



# Die Identifizierung önologischer Hefen und Bakterien unter Verwendung der MALDI-TOF Massenspektrometrie

Amélie Vallet-Courbin<sup>1</sup>, Marine Lucas<sup>1</sup>, Lucie Dutilh<sup>1</sup>, Cécile Miot-Sertier<sup>2</sup>, Sara Windholtz<sup>2</sup>, Patrick Lucas<sup>2</sup>, Isabelle Masneuf-Pomarede<sup>2</sup>, Julie Maupeu<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Microflora-ADERA, Univ. Bordeaux, INRAE, Bordeaux INP, Bordeaux Sciences Agro, UMR 1366 OENOLOGIE, ISW, F33882 Villenave d'Ornon, France

<sup>2</sup> Univ. Bordeaux, INRAE, Bordeaux INP, Bordeaux Sciences Agro, UMR 1366 OENOLOGIE, ISW, F-33140 Villenave d'Ornon, France

In diesem Artikel beschreiben wir die Verwendung der MALDI-TOF Massenspektrometrie zur Identifizierung verschiedener Hefe- und Bakterienarten, die aus unterschiedlichen Proben (Moste, Weine und andere Getränke) stammen. Die Analyse einer großen Anzahl von Isolaten ermöglicht es, die Artenvielfalt der Hefen, sowie der Essig- und Milchsäurebakterien in den verschiedenen Phasen vor und während der Gärung, sowie während der Reifung, und nach dem Abfüllen zu studieren. Zudem kann diese Methode dazu genutzt werden, die Risiken unerwünschter Veränderungen eines Produktes durch Mikroorganismen besser zu kontrollieren.

## Kontext

Die MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight) Massenspektrometriemethode wird schon seit mehr als fünfzehn Jahren als Referenzmethode im biomedizinischen Bereich zur Identifizierung verschiedener Arten von Mikroorganismen genutzt<sup>1</sup>. Sie erlaubt eine schnelle und zuverlässige Identifizierung, und ermöglicht es somit dem medizinischem Fachpersonal, Patienten schnell und gezielt zu behandeln. Niedrige Kosten, einfache Nutzung, Schnelligkeit und Zuverlässigkeit machen die MALDI-TOF Methode auch zu einer guten Alternative zu Verfahren, die auf DNA-Sequenzierung beruhen<sup>2,3</sup>. Aus diesen Gründen hat sie auch Anwendungen in anderen Bereichen wie der Lebensmittelindustrie gefunden<sup>4,5</sup>, wie zum Beispiel zur Identifizierung von Hefen in fermentierten Produkten und Getränken, wie Bier oder Wein<sup>6,7</sup>. Um Hefen und Bakterien von önologischem Interesse zuverlässig bestimmen zu können, ist es notwendig, das Gerät mit einer Datenbank spezifischer Proteinspektren dieser Mikroorganismen zu verbinden. Die in diesem Artikel zusammengefassten Arbeiten zeigen, dass es möglich ist, die Massenspektrometrie als Routinemethode für die mikrobiologische Analyse von Mosten und Weinen zu nutzen.

## Das Prinzip der MALDI-TOF Analysemethode

Die Identifizierung von Mikroorganismen erfolgt in fünf Schritten (Abbildung 1): 1/ Die Isolierung von Hefe- oder Bakterienstämmen aus Most- oder Weinproben erfolgt durch Ausplattieren auf einem Agar-Nährmedium. 2/ Die Kolonie, oder der Teil einer Kolonie, wird dann auf die MALDI-Probenplatte übertragen. Pro Platte können gleichzeitig mehr als 90 Isolate in ungefähr einer Stunde analysiert werden. 3/ Die zu analysierenden Kolonien werden mit einer Matrix-Lösung behandelt, wonach die Probenplatte in das Massenspektrometer eingeschleust und analysiert wird. Mithilfe eines Lasers wird Zellmaterial freigesetzt, Proteine und Peptide werden fragmentiert und ionisiert, und deren Masse im Spektrometer analysiert. 4/ Die Polypeptide jeder Kolonie produzieren ein für eine Hefe- oder Bakterienart charakteristisches Spektrum. 5/ Dieses Spektrum wird schließlich mit einer Referenzspektren-Datenbank (RSD) verglichen. In ungefähr einer Stunde ist es somit möglich, den jeweiligen Mikroorganismus von einer Kolonie auf Artenebene zu identifizieren. Dies ist allerdings nur in einem zufriedenstellenden Rahmen möglich, wenn die Art, oder ein Referenzstamm einer nahen verwandten Art, bereits in der Datenbank vorhanden ist. Bei Nichtvorhandensein oder wenn der Referenzorganismus zu weit vom

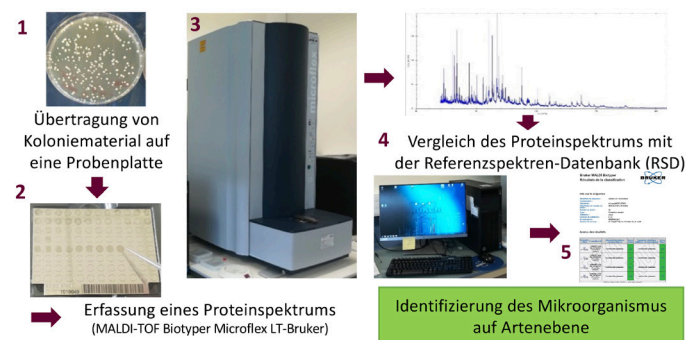
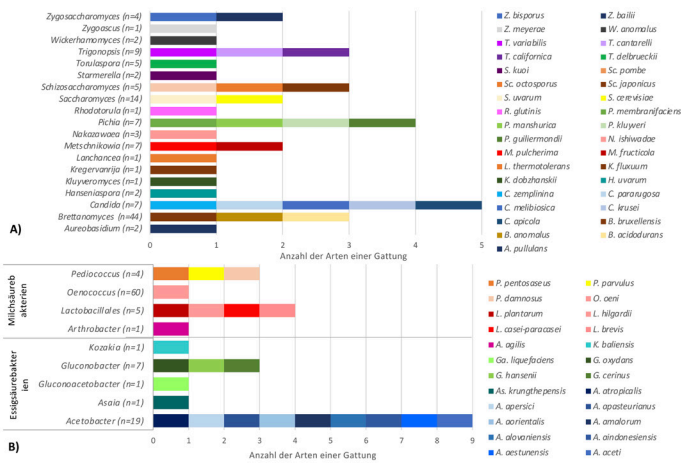


ABBILDUNG 1. Arbeitsschritte zur Identifizierung von Mikroorganismen mithilfe der MALDI-TOF Massenspektrometrie.

önologischen Milieu entfernt ist, ist eine Identifizierung nicht möglich. Die in dieser Studie verwendete Datenbank des Herstellers enthält mehr als 9000 Proteinspektren von Hefe- und Bakterienstämmen, wobei allerdings nur wenige von ihnen mit der Weinherstellung in Verbindung stehen.

## Eine Datenbank speziell für önologische Mikroorganismen

Während dieser 2015 begonnenen Studie hat sich die Referenzspektren-Datenbank des Herstellers als sehr effektiv bei der Identifizierung bestimmter mikrobieller Arten erwiesen, wie z. B. der Hefen *Hanseniaspora uvarum* und *Kluyveromyces lactis* (vor dem Beginn der Gärung nachweisbar), oder von Milchsäurebakterien, die in der Lage sind, die malolaktische Gärung durchzuführen, wie *Lactiplantibacillus plantarum* (früher *Lactobacillus plantarum*). Für andere Arten waren die Ergebnisse jedoch weniger zufriedenstellend. Dies betraf z. B. die Hefe *Saccharomyces cerevisiae*<sup>6</sup>, als auch *Oenococcus oeni*, welcher bei der malolaktischen Gärung die wichtigste Rolle spielt. Beide wurden nur selten korrekt identifiziert. Für die Schadhefe *Brettanomyces bruxellensis* wurde die Identifizierungsrate unter Verwendung der RSD des Herstellers auf nur 46 % geschätzt. Ähnlich unbefriedigende Ergebnisse wurden für die Hefen *Torulaspota delbrueckii* und *Metschnikowia sp.* (biologischer Schutz von Mosten), sowie *Zygosaccharomyces bailii* (Verursacher von Weinfehler) erhalten. Zudem war die Identifizierung von önologischen Mikroorganismen, die in der Hersteller-RSD nicht vorhanden waren, wie z. B. der Hefen *Starmerella bacillaris* und *Trigonopsis cantarelli*, sowie Essigsäurebakterien der Gattung *Acetobacter*, unmöglich.

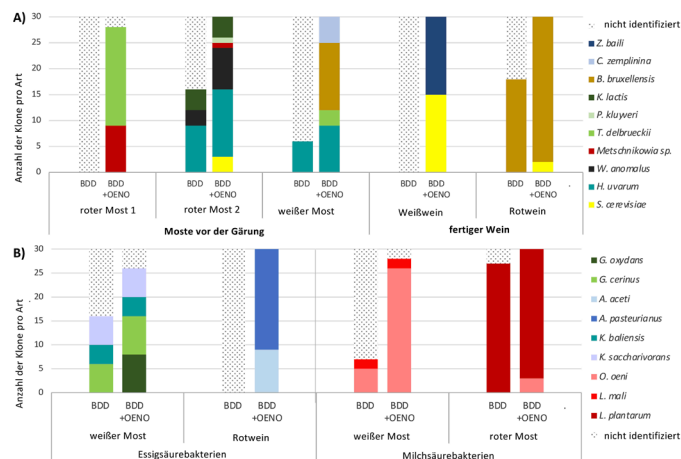


**ABBILDUNG 2.** Die Anzahl der Arten, die der Datenbank önologischer Mikroorganismen hinzugefügt wurden (die Anzahl der Arten pro Gattung sind in Klammern angegeben). (A) 19 Hefegattungen (118 Isolate) und (B) 9 Bakteriengattungen (99 Isolate).

Um eine zuverlässige Identifizierung önologischer Mikroorganismen zu ermöglichen, wurde eine „OENO“-Datenbank aufgebaut. Diese Datenbank basiert auf der RSD des Herstellers und enthält zusätzlich Proteinspektren von 217 Hefe- und Bakterienisolaten aus dem Biological Resource Center (CRB Oeno) des Forschungsinstitutes für Rebe und Wein (ISW) Bordeaux, und ist somit repräsentativ für die wichtigsten Moste und Weine. Die 118 Hefeisolate entsprechen 35 verschiedenen Arten (Abbildung 2-A), von denen etwa 15 ursprünglich in der RSD des Herstellers fehlten. Die 44 *B. bruxellensis* Stämme gehören nach jetzigem Kenntnisstand zu genetischen Gruppen, die mehr oder weniger SO<sub>2</sub>-resistent sind<sup>8</sup>. Von den zirka einhundert hinzugefügten Bakterienisolaten, darunter 17 Arten von Essigsäurebakterien und neun Arten von Milchsäurebakterien (Abbildung 2-B), fehlten ursprünglich sieben in der RSD des Herstellers, insbesondere Vertreter der Gattung *Acetobacter*. Die 60 Stämme von *Oenococcus oeni*, die sich nun in der RSD „OENO“ befinden, stammen aus unterschiedlichen genetischen Gruppen, die speziell an Most oder verschiedene Weintypen angepasst sind<sup>9</sup>.

## Validierung der Methode zur Analyse von Mosten und Weinen

Um die Wirksamkeit der Methode zu testen, wurden mehr als 10.000 Kolonien von Hefen und Bakterien aus Mosten und Weinen der Jahrgänge 2020 und 2021 analysiert<sup>10</sup>. Die Spektren wurden sowohl mit der RSD des Herstellers als auch der RSD „OENO“ verglichen. Abbildung 3 zeigt, dass die Datenbank „OENO“, unabhängig vom Produkt, die Identifizierung aller Arten von Hefen und Bakterien deutlich verbesserte: 99 % der Hefeisolate und 91 % der Bakterienisolate wurden mit der RSD „OENO“ erfolgreich identifiziert.



**ABBILDUNG 3.** Jeweils 30 Proben von (A) Hefen und (B) Bakterien aus Mosten und Weinen wurden mithilfe der MALDI-TOF/MS analysiert, und unter Verwendung der Referenzspektrendatenbank des Herstellers (RSD) oder der RSD „OENO“ (RSD+OENO) identifiziert.

Im Vergleich dazu wurden nur etwa ein Drittel der Hefen und zirka die Hälfte der Weinbakterien mit der Hersteller-RSD bestimmt (Abbildung 3-A).

Die Daten zeigen, dass die neue Datenbank maßgeblich zur Identifizierung von önologischen Mikroorganismen aus Mosten und Weinen beiträgt. Sie kann zudem dazu genutzt werden, Schadorganismen wie *B. bruxellensis*, die Weinfehler verursachen, schnell zu erkennen.

## Fazit

Der Aufbau einer neuen „OENO“-Datenbank am ISW ermöglicht es, die MALDI-TOF-Massenspektrometrie als Routinemethode zur zuverlässigen Identifizierung von auf Agar-Nährböden gezogenen Kolonien önologischer Hefen und Bakterien zu nutzen. Diese Methode kann für die mikrobiologische Analyse von Mosten und Weinen, sowie für Biodiversitätsstudien verwendet werden, zum Beispiel im Rahmen von Studien zur Verringerung der SO<sub>2</sub>-Konzentration in der Weinherstellung. ■

**Danksagung:** Die Autoren danken dem berufsübergreifenden Weinwirtschaftsverband Bordeaux (Conseil Interprofessionnel du Vin de Bordeaux, CIVB) und dem Regionalrat der Region Nouvelle-Aquitaine für ihre finanzielle Unterstützung, sowie dem Centre for Oenological Biological Resources (CRBO) des ISW für die Bereitstellung der Hefe- und Bakterienstämme.

- Clark, A.E., Kaleta, E.J., Arora, A. and D.M. Wolk, 2013. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: A Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology. *Clinical Microbiol. Rev.* (26) 547–603. <http://doi.org/10.1128/CMR.00072-12>
- Kurtzman C.P. and Robnett C.J., 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit 26S ribosomal DNA partial sequences. *Anton. Leeuw.*(73)331-371. <http://doi.org/10.1023/a:1001761008817>
- Sato H., Yanagida F., Shinohara T. and Yokotsuka K., 2000. Restriction fragment length polymorphism analysis of 16S rRNA genes in lactic acid bacteria isolated from red wine. *J. Biosc. Bioeng.*, (90), 335-337. [http://doi.org/10.1016/S1389-1723\(00\)80091-2](http://doi.org/10.1016/S1389-1723(00)80091-2)
- Quero L., Girard V., Pawtowski A., Tréguer S., Weill A., Arend S., Celliere B., Polsinelli S., Monin V., Van Belkum A., Vasseur V., Nodet P., and Mounier J. (2018). Development and application of MALDI-TOF MS for identification of food spoilage fungi. *Food Microbiol.* (81) 76-88. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.05.001>
- Zhang J., Plowman J., Tian B., Clerens S. and On S.L (2021). Application of MALDI-TOF analysis to reveal diversity and dynamics of winemaking yeast species in wild fermented, organically produced, new Zealand Pinot Noir wine. *Food Microbiol.*, 99-103824. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103824>
- Usbeck J.C., Wilde C., Bertrand D., Behr J. and Vogel R.F (2014). Wine yeast typing by MALDI-TOF MS. *Appl Microbiol Biotech.* (98), 3737-3752. DOI 10.1007/s00253-014-5586-x
- Gutiérrez C., Gómez-Flechoso M A., Belda I., Ruiz I., Kayali N., Polo L. and Santos A. (2017). Wine yeasts identification by MALDI-TOF MS: Optimization of the preanalytical steps and development of an extensible open-source platform for processing and analysis of an in-house MS database. *Int. J. of Food Microbiol.*, 2 (254), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.05.003>
- Avramova M., Vallet-Courbin A., Maupeu J., Masneuf-Pomarede I. and Albertin V. (2018). Molecular diagnosis of *Brettanomyces bruxellensis* sulfur dioxide sensitivity through genotype specific method. *Frontiers in Microbiol.*, (9) 1260. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01260>
- El Khoury M., Campbell-Sills H., Salin F., Guichoux E., Claisse O. and Lucas P.M. (2017). Biogeography of *Oenococcus oeni* reveals distinctive but nonspecific populations in wine-producing regions. *Appl. And Env. Microbiol.* 83 (3). <https://doi.org/10.1128/AEM.02322-16>
- Windholtz S., Dutilh L., Lucas M., Maupeu J., Vallet-Courbin A., Farris L., Coulon J. and Masneuf-Pomarede I. (2021). Population Dynamics and Yeast Diversity in Early Winemaking Stages without Sulfites Revealed by Three Complementary Approaches. *Appl. Sci.*, 11(6), 2494. <https://doi.org/10.3390/app11062494>