

UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE FRANCHE-COMTÉ

Ecole Doctorale n° 554 - Environnements-Santé

THÈSE

AgroSup Dijon

en vue de l'obtention du grade de **Docteur de l'Université de Bourgogne Franche-Comté**

Spécialité : Sciences de l'Alimentation

Option : Biotechnologie, Microbiologie, Biochimie et Génie des procédés

par

Antonio de Anchieta CÂMARA JÚNIOR

Conservation et préservation fonctionnelle de levures d'intérêt en agro-alimentaire

Thèse présentée et soutenue à Dijon le 20 décembre de 2018 devant le jury composé de :

Catherine BÉAL	Pr, AgroParisTech, INRA	Rapporteur
Patricia TAILLANDIER	Pr, Université de Toulouse	Rapporteur
Jean-Bernard SOUCI	Dr, Lesaffre Puricenter	Examineur
Thierry FERREIRA	Dr, Université de Poitiers	Examineur
Florence HUSSON	MC-HC, AgroSup Dijon	Directrice de thèse
Raphaëlle TOURDOT-MARÉCHAL	MC-HC, Université de Bourgogne	Co-encadrante de thèse
Pierre-André MARÉCHAL	Pr, AgroSup Dijon	Président du jury

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier le directeur de l'UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques, le Pr. Laurent BENEY, de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et de son équipe de recherche.

Je suis particulièrement reconnaissant à ma directrice de thèse, Dr. Florence HUSSON, pour toutes ses qualités scientifiques et pédagogiques qui m'ont permis d'apprendre continuellement, mais également pour l'attention et l'intérêt continus qu'elle a porté au développement de mon travail. Je la remercie aussi pour sa gentillesse et sa sympathie qu'elle m'a témoignées à plusieurs occasions.

Je tiens également à remercier également le Dr. Raphaëlle TOURDOT-MARÉCHAL, pour avoir co-encadré ma thèse. Je suis très reconnaissant pour l'intérêt et le temps qu'elle m'a accordés. Ses précieux conseils m'ont aidé à évoluer en permanence au tant sur le plan professionnel que sur le plan humain. Je suis aussi très reconnaissant au Pr. Pierre-André MARÉCHAL pour toutes ses suggestions et son soutien constant pendant le co-encadrement de mon travail de thèse.

Merci également au Pr. Catherine BÉAL et au Pr. Patricia TAILLANDIER d'avoir accepté d'être rapporteurs de mon travail de thèse. Je voudrais également remercier les Dr. Thierry FERREIRA et Dr. Jean-Bernard SOUCI d'avoir accepté d'examiner l'ensemble de mes travaux. Je remercie sincèrement tous les membres de mon jury de thèse pour l'intérêt qu'ils ont manifesté à mon travail et pour leurs conseils enrichissants.

Je voudrais également remercier les membres de mon comité de thèse, Pr. Yves Waché et Pr. Selim KERMASHA. Leurs précieuses recommandations ont permis le bon déroulement et la finalisation de ce travail.

Je voudrais également remercier le « Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico » (CNPq) du Brésil, pour le financement de ce projet de thèse.

Je remercie également tout le personnel de notre ancien « 1^{er} étage » : Caroline, Hélène S., Cécile, Sébastien, Sylvie, Pascale, Alexandre et surtout à Florence BOFFY, pour son soutien administratif exemplaire et sa bonne humeur constante. Je remercie aussi à mes collègues doctorantes : Aurore B., Adeline, Chloé et Audrey R., d'avoir partagé toutes ces années de folie. Je pense aussi à tous ceux que j'ai croisés dans l'équipe Valmis : Clément, Arnaud, Frédérique et Scott et avec lesquels j'ai passé des bons moments.

À mes chers membres du « 2^{ème} étage » : Christine, Yves, Hélène L., Rémy et Jeff, je vous remercie pour tous les moments scientifiques partagés au fil de ces années que ce soit à la pause-café, aux réunions ou aux restaurants.

Je remercie aussi les stagiaires qui ont contribué à l'avancement de ma thèse : Audrey J., Camille, Raphaël, Corentin, Coline, Malick et Rémi. Le partage de la science avec vous m'a permis d'apprendre de plus en plus chaque jour. Je tiens aussi à remercier mes chers amis docteurs et doctorants : Da, Aurore P., Mai, Edouard, Thu et Manhal, pour les cafés partagés et leur amitié pendant ces nombreuses années, vous allez me manquer !

Je tiens à remercier spécialement mes collègues du bureau 217 : Bao, Dat, Sophal et Chi, pour leur patience mais aussi pour l'amitié que nous avons partagée toutes ces années. Merci de m'avoir autant appris sur la culture asiatique et pour les bons moments au quotidien. Je me souviendrai toujours de ces années avec vous.

Je remercie ma chère amie Emilie pour toutes les aventures passées ensemble, pour les discussions enrichissantes (parfois pas si riches), pour les nombreux films, jeux, restaurants et... bars (bien sûr !) que nous avons partagés pendant toutes ces années. Sans sa présence et son amitié il n'aurait pas été aussi agréable d'arriver jusqu'ici. Je te garderai pour toujours dans ma vie.

À mon cher ami Maxime, un grand merci d'avoir été si présent dans ma vie durant cette « dernière ligne droite ». Merci pour les nombreuses discussions autour des bons verres (oui !). Merci de m'avoir initié à la science du café V60 et pour les matchs de StarRealms que j'ai gagnés (et quelques-unes que j'ai perdus !). Ses conseils et sa bonne humeur constante m'ont motivé à continuer et ont été essentiels pour terminer mon travail.

Un grand merci à mes chers amis brésiliens : Andria, Clarissa, Gabriel, Geisi, Heber, Isabela, Jéssica, Juliana, Luisa, Luli, Pedro, Rafael, Taísa, Talita, Thaís... et bien d'autres que j'ai pu croiser ici à Dijon. Vous m'avez apporté un peu de chaleur de mon pays au froid dijonnais. Je serai éternellement reconnaissant pour votre amitié.

Enfin, je remercie du fond du cœur à ma mère Conceição, mon père Anchieta et mon frère Kaio. Merci de m'avoir soutenu au cours de toutes ces années de thèse et de m'avoir motivé à poursuivre mes rêves.

Résumé

L'utilisation des levures en industrie est indissociable de sa transformation à l'état déshydraté. Le procédé de séchage provoque un certain nombre de dysfonctionnements dans les cellules de levure qui affectent leur fonctionnalité et leur viabilité. Afin de protéger les levures au cours de la déshydratation, des additifs alimentaires sont souvent utilisés comme les émulsifiants et les antioxydants. Cependant, les levures sont capables de produire naturellement des substances protectrices, telles que le glutathion (GSH) et le tréhalose (TRE). Dans ce contexte, trois souches non-*Saccharomyces* (NS) appartenant aux genres et espèces *Torulaspora delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima* et *Lachancea thermotolerans* ont été étudiées. En effet, malgré leur intérêt pour de multiples applications agro-alimentaires, leurs mécanismes de résistance à la déshydratation associés à la synthèse de GSH et de TRE sont à l'heure actuelle méconnus. Cette investigation peut permettre à terme la formulation de nouvelles souches de levure NS sous forme sèche, sans aucun additifs. Dans un premier chapitre, l'impact de la déshydratation de la levure « modèle » *Saccharomyces cerevisiae* en lit fluidisé pré-pilote a été corrélé à la synthèse du GSH et du TRE. Ainsi, il a été possible d'élucider les effets de la modulation de la composition du milieu de culture afin d'optimiser la conservation des cellules avant, pendant et après la déshydratation. Dans un deuxième chapitre, les conditions précédemment définies ont été appliquées aux levures NS afin de comprendre les effets de la déshydratation sur leur fonctionnalité. Cette étude a démontré que le GSH joue un rôle important dans la protection des levures NS, en fonction des conditions de culture et de déshydratation utilisées. Dans un troisième chapitre, certains phénomènes de résistance à l'oxydation des trois souches NS ont été étudiés. Il a été clairement démontré que la sensibilité des cellules à l'attaque oxydante dépend des conditions de culture-déshydratation et est inhérente à la souche étudiée. Enfin, dans un quatrième chapitre, une étude approfondie au niveau biochimique de la souche de levure la plus sensible, *L. thermotolerans*, a été réalisée par la microspectroscopie infrarouge avec rayonnement synchrotron. Les cellules cultivées en GSM, milieu favorisant la synthèse du glutathion, en plus de présenter une meilleure viabilité, montrent une plus grande intensité dans les bandes spectrales des lipides CH₂ et CH₃, associées à la fluidité de la membrane plasmique. Par ailleurs, les cellules cultivées en milieu TSM, milieu favorisant la synthèse du tréhalose, présentent une dénaturation plus élevée des protéines marquée par une intensité plus élevée des pics de feuillet β, et une intensité plus élevée des groupements C=O (oxydes lipidiques) corrélée à la peroxydation lipidique. Ces deux phénomènes expliquent la diminution de la viabilité obtenue sur cette souche lors de sa déshydratation. Les connaissances fondamentales acquises dans le cadre de cette étude seront utiles pour obtenir de nouvelles souches de levures déshydratées sans additifs et à hautes performances. Elles contribuent également à l'amélioration des méthodes de formulation et de déshydratation actuellement utilisées en industrie.

Mots clés : Déshydratation, oxydation, glutathion, tréhalose, levures, *Torulaspora delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Lachancea thermotolerans*

Abstract

The use of yeasts in industry is inseparable from their ability to be produced and dehydrated. This dehydration process causes various dysfunctions in yeast cells that affect their functionality and viability. In order to protect yeasts from dehydration, food additives are often used as emulsifiers and antioxidants. However, yeasts are able to produce naturally protective substances, such as glutathione (GSH) and trehalose (TRE). In this context, three non-*Saccharomyces* (NS) strains, belonging to the different genera and species *Torulaspora delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima* and *Lachancea thermotolerans*, were studied in this thesis. Despite the great interest aroused by their multiple agro-food applications, their dehydration resistance mechanisms associated with the synthesis of GSH and TRE, are currently unknown. This study is ultimately aimed at the formulation of new NS yeast dried strains without any food additives. In a first chapter, the impact of the “reference yeast” *Saccharomyces cerevisiae* dehydration in a pre-pilot fluidized bed has been correlated with the synthesis of GSH and TRE. It was possible to modulate the culture medium composition in order to optimize cell preservation before, during and after dehydration. In a second chapter, the previously defined conditions were applied to NS yeasts strains in order to understand the effects of dehydration on their microbial functionality. This study demonstrated that GSH plays an important role in NS yeasts protection, depending on the culture and dehydration conditions. In a third chapter, some oxidation resistance phenomena of the three NS strains were studied. It was clearly demonstrated that the susceptibility of cells to oxidative attack was dependent on culture-dehydration conditions and was yeast strain-dependent. Finally, in a fourth chapter, an in-depth biochemical study of the most dehydration-sensitive yeast strain, *L. thermotolerans*, was performed by synchrotron FTIR micro-spectroscopy. Cells grown in GSM (medium favoring the production of GSH), besides showing a better viability, showed a greater intensity in the spectral bands of lipids CH₂ and CH₃, associated with the plasma membrane fluidity. In addition, TSM grown cells (TSM is a medium favoring the production of TRE) exhibited a higher protein denaturation, suggested by the intensity of β -sheet peaks, and C=O (lipid oxides) bands correlated with lipid peroxidation. These data can explain the decreased of viability of this strain during production-dehydration process. The fundamental knowledge acquired in this study will be useful to obtain new dehydrated yeast strains without additives and with high performance. It will be useful also to improve the formulation and dehydration methods currently used in industry.

Keywords: Dehydration, oxidation, glutathione, trehalose, yeasts, *Torulaspora delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Lachancea thermotolerans*

Resumo

A uso das leveduras na indústria é indissociável de sua capacidade de serem produzidas e desidratadas. Esse processo de desidratação causa uma série de disfunções nas células de leveduras que afetam a sua funcionalidade e viabilidade. A fim de proteger as leveduras da desidratação, aditivos alimentares são frequentemente utilizados, como emulsificantes e antioxidantes. Entretanto, as leveduras são capazes de produzir naturalmente substâncias protetoras, como a glutatona (GSH) e a trealose (TRE). Neste contexto, três cepas não-*Saccharomyces* (NS) pertencentes aos diferentes gêneros e espécies *Torulaspota delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima* e *Lachancea thermotolerans*, foram estudadas nesta tese. Apesar do grande interesse despertado por suas múltiplas aplicações agroalimentares, seus mecanismos de resistência à desidratação associados à síntese de GSH e de TRE, são atualmente desconhecidos. Este estudo visa a formulação de novas cepas de leveduras NS desidratadas livres de aditivos. No primeiro capítulo, o impacto da desidratação da “levedura de referência” *Saccharomyces cerevisiae* em leite fluidizado pré-piloto foi correlacionado à síntese de GSH e de TRE. Foi possível modular a composição do meio de cultura para aperfeiçoar a preservação das células antes, durante e depois da desidratação. Em um segundo capítulo, as condições previamente definidas foram aplicadas às cepas de leveduras NS a fim de compreender os efeitos da desidratação sobre sua funcionalidade microbiana. Este estudo demonstrou que a GSH desempenha um papel importante na proteção das leveduras NS, dependendo das condições de cultivo-desidratação. Em um terceiro capítulo, foram estudados alguns fenômenos de resistência à oxidação das três cepas NS. Foi claramente demonstrado que a susceptibilidade das células ao ataque oxidativo é dependente das condições de cultivo-desidratação e é inerente à cepa estudada. Finalmente, no quarto capítulo um estudo bioquímico da cepa de levedura mais sensível, *L. thermotolerans*, foi realizado utilizando micro-espectroscopia FTIR com radiação síncrotron. Células cultivadas em GSM (meio que favorece a síntese de GSH), além de apresentarem maior viabilidade, mostraram maior intensidade nas bandas espectrais dos lipídeos CH₂ e CH₃, associadas à fluidez da membrana plasmática. Já as células TSM (meio que favorece a síntese de trealose) exibiram maior desnaturação das proteínas, sugerida pela intensidade dos picos das folhas β, e das ligações C=O (óxidos lipídicos) relacionados com a peroxidação lipídica. Esses dados podem explicar a diminuição da viabilidade dessa cepa durante o processo de produção-desidratação. Os conhecimentos fundamentais adquiridos neste estudo serão úteis para a obtenção de novas cepas de leveduras desidratadas livres de aditivos e de alta performance. Esses achados também serão úteis para aperfeiçoar os métodos de formulação e de desidratação atualmente empregados na indústria.

Palavras-chave: Desidratação, oxidação, glutatona, trealose, leveduras, *Torulaspota delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Lachancea thermotolerans*

Symboles et abréviations

ADY	Active Dried Yeast
ATP	Adénosine triphosphate
a_w	Activité de l'eau
CFU	Colony forming unit, unité formant colonie (UFC)
Cys	Cystéine
D	Coefficient de diffusion
DO	Densité optique
DTNB	5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)
G1P	Glucose-1-phosphate
G6P	Glucose-6-phosphate
Glu	Glutamate ou Acide glutamique
Gly	Glycine
Gpx	Glutathion peroxydase
GR	Glutathion réductase
GRAS	<i>Generally Recognized As Safe</i>
Grxo	Glutarédoxine oxydée
GrxR	Glutarédoxine-réductase
Grxr	Glutarédoxine réduite
GSH	Glutathion
GSHr	Glutathion réduit
GSHt	Glutathion total
GSM	Glutathione synthesis medium
GSSG	Disulfure de glutathion ou glutathion oxydé
HR	Humidité relative
Hxk	Hexokinase
Levures NS	Levures non- <i>Saccharomyces</i>
LSA	Levure sèche active
Lt	<i>Lachancea thermotolerans</i>
Mp	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
MDA	Malondialdéhyde
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
OTA	Ochratoxine A
p	Pression de vapeur de l'eau

p_0	Pression de vapeur de l'eau pure
P_b	Pression atmosphérique
Pgm	Phosphoglucomutase
PI	Propidium iodide, Iodure de propidium
P_s	Pression partielle de la vapeur d'eau
RH	Relative Humidity, Humidité relative
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
T	Température
T6P	Tréhalose-6-phosphate
Td	<i>Torulaspota delbrueckii</i>
Tm	Température de transition vitreuse
TPS	Tréhalose-6-phosphate synthase
TRE	Tréhalose
TRXo	Thiorédoxine oxydée
TRxR	Thiorédoxine réductase
TRXr	Thiorédoxine réduite
TSM	Trehalose synthesis medium
UDPG	Uridine diphosphate glucose
UDPgp	UDP-glucose phosphorylase
UTP	Uridine triphosphate
V_w	Volume molaire partiel de l'eau
γ_0	Masse absolue du corps sec par unité de volume humide

Table des matières

I. Introduction.....	1
II. Synthèse bibliographique.....	4
1 Les levures et leur intérêt en agro-alimentaire.....	5
1.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6
1.1.1 Applications agro-alimentaires : quelques exemples	7
1.1.1.1 Vin.....	7
1.1.1.2 Panification	7
1.1.1.3 Brasserie.....	8
1.1.1.4 Autres boissons fermentées	8
1.1.1.5 Produits dérivés de la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9
(1) Extrait de levure	9
(2) β -glucanes.....	10
(3) Levures inactivées	10
(4) Levures inertées.....	10
(5) Levures inertées enrichies en glutathion	11
1.2 Levures non- <i>Saccharomyces</i>	11
1.3 <i>Torulaspora delbrueckii</i>	14
1.3.1 Physiologie et morphologie.....	14
1.3.2 Applications en agro-alimentaire et en biocontrôle.....	15
1.3.2.1 Vin.....	15
1.3.2.2 Pâte congelée et chocolat.....	15
1.3.2.3 Conservation de fruits.....	16
1.4 <i>Metschnikowia pulcherrima</i>	16
1.4.1 Physiologie et morphologie.....	16
1.4.2 Applications en agro-alimentaire	17
1.4.2.1 Vin.....	17
1.4.2.2 Activité antimicrobienne	17
1.4.2.3 Production d'acides gras insaturés	18
1.5 <i>Lachancea thermotolerans</i>	18
1.5.1 Physiologie et morphologie.....	19
1.5.2 Applications en agro-alimentaire	19
1.5.2.1 Vin.....	19
1.5.2.2 Ochratoxine A.....	20

1.5.2.3 Pain congelé	20
1.6 Activité fermentaire des trois espèces	21
2 Stress induits au cours de la production de levures	23
2.1 Réponses cellulaires lors de la propagation de la biomasse.....	23
2.2 Phase de récupération des cellules.....	26
2.3 Addition de substances protectrices.....	26
2.4 Séchage de levures	27
2.4.1 L'eau	27
2.4.2 Sécheur en lit fluidisé	28
2.4.3 Séchage par contrôle de l'humidité relative (couche mince).....	30
2.4.4 Stress thermique	31
2.4.5 Stress oxydatif	33
3 Mécanismes de résistance à la déshydratation.....	37
3.1 Glutathion : le tampon redox cellulaire.....	38
3.1.1 Synthèse du glutathion	38
3.1.2 Rôle du GSH contre le stress oxydatif.....	40
3.2 Tréhalose : le disaccharide protecteur.....	42
3.2.1 Synthèse du tréhalose	43
3.2.2 Rôle du tréhalose et la résistance au séchage	44
III. Objectifs de l'étude	47
IV. Résultats et Discussion	50
Chapitre 1 - Effet de l'enrichissement de la levure de référence, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>, en glutathion et en tréhalose sur sa résistance au séchage en lit fluidisé (Publication 1)	51
1 Introduction	52
2 Improving total glutathione and trehalose contents in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> cells to enhance their resistance to fluidized bed drying.....	53
3 Conclusion du Chapitre 1	68
Chapitre 2 - Réponses physiologiques des levures non-<i>Saccharomyces</i> à la déshydratation : effets de la biosynthèse du glutathion et du tréhalose (Publication 2)	69
1 Introduction	70

2 Dehydration stress responses of yeasts <i>Torulaspora delbrueckii</i> , <i>Metschnikowia pulcherrima</i> and <i>Lachancea thermotolerans</i> : effects of glutathione and trehalose biosynthesis	71
3 Conclusion du Chapitre 2	94
Chapitre 3 - Compréhension de la résistance au stress oxydatif de trois souches appartenant à trois espèces différentes de levures non-<i>Saccharomyces</i> soumises à la déshydratation (Publication 3)	95
1 Introduction	96
2 Understand the oxidative stress resistance during dehydration of strains belonging to three non- <i>Saccharomyces</i> wine yeast species	97
3 Conclusion du Chapitre 3	115
Chapitre 4 - Impact de la déshydratation sur la levure <i>Lachancea thermotolerans</i> et ses réponses biochimiques au stress en utilisant la micro-spectroscopie infrarouge synchrotron (Publication 4)	116
1 Introduction	117
2 Biochemical stress response of the yeast <i>Lachancea thermotolerans</i> during dehydration and using real time infrared micro-spectroscopy synchrotron.....	118
3 Conclusion du Chapitre 4	133
V. Conclusion générale et perspectives	134
VI. Références bibliographiques.....	139

Liste des illustrations

Liste des figures (hors publications)

Figure 1-1 : Applications biotechnologiques traditionnelles et non-conventionnelles de levures. Adapté de (Rapoport, 2017)	5
Figure 1-2 : La levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> est considérée comme le « couteau suisse » de l'industrie la fermentation. D'après (Pretorius, 2017)	7
Figure 1-3 : Evolution du nombre de citations scientifiques concernant les mots-clés : <i>yeast</i> , <i>non-Saccharomyces</i> et <i>food</i> . D'après (http://www.webofknowledge.com).....	14
Figure 1-4 : Levure <i>Torulasporea delbrueckii</i> CBS 133. Barre d'échelle = 10 µm. D'après (http://www.westerdijkinstituut.nl).....	15
Figure 1-5 : Levure <i>Metschnikowia pulcherrima</i> CBS 5833. Barre d'échelle = 5 µm. D'après (http://www.westerdijkinstituut.nl).....	17
Figure 1-6 : Levure <i>Lachancea thermotolerans</i> CBS 6340. Barre d'échelle = 10 µm. D'après (http://www.westerdijkinstituut.nl).....	19
Figure 2-1 : Diagramme des différentes étapes de la production et de séchage de levures. La dynamique des paramètres physiologiques et moléculaires est présentée tout au long du processus de propagation de la biomasse jusqu'au séchage, avec les métabolites, les protéines et les modifications les plus importantes de l'expression génique qui se produisent pendant les principaux changements dans l'état des cellules de levure. D'après (Pérez-Torrado et al., 2015)	24
Figure 2-2 : Schéma illustratif du sécheur en lit fluidisé à batch. Les granules de levures sont déposés sur une grille et l'air chaud passe à travers pour les maintenir en suspension. D'après (www.glatt.com)	29
Figure 2-3 : Représentation schématique de la boîte hermétique à l'humidité relative (HR) contrôlée. Les solutions salines saturées couvrent la partie inférieure de la boîte. Les supports en polypropylène contenant les échantillons de levure sont déposés sur un portoir.....	30

Figure 2-4 : Réponses cellulaires au stress oxydatif chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* qui occasionnent la survie cellulaire ou la mort cellulaire programmée. Adapté de (Farrugia and Balzan, 2012) 35

Figure 3-1 : Structure moléculaire du glutathion et des acides aminés qui le constituent. (bleu) l'acide glutamique; (orange) la cystéine; et (vert) la glycine..... 38

Figure 3-2 : Cycle du glutathion (GSH et GSSG). AA, acides aminés ; Glu, glutamate (ou acide glutamique) ; Gly, glycine ; Cys, cystéine. Adapté de (Meister, 1988)..... 39

Figure 3-3 : Cycle de l'équilibre d'oxydoréduction impliqué dans la protection des groupes disulfures des protéines contre l'oxydation. Adapté de (McBean, 2017) 41

Figure 3-4 : Mécanisme schématisé de l'équilibre redox dans les levures. Le glutathion participe à la détoxification des ROS intracellulaires et à la réduction de ponts disulfures dans la membrane plasmique..... 42

Figure 3-5 : Structure moléculaire du tréhalose. Les deux molécules de glucose sont liées par une liaison glycosidique..... 43

Figure 3-6 : Mécanisme de synthèse du tréhalose chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Les étapes sont détaillées dans la section 3.2.1. D'après (Eleutherio et al., 2015) 44

Liste des figures (publications 1 à 4)

Figure 4-1 : Representative microscopic observations of the yeast (*S. cerevisiae* CBS8066) cell diameter. Images were captured after growing for 24 h in GSM (a) or TSM (b). \emptyset = average diameter..... 60

Figure 4-2 : Effect of growth medium GSM or TSM on GSht and TRE biosynthesis in the yeast *S. cerevisiae* CBS8066.. 60

Figure 4-3 : Effects of growth medium and fluidized bed drying conditions on yeast *S. cerevisiae* CBS8066 cell viability..... 61

Figure 4-4 : Representative regrowth kinetics of *S. cerevisiae* CBS8066 dried granules. 62

Figure 4-5 : Evolution of dehydrated yeast particles accelerated shelf life..... 63

Figure 5-1 : Scheme of the airtight box with controlled relative humidity. The saturated salt solutions of KNO₃, NaBr or CH₃COOK cover the lower part of the chamber. The polypropylene supports containing the yeast samples were deposited on a rack. The RH-temperature data logger was placed inside the chamber during kinetics..... 76

Figure 5-2 : Cell viability of *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii*, *M. pulcherrima* and *L. thermotolerans* yeasts..... 80

Figure 5-3 : Impact of dehydration with the kinetic KB and growing conditions (GSM or TSM) on yeast cell metabolic activity and plasma membrane permeability..... 82

Figure 5-4 : Total glutathione (GSHT) produced by yeasts *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii*, *M. pulcherrima* and *L. thermotolerans*..... 83

Figure 5-5 : GSSG:GSH ratio determinations for yeasts *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii*, *M. pulcherrima* and *L. thermotolerans* during biomass formation and after dehydration kinetics..... 84

Figure 5-6 : Trehalose content in *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii*, *M. pulcherrima* and *L. thermotolerans*..... 85

Figure 6-1 : Dehydration kinetics profiles applied to yeasts. Each kinetic, KA or KB, was carried out in three steps (time-temperature) using KNO₃ (step 1), NaBr (step 2) and CH₃COOK (step 3) saturated solutions to control the water activity (a_w)101

Figure 6-2 : Evolution of yeast *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii*, *M. pulcherrima* and *L. thermotolerans* cell cultivability during dehydration.....104

Figure 6-3 : Analysis of the oxidative stress response of yeasts *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii*, *M. pulcherrima* and *L. thermotolerans* cultivated in GSM or TSM and dehydrated with kinetics KA or KB.106

Figure 6-4 : Lipid peroxidation measurements of yeasts *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii*, *M. pulcherrima* and *L. thermotolerans*.....109

Figure 7-1 : Schematic representation of the ZnSe hemisphere, images of the stage used and the double-stained yeast *L. thermotolerans* cells.122

Figure 7-2 : Dehydration kinetics parameters applied to yeast cells.....122

Figure 7-3 : Cell viability of the strain CBS 6340 *L. thermotolerans*.....125

Figure 7-4 : Mean infrared spectra second derivative of the yeast cells before and after dehydration kinetics in the lipid spectral range (3050-2800 cm⁻¹).127

Figure 7-5 : Mean infrared spectra second derivative of the yeast cells before and after dehydration kinetics in the proteins spectral range (1800-1500 cm⁻¹).130

Liste des tableaux (hors publications)

Tableau 1-1 : Exemples d'utilisation des levures dans l'industrie agro-alimentaire. Adapté de (Kellershohn and Russell, 2015)..... 11

Tableau 1-2 : Influence des levures non-*Saccharomyces* (NS) Td, Mp et Lt, sur la composition et/ou les propriétés sensorielles du vin. Adapté de (Varela, 2016)..... 12

Tableau 1-3 : Principales caractéristiques d'activité fermentaire et d'assimilation des levures Td, Mp et Lt, en présence de différents substrats..... 21

Tableau 2-1 : Humidité relative de différentes solutions de salines saturées à températures de 10 à 60°C..... 31

Liste des tableaux (publications 1 à 4)

Tableau 4-1 : Yeast biomass production and water activity (aw) of yeast cell granules according to the growth media (GSM and TSM) and drying conditions 59

Tableau 5-1 : Performed kinetics profiles. Each kinetics, KA or KB, was performed in three steps (time-temperature) using different saturated salt solutions to control the aw (water activity)..... 76

Tableau 6-1 : GSSH:GSH ratio for yeasts, *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii*, *M. pulcherrima* and *L. thermotolerans*, at different conditions of growing (GMS or TSM) and dehydration..105

Tableau 7-1 : Main contributions of the lipid (3050-1800 cm^{-1}) and protein (1800-1500 cm^{-1}) absorption bands and comparisons of overall peak intensity effects according to growing conditions (GSM or TSM) and dehydration kinetics (KA or KB) applied to the cells.131

I. Introduction

Le développement de la civilisation humaine est associé à la production d'aliments fermentés qui sont souvent liées à l'activité levurienne. Les levures sont les principaux agents de la transformation de différentes matières premières pour la production de vins, de bières, de pains, entre autres produits alimentaires fermentés. A l'heure actuelle, les levures sont utilisées dans plusieurs autres domaines et procédés, tels que la conception de médicaments, la production d'énergies renouvelables (bioéthanol), l'alimentation animale et le bio-contrôle ou bio-protection de certains végétaux ou matrices végétales.

L'espèce *Saccharomyces cerevisiae* est sans aucun doute la levure la plus utilisée et la plus étudiée. Micro-organisme facilement manipulable et utilisable, en laboratoire ou dans l'industrie, les études menées sur la levure *S. cerevisiae* contribuent encore aujourd'hui à des progrès significatifs dans l'amélioration de la qualité de la vie, de la santé et de l'alimentation. Cependant, d'autres espèces de levures, connues sous le nom de non-*Saccharomyces*, ont fait l'objet d'une attention considérable ces dernières années, notamment pour des applications alimentaires et bio-protection. Parmi ces espèces, nous avons choisi les levures *Torulaspora delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima* et *Lachancea thermotolerans* qui présentent des caractéristiques différenciées du point de vue de leurs applications en agro-alimentaire. Quelques exemples : l'augmentation du potentiel aromatique des vins, lorsqu'elles sont utilisées en inoculation séquentielle lors d'une vinification ; leurs utilisations en brasserie et production d'alcools forts ; l'inhibition de la croissance d'autres espèces microbiennes ou fongiques d'altération ; leurs utilisations en tant qu'agents détoxifiants. Il existe donc un vif intérêt à étudier ces espèces levuriennes, tant d'un point de vue des connaissances fondamentales que d'un point de vue des applications industrielles.

La production industrielle de levures est indissociable de leur potentielle utilisation. Les procédés de production comportent plusieurs étapes qui interfèrent avec l'activité cellulaire des levures. De la formulation à la déshydratation-réhydratation, les cellules sont soumises à des stress nutritionnels, thermiques et oxydatifs qui diminuent leur viabilité. Afin d'améliorer la résistance des cellules de levure, des additifs sont souvent utilisés pour aider à prévenir les dommages cellulaires induits au cours de la production de levures, en particulier avant la déshydratation. Cependant, la levure *Saccharomyces* est capable de produire des substances qui la protège naturellement des étapes de stress

ultérieures, par exemple le glutathion et le tréhalose. Ces substances participent activement à la protection contre le stress oxydatif et au maintien de la structure microbienne, respectivement. Dans ce cas, la compréhension de la physiologie microbienne associée au métabolisme de nouvelles espèces de levure, en particulier les non-*Saccharomyces*, peut améliorer l'obtention de nouvelles souches de levures déshydratées sans ajout d'additifs.

Ce travail est axé sur la compréhension de la résistance des levures à la déshydratation en utilisant plusieurs paramètres physiologiques indicateurs de la survie (ou de la mort) cellulaire. Afin d'obtenir la plus haute viabilité cellulaire, différentes conditions de culture et de cinétiques de déshydratation, à l'échelle laboratoire et pré-pilote, ont été évaluées. Les levures *Torulaspora delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima* et *Lachancea thermotolerans* ont été étudiées et comparées à la souche de référence *Saccharomyces cerevisiae*.

Ce manuscrit est divisé en cinq parties :

- La première partie est consacrée à l'état des lieux de l'intérêt pour les espèces de levure sélectionnées, les stress induits au cours de la formulation de levures et les réponses physiologiques des cellules à la déshydratation-réhydratation.
- La deuxième partie concerne l'impact des conditions de culture sur l'activité de la levure de référence *S. cerevisiae* en utilisant un procédé de séchage industriel à l'échelle pré-pilote.
- La troisième partie met en évidence la compréhension de la résistance des quatre espèces de levures à la déshydratation à l'échelle laboratoire ainsi que la corrélation entre la synthèse du glutathion et du tréhalose et l'acquisition de cette résistance au stress.
- La quatrième partie comprend l'étude de l'impact du stress oxydatif sur la survie/mort cellulaire des quatre espèces de levures étudiées et sa relation avec l'accumulation de glutathion.
- Enfin, la cinquième partie concerne l'étude à l'échelle cellulaire des modifications biochimiques de la levure la plus sensible (*Lachancea thermotolerans*) parmi les quatre espèces étudiées, par méthode de séchage dynamique et micro-spectroscopie infrarouge avec rayonnement synchrotron.

II. Synthèse bibliographique

1 Les levures et leur intérêt en agro-alimentaire

Historiquement, les levures sont des microorganismes utilisés depuis des millénaires pour la formulation de divers produits boulangers et de boissons alcoolisées. En effet, la relation entre les levures et les humains est très proche, surtout lorsque nous parlons de l'alimentation. Cette relation remonte probablement à plus de 7000 ans lorsque des hommes ont goûté un liquide alcoolisé issu de raisins endommagés et stockés. Ils ne le savaient pas encore, mais ils observaient pour la première fois le phénomène de la fermentation spontanée (Chambers and Pretorius, 2010). Plusieurs découvertes importantes ont révolutionné la science de la levure, telles que des observations microscopiques de levures effectuées pour la première fois par Antoine van Leeuwenhoek en 1680, l'identification des levures comme les responsables de la transformation du sucre en dioxyde de carbone par Louis Pasteur en 1870 (Pretorius et al., 2014), la publication de la première séquence génomique complète de la levure du vin (*Saccharomyces cerevisiae* AWRI1631) en 2008 (Borneman et al., 2008).

Traditionnellement les levures sont utilisées pour la fabrication du pain, de la bière, du vin et pour la production d'alcool, mais les levures sont aussi utilisées pour d'autres applications biotechnologiques comme par exemple dans les domaines médical, pharmaceutique et environnemental (Figure 1-1).

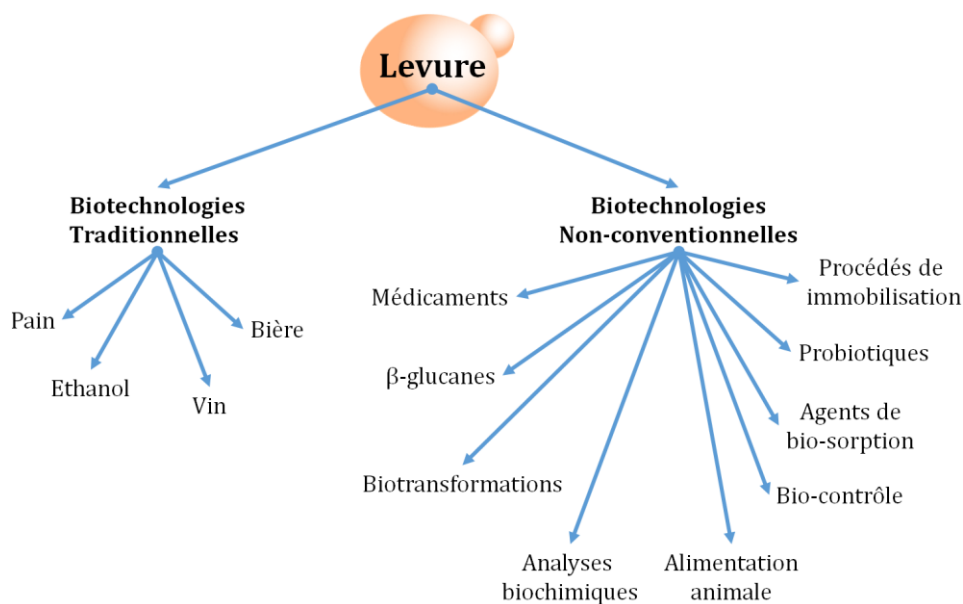


Figure 1-1 : Applications biotechnologiques traditionnelles et non-conventionnelles de levures. Adapté de (Rapoport, 2017)

La production mondiale de levure dépasse trois millions de tonnes par an et l'industrie de la levure est le deuxième plus grand segment de l'industrie de la fermentation (Kellershohn and Russell, 2015). En Europe, la production annuelle de levures est d'environ 900 000 tonnes, dont environ 60% sont utilisées dans l'Union européenne. Le marché mondial de la levure devrait atteindre une augmentation de 7,1% entre 2016 et 2022, ce qui représentera 10,7 milliards de dollars américains en 2022 (McWilliams, 2017). Cette croissance est le reflet de l'augmentation de la production mondiale de bioéthanol et de la consommation de bière, de vin et de spiritueux en Asie et en Amérique Latine. Afin de répondre à cette croissance, l'industrie de la levure est constamment à la recherche non seulement de nouvelles souches toujours plus performantes mais aussi à la recherche de nouvelles applications en biotransformations ou en biocontrôle.

1.1 *Saccharomyces cerevisiae*

La levure *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) est, sans doute, l'espèce la plus étudiée et utilisée dans le monde. Couramment connue comme la « levure boulangère » cette espèce est un agent majeur dans la formulation de divers produits alimentaires, tels que le pain, la bière et le vin. Elle est également utilisée pour la production d'enzymes, d'arômes et de biocarburants. Elle est pour cela considérée comme le « couteau suisse » de l'industrie de la fermentation (Figure 1-2). La levure Sc est un microorganisme polyvalent ayant le statut GRAS (*Generally Recognized As Safe*). La levure Sc est aussi utilisée pour la production de protéines hautement pures de différents hantavirus utilisés dans le développement de vaccins (Razanskiene et al., 2004), pour améliorer l'activité du tube digestif humain (Kondo and Ueda, 2004), comme biocatalyseurs dans de diverses transformations (Ueda and Tanaka, 2000) ou encore, pour détecter et éliminer des composés polluants de l'environnement (Kondo and Ueda, 2004).

De plus, cellule eucaryote facilement manipulable génétiquement, elle est ainsi considérée comme le microorganisme modèle pour l'étude de la biologie du cancer et du vieillissement (Johnson and Echavarri-Erasun, 2011).

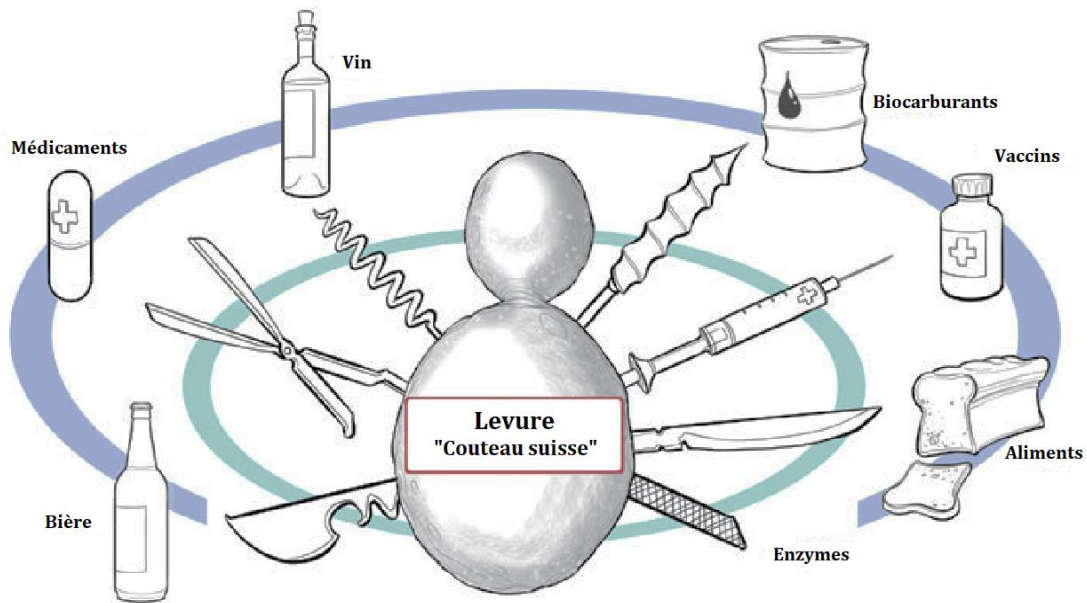


Figure 1-2 : La levure *Saccharomyces cerevisiae* est considérée comme le « couteau suisse » de l'industrie la fermentation. D'après (Pretorius, 2017)

1.1.1 Applications agro-alimentaires : quelques exemples

1.1.1.1 Vin

Pour la fermentation des moûts de raisin, la fermentation peut être spontanée. On parle alors de fermentation en flore indigène, assurée généralement par plusieurs souches de levures provenant des raisins, du matériel ou de l'environnement en cuverie. Le vinificateur peut choisir également la pratique du levurage qui consiste àensemencer les moûts de raisin avec une unique souche de *Saccharomyces cerevisiae* ou *S. bayanus*. Actuellement, plus de 250 références existent sur le marché, sous forme de Levures Sèches Actives (LSA). La pratique du levurage consiste à suivre un protocole de réhydratation dans, le plus souvent des cas, du moût de raisin dilué au demi, maintenu entre 30-35°C, pendant une quinzaine de minutes. Les levures ainsi réhydratées sont apportées directement au moût de raisin. Cette pratique garantit un inoculum d'au moins 1 million de cellules vivantes/ml, favorisant l'implantation de la souche choisie et son démarrage rapide en fermentation.

1.1.1.2 Panification

L'application de la levure Sc en panification varie en fonction des traditions de chaque région. Pour le pain, certains artisans boulangers utilisent le levain (culture symbiotique

de levures Sc et de bactéries lactiques), la levure pressée ou déshydratée pour préparer la pâte. Pour les levures déshydratées, comme pour les levures œnologiques, la réhydratation des cellules est une étape essentielle afin de rétablir la vitalité cellulaire maximale avant l'application. Souvent les cellules sont mélangées avec de la farine de blé ou du sucre avant l'ajout de liquides. Les conditions de réhydratation (température, cinétique, temps) sont très importantes pour la reprise de croissance, l'activité métabolique et le pouvoir fermentaire de la levure Sc (Jenkins et al., 2010).

1.1.1.3 Brasserie

La bière est le résultat de la fermentation par les levures d'un brassin issu de la dégradation partielle de l'amidon malté. En général, la production industrielle des bières utilise deux espèces de levures : *Saccharomyces pastorianus* (fermentation basse avec températures de 8°C à 14°C) et *Saccharomyces cerevisiae* (fermentation haute avec températures de 18°C à 24°C), utilisées respectivement pour la production des bières lager et ale (Lodolo et al., 2008; Rahman, 2015). L'ensemencement se fait le plus souvent avec des levures sèches, directement apportées au brassin, sans réhydratation. Comme pour le vin, la qualité finale de la bière est directement liée au métabolisme de la levure. Les cellules de levure ne produisent pas uniquement de l'alcool et du dioxyde de carbone résultants de la fermentation, mais également d'autres composants, tels que les alcools supérieurs, les acides organiques, les esters, les aldéhydes, les cétones, qui contribuent directement au profil sensoriel de la bière (Ferreira et al., 2010; Pinho et al., 2006).

1.1.1.4 Autres boissons fermentées

Les cidres sont produits à partir de la fermentation de la pomme par des levures, principalement par les espèces *S. cerevisiae* et *S. bayanus*. Cependant, d'autres espèces de levures sont rencontrées lors de la fermentation du cidre, tels que les genres *Dekkera*, *Lachancea*, *Pichia* et *Candida* (Valles et al., 2007). Les principales caractéristiques physiologiques des levures destinées à la production des cidres sont une fermentation rapide, leur tolérance à l'éthanol et aux conditions de pH acide (Lea et al., 2003). En outre, la capacité de développer le profil sensoriel associé à la production d'alcools supérieurs, d'esters et d'acides organiques, constituent également des caractéristiques importantes des levures sélectionnées pour la production de cidre. Egalement

commercialisées sous forme sèche, les levures sont réhydratées avant ensemencement, comme pour l'ensemencement des moûts de raisin.

Le saké est produit à partir du riz et sa production met en œuvre la levure *S. cerevisiae* et le champignon *Aspergillus oryzae* (Kitagaki and Kitamoto, 2013). Les souches de levure destinées à la production de saké doivent principalement être capables de supporter des concentrations élevées d'alcool (jusqu'à 20% d'éthanol) pendant la fermentation (Rahman, 2015).

La tequila est produite à partir du jus d'agave bleu (*Agave tequilana*), qui est fermenté et distillé deux fois (Varela, 2016). La production; de tequila à grande échelle est essentiellement réalisée avec la levure *S. cerevisiae* ; cependant, d'autres espèces de levure peuvent être rencontrées dans la production artisanale de la tequila (fermentation spontanée)(Lappe-Oliveras et al., 2008). Une étude à l'échelle laboratoire a montré que les levures *Kluyveromyces marxianus* et *Pichia kluyveri* sont de bonnes candidates pour améliorer la complexité aromatique de la tequila, en produisant des concentrations élevées d'esters (Segura-García et al., 2015).

La cachaça est une boisson fermentée et distillée à base du jus extrait de la canne à sucre pressée et produite principalement au Brésil (Varela, 2016). Elle se rapproche du rhum agricole. La fermentation de la cachaça est normalement effectuée avec la levure *S. cerevisiae* et dure de 18 à 30 heures. D'autres espèces de levure (*P. anomala* et *P. caribbica*) appliquées en co-inoculation avec *Saccharomyces* améliorent le profil aromatique de la cachaça, grâce à la production de composés aromatiques volatils (hexanoate d'éthyle, 2-phényléthanol, butyrate d'éthyle et acétate de phényléthyl) (Duarte et al., 2013).

1.1.1.5 Produits dérivés de la levure *Saccharomyces cerevisiae*

(1) Extrait de levure

La production des extraits de levures se fait majoritairement avec la levure Sc. Cet ingrédient est utilisé dans l'industrie agro-alimentaire pour améliorer le profil sensoriel de certains produits, comme les snacks. Il peut également remplacer le glutamate monosodique puisqu'il donne les notes de rôti, de grillé et de céréales. L'extrait de

levure est composé de plusieurs composants solubles et insolubles des levures autolysées, tels que les mannoprotéines, les polysaccharides, les vitamines du groupe B et les acides aminés (Kellershohn and Russell, 2015).

(2) β -glucanes

La paroi cellulaire de la levure *Sc* est essentiellement constituée de β -glucanes (environ 50-60%) (Thammakiti et al., 2003). Ses propriétés comme agent épaississant, stabilisant et émulsifiant sont très intéressantes dans certains produits alimentaires (Ferreira et al., 2010). Par exemple, pour la production de mayonnaise réduite en matière grasse, la substitution jusqu'à 50% de la matière grasse par les β -glucanes de levures a été acceptée par les consommateurs (Worrasinchai et al., 2006).

(3) Levures inactivées

Les levures inactivées sont produites à partir de cultures à haute densité de la levure *Saccharomyces* traitées avec de la chaleur ou par variation du pH (IOVW, 2018). Les levures inactivées sont principalement utilisées pour renforcer nutritionnellement les cultures de levures avant et pendant la fermentation (Schmidt and Henschke, 2015). Des études ont montré que les levures inactivées sont capables d'adsorber l'ochratoxine A dans les vins et dans les moûts de raisins, en réduisant sa teneur jusqu'à 75% (Bejaoui et al., 2004; Piotrowska et al., 2013). Les levures inactivées sont également utilisées lors de la réhydratation de cellules de levure déshydratées afin d'améliorer leur viabilité. Les ingrédients à base de levures inactivées constituent la principale source d'azote (acides aminés et peptides) pour la formation de biomasse (Specht, 2010).

(4) Levures inertées

Les levures inertées sont produites à partir de l'autolyse de la biomasse de cellules de levure de *Saccharomyces cerevisiae* (IOVW, 2018). L'autolyse se produit naturellement par l'action d'enzymes endogènes lorsque les cellules atteignent la fin de leur cycle cellulaire (Ferreira et al., 2010). Ces enzymes dégradent les acides nucléiques, les protéines, le glycogène et d'autres constituants cellulaires. L'autolyse peut-être aussi réalisée par l'action d'enzymes exogènes, par exemple les β -1-3 glucanases et/ou des β -1-6 glucanases et/ou des protéases (Conway et al., 2001). Les applications des levures

inertées sont similaires aux levures inactivées, c'est-à-dire principalement en tant que source de nutriments essentiels pour les nouvelles cultures de levure au cours de la réhydratation ou de la fermentation.

(5) Levures inertées enrichies en glutathion

La levure inertée enrichie en glutathion est un ingrédient utilisé en vinification pour améliorer la qualité sensorielle des vins (arômes et couleurs) (Andujar-Ortiz et al., 2012; Ángeles Pozo-Bayón et al., 2009). Cet ingrédient est produit d'une manière similaire à la levure inertée mais se différencie par les conditions de culture spécifiques de la levure *Saccharomyces cerevisiae* qui amènent les cellules à accumuler le glutathion (Kritzinger et al., 2013). Des études ont montré que l'addition de levures inertées riches en glutathion protège les arômes des vins, ce qui est principalement dû à la teneur élevée en glutathion libéré dans le moût de raisins (Lavigne et al., 2007; Vaimakis and Roussis, 1996).

1.2 Levures non-*Saccharomyces*

La production de levures *Saccharomyces cerevisiae*, largement utilisées dans l'industrie agro-alimentaire domine la majeure partie du marché levurien. Cependant, d'autres espèces de levure regroupées sous le nom de non-*Saccharomyces* peuvent présenter des propriétés différenciées qui favorisent le développement, par exemple, de nouveaux produits fermentés ou améliorent les caractéristiques de ceux déjà existants (Varela, 2016). En agro-alimentaire, les levures non-*Saccharomyces* (NS) gagnent en importance pour des applications en vinification, en brasserie, pour la production de cidres, saké, alcools forts, fromages, entre autres. Le Tableau 1-1 présente des exemples d'applications des levures dans l'industrie agro-alimentaire (en caractères gras les espèces non-*Saccharomyces* d'intérêt).

Tableau 1-1 : Exemples d'utilisation des levures dans l'industrie agro-alimentaire. Adapté de (Kellershohn and Russell, 2015).

Procédé	Levure
Panification	Primaire : <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Autres : <i>S. exigus</i> (levain)
Brasserie	Primaire : <i>S. cerevisiae</i> (ale) et <i>S. pastorianus</i> (lager)

Procédé	Levure
	Autres : <i>S. diastaticus</i> , <i>S. bayanus</i> , <i>Dekkera/Brettanomyces</i>
Alcools forts	<i>S. cerevisiae</i>
Saké	<i>S. cerevisiae</i>
Vin	Primaire : <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. bayanus</i> Autres : <i>Hanseniaspora (Kloeckera)</i> , <i>Candida</i> spp., <i>Pichia</i> spp. <i>Metschnikowia pulcherrima</i> , <i>Torulaspota delbrueckii</i> , <i>Metschnikowia fructicola</i>
Rhum	<i>Schizosaccharomyces</i> spp.
Cidres	Primaire : <i>S. cerevisiae</i> Autres : <i>Hanseniaspora valbyensis</i> , <i>Metschnikowia pulcherrima</i>
Arômes de levure	<i>S. cerevisiae</i>
Cacao	<i>Hanseniaspora</i> spp., <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Kluyveromyces (Lachancea)</i> spp., <i>Pichia</i> spp., <i>Candida</i> spp.
Fromages	<i>Kluyveromyces (Lachancea)</i> spp., <i>Debaromyces hansenii</i> , <i>S. unisporus</i> , <i>Candida</i> spp., <i>Pichia</i> spp., <i>Yarrowia lipolytica</i> , <i>Clavispora lusitaniae</i> , <i>Torulospota delbrueckii</i>
Chymosine	<i>Kluyveromyces (Lachancea)</i> spp., <i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Basé sur les études de l'influence de la présence de certaines levures NS en vinification, le choix de l'espèce de levure est directement lié au goût et au profil aromatique du produit final associé (Pires et al., 2014). Le Tableau 1-2 montre quelques exemples de l'impact de l'utilisation des trois souches de levures NS sur les propriétés physico-chimiques et sensorielles des vins produits à partir de plusieurs variétés de raisins.

Tableau 1-2 : Influence des levures non-*Saccharomyces* (NS) Td, Mp et Lt, sur la composition et/ou les propriétés sensorielles du vin. Adapté de (Varela, 2016)

Levure NS	Variété du raisin ou milieu	Impact sur les propriétés physiques, chimiques ou sensorielles *
Td	Malvar	Augmentation des esters d'acétate et des acides gras à chaîne moyenne
Td	Sauvignon blanc	Augmentation de la concentration de thiols, de 3-sulfanylhéxan-1-ol et d'acétate de 3-sulfanylhéxyle
Td	Gewurztraminer	Augmentation de la concentration de terpènes α -terpinéol et de linalol
Td	Soave Chardonnay	Augmentation de l'intensité des arômes, de la complexité et de la persistance

Levure NS	Variété du raisin ou milieu	Impact sur les propriétés physiques, chimiques ou sensorielles *
Td	Tempranillo	Augmentation de l'intensité de la couleur, de l'impression générale et de la qualité aromatique
Td	Merlot	Augmentation de la complexité et des attributs fruités
Td	Macabeo	Augmentation de la moussabilité et de la persistance de la mousse
Mp	Jus de raisin synthétique	Augmentation de la concentration de mannoprotéines
Mp	Riesling	Augmentation des caractéristiques sensorielles agrumes/raisin et de poire
Mp	Macabeo	Persistance accrue de la mousse et caractéristiques sensorielles fumée/ floral
Lt	Riesling	Augmentation des caractéristiques sensorielles pêche/abricot
Lt	Sangiovese	Augmentation de l'acidité et des caractéristiques sensorielles épicées

Td = *Torulaspora delbrueckii*, Mp = *Metschnikowia pulcherrima*, Lt = *Lachancea thermotolerans*

* Composition chimique ou attributs sensoriels comparés aux vins fermentés avec *S. cerevisiae*

En brasserie, malgré le fort potentiel des levures NS pour améliorer la complexité sensorielle des bières, peu sont actuellement utilisées dans l'industrie de la bière (Holt et al., 2018). La levure la plus utilisée est du genre *Brettanomyces* qui est inoculée pendant la fermentation des bières trappistes et acides. Cependant, des études récentes démontrent que la levure *Torulaspora delbrueckii* présente un intérêt pour le développement de nouvelles bières plus aromatiques et offre une nouvelle gamme de perspectives en termes de techniques et d'approches du levurage en brasserie (Basso et al., 2016; Canonico et al., 2016a; Michel et al., 2015). Un autre exemple est l'utilisation de la levure *Lachancea thermotolerans* dans la production de bières acides. Cette espèce peut compléter la fermentation de la bière en une seule étape et sans l'utilisation de bactéries lactiques, puisque cette souche peut naturellement produire de grandes quantités d'acide lactique (Domizio et al., 2016).

Ainsi, la production de nouvelles souches de levures, appartenant spécialement aux non-*Saccharomyces*, est un sujet en pleine expansion. La Figure 1-3 illustre l'évolution du nombre de citations des publications scientifiques faisant référence à l'utilisation de levures non-*Saccharomyces* en agro-alimentaire. Il est possible de constater au cours des

cinq dernières années une multiplication par six du nombre de citations, ce qui témoigne du vif intérêt pour des nouvelles espèces levuriennes.

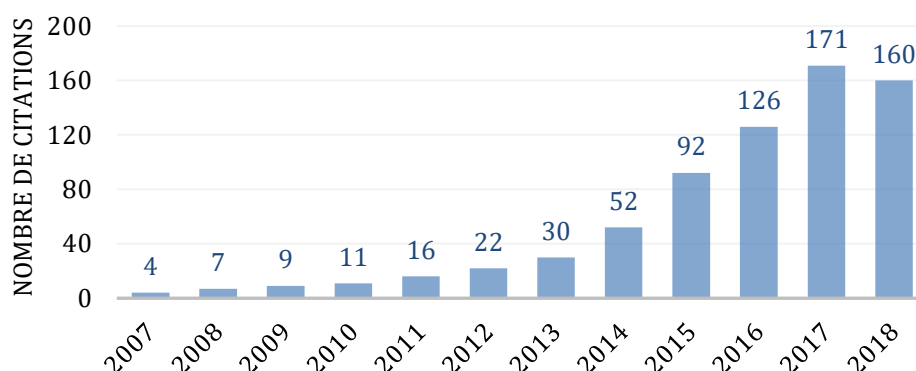


Figure 1-3 : Evolution du nombre de citations scientifiques concernant les mots-clés : *yeast*, *non-Saccharomyces* et *food*. D'après (<http://www.webofknowledge.com>)

Toutes ces informations démontrent clairement l'intérêt pour les levures NS. Parmi celles-ci, les levures *Torulaspora delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima* et *Lachancea thermotolerans* se distinguent par leur polyvalence des applications dans l'industrie agro-alimentaire.

1.3 *Torulaspora delbrueckii*

La levure *Torulaspora delbrueckii* (Td) est une espèce fréquemment et facilement rencontrée dans la nature. Cette levure a déjà été isolée du sol, de la surface des raisins et du jus d'agave (Lachance, 1995). Bien qu'elle ait déjà été considérée comme une espèce d'altération alimentaire, cette levure est actuellement considérée comme l'une des meilleures souches pour améliorer le profil aromatique des vins (Kurtzman, 2011b). La levure Td a un fort caractère osmotolérant, i.e. capacité de survivre dans les environnements à faible activité de l'eau, tels que miel, fruits confits, sucre brut, mélasse et raisins secs (Deák and Deak, 2007). Cette particularité est attribuée à une forte production de tréhalose intracellulaire (D'Amore et al., 1991).

1.3.1 Physiologie et morphologie

Le temps de génération de la levure Td est d'environ 84 min en milieu YPD à 30°C (Sasaki and Ohshima, 1987). Les cellules peuvent se diviser de manière asexuée par bourgeonnement multilatéral, ou de manière sexuée par des asques qui contiennent

d'une à quatre ascospores sphériques (Benito, 2018a). Les cellules sont sphériques à ellipsoïdales, $2-4 \times 3-6 \mu\text{m}$ (Figure 1-4), et sont rencontrées isolées ou occasionnellement par paires (Kurtzman, 2011a).

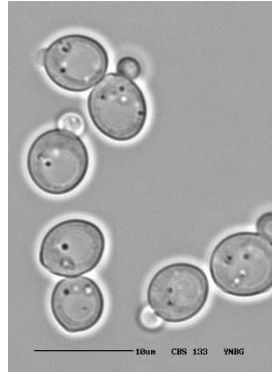


Figure 1-4 : Levure *Torulaspora delbrueckii* CBS 133. Barre d'échelle = 10 μm . D'après (<http://www.westerdijkinstituut.nl>)

1.3.2 Applications en agro-alimentaire et en biocontrôle

1.3.2.1 Vin

La levure Td produit de faibles quantités d'acide acétique, ce qui est apprécié dans l'élaboration des vins. Cette espèce produit environ deux fois moins d'éthanol par rapport à la fermentation traditionnelle avec l'espèce Sc (Contreras et al., 2014). Dans les régions à climat chaud, les raisins ont souvent de grandes proportions de sucres. Dans ce cas, l'utilisation de cette levure peut corriger le problème des moûts à fort degré alcoolique potentiel. En raison de ces propriétés, la levure Td est co-ensemencée avec Sc afin de compléter la fermentation du moût (Benito, 2018a).

D'autres propriétés œnologiques ont été déjà décrites pour la levure Td, telles que l'amélioration du profil aromatique des vins liés aux esters, thiols, terpènes, acétaldéhydes ou l'augmentation de la sensation de douceur et de rondeur en bouche liée à la production de mannoprotéines ou de polysaccharides (Belda et al., 2016a).

1.3.2.2 Pâte congelée et chocolat

L'osmotolérance de cette espèce permet son application pour des produits à faible activité de l'eau comme les pâtes congelées, ou à forte concentration de solutés qui exercent une pression hyper-osmotique aux cellules, comme dans la fermentation du

cacao destinée à la préparation du chocolat (Bely et al., 2008). Dans la pâte à pain congelée, la levure Td peut survivre à -20°C jusqu'à quatre mois, au contraire de la levure Sc qui perd environ 80% de viabilité dans les quinze premiers jours de stockage (Alves-Araújo et al., 2004). Lors de la fermentation du cacao, la levure Td en inoculation mixte avec Sc améliore le profil aromatique du chocolat (Visintin et al., 2017).

1.3.2.3 Conservation de fruits

La moisissure bleue de la pomme est causée par *Penicillium expansum*. Cette altération entraîne jusqu'à 30% de pertes de pommes après la récolte (Vico et al., 2014). La levure Td est capable de contrôler la croissance mycélienne de *P. expansum*. Ce mécanisme de protection vis-à-vis du champignon n'est pas encore clair, mais il est probablement associé à la compétition nutritionnelle, à l'induction de la résistance contre les agents pathogènes, ou à la production de certains métabolites volatiles qui participent à l'inhibition de la croissance mycélienne de la moisissure (Ebrahimi et al., 2012).

1.4 *Metschnikowia pulcherrima*

La levure *Metschnikowia pulcherrima* (Mp) est fréquemment rencontrée dans les matières végétales riches en nutriments tels que les raisins et les cerises noires (Lachance, 2011). Cette espèce est non seulement utilisée en vinification, mais également comme agent de contrôle biologique contre l'agent de la pourriture grise (*Botrytis cinerea*) (Parafati et al., 2015) et contre la moisissure bleue de la pomme (Janisiewicz et al., 2001).

1.4.1 Physiologie et morphologie

Les cellules de la levure Mp se caractérisent par une forme ellipsoïde avec des dimensions de $3-6 \times 4-7 \mu\text{m}$. Elles se reproduisent par bourgeonnement multilatéral (Figure 1-5). Lors d'une inoculation séquentielle avec *Saccharomyces*, le temps de duplication de la levure Mp est de 78 min en moût de raisins Chardonnay à 22°C (Contreras et al., 2014). Les cellules se caractérisent par la présence de formes globuleuses ou sub-globuleuses, contenant un seul globule lipidique, occasionnellement plus d'un, après croissance à 25°C (Lachance, 2011).

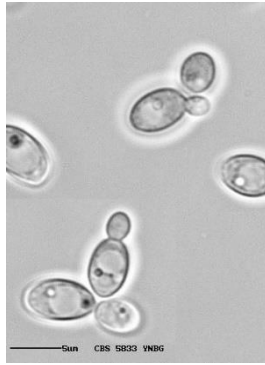


Figure 1-5 : Levure *Metschnikowia pulcherrima* CBS 5833. Barre d'échelle = 5 μm .
D'après (<http://www.westerdijkinstituut.nl>)

1.4.2 Applications en agro-alimentaire

1.4.2.1 Vin

En vinification la levure Mp est généralement utilisée en co-inoculation avec l'espèce Sc afin de réduire les niveaux d'acidité volatile dans les vins. Cette réduction a été attribuée à l'interaction synergique entre ces espèces, où la présence de l'espèce Mp induit chez *Saccharomyces cerevisiae* la modification de l'expressions des voies métaboliques impliquées dans la production d'acide acétique et de glycérol (Sadoudi et al., 2017). De plus, la co-culture Mp-Sc conduit à une augmentation de la teneur en composés aromatiques par rapport aux cultures indépendantes réalisées avec chaque espèce (Sadoudi et al., 2012).

Lors de la croissance de la levure Mp en milieu aéré, la production de l'enzyme β -glycosidase peut augmenter jusqu'à 13 fois. Cette activité enzymatique est très importante pour libérer des composés aromatiques à partir de précurseurs non-volatils liés aux glycosides (Mendes Ferreira et al., 2001). Cette particularité a une implication significative lorsque les vins sont élaborés avec des raisins moins aromatiques. La levure Mp est l'une des espèces non-*Saccharomyces* ayant le plus grand potentiel de libérer des terpènes et les thiols volatils dérivés de raisins, ainsi que les arômes fruité et floral (Sadoudi et al., 2012, 2017).

1.4.2.2 Activité antimicrobienne

La levure Mp présente une propriété inhibitrice contre d'autres espèces de levures. Elle excrète l'acide pulcherrimique dans le milieu externe (Sipiczki, 2006). Ce composé se

combine avec les ions ferriques pour former le pigment pulcherrimine, ce qui conduit à la réduction du fer libre dans le milieu et entraîne l'inhibition de la croissance d'autres micro-organismes qui nécessitent du fer pour se développer, en particulier *Brettanomyces*, *Hanseniaspora* et *Pichia* (Oro et al., 2014). Cette caractéristique pourrait conférer à cette levure un avantage notamment en inoculation mixte avec l'espèce Sc, parce qu'en plus d'améliorer le profil aromatique des vins, la levure Mp empêcherait le développement d'autres espèces indésirables pendant la fermentation du moût de raisin.

1.4.2.3 Production d'acides gras insaturés

L'industrie agro-alimentaire cherche constamment des alternatives aux acides gras saturés fréquemment associées aux maladies cardiovasculaires (Mozaffarian et al., 2006). Lorsque les levures oléagineuses comme la levure Mp sont cultivées en conditions limitées en azote et en présence de grandes quantités de carbone, elles accumulent les lipides en réponse au stress nutritionnel (Beopoulos et al., 2009). Dans certaines conditions de culture, la levure Mp est capable d'accumuler d'importantes quantités d'acides gras insaturés ~70% w/w (Canonica et al., 2016b). Parmi les différentes espèces de levures testées, la levure Mp est la seule espèce à produire ~12% w/w d'acide gras polyinsaturés, ce qui lui confère une option très intéressante pour remplacer certaines huiles végétales couramment utilisées en industrie, comme l'huile de noix de coco et de palme ou d'autres graisses animales comme le beurre.

1.5 *Lachancea thermotolerans*

La levure *Lachancea thermotolerans* (Lt) est une des espèces les moins connues parmi celles mentionnées ci-dessus. La levure Lt a été isolée de fruits et sur certaines espèces d'insectes qui utilisent les plantes pour se nourrir, comme les drosophiles (Lachance and Kurtzman, 2011). Elle est également présente sur des produits fermentés (Senses-Ergul et al., 2006), tels que le cacao au Brésil (Benito, 2018b). Cette levure a une forte capacité à produire de l'acide lactique, donc la plupart des études la concernant sont liées à son application dans la production de vin ou de procédés associés à la vinification.

1.5.1 Physiologie et morphologie

Les cellules de la levure *Lt* ont une forme sphérique-ellipsoïdale et sont un peu plus petites que la levure *Sc*. Ses dimensions varient entre $3-6 \times 6-8 \mu\text{m}$ (Figure 1-6). Son mode de reproduction asexué se fait par bourgeonnement multilatéral et les cellules sont rencontrées isolées, par paires ou en petits groupes. Au cours de la reproduction sexuée, la formation de l'ascus se produit et il contient une à quatre ascospores sphériques (Lachance and Kurtzman, 2011).

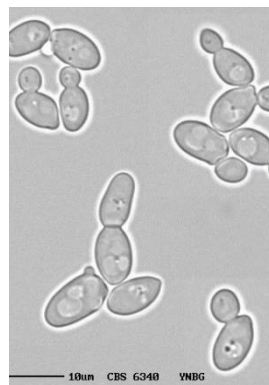


Figure 1-6 : Levure *Lachancea thermotolerans* CBS 6340. Barre d'échelle = 10 μm . D'après (<http://www.westerdijkinstituut.nl>)

1.5.2 Applications en agro-alimentaire

1.5.2.1 Vin

Dans les régions viticoles au climat chaud, les raisins ont une faible acidité, ce qui peut représenter un problème de qualité finale du vin (Benito et al., 2016). La solution la plus utilisée par les industriels afin de corriger l'acidité est l'ajout des acides de grade alimentaire, tels que l'acide malique, l'acide tartrique, l'acide citrique, ou l'acide lactique (IOVW, 2018). Cependant, l'instabilité chimique de ces composés peut également interférer sur la qualité du vin. Dans ce cas, la levure *Lt* présente un intérêt pour sa capacité à produire d'importantes quantités d'acide lactique. La levure *Lt* peut augmenter jusqu'à 70% l'acidité dans les moûts de raisins (Kapsopoulou et al., 2007). Le mécanisme de production d'acide lactique dans cette espèce n'a pas encore été complètement élucidé, mais des études suggèrent une activité plus élevée de la lactate déshydrogénase (EC 1.1.1.27), l'enzyme responsable de la conversion du pyruvate en

lactate/acide lactique, chez la levure Lt (Jolly et al., 2013; Pronk et al., 1996; Witte et al., 1989).

1.5.2.2 Ochratoxine A

L'ochratoxine A (OTA), produite par certains champignons d'altération comme *Aspergillus carbonarius* et *Aspergillus Niger*, est une mycotoxine classifiée comme potentiellement cancérigène pour les humains par le CIRC (Centre International de la Recherche sur le Cancer, OMS). Cette mycotoxine peut être rencontrée sur les raisins et dans les vins rouges. La levure Lt a une forte capacité à contrôler la croissance globale de ces deux champignons ainsi que l'accumulation de l'OTA, en réduisant de 3% à 100% sa teneur dans les vins (Ponsone et al., 2011) et dans les raisins stockés après la récolte (Ponsone et al., 2016). Ce mécanisme antagoniste reste encore inconnu mais il est probable que la compétition pour l'espace et les nutriments soit liée à l'inhibition de la croissance des champignons plutôt qu'à la libération de substances antifongiques (Fiori et al., 2014; Pfliegler et al., 2015). D'autre part, l'élimination de l'OTA par biosorption est effectuée par des cellules vivantes ou mortes de l'espèce Lt, ce qui suggère que l'élimination de la toxine est directement liée aux interactions des constituants de la paroi cellulaire (β -glucanes) avec les groupes fonctionnels de l'OTA (Ringot et al., 2005). Ces effets représentent un avantage stratégique parce qu'une infection par les champignons producteurs de l'OTA peut être évitée avant la récolte du raisin et/ou l'OTA peut être éliminée par biosorption pendant la fermentation (Fiori et al., 2014; Sheikh-Zeinoddin and Khalesi, 2018).

1.5.2.3 Pain congelé

Le procédé de congélation des pains peut affecter directement l'activité des levures présentes dans la pâte, réduisant la viabilité des cellules et affectant la qualité du produit après la décongélation (Kaino et al., 2008). La levure Lt a une capacité plus élevée à résister aux basses températures que la levure boulangère Sc. Après 7 jours de stockage à -20°C , le taux de survie de l'espèce Lt a été de 100 à 10^4 fois supérieur à celui de l'espèce Sc qui a montré une survie $<50\%$ (Hino et al., 1990). Cette résistance au froid a été partiellement attribuée au niveau basal de tréhalose intracellulaire dans la levure Lt après la fermentation.

1.6 Activité fermentaire des trois espèces

Comme constaté jusqu'à présent, les levures non-*Saccharomyces* sont largement utilisées dans le domaine de l'agro-alimentaire pour des applications multiples. Ceci induit une variabilité dans les sources de nutriments pour la croissance, dépendante de la matrice à transformer ou des milieux utilisés pour la production de biomasse. Le Tableau 1-3 présente les activités fermentaires et les tests de croissance de ces trois espèces de levure en fonction de différentes sources de nutriments.

Tableau 1-3 : Principales caractéristiques d'activité fermentaire et d'assimilation des levures Td, Mp et Lt, en présence de différents substrats.

Levure	Td ^a	Mp ^b	Lt ^c
Fermentation :			
D-Glucose	positive	positive	positive
Sucrose	positive	–	positive
Raffinose	positive	–	positive
Assimilation-croissance :			
50% D-Glucose	croissance	croissance	croissance
60% D-Glucose	pas de croissance	croissance	croissance faible
Formation d'amidon	non	non	non
Production d'acide acétique	non	non	non
Hydrolyse de l'urée	non	non	non
Diazonium Blue B	négative	négative	négative
Méthanol	pas de croissance	pas de croissance	pas de croissance
Ethanol	croissance	croissance	croissance

Code CBS des souches : ^a 4865 ; ^b 5833 ; ^c 6340. D'après (<http://www.westerdijkinstituut.nl>)

L'industrie des ferments a un fort intérêt non seulement pour l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*, mais également et de façon beaucoup plus prégnante pour les non-*Saccharomyces*. Même si ces espèces de levures présentent des caractéristiques morphologiques et physiologiques relativement similaires, elles sont utilisées pour les transformations agro-alimentaires les plus diverses, ainsi que la production d'ingrédients alimentaires, d'enzymes, la détoxification ou comme agents de contrôle biologique. Cependant, l'intérêt d'une souche levurienne est indissociable de sa production industrielle, production qui comporte plusieurs étapes qui affectent l'activité cellulaire.

2 Stress induits au cours de la production de levures

La demande croissante de nouvelles espèces de levure pour des applications d'intérêt nécessite la production de grandes quantités de levure. Les levures sont en général produites et commercialisées de trois manières différentes: (i) crème (suspension aqueuse contenant jusqu'à 80% d'eau), (ii) comprimée (déshydratation partielle par concentration cellulaire et contenant jusqu'à 70% d'humidité résiduelle) et (iii) déshydratée (<5% d'eau) (Attfield et al., 1997).

L'eau peut représenter entre 70% et 95% du volume total des cellules (Beker and Rapoport, 1987; Ellis and Minton, 2003). L'eau est un composant essentiel des biopolymères, des biomembranes et de nombreuses réactions biochimiques chez la levure. En fait, la vie ne se produit qu'en présence d'eau. D'une part, réduire la proportion d'eau dans les cellules est une nécessité dans les procédés industriels car cela permet d'améliorer la stabilisation de souches à température ambiante. D'autre part, retirer l'eau d'une matrice cellulaire vivante est un grand défi lorsque l'intérêt majeur est aussi de garder la viabilité des cellules et leur fonctionnalité après la disparition de l'eau.

Lors de l'élaboration des ferments levuriens, les cellules sont soumises à différents types de stress pouvant entraîner la mort cellulaire, tels que les variations osmotiques pendant la propagation de la biomasse, les stress nutritionnels dus à la consommation de nutriments, la cinétique de l'évaporation de l'eau par l'augmentation de la température de l'air pendant le séchage et l'oxydation (Attfield et al., 1997). En réponse aux variations environnementales durant la production et la stabilisation par séchage des levures, la cellule levurienne active la synthèse de différentes substances et l'expression de gènes liés à la protection cellulaire. Certaines de ces molécules sont associées à la résistance des cellules au stress thermo-oxydatif, comme le glutathion et le tréhalose.

2.1 Réponses cellulaires lors de la propagation de la biomasse

La première étape de production de levures est la préparation de la pré-culture (avant F1) (Figure 2-1). Cette étape consiste à récupérer les cellules soit par

réhydratation d'une suspension stockée congelée, soit par collecte directe des colonies isolées sur milieux gélosés. Ensuite, les cellules sont remises en suspension (ensemencement) dans une fiole contenant le milieu de culture stérile, normalement riche en nutriments (carbone, azote, acide aminés, vitamines) pour permettre aux cellules de se développer dans des conditions optimales. Après cette première étape de croissance, les cellules sont utilisées pour ensemencer le premier fermenteur (F1) et ensuite, après la formation de la biomasse, les levures sont transférées dans les bioréacteurs de volume plus important au cours de l'étape de fed-batch (F4-F5-F6) (Figure 2-1). Pendant l'étape de propagation, la biomasse est aérée de façon continue et la température réglée afin de favoriser le développement cellulaire.

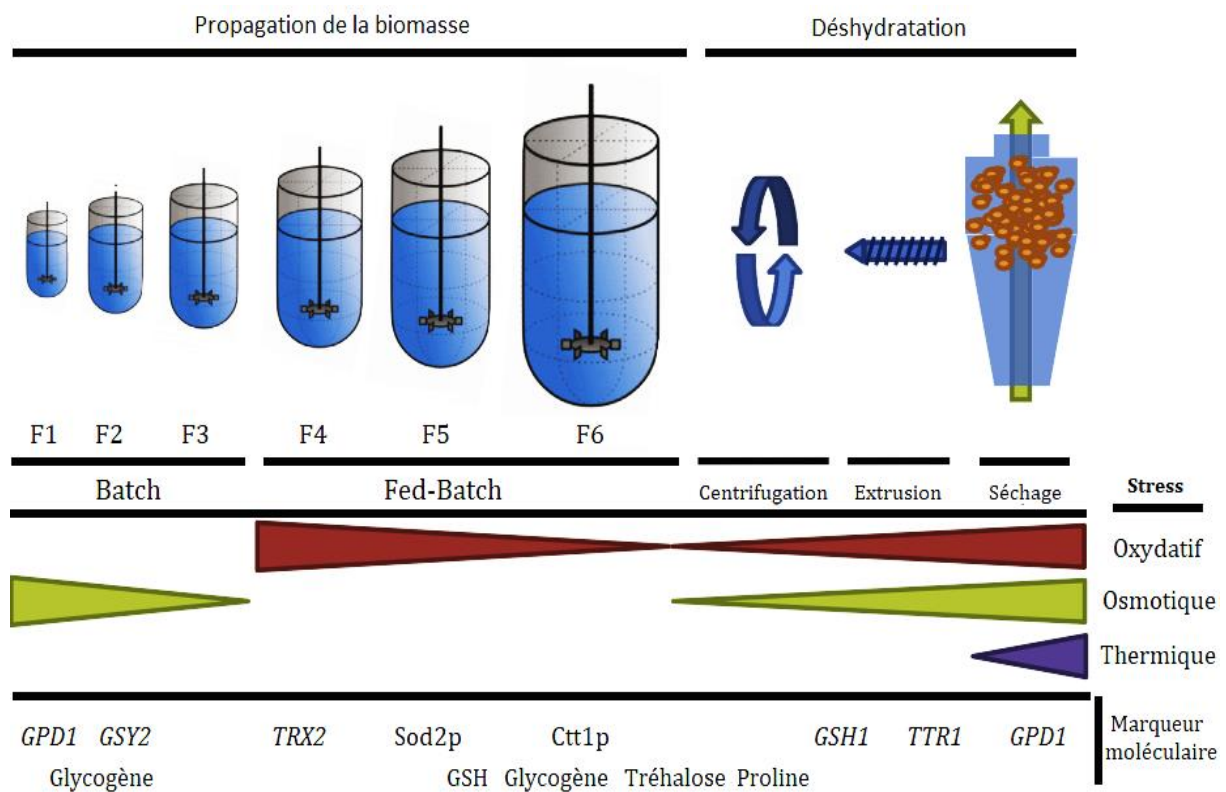


Figure 2-1 : Diagramme des différentes étapes de la production et de séchage de levures. La dynamique des paramètres physiologiques et moléculaires est présentée tout au long du processus de propagation de la biomasse jusqu'au séchage, avec les métabolites, les protéines et les modifications les plus importantes de l'expression génique qui se produisent pendant les principaux changements dans l'état des cellules de levure. D'après (Pérez-Torrado et al., 2015)

Durant l'étape de batch (F1 à F3), les levures sont soumises à un premier stress osmotique causé par la forte concentration de sucres et d'autres solutés dans le milieu.

La haute osmolarité entraîne l'expression des gènes *GPD1* (impliqué dans la production de glycérol) et *GSY2* (impliqué dans la synthèse du glycogène) (Figure 2-1). L'accumulation intracellulaire de glycérol neutralise la pression hyper-osmotique pour éviter la perte d'eau également pendant l'étape de séchage. La propagation des cellules amène à l'épuisement du glucose et l'expression du gène *GSY2* (Pérez-Torrado et al., 2005). Le glycogène est la principale source de carbone et la réserve d'énergie dans de nombreux organismes, y compris la levure. Le glycogène joue donc un rôle important pendant le stress nutritionnel.

L'aération constante du milieu pendant la phase de fed-batch (F4 à F6) a une conséquence directe sur le stress oxydatif. En réponse, la levure produit plusieurs métabolites antioxydants comme la thiorédoxine, le glycogène et le tréhalose. A la fin de la phase de fed-batch, et après une longue période en métabolisme respiratoire, certains gènes sont exprimés en réponse aux stress cellulaires, en particulier ceux liés au stress oxydatif (e.g. *TRX2* codant pour la thiorédoxine) (Gómez-Pastor et al., 2010a). Dans certaines conditions de culture et en réponse au stress oxydatif, les cellules expriment le gène *TRX2* et le gène *GSH1* codant pour la γ -glutamylcystéine synthétase, une enzyme essentielle qui catalyse la synthèse du glutathion (GSH). Ces deux molécules améliorent la résistance de la levure au stress oxydatif. La thiorédoxine et également le système glutathion/glutarédoxine constituent la défense la plus importante contre l'oxydation (Espindola et al., 2003; Gómez-Pastor et al., 2010a).

Le tréhalose s'accumule dans les cellules soumises à des limitations en carbone et en énergie, à la fois pendant la croissance diauxique dans un milieu relativement pauvre et lors de l'approche de la phase stationnaire dans un milieu riche en nutriments (Lillie and Pringle, 1980). La proline est un acide aminé important en termes de fonctions biologiques et d'applications biotechnologiques. En réponse au stress osmotique, la proline s'accumule dans la levure en tant qu'osmo-protecteur (Takagi, 2008). Par exemple, une souche mutante de la levure *Sc* accumulant de la proline a montré une forte tolérance dans la pâte à pain congelée par rapport à la souche sauvage (Kaino et al., 2008).

Les mécanismes physiologiques de réponse aux stress liés à la synthèse de glutathion et de tréhalose seront présentés dans la section 3.

2.2 Phase de récupération des cellules

Pour la préparation des levures à la déshydratation, les cellules sont récupérées par centrifugation et lavées plusieurs fois afin d'éliminer le milieu de culture résiduel qui peut influencer la viabilité des cellules lors de la déshydratation-réhydratation (Pérez-Torrado et al., 2015). Pour éliminer le maximum d'eau avant l'étape de séchage, la biomasse de levures est filtrée soit en tambours rotatifs sous vide soit par pressage. Après cette étape, la « pâte de levures », qui contient environ 30% de solides, est ensuite mise en forme de filaments granuleux par extrusion (Akbari et al., 2012; Bayrock and Ingledew, 1997a; Câmara Jr. et al., 2018). La taille des granulés est variable en fonction du diamètre de l'extrudeuse utilisée.

2.3 Addition de substances protectrices

Après la récupération de la biomasse et afin d'assurer une meilleure survie des levures pendant la déshydratation, les cellules sont mélangées à l'émulsifiant monostéarate de sorbitane (E491) et/ou à l'antioxydant acide ascorbique (E300) (Colavizza and Quipourt-Isnard, 2009). Ces deux additifs alimentaires sont autorisés dans l'Union Européenne (Aguilar et al., 2015; Mortensen et al., 2017).

Le monostéarate de sorbitane est un stabilisant-émulsifiant utilisé pour favoriser la résistance de la levure à la déshydratation-réhydratation. En tant qu'agent émulsifiant, sa fonction principale est de maintenir la stabilité du mélange eau-huile, en agissant probablement sur la stabilité de la membrane plasmique des cellules (Hasenhuettl, 2008).

L'acide ascorbique est une vitamine antioxydante principalement utilisée pour prévenir l'oxydation et la décoloration de certains aliments, tels que la bière, les fruits transformés et les confitures. L'acide ascorbique est un excellent capteur de radicaux libres qui réagit rapidement et inhibe leur propagation (Comuzzo and Zironi, 2013). Dans ce cas, son efficacité à protéger les cellules de levure pendant la déshydratation est probablement due à son activité antioxydante (Hellín et al., 2013).

Même si ces additifs sont actuellement autorisés et utilisés dans l'industrie agro-alimentaire et spécialement pour la production de levures déshydratées, la tendance est

d'éviter leur utilisation et, ainsi, favoriser le développement de nouvelles souches de levure sans aucun additif.

2.4 Séchage de levures

La forme déshydratée présente divers avantages par rapport aux autres formes de conservation de levures. D'une part, le stockage à long terme de levures sous forme liquide ou sur gélose réduit la stabilité génétique des souches, fréquemment associée à une perte de robustesse cellulaire dans les procédés de fermentation industriels (Boulton and Quain, 2007). D'autre part, le stockage à faible température (-80°C) peut réduire la génération de dérivés génétiques, par contre, ce n'est pas économiquement avantageux vue la nécessité de grandes quantités d'énergie. Dans ce cas, tout ce que les scientifiques spécialisés dans les levures pourront apporter en matière de réduction des coûts de production des levures sera bien accueilli par l'industrie et les consommateurs qui bénéficieront des économies réalisées (Verstrepen et al., 2006).

Le séchage de levures répond directement aux besoins de stabilité, facilité de manipulation, réduction des coûts d'entretien, de transport et de stockage. L'étape de séchage se fait par différentes méthodes et technologies, comme l'atomisation (*spray-dryer*) et la lyophilisation, mais le séchage en lit fluidisé reste la technique la plus utilisée pour la production industrielle de levures déshydratées.

2.4.1 L'eau

L'eau a un rôle physiologique, structurel et participe aux réactions essentielles pour la vie cellulaire. L'élimination de l'eau implique de sévères conséquences pour le maintien de la survie microbienne. En effet, l'eau doit être disponible de manière libre dans les cellules pour les réactions métaboliques et le maintien de la structure cellulaire (Ball, 2008). La disponibilité de l'eau est variable en fonction de la composition du produit/milieu et cette disponibilité est généralement exprimée sous forme d'activité de l'eau (a_w). a_w est définie comme le rapport entre la pression de vapeur de l'eau dans le soluté (ou dans les cellules) (p) et le milieu environnant par rapport à la pression de vapeur de l'eau pure (p_0) à la même température (Griffin, 1981) :

$$a_w = \frac{p}{p_0}$$

Lors des procédés de déshydratation des levures, l'eau présente dans les cellules est éliminée par l'action de deux propriétés physiques de l'air de séchage : l'humidité relative et la température. Lorsque l'équilibre de la vapeur et de la température est établi entre les cellules et l'air, l'activité de l'eau de l'échantillon est égale à l'humidité relative (HR) de l'air qui entoure l'échantillon (Deák and Deak, 2007; Gervais and Marechal, 1994) :

$$\%HR = a_w \times 100$$

Une définition plus précise de cette relation est le potentiel hydrique (ψ) qui fait référence à la pression de vapeur de l'air qui entoure les cellules lorsque les deux sont en équilibre (Marechal et al., 1995) :

$$\psi = \frac{RT}{V_w} \log a_w$$

où R est la constante universelle des gaz ($8314 \text{ J k}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), T est la température absolue (en K) et V_w est le volume molaire partiel de l'eau.

2.4.2 Sécheur en lit fluidisé

Le séchage en lit fluidisé est une technique couramment appliquée pour la déshydratation et l'encapsulation de différents produits agro-alimentaires et pharmaceutiques (Gouin, 2004). En raison de la grande surface de contact entre l'air et les granulés de levures dans le lit fluidisé, cette méthode permet de réduire considérablement le temps de séchage et d'améliorer la survie des cellules. Le gradient de température appliqué aux cellules est également moins impactant.

Le principe du séchage en lit fluidisé consiste à souffler de l'air chaud à travers les granulés de levure, du bas vers le haut, à une vitesse suffisante pour les maintenir en suspension (Figure 2-2). Afin de conserver la meilleure survie après le séchage, la température de l'air chaud d'entrée du lit fluidisé doit être réglée de manière à ce que les granulés de levures ne dépassent pas la température de 35-41°C (Pérez-Torrado et al., 2005). Le temps de séjour de particules dans le lit fluidisé est variable en fonction du volume de granulés à sécher et de l' a_w ou de la teneur en eau finale désirée. Pour assurer la meilleure viabilité de levures après le procédé de séchage-réhydratation, la teneur en

eau résiduelle doit être comprise entre 5 et 8% (Dupont et al., 2014). Après avoir atteint ce niveau, la quasi-totalité de l'eau libre présente dans les cellules est éliminée.

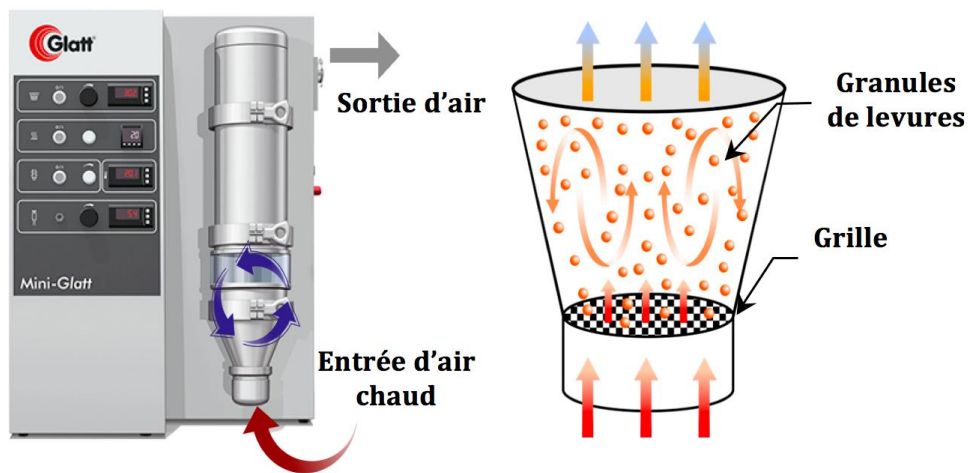


Figure 2-2 : Schéma illustratif du sécheur en lit fluidisé à batch. Les granules de levures sont déposés sur une grille et l'air chaud passe à travers pour les maintenir en suspension. D'après (www.glatt.com)

Deux phénomènes se produisent pendant le séchage convectif des levures : (i) l'eau présente sur la surface des granules de levures s'évapore dans l'environnement ; (ii) à l'intérieur des granules l'eau se disperse, ceci est dû à la diffusion (Beker and Rapoport, 1987).

Dans ce cas, le taux d'évaporation peut être décrit par :

$$I = -D \frac{P_b}{P_b - P_s} \Delta C$$

où I est la quantité d'eau évaporée de la surface du granulé ($\text{kg m}^{-2} \text{h}^{-1}$) ; D est le coefficient de diffusion ($\text{m}^2 \text{h}^{-1}$) ; ΔC est le gradient de concentration (kg m^{-4}) ; P_b est la pression atmosphérique (mm Hg) ; et, P_s est la pression partielle de la vapeur d'eau (mm Hg).

Le granulé de levure destiné au séchage en lit fluidisé est caractérisé comme une matrice poreuse. Dans ce cas, pendant le séchage l'humidité traverse cette matrice sous forme liquide et vapeur. La loi du transfert d'humidité à l'intérieur des granules peut être décrite comme (Lykov, 1968) :

$$i = -k\gamma_0 \Delta u$$

où i est la conductivité de l'eau ($\text{kg m}^{-1} \text{h}^{-1}$) ; k est le coefficient de conductivité de l'humidité de la biomasse ($\text{m}^2 \text{h}^{-1}$) en fonction des coefficients de diffusion de la vapeur et du liquide ; γ_0 est la masse absolue du corps sec par unité de volume humide (kg m^{-3}) ; et Δ_u est le gradient d'humidité.

2.4.3 Séchage par contrôle de l'humidité relative (couche mince)

Plusieurs études montrent que la cinétique de déshydratation des cellules de levure est fortement liée à la conservation (ou réduction) de la viabilité cellulaire (Beker and Rapoport, 1987; Lemetais et al., 2012; Nguyen et al., 2017; Rapoport, 2017). Ce fait est attribué essentiellement au transfert de matière, en particulier de l'eau, pendant les variations hydriques.

Les changements dans le potentiel hydrique du milieu et l'hydratation cellulaire se produisent simultanément. En effet, le potentiel hydrique du cytoplasme et le potentiel externe s'équilibrent très rapidement (Dupont et al., 2014). Cet équilibre est réalisé principalement par osmose, parce que l'eau traverse les membranes des cellules beaucoup plus rapidement que tous les solutés, en particulier chez la levure (Gervais and Marechal, 1994).

Basé sur ces principes, le séchage en couche mince se fait par l'équilibre entre l' a_w d'une solution saline saturée (dont le soluté est non-volatil) et l'air. L' a_w (ou %HR) dans la boîte réduit rapidement au fur et à mesure que la température augmente. Sur la Figure 2-3 est représenté le schéma de la boîte hermétique.

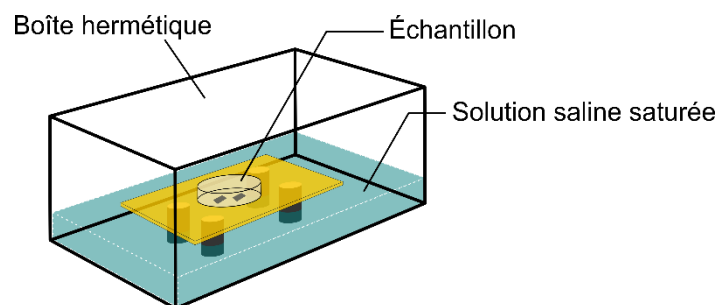


Figure 2-3 : Représentation schématique de la boîte hermétique à l'humidité relative (HR) contrôlée. Les solutions salines saturées couvrent la partie inférieure de la boîte. Les supports en polypropylène contenant les échantillons de levure sont déposés sur un portoir.

En effet, différentes solutions salines peuvent être utilisées pour contrôler l'HR dans l'environnement. Le Tableau 2-1 présente des exemples d'humidités relatives à l'équilibre utilisant différentes solutions salines saturées et des températures comprises entre 10°C et 60°C.

Tableau 2-1 : Humidité relative de différentes solutions de salines saturées à températures de 10 à 60°C

T °C	Humidité relative (%)				
	Chlorure de sodium ^a	Chlorure de potassium ^a	Nitrate de potassium ^a	Bromure de sodium ^a	Acétate de potassium
10	75,67	86,77	95,96	62,15	23,38 ^a
20	75,47	85,11	94,62	59,14	23,11 ^a
30	75,09	83,62	92,31	56,03	21,61 ^a
40	74,68	82,32	89,03	53,17	20,61 ^b
50	74,53	81,20	84,78	50,93	18,99 ^b
60	74,50	80,25	-	49,66	17,58 ^b

^a Greenspan (Greenspan, 1977)

^b Labuza et al. (1985)

2.4.4 Stress thermique

Les cellules eucaryotes, telles que les levures, réagissent à l'augmentation de la température dans leur environnement. En effet, la température a un rôle crucial dans la survie microbienne pendant les procédés de séchage/déshydratation. L'augmentation progressive de la température des levures permet aux cellules d'acquérir une résistance au stress thermique, tandis que le choc thermique réduit drastiquement la viabilité/vitalité des cellules (Guyot et al., 2015). La perturbation de la température dans l'environnement cellulaire a deux conséquences : le transfert d'eau (rapide) et le transfert de chaleur (plus lent). Ces deux perturbations amènent à la production d'un gradient osmotique entre les milieux intra et extracellulaire (Gervais and de Marañon,

1995). La sortie soudaine de l'eau de la cellule peut induire la mort cellulaire, due principalement à l'augmentation du gradient osmotique, au transfert de chaleur et à la réduction du volume cellulaire (Gervais and Marechal, 1994). Cette perturbation peut être réversible en fonction du gradient de température appliqué et jusqu'à la récupération du volume initial de la cellule après la normalisation de la température et des niveaux hydriques.

Des modifications significatives se produisent dans la membrane plasmique en réponse à une augmentation de la température, par exemple des changements sur la fluidité membranaire associés à la synthèse des sphingolipides et des stéroïdes (Gaspar et al., 2008), ainsi que la température de transition de phase de la membrane et les enzymes présentes dans la membrane cellulaire (Pham-Hoang et al., 2013). L'augmentation de la température peut amener également à la perméabilisation de la membrane plasmique. Cette perméabilisation peut être transitoire, i.e. les cellules récupèrent leur état physiologique après la normalisation de gradients de température, ou permanente, c'est-à-dire que la perméabilisation de la membrane induite par la température est létale pour les cellules. En effet, le maintien des cellules de levure à des températures supérieures à 40°C semble offrir une faible protection contre l'augmentation de la perméabilité de la membrane dans les cinq premières minutes de stress thermique (Panaretou and Piper, 1992). D'autre part, la perméabilisation de la membrane peut amener à l'internalisation de grandes quantités de solvants présents dans l'environnement après la réhydratation. Ceci représente probablement un mécanisme de compensation à la perte d'eau due à l'augmentation de la température ou aux variations osmotiques (Da Silva Pedrini et al., 2014). Une explication pour ce phénomène peut être attribuée à l'activité de l'enzyme H⁺-ATPase qui catalyse le flux de protons au niveau de la membrane plasmique. Dans certaines conditions, ce flux de protons dissipe la force motrice des protons résultant du stress thermique, conduisant à la perméabilité membranaire (Coote et al., 1994).

Lorsque la levure est soumise aux températures supérieures au niveau physiologique, les cellules activent une série de réponses au choc thermique afin de s'adapter à cette nouvelle condition. Par exemple, quand la température d'incubation de la levure *Sc* passe de 25°C à 38°C la synthèse d'environ 50 protéines de choc thermique (HSP, *Heat Shock Proteins*) est déclenchée (Boy-Marcotte et al., 1999). L'augmentation de la

température exerce également un grand effet sur la dénaturation des protéines cellulaires, altérant la synthèse du tréhalose et la fonctionnalité du système protéasome et ubiquitine, responsables de la protection des membranes cellulaires et de la destruction de protéines défectueuses, respectivement (Ta et al., 2012). Chez la levure, la dénaturation des protéines et la formation d'agrégats de protéines peuvent être toxiques pour les cellules. Dans ce cas, la surexpression de l'ubiquitine peut rétablir la résistance des cellules au choc thermique, due à la réduction des niveaux de ces agrégats par le système protéasome et ubiquitine (Riezman, 2004).

2.4.5 Stress oxydatif

L'oxydation est l'un des stress les plus importants que subissent les cellules de levure lors de leur formulation en industrie, en particulier dans la production de levures déshydratées. Dans ce processus, l'air de séchage a une grande influence sur l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, *reactive oxygen species*), ce qui impacte directement l'activité et la viabilité des levures. Cette accumulation a été décrite comme l'un des principaux inducteurs de divers dysfonctionnements cellulaires chez la levure, d'une manière dépendante de la concentration de ROS (Ayer et al., 2013; Farrugia and Balzan, 2012).

Au cours de la déshydratation, le contact des cellules avec l'air entraîne la production de molécules extrêmement réactives – l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le radical hydroxyle ($\bullet OH$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et les hydroperoxydes (R-OOH) – souvent associées à l'accumulation de ROS spécialement en présence d'ions métalliques (Jamieson, 1998). En effet, la réduction de la teneur en eau lors de la déshydratation augmente la surface de contact des cellules avec l'air, activant une série de réactions telles que la désactivation des protéines et des enzymes responsables de l'élimination des ROS (Dupont et al., 2014) conduisant à la mort cellulaire (Rapoport, 2017).

Des études démontrent que pendant la formulation de la biomasse, les levures peuvent aussi subir un stress oxydatif (Garre et al., 2010; Pérez-Torrado et al., 2005). En faisant varier les conditions de culture de la levure, en particulier les niveaux d'oxygène dissous, il est possible de stimuler les levures pour que les cellules maintiennent leur métabolisme fermentaire (faibles niveaux de ROS), ou changent de métabolisme pour passer en métabolisme respiratoire (augmentation des niveaux de ROS). Les lipides

membranaires sont particulièrement sensibles à l'accumulation de ROS dans les cellules en raison des doubles liaisons des chaînes d'acides gras insaturés dans les phospholipidiques (Catalá, 2009). La présence d'oxygène lors de l'aération du milieu influence la stabilité lipidique de la cellule (Gibson et al., 2007; Gómez-Pastor et al., 2010b, 2011).

Lorsque les levures atteignent la phase stationnaire pendant la propagation de la biomasse en batch les cellules peuvent acquérir une résistance à une série de stress, y compris le stress oxydatif (H_2O_2 et $O_2^{\bullet-}$) (Jamieson, 1992), dont la transcription de plusieurs gènes codant pour des protéines de choc thermique, tels que Hsp150, Hsp84, Hsp70, Hsp26 et Hsp12 (Piper, 1993). D'autre part, lors de l'épuisement des nutriments à la fin de la phase stationnaire, les levures sont plus sensibles au stress oxydatif et l'affaiblissement du métabolisme cellulaire rend les lipides plus susceptibles à l'attaque par les ROS (Wang, 2016).

Afin de résister au stress oxydatif les cellules de levure sont capables de s'adapter à l'environnement oxydatif qui serait normalement mortel. L'expression de gènes comme *TRX2* et *GSH1* qui activent la synthèse de la thiorédoxine et du glutathion est souvent associée à l'acquisition de la résistance à l'oxydation par les cellules de levure (Fernandes et al., 2007; Grant, 2001).

L'accumulation de ROS dans les cellules de levure induit une série de réponses à l'attaque oxydative, schématisées sur la Figure 2-4, pouvant permettre la survie cellulaire (verte) ou au contraire induire la mort cellulaire (rouge). En réponse au stress oxydatif, les facteurs de transcription sont activés, ainsi que les gènes impliqués dans la régulation des défenses antioxydantes de la cellule : synthèse du glutathion ou synthèse d'enzyme catalase. Ces mécanismes, associés au système ubiquitine-protéasome, aident à éliminer les protéines défectueuses et à assurer la survie des cellules. La cellule peut également activer son système d'autophagie qui élimine les organites et les composants défectueux. Cependant, l'augmentation du degré d'autophagie peut conduire à la mort cellulaire programmée. De plus, la surexposition des cellules aux ROS peut mener à d'autres voies telles que l'apoptose, la nécrose et d'autres voies de mort cellulaire non encore documentées (Farrugia and Balzan, 2012).

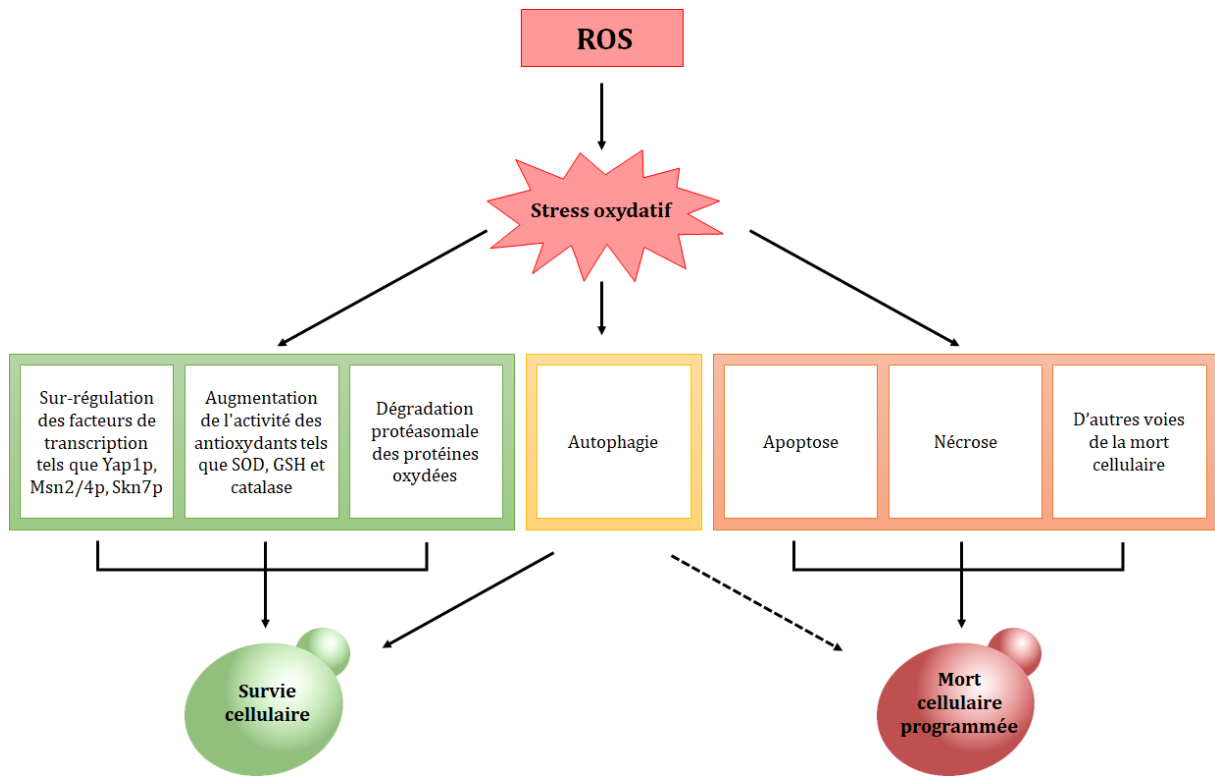


Figure 2-4 : Réponses cellulaires au stress oxydatif chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* qui occasionnent la survie cellulaire ou la mort cellulaire programmée. Adapté de (Farrugia and Balzan, 2012)

Lors de la production de levures déshydratées, les cellules sont soumises à une série de stress qui peuvent affecter leur viabilité et leur activité cellulaire après la déshydratation-réhydratation. L'eau joue un rôle central dans la survie des cellules. En fait, les conditions de formulation du milieu de production et de cinétique de déshydratation affectent directement la viabilité cellulaire. Les amplitudes des stress nutritionnel, thermique et oxydatif sont les principaux responsables du maintien (ou de la réduction) de la viabilité des levures. Afin de résister à ces stress (qui sont également des stress couramment rencontrés dans la nature), les levures ont développé un système avancé de détoxification et de synthèse de molécules. L'expression génique associée à la synthèse du glutathion (contre le stress oxydatif) et au tréhalose (contre les effets de la température / nutrition) semblent être les principaux responsables de l'acquisition chez les levures de la résistance à l'oxydation et de la thermo-résistance, respectivement.

3 Mécanismes de résistance à la déshydratation

Dans la nature, les levures peuvent se développer sur différentes surfaces et environnements, tels que le sol, les plantes et les roches. Par conséquent, les cellules sont souvent soumises à des conditions environnementales anormales, telles que les fluctuations de température, d'humidité et d'oxygène (Gorbushina and Broughton, 2009; Landry et al., 2006).

Les levures sont des organismes décrits comme des anhydrobiotiques. Le phénomène de l'anhydrobiose est un état dans lequel les cellules suspendent temporairement et de manière réversible leur métabolisme dans des conditions défavorables, par exemple pendant le séchage à des niveaux d'humidité extrêmement faibles. Dans ce cas, après la normalisation des niveaux hydriques (réhydratation), les cellules peuvent récupérer leur activité métabolique, se multiplier et croître à nouveau (Dupont et al., 2014; Rapoport, 2017).

Lors du séchage, la diffusion de l'eau de l'intérieur de la cellule vers le milieu extérieur est une question de cinétique. Une diffusion d'eau plus lente (séchage moins impactant) permet aux cellules de synthétiser différentes substances, en particulier dans les premières étapes du séchage convectif (Ratnakumar et al., 2011). La capacité des levures à survivre aux cycles de déshydratation-réhydratation a été corrélée à la synthèse de grandes quantités de glutathion et de tréhalose (Eleutherio et al., 2015; Espindola et al., 2003).

Dans ce contexte, l'enrichissement du milieu de culture peut augmenter la stabilité de la levure pendant le séchage. Par exemple, l'addition de 0,1% d'extrait de levure au milieu de culture augmente la viabilité de la levure *Sc* de 30% à 65%. L'enrichissement des cellules en glutathion peut augmenter jusqu'à 54% la résistance des cellules de levure déshydratées par séchage convectif (Beker and Rapoport, 1987). En outre, l'accumulation de tréhalose intracellulaire augmente dans les premières heures de l'épuisement nutritionnel et jusqu'à trois heures avant la fin de la propagation de la biomasse.

3.1 Glutathion : le tampon redox cellulaire

Le glutathion (GSH, γ -L-Glutamyl-L-cystéinyglycine) est un tripeptide constitué de trois acides aminés : la cystéine, la glycine et l'acide glutamique (Figure 3-1). Le GSH, rencontré dans la plupart des cellules, est le thiol non protéique le plus abondant dans la levure et il est considéré comme le principal tampon redox cellulaire. Le GSH existe sous deux formes différentes, GSHr (réduit) et GSSG (oxydé), et il participe à plusieurs réactions intracellulaires.

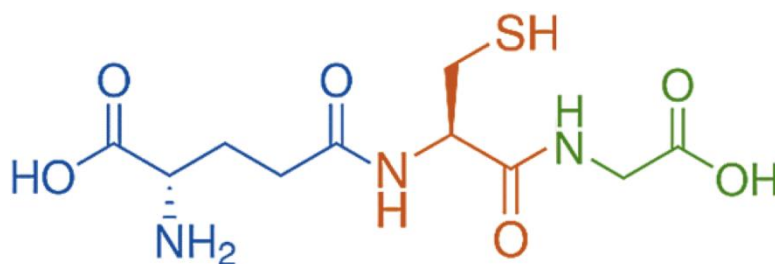


Figure 3-1 : Structure moléculaire du glutathion et des acides aminés qui le constituent. (bleu) l'acide glutamique; (orange) la cystéine; et (vert) la glycine.

Le glutathion fournit une source abondante d'équivalents réducteurs pour la réduction des liaisons disulfures au sein des protéines, la neutralisation des radicaux libres et la détoxification des xénobiotiques (Penninckx, 2002). Pendant le stress thermique, oxydatif ou nutritionnel les cellules sont soumises aux variations de leur potentiel redox qui peuvent amener à l'induction de la mort cellulaire. Dans ce cas, le glutathion intervient afin d'équilibrer les réactions d'oxydation/réduction et assurer la survie cellulaire. Deux enzymes participent au système de synthèse et de recyclage du GSH, la glutathion peroxydase et la glutathion réductase, soit par la réduction de liaisons disulfure natives, soit en éliminant les espèces réactives de l'oxygène présentes dans le cytosol.

3.1.1 Synthèse du glutathion

Le mécanisme de la synthèse-dégradation du glutathion est schématisé par les flèches rouges sur la Figure 3-2. La première étape consiste par la formation de la γ -glutamylcystéine (γ -Glu-Cys) à partir de la cystéine (Cys) et du glutamate (Glu), cette réaction est catalysée par la γ -glutamylcystéine synthétase. La deuxième étape se fait

par la GSH synthétase qui forme une liaison peptidique entre une glycine (Gly) et le γ -Glu-Cys pour former une molécule de GSH (Meister, 1988).

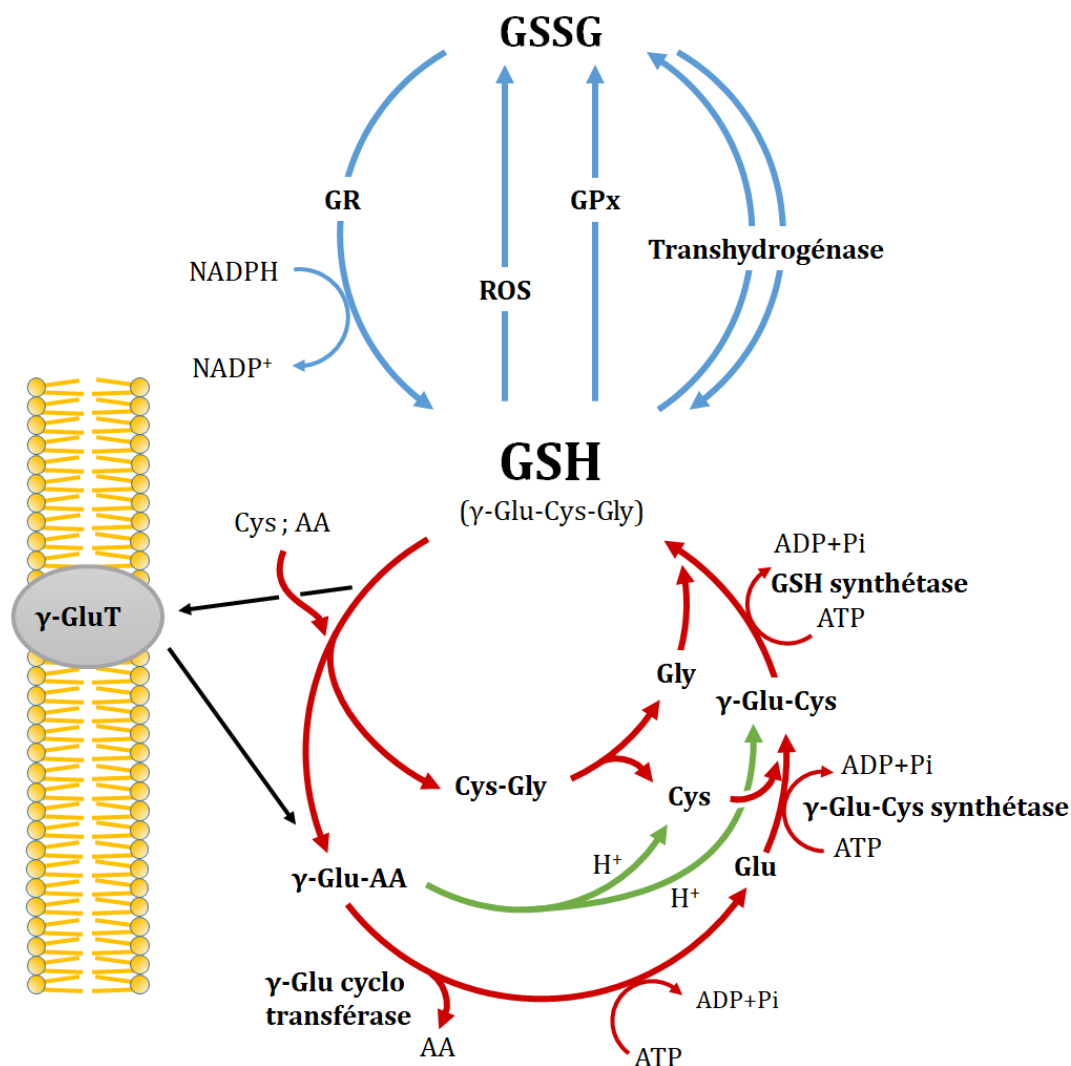
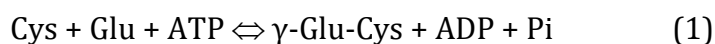


Figure 3-2 : Cycle du glutathion (GSH et GSSG). AA, acides aminés ; Glu, glutamate (ou acide glutamique) ; Gly, glycine ; Cys, cystéine. Adapté de (Meister, 1988)

L'étape de la synthèse de glutathion peut être résumée par les deux réactions suivantes :



Le cycle de dégradation du GSH est très important parce qu'il permet le recyclage du GSH et le transport d'acides aminés dans la cellule. Ce catabolisme commence au niveau de la membrane par la γ -glutamyl transpeptidase (γ -GluT) qui catalyse le transfert du γ -glutamyl sur un acide aminé (γ -Glu-AA). La cystéinyglycine (Cys-Gly) produite par le

clivage du glutathion est également introduite dans la cellule. Ensuite, l'acide aminé est libéré du glutamate par la γ -glutamyl cyclo transférase et le cycle de la synthèse du glutathion continue comme décrit précédemment.

Le disulfure de glutathion (GSSG) est formé par l'action de la glutathion peroxydase (GPx) (flèches bleues, Figure 3-2) qui réduit le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et les peroxydes organiques résultants du métabolisme cellulaire et formés par les ROS. L'action des glutathion transhydrogénases (thiol transférases) et de la glutathion réductase (GR) participe également à la formation-réduction de groupes disulfures de protéines.

3.1.2 Rôle du GSH contre le stress oxydatif

Le glutathion réduit (GSH) et le disulfure de glutathion (GSSG) participent au cycle redox du glutathion total (GSht). La glutathion peroxydase (Gpx) et la glutathion réductase (GR) protègent les protéines et les membranes cellulaires de l'oxydation dans une réaction couplée à l'oxydation du NADPH fourni par la voie du pentose phosphate (PPP) et l'élimination du H_2O_2 (Figure 3-3).

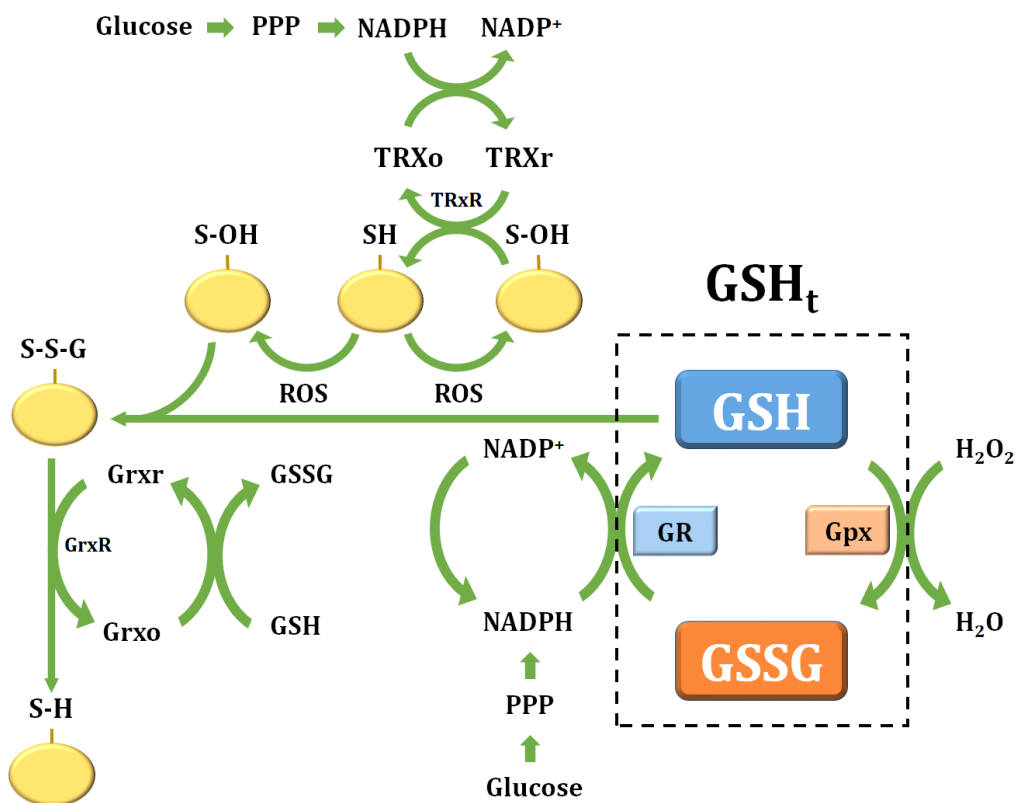


Figure 3-3 : Cycle de l'équilibre d'oxydoréduction impliqué dans la protection des groupes disulfures des protéines contre l'oxydation. Adapté de (McBean, 2017)

Le cycle redox du GSht a lieu dans le cytosol, dans les membranes et dans les mitochondries. La thiorédoxine réductase (TRxR) catalyse le transfert d'électrons de la thiorédoxine réduite (TRXr), qui est régénérée par transfert d'électrons du NADPH à la thiorédoxine oxydée (TRXo). La glutarédoxine-réductase (GrxR) catalyse le transfert d'électrons de la glutarédoxine réduite (Grxr) à la glutarédoxine oxydée (Grxo), elle-même régénérée par l'oxydation du GSH en GSSG (McBean, 2017).

La fonction essentielle de la membrane plasmique est la délimitation de l'espace intra et extracellulaire en contrôlant le flux d'ions et de molécules d'une façon à maintenir les niveaux appropriés des composés nécessaires au bon fonctionnement du métabolisme (Rothstein, 1971). Même si la plupart du glutathion se trouve dans l'espace intracellulaire, l'activité de la γ -glutamyl transpeptidase est fortement liée aux membranes cellulaires (Griffith and Meister, 1979). Les travaux de Tate et al. (1979) ont mis en évidence qu'une partie de cette enzyme est également liée à la surface externe de la membrane. Dans ce cas, le cycle du glutamyl, qui est impliqué dans le maintien de l'équilibre redox chez la levure, est en partie réalisé dans les membranes, en réduisant

les groupes disulfures présents dans la cellule. La Figure 3-4 illustre le mécanisme du cycle du glutamyl associé à la membrane.

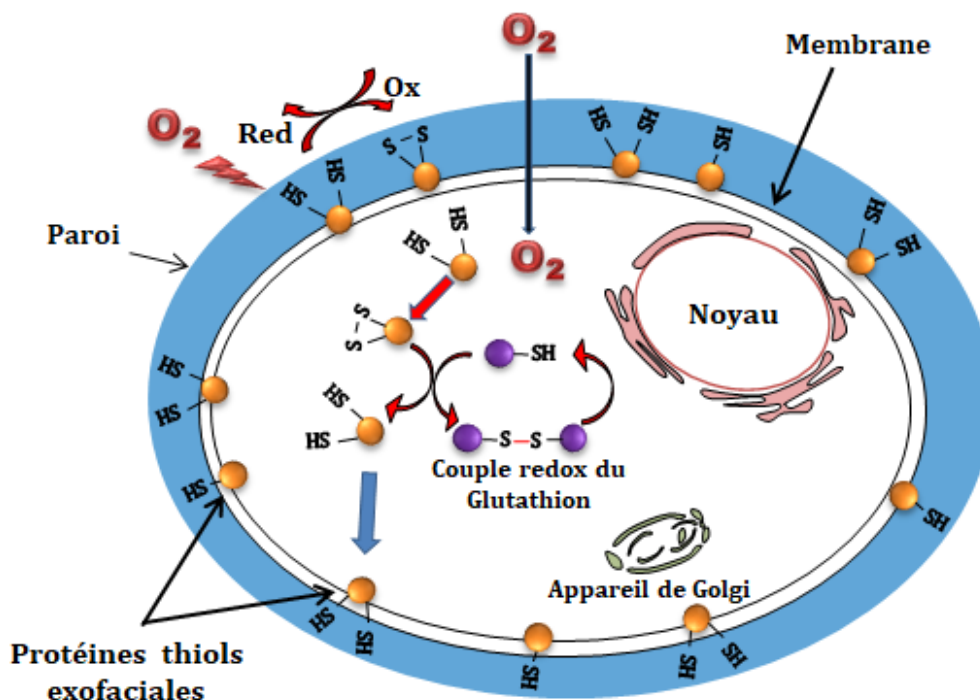


Figure 3-4 : Mécanisme schématisé de l'équilibre redox dans les levures. Le glutathion participe à la détoxification des ROS intracellulaires et à la réduction de ponts disulfures dans la membrane plasmique.

D'autre part, la diminution de la teneur en glutathion est aussi associée à la mort cellulaire programmée (apoptose) (Ghibelli et al., 1999). Le stress oxydatif entraîne une augmentation du rapport GSSG:GSH due à la teneur croissante en disulfure du glutathion par rapport au glutathion réduit. En effet, le stress oxydatif amène à la formation des composants sulféniques dérivés qui interagissent avec le glutathion et forment les ponts disulfures (Filomeni et al., 2002).

3.2 Tréhalose : le disaccharide protecteur

Le tréhalose (α -D-glucopyranosyl- α -D-glucopyranoside) est un disaccharide non-réducteur constitué de deux molécules de glucose liées par une liaison 1,1- α -glycosidique (Figure 3-5).

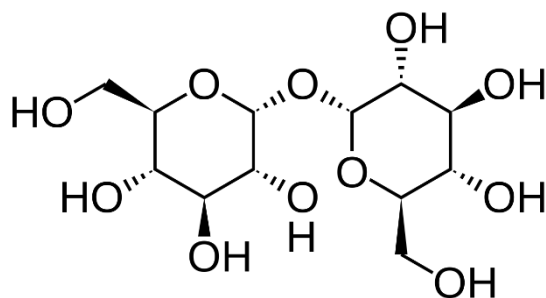


Figure 3-5 : Structure moléculaire du tréhalose. Les deux molécules de glucose sont liées par une liaison glycosidique.

Les levures sont capables de produire et de stocker de grandes quantités de tréhalose (Lillie and Pringle, 1980). Lorsque les nutriments s'épuisent en phase stationnaire, les levures accumulent beaucoup plus de glucides de réserve (tréhalose et glycogène) que les cellules en phase exponentielle. De plus, les cellules riches en tréhalose acquièrent des résistances à divers types de stress environnementaux (séchage, oxydation, température) (Werner-Washburne et al., 1993). Ce disaccharide est souvent associé à l'amélioration de la résistance microbienne à la déshydratation (Cerrutti et al., 2000). D'une part, le tréhalose évite la fusion des membranes en remplaçant les molécules d'eau présentes dans la membrane plasmique (Golovina et al., 2010). D'autre part, le tréhalose peut également agir comme antioxydant. Pour ces raisons, l'enrichissement des cellules en tréhalose a été démontré comme une stratégie efficace pour augmenter la viabilité cellulaire avant, pendant et après la déshydratation (D'Amore et al., 1991). En outre, l'addition de 10% de tréhalose dans le milieu favorise la protection des cellules contre la congélation (Coutinho et al., 1988).

3.2.1 Synthèse du tréhalose

Sur la Figure 3-6 sont exposées les étapes du mécanisme de biosynthèse du tréhalose chez la levure *Sc*. Initialement, le glucose est transporté par les hexoses perméases (HXP) dans la cellule. Grâce à l'hexokinase (Hxk), le glucose est phosphorylé en glucose-6-phosphate (G6P) en utilisant de l'ATP. Ensuite, la phosphoglucomutase (Pgm) convertit le G6P en glucose-1-phosphate (G1P). Le G1P est combiné avec de l'uridine triphosphate (UTP) à travers de l'UDP-glucose phosphorylase (UDPgp) pour former l'uridine diphosphate glucose (UDPG). Le complexe enzymatique TPS (tréhalose-6-phosphate synthase) catalyse la réaction du G6P avec l'UDPG pour former le tréhalose-

6-phosphate (T6P). L'enzyme tréhalose-6-phosphate phosphatase (TPP) hydrolyse le groupe phosphate du T6P pour former la molécule de tréhalose.

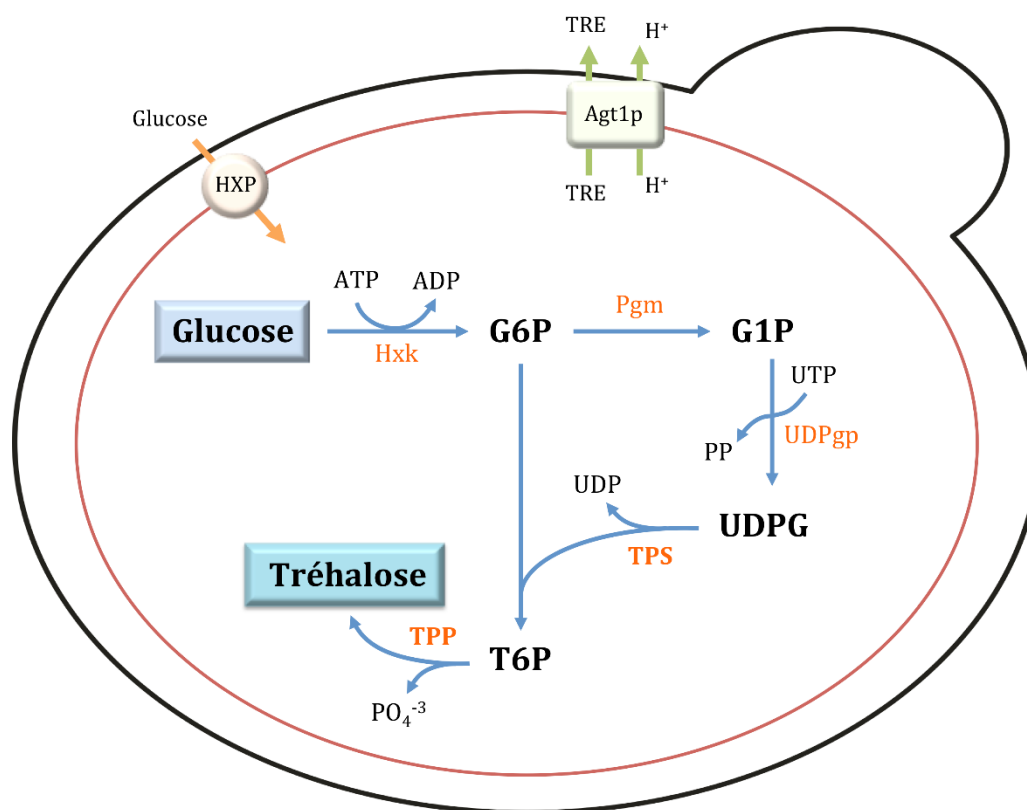


Figure 3-6 : Mécanisme de synthèse du tréhalose chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Les étapes sont détaillées dans la section 3.2.1. D'après (Eleutherio et al., 2015)

Des études ont démontré que pour assurer sa capacité de protection, le tréhalose doit être situé de part et d'autre de la membrane plasmique (Crowe et al., 2011; Eleutherio et al., 1993b). Après la synthèse du tréhalose, la levure code pour un alpha-glucoside transporteur Agt1p qui participe au déplacement du tréhalose à travers la membrane (da Costa Morato Nery et al., 2008; Plourde-Owobi et al., 1999).

3.2.2 Rôle du tréhalose et la résistance au séchage

Le tréhalose est associé à l'acquisition de résistance à diverses conditions environnementales défavorables aux cellules. Le groupe de Crowe (Crowe et al., 1984, 1988) a été l'un des premiers à démontrer les effets du tréhalose sur l'augmentation de la température de transition vitreuse (T_m) dans les phospholipides. Leurs résultats ont démontré que le tréhalose interagit avec les liaisons hydrogène des groupes hydroxyle des glucides et les groupes polaires des phospholipides. Pendant la déshydratation, le

tréhalose est capable de remplacer les molécules d'eau dans les membranes cellulaires, ce qui augmente la stabilisation des cellules après le séchage. D'autre part, l'accumulation de tréhalose intracellulaire est associée à l'augmentation de la viscosité et par conséquent, à la protection des biomolécules indispensables à la survie microbienne (Buitink and Leprince, 2004; Eleutherio et al., 2015).

L'augmentation de la teneur en tréhalose chez la levure *Sc* est corrélée à l'acquisition de résistance à la déshydratation (Coutinho et al., 1988). D'autres études montrent que ce disaccharide est associé à la résistance des cellules de levures à divers types de stress, telles que les températures élevées (Eleutherio et al., 1993a), la présence d'éthanol (Mansure et al., 1994), les variations osmotiques (Eleutherio et al., 1997), l'oxydation (Herdeiro et al., 2006) et la congélation (Hino et al., 1990). D'autre part, la réhydratation des levures déshydratées amène à une diminution rapide de la teneur en tréhalose intracellulaire. Pendant la réhydratation, une partie du tréhalose peut également s'échapper dans l'environnement externe en raison de l'augmentation de la perméabilité des membranes. Environ 16% du tréhalose peut s'échapper dans les dix premières minutes de réhydratation. Cependant, même en tenant compte de ces phénomènes, la viabilité des cellules est souvent élevée (93%) en présence du tréhalose (Beker and Rapoport, 1987).

Pour un séchage industriel des levures, il est indispensable que les nouvelles souches de levure d'intérêt soient capables de résister à différents types de stress lors de la formulation, du séchage, du stockage et jusqu'à leur mise en œuvre après la réhydratation. L'accumulation de tréhalose par les levures est associée à une meilleure performance fermentaire des cellules, grâce à la protection vis-à-vis d'un stress oxydatif. Ceci entraîne une augmentation de la stabilité des levures à long terme (Trevisol et al., 2011). En effet, le tréhalose peut également agir comme antioxydant. Cette capacité est attribuée à la réduction de la carbonylation des protéines, par exemple lors de l'exposition des cellules au peroxyde d'hydrogène (Benaroudj et al., 2001). De plus, le tréhalose peut réduire la peroxydation lipidique pendant la déshydratation, un facteur extrêmement important lors des processus de séchage de levures, puisque l'oxydation des lipides est souvent associée à la perte de viabilité cellulaire.

Les procédés de transformation des levures pour atteindre l'état déshydraté génèrent une série de conséquences pour la survie des cellules, parfois négatives ou positives. Des mécanismes complexes de détoxication des espèces réactives de l'oxygène et la surexpression des gènes induisant la synthèse de substances protectrices se produisent simultanément. Plusieurs études ont corrélé l'un ou l'autre de ces mécanismes avec le maintien de la viabilité des levures. Parmi ceux-ci, le glutathion (tripeptide antioxydant) et le tréhalose (disaccharide protecteur) se distinguent par leur capacité à protéger les cellules contre les attaques oxydantes et le maintien de la structure cellulaire, respectivement. Les levures peuvent synthétiser ces deux substances naturellement en fonction des conditions de culture. Dans ce cas, la modulation des paramètres de propagation de la biomasse semble être une étape clé de la survie des cellules lors des procédés de déshydratation.

III. Objectifs de l'étude

L'analyse bibliographique a démontré le fort intérêt que suscite l'obtention de nouvelles souches de levures non-*Saccharomyces* déshydratées. Les stress induits par la transformation des levures en formes déshydratées génèrent une série de dommages cellulaires qui affectent leur viabilité. Des nombreux phénomènes physiologiques ont déjà été largement documentés pour l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*, mais les mécanismes de résistance aux stress thermiques et oxydants au cours des procédés de formulation-déshydratation des levures non-*Saccharomyces* restent peu étudiés.

Les levures sont capables de produire des substances qui les protègent des effets néfastes de l'épuisement en nutriments, de la chaleur et de l'oxydation. Parmi eux, le glutathion et le tréhalose semblent jouer un rôle prédominant dans le maintien de la viabilité microbienne avant, pendant et après la déshydratation. Ces deux substances peuvent être synthétisées naturellement par les levures en fonction des conditions de culture spécifiques. Ainsi, la substitution de l'addition de substances protectrices par la modulation de la teneur intracellulaire de ces deux composants peut potentiellement générer de nouvelles espèces de levures déshydratées sans additifs.

Cette thèse vise à élucider les phénomènes physiologiques associés à la biosynthèse du glutathion et du tréhalose chez les levures non-*Saccharomyces*, ainsi que la corrélation avec l'acquisition de la résistance aux dommages cellulaires causés par les procédés de production de levures. La compréhension de ces phénomènes fondamentaux permettra l'obtention de nouvelles souches de levures déshydratées hautement performantes, ainsi que la détermination des stratégies innovantes de protection des levures sensibles.

Pour ce faire, nous avons choisi les levures non-*Saccharomyces* *Torulasporea delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima* et *Lachancea thermotolerans*, qui ont été sélectionnées en raison de leur fort potentiel d'application dans l'industrie agro-alimentaire. De plus, à l'heure actuelle, il n'existe aucune étude sur la résistance de ces trois souches en utilisant plusieurs paramètres physiologiques liés à la survie cellulaire et en différentes conditions de culture et de déshydratation.

Les chapitres de la thèse ont été divisés d'une manière à répondre à une série de questions soulevées au cours de l'étude bibliographique :

- Quelles sont les meilleures conditions pour la synthèse du glutathion et du tréhalose et leur rôle dans la résistance à la déshydratation en condition pré-pilote ?
- Quel est l'effet de l'accumulation du glutathion et du tréhalose sur la cultivabilité et la stabilité cellulaire à long terme ?
- Ces conditions prédéfinies s'appliquent-elles aux levures non-*Saccharomyces* ?
- Quel est le rôle du glutathion et du tréhalose sur la résistance des levures non-*Saccharomyces* à la déshydratation ?
- Le stress oxydatif induit par les procédés de production des levures peut-il être réduit en enrichissant les cellules en glutathion ?
- Quels sont les changements biochimiques chez la levure la plus sensible qui affectent leur survie pendant la déshydratation ?

Pour répondre à ces questions, la stratégie utilisée est la suivante.

- Les cellules ont été cultivées dans différents milieux de culture inducteurs de la synthèse du glutathion et du tréhalose, soit en fiole (250 ml), soit en bioréacteur (2 L).
- Les effets de la déshydratation ont été évalués après le séchage en lit fluidisé (pré-pilote) à l'échelle du laboratoire.
- Des analyses par cytométrie en flux et par microscopie bi-photonique, avec différents indicateurs fluorescents, ont été mises en œuvre pour étudier l'impact de chaque étape sur la survie ou la mort cellulaire.
- Des méthodes de quantification enzymatique ont été appliquées à différentes étapes dans le but de déterminer la teneur intracellulaire des substances d'intérêt.
- Enfin, une étude biochimique approfondie de la levure la plus sensible en utilisant la micro-spectroscopie infrarouge avec le rayonnement synchrotron a été réalisée.

IV. Résultats et Discussion

Chapitre 1

Effet de l'enrichissement de la levure de référence, *Saccharomyces cerevisiae*, en glutathion et en tréhalose sur sa résistance au séchage en lit fluidisé (Publication 1)

1 Introduction

La production industrielle de levures déshydratées est souvent réalisée par séchage en lit fluidisé. Ce procédé réduit la cultivabilité des levures principalement en raison des effets de la température et de l'oxydation sur les cellules. En fonction des conditions de culture, les levures produisent du glutathion (antioxydant) et du tréhalose (disaccharide), deux molécules fréquemment associées à la protection des cellules contre la dessiccation. Dans ce cas, la modulation de la composition du milieu de culture peut induire la protection naturelle des cellules à la déshydratation, c'est-à-dire sans l'ajout d'additifs alimentaires. Ainsi, il est important de comprendre le rôle du glutathion et du tréhalose dans la résistance des levures à la déshydratation en lit fluidisé. En outre, il est pertinent d'utiliser des conditions proches de la réalité industrielle afin d'améliorer les procédés habituels de production de levure.

Ce chapitre vise à déterminer les conditions de culture et de séchage en lit fluidisé afin d'obtenir à la fois des cellules riches en glutathion et/ou en tréhalose avec la plus grande cultivabilité possible.

Les objectifs de ce chapitre sont les suivants :

- Comprendre les effets de conditions de culture de la levure de référence, *Saccharomyces cerevisiae* dans deux milieux inducteurs de la synthèse de glutathion et de tréhalose ;
- Étudier l'accumulation de glutathion total et de tréhalose produits par les cellules ;
- Comprendre l'impact de la déshydratation sur la cultivabilité, le stockage et la reprise de la croissance des cellules.

Ce chapitre fait l'objet d'une publication scientifique parue dans le journal *Process Biochemistry* : **Câmara Jr., A.A.**, Nguyen, T.D., Jossier, A., Endrizzi, A., Saurel, R., Simonin, H., Husson, F. (2018). Improving total glutathione and trehalose contents in *Saccharomyces cerevisiae* cells to enhance their resistance to fluidized bed drying. DOI : 10.1016/j.procbio.2018.03.013

2 Improving total glutathione and trehalose contents in *Saccharomyces cerevisiae* cells to enhance their resistance to fluidized bed drying

Antonio de Anchieta Câmara Júnior¹, Thanh Dat Nguyen¹, Audrey Jossier¹, Anne Endrizzi², Rémi Saurel¹, Hélène Simonin¹ & Florence Husson^{1*}

¹Univ. Bourgogne Franche-Comté, AgroSup Dijon, PAM UMR A 02.102, F-21000 Dijon, France

²Welience (SATT Grand-Est), Hall de Technologie Alimentaire, F-21000 Dijon, France

2.1 Abstract

Fluidized bed drying is a dehydration process often applied to microorganisms and used for food particles stabilization. Despite its common use in yeast production, this process can lead to cell death depending on the strain and the growth conditions. During fermentation, yeasts undergo nutritional stressful environments according to media composition. In order to face these conditions, yeasts are able to synthesize protective molecules, e.g. glutathione (tripeptide, an antioxidant) and trehalose (disaccharide, a cell desiccation protector). However, the role of these two molecules during fluidized bed drying is still not well known. This work aimed to investigate if total glutathione (GSht) and trehalose (TRE) accumulation leads to the creation of more resistant and stable yeast cells. The effect of GSht accumulation after relatively nutrient richer cultivation on cell resistance to mild stress (45°C-90 min) was obvious. This growing condition also improved the stabilization and performance of cells after rehydration. On the other hand, the highest amount of TRE stored by yeasts cultivated in nutrient poorer media led to cells being more resistant to severe stress (60°C-60 min). This strategy could be used for the development of new bioprocesses focusing on improving the performance and resistance of cells after fluidized bed drying.

Keywords: yeast; *S. cerevisiae*; total glutathione; trehalose; fluidized bed dryer; drying.

2.2 Introduction

Since long ago yeast *Saccharomyces cerevisiae* has been largely used in the production of food and alcoholic beverages and in biotechnological applications. Its use at an industrial scale requires the development of highly stable dry yeast products. Although several types of dryers exist, the one most commonly used in industry is the fluidized-bed dryer. In this dryer, heated air is blown from the bottom up and through yeast particles at velocities which keep the latter in suspension (Akbari et al., 2012). This process thus requires a pre-drying step which includes rotary vacuum filtration, pressing and biomass pellet-shaping.

Although drying processes have been applied for yeast stabilization, they induce cell damages contributing to cell death (Beker and Rapoport, 1987; Crowe et al., 1992; Dupont et al., 2014; Gervais et al., 1992; Morris et al., 1986; Rapoport, 2017). Dry heat and oxidation have been shown to be responsible for viability decrease during fluidized bed drying (Bayrock and Ingledew, 1997b). Indeed, the loss of water can result in many stresses to yeast cells during drying. On the one hand, mechanical damage is related to osmotic stress (Lemetais et al., 2012) while on the other, oxidative stress occurs because of the surface contact of cells with air (França et al., 2007; Garre et al., 2010). It has been reported that dehydration induces structural and biochemical changes in yeast cells in terms of protein, lipid, carbohydrate, and polyphosphate composition (Beker and Rapoport, 1987; França et al., 2007). The plasma membrane has been described as the main target of injury induced by drying (Guyot et al., 2006; Lemetais et al., 2012; Ragoonanan et al., 2008; Simonin et al., 2007). In fact, changes in yeast cell membranes permeability caused by oxidative damages (de Souza Pereira and Geibel, 1999), osmotic perturbations (Da Silva Pedrini et al., 2014) and chemicals (Câmara Jr. et al., 2016) have been observed.

In order to face environmental stresses, yeast adapts its defense systems and metabolism. Antioxidant mechanisms involving enzymes, such as superoxide dismutase or catalase, and some specific proteins contribute to the capacity of cells to resist stress (de Jesus Pereira et al., 2003; França et al., 2007; Lu et al., 2005; Skoneczna et al., 2007; Sugiyama et al., 2000b; Veal et al., 2007). Among protective molecules, it has been found that glutathione plays an important role in cell adaptation to oxidative, ethanol and heat

stresses (Garre et al., 2010; Izawa et al., 1995; Penninckx, 2000; Saharan et al., 2010; Sies, 1999). This tri-peptide (L-gamma-Glutamyl-L-Cysteinylglycine) is synthesized by both gamma-glutamylcysteine synthetase and glutathione synthetase, which are regulated by the oxidative stress response in yeast (Sugiyama et al., 2000a). Cells lacking glutathione showed a higher increase in oxidation and lipid peroxidation than the control strain after dehydration (Espindola et al., 2003). Besides, trehalose (TRE), a disaccharide formed by two glucose molecules, has been considered a non-toxic protecting molecule for cell membranes during drying. The disaccharide avoids membranes to fusion by replacing water molecules in the phospholipid bilayer (Crowe et al., 1984). Furthermore, authors demonstrated that TRE protects dried cells against oxidation (de Jesus Pereira et al., 2003; Eleutherio et al., 2015; Pénicaud et al., 2014). In agreement with these results, the addition of TRE has been shown to increase the viability of yeasts upon exposure to menadione stress, a source of superoxide (Herdeiro et al., 2006). Moreover, this disaccharide is also recognized as cryoprotectant. Indeed, it has been demonstrated that the addition of 10% TRE to yeast suspension buffer enhances cell's protection to freezing (Coutinho et al., 1988).

Although the adaptation mechanisms of yeast during drying have been widely investigated, there is still a need to understand the role of GSht and TRE biosynthesis in yeast protection to drying in industrial conditions and to ascertain if the accumulation of these two molecules leads to more resistant and stable yeast cells. Furthermore, it is interesting to note that GSht and TRE both contents can be enhanced directly from biomass formation by modifying cell growth conditions (Beker and Rapoport, 1987; Wen et al., 2004, 2006). For example, instances of TRE accumulation by yeasts under nutrient poorer cultivation were reported (François and Parrou, 2001; Lillie and Pringle, 1980). In this way, it could be possible to avoid the addition of protecting compounds and to create new additive-free yeast products.

The present work aimed at studying the impact of GSht and TRE biosynthesis on yeast response to fluidized bed drying. For this purpose, *Saccharomyces cerevisiae* CBS8066 yeast strain was cultivated in an aerobic batch bioreactor containing media able to enhancing the synthesis of GSht and TRE, which correspond to relatively nutrient richer and poorer media compositions, respectively. The yeast cells were then air-dried in a fluidized bed drier at two drying conditions based on industrial practice. Cell viability,

shelf life, and regrowth kinetics were chosen to investigate stabilization effects on dried cell granules.

2.3 Materials and Methods

2.3.1 Yeast strain and growth medium composition

The yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* CBS8066 was purchased from Voor Schimmelcultures (Baarn & Delft, Holland). Two media, relatively nutrient richer and nutrient poorer, GSM (30 g L⁻¹ glucose, 30 g L⁻¹ yeast extract, 0.6 g L⁻¹ KH₂PO₄ and 0.6 g L⁻¹ cysteine), and TSM (30 g L⁻¹ glucose, 3 g L⁻¹ yeast extract and 0.6 g L⁻¹ KH₂PO₄), were designed to allow GSht or TRE enrichment of cells, respectively. The YPD broth (20 g L⁻¹ peptone, 10 g L⁻¹ yeast extract, and 20 g L⁻¹ glucose) was used for the analysis of regrowth kinetics and colony-forming units (CFU).

2.3.2 Culture conditions

The yeast cells were firstly grown in nutrient poorer media (TSM) to minimize GSht synthesis. The pre-culture was prepared in a conical flask and incubated in a rotary shaker (Lab Therm, Kühner AG, Basel, Switzerland) at 30°C for 24 hours. The cells were then harvested by centrifugation (Allegra X-15R, Beckman Coulter, California, USA) at 4°C and 2,200×g for 5 minutes. After being washed twice in water-NaCl solution (0.9% wt), the cells were suspended in the same saline solution and inoculated into 1,800 mL of GSM or TSM prepared in a BioFlo 110 bioreactor (New Brunswick Scientific Inc., Enfield, Connecticut, USA) for the culture (Initial cellular concentration 2×10⁶ cells mL⁻¹). The growth conditions were: 30°C, agitation at 280 rpm, and 2 L.min⁻¹ of airflow feed. In order to obtain maximum GSht/TRE biosynthesis, cellular suspensions were harvested at stationary phase after 24 h of fermentation in a sterile 2 L glass bottle.

2.3.3 Morphological observations

After fermentation in TSM or GSM, cell suspension (1 mL) was collected and a B1 Series light microscope (Motic, Hong Kong, China) was used to observe cells morphology. Representative images were acquired with a ×100 oil-immersion objective and collected with a digital camera. The cells mean diameter was estimated using the

freeware software Image J (Rasband, 2018) and at least 100 random cells from three independent replicates were measured.

2.3.4 Cells preparation for fluidized bed drying

The harvested cells were washed twice in a saline solution. Cell biomass was collected by vacuum filtration (0.45 μm polyethersulfone membrane) (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) and pellet-shaped thanks to a manual sterile extruder (Chaoqun, Chao Yang, Beijing, China) which formed strands. In order to avoid the extruded cellular particles to stick together, cells were incubated at 28°C for 30 min and separated by gentle manual agitation. Mean diameter and length of cylindrical fresh yeast particles were estimated from at least 90 random particles from three independent replicates. Representative images were captured using a digital camera and analyzed with the software ImageJ (Rasband, 2018). The cylindrical particles were 0.987 ± 0.04 mm diameter, and 5.40 ± 2.64 mm length. The biomass granules were dehydrated in a Mini-Glatt fluidized bed dryer (Glatt GmbH, Binzen, Germany). The drying conditions were tested beforehand to reach the target water activity below 0.25, which ensures stabilization, and two different drying conditions were selected at 45°C for 90 min (mild stress) or at 60°C for 60 min (severe stress). The airflow was set to $0.4 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ for both experimental conditions. The dried cellular granules were collected and water activity was immediately measured using a dew point hygrometer Aqualab® series 3 TE (Decagon Devices, Pullman, WA, USA). In other analyses, samples were rehydrated in water-NaCl solution (0.9% wt) at 38°C for 5 min.

2.3.5 Total glutathione content measurement

Rehydrated cells were suspended in sulfosalicylic acid solution (5% wt) (final concentration = 1.3×10^9 cells mL^{-1}). Cell disruption and GSht extraction were performed by adding 300 mg of 0.5 mm glass beads (Next Advance, NY, USA), and by using a FastPrep 24 machine (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) with 6 cycles of 45 s at 5 m s^{-1} . The samples were then kept on ice for 15 min to precipitate proteins. The supernatant was collected by centrifugation and stored at -80°C for maximum 7 days before quantification. The GSht was determined by using the Glutathione Assay Kit CS0260 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), according to the manufacturer's instructions. Quantification was performed using a 96-well-plate and the absorbance

was read each minute during 5 min at 412 nm thanks to a spectrophotometric plate reader (Paradigm, Beckman Coulter, California, USA). The GSht content in samples was calculated based on external standard (reduced glutathione, GSH) calibration.

2.3.6 Trehalose content measurement

Rehydrated cells were suspended in distilled water (final concentration = 3.3×10^9 cells mL⁻¹) and extraction was performed as described above. The samples were submitted to a heat treatment at 80°C for 15 min and supernatant was collected by centrifugation. Trehalose concentration was determined using the trehalose enzymatic kit ref. 016 (Biosentec, Toulouse, France), according to the manufacturer's instructions.

2.3.7 Cell viability

Cell viability was estimated by the CFU method. For dried cells, 100 mg of yeast particles were rehydrated in 0.9% water-NaCl solution at 38°C. After 5 min, cellular suspensions were vortexed for 5 s and appropriate serial dilutions were performed. Diluted cell suspensions were spread onto 15 mL YPD broth solidified with agar (15 g L⁻¹). Colonies were counted after 36 h of incubation at 30°C. Cell suspension before dehydration was used as control.

2.3.8 Accelerated shelf life

Yeast granules were stored in plastic cup containers up to 28 days at 30°C in order to accelerate their aging. Each 7 days, 100 mg of yeast cell granules were rehydrated and cell viability was estimated as described above.

2.3.9 Regrowth kinetics

Yeast granules were rehydrated as described above. The cell suspension was transferred to a 96-well-plate containing YPD broth and the optical density (OD) was adjusted to 0.200 at 600 nm for all samples. Regrowth kinetics was performed for 36 h at 30°C and evolution of OD was collected each 20 min at 600 nm by using a spectrophotometric plate reader (Paradigm, Beckman Coulter, California, USA). The maximum specific growth rate (μ_m) was calculated as the slope of a linear regression fitted to the exponential section in the growth curve.

2.3.10 Statistical analysis

All statistical procedures were performed by using the STATISTICA® software, version 7 (Statsoft, Tulsa, OK, USA). Data were tested using one-way analysis of variance (ANOVA). Tukey HSD post-hoc test (95% of probability level) was used for determining statistical significance ($p < 0.05$).

2.4 Results

2.4.1 Biomass production and water activity of yeast particles

At the end of the fermentation cycle, cell suspension was collected and the number of CFU was measured. Results showed that the number of CFU L⁻¹ for cells cultivated in GSM was three times higher than for cells cultivated in TSM (Tableau 4-1). The same behavior was observed for the weight of fresh and dried biomass produced, approximately three times and two times higher for cells cultivated in GSM than in TSM, respectively. The water activity of TSM cells was lower than the one of GSM cells after dehydration. At the end of fermentation, and for each culture medium, the morphology of fresh cells and its diameter were observed by optical microscopy. It was observed that yeast cells cultivated in GSM were larger than TSM cells (Figure 4-1). These results indicate that the same cell strain, when cultivated in different composition media, have singular physiological responses.

Tableau 4-1 : Yeast biomass production and water activity (aw) of yeast cell granules according to the growth media (GSM and TSM) and drying conditions

Growth media	GSM		TSM	
	45°C-90 min	60°C-60 min	45°C-90 min	60°C-60 min
CFU (10 ¹⁰ L ⁻¹)	3.94 ± 0.67 ^a		1.37 ± 0.12 ^b	
Fresh biomass (g L ⁻¹)	19.04 ± 2.58 ^a		6.66 ± 0.25 ^b	
Final glucose (g L ⁻¹)	0.00 ± 0.01 ^a		0.84 ± 0.01 ^b	
Drying conditions	45°C-90 min	60°C-60 min	45°C-90 min	60°C-60 min
Dried biomass (g L ⁻¹)	4.23 ± 0.25 ^a	3.95 ± 0.34 ^a	2.25 ± 0.14 ^b	2.33 ± 0.08 ^b
aw of dried yeast cell granules	0.26 ± 0.10 ^a	0.22 ± 0.07 ^a	0.13 ± 0.04 ^b	0.10 ± 0.03 ^b

^{a,b} Different letters on the same line indicate significant differences according to Tukey's HSD post-hoc test ($p < 0.05$). The mean values are based on at least three independent replicates ± standard deviation

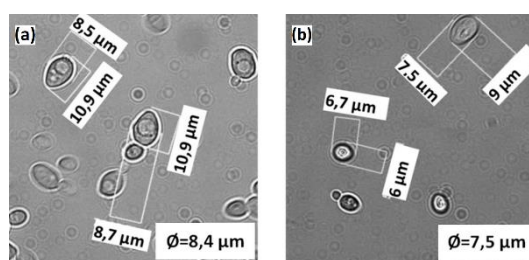


Figure 4-1 : Representative microscopic observations of the yeast (*S. cerevisiae* CBS8066) cell diameter. Images were captured after growing for 24 h in GSM (a) or TSM (b). \emptyset = average diameter.

2.4.2 Influence of growth medium on GSht and TRE content

Glutathione and trehalose are two well known molecules participating in cell drying or freezing resistance. In order to evaluate the influence of the growing medium composition on the yeast GSht and TRE biosynthesis, the intracellular content was quantified right after 24 h of fermentation. On the one hand, cells cultivated in GSM have accumulated intracellular GSht ($73.35 \text{ mmol L}^{-1}$) that was 5 times higher than TSM cells ($14.45 \text{ mmol L}^{-1}$) (Figure 4-2). This result suggests that the enrichment of growing medium with yeast extract, and especially cysteine, has influenced the biosynthesis of GSht in cells. On the other hand, GSM cells have accumulated a 2.5-fold lower TRE ($1389.35 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) in comparison to TSM cells ($3523.43 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$).

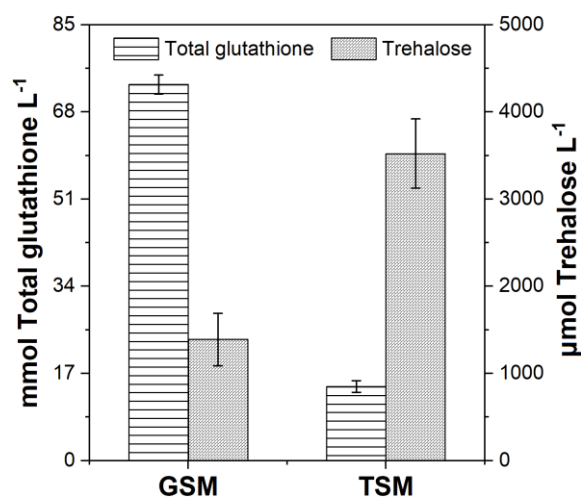


Figure 4-2 : Effect of growth medium GSM or TSM on GSht and TRE biosynthesis in the yeast *S. cerevisiae* CBS8066. GSht and TRE content were determined right after fermentation. Cells were washed twice and resuspended in sulfosalicylic acid solution (final concentration $1.3 \times 10^9 \text{ cells mL}^{-1}$) or in distilled water (final concentration $3.3 \times 10^9 \text{ cells mL}^{-1}$), for GSht or TRE analysis respectively. GSht and TRE contents are expressed in mmol or μmol of each compound per L of cell suspension. Data are the mean values of three independent experiments \pm standard deviation.

2.4.3 Cell viability before and after the drying process

The cell viability was evaluated at different stages of production, i.e. from fresh cells (after biomass pellet-shaping) to dried cells at 45°C for 90 min or 60°C for 60 min. When GSM cells were dehydrated at 45°C-90 min, the reduction of cell viability during the process was not statistically significant (Figure 4-3). When TSM cells were dehydrated in the same conditions, cell viability was reduced from 9.0 to 8.0 log. On the other hand, GSM cells were less resistant when dehydration was performed at 60°C-60 min in comparison to TSM cells. In this dehydration condition, a reduction of two logs (from 9.3 to 7.3) and approximately one log (from 9.0 to 8.1) in cell viability for GSM and TSM cells were observed, respectively.

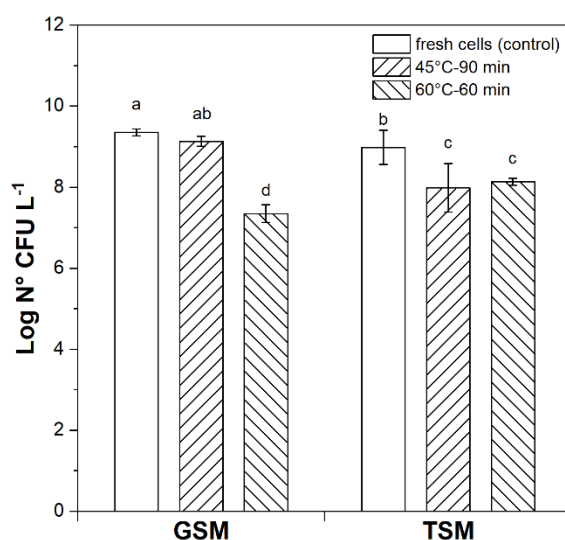


Figure 4-3 : Effects of growth medium and fluidized bed drying conditions on yeast *S. cerevisiae* CBS8066 cell viability. Yeast cells were cultivated in GSM or TSM and cell viability was assessed at different stages: fresh cells (control); after drying at 45°C for 90 min or 60°C for 60 min. Results are reported as Log of number of CFU L⁻¹. The mean values are based on at least three independent replicates \pm standard deviation. ^{a,b,c,d} Different letters indicate significant differences according to Tukey's HSD post-hoc test ($p < 0.05$)

2.4.4 Cell regrowth after drying

The effect of drying process in the yeast granules was evaluated thanks to their regrowth kinetics after rehydration. Yeast cells cultivated in GSM and dehydrated at 45°C-90 min showed the best specific growth rate μ_m (black continuous curve, $\mu_m = 0.125 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$) (Figure 4-4). Yeast cells cultivated in TSM and dehydrated in the

same conditions exhibited a slower regrowth (grey continuous curve, $\mu_m = 0.108 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$). However, when GSM cells were dehydrated at 60°C-60 min, the μ_m was reduced 3-fold (black dashed curve, $\mu_m = 0.039 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$). TSM cells were more resistant to the severe dehydration conditions at 60°C-60 min, as the growth rate was only 1.15-fold lower (grey dashed curve, $\mu_m = 0.095 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$) than the same cells dehydrated at 45°C-90 min. It is also interesting to note the prolongation of the latency phase observed for cells dehydrated at 60°C-60 min, which were grown in GSM or TSM. These observations appeared to correlate with the specific growth rate and cell viability, and the regeneration of the cells may have been affected under such conditions.

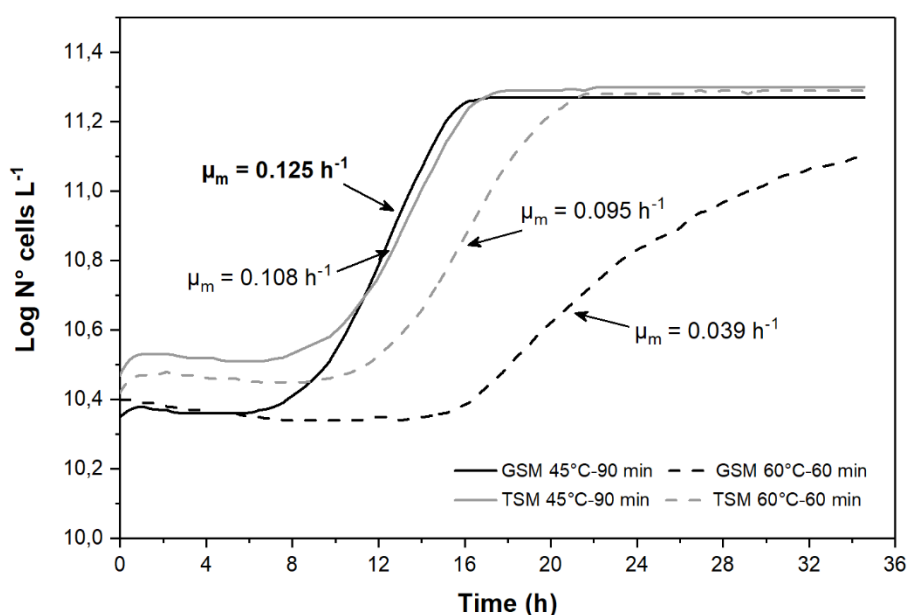


Figure 4-4 : Representative regrowth kinetics of *S. cerevisiae* CBS8066 dried granules. Cells were cultivated in GSM (black curves) or TSM (gray curves), and drying was performed at 45°C for 90 min (continuous curves) or 60°C for 60 min (dashed curves). Dried yeast granules were rehydrated at 38°C for 5 min. Cell suspension was inoculated in YPD broth ($OD_{600} = 0.200$), kinetics performed for 36 h at 30°C and optical density was automatically collected at 600 nm each 20 min using a spectrophotometric plate reader. μ_m = maximum specific growth rate

2.4.5 Yeast particles accelerated shelf life

In order to assess the effects of dehydration on the long-term stabilization of yeast particles, accelerated shelf life was performed during 28 days at 30°C. TSM cells dehydrated at 45°C-90 min exhibited the best stabilization up to 28 days (Figure 4-5, grey triangles curve). However, no significant difference was observed between these samples, GSM cells dried at 45°C-90 min (black square curve) and TSM dehydrated at

60°C-60 min (open grey triangles curve). GSM cells were apparently less resistant during shelf-life when dehydration was carried out at 60°C-60 min.

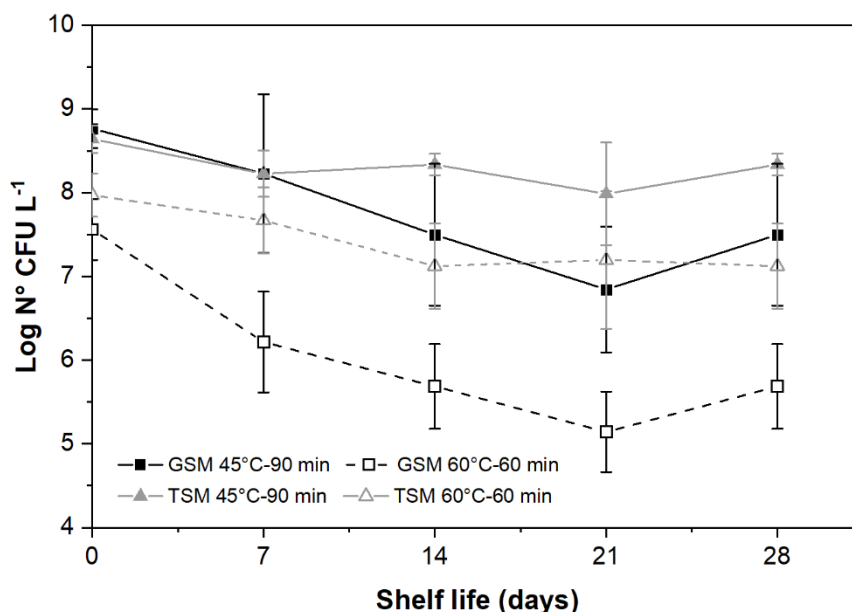


Figure 4-5 : Evolution of dehydrated yeast particles accelerated shelf life. Cells were cultivated in GSM (black curves) or TSM (grey curves), and drying was performed at 45°C for 90 min (filled symbols) or 60°C for 60 min (open symbols). Dehydrated yeast particles (0.100 g) were collected each 7 days and rehydrated in 0.9% water-NaCl solution at controlled temperature (38°C) for 5 min. Cell viability was performed by the CFU method onto YPD solidified broth and counted after 48 h at 30°C. Results are expressed as Log of number of CFU L⁻¹. The mean values are based on at least three independent replicates ± standard deviation

2.5 Discussion

Understanding the adaptation mechanisms of living microorganisms to adverse environmental conditions is a long-term challenge. Many cells, including yeasts, can adapt their physiology or metabolism according to environmental changes. Yeast cells display high evolved adaptation mechanisms which are born out of their natural stressful environment. Nowadays, the industry carries out dehydration as a conservation process for a variety of microbiological applications, e.g. active dried yeasts. In order to improve the performance of dehydrated yeasts, one of the simplest strategies is to add synthesis precursors of well-known protective molecules to the growing media during biomass production. It is interesting as well to modify the drying conditions (temperature, time) in order to understand better how yeast cells can

withstand dehydration, especially regarding the efficiency of the drying process in stabilizing yeast particles and then optimizing these conditions.

2.5.1 The growing medium affects production of yeast biomass

Our results show that each different growing media influences yeast biomass production. Approximately 3 times more biomass was produced for cells cultivated in GSM than for cells cultivated in TSM (Tableau 4-1). In order to check the correlation between cell diameter and biomass formation, microscopic observations were made right after fermentation. It was possible to observe larger cell size for yeast cultivated in GSM than for yeasts grown in TSM (Figure 4-1). The enrichment of the growing medium with additional cysteine and a 10-fold yeast extract (amino acids, peptides, vitamins and carbohydrates) may have contributed to increase yeast cell biomass production in GSM. Actually, several studies have already suggested that culture media enrichment as a simple and efficient strategy to improve yeast cell biomass yield and it could be linked to its resistance to dehydration (Beker and Rapoport, 1987; Trofimova et al., 2010). Wen et al. (2006) obtained a 1.5-fold higher cell biomass when 2 mM cysteine was added to the culture medium. Conversely, when nitrogen sources, especially ammonium, are limited in the medium, the biomass formation is reduced (Larsson et al., 1993). On the other hand, our results showed a lower number of CFU after 24 h of fermentation for cells cultivated in TSM. This was probably due to cell starvation under nutrient limitation which may have affected the ability of cells to bud, which reduces the number of CFU (Fabrizio and Longo, 2003). Thomsson et al. (2003) also showed a reduction of the number of CFU when cells were cultivated in starved conditions (nitrogen or carbon) and a reduced fermentative capacity up to 95%.

2.5.2 Effects of GSht and TRE biosynthesis on resistance of yeast *S. cerevisiae* to fluidized bed drying

When submitted to environmental stresses, yeast cells can activate multiple responses in order to survive, such as the production of antioxidants, accumulation of reserve sugars (trehalose and glycogen) and synthesis of key proteins (Walker and Van Dijck, 2006). In this study, we have induced two major drying resistance responses depending on the tested growth medium. The first one was the higher GSht accumulation observed for cells cultivated in GSM (73.35 mmol L⁻¹). These cells were more resistant to mild

dehydration conditions (45°C-90 min) than TSM cells (Figure 4-2 and Figure 4-3). GSht accumulation in cells could partly be explained as a result of cysteine and yeast extract enrichment in the growth medium. Cysteine is an amino acid that participates in GSht biosynthesis. In fact, it has been shown that cysteine is the only amino acid able to double the GSht production rate in yeast, as opposed to yeast culture without cysteine addition (Alfara et al., 1992). Moreover, according to previous study, the yeast extract and peptone are two of the best nitrogen sources that play a part in cell growth and GSht synthesis (Liu et al., 1999). According to several authors, biosynthesis improvement of glutathione in yeast cells could be correlated with the enhancement of their dehydration tolerance (Espindola et al., 2003; Penninckx, 2000; Saharan et al., 2010). In a previous work, Espindola et al. (2003) demonstrated that cells lacking glutathione were twice less resistant to dehydration than the control strain. As expected, GSht accumulation in cells also influenced their regrowth kinetics after rehydration (Figure 4-4). Indeed, we observed a prolongation of the latency phase after severe dehydration conditions for both cultivation media and it seems to correlate with the reduction of cell viability. These findings have led us to hypothesize that, after severe stress, only a small fraction of cells is able to replicate, i.e. longer time is required to increase microbial density at same levels, thus reflecting its latency phase prolongation (Swinnen et al., 2014).

The second key result was found as regards to cells cultivated in TSM. These cells have accumulated a 2.5-fold higher TRE, probably as a reserve, and were more resistant to severe conditions at 60°C-60 min than GSM cells (Figure 4-2 and Figure 4-3). One explanation for this higher TRE accumulation could be related to the limited sources and the absence of cysteine in TSM, which may induce a stressful nutritional environment and reduce the cell biomass and diameter. In fact, yeast cells can accumulate large amounts of TRE when deprived of nitrogen, sulfate or phosphate in the presence of glucose (Lillie and Pringle, 1980). In addition, when yeast cells undergo exhaustion of nutrients, their cell wall becomes thicker, they store carbohydrates (trehalose and glycogen) as a reserve, and they synthesize several stress proteins (Puig and Pérez-Ortín, 2000). And, during aerobic growth conditions, yeast cells could activate various defenses mechanisms as result of nutrient limitation, preparing them for a possible subsequent period of stress, i.e. dehydration (Jørgensen et al., 2002). For example, yeast

cells cultivated in the presence of TRE showed resistance both to a heat shock at 50°C and nutrient starvation (Plourde-Owobi et al., 2000). A similar behavior was observed for other cells. For plants, sugars accumulation precedes the anhydrobiosis (life without water) providing stabilization of membranes and proteins (Bernacchia and Furini, 2004). What's more, bacteria could reprogram their metabolic system to respond to nutritional stressful conditions (Pichereau et al., 2000; Rojo, 1999). Indeed, yeast cells deprived of TRE have shown a reduction of cell viability/vitality during regrowth after quiescence (François and Parrou, 2001; Shi et al., 2010). During dehydration yeast cells undergo structural modifications caused by elimination of water from their intracellular compartments. The plasma membrane seems to be the main structure impacted during this process as yeast survival is directly affected during plasma membrane reorganization (Lemetais et al., 2012). According to a previous study, up to 3 log reduction in cell viability was observed for yeast cells under water activity = 0.23 (Nguyen et al., 2017). This may explain the TSM cells lower viability due to lower water activity compared to GSM cells, especially in drying condition at 45°C-90 min (Tableau 4-1 and Figure 4-3). Also, it has already been demonstrated that TRE can replace water molecules in lipid bilayers and stabilize membranes during dehydration (Crowe et al., 1987; Patist and Zoerb, 2005). Further studies confirmed that this behavior was due to trehalose interaction with phospholipids membrane, increasing space between lipids and disordering the hydrocarbon chains in concentration-dependent manner (Golovina et al., 2009, 2010). Luzardo et al. (Luzardo et al., 2000) reported that TRE is much more effective to replace water in lipid bilayers (3:11 ratio) than sucrose (4:3 ratio). In the light of these observations, the drying resistance and better stabilization of TSM cells to severe dehydration conditions is attributable to the accumulation of TRE.

In addition, we observed that cells cultivated in both GSM and TSM were more stable during 28 days of shelf life when mild dehydration conditions were adopted (Figure 4-5). Indeed, the reduction of cell viability could be due to the modification of the fluidity or permeability of the plasma membrane during heat perturbations (Gervais and de Maraçon, 1995). Bayrock and Ingledew (1997a), who used a fluidized bed dryer and air at 45°C, observed approximately a 4-fold reduction of *D* value (thermal death time) when dehydration was carried out at 60°C, i.e. yeasts were more stable at a mild dehydration temperature. However, our results showed that GSM cells dehydrated

under severe conditions were less stable up to 28 days of shelf life. It seems likely that, at this temperature, the intracellular GSht did not ensure the maintenance of cell stability. Furthermore, due to the low intracellular TRE content in these cells, the preservation of the microbial structure (plasma membrane, proteins) may have been much more affected (Patist and Zoerb, 2005).

2.6 Conclusion

Microorganisms commonly undergo several stressful environments in nature, e.g. starvation, hyperosmotic conditions or oxidation. During these periods, they develop advanced defense systems in order to survive. In this work, we have found that much more biomass was produced when cells were cultivated in a relatively richer media containing cysteine in comparison with a poorer nutrient media. Furthermore, the cells produced were also more resistant to fluid-bed drying at mild temperature (45°C-90 min). This behavior was associated with the accumulation of GSht in cells. In contrast, cells cultivated in starved conditions accumulated TRE and were more resistant to fluid-bed drying at high temperature (60°C-60 min) than the former. In conclusion, our results show that preparing yeast cells to a subsequent period of stress is a good and efficient strategy to improve yeast cell survival after drying. This strategy could give an economical advantage in comparison with the use of protective additives. The results of this work could be used as a rational basis for the development of new additive-free stabilization strategies for sensitive yeast cells and for using fluidized bed drying.

2.7 Acknowledgements

This work was supported by the Regional Council of Bourgogne – Franche Comté, the “Fonds Européen de Développement Régional (FEDER)” and CNPq, “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico”– Brazil [grant number 200101/2014-5 to A. A. C. Jr.].

2.8 Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

3 Conclusion du Chapitre 1

Dans ce chapitre, nous avons observé que la levure *Saccharomyces cerevisiae* est capable d'accumuler de grandes quantités de glutathion lorsqu'elle est cultivée dans un milieu riche en nutriments (extrait de levure et cystéine), le milieu GSM. Les cellules cultivées dans ces conditions ont été plus résistantes au séchage effectué à 45°C-90 min. D'autre part, les cellules riches en tréhalose (milieu TSM, pauvre en nutriments) ont acquis une résistance plus importante à la déshydratation réalisée à 60°C-60 min. Ces résultats démontrent que la modulation des nutriments présents dans les milieux de croissance interfère directement sur la survie, la stabilisation et la performance des cellules après le séchage en lit fluidisé. Nous nous sommes demandés si ce même comportement pourrait également être observé chez les souches non-*Saccharomyces* et quels seraient les effets physiologiques de la biosynthèse du glutathion et du tréhalose pour leur résistance à la déshydratation (Chapitre 2).

Chapitre 2

**Réponses physiologiques des levures non-*Saccharomyces* à la déshydratation : effets de la biosynthèse du glutathion et du tréhalose
(Publication 2)**

1 Introduction

Les industries agro-alimentaires et viticoles manifestent actuellement un grand intérêt pour les nouvelles espèces de levures non-*Saccharomyces* déshydratées. Cependant, ces levures sont fortement affectées par les conditions de déshydratation. Des découvertes récentes ont montré que l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* acquiert une résistance à la déshydratation de manière dépendante de l'accumulation de glutathion et de tréhalose. Toutefois, ces phénomènes physiologiques et de résistance au stress associés aux souches *Torulaspora delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima* et *Lachancea thermotolerans* sont, à l'heure actuelle, méconnus. Il est donc intéressant d'approfondir la compréhension sur les effets des conditions de culture et de déshydratation sur la survie de ces levures non-*Saccharomyces*. A ce stade, la culture cellulaire et la déshydratation ont été effectuées à une échelle de laboratoire afin d'analyser plus en détail les réponses physiologiques (associées à la biosynthèse du glutathion et du tréhalose) au cours de la déshydratation.

Ce chapitre vise à déterminer si ces trois levures non-*Saccharomyces* sont capables de synthétiser du glutathion et/ou du tréhalose, ainsi qu'à étudier pour la première fois les réponses physiologiques de ces souches à la déshydratation.

Les objectifs de ce chapitre sont les suivants :

- Evaluer l'accumulation de glutathion (total, réduit et oxydé) et de tréhalose par les trois souches non-*Saccharomyces* sélectionnées, et les comparées à l'espèce de référence, *S. cerevisiae* ;
- Comprendre l'impact des différentes conditions de culture et des cinétiques de déshydratation sur la viabilité et la fonctionnalité cellulaire.

Ce chapitre fait l'objet d'un article scientifique parue dans le journal *Food Microbiology* : **Câmara Jr., A.A.**, Maréchal, P-A., Tourdot-Maréchal, R., Husson, F. (2018). Dehydration stress responses of yeasts *torulaspora delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima* and *Lachancea thermotolerans*: effects of glutathione and trehalose biosynthesis. DOI : 10.1016/j.fm.2018.12.008

2 Dehydration stress responses of yeasts *Torulaspora delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima* and *Lachancea thermotolerans*: effects of glutathione and trehalose biosynthesis

Antonio de Anchieta Câmara Júnior, Pierre-André Maréchal, Raphaëlle Tourdot-Maréchal & Florence Husson*

2.1 Abstract

In food industry and winemaking, the use of active dehydrated yeast (ADY) *Saccharomyces cerevisiae* is a frequent practice because of the long-term stability and high efficiency of ADY. Nowadays, there is an increasing interest for new yeasts strains, such as *Torulaspora delbrueckii* (Td), *Metschnikowia pulcherrima* (Mp) and *Lachancea thermotolerans* (Lt). However, the yeasts transformation processes into the solidified form generate several stresses that reduce the cell viability. In this case, understanding the phenomena of yeast cell resistance before, during and after dehydration is of great importance. In this study we analyzed two compounds associated with resistance to stress and produced by cells, glutathione (total, oxidized and reduced) and trehalose, at different stages of the process. The impact of growing and dehydration conditions on cell viability was analyzed by flow cytometry and two-photon laser scanning microscopy. The results showed that cells naturally enriched in glutathione or trehalose acquired resistance to dehydration, preventing the oxidation of glutathione in a growth/dehydration condition dependent manner. This is the first time that simultaneous metabolic and dehydration responses were observed in three non-*Saccharomyces* strains, Td, Mp and Lt. These findings represent an opportunity to better understand the yeast's dehydration resistance phenomena and thus to promote the efficient industrial production of new dried yeasts.

Keywords: Non-*Saccharomyces*; dehydration; glutathione; trehalose

2.2 Introduction

The understanding of the fundamental mechanisms of microbial resistance to environment changes (temperature, oxygen level, pH, nutrients contents...) is of great importance for the food industry. This is particularly important for industries using microbial transformations, such as fermentation. The understanding of the complexity of reactions that may play roles in yeasts survival remains a big scientific challenge. From some years, significant advances in comprehension of the physical, biochemical, adaptive and genomic phenomena linked to the resistance of yeasts to stresses have already been reported using the yeast model, *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), such as Nguyen et al. (2017) for heating stress, da Silva Pedrini et al. (2014) and Câmara et al. (2016) for osmotic perturbations, Lemetais et al. (2012) for air drying process, Câmara et al. (2018) for nutrients availability, and Davey and Hexley (Davey and Hexley, 2010) for ethanol concentrations.

Non-conventional yeasts strains, e.g. *Torulaspora delbrueckii* (Td), *Metschnikowia pulcherrima* (Mp) and *Lachancea thermotolerans* (Lt), are of particular interest for the wine industry. These yeasts could improve the wine color profile, anthocyanin composition and the complexity of volatile compounds (Chen et al., 2018). Td yeast has already been associated with food spoilage microorganism (Kurtzman, 2011a). Today, this yeast is considered one of the best to improve the aromatic wine profile and quality. For example, Td yeast plays an important role in producing higher alcohols and esters (Chen and Liu, 2016). Use of Mp in sequential inoculation with Sc enhances the concentration of higher alcohol, esters and terpenols as well as the fruity and floral aroma (Sadoudi et al., 2012, 2017). The yeast Lt is the least known among these yeast strains. However, Lt can improve the production of lactic acid for the correction of grape must acidity (Kapsopoulou et al., 2007). These three strains can also enhance the wine aroma profile (Gschaedler, 2017) and reduce the use of chemicals as sulfites for must protection or wine conservation (Simonin et al., 2018). Generally, non-*Saccharomyces* yeasts are naturally present on grapes or in musts at the beginning of the fermentation process, and its viability decreases as the alcohol concentration increases (Sadoudi et al., 2012). Nowadays, in order to improve reproducibility and quality, winemakers have been substituting spontaneous process by controlled inoculation with dehydrated and

active yeasts (Benito, 2018a, 2018b). Some of these yeasts have been isolated and are now currently marketed in dry form for use in the co-fermentation of grape must.

Conservation and commercialization of yeast cultures in fresh liquid or pressed forms are not economically advantageous. Besides the shorter storage time compared to the dehydrated form, the maintenance of yeasts in suspension for long periods can generate genetic derivatives (Jenkins et al., 2010). Long-term storage of yeasts in broth or on agar reduces cell viability and genetic stability of strains, often associated with loss of cell robustness in industrial fermentation processes (Boulton and Quain, 2007). In this case, dehydrated yeasts presents several advantages, such as stability, ease of handling, lower cost with maintenance, transport and storage (Luna-Solano et al., 2003). Nevertheless, the dehydration or the drying of the yeasts represents highly sensitive transformation processes for microorganisms that can lead to cell death and/or a significant decrease in cell activity potential (Rapoport, 2017). Different research on the dehydration of microorganisms has shown that the kinetics of the water transfer (or the water potential variation kinetics of the medium) and the final volume of the cells induced by dehydration-rehydration cycles influence the cells survival (Gervais and Beney, 2001). The long-term preservation of dried yeasts is ensured when residual moisture reaches 5-8% (Dupont et al., 2014). An explanation of the yeast mortality is the modification of plasma membrane fluidity during the dehydration-rehydration cycles which affect the membrane structure and induce cell mortality (Dupont et al., 2010). Also, decrease in the cell volume combined with increase of contact surface of the cells with air during dehydration induces accumulation of reactive oxygen species (ROS) – superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$), hydroxyl radical ($\bullet OH$), hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroperoxides ($R-OOH$) – and contributes to suppression of several enzymatic reactions, and thus leads to cell death (Garre et al., 2010).

In the struggle for survival, yeasts are able to synthesize some substances, e.g. glutathione and trehalose, throughout the biomass formation. These molecules protect cells from subsequent stresses, such as dehydration (Câmara Jr. et al., 2018). Glutathione (L-gamma-Glutamyl-L-Cysteinylglycine) is a tripeptide antioxidant formed by three amino acids – cysteine, glutamic acid and glycine – it is present in large amounts in yeasts and it can be found in the reduced (GSH) or oxidized (GSSG) forms. Indeed, glutathione plays a key role in redox equilibrium reactions, i.e. either by allowing

formation of native disulfide bonds or by scavenging free radicals present in the cytosol, protecting cell from oxidative stress (Chakravarthi et al., 2006). These reactions are mediated *via* glutathione reductase and glutathione peroxidase (Rahman et al., 2007). Trehalose is a well-known non-reducing disaccharide participating in cell desiccation tolerance (Tapia et al., 2015). Its major role is the maintenance of the cell structure by replacing water in membranes during dehydration (Golovina et al., 2010, 2009). Also, trehalose has been reported as an antioxidant component, by reducing oxidation reactions rates while enhancing viscosity of cell cytoplasm (Herdeiro et al., 2006). It is interesting to note that yeasts are able to synthesize both molecules, depending on medium composition and growing conditions (Câmara Jr. et al., 2018; François and Parrou, 2001; Lorenz et al., 2015). However, the majority of studies addressing these two molecules and their association with dehydration resistance refer only to the yeast *Sc*. Precise information regarding the relationship of glutathione and trehalose accumulation and mechanisms of cell resistance to dehydration using non-*Saccharomyces* yeasts (*Td*, *Mp* and *Lt*) remain currently scarce.

This study aims to elucidate some of dehydration resistance phenomena associated with glutathione and trehalose production in three non-*Saccharomyces* strains. Yeasts naturally synthesized these molecules during biomass formation. Yeast cells viability before and after dehydration kinetics was evaluated by flow cytometry and by two-photon laser scanning microscopy. As well, glutathione (total, oxidized and reduced) and trehalose contents were determined in different stages of the process. The results presented in this work can be used to formulate new high performance dehydrated non-*Saccharomyces* yeasts for food and beverages applications. The cultivation and dehydration parameters presented here could serve as a basis for designing new drying technologies, more economical and respectful of the environment.

2.3 Materials and Methods

2.3.1 Yeast strains and media composition

Yeasts *Saccharomyces cerevisiae* CBS8066, *Torulaspora delbrueckii* CBS4865, *Metschnikowia pulcherrima* CBS5833 and *Lachancea thermotolerans* CBS6340 were studied. They are named in this study, respectively *Sc*, *Td*, *Mp* and *Lt*. Two growing

media were used to induce glutathione or trehalose production, named GSM or TSM, respectively (Câmara Jr. et al., 2018). The GSM composition is (g l^{-1}): glucose, 30; yeast extract, 30; KH_2PO_4 , 0.6; cysteine, 0.6. The TSM composition is (g l^{-1}) glucose, 30; yeast extract, 3; KH_2PO_4 , 0.6. YPD medium was used for standard growing condition (control).

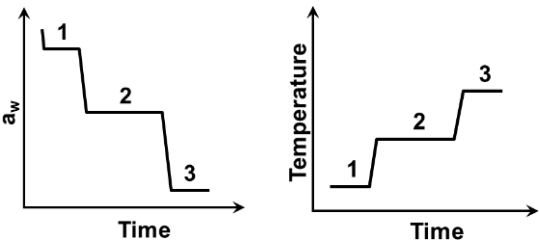
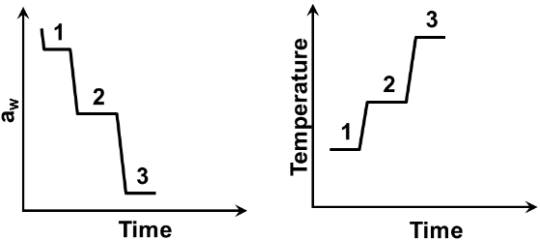
2.3.2 Culture conditions

For each strain, three isolated colonies were grown in 50 ml of GSM, YPD or TSM (Câmara Jr. et al., 2018) in a 250 ml conical flask and incubated in a rotary shaker (Lab Therm, Kühner AG, Basel, Switzerland) at 30°C for 24 h. Cells at stationary phase were then harvested by centrifugation (5810 R, Eppendorf, Hamburg, Germany) at 20°C and $2,500\times g$ for 5 min. Harvested cells were washed twice in water-NaCl solution (0.9% wt) and suspended in the same salt solution (final cell density = 2×10^{10} cells ml^{-1}) before drying kinetics.

2.3.3 Dehydration kinetics parameters

Dehydration kinetics has a high impact on yeast survival. Thus, in order to achieve highest cell viability after dehydration, time-temperature parameters were based on a previously study using a pre-pilot fluidized bed drying (Câmara Jr. et al., 2018). Two dehydration kinetics KA and KB presented in Tableau 5-1 were carried out inside of hermetically sealed plastic chambers (Figure 5-1). The water activity (a_w) was controlled using different saturated salt solutions of potassium nitrate, sodium bromide or potassium acetate. A RH-temperature data logger (EasyLog EL-USB-2-LCD, Lascar Electronics, Pennsylvania, USA) was placed inside the chamber in order to check the stability of the desired parameters. The kinetics were carried out in three stages. Initially, 10 drops of $10\ \mu\text{l}$ of each sample were placed separately in two sterile polypropylene supports which were both transferred to the first drying chamber, kept under controlled conditions and being transferred successively at end of first cycle to the second one and third chamber until the end of whole kinetics. At the end of the process, cells were rehydrated with 5 ml of 0.9% water-NaCl solution ($a_w = 0.99$) at 38°C during 5 min and then vigorously stirred during 10 sec (final cell density = 4×10^8 cells ml^{-1}).

Tableau 5-1 : Performed kinetics profiles. Each kinetics, KA or KB, was performed in three steps (time-temperature) using different saturated salt solutions to control the a_w (water activity)

Kinetic profile		Step	a_w	Temperature	Time
KA		1	0.95 ^a	17°C	20 min
		2	0.54 ^a	31°C	45 min
		3	0.20 ^b	45°C	25 min
KB		1	0.93 ^a	27°C	15 min
		2	0.49 ^a	41°C	25 min
		3	0.18 ^b	60°C	20 min

Saturated salt solution used to control a_w : Step 1, KNO_3 ; Step 2, NaBr ; and, Step 3, CH_3COOK . ^a Greenspan (Greenspan, 1977). ^b Labuza et al. (1985)

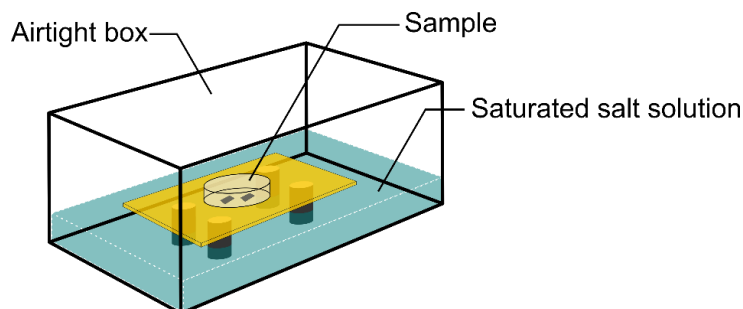


Figure 5-1 : Scheme of the airtight box with controlled relative humidity. The saturated salt solutions of KNO_3 , NaBr or CH_3COOK cover the lower part of the chamber. The polypropylene supports containing the yeast samples were deposited on a rack. The RH-temperature data logger was placed inside the chamber during kinetics

2.3.4 Measurement of yeast cell functionality and membrane integrity using flow cytometry

Cell functionality and membrane integrity measurements were assessed using a flow cytometer after a double staining cells with fluorescein diacetate (FDA) (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) and propidium iodide solution (PI) (Sigma-Aldrich, Missouri, USA). FDA stock solution was prepared diluting 10 mg of FDA into 1 ml acetone and stored at

-20°C until analyses. For the analysis, the FDA stock solution was thawed for 15 min at 25°C and the volume was adjusted to 5 ml with acetone and kept at 4°C (solution stable up to 20 min protected from light). After rehydration, 800 µl of cell suspension was transferred to 5 ml polypropylene tube and 200 µl of FDA solution was added (final concentration of 0.01 mg FDA ml⁻¹ cell suspension). After 10 min kept in the dark, 2 µl of PI (1 mg ml⁻¹) was added to the sample tube immediately before analysis and vigorously stirred for 5 s. A sample not submitted to the drying kinetics was used as positive control (25°C for 90 min or 60 min) and a dead yeast cells suspension (heated at 90°C for 20 min) as a negative control. Flow cytometry measurements were carried out using a BD FACS Aria II flow cytometer analyzer (BD Biosciences, San Jose, USA) equipped with two lasers (excitation lines at 488 nm and 633 nm). The FDA and PI fluorescence was detected with at least 10,000 events in each analysis and data was compensated based on the staining of each individual fluorochrome alone and corrected for autofluorescence with unstained cells. Results were expressed as % of viable cells (positive FDA and negative PI cells)/total cells. The percentage of events within a gate is expressed as the mean ± standard deviation of results from at least three replicate experiments.

2.3.5 Microscopic observations

After rehydration (if necessary), 160 µl of cell suspension was transferred to a 1.5 ml tube and 40 µl of FDA was added in the same conditions than those of flow cytometry measurements. After 10 min and immediately before microscopic analysis, 4 µl of PI was added to samples. Samples were protected from light during all procedure. A two-photon Nikon A1-MP laser-scanning microscope (Nikon, Tokyo, Japan) equipped with a ×60 (NA: 1.27) Plan Apochromat water-immersion objective (Nikon) was used to acquire images from FDA and PI signals. Excitation was performed using an IR laser (Chameleon, Coherent) at 720 nm. Emission signals were collected on two detection channels (channel 2 (green): FF03-525/50-25 filter [500-550 nm]; and, channel 4 (red) FF01-629/56-25 filter [601-657 nm]).

2.3.6 Glutathione content

After rehydration, if necessary, cells were harvested by centrifugation and suspended in sulfosalicylic acid solution (5% wt). Glutathione extraction was carried out after

disrupting cells with FastPrep 24 (MP Biomedicals, California, USA) – 6 cycles of 45 s at 5 m s⁻¹. After disruption, samples were kept on ice for 15 min. Supernatants were collected by centrifugation during 10 min at 10,000×g and 4°C (5471 R, Eppendorf, Hamburg, Germany) and stored at –80°C. The total glutathione (GSht) was determined by using the glutathione assay kit CS0260 (Sigma-Aldrich, Missouri, USA), according to the manufacturer's instructions. Quantification was assessed by reading the evolution of absorbance during 5 min at 412 nm. The total glutathione content in samples was calculated based on an external calibration. Oxidized glutathione (GSSG) content was measured using the method of Griffith (Griffith, 1980) with modifications. Samples were mixed with 0.9 M 2-vinylpyridine to avoid oxidation from GSH to GSSG. After 1 h at room temperature, excess of 2-vinylpyridine was neutralized with 1.3 M triethanolamine. Quantification of GSSG from derivatized samples was carried out as described above. The GSSG content in samples was calculated based on an external oxidized glutathione calibration. Levels of reduced glutathione (GSH) were calculated as follows: $GSht = GSH + 2GSSG$ (Rahman et al., 2007). Results were expressed as μg total glutathione 10^{10} cells⁻¹ and GSSG:GSH ratio.

2.3.7 Trehalose content

Rehydrated cells were harvested by centrifugation and resuspended in distilled water. Extraction/disruption was carried out as described above. The samples were maintained at 80°C for 15 min and supernatants were collected by centrifugation. Trehalose (TRE) contents were determined using the trehalose enzymatic kit ref. 016 (Biosentec, Toulouse, France), according to the manufacturer's instructions. Quantification was performed at 340 nm using a spectrophotometric plate reader (Paradigm, Beckman Coulter, California, USA). TRE concentration in samples was calculated based on an external standard calibration.

2.3.8 Statistical analysis

Statistically significant differences were analyzed by the Tukey HSD post-hoc test or by one-way analysis of variance (ANOVA) using the STATISTICA® software (Statsoft, Oklahoma, USA).

2.4 Results

2.4.1 Cell viability

In order to investigate the physiological behavior of the three non-*Saccharomyces* strains species during drying, cell viability was evaluated before and after dehydration kinetics (KA or KB) and was compared to the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (Sc, control strain). Cells were double stained with FDA and PI to indicate with precision if cells were viable and metabolically active. For all strains, better viability was found when cells were cultivated in GSM (Figure 5-2). When these cells were dehydrated under KA, Sc and Td cells exhibited viability of 70% and 64%, respectively (gray and light red bars, Figure 5-2A and B). No significant differences were found for Mp and Lt cells. However, when applying KB, cell viability was 13% for Sc, 41% for Mp and 2% for Lt yeasts (black, green and blue bars, Figure 5-2A, C and D). Td cells could better resist to this dehydration condition than the former (red bar, Figure 5-2B). Cells cultivated in TSM showed reduction in cell viability levels for all tested strains. Compared to GSM controls, up to two-fold less viable cells were found for TSM in control conditions (white bars, Figure 5-2A-D). These results suggest an adaptive nutritional behavior for all strains. Cells growing in TSM showed lower resistance to KA than GSM cells, especially for Sc and Lt that showed respectively 27% and 22% of cell viability (gray and light blue bars, Figure 5-2A and D). However, Mp and Td grown in TSM showed no significant difference in this dehydration condition. On the other hand, very low viability levels were found for all strains cultivated in TSM and dehydrated with KB, with 5% for Sc, 25% for Td, 12% for Mp and <1% for Lt. In order to compare results obtained with GSM and TSM grown cells, cell viability was also evaluated using another culture medium traditionally employed for yeast cultures, YPD medium. Cell viability of yeasts cultivated on YPD was similar to that obtained with cultured cells on GSM. Significant cell viability differences between control and dehydrated cells was observed when applying KA, which corresponded 53% for Sc, 69% for Mp and 71% for Lt (gray, light green and light blue bars, Figure 5-2A, C and D). Similar behavior was found when using KB, with 24% for Sc, 36% for Mp and 5% for Lt (black, green and blue bars, Figure 5-2A, C and D). Td cells grown in YPD showed 61% and 65% of cell viability in both dehydration conditions KA and KB (light and dark red bars, Figure 5-2B). These results suggest that yeasts growing in rich-nutrient media (GSM or YPD) can acquire dehydration resistance, more

particularly when applying the dehydration kinetics KA. Cell cultures in nutrient-poor medium (TSM) reduced cell viability even before dehydration, probably due to a limited nutritional environment.

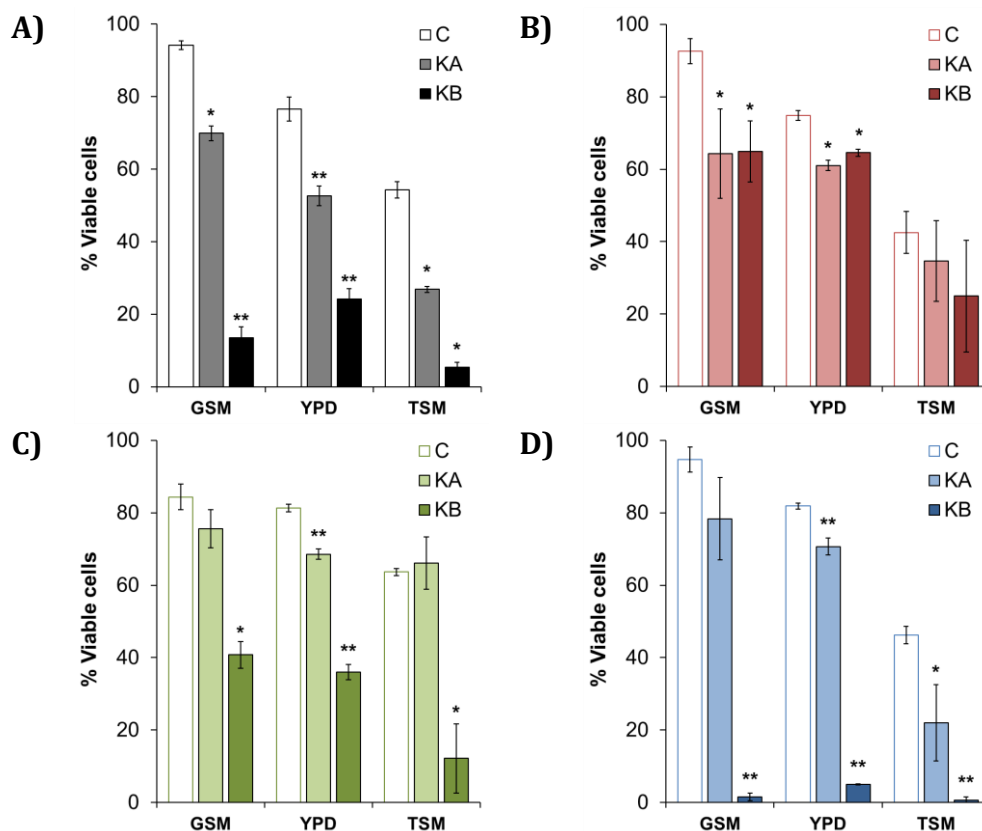
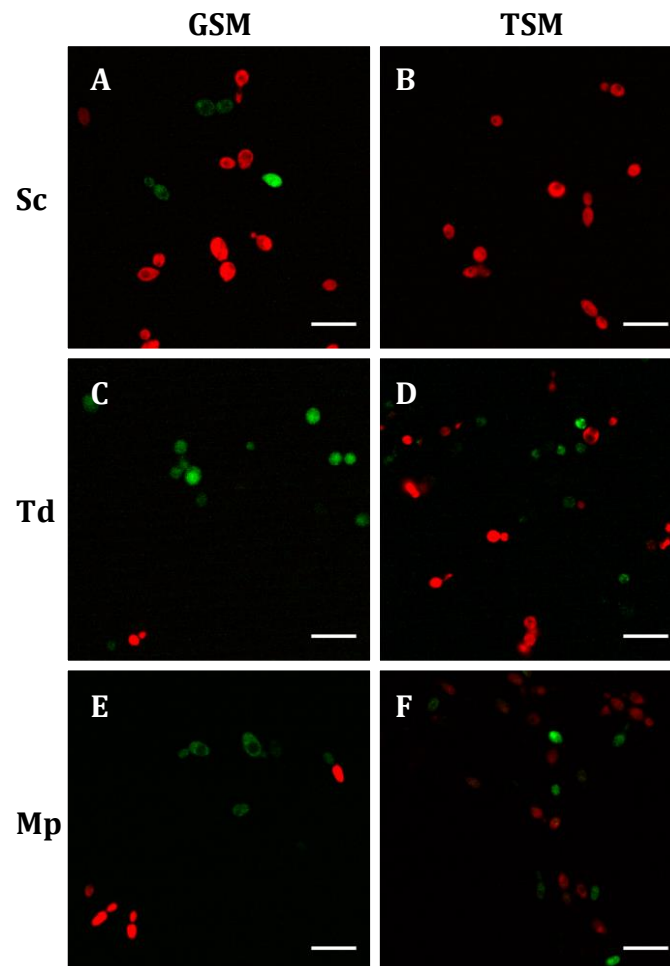


Figure 5-2 : Cell viability of *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii*, *M. pulcherrima* and *L. thermotolerans* yeasts. Cell viability was assessed by flow cytometry and double staining cells with FDA and PI. Yeasts were grown in GSM, YPD or TSM. Dehydration kinetics KA and KB were carried out in airtight boxes and using saturated salt solutions. For each strain and growing condition, a fresh cell suspension not submitted to the treatment was used as control (\square C). Letters correspond to: (A) *S. cerevisiae* cells, black bars; (B) *T. delbrueckii* cells, red bars; (C) *M. pulcherrima* cells, green bars; and, (D) *L. thermotolerans* cells, blue bars. Values are based on at least three independent replicates \pm standard deviation. Significant differences with the corresponding control condition were tested according to Tukey's HSD post-hoc at: * $p < 0.05$ or ** $p < 0.01$.

2.4.2 Yeasts metabolic activity and membrane permeability analysis by two-photon microscopic observations

In order to examine most important differences between growing conditions (GSM and TSM) and yeasts strains, we choose to observe cells only after the most drastic dehydration kinetic, KB. After a dehydration-rehydration cycle, cells were stained with both FDA and PI. Representative images are presented in Figure 5-3. After growing in

GSM, high proportion of non-permeabilized and esterase active yeasts, i.e. viable cells, was observed for Td and Mp strains, 73% and 58% of viable cells respectively (Figure 5-3C and E). Conversely, when these same cells were grown in TSM they showed an opposite behavior, with a large proportion of red cells, i.e. dead cells, and only 13% and 17% of viable cells, respectively. Sc yeast cells seemed to be less resistant after exposure to KB, whatever the growing medium (Figure 5-3A and B). Lt yeast cells were the most affected by the KB, after grown in both media (Figure 5-3G and H) with <4% of viable cells after treatment. These findings were comparable to those obtained with flow cytometry analysis and suggested that viability of the cells during dehydration was not only affected by the growing conditions, but were strongly related to the intrinsic physiological characteristics of each yeast strains.



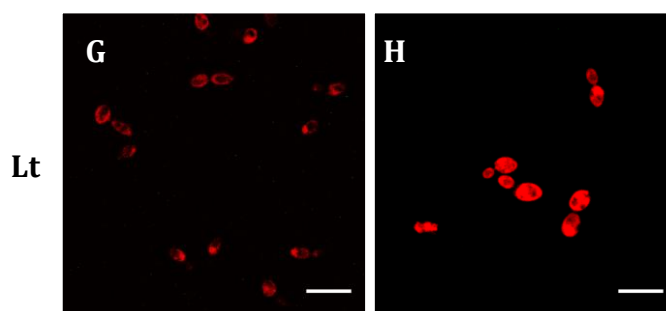


Figure 5-3 : Impact of dehydration with the kinetics KB and growing conditions (GSM or TSM) on yeast cell metabolic activity and plasma membrane permeability. Representative two-photon fluorescence imaging of yeasts stained with FDA and PI after dehydration-rehydration under controlled conditions. Letters correspond to: (A) and (B) *S. cerevisiae* cells; (C) and (D) *T. delbrueckii* cells; (E) and (F) *M. pulcherrima* cells; and, (G) and (H) *L. thermotolerans* cells. The percentages represent the non-permeabilized and esterase active yeasts (viable and green cells) for each growing condition and strain. Scale bar = 12 μm .

2.4.3 Glutathione content

2.4.3.1 Total glutathione

In order to evaluate the effect of nutrient availability on glutathione production and impact of dehydration on GSht, the four yeast strains were grown in GSM, TSM and YPD media and dehydrated according to both KA and KB. Before dehydration, all cells produced important amounts of GSht, which were 278, 202, 213 and 242 μg for Sc, Td, Mp and Lt yeasts, respectively (white bars, Figure 5-4A-D). When Sc, Td, Mp and Lt yeasts were grown in TSM they produced respectively 3.3, 1.7, 2.3 and 1.9 times lower content of GSht (white bars, Figure 5-4A-D). A similar behavior was found for cells cultivated in YPD, where Sc, Td, Mp and Lt yeasts produced 3.6, 2.8, 2.0 and 6.3 times less GSht than in GSM. When yeasts were dehydrated with the kinetics KA, no significant differences in the amount of GSht for all strains were observed regardless the growing condition, except to Td cells grown in TSM and Lt cells grown in YPD (light color bars, Figure 5-4A-D). Conversely, all yeasts grown in GSM or TSM and dehydrated with kinetics KB showed lower GSht content, e.g. up to four times lower for Lt cells (dark color bars, Figure 5-4A-D). We did not observe this same compartment for Td and Mp cells grown in YPD which showed no significant differences between control and dehydrated cells (red and green bars, Figure 5-4B and C). These findings suggest that cells are able to accumulate much more GSht under nutrient-rich growing condition (GSM), probably due to the presence of cysteine and 10 times more nutritional sources

(yeast extract). Moreover, the kinetics KB led to the reduction of the detected GSht levels. It was possible that the higher temperature in this condition affected the intracellular glutathione content, in relation with a reduced cell viability.

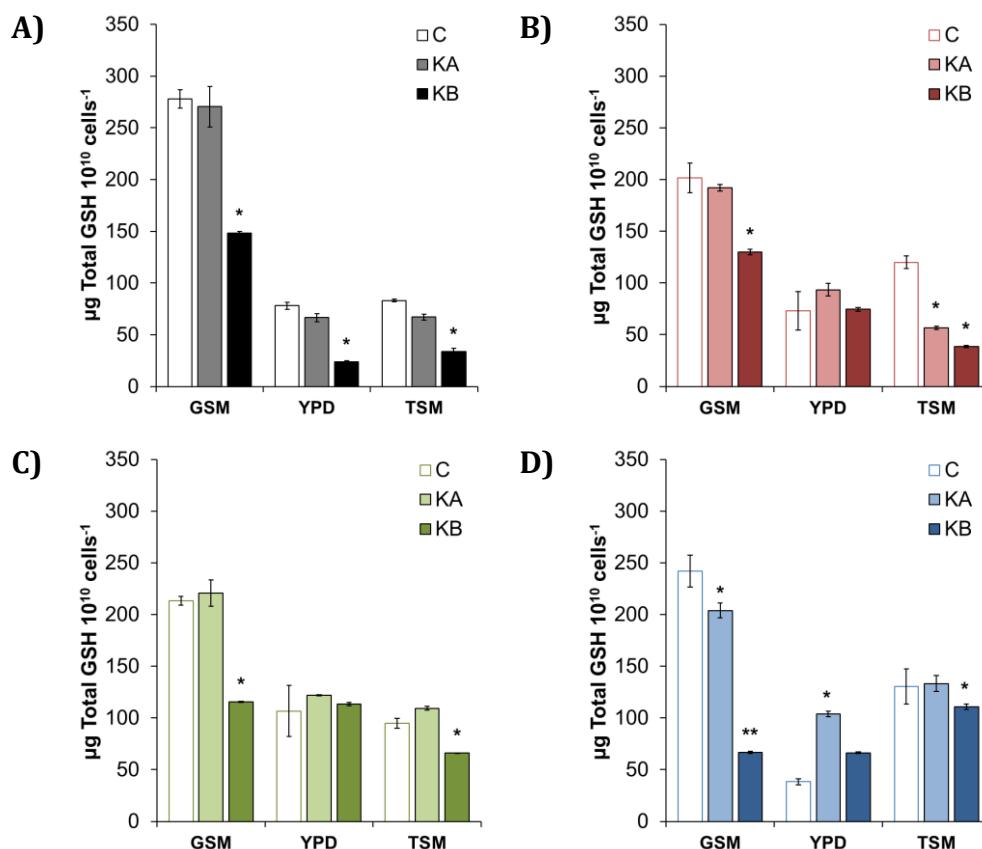


Figure 5-4 : Total glutathione (GSht) produced by yeasts *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii*, *M. pulcherrima* and *L. thermotolerans*. GSht content was estimated before (\square C) and after dehydration kinetics KA or KB. Yeasts growing were carried out in GSM, YPD or TSM. Letters correspond to: (A) *S. cerevisiae* cells, black bars; (B) *T. delbrueckii* cells, red bars; (C) *M. pulcherrima* cells, green bars; and, (D) *L. thermotolerans* cells, blue bars. Data are the mean values of three independent experiments \pm standard deviation. Significant differences with the corresponding control condition were tested according to Tukey's HSD post-hoc at: * $p < 0.05$ or ** $p < 0.01$.

2.4.3.2 GSSG:GSH ratio

The GSSG:GSH ratio is a good indicator of cell metabolic stress and oxidation. Results showed higher GSSG:GSH ratio for all tested conditions. Significant ratio enhancement was found for cells cultivated in TSM and dehydrated through kinetics KB (dark color bars, Figure 5-5A-D). In this growing condition, cells not only produced less GSht (Figure 5-4A-D) but glutathione would be more oxidized during dehydration (e.g. ratio up to eight times higher for Lt cells, blue bar, Figure 5-5D). It is interesting to note that

glutathione produced by *Sc* yeast (the best GSht producer among the four strains) grown in the YPD medium was mostly in the reduced form (Figure 5-5A). Conversely, for all yeasts grown in YPD lower GSSG:GSH ratio was found after dehydrating cells only with the kinetics KB (dark color bars, Figure 5-5A-D). These results suggest that cell culture and dehydration conditions influenced the yeast metabolic state and the cell oxidation. Glutathione enzymatic system was probably affected in such conditions.

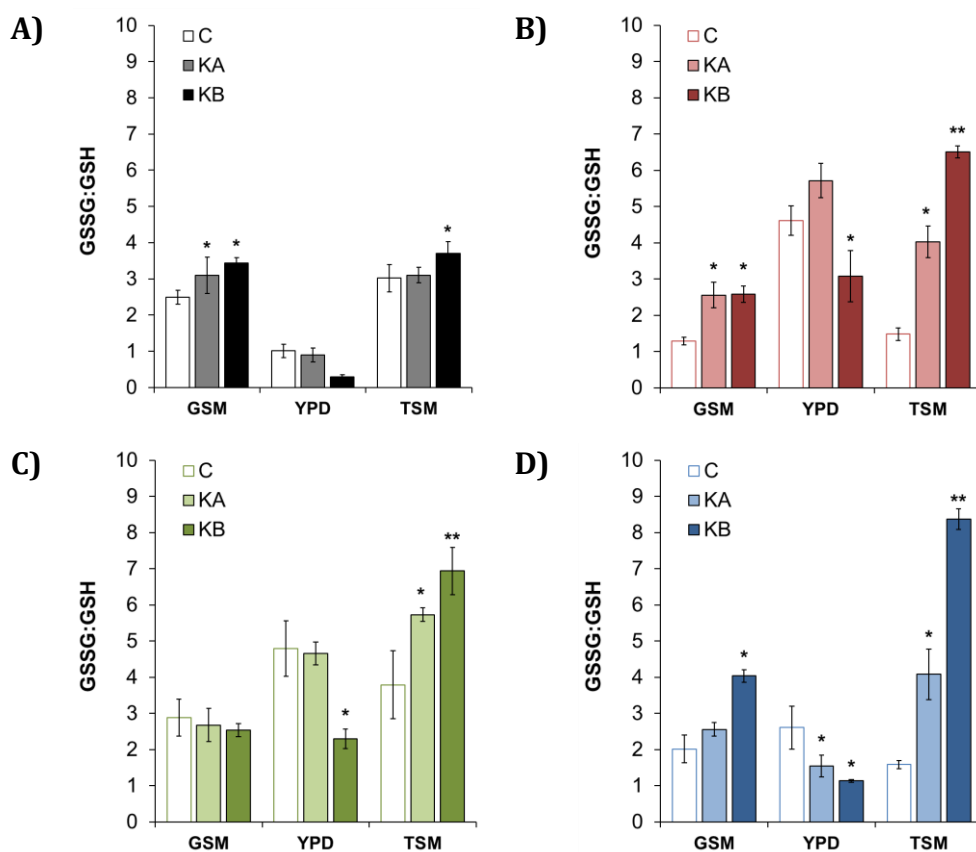


Figure 5-5 : GSSG:GSH ratio determinations for yeasts *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii*, *M. pulcherrima* and *L. thermotolerans* during biomass formation and after dehydration kinetics. GSSG (oxidized glutathione) and GSH (reduced glutathione) contents were determined before (\square C) and after dehydration kinetics KA or KB. Yeast cells were grown in GSM, YPD or TSM. Letters correspond to: (A) *S. cerevisiae* cells, black bars; (B) *T. delbrueckii* cells, red bars; (C) *M. pulcherrima* cells, green bars; and, (D) *L. thermotolerans* cells, blue bars. Data are the mean values of three independent experiments \pm standard deviation. Significant differences were tested according to Tukey's HSD post-hoc at: * $p < 0.05$ or ** $p < 0.01$.

2.4.4 Trehalose content

Cell growing in TSM provided an enhancement of TRE content for all tested yeasts (Figure 5-6A-D). These cells showed from two to three times higher TRE content than cells grown in GSM or YPD. The highest TRE content was found for *Sc* and *Td* cells,

173 μg and 195 μg , respectively (white bars, Figure 5-6A and B). Although a two-fold increase in TRE content for Mp yeast grown in TSM (green bars, Figure 5-6C) was observed, in comparison with culture on GSM or YPD media, overall amount was reduced if compared to the others yeasts strains. Dehydration kinetics KA and KB did not affect the accumulation of TRE by the cells, except for the Td and Lt cells grown in TSM that showed TRE content of 1.7 and 1.3 times lower, respectively (dark red and dark blue bars, Figure 5-6B and D). These results point out that cells growing in TSM have undergone an induction of the accumulation of large amounts of TRE, most probably due to a nutritional stress environment. This mechanism allows the cells to accumulate sugars as reserve in order to survive a possible period of subsequent stress, i.e. the dehydration.

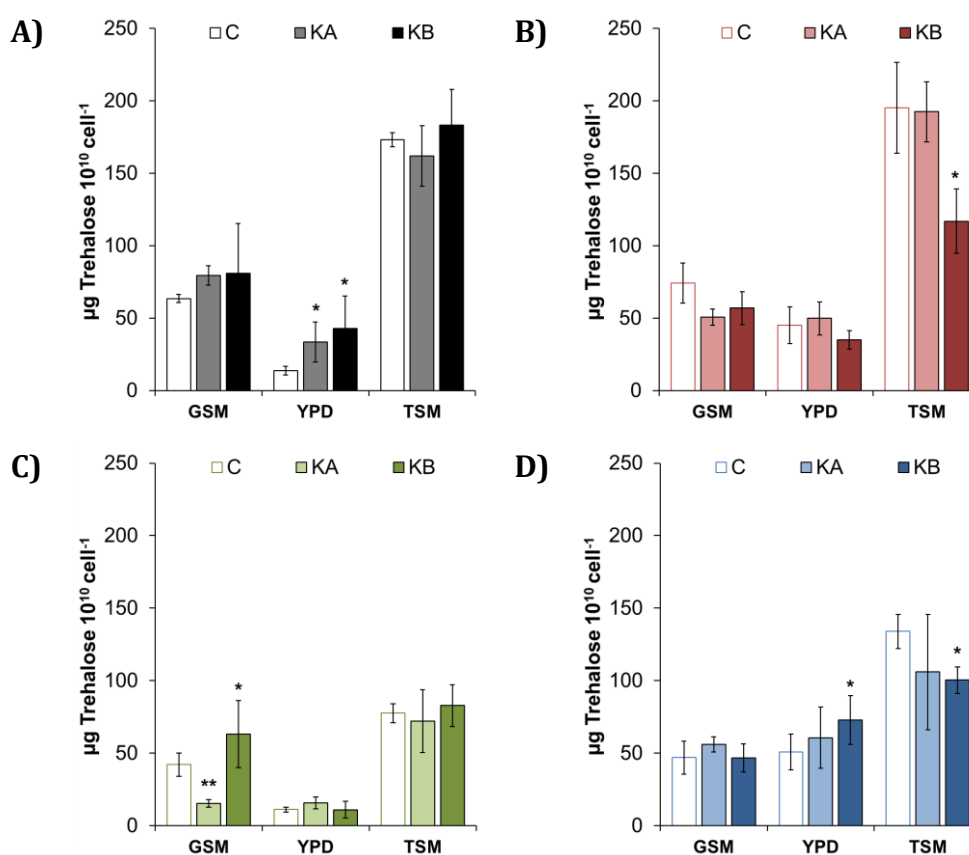


Figure 5-6 : Trehalose content in *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii*, *M. pulcherrima* and *L. thermotolerans*. Cells were grown in GSM, YPD or TSM. Intracellular trehalose content was determined before (\square C) and after dehydration through kinetics KA or KB. Letters correspond to: (A) *S. cerevisiae* cells, black bars; (B) *T. delbrueckii* cells, red bars; (C) *M. pulcherrima* cells, green bars; and, (D) *L. thermotolerans* cells, blue bars. Data are the mean values of three independent experiments \pm standard deviation. Significant differences were tested according to Tukey's HSD post-hoc at: * $p < 0.05$ or ** $p < 0.01$.

2.5 Discussion

2.5.1 Yeast dehydration resistance is related to growth conditions and strains

The growing and dehydration conditions performed in this study affected yeasts cell viability. During cultivation in the nutrient-rich medium GSM, all yeasts strains showed highest viability, compared to the cells grown in the nutrient-poor medium, TSM (Figure 5-2 and Figure 5-3). A similar behavior was found for cells cultivated in YPD medium. This result suggests two cell resistance mechanisms. The first one is related to the nutrient availability effect on the maintenance and preservation of cell life (Beker and Rapoport, 1987). For example, the importance of regulating both carbon (glucose) and nitrogen content (ammonium, glutamine) in the growing media was highlighted for extend yeast *Sc* chronological life span (Santos et al., 2016). Moreover, a previous study has already demonstrated that supplementing medium with Ca^{2+} or Mg^{2+} allows cells to increase their resistance to dehydration (Trofimova et al., 2010). In this nutritional context, high amounts of essential amino acids, peptides, vitamins and carbohydrates are present in yeast extract (Kasprow et al., 1998). Indeed, increasing yeast extract proportion in the growing medium, from 3 to 12 g l⁻¹ (final nitrogen concentration 0.141 mol l⁻¹), enhanced up to 20% the fermentative performance of the yeast *S. cerevisiae* (Bafrcová et al., 1999). Thus, in the composition of GSM, YPD and TSM media, the yeast extract represents respectively 49%, 20% and 8% of the mass of solids, so this can partially explain the better cell viability after dehydration for GSM > YPD > TSM cells (Figure 5-2 and Figure 5-3). Moreover, the presence of cysteine in GSM may have contributed to improve cell viability after dehydration. This assumption is supported by the fact that cysteine is one of the most important amino acids precursor of glutathione synthesis (Wen et al., 2004). About two-fold enhancement in biomass production was found when 2 mM cysteine was added to the growing media (Wen et al., 2006). These results lead us to infer that this favorable growing condition (GSM) may be directly related to cell viability before and after dehydration, especially after the dehydration kinetics KA. In a recent study, we demonstrated the relationship between the growing of *Sc* yeast in nutrient-rich media and the enhancement of GSht content and biomass. We also showed that this growing condition improves cell protection to fluidized bed drying (Câmara Jr. et al., 2018).

The second mechanism refers to the specific characteristics of each yeast strains. Sc, Td, Mp and Lt yeasts strains are not genetically close to each other (du Plessis et al., 2017). Thus, it was expected to obtain distinct stress responses between these four strains. On the other hand, the complex yeast metabolic machinery is the result of millions years of evolution under stressful conditions (Marsit and Dequin, 2015). Thus, it is evident that it is pretentious, if not misleading, to generalize the yeast stress resistance mechanisms with only a few physiological characteristics of the cell. Nevertheless, in the next subsections we will briefly describe some of the non-*Saccharomyces* yeasts characteristics that may help to better understand the resistance phenomena observed in this study.

T. delbrueckii yeast has already been associated with food spoilage microorganism (Kurtzman, 2011a). Today, this yeast is considered one of the best to improve the aromatic wine profile and quality. Td yeast has a strong tolerance to environments with high osmotic pressure, such as products with low water activity (Deák and Deak, 2007). This osmotolerant particularity is attributed to the high-synthesized intracellular levels of trehalose (Alves-Araújo et al., 2004; D'Amore et al., 1991). Td yeast also strongly expresses β -lyase activity. This enzyme is important for the release of aromatic thiol compounds in wines and was associated with a rapid microbial growth, in comparison to Sc cells (Belda et al., 2016b). Additionally, high levels of residual nitrogen were reported after fermentation with isolated Td yeasts (Bely et al., 2008). Authors showed that this higher content, in comparison to Sc yeast, is linked with its lower nutritional demand, or because Td yeast is a greater amino acid releaser. These characteristics suggest that the yeast ability to better withstand dehydration is connected with its intrinsic metabolic and physiological factors (Benito, 2018a).

Td yeast has a strong tolerance to environments with high osmotic pressure, such as products with low water activity (Deák and Deak, 2007). This osmotolerant particularity is attributed to the high-synthesized intracellular levels of trehalose (Alves-Araújo et al., 2004; D'Amore et al., 1991). Additionally, high levels of residual nitrogen were reported after fermentation with isolated Td yeasts (Bely et al., 2008). Authors showed that this higher content, in comparison to Sc yeast, is linked with its lower nutritional demand, or because Td yeast is a greater amino acid releaser. These characteristics suggest that the yeast ability to better withstand dehydration is connected with its intrinsic metabolic

and physiological factors (Benito, 2018a). With respect to oxidation resistance, Mp strain is able to tolerate high doses of H₂O₂. This tolerance is associated with the high catalase activity of this yeast (Barbosa et al., 2018; Mestre Furlani et al., 2017). This characteristic could explain the resistance of this yeast to dehydration even under oxidizing conditions (high GSSG content). Concerning the stress resistance, the Lt strain is highly frozen tolerant because of the important trehalose content produced by cells. During the stationary phase, cells were up to 500 times more resistant to freezing than cells in the exponential phase. This result was related to the higher trehalose content produced by cells in the growing phase (Hino et al., 1990). This high production of trehalose can partially explain the good viability of Lt strain grown even under nutritional stressful conditions (TSM). Moreover, Lt showed great tolerance to Zn and Cr (Raspor and Zupan, 2006). Similarly to Td strain, yeast Lt showed high fermentative power compared to other non-*Saccharomyces* yeasts, and it also demonstrates a glucosidase activity (Comitini et al., 2011).

2.5.2 Impact of dehydration kinetics on yeast viability

The magnitude of dehydration kinetics has a high impact on cell viability. In this study, it was clear that the kinetics KA has a weaker negative impact on yeasts cell viability, if compared to KB (Figure 5-2 and Figure 5-3). During dehydration, temperature and time amplitudes can affect cell viability (Rapoport, 2017). It was already shown that the gradual and slower rise in temperature (slope) could improve cells resistance to dehydration. In contrast, heat shock dramatically affected the yeast Sc cell viability (Guyot et al., 2015). On the other hand, the rate of water efflux through plasma membrane to outside cell followed by an increase in osmotic pressure have been related to yeast cell dehydration resistance (Dupont et al., 2014; Gervais and Beney, 2001). Indeed, plasma membrane is one of the most affected cell structures during dehydration. Lateral reorganization of plasma membrane during osmotic fluctuations in the environment have been also associated to cell death (Dupont et al., 2010). Thus, the slowest dehydration rate (due to lower temperature) during the kinetics KA has probably led to a slower water transfer from inside of the cell to outside, causing less damages to cell membranes and to structural components that are essential for maintaining cell viability.

2.5.3 Glutathione and trehalose enrichment to improve cell dehydration resistance

The increase in total glutathione (GSht) content was evident for all yeast cells grown under better nutritional conditions (GSM medium) (Figure 5-4). Nutrients availability can affect cell viability and resistance before, during and after dehydration (Câmara Jr. et al., 2018; Nguyen et al., 2017; Schmidt and Henschke, 2015). The presence of cysteine (a glutathione precursor) in GSM may have influenced both GSht production and cell resistance to dehydration (Figure 5-2 and Figure 5-4). It was shown that the two-fold increase in yeast glutathione content was correlated to the addition of 2 to 3 mM cysteine to the culture medium (Espindola et al., 2003). One interesting aspect of the study carried out by Espindola and coworkers (2003) was that the addition of glutathione monoethyl ester (a derivate of GSH) to a glutathione deficient *Sc* mutant strain ($\Delta gsh1$) restored cell viability to normal levels. It has been shown that the lack of the glutathione synthetase (GSH1) activity, enzyme that participates in the first stages of glutathione synthesis, and glutathione reductase (Glr1p) which participates in cellular redox balance by recycling GSSG prevent the acquisition of resistance to heat shock or oxidation (H_2O_2) (Berry et al., 2011). It seems likely that ensure cell regrowth, survival and shielding nuclear functions are the main roles of glutathione after stress (Dardalhon et al., 2012; Hatem et al., 2014). For all tested cells, our results showed that the glutathione content in its reduced form was proportionally higher in GSM grown cells, compared to TSM grown cells (Figure 5-5). Similar results were found by Hatem et al. (Hatem et al., 2014). These authors monitored the glutathione depletion on protein-thiol oxidation by using the redox-sensitive yellow fluorescent protein (rxYFP) and showed that glutathione was found predominantly in the reduced form under non-nutritionally stressful conditions.

Different mechanisms have already been proposed to elucidate the role of trehalose on yeasts viability/vitality/cultivability. Nowadays it is clearly known that it is necessary for yeasts (and other cells) to synthesize considerable amounts of trehalose to ensure and/or to improve their resistance to dehydration (Eleutherio et al., 2015). Our results showed that cells cultivated under nutrient-limited condition (TSM) have produced up to eight times more trehalose than in GSM or YPD (Figure 5-6). Cultivation of yeasts with low nitrogen, vitamins and minerals (yeast extract) and high carbon (glucose)

availability induces yeasts to accumulate large amounts of trehalose in order to survive a possible subsequent period of stress (Lillie and Pringle, 1980). During growing under limited nitrogen conditions, yeasts seem to strive to compensate for slow growth by enhancing carbon stocks through trehalose (Hu et al., 2014). Over the years, scientific findings have associated trehalose with various mechanisms of cell protection, such as enhancing membranes stabilization through interaction with hydrogens bonding and phospholipids, increasing the cytosol viscosity through the formation of a vitreous state, reducing lipid peroxidation and acting as an antioxidant (Crowe et al., 1984; de Jesus Pereira et al., 2003; Dupont et al., 2014; Eleutherio et al., 2015). The persistence of high levels of viability (Sc, Td and Mp) under conditions of possible cell starvation (TSM) may be associated with the high amount of trehalose synthesized by the cells (Figure 5-2 and Figure 5-6). Our data are in agreement with those of López-Martínez et al. (2014) that have supplemented cells with trehalose and improved cell viability of 20%. However, additional studies are necessary to define the minimum levels of trehalose needed to overcome the application of the kinetics KB, especially with Lt yeast, as the trehalose content seems to be not sufficient to maintain cell viability at the same levels than the other strains. It is important to emphasize that all these studies used the yeast Sc. For the first time, we approached the phenomenon of glutathione and trehalose synthesis in the non-*Saccharomyces* yeasts Td, Mp and Lt under different culture conditions and their correlation with its resistance to dehydration.

Furthermore, during cultivation in TSM, the enzymatic system of glutathione synthesis may have been affected due to the nutritional stress and dehydration kinetics. Sebollela et al. (Sebollela et al., 2004) demonstrated that glutathione reductase (GSH_R) activity could be suppressed by trehalose in an increasing-dependent manner (reaching up to 70% of inhibition). Indeed, suppression of GSH_R activity leads to an accumulation of oxidized glutathione (GSSG) in cells, affecting intracellular redox balance, causing oxidative stress and reducing cell viability (Espindola et al., 2003; Nguyen et al., 2017). These findings are in agreement with our results. We observed that Sc, Td, Mp, and Lt cells produced much more trehalose in TSM than in GSM/YPD media (Figure 5-6). Consequently, this production increased the GSSG:GSH rate (especially for Td, Mp and Lt, Figure 5-5) and reduced the cell viability (Figure 5-2 and Figure 5-3). Our results are in agreement with those of Gamero-Sandemetrio et al. (2014), where a similar behavior

was found with the commercial Sc T73 yeast strain. Cells showed high trehalose and GSSG contents after dehydration, and reduced GSH_R activity.

2.5.4 Can glutathione or trehalose reduce oxidation of yeast cells during dehydration?

During dehydration, the oxygen in the air has a significant effect on the oxidation of important cellular components and on intracellular ROS accumulation. This effect appears mainly in the final stages of dehydration, due to the exposure of solidified cells to oxygen in the air (Dupont et al., 2014). One of the reasons for cell death during dehydration-rehydration cycles was related to the oxidative stress processes to which cells were subjected (França et al., 2005). These observations may explain the increase of oxidized glutathione (GSSG) during prolonged drying kinetics KA (Figure 5-5). Moreover, glutathione reductase may have been negatively affected by the higher temperature used during the kinetics KB, leading to GSSG accumulation by failure of the glutathione enzyme recycling system. In addition, during biomass propagation the cells may be subjected to both osmotic stress resulting from high initial solids concentration, and oxidative stress caused by the growing media aeration (Gibson et al., 2007; Gómez-Pastor et al., 2010b). This explains why the yeast cells had a significant GSSG:GSH ratio even before dehydration (Figure 5-5).

In contrast, it is interesting to note that Sc and Td cells, which synthesized large amounts of trehalose, showed both lower GSSG:GSH rate before dehydration and after KA (Figure 5-5 and Figure 5-6). Probably in these cases, the trehalose content may have been sufficient to ensure the reducing environment in the cell, leading to lower accumulation of GSSG (less impact with ROS and glutathione reductase) and maintaining a good level of cell viability. The antioxidant activity of trehalose has been reported during yeast dehydration (Eleutherio et al., 2015). Indeed, trehalose protects lipids and proteins from oxidation and is assumed to be related to the increase in the viscosity of the medium, which reduces the biochemical reactions and inhibits the release of ROS (Dupont et al., 2014).

Thus, these observations lead us to believe that the presence of glutathione and trehalose protects the cells from oxidation during dehydration. However, there are other stress responses mechanisms that are still poorly understood, especially those involved

with the adaptation of cells to nutrient-rich or poor media and its association with oxidative stress during dehydration. Also, when we enter the field of non-*Saccharomyces* yeasts (Td, Mp and Lt) these mechanisms are even more unknown. Therefore, in order to clarify these hypotheses, future studies should investigate the adaptation of non-*Saccharomyces* yeasts to nutrient availability and its correlation with both glutathione/trehalose production and its oxidative stress response (accumulation of ROS, lipid peroxidation, etc.) during dehydration.

2.6 Conclusion

The phenomena of yeast cell adaptation to stress are very complex. Multiple responses occur during cell growing and during cell dehydration. In this study we are interested in the glutathione and trehalose synthesis in three non-*Saccharomyces* species. These molecules were described over the years as the main agents of cell protection to dehydration in the reference yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Our results showed that yeasts grown in nutrient-rich medium (GSM) promoted the best glutathione accumulation and a higher resistance, when submitted to the dehydration kinetics KA. The nutrient-poor medium (TSM) induced the cells to accumulate large amounts of trehalose, which partially protected them from GSSG accumulation. However, it was not enough to ensure the viability of the cells at the same levels as in the GSM or YPD media. In addition, the negative impact of the kinetics KB on all parameters analyzed was clearly demonstrated. These results can be used to understand certain physiological responses of non-*Saccharomyces* yeasts to dehydration, in order to promote the production and the marketing of new high performance dehydrated non-*Saccharomyces* yeasts strains for food and beverages elaboration.

2.7 Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

2.8 Acknowledgments

This work was supported by the Regional Council of Bourgogne – Franche-Comté, the “Fonds Européen de Développement Régional (FEDER)” and CNPq, “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” – Brazil [grant number 200101/2014-5 to

A. A. C. Jr.]. The authors are deeply grateful to the Plateau Technique DImaCell (Université de Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France) and to Camille Malnoury for technical assistance with the two-photon fluorescence imaging.

3 Conclusion du Chapitre 2

Dans ce chapitre, nous avons constaté que trois souches de levures non-*Saccharomyces* analysées synthétisaient du glutathion et du tréhalose en fonction de la composition des milieux de culture. Globalement, le milieu riche (GSM) a favorisé l'accumulation de glutathion par les levures. Dans ce cas, les cellules sont plus résistantes lorsqu'elles sont soumises à la cinétique de déshydratation KA (45°C-90 min). D'autre part, les cellules cultivées dans le milieu TSM ont synthétisé une teneur plus élevée en tréhalose, ce qui a partiellement protégé les cellules du stress oxydatif (teneur faible en GSSG). La cinétique de déshydratation KB (60°-60 min) a été la plus destructrice pour toutes les conditions testées. Cependant, les effets du stress oxydatif, l'une des principales causes de la mort cellulaire, semblent avoir un effet important sur ces levures. Dans ce cas, des questions se sont posées sur les réponses oxydatives (accumulation d'espèces réactives de l'oxygène, peroxydation des lipides, etc.) et sa relation avec le glutathion (Chapitre 3).

Chapitre 3

Compréhension de la résistance au stress oxydatif de trois souches appartenant à trois espèces différentes de levures non-*Saccharomyces* soumises à la déshydratation (Publication 3)

1 Introduction

Au cours de la production industrielle de levures déshydratées le stress oxydatif est l'une des principales causes de la réduction de la viabilité et de la cultivabilité cellulaire. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) s'accumulent dans les cellules et provoquent une série de dysfonctionnements métaboliques qui affectent l'activité des cellules de levure et entraînent leur mort. En raison des insaturations présentes dans les chaînes phospholipidiques, la membrane plasmique est particulièrement sensible à l'attaque et à l'accumulation de ROS.

Par ailleurs, le glutathion est l'une des principales molécules responsables du maintien de l'équilibre des réactions d'oxydation-réduction intracellulaires. Cette molécule peut aussi agir comme un piègeant des radicaux libres dans la cellule. Dans ce cas, le rapport entre le GSSG (disulfure de glutathion) et le GSH (glutathion réduit) donne des informations précises sur l'état physiologique de la cellule.

Néanmoins, des questions ont été soulevées afin de mieux comprendre le rôle du glutathion dans la lutte contre le stress oxydatif chez les souches non-*Saccharomyces*, *T. delbrueckii*, *M. pulcherrima* et *L. thermotolerans*.

Ce chapitre vise à clarifier les points suivants :

- Evaluer l'impact du stress oxydatif (accumulation de ROS et les niveaux de peroxydation lipidique) sur les trois souches d'intérêt ;
- Comprendre l'évolution du rapport GSSG:GSH avant et après la déshydratation dans différentes conditions, ainsi que son lien avec la cultivabilité des levures non-*Saccharomyces*.

Ce chapitre fait l'objet d'un article scientifique en révision dans le journal *Applied Microbiology and Biotechnology* : **Câmara Jr., A.A.**, Maréchal, P-A., Tourdot-Maréchal, R., Husson, F. (2018). Understand the oxidative stress resistance during dehydration of strains belonging to three non-*Saccharomyces* wine yeast species.

2 Understand the oxidative stress resistance during dehydration of strains belonging to three non-*Saccharomyces* wine yeast species

Antonio de Anchieta Câmara Júnior, Pierre-André Marechal, Raphaëlle Tourdot-Maréchal & Florence Husson*

2.1 Abstract

The development of new fermented foods and beverages very often requires the use of new dehydrated yeasts species. In this context, the non-*Saccharomyces* (NS) yeasts: *Torulaspora delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima* and *Lachancea thermotolerans*, stands out especially for their use in winemaking as co-culture in the fermentation of the must or must bioprotection. However, during formulation-dehydration the yeast cells impose different stresses that reduce cellular activity. Among these, the oxidative stress induced by the stabilization processes has been described as one of the main causes of cell death. In this study, we evaluated the effect of dehydration on three main cell oxidative responses: (i) ratio of glutathione disulfide and reduced glutathione (GSSG:GSH); (ii) accumulation of reactive oxygen species (ROS); and, (iii) lipid peroxidation levels. Cultivability of all tested yeast strains was affected by growing and dehydration conditions. The NS strains acquired resistance to oxidative stress, i.e. reduced GSSG:GSH ratio, ROS and lower levels of lipid peroxidation, with cells grown in a nutrient-rich medium. In contrast, when cells were grown in a nutrient-poor medium they were particularly sensible to the increased GSSG:GSH ratio and to the performed dehydration kinetics. These results showed that modulation of growing media composition is a simple way to improve resistance to oxidative attack imposed by dehydration in NS yeasts. This was the first time that multiple quantitative and qualitative indicators of oxidative stress response in these three NS yeast strains were explored. These findings could be useful to obtain new high-quality ADYs for applications in food and beverages.

Keywords: Dehydration, Oxidation, *Torulaspora delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Lachancea thermotolerans*

2.2 Introduction

Yeasts are organisms capable of surviving large periods with limited water content, i.e. in the dehydrated state; once in normal hydric conditions they reactivate their metabolism and restart its normal activity, this phenomenon is known as anhydrobiosis (Rapoport et al., 2016). Taking advantage of these characteristics, beverage industries have been interested in new species of yeasts stabilized in dry form (active dry yeasts: ADY), especially for winemaking. In general, for wine production the fermentation occurs spontaneously due to the indigenous flora present on grapes or in musts, which consists in different species of yeasts and bacteria (Liu et al., 2016). Although this practice favors the development of specific wine sensorial profiles, it remains difficult to control the natural development of the microbial population during winemaking, representing loss of yield and reproduction of the batches. Thus, the controlled application of ADY allows obtaining high quality products with guaranteed reproducibility. In addition, the long-term conservation, stability and high performance of ADYs enable the development of economically profitable marketable products (Rodríguez-Porrata et al., 2011).

In this regard, the stabilization processes of yeasts in dried form are mainly applied to the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (Sc). During ADY formulation, yeast cells undergo multiple stresses, which reduces their performance, e.g. cell starvation in the course of biomass propagation and heat and oxidation induced by the drying stages (Beker and Rapoport, 1987; Rapoport, 2017; Schmidt and Henschke, 2015). In fact, cells subjected to hydric variations accumulate intracellular reactive oxygen species (ROS) as result of failure of their detoxification systems and the functionality of the proteins and enzymes responsible for the ROS elimination (Dupont et al., 2014). In addition, evidences showed that the modulation of energy metabolism (from fermentation to respiration) have a great influence on lipid stability to oxidation, especially during the biomass propagation (Gómez-Pastor et al., 2010b).

Depending on the composition of the growing media, yeasts activate biosynthesis of different compounds, e.g. glutathione, which plays part in their resistance to dehydration-oxidation (Câmara Jr. et al., 2018; François and Parrou, 2001; Lorenz et al., 2015). Glutathione (L-gamma-Glutamyl-L-Cysteinylglycine) is a tripeptide thiol

antioxidant formed by the amino acids cysteine, glutamic acid and glycine. Its major role is to maintain the intracellular redox homeostasis, scavenging free radicals (ROS) in the cytosol and reducing the disulfide bonds produced during oxidative stress (Grant, 2001). These reactions are mediated by glutathione reductase and glutathione peroxidase, respectively (Li et al., 2004). In cells, glutathione exists in two different forms, reduced (GSH) and oxidized (GSSG, glutathione disulfide) and the GSSG:GSH ratio indicates the cell physiological and oxidative state, where healthy cells have lower GSSG:GSH ratio. In addition, better cell performance is frequently associated to high glutathione content in cells (Câmara Jr. et al., 2018; Espindola et al., 2003; Hatem et al., 2014).

In this context, the yeast *Sc* is undoubtedly the most studied eukaryotic organism. Numerous studies have elucidated the mechanisms of passive, genetic or adaptive response of *Sc* yeast during nutritional, dehydration and oxidation stresses (Câmara Jr. et al., 2018; Eleutherio et al., 2018; Garre et al., 2010; Nguyen et al., 2017). Nevertheless, precise reports about these mechanisms associated to other yeast species are currently scarce. The non-*Saccharomyces* (NS) wine yeasts *Torulaspora delbrueckii* (Td), *Metschnikowia pulcherrima* (Mp) and *Lachancea thermotolerans* (Lt) aroused great interest in recent years, especially for winemaking applications or bioprotection (Benito, 2018b, 2018a; Oro et al., 2014; Simonin et al., 2018). For example, these species are able to inhibit growing of undesirable yeast species, reduce levels of ochratoxin-A – toxin possible carcinogenic to humans – and act as a biocontrol agent against spoilage fungi (García et al., 2016). These NS yeasts are generally inoculated before the fermentation of must by *Sc* yeast, or in a co-inoculation with *Sc* (Sadoudi et al., 2012). These new practices in enology aim to either protect the must against the implantation of an undesired flora or to improve the flavor complexity of wines during winemaking (Sadoudi et al., 2017; Simonin et al., 2018).

Despite NS yeasts importance in enology, their responses to oxidation during dehydration remain currently poorly characterized. In this study we focused on the dehydration-oxidation resistance of three wine yeast species Td, Mp and Lt cultivated and dehydrated in distinct conditions, in comparison with the yeast *Sc*, as reference. We implemented the oxidant probe dihydroethidium and the quantification of total lipid peroxidation in order to evaluate the impact of growing conditions and dehydration kinetics in cell oxidative response. Moreover, the accumulation of reactive oxygen

species (ROS) in cells was analyzed by two-photon laser scanning microscopy and flow cytometry. Our findings enhance the comprehension of the growing, dehydration and oxidative stress resistance of these three NS wine species, designed to a more efficient production of ADY.

2.3 Materials and Methods

2.3.1 Yeast species and culture conditions

The strains used were *S. cerevisiae* CBS8066, *T. delbrueckii* CBS4865, *M. pulcherrima* CBS5833 and *L. thermotolerans* CBS6340. Two growing media were used: GSM (nutrient-rich medium) and TSM (nutrient-poor medium) (Câmara Jr. et al., 2018). The determination of the population (count of colony forming units, CFU) was realized on YPDA medium (Nguyen et al., 2017). Three colonies previously isolated on YPDA were transferred to a 250 ml conical flask containing 50 ml of GSM (For 1 L: 30 g glucose, 30 g yeast extract, 0.6 g KH_2PO_4 and 0.6 g cysteine) or TSM (30 g glucose, 3 g yeast extract, 0.6 g KH_2PO_4). Cells were grown in a rotary shaker (Lab Therm, Kühner AG, Switzerland) at 140 rpm, 30°C for 24 h. Cells were harvested at stationary phase by centrifugation (5810 R, Eppendorf, Germany) at 20°C, 2,500×g for 5 min and washed twice in water-NaCl solution (0.9% wt). The final cell density was 2×10^{10} cells ml⁻¹.

2.3.2 Dehydration-rehydration conditions

After cell growing, yeasts were dried with two dehydration kinetics (KA and KB) composed of three steps characterized by their water activity, temperature and duration (Figure 6-1). The steps were carried out in different hermetically sealed boxes in which the activity of the water and temperature are in equilibrium. The kinetics used allow to reproduce the dehydration processes used in the work of Câmara Jr. et al. (2018). Dehydration was carried out by disposing separately ten micro drops of 10 µl on two sterile polypropylene supports, resulting in 100 µl of cell suspension for each experience, and by transferring cells successively to the drying boxes until the end of the kinetics. After dehydration, cells were rehydrated with 5 ml of 0.9% water-NaCl solution at 38°C during 5 min. The final cell density was 4×10^8 cells ml⁻¹.

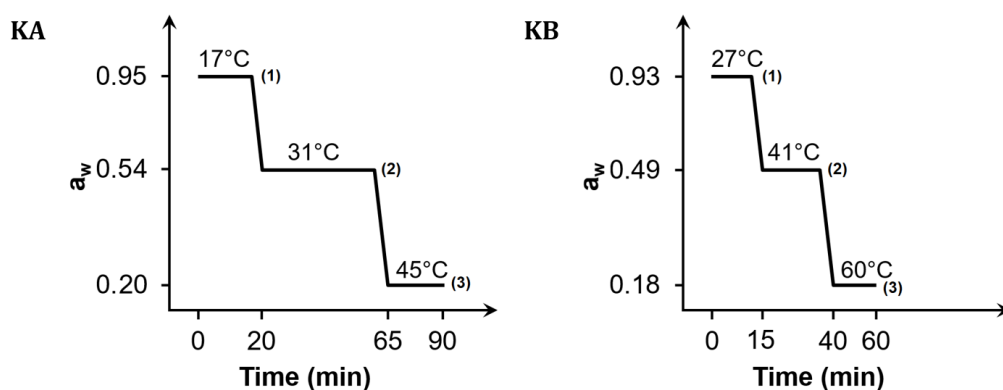


Figure 6-1 : Dehydration kinetics profiles applied to yeasts. Each kinetic, KA or KB, was carried out in three steps (time-temperature) using KNO_3 (step 1), NaBr (step 2) and CH_3COOK (step 3) saturated solutions to control the water activity (a_w)

2.3.3 Determination of cell cultivability

After dehydration-rehydration, cell suspension was serially diluted (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) in the sterile physiological solution (0.9% water-NaCl). Three micro drops ($10 \mu\text{L}$) of each dilution were spotted separately onto YPDA plates, which were incubated at 30°C for 36 h, and colonies were then counted. The control sample consisted of a fresh cell suspension of the same yeasts kept at 25°C for 60 min or 90 min and not submitted to dehydration.

2.3.4 Determination of GSSG:GSH ratio

After cells resuspension in sulfosalicylic acid (5% wt), intracellular glutathione was extracted. The cells were disrupted with FastPrep 24 machine (MP Biomedicals, USA), followed by 15 min on ice. The oxidized glutathione (GSSG) content was determined in the supernatant, after a centrifugation at $10,000 \times g$ during 10 min at 4°C (5471 R, Eppendorf, Germany), as described by Griffith (1980) with minor modifications. GSH oxidation to GSSG *in vitro* occurs rapidly and this may overestimate the oxidized glutathione content in the cell. To prevent that, samples were mixed with 0.9 M 2-vinylpyridine during 1h, followed by neutralization with 1.3 M triethanolamine. Quantification of GSSG from derivatized samples was carried out observing evolution of absorbance during 5 min kinetics at 412 nm using a spectrophotometric plate reader (Paradigm, Beckman Coulter, USA). At the same time, the glutathione assay kit CS0260 (Sigma-Aldrich, USA) was used to quantify total glutathione (GSHt), according to the

manufacturer's instructions. Levels of reduced glutathione (GSH) were calculated as: $GSht = GSH + 2GSSG$ (Rahman et al., 2007).

2.3.5 Accumulation of ROS inside yeast cells

The oxidant probe dihydroethidium (DHE) allowed the observation of the ROS accumulation by yeast cells. The DHE enters all cells and react with ion $O_2^{\bullet-}$ to form a red fluorescent compound, 2-hydroxyethidium (Zielonka et al., 2007). For the DHE stock solution, 10 ml ethanol was added to 25 mg DHE (Invitrogen Molecular Probes, USA). The solution was stored at $-20^{\circ}C$ until analysis. After dehydration-rehydration, cell suspension was mixed with 4 μ l of DHE stock solution. Cells treated with H_2O_2 (30% wt) were used as positive control. Flow cytometry analysis was carried out using a BD FACS Aria II flow cytometer analyzer (BD Biosciences, USA) using excitation laser line at 488 nm and emission filter 585/42 nm. The DHE fluorescence signals were detected with at least 10,000 events in each analysis.

2.3.6 Two-photon microscopic observations

Observations of ROS accumulation were carried out with a two-photon Nikon A1-MP laser-scanning microscope (Nikon, Japan). After rehydration, cell suspension was mixed with DHE, under the same conditions as for the flow cytometry analysis. After 10 min on the dark, images were acquired with a $\times 60$ (NA: 1.27) Plan Apochromat water-immersion objective (Nikon, Japan). Excitation was performed using an IR laser (Chameleon, Coherent) at 800 nm. Emission signals were collected on three detection channels: 2 (green): FF03-525/50-25 [500-550 nm]; 3 (orange) FF01-575/25-25 [563-588 nm] and, 4 (red) FF01-629/56-25 [601-657 nm]. The final cell density was 10^8 cell ml^{-1} .

2.3.7 Quantification of total lipid peroxidation

Total lipid peroxidation was measured with the malondialdehyde (MDA) colorimetric method (Steels et al., 1994). The MDA (Alfa-Aesar, Germany) is one of the products of the oxidative attack (ROS) to polyunsaturated lipids present in cells. Its reaction with the thiobarbituric acid (TBA) forms a colorimetric compound proportional to the MDA concentration. Rehydrated cells were resuspended in distilled water and cell disruption

was carried out using same protocol described above. The supernatant was collected and mixed with 0.1M EDTA and TBA in 0.05 M NaOH. After 15 min in water bath at 90 °C followed by 5 min on ice, the absorbance at 532 nm was measured.

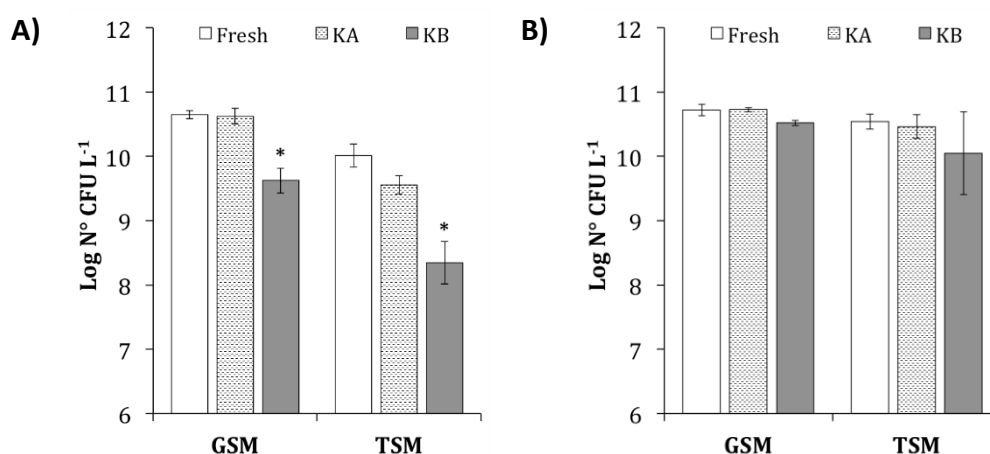
2.3.8 Statistical analysis

The data mean values and significant differences ($n = 3$) were analyzed by the Tukey HSD post-hoc test or by one-way analysis of variance (ANOVA) using the STATISTICA® software (Statsoft, USA).

2.4 Results

2.4.1 Growing and dehydration conditions have different impact on yeast cell cultivability

Cell cultivability assays permitted to analyze the impact of conditions of growing (GSM or TSM) and kinetics of dehydration (KA or KB). No significant differences (between fresh and dried cells) was observed when yeasts were dehydrated with KA (Figure 6-2A-D). Td, Mp and Lt yeasts growth in GSM have shown the same behavior when dehydrated with KB (Figure 6-2B-D) On the other hand, Sc cells grown in GSM showed a less resistance when submitted to KB, with one log reduction (Figure 6-2A). Sc and Lt cells grown in TSM showed two and three log reduction, respectively, after dehydration with KB (Figs. 2A and D). These results led us to infer that different nutritional conditions have a singular effect on yeast replication ability, especially for Sc and Lt species. Moreover, the kinetic KA minimized the negative impact of dehydration on yeast performance.



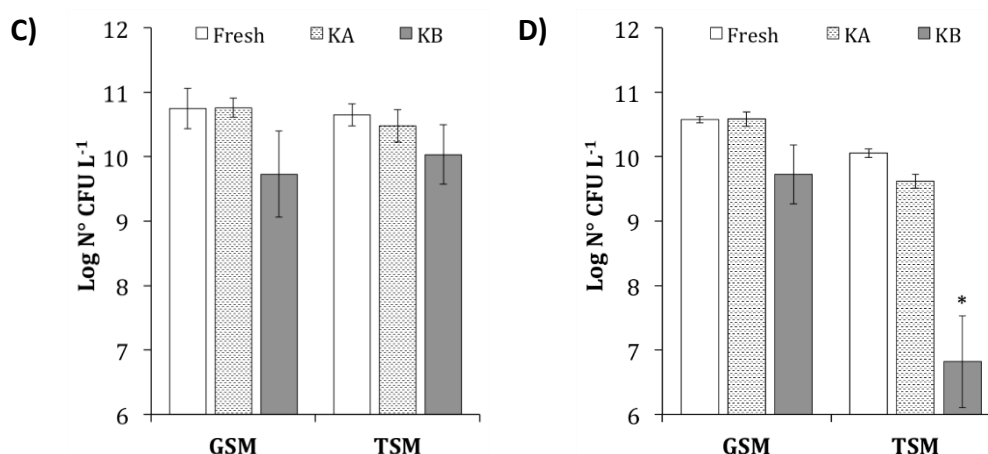


Figure 6-2 : Evolution of yeast *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii*, *M. pulcherrima* and *L. thermotolerans* cell cultivability during dehydration. Yeasts were growing in GSM or TSM and cell cultivability (CFU) was estimated before dehydration (fresh) and after kinetics A or B. (A) CFU analysis of Sc yeast. (B) CFU analysis of Td yeast. (C) CFU analysis of Mp yeast. (D) CFU analysis of Lt yeast. Error bars correspond to the standard deviation of three independent experiments. * Represents significant difference from the control (fresh) with a $p < 0.05$

2.4.2 Levels of GSSG:GSH as redox homeostasis indicator for wine yeasts

Glutathione is one of the most important redox-scavenging molecule in cells. Indeed, it was already demonstrated that GSSG:GSH ratio is a good indicator of cell oxidative and healthy state (Espindola et al., 2003; Rahman et al., 2007). The results showed an increase in the GSSG:GSH ratio for all tested yeasts and conditions, suggesting an oxidative stress in both growing (GSM and TSM) and dehydration conditions (KA and KB), but with different magnitudes according to the analyzed species (Tableau 6-1). For all tested yeasts, a growth in GSM was correlated to a lower GSSG:GSH ratio, if compared to TSM. We did not find significant differences for Mp and Lt cells grown in GSM and dehydrated with KA. In addition, Td yeast showed the higher increasing in accumulation of GSSG in cells (1.99) than the other strains, after a dehydration according the kinetic KA. After growth in GSM and dehydrating yeasts with KB, higher increase of GSSG:GSH ratio for Lt (2.00) was obtained, suggesting an effect of dehydration kinetics in the glutathione redox system, while Td (2.01) and Mp (0.88) cells showed similar increases to those, obtained after the kinetic KA.

Tableau 6-1 : GSSH:GSH ratio for yeasts, *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii*, *M. pulcherrima* and *L. thermotolerans*, at different conditions of growing (GMS or TSM) and dehydration

Yeast	Condition	GSSG:GSH ratio			
		GSM	IF	TSM	IF
<i>S. cerevisiae</i>	Fresh	2.49 ± 0.20 ^a	-	3.02 ± 0.38 ^{a,b}	-
	KA	3.09 ± 0.50 ^{a,b}	1.24	3.10 ± 0.22 ^{a,b}	1.03
	KB	3.43 ± 0.15 ^{a,b}	1.38	3.71 ± 0.32 ^b	1.23
<i>T. delbrueckii</i>	Fresh	1.29 ± 0.10 ^a	-	1.48 ± 0.18 ^a	-
	KA	2.56 ± 0.35 ^b	1.99	4.02 ± 0.44 ^b	2.72
	KB	2.59 ± 0.23 ^b	2.01	6.51 ± 0.16 ^c	4.39
<i>M. pulcherrima</i>	Fresh	2.88 ± 0.51 ^a	-	3.79 ± 0.94 ^a	-
	KA	2.68 ± 0.46 ^a	0.93	5.73 ± 0.19 ^b	1.51
	KB	2.54 ± 0.18 ^a	0.88	6.94 ± 0.65 ^{b,c}	1.83
<i>L. thermotolerans</i>	Fresh	2.01 ± 0.38 ^a	-	1.58 ± 0.11 ^a	-
	KA	2.56 ± 0.19 ^a	1.27	4.08 ± 0.69 ^b	2.58
	KB	4.03 ± 0.17 ^b	2.00	8.38 ± 0.29 ^c	5.29

Fresh = cell suspension before dehydration kinetics; KA = dehydration kinetics A; KB = dehydration kinetics B. IF = increase factor. The mean values were based on at least three independent replicates ± standard deviation. ^{a, b} For each yeast species, the different letters in the columns indicate significant differences between the cells before (fresh) and after the kinetics KA or KB, according to Tukey's HSD post-hoc test (p < 0.05).

The impact of dehydration kinetics was most evident for cells growing in TSM. Significant differences in GSSG:GSH ratio increases for Td, Mp and Lt cells dehydrated with KA were observed, with increase values of 2.72, 1.51 and 2.58, respectively. The effect of dehydration kinetics on the GSSG:GSH ratio increases was even more evident using KB. All NS yeasts showed a strong rise in the GSSG:GSH ratio, Td (4.39), Mp (1.83) and Lt (5.29). These findings suggest an adaptive nutritional response in function of growing media composition and species. Moreover, they underline that non-*Saccharomyces* yeasts dehydrated with the kinetic KB showed a higher increase of GSSG:GSH ratio.

2.4.3 Better nutritional environment correlates with reduction of ROS

The intracellular accumulation of ROS was evaluated with DHE as fluorescent indicator via two different techniques: two-photon laser scanning microscopy (qualitative) and flow cytometry (quantitative). DHE is a well-known ROS probe used to examine oxidative stress response in cells. In the next four subtopics, are showed the effects of growing media and dehydration kinetics on the ROS accumulation for each yeast strains.

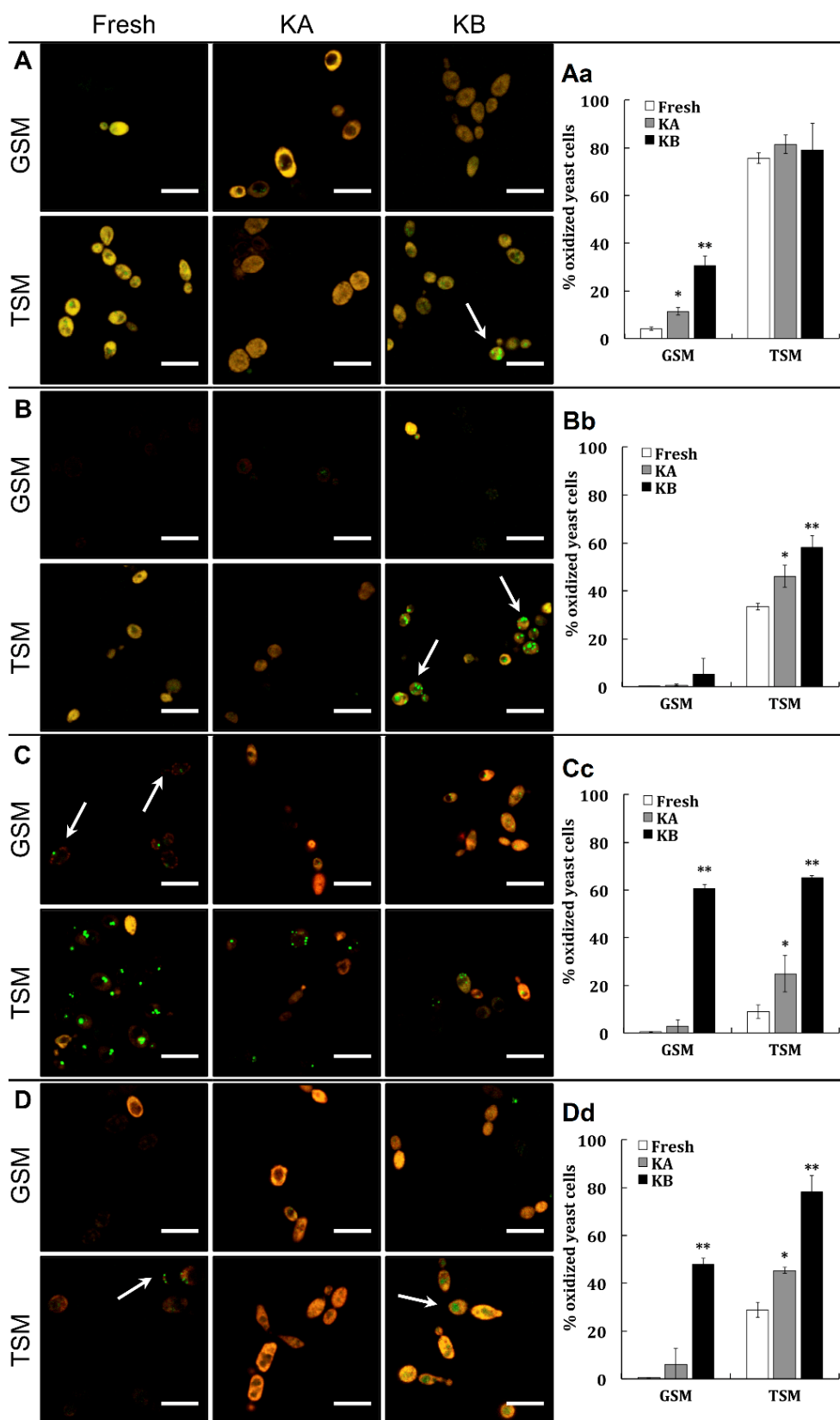


Figure 6-3 : Analysis of the oxidative stress response of yeasts *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii*, *M. pulcherrima* and *L. thermotolerans* cultivated in GSM or TSM and dehydrated with kinetics KA or KB. Cells were growth in GSM or TSM and intracellular ROS were detected with dihydroethidium (DHE) using two-photon

fluorescence microscopy and flow cytometry. Flow cytometry analysis and microscopic representative images of cells were acquired before dehydration in fresh cells (white bars) and after KA (gray bars) or KB (black bars). Final cell density was 10^8 cells ml^{-1} . Letters correspond to: (A-Aa) *S. cerevisiae* cells; (B-Bb) *T. delbrueckii* cells; (C-Cc) *M. pulcherrima* cells; and, (D-Dd) *L. thermotolerans* cells. Error bars correspond to the standard deviation of three independent experiments. Tukey's HSD was used to test significant difference with the corresponding control (Fresh) at * $p < 0.05$ or ** $p < 0.01$. Scale bar = 10 μm

2.4.3.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Sc yeast cultivated in GSM has showed slight ROS accumulation for fresh cells (Figure 6-3A and Aa). We observed cells with bigger vacuole (Figure 6-3A) and a significant higher ROS accumulation when Sc cells were dehydrated with KA (Figure 6-3Aa). In addition, almost 30% of cells were ROS positive when using the dehydration kinetic KB ($p < 0.01$). Cells grown in TSM showed the highest ROS accumulation, approximately 80% of total events with no significant differences for fresh, KA or KB conditions (Figure 6-3A and Aa). These data suggest that the yeast Sc was particularly sensible to growing and dehydration conditions applied in this study. Is also interesting to note some 'green spots' in the cells grown in TSM (Figure 6-3A, white arrow).

2.4.3.2 *Torulaspota delbrueckii*

The effect of growing and dehydration conditions to Td yeast oxidative response was less evident in comparison with Sc yeast. Td cells cultivated in GSM showed almost no fluorescent signals in both microscopy and flow cytometry analyzes (Figure 6-3B and Bb). In contrast, Td cells cultivated in TSM showed a gradual accumulation of ROS (Figure 6-3B and Bb). In this growing condition, the percentage of oxidized cells was significant different for both KA (46%) and KB (58%). These results correlated to microscopy analysis. Like before, we observed an increase of 'green droplets' intensity for cells cultivated in TSM and dehydrated with KB (Figure 6-3B, white arrows), suggesting a stress response to nutrients availability and to the applied dehydration kinetics.

2.4.3.3 *Metschnikowia pulcherrima*

In the case of Mp yeast, when cells were cultivated in GSM they exhibited insignificant accumulation of ROS before and after dehydration with KA, which represented 0.2% and

3%, respectively (Figure 6-3C and Cc). However, we observed a significant percentage of oxidized yeasts after KB (61%) (Figure 6-3C and Cc). When Mp cells were cultivated in TSM, they showed an increase in ROS accumulation for both kinetics KA (25%) and KB (65%). We observed separated red spots in the Mp cells membrane with a low fluorescent intensity (Figure 6-3C, white arrows). In addition, the yeast Mp was the one that exhibited the 'green droplets' in greater quantity and intensity than the other yeasts when cultivated in TSM, even before the dehydration (Figure 6-3C). These results suggest a correlation between these 'green droplets' and nutritional stress and dehydration kinetics.

2.4.3.4 *Lachancea thermotolerans*

Accumulation of ROS in the yeast Lt was most evident and significant for cells dehydrated with KB for both growing conditions GSM and TSM, which were 48% and 78%, respectively (Figure 6-3D and Dd). Lt yeast cells grown in TSM also showed an important ROS accumulation before dehydration (29%) and after KA (45%). The presence of same 'green spots' was observed for Lt cells grown in TSM (Figure 6-3D, white arrows), suggesting a stress response correlated to media composition. Lt cells grown in GSM showed no significant difference when dehydrated with KA (Figure 6-3Dd).

2.4.4 Can lipids be protected from oxidation by regulating media composition?

Under specific growing-dehydration conditions, yeast cells accumulate ROS as result of failure of the enzymatic system or by contact of dehydrated cells with air (Jamieson, 1998). In this case, lipids are particular sensible to ROS accumulation in cells, because of the double bonds in the unsaturated fatty acid chains of phospholipids (Catalá, 2009). No significant difference for Sc yeast grown in GSM and dehydration performed with KA was observed, but a strong increase in MDA content, approximately four times, was obtained when applying KB (Figure 6-4A). Despite the same behavior in TSM and after KA, MDA levels were three times higher than in GSM, as well as after KB. ROS attack to lipids of Td yeast growth in GSM seemed less strong. Indeed, we observed no significant difference between fresh, KA or KB conditions (Figure 6-4B). Even with higher ROS accumulation for fresh Td cells in TSM and after KA, levels were reduced if we compare these cells with those dehydrated under KB, which were almost eight times higher

(Figure 6-4B). Mp and Lt cells showed similar behavior after growth in GSM, with small amounts of MDA for fresh cells and after KA, and a strong increase after KB. For Mp and Lt yeasts, cells grown in TSM showed a significant increase in MDA content for both KA or KB conditions, from three to seven times higher, respectively (Figure 6-4C and D). These results led us to infer the existence of a strong correlation between cell oxidative stress (MDA, ROS) and growing-dehydration conditions performed in this study. All yeasts were less resistant to dehydration with KB, correlated with the stronger MDA accumulation after this dehydration condition.

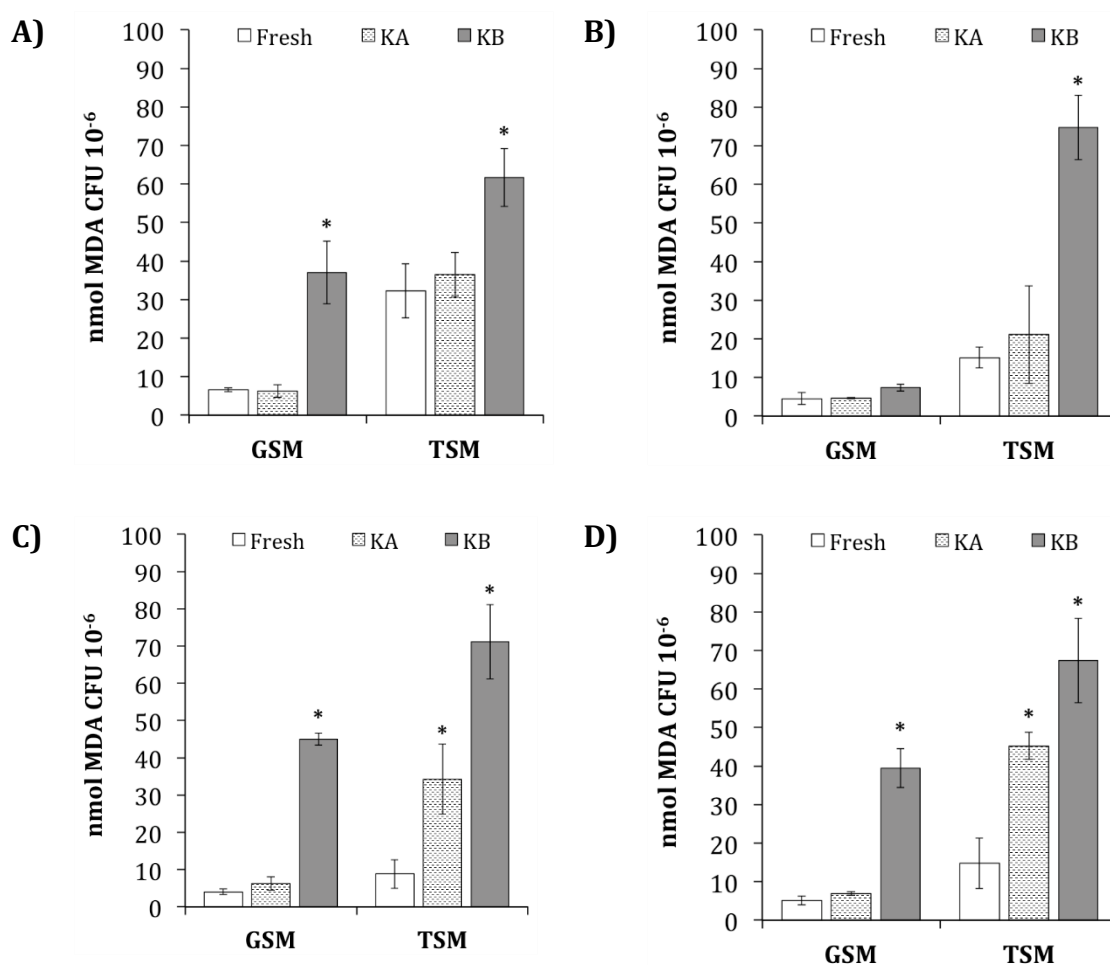


Figure 6-4 : Lipid peroxidation measurements of yeasts *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii*, *M. pulcherrima* and *L. thermotolerans*. Cells were growth in GSM or TSM and lipid peroxidation was determined in different stages: before (fresh cells) and after dehydration with kinetics A (KA) or B (KB). (A) MDA content in Sc yeast. (B) MDA content in Td yeast. (C) MDA content in Mp yeast. (D) MDA content in Lt yeast. Error bars correspond to the standard deviation of three independent experiments. * Represents significant difference from the control (fresh) with a p < 0.05

2.5 Discussion

Oxidation is one of the many stresses to which yeast cells undergo during the production of ADY. This stress plays an important part on reduction of cell performance after dehydration. Indeed, yeast cultivability can be directly affected by intracellular ROS accumulation. This compartment has been described as a major inductor or starting factor of numerous cell dysfunctions in a ROS dependent concentration manner (Ayer et al., 2013; Farrugia and Balzan, 2012). We observed that this behavior is not only dependent on the growing or dehydration conditions, but it is also correlate to intrinsic metabolic and physiological characteristics of each strain belonging to different genus and species. One of the findings in common with all species showed that cells growing in a nutrient-rich media (GSM) had the ability to replicate actively, even after dehydration (KA). In fact, yeasts can adapt their energy metabolism to the nutrients available in the environment and growing conditions (Gómez-Pastor et al., 2011; Wu et al., 2013). The presence of essential amino acids, carbon and nitrogen in sufficient amounts is primordial to extend yeast life span (Santos et al., 2016). Another factor is the presence of O₂ during the biomass formation that triggers the fermentative metabolism to change to respiration and enhances biomass propagation (Gómez-Pastor et al., 2011). This could partially explain the ROS accumulation find for Td and Mp cells grown in TSM. Mp yeast have a Crabtree-negative behavior (Bely et al., 2008; Schnierda et al., 2014), unlike Td, Sc and Lt yeasts. This mechanism is an evolutionary advantage for Crabtree-positive yeast strains (Td, Sc and Lt), due to the higher rate of ATP production during aerobic fermentation (Pfeiffer and Morley, 2014). Furthermore, the ethanol produced by these strains can be latter used as an additional carbon source, giving a fitness advantage to Td, Sc and Lt yeasts (Piškur et al., 2006). These findings suggest that a growth in GSM allows an improvement of yeast robustness during and post-dehydration. However, increasing the dehydration gradient (KB) had a higher impact on yeasts, reducing cell cultivability, probably as a consequence of oxidation. In addition, the yeasts Td and Mp have not showed the same behavior, as we did not observed significant differences in CFU analysis on all tested conditions. These results imply that these two yeasts were more resistant to dehydration than Sc and Lt.

It is also well known that synthesis of large amounts of glutathione correlates with the yeast oxidative stress resistance (Câmara Jr. et al., 2018; Espindola et al., 2003; Grant,

2001; Hatem et al., 2014). In fact, glutathione participates in several functions in cells, specially scavenging free radicals (ROS) present in the cytosol. In this way, GSSG:GSH ratio can give precise information about redox and healthy physiological state of cells (França et al., 2005; Rahman et al., 2007). We found that cells cultivated in nutrient-poor conditions (TSM) with a low glutathione amount production were much more sensible to oxidation, principally when submitted to a stronger dehydration step (KB). These findings suggest that growing in TSM may have affected yeast detoxification mechanisms. Moreover, the enzymatic glutathione recycle mechanism, one of the most important ROS elimination pathways in cells, mediated by both glutathione reductase and glutathione oxidase, may have been affected during cultivation in limited nutritional conditions (Gamero-Sandemetrio et al., 2018; Schmidt and Henschke, 2015). In addition, glutathione can be mobilized as a source of nitrogen and sulfur under limited nutritional conditions satisfying yeast growth requirements (Mehdi and Penninckx, 1997). This can partially explain why cells cultivated in TSM were more cultivable after dehydration with KA. We observed that non-*Saccharomyces* yeasts (Td, Mp and Lt) accumulated much more GSSG after KB, showing the impact of this drying condition on cell oxidative stress response. Indeed, temperature-time dehydration parameters have a crucial role during ADY production, as they can affect cell survival and stabilization post-dehydration (Gamero-Sandemetrio et al., 2014). Life occurs only in the presence of water and its removal involves severe consequences for the maintenance of microbial survival. In particular, the level of water activity in the intracellular medium plays an important role in metabolic reactions and in the maintenance of cell structure (Ball, 2008). Thus, during dehydration processes, the maintenance of cell cultivability is directly correlated with the level of activity of the water reached and the intracellular redox environment (Picazo et al., 2014). The drying kinetics and dehydration level determine the water transfer kinetics and the activity level of the final water in the cells. Thus, when the dehydration gradient is high, the transfer of water from the cell to the medium is greater and faster. Thus, drying amplitude and kinetics will have an impact on cell stability (Gervais and Beney, 2001; Rodríguez-Porrata et al., 2008), i.e. on the functionality of proteins, enzymes and cell structures.

It is well known that one of the reasons for cell death during dehydration processes is in part due to oxidative stress and accumulation of ROS inside cells (Espindola et al., 2003;

França et al., 2005). During the biomass propagation, the oxidative stress resulting from aeration also leads to the accumulation of ROS (Gibson et al., 2007; Gómez-Pastor et al., 2010b). In order to evaluate levels of intracellular ROS in yeasts, we used the oxidant indicator DHE. We analyzed the resulting metabolite 2-hydroxyethidium fluorescent signals using two methods: (i) qualitative with two-photon laser microscopy and (ii) quantitative by flow cytometry. We observed a reduced number of oxidized cells when yeasts were cultivated in GSM. These results were correlated with lower GSSG:GSH levels, while cells growing in TSM were very sensible to oxidation. In addition, dehydration via KB greatly affected the yeasts oxidation levels. In this dehydration condition, the intensity of the fluorescent signals detected by microscopy and the number of oxidized cells detected via cytometry were clearly higher, in comparison with results obtained using the kinetics KA. Interestingly, cells growing in TSM showed irregular distribution of 'green droplets' during microscopic analysis. Probably, cells cultivated in this growing condition have produced more unsaturated lipids as consequence of nutritional limited environment (Rodríguez-Porrata et al., 2011). When oleaginous yeasts, such as yeast Mp, are grown under limited nitrogen conditions and in the presence of large amounts of carbon, they accumulate lipids in response to nutritional stress (Beopoulos et al., 2009). Another hypothesis supports that these cells were metabolically weaker, with lipids more susceptible to ROS attack leading to an enhancement of oxidation levels and intensity of detected fluorescent signals. It was previously shown that these lipid droplets may arise during stressful cycles of dehydration-rehydration (Wang, 2016). The formation of these structures seems to be related to the aggregation and / or inactivation of proteins (Klug and Daum, 2014). These data support the hypothesis that the formation of these lipid droplets are also related to the restructuration of the metabolic activity and to the reparation of the cell membrane structure (Rapoport, 2017). This could explain the better resistance to dehydration-rehydration for yeasts with higher amount of these droplets, as observed with Mp.

In fact, lipids are one of the main targets of oxidation damages induced by dehydration processes (Wiseman, 1993). In order to evaluate the impact of dehydration kinetics, levels of lipid peroxidation were measured. We observed a correlation between a better nutritional growing environment (GSM) and the reduction of lipid peroxidation levels,

mainly after KA. These results also correlate with reduced levels of ROS and GSSG:GSH ratio. However, we observed an enhancement of lipid peroxidation for cells dehydrated with KB. Indeed, lipids can be directly affected with dehydration time-temperature parameters. Modifications in the lipid composition of the plasma membrane, as quantity of sterols or changes in fatty acid unsaturation levels, has already been correlated with yeast sensitivity to environmental modifications (Dupont et al., 2011). This could partially explain the improvement of oxidative attack to lipids. We also observed a nutritional effect to lipid peroxidation, with less oxidized lipids in cells cultivated in GSM. Higher levels of reduced glutathione in the cytosol protect sulfhydryl proteins against oxidation and reduce lipid peroxidation levels in yeast cells (Fernandes et al., 2007). This observation is also supported by the fact that yeasts growing in GSM exhibit lower ROS levels and a better replication activity after dehydration.

2.6 Conclusion

To the best of our knowledge, this is the first time that multiple quantitative and qualitative oxidative stress indicators have been analyzed simultaneously for the non-*Saccharomyces* yeasts *T. delbrueckii*, *M. pulcherrima* and *L. thermotolerans* during dehydration. We observed that cultivating yeasts in better nutritional environment (GSM) led to a better cell cultivability after rehydration, a reduction of GSSG:GSH ratio and lower ROS and lipid peroxidation levels. We also observed that dehydration kinetics KA led to better post-dehydration cell survival. This fact is attributed mainly to the reduction of cell oxidative stress in this dehydration condition. Our findings prove that the obtaining of new high-quality non-*Saccharomyces* ADY is directly related to the reduction of the oxidative attack caused to the cells both during the formulation of the biomass and throughout the dehydration process. In order to obtain the highest cell cultivability and viability of new ADY, future works should focus on the modulation of the composition of the growing medium and dehydration conditions according to yeast species.

2.7 Acknowledgment

This work was supported by the Regional Council of Bourgogne – Franche-Comté, the “Fonds Européen de Développement Régional (FEDER)” and CNPq, “Conselho Nacional

de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” – Brazil [grant number 200101/2014-5 to A. A. C. Jr.]. The authors are deeply grateful to the Plateau Technique DIMaCell (Université de Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France) and to Camille Malnoury for technical assistance with the two-photon fluorescence imaging and to Raphaël Caire for the support with the enzymatic analysis.

2.8 Conflict of interest

The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

3 Conclusion du Chapitre 3

Dans ce chapitre, nous avons analysé les causes de différentes sensibilités des trois souches étudiées suite aux conditions de culture et de déshydratation. La diminution du stress oxydant imposée par les cinétiques de déshydratation appliquées est corrélée à la diminution du rapport GSSS:GSH, aux niveaux réduits de ROS et à la réduction de la peroxydation lipidique. De plus, la culture des cellules dans un milieu riche en nutriments (GSM) a conduit à une plus grande robustesse des levures et à la survie des cellules après déshydratation. D'autre part, les cellules cultivées dans un milieu pauvre en nutriments (TSM) se sont révélées être plus susceptibles à l'oxydation. La cinétique de déshydratation KB (60°C-60 min) est plus destructrice pour la cultivabilité des souches NS, en raison de l'attaque oxydante plus prononcée dans cette condition. La souche de *Lachancea thermotolerans* est la plus sensible aux conditions de culture et de déshydratation utilisées. Ainsi, une analyse poussée au niveau biochimique a été initiée sur cette souche, afin de comprendre les mécanismes impliqués dans cette très forte sensibilité (Chapitre 4).

Chapitre 4

Impact de la déshydratation sur la levure *Lachancea thermotolerans* et ses réponses biochimiques au stress en utilisant la micro-spectroscopie infrarouge synchrotron (Publication 4)

1 Introduction

Les procédés industriels de production et de séchage appliqués aux levures exercent une forte influence sur leur survie et leur viabilité. Il a été précédemment démontré que la souche de levure *Lachancea thermotolerans* étudiée est particulièrement sensible par rapport à la souche *Saccharomyces cerevisiae*. Dans ce contexte, la compréhension des phénomènes biochimiques associés aux modifications de l'environnement peut donner des informations sur les réponses au stress de cette souche sensible. En particulier, des modifications dans les profils lipidique et protéique ont déjà été démontrées comme indicateurs de la perte ou du maintien de la viabilité cellulaire chez une souche de *Saccharomyces cerevisiae*.

Ce chapitre vise à clarifier les questions relatives à l'évolution des bandes spectrales à l'aide d'une méthode non-invasive de micro-spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier avec rayonnement synchrotron (S-FTIR). Cette méthode permet l'acquisition *in situ* des modifications biochimiques engendrées au cours de la déshydratation des levures au niveau d'une cellule unique.

Plus précisément, cette étude vise à élucider les points suivants :

- Comprendre l'évolution du profil biochimique des cellules de la levure *L. thermotolerans* en fonction de différentes conditions de croissance et de déshydratation ;
- Corréler les données obtenues dans le S-FTIR avec le maintien ou la perte de la viabilité cellulaire.

Cette partie fait l'objet d'un article scientifique en cours de préparation :
Câmara Jr., A.A., Nguyen, T.D., Guyot, S., Moundanga, S., Sandt, C., Peltier, C., Dujourdy, L., Saurel, R., & Husson, F. (2018). Biochemical stress responses of the yeast *Lachancea thermotolerans* during dehydration and using real time infrared micro-spectroscopy synchrotron.

2 Biochemical stress response of the yeast *Lachancea thermotolerans* during dehydration and using real time infrared micro-spectroscopy synchrotron

Antonio de Anchieta Câmara Júnior¹, Thanh Dat Nguyen¹, Rémi Saurel¹, Sylvie Moundanga¹, Christophe Sandt², Caroline Peltier¹, Laurence Dujourdy¹, Stéphane Guyot¹ & Florence Husson¹

¹ Univ. Bourgogne Franche-Comté, AgroSup Dijon, PAM UMR A 02.102, F-21000 Dijon, France; ² SMIS beamline, Synchrotron SOLEIL, F-91192 Gif sur Yvette, France

Abstract

During industrial yeast production cells are often subjected to hydric variations during dehydration, which reduce their viability and cellular activity. This study is focused on the yeast *Lachancea thermotolerans*, particularly sensitive to dehydration. The objective was to understand the modifications of cells biochemical profile during different growing and dehydration conditions. Infrared spectra of individual cells were acquired before and after dehydration kinetics using synchrotron radiation-based Fourier-transform infrared (S-FTIR) micro-spectroscopy. The cells were previously stained with fluorescent probes in order to select only viable cells before dehydration. In parallel, cell viability was determined using flow cytometry under the same growing-dehydration conditions. The S-FTIR results showed a strong contribution of the lipid spectral bands (CH₂ and CH₃) for the cells grown in nutrient-rich medium and exhibited the better viability, suggesting a plasma membrane fluidity behavior. The cells with the lower viability showed high intensity in the β -sheet and the C=O (lipid oxides) peaks, which are the indicators of protein degradation and disorder and higher lipid peroxidation levels, respectively. This was the first time that the biochemical resistance mechanisms to dehydration of the individual cells of the yeast *L. thermotolerans* strain were elucidated in real time with a non-invasive method. These findings are important for understanding the mechanisms of microbial resistance to stress in order to improve the viability of a sensitive yeast during dehydration.

Keywords: Dehydration, yeast, *Lachancea thermotolerans*, S-FTIR, proteins, lipids

2.1 Introduction

The use of yeasts is inherent to their potential industrial production and dehydration. These processes involve different steps that interfere with the yeasts' cellular activity. During biomass production, high concentration of solutes in the medium at the beginning of cell propagation causes osmotic stress (Pérez-Torrado et al., 2015). During the propagation of biomass, the consumption of nutrients induces nutritional stresses that affect several cellular functions and may lead to cell death (Gómez-Pastor et al., 2011). However, the most important stress occurs during dehydration. Removal of water by dry-air and elevated temperatures generate modifications in the water potential of the medium and in the cell itself, leading to a decrease in cells volume and an increase of the cells contact surface with air (Beker and Rapoport, 1987; Gervais and Beney, 2001; Lemetais et al., 2012; Rapoport et al., 2016). All these modifications can produce reactive oxygen species (ROS), consequently, oxidative stress and cells death (Eleutherio et al., 2018).

In order to support these steps and survive, yeasts when growing in nutrient-rich conditions are able to synthesize large amounts of glutathione, an antioxidant primarily involved in intracellular redox equilibrium reactions (Espindola et al., 2003). This molecule is able to interact with free radicals (originated by ROS) and acts as scavenging (Gamero-Sandemetrio et al., 2018; Li et al., 2004). Glutathione is found in the cell in two distinct forms: oxidized (GSSG, glutathione disulfide) or reduced glutathione (GSH). The glutathione recycling system mainly involves the activity of two enzymes, glutathione peroxidase and glutathione reductase. This mechanism is one of the most important cellular defenses against oxidative attack (França et al., 2007). On the other hand, during the nutritional stress yeasts activate the synthesis of another molecule associated with the cellular dehydration resistance, the trehalose (Eleutherio et al., 2015; Patist and Zoerb, 2005). This non-reducing disaccharide acts predominantly on the plasma membrane. It stabilizes the phospholipids by replacing the water molecules (Golovina et al., 2010). In addition, trehalose can modify the glass transition temperature (T_m) (Patist and Zoerb, 2005) and the viscosity of the cytoplasm (Dupont et al., 2014), thereby decreasing the deleterious reactions that may lead to cell death. In this context, modifications in the composition of the culture media have been reported as a simple way for induce glutathione or trehalose biosynthesis by the yeast cells. Thus, grown cells

in nutrient-rich conditions showed high intracellular glutathione accumulation while the nutrient-poor media induced cells to accumulate large amounts of trehalose (Câmara Jr. et al., 2018).

The use of the yeast *Lachancea thermotolerans* is currently of great interest for applications in various areas of the food and beverage industries, such as the production of high lactic acid content in beverages (Benito, 2018b), the bio-sorption of ochratoxin A in wines (Morata et al., 2018), the development of new sensorial profiles in sour beers (Domizio et al., 2016) and the high resistance to freezing the dough (Hino et al., 1990). However, this yeast is sensitive to dehydration (Rodríguez-Porrata et al., 2011). It appears important to understand what biochemical modifications occur during dehydration that make the yeast particularly sensitive to thermal-oxidative stress. Indeed, obtaining accurate biochemical and physiological information using dehydrated yeast cells is a challenge, especially when the interest is to understand the real-time cellular biochemical modifications without rehydration step. Indeed, most protocols of enzymatic activity determinations and measurements of proteins or lipids content involve a liquid suspension of the cells or their cell extracts. In these cases, multiple damages in intracellular compartments and/or sensitive molecules may occur during rehydration, which may lead to the accumulation of data artifacts.

Fourier-Transform Infrared (FTIR) spectroscopy is an advanced non-invasive method of analysis of several materials, including biological samples. This method allows obtaining accurate data related to the biochemical characteristics, especially lipids and proteins (Tamm and Tatulian, 1997). Specific absorption peaks related to the lipids, CH₂ (2925-2855 cm⁻¹) and CH₃ (2960-2875 cm⁻¹) bands, and to the proteins, Amide I (1658-1637 cm⁻¹), Amide II (1590-1550 cm⁻¹), α-helix (1650 cm⁻¹) and β-sheet (1630 cm⁻¹) bands, give data about the conformation of these components in the samples (Passot et al., 2015; Timilsena et al., 2018). However, the biological samples used in this method consist of a large population of cells, which gives global information on biochemical changes, but not at the single-cell level. The combination of synchrotron-FTIR (S-FTIR) micro-spectroscopy with fluorescence microscopy techniques allow both individual cell selection and obtaining the precise spectra with a high intensity light source (Tobin et al., 2016). Recently, the cell biochemical composition using S-FTIR technique was analyzed during dehydration of yeast *Saccharomyces cerevisiae* (Nguyen et al., 2017) and

during freezing of lactic acid bacteria (Passot et al., 2015) and demonstrate the potential of applying this technique to understand biochemical modifications of yeast determining its survival.

In this work, we studied the real-time single-cell biochemical response of one strain of *Lachancea thermotolerans* grown in different media and its response to dehydration. Dynamic dehydration kinetics coupled to the S-FTIR microscopy allowed to evaluate *in situ* the evolution of the cells' biochemical behavior before and after dehydration. In parallel, cell viability was determined by flow cytometry in order to correlate the obtained spectral data with cell survival.

2.2 Materials and Methods

2.2.1 Yeast strain and media composition and culture conditions

The yeast strain studied was *Lachancea thermotolerans* CBS 6340. Two media were used for glutathione or trehalose enrichment of cells: GSM (For 1 L: 30 g, glucose; 30 g, yeast extract; 0.6 g, KH_2PO_4 ; and, 0.6 g, cysteine) or TSM (For 1 L: 30 g, glucose; 3 g, yeast extract; and, 0.6 g, KH_2PO_4), respectively (Câmara Jr. et al., 2018). Three isolated colonies were grown in a 250 mL conical flask containing 50 mL of GSM or TSM, and incubated in a rotary shaker at 140 rpm, 30°C for 24 h. The cells at stationary phase were then harvested by centrifugation (2,200×g for 5 min) at 4°C. Cells were washed twice with acetate buffer solution (pH = 5.12) and suspended in the same buffer (final cell density approximately 2×10^{10} cells mL^{-1}) before drying kinetics.

2.2.2 Cell preparation and staining

In order to select only live cells before dehydration process and IR spectra acquisition, cells were previously stained with two fluorescence dyes: fluorescein diacetate (FDA, green) (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA) and propidium iodide (PI, red) (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA). FDA is a metabolic cell activity indicator and PI indicates the membrane integrity (final concentration for FDA was $10 \mu\text{g } 10^{-8}$ cells and for PI $2 \mu\text{g } 10^{-8}$ cells). An aliquot (2 μL) of double-stained cell suspension was deposited on the surface of the ZnSe hemisphere and held at room temperature and relative humidity (RH) during 10 min (25°C and 21% RH) to fix cells on the surface of the

hemisphere. Cells were then partially rehydrated in a hermetically box containing saturated water vapor during 60 min at 25°C before turning it upside down (Figure 7-1, left). Fixed and rehydrated cells were transferred to a Linkam FTIR-600 stage mounted horizontally on the base of the FTIR Nicolet Continuum infrared microscope (Thermo-Fisher, Waltham, USA) for spectral acquisition. Only green-stained (live) cells were selected before spectra acquisition (Figure 7-1, right).



Figure 7-1 : Schematic representation of the ZnSe hemisphere, images of the stage used and the double-stained yeast *L. thermotolerans* cells. The cells were fixed to the surface of the ZnSe hemisphere and carefully placed at the base of the stage. The synchrotron beam was calibrated in the center of the hemisphere. The air relative humidity and temperature were controlled and monitored during dehydration kinetics and acquisition of spectra. Only green-live cells were selected before dehydration .

2.2.3 Synchrotron FTIR micro-spectroscopy (S-FTIR) and dehydration kinetics

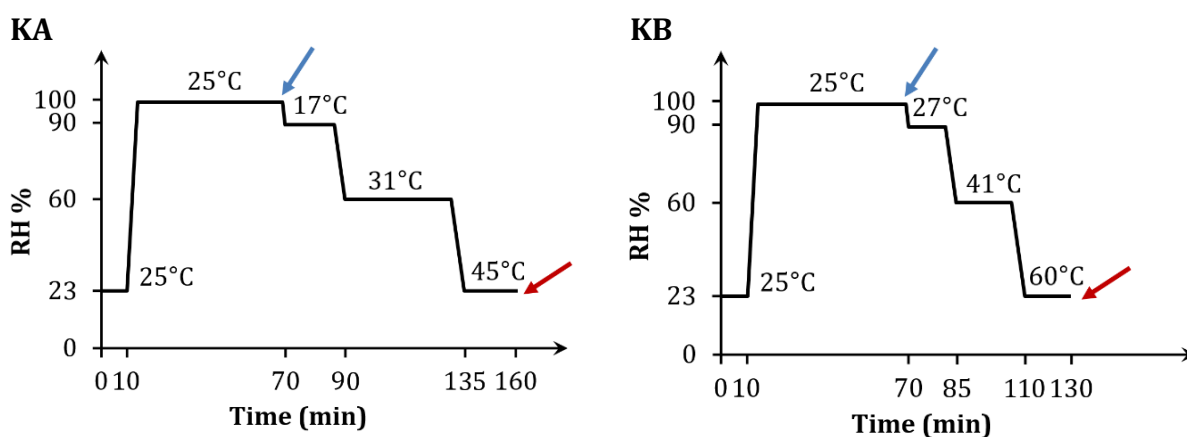


Figure 7-2 : Dehydration kinetics parameters applied to yeast cells. Double-stained yeast cells were initially fixed (10 min at 23% RH and 25°C) and partially rehydrated (60 min at 99% RH and 25°C) before both KA and KB kinetics. For the KA kinetics, the cells were maintained for 20 min at 17°C and 90% RH, followed by 45 min at 31°C and 60% RH, and finally 25 min at 45°C and 23% RH. For the KB kinetics, the cells were maintained for 15 min at 27°C and 90% RH, followed by 25 min at 41°C and 60% RH, and finally 20 min at 45°C and 23% RH. The spectra were acquired before (blue arrow) and after (red arrow) the dehydration kinetics.

In order to observe biochemical profiles of yeast cells, S-FTIR measurements were carried out with same detailed protocol described by Nguyen et al. (Nguyen et al., 2017) at a single-cell level. After cell fixation-rehydration steps, at least 30 live cells were selected for spectral acquisition before dehydration steps. The dehydration was carried out controlling the air relative humidity (RH) inside the stage and the temperature. The dehydration kinetics, KA or KB, were performed as shown in Figure 7-2. A RH-temperature data logger was used to check the stability of the desired parameters during whole process.

2.2.4 Assessment of yeast cell viability using flow cytometry

In order to evaluate cell viability, the dehydration kinetics (KA and KB) were reproduced inside of hermetically sealed drying chambers using different saturated salt solutions of potassium nitrate, sodium bromide or potassium acetate to control RH. These salts correspond to 90%, 60% and 23% of RH, respectively (Greenspan, 1977; Labuza et al., 1985). Cells were previously prepared with the same protocol of staining-fixation-rehydration protocol described above. Initially, an aliquot (2 μ L) of cell suspension was placed on a sterile polypropylene support, which was transferred to the first drying chamber, kept under controlled RH-temperature. It was then transferred successively at end of each cycle until the end of the kinetics (Figure 7-2). At the end of the treatment, the supports were transferred to 15 mL tube. Cells were rehydrated with 5 mL of acetate buffer (pH 5.12) at 38°C during 5 min vigorously stirred during 30 secs (final cell density 10^7 cells mL⁻¹) and immediately analyzed. Cell viability measurements were assessed using a BD FACS Aria II flow cytometer analyzer (BD Biosciences, San Jose, USA) equipped with two lasers (excitation lines at 488 nm and 633 nm). The FDA and PI fluorescence signals were detected with at least 10,000 events in each analysis and data were compensated based on the staining of each individual fluorochrome alone and corrected for autofluorescence with unstained cells.

2.2.5 Spectral data analysis

Mathematical pre-treatments are necessary in order to eliminate experimental biases in spectral data. The classical pre-processing techniques are baseline correction, normalization, derivatives and smoothing (Beebe et al., 1998; Wehrens, 2011). Combinations of these techniques were computed in this order: baseline correction (for

reduce systematic variation from background signal, Savitzky-Golay (SG)), filters (for reduce the amount of random variation such noise) and normalization (for remove systematic variation associated with the total amount of the sample). With SG pre-treatment, each point is replaced by a smoothed estimate obtained from a local polynomial regression. The choice of two parameters is required: w corresponding to the window size in polynomial smoothers, and p the polynomial order. In this study, the optimal window size and polynomial order were obtained with $w = 13$ and $p = 3$. All these analyses were computed using R 3.3.2 (R Core Team, 2018). The package `prospectr` (Stevens and Ramirez-Lopez, 2013) was used for Savitsky-Golay and the package `hyperSpec` (Beleites and Sergo, 2018) was used for the other pre-treatments. For more clarity in the data analysis, the mean values of the second derivative of the spectra in the regions of interest (continuous curves) and its respective \pm standard deviation (dashed curves) were plotted. The cell viability data significant differences ($n = 3$) were analyzed by the Tukey HSD post-hoc test using the STATISTICA® software (Statsoft, USA).

2.3 Results and discussion

2.3.1 Cell viability

The viability of the yeast cells *L. thermotolerans* was strongly affected by both culture conditions and dehydration kinetics. Yeasts cultivated in GSM medium showed 75% viability before kinetics, while grown cells in TSM led to 20% viability before dehydration (Figure 7-3). This reduction of cell viability could be explained by the composition of the culture medium that exerts great influence on yeast cellular activity (Wen et al., 2004, 2006). The presence of ten times more yeast and cysteine extract in the GSM may have contributed to improved cell survival. In addition, grown cells in TSM, which were harvested at the stationary phase, may have entered the stage of induction of cell death due to nutrients exhaustion (Jørgensen et al., 2002; Schmidt and Henschke, 2015; Thomsson et al., 2003).

When cells grown in GSM were dehydrated with kinetics KA they showed ~40% of cell viability and <10% after kinetics KB (Figure 7-3). These results suggest a strong cell survival/death behavior depending on applied kinetics. This behavior was even more

evident when the cells were grown in TSM, which showed viability <10% after kinetics KA and <1% after kinetics KB (Figure 7-3). It was previously shown that *S. cerevisiae* yeast cells grown in nutrient-rich media were more resistant to dehydration performed in a fluidized bed (Câmara Jr. et al., 2018). This finding was attributed to the large amount of glutathione produced by the yeast cells. Furthermore, the induction of trehalose synthesis by cells growing in nutrient-poor media also protected the yeast *S. cerevisiae* from dehydration. In our study, the trehalose synthesis by the cells grown in TSM (data not shown) may not have been sufficient to ensure cell viability at the same levels than cells grown in GSM.

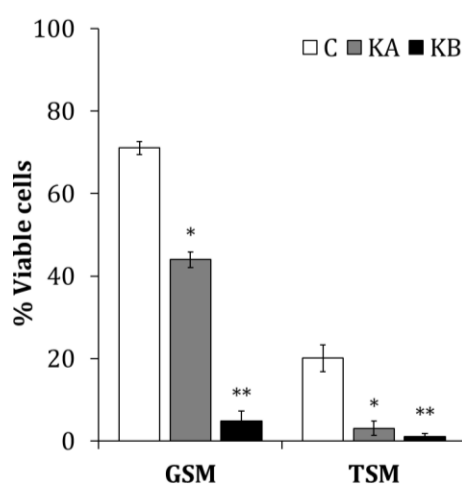


Figure 7-3 : Cell viability of the strain CBS 6340 *L. thermotolerans*. Yeast cells were harvested at the stationary phase after grown in the GSM or TSM and dehydrated according to the KA or KB kinetics. A microbial suspension submitted to the fixation-rehydration stages, but not to dehydration step was used as control (□C). Significant differences with the corresponding control condition were tested according to Tukey's HSD post-hoc at: * $p < 0.05$ or ** $p < 0.01$.

2.3.2 Evolution of lipids profiles

In order to observe the effects of growing conditions (TSM and GSM) and dehydration kinetics (KA and KB) on the lipids profiles changes of the strain, we studied the second derivative of the spectra in the region of 3050 to 2800 cm^{-1} , which corresponds to the CH groups (Figure 7-4). This spectral region characterizes the fatty acid chains of the various cell membranes (e.g. phospholipids) and by some amino side-chain vibrations (Passot et al., 2015).

Significant changes were observed in the peaks intensities of methylene (CH₂ *sym.* and CH₂ *asym.*) and methyl (CH₃ *sym.* and CH₃ *asym.*) for grown cells in GSM and dehydrated with kinetics KA (Figure 7-4). This led us to think that yeast produced higher content of short chain fatty acids and/or more unsaturated fatty acids after this growing-dehydration condition, leading to cells more resistant to dehydration (Figure 7-3). Indeed, the presence of unsaturated fatty acids has already been correlated with the higher yeast *S. cerevisiae* survival during dehydration (Nguyen et al., 2017) and lactic bacteria during freezing (Passot et al., 2015). This could be related to the higher plasma membrane fluidity (Moussa et al., 2008), which is essential for the maintenance of cell viability during dehydration-rehydration cycles (Dupont et al., 2010). These observations can explain the higher viability of the strain *L. thermotolerans* observed for this growing-dehydration condition (Figure 7-3). In contrast, when these same cells were dehydrated with kinetics KB, a reduction in the wavelength intensity of the symmetrical CH₂ stretching peak was observed (Figure 7-4B). In this case, the higher plasma membrane rigidity may have led to this reduction in correlation with a higher cell mortality. It was previously shown that the decrease in water activity of the cells during dehydration leads to a decrease of plasma membrane fluidity and thus to cell death (Simonin et al., 2008).

In the case of grown cells in TSM, significant modifications were observed in the same spectral regions as shown for grown cells in GSM. Conversely, the observed effect was globally inverted. Grown cells in TSM showed lower intensity at the CH₃ *asym.*, CH₂ *asym.* and CH₃ *sym.* spectral peaks after kinetics KB compared to the cells before dehydration (Figure 7-4C). There are three possibilities to explain this phenomenon: (i) cells in TSM may have exhibited an increased desaturation activity during dehydration (Gautier et al., 2013; Rolph et al., 1989); (ii) the nutrients-poor growing condition may have led to a higher sensitivity of the lipid chains to dehydration (Catalá, 2009); or, (iii) the increased rigidity of the plasma membrane was due to the lower water activity of the cells and to the higher trehalose intracellular content (phase transition reduction) (Leslie et al., 1994; Simonin et al., 2008). This leads us to infer that these mechanisms of stress response do not occur exclusively, but simultaneously during dehydration. We also observed modifications in the band position of different zones of the spectrum in comparison with the control condition (Figure 7-4C). Indeed, the wavenumber shift to a

lower value is associated with decreased membrane fluidity (membrane rigidification) and is due to the symmetric C-H stretching vibration of the CH₂ groups (Alvarez-Ordóñez et al., 2010). These changes can be also attributed to the reorganization of aliphatic chains of membrane lipids after dehydration (Passot et al., 2015), which may also be related to a loss of membrane integrity in this growing-dehydration condition (lower cell viability, Figure 7-3).

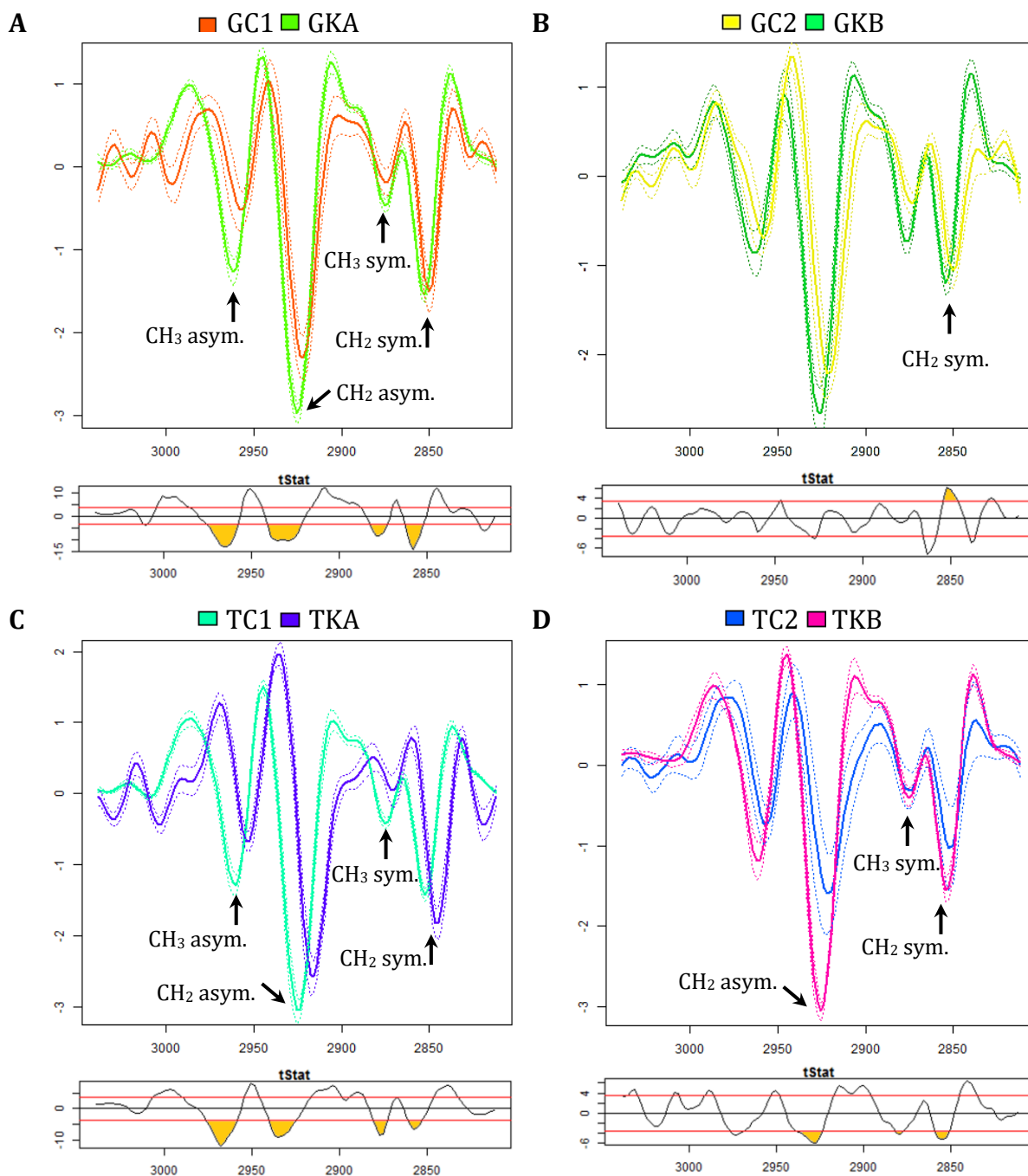


Figure 7-4 : Mean infrared spectra second derivative of the yeast cells before and after dehydration kinetics in the lipid spectral range (3050-2800 cm⁻¹). Cells were grown in GSM or TSM and dehydrated

according to kinetics KA or KB. A-B) cells grown in GSM medium. C-D) cells grown in TSM medium. At the bottom of each image are represented the significant differences (t test, red horizontal lines correspond to 95% of confidence interval) between the mean cell spectra before and after the dehydration kinetics (highlighted in orange the zone of interest; $p < 0.05$). GC1) GSM cells before dehydration with KA; GKA) GSM cells after dehydration with KA; GC2) GSM cells before dehydration with KB; GKB) GSM cells after dehydration with KB. TC1) TSM cells before dehydration with KA; TKA) TSM cells after dehydration with KA; TC2) TSM cells before dehydration with KB; TKB) TSM cells after dehydration with KB.

More precisely, the kinetic KB seems to favor the modifications in the lipid profiles of cells grown in TSM, since higher peak intensities were observed especially in the CH_2 (associated with membrane fluidity). This result may be correlated with the higher cell viability observed for yeast *S. cerevisiae* cells grown in nutrients-poor medium and dehydrated in fluidized bed dryer (Câmara Jr. et al., 2018). However, the effect of these modifications on the lipids profiles in the *L. thermotolerans* strain dehydrated under the conditions of this study is unclear, since these cells did not show a better viability during dehydration with kinetics KB.

When grown cells in GSM were subjected to dehydration with KB kinetics (Figure 7-5B), or when grown cells in TSM were dehydrated with KA kinetics (Figure 7-5C), an increase in C=O peak intensity ($\sim 1750 \text{ cm}^{-1}$) was observed. This spectral band may be related to lipid peroxidation induced by the accumulation of reactive oxygen species (ROS) (Oleszko et al., 2015). Moreover, even if these cells were obtained from different experiments and different populations, we observe a greater intensity in the C=O peak (lipid oxides) for the grown cells in TSM, in comparison with grown cells in GSM (Figure 7-5B and C). These findings reinforce the effect of growing medium composition on the yeast *L. thermotolerans* sensitivity to dehydration.

2.3.3 Evolution of proteins profiles

Modifications in the proteins profiles of the strain CBS 6340 *L. thermotolerans* were also observed under the conditions applied in this study. For grown cells in GSM, a higher intensity was observed in the β -sheet peak when the cells were dehydrated with kinetics KA (Figure 7-5A). This observation suggests variations in the Amide I band ($1610\text{-}1700 \text{ cm}^{-1}$), which is affected by the nature of the secondary protein backbone structure (Barth, 2007). This fact suggests a modification of the proteins structure after the dehydration with kinetics KA. Higher intensity of the α -Helix band of the proteins and

better cell viability after the dehydration at 45°C were showed with the yeast *S. cerevisiae* (Nguyen et al., 2017). Freezing resistant bacteria showed higher intensity in α -Helix secondary structure with up to 81% of cultivable cells after grown in MRS medium, while grown cells in whey protein showed β -pleated sheet secondary structure and lower cell cultivability (~10%) after freezing-thawing (Passot et al., 2015). Our findings indicate that this mechanism may be an indicator of the stress response of the *L. thermotolerans* strain, with a higher intensity at the β -sheet peak correlated with the viability loss (Figure 7-3). Indeed, several studies described the association of an increase in β -sheet structures with the cell death (Jamin et al., 2003; Zelig et al., 2009; Zhou et al., 2001). The lower overall intensity of the Amide II band zone (~1650 cm^{-1}) can be explained by protein degradation after dehydration (Burattini et al., 2008).

When cells grown in GSM were dehydrated with KB kinetics, a reduction in the peaks intensities related to Amide I (C = O) and Amide II (N-H; C-H) was observed (Figure 7-5B). The Amide II region has an important contribution of the curvature of the N-H bond and a small contribution of the C-N bond (Delgado et al., 2018). In this case, these modifications were most probably a consequence of protein degradation and transition of the protein to an unfolded state (Kavosi et al., 2018). We also observed that these changes were more pronounced for cells grown in TSM and dehydrated with kinetics KA and KB, especially in the regions Amide I (C=O), α -Helix and β -sheet (Figure 7-5C and D). The changes in the Amide I zone suggest an increase in the individual absorptions of α -Helix and β -sheet, related to the transition from partially degraded proteins to an unfolded and disorganized state (Burattini et al., 2008). These modifications explain the loss of viability of yeast *L. thermotolerans* associated with these two growth-dehydration conditions.

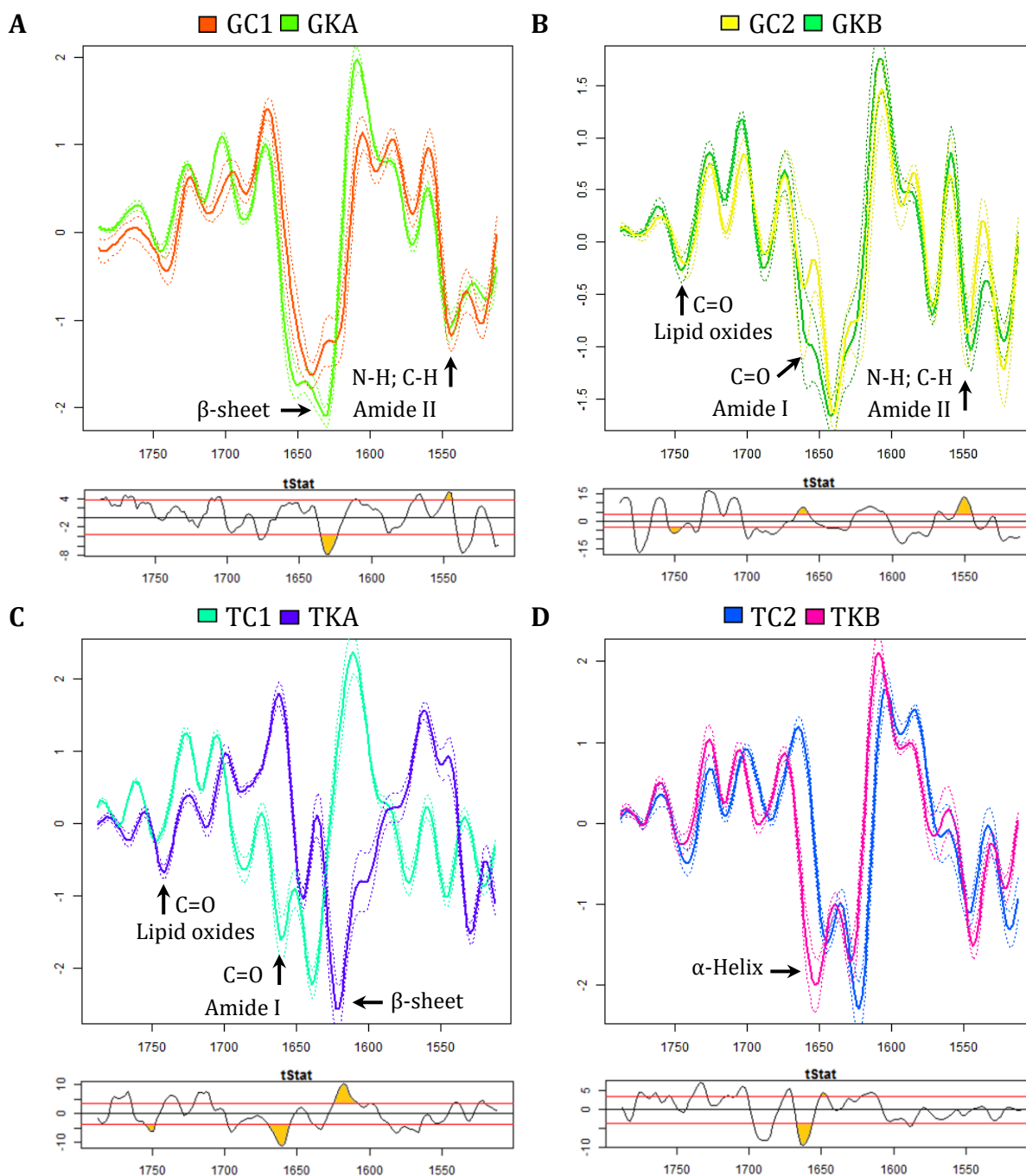


Figure 7-5 : Mean infrared spectra second derivative of the yeast cells before and after dehydration kinetics in the proteins spectral range (1800-1500 cm^{-1}). Cells were grown in GSM or TSM and dehydrated according to kinetics KA or KB. A-B) cells grown in GSM medium. C-D) cells grown in TSM medium. At the bottom of each image are represented the significant differences (t test, red horizontal lines correspond to 95% of confidence interval) between the mean cell spectra before and after the dehydration kinetics (highlighted in orange the area of interest; $p < 0.05$). GC1) GSM cells before dehydration with KA; GKA) GSM cells after dehydration with KA; GC2) GSM cells before dehydration with KB; GKB) GSM cells after dehydration with KB. TC1) TSM cells before dehydration with KA; TKA) TSM cells after dehydration with KA; TC2) TSM cells before dehydration with KB; TKB) TSM cells after dehydration with KB.

Tableau 7-1 : Main contributions of the lipid (3050-1800 cm^{-1}) and protein (1800-1500 cm^{-1}) absorption bands and comparisons of overall peak intensity effects according to growing conditions (GSM or TSM) and dehydration kinetics (KA or KB) applied to the cells.

Abs. band (cm^{-1})	Main assignment*	GSM		TSM	
		GKA:GC1	GKB:GC2	TKA:TC1	TKB:TC2
~2960	CH ₃ <i>asym.</i>	+	ND	--	ND
~2925	CH ₂ <i>asym.</i>	+	ND	--	+
~2875	CH ₃ <i>sym.</i>	+	ND	--	+
~2855	CH ₂ <i>sym.</i>	+	--	+	+
~1750	C=O Lipid oxides	ND	+	+	ND
~1670	Amide I: C=O	ND	--	--	ND
~1653	α -Helix	ND	ND	ND	+
~1637	β -sheet	+	ND	+	ND
~1550	Amide II: N-H; C-N	--	+	ND	ND

+ Higher spectral peak intensity compared to the former; -- Lower spectral peak intensity compared to the former; **ND** no difference; **GC1**) GSM cells before dehydration with KA; **GKA**) GSM cells after dehydration with KA; **GC2**) GSM cells before dehydration with KB; **GKB**) GSM cells after dehydration with KB. **TC1**) TSM cells before dehydration with KA; **TKA**) TSM cells after dehydration with KA; **TC2**) TSM cells before dehydration with KB; **TKB**) TSM cells after dehydration with KB. *Literature (Adt et al., 2006; Burattini et al., 2008; Jackson and Mantsch, 1995; Nguyen et al., 2017; Passot et al., 2015).

The main observations and contributions of the spectral bands of the lipids and proteins observed in this study are grouped in Tableau 7-1. Globally, GSM grown cells dehydrated with KA kinetics demonstrated a better cell viability and a strong contribution of the bands CH₂, CH₃ and reduction of Amide II. These data demonstrate respectively a higher synthesis of short chain and/or unsaturated lipids (probably increasing the plasma membrane fluidity) and a decrease of protein denaturation, both favorable responses to cell survival during dehydration. The loss of viability was observed especially for grown cells in TSM and dehydrated with kinetics KB. This fact can be mainly correlated with a higher intensity of β -sheet peaks and C=O (lipid oxides) bonds associated respectively to protein denaturation and disorder, and to lipid peroxidation. The decrease in viability of this strain during dehydration could be partially attributed to the yeast sensitivity to ROS oxidative attack.

For the first time, it was demonstrated the in-depth biochemistry study of the yeast *Lachancea thermotolerans* related to growing-dehydration conditions. These findings are of substantial importance for understanding the mechanisms of microbial resistance to thermal-oxidative stress and serve as a basis for optimizing the sensitive yeasts industrial production and dehydration.

2.4 Acknowledgment

This work was supported by the Regional Council of Bourgogne – Franche-Comté, the “Fonds Européen de Développement Régional (FEDER)” and CNPq, “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” – Brazil [grant number 200101/2014-5 to A. A. C. Jr.]. The authors are deeply grateful to the French national synchrotron facility SOLEIL (Gif sur Yvette, France) and the SMIS beamline (proposal N° 20150557) for their support in performing the Synchrotron FTIR microspectroscopy.

2.5 Conflict of interest

The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

3 Conclusion du Chapitre 4

Dans ce chapitre, nous avons observé certaines réponses biochimiques de la levure *Lachancea thermotolerans* au cours des différentes conditions de culture et de déshydratation. Les résultats des analyses en S-FTIR ont montré que les cellules cultivées dans le milieu riche en nutriments (GSM) donnent des spectres ayant une intensité plus élevée pour les pics associés aux lipides (CH₂ et CH₃), ce qui est corrélé à une augmentation de la fluidité de la membrane plasmique et à une meilleure viabilité cellulaire. De plus, la perte de viabilité cellulaire pour les cellules cultivées en milieu TSM est corrélée à la forte intensité des pics des feuillets β et de C=O, associés respectivement à l'augmentation du désordre et de la dégradation des protéines et à la peroxydation des lipides causée par l'accumulation de ROS. Ces résultats prouvent que la perte de viabilité de cette levure est provoquée par les conditions de culture-déshydratation utilisées et, de manière plus prégnante, que l'acquisition de la résistance serait due aux défenses biochimiques de la levure *Lachancea thermotolerans* à la déshydratation.

V. Conclusion générale et perspectives

L'objectif principal de cette thèse était de comprendre certains mécanismes de résistance à la déshydratation des levures non-*Saccharomyces*, afin de promouvoir l'amélioration des procédés de production de nouvelles souches déshydratées. Parmi celles-ci, les levures appartenant aux genres et espèces *Torulaspora delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima* et *Lachancea thermotolerans* présentent un grand potentiel pour diverses applications en agro-alimentaire. Du point de vue industriel, l'intérêt majeur est de maintenir la plus grande viabilité possible des cellules après séchage. Cependant, les modifications du potentiel hydrique des levures, induites par la transformation des cellules à l'état déshydraté, génèrent une série de dommages qui réduisent leur activité cellulaire. Dans cette perspective, cette étude a permis d'élucider certains aspects associés à la formulation-déshydratation de souches non-*Saccharomyces* d'intérêt. En outre, nous avons priorisé le fait d'obtenir des cellules à l'état déshydraté sans ajout d'additifs protecteurs, ce qui renforce le caractère innovant de ce travail de thèse.

Une partie de ce travail a été destinée à l'étude de la souche de référence *Saccharomyces cerevisiae*, qui a été produite en bioréacteur et déshydratée dans des conditions pré-pilotes. Au cours de cette étape, nous avons cherché à déterminer les conditions de déshydratation en lit fluidisé les plus proches de la réalité industrielle. En outre, deux milieux de culture ont été utilisés pour améliorer la synthèse du glutathion (tripeptide antioxydant) et du tréhalose (disaccharide associé à la dessiccation), deux composés souvent associés au maintien de la viabilité cellulaire lors de la déshydratation. Nous avons montré que les cellules de levure *S. cerevisiae* riches en glutathion sont plus résistantes au séchage à 45°C-90 min. Elles présentent en effet une meilleure cultivabilité et reprise de croissance, ainsi qu'une bonne stabilité au cours du stockage. Les cellules riches en tréhalose, malgré une biomasse plus faible, ont mieux résisté à la condition de séchage à 60°C-60 min, comparées à la condition précédente. Ces découvertes ont mis en évidence un potentiel mécanisme de modulation du milieu de culture comme moyen de renforcer naturellement (sans utilisation d'additifs) la survie des cellules soumises aux conditions stressantes (température, oxydation, activité de l'eau réduite) inhérentes aux procédés de séchage.

À partir de la définition des conditions de culture et de déshydratation, les paramètres obtenus ont ensuite été appliqués à trois souches non-*Saccharomyces* d'intérêt, *T. delbrueckii*, *M. pulcherrima* et *L. thermotolerans*. Les cultures et les procédés de déshydratation ont été effectués à l'échelle du laboratoire. Dans les cellules, le glutathion peut être sous la forme réduite (GSH) ou oxydée (GSSG, disulfure de glutathion) et l'équilibre entre la teneur intracellulaire du GSH et du GSSG est fortement lié à l'état physiologique de la cellule et, également, à sa capacité à éliminer les espèces réactives de l'oxygène (ROS) produites au cours du métabolisme cellulaire ou induites par les procédés de déshydratation. Nous avons démontré que les souches non-*Saccharomyces* étudiées sont capables d'accumuler le glutathion, ainsi que le tréhalose, d'une manière similaire à celle de la levure *S. cerevisiae*. Nous avons également observé que l'augmentation de la concentration de GSSG interfère avec l'activité cellulaire. Les cellules cultivées dans des conditions optimales (GSM) ont montré une teneur plus élevée en glutathion réduit, une meilleure viabilité et une résistance accrue aux conditions de déshydratation utilisées. En revanche, les cellules cultivées dans un environnement à faible teneur en éléments nutritifs (extrait de levure et cystéine), en milieu TSM, sont particulièrement sensibles à la déshydratation. De plus, nous avons confirmé que la cinétique de déshydratation KA est fortement corrélée au maintien de la viabilité des trois levures non-*Saccharomyces* étudiées.

Au cours de la formulation et de la déshydratation des levures, l'attaque oxydante des ROS interfère dans plusieurs réactions biochimiques essentielles à la survie de la cellule. De plus, les lipides présents dans la membrane plasmique sont particulièrement sensibles à l'oxydation, notamment les phospholipides. En fait, le glutathion, en plus de réguler l'équilibre des réactions d'oxydation-réduction, peut agir comme un piègeur de radicaux libres et comme agent détoxifiant des ROS. Nous avons montré que les conditions de culture et de déshydratation utilisées interfèrent directement avec le système de régulation du glutathion. En effet, la culture des cellules dans des conditions optimales (GSM) induit une diminution : de la teneur en GSSG ; des niveaux d'espèces réactives de l'oxygène ; de l'attaque oxydante des lipides. La cinétique de déshydratation utilisée a un rôle également dans ces mêmes mécanismes, en particulier dans des conditions de température plus extrêmes (cinétique de déshydratation KB). Bien que ce comportement dépende fortement du milieu de culture et de la cinétique de

déshydratation, il est également inhérent à la souche de levure elle-même. La souche de *Lachancea thermotolerans* s'est révélée particulièrement sensible aux conditions de formulation-déshydratation utilisées.

Afin de comprendre la forte sensibilité de la souche de *L. thermotolerans*, l'étude non-invasive au niveau cellulaire a été réalisée par micro-spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier avec rayonnement synchrotron. Cette méthode a permis d'observer les changements biochimiques associés aux bandes spectrales des lipides et des protéines cellulaires *in situ* et sans la nécessité d'une étape de réhydratation. Il a été démontré que les cellules cultivées en GSM ont produit plus de lipides (ou d'insaturations sur les lipides) associées à la fluidité de la membrane plasmique. Ceci peut être corrélé à la meilleure viabilité cellulaire obtenue dans les mêmes conditions de croissance-déshydratation. Les cellules cultivées sur milieu TSM sont plus sensibles (moins viables). Cela peut être attribué à la modification des structures protéiques (feuillettes β) et aux liaisons C=O (oxydes lipidiques) corrélés à la peroxydation lipidique, et très probablement dus à l'accumulation de ROS dans cette condition.

Pour conclure ce travail, la conservation et la préservation fonctionnelle des souches de levure non-*Saccharomyces* déshydratées est directement corrélée à la synthèse de grandes quantités de glutathion et de tréhalose. La modulation des conditions de culture et de déshydratation a permis de mieux comprendre certains mécanismes de résistance de ces souches. Les études menées aux échelles macroscopique et cellulaire ont montré que ces levures possèdent une diversité de réponses au stress, mais elles indiquent principalement que la synthèse du glutathion constitue un moyen simple et efficace de produire des levures déshydratées de haute performance. Ces découvertes scientifiques sont utiles pour améliorer les procédés de production industrielle des levures sensibles, sans qu'il soit nécessaire d'utiliser des additifs alimentaires.

Dans l'avenir, il serait intéressant d'évaluer l'impact des conditions de culture et de déshydratation ici démontrées en utilisant d'autres méthodes de séchage telles que l'atomisation (*spray dryer*) et la lyophilisation, étant donné que ce sont des méthodes de séchage industrielles couramment utilisées pour les microorganismes. De plus, d'autres souches de levure pourraient être testées dans les mêmes conditions de cette étude, par exemple *Dekkera* ou *Brettanomyces*, qui sont utilisées pour de nouvelles applications en

brasserie. Pour aller encore plus loin, les mécanismes génétiques des souches non-*Saccharomyces* mutantes corrélés à la synthèse du glutathion et du tréhalose devraient être évalués. Dans ce cas, les connaissances acquises avec la souche *S. cerevisiae* peuvent fournir des indices sur l'élucidation des mécanismes de résistance associés à l'expression de certains gènes chez les souches non-*Saccharomyces*.

En outre, l'analyse lipidomique pourrait clarifier encore plus les voies métaboliques de la synthèse-dégradation des lipides associées aux conditions de culture et de déshydratation utilisées dans cette étude. Ainsi, il serait possible de comprendre le rôle de la variation de la composition lipidique (acides gras saturés, insaturés, ergostérol, autres stérols) et la résistance de ces souches non-*Saccharomyces* à la déshydratation. Enfin, l'utilisation de sondes fluorescentes spécifiques aux groupes thiol pourrait permettre d'élucider l'évolution intracellulaire du glutathion dans les conditions ici démontrées, en particulier si cette molécule peut être trouvée dans des organites spécifiques et les modifications induites sur ces organites lors d'un stress (nutritionnel, oxydant, thermique) chez les souches non-*Saccharomyces*.

==== ***VI. Références bibliographiques***

- Adt, I., Toubas, D., Pinon, J.-M., Manfait, M., and Sockalingum, G. D. (2006). FTIR spectroscopy as a potential tool to analyse structural modifications during morphogenesis of *Candida albicans*. *Arch. Microbiol.* 185, 277–285. doi:10.1007/s00203-006-0094-8.
- Aguilar, F., Crebelli, R., Domenico, A. Di, Dusemund, B., Frutos, M. J., Galtier, P., et al. (2015). Scientific Opinion on the re-evaluation of ascorbic acid (E 300), sodium ascorbate (E 301) and calcium ascorbate (E 302) as food additives. *EFSA J.* 13, 4087. doi:10.2903/j.efsa.2015.4087.
- Akbari, H., Karimi, K., Lundin, M., and Taherzadeh, M. J. (2012). Optimization of baker's yeast drying in industrial continuous fluidized bed dryer. *Food Bioprod. Process.* 90, 52–57. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2010.12.005.
- Alfafara, C. G., Kanda, A., Shioi, T., Shimizu, H., Shioya, S., and Suga, K. ichi (1992). Effect of amino acids on glutathione production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36, 538–540. doi:10.1007/BF00170199.
- Alvarez-Ordóñez, A., Halisch, J., and Prieto, M. (2010). Changes in Fourier transform infrared spectra of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Enteritidis after adaptation to stressful growth conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 142, 97–105. doi:10.1016/J.IJFOODMICRO.2010.06.008.
- Alves-Araújo, C., Almeida, M. J., Sousa, M. J., and Leão, C. (2004). Freeze tolerance of the yeast *Torulaspora delbrueckii*: cellular and biochemical basis. *FEMS Microbiol. Lett.* 240, 7–14. doi:j.femsle.2004.09.008.
- Andujar-Ortiz, I., Pozo-Bayón, M. Á., Moreno-Arribas, M. V., Martín-Álvarez, P. J., and Rodríguez-Bencomo, J. J. (2012). Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography–Fluorescence Detection for the Analysis of Glutathione and Its Precursor γ -Glutamyl Cysteine in Wines and Model Wines Supplemented with Oenological Inactive Dry Yeast Preparations. *Food Anal. Methods* 5, 154–161. doi:10.1007/s12161-011-9230-4.
- Ángeles Pozo-Bayón, M., Andújar-Ortiz, I., and Moreno-Arribas, M. V. (2009). Scientific evidences beyond the application of inactive dry yeast preparations in winemaking.

- Food Res. Int.* 42, 754–761. doi:10.1016/J.FOODRES.2009.03.004.
- Attfield, P. V., Hogan Jr, J. C., and Attfield, P. V. (1997). Stress tolerance: The key to effective strains of industrial baker's yeast. *Nat. Biotechnol.* 15, 1351–1357. doi:10.1038/nbt1297-1351.
- Ayer, A., Gourlay, C. W., and Dawes, I. W. (2013). Cellular redox homeostasis, reactive oxygen species and replicative ageing in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 14, 60–72. doi:10.1111/1567-1364.12114.
- Bafrncová, P., Šmogrovičová, D., Sláviková, I., Pátková, J., Dömény, Z., Bafrncova, P., et al. (1999). Improvement of very high gravity ethanol fermentation by media supplementation using *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* 21, 337–341. doi:10.1023/A:1005436816047.
- Ball, P. (2008). Water as an active constituent in cell biology. *Chem. Rev.* 108, 74–108. doi:10.1021/cr068037a.
- Barbosa, C., Lage, P., Esteves, M., Chambel, L., Mendes-Faia, A., and Mendes-Ferreira, A. (2018). Molecular and Phenotypic Characterization of *Metschnikowia pulcherrima* Strains from Douro Wine Region. *Fermentation* 4, 8. doi:10.3390/fermentation4010008.
- Barth, A. (2007). Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1767, 1073–1101. doi:10.1016/J.BBABIO.2007.06.004.
- Basso, R. F., Alcarde, A. R., and Portugal, C. B. (2016). Could non-*Saccharomyces* yeasts contribute on innovative brewing fermentations? *Food Res. Int.* 86, 112–120. doi:10.1016/J.FOODRES.2016.06.002.
- Bayrock, D., and Ingledew, W. M. (1997a). Fluidized bed drying of baker's yeast: moisture levels, drying rates, and viability changes during drying. *Food Res. Int.* 30, 407–415. doi:10.1016/S0963-9969(98)00003-9.
- Bayrock, D., and Ingledew, W. M. (1997b). Mechanism of viability loss during fluidized bed drying of baker's yeast. *Food Res. Int.* 30, 417–425. doi:10.1016/S0963-9969(97)00072-0.

- Beebe, K. R., Pell, R. J., and Seasholtz, M. B. (1998). *Chemometrics: a practical guide*. Wiley New York.
- Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P., and Lebrihi, A. (2004). Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces* strains. *J. Appl. Microbiol.* 97, 1038–1044. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02385.x.
- Beker, M. J., and Rapoport, A. I. (1987). Conservation of yeasts by dehydration. *Biotechnol. Methods* 35, 127–171. doi:10.1007/BFb0004428.
- Belda, I., Navascués, E., Marquina, D., Santos, A., Calderón, F., and Benito, S. (2016a). Outlining the influence of non-conventional yeasts in wine ageing over lees. *Yeast* 33, 329–338. doi:10.1002/yea.3165.
- Belda, I., Ruiz, J., Navascués, E., Marquina, D., and Santos, A. (2016b). Improvement of aromatic thiol release through the selection of yeasts with increased β -lyase activity. *Int. J. Food Microbiol.* 225, 1–8. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.03.001.
- Beleites, C., and Sergio, V. (2018). hyperSpec: a package to handle hyperspectral data sets in R. Available at: <http://hyperspec.r-forge.r-project.org>.
- Bely, M., Stoeckle, P., Masneuf-Pomarède, I., and Dubourdieu, D. (2008). Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*–*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 122, 312–320. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.023.
- Benaroudj, N., Lee, D. H., and Goldberg, A. L. (2001). Trehalose Accumulation during Cellular Stress Protects Cells and Cellular Proteins from Damage by Oxygen Radicals. *J. Biol. Chem.* 276, 24261–24267. doi:10.1074/jbc.M101487200.
- Benito, Á., Calderón, F., Palomero, F., and Benito, S. (2016). Quality and composition of Airén wines fermented by sequential inoculation of *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Technol. Biotechnol.* 54, 135–144.
- Benito, S. (2018a). The impact of *Torulaspora delbrueckii* yeast in winemaking. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 3081–3094. doi:10.1007/s00253-018-8849-0.

- Benito, S. (2018b). The impacts of *Lachancea thermotolerans* yeast strains on winemaking. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 6775–6790. doi:10.1007/s00253-018-9117-z.
- Beopoulos, A., Cescut, J., Haddouche, R., Uribelarrea, J.-L., Molina-Jouve, C., and Nicaud, J.-M. (2009). *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Prog. Lipid Res.* 48, 375–387. doi:10.1016/j.plipres.2009.08.005.
- Bernacchia, G., and Furini, A. (2004). Biochemical and molecular responses to water stress in resurrection plants. *Physiol. Plant.* 121, 175–181. doi:10.1111/j.1399-3054.2004.00321.x.
- Berry, D. B., Guan, Q., Hose, J., Haroon, S., Gebbia, M., Heisler, L. E., et al. (2011). Multiple Means to the Same End: The Genetic Basis of Acquired Stress Resistance in Yeast. *PLoS Genet.* 7, e1002353. doi:10.1371/journal.pgen.1002353.
- Borneman, A. R., Forgan, A. H., Pretorius, I. S., and Chambers, P. J. (2008). Comparative genome analysis of a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. *FEMS Yeast Res.* 8, 1185–1195. Available at: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00434.x>.
- Boulton, C., and Quain, D. (2007). “Yeast management,” in *Brewing Yeast and Fermentation* Wiley Online Books., 468–509. doi:10.1002/9780470999417.ch7.
- Boy-Marcotte, E., Lagniel, G., Perrot, M., Bussereau, F., Boudsocq, A., Jacquet, M., et al. (1999). The heat shock response in yeast: differential regulations and contributions of the Msn2p/Msn4p and Hsf1p regulons. *Mol. Microbiol.* 33, 274–283. doi:10.1046/j.1365-2958.1999.01467.x.
- Buitink, J., and Leprince, O. (2004). Glass formation in plant anhydrobiotes : survival in the dry state. *Cryobiology* 48, 215–228. doi:10.1016/j.cryobiol.2004.02.011.
- Burattini, E., Cavagna, M., Dell’Anna, R., Malvezzi Campeggi, F., Monti, F., Rossi, F., et al. (2008). A FTIR microspectroscopy study of autolysis in cells of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Vib. Spectrosc.* 47, 139–147. doi:10.1016/j.vibspec.2008.04.007.
- Câmara Jr., A. A., Dupont, S., Beney, L., Gervais, P., Rosenthal, A., Correia, R. T. P., et al.

- (2016). Fisetin yeast-based bio-capsules via osmoporation: effects of process variables on the encapsulation efficiency and internalized fisetin content. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 5547–5558. doi:10.1007/s00253-016-7425-8.
- Câmara Jr., A. A., Nguyen, T. D., Jossier, A., Endrizzi, A., Saurel, R., Simonin, H., et al. (2018). Improving total glutathione and trehalose contents in *Saccharomyces cerevisiae* cells to enhance their resistance to fluidized bed drying. *Process Biochem.* 69, 45–51. doi:10.1016/j.procbio.2018.03.013.
- Canonica, L., Agarbati, A., Comitini, F., and Ciani, M. (2016a). *Torulaspora delbrueckii* in the brewing process: A new approach to enhance bioflavour and to reduce ethanol content. *Food Microbiol.* 56, 45–51. doi:10.1016/J.FM.2015.12.005.
- Canonica, L., Ashoor, S., Taccari, M., Comitini, F., Antonucci, M., Truzzi, C., et al. (2016b). Conversion of raw glycerol to microbial lipids by new *Metschnikowia* and *Yarrowia lipolytica* strains. *Ann. Microbiol.* 66, 1409–1418. doi:10.1007/s13213-016-1228-0.
- Catalá, A. (2009). Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chem. Phys. Lipids* 157, 1–11. doi:10.1016/J.CHEMPHYSLIP.2008.09.004.
- Cerrutti, P., Segovia De Huergo, M., Galvagno, M., Schebor, C., and Del Pilar Buera, M. (2000). Commercial baker's yeast stability as affected by intracellular content of trehalose, dehydration procedure and the physical properties of external matrices. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54, 575–580. doi:10.1007/s002530000428.
- Chakravarthi, S., Jessop, C. E., and Bulleid, N. J. (2006). The role of glutathione in disulphide bond formation and endoplasmic-reticulum-generated oxidative stress. *EMBO Rep.* 7, 271–275. doi:10.1038/sj.embor.7400645.
- Chambers, P. J., and Pretorius, I. S. (2010). Fermenting knowledge: the history of winemaking, science and yeast research. *EMBO Rep.* 11, 914–920. doi:10.1038/embor.2010.179.
- Chen, D., and Liu, S.-Q. (2016). Impact of simultaneous and sequential fermentation with *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* on non-volatiles and

- volatiles of lychee wines. *LWT - Food Sci. Technol.* 65, 53–61. doi:10.1016/J.LWT.2015.07.050.
- Chen, K., Escott, C., Loira, I., del Fresno, J. M., Morata, A., Tesfaye, W., et al. (2018). Use of non-Saccharomyces yeasts and oenological tannin in red winemaking: Influence on colour, aroma and sensorial properties of young wines. *Food Microbiol.* 69, 51–63. doi:10.1016/j.fm.2017.07.018.
- Colavizza, D. J., and Quipourt-Isnard, A.-D. M. (2009). Novel baker's yeast strains. 33. Brevet:WO2009056708A1. Available at: <https://patents.google.com/patent/WO2009056708A1/en>.
- Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., et al. (2011). Selected non-Saccharomyces wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.* 28, 873–882. doi:10.1016/j.fm.2010.12.001.
- Comuzzo, P., and Zironi, R. (2013). Biotechnological Strategies for Controlling Wine Oxidation. *Food Eng. Rev.* 5, 217–229. doi:10.1007/s12393-013-9071-6.
- Contreras, A., Hidalgo, C., Henschke, P. A., Chambers, P. J., Curtin, C., and Varela, C. (2014). Evaluation of Non-Saccharomyces Yeasts for the Reduction of Alcohol Content in Wine. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 1670 LP-1678. Available at: <http://aem.asm.org/content/80/5/1670.abstract>.
- Conway, J., Gaudreau, H., and Champagne, C. P. (2001). The effect of the addition of proteases and glucanases during yeast autolysis on the production and properties of yeast extracts. *Can. J. Microbiol.* 47, 18–24. doi:10.1139/w00-118.
- Coote, P. J., Jones, M. V, Seymour, I. J., Rowe, D. L., Ferdinando, D. P., McArthur, A. J., et al. (1994). Activity of the plasma membrane H⁺-ATPase is a key physiological determinant of thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 140, 1881–1890. doi:10.1099/13500872-140-8-1881.
- Coutinho, C., Bernardes, E., Félix, D., and Panek, A. D. (1988). Trehalose as cryoprotectant for preservation of yeast strains. *J. Biotechnol.* 7, 23–32.

doi:[https://doi.org/10.1016/0168-1656\(88\)90032-6](https://doi.org/10.1016/0168-1656(88)90032-6).

Crowe, J. H., Crowe, L. M., Carpenter, J. E., Petrelski, S., Hoekstra, F. A., Araujo, P. De, et al. (2011). "Anhydrobiosis: Cellular Adaptation to Extreme Dehydration," in *Handbook of Physiology, Comparative Physiology Major Reference Works.*, 1445–1477. doi:[doi:10.1002/cphy.cp130220](https://doi.org/10.1002/cphy.cp130220).

Crowe, J. H., Crowe, L. M., Carpenter, J. F., Rudolph, A. S., Wistrom, C. A., Spargo, B. J., et al. (1988). Interactions of sugars with membranes. *BBA - Rev. Biomembr.* 947, 367–384. doi:[doi:10.1016/0304-4157\(88\)90015-9](https://doi.org/10.1016/0304-4157(88)90015-9).

Crowe, J. H., Crowe, L. M., Carpenter, J. F., and Wistrom, C. A. (1987). Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochem. J.* 242, 1–10.

Crowe, J. H., Crowe, L. M., and Chapman, D. (1984). Preservation of Membranes in Anhydrobiotic Organisms: The Role of Trehalose. *Science (80-)*. 223, 701–703. doi:[doi:10.1126/science.223.4637.701](https://doi.org/10.1126/science.223.4637.701).

Crowe, J. H., Hoekstra, F. A., and Crowe, L. M. (1992). Anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.* 54, 579–599. doi:[doi:10.1146/annurev.ph.54.030192.003051](https://doi.org/10.1146/annurev.ph.54.030192.003051).

D'Amore, T., Crumplen, R., and Stewart, G. G. (1991). The involvement of trehalose in yeast stress tolerance. *J. Ind. Microbiol.* 7, 191–195. doi:[doi:10.1007/BF01575882](https://doi.org/10.1007/BF01575882).

da Costa Morato Nery, D., da Silva, C. G., Mariani, D., Fernandes, P. N., Pereira, M. D., Panek, A. D., et al. (2008). The role of trehalose and its transporter in protection against reactive oxygen species. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1780, 1408–1411. doi:[doi:10.1016/J.BBAGEN.2008.05.011](https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2008.05.011).

Da Silva Pedrini, M. R., Dupont, S., Câmara Jr., A. A., Beney, L., and Gervais, P. (2014). Osmoporation: A simple way to internalize hydrophilic molecules into yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98. doi:[doi:10.1007/s00253-013-5386-8](https://doi.org/10.1007/s00253-013-5386-8).

Dardalhon, M., Kumar, C., Iraqui, I., Vernis, L., Kienda, G., Banach-Latapy, A., et al. (2012). Redox-sensitive YFP sensors monitor dynamic nuclear and cytosolic glutathione redox changes. *Free Radic. Biol. Med.* 52, 2254–2265. doi:[doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.04.004](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.04.004).

- Davey, H. M., and Hexley, P. (2010). Red but not dead? Membranes of stressed *Saccharomyces cerevisiae* are permeable to propidium iodide. *Environ. Microbiol.* 13, 163–171. doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02317.x.
- de Jesus Pereira, E., Panek, A. D., and Eleutherio, E. C. A. (2003). Protection against oxidation during dehydration of yeast. *Cell Stress Chaperones* 8, 120–124. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC514863/>.
- de Souza Pereira, R., and Geibel, J. (1999). Direct observation of oxidative stress on the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* strains with atomic force microscopy. *Mol. Cell. Biochem.* 201, 17–24. doi:10.1023/A:1007007704657.
- Deák, T., and Deak, T. (2007). *Handbook of food spoilage yeasts.* , ed. 2nd edn. CRC press, Boca Raton.
- Delgado, J. F., Peltzer, M. A., Salvay, A. G., de la Osa, O., and Wagner, J. R. (2018). Characterization of thermal, mechanical and hydration properties of novel films based on *Saccharomyces cerevisiae* biomass. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 48, 240–247. doi:10.1016/j.ifset.2018.06.017.
- Domizio, P., House, J. F., Joseph, C. M. L., Bisson, L. F., and Bamforth, C. W. (2016). *Lachancea thermotolerans* as an alternative yeast for the production of beer. *J. Inst. Brew.* 122, 599–604. doi:10.1002/jib.362.
- du Plessis, H. W., du Toit, M., Hoff, J. W., Hart, R. S., Ndimba, B. K., and Jolly, N. P. (2017). Characterisation of Non-*Saccharomyces* yeasts using different methodologies and evaluation of their compatibility with malolactic fermentation. *South African J. Enol. Vitic.* 38, 46–63. doi:10.21548/38-1-819.
- Duarte, W. F., Amorim, J. C., and Schwan, R. F. (2013). The effects of co-culturing non-*Saccharomyces* yeasts with *S. cerevisiae* on the sugar cane spirit (cachaça) fermentation process. *Antonie Van Leeuwenhoek* 103, 175–194. doi:10.1007/s10482-012-9798-8.
- Dupont, S., Beney, L., Ferreira, T., and Gervais, P. (2011). Nature of sterols affects plasma membrane behavior and yeast survival during dehydration. *Biochim. Biophys. Acta* -

- Biomembr.* 1808, 1520–1528. doi:10.1016/J.BBAMEM.2010.11.012.
- Dupont, S., Beney, L., Ritt, J.-F., Lherminier, J., and Gervais, P. (2010). Lateral reorganization of plasma membrane is involved in the yeast resistance to severe dehydration. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1798, 975–985. doi:10.1016/j.bbamem.2010.01.015.
- Dupont, S., Rapoport, A., Gervais, P., and Beney, L. (2014). Survival kit of *Saccharomyces cerevisiae* for anhydrobiosis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 8821–8834. doi:10.1007/s00253-014-6028-5.
- Ebrahimi, L., Aminian, H., Etebarian, H. R., and Sahebani, N. (2012). Control of apple blue mould disease with *Torulaspora delbrueckii* in combination with Silicon. *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* 45, 2057–2065. doi:10.1080/03235408.2012.720772.
- Eleutherio, E., Brasil, A. de A., França, M. B., de Almeida, D. S. G., Rona, G. B., and Magalhães, R. S. S. (2018). Oxidative stress and aging: Learning from yeast lessons. *Fungal Biol.* 122, 514–525. doi:10.1016/j.funbio.2017.12.003.
- Eleutherio, E. C. A., Araujo, P. S., and Panek, A. D. (1993a). Protective Role of Trehalose during Heat Stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cryobiology* 30, 591–596. doi:10.1006/CRYO.1993.1061.
- Eleutherio, E. C. A., de Araujo, P. S., and Panek, A. D. (1993b). Role of the trehalose carrier in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1156, 263–266. doi:10.1016/0304-4165(93)90040-F.
- Eleutherio, E. C. A., Maia, F. M., Pereira, M. D., Panek, A. D., Degré, R., and Cameron, D. (1997). Induction of desiccation tolerance by osmotic treatment in *Saccharomyces uvarum* var. *carlsbergensis*. *Can. J. Microbiol.* 43, 495–498. doi:10.1139/m97-070.
- Eleutherio, E., Panek, A., De Mesquita, J. F., Trevisol, E., and Magalhães, R. (2015). Revisiting yeast trehalose metabolism. *Curr. Genet.* 61, 263–274. doi:10.1007/s00294-014-0450-1.
- Ellis, R. J., and Minton, A. P. (2003). Join the crowd. *Nature* 425, 27. doi:10.1038/425027a.

- Espindola, A. D. S., Gomes, D. S., Panek, A. D., and Eleutherio, E. C. A. (2003). The role of glutathione in yeast dehydration tolerance. *Cryobiology* 47, 236–241. doi:10.1016/j.cryobiol.2003.10.003.
- Fabrizio, P., and Longo, V. D. (2003). The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging Cell* 2, 73–81. doi:10.1046/j.1474-9728.2003.00033.x.
- Farrugia, G., and Balzan, R. (2012). Oxidative stress and programmed cell death in yeast. *Front. Oncol.* 2, 62–82. doi:10.3389/fonc.2012.00064.
- Fernandes, P. N., Mannarino, S. C., Silva, C. G., Pereira, M. D., Panek, A. D., and Eleutherio, E. C. A. (2007). Oxidative stress response in eukaryotes: effect of glutathione, superoxide dismutase and catalase on adaptation to peroxide and menadione stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Redox Rep.* 12, 236–244. doi:10.1179/135100007X200344.
- Ferreira, I. M. P. L. V. O., Pinho, O., Vieira, E., and Tavarela, J. G. (2010). Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. *Trends Food Sci. Technol.* 21, 77–84. doi:10.1016/J.TIFS.2009.10.008.
- Filomeni, G., Rotilio, G., and Ciriolo, M. R. (2002). Cell signalling and the glutathione redox system. *Biochem. Pharmacol.* 64, 1057–1064. doi:10.1016/S0006-2952(02)01176-0.
- Fiori, S., Urgeghe, P. P., Hammami, W., Razzu, S., Jaoua, S., and Migheli, Q. (2014). Biocontrol activity of four non- and low-fermenting yeast strains against *Aspergillus carbonarius* and their ability to remove ochratoxin A from grape juice. *Int. J. Food Microbiol.* 189, 45–50. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.020.
- França, M. B., Panek, A. D., and Eleutherio, E. C. A. (2005). The role of cytoplasmic catalase in dehydration tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Stress Chaperones* 10, 167–170. doi:10.1379/CSC-103R.1.
- França, M. B., Panek, A. D., and Eleutherio, E. C. A. (2007). Oxidative stress and its effects during dehydration. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 146, 621–631. doi:10.1016/J.CBPA.2006.02.030.

- François, J., and Parrou, J. L. (2001). Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 125–145. doi:10.1016/S0168-6445(00)00059-0.
- Gamero-Sandemetrio, E., Gómez-Pastor, R., and Matallana, E. (2014). Antioxidant defense parameters as predictive biomarkers for fermentative capacity of active dried wine yeast. *Biotechnol. J.* 9, 1055–1064. doi:10.1002/biot.201300448.
- Gamero-Sandemetrio, E., Paya-Tormo, L., Gomez-Pastor, R., Aranda, A., and Matallana, E. (2018). Non-canonical regulation of glutathione and trehalose biosynthesis characterizes non-*Saccharomyces* wine yeasts with poor performance in active dry yeast production. *Microb. cell (Graz, Austria)* 5, 184–197. doi:10.15698/mic2018.04.624.
- García, M., Esteve-zarzoso, B., García, M., and Esteve-zarzoso, B. (2016). “Non-*Saccharomyces* yeasts: biotechnological role for wine production,” in *Grape and Wine Biotechnology*, 249–271. doi:10.5772/64957.
- Garre, E., Raginel, F., Palacios, A., Julien, A., and Matallana, E. (2010). Oxidative stress responses and lipid peroxidation damage are induced during dehydration in the production of dry active wine yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* 136, 295–303. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.10.018.
- Gaspar, M. L., Jesch, S. A., Viswanatha, R., Antosh, A. L., Brown, W. J., Kohlwein, S. D., et al. (2008). A Block in Endoplasmic Reticulum-to-Golgi Trafficking Inhibits Phospholipid Synthesis and Induces Neutral Lipid Accumulation. *J. Biol. Chem.* 283, 25735–25751. doi:10.1074/jbc.M802685200.
- Gautier, J., Passot, S., Pénicaud, C., Guillemin, H., Cenard, S., Lieben, P., et al. (2013). A low membrane lipid phase transition temperature is associated with a high cryotolerance of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* CFL1. *J. Dairy Sci.* 96, 5591–5602. doi:10.3168/JDS.2013-6802.
- Gervais, P., and Beney, L. (2001). Osmotic mass transfer in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell. Mol. Biol.* 47, 831–840. Available at: <https://www.researchgate.net/publication/11627994>.

- Gervais, P., and de Marañon, I. M. (1995). Effect of the kinetics of temperature variation on *Saccharomyces cerevisiae* viability and permeability. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1235, 52–56. doi:10.1016/0005-2736(94)00299-5.
- Gervais, P., and Marechal, P. A. (1994). Yeast resistance to high levels of osmotic pressure: Influence of kinetics. *J. Food Eng.* 22, 399–407. doi:10.1016/0260-8774(94)90042-6.
- Gervais, P., Marechal, P. A., and Molin, P. (1992). Effects of the kinetics of osmotic pressure variation on yeast viability. *Biotechnol. Bioeng.* 40, 1435–1439. doi:10.1002/bit.260401119.
- Ghibelli, L., Coppola, S., Fanelli, C., Rotilio, G., Civitareale, P., Scovassi, A. I., et al. (1999). Glutathione depletion causes cytochrome c release even in the absence of cell commitment to apoptosis. *FASEB J.* 13, 2031–2036. doi:10.1096/fasebj.13.14.2031.
- Gibson, B. R., Lawrence, S. J., Leclaire, J. P. R. R., Powell, C. D., and Smart, K. A. (2007). Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS Microbiol. Rev.* 31, 535–569. doi:10.1111/j.1574-6976.2007.00076.x.
- Golovina, E. A., Golovin, A. V., Hoekstra, F. A., and Faller, R. (2009). Water Replacement Hypothesis in Atomic Detail—Factors Determining the Structure of Dehydrated Bilayer Stacks. *Biophys. J.* 97, 490–499. doi:10.1016/j.bpj.2009.05.007.
- Golovina, E. A., Golovin, A. V., Hoekstra, F. A., and Faller, R. (2010). Water Replacement Hypothesis in Atomic Details: Effect of Trehalose on the Structure of Single Dehydrated POPC Bilayers. *Langmuir* 26, 11118–11126. doi:10.1021/la100891x.
- Gómez-Pastor, R., Pérez-Torrado, R., Cabisco, E., Ros, J., and Matallana, E. (2010a). Reduction of oxidative cellular damage by overexpression of the thioredoxin TRX2 gene improves yield and quality of wine yeast dry active biomass. *Microb. Cell Fact.* 9, 9. doi:10.1186/1475-2859-9-9.
- Gómez-Pastor, R., Perez-Torrado, R., Garre, E., and Matall, E. (2011). Recent advances in yeast biomass production. *Biomass - Detect. Prod. Usage.* doi:10.5772/19458.
- Gómez-Pastor, R., Pérez-Torrado, R., and Matallana, E. (2010b). Improving yield of

- industrial biomass propagation by increasing the Trx2p dosage. *Bioeng. Bugs* 1, 352–353. doi:10.4161/bbug.1.5.12384.
- Gorbushina, A. A., and Broughton, W. J. (2009). Microbiology of the Atmosphere-Rock Interface: How Biological Interactions and Physical Stresses Modulate a Sophisticated Microbial Ecosystem. *Annu. Rev. Microbiol.* 63, 431–450. doi:10.1146/annurev.micro.091208.073349.
- Gouin, S. (2004). Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends Food Sci. Technol.* 15, 330–347. doi:10.1016/J.TIFS.2003.10.005.
- Grant, C. M. (2001). Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. *Mol. Microbiol.* 39, 533–541. doi:10.1046/j.1365-2958.2001.02283.x.
- Greenspan, L. (1977). Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. *J. Res. Natl. Bur. Stand. (1934)*. 81, 89–96. doi:10.6028/jres.081A.011.
- Griffin, D. M. (1981). “Water and Microbial Stress,” in *Advances in Microbial Ecology*, ed. M. Alexander (Boston, MA: Springer US), 91–136. doi:10.1007/978-1-4615-8306-6_3.
- Griffith, O. W. (1980). Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* 106, 207–212. doi:10.1016/0003-2697(80)90139-6.
- Griffith, O. W., and Meister, A. (1979). Translocation of intracellular glutathione to membrane-bound γ -glutamyl transpeptidase as a discrete step in the γ -glutamyl cycle: Glutathionuria after inhibition of transpeptidase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76, 268 LP-272. Available at: <http://www.pnas.org/content/76/1/268.abstract>.
- Gschaedler, A. (2017). Contribution of non-conventional yeasts in alcoholic beverages. *Curr. Opin. Food Sci.* 13, 73–77. doi:10.1016/j.cofs.2017.02.004.
- Guyot, S., Ferret, E., and Gervais, P. (2006). Yeast Survival during Thermal and Osmotic Shocks Is Related to Membrane Phase Change. *J. Agric. Food Chem.* 54, 8450–8455. doi:10.1021/jf0620158.

- Guyot, S., Gervais, P., Young, M., Winckler, P., Dumont, J., and Davey, H. M. (2015). Surviving the heat: Heterogeneity of response in *Saccharomyces cerevisiae* provides insight into thermal damage to the membrane. *Environ. Microbiol.* 17, 2982–2992. doi:10.1111/1462-2920.12866.
- Hasenhuettl, G. L. (2008). "Overview of Food Emulsifiers," in *Food Emulsifiers and Their Applications: Second Edition*, eds. G. L. Hasenhuettl and R. W. Hartel (New York, NY: Springer New York), 1–9. doi:10.1007/978-0-387-75284-6_1.
- Hatem, E., Berthonaud, V., Dardalhon, M., Lagniel, G., Baudouin-Cornu, P., Huang, M.-E., et al. (2014). Glutathione is essential to preserve nuclear function and cell survival under oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 67, 103–114. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.10.807.
- Hellín, P. D.-, Úbeda, J., and Briones, A. (2013). Improving alcoholic fermentation by activation of *Saccharomyces* species during the rehydration stage. *LWT - Food Sci. Technol.* 50, 126–131. doi:10.1016/j.lwt.2012.06.011.
- Herdeiro, R. S., Pereira, M. D., Panek, A. D., and Eleutherio, E. C. A. (2006). Trehalose protects *Saccharomyces cerevisiae* from lipid peroxidation during oxidative stress. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1760, 340–346. doi:10.1016/j.bbagen.2006.01.010.
- Hino, A., Mihara, K., Nakashima, K., and Takano, H. (1990). Trehalose levels and survival ratio of freeze-tolerant versus freeze-sensitive yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1386–1391. Available at: <http://aem.asm.org/content/56/5/1386.abstract>.
- Holt, S., Mukherjee, V., Lievens, B., Verstrepen, K. J., and Thevelein, J. M. (2018). Bioflavoring by non-conventional yeasts in sequential beer fermentations. *Food Microbiol.* 72, 55–66. doi:10.1016/j.fm.2017.11.008.
- Hu, J., Wei, M., Mirzaei, H., Madia, F., Mirisola, M., Amparo, C., et al. (2014). Tor-Sch9 deficiency activates catabolism of the ketone body-like acetic acid to promote trehalose accumulation and longevity. *Aging Cell* 13, 457–467. doi:10.1111/acel.12202.

- IOVW (2018). *International Code of Oenological Practices*. Paris: International Organisation of Vine and Wine Available at: <http://www.oiv.int/public/medias/6067/code-2018-en.pdf>.
- Izawa, S., Inoue, Y., and Kimura, A. (1995). Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 368, 73–76. doi:10.1016/0014-5793(95)00603-7.
- Jackson, M., and Mantsch, H. H. (1995). The Use and Misuse of FTIR Spectroscopy in the Determination of Protein Structure. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30, 95–120. doi:10.3109/10409239509085140.
- Jamieson, D. J. (1992). *Saccharomyces cerevisiae* has distinct adaptive responses to both hydrogen peroxide and menadione. *J. Bacteriol.* 174, 6678 LP-6681. doi:10.1128/jb.174.20.6678-6681.1992.
- Jamieson, D. J. (1998). Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 1511–1527. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(199812)14:16<1511::AID-YEA356>3.0.CO;2-S.
- Jamin, N., Miller, L., Moncuit, J., Fridman, W. H., Dumas, P., and Teillaud, J. L. (2003). Chemical heterogeneity in cell death: Combined synchrotron IR and fluorescence microscopy studies of single apoptotic and necrotic cells. *Biopolym. - Biospectroscopy Sect.* 72, 366–373. doi:10.1002/bip.10435.
- Janisiewicz, W. J., Tworowski, T. J., and Kurtzman, C. P. (2001). Biocontrol Potential of *Metchnikowia pulcherrima* Strains Against Blue Mold of Apple. *Phytopathology* 91, 1098–1108. doi:10.1094/PHYTO.2001.91.11.1098.
- Jenkins, D. M., Powell, C. D., and Smart, K. A. (2010). Dried Yeast: Impact of Dehydration and Rehydration on Brewing Yeast DNA Integrity. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 68, 132–138. doi:10.1094/ASBCJ-2010-0629-01.
- Johnson, E. A., and Echavarri-Erasun, C. (2011). Yeast biotechnology. *The Yeasts* 1, 21–44. doi:10.1016/B978-0-444-52149-1.00003-3.
- Jolly, N. P., Varela, C., and Pretorius, I. S. (2013). Not your ordinary yeast: non-

- Saccharomyces yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Res.* 14, 215–237. doi:10.1111/1567-1364.12111.
- Jørgensen, H., Olsson, L., Rønnow, B., and Palmqvist, E. (2002). Fed-batch cultivation of baker's yeast followed by nitrogen or carbon starvation: effects on fermentative capacity and content of trehalose and glycogen. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 310–317. doi:10.1007/s00253-002-1017-5.
- Kaino, T., Tateiwa, T., Mizukami-Murata, S., Shima, J., and Takagi, H. (2008). Self-Cloning Baker's Yeasts That Accumulate Proline Enhance Freeze Tolerance in Doughs. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 5845 LP-5849. Available at: <http://aem.asm.org/content/74/18/5845.abstract>.
- Kapsopoulou, K., Mourtzini, A., Anthoulas, M., and Nerantzis, E. (2007). Biological acidification during grape must fermentation using mixed cultures of *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 735–739. doi:10.1007/s11274-006-9283-5.
- Kaspro, R. P., Lange, A. J., and Kirwan, D. J. (1998). Correlation of Fermentation Yield with Yeast Extract Composition as Characterized by Near-Infrared Spectroscopy. *Biotechnol. Prog.* 14, 318–325. doi:10.1021/bp980001j.
- Kavosi, M., Mohammadi, A., Shojaee-Aliabadi, S., Khaksar, R., and Hosseini, S. M. (2018). Characterization and oxidative stability of purslane seed oil microencapsulated in yeast cells biocapsules. *J. Sci. Food Agric.* 98, 2490–2497. doi:10.1002/jsfa.8696.
- Kellershohn, J., and Russell, I. (2015). Yeast Biotechnology. *Adv. Food Biotechnol.* doi:10.1002/9781118864463.ch18.
- Kitagaki, H., and Kitamoto, K. (2013). Breeding Research on Sake Yeasts in Japan: History, Recent Technological Advances, and Future Perspectives. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 4, 215–235. doi:10.1146/annurev-food-030212-182545.
- Klug, L., and Daum, G. (2014). Yeast lipid metabolism at a glance. *FEMS Yeast Res.* 14, 369–388. doi:10.1111/1567-1364.12141.
- Kondo, A., and Ueda, M. (2004). Yeast cell-surface display---applications of molecular

- display. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 28–40. doi:10.1007/s00253-003-1492-3.
- Kritzinger, E. C., Stander, M. A., and Du Toit, W. J. (2013). Assessment of glutathione levels in model solution and grape ferments supplemented with glutathione-enriched inactive dry yeast preparations using a novel UPLC-MS/MS method. *Food Addit. Contam. Part A* 30, 80–92. doi:10.1080/19440049.2012.728723.
- Kurtzman, C. P. (2011a). “*Torulaspora lindner* (1904),” in *The Yeasts (Fifth Edition)*, eds. C. P. Kurtzman, J. W. Fell, and T. Boekhout (London: Elsevier), 867–874. doi:10.1016/B978-0-444-52149-1.00075-6.
- Kurtzman, C. P. (2011b). “*Torulaspora Lindner* (1904),” in *The Yeasts* (Elsevier), 867–874. doi:10.1016/B978-0-444-52149-1.00075-6.
- Labuza, T. P., Kaanane, A., and Chen, J. Y. (1985). Effect of Temperature on the Moisture Sorption Isotherms and Water Activity Shift of Two Dehydrated Foods. *J. Food Sci.* 50, 385–392. doi:10.1111/j.1365-2621.1985.tb13409.x.
- Lachance, M.-A. (1995). Yeast communities in a natural tequila fermentation. *Antonie Van Leeuwenhoek* 68, 151–160. doi:10.1007/BF00873100.
- Lachance, M. A. (2011). “*Metschnikowia Kamienski* (1899),” in *The Yeasts* (Elsevier), 575–620. doi:10.1016/B978-0-444-52149-1.00046-X.
- Lachance, M. A., and Kurtzman, C. P. (2011). “*Lachancea Kurtzman* (2003),” in *The Yeasts* (Elsevier), 511–519. doi:10.1016/B978-0-444-52149-1.00041-0.
- Landry, C. R., Townsend, J. P., Hartl, D. L., and Cavalieri, D. (2006). Ecological and evolutionary genomics of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Ecol.* 15, 575–591. doi:10.1111/j.1365-294X.2006.02778.x.
- Lappe-Oliveras, P., Moreno-Terrazas, R., Arrizón-Gaviño, J., Herrera-Suárez, T., García-Mendoza, A., and Gschaedler-Mathis, A. (2008). Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled Agave beverages. *FEMS Yeast Res.* 8, 1037–1052. doi:10.1111/j.1567-1364.2008.00430.x.
- Larsson, C., von Stockar, U., Marison, I., and Gustafsson, L. (1993). Growth and

- metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in chemostat cultures under carbon-, nitrogen-, or carbon- and nitrogen-limiting conditions. *J. Bacteriol.* 175, 4809 LP-4816. Available at: <http://jb.asm.org/content/175/15/4809.abstract>.
- Lavigne, V., Pons, A., and Dubourdieu, D. (2007). Assay of glutathione in must and wines using capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection: Changes in concentration in dry white wines during alcoholic fermentation and aging. *J. Chromatogr. A* 1139, 130–135. doi:10.1016/J.CHROMA.2006.10.083.
- Lea, A. G. H., Drilleau, J.-F., Drilleau, M. J.-F., and Drilleau, J.-F. (2003). "Cidermaking," in *Fermented Beverage Production*, eds. A. G. H. Lea and J. R. Piggott (Boston, MA: Springer US), 59–87. doi:10.1007/978-1-4615-0187-9_4.
- Lemetais, G., Dupont, S., Beney, L., and Gervais, P. (2012). Air-drying kinetics affect yeast membrane organization and survival. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96, 471–480. doi:10.1007/s00253-012-4014-3.
- Leslie, S. B., Teter, S. A., Crowe, L. M., and Crowe, J. H. (1994). Trehalose lowers membrane phase transitions in dry yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1192, 7–13. doi:10.1016/0005-2736(94)90136-8.
- Li, Y., Wei, G., and Chen, J. (2004). Glutathione: a review on biotechnological production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66, 233–242. doi:10.1007/s00253-004-1751-y.
- Lillie, S. H., and Pringle, J. R. (1980). Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. *J. Bacteriol.* 143, 1384–1394. Available at: <http://jb.asm.org/content/143/3/1384.abstract>.
- Liu, C.-H., Hwang, C.-F., and Liao, C.-C. (1999). Medium optimization for glutathione production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochem.* 34, 17–23. doi:10.1016/S0032-9592(98)00055-7.
- Liu, P.-T., Lu, L., Duan, C.-Q., and Yan, G.-L. (2016). The contribution of indigenous non-*Saccharomyces* wine yeast to improved aromatic quality of Cabernet Sauvignon wines by spontaneous fermentation. *LWT - Food Sci. Technol.* 71, 356–363. doi:10.1016/J.LWT.2016.04.031.

- Lodolo, E. J., Kock, J. L. F., Axcell, B. C., and Brooks, M. (2008). The yeast *Saccharomyces cerevisiae*– the main character in beer brewing. *FEMS Yeast Res.* 8, 1018–1036. doi:10.1111/j.1567-1364.2008.00433.x.
- López-Martínez, G., Borrull, A., Poblet, M., Rozès, N., and Cordero-Otero, R. (2014). Metabolomic characterization of yeast cells after dehydration stress. *Int. Microbiol.* 17, 131–139. doi:10.2436/20.1501.01.215.
- Lorenz, E., Schmach, M., Stahl, U., and Senz, M. (2015). Enhanced incorporation yield of cysteine for glutathione overproduction by fed-batch fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.* 216, 131–139. doi:10.1016/j.jbiotec.2015.10.016.
- Lu, F., Wang, Y., Bai, D., and Du, L. (2005). Adaptive response of *Saccharomyces cerevisiae* to hyperosmotic and oxidative stress. *Process Biochem.* 40, 3614–3618. doi:10.1016/J.PROCBIO.2005.03.061.
- Luna-Solano, G., Salgado-Cervantes, M. A., Ramirez-Lepe, M., Garcia-Alvarado, M. A., and Rodriguez-Jimenes, G. C. (2003). Effect of drying type and drying conditions over fermentative ability of brewer's yeast. *J. Food Process Eng.* 26, 135–147. doi:10.1111/j.1745-4530.2003.tb00593.x.
- Luzardo, M. del C., Amalfa, F., Nuñez, A. M., Díaz, S., Biondi de Lopez, A. C., and Disalvo, E. A. (2000). Effect of Trehalose and Sucrose on the Hydration and Dipole Potential of Lipid Bilayers. *Biophys. J.* 78, 2452–2458. doi:10.1016/S0006-3495(00)76789-0.
- Lykov, A. V (1968). *Theory of Drying [in Russian]*. Moscow, Leningrad: énergiya Moscow.
- Mansure, J. J. ., Panek, A. D., Crowe, L. M., and Crowe, J. H. (1994). Trehalose inhibits ethanol effects on intact yeast cells and liposomes. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1191, 309–316. doi:10.1016/0005-2736(94)90181-3.
- Marechal, P. A., de Marañon, I. M., Molin, P., and Gervais, P. (1995). Yeast cell responses to water potential variations. *Int. J. Food Microbiol.* 28, 277–287. doi:10.1016/0168-1605(95)00063-1.
- Marsit, S., and Dequin, S. (2015). Diversity and adaptive evolution of *Saccharomyces*

- wine yeast: a review. *FEMS Yeast Res.* 15, fov067-fov067. doi:10.1093/femsyr/fov067.
- McBean, J. G. (2017). Cysteine, Glutathione, and Thiol Redox Balance in Astrocytes. *Antioxidants* 6. doi:10.3390/antiox6030062.
- McWilliams, A. (2017). Yeasts, yeast extracts, autolysates and related products: the global market. BCC Research Report Code: CHM053C, Wellesley, MA: BCC Research.
- Mehdi, K., and Penninckx, M. J. (1997). An important role for glutathione and γ -glutamyltranspeptidase in the supply of growth requirements during nitrogen starvation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 143, 1885–1889. doi:10.1099/00221287-143-6-1885.
- Meister, A. (1988). Glutathione metabolism and its selective modification. *J. Biol. Chem.* 263, 17205–17208. Available at: <http://www.jbc.org/content/263/33/17205.short>.
- Mendes Ferreira, A., Clímaco, M. C., and Mendes Faia, A. (2001). The role of non-*Saccharomyces* species in releasing glycosidic bound fraction of grape aroma components — a preliminary study. *J. Appl. Microbiol.* 91, 67–71. doi:10.1046/j.1365-2672.2001.01348.x.
- Mestre Furlani, M. V., Maturano, Y. P., Combina, M., Mercado, L. A., Toro, M. E., and Vazquez, F. (2017). Selection of non-*Saccharomyces* yeasts to be used in grape musts with high alcoholic potential: a strategy to obtain wines with reduced ethanol content. *FEMS Yeast Res.* 17, fox010. doi:10.1093/femsyr/fox010.
- Michel, M., Kopecká, J., Meier-Dörnberg, T., Zarnkow, M., Jacob, F., and Hutzler, M. (2015). Screening for new brewing yeasts in the non-*Saccharomyces* sector with *Torulaspora delbrueckii* as model. *Yeast* 33, 129–144. doi:10.1002/yea.3146.
- Morata, A., Loira, I., Tesfaye, W., Bañuelos, M., González, C., and Suárez Lepe, J. (2018). *Lachancea thermotolerans* Applications in Wine Technology. *Ferment.* 4. doi:10.3390/fermentation4030053.
- Morris, G. J., Winters, L., Coulson, G. E., and Clarke, K. J. (1986). Effect of Osmotic Stress

- on the Ultrastructure and Viability of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 132, 2023–2034. Available at: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-132-7-2023>.
- Mortensen, A., Aguilar, F., Crebelli, R., Di Domenico, A., Dusemund, B., Frutos, M. J., et al. (2017). Re-evaluation of sorbitan monostearate (E 491), sorbitan tristearate (E 492), sorbitan monolaurate (E 493), sorbitan monooleate (E 494) and sorbitan monopalmitate (E 495) when used as food additives. *EFSA J.* 15, e04788. doi:10.2903/j.efsa.2017.4788.
- Moussa, M., Dumont, F., Perrier-Cornet, J.-M., and Gervais, P. (2008). Cell inactivation and membrane damage after long-term treatments at sub-zero temperature in the supercooled and frozen states. *Biotechnol. Bioeng.* 101, 1245–1255. doi:10.1002/bit.21981.
- Mozaffarian, D., Katan, M. B., Ascherio, A., Stampfer, M. J., and Willett, W. C. (2006). Trans fatty acids and cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.* 354, 1601–1613.
- Nguyen, T. D., Guyot, S., Pénicaud, C., Passot, S., Sandt, C., Fonseca, F., et al. (2017). Understanding the responses of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain during dehydration processes using synchrotron infrared spectroscopy. *Analyst* 142, 3620–3628. doi:10.1039/c7an00257b.
- Oleszko, A., Olsztyńska-Janus, S., Walski, T., Grzeszczuk-Kuć, K., Bujok, J., Gałęcka, K., et al. (2015). Application of FTIR-ATR spectroscopy to determine the extent of lipid peroxidation in plasma during haemodialysis. *Biomed Res. Int.* 2015. doi:10.1155/2015/245607.
- Oro, L., Ciani, M., and Comitini, F. (2014). Antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima* on wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.* 116, 1209–1217. doi:10.1111/jam.12446.
- Panaretou, B., and Piper, P. W. (1992). The plasma membrane of yeast acquires a novel heat-shock protein (hsp30) and displays a decline in proton-pumping ATPase levels in response to both heat shock and the entry to stationary phase. *Eur. J. Biochem.*

- 206, 635–640. doi:10.1111/j.1432-1033.1992.tb16968.x.
- Parafati, L., Vitale, A., Restuccia, C., and Cirvilleri, G. (2015). Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. *Food Microbiol.* 47, 85–92. doi:10.1016/j.fm.2014.11.013.
- Passot, S., Gautier, J., Jamme, F., Cenard, S., Dumas, P., and Fonseca, F. (2015). Understanding the cryotolerance of lactic acid bacteria using combined synchrotron infrared and fluorescence microscopies. *Analyst* 140, 5920–5928. doi:10.1039/C5AN00654F.
- Patist, A., and Zoerb, H. (2005). Preservation mechanisms of trehalose in food and biosystems. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 40, 107–113. doi:10.1016/J.COLSURFB.2004.05.003.
- Pénicaud, C., Landaud, S., Jamme, F., Talbot, P., Bouix, M., Ghorbal, S., et al. (2014). Physiological and biochemical responses of *Yarrowia lipolytica* to dehydration Induced by air-drying and freezing. *PLoS One* 9, e111138. doi:http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0111138.
- Penninckx, M. (2000). A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stresses. *Enzyme Microb. Technol.* 26, 737–742. doi:10.1016/S0141-0229(00)00165-4.
- Penninckx, M. J. (2002). An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeasts. *FEMS Yeast Res.* 2, 295–305. doi:10.1111/j.1567-1364.2002.tb00098.x.
- Pérez-Torrado, R., Bruno-Bárcena, J. M., and Matallana, E. (2005). Monitoring Stress-Related Genes during the Process of Biomass Propagation of *Saccharomyces cerevisiae* Strains Used for Wine Making. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6831 LP-6837. Available at: <http://aem.asm.org/content/71/11/6831.abstract>.
- Pérez-Torrado, R., Gamero, E., Gómez-Pastor, R., Garre, E., Aranda, A., and Matallana, E. (2015). Yeast biomass, an optimised product with myriad applications in the food

- industry. *Trends Food Sci. Technol.* 46, 167–175. doi:10.1016/j.tifs.2015.10.008.
- Pfeiffer, T., and Morley, A. (2014). An evolutionary perspective on the Crabtree effect. *Front. Mol. Biosci.* 1, 17. doi:10.3389/fmolb.2014.00017.
- Pfliegler, W. P., Pusztahelyi, T., and Pócsi, I. (2015). Mycotoxins – prevention and decontamination by yeasts. *J. Basic Microbiol.* 55, 805–818. doi:10.1002/jobm.201400833.
- Pham-Hoang, B. N., Romero-Guido, C., Phan-Thi, H., and Waché, Y. (2013). Encapsulation in a natural, preformed, multi-component and complex capsule: yeast cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 6635–6645. doi:10.1007/s00253-013-5044-1.
- Picazo, C., Gamero-Sandemetrio, E., Orozco, H., Albertin, W., Marullo, P., Matallana, E., et al. (2014). Mitochondria inheritance is a key factor for tolerance to dehydration in wine yeast production. *Lett. Appl. Microbiol.* 60, 217–222. doi:10.1111/lam.12369.
- Pichereau, V., Hartke, A., and Auffray, Y. (2000). Starvation and osmotic stress induced multiresistances: influence of extracellular compounds. *Int. J. Food Microbiol.* 55, 19–25. doi:10.1016/S0168-1605(00)00208-7.
- Pinho, O., Ferreira, I. M. P. L. V. O., and Santos, L. H. M. L. M. (2006). Method optimization by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography with mass spectrometry for analysis of beer volatile fraction. *J. Chromatogr. A* 1121, 145–153. doi:10.1016/j.chroma.2006.04.013.
- Piotrowska, M., Nowak, A., and Czyzowska, A. (2013). Removal of ochratoxin A by wine *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Eur. Food Res. Technol.* 236, 441–447. doi:10.1007/s00217-012-1908-3.
- Piper, P. W. (1993). Molecular events associated with acquisition of heat tolerance by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 11, 339–355. doi:10.1111/j.1574-6976.1993.tb00005.x.
- Pires, E. J., Teixeira, J. A., Brányik, T., and Vicente, A. A. (2014). Yeast: the soul of beer's aroma—a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 1937–1949. doi:10.1007/s00253-

013-5470-0.

- Piškur, J., Rozpędowska, E., Polakova, S., Merico, A., and Compagno, C. (2006). How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? *Trends Genet.* 22, 183–186. doi:10.1016/j.tig.2006.02.002.
- Plourde-Owobi, L., Durner, S., Goma, G., and François, J. (2000). Trehalose reserve in *Saccharomyces cerevisiae*: phenomenon of transport, accumulation and role in cell viability. *Int. J. Food Microbiol.* 55, 33–40. doi:10.1016/S0168-1605(00)00210-5.
- Plourde-Owobi, L., Durner, S., Parrou, J.-L., Wieczorke, R., Goma, G., and François, J. (1999). AGT1, Encoding an α -Glucoside Transporter Involved in Uptake and Intracellular Accumulation of Trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 181, 3830 LP-3832. Available at: <http://jb.asm.org/content/181/12/3830.abstract>.
- Ponsone, M. L., Chiotta, M. L., Combina, M., Dalcero, A., and Chulze, S. (2011). Biocontrol as a strategy to reduce the impact of ochratoxin A and *Aspergillus* section *Nigri* in grapes. *Int. J. Food Microbiol.* 151, 70–77. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.005.
- Ponsone, M. L., Nally, M. C., Chiotta, M. L., Combina, M., Köhl, J., and Chulze, S. N. (2016). Evaluation of the effectiveness of potential biocontrol yeasts against black sur rot and ochratoxin A occurring under greenhouse and field grape production conditions. *Biol. Control* 103, 78–85. doi:10.1016/j.biocontrol.2016.07.012.
- Pretorius, I. S. (2017). Synthetic genome engineering forging new frontiers for wine yeast. *Crit. Rev. Biotechnol.* 37, 112–136. doi:10.1080/07388551.2016.1214945.
- Pretorius, I. S., Curtin, C. D., and Chambers, P. J. (2014). “Designing wine yeast for the future,” in *Advances in Fermented Foods and Beverages: Improving Quality, Technologies and Health Benefits*, 197–226. doi:10.1016/B978-1-78242-015-6.00009-8.
- Pronk, J. T., Yde Steensma, H., and Van Dijken, J. P. (1996). Pyruvate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 12, 1607–1633. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(199612)12:16<1607::AID-YEA70>3.0.CO;2-4.
- Puig, S., and Pérez-Ortín, J. E. (2000). Stress response and expression patterns in wine

- fermentations of yeast genes induced at the diauxic shift. *Yeast* 16, 139–148. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(20000130)16:2<139::AID-YEA512>3.0.CO;2-J.
- Ragoonanan, V., Malsam, J., Bond, D. R., and Aksan, A. (2008). Roles of membrane structure and phase transition on the hyperosmotic stress survival of *Geobacter sulfurreducens*. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1778, 2283–2290. doi:10.1016/J.BBAMEM.2008.06.006.
- Rahman, I., Kode, A., and Biswas, S. K. (2007). Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat. Protoc.* 1, 3159. doi:10.1038/nprot.2006.378.
- Rahman, M. (2015). Application of Metabolic Engineering in Industrial Fermentative Process. *Adv. Food Biotechnol.* doi:doi:10.1002/9781118864463.ch13.
- Rapoport, A. (2017). “Anhydrobiosis and dehydration of yeasts,” in *Biotechnology of Yeasts and Filamentous Fungi*, ed. A. A. Sibirny (Cham: Springer International Publishing), 87–116. doi:10.1007/978-3-319-58829-2_4.
- Rapoport, A., Turchetti, B., and Buzzini, P. (2016). Application of anhydrobiosis and dehydration of yeasts for non-conventional biotechnological goals. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 32. doi:10.1007/s11274-016-2058-8.
- Rasband, W. S. (2018). Image J. Available at: <https://imagej.nih.gov/ij/>.
- Raspor, P., and Zupan, J. (2006). “Yeasts in Extreme Environments,” in *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*, eds. G. Péter and C. Rosa (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), 371–417. doi:10.1007/3-540-30985-3_15.
- Ratnakumar, S., Hesketh, A., Gkargkas, K., Wilson, M., Rash, B. M., Hayes, A., et al. (2011). Phenomic and transcriptomic analyses reveal that autophagy plays a major role in desiccation tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biosyst.* 7, 139–149. doi:10.1039/C0MB00114G.
- Razanskiene, A., Schmidt, J., Geldmacher, A., Ritzi, A., Niedrig, M., Lundkvist, Å., et al. (2004). High yields of stable and highly pure nucleocapsid proteins of different hantaviruses can be generated in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.*

- 111, 319–333. doi:10.1016/J.JBIOTEC.2004.04.010.
- Riezman, H. (2004). Why do cells require heat shock proteins to survive heat stress? *Cell cycle* 3, 60–62. doi:10.4161/cc.3.1.625.
- Ringot, D., Lerzy, B., Bonhoure, J. P., Auclair, E., Oriol, E., and Larondelle, Y. (2005). Effect of temperature on in vitro ochratoxin A biosorption onto yeast cell wall derivatives. *Process Biochem.* 40, 3008–3016. doi:10.1016/j.procbio.2005.02.006.
- Rodríguez-Porrata, B., Lopez-Martinez, G., Redón, M., Sancho, M., Mas, A., Rozès, N., et al. (2011). Enhancing yeast cell viability after dehydration by modification of the lipid profile. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27, 75–83. doi:10.1007/s11274-010-0428-1.
- Rodríguez-Porrata, B., Novo, M., Guillamón, J., Rozès, N., Mas, A., and Otero, R. C. (2008). Vitality enhancement of the rehydrated active dry wine yeast. *Int. J. Food Microbiol.* 126, 116–122. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.05.016.
- Rojo, F. (1999). Repression of Transcription Initiation in Bacteria. *J. Bacteriol.* 181, 2987 LP-2991. Available at: <http://jb.asm.org/content/181/10/2987.abstract>.
- Rolph, C. E., Moreton, R. S., and Harwood, J. L. (1989). Acyl lipid metabolism in the oleaginous yeast *Rhodotorula gracilis* (CBS 3043). *Lipids* 24, 715–720. doi:10.1007/BF02535210.
- Rothstein, A. (1971). Sulfhydryl Groups in Membrane Structure and Function. *Curr. Top. Membr. Transp.* 1, 135–176. doi:10.1016/S0070-2161(08)60032-5.
- Sadoudi, M., Rousseaux, S., David, V., Alexandre, H., and Tourdot-Maréchal, R. (2017). *Metschnikowia pulcherrima* influences the expression of genes involved in PDH bypass and glyceropyruvic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Front. Microbiol.* 8, 1137. doi:10.3389/fmicb.2017.01137.
- Sadoudi, M., Tourdot-Maréchal, R., Rousseaux, S., Steyer, D., Gallardo-Chacón, J.-J., Ballester, J., et al. (2012). Yeast–yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts. *Food Microbiol.* 32, 243–253. doi:10.1016/J.FM.2012.06.006.

- Saharan, R. K., Kanwal, S., and Sharma, S. C. (2010). Role of glutathione in ethanol stress tolerance in yeast *Pachysolen tannophilus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 397, 307–310. doi:10.1016/J.BBRC.2010.05.107.
- Santos, J., Leitão-Correia, F., Sousa, M. J., and Leão, C. (2016). Nitrogen and carbon source balance determines longevity, independently of fermentative or respiratory metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Oncotarget* 7, 23033. doi:10.18632/oncotarget.8656.
- Sasaki, T., and Ohshima, Y. (1987). Induction and Characterization of Artificial Diploids from the Haploid Yeast &Torulaspora delbrueckii&. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 1504 LP-1511. Available at: <http://aem.asm.org/content/53/7/1504.abstract>.
- Schmidt, S. A., and Henschke, P. A. (2015). Production, reactivation and nutrient requirements of active dried yeast in winemaking: theory and practice. *Aust. J. Grape Wine Res.* 21, 651–662. doi:10.1111/ajgw.12189.
- Schnierda, T., Bauer, F. F., Divol, B., Rensburg, E., and Görgens, J. F. (2014). Optimization of carbon and nitrogen medium components for biomass production using non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Lett. Appl. Microbiol.* 58, 478–485. doi:10.1111/lam.12217.
- Sebollela, A., Louzada, P. R., Sola-Penna, M., Sarone-Williams, V., Coelho-Sampaio, T., and Ferreira, S. T. (2004). Inhibition of yeast glutathione reductase by trehalose: possible implications in yeast survival and recovery from stress. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 900–908. doi:10.1016/j.biocel.2003.10.006.
- Segura-García, L. E., Taillandier, P., Brandam, C., and Gschaedler, A. (2015). Fermentative capacity of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* in agave juice and semi-synthetic medium. *LWT - Food Sci. Technol.* 60, 284–291. doi:10.1016/J.LWT.2014.08.005.
- Senses-Ergul, S., Agoston, R., Belák, A., and Deák, T. (2006). Characterization of some yeasts isolated from foods by traditional and molecular tests. *Int. J. Food Microbiol.* 108, 120–124. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.10.014.

- Sheikh-Zeinoddin, M., and Khalesi, M. (2018). Biological detoxification of ochratoxin A in plants and plant products. *Toxin Rev.*, 1–13. doi:10.1080/15569543.2018.1452264.
- Shi, L., Sutter, B. M., Ye, X., and Tu, B. P. (2010). Trehalose is a key determinant of the quiescent metabolic state that fuels cell cycle progression upon return to growth. *Mol. Biol. Cell* 21, 1982–1990. doi:http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E10-01-0056.
- Sies, H. (1999). Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 916–921. doi:10.1016/S0891-5849(99)00177-X.
- Simonin, H., Beney, L., and Gervais, P. (2007). Sequence of occurring damages in yeast plasma membrane during dehydration and rehydration: Mechanisms of cell death. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1768, 1600–1610. doi:10.1016/J.BBAMEM.2007.03.017.
- Simonin, H., Beney, L., and Gervais, P. (2008). Controlling the membrane fluidity of yeasts during coupled thermal and osmotic treatments. *Biotechnol. Bioeng.* 100, 325–333. doi:10.1002/bit.21749.
- Simonin, S., Alexandre, H., Nikolantonaki, M., Coelho, C., and Tourdot-Maréchal, R. (2018). Inoculation of *Torulasporea delbrueckii* as a bio-protection agent in winemaking. *Food Res. Int.* 107, 451–461. doi:10.1016/j.foodres.2018.02.034.
- Sipiczki, M. (2006). Metschnikowia Strains Isolated from Botrytized Grapes Antagonize Fungal and Bacterial Growth by Iron Depletion. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 6716–6724. doi:10.1128/aem.01275-06.
- Skoneczna, A., Miciałkiewicz, A., and Skoneczny, M. (2007). Saccharomyces cerevisiae Hsp31p, a stress response protein conferring protection against reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* 42, 1409–1420. doi:10.1016/J.FREERADBIOMED.2007.01.042.
- Specht, G. (2010). Yeast fermentation management for improved wine quality. *Manag. Wine Qual.*, 3–33. doi:10.1533/9781845699987.1.3.
- Steels, E. L., Learmonth, R. P., and Watson, K. (1994). Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically.

- Microbiology* 140, 569–576. doi:10.1099/00221287-140-3-569.
- Stevens, A., and Ramirez–Lopez, L. (2013). An introduction to the prospectr package. *R Packag. Vignette R Packag. Version 0.1.3* 3.
- Sugiyama, K., Izawa, S., and Inoue, Y. (2000a). The Yap1p-dependent Induction of Glutathione Synthesis in Heat Shock Response of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 275, 15535–15540. doi:10.1074/jbc.275.20.15535.
- Sugiyama, K., Kawamura, A., Izawa, S., and Inoue, Y. (2000b). Role of glutathione in heat-shock-induced cell death of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* 352, 71–78. doi:10.1042/0264-6021:3520071.
- Swinnen, S., Fernández-Niño, M., González-Ramos, D., van Maris, A. J. A., and Nevoigt, E. (2014). The fraction of cells that resume growth after acetic acid addition is a strain-dependent parameter of acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 14, 642–653. Available at: <http://dx.doi.org/10.1111/1567-1364.12151>.
- Ta, T. M. N., Cao-Hoang, L., Romero-Guido, C., Lourdin, M., Phan-Thi, H., Goudot, S., et al. (2012). A shift to 50°C provokes death in distinct ways for glucose- and oleate-grown cells of *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93, 2125–2134. doi:10.1007/s00253-011-3537-3.
- Takagi, H. (2008). Proline as a stress protectant in yeast: physiological functions, metabolic regulations, and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81, 211. doi:10.1007/s00253-008-1698-5.
- Tamm, L. K., and Tatulian, S. A. (1997). Infrared spectroscopy of proteins and peptides in lipid bilayers. *Q. Rev. Biophys.* 30, 365–429. doi:DOI: undefined.
- Tapia, H., Young, L., Fox, D., Bertozzi, C. R., and Koshland, D. (2015). Increasing intracellular trehalose is sufficient to confer desiccation tolerance to *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 6122–6127. doi:10.1073/pnas.1506415112.
- Tate, S. S., Grau, E. M., and Meister, A. (1979). Conversion of glutathione to glutathione disulfide by cell membrane-bound oxidase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76, 2715–

2719. doi:10.1073/pnas.76.6.2715.
- Team, R. C. (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing.
- Thammakiti, S., Supphantharika, M., Phaesuwan, T., and Verduyn, C. (2003). Preparation of spent brewer's yeast β -glucans for potential applications in the food industry. *Int. J. Food Sci. Technol.* 39, 21–29. doi:10.1111/j.1365-2621.2004.00742.x.
- Thomsson, E., Larsson, C., Albers, E., Nilsson, A., Franzén, C. J., and Gustafsson, L. (2003). Carbon Starvation Can Induce Energy Deprivation and Loss of Fermentative Capacity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3251 LP-3257. Available at: <http://aem.asm.org/content/69/6/3251.abstract>.
- Timilsena, Y. P., Vongsvivut, J., Tobin, M. J., Adhikari, R., Barrow, C., and Adhikari, B. (2018). Investigation of oil distribution in spray-dried chia seed oil microcapsules using synchrotron-FTIR microspectroscopy. *Food Chem.* 275, 457–466. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.043>.
- Tobin, M. J., Bamberg, K. R., Martin, D. E., Puskar, L., Beattie, D. A., Ivanova, E. P., et al. (2016). Attenuated Total Reflection FTIR Microspectroscopy at the Australian Synchrotron. in *Light, Energy and the Environment OSA Technical Digest* (online). (Leipzig: Optical Society of America), FTu2E.5. doi:10.1364/FTS.2016.FTu2E.5.
- Trevisol, E. T. V, Panek, A. D., Mannarino, S. C., and Eleutherio, E. C. A. (2011). The effect of trehalose on the fermentation performance of aged cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90, 697–704. doi:10.1007/s00253-010-3053-x.
- Trofimova, Y., Walker, G., and Rapoport, A. (2010). Anhydrobiosis in yeast: influence of calcium and magnesium ions on yeast resistance to dehydration–rehydration. *FEMS Microbiol. Lett.* 308, 55–61. doi:10.1111/j.1574-6968.2010.01989.x.
- Ueda, M., and Tanaka, A. (2000). Cell surface engineering of yeast: Construction of arming yeast with biocatalyst. *J. Biosci. Bioeng.* 90, 125–136. doi:10.1016/S1389-1723(00)80099-7.

- Vaimakis, V., and Roussis, I. . (1996). Must oxygenation together with glutathione addition in the oxidation of white wine. *Food Chem.* 57, 419–422. doi:10.1016/0308-8146(95)00244-8.
- Valles, B. S., Bedriñana, R. P., Tascón, N. F., Simón, A. Q., and Madrera, R. R. (2007). Yeast species associated with the spontaneous fermentation of cider. *Food Microbiol.* 24, 25–31. doi:10.1016/J.FM.2006.04.001.
- Varela, C. (2016). The impact of non-Saccharomyces yeasts in the production of alcoholic beverages. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 9861–9874. doi:10.1007/s00253-016-7941-6.
- Veal, E. A., Day, A. M., and Morgan, B. A. (2007). Hydrogen Peroxide Sensing and Signaling. *Mol. Cell* 26, 1–14. doi:10.1016/J.MOLCEL.2007.03.016.
- Verstrepen, K. J., Chambers, P. J., and Pretorius, I. S. (2006). “The Development of Superior Yeast Strains for the Food and Beverage Industries: Challenges, Opportunities and Potential Benefits BT - Yeasts in Food and Beverages,” in, eds. A. Querol and G. Fleet (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), 399–444. doi:10.1007/978-3-540-28398-0_13.
- Vico, I., Duduk, N., Vasić, M., and Nikolić, M. (2014). Identification of *Penicillium expansum* causing postharvest blue mold decay of apple fruit. *Pestic. i fitomedicina* 29, 257–266. doi:10.2298/PIF1404257V.
- Visintin, S., Ramos, L., Batista, N., Dolci, P., Schwan, F., and Cocolin, L. (2017). Impact of *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulasporea delbrueckii* starter cultures on cocoa beans fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 257, 31–40. doi:10.1016/J.IJFOODMICRO.2017.06.004.
- Walker, G. M., and Van Dijck, P. (2006). “Physiological and Molecular Responses of Yeasts to the Environment BT - Yeasts in Food and Beverages,” in, eds. A. Querol and G. Fleet (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), 111–152. doi:10.1007/978-3-540-28398-0_5.
- Wang, C. W. (2016). Lipid droplets, lipophagy, and beyond. *Biochim. Biophys. Acta - Mol.*

- Cell Biol. Lipids* 1861, 793–805. doi:10.1016/j.bbalip.2015.12.010.
- Wehrens, R. (2011). *Chemometrics with R: multivariate data analysis in the natural sciences and life sciences.* , eds. R. Gentleman, K. Hornik, and G. Parmigiani Springer Science & Business Media doi:10.1007/978-3-642-17841-2.
- Wen, S., Zhang, T., and Tan, T. (2004). Utilization of amino acids to enhance glutathione production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb. Technol.* 35, 501–507. doi:10.1016/j.enzmictec.2004.08.003.
- Wen, S., Zhang, T., and Tan, T. (2006). Maximizing production of glutathione by amino acid modulation and high-cell-density fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochem.* 41, 2424–2428. doi:10.1016/j.procbio.2006.06.030.
- Werner-Washburne, M., Braun, E., Johnston, G. C., and Singer, R. A. (1993). Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 57, 383 LP-401. Available at: <http://mibr.asm.org/content/57/2/383.abstract>.
- Wiseman, H. (1993). Vitamin D is a membrane antioxidant ability to inhibit iron-dependent lipid peroxidation in liposomes compared to cholesterol, ergosterol and tamoxifen and relevance to anticancer action. *FEBS Lett.* 326, 285–288. doi:10.1016/0014-5793(93)81809-E.
- Witte, V., Krohn, U., and Emeis, C. C. (1989). Characterization of yeasts with high L[+]-lactic acid production: Lactic acid specific soft-agar overlay (LASSO) and TAFE-patterns. *J. Basic Microbiol.* 29, 707–716. doi:10.1002/jobm.3620291014.
- Worrasinchai, S., Suphantharika, M., Pinjai, S., and Jamnong, P. (2006). β -Glucan prepared from spent brewer's yeast as a fat replacer in mayonnaise. *Food Hydrocoll.* 20, 68–78. doi:10.1016/J.FOODHYD.2005.03.005.
- Wu, Z., Liu, S. Q., and Huang, D. (2013). Dietary restriction depends on nutrient composition to extend chronological lifespan in budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* 8. doi:10.1371/journal.pone.0064448.
- Zelig, U., Kapelushnik, J., Moreh, R., Mordechai, S., and Nathan, I. (2009). Diagnosis of cell death by means of infrared spectroscopy. *Biophys. J.* 97, 2107–2114.

doi:10.1016/j.bpj.2009.07.026.

Zhou, J., Wang, Z., Sun, S., Liu, M., and Zhang, H. (2001). A rapid method for detecting conformational changes during differentiation and apoptosis of HL60 cells by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 33, 127–32. doi:10.1042/BA20000074.

Zielonka, J., Vasquez-Vivar, J., and Kalyanaraman, B. (2007). Detection of 2-hydroxyethidium in cellular systems: a unique marker product of superoxide and hydroethidine. *Nat. Protoc.* 3, 8. doi:10.1038/nprot.2007.473.

Liste de publications

Liste des publications parues

- **Câmara Jr., A.A.**, Nguyen, T.D., Jossier, A., Endrizzi, A., Saurel, R., Simonin, H., Husson, F. (2018). Improving total glutathione and trehalose contents in *Saccharomyces cerevisiae* cells to enhance their resistance to fluidized bed drying. *Process Biochemistry*. 69. DOI : 10.1016/j.procbio.2018.03.013
- **Câmara Jr., A.A.**, Maréchal, P-A., Tourdot-Maréchal, R., Husson, F. (2018). Dehydration stress responses of yeasts *Torulasporea delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima* and *Lachancea thermotolerans* : effects of glutathione and trehalose biosynthesis. *Food Microbiology*. 79. DOI : 10.1016/j.fm.2018.12.008
- **Câmara Jr., A.A.**, Maréchal, P-A., Tourdot-Maréchal, R., Husson, F. (2018). Understand the oxidative stress resistance during dehydration of strains belonging to three non-*Saccharomyces* wine yeast species. En révision dans *Applied Microbiology and Biotechnology*.
- **Câmara Jr., A.A.**, Nguyen, T.D., Saurel, R., Moundanga, S., Peltier, C., Dujourdy, L., Sandt, C., Guyot, S., Husson, F. Biochemical stress responses of the yeast *Lachancea thermotolerans* during dehydration and using real time infrared micro-spectroscopy synchrotron. (En cours de préparation)
- **Câmara Jr., A.A.**, Dupont, S., Beney, L., Gervais, P., Rosenthal, A., Correia, R.T.P., Pedrini, M.R.S. (2016). Fisetin yeast-based bio-capsules via osmoporation: effects of process variables on the encapsulation efficiency and internalized fisetin content. *Applied. Microbiology and Biotechnology*. 100. DOI : 10.1007/s00253-016-7425-8

Liste des communications

Communications orales :

- **Câmara Jr., A.A.**, Maréchal, P-A., Tourdot-Maréchal, R., Husson, F. (2018) Réponses physiologiques de la levure *Lachancea thermotolerans* à la déshydratation : rôle de la biosynthèse du glutathion. *14ème Congrès National de la Société Française de Microbiologie*, Paris, France
- **Câmara Jr., A.A.**, Maréchal, P-A., Tourdot-Maréchal, R., Husson, F. (2018) Physiological responses of three sensitive yeast strains during dehydration: effect of glutathione biosynthesis. *24^e Forum des Jeunes Chercheurs de Bourgogne Franche-Comté*, 2018, Besançon, France
- **Câmara Jr., A.A.**, Nguyen, T.D., Jossier, A., Endrizzi, A., Saurel, R., Simonin, H., Husson, F. (2017) Improving glutathione and trehalose content in yeast cells enhances their resistance to fluidized bed drying. *23ème Forum des Jeunes Chercheurs*, 2017, Dijon, France

Communications affichées :

- **Câmara Jr., A.A.**, Nguyen, T.D., Jossier, A., Endrizzi, A., Saurel, R., Simonin, H., Husson, F. (2017) Improving glutathione and trehalose content in yeast cells enhances their resistance to fluidized bed drying. *3rd International Conference on Food and Biosystems Engineering*, Rhodes, Grèce
★ **Prix : 2nd Best Poster Award**
- **Câmara Jr., A.A.**, Nguyen, T.D., Simonin, H., Saurel, R., Endrizzi, A., Penicaud, C., Fonseca, F., Husson, F. (2016) Environmentally reasoned process for functional yeast production and stabilization: role of glutathione and trehalose on stress resistance. *22ème Forum des Jeunes Chercheurs*, Besançon, France
- **Câmara Jr., A.A.**, Nguyen, T.D., Simonin, H., Saurel, R., Endrizzi, A., Penicaud, C., Fonseca, F., Husson, F. (2015) Environmentally reasoned process for functional yeast production and stabilization. *10th European Congress of Chemical Engineering & 3rd European Congress of Applied Biotechnology*, Nice, France

- **Câmara Jr., A.A.**, Nguyen, T.D., Simonin, H., Saurel, R., Endrizzi, A., Penicaud, C., Passot, S., Fonseca, F., Husson, F. (2015) Eco-design process for functional yeast production and stabilization. *21ème Forum des Jeunes Chercheurs*, Dijon, France

Résumé

L'utilisation des levures en industrie est indissociable de sa transformation à l'état déshydraté. Le procédé de séchage provoque un certain nombre de dysfonctionnements dans les cellules de levure qui affectent leur fonctionnalité et leur viabilité. Afin de protéger les levures au cours de la déshydratation, des additifs alimentaires sont souvent utilisés comme les émulsifiants et les antioxydants. Cependant, les levures sont capables de produire naturellement des substances protectrices, telles que le glutathion (GSH) et le tréhalose (TRE). Dans ce contexte, trois souches non-*Saccharomyces* (NS) appartenant aux genres et espèces *Torulaspota delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima* et *Lachancea thermotolerans* ont été étudiées. En effet, malgré leur intérêt pour de multiples applications agro-alimentaires, leurs mécanismes de résistance à la déshydratation associés à la synthèse de GSH et de TRE sont à l'heure actuelle méconnus. Cette investigation peut permettre à terme la formulation de nouvelles souches de levure NS sous forme sèche, sans aucuns additifs. Dans un premier chapitre, l'impact de la déshydratation de la levure « modèle » *Saccharomyces cerevisiae* en lit fluidisé pré-pilote a été corrélé à la synthèse du GSH et du TRE. Ainsi, il a été possible d'élucider les effets de la modulation de la composition du milieu de culture afin d'optimiser la conservation des cellules avant, pendant et après la déshydratation. Dans un deuxième chapitre, les conditions précédemment définies ont été appliquées aux levures NS afin de comprendre les effets de la déshydratation sur leur fonctionnalité. Cette étude a démontré que le GSH joue un rôle important dans la protection des levures NS, en fonction des conditions de culture et de déshydratation utilisées. Dans un troisième chapitre, certains phénomènes de résistance à l'oxydation des trois souches NS ont été étudiés. Il a été clairement démontré que la sensibilité des cellules à l'attaque oxydante dépend des conditions de culture-déshydratation et est inhérente à la souche étudiée. Enfin, dans un quatrième chapitre, une étude approfondie au niveau biochimique de la souche de levure la plus sensible, *L. thermotolerans*, a été réalisée par la micro-spectroscopie infrarouge avec rayonnement synchrotron. Les cellules cultivées en GSM, milieu favorisant la synthèse du glutathion, en plus de présenter une meilleure viabilité, montrent une plus grande intensité dans les bandes spectrales des lipides CH₂ et CH₃, associées à la fluidité de la membrane plasmique. Par ailleurs, les cellules cultivées en milieu TSM, milieu favorisant la synthèse du tréhalose, présentent une dénaturation plus élevée des protéines marquée par une intensité plus élevée des pics de feuillet β, et une intensité plus élevée des groupements C=O (oxydes lipidiques) corrélée à la peroxydation lipidique. Ces deux phénomènes expliquent la diminution de la viabilité obtenue sur cette souche lors de sa déshydratation. Les connaissances fondamentales acquises dans le cadre de cette étude seront utiles pour obtenir de nouvelles souches de levures déshydratées sans additifs et à hautes performances. Elles contribuent également à l'amélioration des méthodes de formulation et de déshydratation actuellement utilisées en industrie.

Mots clés : Déshydratation, oxydation, glutathion, tréhalose, levures, *Torulaspota delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Lachancea thermotolerans*

Abstract

The use of yeasts in industry is inseparable from their ability to be produced and dehydrated. This dehydration process causes various dysfunctions in yeast cells that affect their functionality and viability. In order to protect yeasts from dehydration, food additives are often used as emulsifiers and antioxidants. However, yeasts are able to produce naturally protective substances, such as glutathione (GSH) and trehalose (TRE). In this context, three non-*Saccharomyces* (NS) strains, belonging to the different genera and species *Torulaspota delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima* and *Lachancea thermotolerans*, were studied in this thesis. Despite the great interest aroused by their multiple agro-food applications, their dehydration resistance mechanisms associated with the synthesis of GSH and TRE, are currently unknown. This study is ultimately aimed at the formulation of new NS yeast dried strains without any food additives. In a first chapter, the impact of the "reference yeast" *Saccharomyces cerevisiae* dehydration in a pre-pilot fluidized bed has been correlated with the synthesis of GSH and TRE. It was possible to modulate the culture medium composition in order to optimize cell preservation before, during and after dehydration. In a second chapter, the previously defined conditions were applied to NS yeasts strains in order to understand the effects of dehydration on their microbial functionality. This study demonstrated that GSH plays an important role in NS yeasts protection, depending on the culture and dehydration conditions. In a third chapter, some oxidation resistance phenomena of the three NS strains were studied. It was clearly demonstrated that the susceptibility of cells to oxidative attack was dependent on culture-dehydration conditions and was yeast strain-dependent. Finally, in a fourth chapter, an in-depth biochemical study of the most dehydration-sensitive yeast strain, *L. thermotolerans*, was performed by synchrotron FTIR micro-spectroscopy. Cells grown in GSM (medium favoring the production of GSH), besides showing a better viability, showed a greater intensity in the spectral bands of lipids CH₂ and CH₃, associated with the plasma membrane fluidity. In addition, TSM grown cells (TSM is a medium favoring the production of TRE) exhibited a higher protein denaturation, suggested by the intensity of β-sheet peaks, and C=O (lipid oxides) bands correlated with lipid peroxidation. These data can explain the decreased of viability of this strain during production-dehydration process. The fundamental knowledge acquired in this study will be useful to obtain new dehydrated yeast strains without additives and with high performance. It will be useful also to improve the formulation and dehydration methods currently used in industry.

Keywords: Dehydration, oxidation, glutathione, trehalose, yeasts, *Torulaspota delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Lachancea thermotolerans*