



**THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE**

**PREPAREE A L'INSTITUT UNIVERSITAIRE DE LA VIGNE ET DU VIN JULES GUYOT**

**LABORATOIRE PROCEDES ALIMENTAIRES ET MICROBIOLOGIQUES UMRA 02 102**

**Equipe Vin ALiments Micro-organismes Stress**

Ecole doctorale n°554

Ecole Doctorale Environnements Santé

Doctorat en Biotechnologies agro-alimentaires

Par

**Monsieur Gobert Antoine**

---

## **Etude des besoins en azote des levures non-*Saccharomyces* en vinification : impact sur les fermentations séquentielles**

---

Thèse présentée et soutenue à Dijon, le 10 Avril 2019

Composition du Jury :

|                                |                                           |                              |
|--------------------------------|-------------------------------------------|------------------------------|
| Pr. Emmanuel Coton             | LUBEM, Université de Bretagne Occidentale | Rapporteur/Président du jury |
| Pr. Patricia Taillandier       | LGC, Université de Toulouse               | Rapporteur                   |
| Dr. Vittorio Capozzi           | SAFE, Université de Foggia                | Examineur                    |
| Pr. Hervé Alexandre            | IUVV, Université de Bourgogne             | Directeur de thèse           |
| Dr. Raphaëlle Tourdot-Maréchal | IUVV, Université de Bourgogne             | Co-encadrante                |
| M. Morge Christophe            | Entreprise Sofralab                       | Membre invité                |



## Etude des besoins en azote des levures non-*Saccharomyces* en vinification : impact sur les fermentations séquentielles

**Mots clés :** fermentation séquentielle, azote, levures non-*Saccharomyces*, composés volatils

Les systèmes de régulations impliqués dans le métabolisme de l'azote chez *S. cerevisiae* sont à l'heure actuelle bien décrits mais très peu existent pour les levures non-*Saccharomyces* (NS). Il en va de même pour les considérations œnologiques où les facteurs influençant l'assimilation des YAN et les implications d'un ajout d'azote exogène sont peu clairs. Face à l'importance de l'azote en fermentation, une remise en question d'un certain nombre de concepts (notamment les sources azotées préférentiellement assimilées) a été conduite. Afin d'identifier et de répertorier ces contradictions, un premier chapitre fait un état des connaissances vis-à-vis de l'influence du contenu en azote lors de la fermentation alcoolique. Par ailleurs, plusieurs espèces de levures NS sont déjà commercialisées et utilisées en début de fermentation alcoolique avec pour principal objectif d'améliorer le profil aromatique des vins. Les mécanismes à l'origine de l'amélioration du profil aromatique sont, à ce jour, encore mal identifiés. Il apparaît donc essentiel de les étudier afin d'obtenir une meilleure maîtrise de ces microorganismes. Une des pistes privilégiées pour expliquer ces phénomènes est l'étude des interactions entre les levures NS et *S. cerevisiae*, particulièrement pour la compétition vis-à-vis des sources azotées (YAN). Ainsi, dans un deuxième temps un classement des YAN préférentiellement

assimilés au cours de la fermentation alcoolique par plusieurs levures NS a été réalisé. Puis l'influence d'une fermentation séquentielle (levures NS + *S. cerevisiae*) sur la production des composés volatils a été évaluée. Cette première étude montre clairement que les YAN préférentiellement assimilés par les levures NS sont différents de *S. cerevisiae*. Cette consommation spécifique pourrait expliquer en partie certains changements dans le profil des composés volatils en fermentation séquentielle. Cependant, les conditions environnementales ont un impact significatif sur les sources préférentiellement assimilées. Ces deux premières études ont largement participé à la réalisation d'un troisième axe de recherche ciblant la mise au point d'une méthode biologique de réduction de l'éthanol dans les vins à l'aide des levures NS. En effet, le changement climatique global entraîne la production de vins de plus en plus alcoolisés. La fermentation séquentielle utilisant *S. bacillaris* et *S. cerevisiae* a été retenue. A l'aide d'une oxygénation maîtrisée et d'une nutrition spécifique, cette méthode a permis de réduire la concentration en éthanol de 1,65% (v/v) en condition laboratoire. Cette méthode a été validée à l'échelle pilote en cuverie où une réduction de 1% (v/v) a été obtenue, tout en conservant les qualités organoleptiques du vin.

## Study of nitrogen requirements of non-*Saccharomyces* yeasts during winemaking: impact on sequential fermentations

**Keywords:** Sequential fermentation, nitrogen, non-*Saccharomyces* yeasts, volatile compounds

The nitrogen pathways regulation involved in *S. cerevisiae* are currently well described, but data about non-*Saccharomyces* yeasts are limited (NS). In the same way, oenological considerations including factors influencing YAN uptake and implications of exogenous nitrogen are unclear. Several concepts (notably the nitrogen sources preferentially assimilated) have been questioned. In order to identify these contradictions, a first chapter makes a state of knowledge regarding the influence of nitrogen content during alcoholic fermentation. In addition, some species of NS yeasts are positioned on the market. Usually, they are used at the beginning of alcoholic fermentation with the main objective to improve the aromatic profile of wines. The mechanisms at the origin of the improvement of the aromatic profile remain still poorly understood. That is why, the study of these mechanisms is essential to obtain a better control of these microorganisms. The interactions between NS yeasts and *S. cerevisiae* could explain these phenomena, particularly about yeast assimilable nitrogen (YAN) competition. Thus, in a second part, a classification of YAN preferentially assimilated during the alcoholic fermentation by several NS yeasts was carried out. Then the influence of a sequential fermentation with NS yeasts and *S. cerevisiae* on the production of volatile compounds

was evaluated. This first study clearly shows that YAN preferentially assimilated by NS yeasts are different from *S. cerevisiae*. This specific consumption could explain in part some changes in the profile of volatile compounds in sequential fermentation. However, environmental conditions have a significant impact on preferential YAN sources. To support this data, an in-depth bibliographic study on the involvement of nitrogen during the alcoholic fermentation was carried out. This study highlights the difficulty to propose a general ranking of preferential nitrogen sources in NS yeasts and *S. cerevisiae*. In addition to biotic and abiotic factors, the genetic diversity of strains appears to be strongly implicated. The concept of preferential source must be questioned. These two previous studies largely contribute to the achievement of a third development axis: a biological method for the reduction of ethanol in wines using NS yeasts. Indeed, global climate change induces the production of increasingly alcoholic wines. Sequential fermentation using *S. bacillaris* and *S. cerevisiae* was selected. With targeted oxygenation and specific nutrition, this method reduced the ethanol concentration by 1.65% (v/v) in laboratory conditions. This method has been validated at pilot scale in winery where a reduction of 1% (v/v) was obtained without organoleptic deviation.



# Remerciements

Cette étude a été effectuée au sein de l'équipe Vin Aliment Microbiologie et Stress (VALMiS), de l'UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques (PAM) dirigée par le Pr. Laurent Beney et de l'équipe R&D de l'entreprise Sofralab dirigée par Didier Fages. Je leur adresse mes plus sincères remerciements pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ces travaux au sein de leurs laboratoires.

J'adresse mes remerciements tout particuliers au Pr. Hervé Alexandre pour son encadrement tout au long de ma thèse. Vos précieux conseils m'ont permis d'avancer rapidement et sereinement mais surtout avec méthode ! Merci à vous d'avoir cru en moi et de m'avoir fait confiance. Merci pour ces moments de convivialités lors des vendanges et d'avoir pris le risque d'envoyer à la distillerie 400L d'aligoté (qui n'est pas si mauvais au final !). Je tiens à remercier chaleureusement le Dr. Raphaëlle Tourdot-Maréchal, ma co-encadrante pour son expertise scientifique et sa bienveillance. Merci à vous pour vos conseils lors de mes moments de doute pour savoir quelle direction prendre. Un grand merci pour votre patience lors de la relecture de mes articles scientifiques (promis j'y arriverai avec le « S » à la troisième personne du singulier...)

Tout ceci n'aurait pas été possible sans l'implication de Christophe Morge, mon directeur scientifique de Sofralab. Merci à toi de m'avoir fait confiance et de m'avoir accompagné tout au long de ces trois ans. Merci pour ton enthousiasme et ton implication au projet. Ton soutien m'a beaucoup apporté aussi bien d'un point de vue professionnel que personnel. Bien entendu, un grand merci à Céline Sparrow, ma seconde référente scientifique de Sofralab. Ta bienveillance et ton implication m'ont permis d'accroître mon assurance dans l'industrie du vin et particulièrement dans la recherche appliquée.

Je remercie également très chaleureusement le Pr. Patricia Taillandier, le Pr. Emmanuel Coton ainsi que le Dr. Vittorio Capozzi d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Votre présence parmi le jury de thèse représente un véritable honneur.

Mes plus sincères remerciements vont également aux personnes avec qui j'ai eu la chance de collaborer, en particulier le Dr. Liu Youzhong pour son expertise de programmation, le Dr. Joëlle de Coninck pour son expertise de fermentation en bioréacteur et le Dr. Jordi Ballester pour son savoir intarissable sur l'analyse sensorielle. Sans oublier mes chers collègues de travail (qui pour la plupart d'entre eux sont désormais mes amis) qui m'ont supporté pendant trois ans ! Rémy Romanet (Obélix), Scott Simonin (le gars de Fourchambault), Clément Petitgonnet (le Président), Arnaud Heumann (Neuneu), Peio Elichiry-Ortiz (le Basque), Florian Bahut (le Parisien), Hany Abdo (Jassab),

Nolwenn Wirgot (pompette), Frédérique Julia (Fred) et bien sûr Christian Coelho et Franck Bagala merci du fond du cœur pour cette ambiance chaleureuse et amicale.

Je finirai par remercier toutes les personnes qui m'ont entouré au cours de cette aventure, amis et famille. Merci au club de triathlon de Dijon de m'avoir aussi bien accueilli. L'esprit d'équipe et votre joie de vivre m'ont énormément apporté. Je tiens tout particulièrement à remercier Axel Cerveau, Pierre Roy, Félix Dublot, Charly Dessartine, Quentin Antoine et Tom Austrui pour leur bonne humeur et les moments partagés. Merci à mes parents pour leur soutien et encouragement sans qui je ne serais certainement pas arrivé jusque-là. Merci à ma sœur, Chloé Gobert qui sera prochainement elle aussi Docteur, mais avec un stéthoscope autour du cou. Je ne cache pas ma grande fierté face à son parcours. Merci à ma grand-mère Christiane Ravion chez qui il est toujours bon d'aller pour se ressourcer. Enfin, merci à toi Lucie. Le bonheur, le soutien et l'amour que tu as pu m'apporter pendant ma thèse resteront inoubliables.



# Table des matières

|                                                                                                                   |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Introduction générale.....</b>                                                                                 | <b>1</b>  |
| <b>Introduction bibliographique .....</b>                                                                         | <b>5</b>  |
| 1. Rappel des différentes voies métaboliques pendant la fermentation alcoolique .....                             | 6         |
| 1.1. La glycolyse .....                                                                                           | 6         |
| 1.2. La voie des pentoses phosphates .....                                                                        | 8         |
| 1.3. La phosphorylation oxydative .....                                                                           | 9         |
| 1.4. Balance Redox .....                                                                                          | 10        |
| 1.5. La fermentation alcoolique .....                                                                             | 13        |
| 1.6. La biosynthèse des acide gras et de l'ergostérol chez <i>S. cerevisiae</i> .....                             | 15        |
| 1.7. La $\beta$ -oxydation des acides gras .....                                                                  | 19        |
| 2. L'azote et la fermentation alcoolique .....                                                                    | 21        |
| 2.1. Le rôle de l'azote .....                                                                                     | 21        |
| 2.2. Transport et régulation de l'azote assimilable .....                                                         | 22        |
| 2.3. Les méthodes de classification des sources d'azote assimilées chez <i>S. cerevisiae</i> .....                | 29        |
| 2.4. Métabolisme azoté central (Central Nitrogen Metabolism ou CNM) .....                                         | 31        |
| 3. Synthèse des composés volatils .....                                                                           | 33        |
| 3.1. La voie d'Ehrlich.....                                                                                       | 33        |
| 3.2. Transport des alcools supérieurs, esters et acides organiques.....                                           | 36        |
| 3.3. Influence d'une co-culture de levures NS – <i>S. cerevisiae</i> sur la production des composés volatils..... | 36        |
| 4. Réduction de la concentration en éthanol dans le vin.....                                                      | 41        |
| 4.1. Problématiques .....                                                                                         | 42        |
| 4.2. Solutions pour réduire la concentration en éthanol des vins .....                                            | 44        |
| <b>Problématique et objectifs de la thèse .....</b>                                                               | <b>54</b> |
| <b>Chapitre 1 : Influence du contenu en d'azote dans la fermentation alcoolique .....</b>                         | <b>57</b> |
| Avant-propos : Nitrogen content in must .....                                                                     | 59        |
| 1.1. Diversity from geographical location .....                                                                   | 59        |

|                                                                                                                                                                                                                                                     |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 1.2. The date of harvest choice .....                                                                                                                                                                                                               | 60         |
| 1.3. Irrigation .....                                                                                                                                                                                                                               | 61         |
| 1.4. Fertilization.....                                                                                                                                                                                                                             | 61         |
| Revue scientifique : Influence of nitrogen status in wine alcoholic fermentation .....                                                                                                                                                              | 64         |
| 1.5. Introduction.....                                                                                                                                                                                                                              | 65         |
| 1.6. YAN metabolism in yeast.....                                                                                                                                                                                                                   | 67         |
| 1.7. Factors that influence YAN assimilation.....                                                                                                                                                                                                   | 77         |
| 1.8. Management of nitrogen addition .....                                                                                                                                                                                                          | 80         |
| 1.9. Concluding remarks .....                                                                                                                                                                                                                       | 95         |
| Acknowledgments .....                                                                                                                                                                                                                               | 96         |
| <b>Chapitre 2 : Etude des besoins et de la compétition pour les sources azotées entre les levures NS sélectionnées et <i>S. cerevisiae</i> au cours de la fermentation alcoolique. Evaluation des répercussions sur les composés volatils .....</b> | <b>97</b>  |
| <b>Chapitre 3 : Mise au point d'un procédé biotechnologique utilisant les levures NS afin de réduire la concentration en éthanol dans les vins .....</b>                                                                                            | <b>113</b> |
| Etudes préliminaires.....                                                                                                                                                                                                                           | 115        |
| 3.1. Matériels et méthodes .....                                                                                                                                                                                                                    | 115        |
| 3.2. Résultats et discussion .....                                                                                                                                                                                                                  | 131        |
| 3.3. Conclusions de l'étude préliminaire.....                                                                                                                                                                                                       | 159        |
| Article scientifique : Oxygen and nitrogen management in sequential fermentation with <i>Starmerella bacillaris</i> and <i>Saccharomyces cerevisiae</i> in grape must to reduce ethanol content in wine .....                                       | 161        |
| 3.4. Introduction.....                                                                                                                                                                                                                              | 161        |
| 3.5. Materials and methods .....                                                                                                                                                                                                                    | 166        |
| 3.6. Results .....                                                                                                                                                                                                                                  | 175        |
| 3.7. Discussion .....                                                                                                                                                                                                                               | 190        |
| 3.8. Conclusion .....                                                                                                                                                                                                                               | 196        |
| <b>Conclusions et Perspectives .....</b>                                                                                                                                                                                                            | <b>198</b> |
| <b>Bibliographie.....</b>                                                                                                                                                                                                                           | <b>204</b> |
| <b>Annexes .....</b>                                                                                                                                                                                                                                | <b>239</b> |

# Liste des communications scientifiques

## Articles scientifiques

**Gobert, A.**, Tourdot-Maréchal, R., Morge, C., Sparrow, C., Liu, Y., Quintanilla-Casas, B., Vichi, S., Alexandre, H. (2017). Non-*Saccharomyces* Yeasts Nitrogen Source Preferences: Impact on Sequential Fermentation and Wine Volatile Compounds Profile. *Frontiers in Microbiology* 8, 2175. doi:10.3389/fmicb.2017.02175.

**Gobert, A.**, Tourdot-Maréchal, R., Morge, C., Sparrow, C., Alexandre, H. (2019). Influence of nitrogen status in wine alcoholic fermentation. *Food Microbiology* 83, 71-85. doi:10.1016/j.fm.2019.04.008.

**Gobert, A.**, Tourdot-Maréchal, R., De Coninck, J., Ballester, J., Morge, C., Sparrow, C., Klein, G., Alexandre, H. (2019). *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* (à soumettre)

## Articles de vulgarisation scientifique

**Gobert, A.**, Tourdot-Maréchal, R., Morge, C., Sparrow, C., Liu, Y., Quintanilla-Casas, B., Vichi, S., Alexandre, H. (2018). Besoins en azote des levures non-*Saccharomyces*. *Revue des œnologues et des techniques vitivinicoles et œnologiques*. N°167 – Avril 2018.

**Gobert, A.**, Tourdot-Maréchal, R., Morge, C., Sparrow, C., Liu, Y., Quintanilla-Casas, B., Vichi, S., Alexandre, H. (2018). Non-*Saccharomyces*, elles ont faim d'azote. *La Vigne*. N°310 – Août 2018

## Communications orales

**Gobert, A.**, Tourdot-Maréchal, R., Morge, C., Sparrow, C., Alexandre, H. (2017). Etudes des interactions levures – levures pour la maîtrise des levains mixtes en vin. *Forum des jeunes chercheurs* (1<sup>er</sup> prix), Dijon, France.

## Communications affichées

**Gobert, A.**, Tourdot-Maréchal, R., Morge, C., Sparrow, C., Liu, Y., Quintanilla-Casas, B., Vichi, S., Alexandre, H. (2017). Amino acids and ammonium utilization by non-*Saccharomyces* yeasts from grape juice. *Wine Active Compounds*, Beaune, France.

**Gobert, A.**, Tourdot-Maréchal, R., Morge, C., Sparrow, C., Alexandre, H. (2017). Effect of sequential fermentation with *Starmerella bacillaris* and *Saccharomyces cerevisiae* on nitrogen sources and aromatic profile in wine. *33<sup>e</sup> International specialized symposium on yeasts (ISSY33)*, Cork, Irlande.

**Gobert, A.**, Tourdot-Maréchal, R., Morge, C., Sparrow, C., Alexandre, H. (2017). Effect of sequential fermentation with *Starmerella bacillaris* and *Saccharomyces cerevisiae* on nitrogen sources and aromatic profile in wine. *Forum des jeunes chercheurs*, Dijon, France.

# Liste des abréviations

|                |                                                                                             |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| $a$            | Surface gaz-liquide                                                                         |
| AAP            | Perméases impliquées dans le transport des acides aminés                                    |
| ARNt           | Acide ribonucléique de transfert                                                            |
| ATP            | Adénosine triphosphate                                                                      |
| $C^*$          | Concentration de l'oxygène en saturation dans le liquide en équilibre avec la phase gazeuse |
| cFDA           | 5-6-Carboxyfluorescein Diacetate                                                            |
| $C_L$          | Concentration en oxygène dissous dans le liquide                                            |
| CNM            | Métabolisme azoté central                                                                   |
| CoA            | Coenzyme A                                                                                  |
| GAAC           | Contrôle général des acides aminés                                                          |
| GDP            | Guanosine diphosphate                                                                       |
| Gox            | Glucose oxydase                                                                             |
| GTP            | Guanosine triphosphate                                                                      |
| $H$            | Constante de Henry                                                                          |
| $J^o$          | Flux molaire de l'oxygène                                                                   |
| $K_g$ et $K_L$ | Coefficients de transferts de masse locaux                                                  |
| $KLa$          | Coefficient volumétrique de transfert                                                       |
| NAD            | Nicotinamide adénine dinucléotide                                                           |
| NADP           | Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate                                                 |
| NCR            | Système de répression catabolique par l'azote                                               |
| $N_{O_2}$      | Taux de transfert de masse d'oxygène par unité de volume                                    |
| NS             | Non- <i>Saccharomyces</i>                                                                   |
| OTR            | Taux de transfert de l'oxygène                                                              |
| OUR            | Taux de consommation de l'oxygène du microorganisme                                         |
| $P^*$          | Pression partielle de l'oxygène en équilibre avec la phase liquide                          |
| $P_G$          | Pression partielle d'oxygène dans la bulle de gaz                                           |
| SPS            | Système Ssy1p-Ptr3p-Ssy5p                                                                   |
| TC             | Complexe ternaire                                                                           |
| UAS            | Séquence d'activation cible                                                                 |
| YAN            | Azote assimilable par les levures                                                           |

# Liste des figures

|                                                                                                                                                                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 1 : Utilisation des sucres par les levures suivant leur profil Crabtree .....                                                                                                                                                                         | 6  |
| Figure 2 : Voie de la glycolyse en condition fermentaire chez <i>S. cerevisiae</i> .....                                                                                                                                                                     | 7  |
| Figure 3 : Voie des pentoses phosphates chez <i>S. cerevisiae</i> .....                                                                                                                                                                                      | 8  |
| Figure 4 : Voie de la phosphorylation oxydative chez <i>S. cerevisiae</i> .....                                                                                                                                                                              | 9  |
| Figure 5 : Formation du NADPH dans la partie oxydante de la voie des pentoses phosphates .....                                                                                                                                                               | 11 |
| Figure 6 : Oxydation respiratoire du NADH cytosolique chez <i>S. cerevisiae</i> .....                                                                                                                                                                        | 12 |
| Figure 7 : Réactions connectées au dihydroxyacetone phosphate chez <i>S. cerevisiae</i> .....                                                                                                                                                                | 14 |
| Figure 8 : Cycle de Krebs pendant la respiration et la fermentation .....                                                                                                                                                                                    | 15 |
| Figure 9 : Sites de liaison acyle et réactions de transacylation interdomaine dans la FAS chez <i>S. cerevisiae</i> .....                                                                                                                                    | 16 |
| Figure 10 : Voie de biosynthèse de l'ergostérol chez <i>S. cerevisiae</i> .....                                                                                                                                                                              | 18 |
| Figure 11 : Transport des métabolites à travers la membrane peroxysomale lors de l'oxydation des acides gras .....                                                                                                                                           | 19 |
| Figure 12 : Oxydation des acides gras insaturés chez <i>S. cerevisiae</i> .....                                                                                                                                                                              | 21 |
| Figure 13 : Mécanisme d'assimilation des acides aminés chez <i>S. cerevisiae</i> .....                                                                                                                                                                       | 23 |
| Figure 14 : Voie de détection SPS des acides aminés chez <i>S. cerevisiae</i> .....                                                                                                                                                                          | 24 |
| Figure 15 : Modèle de régulation des gènes NCR-sensibles .....                                                                                                                                                                                               | 26 |
| Figure 16 : Voie de régulation du complexe ternaire .....                                                                                                                                                                                                    | 28 |
| Figure 17 : Régulation de la traduction du gène <i>GCN4</i> en condition de non-carence en acide(s) aminé(s) .....                                                                                                                                           | 28 |
| Figure 18 : Régulation de la traduction du gène <i>GCN4</i> en condition de carence en acide(s) aminé(s) .....                                                                                                                                               | 28 |
| Figure 19 : Fonctionnement d'une perméase Mep .....                                                                                                                                                                                                          | 29 |
| Figure 20 : Représentation générale de la voie de biosynthèse des acides aminés à partir du glucose et de l'ammonium chez <i>S. cerevisiae</i> .....                                                                                                         | 32 |
| Figure 21 : La voie d'Ehrlich. Catabolisme des acides aminés ramifiées et des acides aminés soufrés impliqués dans la formation des acides organiques, des alcools supérieurs et des esters .....                                                            | 34 |
| Figure 22 : Présence de <i>S. cerevisiae</i> (Sc) et des souches non- <i>Saccharomyces</i> (Sp : <i>S. paradoxus</i> , Su : <i>S. uvarum</i> , Se : <i>S. eubayanus</i> et Sk : <i>S. kudriavzevii</i> ) en co-fermentation à différentes températures. .... | 42 |
| Figure 23 : Oxydation du $\beta$ -D-Glucose en D-glucono-1,5-lactone par la GOx puis hydratation du D-glucono-1,5-lactone pour former l'acide gluconique .....                                                                                               | 45 |
| Figure 24 : Capacité de séparation de différents systèmes membranaires à différents niveaux de pressions .....                                                                                                                                               | 47 |

|                                                                                                                                                                                                 |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure 25 : Principe général de résistance du transfert de l'oxygène à travers un liquide pour atteindre une cellule .....                                                                      | 50  |
| Figure 26: Overview of assimilable nitrogen from natural grape juice in Europe (A), America (B), Australia (C) and South Africa (D).....                                                        | 60  |
| Figure 27 (1 manuscript) : (A) The non-induced resting state in the absence of inducing amino acids.. .....                                                                                     | 68  |
| Figure 28 (2 manuscript): Translocation into the nucleus of Gat1p/Gln3p complex depending on nitrogen status .....                                                                              | 69  |
| Figure 29 : Méthode de détermination du $K_La$ (méthode statique) .....                                                                                                                         | 123 |
| Figure 30 : Méthode de détermination du $K_La$ (méthode dynamique). .....                                                                                                                       | 124 |
| Figure 31 : Vue d'ensemble de la fermentation séquentielle du test 1.....                                                                                                                       | 125 |
| Figure 32 : Vue d'ensemble de la fermentation séquentielle du test 2.....                                                                                                                       | 126 |
| Figure 33 : Vue d'ensemble de la fermentation séquentielle du test 3.....                                                                                                                       | 128 |
| Figure 34 : Vue d'ensemble de la fermentation séquentielle du test 4.....                                                                                                                       | 129 |
| Figure 35 : Vue d'ensemble de la fermentation séquentielle du test 5 condition 1.....                                                                                                           | 130 |
| Figure 36 : Vue d'ensemble de la fermentation séquentielle du test 5 condition 2.....                                                                                                           | 130 |
| Figure 37 : Profil de fermentation des levures NS sélectionnées en jus de raisin normalisé à 232 g/L de sucre sans agitation à 20°C.....                                                        | 134 |
| Figure 38 : Profil de fermentation séquentielle des levures NS sélectionnées lors de la première expérience en jus de raisin normalisé à 232 g/L de sucre sans agitation à 20°C .....           | 138 |
| Figure 39 : Profil de fermentation séquentielle des levures NS sélectionnées lors de la première expérience en jus de raisin normalisé à 232 g/L de sucre avec 3 jours d'agitation à 20°C.....  | 139 |
| Figure 40 : Profil de fermentation séquentielle de plusieurs souches de levures <i>S. bacillaris</i> en jus de raisin normalisé à 245 g/L de sucre avec 4 jours d'agitation à 20°C.....         | 140 |
| Figure 41 : Profil de fermentation séquentielle de <i>S. bacillaris</i> SFL1 en moût .....                                                                                                      | 142 |
| Figure 42 : Profil de fermentation séquentielle de <i>S. bacillaris</i> SFL1 et <i>S. cerevisiae</i> SLM en bioréacteur à 28°C lors du test 1.....                                              | 144 |
| Figure 43 : Profil de fermentation de <i>S. cerevisiae</i> SLM en bioréacteur à 28°C lors du premier test. ....                                                                                 | 144 |
| Figure 44 : Profil de fermentation séquentielle de <i>S. bacillaris</i> SFL1 et <i>S. cerevisiae</i> SLM en bioréacteur à 28°C lors du test 2.....                                              | 146 |
| Figure 45 : Profil de fermentation de <i>S. cerevisiae</i> SLM en bioréacteur à 28°C lors du deuxième test. ....                                                                                | 146 |
| Figure 46 : Courbes de croissances de <i>S. bacillaris</i> SFL1 et <i>S. cerevisiae</i> SLM au cours de fermentations séquentielles dans différentes conditions .....                           | 148 |
| Figure 47 : Consommation des sucres et production en éthanol des fermentations séquentielles <i>S. bacillaris</i> SFL1 - <i>S. cerevisiae</i> SLM (S.b – S.c) dans différentes conditions ..... | 149 |

|                                                                                                                                                                                                   |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure 48 : Profil de consommation des YAN par <i>S. bacillaris</i> SFL1 durant les 24 premières heures de fermentation en bioréacteur à 0,5 VVM5VVM et 400 rpm en jus de raisin commercial ..... | 150 |
| Figure 49 : Profil de la fermentation séquentielle en bioréacteur du 4 <sup>ème</sup> test .....                                                                                                  | 151 |
| Figure 50 : Heat map des acides aminés en fonction des paramètres fermentaires.....                                                                                                               | 153 |
| Figure 51 : Concentration en acide acétique au cours de la fermentation séquentielle .....                                                                                                        | 154 |
| Figure 52 : Profil des populations de levures au cours de la fermentation alcoolique lors du 5 <sup>ème</sup> test. ....                                                                          | 156 |
| Figure 53 : Profil de consommation des sucres et production de l'éthanol au cours de la fermentation alcoolique lors du 5 <sup>ème</sup> test. (1) : condition 1, (2) : condition 2.....          | 157 |
| Figure 54 : Production d'acidité volatile au cours des fermentations alcoolique lors du 5 <sup>ème</sup> test. (1) : condition 1, (2) : condition 2 .....                                         | 158 |
| Figure 55 (1 manuscript): Static method to determine $K_La$ .....                                                                                                                                 | 168 |
| Figure 56 (2 manuscript): Dynamic method for measurement of OUR and $K_La$ during fermentation.....                                                                                               | 169 |
| Figure 57 (3 manuscript): (A): $K_La_{max}$ determination by the static method using several agitation and aeration couples. (B): Classification of results in ascending order .....              | 176 |
| Figure 58 (4 manuscript): Oxygen consumption profile of <i>S. bacillaris</i> SFL1 in grape juice at 28°C...                                                                                       | 177 |
| Figure 59 (5 manuscript): Comparison of $K_La_{max}$ obtained in static and dynamic method .....                                                                                                  | 178 |
| Figure 60 (6 manuscript): Oxygen consumption during the first step of the sequential fermentation .....                                                                                           | 179 |
| Figure 61 (7 manuscript): Fermentation profiles at laboratory scale .....                                                                                                                         | 180 |
| Figure 62 (8 manuscript): YAN concentration in grape juice initially and after 24h of fermentation by <i>S. bacillaris</i> SFL1.....                                                              | 181 |
| Figure 63 (9 manuscript) : Pilot-scale fermentation profiles .....                                                                                                                                | 183 |
| Figure 64 (10 manuscript): Projection of wines used in flash profile.....                                                                                                                         | 187 |
| Figure 65 (11 manuscript): Discriminant attributes on the two first dimensions (PC1 and PC2) of the PCA performed with aroma descriptors.....                                                     | 189 |

# Liste des tableaux\*

|                                                                                                                                                                                                                                                 |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tableau 1 : Intermédiaires de la voie d'Ehrlich .....                                                                                                                                                                                           | 35  |
| Tableau 2 : Influence des levures NS sur la composition du vin et/ou ses propriétés sensorielles.....                                                                                                                                           | 38  |
| Tableau 3 : Surface sous la courbe enzymatique (AUEC) des enzymes hydrolytiques produites par des cultures pures et mixtes de <i>S. cerevisiae</i> et de levures NS .....                                                                       | 40  |
| Tableau 4 : Simulation des besoins énergétiques de refroidissement maximum et total en fonction des différentes concentrations de sucre initiales, des températures de fermentation extérieures ou définies en utilisant le programme SOFA..... | 43  |
| Tableau 5 : Réduction de la concentration en éthanol en co-fermentation ou fermentation séquentielle de plusieurs souches de levures NS.....                                                                                                    | 48  |
| Tableau 6 (Table 1 manuscript): Nitrogen compounds considered to be “preferred” nitrogen sources in <i>S. cerevisiae</i> . .....                                                                                                                | 71  |
| Tableau 7 (Table 2 manuscript): Nitrogen compounds considered to be “preferred” nitrogen sources in NS yeasts depending on the conditions of fermentation.....                                                                                  | 76  |
| Tableau 8 (Table 3 manuscript) : Comparison between the impact of the timing of addition and nitrogen source on fermentation.....                                                                                                               | 82  |
| Tableau 9 (Table 4 manuscript) : Impact of the addition of YAN sources on volatile compounds and glycerol produced by <i>S. cerevisiae</i> . .....                                                                                              | 86  |
| Tableau 10 (Table 5 manuscript): Influence of YAN status on the transcriptional activity of gene families in <i>S. cerevisiae</i> during alcoholic fermentation. ....                                                                           | 91  |
| Tableau 11 (Table 6 manuscript) : Experimental conditions used in the tables 3, 4 and 5. ....                                                                                                                                                   | 94  |
| Tableau 12 : Couples agitation/aération testés pour déterminer le $K_L a_{max}$ .....                                                                                                                                                           | 122 |
| Tableau 13 : Rendements en éthanol à 3 jours et 14 jours de fermentation et pourcentage de sucre consommé des levures NS sélectionnées .....                                                                                                    | 135 |
| Tableau 14 : Comparaison des concentrations finales en éthanol et des concentrations résiduelles en sucre lors des fermentations séquentielles avec les souches de levures NS sélectionnées et <i>S. cerevisiae</i> SLM .....                   | 136 |
| Tableau 15 : Comparaison des concentrations finales en éthanol et des concentrations résiduelles en sucre lors des fermentations séquentielles avec les souches de levures <i>S. bacillaris</i> et <i>S. cerevisiae</i> SLM.....                | 141 |
| Tableau 16 : Effet du délai d'inoculation de <i>S. cerevisiae</i> SLM en fermentation séquentielle sur la diminution en éthanol.....                                                                                                            | 141 |
| Tableau 17 : Consommation des YAN par <i>S. bacillaris</i> SFL1 en 24h de fermentation. ....                                                                                                                                                    | 151 |

|                                                                                                                                                              |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tableau 18 (Table 1 manuscript): Reduction of ethanol content after sequential fermentations of some NS yeasts in comparison with <i>S. cerevisiae</i> ..... | 165 |
| Tableau 19 (Table 2 manuscript): Agitation and aeration used to determine the $K_L a_{max}$ in static method .....                                           | 167 |
| Tableau 20 (Table 3 manuscript): Concentration of volatile and minerals constituents in the wine for the control and the sequential fermentation. ....       | 185 |

\* Certaines parties de cette thèse sont rédigées en anglais sous forme d'article ou revue scientifique. Par souci de référencement des tableaux, les légendes des tableaux dans les parties rédigées en anglais apparaîtront avec la désignation « Tableau » et non pas « Table ».



## Introduction générale

---

Les grappes de raisins présentent une grande diversité de micro-organismes à leur surface, parmi lesquels, les levures représentent une part importante. Cette population levurienne évolue constamment en fonction des conditions climatiques et du niveau de maturité des grappes (Raspor et al., 2006). Actuellement, 29 genres et 90 espèces ont été identifiés (Liu et al., 2015). Dans ce contexte, au moment des vendanges, la population des levures est diversifiée et *Saccharomyces cerevisiae*, la levure majoritaire lors de la fermentation alcoolique, est minoritaire. En effet, seulement 0,1 % des grappes sont *S. cerevisiae*-positives (Mortimer and Polsinelli, 1999). Ainsi, au début du processus de vinification puis dans une moindre mesure au cours de la fermentation, *S. cerevisiae* et les autres levures, appelées non-*Saccharomyces* (NS) sont en co-fermentations.

Actuellement, plusieurs espèces de levures NS sont déjà commercialisées et utilisées en début de fermentation alcoolique avec pour principal objectif de modifier le profil aromatique des vins (Soden et al., 2000; Clemente-Jimenez et al., 2005; Kapsopoulou et al., 2007; Bely et al., 2008; Sadoudi et al., 2012; Varela, 2016). Cependant, ces co-fermentations ou fermentations séquentielles restent peu reproductibles. Il apparaît donc essentiel de les étudier afin d'obtenir une meilleure maîtrise de ces microorganismes. Une des pistes pour expliquer ces problèmes de reproductibilité est l'étude des interactions entre les levures NS et *S. cerevisiae*, notamment les phénomènes de compétitions vis-à-vis des nutriments. Dans un moût, les principaux nutriments se retrouvent sous forme de sucres, lipides, minéraux, vitamines et d'azote assimilable. Cette dernière source a un rôle prépondérant dans le métabolisme des composés volatils, c'est pourquoi l'étude de la compétition nutritionnelle entre les levures NS et *S. cerevisiae* vis-à-vis de cette source pourrait être un élément de réponse pour expliquer les changements du profil aromatique lors de co-cultures.

D'une manière générale, une carence en azote assimilable peut conduire à une fermentation languissante (Alexandre and Charpentier, 1998). Or, en conditions de fermentation par des levures indigènes ou suite à l'inoculation d'une levure NS commerciale, une partie significative de l'azote assimilable peut être consommée par les levures NS. Par la suite, *S. cerevisiae* se retrouve donc en conditions de carence azotée et ne pourra pas consommer la totalité des sucres. L'identification des besoins en azote assimilable des levures NS s'avère donc essentielle afin de mieux maîtriser ce paramètre et de mettre au point une supplémentation azotée adaptée.

Outre l'utilisation des levures NS pour améliorer le profil aromatique des vins, ces microorganismes pourraient apporter une solution aux répercussions des problèmes liés au réchauffement climatique. En effet, l'année 2015 a été la plus chaude jamais enregistrée depuis 1880 et la tendance est à la hausse (NASA, 2015). Cette augmentation des températures a pour conséquence d'accélérer la phénologie de la vigne (Jones et al., 2005). Cependant il est nécessaire que le raisin soit à maturité

aromatique et phénolique pour le récolter mais en contrepartie la concentration en sucres sera accrue. Des recherches menées en Hongrie ont montré, sur une échelle de temps réduite, qu'entre 2010 et 2012 la concentration en sucre dans les moûts de Chardonnay sélectionnés pour l'étude avait augmenté de près de 50 g/L dans les cas extrêmes. Le sucre étant l'élément principal converti en éthanol par *S. cerevisiae*, la concentration en alcool dans les vins se retrouve donc augmentée et peut causer des problématiques aussi bien au niveau de la fermentation alcoolique elle-même (Rodrigues et al., 2006) ou en termes de santé publique, économiques ou organoleptiques (Gawel et al., 2007). Dans ce contexte, des recherches ont été entreprises afin de réduire la concentration en alcool dans les vins à l'aide des levures NS comme nouvelle alternative biologique comparée aux techniques déjà existantes (Contreras et al., 2014a, 2014b, 2015; Ciani et al., 2016).



## Introduction bibliographique

---

## 1. Rappel des différentes voies métaboliques pendant la fermentation alcoolique

Les levures comme de nombreux autres organismes sont des micro-organismes hétérotrophes et produisent leur énergie à partir du métabolisme du carbone. Dans ces conditions, les voies métaboliques d'anabolisme fonctionnent conjointement avec les voies métaboliques de catabolisme. Leur énergie chimique, sous forme d'ATP, résulte de l'oxydation de molécules organiques et est utilisée comme source d'énergie par la cellule. D'autre part, ces molécules organiques peuvent également fonctionner comme sources de carbone pour la biosynthèse. La diversité des biotopes des levures conduit à une vaste complexité métabolique, associée à la multiplicité des sources de carbone disponibles dans la nature incluant majoritairement des acides aminés et bien entendu des sucres.

### 1.1. La glycolyse

Suivant les conditions environnementales, l'assimilation du sucre peut se produire en milieu anaérobie ou aérobie. Dans le premier cas, les levures utiliseront la voie fermentaire alors qu'en présence d'oxygène et d'une concentration faible en sucre, elles utiliseront la respiration cellulaire. En effet, la concentration en sucre joue un rôle important dans le choix de la voie de métabolisation par la levure. Il est possible de différencier les levures en deux groupes : d'une part, les levures Crabtree-positives qui, en présence d'une forte concentration en sucre auront un métabolisme fermentaire même en condition aérobie et d'autre part, les levures Crabtree-négatives qui en présence d'une forte concentration en sucres ne rentreront pas dans un métabolisme fermentaire mais produiront uniquement du CO<sub>2</sub> et de la biomasse (Figure 1). C'est en 1929, dans son étude sur le métabolisme de cellules cancéreuses, qu'Herbert Grace Crabtree décrivit le premier ce phénomène (Crabtree, 1929).

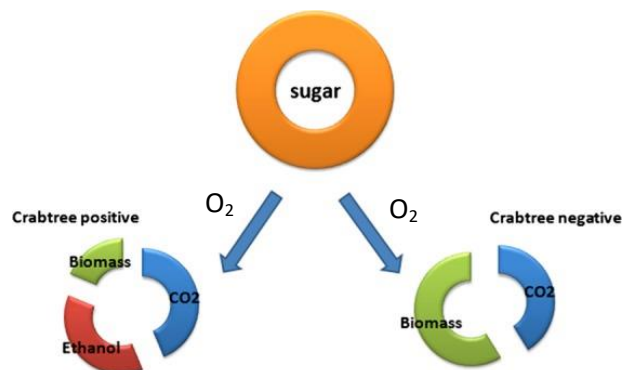


Figure 1 : Utilisation des sucres par les levures suivant leur profil Crabtree. Figure adaptée de (Dashko et al., 2014).

En vinification, les conditions de fermentation peuvent être considérées comme semi-anaérobies puisqu'une partie restreinte du moût est exposée à l'air. Cette exposition conduit alors à un transfert (qui reste restreint) de l'air dans le moût suivant la loi de Henry. Concernant la concentration en sucres, les taux retrouvés dans les moûts sont généralement supérieurs à 200 g/L. Cette forte concentration entraîne alors la levure à s'orienter vers un métabolisme fermentaire puisque *S. cerevisiae* est connue pour être Crabtree-positive. Le mécanisme d'assimilation des sucres le mieux décrit dans ces conditions l'est chez *S. cerevisiae*, la levure majoritaire lors de la fermentation alcoolique (Combina et al., 2005).

La première étape de la voie de la glycolyse consiste en la phosphorylation du glucose en glucose 6-phosphate par l'action des hexokinases 1 et 2 (Hxkp) et de la glucokinase 1 (Glkp). Puis, le glucose-6-phosphate est isomérisée par la glucose-6-phosphate isomérase, codée par le gène *PGI*, en fructose-6-phosphate. L'étape suivante, réalisée par la phosphofructokinase (Pfkp), nécessite de l'énergie, sous forme d'ATP, pour convertir le fructose-6-phosphate en fructose-1,6-ddiphosphate (Figure 2).

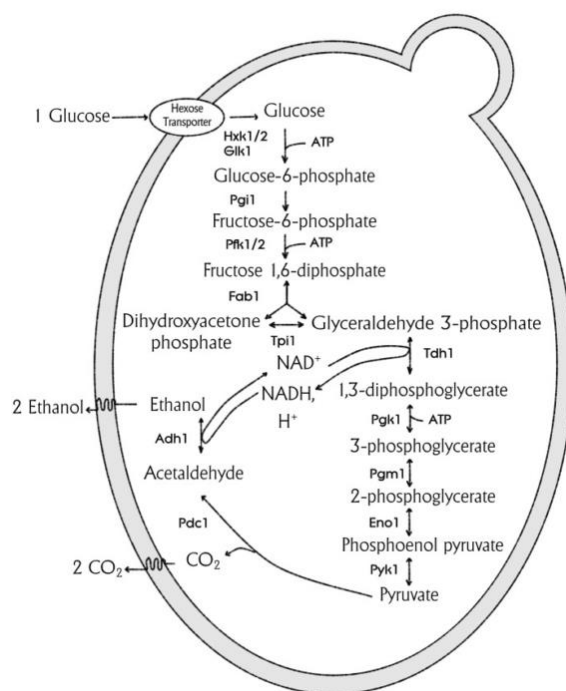


Figure 2 : Voie de la glycolyse en condition fermentaire chez *S. cerevisiae*. Figure de (Faria-oliveira et al., 2013).

L'Aldolase (fructose 1,6-ddisphosphate aldolase) catalyse le clivage du fructose 1,6-disphosphate en glycéraldéhyde 3-phosphate et en dihydroxyacétone phosphate. Ces deux composés peuvent être convertis l'un en l'autre de manière réversible par la triosephosphate isomérase (Tpi1). Par la suite, le glycéraldéhyde 3-phosphate donne le pyruvate par l'intermédiaire d'une série de réactions enzymatiques, tandis qu'une partie du dihydroxyacétone phosphate suit la gluconéogenèse. En

condition fermentaire, le pyruvate est décarboxylé pour donner de l'acétaldéhyde et du  $\text{CO}_2$ , par la pyruvate décarboxylase (Pdc1). Dans la réaction finale, catalysée par l'alcool déshydrogénase (Adhp), l'acétaldéhyde est réduit en donnant l'éthanol et en favorisant la réoxydation du NADH en  $\text{NAD}^+$ . En plus des 2 molécules de  $\text{CO}_2$  et d'éthanol formées par molécule de glucose, le sucre est incorporé dans la production d'autres sous-produits tels que la biomasse, les acides (pyruvique, acétaldéhyde, cétoglutarique, lactique) et le glycérol.

## 1.2. La voie des pentoses phosphates

En parallèle de la glycolyse, *S. cerevisiae* peut assimiler les sucres par une autre voie, la voie des pentoses phosphates. Cette voie joue un rôle important dans la régénération du NADPH, qui intervient principalement comme cofacteur d'oxydoréduction dans les processus anaboliques. La voie des pentoses phosphates peut se décomposer en deux parties. La partie oxydative aboutit à la synthèse du ribulose-5-phosphate et à la formation de deux NADPH et la partie non oxydative produit notamment deux éléments importants, le ribose 5-phosphate et l'érythrose 4-phosphate qui sont deux intermédiaires du métabolisme des nucléotides et des acides aminés aromatiques (Figure 3).

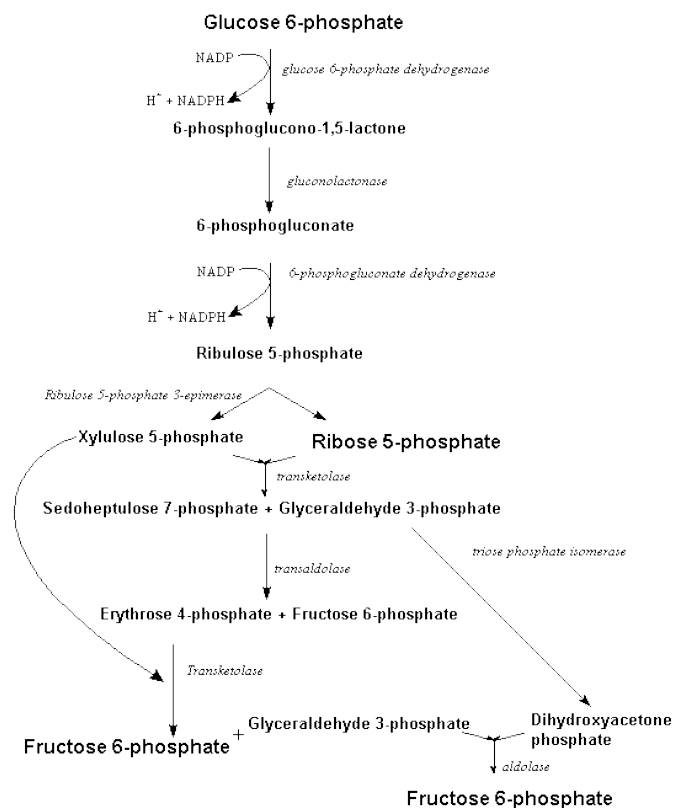


Figure 3 : Voie des pentoses phosphates chez *S. cerevisiae*. Graphique de (Jeppsson et al., 2002)

### 1.3. La phosphorylation oxydative

La phosphorylation oxydative mitochondriale est un réseau complexe et hautement contrôlé par lequel la synthèse de l'ATP est adaptée en continu aux changements de la demande en énergie de la cellule pour soutenir la croissance et/ou l'homéostasie. Au cours du métabolisme respiratoire, le NADH cytosolique et mitochondrial est réoxydé par la chaîne respiratoire (Figure 4). Comparée à d'autres espèces de levures, *S. cerevisiae* ne possède pas la multi-sous-unité du complexe I de la NADH déshydrogénase (Nosek and Fukuhara, 1994). Or, la protéine Ndufab1 impliquée dans ce complexe apparait surlignée en vert (constituants présents chez *S. cerevisiae*) sur la base de données KEGG. L'information sur cette protéine renvoie aux travaux de Goffeau et collaborateurs (1996) qui après une étude approfondie du génome de *S. cerevisiae* sembleraient montrer qu'il existait bien une protéine classée dans la multi-sous-unité du complexe I (Goffeau et al., 1996).

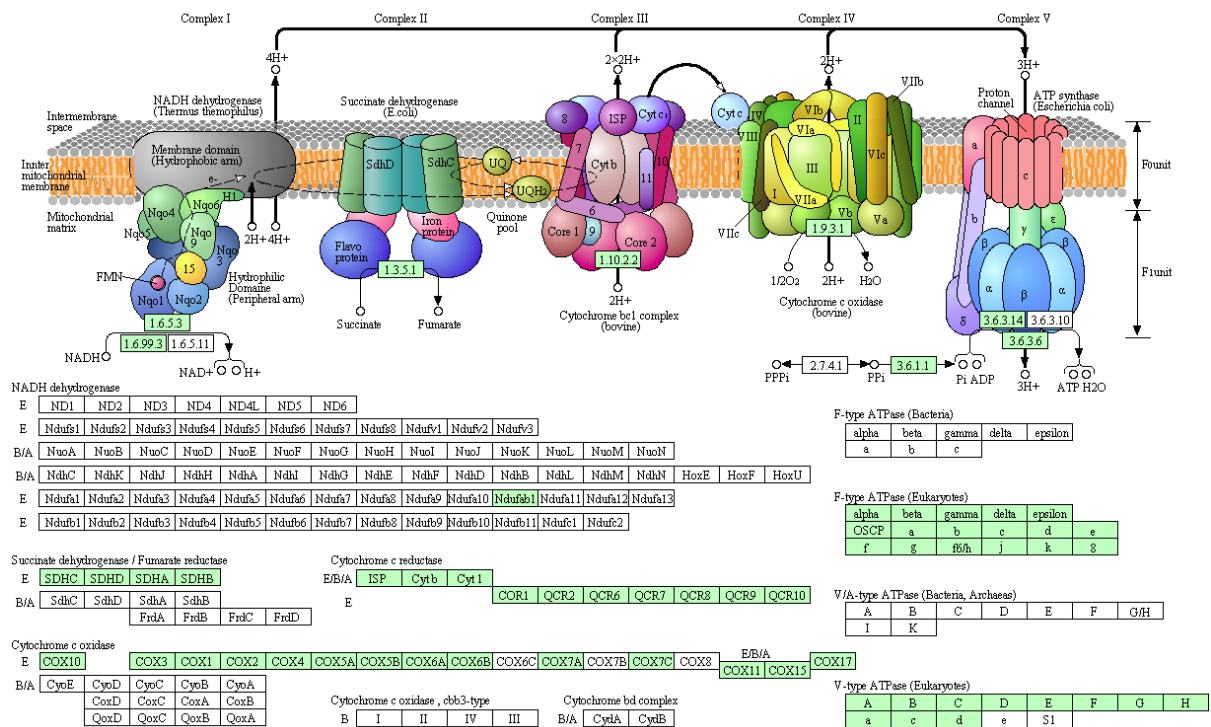


Figure 4 : Voie de la phosphorylation oxydative chez *S. cerevisiae*. Les constituants de la chaîne respiratoire présent chez *S. cerevisiae* sont surlignés en vert (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)).

Mis à part cette exception, *S. cerevisiae* ne possède pas de complexe I à proprement dit mais une seule sous-unité NADH : l'ubiquinone oxydoréductase qui associe l'oxydation du NADH intramitochondrial à la chaîne respiratoire. Cette enzyme catalyse le transfert de deux électrons du NADH intramitochondrial à l'ubiquinone (Yang et al., 2011). *S. cerevisiae* ne possède pas seulement une NADH déshydrogénase interne, mais aussi une activité NADH déshydrogénase mitochondriale externe (von Jagow and Klingenberg, 1970). L'origine de cette activité provient de la présence de

deux gènes chez *S. cerevisiae*, *NDE1* et *NDE2* codant les isoenzymes de la NADH déshydrogénase externe. Comme la NADH déshydrogénase interne, les isoenzymes externes ne pompent pas les protons (von Jagow and Klingenberg, 1970). Par conséquent, *S. cerevisiae* a une faible stœchiométrie lors de la production d'ATP pendant la phosphorylation oxydative. Malgré cette faible stœchiométrie de la phosphorylation oxydative, le catabolisme respiratoire complet d'une molécule de glucose produit environ 16 molécules d'ATP (quatre molécules d'ATP provenant de la phosphorylation au niveau du substrat, deux de la glycolyse, deux de la formation du GTP dans le cycle de Krebs et environ douze lors de la phosphorylation oxydative). Ce rendement est huit fois supérieur à celui obtenu pendant la fermentation alcoolique. Le rendement plus élevé en ATP des sucres par la respiration se reflète dans les rendements de biomasse. En effet, dans des conditions où les levures assimilent le glucose par voie respiratoire, la production de biomasse peut être jusqu'à cinq fois supérieure à celle obtenue en fermentation (Verduyn, 1991). Une autre particularité de la chaîne respiratoire de *S. cerevisiae* est que les complexes bc1 (III) et la cytochrome c oxydase (IV) forment un super-complexe (Schägger and Pfeiffer, 2000). Enfin, contrairement aux plantes et champignons, la chaîne respiratoire de *S. cerevisiae* ne possède pas d'oxydase alternative insensible au cyanure qui catalyse l'oxydation directe de l'ubiquinone par l'oxygène moléculaire sans générer de force protomotrice (Vanlerberghe and McIntosh, 1997). Ainsi, chez *S. cerevisiae*, le taux global de la phosphorylation oxydative est contrôlé à court terme en aval de l'ATP synthase par le renouvellement de l'ATP cytosolique. Mais ce taux est également contrôlé en amont de la chaîne respiratoire en réduisant la disponibilité et l'activation allostérique des déshydrogénases, puis par la perméabilité ionique de la membrane mitochondriale interne (Beauvoit et al., 1993).

#### 1.4. Balance Redox

Les cofacteurs pyridine-nucléotides  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  et  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  jouent un rôle central dans le métabolisme de la levure. Le NADH est préférentiellement utilisé dans le catabolisme, alors que le NADPH est généralement requis pour les réactions anaboliques (Van Dijken et al., 1986). Chez *S. cerevisiae* et probablement aussi chez les levures NS, le NADH et le NADPH ne peuvent pas être interconvertis en raison de l'absence d'une activité transhydrogénase (Bruinenberg et al., 1983). Or maintenir un équilibre redox est une condition indispensable pour les cellules pour conserver une activité métabolique et une croissance normale. Ainsi, sachant que les membranes biologiques sont imperméables aux pyridine-nucléotides, pour maintenir la balance redox, les coenzymes réduits doivent être réoxydés dans le compartiment dans lequel ils ont été produits.

Le NADPH cytosolique est produit dans la partie oxydante de la voie des pentoses phosphates, qui est connectée à la glycolyse au niveau du glucose 6-phosphate (Figure 5). Une étude de Minard et

collaborateurs (1998) a montré que cette voie n'était pas la seule impliquée dans la formation du NADPH. En effet, il a été mis en évidence qu'une activité isocitrate déshydrogénase dépendante du  $\text{NADP}^+$  et une activité acétaldéhyde déshydrogénase, dépendante aussi du  $\text{NADP}^+$ , pouvaient contribuer à la production de NADPH (Minard et al., 1998). Cependant, *S. cerevisiae* ne peut pas coupler directement l'oxydation du NADPH à la chaîne respiratoire (Bruinenberg, 1986) ce qui a pour conséquence de ne pas pouvoir oxyder directement l'excès de NADPH cytosolique. Ainsi, la voie des pentoses phosphates, qui produit le NADPH requis pour la biosynthèse, ne peut pas fonctionner comme voie dissimilatrice chez *S. cerevisiae*.

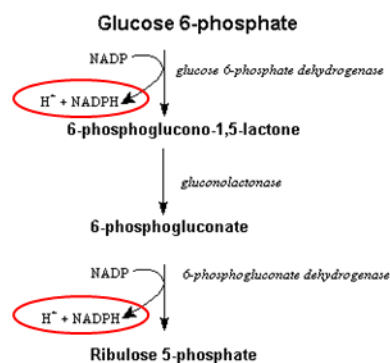


Figure 5 : Formation du NADPH dans la partie oxydante de la voie des pentoses phosphates. Graphique modifié de (Jeppsson et al., 2002).

D'un autre côté, *S. cerevisiae* possède plusieurs mécanismes pour réoxyder le NADH (Bakker et al., 2001). Tout d'abord, la réduction du  $\text{NAD}^+$  se produit à la fois dans le cytosol par la glycolyse et dans les mitochondries par le complexe pyruvate déshydrogénase et les déshydrogénases du cycle de Krebs. Les deux pools de NADH peuvent être ensuite oxydés par la chaîne respiratoire mitochondriale avec l'oxygène comme accepteur final d'électron (Overkamp et al., 2000). En condition aérobie, plusieurs systèmes permettent de transmettre un NADH cytosolique excédentaire à la chaîne de transport d'électrons mitochondriale. Les deux principaux semblent être la NADH déshydrogénase externe formée de deux protéines, Nde1p et Nde2p, et la navette glycérol-3-phosphate (Figure 6).

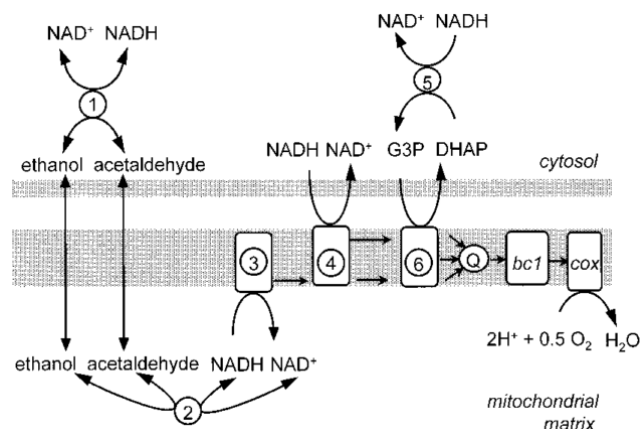


Figure 6 : Oxydation respiratoire du NADH cytosolique chez *S. cerevisiae* proposé par Luttik et collaborateurs (1998). Les chiffres indiquent les enzymes suivantes : 1 : alcool déshydrogénase cytosolique dépendant du  $\text{NAD}^+$ , 2 : alcool déshydrogénase mitochondriale dépendant du  $\text{NAD}^+$ , 3 : NADH déshydrogénase mitochondriale interne, 4 : NADH déshydrogénase mitochondriale externe, 5 : glycérol-3-phosphate déshydrogénase cytosolique dépendant du  $\text{NAD}^+$ , 6 : flavoprotéine mitochondriale de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (Luttik et al., 1998).

Etant donné que ces deux systèmes remplissent la même fonction physiologique, il est raisonnable de penser qu'il existe un système de régulation entre la NADH déshydrogénase externe et la navette glycérol-3-phosphate.

Tout d'abord, il a été démontré que le système de navette glycérol-3-phosphate qui implique la protéine Gut2p (Påhlman et al., 2001) est un système plus efficace dans des conditions pour lesquelles les sources nutritionnelles sont limitées. Dans ces conditions, ce système a un rapport ATP/Oxygène plus élevé par rapport à la NADH déshydrogénase externe. Cependant, dans des conditions non limitantes, la NADH déshydrogénase externe est cette fois-ci le système préférentiellement activé par la levure. Dans tous les cas, toutes les voies connues de l'oxydation respiratoire du NADH chez *S. cerevisiae* convergent vers le pool d'ubiquinone de la chaîne respiratoire.

D'autre part, des interactions cinétiques entre le complexe Nde1p/Nde2p et Gut2p ont été démontrées. En effet, la suppression de l'une ou de l'autre des déshydrogénases externes provoque une augmentation de l'efficacité de l'enzyme restante (Påhlman et al., 2001). Plus particulièrement, l'activation de la NADH déshydrogénase inhibe Gut2p, bien que cette inhibition ne soit pas une conséquence directe du NADH sur Gut2p (Påhlman et al., 2001). De plus, les travaux de Bunoust et collaborateurs (2005) ont mis en évidence que les électrons provenant de Nde1p sont prioritaires sur ceux provenant de Gut2p. Ainsi, ces travaux ont montré que l'organisation métabolique de la chaîne respiratoire implique une sélection et une priorité dans l'approvisionnement en électrons, en soulignant un nouveau mécanisme de régulation du métabolisme oxydatif de la levure (Bunoust et al., 2005).

Un autre point à prendre en compte au niveau de la régulation des deux systèmes de réoxydation du NADH est la répression catabolique par le glucose, particulièrement chez *S. cerevisiae*. Contrairement à ce que l'on pourrait penser, dans le cas de fortes concentrations en glucose, la respiration n'est que partiellement réprimée (Rosenfeld et al., 2003). Au niveau de la chaîne respiratoire, la répression catabolique par le glucose a pour effet d'inactiver Gut2p ce qui a pour conséquence de rendre la navette glycérol-3-phosphate non fonctionnelle (Sprague and Cronan, 1977). Dans ces conditions, l'équilibre redox cytosolique est maintenu par la formation d'éthanol et de glycérol.

Cependant, dans le cas d'une croissance aérobie à de faibles concentrations en glucose, la NADH déshydrogénase externe et la navette glycérol-3-phosphate semblent fonctionner simultanément même si l'activité de la NADH déshydrogénase apparaît plus importante.

### 1.5. La fermentation alcoolique

En condition pauvre en oxygène, afin de continuer à produire de l'énergie, la levure va adopter un métabolisme fermentaire. Selon la stœchiométrie de la fermentation alcoolique, deux molécules d'ATP sont produites par molécule de glucose converties en éthanol. Ce système permet de fournir assez d'énergie à la cellule pour maintenir sa viabilité cellulaire et sa croissance. De plus, la fermentation alcoolique est un processus neutre sur le plan redox puisque le NADH produit pendant l'oxydation du glycéraldéhyde 3-phosphate par la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase est ensuite réoxydé lors de la réduction de l'acétaldéhyde en éthanol par l'alcool déshydrogénase. Contrairement aux conditions aérobies, l'absence d'oxygène ne permet pas l'oxydation des cofacteurs pyridine-nucléotides réduits dans la chaîne respiratoire. Pour conserver un équilibre redox en conditions anaérobies lors de la croissance, une partie du catabolisme du glucose est dirigé vers la production de glycérol. En plus de permettre de conserver un équilibre redox, cette molécule joue le rôle d'osmorégulateur dans des conditions de stress hyperosmotiques. Le glycérol est produit par la réduction du dihydroxyacetone phosphate en glycérol 3-phosphate suivi par une déphosphorylation du glycérol 3-phosphate en glycérol. La première étape est catalysée par la déshydrogénase 3-phosphate dépendante du  $\text{NAD}^+$  (codé par deux gènes, *GPD1* et *GPD2*) (Larsson et al., 1993; Eriksson et al., 1995). La seconde étape est quant à elle catalysée par la glycérol 3-phosphatase (codée par *GPP1* et *GPP2*) (Costenoble et al., 2000). Lorsque *S. cerevisiae* a des besoins élevés de réoxyder du NADH, une forte induction des gènes *GPD2* et *GPP1* est observée. Il a été montré que l'induction de *GPP1* jouait un rôle décisif dans le cas de taux de croissances élevés. A l'inverse, lors de faible demande de réoxydation du NADH lors de la formation du glycérol, les gènes *GPD1*, *GPD2*, *GPP1* et *GPP2* sont tous exprimés à des niveaux basaux (Figure 7).

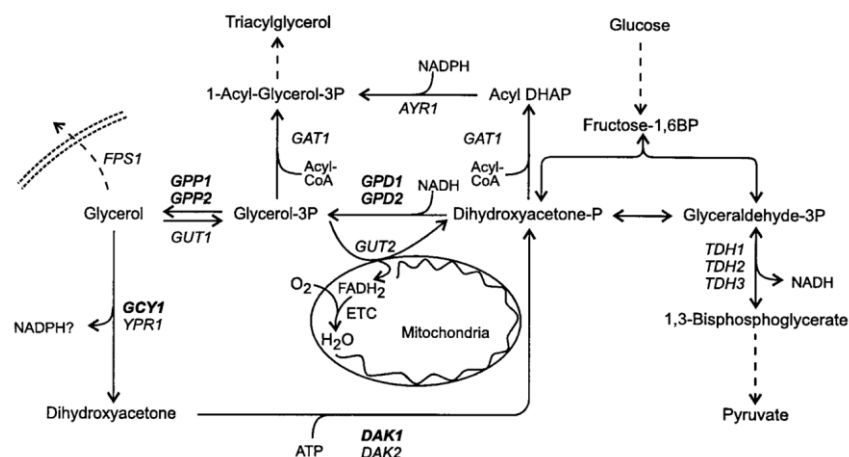


Figure 7 : Réactions connectées au dihydroxyacetone phosphate chez *S. cerevisiae*. Les gènes sont indiqués en italiques : *AYR1* : 1-acyldihydroxyacetone-phosphate reductase, *DAK1/DAK2* : dihydroxyacetone kinase, *FPS1* : facilitateur du transport du glycérol, *GAT1* : glycerol-3-phosphate acyltransferase et dihydroxyacetone phosphate acyltransferase, *GCY1/YPR1* :  $\text{NADP}^+$ -glycérol déshydrogénase, *GPD1/GPD2* : glycérol-3-phosphate déshydrogénase, *GPP1/GPP2* : glycérol-3-phosphatase, *GUT1* : glycérol kinase, *GUT2* : glycérol-3-phosphate déshydrogénase mitochondriale, *TDH1/TDH2/TDH3* : glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase. ETC : Chaîne de transport des électrons (Costenoble et al., 2000).

Plus précisément, les deux enzymes codées par *GPD1* et *GPD2* peuvent se substituer l'une à l'autre en fonction des conditions de cultures (Ansell et al., 1997). Néanmoins, la délétion de *GPD1* et *GPD2* rend les cellules incapables de croître en condition anaérobie (Ansell et al., 1997). La délétion du gène *GPD2* seul entraîne la diminution de la production de glycérol sans affecter significativement la production d'éthanol (Björkqvist et al., 1997). En conditions anaérobies, les mutants  $\Delta gpd2$  diminuent de 40% leur rendement de production de glycérol et augmentent de 8% leur rendement de production d'éthanol, comparé à la souche sauvage (Valadi et al., 1998). La délétion du gène *GPD1* seul ne cause pas de modification significative par rapport au phénotype de la souche sauvage, excepté pour la production d'acétate pour laquelle une réduction a été observée (Björkqvist et al., 1997; Valadi et al., 1998). Cependant, en condition de vinification avec des fortes concentrations en glucose, le mutant  $\Delta gpd1$  diminue de 50% son rendement en glycérol et augmente de 5% son rendement en éthanol (Michnick et al., 1997).

Les conditions de culture rencontrées en vinification vont également influencer le cycle de Krebs. En effet, dans ces conditions, le cycle de Krebs ne fonctionne pas comme un cycle en tant que tel, mais plutôt comme deux voies métaboliques (Gombert and Moreira, 2001). En conservant cette activité, la cellule peut ainsi produire certains éléments essentiels à sa croissance. Ces éléments sont l'oxaloacétate, le 2-oxoglutarate, les précurseurs de l'aspartate et le glutamate (Figure 8). Or, en condition d'anaérobiose ou de répression catabolique par le glucose, la succinate déshydrogénase n'est pas fonctionnelle (Camarasa et al., 2003). Par conséquent, la division du flux de carbone dans le cycle de Krebs entraîne la formation d'une branche oxydante conduisant à la formation du 2-oxoglutarate (Nuñez de castro et al., 1970) et d'une branche réductrice qui aboutit à la formation du

fumarate avec pour enzyme clé la fumarate réductase (Arikawa et al., 1998). Cette dernière réaction joue un rôle particulièrement important dans la réoxydation du NADH intracellulaire puisque des mutants ne possédant pas les gènes *FRDS* et *OSM1* (codant la fumarate réductase) sont incapables de croître en condition anaérobie. Ces mêmes mutants mis en présence de la forme oxydée du bleu de méthylène ou de méthosulfate de phénazine (qui vont permettre d'oxyder non enzymatiquement le NADH en NAD<sup>+</sup>) retrouvent une activité normale de croissance, ce qui prouve bien le rôle essentiel de cette enzyme (Enomoto et al., 2002). La synthèse des précurseurs impliqués dans la formation de biomasse entraîne la formation d'une grande quantité de NADH mitochondriale. Afin d'oxyder ce NADH produit, les navettes ADH1/ADH3 et la branche réductrice du cycle de Krebs sont deux voies possibles. Il a été montré que la navette ADH1/ADH3 est responsable de la régénération du NAD<sup>+</sup> alors que la branche réductrice est associée à la production de succinate (Nissen et al., 1997).

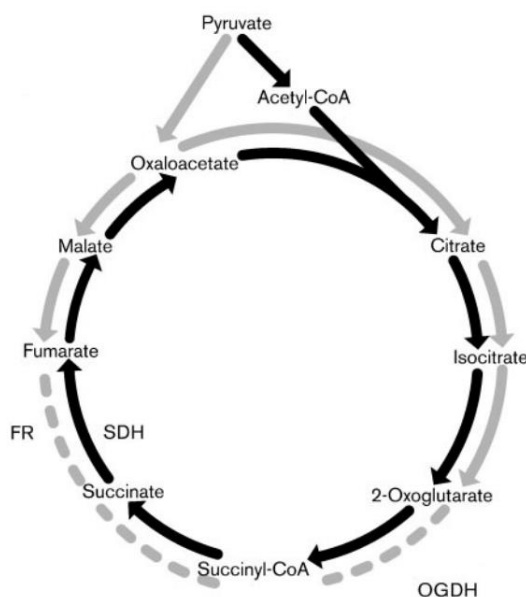


Figure 8 : Cycle de Krebs pendant la respiration et la fermentation. Flèches noires : Fonctionnement du cycle de Krebs pendant la respiration. Flèches grises pleines : Le cycle de Krebs fonctionne comme une branche oxydative et une branche réductrice en condition fermentaire. Ligne grise en pointillés : points d'interruption du cycle de Krebs en condition fermentaire. FR, fumarate réductase; SDH, complexe SDH; OGDH, complexe OGDH (Camarasa et al., 2003).

## 1.6. La biosynthèse des acides gras et de l'ergostérol chez *S. cerevisiae*

### 1.6.1. Les acides gras

Le spectre des acides gras dans la levure est principalement constitué d'acides gras en C<sub>16</sub> et C<sub>18</sub>. En règle générale, 80% des acides gras chez la levure sont monoinsaturés *via* une réaction catalysée par la  $\Delta^9$  désaturase Ole1p. Les acides gras en C<sub>14</sub> et C<sub>26</sub> constituent la part restante et jouent des fonctions importantes dans la modification des protéines ou en tant que composants des sphingolipides.

Dans une première étape, l'acétyl-CoA est carboxylé par addition de CO<sub>2</sub> à du malonyl-CoA. Cette réaction est catalysée *via* l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) codée par les gènes *ACC1* et *HFA1*. La biotine est un cofacteur essentiel dans cette réaction et est liée de manière covalente à l'apoprotéine ACC par une apoprotéine ligase codée par *BPL1* (Cronan and Wallace, 1995). Ainsi, l'ACC chez la levure est une enzyme trifonctionnelle contenant un domaine « protein carrier » biotine-carboxyle, un domaine biotine-carboxylase et un domaine carboxyle-transférase. Le malonyl-CoA produit par l'ACC sert de donneur à deux carbones dans une série de réactions cycliques catalysées par la synthase d'acide gras et des élongases.

Plus précisément, la synthase cytosolique d'acides gras chez la levure (Figure 9) est composée de deux sous-unités, Fas1p (sous-unité  $\beta$ ) et Fas2p (sous-unité  $\alpha$ ) organisées en un complexe hexamérique  $\alpha_6\beta_6$  (Schweizer and Hofmann, 2004). Selon ce schéma, l'acétate est transféré de CoA à SHp dans un processus en trois étapes avec le groupe hydroxyle acétyl-transacylase et le groupe thiol ACP (SHc) comme sites d'acétylation transitoires. À l'exception de l'acétate, le malonate est exclu de SHp et exclusivement destiné à SHc. Ensuite, les thioesters d'acétyl-SHp et de malonyl-SHc se condensent en acétoacétate lié à une enzyme, amorçant ainsi le cycle d'élongation.

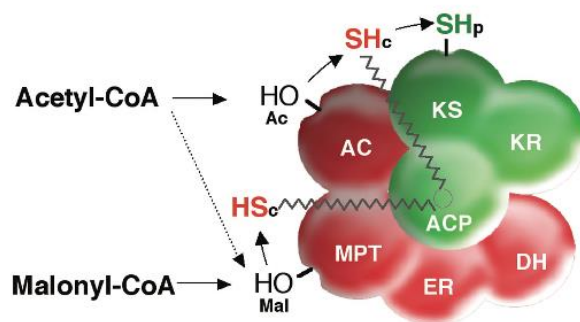


Figure 9 : Sites de liaison acyle et réactions de transacylation interdomaine dans la FAS chez *S. cerevisiae*. Les sous-unités  $\alpha$  (vert) et  $\beta$  (rouge) sont marquées par des couleurs différentes. Les domaines fonctionnels sont disposés en fonction de la séquence de réaction. La ligne en zigzag indique le « bras oscillant » de la phosphopantéthine liée à « l'acyl carrier protein » (ACP). Abréviations : AC : ac(et)yltransférase, KS : cétoacyl synthase, KR : cétoacyl réductase, DH : déshydratase, ER : enoyl réductase, MPT : malonyl palmitoyl-transacylase (Schweizer and Hofmann, 2004).

*S. cerevisiae* peut utiliser différents acides gras saturés à longue chaîne comprenant l'acide myristique (C14 : 0) et palmitique (C16 : 0) comme seule source de carbone. A propos des acides gras à chaîne moyenne, comme l'acide laurique (C12 : 0) ou l'acide octanoïque (C8 : 0), ils sont également métabolisables mais apparaissent cytotoxiques lorsqu'ils sont utilisés comme seule source de carbone. En plus des acides gras saturés, *S. cerevisiae* peut également utiliser des acides gras insaturés comprenant l'acide oléique (C18 : 1, *cis*-9), l'acide pétrosélinique (C18 : 1, *cis*-6), l'acide linoléique (C18 : 2, *cis* -9,12), l'acide linoléinique (C18 : 3, *cis*-9,12, 15), l'acide arachidonique (C20 : 4, *cis*-5,8,11,14), l'acide eicosapenténoïque (C20 : 5, *cis* -5,8,11,14,17) et l'acide docosahexa-énoïque

(C22 : 6, *cis*-4,7,10, 13,16,19) comme seule source de carbone. De plus, certains acides gras préexistants dans la levure peuvent être modifiés par désaturation, élongation et hydroxylation. La mono-insaturation des acides gras est catalysée par une seule désaturase, Ole1p. L'élongation des acides gras est réalisée en introduisant du malonyl-CoA sous forme d'unité C-2 dans des acides gras préexistants. Cette réaction est catalysée par la protéine Elo1p. Par la suite, deux gènes structurellement liés à ELO1, à savoir ELO2 et ELO3, ont été identifiés. Ces gènes codent des composants du système d'élongation des acides gras à très longue chaîne (C-24 et C-26). L'alpha-hydroxylation des acides gras est catalysée par Scs7p et l'hydroxylation des longues chaînes par Sur2p (Daum et al., 1998).

### 1.6.2. L'ergostérol

L'ergostérol est un autre composant important de la membrane cellulaire chez la levure. Il stabilise sa structure en se liant aux phospholipides, régule sa fluidité, sa perméabilité, ses activités enzymatiques et le transport de certains composés (Dupont et al., 2012). L'ergostérol peut également impacter l'absorption et l'utilisation des nutriments en régulant les activités ATPases et l'efficacité du transport des phospholipases en affectant la mobilité de la membrane cellulaire (Zhang et al., 2010). L'ergostérol peut être stocké dans des gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme sous forme d'ester stérylique, qui peut servir de pool de stérols pour maintenir l'équilibre des stérols intracellulaires (Choudhary and Schneiter, 2012). L'ergostérol joue également un rôle essentiel dans l'adaptation au stress pendant la fermentation. Il a été démontré que la capacité de la levure à tolérer le stress est étroitement liée aux niveaux d'ergostérol. Ainsi, *S. cerevisiae* peut augmenter la teneur en ergostérol de sa membrane cellulaire pour réparer les dommages et maintenir une perméabilité normale (Aguilera et al., 2006).

La voie de biosynthèse de l'ergostérol consomme une quantité d'énergie importante. Chez la levure, la biosynthèse d'une molécule d'ergostérol nécessite la consommation d'au moins 24 molécules d'ATP et de 16 molécules de NADPH. Selon les caractéristiques des produits intermédiaires, la voie de biosynthèse peut être divisée en trois modules, à savoir la biosynthèse du mévalonate, la biosynthèse du farnésyl-PP et la biosynthèse de l'ergostérol (Figure 10).

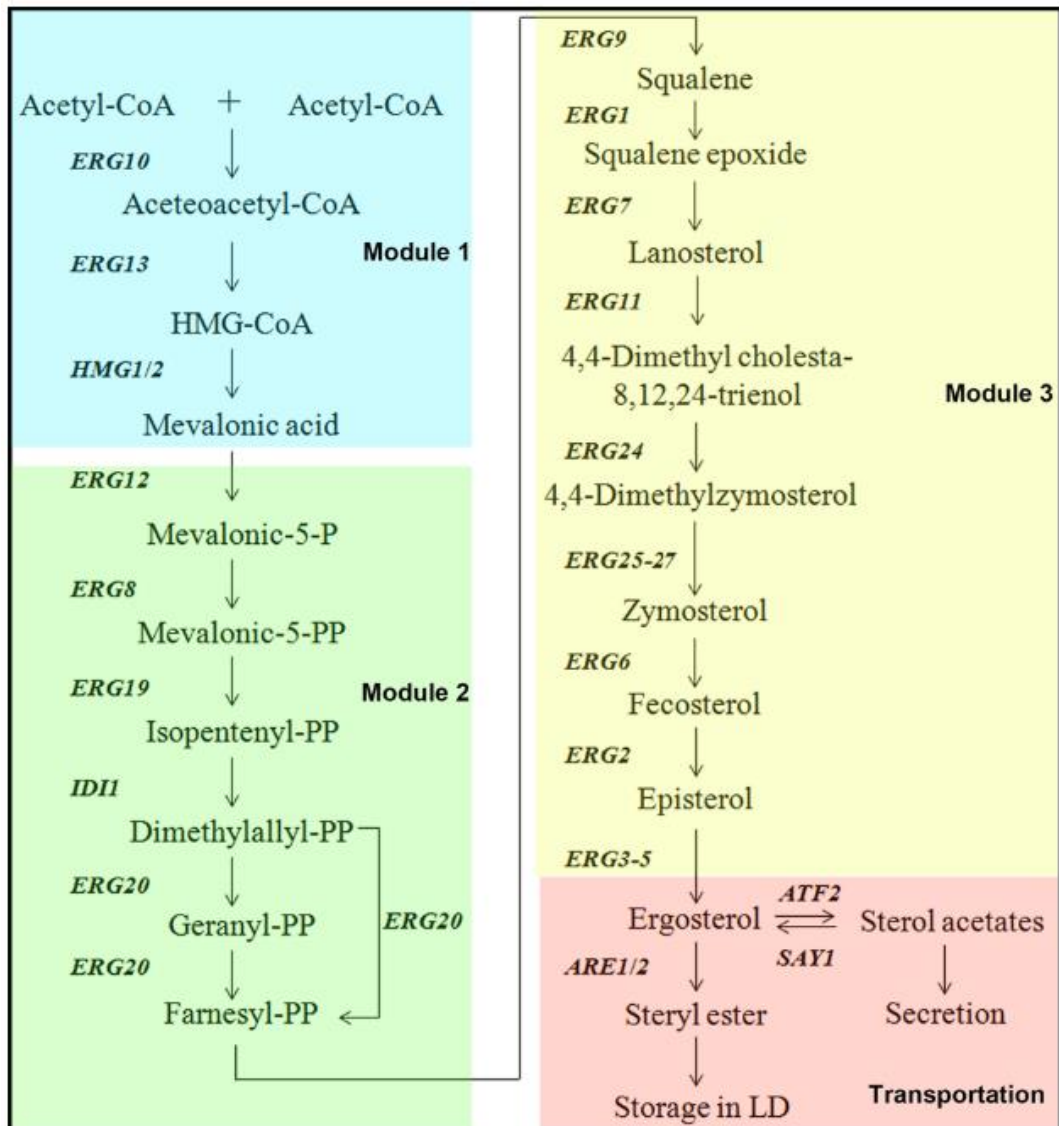


Figure 10 : Voie de biosynthèse de l'ergostérol chez *S. cerevisiae*. Figure d'après Hu et al., (2017)

Le processus de biosynthèse de l'ergostérol (et des stérols en général) nécessite de l'oxygène. En condition anaérobie la levure ne pouvant pas synthétiser l'ergostérol et les stérols, ceux-ci vont être directement assimilés dans l'environnement de culture. Dans ces conditions, il a été montré que les facteurs de transcription Ecm22p et Upc2p peuvent se lier à la région promotrice des gènes de biosynthèse des stérols (également connue sous le nom d'élément régulateur stérol, SRE) pour favoriser leur expression (Davies and Rine, 2006). Upc2p peut également induire l'expression du transporteur de liaison à l'ATP, *AUS1* et *PDR11*, favorisant l'absorption des stérols de l'environnement par la levure. D'autres facteurs environnementaux, comme l'oxydation, la concentration en éthanol et la disponibilité en fer, peuvent avoir une incidence sur la biosynthèse de l'ergostérol (Shakoury-Elizeh et al., 2010). Cependant, lorsque la concentration en oxygène est

suffisante, les cellules utilisent majoritairement l'ergostérol qu'elles biosynthétisent (Dhingra and Cramer, 2017).

## 1.7. La $\beta$ -oxydation des acides gras

Outre l'implication de l'oxygène dans la chaîne respiratoire, l'oxygène va également intervenir dans le métabolisme des acides gras. *S. cerevisiae* est capable de dégrader à la fois les acides gras saturés et insaturés (Dommes et al., 1981). Contrairement aux eucaryotes supérieurs chez lesquels la  $\beta$ -oxydation comprend une partie mitochondriale, chez la levure, la  $\beta$ -oxydation est restreinte au peroxysome (Kunau et al., 1995).

La  $\beta$ -oxydation chez *S. cerevisiae* (Figure 11) implique qu'un premier acide gras soit activé puis transformé en un ester lié au Coenzyme A (CoA). Il subit ensuite une déshydrogénation, une hydratation, une nouvelle déshydrogénation et enfin un clivage thiolitique. Toutes ces réactions suivent un processus plus ou moins complexe. La première étape de la  $\beta$ -oxydation qui est l'activation de l'acide gras, introduit une double liaison entre les atomes de carbone  $\alpha$  et  $\beta$ . Chez *S. cerevisiae*, une seule acyl-CoA oxydase (Fox1p ou Pox1p) a été identifiée permettant cette réaction (Dmochowska et al., 1990). A cette étape, du peroxyde d'hydrogène est formé puis celui-ci est décomposé en  $H_2O$  et  $O_2$  par la catalase Cta1p.

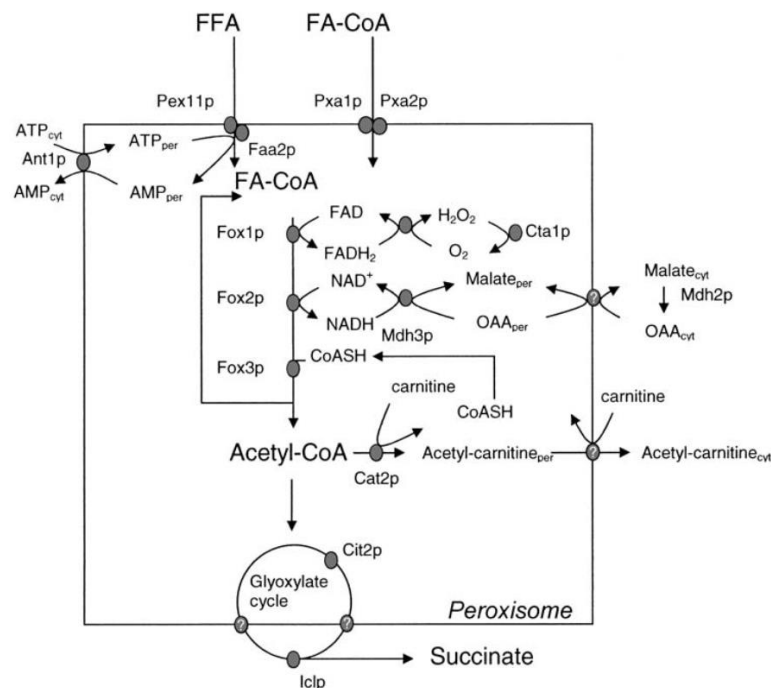


Figure 11 : Transport des métabolites à travers la membrane peroxysomale lors de l'oxydation des acides gras. Graphique de Van Roermund et al., (2003).

La seconde et la troisième réaction de la  $\beta$ -oxydation sont catalysées par un complexe enzymatique comprenant à la fois une activité 2-énoyl-CoA hydratase et une activité 3-hydroxyacyl-CoA ce qui entraîne la génération de 3-cétoacyl-CoA à partir du trans-2-énoyl-CoA avec comme intermédiaire le 3-hydroxyacyl-CoA. Fox2p est une enzyme multifonctionnelle qui possède des activités 2-énoyl-CoA hydratase-2, 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase et 3-hydroxyacyl-CoA épimérase, dont la dernière activité a été décrite pour convertir le 3-hydroxy-CoA en 3-hydroxyacyl-CoA et inversement (Poirier et al., 2006).

La réaction finale de la voie de la  $\beta$ -oxydation chez *S. cerevisiae* est catalysée par une seule enzyme, la thiolase 3-cétoacyl-CoA (Fox3p) (Igual et al., 1991). Cette enzyme clive les esters de 3-cétoacyl-CoA en acyl-CoA et acétyl-CoA. L'expression de cette thiolase est induite par la présence des acides gras (Einerhand et al., 1991).

*S. cerevisiae* peut utiliser aussi bien les acides gras insaturés *trans* que *cis* comme seule source de carbone. Précisément, les acides saturés et insaturés avec une double liaison *trans* en position paire sont des substrats directs pour la  $\beta$ -oxydation classique. Mais les acides gras insaturés *trans* et *cis* avec une double liaison en position impaire nécessitent la participation d'enzymes supplémentaires. Ces enzymes comprennent entre autre les  $\Delta^{3,5}$ ,  $\Delta^{2,4}$  dienoyl-CoA isomérase (Dci1p), 2,4-dienoyl-CoA reductase (Sps19p) (Gurvitz et al., 1997) et  $\Delta^3$ ,  $\Delta^2$  enoyl-CoA isomérase (Eci1p) (Geisbrecht et al., 1998). Trois voies différentes peuvent être distinguées (Figure 12). La première fait intervenir les acides gras avec des liaisons insaturées en position paire. Le 2,4-dienoyl-CoA est alors oxydé en trans-2-énoyl-CoA par l'action séquentielle de la 2,4-dienoyl-CoA reductase et de la  $\Delta^3$ ,  $\Delta^2$ - enoyl-CoA isomérase. Les acides gras avec des liaisons insaturées en positions impaires peuvent suivre deux voies différentes. La première implique la conversion du 2,5-dienoyl-CoA en trans-2-énoyl-CoA par l'action séquentielle de Fox2p, Fox3p et de la  $\Delta^3$ ,  $\Delta^2$  enoyl-CoA isomérase. La seconde est une voie NADPH-dépendante et le 2,5-dienoyl-CoA est transformé, par l'action séquentielle des  $\Delta^3$ ,  $\Delta^2$  enoyl-CoA isomérase,  $\Delta^{3,5}$ ,  $\Delta^{2,4}$  dienoyl-CoA isomérase, 2,4-dienoyl-CoA réductase et une nouvelle fois de la  $\Delta^3$ ,  $\Delta^2$  enoyl-CoA isomérase, en trans-2-énoyl-CoA.

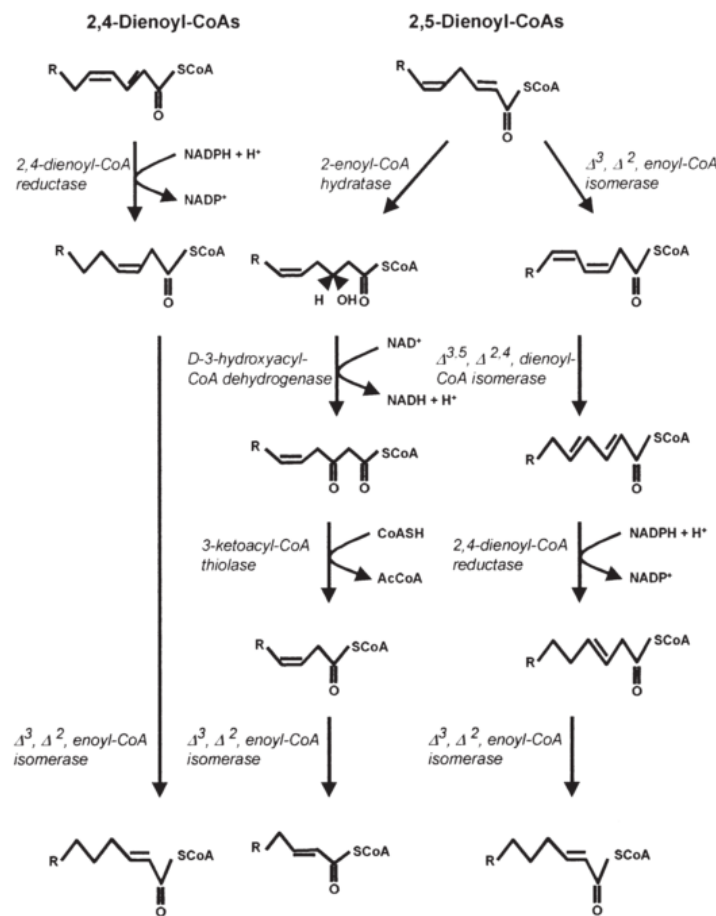


Figure 12 : Oxydation des acides gras insaturés chez *S. cerevisiae* (Van Roermund et al., 2003).

## 2. L'azote et la fermentation alcoolique

### 2.1. Le rôle de l'azote

Les composés azotés organiques assimilables par les levures (YAN) peuvent être métabolisés pour être dirigés vers trois destinations différentes.

Dans le premier cas, les composés azotés peuvent être directement incorporés dans la levure sans modification cellulaire par exemple lors de la synthèse protéique. Ce point peut cependant être discutable car il a également été montré que les acides aminés incorporés pouvaient être impliqués dans un système de réactions de transamination avant d'être engagés dans la synthèse protéique (Jones et al., 1964). Dans un second cas, une partie des composés azotés dégradés par la levure vont être utilisés pour la synthèse d'acides aminés et des bases puriques et pyrimidiques (Spencer and Larue, 1968). Enfin, l'autre partie des composés azotés va intervenir dans la synthèse des composés aromatiques comprenant les alcools supérieurs et les esters même si ce sujet reste discutable et sera

abordé dans la suite de ce manuscrit. . Dans le moût, il est possible de retrouver plusieurs sources d'azote mais les deux sources majoritaires assimilables par *S. cerevisiae* sont les acides aminés et l'ammonium. Bien entendu leurs concentrations vont varier naturellement en fonction de la localisation géographique, du climat, du cépage et des techniques de viticulture (Spayd et al., 1994).

Outre les aspects moléculaires, la demande en azote varie en fonction des souches de levures, de la teneur en sucre et des conditions de fermentation. En effet, la carence en azote assimilable dans les moûts va avoir pour conséquence de diminuer la croissance cellulaire, voire la stopper, limitant ainsi l'assimilation des sucres et entraînant des fermentations dites languissantes (Alexandre and Charpentier, 1998). Pour pallier ce problème, en cas de moûts carencés, l'ajout d'azote sous forme de sels d'ammonium ou de sources aminées est généralement utilisé. Néanmoins il est important de noter que la maîtrise de cet ajout est indispensable puisque les sources azotées interviennent dans le métabolisme des molécules aromatiques. .

## 2.2. Transport et régulation de l'azote assimilable

### 2.2.1. Les acides aminés

Le transport des acides aminés est assuré par des perméases situées sur la membrane plasmique des levures. Leur assimilation dépend de systèmes (largement décrits chez *S. cerevisiae*) qui permet de réguler cette assimilation à plusieurs niveaux.

- **Les perméases**

La consommation des acides aminés est prédéterminée par l'aptitude de la levure à les transporter à travers la membrane plasmique. Or, il existe 22 acides aminés protéinogènes et face à cette diversité, le transport est assuré par plusieurs protéines enzymatiques plus ou moins spécifiques vis-à-vis des acides aminés. Toutes les protéines impliquées dans le transport des acides aminés sont des perméases de type symport actif. Dans ce type de transport, l'acide aminé est acheminé dans la cellule conjointement avec un proton (Horák, 1997). Dès lors, la concentration en protons va augmenter, ce qui aura pour incidence de diminuer le pH. Pour rééquilibrer le gradient de concentration, *S. cerevisiae* possède un mécanisme d'expulsion des protons vers le milieu extracellulaire. Ce système fait intervenir une autre enzyme de type ATPase. Cette protéine a besoin d'énergie sous forme d'Adénosine Tri-Phosphate (ATP) pour transporter le flux de protons vers le milieu extracellulaire (Figure 13) (Koty, 1994).

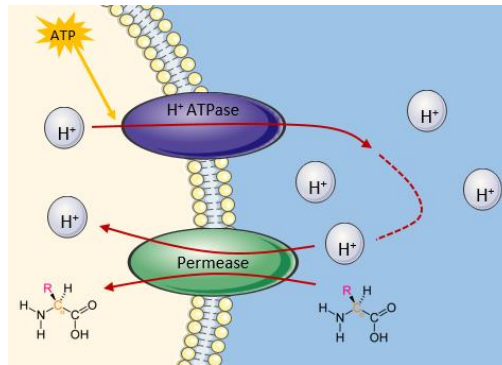


Figure 13 : Mécanisme d'assimilation des acides aminés chez *S. cerevisiae*. Figure modifiée de Casal et al., (2008)

- **Le système Ssy1p-Ptr3p-Ssy5p (SPS)**

*S. cerevisiae* possède donc plusieurs perméases ayant plus ou moins d'affinité avec les acides aminés. Le premier niveau de régulation se situe au niveau des récepteurs de la membrane plasmique. Un système d'activation spécifique de l'expression des perméases désigné sous le nom de SPS a été identifié chez *S. cerevisiae* (Ljungdahl, 2009). En l'absence d'acides aminés inducteurs (Figure 14A), le capteur SPS est dans sa conformation de pré-activation (rouge). Les facteurs de transcription Stp1 et Stp2 (motifs de liaison à l'ADN, boîtes vertes) sont synthétisés sous forme de précurseurs inactifs qui se localisent dans le cytosol en raison de la présence de domaines de rétention cytoplasmique N-terminal (Andréasson and Ljungdahl, 2004). La présence du complexe Asi (Asi1-Asi2-Asi3) au niveau de la membrane nucléaire permet d'ajouter un deuxième niveau d'inhibition. En effet, une faible quantité des facteurs de transcription Stp1 et Stp2 peuvent tout de même passer à travers la membrane nucléaire. Mais le complexe Stp1/Stp2 possède toujours le domaine d'ancrage cytoplasmique qui va être détecté par le complexe Asi situé dans la membrane nucléaire interne, ce qui aura pour effet de bloquer la fixation du complexe Stp1/Stp2 à la séquence d'activation cible ou *upstream activating sequences* (UAS<sub>aa</sub>) présent dans le promoteur régulé par le système SPS. Ensemble, ces éléments de régulation garantissent de faibles niveaux d'expression génique des perméases impliquées dans le transport des acides aminés (AAP).

En présence d'acides aminés extracellulaires (Figure 14B), le capteur SPS est activé (vert), ce qui libère l'activité protéolytique intrinsèque de Ssy5, conduisant au clivage du domaine d'ancrage cytoplasmique de Stp1/Stp2 (ciseaux). Sous cette forme plus courte, le complexe cible efficacement le noyau où il se lie à la séquence UAS<sub>aa</sub> et active la transcription. Enfin, les AAPs sont insérées co-traductionnellement dans la membrane du réticulum endoplasmique qui est accolée à la membrane nucléaire externe. La migration des AAPs vers la membrane plasmique (représentée par la flèche en pointillés) nécessite l'intervention de la chaperonne Shr3, localisée dans la membrane du réticulum

endoplasmique. En l'absence de Shr3, les AAPs et Ssy1 forment des agrégats et s'accumulent dans la membrane du réticulum endoplasmique.

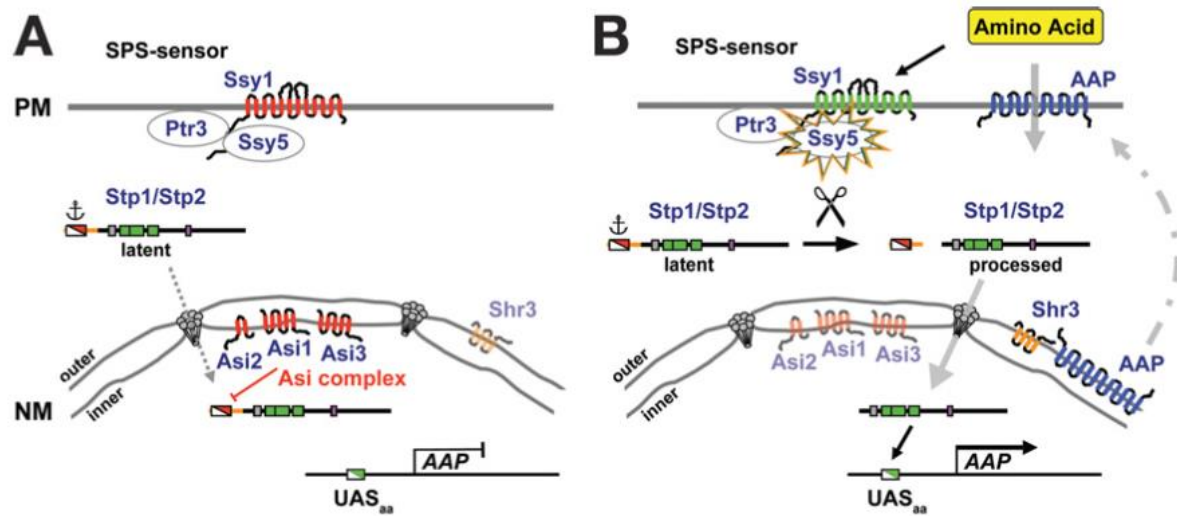


Figure 14 : Voie de détection SPS des acides aminés chez *S. cerevisiae*. A) En l'absence d'acides aminés la transcription des gènes codant les perméases est inhibée, le niveau de perméases sur la membrane plasmique est très faible. B) La présence d'acides aminés permet de lever l'inhibition de la transcription des perméases, la concentration des perméases sur la membrane plasmique augmente (Ljungdahl, 2009).

- **Le système de répression catabolique de l'azote (NCR)**

Afin de mieux appréhender leur diversité, il est possible de regrouper ces transporteurs en deux catégories : les systèmes permettant le transport de tous les acides aminés et les systèmes étant spécifiques d'un acide aminé ou d'un groupe d'acides aminés (Annexe 1 et Annexe 2). De plus, il est possible de rajouter un niveau de classification en prenant en compte la régulation des transporteurs par la qualité de la source d'azote. Aussi, un ensemble de systèmes de transport d'acides aminés impliquant les transporteurs Can1, Gap1, Put4, Uga4 et probablement Gln1 et Gup2 chez *S. cerevisiae* est fortement régulé par la qualité de la source d'azote, alors que les autres sont considérés comme constitutifs (Grenson, 1992). Il a été montré que les régulations s'exerçaient à deux niveaux, à savoir transcriptionnels et post-transcriptionnels. Au niveau des régulations transcriptionnelles, le système de répression catabolique de l'azote ou « *nitrogen catabolite repression* » (NCR) est le système prédominant.

Ce système permet à la levure d'utiliser sélectivement des sources préférées d'azote lorsqu'elles sont disponibles. A l'inverse, en l'absence d'une source préférée d'azote, la dérégulation générale des gènes régulés par le système NCR permet à la cellule de récupérer indifféremment d'autres sources d'azote. La classification des sources d'azote n'est pas absolue et leurs effets répressifs peuvent varier de manière significative entre différentes souches au sein d'une même espèce de levure (Magasanik and Kaiser, 2002). L'expression des gènes codant pour les AAPs sensibles au système NCR

est régulée par des circuits complexes impliquant plusieurs facteurs de transcription ayant des effets d'activation ou d'inhibition. La cible de ces facteurs de transcription est la séquence d'activation UAS<sub>NTR</sub> située en amont du promoteur des gènes codant les AAPs sensibles au système NCR. Cet élément se compose principalement de deux sites dodécanucléotidiques distincts avec une séquence consensus pentanucleotidique 5'-GATATA-3'. Un couple protéique Dal80/Uga43p et trois protéines Gat1p, Ure2p Gln3p ont été identifiés et décrits comme participant dans la régulation de l'expression des gènes NCR-sensibles à travers l'élément UAS<sub>NTR</sub> (Cunningham et al., 1996) mais une étude plus récente montre qu'il semblerait que Ure2p et les facteurs de transcription GATA (facteurs de transcription se fixant sur un motif "GATA") Gln3p, Gat1p, Dal80p et Gzf3p seraient impliqués (Georis et al., 2009). Ainsi, dans l'étude de Cunningham et collaborateurs de 1996, Gln3p et Gat1p sont des facteurs permettant l'activation de la transcription de gènes NCR-sensibles. Dans l'étude de Georis et collaborateurs de 2009, Gln3p et Gat1p sont décrits comme fonctionnant également comme activateurs de l'expression des gènes NCR-sensibles. En revanche, une différence existe au niveau des systèmes de répression, puisque dans cette étude, Dal80p et Gzf3p et non pas Uga43p seraient impliquées comme protéines de "blocage" du site de fixation à UAS<sub>NTR</sub>. Concernant Ure2p, cette étude décrit un mécanisme similaire.

C'est pourquoi, il est suggéré de modifier la proposition du modèle de régulation des gènes NCR-sensibles (Figure 15A) décrit dans l'étude de Georis et collaborateurs de 2009, repris par Ljungdahl et Daignan-Fornier en 2012 (Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012), en y incluant la protéine Uga43p (Figure 15B).

Dans ce modèle, les promoteurs *GAT1*, *GZF3* et *DAL80* contiennent plusieurs séquences GATAAG et leur expression est NCR-sensible. Ces facteurs jouent un rôle dans la régulation de l'expression des autres gènes de régulation du système NCR. Ainsi, l'expression de *GAT1* et *DAL80* dépend principalement de celle de Gln3p et Dal80p. En effet, l'expression de ces facteurs est plus élevée pour les levures cultivées dans des conditions non répressives (sources préférentielles d'azote assimilable). D'autre part, l'inactivation de *GZF3* conduit à la diminution de l'expression de plusieurs gènes NCR-sensibles, notamment *GAT1*, ce qui indique que contrairement à Dal80p, Gzf3p est exprimé à des niveaux significatifs et la protéine est active en présence de sources non préférentielles d'azote assimilable. Conformément à cette dernière découverte, l'expression de *GZF3* est induite par Gat1p dans des conditions où Gln3 est apparemment inactive (Rowen et al., 1997). La protéine Gzf3 maintient de faibles niveaux d'expression du gène *GAT1* car celle-ci rentre en compétition avec la protéine Gat1p aux sites de liaison GATAAG. En résumé, ces deux facteurs participent à une boucle d'autorégulation.

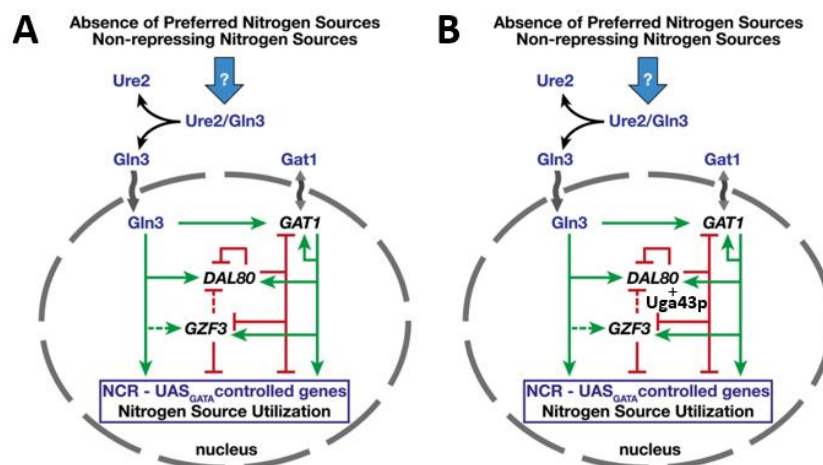


Figure 15 : Modèle de régulation des gènes NCR-sensibles. A) Modèle non modifié (Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012), B) Modèle modifié en prenant en compte la protéine Uga43p dans le système de régulation. Les lignes et flèches vertes représentent une régulation positive et les lignes et barre rouges représentent une régulation négative. Les lignes en pointillés indiquent une régulation relativement plus faible.

- **Régulation post-transcriptionnelle**

Peu de données sont disponibles sur ce point. Aucune étude ne décrit les systèmes impliqués dans les régulations post-transcriptionnelles des AAPs dans leur ensemble. Néanmoins, une étude explique partiellement les mécanismes qui pourraient être mis en jeu (Stanbrough and Magasanik, 1995) pour une AAP en particulier. Dans cette étude, les auteurs ont placé *S. cerevisiae* dans deux conditions de culture. L'une avec comme source d'azote le glutamate (source préférentielle) et dans l'autre de l'urée (source non-préférentielle). Comme il a été décrit auparavant, dans des conditions où *S. cerevisiae* est en présence de sources d'azote assimilables préférentielles en quantité suffisante, le nombre d'AAPs néo-synthétisées sera limité car les besoins de la levure sont couverts. A l'inverse, dans des conditions où *S. cerevisiae* est en présence de sources d'azote assimilable non-préférentielles, ses besoins sont plus difficilement couverts, ce qui nécessite une quantité plus importante d'azote et ainsi plus d'AAPs. L'AAP étudiée dans cet article est la General Amino acid Permease 1 (Gap1p). Cette AAP a la particularité d'assurer le transport de tous les acides aminés. Ainsi, les résultats indiquent que le mécanisme principal de régulation post-transcriptionnelle de Gap1p est une inactivation fonctionnelle. En effet, lorsque *S. cerevisiae* est en présence de sources non préférentielles d'azote, le nombre d'AAP Gap1p augmente. Plus précisément, la forme active de Gap1p, phosphorylée est majoritaire. Lorsque *S. cerevisiae* se retrouve par la suite avec des sources préférentielles d'azote, l'étude a montré qu'il y avait une déphosphorylation des AAPs Gap1p ce qui entraînait leur inactivation. Par la suite, cette inactivation a des répercussions comme une dégradation plus rapide des Gap1p inactives. Ainsi, le mécanisme d'inactivation n'est pas dû à une dégradation de Gap1p directement mais bien par un mécanisme d'inactivation entraînant une dégradation. Un second article essaye d'expliquer quels sont les facteurs mis en jeu dans l'induction

de la dégradation de Gap1p (Hein et al., 1995). Les résultats montrent que le gène *RSP5* codant une ubiquitine ligase (de la famille des ubiquitines ligase E3) permet de catalyser le transfert d'ubiquitine qui a pour fonction principale de marquer la protéine cible en vue de sa protéolyse. Dès lors, Gap1p une fois ubiquitinylée est dirigée vers le protéasome pour être dégradée et recyclée.

- **Le contrôle général des acides aminés (GAAC)**

Le GAAC est nécessaire pour la survie des levures lorsque celles-ci se retrouvent dans un milieu déficitaire pour un ou plusieurs acides aminés. Par exemple, lorsque *S. cerevisiae* est cultivée en présence de tyrosine et de phénylalanine, les mutants dépourvus de GAAC ne peuvent pas croître sur ce milieu car il est dépourvu de tryptophane (Niederberger et al., 1981). Dans ces conditions, cette étude montre bien que le GAAC joue un rôle très important pour la survie des levures. En effet, les levures activent l'expression d'un grand ensemble de gènes (>500) impliqués dans chaque voie de biosynthèse des acides aminés, à l'exception de la cystéine. C'est l'activateur transcriptionnel Gcn4p, qui en se liant à des promoteurs de gènes possédant la séquence consensus UAS<sub>GCRE</sub> avec le motif GAGTCA, régule l'activité du GAAC. L'expression de *GCN4* est induite dans les levures en carence au niveau traductionnel par une initiation de la traduction impliquant quatre courts cadres de lecture ouverts, *short upstream open reading frames* (uORFs).

Plus précisément, le GAAC est activé lorsque les niveaux d'un quelconque acide aminé deviennent limitants, conduisant à des altérations dans les pools d'ARNt chargés (ARNt possédant un codon) (Zaborske et al., 2010). Les ARNt non chargés se lient et activent la kinase Gcn2 qui phosphoryle la sous-unité Ser-51 du facteur d'initiation de la traduction eIF2p. L'eIF2 phosphorylée (eIF2 $\alpha$ -P) présente alors une affinité accrue pour le facteur eIF2Bp qui intervient dans l'hydrolyse du GTP-GDP. Cette réaction permet alors l'inhibition compétitive de la vitesse d'échange des nucléotides, ce qui a pour conséquence de diminuer les niveaux du complexe ternaire eIF2-GTP-Met-tRNA<sup>iMet</sup> (TC) (Figure 16). La diminution des niveaux du TC, a pour effet d'augmenter l'efficacité de lecture des ribosomes pour initier la traduction de *GCN4* (l'activateur transcriptionnel de biosynthèse des acides aminés).

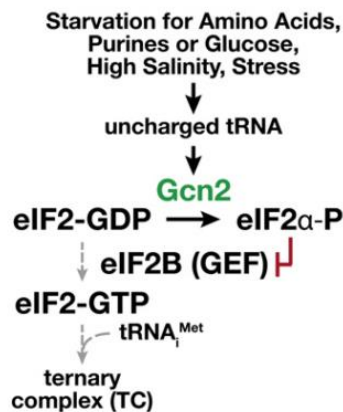


Figure 16 : Voie de régulation du complexe ternaire (Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012)

Au niveau transcriptionnel, le gène *GCN4* est transcrit comme un ARNm avec quatre petits cadres de lecture ouverts. Dans des conditions de non-carence, lorsque que le ribosome 40S couplé au TC, rencontre le premier codon initiateur de l'uORF1, le GTP lié au complexe ternaire est hydrolysé en GDP, libérant eIF2-GDP. Le ribosome 60S est alors recruté pour permettre l'initiation de la traduction (ribosome 80S). La traduction se poursuit jusqu'au codon stop de l'uORF1 et le ribosome 60S se détache. Le ribosome 40S continue sa lecture mais est incapable d'initier la traduction jusqu'à ce qu'il recrute un TC permettant ensuite le recrutement du ribosome 60S. Avec un niveau élevé de TC, le ribosome 40S va se coupler à nouveau avec le TC permettant la traduction de l'uORF4 mais aussi avec l'uORF1 ce qui aura pour effet d'interférer la traduction de *GCN4*. Ce système bloque donc la traduction de *GCN4* (Figure 17).

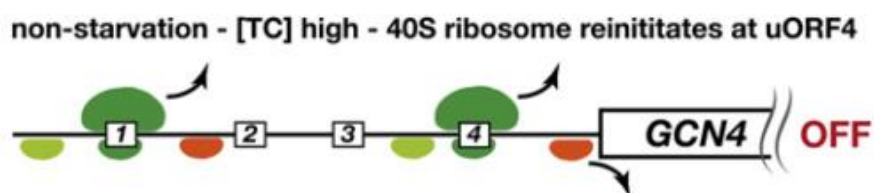


Figure 17 : Régulation de la traduction du gène *GCN4* en condition de non-carence en acide(s) aminé(s) (Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012).

Dans des conditions de carence, en raison d'une faible quantité de TC, le ribosome 40S au niveau de l'uORF4 ne subira pas d'interférence à cause de la fixation du TC au niveau de l'uORF1 et la traduction de *GCN4* sera initiée (Figure 18).

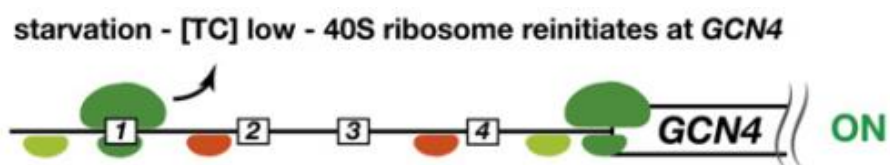


Figure 18 : Régulation de la traduction du gène *GCN4* en condition de carence en acide(s) aminé(s) (Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012)

### 2.2.2. L'ammonium

*S. cerevisiae* possède trois transporteurs pour l'ammonium, Mep1p, Mep2p et Mep3p. Les trois protéines sont très similaires du point de vue de leur séquence nucléotidique et cette similarité est encore plus importante entre Mep1p et Mep3p. De plus, la protéine Mep2p présente la plus grande affinité pour l'ammonium ( $K_m$  de 1 à 2  $\mu\text{M}$ ) suivi de Mep1p ( $K_m$  de 5 à 10  $\mu\text{M}$ ) et enfin de Mep3p ( $K_m$  de 1,4 à 2,1 mM). Hormis les trois gènes *MEP*, le génome de *S. cerevisiae* ne contient aucun autre gène codant pour un homologue de Mep. Chaque gène *MEP* possède un motif 5'-GAT(A/T)A-3 dans sa région promotrice ce qui reflète typiquement une régulation soumise au système NCR. En conséquence, les facteurs Gln3p et Nil1p qui sont impliqués dans le système NCR contrôlent l'expression des trois gènes *MEP* (Marini et al., 1997). Il faut souligner un autre point important sur ces transporteurs. Contrairement aux AAPs, les transporteurs de l'ammonium ne sont pas des perméases de type « symport actif » mais de type « uniport actif ». Les ions ammonium pénètrent à l'intérieur de la cellule à travers une perméase membranaire contre un gradient de concentration puis un proton est excrété de manière active afin de maintenir le pH intracellulaire (Figure 19).

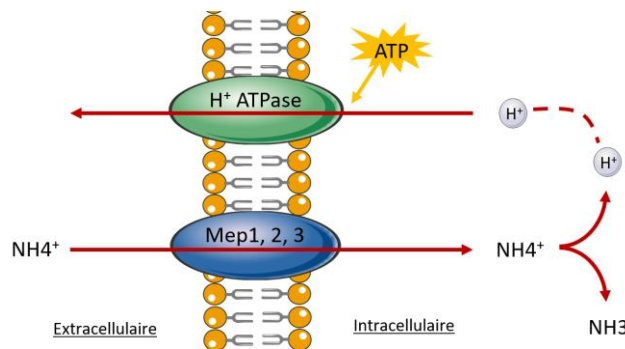


Figure 19 : Fonctionnement d'une perméase Mep

### 2.3. Les méthodes de classification des sources d'azote assimilées chez *S. cerevisiae*

Comme il a été expliqué précédemment, le moût est un milieu riche en azote, mais toutes les sources ne sont pas assimilables par les levures. De nombreux facteurs ont des effets importants aussi bien sur l'aspect qualitatif que quantitatif de la concentration en azote, comme le cépage, le niveau de maturité, les caractéristiques environnementales ou encore les pratiques viticoles (Bell and Henschke, 2005). L'ammonium et les acides aminés représentent respectivement en moyenne 40% et de 51 à 92% de l'azote assimilable des levures ou *Yeast Assimilable Nitrogen* (YAN) lors de la fermentation alcoolique (Bell and Henschke, 2005). L'assimilation des acides aminés et de l'ammonium est soumise à une régulation complexe (système SPS, NCR, GAAC, plus des régulations

post-transcriptionnelles) ce qui a pour conséquence d'entraîner des vitesses d'assimilation différentes. Il est ainsi possible de classer les acides aminés et l'ammonium suivant leur vitesse d'assimilation par les levures. Une étude a montré qu'il était possible de classer l'ammonium et les acides aminés en trois catégories (Jiranek et al., 1995). Pour réaliser ces groupes, des fermentations alcooliques en milieu synthétique, mimant la composition d'un moût, ont été réalisées. Puis, le temps d'assimilation de 50% de la concentration initiale de la source ( $T_{50}$ ) a été utilisé pour comparer les vitesses d'assimilation et réaliser des groupes. Les résultats de cette étude montrent que l'arginine (très souvent majoritaire dans le moût), l'asparagine, l'aspartate, la glutamine, l'isoleucine, la leucine, la lysine, la méthionine, la sérine et la thréonine sont classés dans le groupe A (groupe préférentiel) ; l'alanine, le glutamate, la phenylalanine l'histidine et la valine dans le groupe B (groupe intermédiaire) ; la glycine, le tryptophane et la tyrosine dans le groupe C (groupe non préférentiel). Les conditions de fermentation dans l'étude ont été réalisées sans agitation, avec donc très peu d'aération. Dans ces conditions la proline n'est pas assimilée puisque l'AAP impliquée est une oxydase (Ingledew et al., 1987). C'est pourquoi, la proline n'a pas été dosée au cours de cette étude.

Une étude plus récente a repris ces travaux en s'intéressant là aussi à l'assimilation séquentielle des YAN au cours de la fermentation mais cette fois ci avec 14 souches de *S. cerevisiae* (Crépin et al., 2012). Comme pour Jiranek et collaborateurs (1995), les fermentations ont été réalisées en moût synthétique et les vitesses d'assimilation évaluées également par rapport au  $T_{50}$ . Les résultats montrent des disparités entre ceux obtenus par Jiranek et collaborateurs et par Crépin et collaborateurs (2012). En effet, dans l'étude de Crépin et collaborateurs, le groupe des YAN assimilé "précocément" comprend uniquement la lysine. Le groupe des YAN assimilés "rapidement" comprend l'acide aspartique, la thréonine, l'acide glutamique, la leucine, l'histidine, la méthionine, l'isoleucine, la sérine, la glutamine et la phénylalanine. Enfin, le groupe des acides aminés consommés "lentement" sont l'ammonium, la valine, l'arginine, l'alanine, le tryptophane et la tyrosine.

Enfin, une troisième étude s'est intéressée à l'influence des sources de YAN vis-à-vis de la vitesse de croissance de plusieurs espèces de levures au cours de la fermentation alcoolique (Kemsawasd et al., 2015). Cette étude s'éloigne un peu des précédentes mais vu le peu de littérature sur ce point, elle permet d'avoir un troisième élément de comparaison. Ici le  $T_{50}$  n'est pas pris en compte pour classer les YAN selon leur vitesse d'assimilation mais le paramètre de comparaison qui s'en rapproche le plus est la concentration des YAN obtenue à la fin de la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire. Le dosage des YAN à ce moment permet de les classer suivant la quantité

restante. Plus la concentration de la source dosée et importante, moins elle aura été consommée. Arbitrairement des seuils ont été établis afin de former des groupes. Ces seuils sont de 25% pour le premier groupe, les YAN se trouvant dans cet intervalle sont considérés comme des sources préférentielles. Le second est de 50%, les YAN se trouvant donc entre 25 et 75% sont considérés comme des sources intermédiaires. Enfin, le troisième seuil est de 25%, les YAN se trouvant dans cet intervalle sont considérés comme non préférentiels. A partir de ces résultats, l'alanine, l'arginine, l'asparagine, l'acide aspartique, la glutamine, l'isoleucine, l'ammonium, la sérine, la thréonine, et la valine sont classés dans le premier groupe. La cystéine, la glycine, l'histidine, la tyrosine dans le second groupe. Enfin, la lysine est classée dans le dernier groupe. Certains de ces résultats se retrouvent donc en contradiction avec ceux de Crépin et al. (2012).

Ces résultats montrent bien qu'il est difficile de classer les sources préférentielles d'azote chez *S. cerevisiae* car la méthode de calcul, de classement, les conditions de culture et les souches utilisées varient en fonction des études. Afin d'identifier si des tendances existent et de discuter de leur bienfondé, une liste reprenant les données disponibles jusqu'à aujourd'hui et une interprétation seront présentées dans le chapitre 1 : Influence du contenu en azote dans la fermentation alcoolique.

## 2.4. Métabolisme azoté central (Central Nitrogen Metabolism ou CNM)

### 2.4.1. Catabolisme des YAN

Une fois assimilés, les YAN sont dégradés pour former deux molécules azotées clés, l'ammonium et le L-glutamate. Ces molécules sont interconnectées par trois systèmes enzymatiques (Large, 1986). Le premier est un système faisant intervenir une glutamate déshydrogénase NADP-dépendante (conversion de l'ammonium en glutamate) et une glutamate déshydrogénase NAD-dépendante (conversion du glutamate en ammonium). Le second fait intervenir une aminotransférase impliquant la lysine, l'aspartate et l'alanine. Le troisième fait intervenir une oxydase.

### 2.4.2. Biosynthèse des acides aminés

Toutes les voies des sources non-préférentielles alimentent un ensemble commun de réactions pour la production de glutamate et de glutamine. A partir de ces deux molécules clés, la levure va pouvoir synthétiser tous les acides aminés impliqués dans la synthèse des protéines. L'ammonium est incorporé lors de la formation du glutamate à partir de l' $\alpha$ -cétoglutarate par la glutamate déshydrogénase (Gdh1) dépendante du NADPH (Réaction 1) (Grenson et al., 1974).

**Réaction 1 :**  $\alpha$ -céto-glutarate +  $\text{NH}_4^+$  + NADPH +  $\text{H}^+$   $\leftrightarrow$  Glutamate + NADP<sup>+</sup>

Puis, l'ammonium est de nouveau incorporé lors de la formation de la glutamine à partir du glutamate par la glutamine synthétase (Gln1) (Réaction 2) (Mitchell, 1985).

**Réaction 2 :** Glutamate +  $\text{NH}_4^+$  + ATP  $\leftrightarrow$  Glutamine + ADP + P<sub>i</sub>

Lorsque les levures ont une source abondante d'ammonium, sans avoir à dégrader les sources non-préférentielles, l'ammonium est directement intégré pour la formation du glutamate et de la glutamine. Mise à part ces deux molécules, d'autres voies sont impliquées dans la biosynthèse des acides aminés, notamment reliées à la glycolyse et le cycle de Krebs. En effet, les familles d'acides aminés dérivées d'une molécule commune sont facilement identifiables et comprennent :

- La famille du glutamate : glutamate, glutamine, arginine, proline et lysine
- La famille des acides aminés aromatiques : phénylalanine, tyrosine, tryptophane
- La famille des sérines : sérine, glycine, cystéine et méthionine
- La famille de l'aspartate : aspartate, asparagine, thréonine
- La famille des acides aminés soufrés : cystéine et méthionine
- La famille des pyruvates : alanine, leucine, isoleucine

En plus de ces familles, il est important de souligner que les voies de biosynthèses de l'histidine et des nucléotides sont connectées (Figure 20).

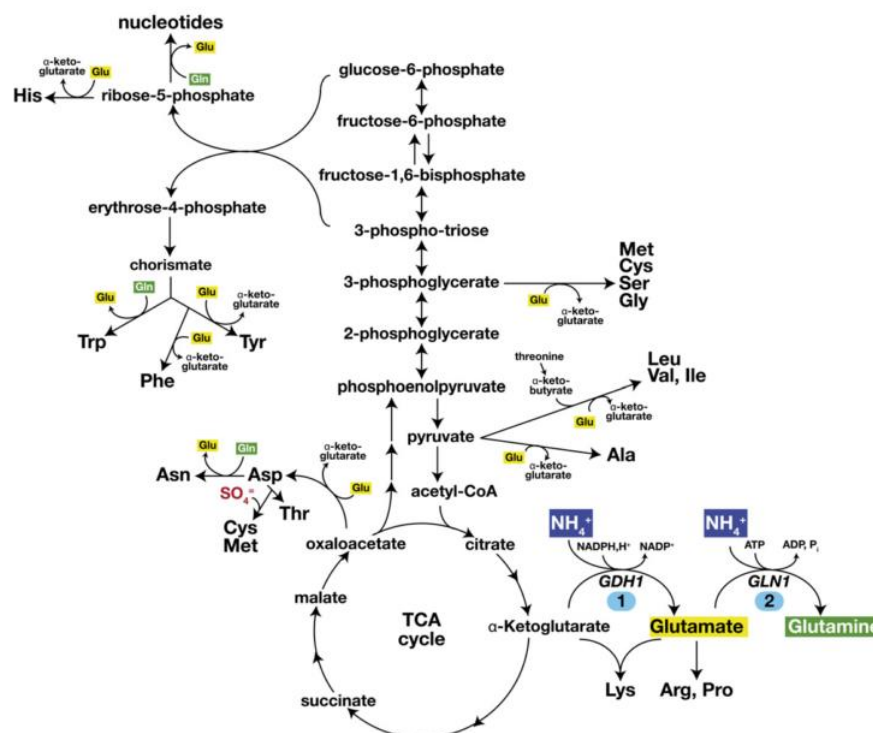


Figure 20 : Représentation générale de la voie de biosynthèse des acides aminés à partir du glucose et de l'ammonium chez *S. cerevisiae* (Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012).

### 3. Synthèse des composés volatils

Le profil aromatique du vin dépend entre autres de la présence de composés volatils. Ces composés peuvent avoir des origines variables mais généralement quatre groupes de composés aromatiques du vin sont distingués (Lambrechts and Pretorius, 2000). Le premier groupe provient du raisin. Ces arômes, appelés « arômes variétaux » sont synthétisés à partir de précurseurs caractéristiques de certains cépages. Ensuite, viennent les arômes pré-fermentaires formés lors des opérations de vinification. Les arômes fermentaires sont issus du métabolisme des micro-organismes (levures et bactéries) présents lors des fermentations alcoolique et malolactique. Enfin, les arômes de vieillissement forment le dernier groupe et interviennent pendant la maturation du vin.

Dans notre étude, l'accent est mis sur l'étude des arômes fermentaires en lien avec les sources azotées lors de co-fermentation de levures NS avec *S. cerevisiae*. Il est connu que la fermentation augmente la complexité chimique et aromatique du vin notamment par l'extraction de composés présents dans le moût, par la modification de certains composés dérivés du raisin et en produisant une quantité importante de métabolites. Les composés volatils identifiés dans les vins sont majoritairement issus des produits de fermentation, puisque ces derniers représentent la concentration la plus élevée. Dans une fermentation modèle avec *S. cerevisiae* en présence de 22 à 24% de sucre, 95% du sucre est converti en éthanol et CO<sub>2</sub>, 1% est converti en composants cellulaires et les 4% restant sont convertis en d'autres produits, notamment les molécules aromatiques (Boulton et al., 1996). Il faut noter que les principaux produits du métabolisme des levures, l'éthanol, le glycérol et le CO<sub>2</sub>, constituent une contribution relativement faible, mais néanmoins fondamentale à l'arôme du vin. D'un autre côté, les principaux groupes de composés qui forment « le bouquet de fermentation » sont les acides organiques, les alcools supérieurs, les esters et dans une moindre mesure, les aldéhydes (Rapp and Versini, 1995). Concernant les alcools supérieurs et les esters, quand ils sont présents à des concentrations élevées, ils confèrent au vin une saveur désagréable. A l'inverse, quand ils sont présents à des faibles concentrations, ils apportent une contribution essentielle aux saveurs et aux arômes du vin. Ces deux types de molécules sont issus du catabolisme des acides aminés *via* la voie d'Ehrlich.

#### 3.1. La voie d'Ehrlich

En 1904, après avoir isolé et caractérisé l'isoleucine, Ehrlich a noté des similitudes structurelles entre cet acide aminé et l'alcool amylique, de même entre la leucine et l'alcool isoamylique. Ces observations l'ont conduit à rechercher si ces alcools supérieurs dérivait des acides aminés (Ehrlich, 1907). En effet, la supplémentation en leucine ou isoleucine lors de la fermentation conduit

à une production accrue respectivement d'alcools isoamylique et amylique. A partir de ces résultats, Ehrlich a émis l'hypothèse que les acides aminés étaient hydrolysés par une activité enzymatique des levures pour former les alcools supérieurs correspondants en faisant intervenir le CO<sub>2</sub> et l'ammonium. Mais c'est réellement en 1911 que Neubauer et Fromherz ont proposé un schéma métabolique modifié de la voie d'Ehrlich qui a été vérifié (Sentheshanmuganathan and Elsdén, 1958; Sentheshanuganathan, 1960; Dickinson et al., 1997, 2000) et complété mais qui reste valable aujourd'hui (Figure 21) (Neubauer and Fromherz, 1911).

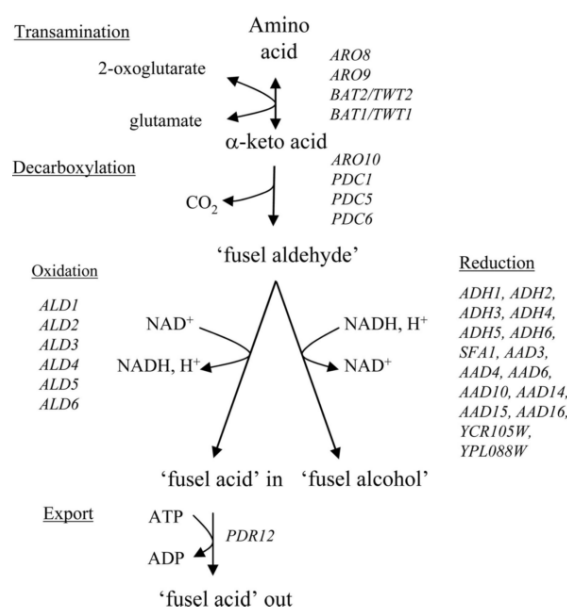


Figure 21 : La voie d'Ehrlich. Catabolisme des acides aminés ramifiés (leucine, valine et isoleucine), acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine et tryptophane) et des acides aminés soufrés impliqués dans la formation des acides organiques, des alcools supérieurs et des esters (Hazelwood et al., 2008).

### 3.1.1. Transamination

Chez *S. cerevisiae*, quatre protéines sont impliquées dans la première étape de transamination. Twt1p (nommée également Bat1p ou Eca39p) est une aminotransférase mitochondriale d'acides aminés à chaînes ramifiées et Twt2p (nommée également Bat2p ou Eca40p) est une isoenzyme cytosolique de Twt1p. En fermentation, *TWT1* est fortement exprimé pendant la phase exponentielle et réprimé pendant la phase stationnaire. A l'inverse, *TWT2* est réprimé lors de la phase exponentielle et exprimé lors de la phase stationnaire. Concernant Aro8p et Aro9p, il semblerait que ces protéines agissent comme des transaminases d'acides aminés à large spécificité (Urrestarazu et al., 1998).

### 3.1.2. Decarboxylation

Le cétoacide obtenu à la fin de l'étape de transamination est converti en aldéhyde en faisant intervenir cinq gènes. *PDC1*, *PDC5* et *PDC6* codent des pyruvates décarboxylases (Hohmann, 1991) et *ARO10* semblerait coder une phénylpyruvate décarboxylase (Dickinson et al., 2003). Enfin, *THI3* est susceptible de coder une  $\alpha$ -céto-isocaproate décarboxylase mais certaines études suggèrent que ce gène interviendrait au niveau de la régulation catabolique (Mojzita and Hohmann, 2006). L'expression de ces cinq gènes va dépendre de l'acide aminé dégradé. Ainsi, la carboxylase majoritaire impliquée dans le catabolisme de la leucine est codée par *THI3*. Dans le catabolisme de la valine, chacune des trois isoenzymes Pdc1p, Pdc5p et Pdc6p décarboxyle l' $\alpha$ -cétoisovalérate. Dans le catabolisme de l'isoleucine, n'importe quelle décarboxylase codée par *PDC1*, *PDC5*, *PDC6*, *ARO10* ou *THI3* est suffisante pour la conversion de l'isoleucine en alcool amylique. Cependant, la décarboxylase Thi3p n'intervient pas dans le catabolisme des acides aminés aromatiques (phenylalanine et tyrosine).

### 3.1.3. Oxydation ou réduction des aldéhydes

L'étape finale de la voie d'Ehrlich est la réduction ou l'oxydation de l'aldéhyde formée dans l'étape de décarboxylation (Tableau 1). En condition de fermentation, la majorité des acides aminés est convertie en alcool supérieur et la formation d'acides organiques par oxydation des aldéhydes est minoritaire (Dickinson et al., 2003). Des études ont montré que l'équilibre entre l'oxydation et la réduction des aldéhydes dépend fortement des conditions de culture. En effet, dans des cultures en condition aérobies limitées en glucose et en YAN (leucine, méthionine et phenylalanine), les acides aminés sont convertis principalement en acides organiques et seules de très faibles concentrations en alcools supérieurs sont formées (Boer et al., 2006).

Tableau 1 : Intermédiaires de la voie d'Ehrlich (Hazelwood et al., 2008).

| Amino acid precursor | Acid                               | Alcohol           | Ester                  |
|----------------------|------------------------------------|-------------------|------------------------|
| <b>Leucine</b>       | $\alpha$ -keto-isocaproate         | Alcohol isoamylic | isoamyl acetate        |
| <b>Isoleucine</b>    | $\alpha$ -keto-methylvalerate      | Alcohol amylic    | amyl acetate           |
| <b>Valine</b>        | $\alpha$ -keto-isovalerate         | Isobutanol        | Isobutyle acetate      |
| <b>Phenylalanine</b> | Phenylpyruvate                     | 2-phenylethanol   | 2-phenylethyle acetate |
| <b>Tyrosine</b>      | 3-indolacetate                     | Tyrosol           | Hydroxy-phenylacetate  |
| <b>Tryptophane</b>   | 3-indol-pyruvate                   | Tryptophol        | x                      |
| <b>Methionine</b>    | $\alpha$ -keto- $\gamma$ -butyrate | Methionol         | x                      |
| <b>Threonine</b>     | $\alpha$ -keto-butyrate            | Propanol          | x                      |

Outre la production de composés volatils, il semblerait que la voie d'Ehrlich joue un rôle dans l'équilibre rédox de la cellule. Une autre hypothèse serait que la synthèse des alcools supérieurs a pour but de dégrader les aldéhydes qui sont des composés toxiques. Enfin, la synthèse des esters d'acétate dépend principalement de l'activité de deux acétyl transférases *ATF1* et *ATF2*.

### 3.2. Transport des alcools supérieurs, esters et acides organiques

Le mécanisme d'exportation des alcools supérieurs et des acides organiques vers le milieu extracellulaire reste à ce jour encore mal connu. Il n'existe aucune donnée sur l'existence d'un mécanisme impliquant des transporteurs membranaires chez *S. cerevisiae*. Mais en considérant le coefficient de répartition eau-octanol (Log P) qui permet d'appréhender le caractère hydrophile ou hydrophobe (lipophile) d'une molécule, il est possible d'estimer le comportement des alcools supérieurs et acides organiques entre le milieu intracellulaire et extracellulaire. En effet, si le LogP est positif et très élevé, cela exprime le fait que la molécule considérée est bien plus soluble dans l'octanol que dans l'eau, ce qui reflète son caractère lipophile, et inversement, si le Log P est négatif cela signifie que la molécule considérée est hydrophile. Un Log P nul signifie que la molécule est aussi soluble dans un solvant que dans l'autre. A l'aide de ce paramètre, il a été montré que certains alcools, comme l'alcool isoamylique, possèdent un log P de 1,30 et certains esters de 2,49 (Tehrany et al., 2004). Il est alors concevable que l'exportation pourrait se faire de façon passive. Concernant l'exportation des acides organiques, un transporteur membranaire ATP dépendant codé par le gène *PDR12* a été identifié.

### 3.3. Influence d'une co-culture de levures NS – *S. cerevisiae* sur la production des composés volatils

L'étude du profil des arômes fermentaires chez *S. cerevisiae* est souvent réalisée en culture pure (avec toutes les variations dues à la diversité des souches). Néanmoins, en pratique le moût n'est pas un milieu stérile et de nombreux micro-organismes y cohabitent. Dès lors, les levures NS vont intervenir et avoir des conséquences sur le profil aromatique. Pour évaluer cet impact, en 2012 une étude réalisée au laboratoire a entrepris la quantification de quarante-quatre composés volatils produits en culture pure ou en co-culture avec différentes levures NS (Sadoudi et al., 2012). Brièvement, il en ressort que les concentrations des composés volatils ont complètement changé dans certaines conditions de co-culture (par exemple avec le couple *S. cerevisiae* – *M. pulcherrima*), produisant un niveau d'alcools supérieurs, d'acides gras, esters et d'acétates (particulièrement le phényléthyle d'acétate et l'acétate d'isoamyle) plus important qu'en culture pure avec *S. cerevisiae*. Ces résultats montrent l'effet synergique (interaction positive) de ces deux levures vis-à-vis de ces

molécules. Depuis, de nombreuses études ont évalué l'impact d'une co-fermentation ou d'une fermentation séquentielle dans différentes conditions sur la production de composés (dont les composés volatils) et plus encore, sur l'impact sensoriel. Toutes ces études ont été synthétisées en 2016 dans l'article de Varela (Tableau 2). Outre les alcools supérieurs et les esters, les résultats montrent que les levures NS vont avoir un impact sur la production de nombreux métabolites, notamment le glycérol, les acides gras à chaîne moyenne, les thiols, les terpènes, les C13-norisoprénoïdes et les mannoprotéines (Varela, 2016). Les profils sensoriels sont également très diversifiés et une différence significative est souvent observée comparée à une fermentation avec *S. cerevisiae* seule. Il est cependant délicat de catégoriser les couples levure NS/*S. cerevisiae* d'après une observation des profils des composés volatils et/ou des profils sensoriels. En effet, les souches utilisées, le moment de l'inoculation, la matrice et les conditions de fermentation sont différents.

Tableau 2 : Influence des levures NS sur la composition du vin et/ou ses propriétés sensorielles (Varela, 2016)

| Non-Saccharomyces yeast          | Inoculation regime <sup>a</sup> | Scale of fermentation                                    | Grape variety or media        | Impact on physical properties, chemical composition or sensory attributes <sup>b</sup>                                                                                                           | References                    |
|----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| <i>Torulaspora delbrueckii</i>   | Simultaneous                    | Lab-scale                                                | Malvar                        | Increased acetate esters and medium-chain fatty acids (MCFAs)                                                                                                                                    | (Cordero-Bueso et al. 2013)   |
| <i>Torulaspora delbrueckii</i>   | Simultaneous                    | Lab-scale                                                | Sauvignon blanc               | Increased concentration of thiols, 3-sulfanylhhexan-1-ol (3SH) and 3-sulfanylhhexyl acetate (3SHA)                                                                                               | (Renault et al. 2016)         |
| <i>Torulaspora delbrueckii</i>   | Simultaneous                    | Medium-scale (5 L)                                       | Gewurztraminer                | Increased concentration of terpenes $\alpha$ -terpineol and linalool                                                                                                                             | (Cus and Jenko 2013)          |
| <i>Torulaspora delbrueckii</i>   | Simultaneous                    | Pilot-scale (80 L)                                       | Soave                         | Increased overall wine quality                                                                                                                                                                   | (Azzolini et al. 2015)        |
| <i>Torulaspora delbrueckii</i>   | Simultaneous                    | Pilot-scale (80 kg)                                      | Chardonnay                    | Increased 'aroma intensity', 'complexity' and 'persistence'                                                                                                                                      | (Belda et al. 2015)           |
| <i>Torulaspora delbrueckii</i>   | Simultaneous                    | Pilot-scale (200 L)                                      | Merlot                        | Increased 'colour intensity', 'overall impression' and 'aroma quality'                                                                                                                           | (Renault et al. 2015)         |
| <i>Torulaspora delbrueckii</i>   | Sequential                      | Industry-scale (1200 kg)                                 | Macabeo (sparkling base wine) | Increased 'complexity' and 'fruity' attributes                                                                                                                                                   | (Gonzalez-Royo et al. 2015)   |
| <i>Hanseniaspora uvarum</i>      | Sequential                      | Pilot-scale (200 kg)                                     | Pinot noir                    | Increased foamability and foam persistence<br>Preferred by sensory panel<br>Increased concentrations of several C <sub>13</sub> -norisoprenoids and some terpenes                                | (Hu et al. 2016a)             |
| <i>Hanseniaspora uvarum</i>      | Simultaneous                    | Lab-scale Pilot-scale (90 L)<br>Industry-scale (1000 hL) | Negroamaro                    | Increased 'tropical fruit', 'berry', 'floral', and 'nut aroma' characters<br>Increased concentration of acetate esters, esters of MCFAs, isomyl alcohol, 2-phenylethanol and $\alpha$ -terpineol | (Tristezza et al. 2016)       |
| <i>Hanseniaspora vineae</i>      | Simultaneous                    | Pilot-scale (225 L)                                      | Chardonnay                    | Increased 'white prune', 'pear', 'citric fruits', and 'honey' attributes                                                                                                                         | (Medina et al. 2013)          |
| <i>Hanseniaspora vineae</i>      | Simultaneous                    | Pilot-scale (100 L)                                      | Macabeo                       | Increased concentration of phenyl-ethyl acetate, ethyl lactate and $\alpha$ -terpineol                                                                                                           | (Lleixa et al. 2016)          |
| <i>Starmarella bacillaris</i>    | Simultaneous                    | Lab-scale                                                | Barbera                       | Increased 'floral' attribute and panel preferences                                                                                                                                               | (Englezos et al. 2016b)       |
| <i>Starmarella bacillaris</i>    | Simultaneous                    | Pilot-scale (200 L)                                      | Bovale                        | Increased glycerol concentration, greater volatile complexity                                                                                                                                    | (Zara et al. 2014)            |
| <i>Starmarella bacillaris</i>    | Simultaneous                    | Pilot-scale (50 L)                                       | Montepulciano                 | Increased glycerol content, 'jam', 'softness', 'structure' and 'persistence' attributes, and decreased 'bitter' characters                                                                       | (Tofalo et al. 2016)          |
| <i>Metschnikovia pulcherrima</i> | Single                          | Lab-scale                                                | Synthetic grape juice         | Increased 'persistence' and decreased 'reduced' characters                                                                                                                                       | (Domizio et al. 2014)         |
| <i>Metschnikovia pulcherrima</i> | Sequential                      | Medium-scale (4 L)                                       | Riesling                      | Increased concentration of mannoproteins                                                                                                                                                         | (Benito et al. 2015b)         |
| <i>Metschnikovia pulcherrima</i> | Simultaneous                    | Industry-scale (1200 kg)                                 | Macabeo (sparkling base wine) | Increased 'overall impression', 'citrus/grape fruit' and 'pear' attributes                                                                                                                       | (Gonzalez-Royo et al. 2015)   |
| <i>Lachancea thermotolerans</i>  | Sequential                      | Medium-scale (4 L)                                       | Riesling                      | Increased foam persistence and 'smoky' and 'flowery' attributes                                                                                                                                  | (Benito et al. 2015b)         |
| <i>Lachancea thermotolerans</i>  | Simultaneous                    | Industry-scale (10 hL)                                   | Sangiovese                    | Increased 'overall impression' and 'peach/apricot' characters                                                                                                                                    | (Gobbi et al. 2013)           |
| <i>Pichia kluyveri</i>           | Sequential                      | Medium-scale (4 L)                                       | Riesling                      | Enhanced acidity and increased 'spicy' attributes                                                                                                                                                | (Benito et al. 2015b)         |
| <i>Pichia kudriavzevii</i>       | Single                          | Lab-scale                                                | Synthetic must                | Increased 'overall impression' and 'peach/apricot' characters                                                                                                                                    | (del Monaco et al. 2014)      |
| <i>Wickerhamomyces anomalus</i>  | Sequential                      | Pilot-scale (90 kg)                                      | Mazuela                       | Decreased malic acid concentration, increased 'fruit' and 'cooked pears' characters                                                                                                              | (Izquierdo-Canas et al. 2014) |
| <i>Debaryomyces hansenii</i>     | Sequential                      | Medium-scale (3 L)                                       | Pedro Gimenez                 | Increased concentration of acetate- and ethyl- esters and panel preferences<br>Increased concentrations of esters and fatty acids                                                                | (Maturano et al. 2015)        |

| Non- <i>Saccharomyces</i> yeast        | Inoculation regime <sup>a</sup> | Scale of fermentation     | Grape variety or media | Impact on physical properties, chemical composition or sensory attributes <sup>b</sup>             | References               |
|----------------------------------------|---------------------------------|---------------------------|------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| <i>Candida sake</i>                    | Sequential                      | Medium-scale<br>(3 L)     | Pedro Gimenez          | Increased concentrations of terpenes and higher alcohols                                           | (Maturano et al. 2015)   |
| <i>Zygosaccharomyces bailii</i>        | Simultaneous                    | Lab-scale                 | Chardonnay             | Increased concentration of ethyl esters, mainly ethyl acetate, ethyl octanoate and ethyl decanoate | (Garavaglia et al. 2015) |
| <i>Kazachstania gamospora</i>          | Sequential                      | Lab-scale                 | Ribolla Gialla         | Increased 'flavour persistence', 'flavour intensity', 'floral' and several 'fruity' attributes     | (Dashko et al. 2015)     |
| <i>Zygosaccharomyces kombuchaensis</i> | Sequential                      | Lab-scale                 | Ribolla Gialla         | Increased 'flavour intensity' and several 'fruity' attributes                                      | (Dashko et al. 2015)     |
| <i>Zygotritulasporea florentina</i>    | Simultaneous                    | Industry-scale<br>(10 hL) | Sangiovese             | Increased 'fruity' and 'floral' notes and decreased values for 'astringency'                       | (Lencioni et al. 2016)   |
| <i>Schizosaccharomyces pombe</i>       | Simultaneous                    | Lab-scale                 | Shiraz                 | Increased formation of vitisins and vinylphenolic pyrananthocyanin                                 | (Loira et al. 2015)      |
| <i>Saccharomycodes ludwigii</i>        | Single                          | Lab-scale                 | Synthetic grape juice  | Increased concentration of mannoproteins                                                           | (Domizio et al. 2014)    |
| <i>Pichia fermentans</i>               | Single                          | Lab-scale                 | Synthetic grape juice  | Increased concentration of mannoproteins                                                           | (Domizio et al. 2014)    |

<sup>a</sup> Although more than one inoculation regime might have been evaluated, inoculation regimes showing a significant impact on volatile composition or sensory profile are reported. Single inoculation involves the addition of only one yeast species into media/must. Sequential inoculation is achieved by inoculating first with a non-*Saccharomyces* yeast followed by a wine strain of *S. cerevisiae* to finish the fermentation. Simultaneous inoculation involves the addition of two or more yeast species at the same time

<sup>b</sup> Chemical composition or sensory attributes compared to control wines fermented with *S. cerevisiae*

Ainsi, les mécanismes d'interactions et l'influence des levures NS sur la fermentation demandent à être mieux caractérisés afin de comprendre l'origine des changements vis-à-vis des composés volatils et plus globalement sur les profils sensoriels.

L'une des premières pistes pouvant expliquer les changements au niveau des composés volatils repose sur l'activité enzymatique de certaines souches de levures NS. Lors de la fermentation, certaines levures NS produisent et sécrètent des enzymes comprenant entre autres des  $\beta$ -glucosidases,  $\beta$ -glucanases, cellulases, protéases, pectinases, xylanases et amylases (Strauss et al., 2001; Maturano et al., 2015). L'évaluation de l'activité enzymatique au cours de la fermentation montre que cette dernière est significativement plus importante chez certaines levures NS (Tableau 3) que chez *S. cerevisiae*. Cependant, lors de co-cultures cette activité est largement réduite (Maturano et al., 2015). L'activité enzymatique de certaines levures NS couplée à celle de *S. cerevisiae* peut être corrélée avec les changements de certains composés volatils. Ainsi, dans un premier cas de co-culture il a été montré que plus les activités des pectinases, amylases et xylanases étaient élevées, plus la concentration en terpènes et alcools supérieurs étaient élevée. Dans un autre cas de co-culture, plus les activités des  $\beta$ -glucosidases, protéases et xylanases étaient élevées et plus la concentration en esters et acides gras était élevée. Il semble donc que ces changements soient souche-dépendants.

Tableau 3 : Surface sous la courbe enzymatique (AUEC) des enzymes hydrolytiques produites par des cultures pures et mixtes de *S. cerevisiae* et de levures NS (Maturano et al., 2015)

| Enzymatic activity | $\beta$ -Glucosidases         | Pectinases                   | Proteases                   | Xylanases                    | Amylases                    |
|--------------------|-------------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| BSc562             | 2569 $\pm$ 21 <sup>f</sup>    | 6932 $\pm$ 83 <sup>b</sup>   | 809 $\pm$ 78 <sup>b</sup>   | n.d.                         | n.d.                        |
| BDv566             | 24594 $\pm$ 196 <sup>b</sup>  | 20580 $\pm$ 623 <sup>a</sup> | 1576 $\pm$ 165 <sup>a</sup> | 41086 $\pm$ 133 <sup>a</sup> | 5336 $\pm$ 39 <sup>a</sup>  |
| BCs403             | 37045 $\pm$ 145 <sup>a</sup>  | 19497 $\pm$ 409 <sup>a</sup> | 1678 $\pm$ 56 <sup>a</sup>  | 37915 $\pm$ 205 <sup>b</sup> | 4108 $\pm$ 21 <sup>b</sup>  |
| MSD1               | 4614 $\pm$ 134 <sup>d</sup>   | 4343 $\pm$ 98 <sup>d</sup>   | 509 $\pm$ 34 <sup>c</sup>   | 7043 $\pm$ 87 <sup>c</sup>   | 972 $\pm$ 19 <sup>d</sup>   |
| MSD2               | 4818 $\pm$ 111 <sup>d</sup>   | 5173 $\pm$ 43 <sup>c</sup>   | 483 $\pm$ 23 <sup>c</sup>   | 14714 $\pm$ 54 <sup>c</sup>  | 1830 $\pm$ 92 <sup>c</sup>  |
| MSC1               | 5629 $\pm$ 89 <sup>c</sup>    | 4243 $\pm$ 99 <sup>d</sup>   | 766 $\pm$ 33 <sup>b</sup>   | 10240 $\pm$ 101 <sup>d</sup> | 1011 $\pm$ 26 <sup>d</sup>  |
| MSC2               | 4924 $\pm$ 103 <sup>d,c</sup> | 4118 $\pm$ 96 <sup>d,c</sup> | 585 $\pm$ 76 <sup>d</sup>   | 1953 $\pm$ 68 <sup>f</sup>   | 925 $\pm$ 61 <sup>d,c</sup> |

Different letters within the same row indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between fermentations for the same enzymatic activity according to Tukey's honestly significant difference (HSD) test

BSc562: *S. cerevisiae*, BDv566: *D. vanrijiae*, BCs403: *C. sake*, MSD1: 1 % BSc562/99 % BDv566, MSD2: 10 % BSc562/90 % BDv566, MSC1: 1 % BSc562/99 % BCs403, MSC2: 10 % BSc562/90 % BCs403

Concernant la voie d'Ehrlich, aucunes données ne sont pour le moment disponibles chez les levures NS pouvant expliquer la formation de certains composés volatils. Néanmoins, Gamero et collaborateurs (2016) suggèrent qu'un tel mécanisme pourrait exister chez les espèces qu'ils ont étudiées. Dans un premier temps, les auteurs ont montré que l'alcool isoamylique (dérivé de la leucine), le 2-méthylbutanol (dérivé de l'isoleucine) et l'alcool isobutylique (dérivé de la valine) ont été produits à des concentrations beaucoup plus élevées lors de fermentations avec *Hanseniaspora*

*guilliermondii*, *Wickerhamomyces subpelliculosus*, *Starmera caribaea*, *Hanseniaspora vineae*, *Kazachstania gamospora* et *Torulaspora microellipsoides* qu'avec *S. cerevisiae*. Puis les niveaux de production d'alcools supérieurs et d'esters d'acétate lorsqu'un seul acide aminé était disponible comme source d'azote ont été évalués. De manière similaire à ce qui a déjà été caractérisé chez *S. cerevisiae*, les alcools supérieurs dérivant d'autres acides aminés que celui fourni comme seule source d'azote ont été produits par chacune des espèces de levure NS. Par exemple, l'alcool isobutylique (dérivé de la valine) a été produit lorsque la leucine était utilisée comme seule source d'azote. Ainsi, similairement à *S. cerevisiae*, il pourrait exister chez les levures NS des enzymes (par exemple, Aro10p impliquée dans la voie d'Ehrlich) à large mode d'action (Hazelwood et al., 2008). De plus, face à la diversité des alcools supérieurs produits dans cette condition par les levures NS, les auteurs suggèrent qu'il existe une diversité importante dans la régulation de l'expression de l'hypothétique voie d'Ehrlich (Gamero et al., 2016).

Enfin, une récente étude a montré l'impact de la présence d'une souche NS sur les niveaux de transcription de certains gènes chez *S. cerevisiae* (Sadoudi et al., 2017). Il apparaît qu'une consommation d'oxygène (changement du potentiel redox) suite à la présence de la souche de levure NS, induise une "réorientation" de certaines voies métaboliques chez *S. cerevisiae*. Ce mécanisme aurait pour effet d'induire une augmentation du niveau d'expression des pyruvates décarboxylases *PDC1*, *PDC5*, de l'acétaldéhyde déshydrogénase *ALD6* et de l'alcool déshydrogénase *ADH1* ce qui entraînerait une diminution de la production d'acide acétique.

#### 4. Réduction de la concentration en éthanol dans le vin

Face au changement climatique mondial, certaines régions viticoles situées dans des zones chaudes du globe font face à une accélération de la phénologie de la vigne. Les dates de bourgeonnement, de floraison et de maturation du raisin sont maintenant plus précoces dans plusieurs régions. Sur une observation des 30 dernières années comparée aux dates de vendanges entre le XVIII<sup>ème</sup> siècle et le XX<sup>ème</sup> siècle, une précocité de 2 à 3 semaines a été observée (Stock et al., 2004). Dans le sud de la France, pour les appellations Châteauneuf du Pape et Tavel, par rapport à la période 1945 – 2000, les dates de vendanges ont été avancées de 18 et 21 jours respectivement. Le même phénomène a été observé en Alsace où les températures annuelles moyennes ont augmenté de 1,8 °C de 1972 à 2002. En conséquence, dans cette région, les vendanges ont été avancées en moyenne de 2 semaines (Duchêne and Schneider, 2008). La maturation précoce des raisins rend le moment approprié de la récolte difficile à choisir. Deux choix sont alors possibles : privilégier une maturité technologique optimale ou privilégier la maturité phénologique donnant lieu à des moûts avec une forte concentration en sucre. Cette forte concentration en sucre va conduire à des concentrations élevées

en éthanol qui peuvent entraîner un certain nombre de problèmes microbiologiques, technologiques, sensoriels, de santé publique et économiques.

## 4.1. Problématiques

### 4.1.1. Problèmes microbiologiques

L'augmentation de la concentration en sucre peut conduire à une inhibition de la croissance des levures due à un stress osmotique trop important et affecter la qualité du vin. La réponse de *S. cerevisiae* à un stress osmotique est souche-dépendante (Erasmus et al., 2004; Ferreira et al., 2006) et peut conduire à la formation de glycérol et d'acide acétique à des concentrations élevées (Kontkanen et al., 2004; Nurgel et al., 2004). Ceci peut s'expliquer par une forte activation des gènes impliqués dans la régulation de la voie de la glycolyse et des pentoses phosphates face au stress osmotique (Erasmus et al., 2003). Les levures NS pourraient également être affectées par cette augmentation de la concentration en sucre et produire certains composés indésirables. En plus de la concentration en sucre élevée, la température de vinification va influencer la biodiversité levurienne au cours de la fermentation (Alonso-del-Real et al., 2017). En effet, plus la température de fermentation sera élevée, plus la prédominance de *S. cerevisiae* sera importante (Figure 22). Or, il apparaît maintenant que les levures NS jouent un rôle important dans le profil aromatique du vin. Ainsi, la maîtrise de la température s'avère être indispensable, ce qui engendre d'autres problématiques technologiques.

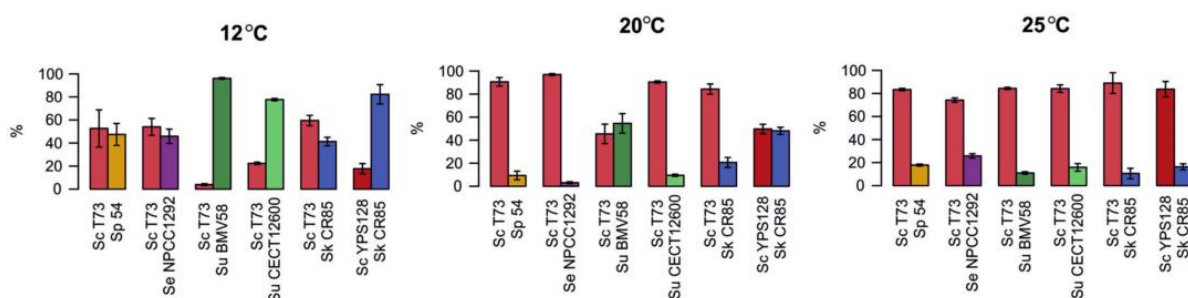


Figure 22 : Présence de *S. cerevisiae* (Sc) et des souches non-*Saccharomyces* (Sp : *S. paradoxus*, Su : *S. uvarum*, Se : *S. eubayanus* et Sk : *S. kudriavzevii*) en co-fermentation à différentes températures. Les valeurs sont la moyenne de trois répétitions. Les barres d'erreur représentent l'écart type (Alonso-del-Real et al., 2017).

### 4.1.2. Problèmes technologiques

Généralement, les fermentations en vin blanc sont réalisées entre 18 et 20°C et celles des rouges entre 28 et 30°C. Parfois, pour les vins blancs très aromatiques, la température lors de la fermentation peut être de l'ordre de 10 à 15 °C. La fermentation alcoolique est une succession de réactions biochimiques produisant de la chaleur (processus exothermique). Une valeur

approximative de 24 kcals par mole de sucre est généralement acceptée comme valeur de référence de l'énergie libérée sous forme de chaleur lors de la fermentation. Bien entendu, le volume de la cuve, la surface de contact avec l'air, la température de fermentation et la température extérieure sont autant de facteurs pouvant influencer cette valeur (Colombié et al., 2005). Il apparaît donc que l'augmentation de la concentration en sucre va conduire à des besoins énergétiques plus importants pour refroidir les moûts en fermentation. Pour évaluer cette augmentation de coût, le programme de simulation de fermentation alcoolique (Simulation Of Alcoholic Fermentation program, SOFA) a été utilisé (Tableau 4).

Tableau 4 : Simulation des besoins énergétiques de refroidissement maximum et total en fonction des différentes concentrations de sucre initiales, des températures de fermentation extérieures ou définies en utilisant le programme SOFA (Goelzer et al., 2009).

| Sugar<br>[g l <sup>-1</sup> ] | Exterior temperature<br>[°C] | Fermentation temperature<br>[°C] | Peak cooling requirement<br>[kW] | Difference<br>[%] | Total cooling requirement<br>[kW h] | Difference<br>[%] |
|-------------------------------|------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-------------------|-------------------------------------|-------------------|
| 200                           | 20                           | 15                               | 3.16                             | 0.0               | 392                                 | 0.00              |
| 220                           | 20                           | 15                               | 3.17                             | +0.40             | 434                                 | +10.77            |
| 240                           | 20                           | 15                               | 3.18                             | +0.70             | 478                                 | +21.85            |
| 200                           | 22                           | 15                               | 3.29                             | +4.27             | 429                                 | +9.51             |
| 200                           | 24                           | 15                               | 3.43                             | +8.54             | 466                                 | +18.96            |
| 220                           | 22                           | 15                               | 3.30                             | +4.67             | 476                                 | +21.52            |
| 240                           | 24                           | 15                               | 3.45                             | +9.20             | 573                                 | +46.08            |

Ce modèle suggère une augmentation linéaire d'environ 5% de l'énergie totale nécessaire pour le refroidissement à chaque degré d'augmentation de la température extérieure ou tous les 10g/L de sucre d'augmentation dans le moût. Pris ensemble, ces deux paramètres montrent bien là un effet synergique. Au cours de la fermentation alcoolique, l'énergie nécessaire au maintien de la température sera donc un aspect technique à ne pas négliger puisque les coûts énergétiques seront sensiblement plus élevés.

#### 4.1.3. Problèmes sensoriels

Les vins à forte concentration en éthanol (entre 13 et 15% v/v) sont de plus en plus présents sur le marché. Les critiques suivent la même tendance avec une description de plus en plus fréquente de vins puissants et chauds. Des études sensorielles ont fourni des informations plus détaillées sur le rôle de l'éthanol au niveau de la perception des arômes. Il a été rapporté auprès de 24 sujets formés que l'augmentation de l'éthanol dans une certaine mesure permettait d'améliorer la perception suave du sucre et de réduire la perception acide ou salée (Goldner et al., 2009). Dans une autre étude, un vin blanc préalablement désalcoolisé puis ajusté en éthanol (de 8 à 14% v/v) a permis de mettre en évidence que là aussi, avec l'augmentation de la concentration en éthanol, la perception de l'acidité était réduite (Fischer and Noble, 1994). Cependant, une augmentation de 3% v/v d'éthanol équivaut à un ajout de 1400 mg/L de catéchine à un vin en contenant à l'origine 100 mg/L. Ceci démontre que l'éthanol augmente significativement la perception de l'amertume (Martin and

Pangborn, 1970; Fischer and Noble, 1994). La perception des composés aromatiques va également être influencée par la concentration en éthanol. Il a été montré que des concentrations accrues en éthanol réduisaient l'équilibre des principaux composés aromatiques (alcools supérieurs, esters, monoterpènes et pyrazines) dans l'espace de tête (Robinson et al., 2009). L'effet d'un excès d'éthanol a donc plusieurs effets sur la perception sensorielle. Tout d'abord, l'éthanol crée un stimulus à part entière en activant les récepteurs trijumeau dans la bouche et la gorge (Rothe and Schrödter, 1996). Ensuite, l'éthanol modifie la polarité de la phase liquide et provoque des changements dans le coefficient de partage de nombreux composés aromatiques, en particulier les composés les plus hydrophobes (Conner et al., 1998). Enfin, au-dessus de certaines concentrations, les caractéristiques visuelles du vin peuvent être modifiées. En effet, en raison des effets de tensions de surface et de l'évaporation de l'éthanol, des motifs distinctifs de gouttelettes lacrymales peuvent être plus ou moins présents sur la surface du verre.

#### 4.1.4. Problèmes de santé publique et économiques

La consommation excessive d'alcool peut être à l'origine de plusieurs maladies du foie, du système nerveux ou du système cardiovasculaire (INSERM, 2001). De nombreuses campagnes de préventions dans plusieurs pays attirent l'attention sur les risques à consommer trop d'alcool. D'après l'observatoire Français des Drogues et des Toxicomanies (OFDT), le « coût social » annuel de l'alcool pour la société est de 120 milliards d'euros principalement dû aux pertes en vie humaines (49 000 décès par an environ). En conséquence, l'émergence sur le marché de vins de plus en plus concentrés en éthanol pourrait impacter les modèles de consommation. De plus, aux USA, la taxe fédérale sur l'alcool passe de 1,07\$ à 1,57\$ par gallon lorsque le vin possède une concentration en éthanol supérieur à 14% (v/v), soit une augmentation de 47%. Cette concentration est maintenant largement rencontrée dans les pays producteurs des régions chaudes. Cette taxation est même encore plus importante dans certains états des USA comme l'Ohio, le Minnesota et le Nouveau-Mexique. De plus des seuils de 13 à 14% (v/v) d'alcool peuvent conduire à des tarifs douaniers plus élevés au Canada et en Nouvelle-Zélande (Mira de Orduña, 2010).

#### 4.2. Solutions pour réduire la concentration en éthanol des vins

Dans la gestion des vignobles, la stratégie la plus évidente pour réduire la concentration en alcool est de réduire la teneur en sucre dans les raisins. Une des stratégies est d'augmenter le rendement de production de grappes de raisin. Ceci est possible à l'aide d'une augmentation de la charge de bourgeons en choisissant un porte-greffe vigoureux. Cependant, l'augmentation du rendement doit être soigneusement évaluée et modulée afin de limiter les éventuels effets nuisibles sur la qualité du

vin. Une autre stratégie consiste à réduire la vigueur des ceps par une augmentation de l'irrigation, de l'intensité d'égavage et de l'utilisation de nouveaux génotypes. Cela permet d'obtenir de petites baies de bonne qualité à un niveau de maturité inférieur en termes de concentration en sucres. L'augmentation de l'irrigation pose tout de même des problèmes. Outre le problème d'augmentation des volumes d'eau utilisés en culture, cette stratégie doit être extrêmement bien maîtrisée et réalisée à des moments précis du cycle de phénologie de la vigne. Cela permet de diminuer la concentration en sucre sans visiblement modifier la composition des moûts (Junquera et al., 2012). D'autres techniques sont applicables comme limiter le flux de CO<sub>2</sub> en pulvérisant un anti-transpirant sur les feuilles en post-véraison ou encore limiter la photosynthèse en construisant des panneaux solaires au-dessus des vignes.

#### 4.2.1. Technique pré-fermentaire

Cette stratégie consiste à dégrader une partie des sucres présents dans le moût à l'aide d'une réaction enzymatique. L'enzyme utilisée est une glucose oxydase (GOx) (EC 1.1.3.4). Cette enzyme est une glycoprotéine aérobie avec une activité déshydrogénase qui catalyse l'oxydation du β-D-glucose en D-glucono-1,5-lactone. Cette réaction nécessite la présence d'oxygène et d'un cofacteur d'oxydo-réduction, la flavine adénine dinucléotide (FAD/FADH<sub>2</sub>) qui participe au transfert d'électron pour donner le peroxyde d'hydrogène. Généralement, une deuxième enzyme est ajoutée dans les préparations commerciales pour dégrader le peroxyde d'hydrogène qui est formé comme sous-produit pendant l'oxydation du substrat. Enfin, la D-glucono-1,5-lactone s'hydrate spontanément pour former de l'acide gluconique (Schmidtke et al., 2012) (Figure 23).

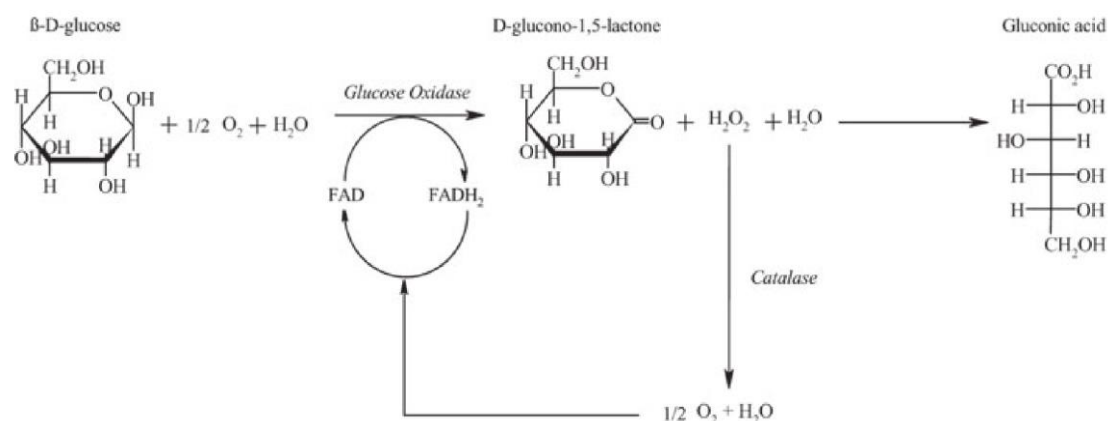


Figure 23 : Oxydation du β-D-Glucose en D-glucono-1,5-lactone par la GOx puis hydratation du D-glucono-1,5-lactone pour former l'acide gluconique. La catalase permet de dégrader le peroxyde d'hydrogène formé pendant l'oxydation du glucose.

En pratique, ce traitement permet de diminuer de 4 à 40% la concentration en éthanol dans le vin. L'efficacité de l'oxydation du glucose dépend de la concentration de l'enzyme, du pH, de la

concentration en oxygène dissous, du temps de traitement et de la température (Pickering, 2000). Cependant, les niveaux élevés d'acide gluconique s'avèrent être problématiques dans la composition finale du vin puisque que cet acide augmente l'acidité totale et participe ainsi au déséquilibre du vin (Pickering et al., 1999). Pour pallier ce problème, la désacidification du moût avec du carbonate de calcium avant le traitement avec la GOx peut être nécessaire. Mais dans tous les cas, pour les vins traités à la GOx, la concentration en composés carbonylés est plus élevée ce qui se traduit par une teneur nettement plus élevée en dioxyde de soufre. Par conséquent, la concentration totale de dioxyde de soufre des vins traités à la GOx peut approcher et même dépasser les limites légales (Pickering et al., 1999). Un autre effet négatif du traitement du moût à la GOx est la sensibilité accrue des vins à subir un brunissement prématuré probablement dû à la production de flavonoïdes (Pickering et al., 1999).

#### 4.2.2. Techniques post-fermentaires

Deux grands principes permettent d'éliminer l'éthanol dans le vin. Le premier est la distillation avec ou sans vide et le second passe par le transport de l'éthanol à travers une membrane semi-perméable. Plusieurs technologies ont été développées à propos des membranes semi-perméables permettant l'élimination sélective de l'éthanol, mais la plus couramment utilisée est l'osmose inverse.

Théoriquement, la séparation de deux solutions de concentration inégale par une membrane semi-perméable établit un gradient de pression entre elles. Alors, la solution la moins concentrée va avoir tendance à migrer vers la solution la plus concentrée pour rétablir l'équilibre du potentiel chimique. Cependant, lorsqu'il est appliqué une pression supérieure à la pression osmotique du côté de la solution la plus concentrée, cette dernière va avoir tendance à migrer vers la solution la moins concentrée. Ce principe est appelé osmose inverse. Par conséquent, la concentration de la solution la moins concentrée diminue et la concentration de la solution la plus concentrée augmente. Par conséquent à l'aide de cette méthode plusieurs niveaux de filtration sont possibles en ajustant la taille des pores de la membrane semi-perméable et la pression appliquée (Figure 24).

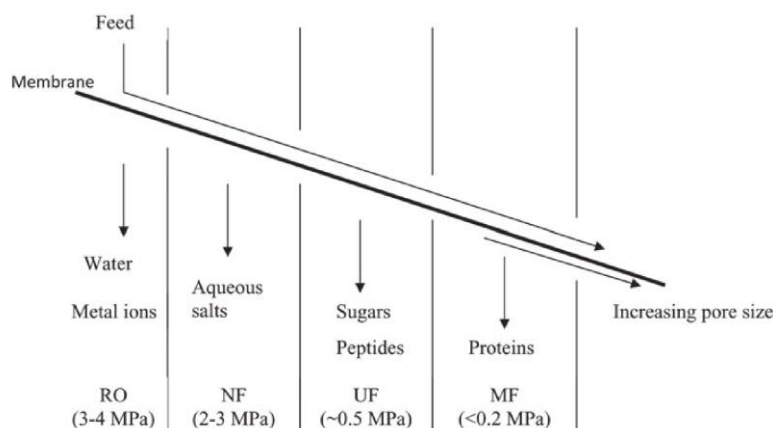


Figure 24 : Capacité de séparation de différents systèmes membranaires à différents niveaux de pressions (entre parenthèses). RO : osmose inverse, NF : nanofiltration, UF : ultrafiltration, MF : microfiltration (Schmidtke et al., 2012).

Concrètement, la désalcoolisation des vins par osmose inverse fait intervenir au départ l'utilisation d'un vin à teneur en alcool « normale ». Ce vin est pompé à des pressions allant jusqu'à 4 MPa à travers un module de membrane. De telles pressions peuvent aboutir à des températures élevées à la surface de la membrane. Pour éviter de dégrader le vin, des échangeurs de chaleur régulant la température entre 20 à 22°C sont utilisés. La membrane utilisée possède un niveau de sélection généralement inférieur à 200 Da, de sorte que l'eau et l'éthanol, étant de petites molécules, traversent la membrane dans le courant de perméat (solution ayant passé la membrane). Le rétentat (solution retenue par la membrane) est redirigé vers le réservoir d'alimentation puis le vin refait un cycle. A chaque cycle, il est ainsi désalcoolisé et concentré (Schmidtke et al., 2012). A la fin du procédé, la teneur en eau du vin est réajustée par l'ajout de jus à faible concentration en sucre. Cette technique permet de désalcooliser totalement le vin puisque l'éthanol n'est présent qu'à une concentration négligeable (0,19% (v/v) en moyenne) à la fin du processus (Liguori et al., 2013). Il est rapporté que l'effet de la désalcoolisation sur le vin est négligeable pour les principales propriétés chimiques et physiques comprenant les phénols totaux, les flavonols, les esters, l'acide tartrique et les acides organiques. Cependant, la fraction volatile du vin diminue de façon significative (Liguori et al., 2013) ce qui a des conséquences négatives sur les arômes qui constituent un élément essentiel d'un produit de qualité.

#### 4.2.3. Nouvelle application biotechnologique des levures NS

Comme il a été précédemment décrit, les domaines d'applications des levures NS sont multiples. Certaines d'entre elles peuvent également diminuer la concentration en éthanol. Plusieurs études ont montré qu'il était possible de diminuer la concentration en éthanol de l'ordre de 0,3% (v/v) à 3,8% (v/v) (Tableau 5) suivant des conditions de culture bien définies (Ferraro et al., 2000; Contreras et al., 2014b, 2015; Gobbi et al., 2014; Ciani et al., 2016). Une étude a même réussi à atteindre une

diminution de 4% (v/v) d'éthanol comparée à une fermentation avec *S. cerevisiae* (Shekhawat et al., 2016). Seulement la concentration en acidité volatile atteinte était de plus de 2 g/L, ce qui n'est pas organoleptiquement envisageable.

Tableau 5 : Réduction de la concentration en éthanol en co-fermentation ou fermentation séquentielle de plusieurs souches de levures NS (Varela and Varela, 2019)

| Non-Saccharomyces yeast <sup>a</sup> | Scale and conditions of fermentation | Grape variety        | Ethanol reduction <sup>b</sup> | Impact on chemical composition or sensory attributes <sup>c</sup>                                                                          | References |
|--------------------------------------|--------------------------------------|----------------------|--------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <i>Candida sake</i>                  | Lab-scale                            | Tempranillo          | 2.4% v/v                       | Increased sorbitol, low production of ethyl esters. No sensory analysis reported                                                           | [62]       |
| <i>Candida stellata</i>              | Medium-scale                         | Chardonnay           | 0.7% v/v                       | Increased glycerol concentration, decreased 'floral' and 'fruity', increased 'ethyl acetate' sensory descriptors                           | [63]       |
| <i>Candida stellata</i>              | Pilot-scale immobilized cells        | Trebbiano            | 0.6% v/v                       | Increased glycerol and succinic acid content, decreased esters and higher alcohols. No sensory reported                                    | [64]       |
| <i>Candida zemplinina</i>            | Pilot-scale aeration                 | Riesling             | 0.8% v/v                       | Decreased 'purity' and increased 'oxidation' and 'solvent' sensory attributes                                                              | [53]       |
| <i>Hanseniaspora opuntiae</i>        | Medium-scale                         | Pinotage             | 0.6% v/v                       | Increased 'hazelnut', 'coffee', 'caramel', 'cherry' and 'acetone' sensory descriptors                                                      | [65]       |
| <i>Hanseniaspora uvarum</i>          | Medium-scale                         | Pinotage             | 0.8% v/v                       | Increased 'hazelnut', 'coffee', 'caramel', 'cherry' and 'acetone' sensory descriptors                                                      | [65]       |
| <i>Lachancea thermotolerans</i>      | Lab-scale                            | Tempranillo          | 1.2% v/v                       | Reduced 'aromatic intensity' and 'aromatic quality', increased 'herbaceous' character                                                      | [51]       |
| <i>Lachancea thermotolerans</i>      | Industrial-scale                     | Sangiovese           | 0.7% v/v                       | Increased 'spicy' and 'acidity' sensory attributes                                                                                         | [66]       |
| <i>Metschnikowia pulcherrima</i>     | Lab-scale                            | Chardonnay           | 0.9% v/v                       | Increased concentration of esters and higher alcohols, decreased volatile acids content. No sensory reported                               | [67]       |
| <i>Metschnikowia pulcherrima</i>     | Lab-scale                            | Shiraz               | 1.6% v/v                       | Increased concentration of higher alcohols, decreased volatile acids content. No sensory reported                                          | [67]       |
| <i>Metschnikowia pulcherrima</i>     | Lab-scale immobilized cells          | Verdicchio           | 1.4% v/v                       | Increased geraniol and acetaldehyde content. No sensory reported                                                                           | [68]       |
| <i>Metschnikowia pulcherrima</i>     | Lab-scale aeration                   | Malvasia/Viura blend | 2.2% v/v                       | No volatile composition or sensory analysis reported                                                                                       | [52]       |
| <i>Metschnikowia pulcherrima</i>     | Pilot-scale                          | Merlot               | 1.0% v/v                       | Decreased 'brown tint' and increased 'red fruit aroma' sensory attributes                                                                  | [39]       |
| <i>Metschnikowia pulcherrima</i>     | Pilot-scale aeration                 | Riesling             | 3.8% v/v                       | Decreased 'purity' and 'fruity', and increased 'vinegar', 'oxidation' and 'solvent' sensory attributes                                     | [53]       |
| <i>Metschnikowia pulcherrima</i>     | Pilot-scale Aeration                 | Viura-Malvasia       | 0.8% v/v                       | Increased glycerol content, decreased 'tropical fruit' and 'white fruits', and increased 'oxidation' sensory attributes                    | [54]       |
| <i>Pichia guilliermodii</i>          | Pilot-scale aeration                 | Riesling             | 2.0% v/v                       | Decreased 'purity' and 'fruity', and increased 'vinegar' and 'reductive' sensory attributes                                                | [53]       |
| <i>Pichia kluyveri</i>               | Pilot-scale aeration                 | Riesling             | 3.0% v/v                       | Decreased 'purity' and 'fruity', and increased 'vinegar', 'oxidation' and 'solvent' sensory attributes                                     | [53]       |
| <i>Schizosaccharomyces pombe</i>     | Medium-scale                         | Airen                | 0.7% v/v                       | Decreased malic acid concentration, increased 'bitterness' and decreased 'acidity' sensory attributes                                      | [69]       |
| <i>Starmerella bacillaris</i>        | Lab-scale                            | Barbera              | 0.7% v/v                       | Increased glycerol content. No volatile composition or sensory analysis reported                                                           | [70]       |
| <i>Starmerella bacillaris</i>        | Pilot- scale                         | Barbera              | 0.5% v/v                       | Increased glycerol content. No volatile composition or sensory analysis reported                                                           | [70]       |
| <i>Starmerella bacillaris</i>        | Pilot- scale                         | Barbera              | 0.3% v/v                       | Reduced concentration of higher alcohols. No sensory analysis reported                                                                     | [71]       |
| <i>Starmerella bombicola</i>         | Lab-scale immobilized cells          | Verdicchio           | 1.6% v/v                       | Increased ethyl acetate and isoamyl acetate concentration. No sensory reported                                                             | [68]       |
| <i>Torulaspora delbrueckii</i>       | Pilot-scale                          | Airen                | 0.3% v/v                       | Increased 'aromatic intensity' and 'fruity' sensory attributes                                                                             | [72]       |
| <i>Torulaspora delbrueckii</i>       | Pilot-scale Aeration                 | Viura-Malvasia       | 0.5% v/v                       | Increased glycerol content, decreased 'tropical fruit' and 'white fruits', and increased 'reduction' and 'dried fruits' sensory attributes | [54]       |

<sup>a</sup> Depending on the study non-Saccharomyces yeasts were used in single, sequential or simultaneous inoculation.

<sup>b</sup> Ethanol concentration compared to control wines fermented with *S. cerevisiae*.

<sup>c</sup> Chemical composition or sensory attributes compared to control wines fermented with *S. cerevisiae*.

La capacité de réduction en éthanol est souche-dépendante. De plus, dans toutes ces études (Tableau 5), la stratégie utilisée est une inoculation séquentielle. La levure NS est inoculée en premier puis au bout d'un certain temps de fermentation (variant suivant les études), *S. cerevisiae* est introduite pour terminer la fermentation. Les levures NS ne possédant pas le même rendement en production d'éthanol (plus élevé), la concentration en éthanol en fin de fermentation s'en retrouve diminuée. Cependant, là encore un paramètre important est à prendre en compte. En effet, la concentration cellulaire lors de l'inoculation initiale de la levure NS varie selon les études. Or, il a été montré que cette concentration cellulaire initiale pouvait influencer la capacité des levures NS à diminuer la concentration en éthanol. Par exemple, la souche de *Metschnikowia pulcherrima* sélectionnée dans l'étude de Contreras et collaborateurs en 2014, inoculée à  $10^6$  cellules/mL permettait de diminuer la concentration en éthanol de 1,8% (v/v) alors qu'avec des inoculations plus élevées aucune diminution n'a été observée.

#### 4.2.4. Fermentation en condition aérobie : principe du bioréacteur

La gestion de l'oxygène des levures NS semble être un point essentiel pour la diminution de l'éthanol, ce qui suggère que ces levures seraient le plus efficaces dans des conditions favorisant un métabolisme respiro-fermentaire (Shekhawat et al., 2016; Englezos et al., 2018b). La maîtrise de l'apport en oxygène s'avère essentielle dans le cadre de la mise en place d'un bioprocédé impliquant le développement de la biomasse, dans notre cas, les levures. Outre la géométrie du bioréacteur qui influence la capacité de transfert de l'oxygène gazeux sous forme dissoute (Gupta and Rao, 2003), les milieux de cultures utilisés sont des matrices complexes et suivant la composition du milieu, la solubilité de l'oxygène est affectée (Gogate and Pandit, 1999) (toutes conditions égales par ailleurs). Par conséquent, le transfert d'oxygène est très important et est fréquemment une étape limitante dans les bioprocédés en milieux liquides. Pour cette raison, au cours de la procédure de conception de la méthode de fermentation, une estimation correcte du coefficient de transfert de l'oxygène est indispensable.

En raison de sa faible solubilité dans les milieux de cultures, l'oxygène doit être fourni en continu. Ce transfert de l'oxygène gazeux vers sa forme dissoute est défini sous le terme « taux de transfert d'oxygène » ou *Oxygen Transfer Rate* (OTR). Plusieurs résistances sont rencontrées au cours de ce transfert gaz – liquide (Ben-Hassan et al., 1991)(Figure 25).

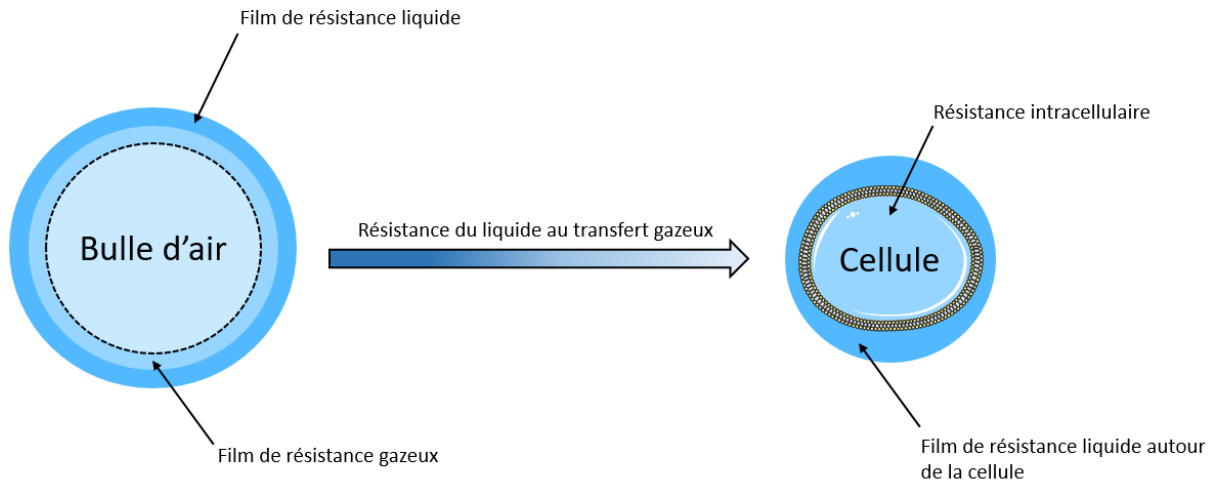


Figure 25 : Principe général de résistance du transfert de l'oxygène à travers un liquide pour atteindre une cellule (adapté d'après Ben-Hassan et al. (1991)).

La théorie la plus simple de transfert gaz-liquide repose sur le modèle de Whitman (1923). Ce modèle décrit chaque film de résistance comme le produit de la force motrice par le coefficient de transfert de masse. Plus précisément, le coefficient de transfert de masse est une constante de vitesse de diffusion qui relie le débit de transfert de masse, la zone de transfert de masse et le changement de concentration. Ainsi, le modèle peut être résumé par l'équation 1 :

$$J^0 = k_G \times (P_G - P_i) = k_L \times (C_i - C_L) \quad (1)$$

Où  $J^0$  correspond au flux molaire de l'oxygène ( $\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) à travers l'interface gaz-liquide,  $k_g$  et  $k_L$  aux coefficients de transferts de masse locaux,  $P_G$  la pression partielle d'oxygène dans la bulle de gaz et  $C_L$  la concentration en oxygène dissous dans le liquide. L'indice  $i$  se réfère aux valeurs à l'interface gaz-liquide. Or, les concentrations entre les films ne sont pas directement mesurables et compte tenu du coefficient global de transfert de masse, l'équation 1 peut être réécrite sous la forme :

$$J^0 = K_G(P_G - P^*) = K_L \times (C^* - C_L) \quad (2)$$

Où  $P^*$  correspond à la pression partielle de l'oxygène en équilibre avec la phase liquide et  $C^*$  à la concentration de l'oxygène (dissous) en saturation dans le liquide en équilibre avec la phase gazeuse, en accord avec la loi de Henry où  $P^* = HC^*$ . Cette loi explique qu'à température constante et à l'équilibre, la quantité de gaz dissout dans un liquide ( $C^*$ ) est proportionnelle à la pression partielle qu'exerce ce gaz sur le liquide ( $P^*$ ). Dans cette formule,  $H$  aussi nommé « constante de Henry » va dépendre de la nature du gaz, de la température et du liquide. Les facteurs  $K_G$  et  $K_L$  correspondent ici aux coefficients globaux de transfert de masse.

Combinées, les équations (1) et (2) permettent d'obtenir la relation suivante (3) :

$$\frac{1}{KL} = \frac{1}{HkG} + \frac{1}{kL} \quad (3)$$

Compte tenu de la faible solubilité de l'oxygène dans le milieu, il est communément admis que la plus grande résistance au transfert de masse se situe du côté liquide de l'interface et que la résistance en phase gazeuse peut être négligée. Dans ces conditions, il peut être considéré que le coefficient global de transfert de masse d'oxygène est égal au coefficient local d'où  $K_L = k_L$ . Le taux de transfert de masse d'oxygène par unité de volume ( $N_{O_2}$ ) est alors obtenu en multipliant le flux global par la surface gaz-liquide ( $a$ ) :

$$N_{O_2} = a \times J^0 = k_L a \times (C^* - C_L) \quad (4)$$

Il est extrêmement difficile de mesurer à la fois «  $K_L$  » et «  $a$  » au cours d'une fermentation et généralement les deux termes sont combinés sous le terme  $K_L a$ . Le  $K_L a$ , appelé coefficient volumétrique de transfert, est exprimé en  $h^{-1}$  ou  $s^{-1}$  et permet de mesurer la capacité d'aération d'un bioréacteur. Plus le  $K_L a$  est élevé, plus la capacité d'aération du bioréacteur est importante. La valeur du  $K_L a$  va dépendre de l'architecture du bioréacteur et sera affectée par des variables telles que le niveau d'agitation, la forme de l'hélice d'agitation, le débit d'aération, la température, la pression ou encore la taille des bulles.

En définitive, la relation qui lie l'OTR et le  $K_L a$  peut être résumée par l'équation 5 :

$$OTR = K_L a \times (C^* - C_L) \quad (5)$$

Afin de déterminer le meilleur débit à délivrer pour que le transfert d'oxygène soit optimal, la vitesse de transfert de l'oxygène gazeux dans le milieu ( $k_L a$ ) est évaluée. Cette valeur est une constante ainsi, lors du transfert dans un plus gros bioréacteur, cette valeur permet d'obtenir des résultats semblables à ceux obtenus en laboratoire. Dans un premier temps, la méthode statique permet d'obtenir une valeur de  $K_L a$  dans un milieu sans micro-organismes. Cette première étape permet de déterminer rapidement quels couples agitation/aération permettent d'obtenir le  $K_L a$  le plus élevé et de déterminer le comportement de la matrice, c'est-à-dire à quelle vitesse l'oxygène gazeux passe sous forme dissoute dans le milieu. Une fois ces couples sélectionnés, un nouveau test est réalisé pour vérifier la valeur du  $K_L a$  en présence de microorganismes. Cette étape s'appelle la détermination du  $K_L a$  par méthode dynamique. Lors de cette étape, le taux de consommation de l'oxygène du micro-organisme ( $OUR$ ) est déterminé. Ainsi, connaissant la vitesse de consommation de l'oxygène du micro-organisme et la capacité du bioréacteur à transférer l'oxygène il sera alors possible d'évaluer si le bioréacteur est en capacité de fournir assez d'oxygène pour couvrir les besoins en oxygène du micro-organisme (Garcia-Ochoa et al., 2010).

Le bilan massique de l'oxygène dissous dans la phase liquide peut alors être décrit comme suit :

$$\frac{dC}{dt} = OTR - OUR \quad (6)$$

Où  $dC/dt$  correspond au taux d'oxygène accumulé dans la phase liquide,  $OTR$  représente le taux de transfert d'oxygène gazeux vers le liquide et  $OUR$  correspond au taux d'absorption d'oxygène par les micro-organismes. Ces éléments déterminés à l'échelle laboratoire permettront de dimensionner les besoins en oxygénation à l'échelle pilote.



## Problématique et objectifs de la thèse

---

Les axes de recherche suivis au cours de ce projet de thèse visaient à mieux comprendre l'importance de l'azote au cours de fermentations séquentielles impliquant certaines levures NS et *S. cerevisiae*. L'étude du lien entre la consommation de l'azote dans de telles conditions de fermentation et la modification du profil aromatique des vins a été entreprise. Enfin, la mise en œuvre des levures NS comme nouvel outil de réduction de la concentration en alcool dans les vins a été explorée.

Afin de faciliter la lecture de cette thèse, suite à l'introduction bibliographique, il est proposé une organisation sous forme de compilation de trois articles scientifiques avec, pour chaque entête de chapitre, une description de la réflexion scientifique entreprise.

Dans ce cadre, suite à la synthèse menée dans le cadre de l'introduction bibliographique, il est apparu que de nombreuses contradictions existaient à propos de l'implication de l'azote lors de la fermentation alcoolique. Le premier objectif a alors consisté à réaliser un état de l'art approfondi, visant à réactualiser les connaissances concernant ce sujet. Ce point constitue le premier chapitre :

- Influence du contenu en azote dans la fermentation alcoolique.

Cet état de l'art, met en évidence le peu de données disponibles concernant les levures NS à propos de l'azote alors que cette source joue un rôle crucial dans le développement levurien et que les levures NS sont de plus en plus utilisées en œnologie. C'est pourquoi l'objectif suivant de cette thèse a été d'étudier la compétition pour les sources azotées dans le cadre d'une fermentation séquentielle mettant en œuvre trois souches de levure NS préalablement sélectionnées :

- Etude de la compétition pour les sources azotées entre les levures NS sélectionnées et *S. cerevisiae* au cours de la fermentation alcoolique. Evaluation des répercussions sur les composés volatils.

L'identification et la quantification des besoins azotés des levures (chez *S. cerevisiae* et les levures NS sélectionnées) ont largement contribué à développer une étude sur l'utilisation des levures NS pour la réduction de la concentration en alcool des vins. Bien que des recherches soient menées sur ce point et que plusieurs résultats soient disponibles, il reste encore des zones d'ombre quant au comportement des souches en co-culture, leurs besoins nutritionnels et leur mise en œuvre à l'échelle pilote et non plus en laboratoire. Le dernier objectif de cette thèse a donc été de mettre au point une méthode technologiquement mature avant un transfert industriel. Ce point constitue le dernier axe de recherche :

- Mise au point d'un procédé biotechnologique utilisant les levures NS afin de réduire la concentration en éthanol dans les vins au cours de la fermentation alcoolique.



---

## Chapitre 1 : Influence du contenu en azote dans la fermentation alcoolique

---

## Contexte scientifique

La confrontation des données réalisée dans l'introduction bibliographique met en évidence un certain nombre de contradictions à propos de l'implication de l'azote lors de la fermentation alcoolique. Il s'avère que les systèmes de régulations impliqués dans le métabolisme de l'azote chez *S. cerevisiae* sont à l'heure actuelle bien décrits (Bell and Henschke, 2005; Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012; Zhang et al., 2018) mais très peu existent pour les levures NS (Andorrà et al., 2010; Kemsawasd et al., 2015; Gobert et al., 2017; Englezos et al., 2018a). Il en va de même pour les considérations œnologiques où les facteurs influençant l'assimilation des YAN et les implications d'un ajout d'azote exogène sont peu clairs. Face à l'importance de l'azote en fermentation, une remise en question d'un certain nombre de concepts (notamment les sources azotées préférentiellement assimilées) a été conduite. Afin d'identifier et de répertorier ces contradictions, ce premier chapitre fait un état des connaissances vis-à-vis de l'influence du contenu en azote lors de la fermentation alcoolique.

Dans le cadre de ce chapitre une partie additionnelle est proposée. En effet, la composition et la concentration en YAN dans le moût sont inévitablement liées aux conditions environnementales et à la vigne. C'est pourquoi, un avant- propos portera sur l'azote contenu dans les moûts.

## Avant-propos : Nitrogen content in must

### 1.1. Diversity from geographical location

Depending on grape cultivar, rootstock, vineyard location, fertilization method or climate, amino acid and ammonium concentration may vary (Henschke and Jiranek, 1993; Spayd et al., 1994; Rapp and Versini, 1995; Stines et al., 2000; Ribéreau-Gayon et al., 2006; Schreiner et al., 2017). In 2005, Bell and Henschke reviewed composition and concentration of amino acids found in the whole grape and/or juice at harvest. They showed that the concentration of each amino acid varies significantly and generally, the major amino acid is arginine or proline. Based on 11 studies dating from 1980 to 2001, Bell and Henschke compared musts from vineyard using soil amendments and vineyard without fertilization. To conclude on the natural diversity and concentration of YAN this comparison can be questionable. On that basis, a comparison of total natural YAN concentration had been undertaken. This comparison was based on the geographical location and variety of 6 studies in Europe (Figure 26A) and 12 studies for the rest of the world (Figure 26B, C and D). From data available in literature, Trincadeira and Roupeiro localised in Portugal had the most important concentration in YAN (between 1000 and 1485 mgN/L). In contrast, Monastrell, Petit Verdot, White Riesling, Viognier, Merlot and Pinot Noir localised in Spain and North America, show a very weak YAN concentration (50 to 82 mgN/L). For these musts, YAN concentration will be critical to perform an alcoholic fermentation with a good biomass generation and maintenance of fermentative activity (Bely et al., 1990; Henschke and Jiranek, 1993; Mendes-Ferreira et al., 2004; Coleman et al., 2007; Martínez-Moreno et al., 2012). On the same work, during the 1996 harvest, Butzke et al (1998) analyzed 1523 clarified musts from the regions of California, Oregon and Washington on the West Coast of the United States of America. They showed that on 1523 samples, 198 were under 140 mg N/L and they showed significant difference between the means of YAN from different varieties. In this study, Cabernet Franc must had the lowest concentration in YAN while Chardonnay and Pinot noir were highest (Butzke, 1998). From these studies, it appears that nitrogen content in must is heterogeneous and can be insufficient in a significant number of situations.

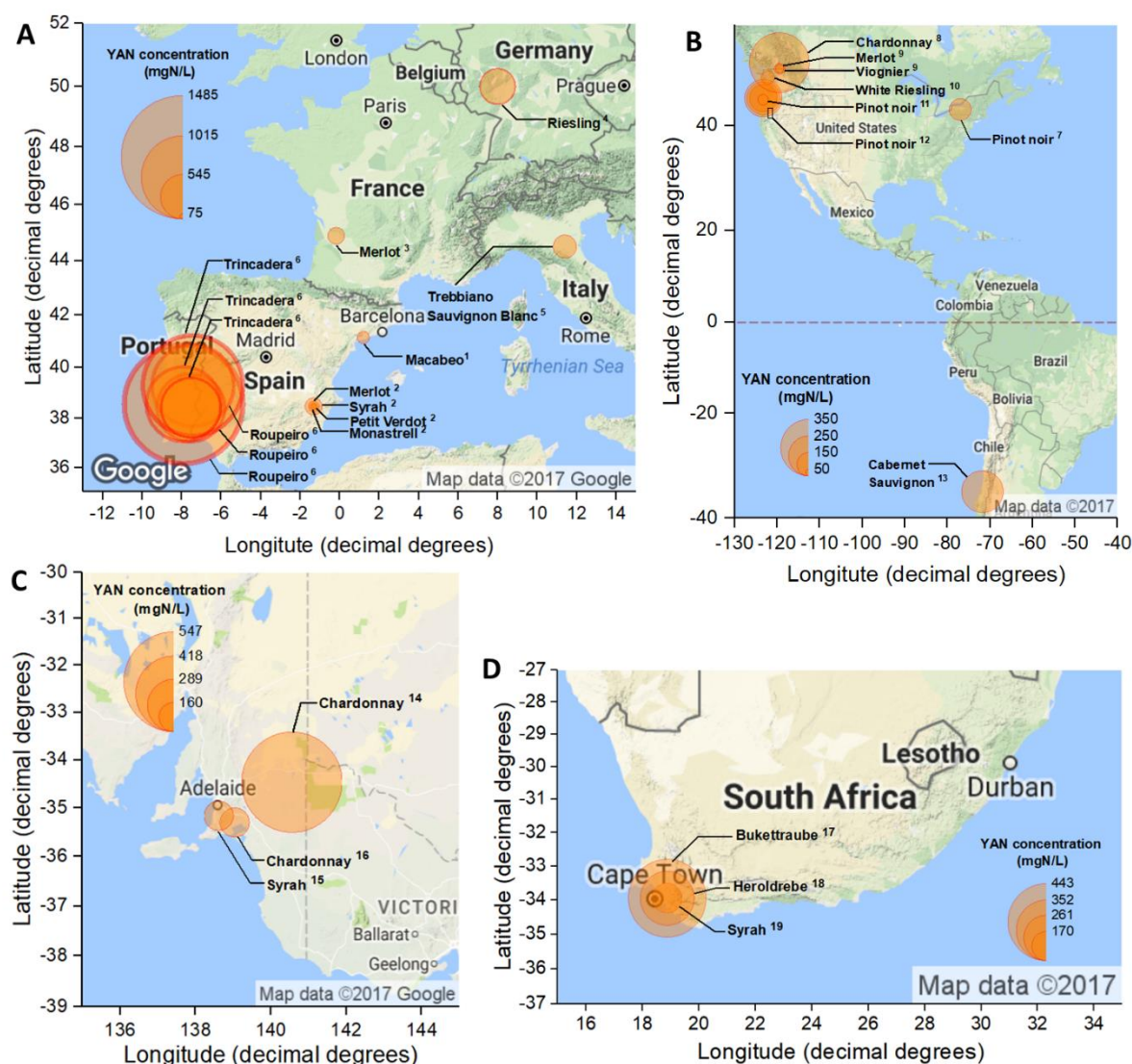


Figure 26: Overview of assimilable nitrogen from natural grape juice in Europe (A), America (B), Australia (C) and South Africa (D). For each item, legend give YAN concentration in mg N/L. 1: (Andorrà et al., 2010), 2: (Garde-Cerdan et al., 2009), 3: (Van Leeuwen et al., 2000), 4: (Linsenmeier et al., 2008), 5: (Cejudo-Bastante et al., 2010), 6: (Herbert et al., 2005), 7: (Watson et al., 2000), 8: (Adams and van Vuuren, 2010), 9: (Hannam et al., 2014), 10: (Spayd et al., 1994), 11: (Keller et al., 1999), 12: (Schreiner et al., 2017), 13: (Gutiérrez-Gamboa et al., 2017b), 14: (Treeby et al., 1998), 15: (Contreras et al., 2014b), 16: (Torrea et al., 2011), 17: (Conradie, 2001), 18: (Whitener et al., 2017).

## 1.2. The choice of harvest date

Independently of geographical localisation, the date of harvest conditions YAN concentration. These compounds vary during grape ripening. A decrease of the concentration of ammonium nitrogen was observed on several varieties (Monastrell, Syrah, Merlot and Petit Verdot) during a two years study (Garde-Cerdan et al., 2009). At the same time, the concentration of free amino acids was increased in Monastrell, Syrah and Merlot, whereas in Petit Verdot it decreased. On this point, it is important to

note that grafted or ungrafted vine influences grape amino acid composition (Gutiérrez-Gamboa et al., 2017a), regardless of the variety. In this study, Carignan noir grapevines grafted over País showed lower grape amino acid content in respect to ungrafted vines. Temperature during nights have also an impact on the final amino acids content. Indeed, one month before the period of harvest, cool night index (CI) was inversely correlated to several amino acids, showing that plant synthesis or accumulation increased with lower minimum temperatures (Gutiérrez-Gamboa et al., 2017b). Thus, the monitoring of nitrogen dynamic in grapes can be an important enological parameter for the determination of the best ratio ammonium/amino acids in order to start harvest, depending on variety, temperature, YAN accumulation and kinetics. Harvesting decision is a critical parameter in terms of YAN and influences widely the nitrogen composition in the must.

### 1.3. Irrigation

Water management is another parameter influencing YAN composition. In warm dry areas, in response to drought, significantly elevated proline levels were demonstrated for the Syrah grape wine (Canoura et al., 2017). Elevated levels of proline could be synonymous of water stress. To avoid this stress, irrigation management in the vineyard can be used to control berry growth and quality. In general, most quality wines are produced in areas where annual precipitation is below 700 to 800 mm. Mimicking this quantity of precipitation by irrigation modulates amino acid composition in must. However can it explain the quality of the wine? Ortega-Heras et al (2014) observed that irrigation caused the increase of most amino acids concentrations in the berries of the Verdejo cultivar. But in the same time, it was shown that vintage had a strong effect on the content in grapes which appeared to be related to weather conditions (Ortega-Heras et al., 2014). On these observations, Bouzas-Cid et al. (2017) showed that irrigation can affect the concentration of proline, cysteine, tryptophan and phenylalanine in the Treixadura must, over three consecutive vintages (2012-2014). In this case, not only an increase was observed but also a decrease in the condition with irrigation for some amino acids (Bouzas-Cid et al., 2017). From these data, it appears that irrigation can influence YAN composition (and not only increase) of the must even if variety and weather conditions during the year seem to be the principal incriminated elements.

### 1.4. Fertilization

For a long time, it has been known that nitrogen fertilization increases fruit yield in situations where vine nitrogen status is low (Bell et al., 1979; Spayd et al., 1993, 1994; Bell and Robson, 1999). Depending variety, fertilization needs can be different. It appears that a maximum of 112 Kg N/ha for Cabernet Sauvignon (Bell and Robson, 1999), 185 kg N/ha for Thompson Seedless (Bell et al., 1979)

and 56 kg N/ha for White Riesling (Spayd et al., 1993) were sufficient to improve vine vigor (growth kinetic, canopy density and yield). This fertilization and the time where fertilization is carry out impact YAN concentration (Conradie, 2001; Linsenmeier et al., 2008). Indeed, YAN concentration increased linearly with increasing nitrogen fertilizer rate except for methionine, cystine, aspartic acid, glutamic acid and lysine (Spayd et al., 1994; Linsenmeier et al., 2008). For example, in the case of White Riesling without fertilization (Spayd et al., 1994), arginine concentration was 26 mg/L while in fertilizer condition (224 kg N/ha) the concentration was 327 mg/L. However, for cysteine the concentration in non-fertilizer and fertilizer condition stayed under 1 mg/L. In contrast to soil fertilization, a fertilization by the canopy (foliar fertilization) can be another alternative. With this method, nitrogen addition is rapidly and efficiently assimilated by the plant (Mengel, 2002). But like soil fertilization, excessive nitrogen levels could induce poorly colored fruit and produced more vegetative growth, which can compete with sugar translocation and pigment accumulation in grape (Kliewer, 1977). Commonly, urea is used like nitrogen sources for foliar application on account of its small molecular size, non-ionic nature and high solubility in water. Lasa et al. (2012) showed that the impact of foliar fertilization on YAN composition in the must was not the same depending on variety. These authors showed that Merlot was more affected than Sauvignon Blanc. Moreover, it seems that vintage effect has a significant impact on assimilation of nitrogen by the vine and for the final concentration of YAN in the must. Indeed, in the second year of the study (Lasa et al., 2012), the difference was even more marked. In another study, Hannam et al. (2016), tested the impact of the urea foliar (2% w/v) or urea soil fertilization around veraison (13.5 kg N/ha) with three treatments on Pinot gris. Results showed that foliar fertilization was usually more effective at boosting grape juice YAN concentration, although soil fertilization improved some grape juice amino acids (Hannam et al., 2016). Recently, new nitrogen treatments (in addition to urea) have been developed by industry. Their effectiveness on vine and impact on YAN composition in Cabernet Sauvignon must were studied by Gutiérrez-Gamboa et al. (2017). They tested two commercial nitrogen complexes: Basfoliar Algae and Nutrimyr Thiols. Basfoliar Algae is a concentrated extract of Chilean natural algae (*Durvillaea antarctica*) supplemented with nutrients, minerals and phytohormones (auxins and cytokinins) and Nutrimyr Thiols is a foliar fertilizer which was sold as a wine flavor enhancer (Gutiérrez-Gamboa et al., 2017b). Compared to control fertilization with urea, no significant increase of YAN was observed with Nutrimyr Thiols and Basfoliar Algae. But YAN composition in the must was modified. For example, concentrations of glutamine, threonine, arginine, alanine and valine were higher with Basfoliar Algae even if the total YAN concentration was lower.

Soil or canopy fertilization influences significantly YAN must composition and concentration if the nitrogen requirements of the vine are not covered. Depending on variety, fertilization level needs to

be adapted. Moreover, the nitrogen source used to fertilize the vine will impact the composition of YAN in must. In addition, vintage effect is also a determinant parameter influencing YAN level in the must.

## Revue scientifique : Influence of nitrogen status in wine alcoholic fermentation

Journal: Food microbiology (Status : *published*) <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.04.008>

**Antoine Gobert<sup>1\*</sup>, Raphaëlle Tourdot-Maréchal<sup>1</sup>, Céline Sparrow<sup>2</sup>, Christophe Morge<sup>2</sup>, and Hervé Alexandre<sup>1</sup>**

UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques, Université de Bourgogne Franche-Comté/ AgroSup Dijon - Equipe VALMiS (Vin, Aliment, Microbiologie, Stress), Institut Universitaire de la Vigne et du Vin Jules Guyot, Université de Bourgogne, Dijon, France.

<sup>2</sup>SAS Sofralab – 79, Av. A.A. Thévenet – BP 1031 – Magenta, France.

### **\*Correspondence:**

Antoine Gobert

[antoinegobert1@gmail.com](mailto:antoinegobert1@gmail.com)

**Keywords: nitrogen, amino acids, ammonium, alcoholic fermentation, yeasts, wine, volatile compounds.**

### **Abstract**

Nitrogen is an essential nutrient for yeast during alcoholic fermentation. Nitrogen is involved in the biosynthesis of protein, amino acids, nucleotides, and other metabolites, including volatile compounds. However, recent studies have called several mechanisms that regulate its role in biosynthesis into question. An initial focus on *S. cerevisiae* has highlighted that the concept of “preferred” versus “non-preferred” nitrogen sources is extremely variable and strain-dependent. Then, the direct involvement of amino acids consumed in the formation of proteins and volatile compounds has recently been reevaluated. Indeed, studies have highlighted the key role of lipids in nitrogen regulation in *S. cerevisiae* and their involvement in the mechanism of cell death. New winemaking strategies using non-*Saccharomyces* yeast strains in co- or sequential fermentation improve nitrogen management. Indeed, recent studies show that non-*Saccharomyces* yeasts have significant and specific needs for nitrogen. Moreover, sluggish fermentation can occur when they are associated with *S. cerevisiae*, necessitating nitrogen addition. In this context, we will present the consequences of nitrogen addition, discussing the sources, time of addition, transcriptome changes, and effect on volatile compound composition.

## 1.5. Introduction

The main sources of yeast assimilable nitrogen (YAN) in grape must are ammonium and amino acids. Their concentrations vary depending on geographical location (Rapp and Versini, 1995), climate (Ribéreau-Gayon et al., 2006), cultivar or rootstock (Stines et al., 2000; Schreiner et al., 2017), and viticulture techniques (Spayd et al., 1994; Schreiner et al., 2017). During alcoholic fermentation, yeast take up and metabolize YAN and other nutrients to support growth and produce biomass, as well as volatile compounds (Vilanova et al., 2007). YAN deficiency can sometimes lead to sluggish or stuck fermentation (Alexandre and Charpentier, 1998; Bisson, 1999). Under enological conditions, a concentration of approximately 140 mg N/L of YAN is necessary to complete fermentation within a reasonable period of time (Bely et al., 1990; Henschke and Jiranek, 1993; Jiranek et al., 1995; Bisson, 1999; Beltran et al., 2005; Kemsawasd et al., 2015), depending on sugar concentration and winemaking practices.

During alcoholic fermentation, the consumption of YAN by yeast is regulated by several molecular mechanisms, which have been well described in *Saccharomyces cerevisiae*. The most recent reviews on the subject date back to 2005 and 2012 (Bell and Henschke, 2005; Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012) and only one review on nitrogen regulation was been recently published (Zhang et al., 2018). The authors examined several studies on the role of nitrogen metabolism under enological conditions. Most studies have classified YAN as “preferential or non-preferential sources”, depending on the alcoholic fermentation conditions, strains used, and classification method (Jiranek et al., 1995; Beltran et al., 2006; Crépin et al., 2012; Kemsawasd et al., 2015; Gobert et al., 2017; Rollero et al., 2018). The comparison of the studies previously cited highlighted significant differences. Such differences could be due to the complexity of nitrogen regulation, which depends on substrate availability, strain phenotype and matrix.

Recent interest in non-*Saccharomyces* (NS) yeasts in spontaneous fermentation (Combina et al., 2005; Cordero-Bueso et al., 2013; Jolly et al., 2014; Liu et al., 2016) and co- or sequential fermentation (Soden et al., 2000; Clemente-Jimenez et al., 2005; Anfang et al., 2009; Ciani et al., 2010; Medina et al., 2013; Padilla et al., 2017; Englezos et al., 2018a) add a second level of complexity to nitrogen management under enological conditions. Despite the large body of literature concerning the use of NS yeasts to increase the aromatic complexity of wine (Lambrechts and Pretorius, 2000; Swiegers and Pretorius, 2005; Sadoudi et al., 2012, 2017; Azzolini et al., 2014; Liu et al., 2016; Escribano et al., 2018), improve ethanol reduction (Contreras et al., 2014b, 2015; Gobbi et al., 2014; Canonico et al., 2016; Ciani et al., 2016; Englezos et al., 2016a; Röcker et al., 2016; Rolle et al., 2017), or act as bio-protection/control agents in winemaking (Qin et al., 2015; Fernandes Lemos

Junior et al., 2016; Cordero-Bueso et al., 2017; Simonin et al., 2018; Wang et al., 2018), little data on nitrogen needs, sources, and preferences are available and have never been reviewed (Andorrà et al., 2010; Kemsawasd et al., 2015; Gobert et al., 2017). In addition, only one study (Englezos et al., 2018a) has highlighted specific features of one NS yeast, *Starmerella bacillaris*, concerning the management of nitrogen.

Aromatic complexity is an essential aspect of wine quality and largely influences consumer acceptance (Lattey et al., 2010; King et al., 2011). Volatile compounds, an essential element of overall wine flavor, are formed during alcoholic fermentation. The relationship between nutrient availability and the production of desirable volatile compounds is one of the main goals in enology and industry. Some YAN sources have been reported to be precursors of volatile compounds in *S. cerevisiae* (Ribéreau-Gayon et al., 2006; Carrau et al., 2008; Hazelwood et al., 2008; Fairbairn et al., 2017) and non-*Saccharomyces* (González et al., 2018) principally *via* the Ehrlich pathway (Hazelwood et al., 2008; González et al., 2018). However, contrary to the generally accepted view, recent studies have shown that the catabolism of consumed branched amino acids (leucine, isoleucine, threonine and valine) plays an indirect role in the formation of some volatile compounds in *S. cerevisiae* (Crépin et al., 2017; Rollero et al., 2017). Precisely, Crépin et al. (2017) demonstrated the low contribution of the carbon skeletons of consumed amino acids to the production of volatile compounds derived from  $\alpha$ -keto acids. Lipid and nitrogen metabolism are interconnected and affect the production of some volatile compounds (Rollero et al., 2016, 2017). The aforementioned studies have shown that there may be a direct relationship between nitrogen sources and the production of volatile compounds and that it may involve more complex mechanisms than those reported to date.

Although a large diversity of YAN content and concentration in must can be found during enological processes, ammonium phosphate or ammonium sulfate are commonly added to YAN deficient must. YAN supplementation directly affects biomass production and the performance of alcoholic fermentation (Varela et al., 2004; Martínez-Moreno et al., 2012). However, although it is clear that YAN impact volatile compounds production, the mechanisms implicated seem to be indirect and need to be more investigated. It has been demonstrated that the use of an amino-acid mix for must supplementation increases the rate of alcoholic fermentation more than ammonium phosphate or sulfate addition, with sometimes less production of undesirable volatile compounds (Martínez-Moreno et al., 2012; Kevvai et al., 2016; Fairbairn et al., 2017).

## 1.6. YAN metabolism in yeast

### 1.6.1. *Saccharomyces cerevisiae*

#### 1.6.1.1. Transporters and general regulation in *Saccharomyces cerevisiae*

Although diverse yeast species are used in the first step of winemaking (Barata et al., 2012; Gilbert et al., 2014; Capozzi et al., 2015), many studies have focused on the nitrogen metabolism of *S. cerevisiae* (Grenson et al., 1974; Mitchell, 1985; Jiranek et al., 1995; Stanbrough and Magasanik, 1995; Hazelwood et al., 2008; Crépin et al., 2012, 2017) and many reviews have focused on its metabolism (Henschke and Jiranek, 1993; Horák, 1997; Bell and Henschke, 2005; Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012; Ramos et al., 2016). Here, we will only provide a brief general description of *S. cerevisiae* nitrogen metabolism, with a focus on recent studies. The readers can refer to the above-cited articles for an in-depth description of *Saccharomyces cerevisiae* nitrogen metabolism

In *S. cerevisiae*, YAN is transported into the cell by various specific or non-specific permeases. Ammonium, which represents a significant proportion of nitrogen sources, is transported by three permeases: Mep1p, Mep2p, and Mep3p. The Mep2 protein displays the highest affinity for ammonium, followed closely by Mep1p and finally Mep3p, of which the affinity is much lower (Marini et al., 1997). These transporters consist of uniport systems.

Amino acids are assimilated by various, more or less, selective transporters. Amino-acid permeases (AAPs) are active symport systems (Kotyk, 1994; Ramos et al., 2016). Among them, the general amino-acid permease (Gap1) allows the transport of all amino acids. Other AAPs are more selective and transport only one or a group of amino acids (Ramos et al., 2016). These permeases are regulated by several mechanisms. The first is located on the plasma membrane and forms a complex called Ssy1p-Ptr3p-Ssy5p (SPS). This complex induces an endoproteolytic processing event in response to the extracellular amino-acid status, which activates the transcription of AAP genes (Figure 1) (Andréasson and Ljungdahl, 2004; Ljungdahl, 2009).

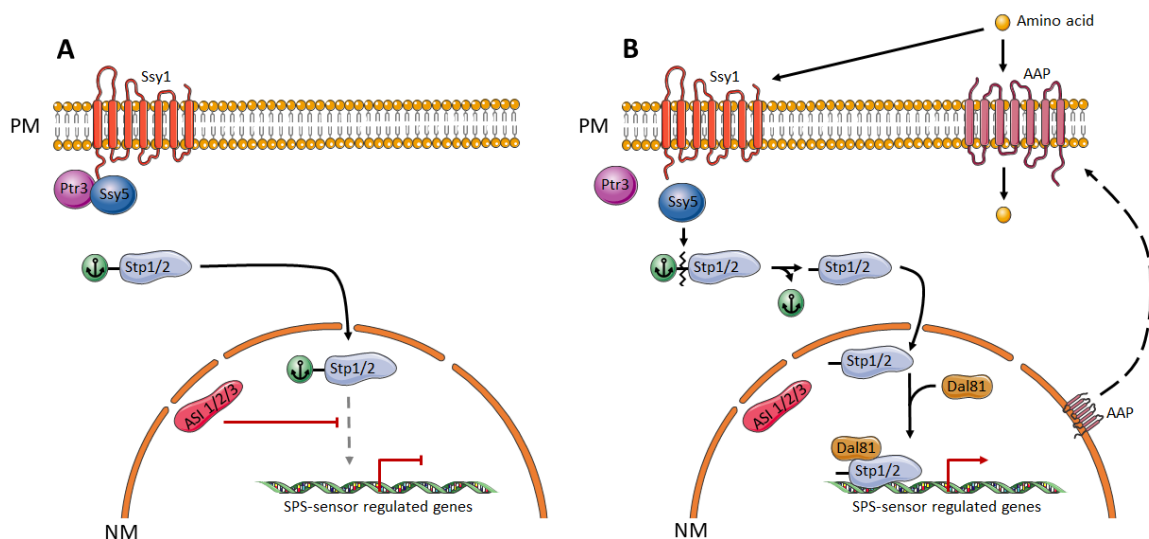


Figure 27 (1 manuscript) : (A) The non-induced resting state in the absence of inducing amino acids. In the absence of inducing amino acids, low levels of AAPs are present in the plasma membrane (PM). NM, nuclear membrane. (B) The induced state in the presence of extracellular amino acids. The derepressed AAP gene expression leads to increased levels of AAP in the PM and enhanced rates of amino acid uptake (adapted from Ljungdahl et al. (2009)).

Nitrogen catabolite repression (NCR) is another regulatory system used by *S. cerevisiae*. Currently, *GAP1*, *CAN1*, *PUT4*, *DIP5*, *UGA4* (amino acids permeases) and *MEP1*, *MEP2*, *MEP3* (ammonium permease) are known to be under the control of this regulatory system (Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012). This system leads the yeast to selectively utilize preferred sources of nitrogen when they are available. Conversely, general de-repression of the genes regulated by the NCR system leads the cell to nonspecifically use other sources of nitrogen in the absence of a preferential nitrogen source. The classification of nitrogen source preferences is not absolute and their repressive effects can vary substantially between yeast strains (Magasanik and Kaiser, 2002). The expression of genes encoding NCR-sensitive AAPs is regulated by complex pathways involving multiple transcription factors with activating or inhibitory effects. The target of these transcription factors is the UAS<sub>NTR</sub> activation sequence, located upstream of the promoter of genes encoding NCR-sensitive AAPs. This element consists mainly of two distinct dodecanucleotide sites with a pentanucleotide consensus sequence 5'-GATATA-3'. A pair of Dal80/Uga43 proteins and three Gat1, Ure2, Gln3 proteins have been identified and reported to participate in the regulation of NCR-sensitive gene expression across the UAS<sub>NTR</sub> element (Cunningham et al., 1996). However, results from a more recent study suggests that Ure2p and GATA transcription factors (Gln3, Gat1, Dal80 and Gzf3 transcription factors) are involved (Georis et al., 2009). Thus, in the study of Cunningham et al. (1996), Gln3p and Gat1p were factors that allowed the activation of NCR-sensitive gene transcription. The factors Dal80/Uga43 are

proteins that block the binding site of the Gln3 and Gat1 factors. Ure2 sequesters Gln3 and Gat1 proteins in the cytoplasm. In the study of Georis et al. (2009), Gln3 and Gat1 were shown to be activators of NCR-sensitive gene expression. However, there are differences at the level of the repression systems. Georis et al. (2009) showed that Dal80 and Gzf3, but not Uga43, were blocking proteins of the UAS<sub>NTR</sub> binding site. Ure2 was shown to have the same role in both studies (Figure 2).

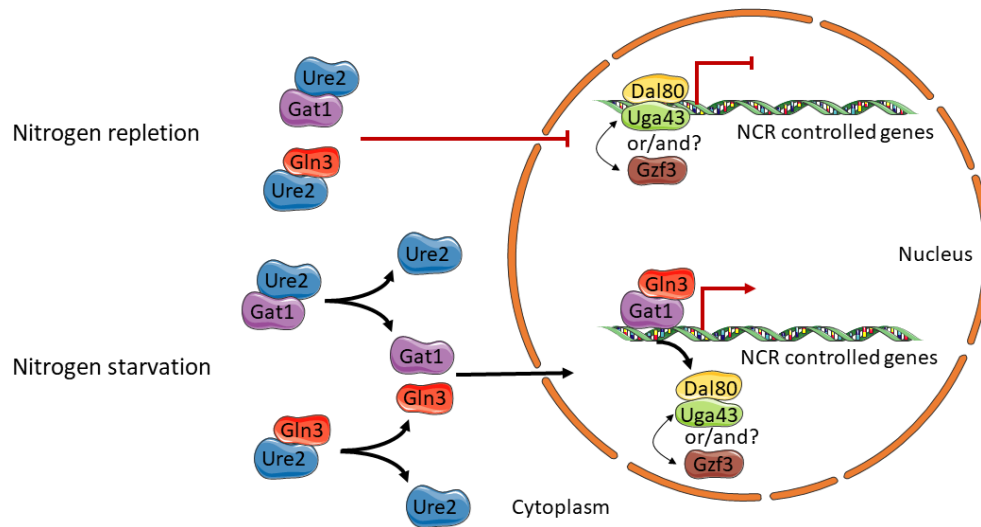


Figure 28 (2 manuscript): Translocation into the nucleus of Gat1p/Gln3p complex depending on nitrogen status. In nitrogen repletion condition, Gat1p and Gln3p are sequestered by Ure2p in the cytoplasm. Dal80p and/or Gzf3p block the UAS<sub>NTR</sub> binding site. In nitrogen starvation condition, Ure2p releases Gat1p and Gln3p and the complex migrates into the nucleus. Dal80p/Uga43p and/or Gzf3p release the UAS<sub>NTR</sub> binding site and Gat1p/Gln3p complex activates the transcription of NCR controlled genes.

In *S. cerevisiae*, the NCR system is controlled by the target of the rapamycin pathway (TOR), which is comprised of two complexes, TOR complex 1 (TORC1) and TOR complex 2 (TORC2). Only TORC1 is involved in the control of the NCR system. This aspect will not be discussed further here, as nitrogen metabolism, including the regulation of sensing, transport, and catabolism was recently extensively reviewed by Zhang et al. (2018). However, a study showed that *TORC1*-mediated control of NCR is only partial (Fayyad-Kazan et al., 2016). The authors investigated the regulation of the NCR system by glutamate and glutamine, major nitrogen sources for biosynthesis. The results showed a negative role of the anabolic glutamate dehydrogenase (Gdh1) on Gat1 and Gln3 (transcriptional activators of NCR genes) activity under repressive nitrogen conditions. Thus, preferred nitrogen sources may trigger NCR-sensitive gene repression or *TORC1* activation, probably through transient glutamine accumulation.

More broadly, global gene expression is strongly influenced by the concentration of nitrogen during fermentation. In synthetic must under conditions of low nitrogen, genes mainly associated with protein synthesis and RNA and nucleic acid metabolism are downregulated at the beginning of fermentation (24 to 48 h) (Mendes-Ferreira et al., 2007). In contrast, genes involved in energy generation, carbohydrate metabolism, oxidoreductase activity, respiratory chain phosphorylation, transporter activity, respiration, response to oxidative stress, oxygen, and reactive oxygen species metabolism are upregulated. This expression profile is sustainable, as the genes expressed at the end of fermentation are fundamentally the same as those expressed early in the yeast cell response (Mendes-Ferreira et al., 2007). Under the same conditions, Barbosa et al. (2015) showed that gene expression varies highly among yeast strains, depending on nitrogen availability (low or high concentration), fermentation stage, and the interaction of the two factors. In particular, the high fermenter yeast strain (*S. cerevisiae* UCD522) used in this study showed high expression of 333 genes involved in transport and phosphate metabolism throughout fermentation under conditions of low nitrogen. In contrast, 246 genes were more highly expressed, including flocculation genes, under conditions of high nitrogen (Barbosa et al., 2015). In addition, transcriptional regulation can be affected by the nitrogen source. In 2006, Boer et al., evaluated the transcriptional response of *S. cerevisiae* in glucose-limited chemostat culture in synthetic must. Phenylalanine, leucine, methionine, and proline were used as “non-preferred” nitrogen sources and asparagine and ammonium as “preferred” nitrogen sources. A group of 23 genes was upregulated during growth on “non-preferred” sources. Among them, six are involved in the metabolism of the “non-preferred” nitrogen sources allantoin and urea (*DAL1*, *DAL2*, *DAL5*, *DUR1*, *DUR2*, *DUR3*) and five encode transporters for nitrogen-containing compounds (*GAP1*, *PTR2*, *MEP2*, *MEP3* and *OPT2*). This group also included the GATA factor. From these 23 genes, 14 were established as NCR targets (Boer et al., 2006).

#### 1.6.1.2. Classification of “preferred” and “non-preferred” nitrogen sources in *Saccharomyces cerevisiae*

The phenotypic diversity of *S. cerevisiae* concerning YAN preferences correlates with the presence of genetic variants (Salinas et al., 2012; Gutiérrez et al., 2013a; Cubillos et al., 2017). Currently, three methods are used to classify YAN as “preferred” or “non-preferred” nitrogen sources. The first, used since the 80’s and 90’s, considers the consumption rate, specific growth rate, and kinetics of fermentation (Grenson, 1983, 1992; Henschke and Jiranek, 1993; Jiranek et al., 1995). The second is based on the response of the NCR system. YAN that induce the activation of transcription of permeases is considered as “preferred” sources. Crépin et al. (2012) used this method to show that

classification was possible according to the order of assimilation of YAN by *S. cerevisiae*. The last method is based on the response of the SPS system (Boer et al., 2006; Ljungdahl, 2009). YAN sources that induce the activation of transcription of permeases under the control of the SPS mechanism are considered to be “preferred”, as for the method based on NCR regulation.

Studies to classify nitrogen sources preferences have yielded varying results throughout the years. Table 1 reviews all studies that have attempted to rank YAN preferences. Three YAN sources (ammonium, asparagine, and glutamine) have been significantly more often classified as preferred nitrogen sources, regardless of the classification method. In contrast, alanine, GABA, glutamic acid, histidine, and methionine have been the least often classified. Overall, 17 YAN sources can theoretically be considered to be “preferred”. This comparison highlights the difficulty in comparing and determining a pool of preferential YAN. Indeed, in winemaking, the metabolic activity of *S. cerevisiae* can be strongly influenced by the matrix. Authors have used different synthetic grape musts or real musts, coming from different grape varieties. YAN assimilation may be influenced by other nutrients, such as lipids or vitamins, not present at the same concentration under all conditions. Without standardization of the matrix, it is difficult to draw definitive conclusions on the YAN that are preferentially assimilated. In addition, multifactorial abiotic factors (discussed later in this review) need to be considered when categorizing YAN. The effect of the strain is also a variable that must be considered. Each strain of *S. cerevisiae* shows differences in terms of their YAN consumption capacities (Crépin et al., 2012; Cubillos et al., 2017; Brice et al., 2018).

Tableau 6 (Table 1 manuscript): Nitrogen compounds considered to be “preferred” nitrogen sources in *S. cerevisiae*.

| Amino acids   | References                         |
|---------------|------------------------------------|
| Alanine       | 8                                  |
| Ammonium      | 1, 2, 3, 6, 7, 8, 11, 13           |
| Arginine      | 2, 3, 8                            |
| Asparagine    | 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13 |
| Aspartate     | 3, 8                               |
| Aspartic acid | 4, 12                              |
| GABA          | 8                                  |
| Glutamine     | 1, 3, 5, 6, 8, 11, 12, 13          |
| Glutamate     | 8, 11, 13                          |
| Glutamic acid | 4                                  |
| Histidine     | 2                                  |
| Isoleucine    | 3, 12                              |
| Leucine       | 2, 3, 12                           |
| Lysine        | 3, 9, 12                           |
| Methionine    | 3                                  |
| Serine        | 2, 3, 9, 10, 12                    |
| Threonine     | 2, 3, 9, 10, 12                    |

1: (Grenson, 1992), 2: (Henschke and Jiranek, 1993), 3: (Jiranek et al., 1995), 4: (Albers et al., 1996), 5: (Magasanik and Kaiser, 2002), 6: (Görgens et al., 2005), 7: (Boer et al., 2006), 8: (Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012), 9: (Crépin et al., 2012), 10: (Pinu et al., 2014), 11: (Tesnière et al., 2015), 12: (Gobert et al., 2017), 13: (Brice et al., 2018).

Several studies have focused on arginine under fermentation conditions. Although arginine is not considered to be a “preferred” nitrogen source in most studies, it plays a major role in nitrogen metabolism. During the first stage of fermentation, part of the amino-acid content, particularly arginine, localizes to the vacuole. After the complete exhaustion of nitrogen sources at the end of the growth phase, arginine stored in the vacuole is remobilized to maintain the biomass concentration, particularly for low biomass-producing *S. cerevisiae* strains (Crépin et al., 2014). Cheng et al. (2016) showed a relationship between the response of *S. cerevisiae* to arginine and ethanol stress. They showed that the addition of 250 mg/L of arginine under stressful conditions increased the cell density by 2.3-fold over that of the control (Cheng et al., 2016). The same observation was made by Noti et al. (2018). They demonstrated that arginine exerted a positive effect (relative to other amino acids) on the growth and fermentation rate of *S. cerevisiae*. They suggested that arginine exerts this beneficial effect on growth not only because of its nutritional role as a nitrogen source, but also because of its effect as an osmoprotectant (Noti et al., 2018).

#### 1.6.1.3. Nitrogen and volatile compounds metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*

The metabolic network involved in the production of volatile compounds has been well mapped by Styger et al. (2011). They studied genetic factors that affect the conversion of amino acids to aroma compounds, focusing on regulation of the Ehrlich pathway (Hazelwood et al., 2008). They showed that the expression of a cluster of ten genes could be significantly correlated with the production of specific volatile compounds. This cluster could be divided into three categories encoding five dehydrogenases, three decarboxylases, and two reductases. Among the dehydrogenases, *GPD2*, *ADH3*, and *OYE2* play an important role in cellular redox maintenance reactions, whereas *AAD6* and *HOM2* appear to be directly involved in Ehrlich reactions. In particular, *HOM2* catalyzes the second step in the common pathway for methionine and threonine biosynthesis. Its expression is regulated by Gcn4 and the general control of amino-acid synthesis. Other genes, including *PRO2*, which catalyzes the second step of proline biosynthesis, can perform their functions directly on the pathway (Styger et al., 2011). The function of the genes was verified by deletion of those that appeared to most strongly affect the Ehrlich pathway. Deletion of *HOM2* led to the greatest reduction in the concentration of higher alcohols and volatile acids, suggesting that *HOM2* plays a central and direct role in the formation of both the higher alcohols and volatile acids. *PRO2* deletion led to an increase in the levels of fatty acids in strains grown on medium supplemented with

branched-chain amino acids. The authors suggested that *PRO2* plays a different role in the Ehrlich pathway than the other selected genes.

Other molecules, such as volatile thiols, also play an important organoleptic role, especially in white wine. The regulation of production of two volatile thiols, 4-methyl-4-sulfanylpentan-2-one (4MSP) and 3-sulfanyl-hexan-1-ol (3SH), was investigated by Thibon et al. (2008) in synthetic medium. The authors demonstrated that *IRC7*, a gene encoding a putative cystathionine  $\beta$ -lyase, was one of the main genes encoding the protein that catalyzes 4MSP and 3SH release under enological conditions. They also demonstrated that transcriptional regulation of *IRC7* is associated with the NCR system (Thibon et al., 2008). The NCR system is also involved in the regulation of the production of another thiol, 3-mercapto-hexanol (3MH), by modulating the activity of Gap1 (Subileau et al., 2008).

Although many studies have shown a significant correlation between YAN and volatile compounds production (Hernández-Orte et al., 2004, 2006; Hernandez-Orte et al., 2006; Carrau et al., 2008; Fairbairn et al., 2017), recent studies suggest that this link may be much weaker than previously thought (Crépin et al., 2017; Rollero et al., 2017). In a first part, Crépin et al. (2017) showed that the main role of the catabolism of most of the consumed amino acids is to supply nitrogen for the *de novo* synthesis of proteinogenic amino acids in accordance with anabolic requirements. This *de novo* synthesis (provided approximately 60 to 80% of the demand for nearly all amino acids) achieved with the carbon backbones of precursors (mainly  $\alpha$ -keto acids) in addition to ammonium donors. In a second part,  $^{13}\text{C}$  tracer used by authors provided evidence that the carbon intermediates originated primarily from the catabolism of sugars through the central carbon metabolism, while the catabolism of and interconversions between amino acids accounted for a limited portion of the formation of  $\alpha$ -keto acids. Furthermore, a low contribution of the carbon skeletons of consumed amino acids to the production of volatile compounds derived from  $\alpha$ -keto acids was demonstrated (Crepineet al., 2017). Rollero et al. (2017) complemented this study by investigating how variations in nitrogen and lipid resources can influence the contributions of both nitrogen and carbon metabolism to the production of fermentative aromas using filtration experiments with  $^{13}\text{C}$ -labelled leucine and valine nitrogen sources. They showed that only a small fraction of higher alcohols was synthesized using the carbon skeletons of amino acids. Moreover, the quantity of YAN available before fermentation had a strong impact on both metabolic protein synthesis and higher alcohol flux. Under conditions of low nitrogen (70 mg/L), the direct incorporation of exogenous leucine into biomass was limited to 30%. This observation is in accordance with the results of Crépin et al. (2017), which show that consumed amino acids provide an intracellular nitrogen pool for *de novo* synthesis. However, under conditions of moderate (250 mg/L) to high nitrogen (425 mg/L), the direct incorporation of consumed leucine

into biomass reached 70%. This result appears to contradict that of Crépin et al. (2017). However, in this study, a low available YAN condition was tested (180 mg/L of YAN for 240 g/L of glucose). Variations in the concentration of YAN appeared to influence the percentage of direct incorporation of amino acids into biomass formation. Simultaneously, the total production of higher alcohols changed differently, depending on nitrogen availability. Rollero et al. (2017) showed that an increase of nitrogen from 70 to 250 mg/L increases the synthesis of  $\alpha$ -ketoacids via central carbon metabolism, which results in a marked increase in the flux towards the formation of higher alcohols. However, at high concentration of YAN (425 mg/L), intracellular  $\alpha$ -ketoacids are, to a large extent, directed towards the synthesis of amino acids at the expense of higher alcohol formation, resulting in a decrease in the formation of aromas relative to the previous conditions. In opposite, it is indeed well known that the production of higher alcohols is highly affected by the nitrogen concentration and composition of grape must (Beltran et al., 2005; Vilanova et al., 2007; Carrau et al., 2008). Nitrogen starvation increases the production of higher alcohols, probably due to the higher levels of  $\alpha$ -keto acids produced on those conditions, which cannot be transaminated and are in turn converted into higher alcohols.

Nevertheless, the strain under study, use of synthetic medium, concentration of nitrogen sources, temperature, and anaerobic and stirring conditions are all elements to consider in validating the redistribution of YAN into the cell for the *de novo* synthesis of proteinogenic amino acids and the consequences on the production of higher alcohols.

### 1.6.2. Non-*Saccharomyces* yeasts

Nitrogen metabolism of NS yeasts is a recent topic of interest in enology. Little data is available and published studies have never been reviewed. There is also recent biotechnological interest in NS yeasts in winemaking, including their needs, in particular that of nitrogen. The use of NS yeasts in co- or sequential fermentation generally leads to YAN consumption and competition for nitrogen sources with *S. cerevisiae*. These types of fermentation can ultimately lead to sluggish or stuck fermentation (Medina et al., 2012). Consequently, a better comprehensive understanding of the metabolic nitrogen requirements of NS yeasts and their regulation will aid in the control of fermentation. The first studies focused on preferential nitrogen sources of NS yeasts (Andorrà et al., 2010; Kemsawasd et al., 2015; Gobert et al., 2017). As for *S. cerevisiae*, the term “preferential” is questionable for NS yeasts. The difficulty in identifying “preferential” sources lies in that it depends on the strain, fermentation method and classification method (Andorrà et al., 2010; Kemsawasd et al., 2015; Gobert et al., 2017). Available studies provide a first overview of “preferential” nitrogen sources, mainly according to the capacity of NS yeasts to assimilate nitrogen and its rate of consumption. No molecular classification based on the regulation of nitrogen assimilation, such as the NCR or SPS systems (known in *S. cerevisiae*) is currently available. Currently, only one study indicated the presence of the NCR mechanism in *Hanseniaspora vineae* (Lleixà et al., 2019). Table 2 shows the first proposed classification of the various “preferential” nitrogen sources according to NS yeast strain, although such a comparison is not evident. Six NS yeasts have been studied: *H. uvarum*, *L. thermotolerans*, *M. pulcherrima*, *S. bacillaris*, *T. delbrueckii*, and *P. membranifaciens*. Most publications have reported glutamine as the preferred nitrogen source for *H. uvarum*, *L. thermotolerans*, *M. pulcherrima*, and *T. delbrueckii* and leucine for *H. uvarum*, *L. thermotolerans*, and *M. pulcherrima*. However, Gobert et al. (2017) showed a significant effect of fermentation temperature on the assimilation and consumption rates of nitrogen sources. For example, leucine was classified as a “preferred” source at 28°C for *M. pulcherrima*, whereas it was classified as an “intermediate” source at 20°C. This effect has also been observed for *S. cerevisiae* (Beltran et al., 2006). No studies are available to explain this phenomenon, but the recent study of Englezos et al. (2018) on NS yeast *S. bacillaris* provides a first answer. Surprisingly, the strains studied showed poor assimilation of amino acids during alcoholic fermentation relative to that of ammonium, which was entirely consumed. In addition, the production of several amino acids, such as alanine, glutamic acid, glycine, and valine was observed, whereas precedent studies have never reported such production. These results showing the ability of *S. bacillaris* to preferentially consume ammonium suggest less efficient SPS-dependent regulation (based on the *S. cerevisiae* model) of amino-acid permeases or an inhibitory mechanism mediated by ammonium.

Tableau 7 (Table 2 manuscript): Nitrogen compounds considered to be “preferred” nitrogen sources in NS yeasts depending on the conditions of fermentation.

| Amino acids   | NS yeasts      | Condition of fermentation | Ref.    |
|---------------|----------------|---------------------------|---------|
| Alanine       | Hu, Mp, Sb, Td | Grape juice 20°C          | 2, 3    |
|               |                | Grape juice 28°C          |         |
|               |                | Synthetic medium 25°C     |         |
| Ammonium      | Mp, Td         | Synthetic medium 25°C     | 2       |
| Arginine      | Lt, Hu, Td     | Synthetic medium 25°C     | 2       |
| Asparagine    | Lt, Pm, Td     | Grape juice 28°C          | 2, 3    |
|               |                | Synthetic medium 25°C     |         |
| Aspartic acid | Hu, Lt         | Synthetic medium 25°C     | 2       |
| Cysteine      | Hu             | Must 20°C stirring        | 1       |
| Glutamic acid | Hu, Lt, Mp     | Synthetic medium 25°C     | 1, 2    |
|               |                | Must 20°C stirring        |         |
| Glutamine     | Hu, Lt, Mp, Td | Grape juice 20°C          | 1, 2, 3 |
|               |                | Grape juice 28°C          |         |
|               |                | Synthetic medium 25°C     |         |
|               |                | Must 20°C stirring        |         |
| Glycine       | Sb, Pm         | Grape juice 20°C          | 1, 3    |
|               |                | Must 20°C stirring        |         |
| Histidine     | Mp, Pm         | Grape juice 20°C          | 3       |
| Isoleucine    | Lt, Mp, Td     | Grape juice 28°C          | 2, 3    |
|               |                | Synthetic medium 25°C     |         |
| Leucine       | Hu, Lt, Mp     | Grape juice 28°C          | 1, 2, 3 |
|               |                | Synthetic medium 25°C     |         |
|               |                | Must 20°C stirring        |         |
| Lysine        | Mp, Sb, Pm     | Grape juice 20°C          | 3       |
|               |                | Grape juice 28°C          |         |
| Methionine    | Hu, Mp         | Grape juice 28°C          | 1, 3    |
|               |                | Must 20°C stirring        |         |
| Phenylalanine | Hu, Lt         | Synthetic medium 25°C     | 2       |
| Serine        | Lt, Pm         | Grape juice 28°C          | 3, 2    |
| Threonine     | Mp, Pm         | Grape juice 20°C          | 3,      |
| Tryptophan    | Sb             | Must 20°C stirring        | 1       |
| Tyrosine      | Lt             | Synthetic medium 25°C     | 2       |
| Valine        | Hu             | Synthetic medium 25°C     | 2       |

Abbreviations of NS yeasts: Hu: *H. uvarum*, Lt: *L. thermotolerance*, Mp: *M. pulcherrima*, Sb: *S. bacillaris*, Pm: *P. membranifaciens* and Td: *T. delbrueckii*. References 1: (Andorrà et al., 2010), 2: (Kemsawasd et al., 2015), 3: (Gobert et al., 2017)

A significant proportion of YAN can be assimilated by NS yeast strains before the predominance of *S. cerevisiae* in the fermentation process. As a consequence, the growth and fermentation kinetics of *S. cerevisiae* may be negatively affected (Medina et al., 2012; Kemsawasd et al., 2015; Wang et al., 2015; Gobert et al., 2017; Rollero et al., 2018). In particular, Gobert et al. (2017) showed that NS yeasts can consume between 66 and 215 mg/L of YAN, depending on the species. Of course, the rate of consumption can vary, depending on the winemaking methods (spontaneous fermentation, co-inoculation, sequential fermentation, temperature, aeration) and matrix (YAN must composition). Thus, nitrogen deficiencies need to be prevented by nitrogen supplementation to cover the needs of *S. cerevisiae* in the must for optimal alcoholic fermentation.

## 1.7. Factors that influence YAN assimilation

### 1.7.1. Sugar – nitrogen balance

Sluggish or stuck fermentations can be prevented by nitrogen supplementation when using deficient must. Several studies have been performed to determine the optimal nitrogen concentration in must to guarantee complete fermentation (Bely et al., 1990; Henschke and Jiranek, 1993; Jiranek et al., 1995; Alexandre and Charpentier, 1998; Bisson, 1999; Mendes-Ferreira et al., 2004). It is generally accepted that 120 at 140 mg N/L is sufficient (Bely et al., 1990) to complete the fermentation of 200 g/L of sugar. However, the needs may be higher, depending on winemaking practices (Mendes-Ferreira et al., 2004). The ratio of nitrogen to carbon sources during fermentation needs to be balanced to ensure good metabolic activity of the yeast. Several studies have associated nitrogen deficiency with a high turnover rate of sugar transporters in nitrogen-deficient must, resulting in a loss of sugar uptake capacity by the cells (Salmon, 1989; Bisson, 1999). Varela et al. (2004) showed that the rate of carbon uptake in “normal” fermentation was 3.6-fold higher during the exponential phase and 10-fold higher during the late stationary phase than for “sluggish” fermentation. The authors found that nitrogen deficiency affects the glucose transporter turnover rate and the expression of at least one: *HXT1* (low-affinity glucose transporter). Surprisingly, under conditions in which sugar uptake is low, they showed that adding biomass from sluggish cultures (from another tank) not only reduced the time to finish a problematic fermentation but was also less likely to affect the quality of the resulting wine. The higher the concentration of biomass, the quicker the fermentation was completed, even if the cells were grown in nitrogen-deficient medium (Varela et al., 2004; Maisonnave et al., 2013). Biomass formation coupled with macro- and micronutrients, including YAN, appear to be essential parameters involved in the mechanism of sluggish fermentation.

### 1.7.2. *S. cerevisiae* strain effect

In 2012, Crépin et al. showed that the kinetics of YAN consumption were strongly strain- dependent. Fourteen *S. cerevisiae* strains were tested in synthetic medium. The maximum rate of nitrogen consumption was between 16.8 and 27.8 mg N/L/h, which represented 40% of the variability in terms of the kinetics of nitrogen consumption. More recently, Lemos Junior et al. (2017) estimated the YAN needs of seven *S. cerevisiae* vineyard strains in synthetic must using three different YAN concentrations (70 mg N/L, 150 mg N/L, and 300 mg N/L). The authors showed no significant differences in fermentation kinetics at 150 and 300 mg N/L for all but one strain. However, there was a strong decrease in the rate of fermentation at 70 mg N/L. Thus, the fermentation kinetics appears to strongly correlate with the *S. cerevisiae* strain in conventional winemaking. In addition, although YAN supplementation reduced the duration of fermentation in this study, a concentration of 300 mg N/L appears to be the lower limit required for the maximum rate of fermentation. Brice et al. (2018) evaluated the diverse nitrogen needs of *S. cerevisiae* by determining the specific quantity of nitrogen consumed in an environment containing excess nitrogen, eliminating the nitrogen limitation/starvation factor that is generally observed during the fermentation processes. The authors demonstrated that the differences in the capacity of the strains to consume YAN were a result of differences in their ability to uptake specific nitrogen sources. The differences between the strains tested in this study to import nitrogen sources could be explained by mutations in the coding sequences that modulate the activities of the permeases or differences in the expression pattern of genes encoding these transporters.

### 1.7.3. Importance of lipids

Lipids, another nutrient present in must, affect nitrogen metabolism and this topic is reviewed here for the first time. The major fatty acids found in must were variable depending on studies (Gallander and Peng, 1979; Yunoki et al., 2005). However, palmitic, stearic, arachidic, behenic, linoleic and linolenic acids are predominant. Phytosterols are also present in grape berries, predominantly  $\beta$ -systerol. Although lipids (sterols and fatty acids) have been shown to play a key role in maintaining membrane integrity and viability during alcoholic fermentation, no link has yet been reported between lipid and nitrogen assimilation. In 2013, Tesnière et al. evaluated the consequences of nutritional lipid/nitrogen imbalances on wine yeast survival during alcoholic fermentation. The authors showed that yeast cell death during lipid-limited fermentation (using ergosterol as lipid source) was strongly influenced by the nitrogen content of the medium, with high nitrogen availability leading to high rates of cell death. Several amino acids were implicated as toxic

precursors: arginine, glutamate, and glutamine. These observations correlated with the presence of the TOR-associated protein Tco89. High viability during lipid-limited fermentation was restored when the gene encoding this protein was deleted. This study highlights a relationship between the *TORC1* nitrogen signaling pathway and lipid limitation during alcoholic fermentation. Similarly, a study by Rollero et al. (2016) highlighted the role of lipid management in nitrogen metabolism. The addition of phytosterols to low-nitrogen medium influenced the consumption of various nitrogen sources. In particular, the nitrogen sources were most rapidly depleted at the lowest lipid concentration, especially valine, phenylalanine, and leucine. Consistent with these results, in nitrogen-rich medium, phytosterol addition (8 mg/L) increased the consumption rate of nitrogen sources, in particular tyrosine, tryptophan, glutamine, and ammonium. However, this was not true for all tested strains. In the same study, one strain consumed nitrogen more rapidly when the must contained a low concentration of phytosterols (2 mg/L). This effect may be explained by changes in the plasma membrane due to the incorporation of phytosterols. Indeed, the phospholipid composition of the membrane can be influenced and could affect transporter activity, particularly that of the arginine permease Can1p and Gap1p (Malinska et al., 2003; Lauwers and André, 2006).

#### 1.7.4. Temperature

Temperature influences the expression of several genes involved in nitrogen metabolism, particularly that of several transporters. For example, *GAP1* is 5.2-fold down-regulated at 12.5°C relative to 25°C (Deed et al., 2015). However, the transcription of several other genes, such as *ARO9* and *ARO10* (involved in catabolism of phenylalanine and methionine and catabolism of multiple amino acids) is induced (Romagnoli et al., 2012; Deed et al., 2015). In 2006, Beltran et al. showed that *S. cerevisiae* grown at a low temperature (13°C) consumed less nitrogen than at 25°C. Indeed, the consumption of ammonium was 79 mg/L at 25°C and 59 mg/L at 13°C and that of amino acids 67 mg/L at 25°C and 59 mg/L at 13°C. The expression of *GAP1* and *MEP2* was not affected by the difference in temperature during fermentation, except at the end of the fermentation at 13°C, at which point the gene expression levels were higher (Beltran et al., 2006).

#### 1.7.5. Oxygen

Under anaerobiosis, yeast growth normally requires oxygen in order to favour the synthesis of sterols and unsaturated fatty acids. However, in such conditions, superfluous oxygen consumption by yeast cells is observed. The superfluous oxygen consumed by the yeast cells appeared not to be related to classical respiration, but mainly to the operation of several mitochondrial alternative respiration pathways, which were linked to the cell cytochrome contents (Salmon et al., 1998). It was calculated

that approximately 124  $\mu\text{mol}$  oxygen/g biomass were necessary for the synthesis of unsaturated fatty acids (Verduyn et al., 1990). In 2000, Blateyron and Sablayrolles showed that the combined additions of oxygen and DAP during the fermentation was more efficient to avoid a sluggish fermentation than a DAP addition alone. Authors justified that nitrogen had an immediate effect on the kinetics of fermentation by reactivating protein synthesis, particularly sugar transporters, while adding oxygen mainly influenced the kinetics at the end of fermentation, by synthesizing unsaturated fatty acids and sterols and thus increasing the yeast's resistance to ethanol. However, the precedent section showed that lipids and nitrogen metabolisms were interconnected (Tesnière et al., 2013; Rollero et al., 2016). Thus, oxygen by participating in lipid synthesis, influence indirectly nitrogen assimilation by the yeast. This observation was confirmed in a recent study where in low lipids condition in a must, the oxygen addition inducing the biosynthesis of ergosterol and unsaturated fatty acid by yeasts promoting nitrogen assimilation (Ochando et al., 2016). Therefore oxygen plays an important role in the regulation of assimilation of nitrogen.

## 1.8. Management of nitrogen addition

### 1.8.1. Ammonium salts and biotin

During winemaking, ammonium sulfate, ammonium phosphate, or diammonium phosphate are most commonly added. Ammonium salts are generally supplemented with biotin. This vitamin, among others, is required by the urea carboxylase involved in the catabolism of arginine (Cooper, 1982), one of the most abundant amino acids in must (Rapp and Versini, 1995; Boulton et al., 1996; Bell and Henschke, 2005; Bouzas-Cid et al., 2017).

Biotin also plays a role as a cofactor for pyruvate carboxylase, which catalyzes the transformation of pyruvate to oxaloacetate. Oxaloacetate is a precursor of both  $\alpha$ -ketoglutarate and aspartic acid, the key intermediates of nitrogen assimilation, and the synthesis of other nitrogenous compounds (Cooper, 1982; Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012). Although biotin has been reported to be involved in nitrogen metabolism and is largely used in industry, only one study has investigated the influence of nitrogen and biotin interactions on the performance of *S. cerevisiae* in alcoholic fermentation (Bohlscheid et al., 2007). Two strains of *S. cerevisiae* were tested in synthetic must with different biotin (0, 1, and 10  $\mu\text{g/L}$ ) and YAN (60 and 250  $\text{mg/L}$ ) concentrations. Both strains exhibited poor growth and very low fermentation rates without biotin. An increase in nitrogen concentration resulted in higher fermentation rates, whereas adjusting biotin from 1 to 10  $\mu\text{g/L}$  had no effect. Based on this single study, coupled biotin/nitrogen sources appear to be essential for fermentation with nitrogen addition. However, only a low concentration of biotin appears to be necessary (1  $\mu\text{g/L}$ ).

### 1.8.2. Consequences of nitrogen addition on fermentation parameters

It is generally agreed that at least 120–140 mg N/L YAN is required for satisfactory fermentation kinetics and final product quality (Bely et al., 1990; Henschke and Jiranek, 1993). However, several studies have shown that the needs can be higher (Mendes-Ferreira et al., 2004; Coleman et al., 2007; Martínez-Moreno et al., 2012) and can reach 267 mg N/L YAN to ferment 200 g/L glucose. Taillandier et al. (2007) showed that there is an optimal requirement that varies from 0.62 to 0.91 mg N/g of sugar, depending on the strain of *S. cerevisiae*. However, the authors found no correlation between sugar assimilation rates and nitrogen requirement (Taillandier et al., 2007). Thus, in the context of nitrogen addition, the yeast strain, matrix, time of addition and nitrogen sources appear to be critical elements for the optimization of enological parameters. We have collected the main conclusions of the studies concerning nitrogen addition in Table 3. This overview highlights the contradictory nature of the results.

Tableau 8 (Table 3 manuscript) : Comparison between the impact of the timing of addition and nitrogen source on fermentation.

| Time of addition        | N Source | Biomass | Growth rate | Fermentation time | Fermentation rate | Ref.   |
|-------------------------|----------|---------|-------------|-------------------|-------------------|--------|
| Must                    | AC       | ↗       | ↗           | ↘                 | ↗                 | 7, 14  |
|                         | AC       | nd      | nd          | ↘                 | ↗                 | 9      |
|                         | AC       | ↘       | ↘           | →                 | ↘                 | 15     |
|                         | AC       | →       | →           | ↘                 | ↗                 | 17     |
|                         | AS       | ↗       | nd          | ↘                 | ↗                 | 1      |
|                         | AS       | ↗       | →           | ↘                 | ↗                 | 3      |
|                         | AS       | ↗       | ↗           | ↘                 | ↗                 | 5      |
|                         | DAP      | →       | ↗           | →                 | →                 | 2      |
|                         | DAP      | nd      | nd          | ↘                 | ↗                 | 8, 12  |
|                         | DAP      | →       | nd          | ↘                 | ↗                 | 10     |
|                         | DAP      | nd      | nd          | →                 | →                 | 13, 16 |
|                         | DAP      | ↗       | nd          | ↘                 | ↗                 | 18     |
|                         | AA       | →       | ↗           | →                 | →                 | 2      |
|                         | AA       | nd      | nd          | ↘                 | →                 | 8      |
|                         | AA       | nd      | nd          | →                 | →                 | 11     |
|                         | AA       | ↘       | ↘           | →                 | ↘                 | 15     |
|                         | AA       | ↗       | nd          | ↘                 | ↗                 | 17     |
|                         | AC + AA  | ↗       | ↗           | ↘                 | ↗                 | 14     |
|                         | AC + AA  | ↗       | nd          | ↘                 | nd                | 4      |
|                         | DAP + AA | nd      | nd          | ↘                 | ↗                 | 6      |
| Stationary growth phase | AC       | →       | →           | ↘                 | ↗                 | 7      |
|                         | AC       | ↗       | →           | ↘                 | ↗                 | 17     |
|                         | AS       | →       | nd          | ↘                 | ↗                 | 1      |
|                         | AS       | ↗       | ↗           | ↘                 | ↗                 | 3, 5   |
|                         | DAP      | nd      | nd          | →                 | →                 | 13     |
|                         | DAP      | ↗       | nd          | ↘                 | ↗                 | 18     |
|                         | AA       | →       | →           | ↘                 | ↗                 | 7      |
|                         | AA       | ↗       | nd          | ↘                 | ↗                 | 18     |
|                         | AC + AA  | →       | →           | ↘                 | ↗                 | 7      |
|                         | AC + AA  | →       | nd          | ↗                 | nd                | 4      |

1: Bely et al. (2003), 2: Hernandez-Orte et al. (2004), 3: Mendes-Ferreira et al. (2004), 4: Beltran et al. (2005), 5: Hernandez-Orte et al. (2006), 6: Arias-Gil et al. (2007), 7: Jiménez-Martí et al. (2007), 8: Miller et al. (2007), 9: Vilanova et al. (2007), 10: Carrau et al. (2008), 11: Garde-Cerdan et al. (2008), 12: Ugliano et al. (2008), 13: Adams et al. (2010) 14: Torrea et al. (2011), 15: Martínez-Moreno et al. (2012), 16: Vilanova et al. (2012), 17: Martínez-Moreno et al. (2014), 18: Seguinot et al. (2018). nd: no data. Abbreviations: N, nitrogen; AC, ammonium chloride; AS, ammonium sulfate; DAP, diammonium phosphate; AA, amino acids. Upward arrows (↗) indicate an increase of the corresponding parameter relative to control, neutral arrows (→) no significant effect, and downward arrows (↘) a decrease. Several studies that concern the impact of nitrogen addition during fermentation are intentionally not mentioned in the table (Albers et al., 1996; Manginot et al., 1998; Barbosa et al., 2009, 2012). In these studies, the impact of increasing the nitrogen concentration was evaluated, but no data for controls without nitrogen addition were available. The experimental conditions in reference to the studies (matrix, initial sugar concentration, initial nitrogen concentration and nature) are described in the table 6.

Most studies included ammonium salts as the principal supplementary YAN source. In must or synthetic must, ammonium chloride addition generally decreases the fermentation time and increases the fermentation rate (Jiménez-Martí et al., 2007; Vilanova et al., 2007; Torrea et al., 2011; Martínez-Moreno et al., 2014). Nevertheless, this is not always true (Martínez-Moreno et al., 2012). No trends are observable concerning biomass production and growth rate (Table 3). The addition of ammonium sulfate to must appeared to decrease the fermentation time and increase the fermentation rate and biomass in all cases (Bely et al., 2003; Mendes-Ferreira et al., 2004; Hernández-Orte et al., 2006). Only the growth rate parameter was divergent (Mendes-Ferreira et al., 2004; Hernandez-Orte et al., 2006). More data are available concerning DAP addition to must. In four studies, DAP addition decreased the fermentation time and increased the fermentation rate (Miller et al., 2007; Carrau et al., 2008; Ugliano et al., 2008; Seguinot et al., 2018). In contrast, three studies showed no effect on the same parameters (Hernández-Orte et al., 2004; Adams and van Vuuren, 2010; Vilanova et al., 2012). Data concerning biomass production and growth rates are surprisingly limited. Only one study showed an increase in biomass after DAP addition to must (Seguinot et al., 2018), whereas two others showed no significant effect (Hernández-Orte et al., 2004; Carrau et al., 2008). Hernández-Orte et al. (2004) evaluated the impact of DAP addition to must on yeast growth rate. They observed an increase, but it is impossible to make a generalization based on a single study. All of this data shows that ammonium salts have not the same effect. This might be explained by the diversity of the matrix and *S. cerevisiae* strains used. Testing the effects of all ammonium salts on different *S. cerevisiae* strains in a single conventional synthetic medium could be a good approach to evaluate nitrogen addition impact.

Amino-acid addition to must as a source of nitrogen supplementation has become increasingly common. The effect varies widely, as for ammonium salts. In general, no impact on fermentation

time has been reported (Hernández-Orte et al., 2004; Garde-Cerdán and Ancín-Azpilicueta, 2008; Martínez-Moreno et al., 2012) except for Miller et al. (2007). Neutral (Hernández-Orte et al., 2004; Miller et al., 2007; Garde-Cerdán and Ancín-Azpilicueta, 2008), decrease (Martínez-Moreno et al., 2012) or increase (Seguinot et al., 2018) effects on fermentation rate can be observed. The results concerning the effect on biomass production were also contradictory (Hernández-Orte et al., 2004; Martínez-Moreno et al., 2012; Seguinot et al., 2018) as for growth rate (Hernández-Orte et al., 2004; Martínez-Moreno et al., 2012). Coupled with ammonium chloride or DAP, amino acid addition appears to decrease fermentation time while increasing fermentation rate (Beltran et al., 2005; Arias-Gil et al., 2007; Torrea et al., 2011) and probably biomass production (Beltran et al., 2005) and growth rate (Torrea et al., 2011). As ammonium salts, the variability of the results might be linked to the diversity of the matrix and *S. cerevisiae* strains used (Fairbairn et al., 2017).

The addition of nitrogen during the stationary growth phase does not have the same consequences on enological parameters as its addition to must; it decreases the fermentation time and increases the fermentation rate, regardless of the study and nitrogen source (Bely et al., 2003; Hernández-Orte et al., 2006; Jiménez-Martí et al., 2007; Martínez-Moreno et al., 2014; Seguinot et al., 2018), with two exceptions for which there were no significant (Adams and van Vuuren, 2010) or opposite effect (Beltran et al., 2005). Generally, nitrogen addition during the stationary growth phase has no significant effect on growth rate (Hernandez-Orte et al., 2006; Martínez-Moreno et al., 2014), excepted in the study of Hernandez-Orte et al. (2006) in which it increased. Half of the published studies showed no significant effect on biomass production (Bely et al., 2003; Beltran et al., 2005; Hernandez-Orte et al., 2006), whereas the other half showed an increase, regardless of the nitrogen source (Hernandez-Orte et al., 2006; Martínez-Moreno et al., 2014; Seguinot et al., 2018).

Overall, it appears to be very complicated to compare the effect of YAN addition on essential fermentation parameters: maximum cell biomass, growth rate, fermentation time and fermentation rate. Indeed, the time of nitrogen addition, sources, the use or not of NS yeasts, the strain of *S. cerevisiae* used, the initial sugar concentration, temperature and the YAN already present in the must appear to influence the fermentation profile. This has led to several contradictions, depending on the experiments (Table 3). For example, Albers et al. (1996) showed that the addition of an amino-acid mixture to must resulted in greater maximum cell biomass than the addition of ammonium sulfate. However, in 2005, Beltran et al. showed that ammonium was the preferred nitrogen source for biomass production. The timing of addition can also affect biomass production. In 2006, Hernandez-Orte et al. showed that ammonium sulfate added at the beginning of fermentation significantly increased the maximum biomass. However, the results were compared to those obtained with

nitrogen deficient synthetic medium. Thus, it is difficult to conclude whether the addition of an amino acid mixture to the must has a better potential to increase biomass formation (Albers et al., 1996) than ammonium sulfate added during the first part of fermentation (Hernandez-Orte et al., 2006). In addition, Hernandez-Orte et al. (2006) reported that adding ammonium sulfate to synthetic must always resulted in lower volatile acidity. Similar results were reported by Bely et al. (2003). However, ammonium sulfate added in excess increased the production of volatile acidity. Although this phenomenon is strain-dependent, it is difficult to draw conclusions on the effect of ammonium sulfate addition on volatile acidity without considering the amount added. The link between sugar and nitrogen metabolism has been established. However, comparing recent to previous studies using different sugar concentrations to compare the effect of nitrogen addition may not be informative. For example, Albert et al. (1996) used 20 g/L of sugar, whereas Taillandier et al. (2007) used 240 g/L and Bely et al. (2003) 360 g/L. Comparing the effect of nitrogen addition between these studies without considering the initial sugar concentration may be misleading. A multiparametric approach appears to be essential to resolve these issues. A compilation of similarly represented data would provide a first comprehensive view of the impact of nitrogen addition on fermentation. This would show if there are identifiable trends or if the effect of strain is predominant.

### 1.8.3. Consequences of nitrogen addition on volatile compounds produced by *S. cerevisiae*

Table 4 provides the first overview of studies concerning the impact of nitrogen addition on volatile compounds and glycerol produced by *S. cerevisiae*.

The addition of ammonium chloride (Jiménez-Martí et al., 2007; Vilanova et al., 2007; Torrea et al., 2011; Martínez-Moreno et al., 2012, 2014) or ammonium sulfate (Bely et al., 2003; Hernandez-Orte et al., 2006) before fermentation appears to decrease higher alcohol production. The impact on the production of other metabolites is less clear (Hernandez-Orte et al., 2006; Jiménez-Martí et al., 2007; Vilanova et al., 2007; Torrea et al., 2011; Martínez-Moreno et al., 2014). The preceding paragraph underlines that there is more data concerning DAP than for other ammonium salts. No significant trends have been reported concerning higher alcohol production (Hernández-Orte et al., 2004; Carrau et al., 2008; Ugliano et al., 2008; Vilanova et al., 2012; Seguinot et al., 2018). For ester production, only Hernandez-Orte et al. (2004) reported no effect, whereas other studies (Miller et al., 2007; Carrau et al., 2008; Ugliano et al., 2008; Vilanova et al., 2012; Seguinot et al., 2018) reported a general increase. The same trend was found for fatty acids, except in the study of Vilanova et al. (2012). Concerning the effect of nitrogen addition on volatile acidity, a decrease (Vilanova et al., 2012) or a neutral effect were reported (Ugliano et al., 2008).

Tableau 9 (Table 4 manuscript) : Impact of the addition of YAN sources on volatile compounds and glycerol produced by *S. cerevisiae*.

| Time of addition        | N Source | Higher alcohols | Esters | Fatty acids | Volatile acidity | Glycerol | Ref. |
|-------------------------|----------|-----------------|--------|-------------|------------------|----------|------|
| Must                    | AC       | ↘               | ↘      | nd          | nd               | nd       | 6    |
|                         | AC       | ↘               | ↗      | →           | →                | →        | 8    |
|                         | AC       | ↘               | ↗      | ↗           | ↗                | →        | 12   |
|                         | AC       | nd              | nd     | nd          | nd               | →        | 13   |
|                         | AC       | nd              | ↘      | nd          | ↗                | ↗        | 15   |
|                         | AS       | nd              | nd     | nd          | ↘                | →        | 1    |
|                         | AS       | ↘               | →      | ↗           | ↘                | nd       | 4    |
|                         | DAP      | ↘               | →      | ↗           | nd               | nd       | 2    |
|                         | DAP      | nd              | ↗      | nd          | nd               | nd       | 7    |
|                         | DAP      | ↘               | ↗      | ↗           | nd               | nd       | 9    |
|                         | DAP      | →               | ↗      | ↗           | ↘                | ↗        | 11   |
|                         | DAP      | ↘               | ↗      | →           | →                | →        | 14   |
|                         | DAP      | ↗               | ↗      | nd          | nd               | →        | 16   |
|                         | AA       | ↘               | →      | →           | nd               | nd       | 2    |
|                         | AA       | nd              | ↘      | nd          | nd               | nd       | 7    |
|                         | AA       | ↗               | ↗      | →           | ↘                | nd       | 10   |
|                         | AA       | nd              | nd     | nd          | nd               | →        | 13   |
|                         | AA       | ↘               | ↗      | nd          | nd               | →        | 16   |
|                         | AC + AA  | ↘               | ↗      | ↗           | ↗                | →        | 12   |
|                         | AC + AA  | ↘               | ↗      | →           | nd               | →        | 3    |
|                         | DAP + AA | nd              | nd     | ↗           | nd               | nd       | 5    |
| Stationary growth phase | AC       | ↘               | ↘      | nd          | nd               | nd       | 6    |
|                         | AC       | nd              | ↘      | nd          | ↗                | ↗        | 15   |
|                         | AS       | nd              | nd     | nd          | ↗                | →        | 1    |
|                         | AS       | ↘               | →      | ↘           | ↘                | nd       | 4    |
|                         | DAP      | ↘               | ↗      | nd          | nd               | →        | 16   |
|                         | AA       | ↗               | ↘      | nd          | nd               | nd       | 6    |
|                         | AA       | →               | ↗      | nd          | nd               | →        | 16   |
|                         | AC + AA  | ↘               | ↘      | nd          | nd               | nd       | 6    |
|                         | AC + AA  | ↗               | ↘      | →           | nd               | ↘        | 3    |

1: Bely et al. (2003), 2: Hernandez-Orte et al. (2004), 3: Beltran et al. (2005), 4: Hernandez-Orte et al. (2006), 5: Arias-Gil et al. (2007), 6: Jiménez-Martí et al. (2007), 7: Miller et al. (2007), 8: Vilanova et al. (2007) 9: Carrau et al. (2008), 10: Garde-Cerdan et al. (2008), 11: Ugliano et al. (2008), 12: Torrea et al. (2011), 13: Martínez-Moreno et al. (2012), 14: Vilanova et al. (2012), 15: Martínez-Moreno et al. (2014), 16: Seguinot et al. (2018), nd: no data. Abbreviations: N, nitrogen; AC, ammonium chloride; AS, ammonium sulfate; DAP, diammonium phosphate; AA, amino acids. Upward arrows (↗) indicate

an increase in the concentration of the corresponding metabolite relative to control, neutral arrows (→) no significant effect, and downward arrows (▼) a decrease. Several studies that concern the impact of nitrogen addition during fermentation are intentionally not mentioned in the table (Albers et al., 1996; Manginot et al., 1998; Barbosa et al., 2009, 2012). In these studies, the impact of increasing the nitrogen concentration was evaluated, but no data for controls without nitrogen addition were available. The experimental conditions in reference to the studies (matrix, initial sugar concentration, initial nitrogen concentration and nature) are described in the table 6.

For glycerol, two studies showed no significant effect (Vilanova et al., 2012; Seguinot et al., 2018), whereas Ugliano et al. (2008) reported an increase. DAP addition also affects hydrogen sulfide production. The addition of DAP to Shiraz must fermented with *S. cerevisiae* led to greater hydrogen sulfide formation than non-supplemented fermentation. Moreover, DAP addition induced prolonged formation of hydrogen sulfide during the latter stage of fermentation, which was associated with higher hydrogen sulfide content in the final wines (Ugliano et al., 2009). Other volatile sulfur compounds were also present in significantly higher concentrations in the wine, including sulfides, disulfides, mercaptans and mercaptoesters (Ugliano et al., 2009). Once again, the strain effect seems to be involved. The study of the effect of ammonium salts on the production of volatile compounds on a large panel of *S. cerevisiae* strains could be relevant to identify possible trends.

The addition of amino acids before fermentation also leads to significantly different outcomes. Most studies have shown a decrease in higher alcohol production (Hernández-Orte et al., 2004; Seguinot et al., 2018), except one in which an increase was reported (Garde-Cerdán and Ancín-Azpilicueta, 2008). Similar contradictions were reported in ester production (Miller et al., 2007; Garde-Cerdán and Ancín-Azpilicueta, 2008; Seguinot et al., 2018). All available studies reported no significant difference in fatty-acids (Hernández-Orte et al., 2004; Garde-Cerdán and Ancín-Azpilicueta, 2008) or glycerol production (Martínez-Moreno et al., 2012; Seguinot et al., 2018). Only one study reported a decrease in volatile acidity (Garde-Cerdán and Ancín-Azpilicueta, 2008). Coupled with ammonium salts, amino-acid addition appears to increase fatty acids production (Arias-Gil et al., 2007; Torrea et al., 2011) excepted for Beltran et al. (2005). For other metabolites, only Beltran et al. (2005) and Torrea et al. (2011) reported an increase in ester production and volatile acidity, whereas there was no significant effect on glycerol production and a decreased production of higher alcohols. In addition, the addition of DAP coupled with amino acids appears to drastically reduce the production of hydrogen sulfide (Barbosa et al., 2012). This study, in which the authors evaluated three strains of *S. cerevisiae*, showed that methionine, in particular, suppressed hydrogen-sulfide production under all conditions.

Less data are available concerning nitrogen addition during the stationary growth phase. A decrease in higher alcohol production has been reported, regardless of YAN source, except for amino-acid

addition alone (Jiménez-Martí et al., 2007; Seguinot et al., 2018). Ammonium chloride addition during the stationary growth phase appears to generally decrease ester production (Jiménez-Martí et al., 2007; Martínez-Moreno et al., 2014) and increase volatile acidity and glycerol production (Martínez-Moreno et al., 2014). The two studies concerning ammonium sulfate addition during the stationary growth phase reported no significant effect on ester production (Bely et al., 2003; Hernandez-Orte et al., 2006), whereas fatty acid production was decreased. The results concerning volatile acidity are contradictory (Bely et al., 2003; Hernandez-Orte et al., 2006). Only DAP appears to increase ester production, in contrast to other ammonium salts. However, there is no significant effect on glycerol concentration (Seguinot et al., 2018). The results obtained after amino-acid addition during the stationary growth phase are also contradictory about ester concentration (Jiménez-Martí et al., 2007; Seguinot et al., 2018). Finally, only Jimenez-Marti et al. (2007) evaluated the impact of the addition of ammonium chloride coupled with amino acids during the stationary growth phase.

The addition of amino acids at the beginning of the stationary phase significantly increases the production of isoamyl acetate relative to the control or DAP addition (Seguinot et al., 2018). In the same study, the authors assessed the influence of these parameters on the production of the higher alcohol propanol. Propanol is considered to be a marker of nitrogen availability in must (Mouret et al., 2014). After the complete consumption of YAN, the production of propanol restarted immediately upon the addition of nitrogen during the stationary phase and stopped again when no more YAN remained in the medium. Propanol production is strongly dependent on the nature of the added nitrogen source (inorganic or organic). Mouret et al. (2014) showed that DAP addition induced greater production of propanol than amino-acid addition, in particular after addition during the stationary phase. In this study, final propanol production increased 4.3-fold after DAP addition during the stationary phase *versus* a two-fold increase after the addition of amino acids. It would be interesting to study the metabolic fluxes impacted by nitrogen addition in detail, especially the production of propanol from threonine, in order to explain the link between production differences observed and nitrogen sources.

The data concerning the impact of YAN addition on volatile compound and glycerol production by *S. cerevisiae* highlight several contradictions, as for enological parameters. The highly variable results cast doubt on the direct link between YAN sources and volatile compounds production. This was confirmed by the recent study of Fairbairn et al. (2017) in which the addition of a single amino acid resulted in the predictable production of volatile compounds. The authors proved a linear correlation between amino-acid concentration and the concentration of aromatic compounds directly derived

from this amino acid. However, linear correlations were lost and volatile compounds production became unpredictable with the use of more complex nitrogen sources (mix) (Fairbairn et al., 2017). The diversity of methods used, including different matrices, fermentation condition, and strains leads to the lack of consensus, requiring reconsideration of how to approach the issue.

Such considerations are supported by the study of Crépin et al. (2017) who demonstrated that YAN is mainly catabolized and involved in the *de novo* synthesis of proteinogenic compounds but not in the formation of volatile compounds. Nonetheless, YAN addition has consistently influenced volatile compounds production. Thus, these data suggest that there may be another indirect mechanism involving YAN sources and sugar metabolism for the production of volatile compounds.

#### 1.8.4. Sensory profile impact

The role of nitrogen during wine fermentation has been extensively studied, particularly the effect of nitrogen on the production of volatile compounds. Surprisingly, few studies evaluated its impact of nitrogen addition on wine sensory profiles wines. In Shiraz wines, where DAP was added to a final YAN concentration of 250 or 400 mg/L in must, the scores for the descriptors “confectionary”, “red fruit”, and “dark fruit” are higher for the high-nitrogen fermentations. These descriptors are strongly positively associated with acetate esters and medium chain fatty acids ethyl esters (Ugliano et al., 2010). Along with DAP became the clear influence on perceived fruitiness, the other major effect of nitrogen addition was a suppression of the perceived intensity of descriptors such as “cheese”, “earth”, and “yeast” (Ugliano et al., 2010). In the same way, wines from Airen musts supplemented with DAP become more “citric” and less sulphurous, independently of the yeast strain used (Hernández-Orte et al., 2004). In another study, a mix of amino acids addition (phenylalanine, aspartic acid, threonine and alanine) in Merlot must affect sulphured, vegetal, fusel, floral, lactic and reduction notes. The least altered notes were spices and sweet fruits (Hernández-Orte et al., 2004, 2006). In their study, Torrea et al. (2011) have shown that the addition of either organic or inorganic nitrogen influence differently the formation of yeast volatile compounds. Consequences of ammonium nitrogen addition are an increase in ethyl acetate and acetic acid while a mix of amino acids and ammonium nitrogen led to a higher production of acetate and medium chain fatty acids ester. From a sensorial point of view, addition of nitrogen sources to reach 320 mg N/l in must led to wines rated higher in intensity for most of the fruity and floral attributes. However, the type of nitrogen added has no significant effect on the sensorial profile. Yet, sensory properties of wines from musts supplemented with amino acids seem to depend on the yeast strain. No study describes sensory impact about nitrogen addition coupled with lipids and/or vitamins.

#### 1.8.5. Transcriptome changes in response to nitrogen addition

The expression of several genes that reflects nitrogen limitation under enological conditions has been shown to predict nitrogen deficiency, including that of *CAR1*, an arginase that catabolizes arginine to ornithine and urea (Carrasco et al., 2003); *ACA1*, which is important for carbon source utilization (Jiménez-Martí et al., 2007); *FSP2*, an alpha-glucosidase; *RGS2*, a negative regulator of glucose-induced cAMP signalling; *AQY1*, a spore-specific water channel; *AGX1*, an alanine glyoxylate aminotransferase (Backhus et al., 2001); *DAL4*, allantoin permease; *GAP1*, general amino acid permease (Gutiérrez et al., 2013b); and *ICY1*, which affects the consumption of ammonium during fermentation (Martínez et al., 2014). However, the studies focused mainly on the impact of low nitrogen medium on the transcriptional activity of *S. cerevisiae*. Little data is currently available concerning the impact of nitrogen addition. Table 5 provides the first comparison between gene families up- and downregulated after YAN addition before fermentation. Under low nitrogen conditions, the addition of DAP to synthetic grape juice medium during fermentation downregulated the expression of genes associated with ribosomal proteins, the small nucleolar ribonucleoprotein complex, the nucleolus, and RNA processing (Mendes-Ferreira et al. 2007). In contrast, genes involved in the functions of the cell wall, glucose metabolism, protein folding, energy pathways, alcohol metabolism, and glycolysis were upregulated (Mendes-Ferreira et al., 2007). Similarly, Barbosa et al. (2015), evaluated the consequences of the transcriptomic response of various *S. cerevisiae* strains to DAP addition to synthetic must before fermentation. Surprisingly, genes involved in ribosomal protein and RNA processing were upregulated, which is opposite of the results of Mendes-Ferreira et al. (2007). In addition, genes involved in flocculation were the most highly over-represented category in the annotation of the most highly expressed genes during high-nitrogen fermentation, in particular, *FLO10*, which participates in the fermentation stress response (FSR). Thus, Barbosa et al. (2015) suggested that such overexpression is an adaptation of the yeast to stress conditions and allows the yeast to conserve a good capacity of fermentation. In contrast to that of Mendes-Ferreira et al. (2007), the study of Barbosa et al. (2015) demonstrated that the addition of DAP before fermentation leads to the upregulation of the expression of genes involved in ribosomal protein and RNA processing.

Tableau 10 (Table 5 manuscript): Influence of YAN status on the transcriptional activity of gene families in *S. cerevisiae* during alcoholic fermentation.

| N Source<br>& condition                                  | Gene family upregulated         | Gene family downregulated                 | Ref. |
|----------------------------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------------|------|
| <b>AS</b><br><b>Supplemented versus non-supplemented</b> | RNA processing                  | Protein catabolic processes               | 4    |
|                                                          | Ribosome biogenesis             | Stress response                           |      |
|                                                          | Amino-acid biosynthesis         | Oxidation-reduction processes             |      |
| <b>DAP</b><br><b>High versus low level</b>               | Cell wall functions             | Ribosomal proteins                        | 1    |
|                                                          | Glucose metabolism              | Small nucleolar ribonucleoprotein complex |      |
|                                                          | Protein folding                 | Nucleolus and RNA processing              |      |
|                                                          | Energy pathways                 |                                           |      |
|                                                          | Alcohol metabolism              |                                           |      |
|                                                          | Glycolysis                      |                                           |      |
| <b>DAP</b><br><b>High versus low level</b>               | Flocculation                    | nd                                        | 2    |
|                                                          | Ribosomal proteins              | nd                                        |      |
|                                                          | RNA processing                  | nd                                        |      |
|                                                          | Autophagy                       | nd                                        |      |
| <b>AA</b><br><b>Supplemented versus non-supplemented</b> | Biosynthesis of aroma compounds | nd                                        | 3    |
|                                                          | Yeast growth                    | nd                                        |      |
|                                                          | Environmental stress response   | nd                                        |      |

1: Mendes-Ferreira et al. (2007), 3: Barbosa et al. (2015), 3: Liu et al. (2017), 4: Tesnière et al. (2017), nd: no data. Abbreviations: AS, ammonium sulfate; DAP, diammonium phosphate; AA, amino acids. The experimental conditions in reference to the studies (matrix, initial sugar concentration, initial nitrogen concentration and nature) are described in the table 6.

The addition of ammonium sulfate during fermentation, when yeast are in nitrogen starvation, leads to global transcriptome changes. Tesnière et al. (2017) showed that 30 minutes after ammonium sulfate replenishment, a set of 1,410 genes enriched for those related to RNA processing, ribosome biogenesis, translation, and amino-acid biosynthesis was upregulated. At the same time, 1,564 genes related to protein catabolic processes (ubiquitin-dependent and vacuolar protein degradation), stress responses, and oxidation-reduction processes were downregulated. Under similar conditions, DAP addition downregulated genes including those involved in RNA processing and ribosomal protein synthesis (Mendes-Ferreira et al., 2007). This contradiction was not noted by Tesnière et al. (2017). Conway et al. (2012) also evaluated the impact of the addition of ammonium sulfate coupled with amino acids. In this study, they obtained contradictory results compared to Mendes-Ferreira et al., (2007) (Table 5). Thus, it appears that the transcriptional activity related to RNA processing is

affected depending on the ammonium salts. However, it is difficult to compare the two conditions as the strains and medium and fermentation parameters were different.

As already discussed, amino acids are another potential supplementary nitrogen source. High nitrogen concentrations, including that from exogenous amino-acids and ammonium, can unbalance the general composition of the must, particularly under conditions of high nitrogen content and low micronutrients. In 2017, Duc et al. showed that, among the seven micronutrients evaluated in this study (ergosterol, oleic acid, pantothenic acid, nicotinic acid, thiamin, biotin, and inositol), four trigger yeast cell death when the yeast are in growth-restricting amounts in a nitrogen-rich medium. Two (ergosterol, oleic acid) are lipid growth factors, conditional to anaerobic growth, and the other two vitamins (pantothenic acid and nicotinic acid). They showed that the *TORC1/SCH9* signaling pathway was a key complex in this effect. Indeed, the authors observed that decreasing *TORC1/SCH9* signaling restored high cell viability under several micronutrient-limited fermentation conditions. Viability was also restored by *SCH9* deletion under conditions of oleic acid, ergosterol, and pantothenic acid starvation. Global gene expression experiments showed that two clusters distinguish the conditions that preserve viability from those that lead to a high rate of cell death. The first included genes involved in mitochondrial respiration, electron transport processes, the TCA cycle, membrane transport, and detoxification. The second included genes involved in nitrogen catabolism, purine metabolism, and membrane transport, including that of nitrogen substrates. Significant differences in gene expression were specifically observed in these clusters under conditions of high nitrogen content and limited-micronutrients (Duc et al., 2017).

The addition of amino acids alone as a nitrogen source to must also affects global gene expression (Liu et al., 2017). L-valine, L-leucine, and L-isoleucine added in a non-limiting nitrogen medium resulted in the up- or downregulation of 25 genes during fermentation. Some genes were upregulated throughout fermentation, including: *ACT1*, a structural protein involved in cell polarization; *PDA1*, which catalyzes the direct oxidative decarboxylation of pyruvate to acetyl-CoA; *SER1*, required for serine and glycine biosynthesis; *FOX2*, a multifunctional enzyme of the peroxisomal fatty acid beta-oxidation pathway; *MEP2*, ammonium permease; *BAP3*, which is involved in the uptake of cysteine, leucine, isoleucine, and valine; *THR4*, a conserved protein that catalyzes the formation of threonine from O-phosphohomoserine; *AGX1*, which catalyzes the synthesis of glycine from glyoxylate; *STL1*, a glycerol proton symporter of the plasma membrane; and *GAP1*, general amino acid permease), whereas others genes were upregulated only during the exponential growth phase, including *GIP1*, a meiosis-specific regulatory subunit of the Glc7p protein phosphatase; *DIT2*, N-formyltyrosine oxidase; *RCK1*, a protein kinase involved in the oxidative stress

response; *SPO1* a meiosis-specific prospore protein; and *MEK1*, meiosis-specific serine/threonine protein kinase. The addition of this mix of amino acids also up-regulated the expression of *SUT1*, which positively regulates sterol uptake genes under anaerobic conditions; *RR12*, a subunit of the COP9 signalosome complex; and *CIN5*, a basic leucine zipper transcription factor of the  $\gamma$ AP-1 related to the environmental stress response. Surprisingly, the expression of few genes related to the biosynthesis of volatile compounds was also affected. Among 412 genes, only the expression of *AAD3*, *AAD4*, *AAD14*, *ADH2*, and *PDC5*, involved in the biosynthesis of aroma substances, was significantly up-regulated (Liu et al., 2017).

Tableau 11 (Table 6 manuscript) : Experimental conditions used in the tables 3, 4 and 5.

| References                    | Table 3 | Table 4 | Table 5 | Matrix | Initial sugar concentration (g/L) | Initial nitrogen concentration (mg/L) | Nature of nitrogen source       |
|-------------------------------|---------|---------|---------|--------|-----------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|
| Bely et al. (2003)            | 1       | 1       |         | Must   | 320 to 370                        | 92                                    | Naturally present in must       |
| Hernandez-Orte et al. (2004)  | 2       | 2       |         | Must   | nd                                | 175                                   | Naturally present in must       |
| Mendes-Ferreira et al. (2004) | 3       |         |         | GJM    | 200                               | 66                                    | AS                              |
| Beltran et al. (2005)         | 4       | 3       |         | SM     | 200                               | 60 or 300                             | AC + AA                         |
| Hernandez-Orte et al. (2006)  | 5       | 4       |         | SM     | 210                               | 270                                   | AS + AA                         |
| Arias-Gil et al. (2007)       | 6       | 5       |         | Must   | nd                                | 285                                   | Naturally present in must + DAP |
| Jiménez-Martí et al. (2007)   | 7       | 6       |         | SM     | 200                               | 60 to 300                             | AS + AA                         |
| Mendes-Ferreira et al. (2007) |         |         | 1       | GJM    | 200                               | 66 to 267                             | DAP                             |
| Miller et al. (2007)          | 8       | 7       |         | Must   | 213                               | 2095                                  | Naturally present in must       |
| Vilanova et al. (2007)        | 9       | 8       |         | CDGJ   | 225                               | 117                                   | AC + AA                         |
| Carrau et al. (2008)          | 10      | 9       |         | CDGJ   | 120                               | 75 to 400                             | DAP + AA                        |
| Garde-Cerdan et al. (2008)    | 11      | 10      |         | Musts  | nd                                | 285 to 1173                           | Naturally present in must       |
| Ugliano et al. (2008)         | 12      | 11      |         | Musts  | 215                               | 87 to 312                             | Naturally present in must       |
| Adams et al. (2010)           | 13      |         |         | Must   | nd                                | 361                                   | Naturally present in must       |
| Torrea et al. (2011)          | 14      | 12      |         | Must   | 200                               | 160                                   | Naturally present in must       |
| Martinez-Moreno et al. (2012) | 15      | 13      |         | SM     | 200 to 280                        | 0 to 220                              | AC or AA or AC + AA             |
| Vilanova et al. (2012)        | 16      | 14      |         | Must   | nd                                | 250                                   | Naturally present in must       |
| Martinez-Moreno et al. (2014) | 17      | 15      |         | SM     | 240                               | 100 to 200                            | AC + AA                         |
| Barbosa et al. (2015)         |         |         | 3       | GJM    | 200                               | 67 to 670                             | DAP                             |
| Liu et al. (2017)             |         |         | 4       | SM     | 200                               | 300                                   | AC+AA                           |
| Tesnière et al. (2017)        |         |         | 5       | YNB    | 20                                | 0                                     | Ammonium (source unspecified)   |
| Seguinot et al. (2018)        | 18      | 16      |         | SM     | 200                               | 100                                   | AC + AA                         |

Abbreviations: GJM, grape must modified; SM, synthetic must; CDGJ, chemically defined grape juice; YNB, yeast nitrogen base.

### 1.9. Concluding remarks

From grape to wine, the role of nitrogen in winemaking is complex. This review focuses on fermentation and highlights new considerations concerning the impact of nitrogen on yeast metabolism and how biotic, abiotic, and exogenous addition can influence enological parameters. Here, the review of recent studies showed that YAN preferentially consumed by NS yeast strains during the first stage of fermentation vary and other factors, such as competition can be involved. There are no studies that explain why some YAN sources are preferentially consumed by NS yeasts. Moreover, the effect on the expression of genes involved in nitrogen regulation of *S. cerevisiae* in the presence of NS yeasts is still unexplored. The vast majority of studies have referred to “preferred” or “non-preferred” YAN sources, but a close examination in this review shows that this categorization varies widely, even if the same parameters of comparison were used. An exploration of genetic variation appears to be necessary to obtain a better understanding of the preferential assimilation of YAN. Much genetic data are available for *S. cerevisiae*. In contrast, current genetic data for NS yeast are too limited to develop significant research on nitrogen regulation. Enological nitrogen addition using amino acids is being increasingly performed, but the impact on *S. cerevisiae* in terms of fermentation parameters and volatile compound production is not clear. Indeed, recent studies show that only 5% of amino acids present in the must are directly involved in the synthesis of volatile compounds. Moreover, transcriptomic analysis has shown that the addition of nitrogen does not lead to the significant overexpression of genes involved in volatile compound production. Thus, the significant modification of the volatile compound profiles in wine caused by the addition of amino acids needs to be further investigated. Deciphering the link between nitrogen metabolism and volatile compound synthesis will provide useful information to monitor the fermentative aroma profile of wine.

Future studies that will lead to a better comprehension of YAN dynamics, from grape to wine, interconnected with other pathways (vitamins and lipids), will help to explain the production of volatile compounds and allow better control of fermentation by avoiding sluggish fermentation, providing new tools to winemakers. Most of the studies examining the link between nitrogen and volatile compound production were carried out in synthetic must. Given the complexity of the composition of must it will be necessary to include real must in future studies aiming to understand the influence of nitrogen on fermentation kinetics and aroma production.

## Acknowledgments

This work is supported by the Conseil Régional de Bourgogne through the plan d'actions régional pour l'innovation (PARI) and the European Union through the PO FEDER-FSE Bourgogne 2014/2020 programs.

---

Chapitre 2 : Etude des besoins et de la compétition  
pour les sources azotées entre les levures NS  
sélectionnées et *S. cerevisiae* au cours de la  
fermentation alcoolique. Evaluation des  
répercussions sur les composés volatils

---

## Contexte scientifique

L'utilisation des levures NS est de plus en plus répandue dans l'industrie. Dès la vigne, les levures NS peuvent être utilisées dans le cadre d'agents de biocontrôle, même si cette méthode reste encore aujourd'hui à être validée en conditions réelles (Fernandes Lemos Junior et al., 2016; Escribano-Viana et al., 2018; Wang et al., 2018). Certaines souches sélectionnées sont utilisées comme alternative au SO<sub>2</sub> lors des toutes premières étapes de vinification (débourbage, macération pré-fermentaire). Lors de la fermentation proprement dite, des levures NS peuvent être inoculées conjointement ou séquentiellement avec *S. cerevisiae* afin de modifier le profil aromatique (Andorrà et al., 2012; Sadoudi et al., 2012; Liu et al., 2016; Tofalo et al., 2016; Escribano et al., 2018) ou de diminuer la concentration en éthanol du vin (Pickering, 2000; Röcker et al., 2016; Mestre Furlani et al., 2017; Varela and Varela, 2019). Bien que les levures NS soient aujourd'hui largement utilisées, leurs besoins en nutriments et particulièrement en azote assimilable restent très peu connus. Ainsi cet axe de recherche a eu pour objectifs de déterminer quels étaient les besoins en azote d'une sélection de trois levures NS, déjà utilisées en applications oenologiques ou ayant un fort potentiel d'application. Leurs consommations préférentielles en YAN ont été déterminées et la répercussion des fermentations séquentielles sur la production des composés volatils évaluée. Le choix des levures NS est justifié dans notre cas également pour une application en vue de réduire la teneur en éthanol dans les vins.



# Non-Saccharomyces Yeasts Nitrogen Source Preferences: Impact on Sequential Fermentation and Wine Volatile Compounds Profile

Antoine Gobert<sup>1\*</sup>, Raphaëlle Tourdot-Maréchal<sup>1</sup>, Christophe Morge<sup>2</sup>, Céline Sparrow<sup>2</sup>, Youzhong Liu<sup>1</sup>, Beatriz Quintanilla-Casas<sup>3</sup>, Stefania Vichi<sup>3</sup> and Hervé Alexandre<sup>1</sup>

<sup>1</sup> UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques, Université de Bourgogne Franche-Comté/AgroSup Dijon - Equipe VAIMIS (Vin, Aliment, Microbiologie, Stress), Institut Universitaire de la Vigne et du Vin Jules Guyot, Université de Bourgogne, Dijon, France, <sup>2</sup> SAS Sofralab, Magenta, France, <sup>3</sup> Nutrition, Food Science and Gastronomy Department, INSA - XaRTA (Catalonian Reference Network on Food Technology), University of Barcelona, Santa Coloma de Gramenet, Spain

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Juan Aguirre,  
Universidad de Chile, Chile

### Reviewed by:

E. Emma Tymczyszyn,  
Universidad Nacional de Quilmes  
(UNQ), Argentina  
Mariona H. Gil I. Cortiella,  
Universidad Autónoma de Chile, Chile

### \*Correspondence:

Antoine Gobert  
antoinegobert1@gmail.com

### Specialty section:

This article was submitted to  
Food Microbiology,  
a section of the journal  
Frontiers in Microbiology

**Received:** 08 August 2017

**Accepted:** 23 October 2017

**Published:** 06 November 2017

### Citation:

Gobert A, Tourdot-Maréchal R,  
Morge C, Sparrow C, Liu Y,  
Quintanilla-Casas B, Vichi S and  
Alexandre H (2017)  
Non-Saccharomyces Yeasts Nitrogen  
Source Preferences: Impact on  
Sequential Fermentation and Wine  
Volatile Compounds Profile.  
Front. Microbiol. 8:2175.  
doi: 10.3389/fmicb.2017.02175

Nitrogen sources in the must are important for yeast metabolism, growth, and performance, and wine volatile compounds profile. Yeast assimilable nitrogen (YAN) deficiencies in grape must are one of the main causes of stuck and sluggish fermentation. The nitrogen requirement of *Saccharomyces cerevisiae* metabolism has been described in detail. However, the YAN preferences of non-*Saccharomyces* yeasts remain unknown despite their increasingly widespread use in winemaking. Furthermore, the impact of nitrogen consumption by non-*Saccharomyces* yeasts on YAN availability, alcoholic performance and volatile compounds production by *S. cerevisiae* in sequential fermentation has been little studied. With a view to improving the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking, we studied the use of amino acids and ammonium by three strains of non-*Saccharomyces* yeasts (*Starmerella bacillaris*, *Metschnikowia pulcherrima*, and *Pichia membranifaciens*) in grape juice. We first determined which nitrogen sources were preferentially used by these yeasts in pure cultures at 28 and 20°C (because few data are available). We then carried out sequential fermentations at 20°C with *S. cerevisiae*, to assess the impact of the non-*Saccharomyces* yeasts on the availability of assimilable nitrogen for *S. cerevisiae*. Finally, 22 volatile compounds were quantified in sequential fermentation and their levels compared with those in pure cultures of *S. cerevisiae*. We report here, for the first time, that non-*Saccharomyces* yeasts have specific amino-acid consumption profiles. Histidine, methionine, threonine, and tyrosine were not consumed by *S. bacillaris*, aspartic acid was assimilated very slowly by *M. pulcherrima*, and glutamine was not assimilated by *P. membranifaciens*. By contrast, cysteine appeared to be a preferred nitrogen source for all non-*Saccharomyces* yeasts. In sequential fermentation, these specific profiles of amino-acid consumption by non-*Saccharomyces* yeasts may account for some of the interactions observed here, such as poorer performances of *S. cerevisiae* and volatile profile changes.

**Keywords:** non-*Saccharomyces* yeasts, alcoholic fermentation, yeast interactions, nitrogen sources, volatile compounds, wine

## INTRODUCTION

The main sources of yeast assimilable nitrogen (YAN) in grape must are ammonium and amino acids. YAN availability for winemaking is one of the major factors controlling alcoholic fermentation and preventing stuck or sluggish fermentations (Henschke and Jiranek, 1993; Alexandre and Charpentier, 1998).

Many studies have focused on the nitrogen requirements of the predominant yeast in the fermentation process, *Saccharomyces cerevisiae* (Beltran et al., 2002; Zott et al., 2008; Albergaria and Arneborg, 2016). Nitrogen demand is dependent on yeast strain, sugar content and fermentation conditions. It is generally agreed that at least 120–140 mg N/L YAN is required for satisfactory fermentation kinetics and final product quality (Bely et al., 1990; Jiranek et al., 1995). To prevent nitrogen deficiency, ammonium could be added which will influence biomass formation, fermentation kinetics, viability, and also the production of aroma compounds (Hernández-Orte et al., 2005, 2006; Hazelwood et al., 2008). The assimilation of diverse sources of nitrogen is tightly regulated. Nitrogen sources may be “good” (preferred nitrogen source) or poor (non-preferred nitrogen sources; Jiranek et al., 1995). Preferred nitrogen sources are assimilated more rapidly and are generally used earlier in the fermentation than poor nitrogen sources. These differences can be attributed principally to differences in the efficiency of the corresponding transport systems.

The pattern of nitrogen assimilation by *S. cerevisiae* in the presence of complex nitrogen sources is controlled by nitrogen catabolite repression (NCR). For example, ammonium is a preferred nitrogen source, and, when present in the medium, it represses the expression of catabolic pathways making use of other nitrogenous compounds (Ter Schure et al., 2000; Magasanik and Kaiser, 2002; Marks et al., 2003; Beltran et al., 2004). Permeases involved in the assimilation of preferred nitrogen sources are expressed whereas transporters of non-preferred nitrogen sources are repressed and degraded under NCR control (Ter Schure et al., 2000; Magasanik and Kaiser, 2002). At the start of the alcoholic fermentation, preferred nitrogen sources are present and NCR is active. As the concentrations of these preferred nitrogen sources decreases during fermentation, NCR weakens until a derepressed state is reached.

Many aroma compounds are directly related to nitrogen metabolism. For example, higher alcohols and their associated fatty acids and esters are influenced by the quality and quantity of nitrogen sources (Beltran et al., 2005; Hernández-Orte et al., 2005; Barbosa et al., 2009). Low nitrogen concentrations in grape directly affect higher alcohol production, with an inverse effect observed in the presence of moderate to high nitrogen levels (Äyräpää, 1968). Nitrogen limiting conditions lead to higher levels of higher alcohol production via both catabolic and anabolic biosynthetic pathways (Carrau et al., 2008). Furthermore, nitrogen metabolism also regulates other major pathways, such as sugar and sulfur metabolism, and the use of essential nutrients. It can affect the production of many flavor-active intermediates and end-products (Hernandez-Orte et al., 2006; Mendes-Ferreira et al., 2011; Hirst and Richter, 2016).

The use of non-*Saccharomyces* (NS) yeasts has spread in recent years, due to the value of these microbes for improving the aromatic profile of the wine (Lambrechts and Pretorius, 2000; Soden et al., 2000; Clemente-Jimenez et al., 2005; Sadoudi et al., 2012; Cordero-Bueso et al., 2013; Liu et al., 2016). The medium is generally either co-inoculated with these yeasts and *S. cerevisiae* (Anfang et al., 2009; Medina et al., 2013; Tofalo et al., 2016) or sequentially inoculated (Ciani et al., 2010; Liu et al., 2017; Puertas et al., 2017). However, very few studies have described YAN consumption by NS yeasts and its effects on the kinetics of fermentation by *S. cerevisiae*. Moreover, as many YAN sources are precursors of volatile molecules, YAN consumption by NS yeasts may affect the volatile compounds profile of the final product. In this study, we investigated the YAN consumption profiles of three NS yeast strains during alcoholic fermentation in different conditions. We then evaluated the effect of YAN consumption by these strains on the fermentation kinetics of *S. cerevisiae* in sequential fermentation conditions. Finally, the volatile compounds profiles of wines obtained in sequential fermentation were compared with the YAN consumption profiles.

## MATERIALS AND METHODS

### Microorganisms and Media

Three non-*Saccharomyces* yeast strains isolated in Burgundy were obtained from the collection of the Burgundy University Vine and Wine Institute (*Institut Universitaire de la Vigne et du Vin*, IUUVV). The strains selected for this study were *Starmerella bacillaris* (prev. *Candida zemplinina*) BBMV5FA17, *Metschnikowia pulcherrima* BB810, and *Pichia membranifaciens* BB3 (selection based on potential for use in the wine industry; Di Maio et al., 2012; Sadoudi et al., 2012; Cordero-Bueso et al., 2013; Liu et al., 2017). A commercial strain of *S. cerevisiae* “Selectys® La Marquise” (Sofralab, Magenta, France) was used as a reference and for sequential inoculation. Each strain was stored in 20% (v/v) glycerol at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Initial cultures for inoculation (precultures) were prepared by incubation in modified YPD medium (0.5% (w/v) yeast extract, 1% (w/v) peptone, 2% (w/v) glucose, and 0.02% (w/v) chloramphenicol) in 100 mL Erlenmeyer flasks at  $28^{\circ}\text{C}$  with stirring (150 rpm) for 24 h.

### Inoculation

The density of viable cells in precultures was determined by flow cytometry (BD Accuri™ C6). The fluorophore used to detect the viable cells was 5-6-carboxyfluorescein diacetate (cFDA) (Molecular Probes) dissolved in acetone at a final concentration of 500  $\mu\text{M}$ . We added 10  $\mu\text{L}$  of this solution to 100  $\mu\text{L}$  of diluted yeast suspension. Before measurement, the suspension was incubated in the dark for 20 min. Once the density of viable cells had been determined, we sampled  $10^6$  or  $5 \times 10^6$  viable cells/mL. This sample was centrifuged at  $10\,000 \times g$ . The supernatant was discarded and the pellet was resuspended in grape juice and used to inoculate 200 mL of grape juice for the fermentation.

## Fermentation Conditions

All fermentations were carried out with the same batch of commercial grape juice (100% pure white and Muscat grape juice from the industry with initial concentration of 150 g/L of sugar) supplemented with equal proportions of glucose and fructose to achieve a final sugar concentration of 200 g/L. This grape juice was sterilized by filtration (0.22  $\mu$ m pores). We used 250 mL Erlenmeyer flasks containing 200 mL of sterile grape juice covered with sterile cotton wool to prevent contamination. For pure cultures, fermentations were performed under three sets of conditions: at 28°C with shaking (150 rpm); at 28°C without shaking; at 20°C without shaking. For sequential fermentations, cultures were incubated at 20°C without shaking. Samples were collected at 6-h intervals during the first 3 days, and then every 24 h for fermentations performed at 28°C and after 24 h only for fermentations at 20°C. For pure cultures, the medium was inoculated with 10<sup>6</sup> viable cells/mL of NS yeast or *S. cerevisiae*. For sequential inoculations, the medium was inoculated with 5  $\times$  10<sup>6</sup> viable cells of NS yeast/mL. After 3 days of fermentation, the medium was inoculated with 10<sup>6</sup> viable cells of *S. cerevisiae*/mL. Cultures at 28°C were conducted in duplicate, and cultures at 20°C (pure and sequential) were conducted in triplicate.

## Monitoring of Biomass Growth

For pure cultures, viable cell density was determined as before inoculation. For sequential fermentations, serial dilutions of cell suspensions in 0.9% (w/v) NaCl were generated. Samples of each dilution (100  $\mu$ L) were then spread on solid lysine medium (Oxoid LTD., England) and incubated at 28°C for 3 or 4 days. On this medium, NS yeast colonies appear rapidly and are clearly visible, whereas *S. cerevisiae* “Selectys® La Marquise” (SLM) colonies appear more slowly and are smaller. Unlike flow cytometry, here only cultivable cells are detected.

## Analytical Methods

### Enological Analysis

Samples were centrifuged at 10,000  $\times$  g for 5 min and the supernatants were stored at –20°C until analysis. Total sugar and ethanol concentrations were determined by FTIR spectroscopy with an OenoFoss type 4101 apparatus (FOSS Electric, Denmark).

### Concentrations of Amino Acids and Ammonium

Amino acids and ammonium were derivatized with an AccQ-Tag™ Ultra Derivatization kit, according to the manufacturer's instructions (Waters, USA). Separation was then performed by high-performance liquid chromatography (HPLC) with a C18 reverse-phase column (AccQ-Tag™ Ultra Column, 3.9  $\times$  150 mm) and fluorometric detection. L-alpha-amino-*n*-butyric acid (0.1 mM) was added to the samples, as an internal standard, as previously described (Ritt et al., 2009). For each sample, we injected 1  $\mu$ L onto the column and the chamber was maintained at 37°C. The buffer flow rate was 1 mL/min. The sample was eluted according to the gradient program shown in Table 1. Buffer A contained 140 mM sodium acetate trihydrate, 6.9 mM triethylamine, and 3.42  $\mu$ M ethylenediaminetetraacetic

**TABLE 1 |** Gradient program for HPLC separation and the quantification of amino acids and ammonium.

| Time (min) | Buffer A (%) | Buffer B (%) | Water (%) |
|------------|--------------|--------------|-----------|
| 0          | 100          | 0            | 0         |
| 1          | 100          | 0            | 0         |
| 1.5        | 99           | 1            | 0         |
| 16.5       | 97           | 3            | 0         |
| 25.5       | 94           | 6            | 0         |
| 35.5       | 86           | 14           | 0         |
| 51.5       | 86           | 14           | 0         |
| 52         | 0            | 60           | 40        |
| 55         | 0            | 60           | 40        |
| 55.5       | 100          | 0            | 0         |
| 66.5       | 100          | 0            | 0         |

acid. Buffer B contained 99.8% acetonitrile. Both buffers were filtered (0.22  $\mu$ m pores) before use.

### HS-SPME-GC/MS Analysis of Volatile Compounds

We placed 2 mL of wine in a 10 mL vial fitted with a silicone septum, which was then transferred to a silicon oil bath at 40°C, in which the sample was incubated for 10 min, with magnetic stirring (700 rpm) divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) fiber (Supelco, Bellefonte, PA, USA) was exposed to the sample headspace for 30 min and then subjected to immediate desorption in the gas chromatograph injector.

Volatile compounds were analyzed by gas chromatography coupled to quadrupole mass selective spectrometry with an Agilent 5973 Network detector (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Analytes were separated on a Supelcowax-10 (Supelco) column with a length of 60 m, an internal diameter of 0.25 mm and a film thickness of 0.25  $\mu$ m. Column temperature was held at 40°C for 5 min, increased to 130°C at a rate of 4.5°C/min, and then to 250°C at 15°C/min. The temperature was then held at 250°C for 2 min. The injector temperature was 260°C and the time fiber desorption time in the injection port was fixed at 5 min. Helium at a flow rate of 1.2 mL/min was used as the carrier gas. Ion source temperature was 175°C and transfer line temperature was 280°C. Electron impact mass spectra were recorded at an ionization energy of 70 eV, with 2 scan/s. GC–MS analysis was performed in complete scanning mode (SCAN), in the 30–300 mass units range.

Compounds were identified by comparison of their mass spectra and retention times with those of standard compounds or with those available in the Wiley 6 mass spectrum library or reported in previous publications. Response factors were calculated for volatile compounds from calibration curves obtained by analyzing hydroalcoholic solutions (ethanol 10%, v/v) of various reference compounds in the 2–500  $\mu$ g/L (ethyl hexanoate, ethyl octanoate, ethyl decanoate, 1-hexanol, isoamylacetate, and linalyl oxide) and 1–50 mg/L (3-methylbutanol, phenylethyl alcohol, and octanoic acid) concentration ranges.

## Comparison of the Kinetics of Nitrogen Consumption

$T_{50}$  values were used for the comparison of YAN consumption rates. This value is the time point at which 50% of the initial concentration of the YAN is consumed. It was determined by fitting a logistic function (Equation 1) to nitrogen consumption curves with OriginPro8 version 8E.

**Equation 1:** Fitting equation for the determination of  $T_{50}$ . A1: Maximum amino acid or ammonium concentration, A2: Residual amino acid or ammonium concentration, x: time,  $x_0$ :  $T_{50}$ , P: coefficient.

$$y = \frac{A1 - A2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^P} + A2$$

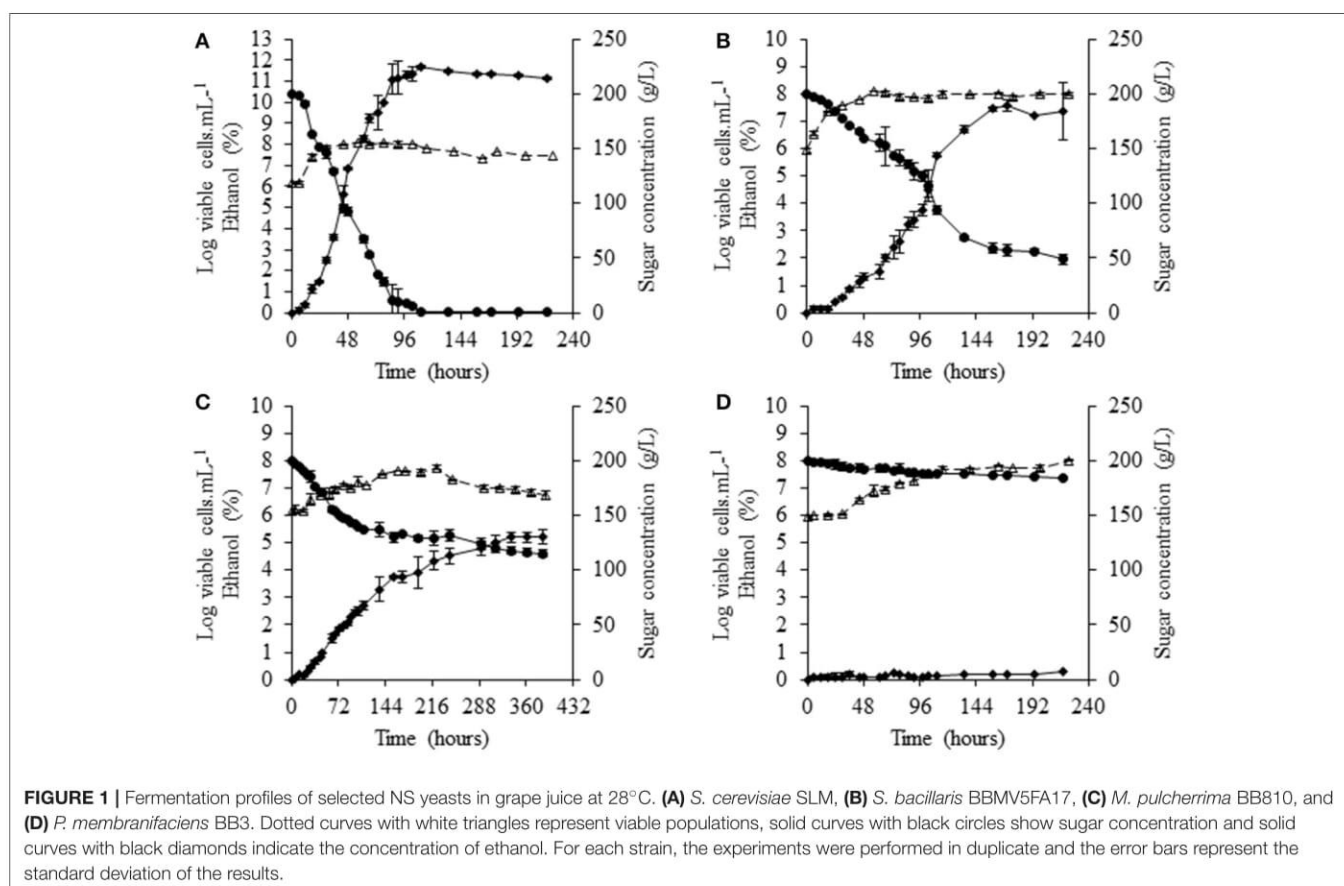
## Statistical Analysis

Preferred amino acid groups were compared in the Kruskal–Wallis test, an alternative to ANOVA, with XLSTAT version 2014 statistical software (Addinsoft, France). Differences in aroma compound concentrations were assessed by analysis of variance (Tukey's test). Differences were considered significant if the  $P$ -values obtained were below 0.05. For the analysis of multivariate data principal component analysis (PCA) was constructed performed with XLSTAT version 2014 statistical software (Addinsoft, France). For the analysis of other data, we also used Microsoft Excel 2013 and OriginPro8 version 8E.

## RESULTS

### Profile of the Consumption of Nitrogen Sources by NS Yeasts

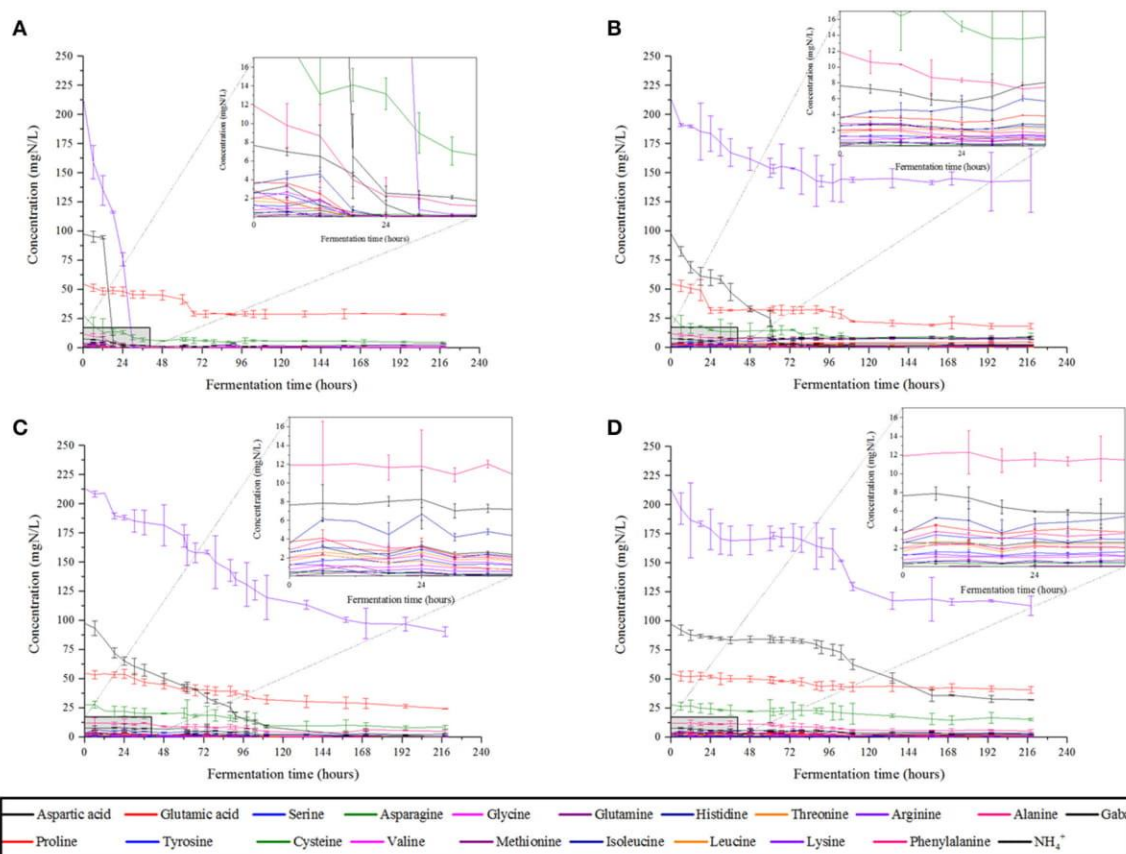
Monocultures were performed in commercial grape juice containing 200 g/L sugar and 450 mg/L YAN. At 28°C, the reference *S. cerevisiae* strain, SLM, completed fermentation in 134 h, consuming all the sugar present, resulting in the formation of about  $10^8$  cells/mL (Figure 1A). Fermentations with NS yeasts were slower. In 150 h, a large amount of the sugar present (150 g/L) was consumed by *S. bacillaris* BBMV5FA17 but, thereafter, sugar consumption was significantly lower (Figure 1B). Biomass formation was similar to that with *S. cerevisiae* SLM. *M. pulcherrima* BB810 consumed significantly less sugar than *S. bacillaris* BBMV5FA17, with only 70 g/L consumed in 158 h. The biomass generated reached  $\sim 3.1 \times 10^7$  cells/mL (Figure 1C). *P. membranifaciens* BB3 was not a good fermenting yeast, as it consumed only 16 g/L sugar over the course of the experiment and formed  $6.3 \times 10^7$  cells/mL (Figure 1D). At 20°C, the total NS yeast population varied from  $1.9 \times 10^7$  cells/mL for *M. pulcherrima* BB810 (Supplementary Figure 1C) to  $2.5 \times 10^7$  cells/mL for *P. membranifaciens* BB3 (Supplementary Figure 1D), whereas that for *S. bacillaris* BBMV5FA17 (Supplementary Figure 1B) reached  $\sim 10^8$  cells/mL like *S. cerevisiae* SLM (Supplementary Figure 1A). None of the NS strains performed a complete fermentation in any of the conditions tested (28 or 20°C), over the duration of the experiment.



We monitored YAN consumption at both culture temperatures. At 28°C, most of the YAN was consumed within 30 h by *S. cerevisiae* SLM, but only 10 mg/L proline was consumed in 72 h (**Figure 2A**). Consumption occurred during the exponential growth phase of the yeast (**Figure 1A**). NS yeasts generally consumed YAN more slowly than *S. cerevisiae*. *S. cerevisiae* SLM consumed almost all the YAN present (396 mg/L) in 72 h, whereas *S. bacillaris* BBMV5FA17 consumed 193 mg/L, *M. pulcherrima* BB810 168 mg/L and *P. membranifaciens* BB3 70 mg/L. These observations may reflect the lower biomass production and lower growth rate of NS yeasts, because *S. bacillaris* BBMV5FA17 took 45 h to reach exponential growth phase, *M. pulcherrima* BB810 took 57 h and *P. membranifaciens* BB3 took 115 h. In addition to these differences in kinetics, the nature of the YAN consumed differed between NS yeasts and *S. cerevisiae* SLM. The predominant YAN sources (arginine, ammonium, and asparagine) were consumed within 30 h by *S. cerevisiae* SLM, whereas *S. bacillaris* BBMV5FA17 consumed arginine more slowly, in accordance with its slower growth rate (70 mg/L in 218 h; **Figure 2B**). *M. pulcherrima* BB810 (**Figure 2C**) and *P. membranifaciens* BB3 (**Figure 2D**) also consumed this amino acid more slowly than *S. cerevisiae* SLM. Ammonium was rapidly completely

consumed by *S. bacillaris* BBMV5FA17 (97 mg/L in 72 h), but more slowly by *M. pulcherrima* BB810 (complete consumption in 158 h), and it had not been completely consumed by *P. membranifaciens* BB3 by the end of the experiment. The overall YAN consumption rate was lower at 20°C, for all strains, with some variation of preferential nitrogen sources (Supplementary Figure 2).

We therefore used  $T_{50}$  values to identify the sources preferred by the different yeasts. In our classification, group A corresponds to preferred sources, B to intermediate sources, C to non-preferred sources and D or \* indicates very low levels of assimilation or no assimilation, respectively. This classification was applied to fermentations performed at 28°C (Supplementary Figure 3) and at 20°C (Supplementary Figure 4). A summary of the YAN sources used more by NS yeasts than by *S. cerevisiae* SLM at the two temperatures is provided in **Table 2**. Strikingly, histidine, methionine, threonine and tyrosine were not consumed by *S. bacillaris* BBMV5FA17, at either temperature. Aspartic acid was assimilated very slowly (group D) or was a non-preferred source (group C) for *M. pulcherrima* BB810, whereas this amino acid was well-assimilated by *S. cerevisiae* SLM (group A or B). Glutamine was not assimilated by *P. membranifaciens* BB3. By contrast,



**FIGURE 2 |** YAN consumption profiles of *S. cerevisiae* SLM (**A**), *S. bacillaris* BBMV5FA17 (**B**), *M. pulcherrima* BB810 (**C**), and *P. membranifaciens* BB3 (**D**) in grape juice at 28°C. For each strain, the experiments were performed in duplicate and the error bars represent the standard deviation of the results.

**TABLE 2** | Overview of YAN ranking on the basis of consumption rate.

| YAN                          | 28°C |    |    |    | 20°C |    |    |    |
|------------------------------|------|----|----|----|------|----|----|----|
|                              | Sc   | Sb | Mp | Pm | Sc   | Sb | Mp | Pm |
| Aspartic acid                | A    | *  | D  | C  | B    | B  | C  | *  |
| Glutamic acid                | B    | *  | C  | C  | B    | B  | B  | B  |
| Alanine                      | B    | A  | C  | B  | C    | A  | A  | B  |
| Arginine                     | C    | B  | D  | B  | C    | B  | D  | C  |
| Asparagine                   | A    | D  | B  | A  | A    | B  | *  | *  |
| Cysteine                     | C    | A  | A  | A  | C    | A  | A  | A  |
| GABA                         | C    | *  | C  | B  | A    | A  | C  | B  |
| Glutamine                    | A    | *  | A  | *  | B    | B  | A  | *  |
| Glycine                      | C    | *  | D  | *  | A    | A  | B  | A  |
| Histidine                    | C    | *  | C  | *  | A    | *  | A  | A  |
| Isoleucine                   | A    | B  | A  | C  | B    | B  | B  | B  |
| Leucine                      | A    | B  | A  | B  | C    | B  | B  | C  |
| Lysine                       | A    | *  | A  | B  | A    | A  | A  | A  |
| Methionine                   | B    | *  | A  | *  | A    | *  | *  | *  |
| NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> | B    | B  | B  | C  | B    | B  | C  | D  |
| Phenylalanine                | B    | B  | B  | C  | A    | B  | C  | B  |
| Proline                      | C    | C  | C  | A  | C    | C  | *  | *  |
| Serine                       | A    | B  | C  | A  | C    | B  | C  | *  |
| Threonine                    | A    | *  | C  | *  | A    | *  | A  | A  |
| Tyrosine                     | C    | *  | D  | C  | B    | *  | D  | B  |
| Valine                       | B    | B  | B  | C  | C    | C  | C  | *  |

Preferred sources are indicated by A, intermediate sources by B, non-preferred sources by C, very low levels of assimilation by D and an absence of assimilation by \*. Classification was based on the  $T_{50}$  values obtained. The different yeasts are represented as Sc for *S. cerevisiae* SLM, Sb for *S. bacillaris* BBMV5FA17, Mp for *M. pulcherrima* BB810 and Pm for *P. membranifaciens* BB3.

cysteine appeared to be a preferred source of YAN for all NS yeasts whereas it was assigned to group C for *S. cerevisiae* SLM.

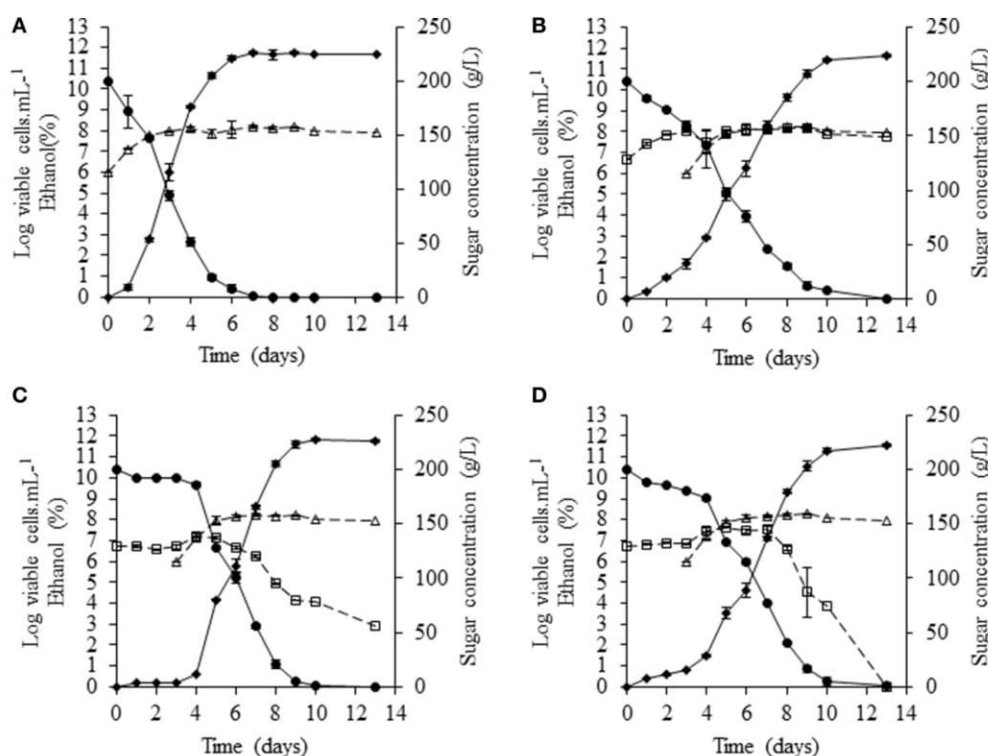
Temperature had a marked effect. *S. bacillaris* BBMV5FA17 did not consume GABA, glycine, and lysine at 28°C, whereas these molecules were preferred sources (group A) at 20°C. The same pattern was observed in *M. pulcherrima* BB810 for alanine and histidine (group C at 28°C and group A at 20°C) and in *P. membranifaciens* BB3 for glycine, histidine and threonine (non-assimilated at 28°C and group A at 20°C). With the exception of consumption or non-consumption, the classification of an individual YAN could change from preferred source (A) or intermediate group (B) to non-preferred source (C), and vice versa, in different conditions. These changes highlight the complexity of the classification.

These results show, for the first time, that the NS strains studied here can consume some of the YAN, thereby modifying the quantity and quality of the nitrogen sources present in the grape juice. These results are of particular importance for spontaneous and sequential fermentations. Indeed, NS yeasts develop first and may therefore consume nitrogen compounds that may affect fermentation kinetics and the aroma profile of the wine. We performed sequential fermentations to investigate the impact of YAN consumption by NS yeasts.

## Consequence of Sequential Fermentations with NS Yeasts on YAN Sources and Volatile Compounds Profiles

Fermentations were carried out at 20°C, with the same grape juice used for pure cultures. NS yeasts were inoculated at a density of  $5 \times 10^6$  cells/mL and, after 3 days of fermentation, *S. cerevisiae* SLM was added at a density of  $10^6$  cells/mL. *S. cerevisiae* SLM in pure culture performed complete fermentation in 7 days, consuming all the sugar present and generating a biomass of  $10^8$  cells/mL (Figure 3A). In sequential fermentations, only *S. bacillaris* BBMV5FA17 remained cultivable throughout the fermentation (Figure 3B), generating amounts of biomass similar to those produced by *S. cerevisiae* SLM ( $\sim 10^8$  cells/mL). In these conditions, sugar consumption increased slightly 1 day after inoculation of the medium with *S. cerevisiae*. This effect was even more marked in sequential fermentations with *M. pulcherrima* BB810 and *P. membranifaciens* BB3 (Figures 3C,D, respectively). Furthermore, the viability of *M. pulcherrima* BB810 and *P. membranifaciens* BB3 decreased significantly (Figures 3C,D) 2 days after the addition of *S. cerevisiae*. Cell cultivability decreased particularly rapidly for *P. membranifaciens* BB3, for which no cultivable cells were present 9 days after the addition of *S. cerevisiae* SLM.

The concentration of YAN available for *S. cerevisiae* SLM at the time of inoculation depended on the NS yeast strains. First, in three days, *S. cerevisiae* SLM consumed all YAN excepted proline as expected (Figure 4A). *S. bacillaris* BBMV5FA17 consumed 215 mg/L of the 450 mg/L YAN initially present, whereas *M. pulcherrima* BB810 and *P. membranifaciens* BB3 consumed 173 mg/L and 66 mg/L YAN, respectively. YAN matrix composition and quantity were therefore different between cultures inoculated with *S. cerevisiae* alone and those inoculated with *S. cerevisiae* 3 days after NS yeasts. During the first step in the sequential fermentation, large amounts of ammonium and leucine were consumed by *S. bacillaris* BBMV5FA17 (Figure 4B). *M. pulcherrima* BB810 consumed mostly GABA, asparagine, glutamic acid, aspartic acid, and leucine (Figure 4C). For *P. membranifaciens* BB3, the YAN sources consumed were asparagine, glutamic acid, aspartic acid, and glycine (Figure 4D). YAN sources have been identified as potential volatile compounds precursors in *S. cerevisiae* (Hazelwood et al., 2008) and the NS yeasts used in sequential fermentation clearly influence the volatile compounds profile of the wine produced. We compared the YAN profiles obtained in sequential fermentations with the volatile compounds profile of the wine, by HS-SPME-GC/MS analysis for each sample. We identified 22 volatile compounds in total (Table 3). The major changes relative to *S. cerevisiae* SLM concerned the sum of the concentrations of ethyl acetate + diethyl acetal and 1-octanol. The concentrations of these volatile compounds were significantly lower in sequential fermentations with all NS yeasts. However, isobutyl alcohol and phenylethyl acetate concentrations were higher in all sequential fermentations. We performed principal component analysis (PCA) to gain further insight (Figure 5). For the first two principal components accounted for 74.60% of the total



**FIGURE 3 |** Sequential fermentation profiles of selected NS yeasts (white squares) with *S. cerevisiae* (white triangles) in grape juice in static conditions at 20°C. **(A)** *S. cerevisiae* SLM (control), **(B)** *S. bacillaris* BBMV5FA17—*S. cerevisiae* SLM, **(C)** *M. pulcherrima* BB810—*S. cerevisiae* SLM and **(D)** *P. membranifaciens* BB3—*S. cerevisiae* SLM. Dotted curves represent cultivable populations, solid curves with black circles show sugar concentration and solid curves with black diamonds indicate the concentration of ethanol. For each strain, the experiments were performed in triplicate and the error bars represent the standard deviation of the results.

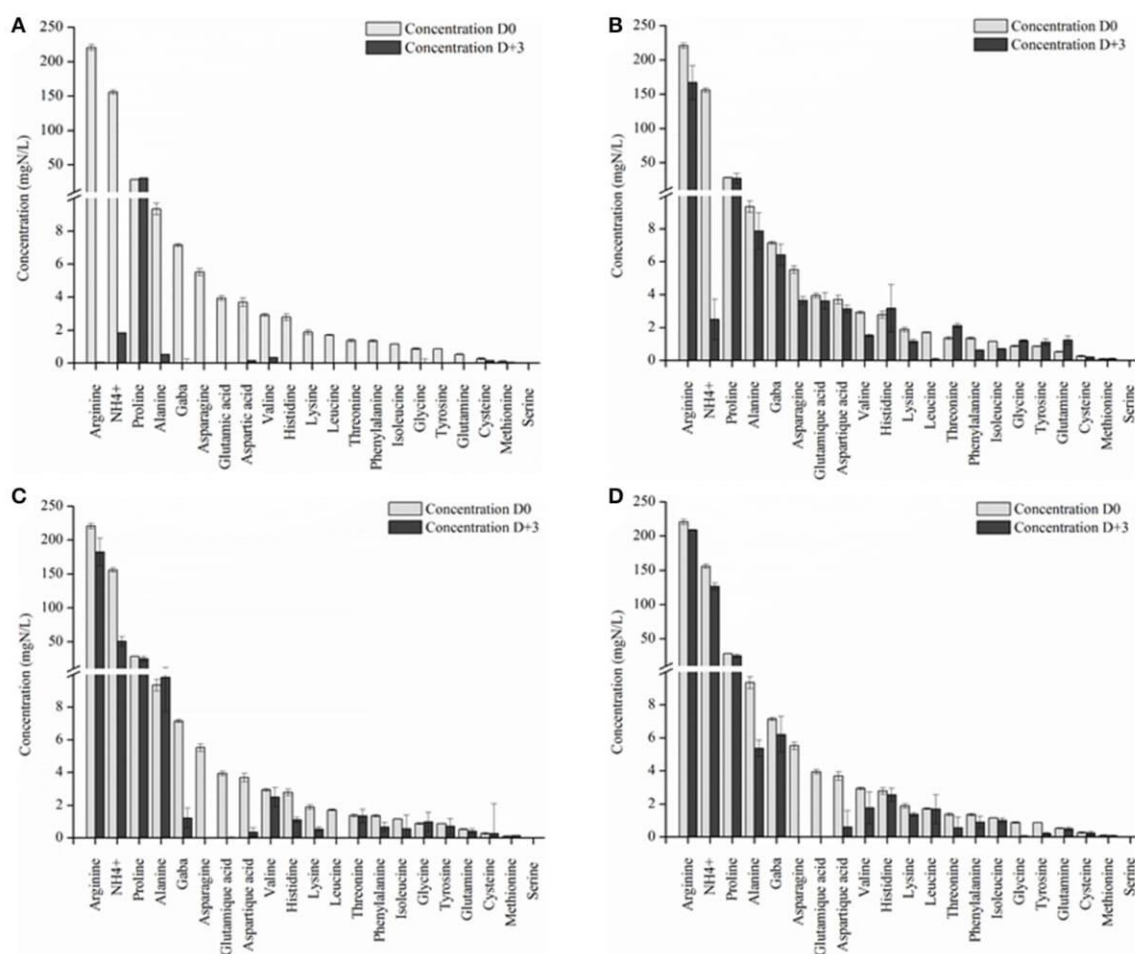
variance *s*. A classical ascendant hierarchy method identified three groups on the basis of significant differences in aroma production. Several molecules derived from yeast metabolism were present at significantly lower concentrations in sequential fermentation with *S. bacillaris* BBMV5FA17 than in pure cultures of *S. cerevisiae* SLM. These decreases could may result from lower YAN availability to *S. cerevisiae* SLM. The lower isoamyl acetate concentration in sequential fermentations involving *S. bacillaris* BBMV5FA17/*S. cerevisiae* SLM may be directly linked to the consumption of leucine by *S. bacillaris* BBMV5FA17 (which produces small amounts of this molecule) during the first stage of fermentation. Leucine was also totally consumed by *M. pulcherrima* BB810 (**Figure 4C**), but in this case, isoamyl acetate concentration was similar to that in pure cultures of *S. cerevisiae* SLM (**Table 3**). Conversely, leucine was not consumed by *P. membranifaciens* BB3 during the 3 days of fermentation (**Figure 4D**). Isoamyl acetate concentration in sequential cultures with this NS yeast was very similar to that in pure cultures of *S. cerevisiae* SLM (**Table 3**). Therefore, in this case, the isoamyl acetate present was probably mostly produced by *S. cerevisiae* SLM.

In some cases, sequential fermentation led to an increase in the concentration of some volatile compounds. Indeed, sequential fermentation with *S. bacillaris* BBMV5FA17 and

*S. cerevisiae* SLM led to an increase in the production of ethyl butanoate + propanol, isobutyl alcohol and 1-hexanol. Sequential fermentation with *M. pulcherrima* BB810 and *S. cerevisiae* SLM significantly increased the concentrations of ethyl butanoate + propanol, isobutyl alcohol (more than *S. bacillaris* BBMV5FA17), phenylethyl alcohol and phenylethyl acetate. Finally, with *P. membranifaciens* BB3, the differences between pure cultures of *S. cerevisiae* SLM and sequential fermentation were observed essentially for Z-3-hexenyl acetate, ethyl octanoate, phenylethyl acetate, and octanoic acid (**Table 3**). Despite a probable synergistic effect on the production of some volatile compounds in sequential fermentations of *P. membranifaciens* BB3 with *S. cerevisiae* SLM, PCA analysis was unable to distinguish between the volatile compounds profiles of *S. cerevisiae* SLM alone and the sequential fermentation. The volatile compounds profiles of *S. cerevisiae* SLM and the *P. membranifaciens* BB3/*S. cerevisiae* SLM sequential fermentation were found in the same cluster as the other sequential fermentations.

## DISCUSSION

NS yeasts now have several industrial applications. Their use in sequential fermentations and cofermentations is recommended



**FIGURE 4 |** YAN concentration in grape juice initially (D0) and after 3 days of fermentation (D+3) by *S. cerevisiae* SLM (A), *S. bacillaris* BBMV5FA17 (B), *M. pulcherrima* BB810 (C), and *P. membranifaciens* (D). For each strain, the experiments were performed in triplicate and the error bars represent the standard deviation of the results.

in wine-making, to improve the aromatic profile of the wine (Romano et al., 2003; Anfang et al., 2009; Andorrà et al., 2010; Sadoudi et al., 2012; Jolly et al., 2014; Liu et al., 2016; Mas et al., 2016; Tofalo et al., 2016; Varela, 2016; Puertas et al., 2017; Whitener et al., 2017). However, it remains unclear how NS yeasts effect these positive changes. NS yeasts predominate during the early stages of fermentation (Zott et al., 2008; Liu et al., 2015), but their populations gradually decrease or disappear, to be replaced by *S. cerevisiae*, the yeast with the highest fermentation capacity (Wang et al., 2016). At the start of fermentation, NS yeasts consume some of the nutrients present, including YAN, which is known to be a source of volatile compounds precursors in *S. cerevisiae* (Hazelwood et al., 2008). Several studies have shown that *S. cerevisiae* has preferences among nitrogen sources (Jiranek et al., 1995; Crépin et al., 2012), but little is known about the nitrogen source preferences of NS yeasts (Andorrà et al., 2010; Kemsawasd et al., 2015). We addressed this issue, with a view to improving the management of NS yeast implementation, by determining the YAN consumption profiles of NS yeasts in

pure culture and quantifying aroma compound production in sequential fermentations with *S. cerevisiae*. YAN sources were classified into groups according to the preferences of the three NS yeasts strains, based on the  $T_{50}$  values obtained by Jiranek et al. (1995) (Table 2). Indeed,  $T_{50}$  is the time point at which 50% of the initial concentration of the nitrogen source has been assimilated. It can be used to compare assimilation rates. This method can be used to classify YAN sources into different groups according to use preferences (A for the preferential group, B for the intermediate group and C for the non-preferential group). However, the classification of YAN sources within the group may be strain-dependent.

The preferential nitrogen sources identified for *S. cerevisiae* SLM were consistent with published results (Jiranek et al., 1995; Crépin et al., 2012; Kemsawasd et al., 2015). Some nitrogen nutrition data were available for NS yeasts (Andorrà et al., 2010; Kemsawasd et al., 2015). However, Andorrà et al. (2010) did not identify the preferred nitrogen sources of the non-*Saccharomyces* yeasts they studied, and Kemsawasd et al. (2015)

**TABLE 3 |** Concentration of volatile constituents in the wine ( $\mu\text{g/L}$ ) after sequential fermentations of *S. bacillaris* BBMV5FA17—*S. cerevisiae* SLM (Sb–Sc), *M. pulcherrima* BB810—*S. cerevisiae* SLM (Mp–Sc), *P. membranifaciens* BB3—*S. cerevisiae* SLM (Pm–Sc) at 20°C in static conditions.

| Compounds                                  | Sc                                  | Sb-Sc                             | Mp-Sc                             | Pm-Sc                             |
|--------------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| $\Sigma$ Ethyl acetate + diethyl acetal*   | 434.2 $\pm$ 61.4 <sup>a</sup>       | 1051.5 $\pm$ 38.2 <sup>b</sup>    | 1605.4 $\pm$ 140.0 <sup>c</sup>   | 837.4 $\pm$ 39.6 <sup>d</sup>     |
| $\Sigma$ Ethyl butanoate + propanol*       | 92.2 $\pm$ 40.7 <sup>c</sup>        | 223.4 $\pm$ 15.5 <sup>a</sup>     | 182.6 $\pm$ 6.9 <sup>a,b</sup>    | 136.1 $\pm$ 24.6 <sup>b,c</sup>   |
| Isobutyl alcohol*                          | 1102.9 $\pm$ 292.6 <sup>c</sup>     | 2088.0 $\pm$ 225.2 <sup>b</sup>   | 2740.7 $\pm$ 188.2 <sup>a</sup>   | 1649.4 $\pm$ 123.5 <sup>b,c</sup> |
| Isoamyl acetate*                           | 468.2 $\pm$ 194.1 <sup>a</sup>      | 21.8 $\pm$ 3.4 <sup>b</sup>       | 561.9 $\pm$ 80.2 <sup>a</sup>     | 509.8 $\pm$ 146.5 <sup>a</sup>    |
| 2- + 3-Methylbutanol*                      | 24515.8 $\pm$ 3420.4 <sup>a,b</sup> | 16541.0 $\pm$ 608.3 <sup>c</sup>  | 29735.3 $\pm$ 1568.3 <sup>a</sup> | 24155.0 $\pm$ 1563.3 <sup>b</sup> |
| Ethyl hexanoate**                          | 72.8 $\pm$ 8.9 <sup>a</sup>         | 29.2 $\pm$ 3.9 <sup>b</sup>       | 78.5 $\pm$ 11.8 <sup>a</sup>      | 81.9 $\pm$ 7.1 <sup>a</sup>       |
| Hexyl acetate**                            | 38.7 $\pm$ 4.0 <sup>a</sup>         | 18.9 $\pm$ 1.7 <sup>b</sup>       | 41.2 $\pm$ 5.3 <sup>a</sup>       | 42.8 $\pm$ 3.2 <sup>a</sup>       |
| Z-3-Hexenyl acetate*                       | 4.7 $\pm$ 1.0 <sup>b</sup>          | nd                                | 2.7 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>        | 8.0 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>        |
| 1-Hexanol**                                | 203.0 $\pm$ 20.9 <sup>b</sup>       | 276.5 $\pm$ 8.7 <sup>a</sup>      | 143.5 $\pm$ 2.3 <sup>c</sup>      | 149.9 $\pm$ 6.8 <sup>c</sup>      |
| Z-3-Hexenol*                               | 32.3 $\pm$ 8.2 <sup>a</sup>         | 25.2 $\pm$ 3.1 <sup>a</sup>       | 34.2 $\pm$ 5.8 <sup>a</sup>       | 29.5 $\pm$ 7.4 <sup>a</sup>       |
| Ethyl octanoate*                           | 73.9 $\pm$ 8.2 <sup>b</sup>         | 7.9 $\pm$ 1.7 <sup>c</sup>        | 64.4 $\pm$ 8.5 <sup>b</sup>       | 94.6 $\pm$ 7.5 <sup>a</sup>       |
| $\Sigma$ Nerol oxide + (Z)-Linalool oxide* | 27.1 $\pm$ 3.1 <sup>a</sup>         | 23.3 $\pm$ 1.1 <sup>a,b</sup>     | 19.7 $\pm$ 1.0 <sup>b</sup>       | 19.8 $\pm$ 3.9 <sup>b</sup>       |
| 2-octanol*                                 | 41.6 $\pm$ 3.4 <sup>a</sup>         | 22.0 $\pm$ 3.6 <sup>b</sup>       | 16.4 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>       | 33.1 $\pm$ 4.2 <sup>a</sup>       |
| Linalool*                                  | 18.0 $\pm$ 1.1 <sup>a,b</sup>       | 21.0 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>       | 13.8 $\pm$ 0.8 <sup>c</sup>       | 14.6 $\pm$ 2.2 <sup>b,c</sup>     |
| Benzaldehyde*                              | 9.5 $\pm$ 2.7 <sup>a</sup>          | 7.6 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>        | 2.8 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>        | 2.5 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>        |
| 1-Octanol*                                 | 59.2 $\pm$ 3.2 <sup>a</sup>         | 12.3 $\pm$ 1.8 <sup>b</sup>       | 22.7 $\pm$ 2.4 <sup>c</sup>       | 41.2 $\pm$ 4.9 <sup>d</sup>       |
| Ethyl decanoate*                           | 12.9 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>         | 7.1 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>        | 11.7 $\pm$ 1.8 <sup>a</sup>       | 12.8 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>       |
| Ethyl-9-decanoate***                       | 17.2 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>         | 3.4 $\pm$ 0.3 <sup>c</sup>        | 6.6 $\pm$ 1.4 <sup>b</sup>        | 15.1 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>       |
| Phenylethyl acetate**                      | 9.0 $\pm$ 0.9 <sup>c</sup>          | 2.4 $\pm$ 0.1 <sup>d</sup>        | 20.9 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>       | 14.6 $\pm$ 2.0 <sup>b</sup>       |
| 2,4- or 3,4-Dimethylbenzaldehyde*          | 122.0 $\pm$ 5.3 <sup>a</sup>        | 117.7 $\pm$ 3.8 <sup>a</sup>      | 126.3 $\pm$ 10.2 <sup>a</sup>     | 101.0 $\pm$ 37.9 <sup>a</sup>     |
| Phenylethyl alcohol***                     | 19205.9 $\pm$ 1668.9 <sup>b</sup>   | 14003.5 $\pm$ 1193.8 <sup>b</sup> | 45648.6 $\pm$ 2397.7 <sup>a</sup> | 17394.9 $\pm$ 2704.5 <sup>b</sup> |
| Octanoic acid***                           | 179.4 $\pm$ 14.8 <sup>b</sup>       | 120.3 $\pm$ 13.9 <sup>b</sup>     | 140.1 $\pm$ 11.9 <sup>b</sup>     | 438.2 $\pm$ 75.6 <sup>a</sup>     |

Values with the same letters were not significantly different in Tukey's test (95%).

\*\*\*Significance level for one-way ANOVA (\*0.05 > p > 0.01; \*\*0.01 > p > 0.001; \*\*\*p < 0.001), nd, not detected. *S. cerevisiae* SLM (Sc) in pure culture was used as a control. The data shown are the means of three replicates  $\pm$  standard deviations.

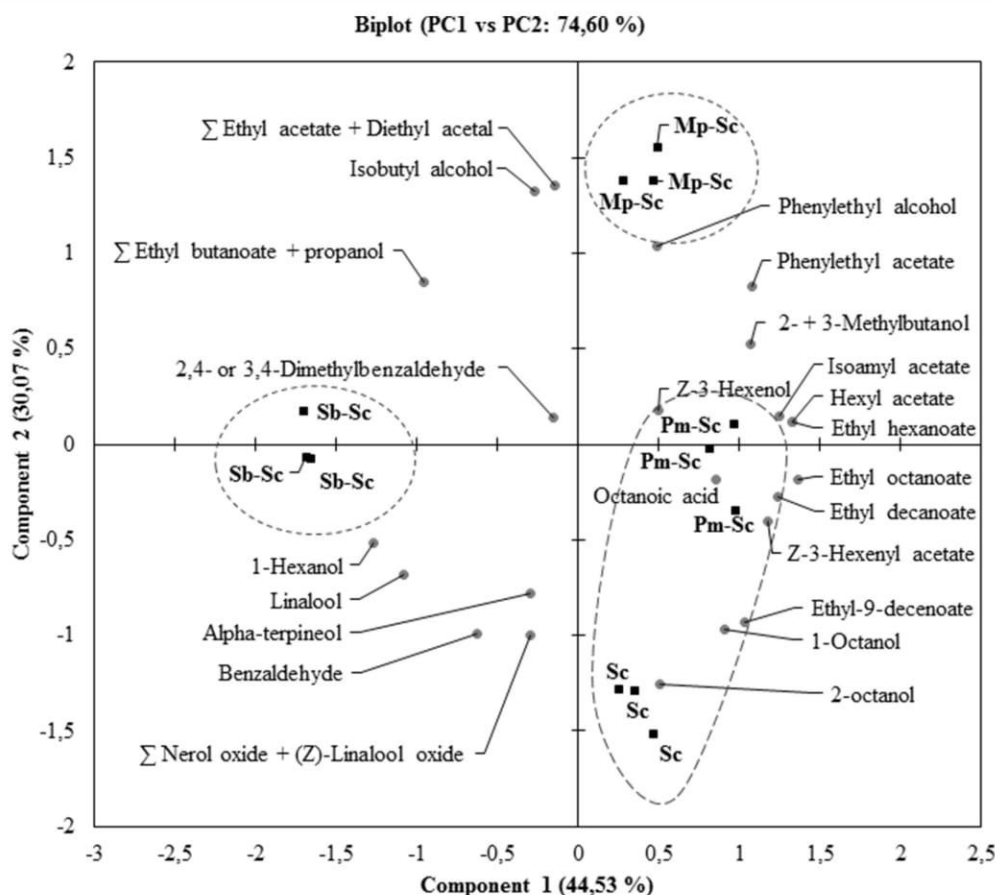
used a synthetic must. Our study is the first to provide a global overview of YAN consumption profiles during alcoholic fermentations in grape juice. Kemsawasd et al. (2015) reported that glutamine and ammonium could be considered preferred nitrogen sources for *M. pulcherrima*. Our results suggest that this is indeed the case for glutamine, but not for ammonium. Indeed, we found that ammonium assimilation was affected by temperature. Kemsawasd et al. (2015) identified cysteine, histidine and threonine as “bad” sources of nitrogen for this yeast. We obtained similar results for histidine and threonine at 28°C, but not at 20°C. Furthermore, we obtained the opposite results for cysteine (identified as a preferred source in our study). These comparisons show that the matrix and fermentation conditions affect the regulation of YAN assimilation. These differences may also be due to a strain-dependent effect. The YAN consumption profiles of the three NS yeast strains studied here differed from that of *S. cerevisiae* SLM in terms of both assimilation rates and the types of YAN assimilated. NS yeasts displayed specific patterns of YAN assimilation (non-consumption or preferential nitrogen sources) different from that of *S. cerevisiae*, suggesting that these species may display genomic differences in nitrogen metabolism and regulatory systems. For example, the assimilation, by *P. membranifaciens*, of proline at 28°C, suggests that it may have different mechanisms of transporter regulation,

potentially accounting for its effects on the volatile compounds profile of wine (Lambrechts and Pretorius, 2000; Clemente-Jimenez et al., 2005; Sadoudi et al., 2012; Cordero-Bueso et al., 2013; Liu et al., 2016).

For *S. cerevisiae*, the preferential assimilation of certain YAN sources can be explained mainly by the regulation of nitrogen source transport by permeases, including the Ssy1p-Ptr3p-Ssy5 (SPS) system (Ljungdahl, 2009) and the NCR system (Grenson, 1992; Horák, 1997; Crépin et al., 2012; Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012). The recent increase in interest in NS yeasts has not led to explorations of these mechanisms.

Our results also highlight the effect of temperature on YAN assimilation profiles, as already reported for *S. cerevisiae* (Beltran et al., 2007) but never previously reported for non-*Saccharomyces* yeasts. Beltran et al. (2007) suggested that lower temperatures are associated with a lower plasma membrane fluidity and lower levels of molecular motion for phospholipids, membrane proteins and, consequently, some of the permeases involved in YAN transport. These aspects have been described in *S. cerevisiae*, but it is reasonable to assume that the same pattern is likely to occur in NS yeasts.

Sequential inoculation greatly alters nitrogen availability at the time of inoculation with *S. cerevisiae*. The YAN consumed by NS yeasts are not subsequently available to



**FIGURE 5 |** Biplot of the principal component analysis (PC1 vs. PC2) for volatile compounds (A) from sequential fermentations: *S. bacillaris* BBMV5FA17—*S. cerevisiae* SLM (Sb-Sc), *M. pulcherrima* BB810—*S. cerevisiae* SLM (Mp-Sc), *P. membranifaciens* BB3—*S. cerevisiae* SLM (Pm-Sc) at 20°C. *S. cerevisiae* SLM (Sc) in pure culture was used as a control. Ellipses represent clusters obtained from HCA.

*S. cerevisiae*, and this may affect the concentrations of the volatile compounds generated from these amino acids. For example, leucine, the precursor of the volatile compounds isoamyl acetate in *S. cerevisiae* (Hazelwood et al., 2008) was rapidly consumed by *S. bacillaris* BBMV5FA17 during the first stage of fermentation. *S. bacillaris* has been shown to produce only small amounts of isoamyl acetate (Sadoudi et al., 2012). Thus, in sequential culture, the isoamyl acetate present is produced mostly by *Saccharomyces cerevisiae*. We compared isoamyl acetate production by *S. cerevisiae* in pure and sequential cultures. The levels of this compound were 21 times higher in pure cultures than in sequential cultures, and this difference is probably due to the consumption of its precursor by the NS yeast. Leucine is also the precursor of 2-methylbutanol (Ribéreau-Gayon et al., 2006). We determined the concentration of 2- + 3-methylbutanol, which was significantly lower in sequential fermentations with *S. bacillaris* BBMV5FA17 than in pure cultures of *S. cerevisiae* SLM (Table 3). In this case, as for isoamyl acetate, the decrease in 2- + 3-methylbutanol levels directly reflects the consumption of leucine by *S. bacillaris* BBMV5FA17. Valine was also partially consumed

by *S. bacillaris* BBMV5FA17. However, by contrast to our observations for isoamyl acetate and 2- + 3-methylbutanol, the concentration of isobutyl alcohol, the higher alcohol derived from valine (Ribéreau-Gayon et al., 2006), was significantly higher in sequential fermentations ( $2088.0 \pm 225.2 \mu\text{g/L}$ ) than in pure cultures of *S. cerevisiae* SLM ( $1102.9 \pm 292.6 \mu\text{g/L}$ ; Table 3). There are two possible reasons for this: *S. bacillaris* may produce large amounts of isobutyl alcohol or, in cofermentations with *S. cerevisiae*, a synergistic effect results in higher levels of production. Such effects have already been reported (Lambrechts and Pretorius, 2000; Andorrà et al., 2010; Ciani et al., 2010; Sadoudi et al., 2012; Ciani and Comitini, 2015). The same may also be true for sequential fermentations with *M. pulcherrima* BB810, which resulted in significantly higher levels of isobutyl alcohol than were obtained with *S. bacillaris* BBMV5FA17 (Table 3). Similar concentrations of isobutyl alcohol were obtained in pure cultures of *S. cerevisiae* SLM and in sequential fermentations with *P. membranifaciens* BB3 (Table 3). Phenylalanine is another amino acid precursor described in previous studies (Ribéreau-Gayon et al., 2006) and associated with volatile compounds production. All the NS

yeasts studied consumed this amino acid in the first part of the sequential fermentation, but, at the end of the sequential fermentation, only *M. pulcherrima* BB810/*S. cerevisiae* SLM sequential fermentations had produced significant amounts of phenylethyl alcohol, the volatile compounds derived from phenylalanine (Table 3). Phenylethyl acetate, an ester derived from phenylethyl alcohol, was present at high concentration (more than twice that in pure cultures of *S. cerevisiae* SLM). *S. cerevisiae* is known to produce larger amounts of phenylethyl acetate than pure cultures of NS yeasts, but even higher phenylethyl acetate levels were reported in a previous study for a *M. pulcherrima*/*S. cerevisiae* coculture (Sadoudi et al., 2012). In this study, other than for leucine and valine, the link between amino acid concentration and volatile compound levels is not straightforward. Indeed, the production of higher alcohols and esters by yeasts is a highly complex process dependent on a number of parameters. Higher alcohols are produced either from their amino acid precursors or by central carbon metabolism (Lambrechts and Pretorius, 2000; Swiegers and Pretorius, 2005; Mouret et al., 2009; Styger et al., 2011) showed that isobutanol and isoamyl alcohol were not produced exclusively from their amino acid precursors. The availability of lipids and of oxygen also affects acetate formation. The *de novo* synthesis of acetate by yeast is restricted if lipids are abundant in the growth medium. This, in turn, reduces the production by the yeast of related aroma compounds, such as fatty acid ethyl esters and isoamyl acetate (Yunoki et al., 2005; Rollero et al., 2015). In addition to the specific metabolic features of individual strains, complex interactions between yeasts involving competition for nitrogen, lipids, and oxygen, also control the concentrations of esters and higher alcohols in sequential culture. Finally, the production of volatile compounds by yeasts is dependent on the types and amounts of YAN in the medium (Bell and Henschke, 2005; Torrea et al., 2011). As demonstrated here, non-*Saccharomyces* yeasts have quantitative and qualitative effects on YAN, at least partly explaining the differences in compound concentrations between pure cultures of *Saccharomyces* and sequential fermentations.

In conclusion, we provide here the first characterization of the specific nitrogen preferences of NS yeast strains. Our results highlight considerable differences in preferred nitrogen sources between the species studied. Further studies are required to determine the molecular basis of these differences. Our

findings highlight the need to monitor nitrogen levels in sequential fermentations for winemaking, to prevent sluggish *S. cerevisiae* fermentations due to the depletion of YAN by non-*Saccharomyces* yeasts. From these results, a specific addition of amino acids in must could be considered. Moreover the impact of the sequential fermentation on the volatile and aromatic profile deserves further investigation. In a context of indigenous fermentation, our work suggests that non-*Saccharomyces* yeasts compete with *Saccharomyces* for nitrogen sources, with implications for the organoleptic characteristics of the wines produced.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceived and designed the study: AG, HA, RT, CM, and CS. Performed nitrogen HPLC experiments: AG, YL. Developed analysis method for amino acids and ammonium integration: AG, YL, HA, and RT. Determination of the concentration of volatile constituents in the wine and analysis: SV, BQ, AG, HA, RT. Drafted the manuscript: AG. Corrected and refined the manuscript: HA, RT, CM, CS, YL, SV, and BQ. All authors read and approved the final manuscript.

## FUNDING

Région Bourgogne Franche-Comté.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank the other members of the laboratory for their assistance, including, in particular, Laurence Noret for the amino acid analysis, and Vanessa David-Vaizant for her skillful technical assistance. This work is supported by the Conseil Régional de Bourgogne through the plan d'actions régional pour l'innovation (PARI) and the European Union through the PO FEDER-FSE Bourgogne 2014/2020 programs.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.02175/full#supplementary-material>

## REFERENCES

- Albergaria, H., and Arneborg, N. (2016). Dominance of *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation processes: role of physiological fitness and microbial interactions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 2035–2046. doi: 10.1007/s00253-015-7255-0
- Alexandre, H., and Charpentier, C. (1998). Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 20, 20–27. doi: 10.1038/sj.jim.2900442
- Andorrà, I., Berradre, M., Rozès, N., Mas, A., Guillamon, J. M., and Esteve-Zarzoso, B. (2010). Effect of pure and mixed cultures of the main wine yeast species on grape must fermentations. *Eur. Food Res. Technol.* 231, 215–224. doi: 10.1007/s00217-010-1272-0
- Anfang, N., Brajkovich, M., and Goddard, M. R. (2009). Co-fermentation with *Pichia kluyveri* increases varietal thiol concentrations in sauvignon blanc. *Aust. J. Grape Wine Res.* 15, 1–8. doi: 10.1111/j.1755-0238.2008.00031.x
- Äyräpää, T. (1968). Formation of higher alcohols by various yeasts. *J. Inst. Brew.* 74, 169–178. doi: 10.1002/j.2050-0416.1968.tb03111.x
- Barbosa, C., Falco, V., Mendes-Faia, A., and Mendes-Ferreira, A. (2009). Nitrogen addition influences formation of aroma compounds, volatile acidity and ethanol in nitrogen deficient media fermented by *Saccharomyces cerevisiae* wine strains. *J. Biosci. Bioeng.* 108, 99–104. doi: 10.1016/j.jbiosc.2009.02.017
- Bell, S. J., and Henschke, P. A. (2005). Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* 11, 242–295. doi: 10.1111/j.1755-0238.2005.tb00028.x

- Beltran, G., Esteve-Zarzoso, B., Rozès, N., Mas, A., and Guillamón, J. M. (2005). Influence of the timing of nitrogen additions during synthetic grape must fermentations on fermentation kinetics and nitrogen consumption. *J. Agric. Food Chem.* 53, 996–1002. doi: 10.1021/jf0487001
- Beltran, G., Novo, M., Rozès, N., Mas, A., and Guillamón, J. M. (2004). Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentations. *FEMS Yeast Res.* 4, 625–632. doi: 10.1016/j.femsyr.2003.12.004
- Beltran, G., Rozès, N., Mas, A., and Guillamón, J. M. (2007). Effect of low-temperature fermentation on yeast nitrogen metabolism. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 809–815. doi: 10.1007/s11274-006-9302-6
- Beltran, G., Torija, M. J., Novo, M., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamón, J. M., et al. (2002). Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: a six year follow-up study. *Syst. Appl. Microbiol.* 25, 287–293. doi: 10.1078/0723-2020-00097
- Bely, M., Sablayrolles, J. M., and Barre, P. (1990). Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions. *J. Ferment. Bioeng.* 70, 246–252. doi: 10.1016/0922-338X(90)90057-4
- Carrau, F. M., Medina, K., Farina, L., Boido, E., Henschke, P. A., and Dellacassa, E. (2008). Production of fermentation aroma compounds by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts: effects of yeast assimilable nitrogen on two model strains. *FEMS Yeast Res.* 8, 1196–1207. doi: 10.1111/j.1567-1364.2008.00412.x
- Ciani, M., and Comitini, F. (2015). Yeast interactions in multi-starter wine fermentation. *Curr. Opin. Food Sci.* 1, 1–6. doi: 10.1016/j.cofs.2014.07.001
- Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., and Domizio, P. (2010). Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-Saccharomyces yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Res.* 10, 123–133. doi: 10.1111/j.1567-1364.2009.00579.x
- Clemente-Jimenez, J. M., Mingorance-Cazorla, L., Martínez-Rodríguez, S., Las Heras-Vázquez, F. J., and Rodríguez-Vico, F. (2005). Influence of sequential yeast mixtures on wine fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 98, 301–308. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.06.007
- Cordero-Bueso, G., Esteve-Zarzoso, B., Cabellos, J. M., Gil-Díaz, M., and Arroyo, T. (2013). Biotechnological potential of non-Saccharomyces yeasts isolated during spontaneous fermentations of Malvar (*Vitis vinifera* cv. L.). *Eur. Food Res. Technol.* 236, 193–207. doi: 10.1007/s00217-012-1874-9
- Crépin, L., Nidelet, T., Sanchez, I., Dequin, S., and Camarasa, C. (2012). Sequential use of nitrogen compounds by *saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation: a model based on kinetic and regulation characteristics of nitrogen permeases. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 8102–8111. doi: 10.1128/AEM.02294-12
- Di Maio, S., Genna, G., Gandolfo, V., Amore, G., Ciaccio, M., and Oliva, D. (2012). Presence of *Candida zemplinina* in sicilian musts and selection of a strain for wine mixed fermentations. *South Afr. J. Enol. Vitic.* 33, 80–87. Available online at: <https://www.sasev.org/journal/list-of-journals/presence-of-candida-zemplinina-in-sicilian-musts-and-selection-of-a-strain-for-wine-mixed-fermentations/?id=14&entryId=111>
- Grenson, M. (1992). Amino acid transporters in yeast: structure, function and regulation. *New Compr. Biochem. Mol. Asp. Transp. proteins* 21, 219–245. doi: 10.1016/S0167-7306(08)60069-1
- Hazelwood, L. A., Daran, J. M., Van Maris, A. J. A., Pronk, J. T., and Dickinson, J. R. (2008). The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2259–2266. doi: 10.1128/AEM.00934-08
- Henschke, P., and Jiranek, V. (1993). Yeasts-metabolism of nitrogen compounds in wine microbiology and biotechnology. *Aust. Wine Res. Inst.* 77–164.
- Hernandez-Orte, P., Bely, M., Cacho, J., and Ferreira, V. (2006). Impact of ammonium additions on volatile acidity, ethanol, and aromatic compound production by different *Saccharomyces cerevisiae* strains during fermentation in controlled synthetic media. *Aust. J. Grape Wine Res.* 12, 150–160. doi: 10.1111/j.1755-0238.2006.tb00055.x
- Hernández-Orte, P., Ibarz, M. J., Cacho, J., and Ferreira, V. (2005). Effect of the addition of ammonium and amino acids to musts of Airen variety on aromatic composition and sensory properties of the obtained wine. *Food Chem.* 89, 163–174. doi: 10.1016/j.foodchem.2004.02.021
- Hernández-Orte, P., Ibarz, M. J., Cacho, J., and Ferreira, V. (2006). Addition of amino acids to grape juice of the Merlot variety: effect on amino acid uptake and aroma generation during alcoholic fermentation. *Food Chem.* 98, 300–310. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.05.073
- Hirst, M. B., and Richter, C. L. (2016). Review of aroma formation through metabolic pathways of *Saccharomyces cerevisiae* in beverage fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 67, 361–370. doi: 10.5344/ajev.2016.15098
- Horák, J. (1997). Yeast nutrient transporters. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Biomembr.* 1331, 41–79. doi: 10.1016/S0304-4157(96)00015-9
- Jiranek, V., Langridge, P., and Henschke, P. A. (1995). Amino acid and ammonium utilization by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts from a chemically defined medium. *Am. J. Enol. Vitic.* 46, 75–83.
- Jolly, N. P., Varela, C., and Pretorius, I. S. (2014). Not your ordinary yeast: non-saccharomyces yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Res.* 14, 215–237. doi: 10.1111/1567-1364.12111
- Kemsawasd, V., Viana, T., Ardö, Y., and Arneborg, N. (2015). Influence of nitrogen sources on growth and fermentation performance of different wine yeast species during alcoholic fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 10191–10207. doi: 10.1007/s00253-015-6835-3
- Lambrechts, M. G., and Pretorius, I. S. (2000). Yeast and its importance to wine aroma - a review. *South Afr. J. Enol. Vitic.* 21, 97–129.
- Liu, J., Arneborg, N., Toldam-Andersen, T. B., Petersen, M. A., and Bredie, W. L. (2017). Effect of sequential fermentations and grape cultivars on volatile compounds and sensory profiles of Danish wines. *J. Sci. Food Agric.* 97, 3594–3602. doi: 10.1002/jsfa.8218
- 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
- Liu, Y., Rousseaux, S., Tourdot-Maréchal, R., Sadoudi, M., Gougeon, R., Schmitt-Kopplin, P., et al. (2015). Critical reviews in food science and nutrition wine microbiome, a dynamic world of microbial Interactions 57, 37–41. doi: 10.1080/10408398.2014.983591
- Ljungdahl, P. O. (2009). Amino-acid-induced signalling via the SPS-sensing pathway in yeast. *Biochem. Soc. Trans.* 37, 242–247. doi: 10.1042/BST0370242
- Ljungdahl, P. O., and Daignan-Fornier, B. (2012). Regulation of amino acid, nucleotide, and phosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 190, 885–929. doi: 10.1534/genetics.111.133306
- Magasanik, B., and Kaiser, C. A. (2002). Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 290, 1–18. doi: 10.1016/S0378-1119(02)00558-9
- Marks, V. D., Van Der Merwe, G. K., and Van Vuuren, H. J. J. (2003). Transcriptional profiling of wine yeast in fermenting grape juice: regulatory effect of diammonium phosphate. *FEMS Yeast Res.* 3, 269–287. doi: 10.1016/S1567-1356(02)00201-5
- Mas, A., Guillamón, J. M., and Beltran, G. (2016). Editorial: non-conventional yeast in the wine industry. *Front. Microbiol.* 7:1494. doi: 10.3389/fmicb.2016.01494
- Medina, K., Boido, E., Faria, L., Gioia, O., Gomez, M. E., Barquet, M., et al. (2013). Increased flavour diversity of Chardonnay wines by spontaneous fermentation and co-fermentation with *Hanseniaspora vineae*. *Food Chem.* 141, 2513–2521. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.04.056
- Mendes-Ferreira, A., Barbosa, C., Lage, P., and Mendes-Faia, A. (2011). The impact of nitrogen on yeast fermentation and wine quality. *Ciência Téc. Vitiv.* 26, 17–32. Available online at: [http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0254-02232011000100003&lng=en&nrm=i&tlng=en](http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0254-02232011000100003&lng=en&nrm=i&tlng=en)
- Mouret, J. R., Cadiere, A., Agüera, E., Rollero, S., Ortiz-Julien, A., Sablayrolles, J. M., et al. (2009). Dynamics and quantitative analysis of the synthesis of fermentative aromas by an evolved wine strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 26, 545–551. doi: 10.1002/yea.3028
- Puertas, B., Jiménez, M. J., Cantos-Villar, E., Cantoral, J. M., and Rodríguez, M. E. (2017). Use of *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* in semi-industrial sequential inoculation to improve quality of Palomino and Chardonnay wines in warm climates. *J. Appl. Microbiol.* 122, 733–746. doi: 10.1111/jam.13375
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., and Dubourdieu, D. (2006). *Handbook of Enology: The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments, Vol. 2, 2nd Edn.* Chichester: Wiley. doi: 10.1002/0470010398

- Ritt, J. F., Remize, F., Grandvalet, C., Guzzo, J., Atlan, D., and Alexandre, H. (2009). Peptidases specific for proline-containing peptides and their unusual peptide-dependent regulation in *Oenococcus oeni*. *J. Appl. Microbiol.* 106, 801–813. doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.04032.x
- Rollero, S., Bloem, A., Camarasa, C., Sanchez, I., Ortiz-Julien, A., Sablayrolles, J. M., et al. (2015). Combined effects of nutrients and temperature on the production of fermentative aromas by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 2291–2304. doi: 10.1007/s00253-014-6210-9
- Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., and Capece, A. (2003). Function of yeast species and strains in wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 169–180. doi: 10.1016/S0168-1605(03)00290-3
- 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
- Soden, A., Francis, I. L., Oakey, H., and Henschke, P. (2000). Effects of co-fermentation with *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and composition of Chardonnay wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* 6, 21–30. doi: 10.1111/j.1755-0238.2000.tb00158.x
- Styger, G., Prior, B., and Bauer, F. F. (2011). Wine flavor and aroma. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38, 1145–1159. doi: 10.1007/s10295-011-1018-4
- Swiegers, J. H., and Pretorius, I. S. (2005). Yeast modulation of wine flavor. *Adv. Appl. Microbiol.* 57, 131–175. doi: 10.1016/S0065-2164(05)57005-9
- Ter Schure, E. G., Van Riel, N. A. W., and Verrips, C. T. (2000). The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 67–83. doi: 10.1111/j.1574-6976.2000.tb00533.x
- Tofalo, R., Patrignani, F., Lanciotti, R., Perpetuini, G., Schirone, M., Di Gianvito, P., et al. (2016). Aroma profile of montepulciano d'abruzzo wine fermented by single and co-culture starters of autochthonous Saccharomyces and non-Saccharomyces yeasts. *Front. Microbiol.* 7:610. doi: 10.3389/fmicb.2016.00610
- Torrea, D., Varela, C., Ugliano, M., Ancin-Azpilicueta, C., Leigh Francis, I., and Henschke, P. A. (2011). Comparison of inorganic and organic nitrogen supplementation of grape juice - Effect on volatile composition and aroma profile of a Chardonnay wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *Food Chem.* 127, 1072–1083. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.01.092
- 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
- Wang, C., Mas, A., and Esteve-zarzoso, B. (2016). The interaction between *Saccharomyces cerevisiae* and non-Saccharomyces yeast during alcoholic fermentation is species and strain-specific. *Front. Microbiol.* 7:502. doi: 10.3389/fmicb.2016.00502
- Whitener, M. E. B., Stanstrup, J., Carlin, S., Divol, B., Du Toit, M., and Vrhovsek, U. (2017). Effect of non-Saccharomyces yeasts on the volatile chemical profile of Shiraz wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* 23, 179–192. doi: 10.1111/ajgw.12269
- Yunoki, K., Yasui, Y., Hirose, S., and Ohnishi, M. (2005). Fatty acids in must prepared from 11 grapes grown in Japan: comparison with wine and effect on fatty acid ethyl ester formation. *Lipids* 40, 361–367. doi: 10.1007/s11745-006-1395-z
- Zott, K., Miot-Sertier, C., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., and Masneuf-Pomarede, I. (2008). Dynamics and diversity of non-Saccharomyces yeasts during the early stages in winemaking. *Int. J. Food Microbiol.* 125, 197–203. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.001

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Gobert, Tourdot-Maréchal, Morge, Sparrow, Liu, Quintanilla-Casas, Vichi and Alexandre. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



---

Chapitre 3 : Mise au point d'un procédé  
biotechnologique utilisant les levures NS afin de  
réduire la concentration en éthanol dans les vins

---

## Contexte scientifique

Plusieurs techniques physiques de désalcoolisation des vins existent déjà sur le marché mais elles engendrent inévitablement une dépréciation du produit. Depuis quelques années, l'émergence d'une alternative biologique utilisant les levures NS est apparue. Récemment, une revue scientifique à propos des stratégies microbiologiques pour réduire la concentration en éthanol dans le vin a été publiée (Varela and Varela, 2019). Il en ressort que bien que plusieurs études réussissent à réduire la concentration en éthanol de plusieurs pourcents, aucune n'a pour le moment eu cette même efficacité à l'échelle semi-industrielle et encore moins à produire des vins avec des concentrations en acidité volatile acceptables.

C'est pourquoi la mise au point d'une méthode de réduction de l'éthanol dans le vin, efficace à l'échelle semi-industrielle utilisant les levures NS avec une concentration acceptable en acidité volatile a été entreprise. La mise au point de ce procédé a été réalisée tout au long de la thèse pour aboutir à la rédaction d'un article scientifique. Dans cet article, seule la méthode « finalisée » à l'échelle laboratoire et à l'échelle semi-industrielle est présentée. Or plusieurs étapes de développement préalables ont été nécessaires. Dans ce chapitre, comme pour le chapitre 2, une partie additionnelle est proposée. L'étude préliminaire est découpée en deux parties comprenant un rappel du matériel et méthodes puis une description et discussion des résultats obtenus à l'échelle laboratoire. Volontairement, ce troisième volet de la thèse est placé en dernier chapitre. En effet, l'étude bibliographique sur l'influence du contenu en azote en fermentation alcoolique et l'étude des consommations en azote des levures NS sélectionnées ont permis de mieux considérer la gestion de l'azote dans certaines étapes. Ceci a notamment pu régler des problèmes de fermentation languissante.

N.B. Les références bibliographiques de l'article scientifique sont incluses dans la bibliographie générale de la thèse.

## Etudes préliminaires

### 3.1. Matériels et méthodes

#### 3.1.1. Souches de levures

##### 3.1.1.1. *S. cerevisiae*

La souche de levure *S. cerevisiae* utilisée est *S. cerevisiae* "Selectys® La Marquise", possédant un phénotype killer positif (souche commerciale Sofralab).

##### 3.1.1.2. Levures NS

Les différentes levures NS utilisées sont *Kluyveromyces lactis* 1mucl 2777, *Kluyveromyces lactis* 2mucl 27778, *Torulaspora delbrueckii* CBS 4865, *Torulaspora delbrueckii* collection Valmis 3, *Torulaspora delbrueckii* collection Valmis 6, *Metschnikowia pulcherrima* SB13, *Metschnikowia pulcherrima* collection Valmis, *Metschnikowia pulcherrima* 2, *Hanseniaspora uvarum* 4B13, *Hanseniaspora uvarum* 2A10, *Starmerella bacillaris* SFL1, *S. bacillaris* BBIFA3 et *S. bacillaris* BA1-7. Mis à part la souche *Torulaspora delbrueckii* CBS 4865, les autres souches ont été isolées au laboratoire entre 2010 et 2017 en Bourgogne.

#### 3.1.2. Milieux de culture, tampon et marqueur fluorescent

##### 3.1.2.1. Pré-culture

A partir d'un cryotube (glycérol à -80°C), les levures sont resuspendues dans 50 mL de *Yeast extract Peptone Dextrose* (YPD) modifié puis mises à incuber 24h à 28°C sous agitation à 150 rpm. Le milieu YPD modifié est composé, pour un litre, de 20 g de glucose, 10 g de peptone bactériologique, 5 g d'extrait de levure et 0,2 g de chloramphénicol. Seize grammes d'agar sont ajoutés en cas de préparation de milieu gélosé. Le milieu est ensuite autoclavé à 120°C pendant 20 minutes.

##### 3.1.2.2. Jus de raisin normalisé en sucre

Le jus de raisin utilisé pour réaliser les fermentations est un jus bio 100% pur jus de raisin blanc et muscat de la marque Casino. Le même lot est utilisé pour toutes les expériences. Dans un premier temps, la concentration en sucre est vérifiée par Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF) à l'aide d'un OenoFoss, onglet « moût ». Une fois la concentration connue, la quantité de glucose et fructose à ajouter est déterminée pour atteindre une concentration finale de 200 g/L. Après dilution complète

du saccharose, le jus de raisin normalisé en sucre est stérilisé à l'aide d'un filtre 0,22 µm. La concentration en azote assimilable est d'environ 450 mg/L et le pH de 3,3.

#### 3.1.2.3. Moûts

Le premier moût utilisé dans cette étude préliminaire est issu du cépage Merlot et provient de la région de Bordeaux. Dès réception, le moût est conservé à -20°C jusqu'à utilisation. Le moût possède une concentration en sucre de 220,5 g/L, ce qui représente un potentiel alcoolique de 13,1 % (v/v). La concentration en azote assimilable est d'environ 180 mg/L et le pH de 3,3.

#### 3.1.2.4. Tampon citrate phosphate

La composition du tampon citrate phosphate est composé de 0,1 M d'acide citrique monohydraté et 0,2 M de phosphate de sodium dibasique. Les composés sous forme de poudre sont dilués dans de l'eau distillée sous agitation à l'aide d'un barreau aimanté à 40°C. La solution est ajustée à pH 4 avec une solution de HCl à 37% m/v puis stérilisée à l'aide d'un filtre 0,22 µm. Ce tampon est utilisé en cytométrie de flux.

#### 3.1.2.5. 5-6-Carboxyfluorescein Diacetate (cFDA)

La solution de cFDA est composée de 2,3 mg de cFDA en poudre dissous dans 100 mL d'acétone. La concentration finale est de 500 µM. Cette molécule est un marqueur fluorescent utilisé en cytométrie et permet de distinguer l'activité estérase des cellules (les cellules possédant une activité estérase émettent un niveau de fluorescence plus élevé et sont ainsi considérées comme viables).

#### 3.1.2.6. Solution de sulfate d'ammonium

La solution de sulfate d'ammonium est composée de 94 g de sulfate d'ammonium dissous dans 200 mL d'eau distillée. La concentration en azote de cette solution mère est de 100 g/L ou 5,5 M.

#### 3.1.2.7. Solution de Tween 80/ergostérol

La solution mère est composée de 1,5 g d'ergostérol et 50 mL de Tween 80 complétée à 100 mL avec de l'éthanol à 99% (v/v).

#### 3.1.2.8. Solution de facteurs de croissance

- Echelle laboratoire

La solution mère de facteurs de croissance est composée de 2,61 g/L de L-glutamine, 5,25 g/L d'acide L-glutamique, 1,55 g/L de L-arginine, 2,36 g/L de sulfate d'ammonium, 15 mg/L d'ergostol, 2,5 g/L de chlorhydrate de thiamine et de 100 µg/L de biotine. La solution mère a été stérilisée par filtration (0,22 µm). Lors des ajouts dans le moût en fermentation (1 L), à chaque fois 10 mL ont été ajoutés pour obtenir une concentration finale de 200 mgN/L en YAN, de 25 mg/L en thiamine chlorhydrate, de 1 µg/L de biotine-D et de 1,5 mg/L d'ergostérol. Ce volume ajouté représente 1/100<sup>ème</sup> du volume total et est considéré comme négligeable.

- Echelle pilote

La composition des facteurs de croissance est identique à celle utilisée à l'échelle laboratoire. La stérilité n'étant plus indispensable, après pesée, les poudres ont été directement versées dans la cuve exceptée pour la biotine. Pour la biotine, 10 mL d'une solution mère à 100 µg/L ont été ajoutés séparément.

### 3.1.3. Dénombrement par cytométrie en flux des pré-cultures

A partir de la pré-culture, une dilution au 1/100<sup>ème</sup> est réalisée dans du tampon citrate phosphate. 100 µL de la dilution au 1/100<sup>ème</sup> sont ensuite prélevés et 10 µL de cFDA à 500 µM sont ajoutés. Ce tube est mis à incuber pendant 20 minutes à température ambiante à l'obscurité. Pendant le temps d'incubation, le reste de la suspension levurienne diluée au 1/100<sup>ème</sup> est utilisé pour déterminer le nombre de cellules « non marquées » par cytométrie en flux (BD ACCURI C6). Les paramètres de mesure comprennent le volume à analyser (20 µL), la vitesse du flux (medium), le nombre d'évènements (compris entre 200 et 2000 évènements/µL). Lorsque le temps d'incubation des levures « marquées » est terminé, les mêmes paramètres de mesures sont utilisés. Les cellules possédant une intensité de fluorescence supérieure à l'autofluorescence sont considérées comme viables.

### 3.1.4. Dénombrement sur milieu sélectif

Lorsque plusieurs levures sont présentes dans le milieu, leur dénombrement a été réalisé sur milieu sélectif. Pour cela, 100 µL d'une suspension cellulaire diluée à la bonne concentration dans de l'eau physiologique sont étalés sur milieux gélosés. Le milieu YPD modifié (0,5% (m/v) extrait de levure, 1% (m/v) peptone, 2% (m/v) glucose, et 0,02% (m/v) chloramphénicol) permet de déterminer la concentration levurienne totale (levures NS + *S. cerevisiae*). Le milieu Lysine (composition complète disponible en Annexe 3) (Oxoid LTD., England) permet de déterminer la concentration levurienne NS.

Sur ce milieu, les colonies de levure NS apparaissent rapidement et sont clairement visibles, alors que les colonies de levure *S. cerevisiae* apparaissent plus lentement et sont beaucoup plus petites.

### 3.1.5. Conditions de fermentation

#### 3.1.5.1. Echelle laboratoire Erlenmeyer

##### 3.1.5.1.1. Sélection des souches

Les fermentations sont réalisées dans des Erlenmeyers de 250 mL contenant 200 mL de jus de raisin stérile normalisé à 232 g/L de sucre et contenant 450 mg/L d'azote assimilable. Dans un premier temps chaque levure NS sélectionnée pour l'expérience (11 souches au total) est inoculée à une concentration de  $5 \cdot 10^6$  cellules/mL. Pour cela, le volume adéquat de suspension levurienne de pré-culture nécessaire (déterminé préalablement) pour atteindre la concentration désirée de cellules viables est prélevé et centrifugé à 10 000g pendant 5 minutes. Le surnageant est ensuite éliminé et le culot est resuspendu avec le jus de raisin normalisé. Cette suspension est alors placée dans l'Erlenmeyer. Les fermentations sont réalisées à 20°C sans agitation.

##### 3.1.5.1.2. Premier test de réduction en éthanol

Les fermentations sont réalisées dans des Erlenmeyers de 250 mL contenant 200 mL de jus de raisin stérile normalisé à 232 g/L de sucre et contenant 450 mg/L d'azote assimilable. Dans un premier temps chaque levure NS sélectionnée dans la première étape est inoculée à une concentration cellulaire de  $5 \cdot 10^6$  cellules/mL. Pour cela, le volume adéquat de suspension levurienne de pré-culture nécessaire (déterminé préalablement) pour atteindre la concentration désirée de cellules viables est prélevé et centrifugé à 10 000g pendant 5 minutes. Le surnageant est ensuite éliminé et le culot est resuspendu avec le jus de raisin normalisé. Cette suspension est alors placée dans l'Erlenmeyer. Les expériences sont réalisées suivant deux conditions :

- Fermentation sous agitation à 150 rpm à 20°C pendant 3 jours
- Fermentation statique à 20°C pendant 3 jours.

Au bout de trois jours d'incubation, *S. cerevisiae* SLM est inoculée à  $10^6$  cellules/mL suivant la même procédure que l'inoculation des pré-cultures des levures NS. A ce moment, l'agitation pour la première condition est stoppée. Les deux conditions se poursuivent sans agitation jusqu'à la fin de la fermentation sans agitation à 20°C.

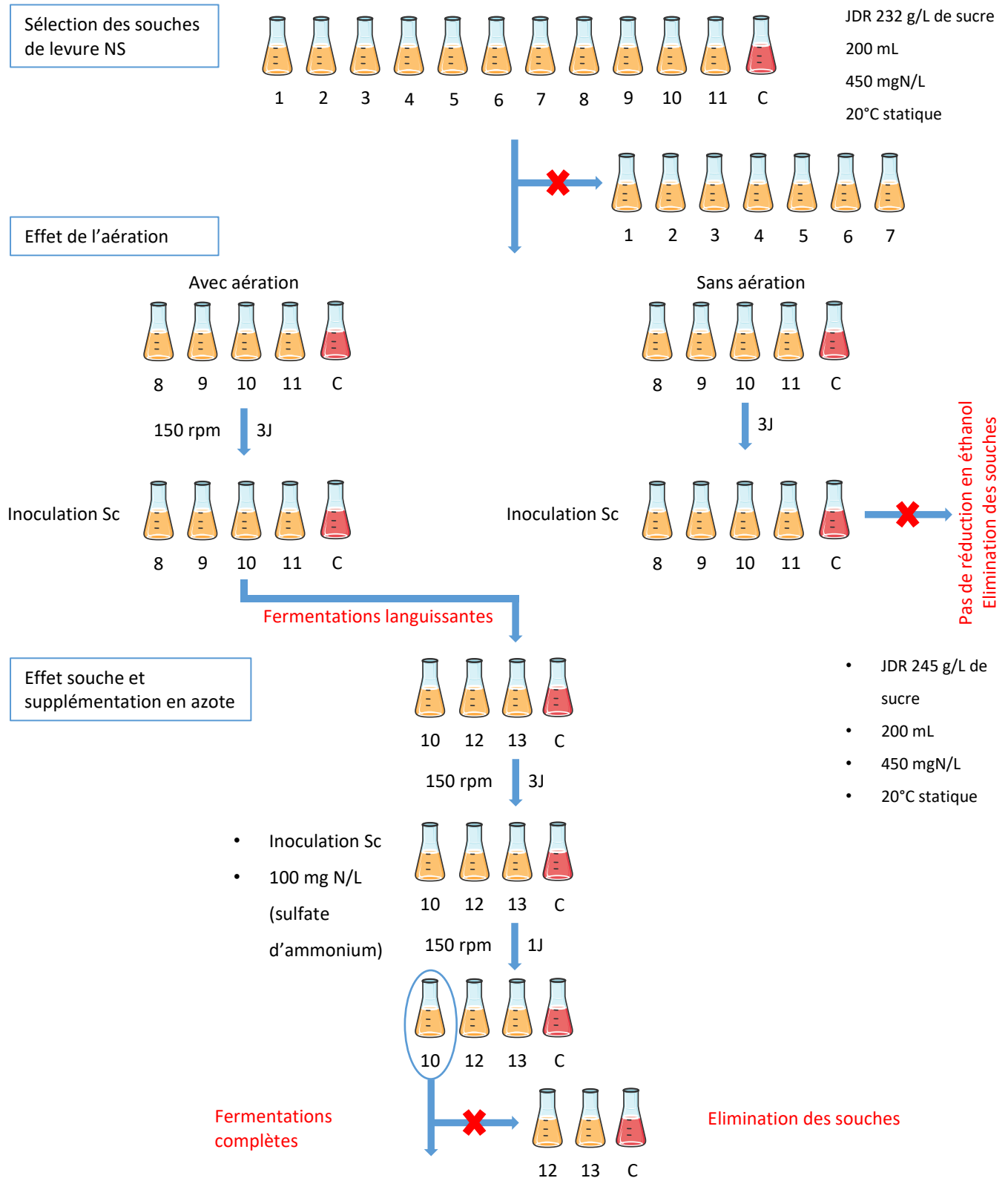
#### 3.1.5.1.2. Deuxième test de réduction en éthanol

Les fermentations sont réalisées dans des Erlenmeyers de 250 mL contenant 200 mL de jus de raisin stérile normalisé à 245 g/L de sucre et contenant 450 mg/L d'azote assimilable. Dans un premier temps *S. bacillaris* SFL1, *S. bacillaris* BBIFA3 et *S. bacillaris* BA1-7 sont inoculées à une concentration cellulaire de  $5 \cdot 10^6$  cellules/mL. Pour cela, le volume adéquat de suspension levurienne de pré-culture nécessaire (déterminé préalablement) pour atteindre la concentration désirée de cellules viables est prélevé et centrifugé à 10 000g pendant 5 minutes. Le surnageant est ensuite éliminé et le culot est resuspendu avec le jus de raisin normalisé. Cette suspension est alors placée dans l'Erlenmeyer. Les fermentations sont réalisées à 20°C sous agitation à 150 rpm pendant trois jours. Au bout des trois jours, *S. cerevisiae* SLM est inoculée à une concentration de  $10^6$  cellules/mL pour chaque condition. Conjointement à l'inoculation, 1 mL d'une solution de sulfate d'ammonium  $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$  à 10 g/L est ajouté. L'agitation est maintenue encore une journée puis stoppée au quatrième jour de fermentation. Enfin, l'expérience se poursuit sans agitation jusqu'à la fin de la fermentation à 20°C.

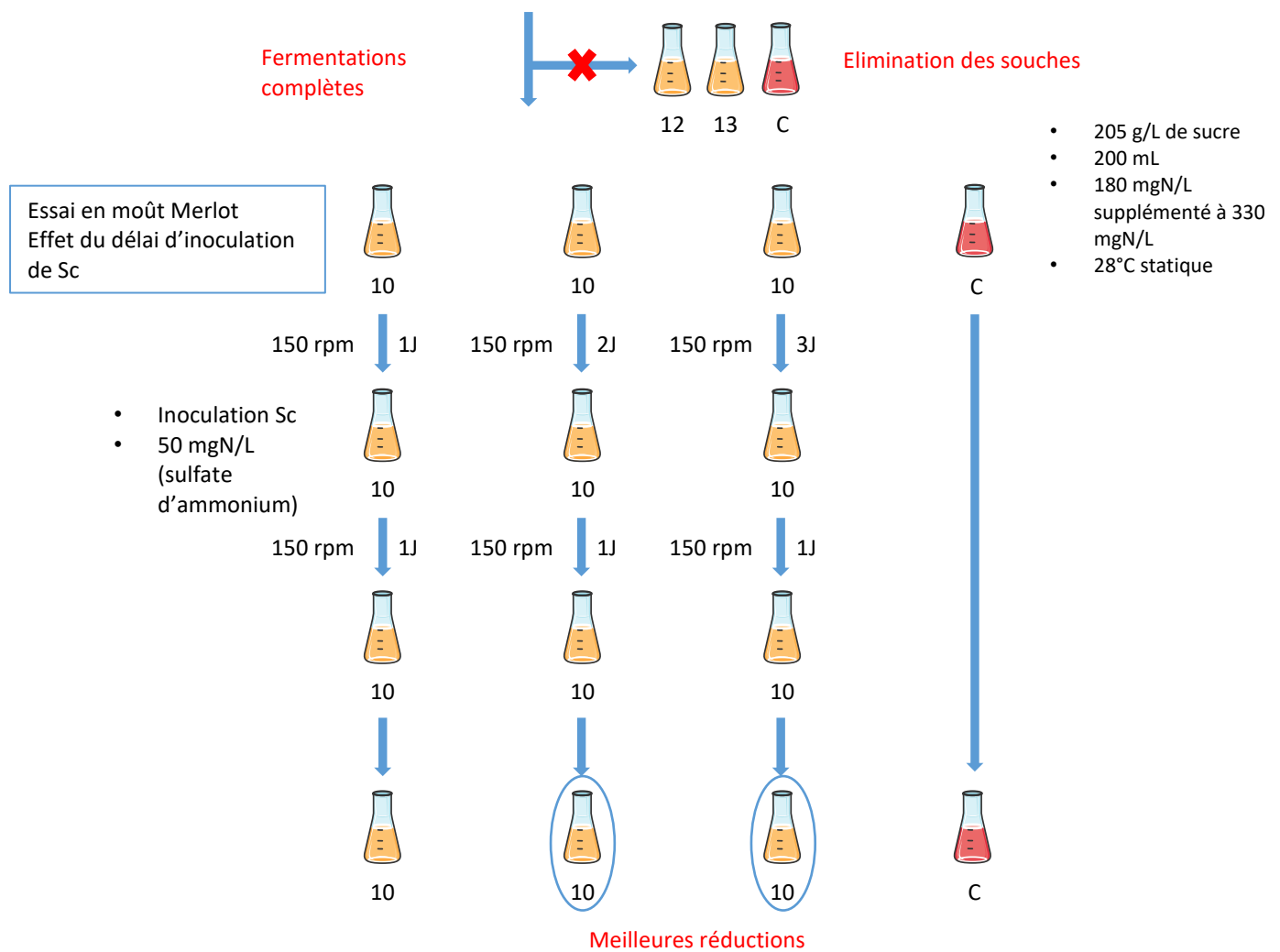
#### 3.1.5.1.3. Troisième test de réduction en éthanol

Les fermentations sont réalisées dans des Erlenmeyers de 250 mL contenant 200 mL de moût (Merlot, Région de Bordeaux) décongelé stérilisé par filtration et contenant environ 180 mg/L d'azote assimilable et 205 g/L de sucre. Dans un premier temps *S. bacillaris* SFL1, est inoculée à une concentration cellulaire de  $5 \cdot 10^6$  cellules/mL. Pour cela, le volume adéquat de suspension levurienne de pré-culture nécessaire (déterminé préalablement) pour atteindre la concentration désirée de cellules viables est prélevé et centrifugé à 10 000g pendant 5 minutes. Le surnageant est ensuite éliminé et le culot est resuspendu avec le moût. Cette suspension est alors placée dans l'Erlenmeyer. Dans un même temps, 1 mL d'une solution de sulfate d'ammonium  $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$  à 10 g/L est ajouté. Les fermentations sont réalisées à 28°C sous agitation à 150 rpm pendant un, deux ou trois jours. Lorsque le temps de fermentation avec la levure NS est atteint (1, 2 ou 3 jours), *S. cerevisiae* SLM est inoculée à une concentration de  $10^6$  cellules/mL avec un ajout de 0,5 mL d'une solution de sulfate d'ammonium  $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$  à 10 g/L. L'agitation est maintenue encore une journée, 0,5 mL de la solution de sulfate d'ammonium est à nouveau ajouté. L'agitation est ensuite stoppée au lendemain de l'inoculation de *S. cerevisiae* SLM. Enfin, l'expérience se poursuit sans agitation jusqu'à la fin de la fermentation à 28°C.

#### 3.1.5.1.4. Vue d'ensemble du protocole à l'échelle laboratoire Erlenmeyer



Suite page suivante



Correspondances : 1 : *Kluyveromyces lactis* 1mucl 2777, 2 : *Kluyveromyces lactis* 2mucl 27778, 3 : *Torulaspora delbrueckii* CBS, 4 : *Torulaspora delbrueckii* collection Valmis 3, 5 : *Torulaspora delbrueckii* collection Valmis 6, 6 : *Metschnikowia pulcherrima* SB13, 7 : *Metschnikowia pulcherrima* collection Valmis, 8 : *Metschnikowia pulcherrima* 2, 9 : *Hanseniaspora uvarum* 4B13, 10 : *Starmerella bacillaris* SFL1, 11 : *Hanseniaspora uvarum* 2A10, 12 : *S. bacillaris* BBIFA3 13 : *S. bacillaris* BA1-7, C : *S. cerevisiae* SLM.

### 3.1.5.2. Echelle laboratoire bioréacteur

#### 3.1.5.2.1. Détermination du $K_La$ par méthode statique

La détermination du  $K_La$  par méthode statique a été réalisée dans un bioréacteur de 2 L (New Brunswick BioFlo/ CelliGen 115) équipé pour les mesures d'une sonde polarographique à oxygène (InPro 6800, Mettler Toledo) et d'une électrode pH (405-DPAS-SC-K8S, Mettler Toledo). Après autoclavage à 120°C pendant 20 minutes, la cuve a été remplie de 2 L de jus de raisin normalisé en sucre à 250 g/L. Pour l'expérience, la température du jus de raisin a été maintenue à 28°C. Pour déterminer la vitesse de transfert de l'oxygène gazeux vers le jus de raisin (oxygène dissous) plusieurs couples d'agitation/aération ont été testés (Tableau 12)

Tableau 12 : Couples agitation/aération testés pour déterminer le  $K_La_{max}$  (rpm : rotation par minute, VVM : volume d'air par volume de jus de raisin par min)

| Agitation | Aération |
|-----------|----------|
| 100 rpm   | 0,5 VVM  |
|           | 1 VVM    |
|           | 2 VVM    |
| 200 rpm   | 0,5 VVM  |
|           | 1 VVM    |
|           | 2 VVM    |
| 300 rpm   | 0,5 VVM  |
|           | 1 VVM    |
|           | 2 VVM    |
| 400 rpm   | 0,5 VVM  |
|           | 1 VVM    |
|           | 2 VVM    |
| 500 rpm   | 0,5 VVM  |
|           | 1 VVM    |
|           | 2 VVM    |
| 600 rpm   | 0,5 VVM  |
|           | 1 VVM    |
|           | 2 VVM    |
| 700 rpm   | 0,5 VVM  |

Par souci de praticité, les couples agitation/aération ont été stoppés à 700 rpm/0,5 VVM car la formation de mousse devenait trop importante.

Dans un premier temps, le jus de raisin est saturé en oxygène à l'aide d'air comprimé (phase de saturation), puis inerté au diazote (phase d'inertage). Lorsque la concentration en oxygène dissous atteint environ les 10%, le flux de diazote est coupé et le couple agitation/aération à tester est fixé. La re-saturation en oxygène du jus de raisin va suivre le schéma d'une fonction exponentielle comprenant une partie linéaire (zone linéaire) (Figure 29). A partir des points expérimentaux de la

zone linéaire, la formule permettant de déterminer le  $K_La$  à l'instant  $t$  est appliquée :  $\ln(C^*/(C^*-C_L)) = f(\text{temps})$  où  $C^*$  correspond à la valeur de la saturation en oxygène du jus de raisin (100%) et  $C_L$  à la valeur des points expérimentaux dans la zone linéaire. A partir de ces résultats, une régression linéaire est appliquée et le coefficient directeur déterminé, correspondant au  $K_La$  (Garcia-Ochoa and Gomez, 2009).

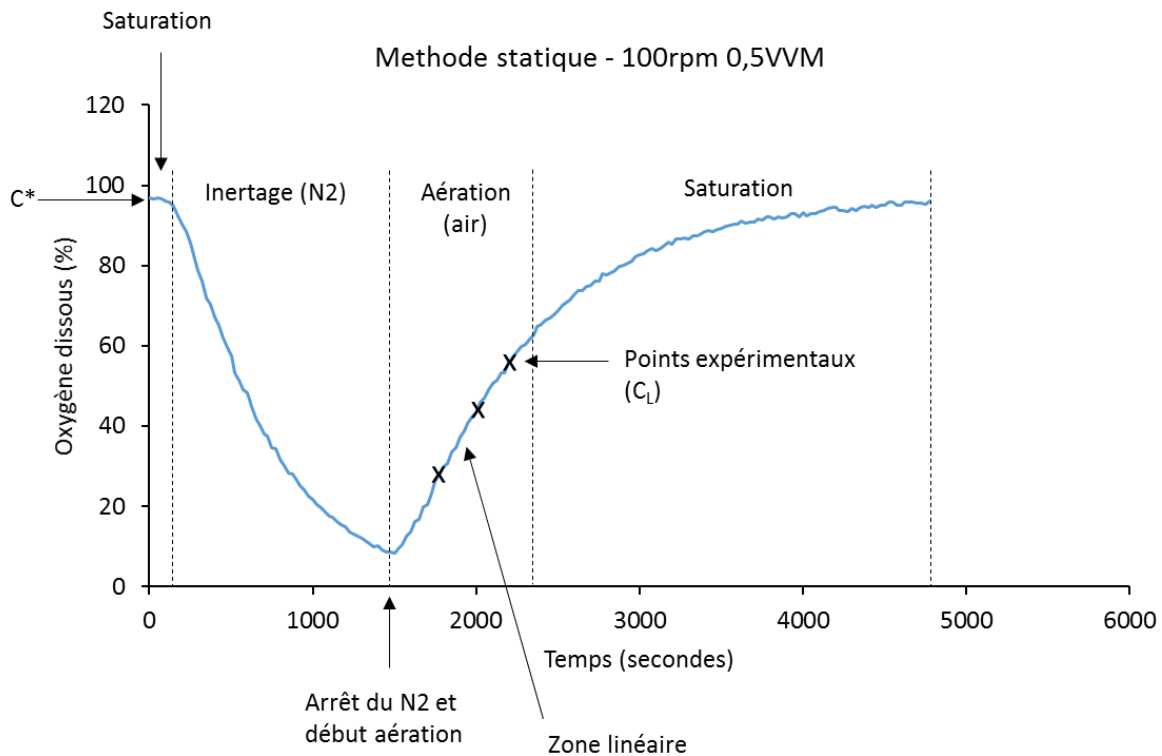


Figure 29 : Méthode de détermination du  $K_La$  (méthode statique). Exemple du couple 100 rpm/0,5 VVM.

Cette méthode a été appliquée pour chaque couple agitation/aération décrit dans le Tableau 12.

#### 3.1.5.2.2. Détermination du $KLa$ par méthode dynamique

La détermination du  $K_La$  par méthode dynamique a été réalisée dans un bioréacteur de 2 L (New Brunswick BioFlo/ CelliGen 115) équipé pour les mesures d'une sonde polarographique à oxygène (InPro 6800, Mettler Toledo) et d'une électrode pH (405-DPAS-SC-K8S, Mettler Toledo). Après autoclavage à 120°C pendant 20 minutes, la cuve a été remplie de 2 L de jus de raisin stérilisé par filtration (filtre 0,22  $\mu m$ ) et normalisé en sucre à 250 g/L. Pour l'expérience, la température du jus de raisin a été maintenue à 28°C et le taux d'ensemencement fixé à  $5 \cdot 10^6$  cellules/mL. A partir des résultats obtenus lors de la détermination du meilleur taux de transfert en oxygène par méthode statique ( $K_La$  max), le couple agitation/aération retenu est 500 rpm/1VVM. Ce couple a été choisi pour évaluer le  $K_La$  en méthode dynamique.

Cette méthode est basée sur la technique proposée par Taguchi et Humphrey (1966), mesurant l'activité respiratoire des microorganismes en culture dans un bioréacteur. Ainsi, lorsque l'alimentation en air est coupée, la concentration en oxygène dissous diminuera à un taux égal à la consommation en oxygène par la respiration des microorganismes (Figure 30).

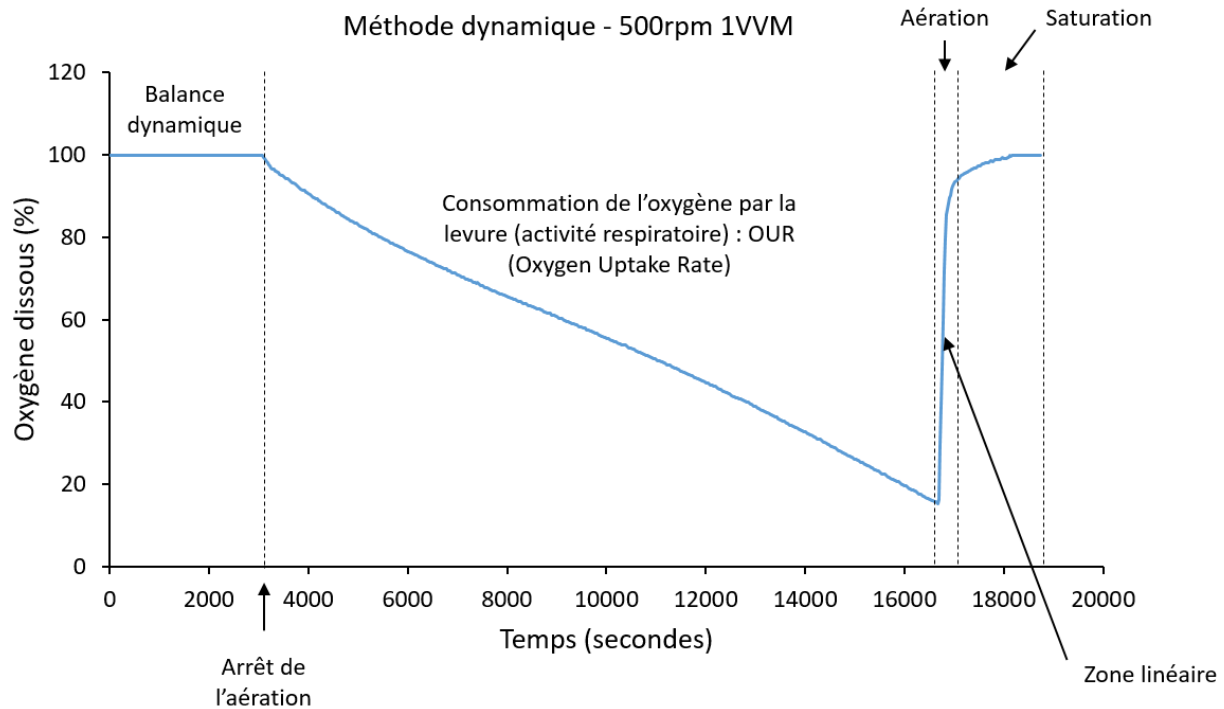


Figure 30 : Méthode de détermination du  $K_La$  (méthode dynamique). Exemple du couple 500 rpm/1 VVM.

L' $OUR$  représente cette vitesse de consommation de l'oxygène dissous au cours du temps. La détermination de l' $OUR$  fait intervenir la quantité de biomasse présente lors de la mesure. Ainsi, pour simplifier les équations, il est considéré que la quantité de biomasse sur le laps de temps imparti reste stable et a été déterminée en début d'expérience par cytométrie en flux (voir dénombrements des pré-cultures par cytométrie en flux). Lorsque la concentration en oxygène dissous a atteint une fourchette de 10 à 20% (avant que la concentration en oxygène dissous devienne critique pour la levure) l'aération a été relancée (1VVM). La zone linéaire a permis de déterminer la valeur du  $K_La$  à l'instant  $t$  en méthode dynamique suivant la formule :

$$\ln \frac{C^* - C_L}{C^* - C_{Lt0}} = -K_L a \cdot t$$

Où  $C^*$  correspond à la valeur de la saturation en oxygène du jus de raisin (100%),  $C_L$  à la valeur des points expérimentaux dans la zone linéaire et  $C_{Lt0}$  à la concentration en oxygène dissous lors de la reprise de l'aération (Garcia-Ochoa and Gomez, 2009; Chiciuc et al., 2010). Les valeurs obtenues pour

chaque point expérimental sont tracées en fonction du temps et après régression linéaire, le  $K_La$  en méthode dynamique a été obtenu.

### 3.1.5.2.3. Application des paramètres sélectionnés à la fermentation séquentielle

#### Test 1 : 267 g/L de sucres – 500 rpm/1 VVM – Premier essai en bioréacteur

Après stérilisation à 120°C pendant 20 minutes, le bioréacteur (New Brunswick™ BioFlo®/ CelliGen® 115) a été rempli avec 1 L de jus de raisin stérile pour éviter les débordements et normalisé en sucre à 267 g/L afin de se rapprocher des conditions réelles. Pour l'expérience, la température du jus de raisin a été maintenue à 28°C. Le couple agitation/aération appliqué correspond au  $K_La$  max déterminé lors des précédentes expériences soit 500 rpm/1 VVM. Une fois mis en place, le jus de raisin a été inoculé avec *S. bacillaris* SFL1 à une concentration de  $5 \cdot 10^6$  cellules/mL. Au bout de 24h de culture, *S. cerevisiae* SLM a ensuite été ajoutée à une concentration de  $10^6$  cellules/mL. Conjointement à l'inoculation de *S. cerevisiae* SLM, 100 mgN/L de sulfate d'ammonium ont été ajoutés. L'agitation et l'aération ont été maintenues pendant 24h puis de nouveau 100 mgN/L de sulfate d'ammonium ont été ajoutés. Quarante huit heures après le début de l'expérience, l'agitation et l'aération ont été coupées. Chaque jour, un prélèvement a été réalisé pour déterminer la population de *S. bacillaris* SFL1 (dénombrement sur milieu Lysine (Oxoid LTD., Angleterre) et de *S. cerevisiae* SLM (dénombrement sur milieu YPD). Lors de ces prélèvements, le couple agitation/aération a été relancé pendant 5 min (Figure 31). Les concentrations en éthanol et en sucres ont été déterminées par spectroscopie IRTF - OenoFoss type 4101 (FOSS Electric, Danemark).

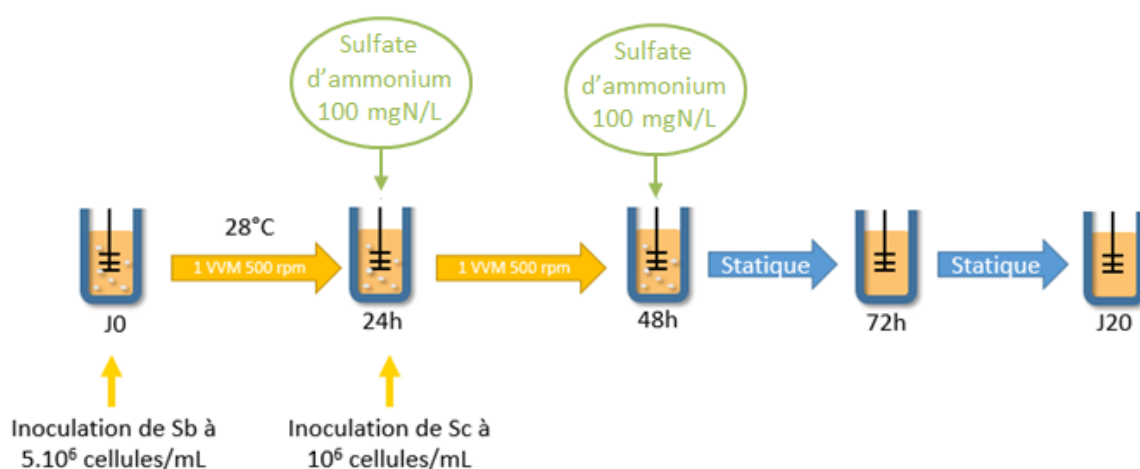


Figure 31 : Vue d'ensemble de la fermentation séquentielle du test 1. Sb : *S. bacillaris* SFL1 et Sc : *S. cerevisiae* SLM. Statique : aération et agitation stoppées.

### Test 2 : 250 g/L de sucres – 500 rpm/1 VVM – Diminution des sucres, augmentation de l'azote

Dans cette condition, la concentration sucres a été diminuée à 250 g/L pour favoriser leur consommation complète par les levures. Les concentrations en sulfate d'ammonium injectées à 24 et 48h ont été augmentées et sont de 200 mgN/L (Figure 32).

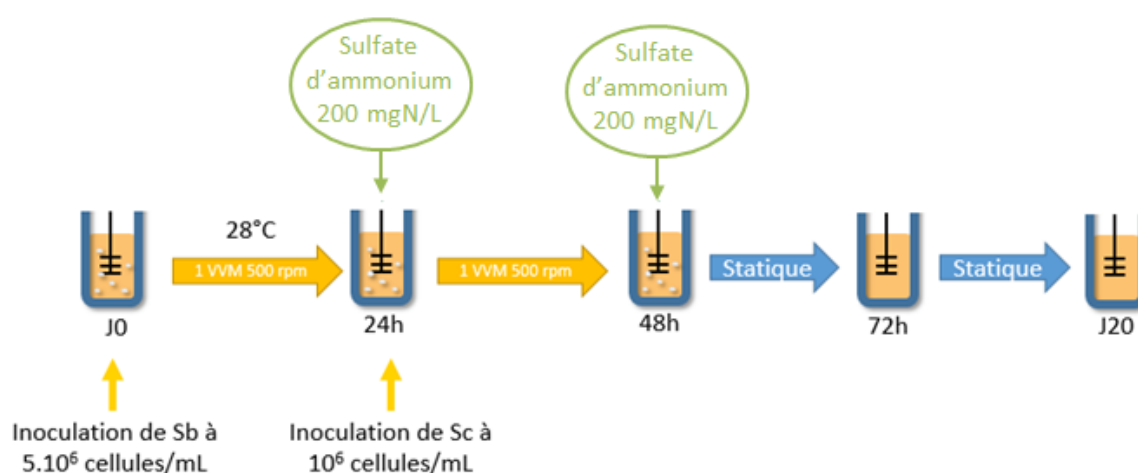


Figure 32 : Vue d'ensemble de la fermentation séquentielle du test 2. Sb : *S. bacillaris* SFL1 et Sc : *S. cerevisiae* SLM. Statique : aération et agitation stoppées.

### Test 3 : 220 g/L de sucres – 400 rpm/0,5 VVM – Diminution des sucres et du transfert d'oxygène

Après stérilisation à 120°C pendant 20 minutes, le bioréacteur a été rempli avec 1L de jus de raisin stérile normalisé en sucre à 220 g/L afin de limiter la fermentation languissante observée lors du test 1. Pour l'expérience, la température du jus de raisin a été maintenue à 28°C. Le couple agitation/aération appliqué correspond à  $\frac{1}{2}$  du  $K_{La}$  max soit 400 rpm/0,5 VVM. Une fois mis en place, le jus de raisin a été inoculé avec *S. bacillaris* SFL1 à une concentration de 5.10<sup>6</sup> cellules/mL. Au bout de 24h de culture, *S. cerevisiae* SLM a ensuite été ajoutée à une concentration de 10<sup>6</sup> cellules/mL.

A ce moment, un premier Erlenmeyer de 250 mL a été rempli avec 200 mL de la suspension levurienne provenant du bioréacteur. 200 mgN/L d'une solution de sulfate d'ammonium/thiamine et 100  $\mu$ L d'une solution Tween 80/ergostérol ont été ajoutés pour cette condition. Puis, un deuxième Erlenmeyer de 250 mL a été rempli également avec 200 mL de la suspension levurienne provenant du bioréacteur. Dans ce deuxième Erlenmeyer, uniquement 200 mgN/L de sulfate d'ammonium ont été ajoutés. Enfin, suite aux prélèvements, 200 mgN/L de sulfate d'ammonium/thiamine et 1 mL d'une solution Tween 80/ergostérol ont été ajoutés dans la cuve du bioréacteur.

Dans la suite de l'expérience, à 48h de nouveau 200 mgN/L de sulfate d'ammonium/thiamine et 1 mL d'une solution Tween 80/ergostérol ont été ajoutés au bioréacteur. Conjointement, le couple agitation/aération a été relancé pendant 5 minutes. Dans le premier Erlenmeyer, 200 mgN/L de sulfate d'ammonium/thiamine et 100 µL d'une solution Tween 80/ergostérol ont été ajoutés en limitant l'aération de la culture (homogénéisation uniquement par refoulement à l'aide de la pipette). Enfin dans le deuxième Erlenmeyer, uniquement 200 mgN/L de sulfate d'ammonium ont été ajoutés en limitant l'aération de la culture (homogénéisation uniquement par refoulement à l'aide de la pipette).

A 72h, 200 mgN/L de sulfate d'ammonium ont été rajoutés dans toutes les conditions avec agitation/aération pendant 5 minutes dans le bioréacteur et limitation de l'aération dans les Erlenmeyers de la même manière qu'à 48h (Figure 33).

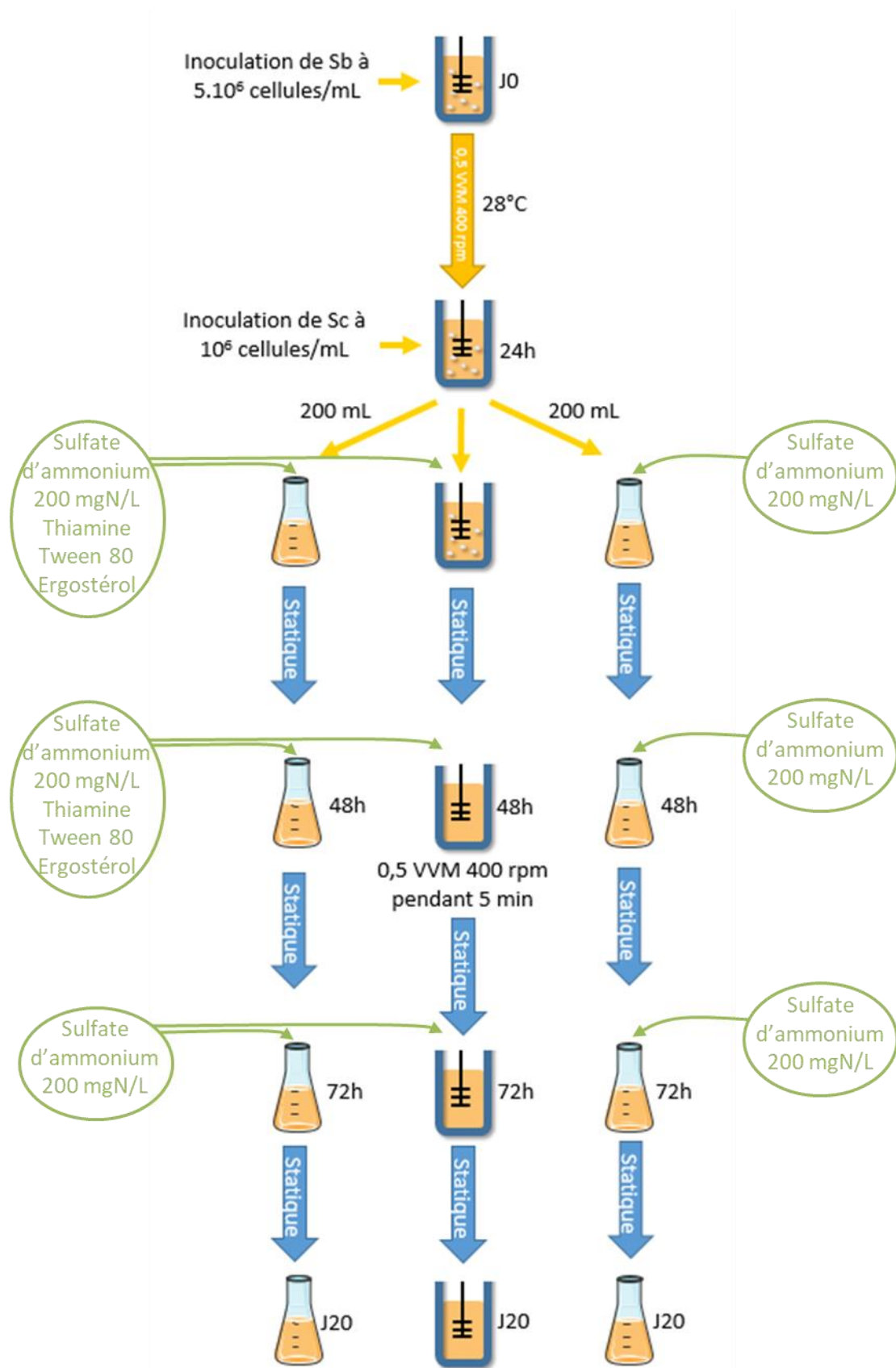


Figure 33 : Vue d'ensemble de la fermentation séquentielle du test 3. Sb : *S. bacillaris* SFL1 et Sc : *S. cerevisiae* SLM. Statique : aération et agitation stoppées.

#### Test 4 : 220 g/L de sucres – 400 rpm/0,5 VVM – Maitrise de l'azote

Après stérilisation à 120°C pendant 20 minutes, le bioréacteur a été rempli avec 1 L de jus de raisin stérile normalisé en sucre à 220 g/L. Pour l'expérience, la température du jus de raisin a été maintenue à 28°C. Le couple agitation/aération appliqué correspond à  $\frac{1}{2}$  du  $K_La$  max soit 400 rpm/0,5 VVM. Une fois mis en place, le jus de raisin a été inoculé avec *S. bacillaris* SFL1 à une concentration de  $5 \cdot 10^6$  cellules/mL. Au bout de 24h de culture, *S. cerevisiae* SLM a ensuite été ajoutée à une concentration de  $10^6$  cellules/mL. A ce moment, l'agitation a été stoppée et uniquement l'aération à 0,5 VVM conservée pendant 24h. A la fin du temps d'aération, le débit d'air a été arrêté.

Le milieu a été supplémenté en sulfate d'ammonium à une concentration finale de 200 mgN/L à 24, 48 et 72h (Figure 34).

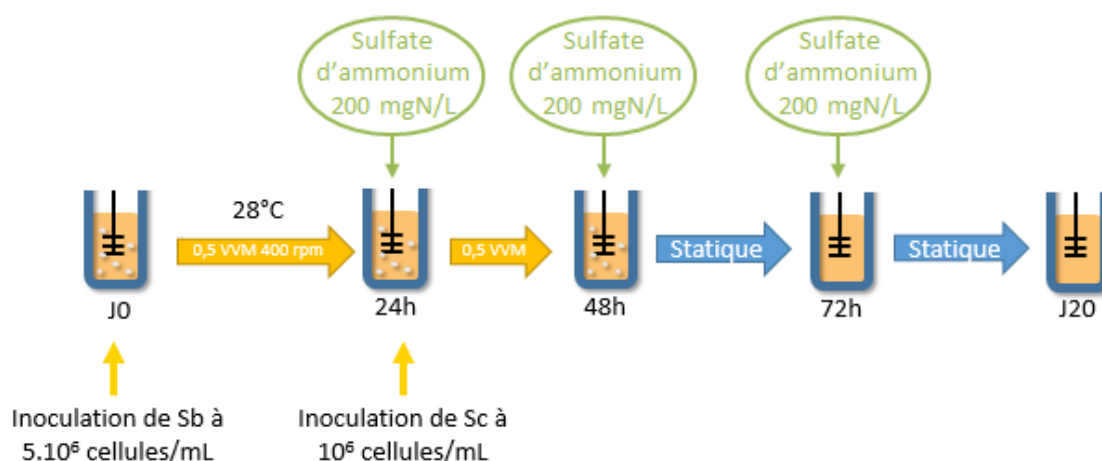


Figure 34 : Vue d'ensemble de la fermentation séquentielle du test 4. Sb : *S. bacillaris* SFL1 et Sc : *S. cerevisiae* SLM. Statique : aération et agitation stoppées.

#### Test 5 : 220 g/L de sucres – 400 rpm/0,5 VVM – Essai d'une supplémentation multiple

Après stérilisation à 120°C pendant 20 minutes, le bioréacteur a été rempli avec 1,4 L de jus de raisin stérile normalisé en sucre à 220 g/L. Pour l'expérience, la température du jus de raisin a été maintenue à 28°C. Le couple agitation/aération appliqué correspond à  $\frac{1}{2}$  du  $K_La$  max soit 400 rpm/0,5 VVM. Une fois mis en place, le jus de raisin a été inoculé avec *S. bacillaris* SFL1 à une concentration de  $5 \cdot 10^6$  cellules/mL.

##### Condition 1

Dans une première condition, au bout de 24h de culture, *S. cerevisiae* SLM a ensuite été ajoutée à une concentration de  $10^6$  cellules/mL. A ce moment, l'agitation a été stoppée et l'aération à 0,5 VVM

conservée pendant 24h. A la fin du temps d'aération, le débit d'air a été arrêté (Figure 35). Le milieu a été supplémenté en facteurs de croissance à 24, 48 et 72h.

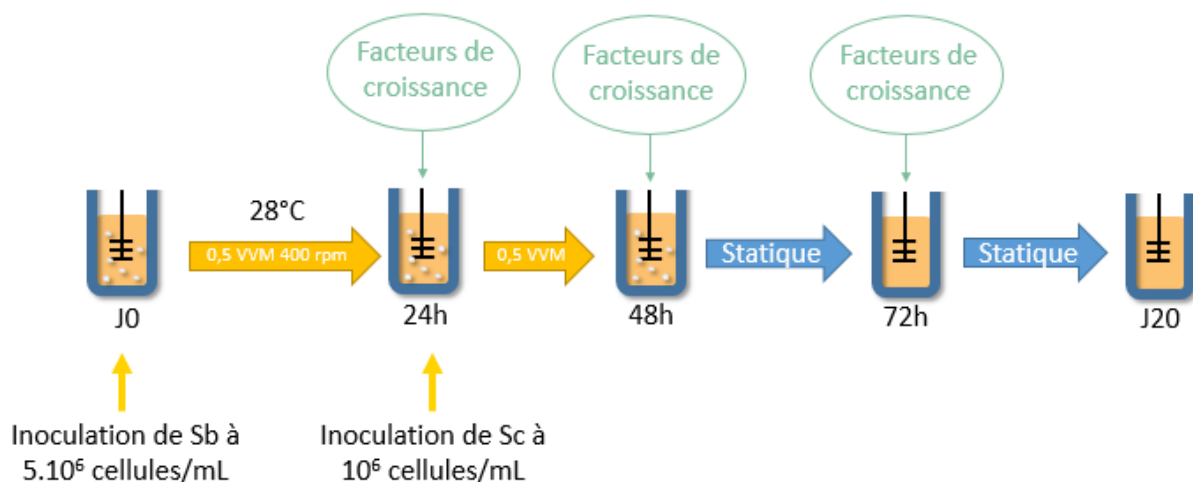


Figure 35 : Vue d'ensemble de la fermentation séquentielle du test 5 condition 1. Sb : *S. bacillaris* SFL1 et Sc : *S. cerevisiae* SLM. Statique : aération et agitation stoppées.

### Condition 2

Dans une seconde condition, *S. cerevisiae* SLM a été inoculée lorsque *S. bacillaris* SFL1 a atteint une concentration cellulaire de  $10^8$  cellules/mL. Puis, l'agitation a été stoppée et l'aération à 0,5 VVM conservée pendant 24h. A la fin du temps d'aération, le débit d'air a été arrêté (Figure 36). Le milieu a été supplémenté en facteurs de croissance (L-glutamine, acide L-glutamique, L-arginine, sulfate d'ammonium, ergostol, chlorhydrate de thiamine et biotine) à 24, 48 et 72h.

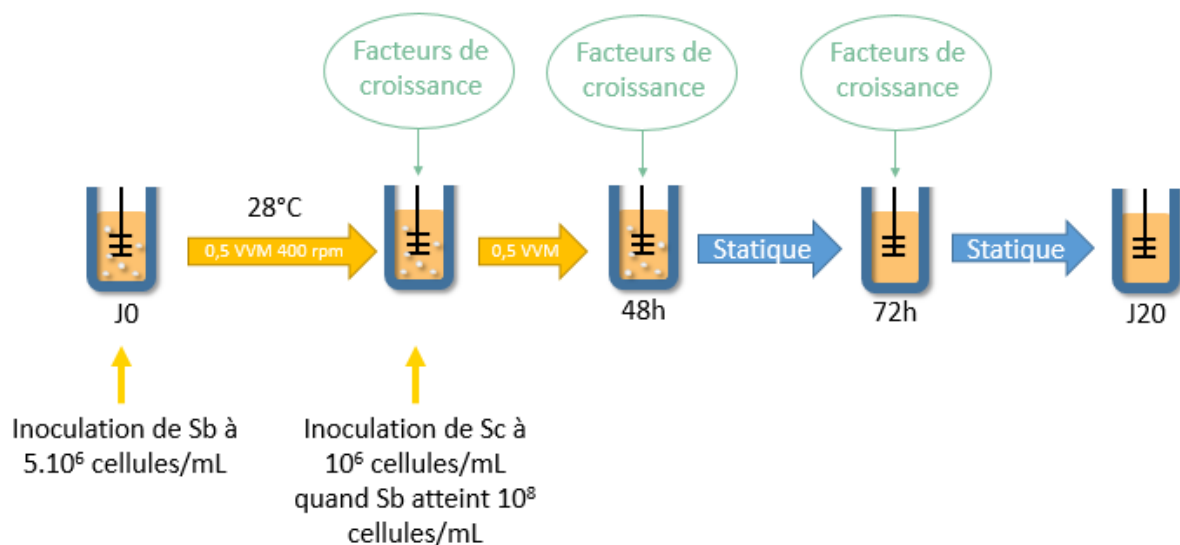


Figure 36 : Vue d'ensemble de la fermentation séquentielle du test 5 condition 2. Sb : *S. bacillaris* SFL1 et Sc : *S. cerevisiae* SLM. Statique : aération et agitation stoppées.

## 3.2. Résultats et discussion

### 3.2.1. Echelle laboratoire Erlenmeyer

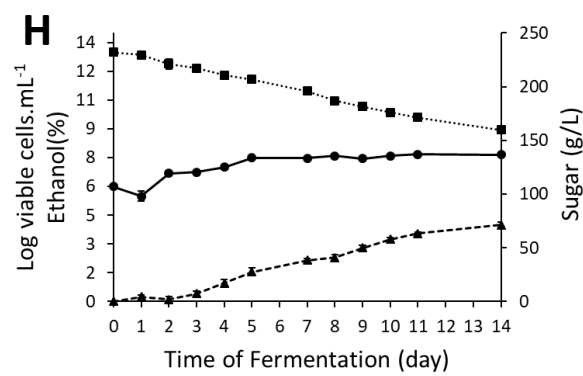
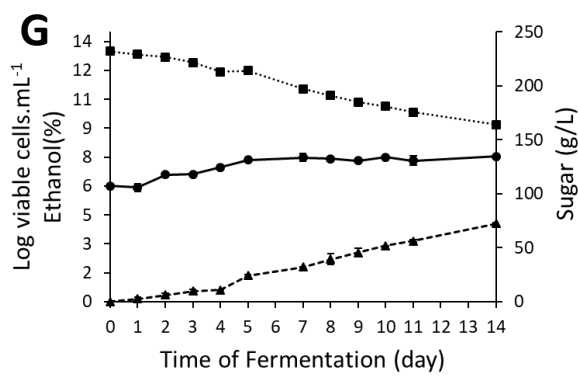
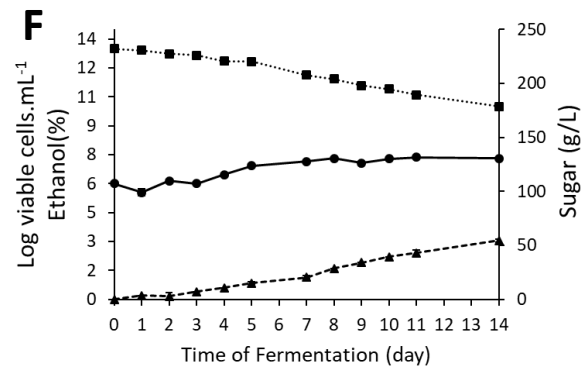
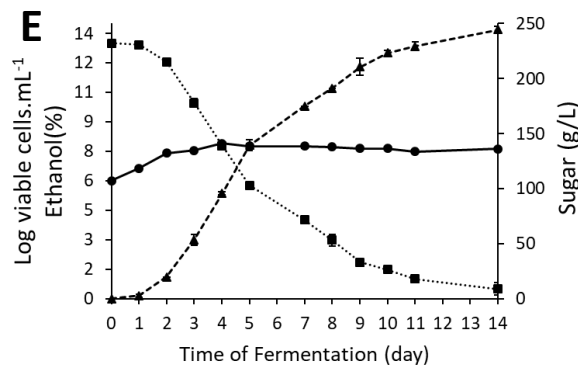
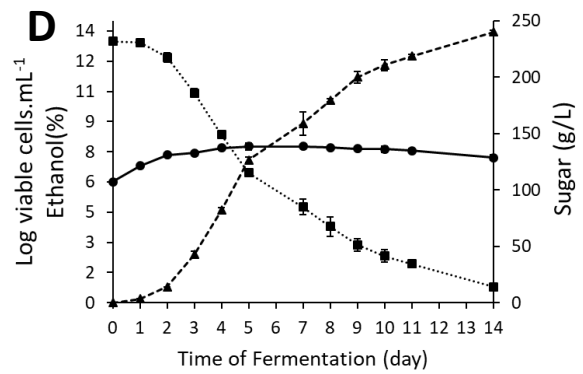
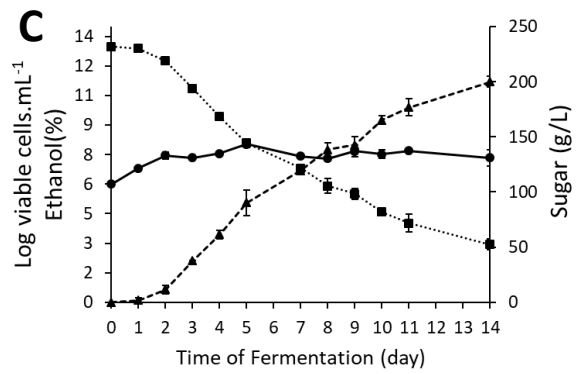
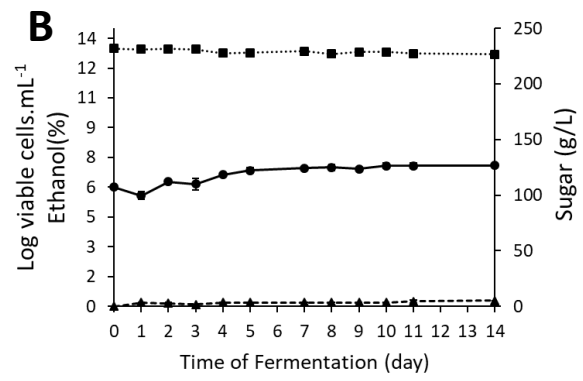
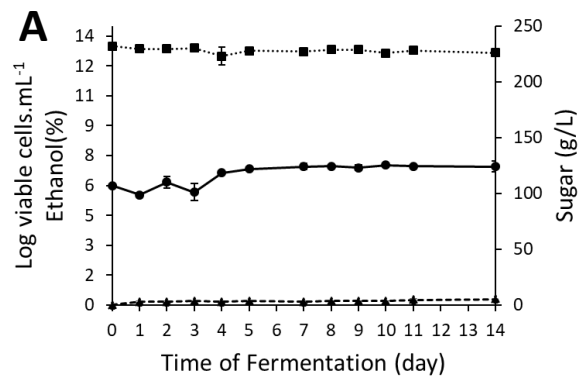
#### 3.2.1.1. Sélection des souches

Parmi les onze souches de levures non-*Saccharomyces* sélectionnées, neuf sont Crabtree positives et deux Crabtree négatives. Les profils de fermentation des deux souches Crabtree négatives (*K. lactis*) sont clairement identifiables (Figure 37 A et B). En effet, la consommation en sucre est très faible (6 g/L en 14 jours), ainsi que la production en éthanol (0,3% v/v en 14 jours) pour les deux souches. Cependant, les populations de *K. lactis* mucl2777 et de *K. lactis* mucl27778 atteignent  $8,9 \cdot 10^6$  cellules/mL et  $7,9 \cdot 10^7$  cellules/mL respectivement lors de la fin de l'expérience. Ainsi, même dans ces conditions, le peu d'oxygène dissous disponible a permis à ces levures de se développer.

Les souches de *T. delbrueckii* (Figure 37 C, D et E), n'étant pas Crabtree négatives, présentent une consommation en sucre beaucoup plus rapide que les deux souches de *K. lactis*. En 14 jours de fermentation, *T. delbrueckii* CBS a consommé 179,6 g/L de sucre, *T. delbrueckii* Valmis 216,2 g/L et *T. delbrueckii* Valmis 6, 218 g/L. Dans un même temps, les concentrations en éthanol s'échelonnent respectivement de 11,20 % (v/v), 13,45 % (v/v) et 13,70 % (v/v). Les populations de levures pour les trois souches atteignent sensiblement la même concentration cellulaire, soit environ  $3 \cdot 10^7$  cellules/mL. Le profil de fermentation des souches de *M. pulcherrima* (Figure 37 F, G et H) se différencie tout d'abord par la consommation linéaire des sucres au cours du temps. La vitesse de consommation est beaucoup moins rapide que les précédentes souches. Par exemple, en 14 jours, seulement 68 g/L de sucre ont été consommés par *M. pulcherrima* Valmis et 72 g/L par *M. pulcherrima* 2. Parallèlement, 4% (v/v) d'éthanol ont été produits par les deux souches. Après une phase de latence de 24h, les niveaux de population pour ces deux souches atteignent environ  $2 \cdot 10^7$  cellules/mL en phase stationnaire.

Le profil de fermentation des deux souches de *H. uvarum* (Figure 37 I et J) est similaire à ceux de *M. pulcherrima*. En effet, la consommation des sucres est quasi-linéaire. Sur le temps de l'expérience, *H. uvarum* 4B13 a consommé 64 g/L de sucre et *H. uvarum* 2A10 56 g/L. 3,85% (v/v) et 3,00% (v/v) d'éthanol ont été respectivement produits. Comme pour *M. pulcherrima*, les deux souches atteignent une biomasse d'environ  $2 \cdot 10^7$  cellules/mL. La dernière souche de levure NS testée est *S. bacillaris* SFL1 (Figure 37K). Comparée aux deux dernières espèces, près de 120 g/L de sucre ont été consommés en 14 jours avec une production de 5,7% (v/v) d'éthanol. La population de cette souche atteint également une concentration de  $2 \cdot 10^7$  cellules/mL en phase stationnaire. Enfin, le témoin *S. cerevisiae* SLM (Figure 37L) réalise une fermentation complète en 11 jours avec une production de

14,1% (v/v) d'éthanol. Durant la phase stationnaire, une population stable de  $6.10^7$  cellules/mL a été atteinte.



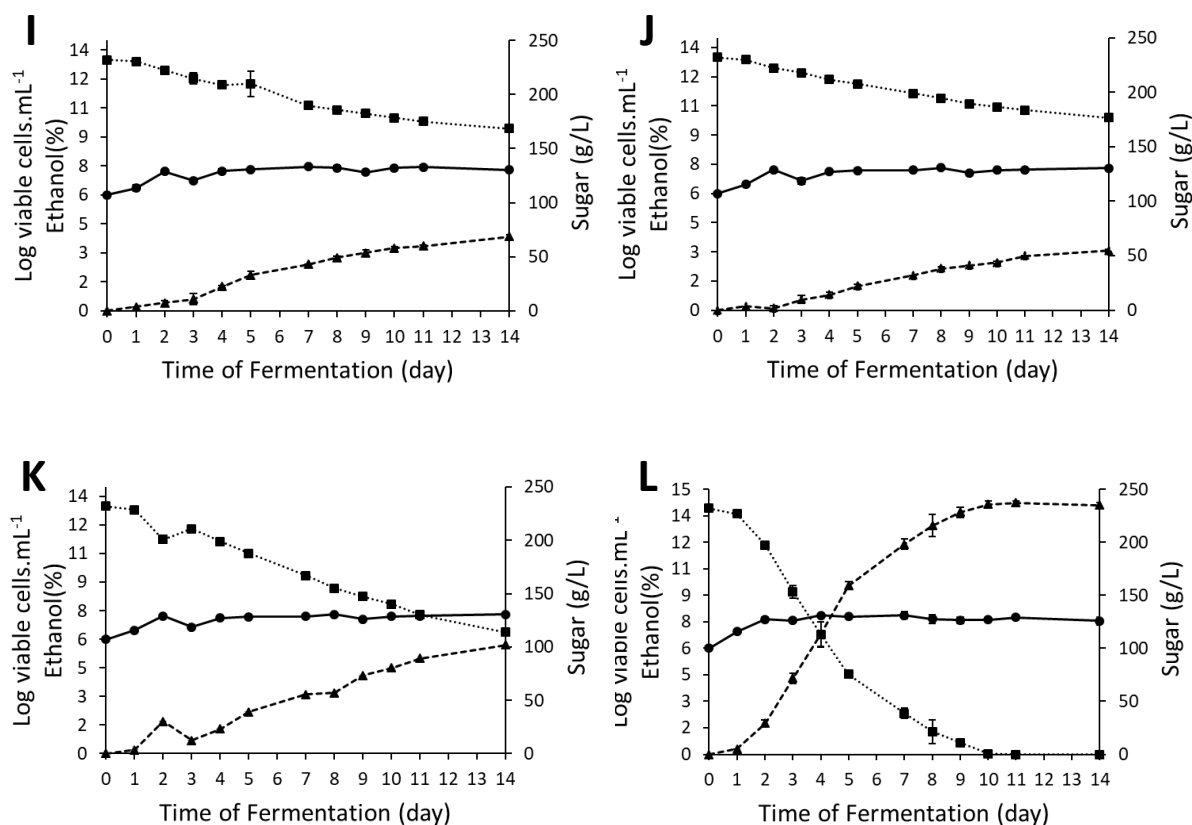


Figure 37 : Profil de fermentation des levures NS sélectionnées en jus de raisin normalisé à 232 g/L de sucre sans agitation à 20°C. A : *K. lactis* mucl2777, B : *K. lactis* mucl27778, C : *T. delbrueckii* CBS, D : *T. delbrueckii* Valmis 3, E : *T. delbrueckii* Valmis 6, F : *M. pulcherrima* SB13, G : *M. pulcherrima* Valmis, H : *M. pulcherrima* 2, I : *H. uvarum* 4B13, J : *H. uvarum* 2A10, K : *S. bacillaris* SFL1, L : *S. cerevisiae* SLM (témoin). Les courbes pleines représentent les populations viables, les courbes en pointillés avec un carré la concentration en sucre et les courbes en pointillés avec un triangle la concentration en éthanol. Pour chaque souche, les expériences ont été réalisées en duplicat et les barres d'erreur représentent l'écart-type des résultats.

A partir de ces profils de fermentation, le rendement en éthanol a été calculé à deux moments différents. Le premier, réalisé à 3 jours, correspond au moment de l'inoculation de *S. cerevisiae* SLM lors des fermentations séquentielles, le deuxième en fin d'expérience (14 jours). Le Tableau 13 résume l'ensemble des rendements en éthanol et le pourcentage de sucre consommé.

Tableau 13 : Rendements en éthanol à 3 jours et 14 jours de fermentation et pourcentage de sucre consommé des levures NS sélectionnées. Fermentations réalisées en jus de raisin normalisé en sucre à 232 g/L. *S. cerevisiae* a été utilisée comme témoin dans les mêmes conditions de culture. X : non calculable, EtOH : éthanol.

| Souches     | Espèce                           | Rendement en éthanol (g EtOH/g de sucre) |          | Sucre consommé (%) |         |
|-------------|----------------------------------|------------------------------------------|----------|--------------------|---------|
|             |                                  | Jour 3                                   | Jour 14  | Jour 3             | Jour 14 |
| 1mucl 2777  | <i>Kluyveromyces lactis</i>      | X                                        | X        | X                  | X       |
| 2mucl 27778 | <i>Kluyveromyces lactis</i>      | X                                        | X        | X                  | X       |
| CBS         | <i>Torulaspora delbrueckii</i>   | 0,44±0,2                                 | 0,49±0,3 | 16,40±2            | 77,41±1 |
| Valmis 3    | <i>Torulaspora delbrueckii</i>   | 0,41±0,1                                 | 0,49±0,2 | 19,78±3            | 93,90±2 |
| Valmis 6    | <i>Torulaspora delbrueckii</i>   | 0,44±0,3                                 | 0,48±0,2 | 23,38±3            | 96,21±3 |
| SB13        | <i>Metschnikowia pulcherrima</i> | 0,52±0,4                                 | 0,45±0,3 | 2,63±1             | 23,02±2 |
| Valmis      | <i>Metschnikowia pulcherrima</i> | 0,42±0,2                                 | 0,47±0,2 | 4,46±1             | 29,31±3 |
| 2           | <i>Metschnikowia pulcherrima</i> | 0,21±0,1                                 | 0,44±0,1 | 6,40±2             | 31,06±2 |
| 4B13        | <i>Hanseniaspora uvarum</i>      | 0,28±0,1                                 | 0,48±0,2 | 7,35±2             | 27,28±2 |
| 2A10        | <i>Hanseniaspora uvarum</i>      | 0,31±0,2                                 | 0,43±0,1 | 6,03±1             | 23,88±2 |
| SFL1        | <i>Starmerella bacillaris</i>    | 0,26±0,1                                 | 0,38±0,1 | 9,09±3             | 50,99±3 |
| SLM         | <i>Saccharomyces cerevisiae</i>  | 0,43±0,1                                 | 0,48±0,1 | 33,84±4            | 100±0   |

Suite aux très faibles consommations de sucre et de productions d'éthanol des deux souches de *K. lactis*, le calcul du rendement en éthanol n'a pas été possible. Parmi les autres souches, les rendements à 3 jours varient de 0,21 à 0,52 (g EtOH/g de sucre) et les rendements en fin d'expérience de 0,38 à 0,49 (g EtOH/g de sucre). Parmi ces résultats, les moins bons rendements ont été choisis comme critère de sélection des souches. Ainsi, les souches surlignées en bleu (Tableau 13) regroupant *M. pulcherrima* 2, *H. uvarum* 4B13, *H. uvarum* 2A10 et *S. bacillaris* SFL1 ont été sélectionnées. Comparées à *S. cerevisiae* SLM, aucune des levures NS n'a consommé la totalité des sucres. Néanmoins, sur ces premiers résultats, la levure qui semblerait la plus intéressante est *S. bacillaris* SFL1 puisqu'elle a consommé 51% des sucres et possède un rendement de 0,38 (g etoh/g de sucre) à 14 jours. Cette première étape de sélection a permis de réduire le nombre de candidats afin d'évaluer ensuite leur potentiel de réduction en éthanol dans le cadre de fermentations séquentielles.

### 3.2.1.2. Fermentation séquentielle – Effet de l'aération

A partir des souches précédemment sélectionnées, l'effet de l'aération sur la première partie de la fermentation séquentielle avec *S. cerevisiae* SLM a été évalué. Par comparaison, en fermentation séquentielle statique, tous les couples levures NS – *S. cerevisiae* SLM ont terminé la fermentation avec une consommation totale des sucres. Mais comparé à *S. cerevisiae* SLM seule (Figure 38E), les concentrations en éthanol obtenues en fermentation séquentielle ne sont que très légèrement

inférieures (-0,35% v/v pour *M. pulcherrima* 2 – *S. cerevisiae* SLM et -0,2%v/v pour *S. bacillaris* SFL1 – *S. cerevisiae* SLM) (Tableau 14). Dans ces conditions, lors de l'inoculation de *S. cerevisiae* SLM, toutes les levures NS testées ici n'ont pas la même capacité à persister dans le milieu. En effet, après 7 jours, *M. pulcherrima* 2 (Figure 38A) n'est plus détectable, 9 jours pour *H. uvarum* 4B13 (Figure 38B), 12 jours pour *H. uvarum* 2A10 (Figure 38C) et 16 jours pour *S. bacillaris* SFL1 (Figure 38D). Ceci pourrait s'expliquer par la sensibilité plus ou moins importante des souches de levure NS à l'éthanol, à certaines toxines produites par *S. cerevisiae* SLM ou encore un phénomène de compétition vis-à-vis de certains nutriments (Pérez-Nevado et al., 2006).

Tableau 14 : Comparaison des concentrations finales en éthanol et des concentrations résiduelles en sucre lors des fermentations séquentielles avec les souches de levures NS sélectionnées et *S. cerevisiae* SLM. Mp 2 – Sc SLM : *M. pulcherrima* 2 – *S. cerevisiae* SLM, Hu 4B13 – Sc SLM : *H. uvarum* 4B13 – *S. cerevisiae* SLM, Hu 2A10 – Sc SLM : *H. uvarum* – *S. cerevisiae* SLM et Sb SFL1 – Sc SLM : *S. bacillaris* SFL1 – *S. cerevisiae* SLM. *S. cerevisiae* SLM a été inoculée 3 jours après la levure NS. Pour chaque souche, les expériences ont été réalisées en duplicat (20 jours de fermentation).

| Souches                  | Fermentation statique            |                                       | Fermentation agitée              |                                       |
|--------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|
|                          | Concentration en éthanol (% v/v) | Concentration en sucre résiduel (g/L) | Concentration en éthanol (% v/v) | Concentration en sucre résiduel (g/L) |
| Mp 2 – Sc SLM            | 13,6±0,8                         | 0                                     | 11,55±0,6                        | 33,25±2                               |
| Hu 4B13 – Sc SLM         | 13,95±0,5                        | 0                                     | 13,7±0,2                         | 0                                     |
| Hu 2A10 – Sc SLM         | 13,95±0,6                        | 0                                     | 13,7±0,1                         | 0                                     |
| Sb SFL1 – Sc SLM         | 13,75±0,4                        | 0                                     | 11,25±0,3                        | 25,25±3                               |
| <i>S. cerevisiae</i> SLM | 13,95±0,1                        | 0                                     | 13,75±0                          | 0                                     |

L'agitation lors de la première partie de la fermentation séquentielle entraîne une augmentation de la concentration cellulaire. En effet, sans agitation les niveaux de populations atteignent une concentration d'environ  $10^8$  cellules/mL pour *M. pulcherrima* 2, *H. uvarum* 4B13 et 2A10 (Figure 38A, B, C) et  $5.10^8$  pour *S. bacillaris* SFL1 (Figure 38D) en phase stationnaire. Avec agitation, les niveaux de *M. pulcherrima* 2, *H. uvarum* 4B13 et *H. uvarum* 2A10 atteignent une concentration d'environ  $4.10^8$  cellules/mL (Figure 39A, B et C) et *S. bacillaris* SFL1  $10^9$  cellules/mL (Figure 39D). Pour toutes les souches, la durée de cultivabilité en présence de *S. cerevisiae* SLM est augmentée. Ainsi, *M. pulcherrima* 2 reste détectable jusqu'à 19 jours (Figure 39A), *H. uvarum* 4B13 et 2A10 14 jours (Figure 39B et 39C). *S. bacillaris* SFL1 reste viable tout au long de l'expérience avec des niveaux de populations supérieurs à *S. cerevisiae* SLM (Figure 39D) ce qui a déjà été observé dans l'étude de Englezos et collaborateurs (2018). Au niveau des profils de fermentation, une différence notable est visible pour les fermentations séquentielles *M. pulcherrima* 2 – *S. cerevisiae* SLM et *S. bacillaris* SFL1 – *S. cerevisiae* SLM. Pour chacune de ces fermentations, la totalité du sucre n'a pas été consommée et une fermentation languissante a été observée. En parallèle, les concentrations en éthanol ont atteint 11,55% (v/v) et 11,25% (v/v), respectivement. Pour les deux fermentations séquentielles avec *H. uvarum*, la totalité du sucre a été consommée et les concentrations en éthanol ont atteint une valeur de 13,95% (v/v), soit la même concentration que celle obtenue avec *S. cerevisiae* SLM seule.

Cette deuxième étape de sélection a permis de montrer que la souche la plus adaptée à notre objectif de réduction de la teneur en éthanol est *S. bacillaris* SFL1. D'autre part, cette expérience a montré que l'aération pendant la première partie de la fermentation séquentielle était un élément déterminant pour diminuer de manière plus importante la concentration en éthanol. Dans ces conditions, le métabolisme respiro-fermentaire est favorisé et permet une consommation des sucres avec une production d'éthanol diminuée (Quiros et al., 2014; Morales et al., 2015). Cependant, un phénomène de fermentation languissante est apparu, ce qui pourrait suggérer que les besoins en azote assimilable pour *S. cerevisiae* SLM n'ont pas été couverts (Alexandre and Charpentier, 1998). En effet, l'aération favorise la production de biomasse ce qui entraîne une consommation plus importante des nutriments et notamment l'azote assimilable.

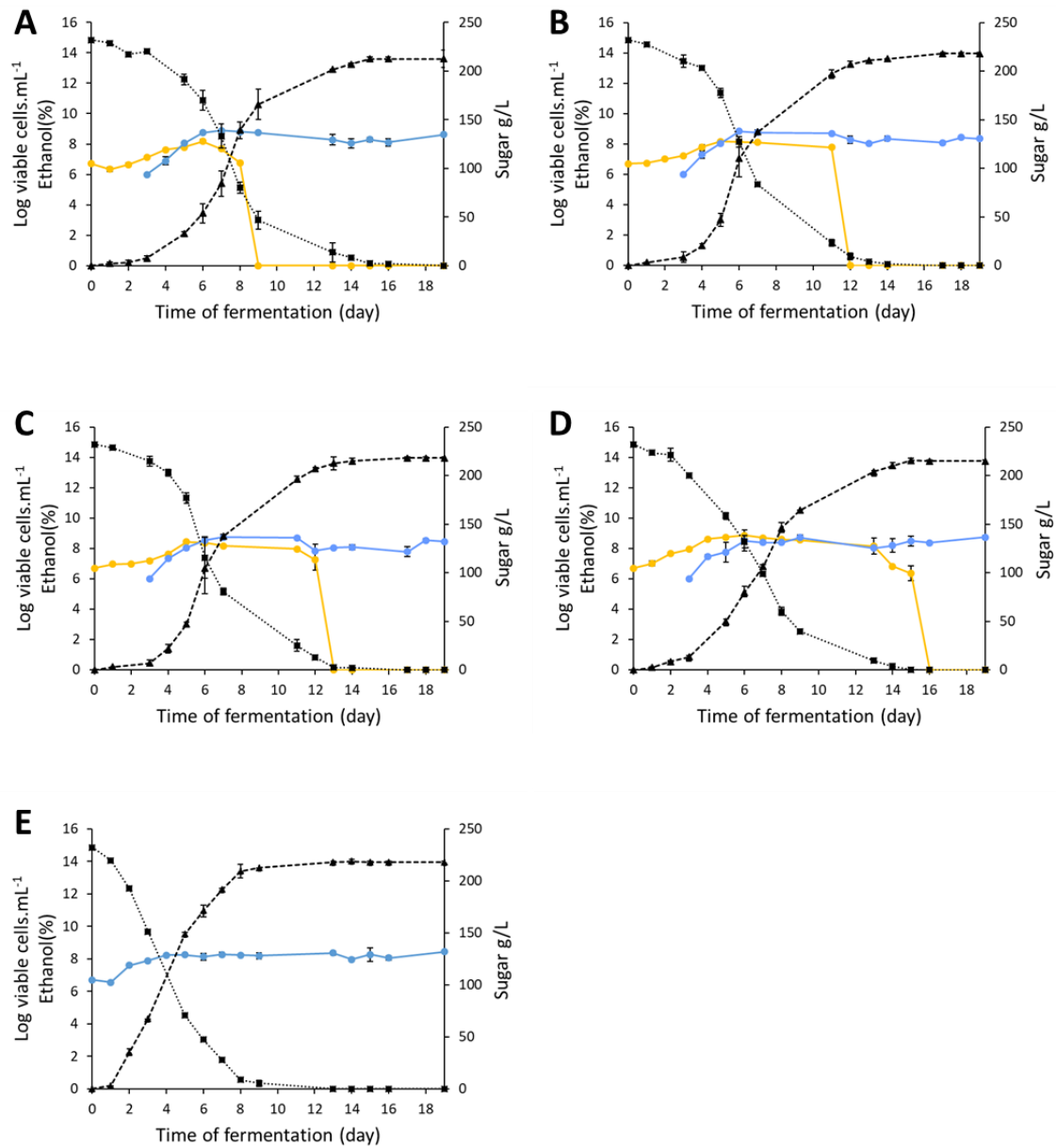


Figure 38 : Profil de fermentation séquentielle des levures NS sélectionnées lors de la première expérience en jus de raisin normalisé à 232 g/L de sucre sans agitation à 20°C. **A** : *M. pulcherrima* 2, **B** : *H. uvarum* 4B13, **C** : *H. uvarum* 2A10, **D** : *S. bacillaris* SFL1, **E** : *S. cerevisiae* SLM (témoin). Les courbes pleines jaunes représentent les populations viables des levures NS, Les courbes pleines bleues les populations viables de *S. cerevisiae* SLM, les courbes en pointillés avec un carré la concentration en sucre et les courbes en pointillés avec un triangle la concentration en éthanol. Pour chaque souche, les expériences ont été réalisées en duplicat et les barres d'erreur représentent l'écart-type des résultats.

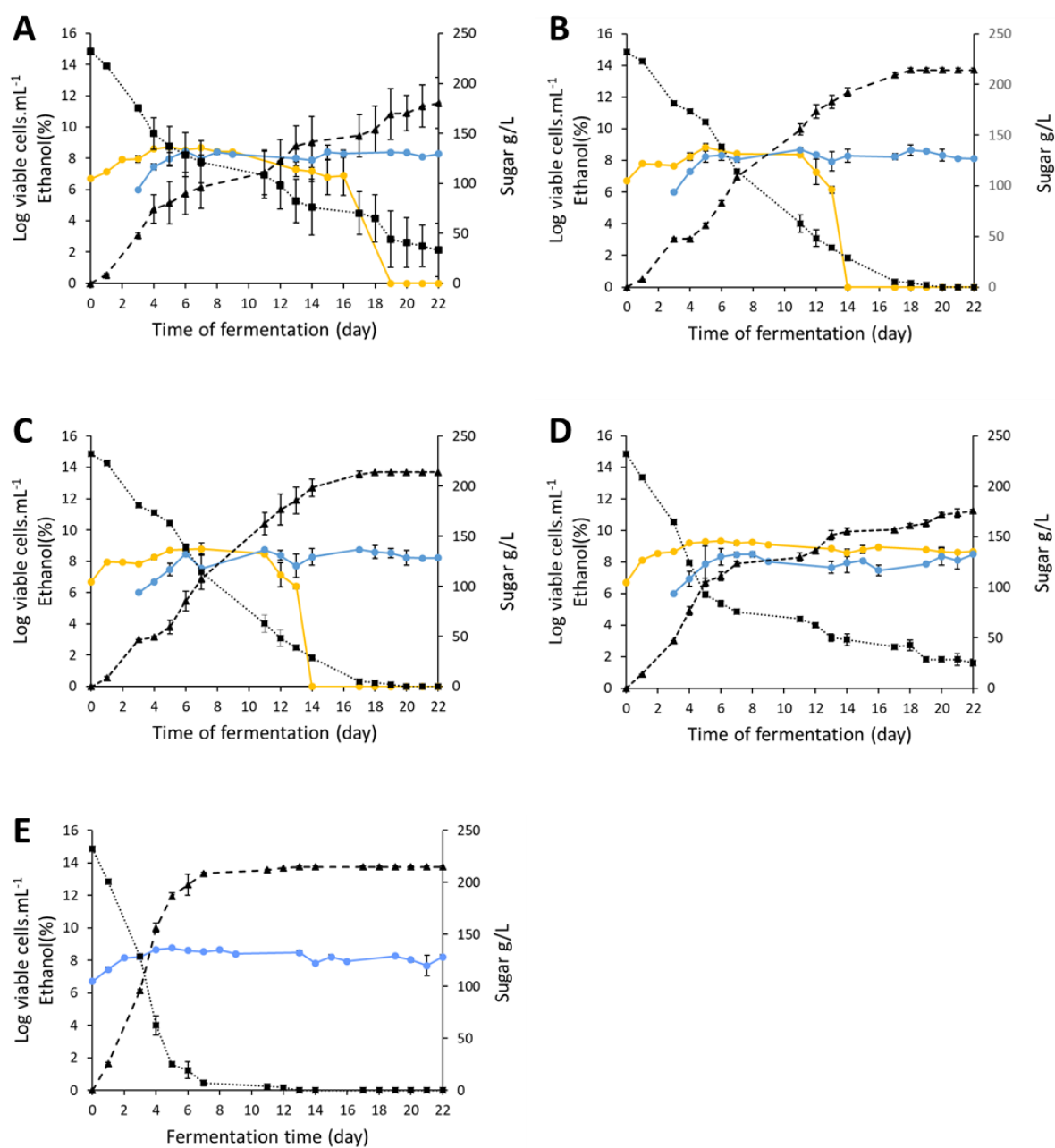


Figure 39 : Profil de fermentation séquentielle des levures NS sélectionnées lors de la première expérience en jus de raisin normalisé à 232 g/L de sucre avec 3 jours d'agitation à 20°C. **A** : *M. pulcherrima* 2, **B** : *H. uvarum* 4B13, **C** : *H. uvarum* 2A10, **D** : *S. bacillaris* SFL1, **E** : *S. cerevisiae* SLM (témoin). Les courbes pleines jaunes représentent les populations viables des levures NS, Les courbes pleines bleues les populations viables de *S. cerevisiae* SLM, les courbes en pointillés avec un carré la concentration en sucre et les courbes en pointillés avec un triangle la concentration en éthanol. Pour chaque souche, les expériences ont été réalisées en duplicat et les barres d'erreur représentent l'écart-type des résultats.

### 3.2.1.3. Fermentation séquentielle – Effet d’une supplémentation en azote

Les précédents résultats ont montré que l’aération au cours de la première partie de la fermentation séquentielle permettait de diminuer de manière plus importante la concentration en éthanol en fin de fermentation. La levure *S. bacillaris* SFL1 semble être la levure la plus prometteuse mais des problèmes de fermentation languissante ont été rencontrés. Dans cette expérience, plusieurs souches appartenant à l’espèce *Starmerella bacillaris* ont été de nouveau sélectionnées afin de vérifier si d’autres souches ne seraient pas plus performantes. De plus, une supplémentation en azote sous forme de sulfate d’ammonium a été apportée. En plus de *S. bacillaris* SFL1, deux autres souches ont été testées : *S. bacillaris* BB1FA3 et *S. bacillaris* BA1-7. Au cours de la fermentation séquentielle, toutes les souches de *S. bacillaris* (SFL1, BB1FA3 et BA1-7) maintiennent un niveau de population élevée d’environ  $6.10^9$  cellules/mL au cours de la phase stationnaire (Figure 40 A, B et C).

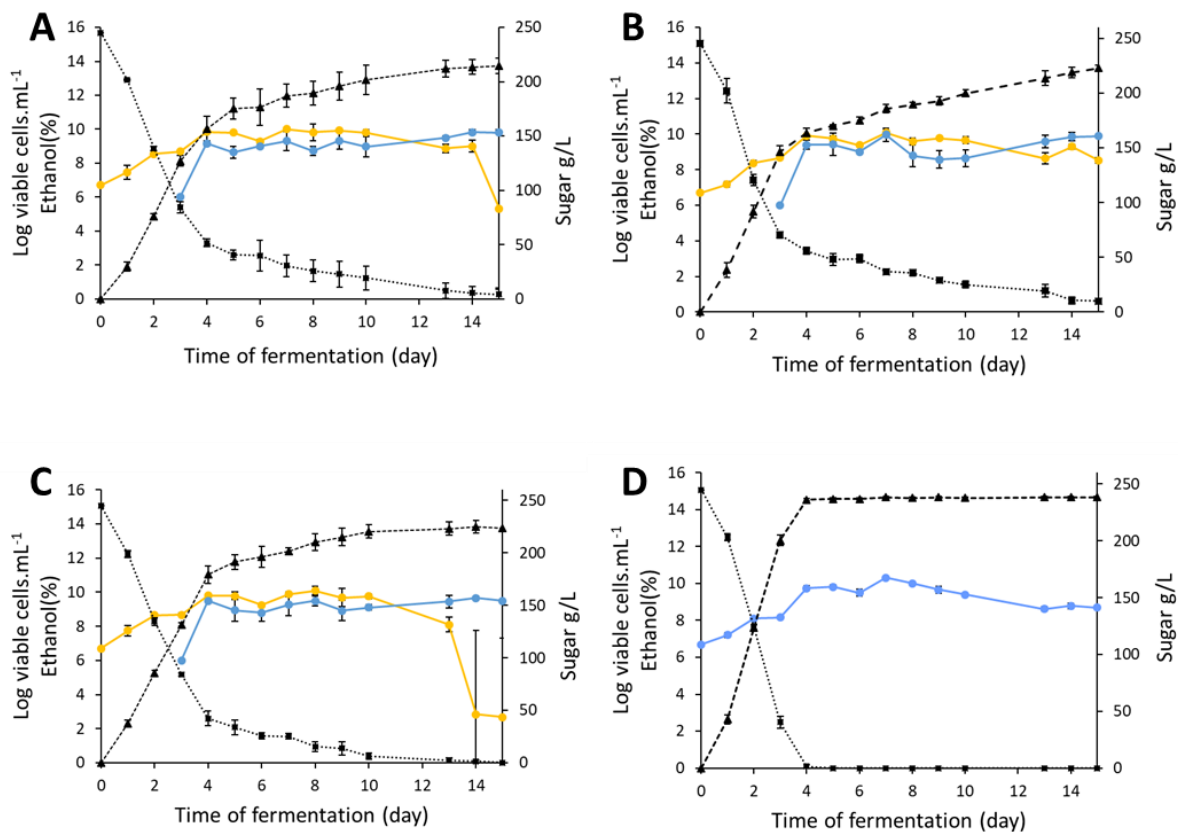


Figure 40 : Profil de fermentation séquentielle de plusieurs souches de levures *S. bacillaris* en jus de raisin normalisé à 245 g/L de sucre avec 4 jours d’agitation à 20°C. **A** : *S. bacillaris* BB1FA3, **B** : *S. bacillaris* BA1-7, **C** : *S. bacillaris* SFL1, **D** : *S. cerevisiae* SLM (témoin). Les courbes pleines jaunes représentent les populations viables des levures NS, Les courbes pleines bleues les populations viables de *S. cerevisiae* SLM, les courbes en pointillés avec un carré la concentration en sucre et les courbes en pointillés avec un triangle la concentration en éthanol. Pour chaque souche, les expériences ont été réalisées en triplicat et les barres d’erreur représentent l’écart-type des résultats.

En fin de fermentation, une chute de la viabilité est observée mis à part pour *S. bacillaris* BA1-7 (Figure 40B). Comparé à la précédente expérience, l'apport en sulfate d'ammonium a permis dans le cas du couple *S. bacillaris* SFL1 – *S. cerevisiae* SLM de consommer la totalité des sucres en produisant 13,77% (v/v) d'éthanol. Dans le temps de l'expérience, seul ce couple a terminé la fermentation. La diminution obtenue dans ce cas était de près de 0,9% (v/v) d'éthanol (Tableau 15) comparée à une fermentation avec *S. cerevisiae* SLM seule (Figure 40D). L'étape suivante a consisté à réaliser les fermentations séquentielles en moût issu du cépage Merlot. Le délai d'inoculation de *S. cerevisiae* (après *S. bacillaris* SFL1) a été étudié afin d'évaluer l'impact sur la réduction en éthanol (Englezos et al., 2016a).

Tableau 15 : Comparaison des concentrations finales en éthanol et des concentrations résiduelles en sucre lors des fermentations séquentielles avec les souches de levures *S. bacillaris* et *S. cerevisiae* SLM. Sb BB1FA3 – Sc SLM : *S. bacillaris* BB1FA3 – *S. cerevisiae* SLM, Sb BA1-7 – Sc SLM : *S. bacillaris* BA1-7 – *S. cerevisiae* SLM, Sb SFL1 – Sc SLM : *S. bacillaris* SFL1 – *S. cerevisiae* SLM. Pour chaque souche, les expériences ont été réalisées en triplicat.

| Souches                  | Concentration en éthanol (% v/v) | Concentration en sucre résiduel (g/L) |
|--------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|
| Sb BB1FA3 – Sc SLM       | 13,73±0,2                        | 4±0,8                                 |
| Sb BA1-7 – Sc SLM        | 13,7±0,1                         | 10±1                                  |
| Sb SFL1 – Sc SLM         | 13,77±0,2                        | 0                                     |
| <i>S. cerevisiae</i> SLM | 14,66±                           | 0                                     |

#### 3.2.1.4. Fermentation séquentielle – Test en moût de Merlot

Le moût utilisé ici est issu du cépage Merlot et contient 205 g/L de sucre et 180 mgN/L supplémenté en sulfate d'ammonium pour obtenir 350 mg N/L. Trois délais d'inoculation de *S. cerevisiae* SLM ont été testés : 24, 48 ou 72h (sous agitation) après ensemencement de *S. bacillaris* SFL1 (Tableau 16).

Tableau 16 : Effet du délai d'inoculation de *S. cerevisiae* SLM en fermentation séquentielle sur la diminution en éthanol. *S. cerevisiae* SLM seule a été utilisée comme témoin dans les mêmes conditions de fermentation.

| Moment d'inoculation de <i>S. cerevisiae</i> SLM après <i>S. bacillaris</i> SFL1 | Concentration en éthanol (% v/v) |                                   |
|----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
|                                                                                  | <i>S. bacillaris</i> SFL1        | <i>S. cerevisiae</i> SLM (témoin) |
|                                                                                  | –                                | <i>S. cerevisiae</i> SLM          |
| Statique (témoin)                                                                | x                                | 12,3 ± 0                          |
| 24h avec agitation                                                               | 12 ± 0                           | 12,15 ± 0,1                       |
| 48h avec agitation                                                               | 11,8 ± 0                         | 12,25 ± 0,1                       |
| 72h avec agitation                                                               | 11,9 ± 0,1                       | 12,25 ± 0,1                       |

En condition statique, *S. cerevisiae* SLM réalise la fermentation en 7 jours avec une concentration cellulaire finale ? d'environ  $5.10^8$  cellules/mL et une production de 12,3 % (v/v) d'éthanol (Figure 41D). En fermentation séquentielle avec *S. bacillaris* SFL1, il apparaît que la diminution la plus importante a lieu lorsque *S. cerevisiae* SLM est inoculée après 48h de fermentation de *S. bacillaris* SFL1. La même observation est obtenue à 72h. Au niveau des populations, l'inoculation de *S. cerevisiae* SLM à 24h n'engendre pas une chute importante de la cultivabilité de *S. bacillaris* SFL1

( $2 \cdot 10^7$  cellules/mL) (Figure 41A), alors qu'à 48 et 72h une chute importante de la cultivabilité a été observée ( $3 \cdot 10^3$  et  $7 \cdot 10^3$  cellules/mL, respectivement) (Figure 41B et C). Dans ces conditions, une fermentation de 48h de *S. bacillaris* SFL1 est suffisante pour diminuer (-0,45 % (v/v)) la concentration en éthanol dans le vin (Tableau 16).

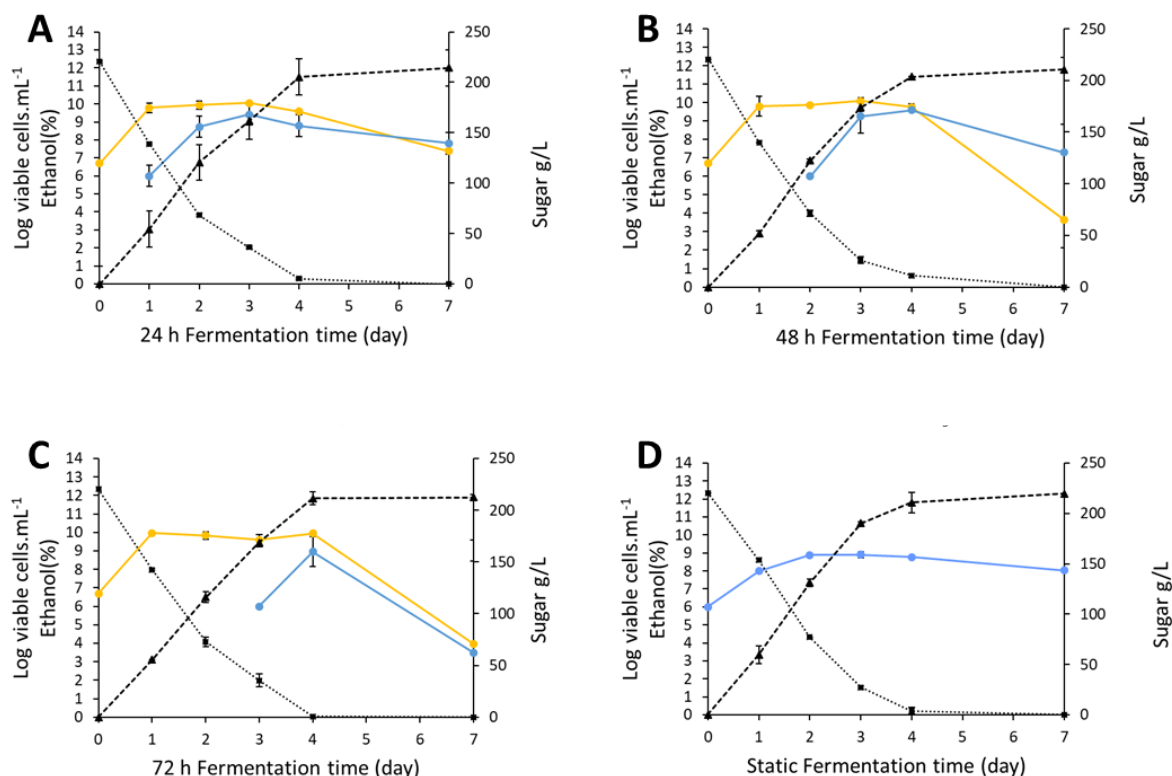


Figure 41 : Profil de fermentation séquentielle de *S. bacillaris* SFL1 en moût (Merlot) avec différents temps d'agitations lors de la première partie de la fermentation à 28°C. A : 24h d'agitation, B : 48h d'agitation, C : 72h d'agitation, D : *S. cerevisiae* SLM sans agitation (témoin). Les courbes pleines jaunes représentent les populations viables des levures NS, Les courbes pleines bleues les populations viables de *S. cerevisiae* SLM, les courbes en pointillés avec un carré la concentration en sucre et les courbes en pointillés avec un triangle la concentration en éthanol. Pour chaque souche, les expériences ont été réalisées en triplicat et les barres d'erreur représentent l'écart-type des résultats.

Cette première série d'expériences a permis de sélectionner la levure NS *S. bacillaris* SFL1 comme meilleure candidate vis-à-vis de la réduction en éthanol dans les vins de manière biologique. Plusieurs études ont déjà décrit cette levure comme ayant un fort potentiel de réduction en éthanol (Englezos et al., 2015, 2016a, 2017; Canonico et al., 2016; Rolle et al., 2017). Comme dans notre étude, il s'avère que l'aération durant la première phase de la fermentation séquentielle est essentielle pour obtenir une diminution de l'éthanol significative (Contreras et al., 2015; Englezos et al., 2018b). Ainsi, pour améliorer le procédé en favorisant la production de biomasse et le métabolisme respiro-fermentaire de *S. bacillaris* SFL1, l'étape suivante a consisté à réaliser les fermentations séquentielles en bioréacteur.

### 3.2.2. Echelle laboratoire bioréacteur

#### 3.2.2.1. Détermination des paramètres d'oxygénation en bioréacteur ( $K_La$ statique et dynamique)

Cette partie est reprise dans son intégralité dans l'article scientifique rédigé à la suite de l'étude préliminaire. Ces paramètres permettent uniquement de réaliser des fermentations dans des conditions d'aération identiques entre les essais. Ainsi pour éviter une redondance, il est proposé au lecteur de se reporter aux sections «3.5.2.» et « 3.5.3. » de l'article scientifique pages 154 à 157.

#### 3.2.2.2. Premier test de réduction en éthanol (267 g/L de sucre – 500 rpm/1 VVM) 100 mgN/L J+1 et J+2

Lors de ce premier test, le niveau de population de *S. bacillaris* SFL1 atteint en 24h une concentration de  $5.10^8$  cellules/mL. Puis de 2 à 4 jours, une population moyenne de  $2.10^9$  cellules/mL est obtenue. Comparés aux précédentes expériences en Erlenmeyer, ces niveaux sont beaucoup plus importants. Lors de l'inoculation de *S. cerevisiae* SLM, la phase stationnaire est atteinte en 48h, puis le niveau de population se maintient à environ  $2.10^8$  cellules/mL. Au bout de 7 jours de fermentation, une chute de la cultivabilité cellulaire est visible, aussi bien pour *S. bacillaris* SFL1 que *S. cerevisiae* SLM. A 3 jours de fermentation, 55,6 g/L de sucre ont été consommés et 0,7 % (v/v) d'éthanol produit. Il faut attendre la fin de la phase exponentielle de *S. cerevisiae* SLM pour voir une augmentation significative de la concentration en éthanol (1,5 % (v/v) en 24h). Au bout de 21 jours, une fermentation languissante est observée et un arrêt de la fermentation est visible à 30 jours. A la fin de l'expérience la concentration en sucre résiduel est de 32,2 g/L (Figure 42).

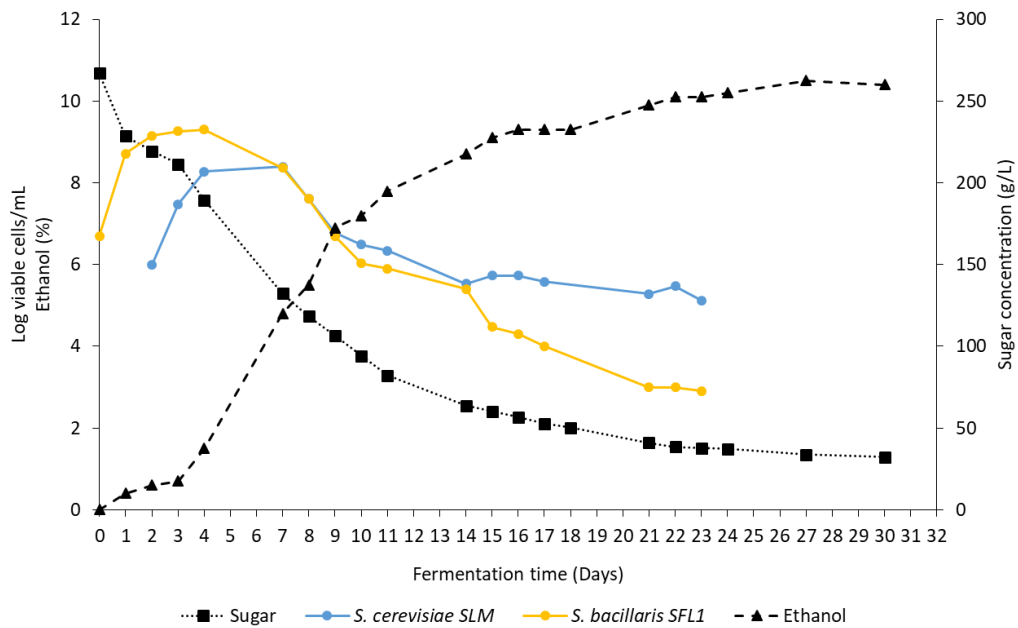


Figure 42 : Profil de fermentation séquentielle de *S. bacillaris* SFL1 et *S. cerevisiae* SLM en bioréacteur à 28°C lors du test 1 ((267 g/L de sucre – 500 rpm/1 VVM) 100 mgN/L J+1 et J+2). Les courbes pleines jaunes représentent les populations viables des levures NS. Les courbes pleines bleues les populations viables de *S. cerevisiae* SLM, les courbes en pointillées avec un carré la concentration en sucre et les courbes en pointillées avec un triangle la concentration en éthanol. Expérience réalisée sans répétition.

Lors de cette première expérience un ajout de 100 mg N/L de sulfate d'ammonium a été réalisé conjointement à l'inoculation de *S. cerevisiae* SLM, puis de nouveau 100 mgN/L ont été ajoutés 24h après. Suite à l'arrêt de la fermentation, il semblerait que la quantité de sulfate d'ammonium ajoutée ne soit pas suffisante. La fermentation avec *S. cerevisiae* SLM seule (témoin) conforte cette hypothèse puisque la fermentation s'est également stoppée à 15,3% (v/v) d'éthanol avec 15 g/L de sucre résiduel (Figure 43). Cependant, d'autres facteurs pourraient expliquer cet arrêt de fermentation comme un effet cytotoxique de l'éthanol ou une carence nutritionnelle.

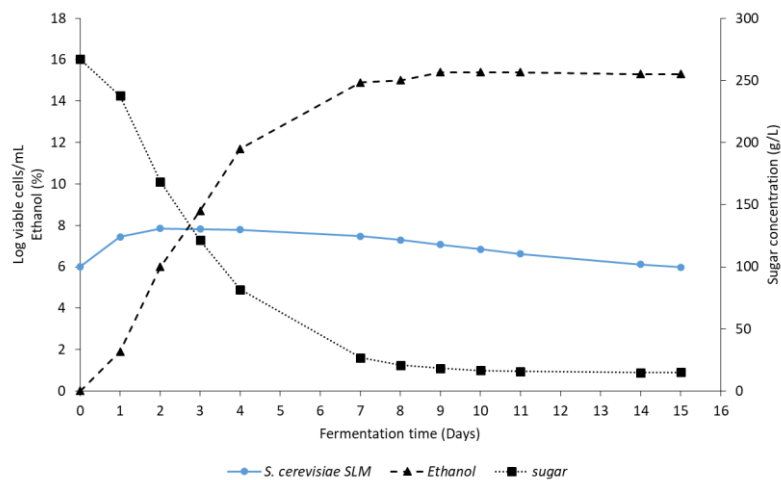


Figure 43 : Profil de fermentation de *S. cerevisiae* SLM en bioréacteur à 28°C lors du premier test dans les mêmes conditions d'agitation/aération que la fermentation séquentielle. La courbe pleine bleue représente la population viable de *S.*

*cerevisiae* SLM, la courbe en pointillé avec un carré la concentration en sucre et la courbe en pointillé avec un triangle la concentration en éthanol. Expérience réalisée sans répétition.

Ainsi, pour vérifier si une carence azotée serait à l'origine de la fermentation languissante puis de l'arrêt de la fermentation, des concentrations en sulfate d'ammonium plus importantes ont été ajoutées. Pour faciliter la consommation complète des sucres tout en restant dans un potentiel alcoolique important, la concentration en sucre est diminuée d'environ 10 g/L pour une concentration finale de 250 g/L (potentiel alcoolique de 14,88% (v/v)).

#### 3.2.2.3. Deuxième test de réduction en éthanol (250 g/L de sucre – 500 rpm/1 VVM)

L'ajout de sulfate d'ammonium à 200 mgN/L (100 mgN/L dans la précédente expérience) dans le bioréacteur à 24 et 48h a entraîné une augmentation de la concentration cellulaire. *S. bacillaris* SFL1 a atteint une population de  $6,3 \cdot 10^{10}$  cellules/mL en 3 jours et *S. cerevisiae* SLM  $10^9$  cellules/mL deux jours après son inoculation. Le doublement de la concentration en sulfate d'ammonium a ainsi augmenté de près de 40 fois la concentration cellulaire de *S. bacillaris* SFL1 et 8 fois la population de *S. cerevisiae* SLM. Cependant, après 3 jours de fermentation les populations des deux levures chutent. Dans ce deuxième test, une fermentation languissante a été de nouveau observée à partir de 8 jours de fermentation. La concentration en sucre résiduel mesurée en fin d'expérience atteint 8 g/L et la concentration en éthanol 11,3 % (v/v) (Figure 44). En comparaison, la fermentation témoin avec *S. cerevisiae* SLM termine pratiquement la fermentation en 10 jours avec une concentration en sucre résiduel de 3 g/L et une concentration en éthanol de 14,4 % (v/v) (Figure 45).

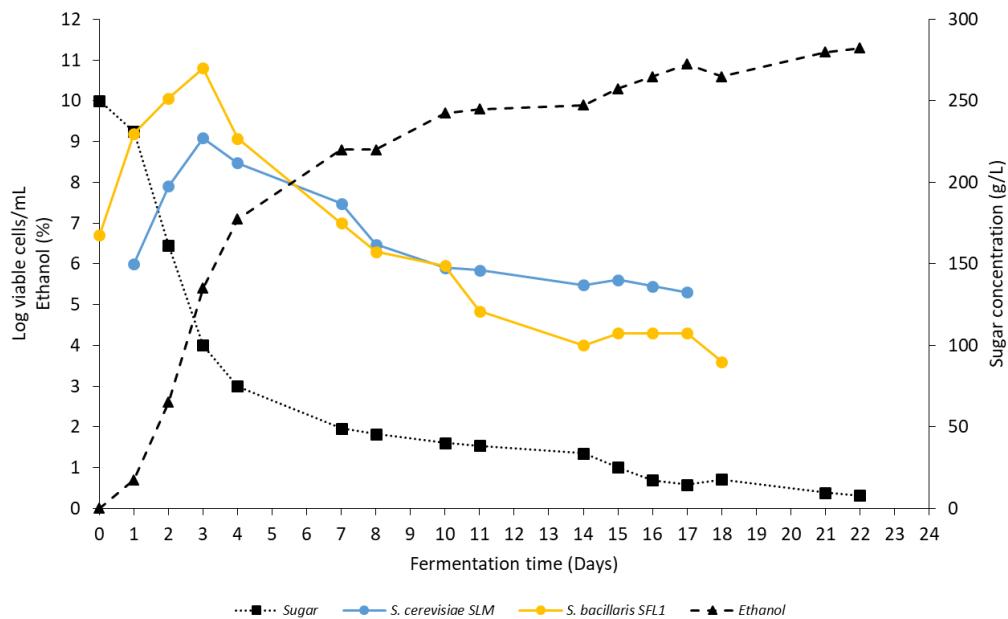


Figure 44 : Profil de fermentation séquentielle de *S. bacillaris* SFL1 et *S. cerevisiae* SLM en bioréacteur à 28°C lors du test 2. Les courbes pleines jaunes représentent les populations viables des levures NS, Les courbes pleines bleues les populations viables de *S. cerevisiae* SLM, les courbes en pointillés avec un carré la concentration en sucre et les courbes en pointillés avec un triangle la concentration en éthanol. Expérience réalisée sans répétition.

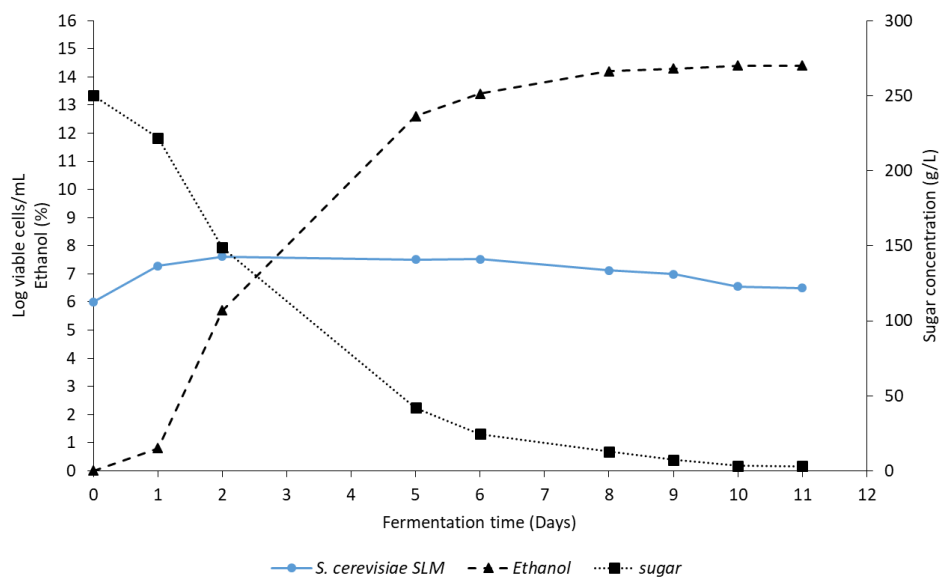


Figure 45 : Profil de fermentation de *S. cerevisiae* SLM en bioréacteur à 28°C lors du deuxième test. La courbe pleine bleue représente la population viable de *S. cerevisiae* SLM, la courbe en pointillés avec un carré la concentration en sucre et la courbe en pointillés avec un triangle la concentration en éthanol. Expérience réalisée sans répétition.

L'augmentation de la concentration en sulfate d'ammonium ajouté en début de fermentation et la concentration en sucre dans le moût légèrement plus faible que lors du premier test ont permis de réaliser la fermentation presque dans sa totalité. Mais une fermentation languissante est encore observée. Les paramètres d'agitation et d'aération sont définis tels que la vitesse de transfert de l'oxygène gazeux vers l'oxygène dissous soit optimale. Or il semblerait que dans ces conditions,

l'assimilation des nutriments et notamment l'azote assimilable entraîne rapidement une carence, ne permettant pas à *S. cerevisiae* SLM de terminer la fermentation dans des délais raisonnables. Le  $K_L a_{\max}$  pourrait donc être diminué afin de limiter légèrement la production de biomasse et ainsi de carencer dans une moindre mesure le milieu. Pour limiter le risque de fermentation languissante et valider cette hypothèse, la concentration en sucre est ramenée à une concentration raisonnable, généralement trouvée en vinification (220 g/L, potentiel alcoolique : 13,1 % (v/v)). Pour évaluer si le milieu pourrait être carencé vis-à-vis d'autres nutriments, pouvant également expliquer une fermentation languissante (Belviso et al., 2004; Redón et al., 2009; Rollero et al., 2016), une supplémentation en lipides et vitamines est testée.

#### 3.2.2.4. Troisième test de réduction en éthanol (220 g/L – 400 rpm/0,5 VVM)

Quelles que soient les conditions de fermentation, les populations de *S. bacillaris* SFL1 sont plus élevées que celles de *S. cerevisiae* SLM en début de fermentation. Les concentrations cellulaires atteignent  $10^{11}$  cellules/mL à 3 jours puis une chute de la viabilité est observée jusqu'à 8 jours de fermentation avant de se stabiliser entre  $10^3$  et  $10^4$  cellules/mL. Néanmoins, il semblerait que la condition avec uniquement une supplémentation en sulfate d'ammonium (Figure 46) permette d'atteindre plus rapidement la phase stationnaire, à la fois pour *S. bacillaris* SFL1 et *S. cerevisiae* SLM. Pour vérifier cette observation, un plus grand nombre de réplicats serait nécessaire. Le témoin *S. cerevisiae* SLM seul atteint le début de la phase stationnaire en une journée puis maintient une population d'environ  $3 \cdot 10^7$  cellules/mL jusqu'à la fin de la fermentation.

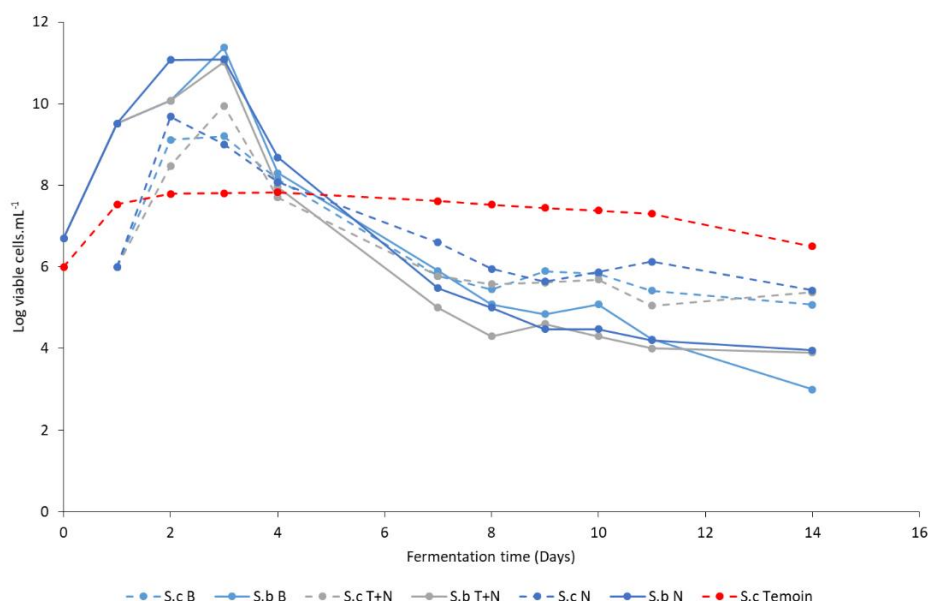


Figure 46 : Courbes de croissances de *S. bacillaris* SFL1 et *S. cerevisiae* SLM au cours de fermentations séquentielles dans différentes conditions. S.c : *S. cerevisiae* SLM, S.b : *S. bacillaris* SFL1, B : bioréacteur, T+N : solution Tween 80/Ergostérol, N : solution de sulfate d'ammonium. Pour plus de précision sur les conditions de fermentation voir « matériel et méthodes section 3.1.5.2.3. Application des paramètres sélectionnés à la fermentation séquentielle, test 3 ». Expérience réalisée sans répétition.

Au niveau de la consommation en sucre, le témoin *S. cerevisiae* SLM seul a consommé la totalité des sucres en 7 jours de fermentation, ce qui constitue le temps de fermentation le plus rapide. Comparées aux tests précédents, les conditions appliquées ici ont permis une consommation des sucres rapide et totale. En fermentation séquentielle, seules les fermentations réalisées dans un premier temps dans le bioréacteur pour la première partie, puis transférées dans les Erlenmeyers terminent la fermentation. Parmi elles, la condition avec supplémentation en sulfate d'ammonium uniquement permet une fermentation totale en 14 jours avec une concentration en sucre résiduel de 0,9 g/L. La condition avec supplémentation en sulfate d'ammonium plus la solution de Tween 80/Ergostérol permet une fermentation en 17 jours avec une concentration en sucre résiduel de 2 g/L. La fermentation séquentielle réalisée en totalité dans le bioréacteur présente près de 24 g/L de sucre résiduel en fin d'expérience. Ainsi il semblerait qu'une oxygénation excessive après l'inoculation de *S. cerevisiae* SLM induise une fermentation languissante, voire un arrêt de la fermentation (Figure 47). Cette observation n'a pour le moment jamais été relevée dans la littérature.

Concernant les concentrations en éthanol, la plus haute concentration est atteinte par le témoin *S. cerevisiae* SLM avec 13,2% (v/v) d'éthanol. Puis suivent les fermentations séquentielles réalisées dans les Erlenmeyers avec une concentration de 11,9% (v/v) pour la condition avec supplémentation en sulfate d'ammonium et 11,8% (v/v) pour la condition avec supplémentation en sulfate d'ammonium

plus la solution Tween 80/Ergostérol. Enfin, la plus faible concentration est obtenue pour la fermentation séquentielle réalisée en totalité dans le bioréacteur avec 10,5% (v/v) d'éthanol. Toutefois, dans ce dernier cas, la fermentation n'est pas terminée et une grande quantité de sucre résiduel est encore présente. Ainsi, en prenant comme référence la concentration en éthanol du témoin « *S. cerevisiae* SLM », il peut être considéré que des diminutions de 1,3 et 1,4% (v/v) sont obtenues pour la supplémentation en sulfate d'ammonium et sulfate d'ammonium/ergostérol, en Erlenmeyer respectivement. Cependant, dans le cas des essais, la concentration en acidité volatile a augmenté de manière significative pour atteindre une valeur comprise entre 0,7 et 0,8 g/L. Cette concentration est trop importante d'un point de vue organoleptique et un maximum de 0,5 g/L doit être obtenu (Figure 47).

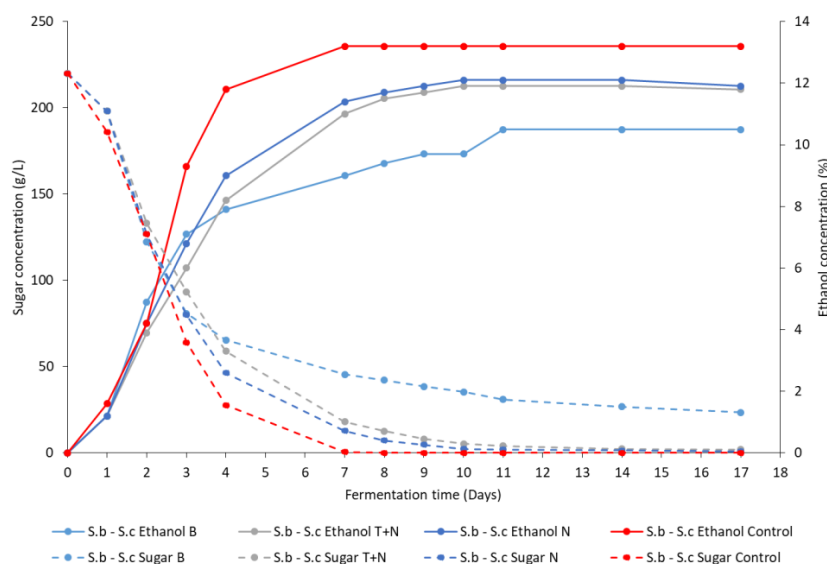


Figure 47 : Consommation des sucres et production en éthanol des fermentations séquentielles *S. bacillaris* SFL1 - *S. cerevisiae* SLM (S.b – S.c) dans différentes conditions. B : bioréacteur, T+N : solution Tween 80/Ergostérol, N : solution de sulfate d'ammonium. Pour plus de précision sur les conditions de fermentation voir « matériel et méthodes section 3.1.5.2.3. Application des paramètres sélectionnés à la fermentation séquentielle, test 3 ». Expérience réalisée sans répétition.

L'ajout exclusif de sulfate d'ammonium comme source d'azote pourrait expliquer l'augmentation de l'acidité volatile (présenté dans la revue du chapitre 1). Cette augmentation est visible après l'inoculation de *S. cerevisiae* SLM (données non présentées) ce qui laisse supposer que la composition de la supplémentation nutritionnelle doit être revue. Pour cela, le dosage des YAN avant l'inoculation de *S. cerevisiae* SLM permettra de sélectionner les sources en YAN à apporter et à quelle concentration. Mais avant cette étape, il est indispensable de réaliser une fermentation complète en bioréacteur. Ainsi, les conditions de la fermentation séquentielle avec un transfert en Erlenmeyer et un ajout de sulfate d'ammonium sont à appliquer à une fermentation complète en bioréacteur.

### 3.2.2.5. Quatrième test de réduction en éthanol (220 g/L – 400 rpm/0,5 VVM) – Maitrise de l'azote

Afin de déterminer les sources en YAN encore présentes lors de l'inoculation de *S. cerevisiae* SLM et leurs concentrations, un dosage des YAN a été réalisé à 24h de fermentation avec *S. bacillaris* SFL1 (juste avant l'inoculation de *S. cerevisiae* SLM et l'ajout de sulfate d'ammonium).

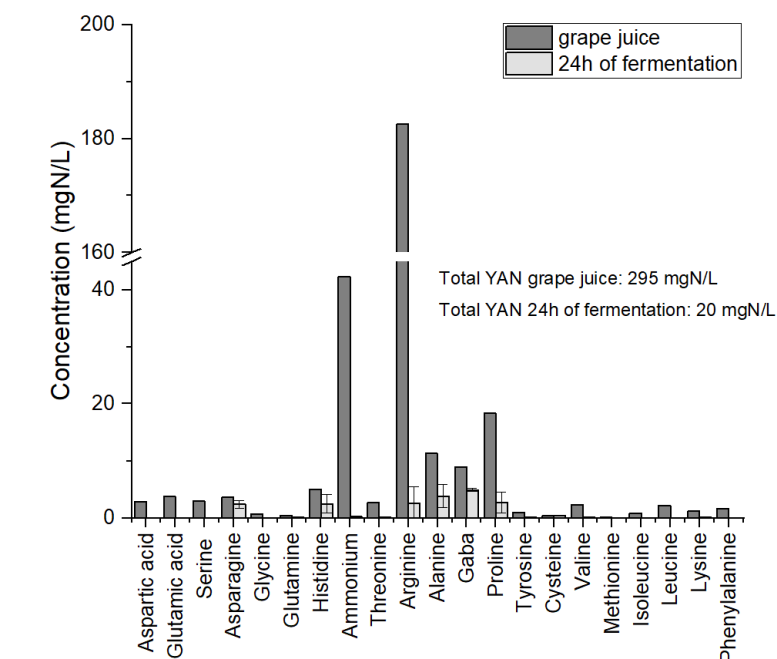


Figure 48 : Profil de consommation des YAN par *S. bacillaris* SFL1 durant les 24 premières heures de fermentation en bioréacteur à 0,5 VVM et 400 rpm en jus de raisin commercial. Les expériences ont été réalisées en triplicat et les barres d'erreur représentent l'écart-type des résultats.

Après 24h de fermentation en bioréacteur avec *S. bacillaris* SFL1, seuls l'asparagine, la glutamine, l'histidine, l'arginine, l'alanine, le gaba, la proline et la cystéine sont encore présents. Parmi eux, le gaba, l'alanine, la proline, l'arginine et l'histidine sont les sources d'azote les plus importantes (Figure 48). En terme de concentration totale des YAN, ces sources encore présentes ne représentent qu'une concentration finale d'environ 20 mg N/L (Tableau 17).

Tableau 17 : Consommation des YAN par *S. bacillaris* SFL1 en 24h de fermentation.

| YAN non présents | YAN présents | Concentration des YAN encore présents (mgN/L) |
|------------------|--------------|-----------------------------------------------|
| Aspartic acid    | Asparagine   | 2,1                                           |
| Glutamic acid    | Glutamine    | 0,1                                           |
| Serine           | Histidine    | 2,4                                           |
| Glycine          | Arginine     | 2,6                                           |
| Threonine        | Alanine      | 3,9                                           |
| Ammonium         | Gaba         | 4,9                                           |
| Tyrosine         | Proline      | 2,7                                           |
| Valine           | Cysteine     | 0,3                                           |
| Methionine       |              |                                               |
| Isoleucine       |              |                                               |
| Leucine          |              |                                               |
| Lysine           |              |                                               |
| Phenylalanine    |              |                                               |
| Total            |              | ≈ 20 mgN/L                                    |

En parallèle, la concentration cellulaire est passée de  $5.10^6$  cellules/mL (inoculation) à  $5,5.10^8$  cellules/mL soit une concentration 110 fois plus importante. De plus, après 24h, la population de *S. bacillaris* SFL1 reste stationnaire. Ainsi, sur les 295 mg N/L initialement présents dans le jus de raisin, 275 mg N/L ont été consommés pour que *S. bacillaris* SFL1 atteigne la phase stationnaire. Ramenés à la concentration cellulaire, les besoins de *S. bacillaris* SFL1 en YAN dans ces conditions s'élèvent à 5 mg N/million de cellules. Par la suite, les niveaux de population de *S. bacillaris* SFL1 diminuent et la concentration cellulaire de *S. cerevisiae* reste assez faible. Enfin au 7<sup>ème</sup> jour de l'expérience, une fermentation languissante est observée (Figure 49).

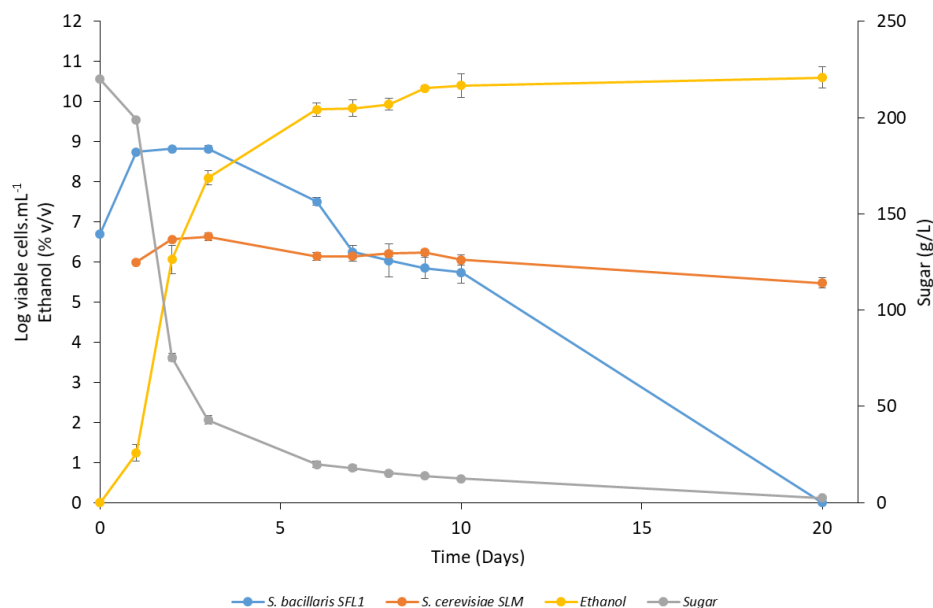


Figure 49 : Profil de la fermentation séquentielle en bioréacteur du 4<sup>ème</sup> test. Les expériences ont été réalisées en triplicat et les barres d'erreur représentent l'écart-type des résultats.

Les conditions de culture utilisées lors de la première phase de la fermentation séquentielle permettent de favoriser la croissance de *S. bacillaris* SFL1 pour atteindre des concentrations cellulaires importantes ( $5,5 \cdot 10^8$  cellules/mL environ). Cette optimisation du développement cellulaire va alors conduire à une diminution rapide des sources en azote assimilable. Ainsi, lors de l'inoculation de *S. cerevisiae* SLM, une grande partie des sources n'est plus disponible. En condition œnologique, il est généralement admis qu'une concentration minimale de 120 à 140 mgN/L est nécessaire pour réaliser une fermentation complète dans un temps raisonnable (Bely et al., 1990; Henschke and Jiranek, 1993; Jiranek et al., 1995; Alexandre and Charpentier, 1998; Bisson, 1999; Beltran et al., 2005; Kemsawasd et al., 2015). Seulement, dans le cadre de cette fermentation séquentielle, seulement 20 mgN/L sont disponibles lors de l'inoculation de *S. cerevisiae* SLM. Cette concentration et la diversité réduite des sources de YAN disponibles sont alors largement insuffisantes pour permettre une croissance satisfaisante de *S. cerevisiae* SLM et éviter une fermentation languissante. De plus, la concentration importante de *S. bacillaris* SFL1 risque d'impliquer des phénomènes de compétitions vis-à-vis de l'accessibilité des sources en azote. En effet, lors de l'inoculation, la concentration cellulaire de *S. cerevisiae* est près de 550 fois inférieure à celle de *S. bacillaris* SFL1. A la vue de ces résultats, il est alors indispensable de réaliser une supplémentation en azote assimilable dans le cadre d'un protocole de fermentation séquentielle visant à réduire la teneur en éthanol dans le vin. Ce paramètre qui a été de nombreuses fois envisagé (Magyar and Tóth, 2011; Englezos et al., 2015, 2017, 2018b; Masneuf-Pomarede et al., 2015; Mestre Furlani et al., 2017; Rolle et al., 2017) est maintenant vérifié.

La supplémentation en azote assimilable peut se faire sous deux formes : organique (acides aminés) ou minérale (sulfate/phosphate d'ammonium). Par souci de praticité et de coût, la source minérale est le plus souvent privilégiée dans le cas de moût carencé ou de fermentation languissante par exemple. Or, les YAN sont décrits pour certains comme précurseurs de composés volatils (Ribéreau-Gayon et al., 2006; Hazelwood et al., 2008). Ainsi, la source d'azote assimilable utilisée pourrait influencer la production de composés volatils même si d'autres mécanismes sont mis en jeu. D'autre part, dans le cadre d'une fermentation séquentielle *S. bacillaris* SFL1/*S. cerevisiae* SLM, une supplémentation en azote assimilable sous forme minérale (sulfate d'ammonium) ne semble pas être la meilleure source en azote d'un point de vue de la production de biomasse, de la vitesse de croissance en phase exponentielle, du temps de latence et du temps de fermentation (Fairbairn et al., 2017) (Figure 50).

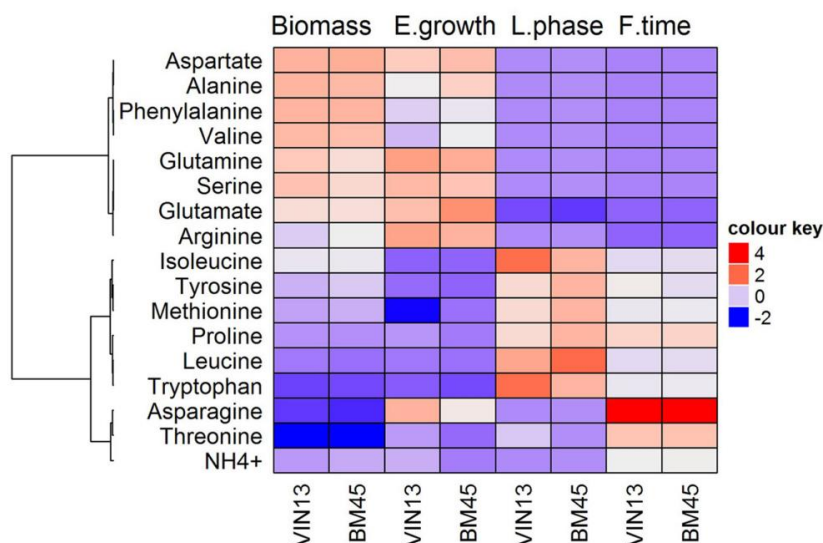


Figure 50 : Heat map des acides aminés en fonction des paramètres fermentaires. Deux souches de *S. cerevisiae* ont été testées (Fairbairn et al., 2017).

Ainsi, à partir de l'étude de Fairbairn et al. (2017), il semblerait qu'un mix d'acides aminés composé de glutamate, glutamine, arginine, alanine, serine, aspartate, phenylalanine et valine serait le meilleur compromis (maximisation de la vitesse de fermentation, de la production de biomasse, de la vitesse de croissance en phase exponentielle et diminution de la phase de latence) étant donné qu'une variabilité entre les souches est observable. Ce mix permettrait de couvrir un ensemble plus large de souches de *S. cerevisiae* qui pourrait être utilisées en vinification avec des besoins et des comportements différents.

A propos de la production des composés volatils, une corrélation linéaire (effet dose-dépendant) a été clairement établie entre l'acide aminé précurseur et le composé volatil correspondant. A ceci près que cette corrélation est valable dans le cas d'une fermentation avec *S. cerevisiae* dans un milieu synthétique avec comme seule source en azote assimilable, l'acide aminé étudié (Fairbairn et al., 2017). En effet, en présence de plusieurs acides aminés cette corrélation est perdue. Dans le cas de la fermentation séquentielle avec *S. bacillaris* SFL1, lors de l'inoculation de *S. cerevisiae* SLM, un appauvrissement important des sources azotées a été observé. Dans ces conditions, l'ajout contrôlé d'acides aminés pourrait permettre de diriger la production de certains composés volatils métabolisés par *S. cerevisiae* SFL1 même si des systèmes de régulations et de compétitions avec *S. bacillaris* SFL1 peuvent avoir lieu. Afin de réduire la variabilité des résultats à propos de la production des composés volatils, 3 acides aminés seront retenus dans la poursuite des expériences. Ces acides aminés sont le glutamate, la glutamine et l'arginine. Ces trois acides aminés ont été décrits comme des sources préférentielles chez *S. cerevisiae* (Crépin et al., 2012, 2017; Fairbairn et al., 2017; Gobert et al., 2017) et permettent de maximiser les paramètres fermentaires. De plus, le glutamate et la

glutamine sont directement impliqués dans la biosynthèse des acides aminés chez *S. cerevisiae*. Quant à l'arginine, cet acide aminé est dans de très nombreux cas l'acide aminé majoritaire dans le moût. Lors de la précédente expérience, la supplémentation en source azotée a été réalisée à l'aide d'une solution de sulfate d'ammonium. Or il s'avère que cette source n'est pas optimale pour maximiser les paramètres fermentaires avec *S. cerevisiae*. L'ammonium est également impliqué dans la production d'acide acétique, or les besoins en azote étant importants, la quantité importante de sulfate d'ammonium utilisée lors de la fermentation séquentielle pourrait expliquer la production significative d'acide acétique (Figure 51).

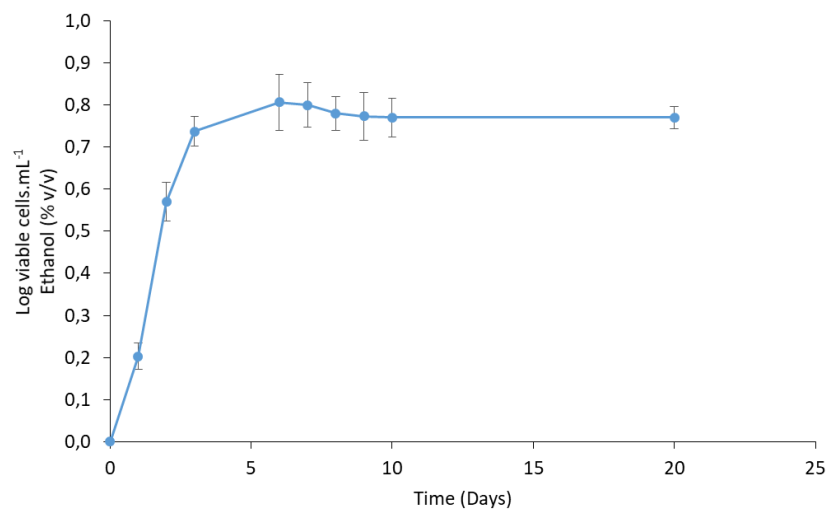
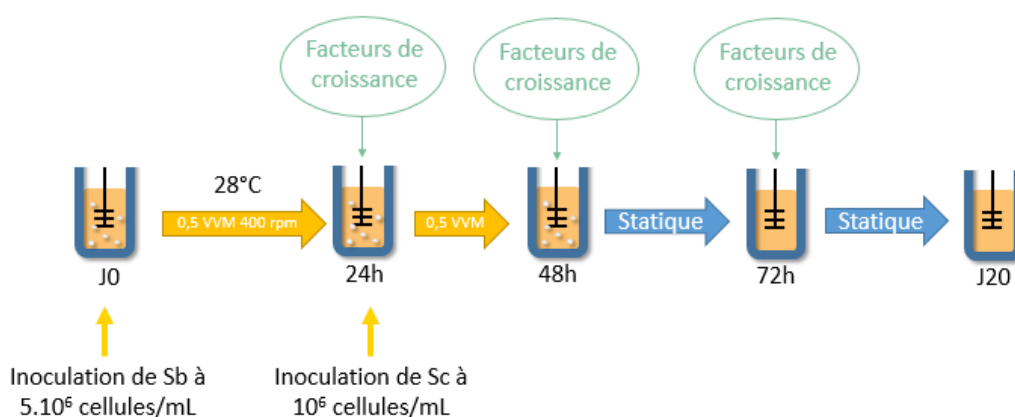


Figure 51 : Concentration en acide acétique au cours de la fermentation séquentielle. *S. cerevisiae* SLM a été ajoutée à 24h. Les expériences ont été réalisées en triplicat et les barres d'erreur représentent l'écart-type des résultats.

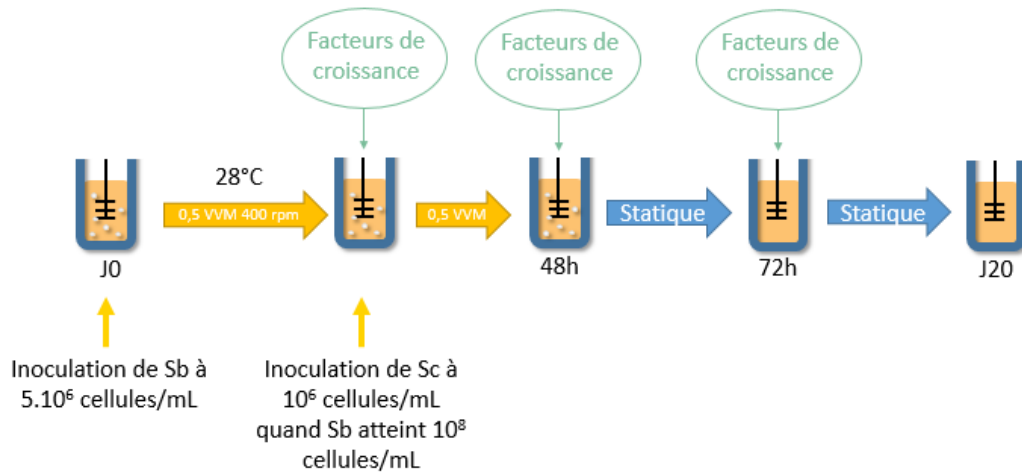
3.2.2.6. Cinquième test de réduction en éthanol (220 g/L – 400 rpm/0,5 VVM) – Essai d'une supplémentation multiple (lipide, acide aminés, sulfate d'ammonium, vitamines)

Rappel des conditions de fermentation :

- Condition 1



- Condition 2



La vitesse de croissance de *S. bacillaris* SFL1 dans les deux conditions d'expérimentation suit la même tendance. En 24h, la phase stationnaire est atteinte avec une concentration levurienne d'environ  $7,5 \cdot 10^8$  cellules/mL. En comparaison, le témoin *S. cerevisiae* SLM atteint une concentration d'environ  $2 \cdot 10^8$  cellules/mL. Lors de l'inoculation de *S. cerevisiae* à  $10^6$  cellules/mL, lorsque *S. bacillaris* SFL1 atteint  $10^8$  cellules/mL (en réalité  $5 \cdot 10^8$  cellules/mL) (essai 2), la vitesse de croissance de *S. cerevisiae* SLM est ralentie. En effet, la phase stationnaire est atteinte en 24h avec une population d'environ  $2$  à  $3 \cdot 10^6$  cellules/mL. Le même profil de croissance est observé dans le cas de l'inoculation à  $5 \cdot 10^6$  cellules/mL de *S. cerevisiae* SLM après 24h de fermentation avec *S. bacillaris* SFL1. En fin de fermentation, les populations viables de *S. bacillaris* SFL1 chutent rapidement (environ  $2 \cdot 10^6$  cellules/mL) alors que les populations de *S. cerevisiae* SLM se maintiennent dans les deux cas (Figure 52).

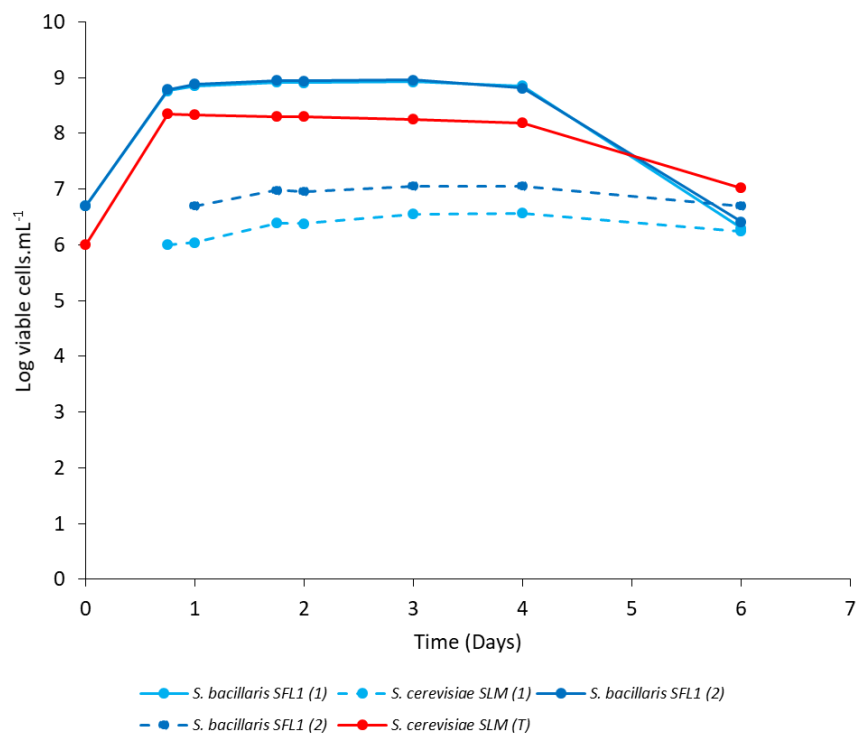


Figure 52 : Profil des populations de levures au cours de la fermentation alcoolique lors du 5<sup>ème</sup> test. (1) : condition 1, (2) : condition 2. Expérience réalisée sans répétition.

La vitesse de consommation des sucres la plus rapide est observée pour le témoin *S. cerevisiae* SLM en début de fermentation jusqu'à 2 jours environ. Puis étonnamment, la fermentation séquentielle de l'essai 2 montre une vitesse de consommation supérieure jusqu'à la consommation totale des sucres en 4 jours. Les deux autres essais terminent la fermentation au bout de 6 jours. Dans tous les cas, aucune fermentation languissante ou arrêt de fermentations n'est observé. Parallèlement, la concentration en éthanol obtenue avec le témoin *S. cerevisiae* SLM atteint 13,2 % (v/v) alors que pour les fermentations séquentielles, les concentrations atteignent 11,8 % (v/v) pour l'essai 1 et 11,5 % (v/v) pour l'essai 2, ce qui représente une diminution respective de 1,4 % (v/v) et 1,7 % (v/v) (Figure 53).

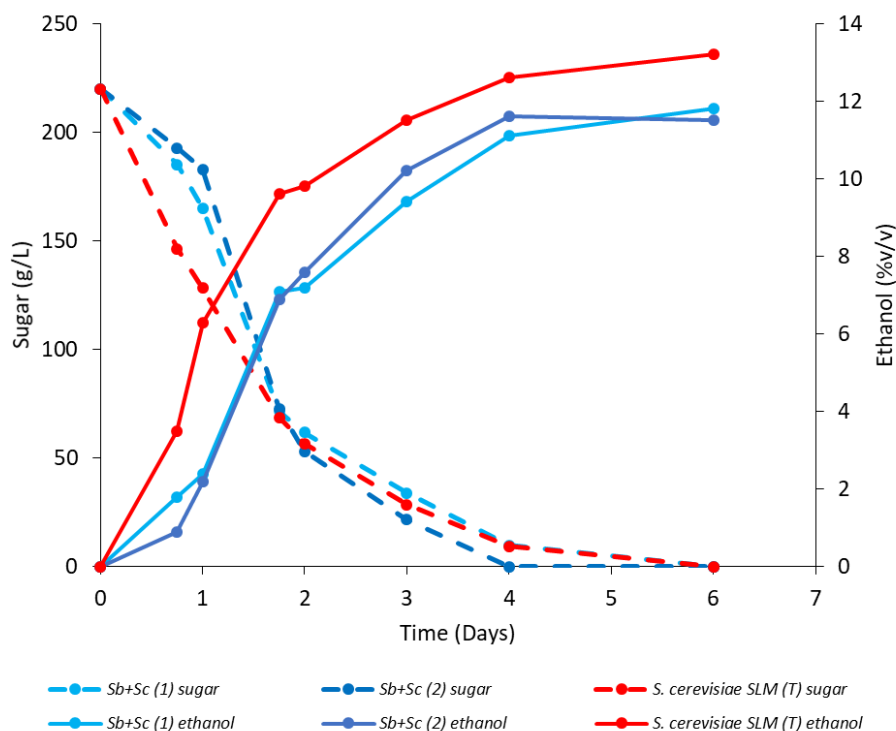


Figure 53 : Profil de consommation des sucres et production de l'éthanol au cours de la fermentation alcoolique lors du 5<sup>ème</sup> test. (1) : condition 1, (2) : condition 2. Abréviations : Sb : *S. bacillaris* SFL1, Sc : *S. cerevisiae* SLM. Expérience réalisée sans répétition.

Les précédentes expériences avaient montré une production importante d'acidité volatile. Il avait été émis l'hypothèse que le sulfate d'ammonium, ajouté comme seule source d'azote assimilable, pouvait être à l'origine de ce problème. D'autres facteurs comme une carence en vitamines et en stérols peuvent également expliquer l'état de stress de *S. cerevisiae* induisant la production d'acide acétique. Les résultats de la deuxième série d'expériences, en utilisant un « mix » de différentes sources en azote, de vitamines et d'ergostérol, montrent une production significativement moins élevée avec une concentration de 0,36 g/L pour l'essai 1 et 0,40 g/L pour l'essai 2 en fin de fermentation. La concentration du témoin *S. cerevisiae* SLM est cependant moins élevée avec une concentration de 0,17 g/L (Figure 54). Cette dernière série d'expériences montre bien qu'outre la nécessité de compléter le milieu en azote assimilable après l'inoculation de *S. cerevisiae* SLM, ces sources doivent être diversifiées. L'ajout d'azote assimilable doit également être accompagné d'une source en stérols afin d'éviter un déséquilibre azote/stérols (Tesnière et al., 2013; Duc et al., 2017) pouvant entraîner une fermentation languissante.

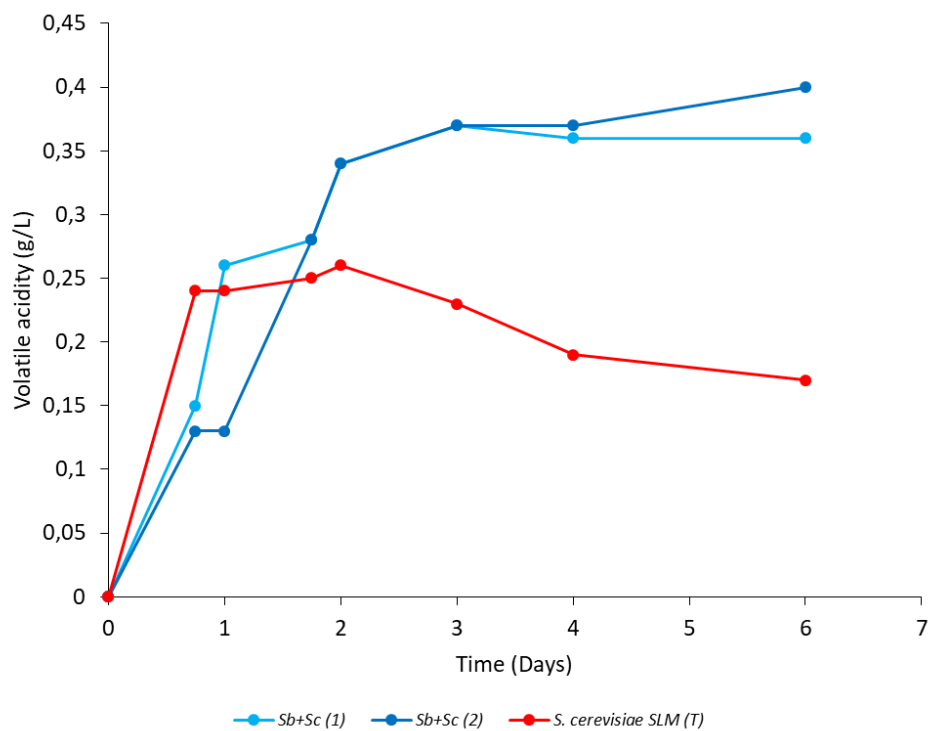


Figure 54 : Production d'acidité volatile au cours des fermentations alcoolique lors du 5<sup>ème</sup> test. (1) : condition 1, (2) : condition 2. Abréviations : Sb : *S. bacillaris* SFL1, Sc : *S. cerevisiae* SLM. Expérience réalisée sans répétition.

### 3.3. Conclusions de l'étude préliminaire

Les différentes étapes de sélection ont fait apparaître que la levure *Starmerella bacillaris* était la meilleure candidate dans le cadre de la mise au point de notre procédé. Les essais à l'échelle laboratoire en Erlenmeyers ont mis en évidence qu'une aération était nécessaire afin d'obtenir une réduction en éthanol significative. Cette aération a eu pour effet d'augmenter la concentration cellulaire de *S. bacillaris* ce qui a entraîné une fermentation languissante après inoculation de *S. cerevisiae* SLM. Une carence en YAN peut être à l'origine de fermentation languissante. De ce fait, une supplémentation en sel d'ammonium sous forme de sulfate d'ammonium a été réalisée. Parmi les différentes souches de *S. bacillaris* testées, seul le couple *S. bacillaris* SFL1/*S. cerevisiae* SLM a terminé la fermentation dans les temps de l'expérience avec une réduction significative de l'éthanol (-0,9% v/v) comparée au témoin *S. cerevisiae* SLM seul. Ce couple a alors été retenu pour la suite des expériences. Un dernier test a été réalisé à l'échelle laboratoire en Erlenmeyer sur moût de Merlot afin d'évaluer le comportement des levures dans cette matrice. Au cours de cette expérience, l'impact du délai d'inoculation de *S. cerevisiae* SLM sur la réduction en éthanol a été évalué. Les résultats montrent que le meilleur délai d'inoculation de *S. cerevisiae* SLM est de 48 h après l'ensemencement de *S. bacillaris* SFL1. Cependant, la diminution en éthanol observée en moût (-0,45% v/v) a été moins importante qu'en jus de raisin supplémenté (-0,9% v/v). Ces premiers résultats à l'échelle laboratoire en Erlenmeyers ont mis en avant que l'aération durant la première phase de la fermentation séquentielle était déterminante. Ainsi, afin d'améliorer le procédé, des fermentations séquentielles en bioréacteur ont été réalisées. Tout d'abord, la capacité maximale du bioréacteur à transférer l'oxygène gazeux sous forme dissoute dans un jus de raisin normalisé en sucre a été réalisée. Après plusieurs séries d'expériences, il s'est avéré que l'amélioration de l'oxygénation durant la première partie de la fermentation séquentielle entraîne une importante augmentation de la production de la biomasse de *S. bacillaris* SFL1, induisant un appauvrissement rapide du milieu en nutriments. Le délai et la concentration cellulaire d'inoculation de *S. cerevisiae* SLM ont été optimisés. L'ajout seul de sulfate d'ammonium n'est pas suffisant pour éviter une fermentation languissante. De plus, il pourrait être à l'origine de la production importante d'acidité volatile. Ainsi, la mise au point d'un mix de facteurs de croissance pour *S. cerevisiae* SLM a montré que les besoins nutritionnels pour éviter une fermentation languissante et une production importante d'acidité volatile étaient multifactoriels. Une fois ces verrous technologiques levés, la diminution en éthanol atteint -1,7% v/v comparée au témoin avec une concentration acceptable en acidité volatile (0,4 g/L).

A partir de cette mise au point préliminaire, les expérimentations réalisées font l'objet d'un dernier article scientifique présenté dans la prochaine partie. De plus, le transfert vers l'échelle semi-industrielle fait partie intégrante de la publication.

N.B. : Le référencement des tableaux et des figures dans l'article sont compris entre parenthèses suivi de la mention « manuscript ». Le référencement des tableaux et des figures en considérant la thèse dans son ensemble sont situés en début de légende.

Article scientifique : Oxygen and nitrogen management in sequential fermentation with *Starmerella bacillaris* and *Saccharomyces cerevisiae* in grape must to reduce ethanol content in wine

Journal: Applied microbiology and biotechnology (Statut : à soumettre)

**Antoine Gobert<sup>1,2,5\*</sup>, Raphaëlle Tourdot-Maréchal<sup>1,2</sup>, Joëlle De Coninck<sup>1,4</sup>, Jordi Ballester<sup>1,3</sup>  
Christophe Morge<sup>5</sup>, Céline Sparrow<sup>5</sup>, Géraldine Klein<sup>1,2</sup> and Hervé Alexandre<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques, Université de Bourgogne Franche-Comté/ AgroSup Dijon, France.

<sup>2</sup>Equipe VALMiS (Vin, Aliment, Microbiologie, Stress), Institut Universitaire de la Vigne et du Vin Jules Guyot, Université de Bourgogne, Dijon, France.

<sup>3</sup>Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, AgroSup Dijon, CNRS, INRA, Université Bourgogne Franche-Comté, F-21000 Dijon, France.

<sup>4</sup>Welience, Plateforme de Prédéveloppement en Biotechnologie, site INRA, 17 rue de Sully, Dijon, France.

<sup>5</sup>SAS Sofralab – 79, Av. A.A. Thévenet – BP 1031 – Magenta, France.

**\*Correspondence:**

antoinegobert1@gmail.com

**Keywords:** non-*Saccharomyces* yeasts, Sequential fermentation, Ethanol reduction, Nitrogen, Wine, Flavors, Volatiles Compounds.

**Abstract**

The use of non-*Saccharomyces* yeasts in sequential fermentation has been highlighted as a new biological method to reduce ethanol content in wine. However, until now ethanol reduction using this method has been limited and industrial scaling-up ineffective. In this study, we tested the strain *Starmerella bacillaris* SFL1. Oxygen and nitrogen requirements were studied to optimize ethanol reduction in sequential fermentation. The results on the bioreactor scale showed that oxygenation

during the first part of sequential fermentation was essential to increase biomass development and limit ethanol production. However, an addition of a growth factor solution including several nitrogen sources was necessary to avoid *S. cerevisiae* nutritional deficiency. Ethanol reduction obtained on the bioreactor scale reached -1.65% (v/v) compared to a pure culture of *S. cerevisiae*. This method applied at pilot scale fermentation with Syrah must, provided that a 1% (v/v) ethanol reduction without organoleptic deviation. Sensory analysis confirmed that positive descriptors were generally mostly attributed to wines obtained with sequential fermentation compared to control fermentation.

### 3.4. Introduction

In the face of global climate change, some wine regions are undergoing an acceleration of vine phenology (Stock et al., 2004). Consequently, the harvest date is generally early (Duchêne and Schneider, 2008) to prioritize optimal technological maturity but with the risk of suboptimal phenolic maturity. In such conditions, musts can present high sugar concentration. Thus, a must with good phenolic maturity can present a high concentration of sugar (Mira de Orduña, 2010), leading to a high final ethanol content. This increase of wine ethanol content can lead to a number of microbiological, technological, sensory, public health and economic problems (Martin and Pangborn, 1970; Fischer and Noble, 1994; Kontkanen et al., 2004; Colombié et al., 2005; Mira de Orduña, 2010).

The first step to reduce sugar concentration in must is vine management. Increasing the number of buds by choosing a vigorous rootstock allows increasing the number of grapes per vine and improving its vegetal characteristics (Bogard and Bisson, 2006). In addition, the rate of sugar accumulation in grapes is mainly dependent on the ratio between leaf surface and fruit weight. Thus, lower sugar accumulation in grape berries can be achieved by reducing leaf surface (Ozturk and Anli, 2014; Zhang et al., 2017). Increasing irrigation is another possibility, but good control of the process is essential to obtain a must without significant modifications (Junquera et al., 2012). Moreover, the use of water resources is questionable from the environmental perspective. If vine management cannot be considered, pre-fermentation methods can be used. The first and the most simple process, where allowed by legislation, is the dilution of the must with water or a weakly sweet must (Pickering, 2000; Schmidtke et al., 2012). However, this method can induce sensory imbalances, aromatic losses in wines, and may be illegal in some countries. The second pre-fermentation method involves aerobic dehydrogenase, the glucose oxidase (EC 1.1.3.4) (GOX) that catalyzes the oxidation of glucose to gluconolactone in the presence of oxygen. The reduction of ethanol by about 40% (v/v) can be achieved but GOX-treated wines are acidic due to the high level of gluconic acid and deacidification or the addition of sweet reserve is necessary (Pickering et al., 1998, 1999; Pickering, 2000). Post-fermentation methods can be also used. Reverse osmosis is the most common method

and consists in applying greater pressure than osmotic pressure on the high concentration side (wine rich in ethanol) and solvent (water and ethanol) can migrate from the “rich” wine across the membrane to the low concentration solution (Schmidtke et al., 2012). At the end of the process, the water content of the wine is readjusted by the addition of juice with a low sugar concentration. This technique allows completely dealcoholizing wine, with a negligible ethanol concentration (0.19% (v/v) on average) (Liguori et al., 2013). Wine dealcoholization has no effect on the main chemical and physical properties of wine including total phenols, flavonols, esters and other organic acids. However, the volatile fraction of wine decreases significantly (Liguori et al., 2013), which has a negative impact on aromas, essential elements of a wine quality.

Faced with these somewhat serious issues, the use of non-*Saccharomyces* (NS) yeasts has proved to be a new and gentle alternative. These yeasts were isolated from the microbiota present on grapes and winemaking equipment and several studies of selections were conducted regarding their low ethanol yields (Ferraro et al., 2000; Contreras et al., 2014b, 2015; Gobbi et al., 2014; Ciani et al., 2016). Generally, NS yeasts are unable to carry out complete alcoholic fermentation alone. Therefore, co-inoculation or sequential inoculation with *S. cerevisiae* is necessary. Table 1 summarizes the ethanol reduction ranges obtained with several NS species used in co- or sequential inoculations with *S. cerevisiae* at the laboratory scale only. For the largest reduction (4% (v/v)) (Shekhawat et al., 2016), fermentations were conducted in a Chemical Defined Grape Juice (CDGJ) with a relatively low sugar concentration (200 g/L) and strong aeration (Shekhawat et al., 2016). In these conditions, acetic acid production was significantly high (2.05 to 3.84 g/L) and thus not applicable in winemaking. For the other studies performed, ethanol reduction ranged between 2.2% (v/v) and 0.1% (v/v), with significantly lower acetic acid concentrations, but not always under the critical threshold of 0.6 g/L (Contreras et al., 2015; Canonico et al., 2016; Englezos et al., 2018b). From these studies, it appears that *Metschnikowia pulcherrima* and *Starmerella bacillaris* were the NS yeasts used most. In particular, the strong fructophilic characteristic of *S. bacillaris* and its ability to produce low quantities of ethanol and acetic acid, with high amounts of glycerol (Englezos et al., 2015), demonstrated high potential for the reduction of ethanol in wine.

In sequential inoculation with NS yeasts, the total consumption of sugar (residual sugar concentration  $\leq 2$  g/L) was not observed in all conditions and fermentation times were prolonged compared to control fermentations with *S. cerevisiae* alone (Contreras et al., 2015; Canonico et al., 2016). These observations can be explained by a consumption of a significant part of nitrogen sources by NS yeasts during the first part of the fermentation (Andorrà et al., 2010; Kemsawasd et al., 2015; Gobert et al., 2017). In must, Yeast Assimilable Nitrogen (YAN), mainly represented by

ammonium and amino acids, is one of the major factors controlling alcoholic fermentation and preventing stuck or sluggish fermentations (Henschke and Jiranek, 1993; Alexandre and Charpentier, 1998). This critical point has never been investigated during sequential fermentation targeting ethanol reduction.

Tableau 18 (Table 1 manuscript): Reduction of ethanol content after sequential fermentations of some NS yeasts in comparison with *S. cerevisiae*. CDGJ: Chemical Defined Grape Juice

| Strains                                       | Fermentation   | Matrix                           | Time before inoculation of <i>S.cerevisiae</i>   | Ethanol reduction (% v/v) | Volatile acidity (as acetic acid g/L) | Oxygenation | Reference                 |
|-----------------------------------------------|----------------|----------------------------------|--------------------------------------------------|---------------------------|---------------------------------------|-------------|---------------------------|
| <i>S. bombicola/S. cerevisiae</i>             | sequential     | Verdicchio                       | 3 days                                           | 1.64                      | 0.58                                  | no          | (Canónico et al., 2016)   |
| <i>M. pulcherrima/S. cerevisiae</i>           | sequential     | Verdicchio                       | 72 days                                          | 1.46                      | 0.65                                  | no          | (Canónico et al., 2016)   |
| <i>M. pulcherrima/S. cerevisiae</i>           | sequential     | Chardonnay                       | 16 days                                          | 0.9                       | 0.1                                   | no          | (Contreras et al., 2014b) |
| <i>M. pulcherrima/S. cerevisiae</i>           | sequential     | Shiraz                           | 8 days                                           | 1.6                       | 0.3                                   | no          | (Contreras et al., 2014b) |
| <i>T. delbrueckii/S. cerevisiae</i>           | sequential     | CDGJ                             | After 50% of the initial sugar had been consumed | 1.5                       | 1.1                                   | yes         | (Contreras et al., 2015)  |
| <i>Z. bailii/S. cerevisiae</i>                | sequential     | CDGJ                             | After 50% of the initial sugar had been consumed | 2                         | 0.8                                   | yes         | (Contreras et al., 2015)  |
| <i>M. pulcherrima/S. cerevisiae</i>           | sequential     | Shiraz                           | 7 days                                           | 0.97                      | 0.06                                  | No          | (Contreras et al., 2014a) |
| <i>S. uvarum/S. cerevisiae</i>                | sequential     | Shiraz                           | 7 days                                           | 0.82                      | 0                                     | No          | (Contreras et al., 2014a) |
| <i>M. pulcherrima/S. uvarum/S. cerevisiae</i> | sequential     | Shiraz                           | 7 days                                           | 1.77                      | 0                                     | No          | (Contreras et al., 2014a) |
| <i>M. pulcherrima/S. cerevisiae</i>           | Co-inoculation | Malvasia and Viura               | 0                                                | 2.2                       | 0.35                                  | yes         | (Morales et al., 2015)    |
| <i>L. thermotolerans/S. cerevisiae</i>        | Co-inoculation | CDGJ                             | 0                                                | 3%                        | 3.84                                  | yes         | (Shekhawat et al., 2016)  |
| <i>T. delbrueckii/S. cerevisiae</i>           | Co-inoculation | CDGJ                             | 0                                                | 4%                        | 2.06                                  | yes         | (Shekhawat et al., 2016)  |
| <i>M. pulcherrima/S. cerevisiae</i>           | Co-inoculation | CDGJ                             | 0                                                | 4%                        | 2.05                                  | yes         | (Shekhawat et al., 2016)  |
| <i>S. bacillaris/S. cerevisiae</i>            | sequential     | Barbera                          | 2 days                                           | 0.7%                      | 0.34                                  | no          | (Englezos et al., 2015)   |
| <i>S. bacillaris/S. cerevisiae</i>            | Co-inoculation | Barbera                          | 0                                                | 0.5%                      | 0.34                                  | no          | (Englezos et al., 2018b)  |
| <i>S. bacillaris/S. cerevisiae</i>            | Co-inoculation | Barbera                          | 0                                                | 0.6%                      | 0.62                                  | yes         | (Englezos et al., 2017)   |
| <i>S. bacillaris/S. cerevisiae</i>            | sequential     | Barbera                          | 2 days                                           | 0.3%                      | 0.33                                  | no          | (Rolle et al., 2017)      |
| <i>S. bacillaris/S. cerevisiae</i>            | sequential     | Chardonnay<br>Muscat<br>Riesling | 2 days                                           | 0.1 – 0.2%                | 0.27-0.4                              | no          | (Englezos et al., 2018c)  |

To obtain significant ethanol reduction using sequential fermentation, oxygen supplementation during the first stage also appeared essential (Table 1). According to the hypothesis of Gonzalez et al. (2013), many studies apply partial aeration to ensure yeast sugar assimilation via the respiration pathway (Quiros et al., 2014; Contreras et al., 2015; Morales et al., 2015; Rodrigues et al., 2016; Shekhawat et al., 2016; Mestre Furlani et al., 2017; Englezos et al., 2018b). Indeed, oxygen requirement and the Crabtree effect are two factors to be considered for yeast cell aerobic consumption of sugars under winemaking conditions. Under these conditions, the use of NS yeast strains showing no or a weak Crabtree effect is necessary, as reported by Ciani et al. (2016). To our knowledge, no study has yet described the oxygen uptake rate (OUR) of NS yeasts in this context. Moreover, in this aerobic process, the oxygen transfer rate (OTR) and volumetric oxygen mass transfer coefficient in a fermenter ( $K_La$ ) are important physical parameters for understanding and mastering ethanol reduction in sequential fermentations. The determination of  $K_La$  (volumetric mass transfer coefficient) allows establishing aeration efficiency and quantifying the effects of operating variables on the provision of oxygen (Pouliot et al., 2000; Garcia-Ochoa and Gomez, 2009; Suresh et al., 2009; Chiciuc et al., 2010; Garcia-Ochoa et al., 2010; Stanbury et al., 2013). Controlling these parameters can ensure that the oxygen requirements of the NS yeast used are satisfied, thereby minimizing any risk of oxidation of wine compounds.

In this study, one strain of *Starmerella bacillaris* was studied (strain SFL1) as yeasts belonging to this species have previously demonstrated a potential role in ethanol reduction (Magyar and Tóth, 2011; Englezos et al., 2015, 2016a, 2018b; Mestre Furlani et al., 2017; Rolle et al., 2017) and a positive impact in sequential fermentation with *S. cerevisiae* on wine aromatic profiles (Sadoudi et al., 2012; Whitener et al., 2017). The relation of oxygen transfer and the optimization of the growth dynamics of *S. bacillaris* SFL1 during the first stage of must fermentation have been studied at the laboratory scale. The scale-up to the pilot scale of this strain on Syrah must completed this study. Nitrogen consumption and wine chemical composition were measured throughout sequential fermentations and final point sensorial analysis was performed from bottled pilot scale wines.

### 3.5. Materials and methods

#### 3.5.1. Microorganism and media

The NS yeast strain selected for this study was *Starmerella bacillaris* (prev. *Candida zemplinina*) SFL1 (Sofralab, Magenta, France). A commercial strain of *Saccharomyces cerevisiae* “Selectys La Marquise” (Sofralab, Magenta, France) was used for single (reference) and sequential fermentations. Each strain was stored in 20% (v/v) glycerol at -80°C. In the laboratory, pre-cultures were prepared in 100 mL

modified YPD medium (0.5% (w/v) yeast extract, 1% (w/v) peptone, 2% (w/v) glucose and 0.02% (w/v) chloramphenicol) at 28°C with stirring (150 rpm) for 24 h. In an experimental winery, pre-cultures of *S. bacillaris* SFL1 were prepared in two 20L sterile plastic jugs filled with 15L of modified YPD medium at 24°C with magnetic stirring (400 rpm) for 48 h. The inoculation of *S. cerevisiae* “Selectys® La Marquise” (SLM), a commercial active dry yeast, was performed according to the manufacturer’s instructions.

### 3.5.2. Oxygen transfer coefficient ( $K_La$ ) determination – Static gassing out method

Measures were carried out in a 2L Bioflo 115 benchtop bioreactor (New Brunswick, NJ, USA) using 1L of final working volume. The temperature was fixed at 28°C. Commercial grape juice (100% pure white and Muscat grape juice) supplemented with equal proportions of glucose and fructose to achieve a final sugar concentration of 220 g/L was used, without inoculation. To study the re-oxygenation rate of the must, 7 stirring speed values coupled with 3 aeration levels (compressed air) were tested (Table 2). For each measure, the Dissolved Oxygen (DO) concentration started at the saturation level (100%).

Tableau 19 (Table 2 manuscript): Agitation and aeration used to determine the  $K_La_{max}$  in static method.

| Agitation (rpm) | Aeration (VVM) |
|-----------------|----------------|
| 100             | 0.5            |
| 100             | 1              |
| 100             | 2              |
| 200             | 0.5            |
| 200             | 1              |
| 200             | 2              |
| 300             | 0.5            |
| 300             | 1              |
| 300             | 2              |
| 400             | 0.5            |
| 400             | 1              |
| 400             | 2              |
| 500             | 0.5            |
| 500             | 1              |
| 500             | 2              |
| 600             | 0.5            |
| 600             | 1              |
| 600             | 2              |
| 700             | 0.5            |
| 700             | 1              |
| 700             | 2              |

Then, the air flow was stopped and the nitrogen flow was opened at 1VVM with the stirring speed tested. At 10% of DO, the nitrogen flow was stopped and the air opened at the flow rate tested (Figure 1).

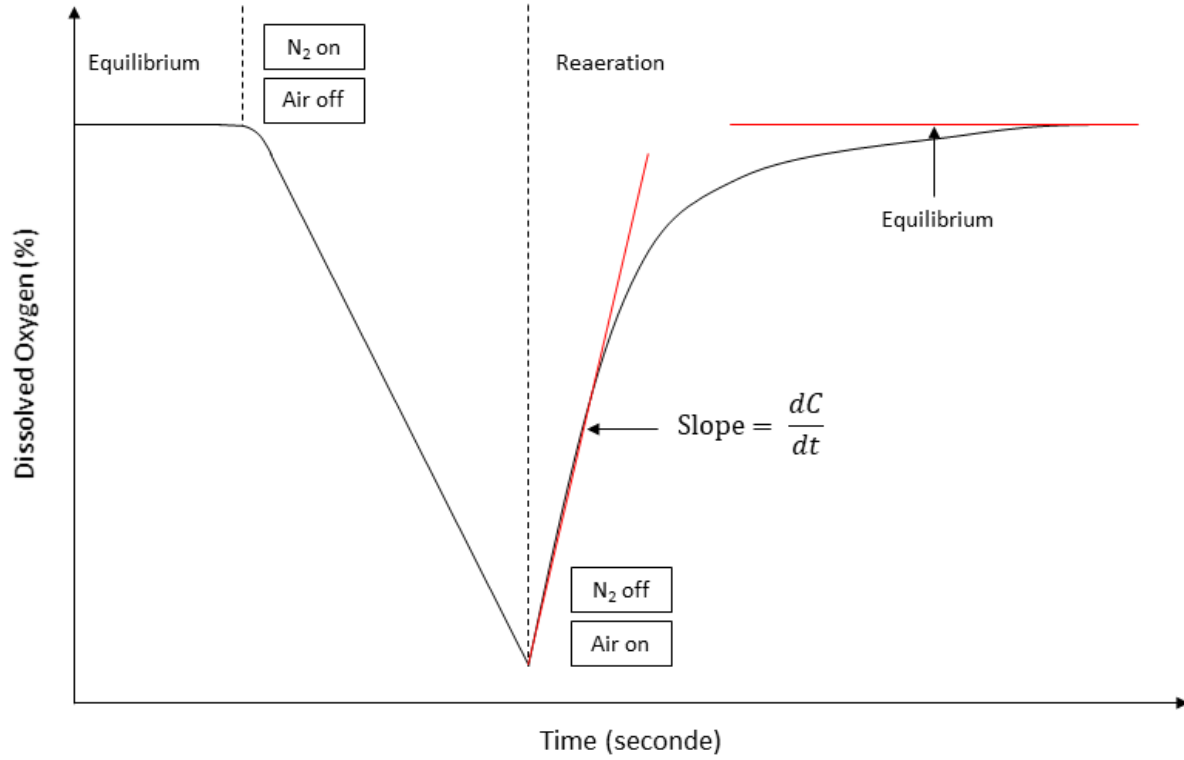


Figure 55 (1 manuscript): Static method to determine  $K_L a$  according to agitation and aeration couples.

In this technique, first described by Wise (1951), the increase in dissolved oxygen concentration is obtained by equation (Eq.1):

$$\frac{dC}{dt} = K_L a (C^* - C) \quad (\text{Eq.1})$$

Where  $dC/dt$  is the flow rate of oxygen solution at a concentration of dissolved oxygen  $C$ .  $C^*$  is the saturation concentration of dissolved oxygen and  $K_L a$  the volumetric oxygen mass transfer coefficient in the absence of micro-organisms.

By integrating equation (Eq.1),  $K_L a$  was obtained from the slope of the curve (Eq.2):

$$\ln \left( \frac{C^*}{C^* - C} \right) = K_L a \quad (\text{Eq.2})$$

A  $K_La$  value was obtained for each couple tested. When  $K_La$  reached a maximum value with no significant change, even when increasing agitation or aeration, it corresponded to the  $K_La_{\max}$  value.

### 3.5.3. Oxygen transfer coefficient ( $K_La$ ) determination – Dynamic method

The determination of  $K_La$  using the dynamic method is based on the same model. The bioreactor and grape juice used were the same as for the static method. At the start of measurement, the DO in the grape juice was maintained at saturation (100%) with an agitation of 500 rpm and an aeration of 1 VVM, corresponding to the parameters used to obtain  $K_La_{\max}$  in the static method. After an equilibration time (10 min), *S. bacillaris* SFL1 was inoculated with a concentration of  $5 \times 10^6$  cells/mL. Meanwhile, the air flow was stopped. Three samples were collected to evaluate the viable cell density by flow cytometry during DO recording (see method in “inoculation part”). Cell density was considered as stable during the measurement. In this step, DO reduction followed a linear curve. The Oxygen Uptake Rate (OUR) was calculated from the slope of the linear curve part (Figure 2).

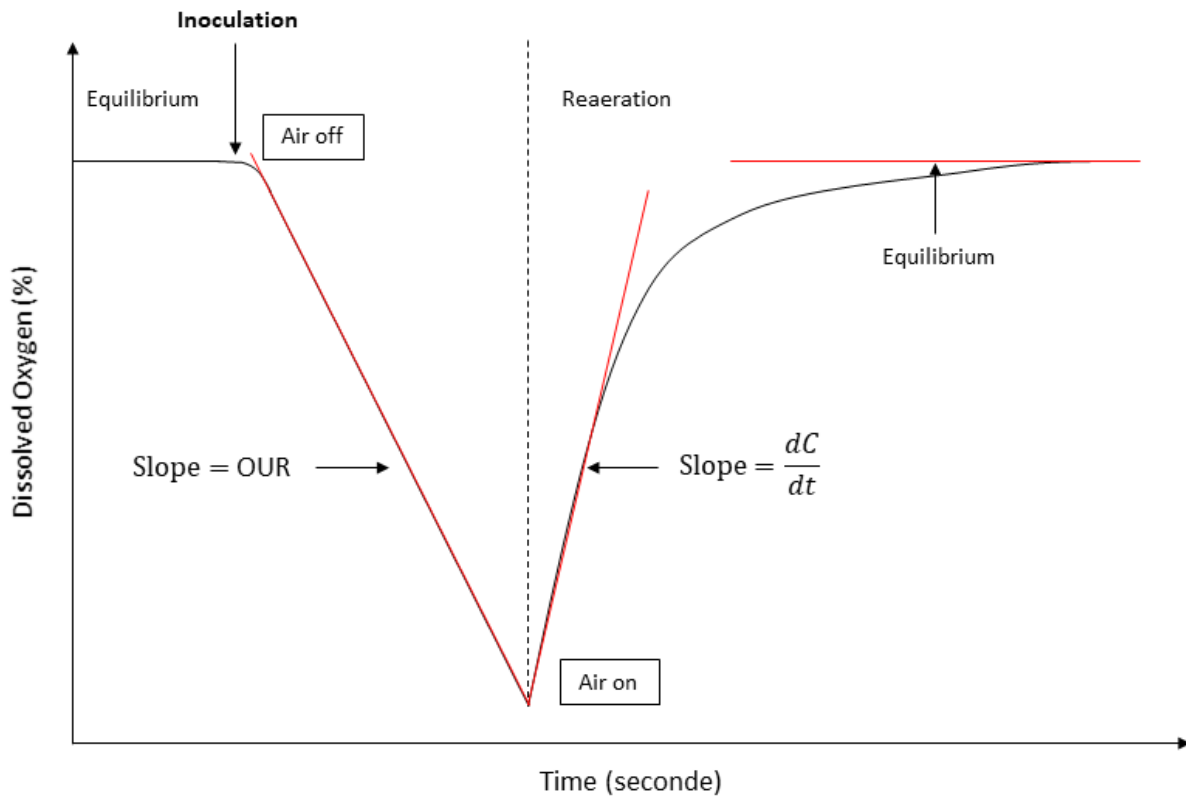


Figure 56 (2 manuscript): Dynamic method for measuring OUR and  $K_La$  during fermentation.

When the DO concentration reached values of 10 at 20%, air was reintroduced under the same previous operational conditions, thus ensuring the same oxygen transfer rate (Figure 2). In these

experimental conditions, the increase in dissolved oxygen concentration is calculated by equation (Eq.3), first described by Bandyopadhyay et al., (1967) and the increase in dissolved oxygen concentration is described by equation (Eq.3) first described by (Bandyopadhyay et al., 1967)

$$\frac{dC}{dt} = K_L a (C^* - C) - OUR \quad (\text{Eq.3})$$

By integrating equation (3),  $K_L a$  was obtained from the slope of the curve (Eq.4):

$$\ln \left( \frac{C^* - C_i}{C^* - C} \right) = K_L a t \quad (\text{Eq.4})$$

Where  $C^*$  is the saturation concentration of dissolved oxygen,  $C_i$  is the initial oxygen concentration and  $C$  the instantaneous oxygen concentration.

### 3.5.4. Inoculation

#### 3.5.4.1. Laboratory

Viable cell density in pre-cultures was determined by flow cytometry (BD Accuri™ C6). The fluorophore used to detect the viable cells was 5-6-carboxyfluorescein diacetate (cFDA) (Molecular Probes) dissolved in acetone at a final concentration of 500  $\mu\text{M}$ . Ten microliters of this solution were added to 100  $\mu\text{L}$  of diluted yeast suspension. Before the measurement, the suspension was incubated in the dark for 20 minutes. Once the viable cell density had been determined, we sampled  $10^6$  (for *S. cerevisiae* SLM) or  $5 \times 10^6$  (for *S. bacillaris* SFL1) viable cells/mL. The samples were centrifuged at 10 000 x g for 5 minutes. The supernatant was discarded and the pellet was re-suspended in grape juice and used to inoculate 1L of grape juice for the fermentation.

#### 3.5.4.2. Experimental winery

The density of *S. bacillaris* SFL1 viable cells in pre-cultures was determined using methylene blue staining and counted under a light microscope using a Thoma globule-counting chamber. Once the viable cells density had been determined,  $5 \times 10^6$  viable cells/mL were sampled. This sample was centrifuged at 8000 x g for 5 minutes. The supernatant was discarded and the pellet was re-suspended in must and used to inoculate 450L of must for the fermentation. For *S. cerevisiae* SLM, the inoculation was performed according to the manufacturer's instructions.

### 3.6.5. Fermentation conditions

#### 3.5.5.1. Laboratory bioreactor scale

All fermentations were carried out with the same batch of commercial grape juice (100% pure white and Muscat grape juice) supplemented with equal proportions of glucose and fructose to achieve a final sugar concentration of 220 g/L. This grape juice was sterilized by filtration (0.22 µm pores). The grape juice was composed of 295 mgN/L YAN - pH 3.3. The DO probe was calibrated by adding oxygen to the medium as compressed air, using an agitation of 500 rpm and an aeration of 1 VVM for 30 minutes. Fermentations were conducted in a 2L Bioflo 115 bench top bioreactor (New Brunswick, NJ, USA) using 1L of final working volume with a temperature of 28°C. Before inoculation, DO was maintained at saturation (100%).

For the sequential fermentations, *S. bacillaris* SFL1 was inoculated with an initial concentration of  $5 \times 10^6$  cells/mL. During the first 24h, agitation and aeration were maintained at 400 rpm and 0.5 VVM respectively. After 24h, *S. cerevisiae* SLM was inoculated at  $10^6$  cells/mL. Simultaneously, 10 mL of growth factors stock solution consisting of 2.61 g/L of L-glutamine, 5.25 g/L of L-glutamic acid, 1.55 g/L of L-arginine, 2.36 g/L of ammonium sulfate, 15 mg/L of ergosterol, 2.5 g/L of thiamine hydrochloride 100 µg/L of biotin were added. This addition represented a final concentration in nitrogen of 100 mgN/L in the must. After the inoculation of *S. cerevisiae* SLM, agitation was stopped. At 48h of fermentation, another 10 mL of solution growth factors were added. A short agitation of one minute was applied for homogenization after which agitation and aeration were stopped. Fermentations with *S. cerevisiae* SLM alone were carried out under the same conditions (at the moment of its inoculation in sequential fermentation) for reference. All the fermentations were conducted in duplicate.

#### 3.5.5.2. Pilot-scale fermentations

Experiments were carried out in the experimental winery of the Sofralab company in Montagnac (Languedoc-Roussillon, France). Sequential fermentations were performed in 525L stainless-steel fermenters filled with 450L of thermic-maceration Syrah must. The must was composed of 237 g/L of sugar, 291 mgN/L of YAN - pH 3.7. First, *S. bacillaris* SFL1 was inoculated with an initial cell population of  $5 \times 10^6$  cells/mL as described above for the laboratory bioreactor scale trials. Oxygenation was maintained at 1 mg/L for 48h. Homogenization was applied using enological pumps from the drain cock to the top of the fermenter, with a flux at 52 hL/h. At 48h of fermentation, *S. cerevisiae* SLM was inoculated with an initial cell population of  $1.0 \times 10^7$  cells/mL to ensure its implementation after rehydration, as recommended by the manufacturer. A hundred milligrams of nitrogen per liter

from growth factor stock at the laboratory bioreactor scale and 10mL of biotin stock solution at 100 µg/L were added. At 72h, 100 mgN/L and 10mL of biotin stock solution were added again. Then, oxygenation and homogenization were stopped at 74h. The temperature was maintained at 20°C during fermentation. Sequential fermentations were conducted in duplicate.

Control fermentation was performed in a stainless-steel fermenter filled with the same thermic-maceration Syrah must used in sequential fermentation. *S. cerevisiae* SLM was inoculated with an initial cell population of  $1.0 \times 10^7$  cells/mL. Fermentation was carried out in an air-conditioned room at 20°C.

When the residual sugars were less than 2 g/L, all the wines were sampled in 50L stainless steel vats. The wines were supplemented with 30 mg/L of total SO<sub>2</sub> and kept for 2 weeks at 16°C to clarification. After 10 days, commercial gelatin (Gélisol, Martin Vialatte, France) was added at a final concentration of 150 mg/L to improve clarification. After 10 days at 16°C, the wine supernatants were supplemented with 15 mg/L of total SO<sub>2</sub> and 100 mg/L of potassium polyaspartate (Antartika, Martin Vialatte, France) to prevent tartaric precipitation before bottling.

### 3.5.6. Monitoring of biomass growth

At the laboratory bioreactor scale, viable cell density was determined as before inoculation (as described previously: Inoculation – Laboratory). *S. bacillaris* SFL1 and *S. cerevisiae* SLM by flow cytometry analyses gave two distinct clouds representing viable cells, according to their granularity and size. cFDA fluorophore was used as a viability label. Serial dilutions of cell suspensions in 0.9% (w/v) NaCl were generated in the experimental winery. Samples of each dilution (100 µL) were then spread on different media: lysine medium (Oxoid LTD., England), *Dekkera/Brettanomyces* sp. selective medium (Rodrigues et al., 2001) (10 g/L yeast extract, 20 g/L bacto-peptone, 20 g/L glucose, 0.1 g/L p-coumaric acid, 0.1 g/L ferulic acid, 0.03 g/L bromocresol green, 0.2 g/L chloramphenicol, 0.006% (w/v) cycloheximid, 20 g/L agar and pH adjusted to 5); Mannitol medium (25 g/L mannitol, 10 g/L yeast extract, 20 g/L agar and 5 mL/L of Delvocid 1% plus 63 mg/L penicillin added after autoclaving (55°C). Each sample was incubated at 28°C for 3 days. NS yeast colonies appeared rapidly and were clearly visible on lysine medium, whereas *S. cerevisiae* SLM colonies appeared more slowly and were smaller. Unlike flow cytometry, here only cultivable cells were detected by this method.

### 3.5.7. Analytical methods

#### 3.5.7.1. Oenological analysis

At the laboratory scale, samples were centrifuged at 10,000 x g for 5 min and the supernatants were stored at -20°C until analysis. For pilot scale, samples were centrifuged at 10,000 x g for 5 min and immediately analyzed. Total sugar, ethanol and volatile acidity concentrations were determined by FTIR spectroscopy with an OenoFoss type 4101 apparatus (FOSS Electric, Denmark).

#### 3.5.7.2. Concentrations of amino acids and ammonium

At the laboratory scale, amino acids and ammonium were derivatized with an AccQ-Tag Ultra Derivatization kit, according to the manufacturer's instructions (Waters, USA). Separation was then performed by high-performance liquid chromatography (HPLC) with a C18 reverse-phase column (AccQ-Tag Ultra Column, 3.9 x 150 mm) and fluorometric detection, according to Gobert et al. (2017).

#### 3.5.7.3. Analysis of volatile compounds

Volatile compounds analyses (wines from experimental winery) were carried out by Nyséos (Montpellier, France). Briefly, the first step consisted of liquid/liquid extraction. After an internal calibration (isotopic dilution for 16 compounds), volatiles compounds were analyzed by gas chromatography coupled with mass spectrometry. For each sample, 1 µL was injected. Separation was performed using an Agilent VF-WAXms, 30 m x 0.25mm column.

### 3.5.8. Sensory analysis of wines

Sensory analysis of wines from the experimental winery was performed two months after bottling. The samples were presented simultaneously according to a random order different for each assessor. Three samples were proposed including for the first one, the wine from control fermentation, and the two other replicates from sequential fermentation. 25 mL samples were poured into dark wine glasses labelled with 3-digit random codes and covered by plastic Petri dishes. All the samples were served at room temperature and evaluated in individual booths. The panelists were not informed about the nature of the samples evaluated.

#### 3.5.8.1. Flash profile

The protocol used to perform the flash profile method refers to the book "Descriptive Analysis in Sensory Evaluation", Chapter 14 (Bredie et al., 2018). Based on this recent work, a panel was formed

by 22 trained assessors with experience in the sensory description of wine. This panel was made up of students of the Burgundy Vine and Wine Institute (9 women and 13 men, ranging from 20 to 35 years old, average = 24). The flash profile process was organized in 3 testing sessions including both orthonasal and in-mouth analysis (aroma, mouthfeel and taste), independently. The 3 wines from the experimental winery were proposed (sequential fermentation replicate 1, sequential fermentation replicate 2 and the control). In the first session, the panel was asked to give a list of descriptors (individual vocabulary development). At the end of the session, all the descriptors were pooled on a single list. In the second session, the possibility to adjust individual vocabulary with attributes from other panel members was given (adjustment of individual vocabulary). From this definitive list, a ranking sheet based on the attributes cited were established for each panelist. A non-structured 10 cm continuous length scale anchored with the words “low intensity” and “high intensity” on the left and right ends was provided for each descriptor. By doing this, the position was ascending according to the increase in sensory intensity for the attribute. In the third session, the previous individual ranking sheet was given to each panelist in order to evaluate the intensity of descriptors cited in the second session. This last session was carried out in two replicates.

#### 3.5.8.2. Flash profile data analysis

The rank ordering evaluation was converted into scores. The product with the lowest intensity was given a score of 1 and then the score increased according to the ranking order of each sample (3 samples). For the product with equal rank position, a mean rank value was given. A multiple factor analysis (MFA) was used to evaluate how the wines were positioned relative to each other and the relationships between different criteria and the criteria group. From the first MFA results, the similarity between the matrices of the quantitative variables was evaluated using an RV-coefficient (Robert and Escoufier, 1975). Only matrices (represented as panelists) with a high RV-coefficient and grouped in the same major cloud of dots were conserved. 5 assessors were excluded from data in this step. A final MFA was carried out with the 16 assessors selected. Analyses were carried out with XLSTAT software (version 2014).

#### 3.5.9. Statistical analysis

Fermentations at the laboratory bioreactor scale were performed in triplicate and at the pilot scale in duplicate biological repeats. The enological parameters and amino acids and ammonium concentrations were expressed as means  $\pm$  SD. Normality was determined by the Shapiro-Wilk test and differences between measurements were determined using one-way ANOVA and Tuckey's test with the statistical software, XLSTAT version 2014 (Addinsoft, France). For data not modelled by

normal distribution, the Kruskal-Wallis test was used with the same software. We used Microsoft Excel 2013 and Origin 2018 version 95E for the analysis of the other data.

### 3.6. Results

#### 3.6.1. $K_La$ - static method in grape juice

To promote the biomass development of *S. bacillaris* SFL1 during the first part of the sequential fermentation, oxygen transfer capacity in grape juice of the bioreactor had to be evaluated. To do this, the maximum capacity of oxygen transfer ( $K_La_{\max}$ ) was determined. In the experimental conditions tested,  $K_La$  values improved with the increase of agitation rate and aeration level couples (from 0.001 to 0.0141 s<sup>-1</sup>). At 500 rpm and 1 VVM, this increase was slowed down ( $\sim 0.014$  s<sup>-1</sup>) and a stationary phase was observed for the highest agitation/aeration (700 rpm and 2 VVM) values (Figure 3A). The stationary phase was highlighted by keeping only the  $K_La$  value higher than the previous one (Figure 3B). To confirm this observation, a Shapiro-Wilk test was applied and showed that our data were not modeled by a normal distribution. Consequently, the significant difference of the results was determined by a Kruskal-Wallis test, an alternative to ANOVA. The results showed a significant difference between the exponential values (group A) and the stationary values (group B). At the same time, stationary values were modeled by a normal distribution and an ANOVA test showed no significant differences (NS) (Figure 3B). In these conditions, 500 rpm / 1VVM was chosen as the parameter to obtain a  $K_La_{\max}$  in the static method. In the commercial grape juice with a sugar concentration of 220 g/220g/L and a temperature of 28°C, the  $K_La_{\max}$  value was  $50.8 \pm 1.6$  h<sup>-1</sup> ( $0.0141 \pm 4.5 \times 10^{-4}$  s<sup>-1</sup>, Figure 3B).

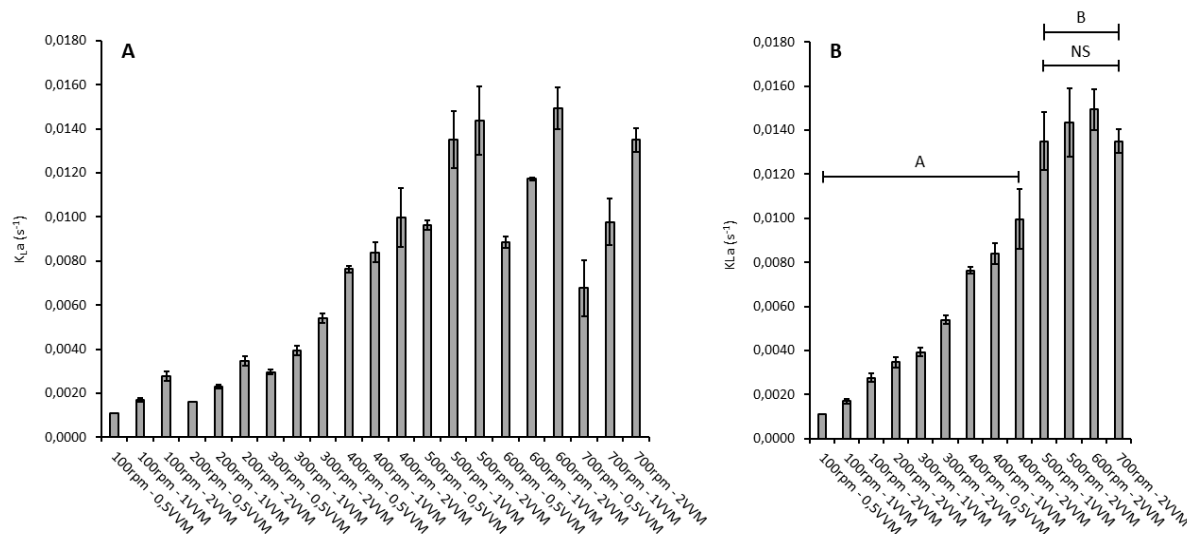


Figure 57 (3 manuscript): (A):  $K_L a_{max}$  determination by the static method using several agitation and aeration couples. (B): Classification of results in ascending order. Only the directly higher values were kept. Groups of  $K_L a$  values represented by letters were significantly different (Kruskal-Wallis test,  $p < 0.05$ ). Values in the stationary step (group B) were not significantly different (Tuckey test,  $p < 0.05$ ). The experiments were performed in triplicate and the error bars represent the standard deviation of the results.

### 3.6.2. $K_L a$ – dynamic method in grape juice

#### 3.6.2.1. Determination of the *S. bacillaris* SFL1 OUR

During the OUR measurement period, it was theoretically considered that the biomass was constant. Therefore, a linear decrease of DO concentration was observed. Here, *S. bacillaris* SFL1 development was fast and the biomass increase had to be taken into consideration. Thus, only the first linear part of the curve was selected for the OUR calculation (Figure 4). During this period, a mean of  $5.4 \times 10^6 \pm 0.6$  cells/mL was measured. The slope of the linear fitting was  $-0.002 \% O_2 \cdot s^{-1}$  ( $-7\% O_2 \cdot h^{-1}$ ) for the biomass measured ( $5.4 \times 10^6 \pm 0.6$  cells/mL) or  $-1.3\% O_2 \cdot h^{-1}$  for one million cells per milliliter.

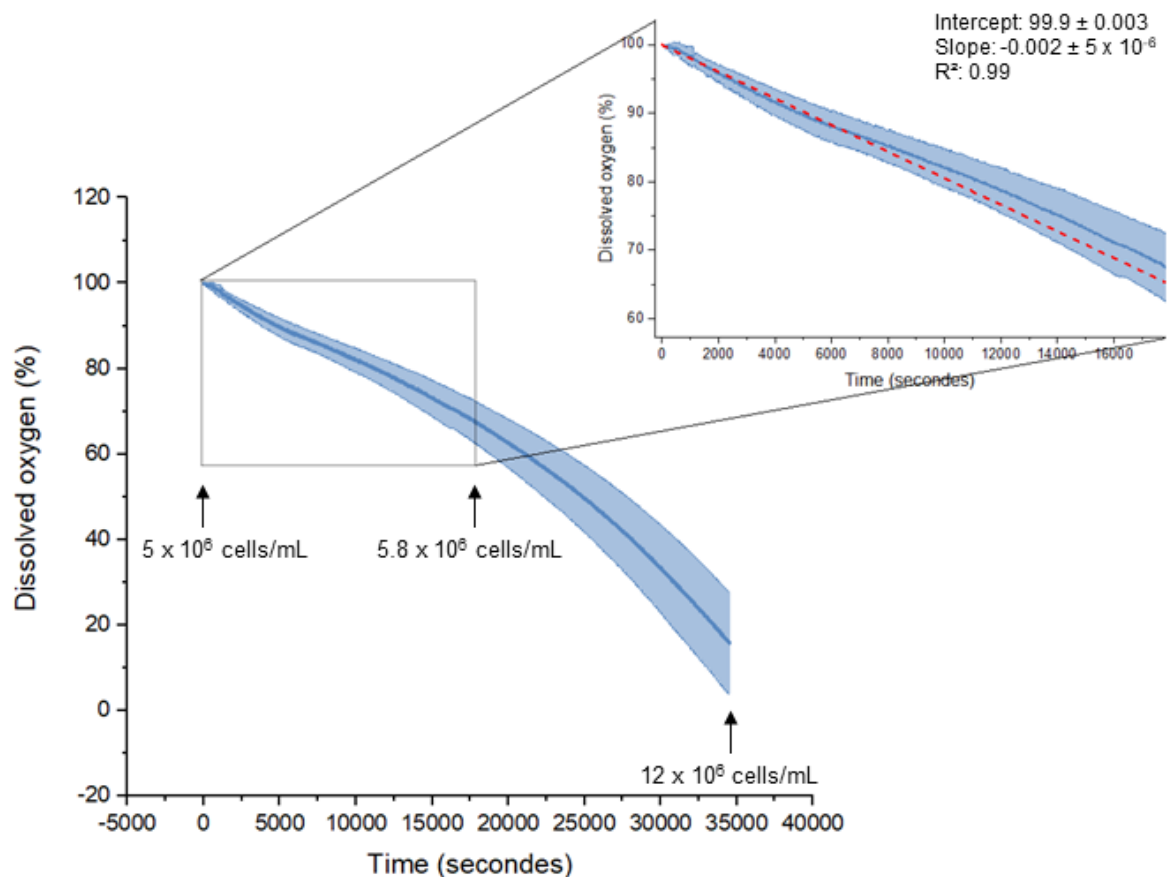


Figure 58 (4 manuscript): Oxygen consumption profile of *S. bacillaris* SFL1 in grape juice at 28°C. The zoom represents the linear part where the slope of the linear fitting was calculated. The experiments were performed in triplicate. The error bars have been set as line with fill areas and represent the standard deviation of the results.

### 3.6.2.2. Determination of the *S. bacillaris* SFL1 $K_L a$ – Dynamic method

When the DO reached  $\sim 10\%$ , aeration was set to 1 VVM with 500 rpm agitation. These parameters were chosen from the preliminary results using the static method according to the  $K_L a_{\max}$  parameters. DO saturation was obtained after 15 min. In the presence of *S. bacillaris* SFL1,  $K_L a$  was  $24.5 \pm 0.5 \text{ h}^{-1}$  ( $0.0068 \pm 1.5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ). Compared with the static method, the  $K_L a_{\max}$  value was almost halved (Figure 5).

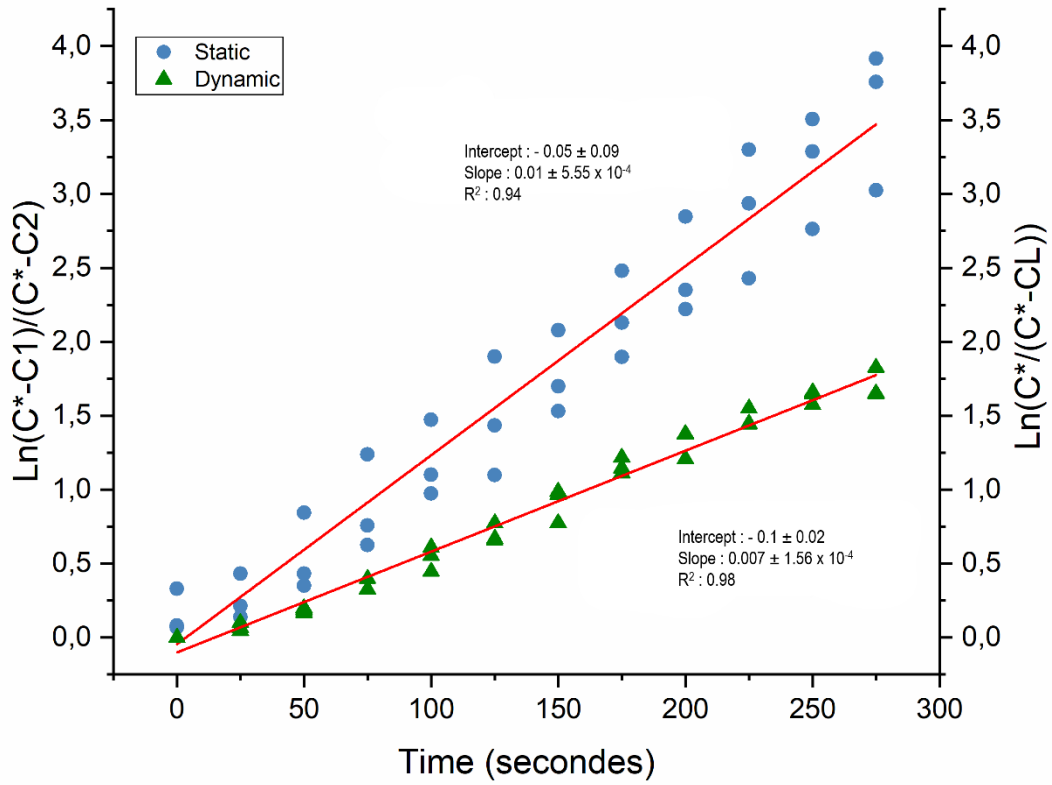


Figure 59 (5 manuscript): Comparison of  $K_L a_{\max}$  obtained in static and dynamic methods. Blue circles represent data from static method and green triangles the dynamic method. Red curves represent the linear fitting. The experiments were performed in triplicate.

### 3.6.3. Sequential fermentation with *S. bacillaris* SFL1 and *S. cerevisiae* SLM in laboratory bioreactor scale

The determination of  $K_L a_{\max}$  allowed defining the agitation and aeration parameters leading to the maximum oxygen transfer rate. From this data and in order to minimize acetic acid production (Contreras et al., 2015; Tronchoni et al., 2017), only the parameters defined by  $\frac{1}{2} K_L a_{\max}$  were conserved (400 rpm/0.5 VVM) in sequential fermentation at the laboratory bioreactor scale. The oxygen concentration varied from 100% at the moment of inoculation of *S. bacillaris* SFL1 to 0% after approximately 17h of fermentation (Figure 6).

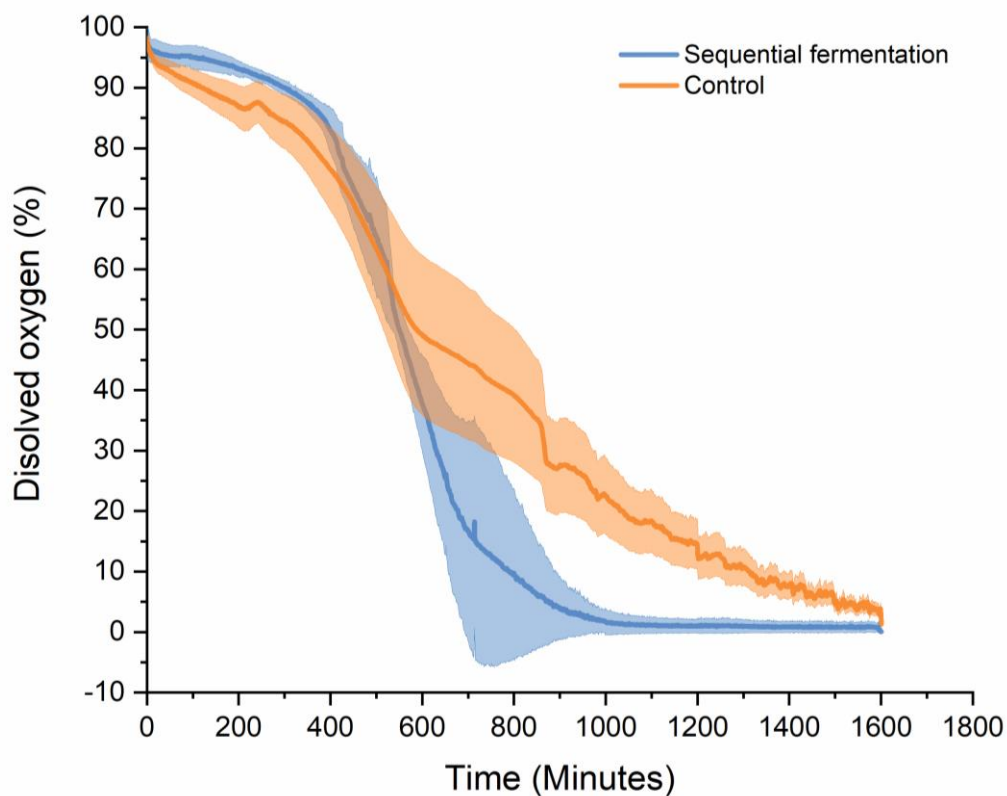


Figure 60 (6 manuscript): Oxygen consumption during the first step of the sequential fermentation (*S. bacillaris* SFL1) and control fermentation (*S. cerevisiae* SLM) with an aeration at 0.5 VVM and an agitation at 400 rpm. The experiments were performed in duplicate. The error bars (fill areas) represent the standard deviation of the results.

This fast consumption of oxygen could be correlated with the biomass formation. Indeed, in 24h the generated biomass reached  $\sim 8 \times 10^8$  cells/mL (Figure 7A). In comparison, the oxygen concentration with *S. cerevisiae* SLM varied from 100% at the moment of inoculation to 0% in approximately 26h (Figure 6). The biomass produced by *S. cerevisiae* SLM in 24h reached  $\sim 2 \times 10^8$  cells/mL (Figure 7A). Compared to *S. bacillaris* SFL1, the concentration of *S. cerevisiae* SLM at the same time was 25% lower.

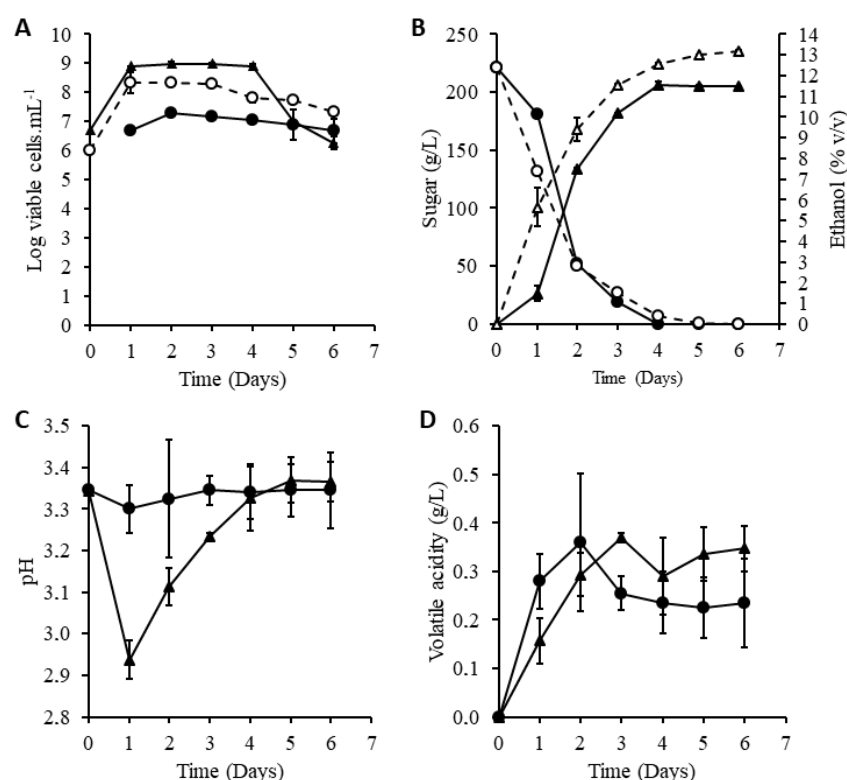


Figure 61 (7 manuscript): Fermentation profiles at the laboratory scale. (A) Growth curves of sequential fermentation with *S. bacillaris* SFL1 (solid curves with black triangles) and *S. cerevisiae* SLM (solid curves with black circles). *S. cerevisiae* SLM in pure culture is represented by dotted curves with white circles. (B) Sugar consumption and ethanol production in sequential fermentation with *S. bacillaris* SFL1 and *S. cerevisiae* SLM (solid curves with black circles and black triangles respectively). For the control with *S. cerevisiae* SLM, the same parameters are represented by dotted curves with white circles and white triangles. (C) pH variation during sequential fermentation (black triangles) and control fermentation (black circles). (D) Volatile acidity production during the sequential fermentation (black triangles) and control fermentation (black circles). The experiments were performed in duplicate and the error bars represent the standard deviation of the results.

After 24h of fermentation with *S. bacillaris* SFL1 with aeration and agitation, *S. cerevisiae* SLM was inoculated at  $5 \times 10^6$  cells/mL. The results showed that the YAN concentration at the moment of inoculation was 20 mg N/L (Figure 8). A solution of growth factors was added to avoid nutritional deficiency for *S. cerevisiae* SLM (not only YAN sources). Preliminary experiments with only YAN addition led to sluggish fermentations (data not shown). The concentration of added YAN was 200 mgN/L. A new addition was carried out at 48h to maintain a stable viable cell concentration. This addition had no effects on the maximum biomass of *S. bacillaris* SFL1. Indeed, the cell concentration in stationary phase remained stable until the fourth day of fermentation ( $\sim 8 \times 10^8$  cells/mL). The concentration of *S. cerevisiae* SLM 24h after inoculation reached  $2 \times 10^7$  cells/mL. Then, the viable cell concentration decreased gradually for *S. bacillaris* SFL1 to reach  $5 \times 10^6$  cells/mL after 6 days of fermentation (Figure 7A). Concerning sugar consumption, it was faster in the control fermentation during the first 2 days. *S. cerevisiae* SLM performed complete fermentation in 5 days, consuming all the sugar present and generating an ethanol concentration of  $13.15 \pm 0.07\%$  (v/v). In sequential

fermentation, the fermentation was completed in 4 days, also consuming all the sugar present and generating an ethanol concentration of  $11.5 \pm 0.1\%$  (v/v) (Figure 7B). The end of fermentation in 4 days could explain the significant *S. bacillaris* SFL1 viability decrease observed in Figure 7A. Compared to *S. cerevisiae* SLM single fermentation, the sequential fermentation with *S. bacillaris* SFL1 led to a decrease of ethanol of  $\sim 1.65\%$  (v/v).

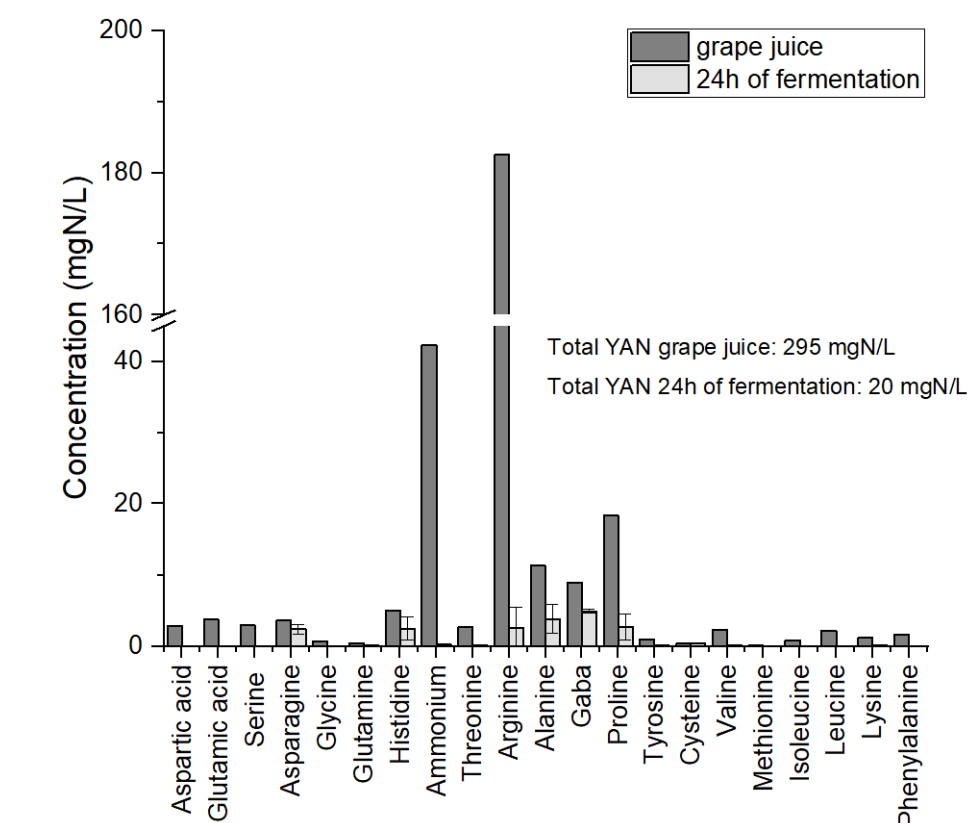


Figure 62 (8 manuscript): YAN concentration in grape juice initially and after 24h of fermentation by *S. bacillaris* SFL1. The experiments were performed in duplicate and the error bars represent the standard deviation of the results.

Interestingly, during the first part of sequential fermentation (when *S. bacillaris* SFL1 was the only species present), the pH decreased significantly to reach  $2.94 \pm 0.12$ . At the same time, in pure *S. cerevisiae* SLM culture, the pH was 3.3 which represented a difference of  $0.36 \pm 0.01$ . Then, the pH increased gradually to attain at the end of fermentation approximately the same value obtained with the control fermentation ( $3.35 \pm 0.01$  and  $3.37 \pm 0.02$  respectively) (Figure 8C). The volatile acidity concentration in sequential fermentation reached  $0.35 \pm 0.05$  g/L and  $0.24 \pm 0.09$  g/L in control fermentation (Figure 8D). The concentration of volatile acidity was  $0.16 \pm 0.05$  g/L before the inoculation of *S. cerevisiae* SLM in the sequential fermentation.

### 3.6.4. Comparison between sequential and control fermentations at the pilot fermenter scale

#### 3.6.4.1. Enological parameters

The  $K_La$  was evaluated to optimize the oxygen supply in the medium in order to promote biomass production and allow aerobic metabolism to reduce the wine's alcohol concentration. The first results showed that controlled oxygenation can reduce the alcohol content. However, at the pilot scale, the volumes used did not allow determining the experimental  $K_La$ . That is why a polarographic oxygen sensor coupled with an automatic O<sub>2</sub> adjustment system using pure oxygen pulsing was set up to preserve the aerobic condition during the first step of sequential fermentation to increase the biomass.

Fermentations in the experimental winery were performed with a thermic-macerated Syrah must containing 237 g/L of sugar, 291 mg/L of YAN – pH 3.7. Before inoculation, the indigenous NS yeast population was negligible compared to the inoculated yeast strains. No *S. cerevisiae* colonies were detectable. During the experiment, *S. bacillaris* SFL1 (sequential fermentation) was considered to represent most of the NS yeast population while *S. cerevisiae* SLM (sequential fermentation + control fermentation) represented most of the *S. cerevisiae* population. *S. bacillaris* SFL1 was inoculated at a density of 10<sup>7</sup> cells/mL and *S. cerevisiae* SLM was added at a density of 10<sup>7</sup> cells/mL after 2 days of fermentation.

In control fermentation *S. cerevisiae* SLM reached the stationary phase in 2 days with a biomass of ~2.7 x 10<sup>10</sup> cells/mL. During this period, the indigenous NS yeast biomass present at the beginning of the fermentation decreased rapidly to become undetectable after one day of fermentation (Figure 9A). All sugar was consumed in 4 days with an ethanol production of 14.36 ± 0.1% (v/v) (Figure 9B) and pH values varied from 3.9 to 3.6 at the end of fermentation (Figure 9C). At the end of experiment cell cultivability reached 1.1 x 10<sup>6</sup> cells/mL (7 days).

In sequential fermentation, *S. bacillaris* SFL1 reached ~3.7 x 10<sup>10</sup> cells/mL in 2 days. At this point, 44.5 g/L of sugar had already been consumed by *S. bacillaris* SFL1, and *S. cerevisiae* SLM was inoculated at 10<sup>7</sup> cells/mL with the addition of growth factors. The *S. cerevisiae* SLM concentration reached ~1.2 x 10<sup>10</sup> cells/mL 24h after inoculation and the biomass was stable until the end of fermentation (in contrast to control fermentation where the cultivability decreased). Only *S. bacillaris* SFL1 cell cultivability decreased after 5 days. Compared to control fermentation, sequential fermentation lasted 3 more days. A decrease of the pH value from -0.16 was observed at the end of sequential fermentation compared to the value observed in control fermentation (Figure 9D). In

sequential fermentation the concentration of ethanol reached  $13.35 \pm 0.4\%$  (v/v) (Figure 9B). This difference represented an average decrease of 1% (v/v) ethanol concentration. Surprisingly, a significant increase of volatile acidity was observed on the last day of fermentation with a concentration of  $0.55 \pm 0.03$  g/L for sequential fermentation and  $0.40 \pm 0.03$  g/L for control fermentation. No spoilage flora that could explain an increase in the volatile acidity concentration was detected.

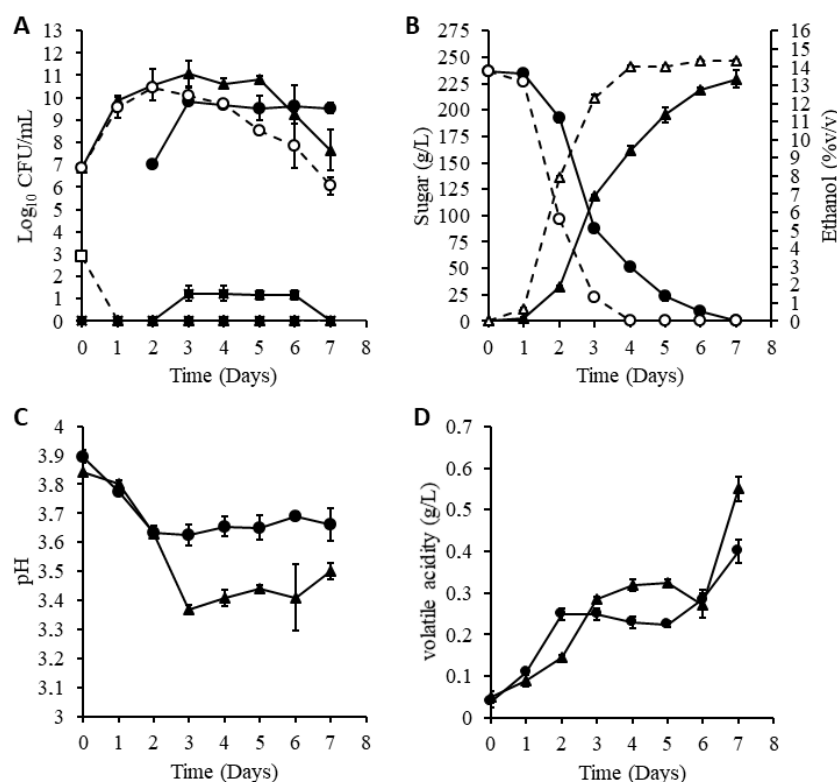


Figure 63 (9 manuscript) : Pilot-scale fermentation profiles. (A) Growth curves of sequential fermentation after inoculation of *S. bacillaris* SFL1 (solid curves with black triangles) and *S. cerevisiae* SLM (solid curves with black circles) in natural must. For sequential fermentation indigenous NS yeasts (741 cells/mL before inoculation) are confounded with *S. bacillaris* SFL1 growth curve. Conventional fermentation with only *S. cerevisiae* SLM inoculated is represented by dotted curves with white circles. For conventional fermentation, indigenous NS yeasts are represented by dotted curves with white squares. Acetic bacteria in sequential or conventional fermentation were undetectable (marks confounded with horizontal axis). *Dekkera bruxellensis* was only detectable in sequential fermentation (solid curve with black squares). In conventional fermentation marks are confounded with horizontal axis. (B) Sugar consumption and ethanol production in sequential fermentation with *S. bacillaris* SFL1 and *S. cerevisiae* SLM (solid curves with black circles and black triangles respectively). For the conventional fermentation with *S. cerevisiae* SLM, same parameters are represented by dotted curves with white circles and white triangles. (C) pH variation during sequential fermentation (black triangles) and conventional fermentation (black circles). (D) Volatile acidity production during the sequential fermentation (black triangles) and conventional fermentation (black circles). The experiments were performed in duplicate and the error bars represent the standard deviation of the results.

#### 3.6.4.2. Volatile and non-volatile compounds profiles

Table 3 shows the concentration of 34 compounds including esters/acetates,  $C_{13}$ -norisoprenoids, pyrazine, terpenols, higher alcohols, acids and minerals. For control fermentation, the concentration

of esters and acetates reached ~7 mg/L with ethyl 2-hydroxypropanoate, isoamyl acetate and ethyl hexanoate as the main compounds. In comparison, the concentration of esters and acetates reached ~3 mg/L in sequential fermentation, which represented a decrease of 57%. After sequential fermentation, the main compounds were ethyl 2-hydroxypropanoate, ethyl butanoate (in contrast to isoamyl acetate in control fermentation) and ethyl hexanoate. Several compounds such as hexyl acetate, 2-phenylethyl acetate, ethyl decanoate and ethyl 2-methylbutanoate were no longer detected in sequential fermentation. The strategy used for sequential fermentation seemed to have no significant effect on the C<sub>13</sub>-norisoprenoid compounds (2 µg/L in control fermentation vs 1.5 µg/L in sequential fermentation). In the two experiments, no pyrazines were detected. In contrast to esters and acetates, terpenols concentrations were higher in sequential fermentation with ~96 µg/L. In control fermentation, their concentrations reached ~34 µg/L, which represented a decrease of 65%. The most significant differences involved geraniol and linalool. In control fermentation, the concentrations reached ~16 and ~6 µg/L, respectively and ~71 and ~14.6 µg/L respectively in sequential fermentation. The concentrations of higher alcohols in control fermentation (~80 mg/L) were approximately four times higher than in sequential fermentation (~20 mg/L).

Tableau 20 (Table 3 manuscript): Concentration of volatile and minerals constituents in the wine for control and sequential fermentation.

| Compounds                                   | Control<br>fermentation |   | Sequential<br>fermentation |  |  |
|---------------------------------------------|-------------------------|---|----------------------------|--|--|
| <b>Esters/acetates (µg/L)</b>               |                         |   |                            |  |  |
| Hexyl acetate                               | 52                      |   | nd                         |  |  |
| Isoamyl acetate                             | 2375                    |   | 93 ± 9                     |  |  |
| 2-phenylethyl acetate                       | 318                     |   | nd                         |  |  |
| Ethyl decanoate                             | 127.2                   |   | nd                         |  |  |
| Ethyl hexanoate                             | 404                     |   | 210 ± 54                   |  |  |
| Ethyl octanoate                             | 284                     |   | 105 ± 18                   |  |  |
| Ethyl butanoate                             | 173                     |   | 242 ± 14                   |  |  |
| Ethyl 2-hydroxypropanoate                   | 3009                    |   | 2179 ± 17                  |  |  |
| Ethyl 3-hydroxybutanoate                    | 294                     |   | 64 ± 8                     |  |  |
| Ethyl 2-methylbutanoate                     | 4.3                     |   | nd                         |  |  |
| Ethyl 2-methylpropanoate                    | 32                      |   | 68 ± 10                    |  |  |
| Ethyl 2-hydroxyisocaproate                  | nd                      |   | nd                         |  |  |
| Σ                                           | 7072                    | > | 2961 ± 130                 |  |  |
| <b>C<sub>13</sub>-norisoprenoids (µg/L)</b> |                         |   |                            |  |  |
| 1.1.6-trimethyl-1.2-dihydronaphthalene      | 0.2                     |   | 0.1 ± 0.0                  |  |  |
| α-ionone                                    | nd                      |   | nd                         |  |  |
| β-damascenone                               | 1.7                     |   | 1.3 ± 0.1                  |  |  |
| β-ionone                                    | 0.1                     |   | 0.1 ± 0.0                  |  |  |
| Σ                                           | 2.0                     | > | 1.5 ± 0.1                  |  |  |
| <b>Pyrazine (µg/L)</b>                      |                         |   |                            |  |  |
| 2-isobutyl-3-methoxypyrazine                | nd                      |   | nd                         |  |  |
| <b>Terpenols</b>                            |                         |   |                            |  |  |
| Linalool                                    | 6.0                     |   | 14.6 ± 0.8                 |  |  |
| Nerol                                       | 1.9                     |   | 2.5 ± 0.0                  |  |  |
| Geraniol                                    | 16                      |   | 71 ± 6                     |  |  |
| Citronellol                                 | 7.8                     |   | 5.6 ± 0.4                  |  |  |
| Alpha terpineol                             | 2.4                     |   | 2.5 ± 0.1                  |  |  |
| Rose oxide                                  | nd                      |   | nd                         |  |  |
| Σ                                           | 34                      | < | 96 ± 7.6                   |  |  |

**Higher alcohols (µg/L)**

|                                         |       |   |       |   |      |
|-----------------------------------------|-------|---|-------|---|------|
| 2-phenylethanol                         | 80059 |   | 19673 | ± | 3683 |
| Propanol                                | 60    |   | 82    | ± | 9.2  |
| Isobutanol                              | 39    |   | 47    | ± | 4.6  |
| Butanol                                 | 0.9   |   | 0.2   | ± | 0.1  |
| Σ 2-methyl butanol and 3-methyl butanol | 370   |   | 134   | ± | 28   |
| Σ                                       | 80528 | > | 19935 | ± | 3725 |

**Acids (mg/L)**

|               |      |   |      |   |     |
|---------------|------|---|------|---|-----|
| Citric acid   | 350  |   | 295  | ± | 7.1 |
| Lactic acid   | 280  |   | 260  | ± | 28  |
| Malique acid  | 2210 |   | 1640 | ± | 0.0 |
| Tartaric acid | 2900 |   | 2635 | ± | 64  |
| Σ             | 5740 | > | 4830 | ± | 99  |

**Minerals (mg/L)**

|           |      |   |      |   |     |
|-----------|------|---|------|---|-----|
| Calcium   | 68   |   | 61   | ± | 1.4 |
| Potassium | 1440 |   | 1303 | ± | 11  |
| Σ         | 1508 | > | 1364 | ± | 12  |

---

The data shown are the mean of two replicates ± standard deviations except for control fermentation for which only one experience was considered.

### 3.6.4.3. Sensory analysis

Figure 10 shows the projection of wines on the graph obtained with the first and the second principal components of the MFAs, representing 44.99% and 24.94% of variance, respectively. Duplicates from sequential fermentation and control fermentation, grouped together in the plot, indicate the reliability of the tasting panel. Three groups of wines could be observed in the graph. The first one involved wines from sequential fermentation (SFR1 A, SFR1B and SFR2B). The second one involved wines from control fermentation (CF A and CF B). The third one involved only one sample from sequential fermentation (SFR2 A). To confirm this observation, agglomerative hierarchical clustering (AHC) was carried out. The results obtained were in agreement with the previous observation and confirmed the existence of three significant groups. It was expected that the SFR2 A sample (third group) was included in the first group with other sample wines from sequential fermentation. A bottle effect or a lack of repeatability could explain this observation (combined effect). Nevertheless, the groups from sequential fermentation and control fermentation were clearly separated.

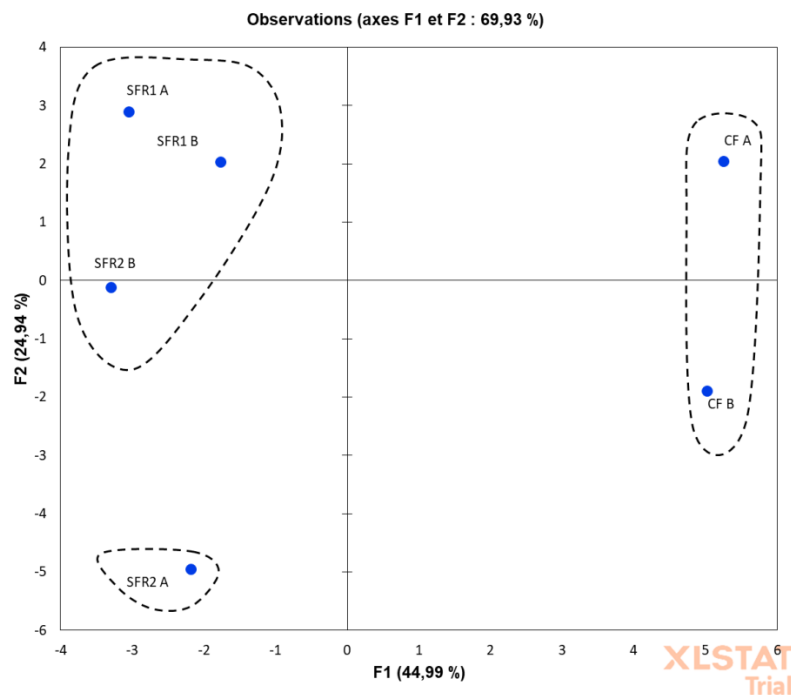


Figure 64 (10 manuscript): Projection of wines used in flash profile (3 wines + 2 replicates). Abbreviations: SF, sequential fermentation; CF, conventional fermentation; R1, biological replicate one; R2, biological replicate two; A first replicate of the degustation; B second replicate of the degustation (third session of flash profile). Ellipses represent clusters obtained from AHC.

The first principal component (PC) compared terms according to candied red berry, milky, exotic fruits and freshness sensations, mainly attributed to wines elaborated in sequential fermentation.

The terms of vegetal/herbaceous, reduced, metallic, amylic characterized wines elaborated in control fermentation (Figure 11). The direction of the second PC was less clear. Indeed, groups of samples were very similar (biological and technical repeats). Therefore, no significant difference was observable between the 3 wines (sequential fermentation replicate 1 (SFR1), sequential fermentation replicate 2 (SFR2) and the control (CF)) except for SFR2. For these samples, it would seem that SFR2 A was distinguished from group 1 (other wines from sequential fermentation) by attributes defined by exotic fruits, passion fruit, pineapple and red and black berry. Although the alcohol content was lower in wines from sequential fermentation ( $\sim 1\%$  v/v), descriptors directly correlated with alcohol were not attributed for one group in particular.

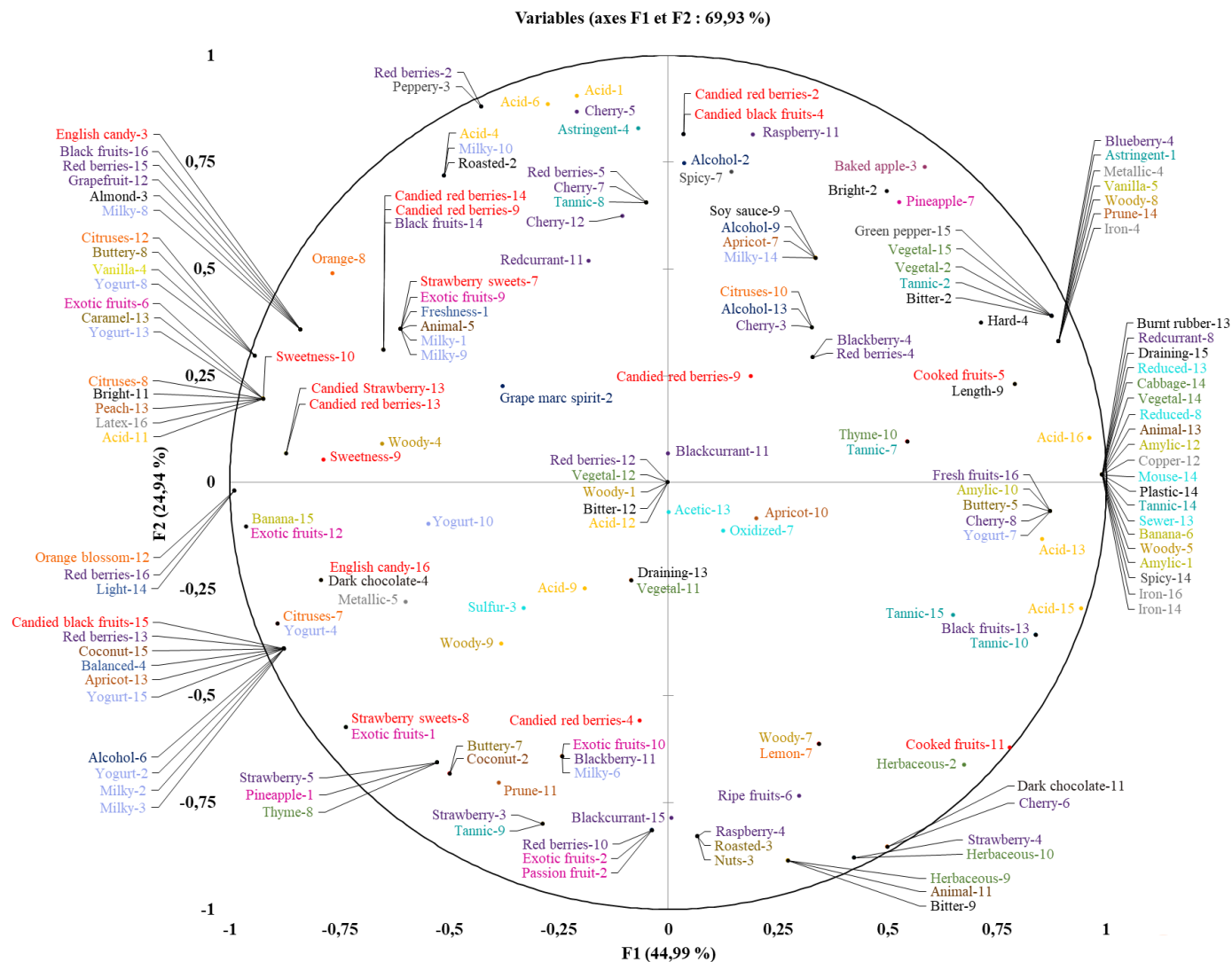


Figure 65 (11 manuscript): Discriminant attributes on the two first dimensions (PC1 and PC2) of the PCA performed with aroma descriptors. Colors represent descriptors from the same aromatic family. Numbers at the end of descriptors refer to panellist identification. Abbreviations: SF, sequential fermentation; CF, conventional fermentation; R1, biological replicate one; R2, biological replicate two; A, first replicate of the degustation; B, second replicate of the degustation (third session of flash profile).

### 3.7. Discussion

Currently, consumers show a preference for wines with lower ethanol content (between 9 and 13% v/v) (Massot et al., 2008). However, climate changes tend to produce wines that are richer in alcohol. To address this problem, filtration techniques exist but most of them produce wines that are not organoleptically accepted (Pickering, 2000; Ozturk and Anli, 2014; Rolle et al., 2017). Another strategy to reduce alcohol in wine is to use yeast species with low ethanol yield. That is why sequential or mixed fermentation using NS yeasts has been examined. Based on the data obtained, *S. bacillaris* is presented as a good candidate due to its ethanol reduction potential and enological interest (Englezos et al., 2015, 2016a, 2018b; Mestre Furlani et al., 2017; Rolle et al., 2017). It was revealed that aeration during the first part of sequential fermentation improved ethanol reduction compared to control fermentation with *S. cerevisiae* alone. From these observations, several reports have explored the oxidative metabolism observed in several NS yeast species, which can respire sugar at high concentrations and therefore, “burn off” carbon that would otherwise lead to ethanol formation (Contreras et al., 2015; Morales et al., 2015; Röcker et al., 2016; Tronchoni et al., 2017). Thus, aeration seems to be an essential parameter for obtaining significant ethanol reduction in wine. From these data, our study developed the concept of aeration during the first step of the sequential fermentation by *S. bacillaris* in a bioreactor. The optimization of oxygenation in the context of wine ethanol reduction was carried out for the first time. Moreover, only few data are available at the pilot scale and oxygenation is rarely considered at this level in sensory analysis.

At the laboratory bioreactor scale, the determination of  $K_L a_{\max}$  gave the starting point for optimizing and controlling the level of oxygenation of *S. bacillaris* SFL1. The  $K_L a$  coefficient was used as a measure of the aeration capacity of a fermenter. The higher  $K_L a$  is, the higher the aeration capacity of the system. Many factors affect aeration efficiency including such parameters as air pressure, temperature, vessel geometry, fluid characteristics (density, viscosity, surface tension, etc.) and the presence of antifoam agents (Stanbury et al., 2013). In the conditions tested, the  $K_L a_{\max}$  value was obtained with an agitation of 500 rpm and an aeration of 1 VVM. On this basis, the same parameters were applied in the presence of *S. bacillaris* SFL1 (dynamic method). The  $K_L a$  values found by the static and the dynamic methods were relatively different. Surprisingly, the  $K_L a$  value in the static method was nearly twice as high as in the dynamic method ( $50.8 \pm 1.6 \text{ h}^{-1}$  and  $24.5 \pm 0.5 \text{ h}^{-1}$  respectively). It was reported that oxygen transfer is stimulated by cell consumption (Djelal et al., 2012) and so increases the  $K_L a$  value. The phenomenon observed in this study could be explained by the presence of biomass which negatively influenced aeration due to a reduction in the gas–liquid

interfacial area (a) as a result of the coalescence process (Joosten et al., 1977; Miyachi et al., 1981; Özbek and Gayik, 2000).

The oxygen consumption rate (OUR) of *S. bacillaris* SFL1 was  $-1.3\%O_2.h^{-1}$  for one million cells per milliliter. Considering the growth rate during the experiment, the dissolved oxygen in the grape juice was totally consumed in approximately 11 hours. Usually, studies focus on the impact of oxygen on the NS yeast growth and metabolite production. Regarding ethanol reduction, Tronchoni et al. (2017) used several *Metschnikowia pulcherrima* and *Torulaspora delbrueckii* strains in aerated sequential fermentation conditions. Aeration was carried out using compressed air at 0.01 VVM through submerged ceramic spargers for 4 days before the inoculation of *S. cerevisiae*. No data reported oxygen consumption, but this arbitrary aeration reduced the ethanol concentration to  $-0.88\%$  (v/v) with *M. pulcherrima* and  $-0.46\%$  (v/v) with *T. delbrueckii*, compared to fermentation with *S. cerevisiae* alone. In another study, Englezos et al. (2018) investigated the impact of oxygen addition and the combination of *S. bacillaris* with *S. cerevisiae* on microbial growth and metabolite production. A sequential fermentation with *S. bacillaris* inoculated at  $5 \times 10^6$  cells/mL was carried out and two days later *S. cerevisiae* was inoculated at the same concentration. In this study, a Barbera must containing 246.4 g/L sugars and 130 mg/L of YAN was used. Samples were micro-oxygenated with a flow rate of 10 mg/min oxygen for 10 min at 24 and 48h after yeast inoculation. A reduction of ethanol of  $-1\%$  (v/v) was obtained with this method. From this comparison and the studies presented in Table 1, the use of an aeration in sequential fermentation is generally arbitrary (Contreras et al., 2015).

However, it appears that aeration during the first stage of sequential fermentation is necessary to improve ethanol reduction in wine. In this work, the determination of the  $K_L a_{max}$  value allowed determining the agitation and aeration parameters leading to the maximum oxygen transfer rate. On the basis of this data and to minimize the production of acetic acid (Contreras et al., 2015; Tronchoni et al., 2017), only the parameters defined by  $\frac{1}{2} K_L a_{max}$  were conserved (400 rpm/0.5 VVM) in sequential fermentation at the laboratory bioreactor scale. In a previous study (Gobert et al., 2017), we showed that in pure culture in static condition in the same grape juice, *S. bacillaris* SFL1 (named BBMV5FA17 in the latter article) reached a biomass  $\sim 10^8$  cells/mL in stationary phase. The results showed here that oxygen addition promoted the growth of the *S. bacillaris* SFL1 by increasing its maximum biomass ( $\sim 8 \times 10^8$  cells/mL). In contrast to the study of Englezos et al. (2018), strong aeration during the first stage of sequential fermentation had no effect on the persistence of *S. bacillaris* SFL1 mixed with *S. cerevisiae* SLM. Indeed, in our previous study *S. bacillaris* SFL1 cultivability remained stable until the end of static sequential fermentation (Erlenmeyer closed with

carded cotton). From these data, it seems that strong aeration of *S. bacillaris* significantly promoted biomass formation. On the contrary, only restricted aeration allowed *S. bacillaris* to persist throughout fermentation. Similar results were reported in mixed fermentation with *T. delbrueckii*, *M. pulcherrima* and *L. thermotolerans* coupled with *S. cerevisiae*. The authors showed that oxygen availability strongly influenced population dynamics, although clear species-dependent differences were observed. *L. thermotolerans* required the least oxygen, followed by *T. delbrueckii* and *M. pulcherrima* (Shekhawat et al., 2016). In addition to the effect of oxygen, the persistence of *S. bacillaris* SFL1 at the bioreactor scale until the end of sequential fermentation showed the tolerance of this strain to ethanol concentrations higher than 13% (v/v), which is in agreement with previous reports (Tofalo et al., 2012; Englezos et al., 2015, 2018b).

Recently the implication of nitrogen in sequential fermentation to reduce ethanol content in wine was considered (Varela and Varela, 2019). The authors reported that the production of certain off-flavors was related to amino acid metabolism and it has been suggested that supplementation with carefully formulated nitrogen sources could be used to reduce their formation. However, nitrogen addition can be necessary to cover the needs of *S. cerevisiae* in the second part of sequential fermentation to avoid sluggish or stopped fermentation. Like aeration, nitrogen addition is generally arbitrary (Padilla et al., 2017; Tronchoni et al., 2017). Indeed, few data are available on YAN preferentially assimilated by NS yeasts during the first part of sequential fermentation. Therefore, the impact of a nitrogen source added during the fermentation on the development of *S. cerevisiae* and the volatile compounds produced are currently unclear (Gobert et al., 2019). Our results showed that during the first 24h of fermentation *S. bacillaris* SFL1 consumed 275 mgN/L out of the 295 mgN/L initially present. It seems that YAN consumption was strongly influenced by aeration. In a previous study (Gobert et al., 2017), we showed that after three days of static fermentation with *S. bacillaris*, SFL1 215 mgN/L of the 450 mgN/L initially present was consumed. The higher consumption could be correlated with the higher biomass produced in aerated sequential fermentation. However, the quality of the YAN sources assimilated were significantly different. For example, the consumption of arginine and ammonium, the two main sources (in concentration) were limited in static fermentation whereas their consumption was almost total in aerated sequential fermentation. Thus, like temperature (Gobert et al., 2017), oxygen is implicated in the regulation of YAN assimilation in *S. bacillaris* SFL1. Interestingly, in semi-anaerobic conditions at 25°C with continuous stirring (300 rpm), Englezos et al. (2018) reported that the main characteristic feature of *S. bacillaris* was its low assimilation of amino acids during fermentation, compared with ammonium, which was entirely consumed in the study. In addition, the concentrations of several amino acids did not vary throughout fermentation, while certain other amino acids were produced, such as alanine, glutamic

acid, glycine, leucine and valine (Englezos et al., 2018a). However, the authors specified that this observation was made only for some strains. Up to now, no similar results have been observed with *S. bacillaris* SFL1. This suggests that the quantity and quality of the YAN sources consumed by *S. bacillaris* are strain-specific in addition to the influence of abiotic factors.

The concentration of YAN sources 24h after inoculation of *S. bacillaris* SFL1 at the laboratory bioreactor scale imposed the addition of nitrogen for *S. cerevisiae* SLM growth. Previous tests showed that the addition of an inorganic nitrogen source such as ammonium sulfate salt was not sufficient to finish fermentation and that a significant concentration of volatile acidity was produced (data not shown). In 2017, Fairbairn et al. showed that ammonium was not the best nitrogen source for *S. cerevisiae* on the basis of biomass formation, exponential growth rate, lag phase and fermentation time. These authors identified arginine, glutamine and glutamic acid as a pool of amino acids with high performance for the four parameters cited previously (Fairbairn et al., 2017). Moreover, the results of the study showed that ammonium is one of the YAN sources implicated in high levels of acetic acid production. Nevertheless, to complete the amino acid nitrogen source, the choice made to add an ammonium nitrogen source such as ammonium sulfate salt, in agreement with many studies describing ammonium as a preferential source (Grenson, 1992; Henschke and Jiranek, 1993; Jiranek et al., 1995; Görgens et al., 2005; Boer et al., 2006; Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012; Brice et al., 2014, 2018; Tesnière et al., 2015). It was reasonable to assume that other essential nutrients for *S. cerevisiae* SLM were consumed by *S. bacillaris* SFL1 during the first part of the sequential fermentation. In particular, lipids play a key role in maintaining membrane integrity and viability during alcoholic fermentation. Tesnière et al. (2013) evaluated the consequences of nutritional lipid/nitrogen imbalances on wine yeast survival during alcoholic fermentation. The sterol used in this study was ergosterol, the main sterol found in *S. cerevisiae*. The authors showed that yeast cell death during lipid-limited fermentation was strongly influenced by the nitrogen content of the medium, high nitrogen availability leading to high cell death rates. Several amino acids were implicated as toxic precursors: arginine, glutamic acid, and glutamine (the same used in the growth factor mix). During the second part of sequential fermentation, *S. cerevisiae* SLM was in anaerobic condition. However, oxygen is necessary in order to promote lipid (sterols and unsaturated fatty acids) synthesis (Andreasen and Stier, 1953; Fornairon-Bonnefond et al., 2003). That is why ergosterol was added to prevent lipid/nitrogen imbalances with amino acids described as toxic precursors. Vitamins were also added in the growth factor mix. Biotin is required by the urea carboxylase involved in the catabolism of arginine (Cooper, 1982). Thiamine (in the form of thiamine hydrochloride) is an essential cofactor for enzymes that decarboxylate  $\alpha$ -keto acids, including  $\alpha$ -

ketoglutarate dehydrogenase, branched-chain  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase, and transketolase, during amino acid and carbohydrate metabolism (Hohmann and Meacock, 1998).

Aeration control during the first stage of sequential fermentation and the addition of selected growth factors led to a decrease of ethanol content at the bioreactor scale of  $\sim 1.65\%$  (v/v). No stopped or sluggish fermentation was observed, and the level of volatile acidity was acceptable ( $0.35 \pm 0.05$  g/L). Scaling-up was carried out in an experimental winery on the basis of these results. Considering the dimensions of the tanks, experimental  $K_La$  determination was not conceivable. The theoretical equations for  $k_La$  prediction developed for stirred tanks exist (Garcia-Ochoa and Gomez, 2005). The mass transfer coefficient,  $k_L$ , was determined according to Higbie's penetration theory, for the description of the rate of mass transfer process in the continuous phase around the bubbles. Then, the specific interfacial area,  $a$ , was obtained from the theoretical expression for hydrodynamic parameters (gas hold-up and mean bubble size). The theoretical evaluation of  $K_La$  is therefore particularly delicate. The validation domain remains limited and the values of the validation debatable (Linek et al., 1987). For these reasons, it was decided to fix the oxygenation at 1 mg/L (set value), considering that the oxygen saturation of a must is about 7 at 8 mg/L of  $O_2$  (Englezos et al., 2018b) to bring enough oxygen to yeasts and limit must oxidation and volatile acidity production. Coupled with a regular flux homogenization, this first test in sequential fermentation in an enological context showed a decrease of  $\sim 1\%$  (v/v) in ethanol. Moreover, an acceptable concentration of volatile acidity was obtained ( $0.55 \pm 0.03$  g/L). This result confirms the efficiency of the protocol, although stronger oxygenation could lead to a more considerable decrease in ethanol. The growth curves in sequential and control fermentation in pilot scale were similar to the bioreactor scale. However, biomass production by both *S. bacillaris* SFL1 and *S. cerevisiae* SLM were higher at the pilot scale. Nutrient composition, oxygenation and tank geometry could explain this observation. Fermentation durations were similar for single cultures of *S. cerevisiae* at the bioreactor scale and in control fermentation at the pilot scale. For sequential fermentations, three more days were needed at the pilot scale. Nutrient composition, oxygenation and tank geometry could explain this observation. Interestingly, at the end of the experiment at the pilot scale a significant difference in pH value was observed ( $-0.16$  in sequential fermentation compared to control fermentation). Additional analysis showed that the concentrations of citric acid, lactic acid, malic acid, tartaric acid, calcium and potassium between sequential and control fermentations were not significantly different. The same conclusion was reported by Englezos et al. (2018), who hypothesized that the metabolic activity of *S. bacillaris* produced a significant quantity of  $\alpha$ -ketoglutaric and pyruvic acids (Magyar et al., 2014; Englezos et al., 2018b). This acidification could be exploited in winemaking, in

order to make more acidic wines in warm climate regions. This acidification can also improve microbiological stability at the end of the fermentation process.

The sensory analysis using the flash profile method showed significant differences between wines from sequential and control fermentations. Nevertheless, the distribution of the alcohol term (and the vocabulary of the same lexical field) in the MFA did not distinguish a correlation with a particular group of samples. This result is in agreement with the literature in which, unlike the panelists, consumers were unable to detect changes among wines with a 1% (v/v) difference in ethanol content (King and Heymann, 2014). Generally, alcohol reduction leads to a decrease in the perception of the number of aromas, persistence, strength and complexity of Syrah wines (Escudero et al., 2007; Goldner et al., 2009). However, it seemed that the complexity of wines from sequential fermentation (samples with the least alcohol) was not affected and was even improved. In 2009, Goldner et al. evaluated the sensory profiles of 23 monovarietal Malbec wines related to the headspace composition of aromas at two levels of ethanol (10–12 to 14.5–17.2% (v/v)). The results showed that samples with a high level of ethanol (14.5–17.2% (v/v)) were described as herbaceous instead of fruity, a trait that was perceived at low ethanol levels (Goldner et al., 2009). To a lesser extent, our results obtained from control fermentation (samples with the most alcohol (14.36% (v/v))) were correlated with vegetal/herbaceous descriptors. Wines obtained from sequential fermentation (13.35% (v/v)) were correlated with red berry and exotic fruits descriptors. Nevertheless, the ethanol effect on aroma profiles taken alone could not explain the aromatic difference.

In 2017, we showed that sequential inoculation greatly affects nitrogen availability at the time of inoculation with *S. cerevisiae* SLM. The YAN consumed by *S. bacillaris* SFL1 are not subsequently available to *S. cerevisiae* SLM, and this may affect the concentrations of the volatile compounds generated from these amino acids. Leucine, the precursor of isoamyl acetate in *S. cerevisiae* (Hazelwood et al., 2008) was rapidly consumed by *S. bacillaris* SFL1 during the first stage of fermentation. *S. bacillaris* has been shown to produce only small amounts of isoamyl acetate (Sadoudi et al., 2012). Thus, without its precursor the production of isoamyl acetate by *S. cerevisiae* is limited. The contrast between sequential and control fermentation regarding amylic/banana descriptors could be explained by this fact. However, recent studies have suggested that YAN plays a minor role in the production of volatile compounds (Crépin et al., 2017; Rollero et al., 2017). A significant difference was also observed for higher alcohols, in particular for 2-phenylethanol. The concentration in control fermentation was approximately four times higher than in sequential fermentation. In the literature, the production of 2-phenylethanol is variable depending on the studies considered. For some of them, in the presence of *S. bacillaris* (mixed or sequential

fermentation) the production of 2-phenylethanol was improved (Andorrà et al., 2012; Englezos et al., 2016b, 2018c), whereas in the study of Englezos et al. (2018), it decreased. The use of different strains and/or fermentation conditions (such as grape variety, temperature, pH, YAN, lipids etc.) may explain these differences. It was demonstrated that *S. bacillaris* produced significantly more terpenols than *S. cerevisiae* (Sadoudi et al., 2012; Rolle et al., 2017). Here, the concentration in terpenols in sequential fermentation was approximately three times higher than in control fermentation. This result was in contradiction with the study of Rolle et al. (2017) in which no difference was observed in sequential fermentation and a pure culture of *S. cerevisiae* but in agreement with that of Sadoudi et al. (2012). In addition to positive or negative interactions, the use of different strains and/or fermentation conditions could also have been involved in this case.

### 3.8. Conclusion

The use of a bioreactor at the laboratory scale provided better insight into the oxygen needs of *S. bacillaris*. To our knowledge,  $K_La$  used as landmark in the enological context applied to sequential fermentation has never been considered before. Reasoned oxygenation led to a significant decrease of ethanol ( $\sim$ -1.65 % v/v) with reasonable volatile acidity production (0.28 g/L). The results showed that several nutrients were consumed during the first part of the sequential fermentation by *S. bacillaris*, involving a the addition of multiple growth factors to fulfil the needs of *S. cerevisiae*. The choice of nutrients referred to the recent bibliography and confirmed that specific supplementation is necessary. The development of the process at the laboratory scale was adapted to the pilot scale. The results showed a decrease of  $\sim$ -1% (v/v) without organoleptic deviation, which confirmed the proof of concept. Nevertheless, to complete the control of the process further studies focusing on the timing of the addition of the NS yeast in industrial application (during harvest, before racking, after racking etc.), the implantation of *S. bacillaris* in the must, the behavior of the strain with other NS yeasts and the consequences of using another matrix appear necessary.



## Conclusions et Perspectives

---

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse portaient sur l'étude des besoins en azote des levures non-*Saccharomyces* et de leur impact sur les fermentations séquentielles. Deux grandes familles de levures sont distinguées en œnologie, les levures non-*Saccharomyces* (NS) et *S. cerevisiae*. Généralement, la diversité des levures NS est importante en début de fermentation puis *S. cerevisiae* devient la levure majoritaire (Albergaria and Arneborg, 2016). Ainsi, *S. cerevisiae* a été intensément étudiée depuis plusieurs décennies.

Cependant, il est apparu que l'implication de l'azote aussi bien d'un point de vue physiologique qu'au niveau de la production des composés volatils suite à une supplémentation n'était pas clairement établie. Il a alors été choisi de consacrer le premier chapitre de cette thèse à une analyse bibliographique en abordant le sujet d'un point de vue œnologique. Une liste de sources en YAN « préférentielles » ou « non préférentielles » a été établie à la fois chez les levures NS et *S. cerevisiae*. L'analyse de cette liste montre clairement que ce concept est remis en cause car en fonction des conditions de croissance et de la souche utilisée, les résultats peuvent être contradictoires. Une uniformisation de la méthode de détermination des sources en YAN préférentielles doit être envisagée. Puis il faudrait évaluer si un effet souche-dépendant existe (Eder et al., 2018) et si un regroupement possible de souches peut s'expliquer par une pression environnementale (nature de la matrice, niveau de maturité, itinéraires œnologiques suivis, ...) Toutes ces questions amènent à la problématique de l'ajout d'azote assimilable exogène dans le moût. De nombreuses sources (sels d'ammonium, acides aminés) et de moments d'ajout (avant fermentation, pendant la phase stationnaire) sont préconisés. Ces préconisations sont basées sur les paramètres fermentaires (formation de biomasse, vitesse de croissance, temps de fermentation, vitesse de fermentation). Mais il apparaît une grande variabilité, confortant l'idée de mettre au point ici aussi une nouvelle méthode de détermination de l'impact de la source azotée et le moment de l'ajout sur les paramètres fermentaires. Le même constat peut être fait vis-à-vis de l'impact d'un ajout d'azote assimilable sur la production des composés volatils. Une analyse bibliographique des changements du transcriptome a d'ailleurs montré que suite à l'ajout d'azote assimilable, la surexpression des gènes impliqués dans la synthèse des composés volatils n'avait pas lieu (Mendes-Ferreira et al., 2007; Conway et al., 2012; Barbosa et al., 2015; Liu et al., 2017; Tesnière et al., 2017). Cette étude bibliographique ouvre donc de nouvelles perspectives de recherche. Une approche multiparamétrique paraît essentielle puisqu'il a été démontré que le métabolisme de l'azote est interconnecté avec d'autres voies (lipidiques, vitaminiques).

L'intérêt des levures NS en œnologie est récent. Plusieurs levures NS sont déjà commercialisées avec pour principales applications d'améliorer le profil aromatique des vins (Soden et al., 2000; Azzolini et

al., 2014; Liu et al., 2016; Tofalo et al., 2016), de réduire l'utilisation des sulfites (Simonin et al., 2018) ou encore de réduire la concentration en éthanol dans les vins (Contreras et al., 2014b, 2015; Englezos et al., 2015; Rolle et al., 2017). Or l'utilisation des levures NS dans ces domaines d'applications lors du processus de vinification implique de nouvelles problématiques. En effet, certains nutriments présents dans le moût vont être consommés avant que *S. cerevisiae* soit inoculée ou devienne majoritaire. Ceci augmente ainsi le risque de carence nutritionnelle envers *S. cerevisiae* qui reste indispensable à la réalisation de la fermentation alcoolique. Cette carence peut se traduire par une fermentation languissante ou même un arrêt de la fermentation. Parmi ces nutriments, l'azote assimilable est essentiel aux levures dans la réalisation de la fermentation alcoolique (Bell and Henschke, 2005).

C'est pourquoi, la deuxième partie de cette thèse a permis de caractériser les besoins en azote assimilable (YAN) de plusieurs levures NS d'intérêt. Les résultats ont montré que l'implication des levures NS vis-à-vis de la compétition pour les sources azotées avec *S. cerevisiae* était significative. En sachant qu'une carence en azote assimilable peut conduire à une fermentation languissante (Alexandre and Charpentier, 1998), l'utilisation des levures NS commerciales ou indigènes doit être maîtrisée. Il est clair que suivant les conditions de fermentation les sources en YAN, aussi bien d'un point de vue quantitatif que qualitatif, consommées par les levures NS vont être impactées. Certaines sources azotées sont préférentiellement assimilées par chacune des souches de levure NS testées. Afin de mieux comprendre les mécanismes de régulations impliqués lors d'une fermentation séquentielle, une première étude du niveau de transcription de gènes déjà bien décrits chez *S. cerevisiae* impliqués dans la régulation des YAN (*MEPs*, *GAP1*) pourrait être envisagée. Puis à plus grande échelle, une étude transcriptomique en utilisant le RNA-Seq permettrait de mettre en évidence l'impact de ces co-fermentations sur l'expression de l'ensemble des gènes connus impliqués dans la régulation de l'azote chez *S. cerevisiae*. Dans une même approche, une étude métabolomique au cours d'une fermentation séquentielle permettrait de suivre l'évolution de l'ensemble des métabolites et d'identifier si certains composés sont impliqués dans le métabolisme de l'azote. Enfin, la nature des interactions vis-à-vis de l'azote pourrait être étudiée en réalisant des fermentations compartimentées afin d'identifier si des phénomènes de cell-cell contact sont impliqués.

L'identification de ces sources préférentielles pourrait également permettre la mise au point de nutriments azotés spécifiques répondant aux besoins de la souche dans le cas d'une carence dans le moût. En effet, l'utilisation généralisée de sels d'ammonium pour supplémer les moûts peut conduire à la production de composés indésirables déjà décrite chez *S. cerevisiae* (Torrea et al., 2011;

Martínez-Moreno et al., 2014). De plus, Fairbairn et collaborateurs (2017) ont montré que d'autres sources en YAN pouvaient s'avérer être plus performantes d'un point de vue œnologique. Néanmoins, il n'existe pour le moment aucunes données sur l'impact d'une supplémentation azotée sur le comportement des levures NS aussi bien d'un point de vue physiologique qu'œnologique. Ainsi, une première étude du « fitness » de plusieurs souches de levures NS avec une supplémentation azotée pourrait être entreprise. Cela permettrait de mettre en évidence à la fois l'impact de la source en azote ajoutée sur la vitesse de croissance et de fermentation ainsi que de comparer le comportement des différentes levures NS à cet ajout.

Dans cette deuxième partie, il a également été montré que la compétition pour les sources azotées entre les levures NS et *S. cerevisiae* pouvait être à l'origine de certains changements vis-à-vis de la production de composés volatils par *S. cerevisiae*. Cette observation pourrait expliquer en partie l'origine des changements des profils aromatiques des vins produits en fermentation séquentielle ou mixte. Ce dernier point reste à discuter puisque récemment des études ont montré que l'implication des YAN ne serait pas directe dans la formation des composés volatils (Crépin et al., 2017; Rollero et al., 2017). A ce jour, il reste donc des mécanismes inconnus impliquant les YAN et la formation des composés volatils notamment lorsque les sources en YAN sont multiples. Une approche globale de génomique puis de transcriptomique dans le cadre d'une fermentation en milieu synthétique, corrélée aux profils des composés volatils, pourrait apporter une première piste quant aux voies de biosynthèses impliquées.

Les deux premiers chapitres de cette thèse ont activement permis d'aboutir à une stratégie pour la mise au point d'un nouveau procédé biotechnologique de réduction de la teneur en éthanol dans le vin. A partir de la bibliographie et de plusieurs étapes de screening, la levure *Starmerella bacillaris* s'est avérée être la meilleure candidate pour réduire la concentration en éthanol dans le cadre d'une fermentation séquentielle. L'oxygénation durant la première partie de la fermentation s'est montrée essentielle. Cette oxygénation a impliqué la formation plus importante de biomasse de *S. bacillaris* qui a consommé la majeure partie de l'azote assimilable et probablement d'autres nutriments. Pour pallier une carence pour *S. cerevisiae* (qui reste essentielle dans ce procédé puisque *S. bacillaris* seule ne peut pas terminer la fermentation), la mise au point d'une solution de facteurs de croissance a été nécessaire. En effet, un ajout seul de sulfate d'ammonium ne permettait pas de pallier une fermentation languissante. La mise au point de cette solution a pu se faire à l'aide des connaissances acquises lors du chapitre 1 et 2 au cours desquels les connaissances des besoins des souches en azote et les relations entre les différentes voies métaboliques ont été déterminantes. L'utilisation de bioréacteurs afin de maximiser le transfert d'oxygène a permis de diminuer la concentration en

éthanol de 1,65 % v/v avec une teneur acceptable en acidité volatile. Cette méthode a par la suite été transférée à l'échelle semi-industrielle. Pour la première fois, une diminution de 1% v/v avec une concentration acceptable en acidité volatile a été obtenue à cette échelle. Une analyse sensorielle a confirmé la bonne qualité du vin, avec une corrélation plus importante des descripteurs « positifs » vis-à-vis des vins réalisés à l'aide du procédé. Avant industrialisation de ce procédé, un certain nombre de paramètres restent encore à être vérifiés, notamment la résistance de la souche aux sulfites, l'impact d'un séchage de la levure sur son comportement fermentaire, la maîtrise des niveaux de population des levures indigènes dans le moût. D'un point de vue technologique, le développement d'un procédé de macro-oxygénation dynamique en cuve industrielle reste à être réalisé.



## Bibliographie

---

- Adams, C., and van Vuuren, H. J. J. (2010). Effect of timing of diammonium phosphate addition to fermenting grape must on the production of ethyl carbamate in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 61, 125–129.
- Aguilera, F., Peinado, R. A., Millán, C., Ortega, J. M., and Mauricio, J. C. (2006). Relationship between ethanol tolerance, H<sup>+</sup>-ATPase activity and the lipid composition of the plasma membrane in different wine yeast strains. *Int. J. Food Microbiol.* 110, 34–42. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.02.002.
- Albergaria, H., and Arneborg, N. (2016). Dominance of *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation processes: role of physiological fitness and microbial interactions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 2035–2046. doi:10.1007/s00253-015-7255-0.
- Albers, E., Larsson, C., Lidén, G., Niklasson, C., and Gustafsson, L. (1996). Influence of the nitrogen source on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3187–95. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=168115&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Alexandre, H., and Charpentier, C. (1998). Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 20, 20–27. doi:10.1038/sj.jim.2900442.
- Alonso-del-Real, J., Lairon-Peris, M., Barrio, E., and Querol, A. (2017). Effect of temperature on the prevalence of *Saccharomyces non cerevisiae* species against a *S. cerevisiae* Wine strain in wine fermentation: Competition, physiological fitness, and influence in final wine composition. *Front. Microbiol.* 8. doi:10.3389/fmicb.2017.00150.
- Andorrà, I., Berradre, M., Mas, A., Esteve-Zarzoso, B., and Guillamón, J. M. (2012). Effect of mixed culture fermentations on yeast populations and aroma profile. *LWT - Food Sci. Technol.* 49, 8–13. doi:10.1016/j.lwt.2012.04.008.
- Andorrà, I., Berradre, M., Rozès, N., Mas, A., Guillamon, J. M., and Esteve-Zarzoso, B. (2010). Effect of pure and mixed cultures of the main wine yeast species on grape must fermentations. *Eur. Food Res. Technol.* 231, 215–224. doi:10.1007/s00217-010-1272-0.
- Andreasen, A. A., and Stier, T. J. B. (1953). Anaerobic nutrition of *Saccharomyces cerevisiae*. I. Ergosterol requirement for growth in a defined medium. *J. Cell. Comp. Physiol.* 41, 23–36. doi:10.1002/jcp.1030410103.
- Andréasson, C., and Ljungdahl, P. O. (2004). The N-terminal regulatory domain of Stp1p is modular

- and, fused to an artificial transcription factor, confers full Ssy1p-Ptr3p-Ssy5p sensor control. *Mol. Cell. Biol.* 24, 7503–7513. doi:10.1128/MCB.24.17.7503-7513.2004.
- Anfang, N., Brajkovich, M., and Goddard, M. R. (2009). Co-fermentation with *Pichia kluyveri* increases varietal thiol concentrations in sauvignon blanc. *Aust. J. Grape Wine Res.* 15, 1–8. doi:10.1111/j.1755-0238.2008.00031.x.
- Ansell, R., Granath, K., Hohmann, S., M.Thevelein, J., and Adler, L. (1997). The two isoenzymes for yeast NAD<sup>+</sup>-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by GPD1 and GPD2 have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. *EMBO J.* 16, 2179–2187.
- Arias-Gil, M., Garde-Cerdán, T., and Ancín-Azpilicueta, C. (2007). Influence of addition of ammonium and different amino acid concentrations on nitrogen metabolism in spontaneous must fermentation. *Food Chem.* 103, 1312–1318. doi:10.1016/j.foodchem.2006.10.037.
- Arikawa, Y., Enomoto, K., Muratsubaki, H., and Okazaki, M. (1998). Soluble fumarate reductase isoenzymes from *Saccharomyces cerevisiae* are required for anaerobic growth. *FEMS Microbiol. Lett.* 165, 111–116. doi:10.1111/j.1574-6968.1998.tb13134.x.
- Azzolini, M., Tosi, E., Lorenzini, M., Finato, F., and Zapparoli, G. (2014). Contribution to the aroma of white wines by controlled *Torulaspora delbrueckii* cultures in association with *Saccharomyces cerevisiae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 31, 277–293. doi:10.1007/s11274-014-1774-1.
- Backhus, L. E., DeRisi, J., Brown, P. O., and Bisson, L. F. (2001). Functional genomic analysis of a commercial wine strain of *Saccharomyces cerevisiae* under differing nitrogen conditions. *FEMS Yeast Res.* 1, 111–125. doi:10.1016/S1567-1356(01)00019-8.
- Bakker, B. M., Overkamp, K. M., Van Maris, A. J. A., Kötter, P., Luttik, M. A. H., Van Dijken, J. P., et al. (2001). Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 15–37. doi:10.1016/S0168-6445(00)00039-5.
- Bandyopadhyay, B., Humphrey, A. E., and Taguchi, H. (1967). Dynamic measurement of the volumetric oxygen transfer coefficient in fermentation systems. *Biotechnol. Bioeng.* 9, 533–544. doi:10.1002/bit.260090408.
- Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., and Loureiro, V. (2012). The microbial ecology of wine grape berries. *Int. J. Food Microbiol.* 153, 243–259. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.025.
- Barbosa, C., Falco, V., Mendes-Faia, A., and Mendes-Ferreira, A. (2009). Nitrogen addition influences formation of aroma compounds, volatile acidity and ethanol in nitrogen deficient media

- fermented by *Saccharomyces cerevisiae* wine strains. *J. Biosci. Bioeng.* 108, 99–104. doi:10.1016/j.jbiosc.2009.02.017.
- Barbosa, C., García-Martínez, J., Pérez-Ortín, J. E., and Mendes-Ferreira, A. (2015). Comparative transcriptomic analysis reveals similarities and dissimilarities in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains response to nitrogen availability. *PLoS One* 10. doi:10.1371/journal.pone.0122709.
- Barbosa, C., Mendes-Faia, A., and Mendes-Ferreira, A. (2012). The nitrogen source impacts major volatile compounds released by *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 160, 87–93. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.10.003.
- Beauvoit, B., Rigoulet, M., Bunoust, O., Raffard, G., Canioni, P., and Guérin, B. (1993). Interactions between glucose metabolism and oxidative phosphorylations on respiratory-competent *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Eur. J. Biochem.* 214, 163–172. doi:10.1111/j.1432-1033.1993.tb17909.x.
- Bell, A. A., Ough, C. S., and Kliewer, W. M. (1979). Effects on must and wine composition, rates of fermentation, and wine quality of nitrogen fertilization of *Vitis vinifera* Var. Thompson Seedless Grapevines. *Am. J. Enol. Vitic.* 30, 124–129. Available at: <http://www.ajevonline.org/content/30/2/124.short>.
- Bell, S. J., and Henschke, P. a (2005). Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* 11, 242–295. doi:10.1111/j.1755-0238.2005.tb00028.x.
- Bell, S. J., and Robson, A. (1999). Effect of nitrogen fertilization on growth, canopy density, and yield of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon. *Am. J. Enol. Vitic.* 50, 351–358.
- Beltran, G., Esteve-Zarzoso, B., Rozès, N., Mas, A., and Guillamon, J. M. (2005). Influence of the timing of nitrogen additions during synthetic grape must fermentations on fermentation kinetics and nitrogen consumption. *J. Agric. Food Chem.* 53, 996–1002. doi:10.1021/jf0487001.
- Beltran, G., Rozès, N., Mas, A., and Guillamón, J. M. (2006). Effect of low-temperature fermentation on yeast nitrogen metabolism. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 809–815. doi:10.1007/s11274-006-9302-6.
- Belviso, S., Bardi, L., Bartolini, A. B., and Marzona, M. (2004). Lipid nutrition of *Saccharomyces cerevisiae* in winemaking. *Can. J. Microbiol.* 50, 669–674. doi:10.1139/w04-051.
- Bely, M., Rinaldi, A., and Dubourdieu, D. (2003). Influence of physiological state of inoculum on volatile acidity production by *Saccharomyces cerevisiae* during high sugar fermentation. *J. Int.*

- des Sci. la Vigne du Vin* 39, 191–197. doi:10.1016/S1389-1723(04)70141-3.
- Bely, M., Sablayrolles, J.-M., and Barre, P. (1990). Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions. *J. Ferment. Bioeng.* 70, 246–252. doi:10.1016/0922-338X(90)90057-4.
- 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.
- Ben-Hassan, R. M., Ghaly, A. E., and Mansour, M. H. (1991). A microcomputer-based oxygen measurement and control system for fermentation processes. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 30, 247–263. doi:10.1007/BF02922029.
- Bisson, L. F. (1999). Stuck and sluggish fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 50, 107–119.
- Björkqvist, S., Ansell, R., Adler, L., Lidén, G., and Bjo, S. (1997). Physiological response to anaerobicity of glycerol-3-phosphate dehydrogenase mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. 63, 128–132.
- Boer, V. M., Tai, S. L., Vuralhan, Z., Arifin, Y., Walsh, M. C., Piper, M. D. W., et al. (2006). Transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* to preferred and nonpreferred nitrogen sources in glucose-limited chemostat cultures. *FEMS Yeast Res.* 7, 604–620. doi:10.1111/j.1567-1364.2007.00220.x.
- Bogard, K., and Bisson, L. (2006). Persistence of vegetal characters in winegrapes and wine. *Pract. Winer. Vineyard Mag. March/April*. Available at: <https://www.practicalwinery.com/marapr06p13.htm> [Accessed February 14, 2018].
- Bohlscheid, J. C., Fellman, J. K., Wang, X. D., Ansen, D., and Edwards, C. G. (2007). The influence of nitrogen and biotin interactions on the performance of *Saccharomyces* in alcoholic fermentations. *J. Appl. Microbiol.* 102, 390–400. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03180.x.
- Boulton, R. ., Singleton, V. ., Bisson, L. ., and Kunkee, R. . (1996). Principles and practices of winemaking. doi:10.1007/978-1-4615-1781-8.
- Bouzas-Cid, Y., Díaz-Losada, E., Trigo-Córdoba, E., Falqué, E., Orriols, I., Garde-Cerdán, T., et al. (2017). Effects of irrigation over three years on the amino acid composition of Albariño (*Vitis vinifera* L) musts and wines in two different terroirs. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 227, 313–325. doi:10.1016/j.scienta.2017.05.005.
- Bredie, W. L. P., Liu, J., Dehlholm, C., and Heymann, H. (2018). Flash Profile Method. *Descr. Anal.*

*Sens. Eval.*, 513–533. doi:10.1002/9781118991657.ch14.

- Brice, C., Cubillos, F. A., Dequin, S., Camarasa, C., and Martínez, C. (2018). Adaptability of the *Saccharomyces cerevisiae* yeasts to wine fermentation conditions relies on their strong ability to consume nitrogen. *PLoS One* 13, 1–20. doi:10.1371/journal.pone.0192383.
- Brice, C., Sanchez, I., Tesnière, C., and Blondin, B. (2014). Assessing the mechanisms responsible for differences between nitrogen requirements of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts in alcoholic fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 1330–1339. doi:10.1128/AEM.03856-13.
- Bruinenberg, P. (1986). The NADP (H) redox couple in yeast metabolism. 52, 411–429. doi:10.1007/BF00393469.
- Bruinenberg, P. M., van Dijken, J. P., and Scheffers, W. A. (1983). An enzymic analysis of NADPH production and consumption in *Candida utilis*. *J. Gen. Microbiol.* 129, 965–971. doi:10.1099/00221287-129-4-965.
- Bunoust, O., Devin, A., Averet, N., Camougrand, N., and Rigoulet, M. (2005). Competition of Electrons to Enter the Respiratory Chain: a new regulatory mechanism of oxidative metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 280, 3407–3413. doi:10.1074/jbc.M407746200.
- Butzke, C. E. (1998). Survey of yeast assimilable nitrogen status in musts from California, Oregon, and Washington. *Am. J. Enol. Vitic.* 49, 220–224.
- Camarasa, C., Grivet, J. P., and Dequin, S. (2003). Investigation by <sup>13</sup>C-NMR and tricarboxylic acid (TCA) deletion mutant analysis of pathways of succinate formation in *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic fermentation. *Microbiology* 149, 2669–2678. doi:10.1099/mic.0.26007-0.
- Canonico, L., Comitini, F., Oro, L., and Ciani, M. (2016). Sequential fermentation with selected immobilized non-*Saccharomyces* yeast for reduction of ethanol content in wine. *Front. Microbiol.* 7. doi:10.3389/fmicb.2016.00278.
- Canoura, C., Kelly, M. T., and Ojeda, H. (2017). Effect of irrigation and timing and type of nitrogen application on the biochemical composition of *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay and Syrah grapeberries. *Food Chem.* 241, 171–181. doi:10.1016/j.foodchem.2017.07.114.
- Capozzi, V., Garofalo, C., Chiriatti, M. A., Grieco, F., and Spano, G. (2015). Microbial terroir and food innovation: The case of yeast biodiversity in wine. *Microbiol. Res.* 181, 75–83. doi:10.1016/j.micres.2015.10.005.
- Carrasco, P., Pérez-Ortín, J. E., and Del Olmo, M. (2003). Arginase activity is a useful marker of

- nitrogen limitation during alcoholic fermentations. *Syst. Appl. Microbiol.* 26, 471–479. doi:10.1078/072320203322497518.
- Carrau, F. M., Medina, K., Farina, L., Boido, E., Henschke, P. A., and Dellacassa, E. (2008). Production of fermentation aroma compounds by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts: Effects of yeast assimilable nitrogen on two model strains. *FEMS Yeast Res.* 8, 1196–1207. doi:10.1111/j.1567-1364.2008.00412.x.
- Casal, M., Paiva, S., Queirós, O., and Soares-Silva, I. (2008). Transport of carboxylic acids in yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 974–94. doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00128.x.
- Cejudo-Bastante, M. J., Sonni, F., Chinnici, F., Versari, A., Perez-Coello, M. S., and Riponi, C. (2010). Fermentation of sulphite-free white musts with added lysozyme and oenological tannins: Nitrogen consumption and biogenic amines composition of final wines. *LWT - Food Sci. Technol.* 43, 1501–1507. doi:10.1016/j.lwt.2010.02.011.
- Cheng, Y., Du, Z., Zhu, H., Guo, X., and He, X. (2016). Protective effects of arginine on *Saccharomyces cerevisiae* against ethanol stress. *Sci. Rep.* 6, 1–12. doi:10.1038/srep31311.
- Chiciuc, I., Farines, V., Mietton-Peuchot, M., and Devatine, A. (2010). Effect of wine properties and operating mode upon mass transfer in micro-oxygenation. *Int. J. Food Eng.* 6, Article 9. doi:10.2202/1556-3758.1770.
- Choudhary, V., and Schneiter, R. (2012). Pathogen-Related Yeast (PRY) proteins and members of the CAP superfamily are secreted sterol-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 16882–16887. doi:10.1073/pnas.1209086109.
- Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., and Domizio, P. (2010). Controlled mixed culture fermentation: A new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Res.* 10, 123–133. doi:10.1111/j.1567-1364.2009.00579.x.
- Ciani, M., Morales, P., Comitini, F., Tronchoni, J., Canonico, L., Curiel, J. A., et al. (2016). Non-conventional yeast species for lowering ethanol content of wines. *Front. Microbiol.* 7, 1–13. doi:10.3389/fmicb.2016.00642.
- Clemente-Jimenez, J. M., Mingorance-Cazorla, L., Martínez-Rodríguez, S., Las Heras-Vázquez, F. J., and Rodríguez-Vico, F. (2005). Influence of sequential yeast mixtures on wine fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 98, 301–308. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.06.007.
- Coleman, M. C., Fish, R., and Block, D. E. (2007). Temperature-dependent kinetic model for nitrogen-

- limited wine fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5875–5884. doi:10.1128/AEM.00670-07.
- Colombié, S., Malherbe, S., and Sablayrolles, J. M. (2005). Modeling alcoholic fermentation in enological conditions: Feasibility and interest. *Am. J. Enol. Vitic.* 56, 238–245.
- Combina, M., Elorza, A., Mercado, L., Catania, C., Ganga, A., and Martinez, C. (2005). Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. *Int. J. Food Microbiol.* 99, 237–243. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.08.017.
- Conner, J. M., Birkmyre, L., Paterson, A., and Piggott, J. R. (1998). Headspace concentrations of ethyl esters at different alcoholic strengths. *J. Sci. Food Agric.* 77, 121–126. doi:10.1002/(SICI)1097-0010(199805)77:1<121::AID-JSFA14>3.0.CO;2-V.
- Conradie, W. J. (2001). Timing of nitrogen fertilisation and the effect of poultry manure on the performance of grapevines on sandy soil. Soil analysis , grape yield and vegetative growth. *S. Afr. J. Enol. Vitic* 22, 53–59.
- Contreras, A., Curtin, C., and Varela, C. (2014a). Yeast population dynamics reveal a potential collaboration between *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum* for the production of reduced alcohol wines during Shiraz fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 1885–1895. doi:10.1007/s00253-014-6193-6.
- Contreras, A., Hidalgo, C., Henschke, P. A., Chambers, P. J., Curtin, C., and Varela, C. (2014b). Evaluation of non-*Saccharomyces* yeasts for the reduction of alcohol content in wine. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 1670–1678. doi:10.1128/AEM.03780-13.
- Contreras, A., Hidalgo, C., Schmidt, S., Henschke, P. A., Curtin, C., and Varela, C. (2015). The application of non-*Saccharomyces* yeast in fermentations with limited aeration as a strategy for the production of wine with reduced alcohol content. *Int. J. Food Microbiol.* 205, 7–15. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.027.
- Conway, M. K., Grunwald, D., and Heideman, W. (2012). Glucose, nitrogen, and phosphate repletion in *Saccharomyces cerevisiae* : Common transcriptional responses to different nutrient signals. *G3&#58; Genes/Genomes/Genetics* 2, 1003–1017. doi:10.1534/g3.112.002808.
- Cooper, T. G. (1982). Nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. doi:10.1101/087969180.11B.39.
- Cordero-Bueso, G., Esteve-Zarzoso, B., Cabellos, J. M., Gil-Díaz, M., and Arroyo, T. (2013).

- Biotechnological potential of non-*Saccharomyces* yeasts isolated during spontaneous fermentations of Malvar (*Vitis vinifera* cv. L.). *Eur. Food Res. Technol.* 236, 193–207. doi:10.1007/s00217-012-1874-9.
- Cordero-Bueso, G., Mangieri, N., Maghradze, D., Foschino, R., Valdetara, F., Cantoral, J. M., et al. (2017). Wild grape-associated yeasts as promising biocontrol agents against *Vitis vinifera* fungal pathogens. *Front. Microbiol.* 8. doi:10.3389/fmicb.2017.02025.
- Costenoble, R., Valadi, H., Gustafsson, L., Niklasson, C., and Franzén, C. J. (2000). Microaerobic glycerol formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 16, 1483–1495. doi:10.1002/1097-0061(200012)16:16<1483::AID-YEA642>3.0.CO;2-K.
- Crabtree, H. G. (1929). Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochem. J.* 23, 536–45. Available at: [http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1254097&tool=pmcentrez&render\\_type=abstract](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1254097&tool=pmcentrez&render_type=abstract).
- Crépin, L., Nidelet, T., Sanchez, I., Dequin, S., and Camarasa, C. (2012). Sequential use of nitrogen compounds by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation: A model based on kinetic and regulation characteristics of nitrogen permeases. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 8102–8111. doi:10.1128/AEM.02294-12.
- Crépin, L., Sanchez, I., Nidelet, T., Dequin, S., and Camarasa, C. (2014). Efficient ammonium uptake and mobilization of vacuolar arginine by *Saccharomyces cerevisiae* wine strains during wine fermentation. *Microb. Cell Fact.* 13, 1–13. doi:10.1186/s12934-014-0109-0.
- Crépin, L., Truong, N. M., Bloem, A., Sanchez, I., Dequin, S., and Camarasa, C. (2017). Management of multiple nitrogen sources during wine fermentation by *S. cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 83, AEM.02617-16. doi:10.1128/AEM.02617-16.
- Cronan, J. E., and Wallace, J. C. (1995). The gene encoding the biotin-apoprotein ligase of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 130, 221–229. doi:10.1016/0378-1097(95)00210-V.
- Cubillos, F. A., Brice, C., Molinet, J., Tisné, S., Abarca, V., Tapia, S. M., et al. (2017). Identification of nitrogen consumption genetic variants in yeast through QTL mapping and bulk segregant RNA-Seq analyses. *G3 (Bethesda)*. 7, 1693–1705. doi:10.1534/g3.117.042127.
- Cunningham, T. S., Svetlov, V. V., Rai, R., Smart, W., and Cooper, T. G. (1996). Gln3p is capable of binding to UASNTR elements and activating transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.*

*Bacteriol.* 178, 3470–3479.

Dashko, S., Zhou, N., Compagno, C., and Pi??kur, J. (2014). Why, when, and how did yeast evolve alcoholic fermentation? *FEMS Yeast Res.* 14, 826–832. doi:10.1111/1567-1364.12161.

Daum, G., Lees, N. D., Bard, M., and Dickson, R. (1998). Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 1471–1510. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(199812)14:16<1471::AID-YEA353>3.0.CO;2-Y.

Davies, B. S. J., and Rine, J. (2006). A role for sterol levels in oxygen sensing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 174, 191–201. doi:10.1534/genetics.106.059964.

Deed, R. C., Deed, N. K., and Gardner, R. C. (2015). Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to low temperature during wine fermentation. *Antonie Van Leeuwenhoek* 107, 1029–1048. doi:10.1007/s10482-015-0395-5.

Dhingra, S., and Cramer, R. A. (2017). Regulation of sterol biosynthesis in the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*: Opportunities for therapeutic development. *Front. Microbiol.* 8, 1–14. doi:10.3389/fmicb.2017.00092.

Dickinson, J. R., Harrison, S. J., Dickinson, J. A., and Hewlins, M. J. E. (2000). An investigation of the metabolism of isoleucine to active amyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 275, 10937–10942. doi:10.1074/jbc.275.15.10937.

Dickinson, J. R., Lanterman, M. M., Danner, D. J., Pearson, B. M., Sanz, P., Harrison, S. J., et al. (1997). A C13 nuclear magnetic resonance investigation of the metabolism of leucine to isoamyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 272, 26871–26878. doi:10.1074/jbc.272.43.26871.

Dickinson, J. R., Salgado, L. E. J., and Hewlins, M. J. E. (2003). The catabolism of amino acids to long chain and complex alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 278, 8028–8034. doi:10.1074/jbc.M211914200.

Djelal, H., Larher, F., Martin, G., and Amrane, A. (2012). Continuous culture for the bioproduction of glycerol and ethanol by *Hansenula anomala* growing under salt stress conditions. *Ann. Microbiol.* 62, 49–54. doi:10.1007/s13213-011-0225-6.

Dmochowska, A., Dignard, D., Maleszka, R., and Thomas, D. Y. (1990). Structure and transcriptional control of the *Saccharomyces cerevisiae* POX1 gene encoding acylcoenzyme A oxidase. *Gene* 88, 247–252. doi:10.1016/0378-1119(90)90038-S.

Dommes, V., Baumgart, C., and Kunau, W. H. (1981). Degradation of unsaturated fatty acids in

- peroxisomes. Existence of a 2,4-dienoyl-CoA reductase pathway. *J. Biol. Chem.* 256, 8259–8262.
- Duc, C., Pradal, M., Sanchez, I., Noble, J., Tesnière, C., and Blondin, B. (2017). A set of nutrient limitations trigger yeast cell death in a nitrogen-dependent manner during wine alcoholic fermentation. *PLoS One* 12, 1–22. doi:10.1371/journal.pone.0184838.
- Duchêne, E., and Schneider, C. (2008). Grapevine and climatic changes: a glance at the situation in Alsace. *Ital. J. Agron.* 3, 77–78. doi:10.1051/agro.
- Dupont, S., Lemetais, G., Ferreira, T., Cayot, P., Gervais, P., and Beney, L. (2012). Ergosterol biosynthesis: a fungal pathway for life on land? *Soc. Study Evol.* 66, 2961–2968. doi:10.5061/dryad.pd28pm7n.
- Eder, M., Sanchez, I., Brice, C., Camarasa, C., Legras, J. L., and Dequin, S. (2018). QTL mapping of volatile compound production in *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. *BMC Genomics* 19, 1–19. doi:10.1186/s12864-018-4562-8.
- Einerhand, a W., Voorn-Brouwer, T. M., Erdmann, R., Kunau, W. H., and Tabak, H. F. (1991). Regulation of transcription of the gene coding for peroxisomal 3-oxoacyl-CoA thiolase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 200, 113–122.
- Englezos, V., Cocolin, L., Rantsiou, K., Ortiz-Julien, A., Bloem, A., Dequin, S., et al. (2018a). Specific phenotypic traits of *Starmerella bacillaris* related to nitrogen source consumption and central carbon metabolite production during wine fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 84, 1–16. doi:10.1128/AEM.000797-18.
- Englezos, V., Cravero, F., Torchio, F., Rantsiou, K., Ortiz-Julien, A., Lambri, M., et al. (2018b). Oxygen availability and strain combination modulate yeast growth dynamics in mixed culture fermentations of grape must with *Starmerella bacillaris* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.* 69, 179–188. doi:10.1016/j.fm.2017.08.007.
- Englezos, V., Giacosa, S., Rantsiou, K., Rolle, L., and Cocolin, L. (2017). *Starmerella bacillaris* in winemaking: opportunities and risks. *Curr. Opin. Food Sci.* 17, 30–35. doi:10.1016/j.cofs.2017.08.007.
- Englezos, V., Rantsiou, K., Cravero, F., Torchio, F., Ortiz-Julien, A., Gerbi, V., et al. (2016a). *Starmerella bacillaris* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed fermentations to reduce ethanol content in wine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 5515–5526. doi:10.1007/s00253-016-7413-z.
- Englezos, V., Rantsiou, K., Cravero, F., Torchio, F., Pollon, M., Daniela, F., et al. (2018c). Volatile

- profile of white wines fermented with sequential inoculation of *Starmerella bacillaris* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chem.* 257, 350–360. doi:10.1016/j.foodchem.2018.03.018.
- Englezos, V., Rantsiou, K., Torchio, F., Rolle, L., Gerbi, V., and Cocolin, L. (2015). Exploitation of the non-*Saccharomyces* yeast *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) in wine fermentation: Physiological and molecular characterizations. *Int. J. Food Microbiol.* 199, 33–40. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.01.009.
- Englezos, V., Torchio, F., Cravero, F., Marengo, F., Giacosa, S., Gerbi, V., et al. (2016b). Aroma profile and composition of Barbera wines obtained by mixed fermentations of *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) and *Saccharomyces cerevisiae*. *LWT - Food Sci. Technol.* 73, 567–575. doi:10.1016/j.lwt.2016.06.063.
- Enomoto, K., Arikawa, Y., and Muratsubaki, H. (2002). Physiological role of soluble fumarate reductase in redox balancing during anaerobiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 215, 103–108. doi:10.1016/S0378-1097(02)00918-7.
- Erasmus, D. J., Cliff, M., and Van Vuuren, H. J. J. (2004). Impact of yeast strain on the production of acetic acid, glycerol, and the sensory attributes of icewine. *Am. J. Enol. Vitic.* 55, 371–378.
- Erasmus, D. J., Van Der Merwe, G. K., and Van Vuuren, H. J. J. (2003). Genome-wide expression analyses: Metabolic adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high sugar stress. *FEMS Yeast Res.* 3, 375–399. doi:10.1016/S1567-1356(02)00203-9.
- Eriksson, P., Andre, L., Ansell, R., Blomberg, A., and Alder, L. (1995). Cloning and characterization of GPD2, a second gene encoding i-glycerol 3-phosphahte dehydrogenase (NAD<sup>+</sup>) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 17, 95–107.
- Escribano-Viana, R., Portu, J., Garijo, P., Gutiérrez, A. R., Santamaría, P., López-Alfaro, I., et al. (2018). Evaluating a preventive biological control agent applied on grapevines against *Botrytis cinerea* and its influence on winemaking. *J. Sci. Food Agric.* doi:10.1002/jsfa.8977.
- Escribano, R., González-Arenzana, L., Portu, J., Garijo, P., López-Alfaro, I., López, R., et al. (2018). Wine aromatic compound production and fermentative behaviour within different non-*Saccharomyces* species and clones. *J. Appl. Microbiol.* doi:10.1111/jam.13735.
- Escudero, A., Campo, E., Fariña, L., Cacho, J., and Ferreira, V. (2007). Analytical characterization of the aroma of five premium red wines. Insights into the role of odor families and the concept of fruitiness of wines. *J. Agric. Food Chem.* 55, 4501–4510. doi:10.1021/jf0636418.

- Fairbairn, S., McKinnon, A., Musarurwa, H. T., Ferreira, A. C., and Bauer, F. F. (2017). The impact of single amino acids on growth and volatile aroma production by *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Front. Microbiol.* 8, 1–12. doi:10.3389/fmicb.2017.02554.
- Faria-oliveira, F., Puga, S., and Ferreira, C. (2013). Yeast : World ' s Finest Chef. *Food Ind.*, Chapter 23. doi:10.5772/53156.
- Fayyad-Kazan, M., Feller, A., Bodo, E., Boeckstaens, M., Marini, A. M., Dubois, E., et al. (2016). Yeast nitrogen catabolite repression is sustained by signals distinct from glutamine and glutamate reservoirs. *Mol. Microbiol.* 99, 360–379. doi:10.1111/mmi.13236.
- Fernandes Lemos Junior, W. J., Bovo, B., Nadai, C., Crosato, G., Carlot, M., Favaron, F., et al. (2016). Biocontrol ability and action mechanism of *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) isolated from wine musts against gray mold disease agent botrytis cinerea on grape and their effects on alcoholic fermentation. *Front. Microbiol.* 7, 1–12. doi:10.3389/fmicb.2016.01499.
- Ferraro, L., Fatichenti, F., and Ciani, M. (2000). Pilot scale vinification process using immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochem.* 35, 1125–1129. doi:10.1016/S0032-9592(00)00148-5.
- Ferreira, J., Du Toit, M., and Du Toit, W. J. (2006). The effects of copper and high sugar concentrations on growth, fermentation efficiency and volatile acidity production of different commercial wine yeast strains. *Aust. J. Grape Wine Res.* 12, 50–56. doi:10.1111/j.1755-0238.2006.tb00043.x.
- Fischer, U., and Noble, A. (1994). The effect of ethanol, catechin concentration, and pH on sourness and bitterness of wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 45, 6–10.
- Fornairon-Bonnefond, C., Aguera, E., Deytieux, C., Sablayrolles, J.-M., and Salmon, J.-M. (2003). Impact of oxygen addition during enological fermentation on sterol contents in yeast lees and their reactivity towards oxygen. *J. Biosci. Bioeng.* 95, 496–503. doi:10.1263/jbb.95.496.
- Gallander, J. F., and Peng, A. C. (1979). Lipid and fatty acid compositions of different grape types. *Am. J. Enol. Vitic.* 31, 24–27. Available at: <http://www.ajevonline.org/cgi/content/abstract/31/1/24>.
- Gamero, A., Quintilla, R., Groenewald, M., Alkema, W., Boekhout, T., and Hazelwood, L. (2016). High-throughput screening of a large collection of non-conventional yeasts reveals their potential for aroma formation in food fermentation. *Food Microbiol.* 60, 147–159. doi:10.1016/j.fm.2016.07.006.

- Garcia-Ochoa, F., and Gomez, E. (2005). Prediction of gas-liquid mass transfer coefficient in sparged stirred tank bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* 92, 761–772. doi:10.1002/bit.20638.
- Garcia-Ochoa, F., and Gomez, E. (2009). Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnol. Adv.* 27, 153–176. doi:10.1016/j.biotechadv.2008.10.006.
- Garcia-Ochoa, F., Gomez, E., Santos, V. E., and Merchuk, J. C. (2010). Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview. *Biochem. Eng. J.* 49, 289–307. doi:10.1016/j.bej.2010.01.011.
- Garde-Cerdán, T., and Ancín-Azpilicueta, C. (2008). Effect of the addition of different quantities of amino acids to nitrogen-deficient must on the formation of esters, alcohols, and acids during wine alcoholic fermentation. *LWT - Food Sci. Technol.* 41, 501–510. doi:10.1016/j.lwt.2007.03.018.
- Garde-Cerdan, T., Lorenzo, C., Lara, J. F., Pardo, F., Ancin-Azpilicueta, C., and Salinas, M. R. (2009). Study of the evolution of nitrogen compounds during grape ripening. Application to differentiate grape varieties and cultivated systems. *J. Agric. Food Chem.* 57, 2410–2419. doi:10.1021/jf8037049.
- Gawel, R., Van Sluyter, S., and Waters, E. J. (2007). The effects of ethanol and glycerol on the body and other sensory characteristics of Riesling wines. *Aust. J. Grape Wine Res.* 13, 38–45. doi:10.1111/j.1755-0238.2007.tb00070.x.
- Geisbrecht, B. V., Zhu, D., Schulz, K., Nau, K., Morrell, J. C., Geraghty, M., et al. (1998). Molecular characterization of *Saccharomyces cerevisiae* delta 3, delta 2, Enoyl-CoA Isomerase. 273, 33184–33191.
- Georis, I., Feller, A., Vierendeels, F., and Dubois, E. (2009). The yeast GATA factor Gat1 occupies a central position in nitrogen catabolite repression-sensitive gene activation. *Mol. Cell. Biol.* 29, 3803–3815. doi:10.1128/MCB.00399-09.
- Gilbert, J. a, van der Lelie, D., and Zarraonaindia, I. (2014). Microbial terroir for wine grapes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 5–6. doi:10.1073/pnas.1320471110.
- Gobbi, M., De Vero, L., Solieri, L., Comitini, F., Oro, L., Giudici, P., et al. (2014). Fermentative aptitude of non-*Saccharomyces* wine yeast for reduction in the ethanol content in wine. *Eur. Food Res. Technol.* 239, 41–48. doi:10.1007/s00217-014-2187-y.
- Gobert, A., Tourdou-Maréchal, R., Morge, C., Sparrow, C., Liu, Y., Quintanilla-Casas, B., et al. (2017). Non-*Saccharomyces* yeasts nitrogen source preferences: Impact on sequential fermentation

- and wine volatile compounds profile. *Front. Microbiol.* 8, 2175. doi:10.3389/fmicb.2017.02175.
- Gobert, A., Tourdot-Maréchal, R., Sparrow, C., Morge, C., and Alexandre, H. (2019). Influence of nitrogen status in wine alcoholic fermentation. *Food Microbiol.* 83, 71–85. doi:10.1016/j.fm.2019.04.008.
- Goelzer, A., Charnomordic, B., Colombié, S., Fromion, V., and Sablayrolles, J. M. (2009). Simulation and optimization software for alcoholic fermentation in winemaking conditions. *Food Control* 20, 635–642. doi:10.1016/j.foodcont.2008.09.016.
- Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., et al. (1996). Life with 6000 Genes. *Science (80-. )*. 274, 546–567. doi:jyu.
- Gogate, P. R., and Pandit, a B. (1999). Survey of measurement techniques for gas-liquid mass transfer coefficient in bioreactors. *Biochem. Eng. J.* 4, 7–15. doi:10.1016/S1369-703X(99)00033-9.
- Goldner, M. C., Zamora, M. C., Lira, P. D. L., Gianninoto, H., and Bandoni, A. (2009). Effect of ethanol level in the perception of aroma attributes and the detection of volatile compounds in red wine. 24, 243–257. doi:10.1111/j.1745-459X.2009.00208.x.
- Gombert, A. K., and Moreira, M. (2001). Network identification and flux quantification in the central metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* under different conditions of glucose repression network identification and flux quantification in the central metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 183, 1441–1451. doi:10.1128/JB.183.4.1441.
- González, B., Vázquez, J., Morcillo-Parra, M. Á., Mas, A., Torija, M. J., and Beltran, G. (2018). The production of aromatic alcohols in non-*Saccharomyces* wine yeast is modulated by nutrient availability. *Food Microbiol.* 74, 64–74. doi:10.1016/j.fm.2018.03.003.
- Görgens, J. F., Van Zyl, W. H., Knoetze, J. H., and Hahn-Hägerdal, B. (2005). Amino acid supplementation improves heterologous protein production by *Saccharomyces cerevisiae* in defined medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67, 684–691. doi:10.1007/s00253-004-1803-3.
- Grenson, M. (1983). Inactivation-reactivation process and repression of permease formation regulate several ammonia-sensitive permeases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 133, 135–139. doi:10.1111/j.1432-1033.1983.tb07438.x.
- Grenson, M. (1992). Amino acid transporters in yeast: Structure, function and regulation. *New Compr. Biochem. Mol. Asp. Transp. proteins* 21, 219–245.

- Grenson, M., Dubois, E., Piotrowska, M., Drillien, R., and Aigle, M. (1974). Ammonia assimilation in *Saccharomyces cerevisiae* as mediated by the two glutamate dehydrogenases. *Mol Gen Genet* 128, 73–85.
- Gupta, A., and Rao, G. (2003). A study of oxygen transfer in shake flasks using a non-invasive oxygen sensor. *Biotechnol. Bioeng.* 84, 351–358. doi:10.1002/bit.10740.
- Gurvitz, A., Rottensteiner, H., Kilpeläinen, S. H., Hartig, A., Hiltunen, J. K., Binder, M., et al. (1997). The *Saccharomyces cerevisiae* peroxisomal 2, 4-Dienoyl-CoA reductase is encoded by the oleate-inducible gene SPS19. *J. Biol. Chem.* 272, 22140–22147.
- Gutiérrez-Gamboa, G., Carrasco-Quiroz, M., Martínez-Gil, A. M., Pérez-Álvarez, E. P., Garde-Cerdán, T., and Moreno-Simunovic, Y. (2017a). Grape and wine amino acid composition from Carignan noir grapevines growing under rainfed conditions in the Maule Valley, Chile: Effects of location and rootstock. *Food Res. Int.* 105, 344–352. doi:10.1016/j.foodres.2017.11.021.
- Gutiérrez-Gamboa, G., Garde-Cerdán, T., Gonzalo-Diago, A., Moreno-Simunovic, Y., and Martínez-Gil, A. M. (2017b). Effect of different foliar nitrogen applications on the must amino acids and glutathione composition in Cabernet Sauvignon vineyard. *LWT - Food Sci. Technol.* 75, 147–154. doi:10.1016/j.lwt.2016.08.039.
- Gutiérrez, A., Beltran, G., Warringer, J., and Guillamón, J. M. (2013a). Genetic basis of variations in nitrogen source utilization in four wine commercial yeast strains. *PLoS One* 8, 1–13. doi:10.1371/journal.pone.0067166.
- Gutiérrez, A., Chiva, R., Beltran, G., Mas, A., and Guillamon, J. M. (2013b). Biomarkers for detecting nitrogen deficiency during alcoholic fermentation in different commercial wine yeast strains. *Food Microbiol.* 34, 227–237. doi:10.1016/j.fm.2012.12.004.
- Hannam, K. D., Neilsen, G. H., Neilsen, D., Midwood, A. J., Millard, P., Zhang, Z., et al. (2016). Amino acid composition of grape (*Vitis vinifera* L.) juice in response to applications of urea to the soil or foliage. *Am. J. Enol. Vitic.* 67, 47–55. doi:10.5344/ajev.2015.15015.
- Hannam, K. D., Neilsen, G. H., Neilsen, D., Rabie, W. S., Midwood, A. J., and Millard, P. (2014). Late-season foliar urea applications can increase berry yeast-assimilable nitrogen in winegrapes (*Vitis vinifera* L.). *Am. J. Enol. Vitic.* 65, 89–95. doi:10.5344/ajev.2013.13092.
- Hazelwood, L. A., Daran, J. M., Van Maris, A. J. A., Pronk, J. T., and Dickinson, J. R. (2008). The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: A century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism 74, 8, (2259–2266)). *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 3920. doi:10.1128/AEM.00934-08.

- Hein, C., Springael, J. Y., Volland, C., Haguenaer-Tsapis, R., and André, B. (1995). NPI1, an essential yeast gene involved in induced degradation of Gap1 and Fur4 permeases, encodes the Rsp5 ubiquitin-protein ligase. *Mol. Microbiol.* 18, 77–87. doi:10.1111/j.1365-2958.1995.mmi\_18010077.x.
- Henschke, P., and Jiranek, V. (1993). Yeasts-metabolism of nitrogen compounds in Wine Microbiology and Biotechnology. *Aust. Wine Res. Inst.*, 77–164.
- Herbert, P., Cabrita, M. J., Ratola, N., Laureano, O., and Alves, A. (2005). Free amino acids and biogenic amines in wines and musts from the Alentejo region. Evolution of amines during alcoholic fermentation and relationship with variety, sub-region and vintage. *J. Food Eng.* 66, 315–322. doi:10.1016/j.jfoodeng.2004.03.024.
- Hernandez-Orte, P., Bely, M., Cacho, J., and Ferreira, V. (2006). Impact of ammonium additions on volatile acidity, ethanol, and aromatic compound production by different *Saccharomyces cerevisiae* strains during fermentation in controlled synthetic media. *Aust. J. Grape Wine Res.* 12, 150–160. doi:10.1111/j.1755-0238.2006.tb00055.x.
- Hernández-Orte, P., Ibarz, M. J., Cacho, J., and Ferreira, V. (2004). Effect of the addition of ammonium and amino acids to musts of Airen variety on aromatic composition and sensory properties of the obtained wine. *Food Chem.* 89, 163–174. doi:10.1016/j.foodchem.2004.02.021.
- Hernández-Orte, P., Ibarz, M. J., Cacho, J., and Ferreira, V. (2006). Addition of amino acids to grape juice of the Merlot variety: Effect on amino acid uptake and aroma generation during alcoholic fermentation. *Food Chem.* 98, 300–310. doi:10.1016/j.foodchem.2005.05.073.
- Hohmann, S. (1991). Characterization of PDC6, a third structural gene for pyruvate decarboxylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 173, 7963–7969.
- Hohmann, S., and Meacock, P. A. (1998). Thiamin metabolism and thiamin diphosphate-dependent enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: genetic regulation. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1385, 201–219. doi:10.1016/S0167-4838(98)00069-7.
- Horák, J. (1997). Yeast nutrient transporters. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.* 1331, 41–79. doi:10.1016/S0304-4157(96)00015-9.
- Hu, Z., He, B., Ma, L., Sun, Y., Niu, Y., and Zeng, B. (2017). Recent Advances in Ergosterol Biosynthesis and Regulation Mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. *Indian J. Microbiol.* 57, 270–277. doi:10.1007/s12088-017-0657-1.

- Igual, J. C., Matallana, E., Gonzalez-Bosch, C., Franco, L., and Pérez-Ortín, J. E. (1991). A new glucose-repressible gene identified from the analysis of chromatin structure in deletion mutants of yeast SUC2 locus. *Yeast* 7, 379–389. doi:10.1002/yea.320070408.
- Inglédew, W., Magnus, C., and Sosulski, F. (1987). Influence of oxygen on proline utilisation during the wine fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 38, 246–248.
- INSERM (2001). “Expertise collective : Alcool effets sur la santé.” 1–358.
- Jeppsson, M., Johansson, B., Hahn-hägerdal, B., and Gorwa-grauslund, M. F. (2002). Reduced oxidative pentose phosphate pathway flux in recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains improves the ethanol yield from xylose. *Society* 68, 1604–1609. doi:10.1128/AEM.68.4.1604.
- Jiménez-Martí, E., Aranda, A., Mendes-Ferreira, A., Mendes-Faia, A., and del Olmo, M. L. (2007). The nature of the nitrogen source added to nitrogen depleted vinifications conducted by a *Saccharomyces cerevisiae* strain in synthetic must affects gene expression and the levels of several volatile compounds. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 92, 61–75. doi:10.1007/s10482-006-9135-1.
- Jiranek, V., Langridge, P., and Henschke, P. A. (1995). Amino acid and ammonium utilization by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts from a chemically defined medium. *Am. J. Enol. Vitic.* 46, 75–83. doi:10.1016/S1567-1356(03)00157-0.
- Jolly, N. P., Varela, C., and Pretorius, I. S. (2014). Not your ordinary yeast: Non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Res.* 14, 215–237. doi:10.1111/1567-1364.12111.
- Jones, B. M., Pierce, J. S., and Son, A. G. (1964). Absorption of amino acids from wort by yeasts. *J. Inst. Brew.* 70, 307–315. doi:10.1002/j.2050-0416.1964.tb01996.x.
- Jones, G. V., White, M. A., Cooper, O. R., and Storchmann, K. (2005). Climate change and global wine quality. *Clim. Change* 73, 319–343. doi:10.1007/s10584-005-4704-2.
- Joosten, G. E. H., Schilder, J. G. M., and Janssen, J. J. (1977). The influence of suspended solid material on the gas-liquid mass transfer in stirred gas-liquid contactors. *Chem. Eng. Sci.* 32, 563–566. doi:10.1016/0009-2509(77)87017-6.
- Junquera, P., Lissarrague, J. R., Jiménez, L., Linares, R., and Baeza, P. (2012). Long-term effects of different irrigation strategies on yield components, vine vigour, and grape composition in cv. Cabernet-Sauvignon (*Vitis vinifera* L.). *Irrig. Sci.* 30, 351–361. doi:10.1007/s00271-012-0348-y.

- 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.
- Keller, M., Pool, R. M., and Henick-Kling, T. (1999). Excessive nitrogen supply and shoot trimming can impair colour development in Pinot Noir grapes and wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* 5, 45–55. doi:10.1111/j.1755-0238.1999.tb00151.x.
- Kemsawasd, V., Viana, T., Ardö, Y., and Arneborg, N. (2015). Influence of nitrogen sources on growth and fermentation performance of different wine yeast species during alcoholic fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 10191–10207. doi:10.1007/s00253-015-6835-3.
- Kevvai, K., Kütt, M. L., Nisamedtinov, I., and Paalme, T. (2016). Simultaneous utilization of ammonia, free amino acids and peptides during fermentative growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Inst. Brew.* 122, 110–115. doi:10.1002/jib.298.
- King, E. S., and Heymann, H. (2014). The effect of reduced alcohol on the sensory profiles and consumer preferences of white wine. *J. Sens. Stud.* 29, 33–42. doi:10.1111/joss.12079.
- King, E. S., Osidacz, P., Curtin, C., Bastian, S. E. P., and Francis, I. L. (2011). Assessing desirable levels of sensory properties in Sauvignon Blanc wines - consumer preferences and contribution of key aroma compounds. *Aust. J. Grape Wine Res.* 17, 169–180. doi:10.1111/j.1755-0238.2011.00133.x.
- Kliewer, W. M. (1977). Influence of temperature, solar radiation and nitrogen on coloration and composition of Emperor grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* 28, 96–103. Available at: <http://www.ajevonline.org/content/28/2/96.abstract>.
- Kontkanen, D., Inglis, D. L., Pickering, G. J., and Reynolds, A. (2004). Effect of yeast inoculation rate, acclimatization, and nutrient addition on icewine fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 55, 363–370.
- Kotyk, A. (1994). Enhancement of synthesis and activity of yeast transport proteins by metabolic substrates. *Folia Microbiol. Off. J. Inst. Microbiol. Acad. Sci. Czech Repub.* 39, 261–264. doi:10.1007/BF02814309.
- Kunau, W. H., Dommes, V., and Schulz, H. (1995). B-Oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: A century of continued progress. *Prog. Lipid Res.* 34, 267–342. doi:10.1016/0163-7827(95)00011-9.

- Lambrechts, M. G., and Pretorius, I. S. (2000). Yeast and its importance to wine aroma - A review. *South African J. Enol. Vitic.* 21, 97–129.
- Large, P. J. (1986). Degradation of organic nitrogen compounds by yeasts. *Yeast* 2, 1–34. doi:10.1002/yea.320020102.
- Larsson, K., Ansell, R., Eriksson, P., and Adler, L. (1993). A gene encoding sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD<sup>+</sup>) complements an osmosensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 10, 1101–1111. doi:10.1111/j.1365-2958.1993.tb00980.x.
- Lasa, B., Menendez, S., Sagastizabal, K., Cervantes, M. E. C., Irigoyen, I., Muro, J., et al. (2012). Foliar application of urea to “Sauvignon Blanc” and “Merlot” vines: Doses and time of application. *Plant Growth Regul.* 67, 73–81. doi:10.1007/s10725-012-9667-5.
- Lattey, K. A., Bramley, B. R., and Francis, I. L. (2010). Consumer acceptability, sensory properties and expert quality judgements of Australian Cabernet Sauvignon and Shiraz wines. *Aust. J. Grape Wine Res.* 16, 189–202. doi:10.1111/j.1755-0238.2009.00069.x.
- Lauwers, E., and André, B. (2006). Association of yeast transporters with detergent-resistant membranes correlates with their cell-surface location. *Traffic* 7, 1045–1059. doi:10.1111/j.1600-0854.2006.00445.x.
- Liguori, L., Russo, P., Albanese, D., and Di Matteo, M. (2013). Evolution of quality parameters during red wine dealcoholization by osmotic distillation. *Food Chem.* 140, 68–75. doi:10.1016/j.foodchem.2013.02.059.
- Linek, V., Vacek, V., and Beneš, P. (1987). A critical review and experimental verification of the correct use of the dynamic method for the determination of oxygen transfer in aerated agitated vessels to water, electrolyte solutions and viscous liquids. *Chem. Eng. J.* 34, 11–34. doi:10.1016/0300-9467(87)85003-7.
- Linsenmeier, A. W., Loos, U., and Löhnertz, O. (2008). Must composition and nitrogen uptake in a long-term trial as affected by timing of nitrogen fertilization in a cool-climate riesling vineyard. *Am. J. Enol. Vitic.* 59, 255–264.
- 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.
- Liu, P., Wang, Y., Ye, D., Duan, L., Duan, C., and Yan, G. (2017). Effect of the addition of branched-

- chain amino acids to non-limited nitrogen synthetic grape must on volatile compounds and global gene expression during alcoholic fermentation. *Aust. J. Grape Wine Res.* 24, 197–205. doi:10.1111/ajgw.12313.
- Liu, Y., Rousseaux, S., Tourdot-Maréchal, R., Sadoudi, M., Gougeon, R., Schmitt-Kopplin, P., et al. (2015). Critical reviews in food science and nutrition wine microbiome, a dynamic world of microbial interactions. 37–41. doi:10.1080/10408398.2014.983591.
- Ljungdahl, P. O. (2009). Amino-acid-induced signalling via the SPS-sensing pathway in yeast. *Biochem. Soc. Trans.* 37, 242–7. doi:10.1042/BST0370242.
- Ljungdahl, P. O., and Daignan-Fornier, B. (2012). Regulation of amino acid, nucleotide, and phosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 190, 885–929. doi:10.1534/genetics.111.133306.
- Lleixà, J., Martín, V., Giorello, F., Portillo, M. C., Carrau, F., Beltran, G., et al. (2019). Analysis of the NCR Mechanisms in *Hanseniaspora vineae* and *Saccharomyces cerevisiae* During Winemaking. *Front. Genet.* 9, 1–9. doi:10.3389/fgene.2018.00747.
- Luttik, M. A. H., Overkamp, K. M., Kötter, P., De Vries, S., Van Dijken, J. P., and Pronk, J. T. (1998). The *Saccharomyces cerevisiae* NDE1 and NDE2 genes encode separate mitochondrial NADH dehydrogenases catalyzing the oxidation of cytosolic NADH. *J. Biol. Chem.* 273, 24529–24534. doi:10.1074/jbc.273.38.24529.
- Magasanik, B., and Kaiser, C. A. (2002). Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 290, 1–18. doi:10.1016/S0378-1119(02)00558-9.
- Magyar, I., Nyitrai-Sárdy, D., Leskó, A., Pomázi, A., and Kállay, M. (2014). Anaerobic organic acid metabolism of *Candida zemplinina* in comparison with *Saccharomyces wine* yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* 178, 1–6. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.03.002.
- Magyar, I., and Tóth, T. (2011). Comparative evaluation of some oenological properties in wine strains of *Candida stellata*, *Candida zemplinina*, *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.* 28, 94–100. doi:10.1016/j.fm.2010.08.011.
- Maisonnavé, P., Sanchez, I., Moine, V., Dequin, S., and Galeote, V. (2013). Stuck fermentation: Development of a synthetic stuck wine and study of a restart procedure. *Int. J. Food Microbiol.* 163, 239–247. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.03.004.
- Malinska, K., Malinsky, J., Opekarova, M., and Tanner, W. (2003). Visualization of protein

- compartmentation within the plasma membrane of living yeast cells. *Mol. Biol. Cell* 15, 3751–3737. doi:10.1091/mbc.E03.
- Manginot, C., Roustan, J. L., and Sablayrolles, J. M. (1998). Nitrogen demand of different yeast strains during alcoholic fermentation. Importance of the stationary phase. *Enzyme Microb. Technol.* 23, 511–517. doi:10.1016/S0141-0229(98)00080-5.
- Marini, A. M., Soussi-Boudekou, S., Vissers, S., and Andre, B. (1997). A family of ammonium transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 17, 4282–93. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=232281&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 8, 2016].
- Martin, S., and Pangborn, R. M. (1970). Taste interaction of ethyl alcohol with sweet, salty, sour and bitter compounds. *J. Sci. Food Agric.* 21, 653–655. doi:10.1002/jsfa.2740211213.
- Martínez-Moreno, R., Morales, P., Gonzalez, R., Mas, A., and Beltran, G. (2012). Biomass production and alcoholic fermentation performance of *Saccharomyces cerevisiae* as a function of nitrogen source. *FEMS Yeast Res.* 12, 477–485. doi:10.1111/j.1567-1364.2012.00802.x.
- Martínez-Moreno, R., Quirós, M., Morales, P., and Gonzalez, R. (2014). New insights into the advantages of ammonium as a winemaking nutrient. *Int. J. Food Microbiol.* 177, 128–135. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.020.
- Martínez, C., Contreras, A., Aguilera, O., García, V., Ganga, A., and García, V. (2014). The ICY1 gene from *Saccharomyces cerevisiae* affects nitrogen consumption during alcoholic fermentation. *Electron. J. Biotechnol.* 17, 150–155. doi:10.1016/j.ejbt.2014.04.006.
- Masneuf-Pomarede, I., Juquin, E., Miot-Sertier, C., Renault, P., Laizet, Y., Salin, F., et al. (2015). The yeast *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) shows high genetic diversity in winemaking environments. *FEMS Yeast Res.* 15, 1–11. doi:10.1093/femsyr/fov045.
- Massot, A., Mietton-Peuchot, M., Peuchot, V., and Milisic, V. (2008). Nanofiltration and reverse osmosis in winemaking. *Desalination* 231, 283–289. doi:10.1016/j.desal.2007.10.032.
- Maturano, Y. P., Assof, M., Fabani, M. P., Nally, M. C., Jofré, V., Rodríguez Assaf, L. A., et al. (2015). Enzymatic activities produced by mixed *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* cultures: relationship with wine volatile composition. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 108, 1239–1256. doi:10.1007/s10482-015-0578-0.
- Medina, K., Boido, E., Dellacassa, E., and Carrau, F. (2012). Growth of non-*Saccharomyces* yeasts

- affects nutrient availability for *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 157, 245–250. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.012.
- Medina, K., Boido, E., Fariña, L., Gioia, O., Gomez, M. E., Barquet, M., et al. (2013). Increased flavour diversity of Chardonnay wines by spontaneous fermentation and co-fermentation with *Hanseniaspora vineae*. *Food Chem.* 141, 2513–2521. doi:10.1016/j.foodchem.2013.04.056.
- Mendes-Ferreira, A., Del Olmo, M., García-Martínez, J., Jiménez-Martí, E., Mendes-Faia, A., Pérez-Ortín, J. E., et al. (2007). Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to different nitrogen concentrations during alcoholic fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 3049–3060. doi:10.1128/AEM.02754-06.
- Mendes-Ferreira, A., Mendes-Faia, A., and Leão, C. (2004). Growth and fermentation patterns of *Saccharomyces cerevisiae* under different ammonium concentrations and its implications in winemaking industry. *J. Appl. Microbiol.* 97, 540–545. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02331.x.
- Mengel, K. (2002). Alternative or complementary role of foliar supply in mineral nutrition. *Acta Hortic.* 594, 33–47. doi:10.17660/ActaHortic.2002.594.1.
- 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, 1–10. doi:10.1093/femsyr/fox010.
- Michnick, S., Roustan, J., Remize, F., and Barre, P. (1997). Modulation of glycerol and ethanol yields during alcoholic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressed or disrupted for GPD1 encoding glycerol 3-phosphate dehydrogenase. 793, 783–793. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(199707)13.
- Miller, A. C., Wolff, S. R., Bisson, L. F., and Ebeler, S. E. (2007). Yeast strain and nitrogen supplementation: Dynamics of volatile ester production in chardonnay juice fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 58, 470–483.
- Minard, K. I., Jennings, G. T., Loftus, T. M., Xuan, D., and McAlister-Henn, L. (1998). Sources of NADPH and expression of mammalian NADP<sup>+</sup>-specific isocitrate dehydrogenases in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 273, 31486–31493. doi:10.1074/jbc.273.47.31486.
- Mira de Orduña, R. (2010). Climate change associated effects on grape and wine quality and production. *Food Res. Int.* 43, 1844–1855. doi:10.1016/j.foodres.2010.05.001.

- Mitchell, A. P. (1985). The GLN1 locus of *Saccharomyces cerevisiae* encodes glutamine synthetase. *Genetics* 111, 243–258.
- Miyachi, M., Iguchi, A., Uchida, S., and Koide, K. (1981). Effect of solid particles in liquid-phase on liquid-side mass transfer coefficient. *Can. J. Chem. Eng.* 59, 640–641. doi:10.1002/cjce.5450590515.
- Mojzita, D., and Hohmann, S. (2006). Pdc2 coordinates expression of the THI regulon in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Genet. Genomics* 276, 147–161. doi:10.1007/s00438-006-0130-z.
- Morales, P., Rojas, V., Quirós, M., and Gonzalez, R. (2015). The impact of oxygen on the final alcohol content of wine fermented by a mixed starter culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 3993–4003. doi:10.1007/s00253-014-6321-3.
- Mortimer, R., and Polsinelli, M. (1999). On the origins of wine yeast. *Res. Microbiol.* 150, 199–204. doi:10.1016/S0923-2508(99)80036-9.
- Mouret, J. R., Perez, M., Angenieux, M., Nicolle, P., Farines, V., and Sablayrolles, J. M. (2014). Online-based kinetic analysis of higher alcohol and ester synthesis during winemaking fermentations. *Food Bioprocess Technol.* 7, 1235–1245. doi:10.1007/s11947-013-1089-5.
- NASA (2015). Climate Change : Vital Signs of the Planet : Global Temperature. Available at: <http://climate.nasa.gov/vital-signs/global-temperature/>.
- Niederberger, P., Miozzari, G., and Hütter, R. (1981). Biological role of the general control of amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 1, 584–593. doi:10.1128/MCB.1.7.584.
- Nissen, T. L., Schulze, U., Nielsen, J., and Villadsen, J. (1997). Flux distribution in anaerobic, glucose-limited continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 143, 203–218. doi:10.1099/00221287-143-1-203.
- Nosek, J., and Fukuhara, H. (1994). NADH dehydrogenase subunit genes in the mitochondrial DNA of yeasts. *J. Bacteriol.* 176, 5622–5630.
- Noti, O., Vaudano, E., Giuffrida, M. G., Lamberti, C., Cavallarin, L., Garcia-Moruno, E., et al. (2018). Enhanced arginine biosynthesis and lower proteolytic profile as indicators of *Saccharomyces cerevisiae* stress in stationary phase during fermentation of high sugar grape must: A proteomic evidence. *Food Res. Int.* 105, 1011–1018. doi:10.1016/j.foodres.2017.12.004.

- Núñez de castro, I., Ugarte, M., Cano, A., and Mayor, F. (1970). Effect of glucose, galactose, and different nitrogen-sources on the activity of yeast glutamate dehydrogenase (NAD and NADP-linked) from normal strain and impaired respiration mutant. *Eur. J. Biochem.* 16, 567–570. doi:10.1111/j.1432-1033.1970.tb01118.x.
- Nurgel, C., Pickering, G. J., and Inglis, D. L. (2004). Sensory and chemical characteristics of Canadian ice wines. *J. Sci. Food Agric.* 84, 1675–1684. doi:10.1002/jsfa.1860.
- Ochando, T., Mouret, J.-R., Humbert-Goffard, A., Sablayrolles, J.-M., and Farines, V. (2016). Impact of initial lipid content and oxygen supply on alcoholic fermentation in champagne-like musts. *Food Res. Int.* 98, 87–94. doi:10.1016/j.foodres.2016.11.010.
- Ortega-Heras, M., Pérez-Magariño, S., Del-Villar-Garrachón, V., González-Huerta, C., Moro Gonzalez, L. C., Guadarrama Rodríguez, A., et al. (2014). Study of the effect of vintage, maturity degree, and irrigation on the amino acid and biogenic amine content of a white wine from the Verdejo variety. *J. Sci. Food Agric.* 94, 2073–2082. doi:10.1002/jsfa.6526.
- Overkamp, K. M., Bakker, B. M., Kötter, P., Tuijl, V., Vries, S. De, Dijken, J. P. Van, et al. (2000). In vivo analysis of the mechanisms for oxidation of cytosolic NADH by *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria in vivo analysis of the Mechanisms for Oxidation of cytosolic NADH by *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. 182, 2823–2830. doi:10.1128/JB.182.10.2823-2830.2000.Updated.
- Özbek, B., and Gayik, S. (2000). The studies on the oxygen mass transfer coefficient in a bioreactor. *Process Biochem.* 36, 729–741. doi:10.1007/s10971-013-3041-6.
- Ozturk, B., and Anli, E. (2014). Different techniques for reducing alcohol levels in wine: A review. *BIO Web Conf.* 3, 02012. doi:10.1051/bioconf/20140302012.
- Padilla, B., Zulian, L., Ferreres, À., Pastor, R., Esteve-Zarzoso, B., Beltran, G., et al. (2017). Sequential inoculation of native non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae* strains for wine making. *Front. Microbiol.* 8, 1–12. doi:10.3389/fmicb.2017.01293.
- Påhlman, A. K., Granath, K., Ansell, R., Hohmann, S., and Adler, L. (2001). The yeast glycerol 3-phosphatases Gpp1p and Gpp2p are required for glycerol biosynthesis and differentially involved in the cellular responses to osmotic, anaerobic, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 276, 3555–3563. doi:10.1074/jbc.M007164200.
- Pérez-Nevado, F., Albergaria, H., Hogg, T., and Girio, F. (2006). Cellular death of two non-*Saccharomyces* wine-related yeasts during mixed fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*.

- Int. J. Food Microbiol.* 108, 336–345. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.12.012.
- Pickering, G. J. (2000). Low- and Reduced-alcohol Wine: A Review. *J. Wine Res.* 11, 129–144. doi:10.1080/09571260020001575.
- Pickering, G. J., Heatherbell, D. A., and Barnes, M. F. (1998). Optimising glucose conversion in the production of reduced alcohol wine using glucose oxidase. *Food Res. Int.* 31, 685–692. doi:10.1016/S0963-9969(99)00046-0.
- Pickering, G. J., Heatherbell, D. A., and Barnes, M. F. (1999). The production of reduced-alcohol wine using glucose oxidase-treated juice. Part I. Composition. *Am. J. Enol. Vitic.* 50, 307–316.
- Pinu, F. R., Edwards, P. J. B., Gardner, R. C., and Villas-Boas, S. G. (2014). Nitrogen and carbon assimilation by *Saccharomyces cerevisiae* during Sauvignon blanc juice fermentation. *FEMS Yeast Res.* 14, 1206–1222. doi:10.1111/1567-1364.12222.
- Poirier, Y., Antonenkov, V. D., Glumoff, T., and Hiltunen, J. K. (2006). Peroxisomal B-oxidation-A metabolic pathway with multiple functions. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1763, 1413–1426. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.08.034.
- Pouliot, K., Thibault, J., Garnier, a., and Acuña Leiva, G. (2000). KL a Evaluation during the course of fermentation using data reconciliation techniques. *Bioprocess Eng.* 23, 565–573. doi:10.1007/s004490000198.
- Qin, X., Xiao, H., Xue, C., Yu, Z., Yang, R., Cai, Z., et al. (2015). Biocontrol of gray mold in grapes with the yeast *Hanseniaspora uvarum* alone and in combination with salicylic acid or sodium bicarbonate. *Postharvest Biol. Technol.* 100, 160–167. doi:10.1016/j.postharvbio.2014.09.010.
- Quiros, M., Rojas, V., Gonzalez, R., and Morales, P. (2014). Selection of non-*Saccharomyces* yeast strains for reducing alcohol levels in wine by sugar respiration. *Int. J. Food Microbiol.* 181, 85–91. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.024.
- Ramos, J., Sychrová, H., and Kschischo, M. (2016). *Yeast Membrane Transport*. doi:10.1007/978-3-319-25304-6.
- Rapp, A., and Versini, G. (1995). Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wines. *Dev. Food Sci.* 37, 1659–1694. doi:10.1016/S0167-4501(06)80257-8.
- Raspor, P., Mikli, D., Polanc, J., and Smole, S. (2006). Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region , Slovenia. 109, 97–102. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.017.

- Redón, M., Guillamón, J. M., Mas, A., and Rozès, N. (2009). Effect of lipid supplementation upon *Saccharomyces cerevisiae* lipid composition and fermentation performance at low temperature. *Eur. Food Res. Technol.* 228, 833–840. doi:10.1007/s00217-008-0996-6.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., and Dubourdieu, D. (2006). *Handbook of Enology: The Microbiology of Wine and Vinifications*. doi:10.1002/0470010398.
- Robert, P., and Escoufier, Y. (1975). A unifying tool for linear multivariate statistical methods: The RV-coefficient. 25, 257–265.
- Robinson, A. L., Ebeler, S. E., Heymann, H., Boss, P. K., Solomon, P. S., and Trengove, R. D. (2009). Interactions between wine volatile compounds and grape and wine matrix components influence aroma compound headspace partitioning. *J. Agric. Food Chem.* 57, 10313–10322. doi:10.1021/jf902586n.
- Röcker, J., Strub, S., Ebert, K., and Grossmann, M. (2016). Usage of different aerobic non-*Saccharomyces* yeasts and experimental conditions as a tool for reducing the potential ethanol content in wines. *Eur. Food Res. Technol.* 242, 2051–2070. doi:10.1007/s00217-016-2703-3.
- Rodrigues, A. J., Raimbourg, T., Gonzalez, R., and Morales, P. (2016). Environmental factors influencing the efficacy of different yeast strains for alcohol level reduction in wine by respiration. *LWT - Food Sci. Technol.* 65, 1038–1043. doi:10.1016/j.lwt.2015.09.046.
- Rodrigues, F., Ludovico, P., and Leão, C. (2006). Sugar metabolism in yeasts : an overview of aerobic and anaerobic glucose catabolism. *Biodivers. Ecophysiol. Yeasts*, 101–121. doi:10.1007/3-540-30985-3\_6.
- Rodrigues, N., Gonçalves, G., Pereira-Da-Silva, S., Malfeito-Ferreira, M., and Loureiro, V. (2001). Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera/Brettanomyces*. *J. Appl. Microbiol.* 90, 588–599. doi:10.1046/j.1365-2672.2001.01275.x.
- Rolle, L., Englezos, V., Torchio, F., Cravero, F., Río Segade, S., Rantsiou, K., et al. (2017). Alcohol reduction in red wines by technological and microbiological approaches: a comparative study. *Aust. J. Grape Wine Res.* doi:10.1111/ajgw.12301.
- Rollero, S., Bloem, A., Ortiz-Julien, A., Camarasa, C., and Divol, B. (2018). Altered fermentation performances, growth, and metabolic footprints reveal competition for nutrients between yeast species inoculated in synthetic grape juice-like medium. *Front. Microbiol.* 9, 1–12. doi:10.3389/fmicb.2018.00196.

- Rollero, S., Mouret, J. R., Bloem, A., Sanchez, I., Ortiz-Julien, A., Sablayrolles, J. M., et al. (2017). Quantitative<sup>13</sup>C-isotope labelling-based analysis to elucidate the influence of environmental parameters on the production of fermentative aromas during wine fermentation. *Microb. Biotechnol.* 10, 1649–1662. doi:10.1111/1751-7915.12749.
- Rollero, S., Mouret, J. R., Sanchez, I., Camarasa, C., Ortiz-Julien, A., Sablayrolles, J. M., et al. (2016). Key role of lipid management in nitrogen and aroma metabolism in an evolved wine yeast strain. *Microb. Cell Fact.* 15, 1–15. doi:10.1186/s12934-016-0434-6.
- Romagnoli, G., Luttik, M. A. H., Kötter, P., Pronk, J. T., and Daran, J. M. (2012). Substrate specificity of thiamine pyrophosphate-dependent 2-oxo-acid decarboxylases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 7538–7548. doi:10.1128/AEM.01675-12.
- Rosenfeld, E., Beauvoit, B., Blondin, B., and Salmon, J. (2003). Oxygen Consumption by Anaerobic *Saccharomyces cerevisiae* under Enological Conditions : Effect on Fermentation Kinetics. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 113–121. doi:10.1128/AEM.69.1.113.
- Rothe, M., and Schrödter, R. (1996). Flavour Contribution of Ethanol, a Neglected Aroma Compound. *Flavour Sci.*, 348–349. doi:10.1533/9781845698232.6.348.
- Rowen, D. W., Esiobu, N., and Magasanik, B. (1997). Role of GATA factor Nil2p in nitrogen regulation of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 179, 3761–3766.
- 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, 1–11. 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, 243–53. doi:10.1016/j.fm.2012.06.006.
- Salinas, F., Cubillos, F. A., Soto, D., Garcia, V., Bergström, A., Warringer, J., et al. (2012). The genetic basis of natural variation in oenological traits in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* 7. doi:10.1371/journal.pone.0049640.
- Salmon, J. M. (1989). Effect of sugar transport inactivation in *Saccharomyces cerevisiae* on sluggish and stuck enological fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 953–958.

- Salmon, J. M., Fornairon, C., and Barre, P. (1998). Determination of oxygen utilization pathways in an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* during enological fermentation. *J. Ferment. Bioeng.* 86, 154–163. doi:10.1016/S0922-338X(98)80054-8.
- Schägger, H., and Pfeiffer, K. (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J.* 19, 1777–1783. doi:10.1093/emboj/19.8.1777.
- Schmidtke, L. M., Blackman, J. W., and Agboola, S. O. (2012). Production technologies for reduced alcoholic wines. *J. Food Sci.* 77, 25–41. doi:10.1111/j.1750-3841.2011.02448.x.
- Schreiner, R. P., Osborne, J., and Skinkis, P. A. (2017). Nitrogen requirements of pinot noir based on growth parameters, must composition, and fermentation behavior. *Am. J. Enol. Vitic., ajev.* 2017.17043. doi:10.5344/ajev.2017.17043.
- Schweizer, E., and Hofmann, J. (2004). Microbial Type I Fatty Acid Synthases (FAS): Major Players in a Network of Cellular FAS Systems. *Am. Soc. Microbiol.* 68, 501–517. doi:10.1128/MMBR.68.3.501.
- Seguinot, P., Rollero, S., Sanchez, I., Sablayrolles, J. M., Ortiz-Julien, A., Camarasa, C., et al. (2018). Impact of the timing and the nature of nitrogen additions on the production kinetics of fermentative aromas by *Saccharomyces cerevisiae* during winemaking fermentation in synthetic media. *Food Microbiol.* 76, 29–39. doi:10.1016/j.fm.2018.04.005.
- Sentheshanmuganathan, S., and Elsdén, S. R. (1958). The mechanism of the formation of tyrosol by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* 69, 210–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13546168> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1196540>.
- Sentheshanmuganathan, S. (1960). The mechanism of the formation of higher alcohols from amino acids by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* 74, 568–576. doi:10.1042/bj0740568.
- Shakoury-Elizeh, M., Protchenko, O., Berger, A., Cox, J., Gable, K., Dunn, T. M., et al. (2010). Metabolic response to iron deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 285, 14823–14833. doi:10.1074/jbc.M109.091710.
- Shekhawat, K., Bauer, F. F., and Setati, M. E. (2016). Impact of oxygenation on the performance of three non-*Saccharomyces* yeasts in co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101, 2479–2491. doi:10.1007/s00253-016-8001-y.
- Simonin, S., Alexandre, H., Nikolantonaki, M., Coelho, C., and Tourdou-Maréchal, R. (2018).

- Inoculation of *Torulaspora delbrueckii* as a bio-protection agent in winemaking. *Food Res. Int.* 107, 451–461. doi:10.1016/j.foodres.2018.02.034.
- Soden, a, Francis, I. L., Oakey, H., and Henschke, P. a (2000). Effects of co-fermentation with *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and composition of Chardonnay wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* 6, 21–30. doi:10.1111/j.1755-0238.2000.tb00158.x.
- Spayd, S. E., Wample, R. L., Evans, R. G., Stevens, R. G., Seymour, B. J., and Nagel, C. W. (1994). Nitrogen fertilization of White Riesling grapes in Washington. Must and wine composition. *Am. J. Enol. Vitic.* 45, 34–42.
- Spayd, S. E., Wample, R. L., Stevens, R. G., Evans, R. G., and Kawakami, A. K. (1993). Nitrogen fertilization of White Riesling in Washington: Effects on petiole nutrient concentration, yield, yield components, and vegetative growth. *Am. J. Enol. Vitic.* 44, 378–386.
- Spencer, J. F. T., and LaRue, T. A. (1968). The utilization of purines and pyrimidines by yeasts.
- Sprague, G. F. J., and Cronan, J. E. J. (1977). Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants defective in glycerol catabolism. *J. Bacteriol.* 129, 1335–1342.
- Stanbrough, M., and Magasanik, B. (1995). Transcriptional and post-translational regulation of the general amino acid permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 177, 94–102.
- Stanbury, P. F., Whitaker, A., and Hall, S. J. (2013). Principles of fermentation technology. *J. Chem. Inf. Model.* 53, 1689–1699. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- Stines, a P., Grubb, J., Gockowiak, H., Henschke, P. a, Høj, P. B., and van Heeswijck, R. (2000). Proline and arginine accumulation in developing berries of *Vitis vinifera* L. in Australian vineyards: Influence of vine cultivar, berry maturity and tissue type. *Aust. J. Grape Wine Res.* 6, 150–158. doi:10.1111/j.1755-0238.2000.tb00174.x.
- Stock, M., Gerstengarbe, F., Kartschall, T., and Werner, P. (2004). Reliability of climate change impact assessments for viticulture. *Acta Hortic.* 689, 29–40. Available at: [http://www.actahort.org/books/689/689\\_1.htm](http://www.actahort.org/books/689/689_1.htm).
- Strauss, M. L. A., Jolly, N. P., Lambrechts, M. G., and Van Rensburg, P. (2001). Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.* 91, 182–190. doi:10.1046/j.1365-2672.2001.01379.x.
- Styger, G., Jacobson, D., and Bauer, F. F. (2011). Identifying genes that impact on aroma profiles produced by *Saccharomyces cerevisiae* and the production of higher alcohols. *Appl. Microbiol.*

- Biotechnol.* 91, 713–730. doi:10.1007/s00253-011-3237-z.
- Subileau, M., Schneider, R., Salmon, J. M., and Degryse, E. (2008). Nitrogen catabolite repression modulates the production of aromatic thiols characteristic of Sauvignon Blanc at the level of precursor transport. *FEMS Yeast Res.* 8, 771–780. doi:10.1111/j.1567-1364.2008.00400.x.
- Suresh, S., Srivastava, V. C., and Mishra, I. M. (2009). Techniques for oxygen transfer measurement in bioreactors: A review. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 84, 1091–1103. doi:10.1002/jctb.2154.
- Swiegers, J. H., and Pretorius, I. S. (2005). Yeast modulation of wine flavor. *Adv. Appl. Microbiol.* 57, 131–175. doi:10.1016/S0065-2164(05)57005-9.
- Taillandier, P., Ramon Portugal, F., Fuster, A., and Strehaiano, P. (2007). Effect of ammonium concentration on alcoholic fermentation kinetics by wine yeasts for high sugar content. *Food Microbiol.* 24, 95–100. doi:10.1016/j.fm.2006.04.002.
- Tehrany, E. A., Fournier, F., and Desobry, S. (2004). Simple method to calculate octanol-water partition coefficient of organic compounds. *J. Food Eng.* 64, 315–320. doi:10.1016/j.jfoodeng.2003.10.015.
- Tesnière, C., Brice, C., and Blondin, B. (2015). Responses of *Saccharomyces cerevisiae* to nitrogen starvation in wine alcoholic fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 7025–7034. doi:10.1007/s00253-015-6810-z.
- Tesnière, C., Delobel, P., Pradal, M., and Blondin, B. (2013). Impact of nutrient imbalance on wine alcoholic fermentations: Nitrogen excess enhances yeast cell death in lipid-limited must. *PLoS One* 8. doi:10.1371/journal.pone.0061645.
- Tesnière, C., Pradal, M., Bessière, C., Sanchez, I., Blondin, B., and Bigey, F. (2017). Relief from nitrogen starvation triggers a transient destabilization of glycolytic mRNAs in *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Mol. Biol. Cell* 29, 490. doi:10.1091/mbc.E17-01-0061.
- Thibon, C., Marullo, P., Claisse, O., Cullin, C., Dubourdieu, D., and Tominaga, T. (2008). Nitrogen catabolic repression controls the release of volatile thiols by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *FEMS Yeast Res.* 8, 1076–1086. doi:10.1111/j.1567-1364.2008.00381.x.
- Tofalo, R., Patrignani, F., Lanciotti, R., Perpetuini, G., Schirone, M., Di Gianvito, P., et al. (2016). Aroma profile of montepulciano d’abruzzo wine fermented by single and co-culture starters of autochthonous *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts. *Front. Microbiol.* 7, 1–12. doi:10.3389/fmicb.2016.00610.

- Tofalo, R., Schirone, M., Torriani, S., Rantsiou, K., Cocolin, L., Perpetuini, G., et al. (2012). Diversity of *Candida zemplinina* strains from grapes and Italian wines. *Food Microbiol.* 29, 18–26. doi:10.1016/j.fm.2011.08.014.
- Torrea, D., Varela, C., Ugliano, M., Ancin-Azpilicueta, C., Leigh Francis, I., and Henschke, P. A. (2011). Comparison of inorganic and organic nitrogen supplementation of grape juice - Effect on volatile composition and aroma profile of a Chardonnay wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *Food Chem.* 127, 1072–1083. doi:10.1016/j.foodchem.2011.01.092.
- Treeby, M. T., Holzapfel, B. P., Walker, R. R., and Nicholas, P. R. (1998). Profiles of free amino acids in grapes of grafted Chardonnay grapevines. *Aust. J. Grape Wine Res.* 4, 121–126. doi:10.1111/j.1755-0238.1998.tb00140.x.
- Tronchoni, J., Curiel, J. A., Sáenz-Navajas, M. P., Morales, P., De-la-Fuente-Blanco, A., Fernández-Zurbano, P., et al. (2017). Aroma profiling of an aerated fermentation of natural grape must with selected yeast strains at pilot scale. *Food Microbiol.* 70, 214–223. doi:10.1016/j.fm.2017.10.008.
- Ugliano, M., Fedrizzi, B., Siebert, T., Travis, B., Magno, F., Versini, G., et al. (2009). Effect of nitrogen supplementation and *Saccharomyces* species on hydrogen sulfide and other volatile sulfur compounds in Shiraz fermentation and wine. *J. Agric. Food Chem.* 57, 4948–4955. doi:10.1021/jf8037693.
- Ugliano, M., Siebert, T., Mercurio, M., Capone, D., and Henschke, P. A. (2008). Volatile and color composition of young and model-aged shiraz wines as affected by diammonium phosphate supplementation before alcoholic fermentation. *J. Agric. Food Chem.* 56, 9175–9182. doi:10.1021/jf801273k.
- Ugliano, M., Travis, B., Francis, I. L., and Henschke, P. A. (2010). Volatile composition and sensory properties of Shiraz wines as affected by nitrogen supplementation and yeast species: Rationalizing nitrogen modulation of wine aroma. *J. Agric. Food Chem.* 58, 12417–12425. doi:10.1021/jf1027137.
- Urrestarazu, A., Vissers, S., Iraqui, I., and Grenson, M. (1998). Phenylalanine- and tyrosine-auxotrophic mutants of *Saccharomyces cerevisiae* impaired in transamination. *Mol. Gen. Genet.* 257, 230–237. doi:10.1007/s004380050643.
- Valadi, H., Larsson, C., and Gustafsson, L. (1998). Improved ethanol production by glycerol-3-phosphate dehydrogenase mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*

50, 434–439. doi:10.1007/s002530051317.

- Van Dijken, J. P., Van Den Bosch, E., Hermans, J. J., De Miranda, L. R., and Scheffers, W. A. (1986). Alcoholic fermentation by 'non-fermentative' yeasts. *Yeast* 2, 123–127. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/yea.320020208/abstract>.
- Van Leeuwen, C., Friant, P., Soyer, J. P., Molot, C., Chone, X., and Dubourdieu, D. (2000). Measurement of total nitrogen and assimilable nitrogen in grape juice to assess vine nitrogen status. *J. Int. des Sci. la Vigne du Vin* 34, 75–82.
- Van Roermund, C. W. T., Waterham, H. R., IJlst, L., and Wanders, R. J. A. (2003). Fatty acid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 1838–1851. doi:10.1007/s00018-003-3076-x.
- Vanlerberghe, G. C., and McIntosh, L. (1997). Alternative oxidase: from gene to function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 703–734. doi:10.1146/annurev.arplant.48.1.703.
- Varela, C. (2016). The impact of non-Saccharomyces yeasts in the production of alcoholic beverages. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 9861–9874. doi:10.1007/s00253-016-7941-6.
- Varela, C., Pizarro, F., and Agosin, E. (2004). Biomass content governs fermentation rate in nitrogen-deficient wine musts. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3392–3400. doi:10.1128/AEM.70.6.3392-3400.2004.
- Varela, J., and Varela, C. (2019). Microbiological strategies to produce beer and wine with reduced ethanol concentration. *Curr. Opin. Biotechnol.* 56, 88–96. doi:10.1016/j.copbio.2018.10.003.
- Verduyn, C. (1991). Physiology of yeast in relation to biomass yields.pdf. *Biomed. Life Sci.* 60, 325–353.
- Verduyn, C., Postma, E., Scheffers, W. A., and van Dijken, J. P. (1990). Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose-limited chemostat cultures. *J. Gen. Microbiol.* 136, 395–403. doi:10.1099/00221287-136-3-395.
- Vilanova, M., Siebert, T. E., Varela, C., Pretorius, I. S., and Henschke, P. A. (2012). Effect of ammonium nitrogen supplementation of grape juice on wine volatiles and non-volatiles composition of the aromatic grape variety Albariño. *Food Chem.* 133, 124–131. doi:10.1016/j.foodchem.2011.12.082.
- Vilanova, M., Ugliano, M., Varela, C., Siebert, T., Pretorius, I. S., and Henschke, P. A. (2007). Assimilable nitrogen utilisation and production of volatile and non-volatile compounds in

- chemically defined medium by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77, 145–157. doi:10.1007/s00253-007-1145-z.
- von Jagow, G., and Klingenberg, M. (1970). Pathways of hydrogen in mitochondria of *Saccharomyces carlsbergensis*. *Eur. J. Biochem.* 12, 583–592. doi:10.1111/j.1432-1033.1970.tb00890.x.
- Wang, C., Mas, A., and Esteve-Zarzoso, B. (2015). Interaction between *Hanseniaspora uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 206, 67–74. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.022.
- Wang, X., Glawe, D. A., Kramer, E., Weller, D., and Okubara, P. A. (2018). Biological control of *Botrytis cinerea*: interactions with native vineyard yeasts from Washington State. *Phytopathology*, 1–40. doi:10.1094/PHYTO-09-17-0306-R.
- Watson, B., Godard, M., and Chen, H. (2000). Manipulating soil moisture and nitrogen availability Part II : Effects on pinot noir must and wine composition.
- Whitener, M. E. B., Stanstrup, J., Carlin, S., Divol, B., Du Toit, M., and Vrhovsek, U. (2017). Effect of non- *Saccharomyces* yeasts on the volatile chemical profile of Shiraz wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* doi:10.1111/ajgw.12269.
- Yang, Y., Yamashita, T., Nakamaru-Ogiso, E., Hashimoto, T., Murai, M., Igarashi, J., et al. (2011). Reaction mechanism of single subunit NADH-ubiquinone oxidoreductase (Ndi1) from *Saccharomyces cerevisiae*: Evidence for a ternary complex mechanism. *J. Biol. Chem.* 286, 9287–9297. doi:10.1074/jbc.M110.175547.
- Yunoki, K., Yasui, Y., Hirose, S., and Ohnishi, M. (2005). Fatty acids in must prepared from 11 grapes grown in Japan: Comparison with wine and effect on fatty acid ethyl ester formation. *Lipids* 40, 361–367. doi:10.1007/s11745-006-1395-z.
- Zaborske, J. M., Wu, X., Wek, R. C., and Pan, T. (2010). Selective control of amino acid metabolism by the GCN2 eIF2 kinase pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Biochem.* 11, 29. doi:10.1186/1471-2091-11-29.
- Zhang, P., Wu, X., Needs, S., Liu, D., Fuentes, S., and Howell, K. (2017). The influence of apical and basal defoliation on the canopy structure and biochemical composition of *Vitis vinifera* cv. Shiraz grapes and wine. *Front. Chem.* 5, 1–9. doi:10.3389/fchem.2017.00048.
- Zhang, W., Du, G., Zhou, J., and Chen, J. (2018). Regulation of Sensing, Transportation, and Catabolism of Nitrogen Sources in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 82, 1–29.

Zhang, Y. Q., Gamarra, S., Garcia-Effron, G., Park, S., Perlin, D. S., and Rao, R. (2010). Requirement for ergosterol in V-ATPase function underlies antifungal activity of azole drugs. *PLoS Pathog.* 6. doi:10.1371/journal.ppat.1000939.

## Annexes

---

**Table 4.1** Fungal amino acid transporters of known function

| Superfamily | Family | Organism             | Name | Location | Specificity                                                                 | References                                                              |
|-------------|--------|----------------------|------|----------|-----------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| APC         | YAT    | <i>S. cerevisiae</i> | Agp1 | pm       | Broad-specificity, relatively-low-affinity, neutral amino-acid permease     | Iraqui et al. (1999), Regenberget al. (1999), and Schreve et al. (1998) |
| APC         | YAT    | <i>S. cerevisiae</i> | Agp2 | pm       | Proposed role in carnitine, polyamine and amino-acid transport              | Schreve and Garrett (2003) and van Roermund et al. (1999)               |
| APC         | YAT    | <i>S. cerevisiae</i> | Agp3 | pm       | Low-affinity uptake of branched-chain and aromatic amino acids              | Schreve and Garrett (2003)                                              |
| APC         | YAT    | <i>S. cerevisiae</i> | Alp1 | pm       | Arginine, unknown conditions of expression                                  | Regenberget al. (1999) and Sychrova and Chevallier (1994)               |
| APC         | YAT    | <i>S. cerevisiae</i> | Bap2 | pm       | Branched chain and aliphatic amino acids                                    | Grauslund et al. (1995) and Regenberget al. (1999)                      |
| APC         | YAT    | <i>S. cerevisiae</i> | Bap3 | pm       | Broad-specificity, neutral amino-acid permease                              | Didion et al. (1998), Iraqui et al. (1999), and Regenberget al. (1999)  |
| APC         | YAT    | <i>S. cerevisiae</i> | Can1 | pm       | High affinity Arg permease, also transports Lys and His with lower affinity | Grenson et al. (1966) and Hoffmann (1985)                               |
| APC         | YAT    | <i>S. cerevisiae</i> | Dip5 | pm       | Asp, Glu permease, also transports Gln, Asn, Ser, Ala, and Gly              | Regenberget al. (1998, 1999)                                            |
| APC         | YAT    | <i>S. cerevisiae</i> | Gap1 | pm       | General amino acid permease                                                 | Grenson et al. (1970) Jauniaux and Grenson (1990)                       |
| APC         | YAT    | <i>S. cerevisiae</i> | Gnp1 | pm       | Broad-specificity, relatively-low-affinity, neutral amino-acid permease     | Iraqui et al. (1999), Regenberget al. (1999), and Zhu et al. (1996)     |
| APC         | YAT    | <i>S. cerevisiae</i> | Hip1 | pm       | His                                                                         | Tanaka and Fink (1985)                                                  |
| APC         | YAT    | <i>S. cerevisiae</i> | Lyp1 | pm       | Lys                                                                         | Sychrova and Chevallier (1993)                                          |
| APC         | YAT    | <i>S. cerevisiae</i> | Mmp1 | pm       | s-methylmethionine permease                                                 | Rouillon et al. (1999)                                                  |
| APC         | YAT    | <i>S. cerevisiae</i> | Put4 | pm       | High affinity Pro permease, also transports Gly, Ala, GABA and L-AZC        | Vandenbol et al. (1989)                                                 |
| APC         | YAT    | <i>S. cerevisiae</i> | Sam3 | pm       | S-adenosylmethionine permease                                               | Rouillon et al. (1999) and Uemura et al. (2007)                         |

(continued)

**Table 4.1** (continue)

| Superfamily | Family | Organism              | Name | Location | Specificity                                                                            | References                                                                |
|-------------|--------|-----------------------|------|----------|----------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| APC         | YAT    | <i>S. cerevisiae</i>  | Ssy1 | pm       | Sensor of extracellular amino acids (mostly neutral amino acids)                       | Didion et al. (1998) and Iraqui et al. (1999)                             |
| APC         | YAT    | <i>S. cerevisiae</i>  | Tat1 | pm       | Transporter of Val, Leu, Ile and Tyr; low-affinity Trp and His transporter             | Bajmoczy et al. (1998), Regenberget al. (1999), and Schmidt et al. (1994) |
| APC         | YAT    | <i>S. cerevisiae</i>  | Tat2 | pm       | High affinity for Trp and Tyr, also contributes to Phe, Ala, Gly and Cys uptake        | Regenberget al. (1999) and Schmidt et al. (1994)                          |
| APC         | YAT    | <i>S. pastorianus</i> | Tat3 | pm       | Aromatic amino acids, Leu                                                              | Omura et al. (2007)                                                       |
| APC         | YAT    | <i>A. nidulans</i>    | PmbB | pm       | Pro                                                                                    | Sophianopoulou and Scazzocchio (1989)                                     |
| APC         | YAT    | <i>A. nidulans</i>    | AgtA | pm       | Asp, Glu                                                                               | Apostolaki et al. (2009)                                                  |
| APC         | LAT    | <i>S. cerevisiae</i>  | Mup1 | pm       | High affinity for Met, also involved in Cys transport                                  | Isnard et al. (1996) and Kosugi et al. (2001)                             |
| APC         | LAT    | <i>S. cerevisiae</i>  | Mup3 | pm       | Low affinity Met permease                                                              | Isnard et al. (1996)                                                      |
| APC         | ACT    | <i>S. cerevisiae</i>  | Uga4 | pm       | GABA                                                                                   | André et al. (1993)                                                       |
| APC         | ACT    | <i>S. cerevisiae</i>  | Hnm1 | pm       | Choline, ethanolamine, and carnitine                                                   | Li et al. (1991)                                                          |
| APC         | ACT    | <i>A. nidulans</i>    | GabA | pm       | GABA                                                                                   | Hutchings et al. (1999)                                                   |
| APC         | AAAP   | <i>S. cerevisiae</i>  | Avt1 | vac      | Tyr, Gln, Asn, Ile and Leu transporter                                                 | Russnak et al. (2001)                                                     |
| APC         | AAAP   | <i>S. cerevisiae</i>  | Avt3 | vac      | Tyr, Gln, Asn, Ile and Leu exporter                                                    | Russnak et al. (2001)                                                     |
| APC         | AAAP   | <i>S. cerevisiae</i>  | Avt4 | vac      | Tyr, Gln, Asn, Ile and Leu exporter                                                    | Russnak et al. (2001)                                                     |
| APC         | AAAP   | <i>S. cerevisiae</i>  | Avt6 | vac      | Glu and Asp exporter                                                                   | Chahomchuen et al. (2009)                                                 |
| MFS         | DHA1   | <i>S. cerevisiae</i>  | Aqr1 | ves      | Vesicular amino-acid transporter involved in excretion of homoserine, Thr and other aa | Velasco et al. (2004)                                                     |
| MFS         | V-BAAT | <i>S. cerevisiae</i>  | Vba1 | vac      | Transporter involved in vacuolar sequestration of Lys and His                          | Shimazu et al. (2005)                                                     |

|     |        |                      |       |     |                                                                                |                           |
|-----|--------|----------------------|-------|-----|--------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| MFS | V-BAAT | <i>S. cerevisiae</i> | Vba2  | vac | Transporter involved in vacuolar sequestration of Arg, His, Lys and Tyr        | Shimazu et al. (2005)     |
| MFS | DHA2   | <i>S. cerevisiae</i> | Vba3  | vac | Transporter involved in vacuolar sequestration of His and Lys                  | Shimazu et al. (2005)     |
| MFS | UMF1   | <i>S. cerevisiae</i> | Atg22 | vac | Transporter catalyzing efflux of amino acids from the vacuole during autophagy | Yang et al. (2006)        |
| MFS | ACS    | <i>S. cerevisiae</i> | Yct1  | pm  | Cysteine                                                                       | Kaur and Bachhawat (2007) |
| TOG | LCT    | <i>S. cerevisiae</i> | Ypq1  | vac | Basic amino acid exporter of the vacuole                                       | Jézégou et al. (2012)     |
| TOG | LCT    | <i>S. cerevisiae</i> | Ypq2  | vac | Basic amino acid exporter of the vacuole                                       | Jézégou et al. (2012)     |
| TOG | LCT    | <i>S. cerevisiae</i> | Ypq3  | vac | Basic amino acid exporter of the vacuole                                       | Jézégou et al. (2012)     |
| TOG | LCT    | <i>S. cerevisiae</i> | Ers1  | vac | Vacuolar and endosomal cysteine exporter                                       | Gao et al. (2005)         |
| MC  | MC     | <i>S. cerevisiae</i> | Cre1  | mit | Mitochondrial carnitine transporter                                            | Palmieri et al. (2000)    |
| MC  | MC     | <i>S. cerevisiae</i> | Orr1  | mit | Mitochondrial ornithine exporter                                               | Palmieri et al. (1997)    |
| MC  | MC     | <i>S. cerevisiae</i> | Agc1  | mit | Mitochondrial glutamate uniporter and Asp-Glu exchanger                        | Cavero et al. (2003)      |

Abbreviations used in the table but not in the text: *UMF1* unidentified major facilitator 1, *pm*, plasma membrane, *vac* vacuole, *mit* mitochondria, *ves* vesicles

| Amino acid permease family                                 |           |                                                                                                                                      |                                    |                                                                                             |
|------------------------------------------------------------|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| Systematic name                                            | Gene name | Functional description (substrate specificity)                                                                                       | Regulation                         | Reference                                                                                   |
| <i>Core - Cluster I<sup>a</sup> – SPS sensor regulated</i> |           |                                                                                                                                      |                                    |                                                                                             |
| YCL025c                                                    | AGP1      | Broad substrate range, medium capacity permease (Val, Ile, Phe, Met, Ser, Leu, Thr, Cys, Asn, Tyr, Ala, Gly, Gln) <sup>b</sup> (Pro) | SPS-sensor, NCR, GAAC <sup>c</sup> | Andréasson <i>et al.</i> (2004); Iraqui <i>et al.</i> (1999); Schreve <i>et al.</i> (1998)  |
| YBR068c                                                    | BAP2      | Branched-chain amino acid permease (Val, Ile, Phe, Tyr, Leu, Trp, Met, Cys, Ala) <sup>b</sup>                                        | SPS-sensor, GAAC <sup>c</sup>      | Grauslund <i>et al.</i> (1995)                                                              |
| YDR046c                                                    | BAP3      | Branched-chain amino acid permease (Val, Ile, Phe, Tyr, Trp, Leu, Met, Cys, Thr, Ala) <sup>b</sup>                                   | SPS-sensor                         | Didion <i>et al.</i> (1998)                                                                 |
| YDR508c                                                    | GNP1      | High-affinity glutamine permease (Thr, Gln, Ser, Cys, Leu, Met, Asn) <sup>b</sup> (Pro)                                              | SPS-sensor                         | Andréasson <i>et al.</i> (2004); Zhu <i>et al.</i> (1996)                                   |
| YBR069c                                                    | TAT1      | Tyrosine and tryptophan permease (Val, Thr) <sup>b</sup> (low-affinity His), (Leu)                                                   | SPS-sensor                         | Bajmoczy <i>et al.</i> (1998); Schmidt <i>et al.</i> (1994)                                 |
| YOL020w                                                    | TAT2      | High-affinity tryptophan permease (Phe, Tyr, Trp, Gly, Ala) <sup>b</sup>                                                             | SPS-sensor                         | Schmidt <i>et al.</i> (1994)                                                                |
| <i>Core - Cluster II</i>                                   |           |                                                                                                                                      |                                    |                                                                                             |
| YKR039w                                                    | GAP1      | General, high-capacity, amino acid permease (all L-amino acids, D-amino acids, GABA, peptides, polyamines)                           | NCR, GAAC <sup>c</sup>             | André <i>et al.</i> (1993); Jauniaux and Grenson (1990); van Zeebroeck <i>et al.</i> (2009) |
| YGR191w                                                    | HIP1      | Histidine permease                                                                                                                   |                                    | Tanaka and Fink (1985)                                                                      |
| YLL061w                                                    | MMP1      | High-affinity S-methyl methionine permease                                                                                           |                                    | Rouillon <i>et al.</i> (1999)                                                               |
| YPL274w                                                    | SAM3      | High-affinity S-adenosyl methionine permease; High-affinity putrescine, spermidine, spermine (polyamine)                             |                                    | Rouillon <i>et al.</i> (1999); Uemura <i>et al.</i> (2007)                                  |
| <i>Core - Cluster III</i>                                  |           |                                                                                                                                      |                                    |                                                                                             |
| YEL063c                                                    | CAN1      | Arginine permease (Arg)                                                                                                              | NCR, GAAC <sup>c</sup>             | Hoffmann (1985)                                                                             |
| YNL270c                                                    | ALP1      | Arginine permease (Arg) <sup>b</sup>                                                                                                 |                                    | Sychrova and Chevallier (1994)                                                              |
| YNL268w                                                    | LYP1      | Lysine permease (Lys, Met) <sup>b</sup>                                                                                              | GAAC <sup>c</sup>                  | Sychrova and Chevallier (1993)                                                              |
| <i>Core - Unclustered</i>                                  |           |                                                                                                                                      |                                    |                                                                                             |
| YOR348c                                                    | PUT4      | High-affinity proline permease (Val, Ala, Pro) <sup>b</sup> (GABA)                                                                   | NCR                                | André <i>et al.</i> (1993); Jauniaux <i>et al.</i> (1987)                                   |
| YPL265w                                                    | DIPS      | Dicarboxylic amino acid permease (Ser, Ala, Asn, Asp, Gln, Gly, Gln) <sup>b</sup>                                                    | NCR                                | Regenberg <i>et al.</i> (1998)                                                              |
| YDR160w                                                    | SSY1      | Receptor component of the SPS sensor                                                                                                 |                                    | Didion <i>et al.</i> (1998); Iraqui <i>et al.</i> (1999); Klasson <i>et al.</i> (1999)      |
| YBR132c                                                    | AGP2      | Carnitine, spermidine, putrescine (polyamine)                                                                                        |                                    | Aouida <i>et al.</i> (2005); van Roermund <i>et al.</i> (1999)                              |

(continued)

| Amino acid permease family |             |                                                                                    |                   |                                                            |
|----------------------------|-------------|------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|------------------------------------------------------------|
| Systematic name            | Gene name   | Functional description (substrate specificity)                                     | Regulation        | Reference                                                  |
| YFL055w                    | <i>AGP3</i> | Broad-substrate specificity amino acid permease (Asp, Glu, Ser) <sup>P</sup> (Met) |                   | Menant <i>et al.</i> (2006); Regenber <i>et al.</i> (1999) |
| Non-core - MUP Cluster     |             |                                                                                    |                   |                                                            |
| YGR055w                    | <i>MUP1</i> | High-affinity methionine permease (Cys)                                            |                   | Isnard <i>et al.</i> (1996); Kosugi <i>et al.</i> (2001)   |
| YHL036w                    | <i>MUP3</i> | Low-affinity methionine permease; inhibited by broad-substrate spectrum (Met)      | GAAC <sup>c</sup> | Isnard <i>et al.</i> (1996)                                |
| Non-core - UGA Cluster     |             |                                                                                    |                   |                                                            |
| YDL210w                    | <i>UGA4</i> | GABA permease (δ-aminolevulinic acid, putrescine) vacuole localization             | NCR               | André <i>et al.</i> (1993); Uemura <i>et al.</i> (2004)    |
| YKL174c                    | <i>TPO5</i> | Polyamine secretion, Golgi localization                                            |                   | Tachihara <i>et al.</i> (2005)                             |
| YGL077c                    | <i>HNH1</i> | Choline permease (ethanolamine)                                                    | INO regulon       | Nikawa <i>et al.</i> (1986)                                |
| YNR056c                    | <i>BIO5</i> | Biotin permease (7-keto 8-aminopelargonic acid)                                    |                   | Phalip <i>et al.</i> (1999)                                |
| Ammonium permease family   |             |                                                                                    |                   |                                                            |
| YGR121C                    | <i>MEP1</i> | Medium-affinity, high-capacity ammonium permease                                   | NCR               | Marini <i>et al.</i> (1994)                                |
| YNL142W                    | <i>MEP2</i> | High-affinity, low-capacity ammonium permease, ammonium sensor                     | NCR               | Lorenz and Heitman (1998); Marini <i>et al.</i> (1997)     |
| YPR138C                    | <i>MEP3</i> | Low-affinity, high-capacity ammonium permease                                      | NCR               | Marini <i>et al.</i> (1997)                                |

Annexe 2 : Transporteurs des acides aminés et ammonium chez *S. cerevisiae* (Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012)

| <b>Compounds</b>               | <b>g/L</b> |
|--------------------------------|------------|
| Glucose                        | 44,5       |
| Potassium dihydrogen phosphate | 1,78       |
| Magnesium sulphate             | 0,89       |
| Calcium chloride fused         | 0,178      |
| Sodium chloride                | 0,089      |
| Adenine                        | 0,00178    |
| DL-methionine                  | 0,000891   |
| L-histidine                    | 0,000891   |
| DL-tryptophane                 | 0,000891   |
| Boric acid                     | 0,0000089  |
| Zinc sulphate                  | 0,0000356  |
| Ammonium molybdate             | 0,0000178  |
| Manganese sulphate             | 0,0000356  |
| Ferrous sulphate               | 0,0002225  |
| Lysine                         | 1,0        |
| Inositol                       | 0,02       |
| Calcium pantothenate           | 0,002      |
| Aneurine                       | 0,0004     |
| Pyridoxine                     | 0,0004     |
| p-aminobenzoic acid            | 0,0002     |
| Nicotinic acid                 | 0,0004     |
| Riboflavin                     | 0,0002     |
| Biotin                         | 0,000002   |
| Folic acid                     | 0,000001   |
| Agar                           | 17,8       |

Annexe 3 : Composition du milieu Lysine (Oxoid LTD., England)