



Identificação de leveduras e bactérias enológicas por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF

Amélie Vallet-Courbin¹, Marine Lucas¹, Lucie Dutilh¹, Cécile Miot-Sertier², Sara Windholtz², Patrick Lucas², Isabelle Masneuf-Pomaredé², Julie Maupeu¹

¹ Microflora-ADERA, Univ. Bordeaux, INRAE, Bordeaux INP, Bordeaux Sciences Agro, UMR 1366 OENOLOGIE, ISVV, F33882 Villenave d'Ornon, France

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

A espectrometria de massa segundo a técnica MALDI-TOF foi adaptada para ser utilizada como uma ferramenta inovadora de identificação das espécies de leveduras e bactérias isoladas de amostras variadas (mostos, vinhos, bebidas). A análise de um grande número de clones permite apreciar a diversidade das espécies de leveduras, bactérias acéticas e lácticas presentes nas fases pré-fermentativas, durante as fermentações, durante o envelhecimento ou após o acondicionamento. Caso os produtos sejam alterados, este instrumento inovador contribuirá para um melhor controlo dos riscos microbiológicos.

Contexto

A identificação de espécies de microrganismos por espectrometria de massa segundo a técnica MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight) é o método de referência desde há mais de 15 anos no sector biomédico¹. Permite identificar os microrganismos de forma fiável e rápida, orientando assim os profissionais de saúde para os tratamentos terapêuticos adequados. A sua rapidez, fiabilidade, simplicidade e baixo custo tornam-na uma alternativa aos métodos de identificação baseados na sequenciação do ADN^{2,3}. Esta técnica já cativou outros sectores, como o do sector agroalimentar^{4,5}. Trabalhos recentes recorreram a este método para identificar as leveduras presentes em produtos e bebidas fermentados como a cerveja ou o vinho^{6,7}. No entanto, para uma identificação fiável e robusta das leveduras e das bactérias de interesse enológico, é necessário associar o aparelho - um espectrómetro de massa do tipo MALDI-TOF - uma base de dados de espectros proteicos específicos de estirpes de leveduras e bactérias do ambiente enológico. Os trabalhos resumidos neste artigo permitem propor a espectrometria de massa como método de rotina para a análise microbiológica dos mostos e dos vinhos.

Princípio do método de análise

A identificação dos microrganismos decorre em cinco etapas (figura 1): 1/ É, antes de mais, indispensável colocar colónias de leveduras ou de bactérias isoladas num meio nutritivo de agar, a partir de amostras de mosto ou de vinho. 2/ Cada colónia ou fração de colónia a ser identificada é então depositada num alvo adequado que permite a identificação simultânea de mais de 90 microrganismos isolados em cerca de uma hora. 3/ Após um tratamento rápido de todas as colónias a analisar, o alvo é depositado no espectrómetro de massa e analisado. Cada colónia é assim analisada com um raio laser que permite destruir as células, fracionar as suas proteínas em polipéptidos e ionizá-las com a finalidade de serem analisadas pelo espectrómetro de massa. 4/ O conjunto dos polipéptidos de cada colónia produz um espectro proteico, específico de um tipo de levedura ou de bactéria. 5/ Este espectro é finalmente comparado com os referenciados no banco de dados de espectros do fabricante (BDD). A colónia depositada no alvo é assim identificada em menos de uma hora numa espécie, se a comparação for satisfatória. Mas se esta colónia pertence a uma espécie de levedura ou bactérias ausentes desta biblioteca

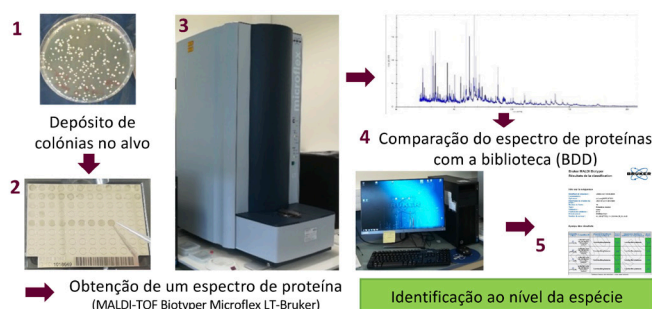


FIGURA 1. Etapas de identificação de uma espécie de microrganismos por espectrometria de massa segundo a técnica MALDI-TOF.

ou presente, mas com estirpes demasiado afastadas do ambiente enológico, a espécie não é identificada. A base de dados do fabricante utilizada neste estudo contém mais de 9000 espectros proteicos, referenciados a partir de estirpes de leveduras e bactérias raramente de origem enológica.

Base de dados específica dos microrganismos enológicos

A base de dados dos espectros de referência do fabricante (BDD) revelou-se suficientemente eficaz para identificar certas espécies de interesse, como as leveduras *Hanseniaspora uvarum* e *Kluyveromyces lactis* (presentes em fases pré-fermentativas) ou a bactéria láctea capaz de produzir a fermentação malolática *Lactiplantibacillus plantarum* (anteriormente designada *Lactobacillus plantarum*). Estes trabalhos, iniciados em 2015, revelaram-se menos satisfatórios para outras espécies, *Saccharomyces cerevisiae*⁶, ou para principal agente da fermentação malolática *Oenococcus oeni*, identificados corretamente de forma demasiado aleatória. Para a levedura de alteração *Brettanomyces bruxellensis*, a eficácia de identificação foi estimada em apenas 46 % com esta base de dados de espectros (BDD). Observam-se resultados igualmente insatisfatórios no caso das leveduras *Torulaspota delbrueckii* e *Metschnikowia sp.* (utilizadas no controlo biológico do mosto), e *Zygosaccharomyces bailii* (que causam alterações), ainda identificadas em baixa escala. Por último, a identificação é impossível para as espécies enológicas que não são referenciadas nesta base de dados de espectros, como as leveduras *Starmarella bacillaris* e *Trigonopsis cantarelli* ou bactérias acéticas do género da *Acetobacter*.

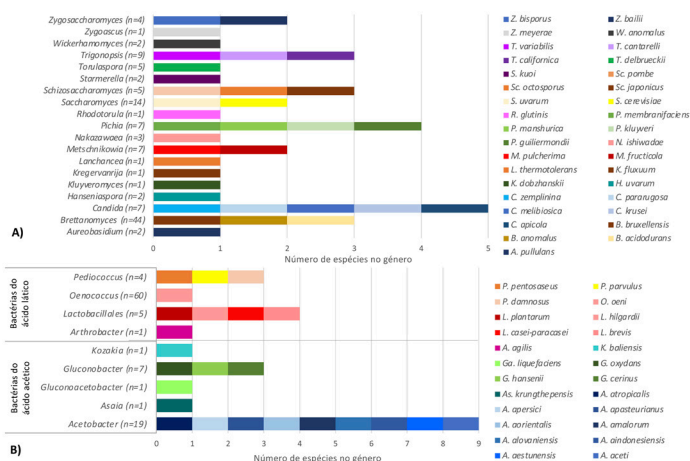


FIGURA 2. Número de espécies dos 19 gêneros de leveduras (A) (118 isolados) e dos 9 gêneros de bactérias (B) (99 isolados) adicionados à base de dados enológicas (o número de estirpes de cada gênero é registrado entre parênteses).

Para permitir uma identificação fiável das espécies enológicas, foi construída uma base de dados «OENO», que referencia os espectros proteicos de 217 isolados de leveduras e bactérias provenientes do Centro de Recursos Biológicos do ISW (CRB OENO), e representativas das principais espécies do mosto e do vinho. Compõe-se dos espectros proteicos de 118 isolados de leveduras, correspondentes a 35 espécies diferentes (figura 2-A), dos quais uma quinzena inicialmente ausente da base de dados de espectros do fabricante. Graças aos conhecimentos atuais, as 44 estirpes de *B. bruxellensis* referenciadas pertencem a grupos genéticos mais ou menos resistentes ao SO₂⁸.

Uma centena de isolados de bactérias, incluindo 17 espécies de bactérias acéticas e 9 espécies de bactérias lácticas (Figura 2-B), estão atualmente referenciados, dos quais 7 estavam inicialmente ausentes, e de forma particular para o tipo de bactérias acéticas *Acetobacter*. As 60 estirpes de *Oenococcus oeni* referenciadas na base de dados de espectros «OENO» são de diferentes grupos genéticos adaptados ao mosto ou aos diferentes tipos de vinhos⁹.

Validação do método para a análise dos mostos e dos vinhos

Para testar a eficácia do método, foram analisadas mais de 10 000 colónias de leveduras e bactérias provenientes de mostos¹⁰ e de vinhos, utilizando a base de dados do aparelho isoladamente ou como complemento da base de dados do espectro «OENO» ao longo de trabalhos diferentes, durante os anos 2020 e 2021.

A figura 3 mostra que a base de dados «OENO» melhora consideravelmente a identificação de todas as espécies de leveduras e bactérias, independentemente dos produtos de que provêm. A adição da biblioteca «OENO» permite identificar com sucesso mais de 99 % de isolados de leveduras, contrariamente à biblioteca

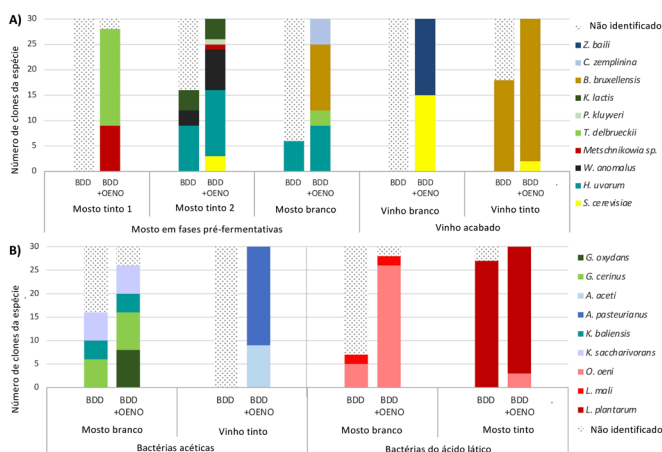


FIGURA 3. Proporção de cada espécie de leveduras (A) e bactérias (B) a partir de 30 clones analisados pela MALDI-TOF/MS e isolados de mostos ou vinhos, utilizando a base de dados de espectros do fabricante (BDD) ou incrementada da biblioteca específica dos microrganismos enológicos (BDD+OENO).

do fabricante (BDD) utilizada de forma isolada, apenas um terço (Figura 3-A). Pouco menos de metade das bactérias enológicas são identificadas com a biblioteca BDD sozinha, enquanto que com a adição da base de dados de espectros «OENO», 91 % dos isolados bacterianos são identificáveis com êxito.

Esta nova base de dados é indispensável para a análise da biodiversidade microbiana dos mostos, mas também para identificar rapidamente os agentes de alteração dos vinhos como o *B. bruxellensis*.

Conclusão

A construção de uma nova base de dados «OENO» permitiu adotar a espectrometria de massa MALDI-TOF como análise de rotina para identificar com fiabilidade as leveduras e bactérias enológicas, previamente isoladas em meio nutritivo de ágar, numa hora, no ISVV. Este método pode ser utilizado para a análise microbiológica dos mostos e dos vinhos, bem como para estudos de biodiversidade, nomeadamente num contexto de redução de doses de SO₂. ■

Agradecimentos: os autores agradecem ao Conselho Interprofissional do Vinho de Bordeaux (CIVB) e ao Conselho Regional da Região da Nova Aquitânia o seu apoio financeiro, bem como ao Centro de Recursos Biológicos Enológicos do ISVV (CRBO), pelo o fornecimento das estirpes de leveduras e bactérias utilizadas.

- 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.* (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>