

Judith Franquès Montserrat

**Characterization of *Oenococcus*  
*oeni* and other lactic acid bacteria from  
the vine-wine ecosystem in Priorat**

Doctoral Thesis

Supervised by Dr. Isabel Araque, Dr. Albert Bordons and  
Dr. Cristina Reguant

Department of Biochemistry and Biotechnology - Universitat Rovira i Virgili



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tarragona, 2018

This doctoral research was carried out between 2012-2018 and directed by the Lactic Acid Bacteria group of the Oenological Biotechnology research group (Department of Biochemistry and Biotechnology, Faculty of Oenology) at the Universitat Rovira i Virgili (URV). The doctoral thesis was supervised by Dr. Isabel Araque, Dr. Albert Bordons and Dr. Cristina Reguant. The research was financially supported by the European project FP7-SME-2012-Grant 315065 with the pre-doctoral grant 2012BPURV-28 from the Universitat Rovira i Virgili, and a mobility grant 2013CTP00024 from Generalitat de Catalunya. An international phase was completed at the Institute des Sciences de la Vigne et du Vin (Bordeaux, France) under the supervision of Dr. Patrick Lucas.

The editing of the thesis book was supported by the Postgraduate and Doctoral School of the URV.

# SUMMARY

---

*Oenococcus oeni*, the lactic acid bacterium (LAB) mainly responsible for malolactic fermentation (MLF), has been repeatedly isolated from wines, but hardly ever from grapes. In this work, the LAB biodiversity of the vine-wine ecosystem was established, and a large survey of autochthonous LAB from the Catalan wine region of Priorat was achieved, too. A total of 1,904 LAB isolates, from Grenache and Carignan grape berries and from wines of different cellars, were identified and typed. Around 70% of isolates were *O. oeni*, mostly from wines, but remarkably, 53 of them were isolated from grapes. Other non-*Oenococcus* species were also identified and typed, being *Lactobacillus plantarum* the predominant one in grapes. The presence of *Oenococcus* and *Lactobacillus* in grapes was also confirmed by high-throughput sequencing.

The possibility of using some of these autochthonous strains was studied. From them, 45 *O. oeni* strains were selected and characterized in base of their degradation of L-malic acid, the resistance to low pH and high ethanol, and the absence of biogenic amine genes. The three strains with the most desirable characteristics were inoculated in real wines and its MLF was carried out successfully. The characteristics of the obtained wines suggested the possible use of one of the strains as good candidate for starter culture. Thereby, autochthonous strains have the potential to be used, after being selected, as inoculum of real wines, they are well adapted to the conditions of this specific area and can keep the terroir characteristics.

# RÉSUMÉ

---

*Oenococcus oeni*, l'espèce de bactéries de l'acide lactique (BAL) principalement responsable de la fermentation malolactique (FML), a été isolée à plusieurs reprises sur les vins, mais rarement sur les raisins. Dans ce travail, la biodiversité de BAL de l'écosystème vignoble-vin a été établie, et une vaste enquête sur BAL autochtone de la région viticole catalane du Priorat a été réalisée aussi. Au total, 1.904 isolats de BAL, issus de grenache et de carignan et de vins de différentes caves, ont été identifiés et typés. Environ 70% des isolats étaient des *O. oeni*, principalement des vins, mais remarquablement, 53 d'entre eux ont été isolés des raisins. D'autres espèces non-*Oenococcus* ont également été identifiées et typées, *Lactobacillus plantarum* étant prédominant dans les raisins. La présence d'*Oenococcus* et de *Lactobacillus* dans les raisins a également été confirmée par séquençage massif.

La possibilité d'utiliser certaines de ces souches autochtones a été étudiée. A partir d'eux, 45 souches d'*O. oeni* ont été sélectionnées et caractérisées en fonction de leur dégradation de l'acide L-malique, de la résistance à un pH bas et d'un éthanol élevé, et de l'absence de gènes d'amines biogènes. Les trois souches présentant les caractéristiques les plus souhaitables ont été inoculées dans de vrais vins et la FML a été réalisée avec succès. Les caractéristiques des vins obtenus suggèrent l'utilisation possible de l'une des souches comme un bon candidat pour la culture starter. Ainsi, les souches autochtones ont le potentiel d'être utilisées, après avoir été sélectionnées, comme inoculum de vrais vins, donc elles sont bien adaptées aux conditions de cette zone spécifique et peuvent garder les caractéristiques du terroir.

# RESUM

---

*Oenococcus oeni*, l'espècie de bacteris làctics (BL) que són els principals responsables de la fermentació malolàctica (FML), s'han aïllat repetidament dels vins, però quasi mai des del raïm. En aquesta tesi, la biodiversitat de BL de l'ecosistema vinya-vi va ser establerta i també es va realitzar un ampli estudi sobre els BL autòctons de la regió vitivinícola catalana del Priorat. Es van identificar i tipificar un total de 1.904 aïllats de BL, de raïm de garnatxa i de raïm de carinyena, així com de vins de diferents cellers. Al voltant del 70% dels aïllats van ser *O. oeni*, principalment de vi, però sorprenentment, 53 d'ells es van aïllar de raïm. Es van identificar i tipificar també altres espècies no *Oenococcus*, essent *Lactobacillus plantarum* la predominant en raïm. La presència d'*Oenococcus* i *Lactobacillus* en raïm també es va confirmar per seqüenciació massiva.

Es va estudiar la possibilitat d'utilitzar algunes d'aquestes soques autòctones. D'aquestes, es van seleccionar i caracteritzar 45 soques d'*O. oeni* en base a la degradació de l'àcid L-màlic, la resistència al pH baix i a les altes concentracions d'etanol, i l'absència de gens d'amines biògenes. Les tres soques amb les característiques més desitjables es van inocular en vins reals, dels quals la FML es va dur a terme amb èxit. Les característiques dels vins obtinguts van suggerir el possible ús d'una de les soques com a bona candidata per a un potencial cultiu iniciador. Per tant, les soques autòctones podrien ser utilitzades, després de ser seleccionades, com inòcul de vins reals, ja que estan ben adaptades a les condicions d'aquesta àrea específica i poden mantenir les característiques del terroir.