC4: uva blanca (22/09)	YPD (placa 1.1)	P 1.1 (r1)	MC4-YPD-1	Pequeña, gris marrón.	Uva blanca
6	27/10/2016	MC4: uva blanca (22/09)	YPD (placa 1.5)	P 1.5 (r2)	MC4-YPD-5	Mediana, blanca.	Uva blanca
7	27/10/2016	MC4: uva blanca (22/09)	YPD (placa 1.6)	P 1.6 (r3)	MC4-YPD-6	Marrón, cremosa.	Uva blanca
8	27/10/2016	MC4: uva blanca (22/09)	YPD (placa 1.8)	P 1.8 (r4)	MC4-YPD-8	Mediana, densa, blanca, cremosa.	Uva blanca
9	27/10/2016	LLE2: uva tinta (22/09)	YPD (placa 3.1)	P 3.1 (r9)	LLE2-YPD-1	Grande, blanca, redonda, cremosa.	Uva tinta
10	27/10/2016	LLE2: uva tinta (22/09)	YPD (placa 3.2)	P 3.2 (r8)	LLE2-YPD-2	Grande, punto medio marrón.	Uva tinta
11	27/10/2016	LLE2: uva tinta (22/09)	YPD (placa 3.3)	P 3.3 (r7)	LLE2-YPD-3	Grande, marrónacea.	Uva tinta
12	27/10/2016	LLE2: uva tinta (22/09)	YPD (placa 3.4)	P 3.4 (r6)	LLE2-YPD-4	Mediana, irregular.	Uva tinta
13	27/10/2016	LLE2: uva tinta (22/09)	YPD (placa 3.7)	P 3.7 (r5)	LLE2-YPD-7	Pequeña.	Uva tinta
14	28/10/2016	DEP.26 ROSÉ (27/09)	SAC (8.1)	Mosto 8.1 (r10)	D26-SAC-8.1	Blanca, pequeña.	Mosto rosé AST
15	28/10/2016	DEP.26 ROSÉ (27/09)	SAC (8.2)	Mosto 8.2 (r11)	D26-SAC-8.2	Blanca, grande.	Mosto rosé AST
16	28/10/2016	MC4: uva blanca (22/09)	YPD (placa 2.2)	P 2.2 (r12)	MC4-YPD-2.2	Grande, blanca.	Uva blanca
17	28/10/2016	DEP.26 ROSÉ (27/09)	YPD (placa 4.1)	P 4.1 (r13)	D26-YPD-4.1	Grande, cremosa.	Mosto rosé AST
18	28/10/2016	DEP.26 ROSÉ (27/09)	YPD (placa 4.2)	P 4.2 (r14)	D26-YPD-4.2	Pequeña.	Mosto rosé AST
19	02/11/2016	DEP.6: psTD (13/10)	YPD (sinag 6.1)	D 6.1 (r15)	D6-YPD-sa-6.1	Beige, volcánica.	Mosto presiembra
20	02/11/2016	DEP.6: psTD (13/10)	YPD (sinag 6.2)	D 6.2 (r16)	D6-YPD-sa-6.2	Beige, volcánica, más pequeña.	Mosto presiembra
21	02/11/2016	T-3: sSC+TD+KT (13/10)	YPD (ag 3.1)	Ta 3.1 (r17)	T3-YPD-a-3.1	Pequeña.	Mosto siembra
22	02/11/2016	T-3: sSC+TD+KT (13/10)	YPD (ag 3.2)	Ta 3.2 (r18)	T3-YPD-a-3.2	Blanca, circular, mediana.	Mosto siembra
23	02/11/2016	T-3: sSC+TD+KT (13/10)	YPD (ag 3.3)	Ta 3.3 (r19)	T3-YPD-a-3.3	Blanca, bordes irregulares.	Mosto siembra
24	02/11/2016	T-3: sSC+TD+KT (13/10)	YPD (ag 3.4)	Ta 3.4 (r20)	T3-YPD-a-3.4	Pequeña, beige.	Mosto siembra
25	02/11/2016	T-3: sSC+TD+KT (13/10)	YPD (ag 3.5)	Ta 3.5 (r21)	T3-YPD-a-3.5	Pequeña, marrón.	Mosto siembra
26	02/11/2016	DEP.26 ROSÉ: sSC (13/10)	YPD (ag 26.1)	D-26.1 (b22)	D26-YPD-a-26.1	Pequeña.	Mosto siembra
27	02/11/2016	DEP.26 ROSÉ: sSC (13/10)	YPD (ag 26.2)	D-26.2 (b23)	D26-YPD-a-26.2	Mediana, blanca.	Mosto siembra
28	02/11/2016	DEP.26 ROSÉ: sSC (13/10)	YPD (ag 26.3)	D-26.3 (b25)	D26-YPD-a-26.3	Blanca, mate, grande, irregular.	Mosto siembra
29	02/11/2016	DEP.26 ROSÉ: sSC (13/10)	YPD (ag 26.4)	D-26.4 (b24)	D26-YPD-a-26.4	Blanca, no clara, irregular.	Mosto siembra
30	07/11/2016	DEP.1: psSC (13/10)	SAC (1)	D1 S+C-1 (b26)	D1-SAC-1	Mediana, beige, cremosa.	Mosto presiembra
31	07/11/2016	DEP.1: psSC (13/10)	SAC (2)	D1 S+C-2 (b)	D1-SAC-2	Pequeña, beige, cremosa.	Mosto presiembra
32	07/11/2016	DEP.1: psSC (13/10)	SAC (3)	D1 SAC-3 (b)	D1-SAC-3	Pequeña, beige, cremosa.	Mosto presiembra
33	07/11/2016	DEP.6: psTD (13/10)	SAC (1)	D6 SAC-1 (b29)	D6-SAC-1	Volcánica, cremosa, grande.	Mosto presiembra
34	07/11/2016	DEP.6: psTD (13/10)	SAC (2)	D6 SAC-2 (b)	D6-SAC-2	Volcánica, mediana, lateral.	Mosto presiembra
35	07/11/2016	DEP.6: psTD (13/10)	SAC (3)	D6 SAC-3 (b31)	D6-SAC-3	Mediana, redonda, marrón.	Mosto presiembra
36	07/11/2016	DEP.13: psSC (13/10)	SAC (1)	D13 SAC-1 (b)	D13-SAC-1	Pegada a otra, mediana.	Mosto presiembra
37	07/11/2016	DEP.13: psSC (13/10)	SAC (2)	D13 SAC-2 (b33)	D13-SAC-2	Mediana, aureóla marrónacea, nú. blanco.	Mosto presiembra
38	07/11/2016	DEP.13: psSC (13/10)	SAC (3)	D13 SAC-3 (b)	D13-SAC-3	Pequeña, lateral.	Mosto presiembra
39	07/11/2016	DEP.13: psSC (13/10)	SAC (4)	D13 SAC-4 (b)	D13-SAC-4	Pequeña.	Mosto presiembra
40	07/11/2016	DEP.17: psSC (13/10)	SAC (1)	D17 SAC-1 (b)	D17-SAC-1	Mediana, blanca.	Mosto presiembra
41	07/11/2016	DEP.17: psSC (13/10)	SAC (2)	D17 SAC-2 (b)	D17-SAC-2	Pequeña, blanca.	Mosto presiembra

ESPECTROMETRÍA MALDI-TOF APLICADA A LEVADURAS ENOLÓGICAS: IDENTIFICACIÓN.

42	07/11/2016	DEP.17: psSC (13/10)	SAC (3)	D17 SAC-3 (b)	D17-SAC-3	Pequeñita, blanca.	Mosto presiembra
43	07/11/2016	DEP.17: psSC (13/10)	SAC (4)	D17 SAC-4 (b39)	D17-SAC-4	Pequeñita, blanca.	Mosto presiembra
44	07/11/2016	DEP.26 ROSÉ: sSC (13/10)	SAC (1)	D26 SAC-1 (b40)	D26-SAC-1	Lateral, volcánica, blanca, grande, lisa.	Mosto siembra
45	07/11/2016	DEP.26 ROSÉ: sSC (13/10)	SAC (2)	D26 SAC-2 (b41)	D26-SAC-2*	Volcánica, blanca, irregular, grande.	Mosto siembra
46	07/11/2016	DEP.26 ROSÉ: sSC (13/10)	SAC (3)	D26 SAC-3 (a)	D26-SAC-3	Pequeña.	Mosto siembra
47	07/11/2016	T-3: sSC+TD+KT (13/10)	SAC (1)	T3-SAC-1 (a43)	T3-SAC-1	Montaña blanca, bordes no lisos.	Mosto siembra
48	07/11/2016	T-3: sSC+TD+KT (13/10)	SAC (2)	T3-SAC-2 (a)	T3-SAC-2	Montaña mediana, blanca.	Mosto siembra
49	07/11/2016	T-3: sSC+TD+KT (13/10)	SAC (3)	T3-SAC-3 (a)	T3-SAC-3	Pequeña montaña, bordes marrones.	Mosto siembra
50	07/11/2016	T-3: sSC+TD+KT (13/10)	SAC (4)	T3-SAC-4 (a46)	T3-SAC-4	Pequeñita.	Mosto siembra
51	08/11/2016	DEP.1: psSC (13/10)	YPD (1)	D1-YPD-1 (az47)	D1-YPD-1	Grande, cremosa, bordes irregulares.	Mosto presiembra
52	08/11/2016	DEP.1: psSC (13/10)	YPD (2)	D1-YPD-2 (az)	D1-YPD-2	Grande, cremosa, circular.	Mosto presiembra
53	08/11/2016	DEP.1: psSC (13/10)	YPD (3)	D1-YPD-3 (az)	D1-YPD-3	Mediana, cremosa, circular.	Mosto presiembra
54	08/11/2016	DEP.1: psSC (13/10)	YPD (4)	D1-YPD-4 (az)	D1-YPD-4	Pequeña, cremosa, circular.	Mosto presiembra
55	08/11/2016	DEP.1: psSC (13/10)	YPD (5)	D1-YPD-5 (az51)	D1-YPD-5	Muy pequeña, cremosa, circular.	Mosto presiembra
56	08/11/2016	DEP.13: psSC (13/10)	YPD (1)	D13-YPD-1 (az52)	D13-YPD-1	Mediana, cremosa, circular.	Mosto presiembra
57	08/11/2016	DEP.13: psSC (13/10)	YPD (2)	D13-YPD-2 (az53)	D13-YPD-2	Pequeñita, cremosa, algo irregular.	Mosto presiembra
58	08/11/2016	DEP.13: psSC (13/10)	YPD (3)	D13-YPD-3 (az)	D13-YPD-3	Pequeñita, cremosa, irregular.	Mosto presiembra
59	08/11/2016	DEP.13: psSC (13/10)	YPD (4)	D13-YPD-4 (az55)	D13-YPD-4	Mediana, cremosa, irregular.	Mosto presiembra
60	08/11/2016	DEP.17: psSC (13/10)	YPD (1)	D17-YPD-1 (az56)	D17-YPD-1	Grande, cremosa, circular.	Mosto presiembra
61	08/11/2016	DEP.17: psSC (13/10)	YPD (2)	D17-YPD-2 (az)	D17-YPD-2	Mediana, cremosa, circular.	Mosto presiembra
62	08/11/2016	DEP.17: psSC (13/10)	YPD (3)	D17-YPD-3 (az)	D17-YPD-3	Pequeñita, circular.	Mosto presiembra
63	08/11/2016	T-3: sSC+TD+KT (13/10)	YPD (1)	T3-YPD-1 (az59)	T3-YPD-1	Grande, cremosa, circular.	Mosto siembra
64	08/11/2016	T-3: sSC+TD+KT (13/10)	YPD (2)	T3-YPD-2 (az)	T3-YPD-2	Mediana, cremosa, redonda.	Mosto siembra
65	08/11/2016	T-3: sSC+TD+KT (13/10)	YPD (3)	T3-YPD-3 (az)	T3-YPD-3	Pequeña, circular.	Mosto siembra
66	08/11/2016	T-3: sSC+TD+KT (13/10)	YPD (4)	T3-YPD-4 (az62)	T3-YPD-4	Marrón.	Mosto siembra
67	21/11/2016	DEP.1: pura SC (08/10)	D1-P.PDA-LEV	D1-P-PDA-lev (v73)	D1-PDA-LP		Lev. Comercial
68	21/11/2016	DEP.6: pura TD (13/10)	D6-P.PDA-LEV	D6-P-PDA-lev (v74)	D6-PDA-LP		Lev. Comercial
69	21/11/2016	DEP.6.1: pura SC (18/10)	D6.1-P.PDA-LEV	D6.1-P-PDA-lev (v75)	D6.1-PDA-LP		Lev. Comercial
70	21/11/2016	DEP.13: pura SC (06/10)	D13-P.PDA-LEV	D13-P-PDA-lev (v76)	D13-PDA-LP	Muy líquida, más cremosa.	Lev. Comercial
71	21/11/2016	DEP.14: pura SC (15/10)	D14-P.PDA-LEV	D14-P-PDA-lev (v77)	D14-PDA-LP		Lev. Comercial
72	21/11/2016	DEP.17: pura SC (08/10)	D17-P.PDA-LEV	D17-P-PDA-lev (v78)	D17-PDA-LP		Lev. Comercial
73	21/11/2016	DEP.26: pura SC (29/09)	D26-P.PDA-LEV	D26-P-PDA-lev (v79)	D26-PDA-LP	Bastante, cremosa.	Lev. Comercial
74	21/11/2016	DEP.32: pura SC (18/10)	D32-P.PDA-LEV	D32-P-PDA-lev (v80)	D32-PDA-LP		Lev. Comercial
75	29/11/2016	T-3: pura SC+TD+KT (11/10)	T3-P1-PDA	T3-P1-PDA (v64)	T3-PDA-LP-1	Pequeña, blanca.	Lev. Comercial
76	29/11/2016	T-3: pura SC+TD+KT (11/10)	T3-P2-PDA	T3-P2-PDA (v65)	T3-PDA-LP-2		Lev. Comercial
77	29/11/2016	T-3: pura SC+TD+KT (11/10)	T3-P3-PDA	T3-P3-PDA (v66)	T3-PDA-LP-3	Blanca, circular, mediana.	Lev. Comercial
78	29/11/2016	T-3: pura SC+TD+KT (11/10)	T3-P4-PDA	T3-P4-PDA (v67)	T3-PDA-LP-4	Irregular, blanca.	Lev. Comercial
79	29/11/2016	T-3: pura SC+TD+KT (11/10)	T3-P5-PDA	T3-P5-PDA (v68)	T3-PDA-LP-5	Muy pequeña.	Lev. Comercial
80	29/11/2016	DEP.12^2: mosto sin AST (20/10)	D12.2-1YPD	D-12.2-1 (v1)	D12.2-YPD-1	Marrón debajo, crema arriba, aro marrón.	Seguimiento DEP.12
81	29/11/2016	DEP.12^2: mosto sin AST (20/10)	D12.2-2YPD	D-12.2-2 (v2)	D12.2-YPD-2	Blanca, doble.	Seguimiento DEP.12
82	29/11/2016	DEP.12^2: mosto sin AST (20/10)	D12.2-3YPD	D-12.2-3 (v3)	D12.2-YPD-3	Blanca, redonda.	Seguimiento DEP.12

ESPECTROMETRÍA MALDI-TOF APLICADA A LEVADURAS ENOLÓGICAS: IDENTIFICACIÓN.

83	29/11/2016	DEP.12^2: mosto sin AST (20/10)	D12.2-4YPD	D-12.2-4	(v4)	D12.2-YPD-4	Blanca, irregular.	Seguimiento DEP.12
84	29/11/2016	DEP.12^2: mosto sin AST (20/10)	D12.2-5YPD	D-12.2-5	(v5)	D12.2-YPD-5	Mediana, blanca, redonda.	Seguimiento DEP.12
85	29/11/2016	DEP.12^2: mosto sin AST (20/10)	D12.2-6YPD	D-12.2-6	(v6)	D12.2-YPD-6	Pequeña, blanca, redonda.	Seguimiento DEP.12
86	29/11/2016	DEP.12^2: mosto sin AST (20/10)	D12.2-7YPD	D-12.2-7	(v7)	D12.2-YPD-7	Pequeña, marrón por debajo.	Seguimiento DEP.12
87	29/11/2016	DEP.12^3: mosto con AST (20/10)	D12.3-1YPD	D-12.3-1	(a74)	D12.3-YPD-1	Crema, grande, irregular.	Seguimiento DEP.12
88	29/11/2016	DEP.12^3: mosto con AST (20/10)	D12.3-2YPD	D-12.3-2	(a75)	D12.3-YPD-2	Crema, grande, irregular.	Seguimiento DEP.12
89	29/11/2016	DEP.12^3: mosto con AST (20/10)	D12.3-3YPD	D-12.3-3	(a76)	D12.3-YPD-3	Crema, mediana, irregular.	Seguimiento DEP.12
90	29/11/2016	DEP.12^3: mosto con AST (20/10)	D12.3-4YPD	D-12.3-4	(a77)	D12.3-YPD-4	Crema, mediana, regular.	Seguimiento DEP.12
91	29/11/2016	DEP.12^3: mosto con AST (20/10)	D12.3-5YPD	D-12.3-5	(az78)	D12.3-YPD-5	Pequeñita.	Seguimiento DEP.12
92	29/11/2016	DEP.12^4: mosto psSC (26/10)	D12.4-1YPD	D-12.4-1YPD	(a70)	D12.4-YPD-1	Grande, irregular.	Seguimiento DEP.12
93	29/11/2016	DEP.12^4: mosto psSC (26/10)	D12.4-2YPD	D-12.4-2YPD	(a69)	D12.4-YPD-2	Mediana, irregular.	Seguimiento DEP.12
94	29/11/2016	DEP.12^4: mosto psSC (26/10)	D12.4-3YPD	D-12.4-3YPD	(a71)	D12.4-YPD-3	Pequeña, irregular.	Seguimiento DEP.12
95	29/11/2016	DEP.12^4: mosto psSC (26/10)	D12.4-4YPD	D-12.4-4YPD	(a72)	D12.4-YPD-4	Pequeña, regular.	Seguimiento DEP.12
96	29/11/2016	DEP.12^4: mosto psSC (26/10)	D12.4-5YPD	D-12.4-5YPD	(a73)	D12.4-YPD-5	Pequeñita.	Seguimiento DEP.12
97	29/11/2016	DEP.12^5: mosto sSC (31/10)	D12.5-1YPD	D-12.5-1	(a63)	D12.5-YPD-1	Grande, irregular.	Seguimiento DEP.12
98	29/11/2016	DEP.12^5: mosto sSC (31/10)	D12.5-2YPD	D-12.5-2	(a64)	D12.5-YPD-2	Grande, regular con trozo comido.	Seguimiento DEP.12
99	29/11/2016	DEP.12^5: mosto sSC (31/10)	D12.5-3YPD	D-12.5-3	(a65)	D12.5-YPD-3	Mediana, irregular.	Seguimiento DEP.12
100	29/11/2016	DEP.12^5: mosto sSC (31/10)	D12.5-4YPD	D-12.5-4	(a66)	D12.5-YPD-4	Mediana, regular.	Seguimiento DEP.12
101	29/11/2016	DEP.12^5: mosto sSC (31/10)	D12.5-5YPD	D-12.5-5	(a67)	D12.5-YPD-5	Pequeña.	Seguimiento DEP.12
102	29/11/2016	DEP.12^5: mosto sSC (31/10)	D12.5-6YPD	D-12.5-5	(a68)	D12.5-YPD-6	Pequeñita.	Seguimiento DEP.12
103	01/12/2016	DEP.12^1: uva merlot (20/10)	D12.1-1YPD-CC	D-12.1-1	(az79)	D12.1-CC-YPD-1	Grande, espachurrada.	Seguimiento DEP.12
104	01/12/2016	DEP.12^1: uva merlot (20/10)	D12.1-2YPD-CC	D-12.1-2	(az80)	D12.1-CC-YPD-2	Pequeña, embebida en gel.	Seguimiento DEP.12
105	01/12/2016	DEP.12^1: uva merlot (20/10)	D12.1-3YPD-CC	D-12.1-3	(az81)	D12.1-CC-YPD-3	Pequeñita, blanca, embebida en gel.	Seguimiento DEP.12
106	15/12/2016	M4+5: no inoculada (13/12)	45-YPD-1	45-YPD-1	(r11)	M4+5-YPD-1	Blanca, borde liso, mediana.	Ferm. Maloláctica
107	15/12/2016	M4+5: no inoculada (13/12)	45-YPD-2	45-YPD-2	(r12)	M4+5-YPD-2	Blanca, borde liso, pequeñita.	Ferm. Maloláctica
108	15/12/2016	M4+5: no inoculada (13/12)	45-YPD-3	45-YPD-3	(r13)	M4+5-YPD-3	Blanca, borde liso, pequeñita.	Ferm. Maloláctica
109	15/12/2016	M4+5i: inoculada O.Oeni (13/12)	45i-YPD-1	45i-YPD1	(r8)	M4+5i-YPD-1	Blanca, borde liso, mediana.	Ferm. Maloláctica
110	15/12/2016	M4+5i: inoculada O.Oeni (13/12)	45i-YPD-2	45i-YPD2	(r9)	M4+5i-YPD-2	Blanca, borde liso, pequeñita.	Ferm. Maloláctica
111	15/12/2016	M4+5i: inoculada O.Oeni (13/12)	45i-YPD-3	45i-YPD3	(r10)	M4+5i-YPD-3	Blanca, borde liso, grande.	Ferm. Maloláctica
112	15/12/2016	MA2a: autóctona (13/12)	A2a-YPD-1	A2a-YPD-1	(r14)	MA2a-YPD-1	Blanca, borde liso, pequeñita.	Ferm. Maloláctica
113	15/12/2016	MA2a: autóctona (13/12)	A2a-YPD-2	A2a-YPD-2	(r15)	MA2a-YPD-2	Blanca, borde liso, mediana.	Ferm. Maloláctica
114	15/12/2016	MA2a: autóctona (13/12)	A2a-YPD-3	A2a-YPD-3	(r16)	MA2a-YPD-3	Blanca, borde liso, pequeñita.	Ferm. Maloláctica
115	21/12/2016	M4+5: no inoculada (13/12)	45CCYPD1	45CCYPD1	(r17)	M4+5-CC-YPD-1	Crema, blanca, grande, uniforme.	Ferm. Maloláctica
116	21/12/2016	M4+5: no inoculada (13/12)	45CCYPD2	45CCYPD2	(r18)	M4+5-CC-YPD-2	Crema, blanca, grande, irregular.	Ferm. Maloláctica
117	21/12/2016	M4+5: no inoculada (13/12)	45CCYPD3	45CCYPD3	(r19)	M4+5-CC-YPD-3	Crema, blanca, mediana, uniforme.	Ferm. Maloláctica
118	21/12/2016	M4+5: no inoculada (13/12)	45CCYPD4	45CCYPD4	(r20)	M4+5-CC-YPD-4	Crema, blanca, pequeñita, uniforme.	Ferm. Maloláctica
119	21/12/2016	M4+5i: inoculada O.Oeni (13/12)	45iCCYPD1	45iCCYPD1	(r21)	M4+5i-CC-YPD-1	Crema blanca, grande, uniforme.	Ferm. Maloláctica
120	21/12/2016	M4+5i: inoculada O.Oeni (13/12)	45iCCYPD2	45iCCYPD2	(r22)	M4+5i-CC-YPD-2	Crema blanca, pequeñita, uniforme.	Ferm. Maloláctica
121	21/12/2016	M4+5i: inoculada O.Oeni (13/12)	45iCCYPD3	45iCCYPD3	(r23)	M4+5i-CC-YPD-3	Crema blanca, mediana, uniforme.	Ferm. Maloláctica
122	21/12/2016	MA2a: autóctona (13/12)	A2aCCYPD1	A2aCCYPD1	(r)	MA2a-CC-YPD-1	Crema, mediana, uniforme, sin nada alr.	Ferm. Maloláctica
123	21/12/2016	MA2a: autóctona (13/12)	A2aCCYPD2	A2aCCYPD2	(r25)	MA2a-CC-YPD-2	Marrónacena, mediana, uniforme.	Ferm. Maloláctica

ESPECTROMETRÍA MALDI-TOF APLICADA A LEVADURAS ENOLÓGICAS: IDENTIFICACIÓN.

124	21/12/2016	MA2a: autóctona (13/12)	A2aCCYPD3	A2aCCYPD3 (r26)	MA2a-CC-YPD-3	Crema, grande, no uniforme, con halo.	Ferm. Maloláctica
125	21/12/2016	MA2a: autóctona (13/12)	A2aCCYPD4	A2aCCYPD4 (r27)	MA2a-CC-YPD-4	Crema, grande, no uniforme, con halo.	Ferm. Maloláctica
126	21/12/2016	MA2a: autóctona (13/12)	A2aCCYPD5	A2aCCYPD5 (am28)	MA2a-CC-YPD-5	Crema, pequeñita, uniforme sin halo.	Ferm. Maloláctica
127	21/12/2016	MA2a: autóctona (13/12)	A2aCCYPD6	A2aCCYPD6 (am29)	MA2a-CC-YPD-6	Sólo halo.	Ferm. Maloláctica
128	21/12/2016	MA2a: autóctona (13/12)	A2aCCYPD7	A2aCCYPD7 (am30)	MA2a-CC-YPD-7	Crema mediana, unifrome sin halo.	Ferm. Maloláctica
129	22/12/2016	DEP.6: psTD (13/10)	6SAC4YPD*	6SAC4YPD* (a31)	D6-SAC-YPD-4	Blanca y pequeña.	Mosto presiembra
130	22/12/2016	DEP.6: psTD (13/10)	6SAC5YPD*	6SAC5YPD* (a32)	D6-SAC-YPD-5	Oscura, no puntiaguda.	Mosto presiembra
131	22/12/2016	DEP.6: psTD (13/10)	6SAC6YPD*	6SAC6YPD* (a33)	D6-SAC-YPD-6	Pequeña, blanca.	Mosto presiembra
132	22/12/2016	DEP.6: psTD (13/10)	6SAC7YPD*	6SAC7YPD* (a34)	D6-SAC-YPD-7	Pequeña, blanca.	Mosto presiembra
133	22/12/2016	DEP.12^2: mosto sin AST (20/10)	12.2-SCA-8-YPD*	12.2SCA8YPD* (a35)	D12.2-SAC-YPD-8	Blanca y pequeña.	Seguimiento DEP.12
134	22/12/2016	DEP.12^3: mosto con AST (20/10)	12.3-SCA-7-YPD*	12.3SCA7YPD* (a36)	D12.3-SAC-YPD-7	Blanca y pequeña.	Seguimiento DEP.12
135	22/12/2016	DEP.12^3: mosto con AST (20/10)	12.3-SCA-8-YPD*	12.3SCA8YPD* (a37)	D12.3-SAC-YPD-8	Blanca y pequeña.	Seguimiento DEP.12
136	22/12/2016	DEP.12^4: mosto psSC (26/10)	12.4-SCA-7-YPD*	12.4SCA7YPD* (a38)	D12.4-SAC-YPD-7	Blanca y pequeña.	Seguimiento DEP.12
137	22/12/2016	DEP.12^1: uva merlot (20/10)	12.1-5-YPD-CC*	12.1.5YPDCC* (a39)	D12.1-CC-YPD-5	Oscura, arracimada.	Seguimiento DEP.12
138	22/12/2016	M4+5i: inoculada O.Oeni (13/12)	4+5iYPD4*	4+5iYPD* (a40)	M4+5i-YPD-4	Pequeña, blanca.	Ferm. Maloláctica
139	22/12/2016	MA2a: autóctona (13/12)	A2aYPD4*	A2aYPD4* (a41)	MA2a-YPD-4	Centro y aro gris, medio más transparente.	Ferm. Maloláctica
140	22/12/2016	MA2a: autóctona (13/12)	A2aYPD5*	A2aYPD5* (a42)	MA2a-YPD-5	Blanca, mediana.	Ferm. Maloláctica
141	22/12/2016	MA2a: autóctona (13/12)	A2aCCYPD8*	A2aCCYPD8* (a43)	MA2a-CC-YPD-8	Pequeña, irregular.	Ferm. Maloláctica
142	22/12/2016	MA2a: autóctona (13/12)	A2aCCYPD9*	A2aCCYPD9* (a44)	MA2a-CC-YPD-9	Desparramada, translúcida.	Ferm. Maloláctica
143	22/12/2016	MA2a: autóctona (13/12)	A2aCCYPD10*	A2aCCYPD10* (a45)	MA2a-CC-YPD-10	Translúcida.	Ferm. Maloláctica
144	22/12/2016	M4+5i: inoculada O.Oeni (13/12)	45iCCAS	45iCCAS (az46)	M4+5i-CC-AS	Puntos blanquecinos, grisáceos.	Ferm. Maloláctica
145	22/12/2016	M4+5: no inoculada (13/12)	45CCAS	45CCAS (az47)	M4+5-CC-AS	Puntos blanquecinos, grisáceos.	Ferm. Maloláctica
146	22/12/2016	MA2a: autóctona (13/12)	A2aCCAS	A2aCCAS (az48)	MA2a-CC-AS	Placa marronácea, puntos grisáceos.	Ferm. Maloláctica

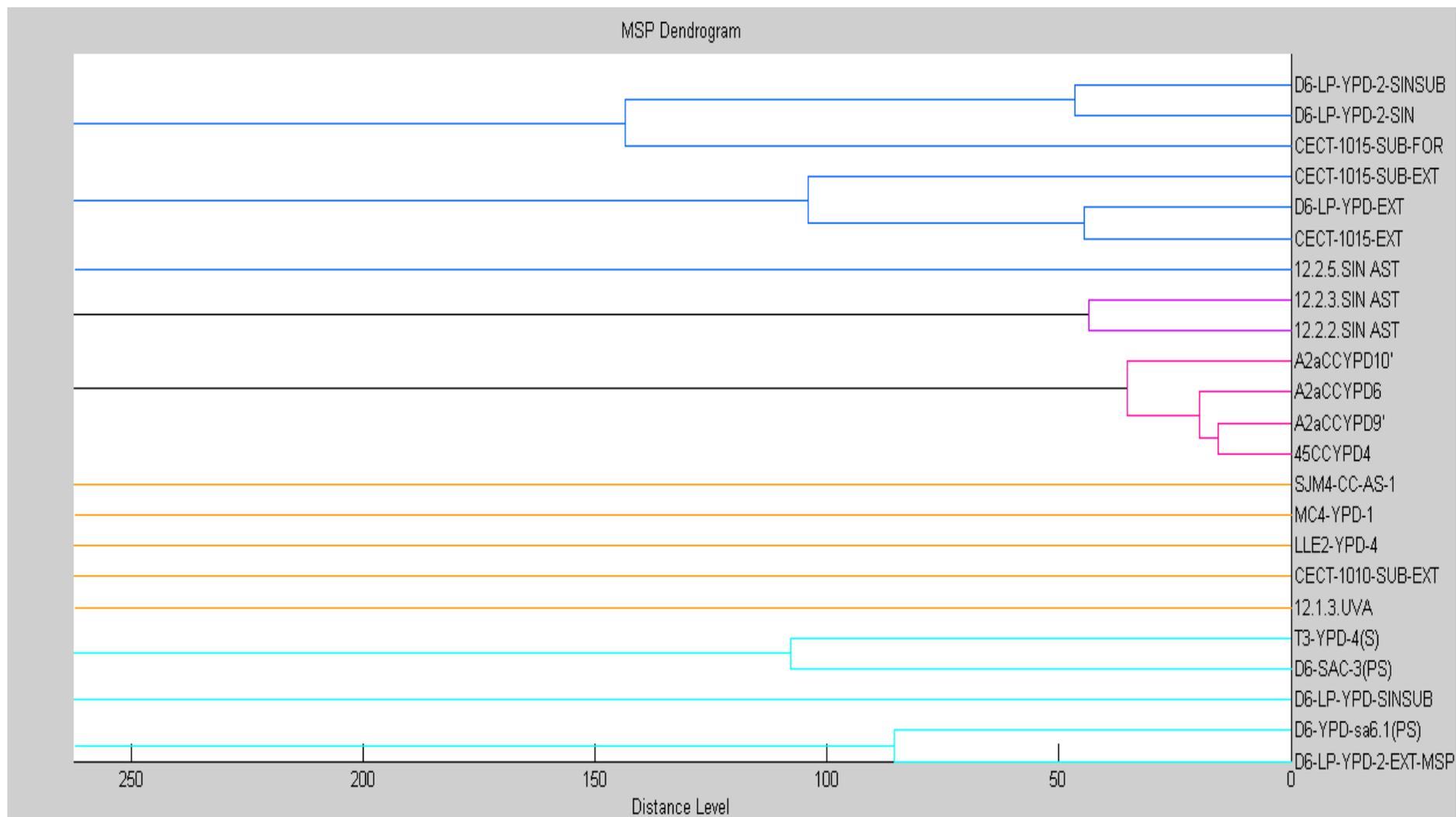
ANEXO II

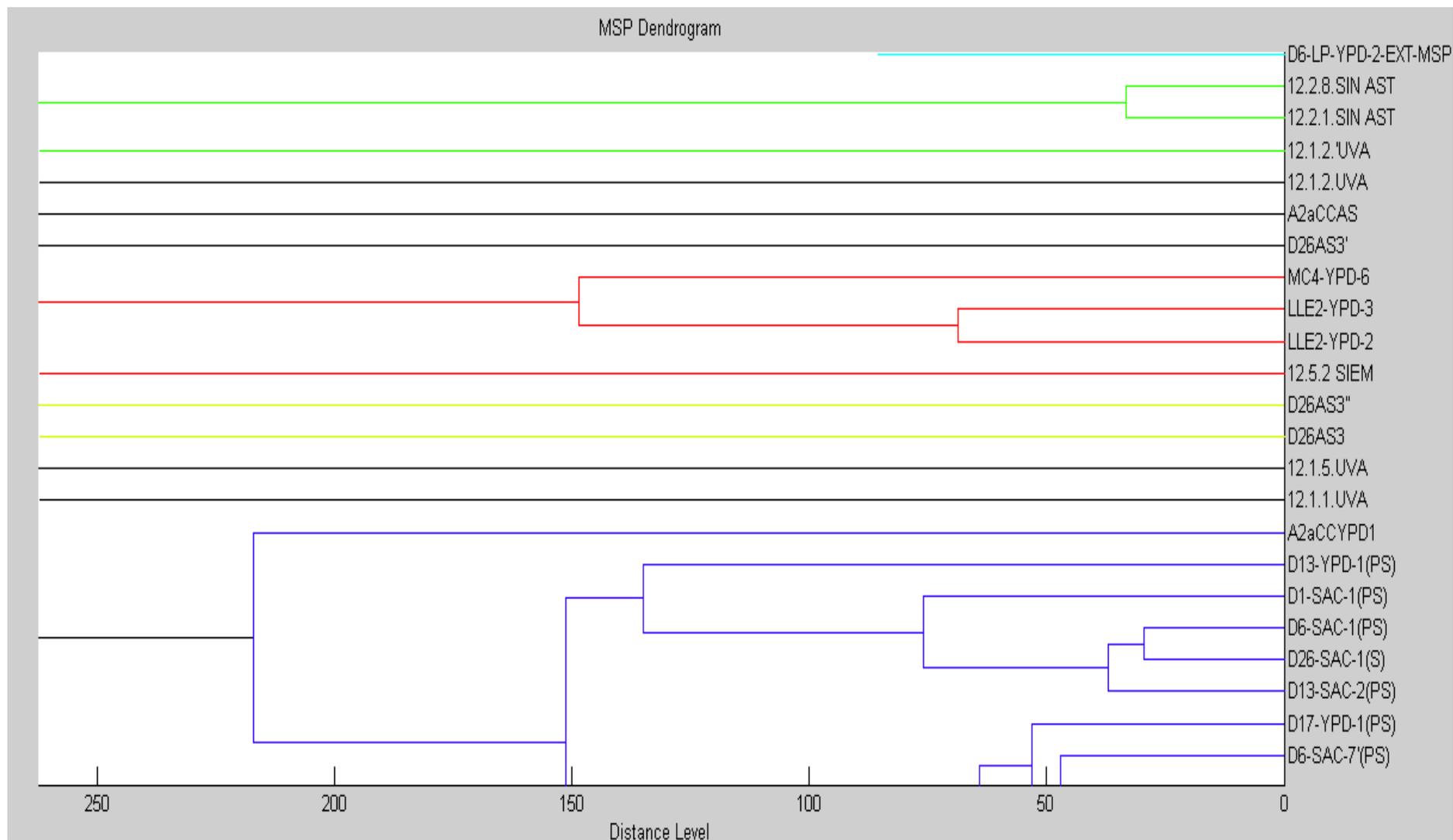
ANÁLISIS MALDI LEVADURAS COMERCIALES (12/06/17)

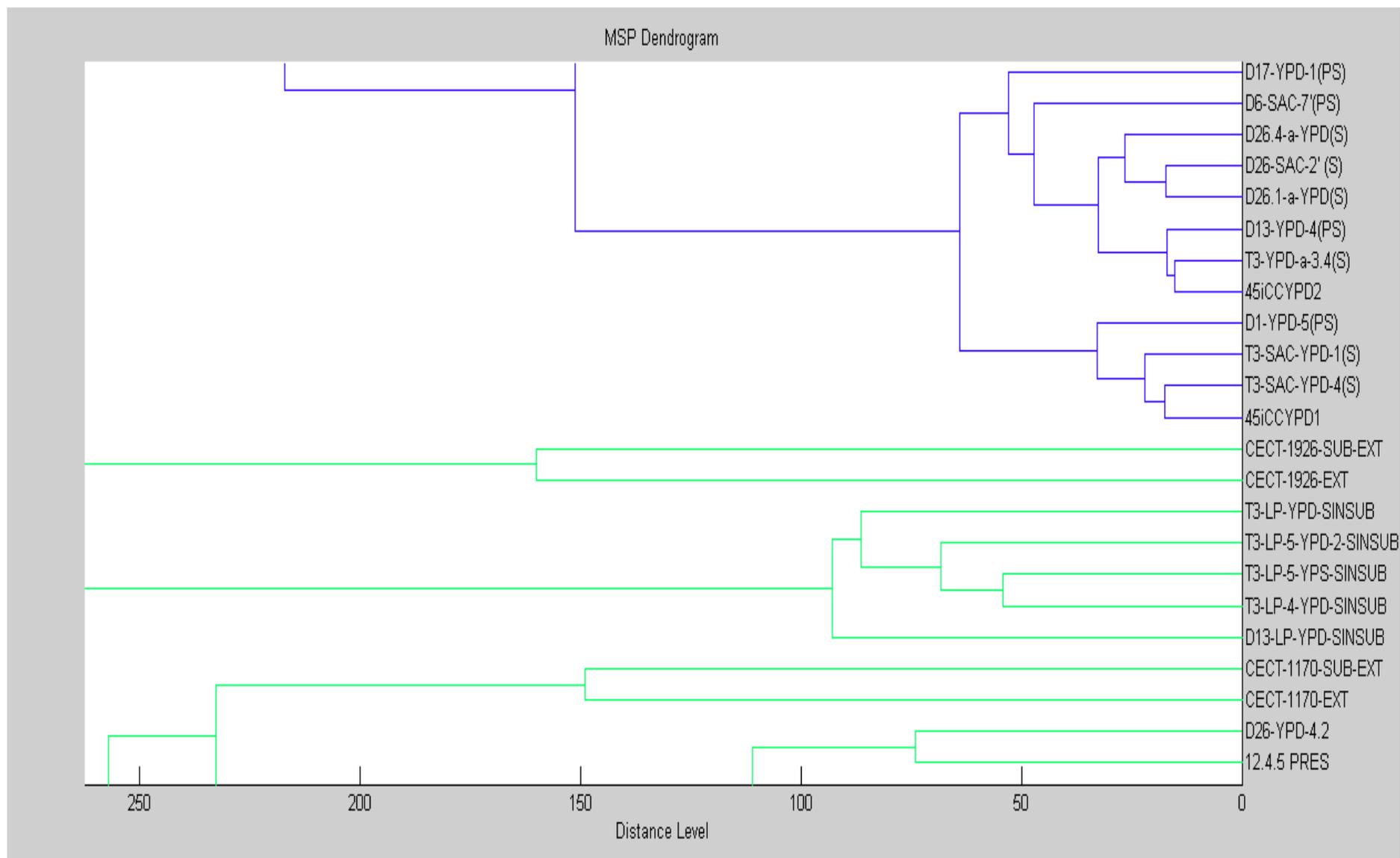
	D6-LP-YPD			D6-LP-YPD-2			D13-LP-YPD			T3-LP-3-YPD			T3-LP-4-YPD			T3-LP-5-YPD			T3-LP-5-YPD-2					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A																								
B																								
C																								
D	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•			
E	•	X•	•	•	X•	•	•	X•	•	•	X•	•	•	X•	•	•	X•	•	•	X•	•			
F	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•			
G	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•			
H	•	X•	•	•	X•	•	•	X•	•	•	X•	•	•	X•	•	•	X•	•	•	X•	•			
I	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•			
J	X•																							
K																		•						
L																		•						
M																		X						
N																								
O																								
P																								

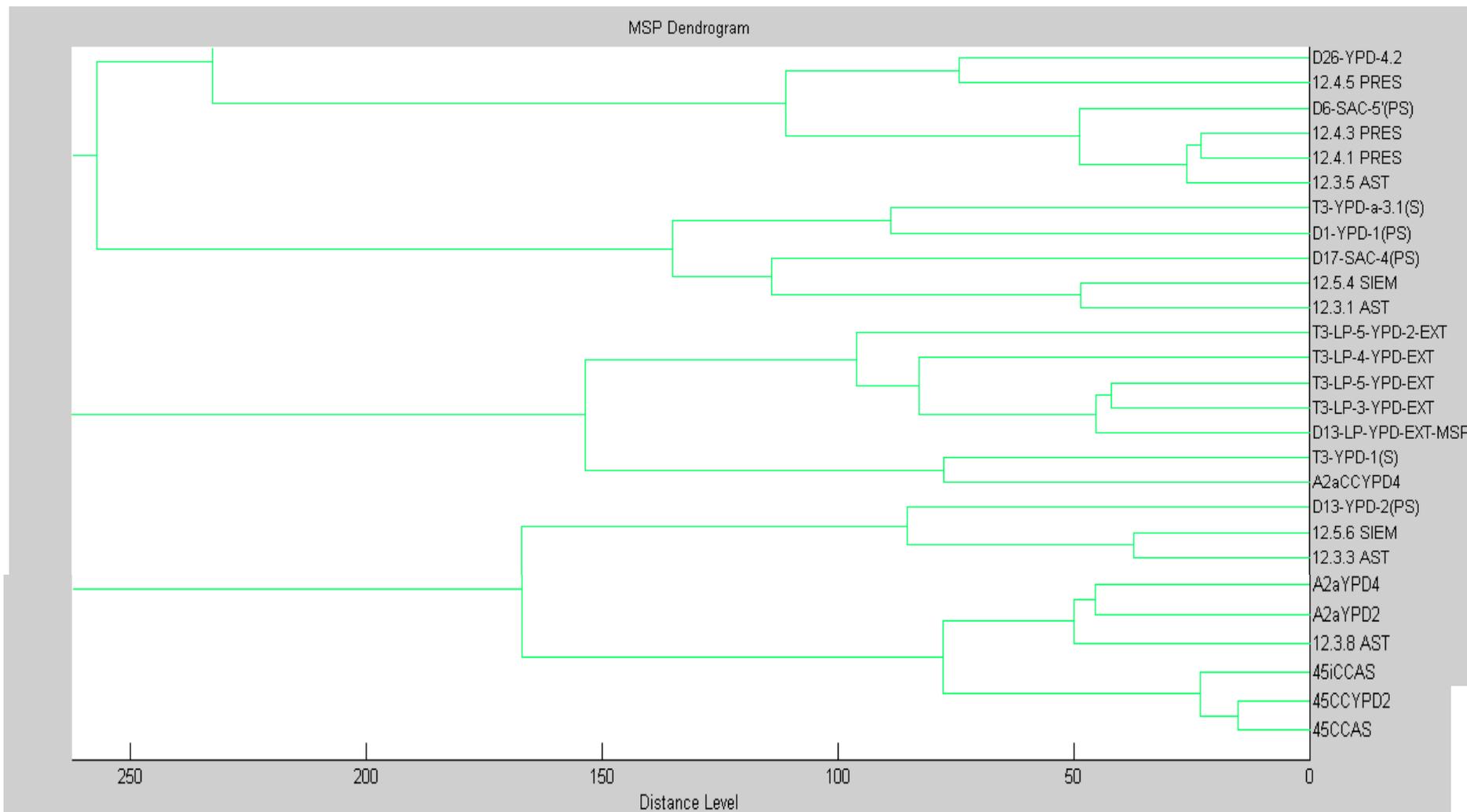
ANEXO III

DENDROGRAMA





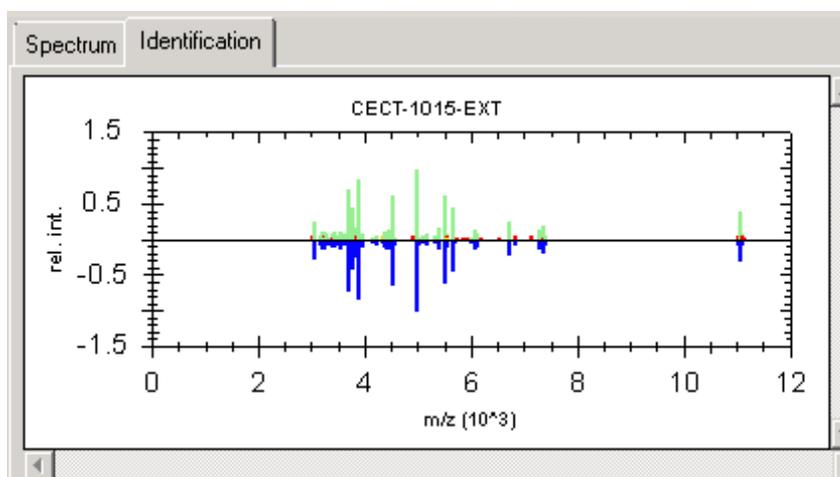
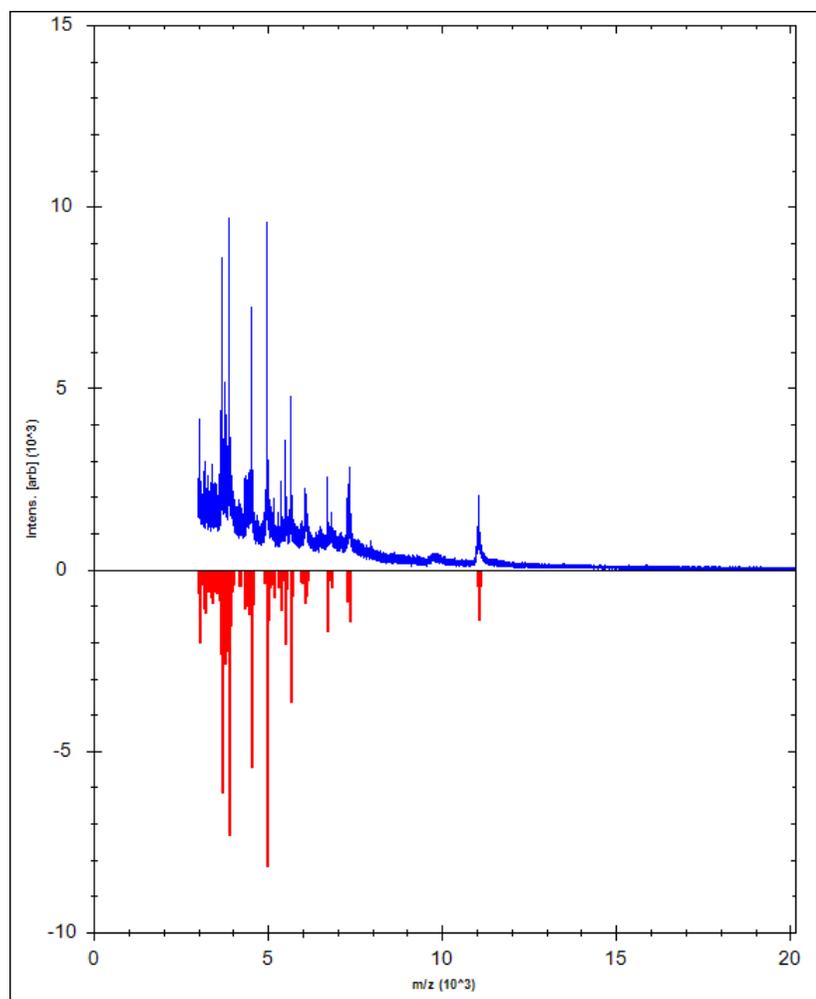




ANEXO IV

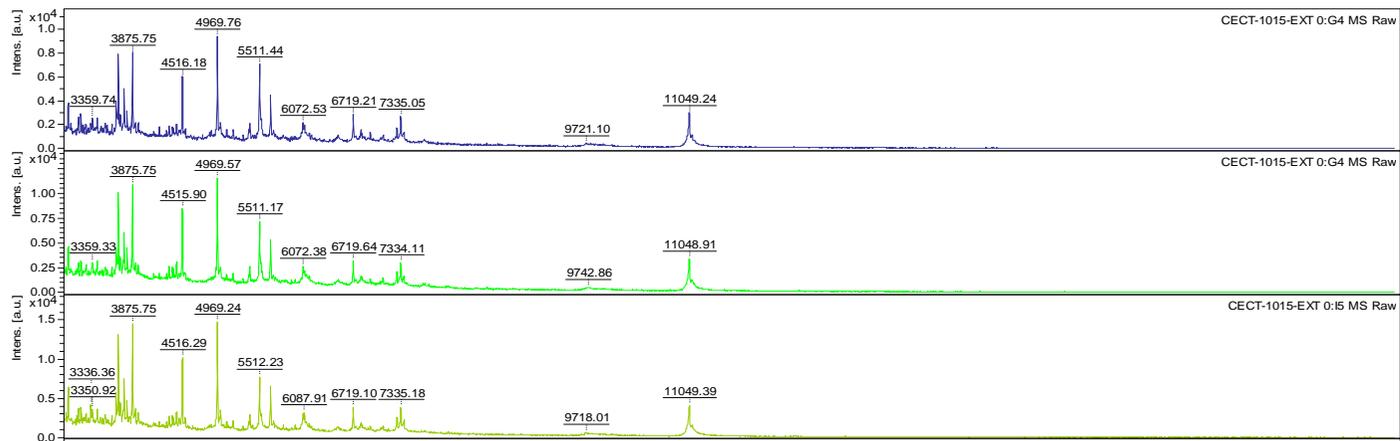
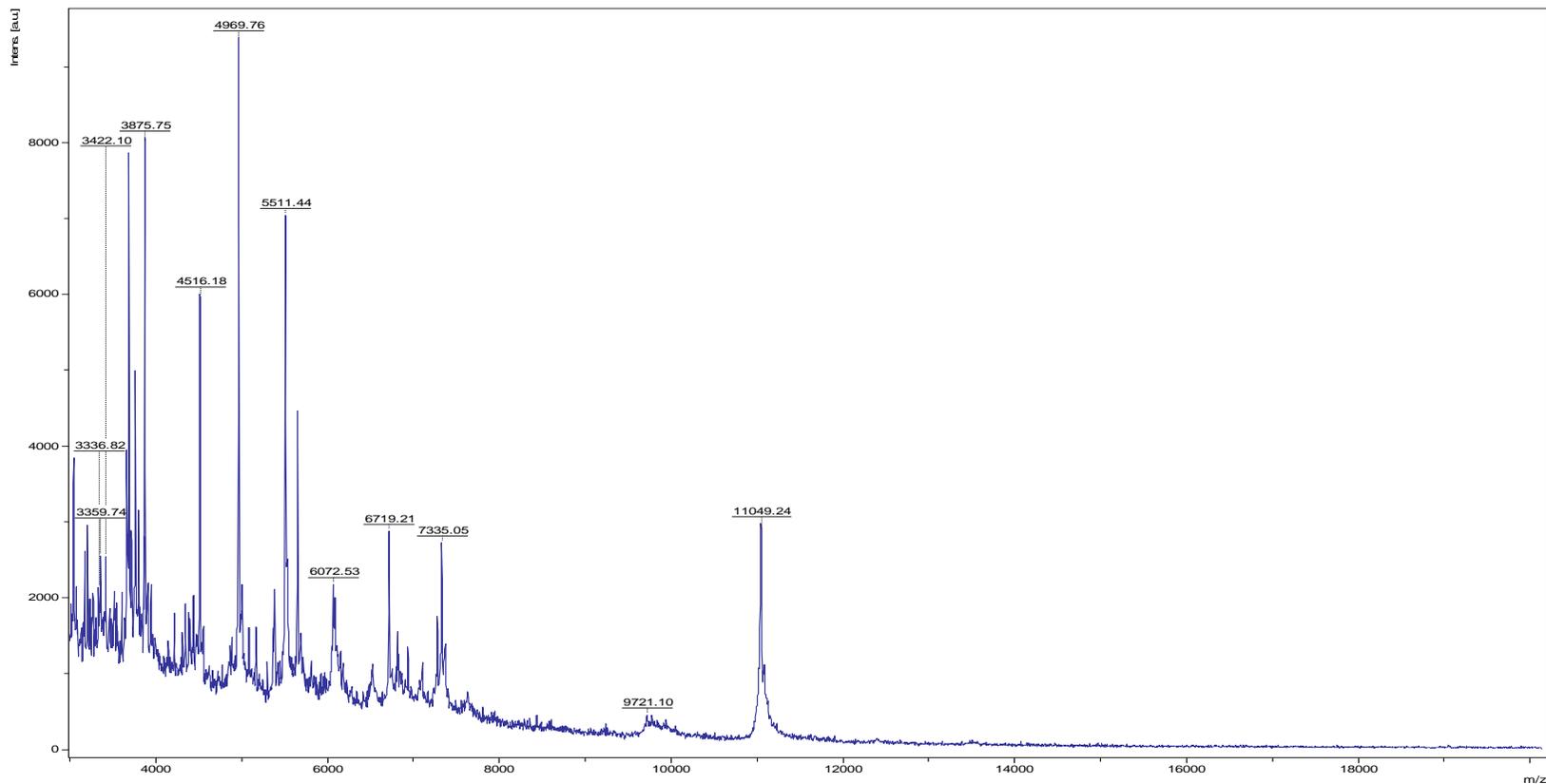
ESPECTROS E IDENTIFICACIONES DE LAS CECT

CECT-1015-EXT *Torulaspota delbrueckii* (Lindner 1904)

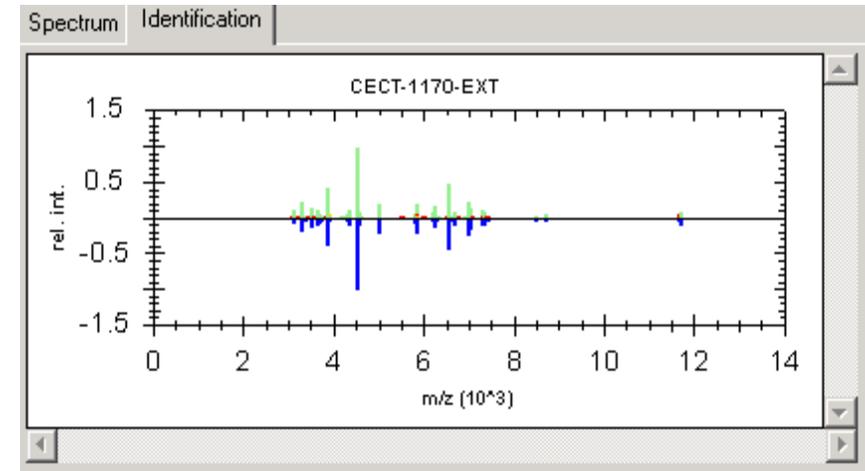
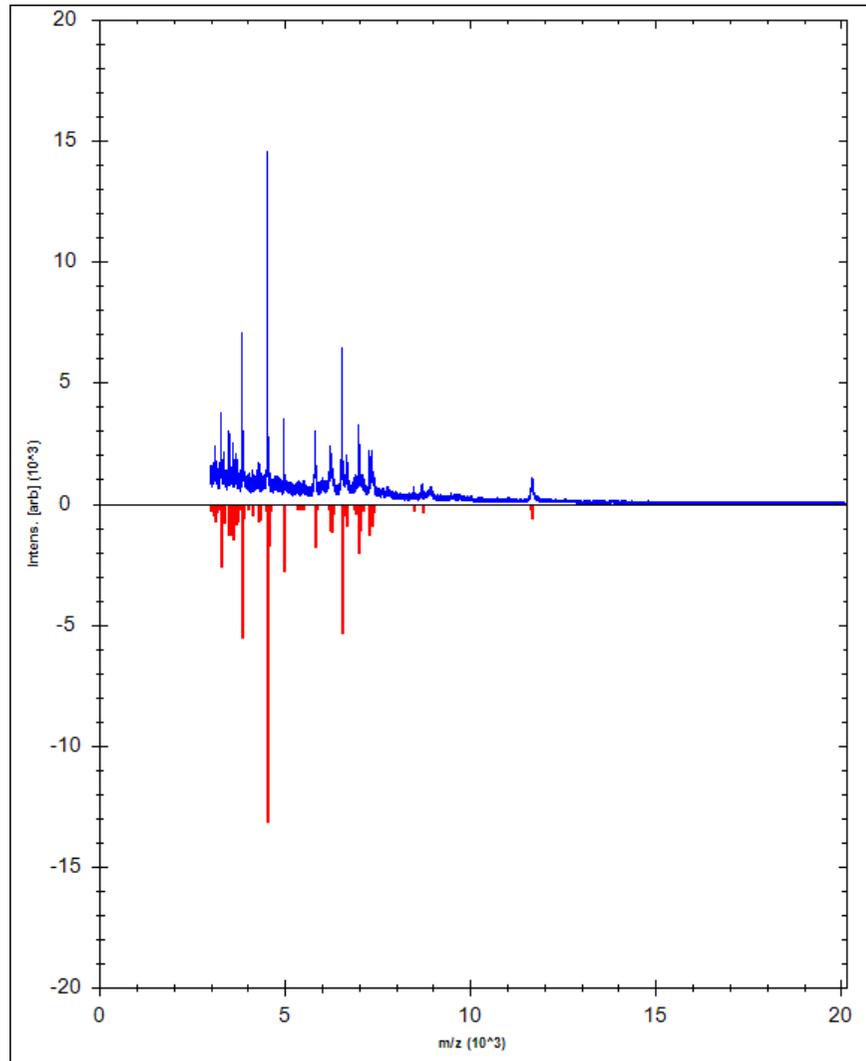


Mix	Detected Species	Log(Score)
1	CECT-1015-EXT	2.798
2	D6-LP-YPD-EXT	2.371
3	CECT-1015-SUB-EXT	2.368
4	Candida colliculosa[ana] (Torulaspota delbrueckii[teleo]#) ...	2.110
5	Candida colliculosa[ana] (Torulaspota delbrueckii[teleo]#) ...	2.098
6	12.2.5.SIN AST	2.071
7	Pseudomonas aeruginosa DSM 50071T HAM	1.269
8	Lactobacillus malefermentans DSM 5705T DSM	1.237
9	Lactobacillus salivarius DSM 20492 DSM	1.232
10	Lactobacillus zeae DSM 20178T DSM	1.217

Selected MSP (5718) Current MSP Spectrum Scores (10)

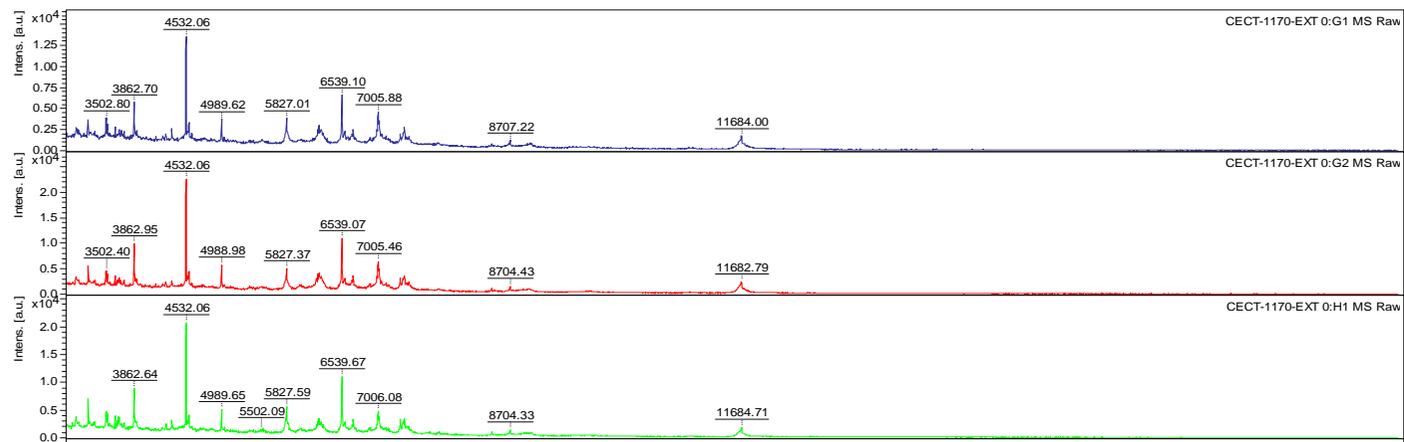
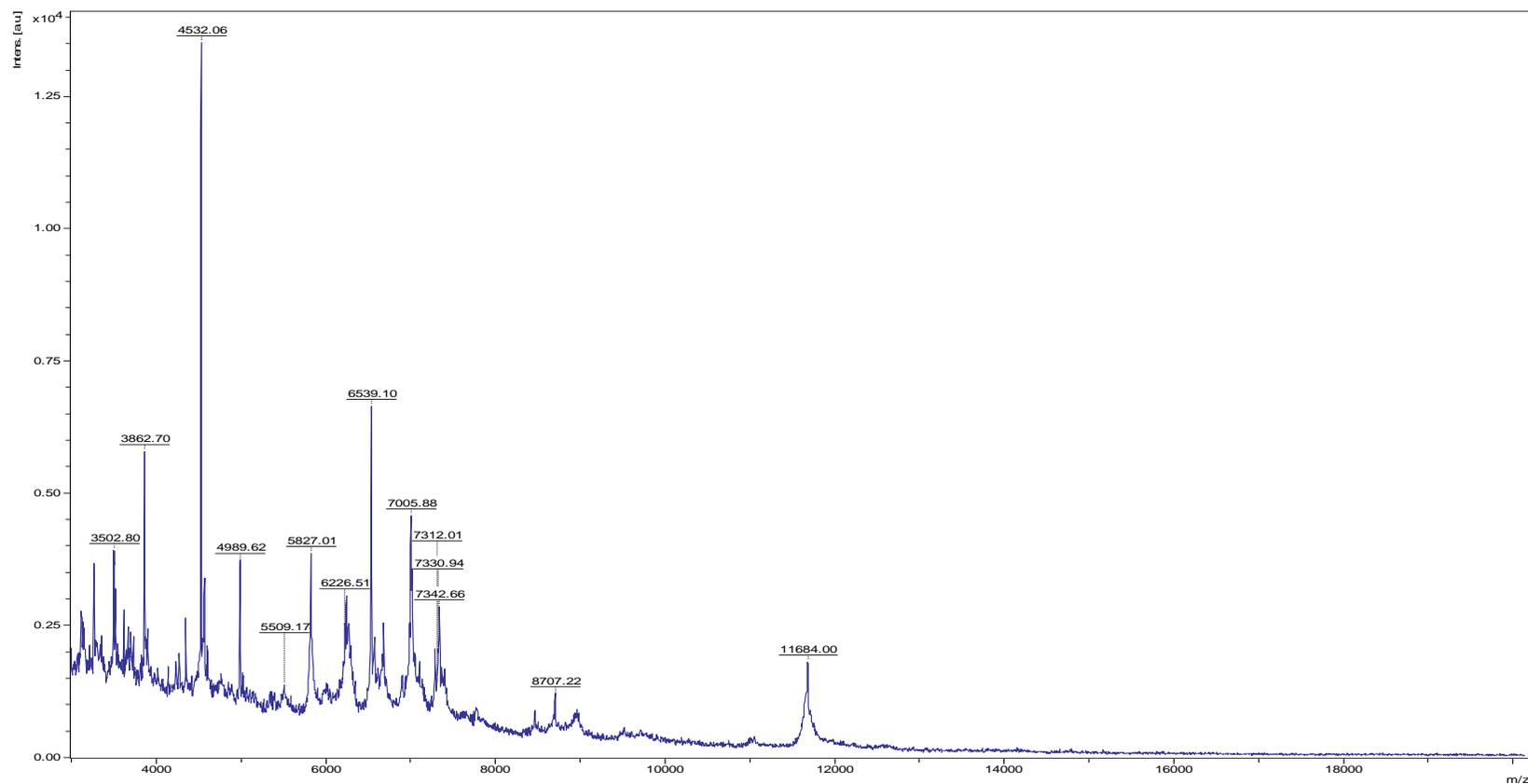


CECT-1170-EXT *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. (Hansen 1883).

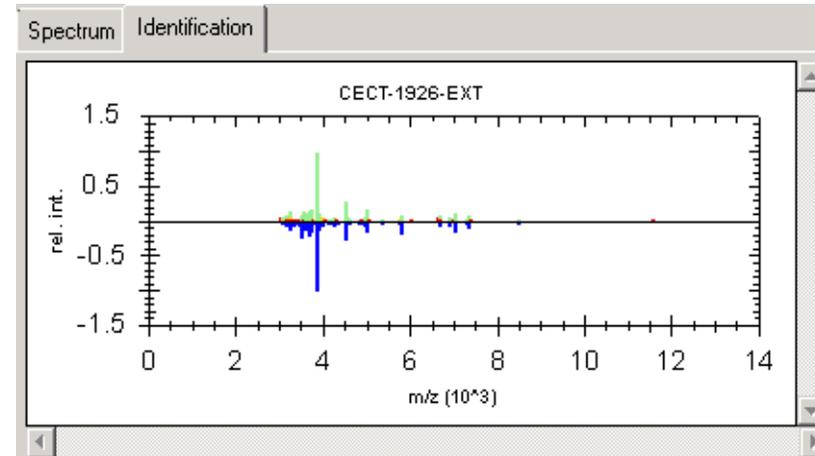
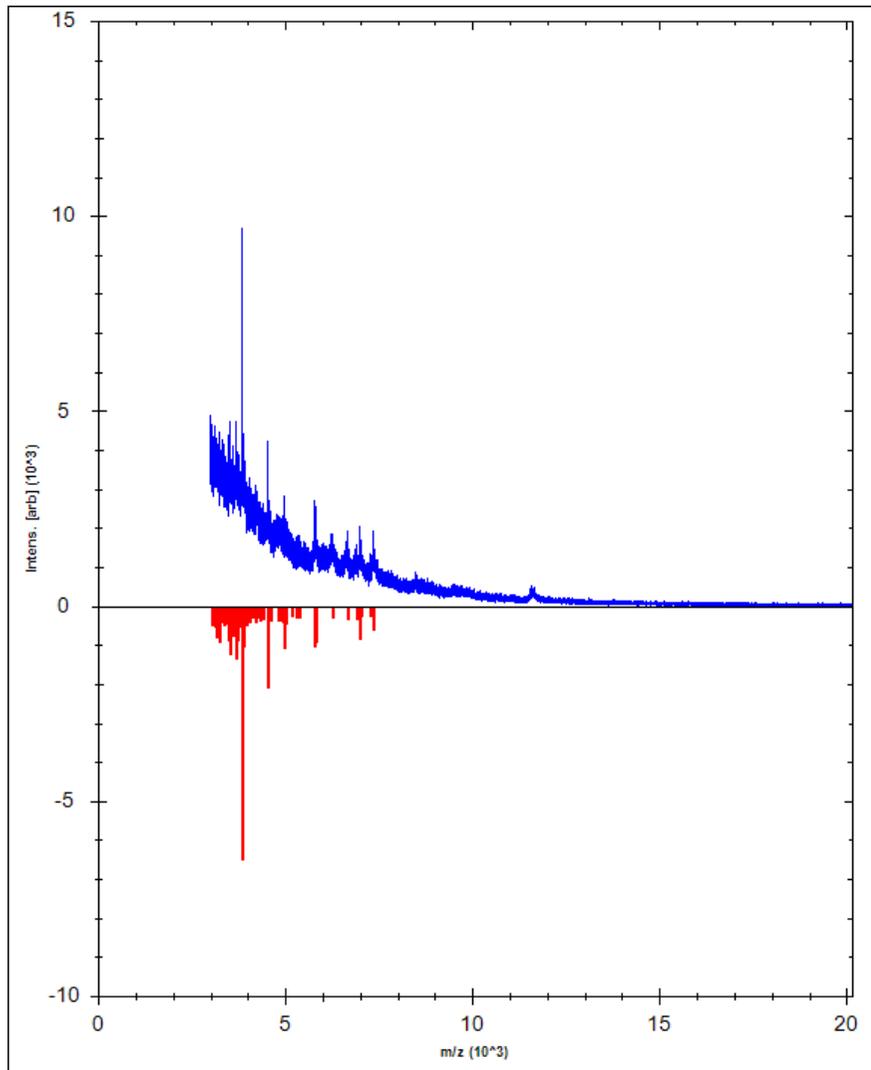


Mix	Detected Species	Log(Score)
1	CECT-1170-EXT	2.759
2	CECT-1170-SUB-EXT	2.069
3	T3-LP-4-YPD-EXT	1.936
4	T3-LP-5-YPD-EXT	1.924
5	D13-LP-YPD-EXT-MSP	1.918
6	T3-LP-3-YPD-EXT	1.913
7	T3-LP-4-YPD-SINSUB	1.845
8	T3-LP-5-YPD-2-SINSUB	1.768
9	D13-LP-YPD-SINSUB	1.707
10	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Isolat LGL Muenchen	1.701

Selected MSP (5718) Current MSP Spectrum Scores (10)

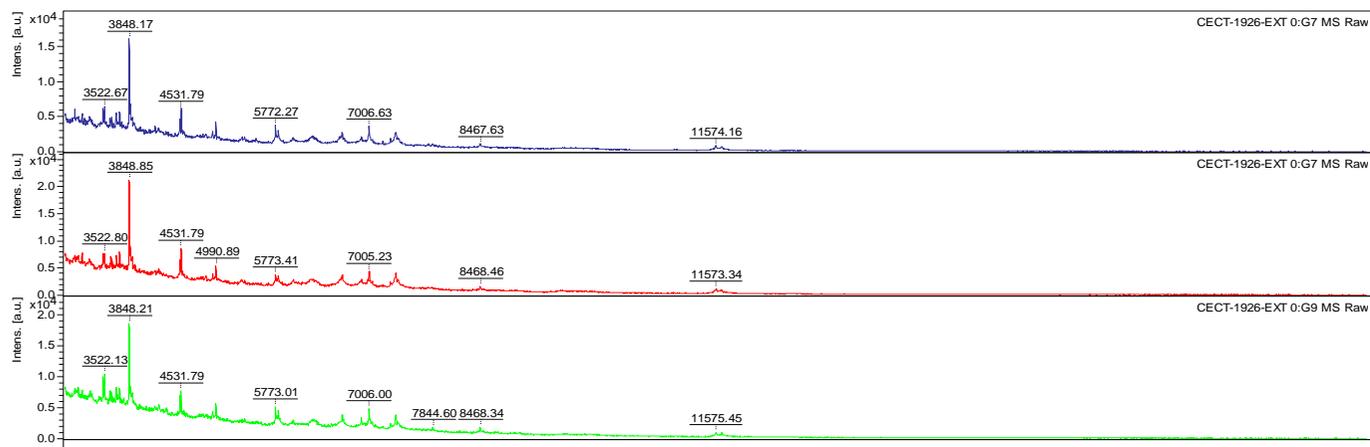
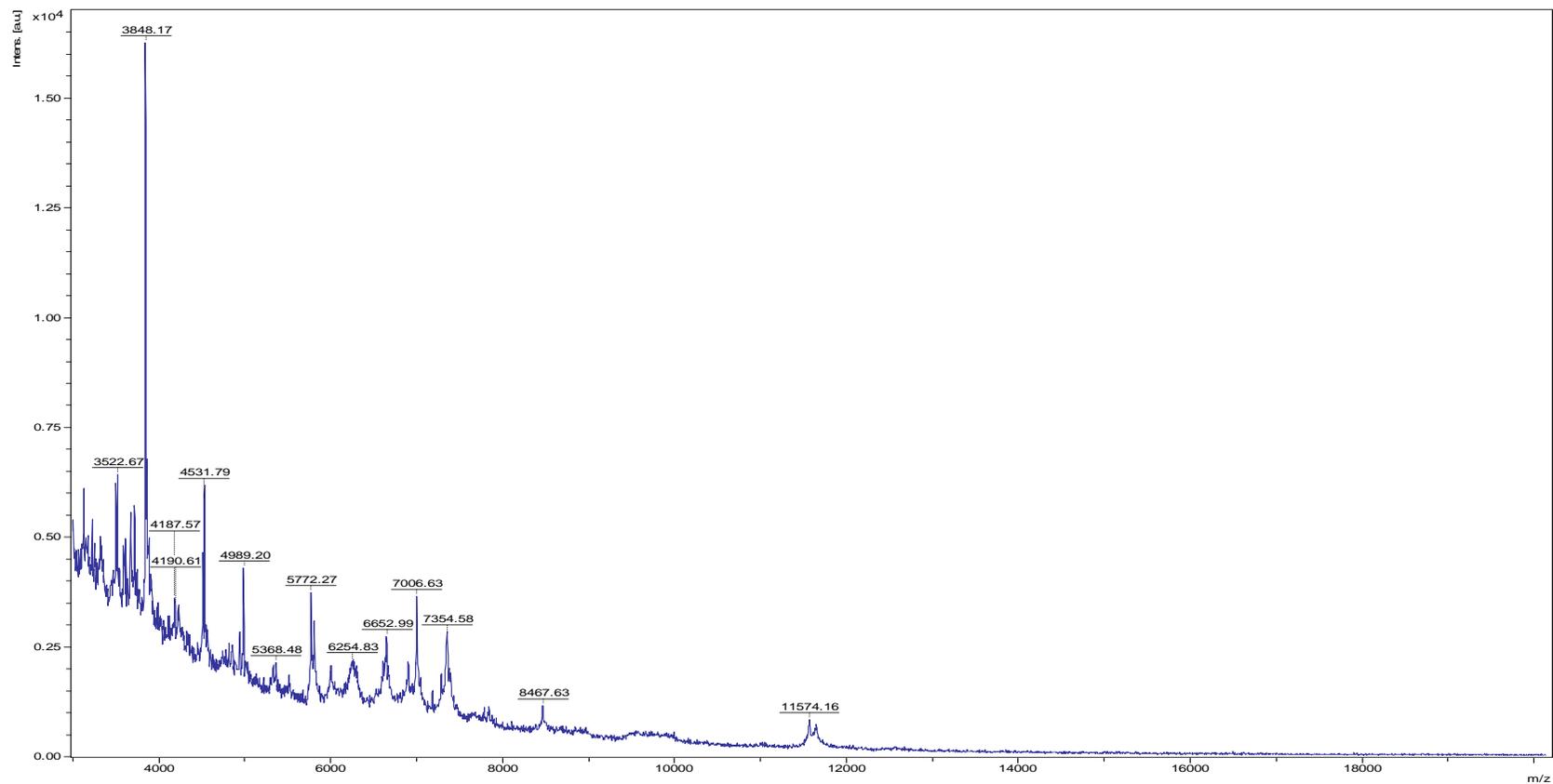


CECT-1926-EXT *Saccharomyces bayanus* (Saccardo 1895).

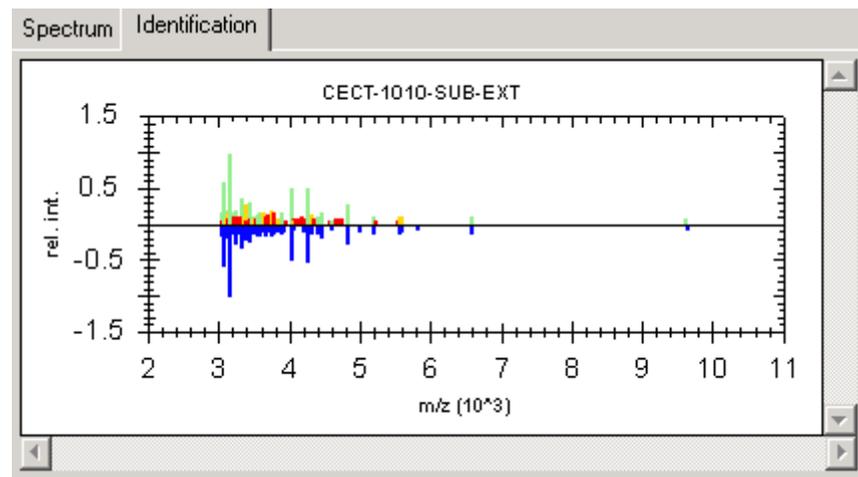
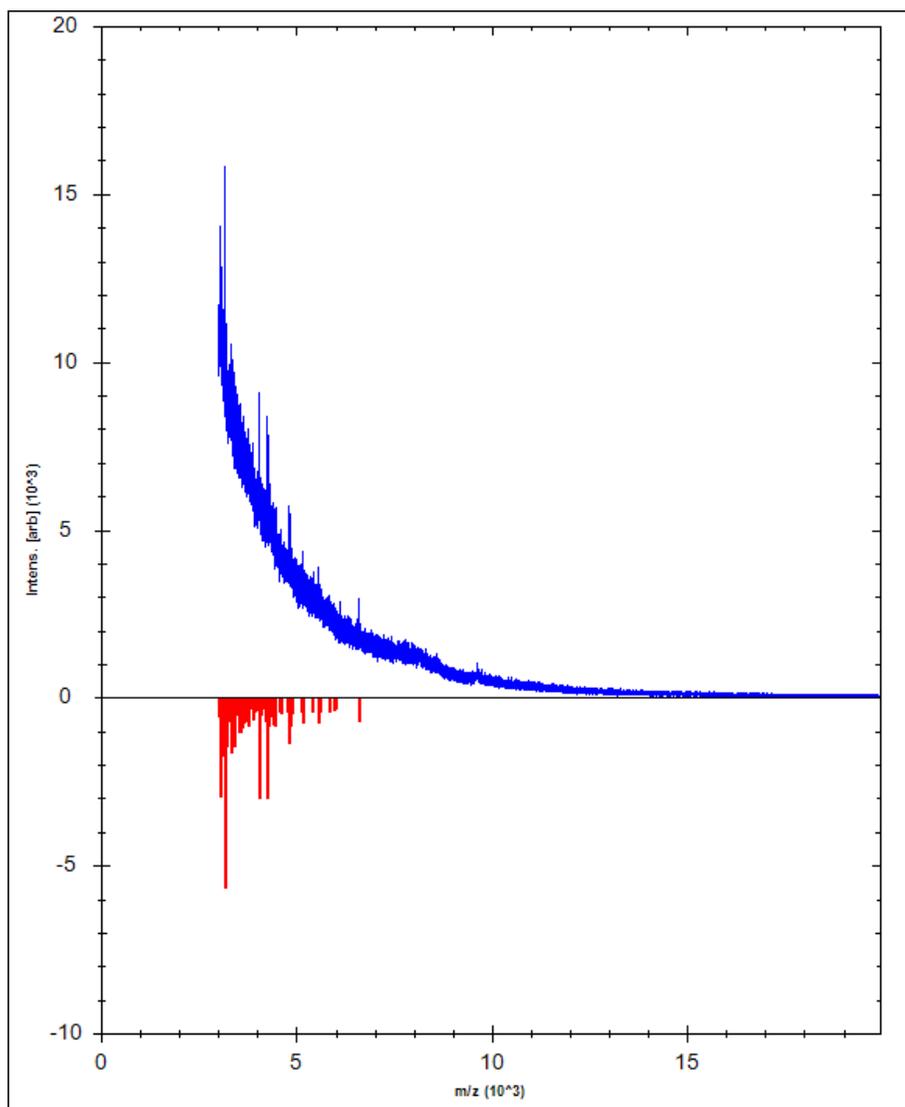


Mix	Detected Species	Log(Score)
1	CECT-1926-EXT	2.643
2	CECT-1926-SUB-EXT	2.223
3	CECT-1170-EXT	1.972
4	T3-LP-5-YPD-EXT	1.807
5	T3-LP-5-YPD-2-EXT	1.777
6	T3-LP-4-YPD-EXT	1.771
7	T3-LP-3-YPD-EXT	1.702
8	D13-LP-YPD-EXT-MSP	1.692
9	T3-LP-5-YPD-2-SINSUB	1.638
10	D13-LP-YPD-SINSUB	1.572

Selected MSP [5718] Current MSP Spectrum Scores [10]

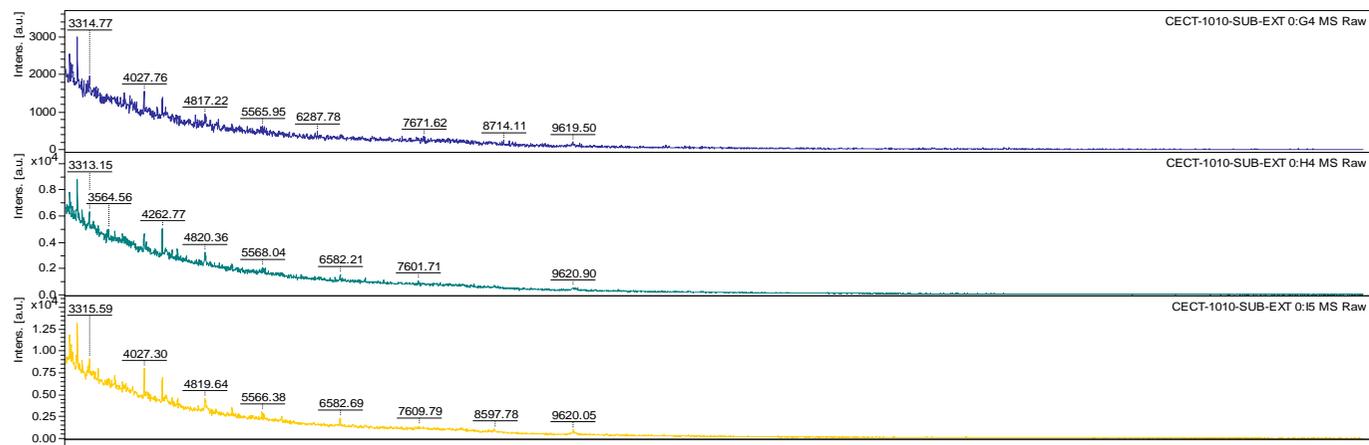
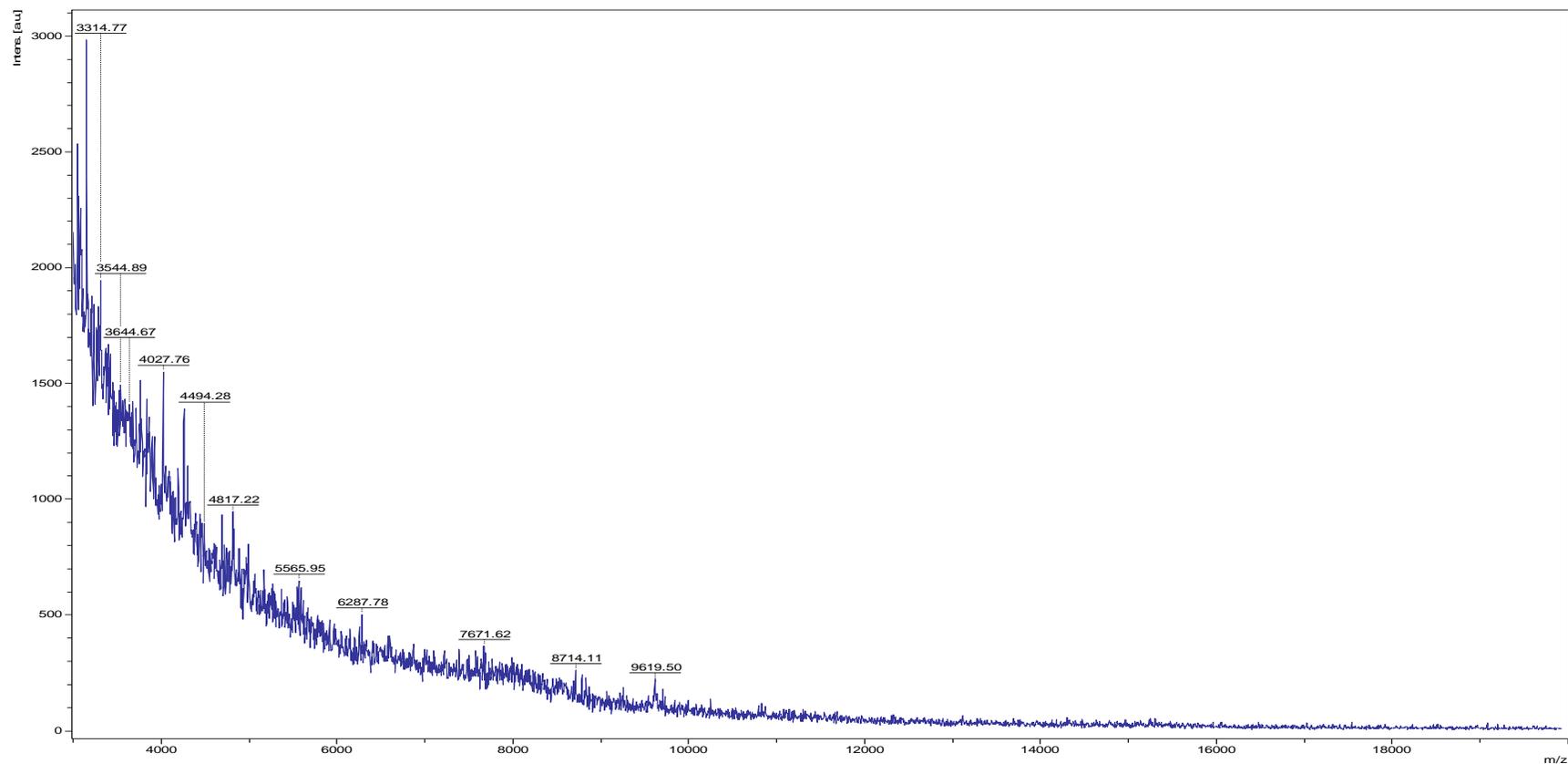


CECT-1010-SUB-EXT *Dekkera Bruxellensis* (Van del Walt, 1964).



	MSP	Detected Species	Log(Score)
●	1	CECT-1010-SUB-EXT	2.482
●	1	Filifactor villosus 1051 NCTC 11220T B0G	1.577
●	1	Mycoplasma hyorhinis FLR	1.480
●	1	T3-LP-5-YPD-EXT	1.468
●	1	Staphylococcus aureus ssp aureus DSM 20232 DSM	1.440
●	1	Lactobacillus gastricus DSM 16046 DSM	1.430
●	1	Mycobacterium bovis BCG 1878 PGM	1.417
●	1	Aeromonas encheleia CECT 4342T DSM	1.396
●	1	Trichosporon mucoides ATCC 204094 THL	1.393
●	1	Tsakamurella paurometabola DSM 20162T DSM	1.384

Selected MSP (5718) | Current MSP | Spectrum Scores (10)



9 GLOSARIO⁶⁶

ADN, *Deoxyribonucleic Acid* (ácido desoxirribonucleico).

ADNmt, *Mitochondrial DNA* (ADN mitocondrial).

ADNr, *Recombinant DNA* (ADN recombinante o ribosómico).

AFLP, *Amplified Fragment Length Polimorphism* (polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados)

AS, medio de cultivo *Agar Sangre*.

AST, *metabisulfito potásico*.

BTS, *Bacterial Test Standard* (test bactericida estándar).

CC, medio de cultivo *Cerebro Corazón de Buey*.

CECT, *Colección Española de Cultivos Tipo*.

CL, *Cromatografía de Líquidos* (liquid chromatography).

CS, *Cromatografía de Gases* (gas chromatography).

ESI, *Electrospray Ionization* (ionización por desorción con *electrospray*).

FISH, *Fluorescence In Situ Hybridization* (hibridación in situ fluorescente).

FML, *fermentación maloláctica*.

FOH, *fermentación alcohólica*.

FTICR, *Fourier-Transform Ion Cyclotron Resonance* (analizador por resonancia de ión-ciclotrón con transformada de Fourier).

HCCA, *α -cyano-4-hydroxycinnamic acid* (matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinámico).

IT, *Ion Trap* (analizador de trampa de iones).

KT, *Kluyveromyces Thermotolerans*.

LD, *Laser Desorption* (desorción láser).

MALDI-TOF MS, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry* (espectrometría de masas de desorción/ionización láser asistida por matriz con tiempo de vuelo).

MCP, *Microchannel Plate* (plato de microcanales).

MBT_FC, *Maldi BioTyper Function Calibration*.

MS, *Mass Spectrometry* (espectrometría de masas).

MSP, *Main Spectrum Profile* (perfil de espectro principal).

PCR, *Polymerase Chain Reaction* (reacción en cadena de polimerasa).

PDA, medio de cultivo *Potato Dextrose Agar*.

PFGE, *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (electroforesis en gel de campos pulsados).

PS, *presiembra*.

Q, *analizador cuadrupolar* (QMS, Quadrupole Mass Analyzer).

RAPD-PCR, *Random Amplified Polymorphic DNA-PCR* (amplificación aleatoria de ADN polimórfico).

RFLP, *Restriction Fragment Length Polymorphisms* (polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción).

S, *siembra*.

SAC, medio de cultivo *Agar Sabouraud con cloroanfenicol*.

SC, *Saccharomyces cerevisiae*.

TD, *Torulaspota Delbrueckii*.

TFA, *trifluoracético*.

TOF, *Time of flight* (tiempo de vuelo).

YPD, medio de cultivo *extracto de peptona-dextrosa agar*.

Cepa: En microbiología es una población de células de una sola especie descendientes de una única célula o conjunto de especies bacterianas que comparten, al menos, una característica.

Especie: colección de cepas que comparten numerosas propiedades estables y que difieren de forma significativa de otros grupos de cepas.

Género: constituye el siguiente rango en la jerarquía taxonómica. Conjunto de especies que difiere de otros grupos de especies.

⁶⁶. Joaquín Abián, Jesús Vázquez. *LISTA DE TÉRMINOS Y EXPRESIONES EN INGLÉS Y SU TRADUCCIÓN RECOMENDADA AL CASTELLANO*. Proteómica. (2008); 2.

