

Aitor Balmaseda Rubina

**Effects of *Torulaspora delbrueckii*
and *Metschnikowia pulcherrima* on
Oenococcus oeni and malolactic
fermentation**

Doctoral Thesis

Supervised by Prof. Cristina Reguant Miranda and
Prof. Albert Bordons de Porrata-Doria

Department of Biochemistry and Biotechnology
Universitat Rovira i Virgili



UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI

Tarragona, 2021

Summary

Oenococcus oeni is the main agent responsible of wine malolactic fermentation (MLF). This lactic acid bacterium overcomes difficult and harsh wine conditions in order to finish MLF, which usually takes place after alcoholic fermentation, traditionally undergone inoculating *Saccharomyces cerevisiae*. In this sense, the current interest in non-*Saccharomyces* yeasts open a new scenario where the interactions between them and *O. oeni* are still unknown. The aim of this thesis was to evaluate the effects of non-*Saccharomyces*, particularly *Torulaspora delbrueckii* and *Metschnikowia pulcherrima*, on *O. oeni* and MLF.

Firstly, these effects were studied under real winemaking conditions, where the use of non-*Saccharomyces* reduced the MLF duration and modulated the wine organoleptic attributes. From those, polyphenolic composition was enhanced by the use of *T. delbrueckii*. Then, the performance of MLF was evaluated under lees of different yeast species, resulting an improvement in those wines with *T. delbrueckii* lees. From this, the use of mannoproteins was related with a useful metabolism of *O. oeni* to face wine conditions. The genes related with this metabolism responded to these conditions and consumption of mannoproteins was increased in wines with the highest mannoprotein content. Also, a combined omic approach was used to identify those molecular changes activated in *O. oeni* by non-*Saccharomyces*. These changes were mainly related with amino acid and carbohydrate metabolisms. Moreover, a complex metabolism of amino acids affected by non-*Saccharomyces* was observed, in which peptides are the key nitrogen compound in *O. oeni*.

The results of this thesis contribute to better understand the general impacts of non-*Saccharomyces* in *O. oeni* and how the bacterium respond to those changes at molecular level. In addition, this thesis points the main key elements and metabolisms to consider in the selection of suitable yeast- *O. oeni* strain tandem for winemaking.

Resumen

Oenococcus oeni es el principal microorganismo responsable de la fermentación maloláctica (FML) del vino. Esta bacteria láctica se impone a las difíciles condiciones enológicas para terminar la FML, que normalmente ocurre tras la fermentación alcohólica, tradicionalmente llevada a cabo inoculando *Saccharomyces cerevisiae*. El actual interés en las levaduras no-*Saccharomyces* abre un nuevo horizonte donde las interacciones entre ellas y *O. oeni* son todavía desconocidas. El objetivo de esta tesis fue la evaluación de los efectos de las no-*Saccharomyces*, particularmente *Torulaspora delbrueckii* y *Metschnikowia pulcherrima*, en *O. oeni* y la FML.

En primer lugar, se vio que en condiciones de bodega el uso de no-*Saccharomyces* redujo la duración de la FML y moduló los atributos organolépticos de los vinos. Entre ellos, la composición polifenólica fue potenciada por el uso de *T. delbrueckii*. Después se evaluó el comportamiento de la FML en contacto con lías de diferentes especies, obteniéndose un rendimiento superior con lías de *T. delbrueckii*. Con ello, se confirmó la utilidad de las manoproteínas en la adaptación de *O. oeni* al vino. Los genes relacionados con el metabolismo de manoproteínas se sobreexpresaron en condiciones enológicas y su consumo fue mayor en aquellos vinos con las concentraciones más altas. También se utilizó un enfoque ómico combinado para identificar los mecanismos moleculares activados en *O. oeni* por las no-*Saccharomyces*. Los principales cambios observados fueron los relacionados con el metabolismo de aminoácidos y carbohidratos. También se observó un complejo metabolismo aminoacídico, donde los péptidos jugaron un papel fundamental, afectado por las no-*Saccharomyces*.

Los resultados de esta tesis contribuyen a comprender mejor el impacto global de las no-*Saccharomyces* en *O. oeni* y cómo la bacteria responde a ellos a nivel molecular. Además, esta tesis señala los elementos y metabolismos claves a considerar en la selección de combinaciones levadura – *O. oeni* adecuadas para vinificación.

Resum

Oenococcus oeni és el principal microorganisme responsable de la fermentació malolàctica (FML) del vi. Aquest bacteri làctic s'imposa a les difícils condicions enològiques per acabar la FML, que normalment succeeix després de la fermentació alcohòlica, tradicionalment portada a terme inoculant *Saccharomyces cerevisiae*. L'interès actual en els llevats no-*Saccharomyces* obre un nou horitzó on les interaccions entre aquests i *O. oeni* són encara desconegudes. L'objectiu d'aquesta tesi va ser l'avaluació dels efectes dels no-*Saccharomyces*, concretament *Torulaspora delbrueckii* i *Metschnikowia pulcherrima*, en *O. oeni* i la FML.

En primer lloc es va comprovar que en condicions de celler l'ús de no-*Saccharomyces* va reduir la durada de la FML i va modular els atributs organolèptics dels vins. D'aquests atributs, la composició polifenòlica va ser potenciada per l'ús de *T. delbrueckii*. Després es va avaluar el comportament de la FML en contacte amb lies de diferents espècies, i es va obtenir un rendiment superior en vins amb lies de *T. delbrueckii*. Amb això es va confirmar la utilitat de les manoproteïnes en l'adaptació d'*O. oeni* al vi. Els gens relacionats amb aquest metabolisme es van sobreexpressar en condicions enològiques i el consum de manoproteïnes va augmentar en aquells vins amb concentracions més altes. També es va utilitzar un enfocament òmic combinat per identificar els mecanismes moleculars activats en *O. oeni* pels no-*Saccharomyces*. Aquests canvis es relacionaven sobretot amb el metabolisme d'aminoàcids i carbohidrats. També es va observar un complex metabolisme aminoacídic, on els pèptids van jugar un paper fonamental, afectat per les no-*Saccharomyces*.

Els resultats d'aquesta tesi contribueixen a comprendre millor l'impacte global de les no-*Saccharomyces* en *O. oeni* i com el bacteri respon a ells a nivell molecular. A més, aquesta tesi assenyala els elements i metabolismes claus a considerar en la selecció de combinacions llevat - *O. oeni* adequades per la vinificació.