



# Identificazione di lieviti e batteri enologici mediante spettrometria di massa di 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

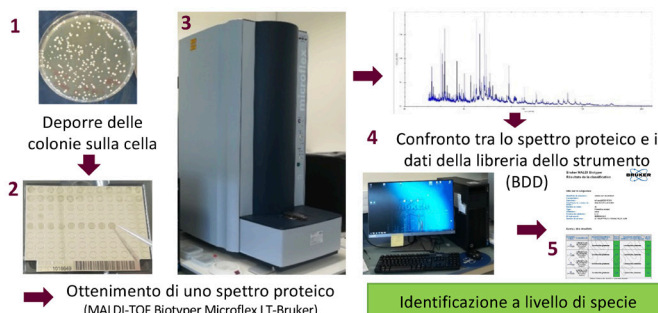
La spettrometria di massa di tipo MALDI-TOF è stata adattata per essere utilizzata come strumento innovativo per l'identificazione di specie di lieviti e batteri isolati da vari campioni (mosti, vini e bevande). L'analisi di un gran numero di cloni permette di valutare la diversità delle specie di lieviti, batteri acetici e lattici presenti nelle fasi prefermentative, durante la fermentazione, durante l'affinamento o dopo il condizionamento. In caso di alterazione dei prodotti, questo strumento innovativo permetterà una migliore gestione dei rischi microbiologici.

## Contesto

L'identificazione di microrganismi a livello di specie mediante spettrometria di massa di tipo MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight) è il metodo di riferimento da più di quindici anni nel settore biomedico<sup>1</sup>. Permette di identificare i microrganismi in modo affidabile e rapido e quindi di indirizzare i professionisti sanitari verso i trattamenti terapeutici appropriati. La sua rapidità, affidabilità, semplicità e basso costo lo rendono un'alternativa ai metodi di identificazione basati sul sequenziamento del DNA<sup>2, 3</sup>. Ha già conquistato altri settori come quello agroalimentare<sup>4, 5</sup>. Alcuni recenti lavori ne hanno fatto uso per identificare i lieviti presenti in prodotti e bevande fermentate come la birra o il vino<sup>6, 7</sup>. Tuttavia, per un'identificazione affidabile e robusta di lieviti e batteri di interesse enologico, è necessario associare il dispositivo - uno spettrometro di massa di tipo MALDI-TOF - a un database di spettri proteici specifici per i diversi ceppi di lieviti e batteri presenti in ambiente enologico. I lavori presentati in questo articolo permettono di proporre la spettrometria di massa come metodo di routine per l'analisi microbiologica dei mosti e dei vini.

## Principio del metodo di analisi

L'identificazione dei microrganismi avviene in cinque fasi (figura 1):  
1/ In primo luogo è indispensabile disporre di colonie di lieviti o di batteri isolati su un terreno nutritivo agarizzato, a partire da campioni di mosto o di vino.  
2/ Ogni colonia o frazione di colonia da identificare viene quindi deposta su uno spot di un "target plate" che consente l'identificazione simultanea di più di 90 isolati in circa un'ora.  
3/ Dopo un trattamento rapido di tutte le colonie da analizzare, il "target plate" è depositato nello spettrometro di massa e sottoposto ad analisi. Ogni colonia viene quindi analizzata con un raggio laser che permette di distruggere le cellule, frazionare le loro proteine in polipeptidi e ionizzarle al fine di essere analizzate dallo spettrometro di massa.  
4/ L'insieme dei polipeptidi di ogni colonia produce uno spettro proteico, specifico per una specie di lievito o di batterio.  
5/ Questo spettro è infine confrontato con quelli raccolti nella banca dati dello strumento (BDD). Se il confronto è soddisfacente, la colonia depositata sulla cella viene così identificata in meno di un'ora a livello di specie. Ma se questa colonia appartiene a una specie di lievito o di batteri assente da questa biblioteca o presente ma con ceppi di riferimento troppo lontani da quelli ritrovati in ambiente enologico, la specie non viene identificata. La banca dati dello strumento utilizzata



**FIGURA 1.** Fasi di identificazione di una specie di microrganismi mediante spettrometria di massa di tipo MALDI-TOF.

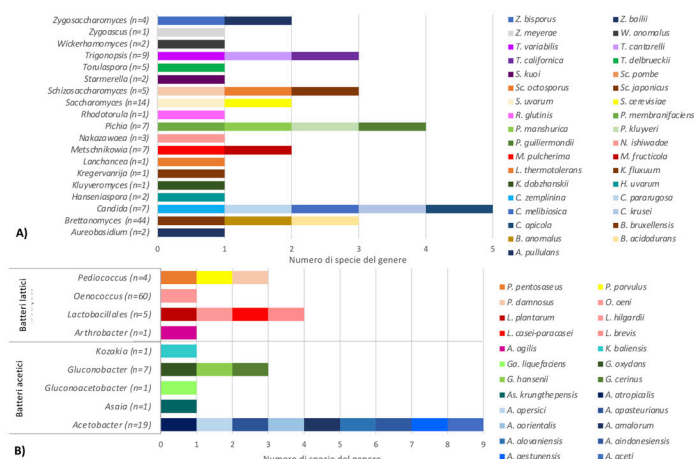
in questo studio contiene più di 9000 spettri proteici, raccolti a partire da ceppi di lieviti e batteri raramente di origine enologica.

## Banca dati specifica per microrganismi enologici

La banca dati degli spettri di riferimento dello strumento (BDD) si è rivelata abbastanza efficace per identificare alcune specie d'interesse, come i lieviti *Hanseniaspora uvarum* e *Kluyveromyces lactis* (presenti in fase pre-fermentativa) o il batterio lattico che può realizzare la fermentazione malolattica *Lactiplantibacillus plantarum* (precedentemente denominato *Lactobacillus plantarum*).

Questi lavori, iniziati nel 2015, si sono rivelati meno soddisfacenti per altre specie, *Saccharomyces cerevisiae*<sup>6</sup> o il principale agente della fermentazione malolattica *Oenococcus oeni*, raramente correttamente identificati in maniera troppo aleatoria. Per il lievito d'alterazione *Brettanomyces bruxellensis*, l'efficacia d'identificazione è stata stimata solo al 46 % con questa banca dati di spettri (BDD). Risultati altrettanto insoddisfacenti si osservano per i lieviti *Torulaspora delbrueckii* e *Metschnikowia sp.* (utilizzati nella bioprotezione del mosto) e *Zygosaccharomyces bailii* (causa di alterazioni), identificate ancora meno bene. Infine, l'identificazione è impossibile per le specie enologiche che non sono citate in questo database di spettri, come i lieviti *Starmerella bacillaris* e *Trigonopsis Cantarelli* o i batteri acetici del genere *Acetobacter*.

Per consentire un'identificazione accurata delle specie enologiche, è stata costruita una banca dati «OENO» che fa riferimento agli spettri proteici di 217 isolati di lieviti e batteri provenienti

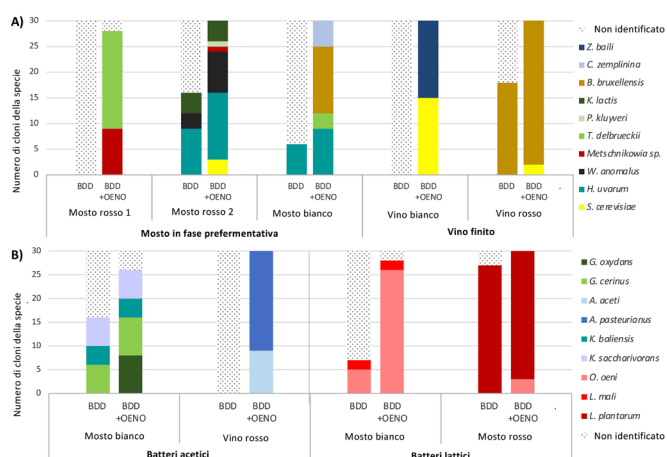


**FIGURA 2.** Numero di specie dei 19 generi di lieviti (A) (118 isolati) e dei 9 generi di batteri (B) (99 isolati) aggiunti alla banca dati enologica (il numero di ceppi di ciascun genere è indicato tra parentesi).

dal Centro delle Risorse Biologiche dell'ISVV (CRB Oeno) e rappresentativa delle principali specie del mosto e del vino. La banca dati è composta dagli spettri proteici di 118 isolati di lieviti, corrispondenti a 35 specie diverse (figura 2-A), di cui una quindicina inizialmente assenti dalla banca dati di spettri dello strumento. Grazie alle conoscenze attuali, sappiamo che i 44 ceppi di *B. bruxellensis* registrati appartengono a gruppi genetici più o meno resistenti all' $SO_2$ . Un centinaio di isolati batterici, di cui 17 specie di batteri acetici e 9 specie di batteri lattici (figura 2-B) sono oggi registrati, di cui 7 erano inizialmente assenti, in particolare per il genere di batteri acetici *Acetobacter*. I 60 ceppi di *Oenococcus oeni* raccolti nella banca dati di spettri «OENO» appartengono a diversi gruppi genetici adattati al mosto o a diverse tipologie di vino?

## Validazione del metodo per l'analisi dei mosti e dei vini

Per verificare l'efficacia del metodo, durante diversi lavori tra il 2020 e 2021, sono state analizzate più di 10 000 colonie di lieviti e batteri provenienti da mosti<sup>10</sup> e vini utilizzando la banca dati iniziale dello strumento o completata dalla nuova banca dati di spettri «OENO». La figura 3 mostra che la banca dati «OENO» migliora notevolmente l'identificazione di tutte le specie di lieviti e batteri, indipendentemente dai prodotti da cui provengono. L'aggiunta della libreria «OENO» permette di identificare con successo più del 99 % degli isolati di lieviti contro solo un terzo con la sola banca dati iniziale dello strumento (BDD) (Figura 3-A). Poco meno della metà dei batteri enologici vengono identificati con la sola libreria BDD, mentre con l'aggiunta del database di spettri «OENO», il 91 % degli isolati batterici sono identificabili con successo.



**FIGURA 3.** Proporzioni di ogni specie di lieviti (A) e di batteri (B) tra 30 cloni analizzati tramite MALDI-TOF/MS e isolati da mosti o vini utilizzando la banca dati degli spettri dello strumento (BDD) o incrementata con la libreria specifica dei microrganismi enologici (BDD+OENO).

Questa nuova banca dati è indispensabile per l'analisi della biodiversità microbica dei mosti ma anche per identificare rapidamente gli agenti di alterazione dei vini come *B. bruxellensis*.

## Conclusione

La costruzione di una nuova banca dati «OENO» ha permesso all'ISVV di adottare la spettrometria di massa MALDI-TOF come analisi di routine per identificare con accuratezza in un'ora lieviti e batteri enologici precedentemente isolati su terreno nutritivo agarizzato. Questo metodo può essere utilizzato per l'analisi microbiologica dei mosti e dei vini, nonché per studi di biodiversità, in particolare in un contesto di riduzione delle dosi di  $SO_2$ .

**Ringraziamenti:** gli autori ringraziano il Consiglio Interprofessionale del Vino di Bordeaux (CIVB) e il Consiglio Regionale della Regione Nuova Aquitania per il loro sostegno finanziario, nonché il centro di Risorse Biologiche Enologiche dell'ISVV (CRBO), per la fornitura dei ceppi di lieviti e batteri utilizzati.

- 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>