



# Identificación de las levaduras y bacterias enológicas por espectrometría de masa de tipo MALDI-TOF

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, ISVV, F33882 Villenave d'Ornon, France

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

La espectrometría de masa de tipo MALDI-TOF fue adaptada con el objetivo de utilizarla como herramienta innovadora para la identificación a nivel de especie de las levaduras y bacterias aisladas de variadas muestras (mostos, vinos, bebidas). El análisis de un gran número de clones permitió apreciar la diversidad de las especies de levaduras y bacterias acéticas y lácticas presentes desde de las fases pre-fermentativas, a lo largo de la fermentación, durante la crianza o después del acondicionamiento. En caso de alteración de los productos, esta herramienta innovadora participara en un mejor manejo de los riesgos microbiológicos.

## Contexto

La identificación de microorganismos a nivel de especie por espectrometría de masa de tipo MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight) es el método de referencia desde hace más de quince años en el sector biomédico<sup>1</sup>. Esta permite identificar los microorganismos de manera fiable y rápida para así orientar a los profesionales de la salud hacia los tratamientos terapéuticos apropiados. Su rapidez, fiabilidad, simplicidad y su bajo costo hacen de esta una alternativa a los métodos de identificación basados en la secuenciación del ADN<sup>2,3</sup>. Esta ya ha seducido otros sectores como por ejemplo el agroalimentario<sup>4,5</sup>. Trabajos recientes han recurrido a ella para identificar las levaduras presentes en productos y bebidas fermentadas como la cerveza o el vino<sup>6,7</sup>. No obstante, para una identificación fiable y robusta de las levaduras y de las bacterias de interés enológico, hace falta asociar el aparato - un espectrómetro de masa de tipo MALDI-TOF - a una base de datos de espectros proteicos específicos de las cepas de levaduras y bacterias del medioambiente enológico. Los trabajos resumidos en este artículo permiten proponer la espectrometría de masa como método de rutina para el análisis microbiológico de los mostos y de los vinos.

## Fundamentos del método de análisis

La identificación de los microorganismos se lleva a cabo en cinco etapas (figura 1): 1/ Es indispensable primero disponer de colonias de levaduras o de bacterias aisladas en un medio nutritivo con agar, a partir de muestras de mosto o de vino. 2/ Cada colonia o fracción de colonia a identificar es enseguida dispuesta sobre una placa adaptada que permite la identificación simultánea de más de 90 colonias en aproximadamente una hora. 3/ Después de un tratamiento rápido de todas las colonias a analizar, se deposita la placa en el espectrómetro de masa y se efectúa el análisis. Cada colonia es de esta manera analizada con un rayo láser que permite destruir las células, fraccionar sus proteínas en polipéptidos y ionizarlas para luego ser analizadas por el espectrómetro de masa. 4/ El conjunto de polipéptidos de cada colonia produce un espectro proteico específico de una especie de levadura o bacteria. 5/ Este espectro es finalmente comparado con aquellos referenciados en el banco de datos de espectros del fabricante (BDD). La colonia depositada sobre la placa es de esta manera identificada en menos de una hora a nivel de especie si la comparación es satisfactoria. Pero si esta colonia pertenece a una especie de levadura o bacteria

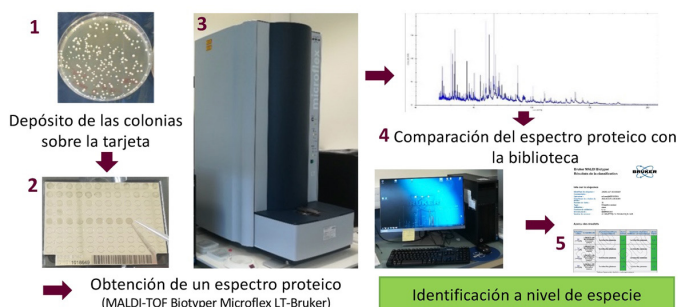


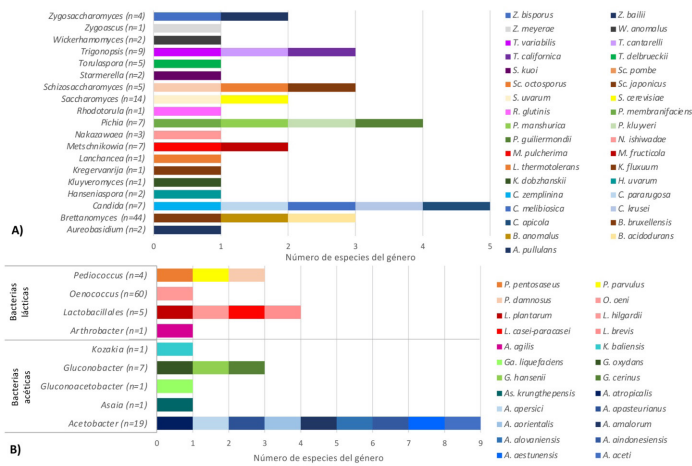
FIGURA 1. Etapas de la identificación de una especie de microorganismo por espectrometría de masa de tipo MALDI-TOF.

ausente de esta biblioteca o presente pero con cepas de referencia demasiado alejadas del medioambiente enológico, la especie no es identificada. La base de datos del fabricante utilizada en este estudio contiene más de 9000 espectros proteicos, referenciados a partir de cepas de levaduras y bacterias de origen rara vez enológico.

## Base de datos específica de los microorganismos enológicos

La base de datos de espectros de referencia del fabricante (BDD) resultó ser bastante eficaz para identificar ciertas especies de interés como las levaduras *Hanseniaspora uvarum* y *Kluyveromyces lactis* (presentes en fases pre-fermentativas) o la bacteria láctica capaz de realizar la fermentación maloláctica *Lactiplantibacillus plantarum* (llamada precedentemente *Lactobacillus plantarum*).

Estos trabajos, iniciados el 2015, resultaron ser menos satisfactorios para otras especies como *Saccharomyces cerevisiae*<sup>6</sup> o el mayor agente de la fermentación maloláctica *Oenococcus oeni*, identificados correctamente pero de manera demasiado aleatoria. Para la levadura de alteración *Brettanomyces bruxellensis*, la eficiencia de identificación fue estimada a solamente 46 % utilizando solo esta base de datos de espectros (BDD). Se observan resultados igualmente poco satisfactorios para las levaduras *Torulaspota delbrueckii* y *Metschnikowia* sp. (utilizadas en bioprotección del mosto) y *Zygosaccharomyces bailii* (causa de alteraciones), incluso peor identificadas. Finalmente, la identificación fue imposible para las especies enológicas que no están referenciadas en esta base de datos de espectros, como las levaduras *Starmarella bacillaris* y *Trigonopsis cantarelli* o las bacterias acéticas del género *Acetobacter*.



**FIGURA 2.** Número de especies de los 19 géneros de levadura (A) (118 muestras aisladas) y de los 9 géneros de bacteria (B) (99 muestras aisladas) agregadas a la base de datos enológica (el número de cepas de cada género se encuentra anotado entre paréntesis).

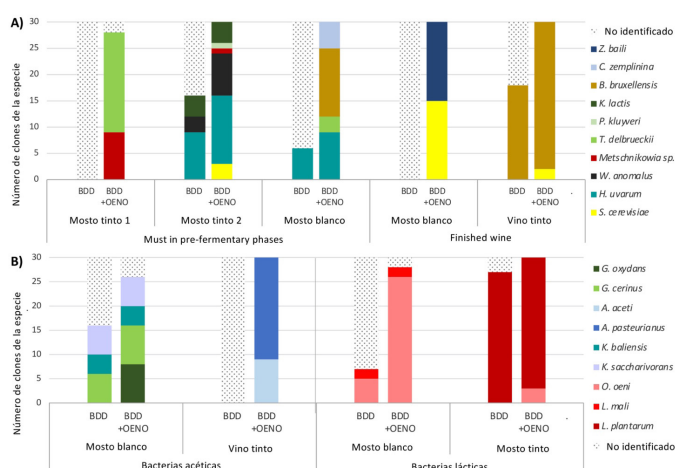
Para permitir una identificación fiable de las especies enológicas, se construyó una base de datos «OENO» que referencia los espectros proteicos de 217 muestras aisladas de levaduras y bacterias provenientes del Centro de Recursos Biológicos del ISW (CRB Oeno) y representativas de las principales especies del mosto y del vino. Esta se compone de los espectros proteicos de 118 muestras aisladas de levaduras, correspondientes a 35 especies diferentes (figura 2-A), entre las cuales una quincena estaba inicialmente ausente de la base de datos de espectros del fabricante. Gracias a los conocimientos actuales, las 44 cepas de *B. bruxellensis* referenciadas pertenecen a grupos genéticos más o menos resistentes al SO<sub>2</sub><sup>8</sup>.

Un centenar de muestras aisladas de bacterias, contando 17 especies de bacterias acéticas y 9 especies de bacterias lácticas (figura 2-B) se encuentran hoy referenciadas, de las cuales 7 estaban inicialmente ausentes, particularmente para el género de bacterias acéticas *Acetobacter*. Las 60 cepas de *Oenococcus oeni* referenciadas en la base de datos de espectros «OENO» son de diferentes grupos genéticos adaptados al mosto o a los diferentes tipos de vino<sup>9</sup>.

## Validación del método para el análisis de mostos y vinos

Para evaluar la eficacia del método, más de 10000 colonias de levaduras y bacterias provenientes de mostos<sup>10</sup> y vinos fueron analizadas utilizando la base de datos del aparato sola o completada con la nueva base de datos de espectros «OENO» durante diversos trabajos producto de las cosechas 2020 y 2021.

La figura 3 muestra que la base de datos «OENO» mejora considerablemente la identificación de todas las especies de levaduras y bacterias, sean cuales sean los productos de los cuales estas provienen.



**FIGURA 3.** Proporción de cada especie de levadura (A) y de bacteria (B) entre 30 clones analizados por MALDI-TOF/MS y muestras de mostos o de vinos utilizando la base de datos de espectros del fabricante (BDD) o incrementada con la biblioteca específica de microorganismos enológicos (BDD+OENO).

La adición de la biblioteca «OENO» permite identificar con éxito a más del 99 % de las muestras de levaduras contra solamente un tercio con la biblioteca del fabricante (BDD) sola (figura 3-A). Un poco menos de la mitad de las bacterias enológicas son identificadas con la biblioteca BDD sola, mientras que con la adición de la base de datos de espectros «OENO», el 91 % de las muestras bacterianas son exitosamente identificables.

Esta nueva base de datos es indispensable para el análisis de la biodiversidad microbiana de los mostos, así como para identificar rápidamente los agentes de alteración de los vinos tales como *B. bruxellensis*.

## Conclusión

La construcción de una nueva base de datos «OENO» permitió adoptar la espectrometría de masa MALDI-TOF como análisis de rutina para identificar con fiabilidad, en una hora en el ISW, a las levaduras y bacterias enológicas previamente aisladas en un medio nutritivo de agar. Este método puede ser empleado para el análisis microbiológico de los mostos y de los vinos, así como para estudios de biodiversidad, sobre todo en un contexto de reducción de las dosis de SO<sub>2</sub>. ■

**Agradecimientos:** los autores agradecen al Consejo Interprofesional del Vino de Burdeos (CIVB) y al Consejo Regional de la Región Nueva Aquitania por su apoyo financiero, así como al Centro de Recursos Biológicos Enológicos del ISW (CRBO), por haber proveído las cepas de levaduras y bacterias utilizadas.

**1** 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>

**2** 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>

**3** 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)

**4** 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>

**5** 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>

**6** 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

**7** 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>

**8** Avramova M., Vallet-Courbin A., Maupeu J., Masneuf-Pomarède I. and Albertin W. (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>

**9** 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>

**10** 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>