



**HAL**  
open science

# Vers une meilleure exploitation du potentiel enzymatique et métabolique de *Metschnikowia pulcherrima* et *Torulaspora delbrueckii* pour la production d'arômes en fermentation oenologique

Pauline Seguinot

## ► To cite this version:

Pauline Seguinot. Vers une meilleure exploitation du potentiel enzymatique et métabolique de *Metschnikowia pulcherrima* et *Torulaspora delbrueckii* pour la production d'arômes en fermentation oenologique. Biotechnologies. Université de Montpellier, 2019. Français. NNT : . tel-02957583

**HAL Id: tel-02957583**

**<https://hal.science/tel-02957583v1>**

Submitted on 5 Oct 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biotechnologie et Microbiologie

École doctorale GAIA – Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau

Unité de recherche Sciences Pour l'Œnologie (UMR SPO)

Vers une meilleure exploitation du potentiel enzymatique  
et métabolique de *Metschnikowia pulcherrima* et  
*Torulaspota delbrueckii* pour la production d'arômes en  
fermentation œnologique

Présentée par Pauline SEGUINOT  
Le 18 Novembre 2019

Sous la direction de Carole CAMARASA

Devant le jury composé de

Mme Isabelle MASNEUF-POMAREDE, Professeure, Bordeaux Sciences Agro, Bordeaux, France	Rapporteuse
M. Jean-Luc PARROU, Chargé de Recherche, CNRS, Toulouse, France	Rapporteur
M. José Manuel GUILLAMON NAVARRO, Professeur, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, Valencia, Espagne	Examineur
Mme Carole CAMARASA, Directrice de recherche, INRA, Montpellier, France	Directrice de thèse
Mme Anne ORTIZ-JULIEN, Directrice R&D Levures et Nutriments, Lallemand SAS, Blagnac, France	Invitée



UNIVERSITÉ  
DE MONTPELLIER

# TABLE DES MATIERES

<b>Abréviations</b> .....	1
<b>Introduction générale</b> .....	3
<b>Introduction bibliographique</b> .....	8
1. La fermentation œnologique .....	9
1.1. Présentation .....	9
1.2. Déroulement de la fermentation .....	10
1.2.1. Phase de latence .....	10
1.2.2. Phase de croissance .....	11
1.2.3. Phase stationnaire.....	11
2. Diversité des souches œnologiques.....	11
2.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	12
2.1.1. Présentation et rôle en fermentation .....	12
2.1.2. Métabolisme carboné en conditions fermentaires .....	14
2.1.3. Métabolisme azoté en fermentation .....	16
2.2. Les levures non- <i>Saccharomyces</i> .....	20
2.2.1. Diversité et dynamique .....	21
2.2.2. <i>T. delbrueckii</i> .....	24
2.2.3. <i>M. pulcherrima</i> .....	28
3. Les arômes.....	29
3.1. Les arômes du vin .....	29
3.2. Les arômes variétaux.....	31
3.2.1. Thiols variétaux .....	32
3.2.2. Terpènes variétaux.....	35
3.3. Les arômes fermentaires .....	37
3.3.1. Présentation .....	37
3.3.2. Métabolisme des arômes .....	38
4. Effet des paramètres environnementaux .....	45
4.1. Sucre et éthanol.....	45

4.2.	Azote.....	46
4.2.1.	Impact de l'azote sur le déroulement de la fermentation.....	46
4.2.2.	Impact de l'azote sur la production d'arômes .....	48
4.3.	Lipides et oxygène .....	50
4.4.	Température.....	51
4.5.	Vitamines et oligo-éléments.....	52
4.6.	Dioxyde de soufre.....	53
5.	Interactions entre les levures.....	54
5.1.	Interaction de contact cellule-cellule .....	54
5.2.	Compétition pour la consommation de nutriments .....	55
5.3.	Production de composés toxiques et effet killer.....	56
5.4.	Changements transcriptomiques .....	57
	<b>Matériels et Méthodes.....</b>	<b>59</b>
1.	Levures .....	60
2.	Milieus synthétiques .....	60
3.	Moûts naturels .....	63
4.	Fermentation et suivi cinétique .....	64
4.1.	Fermentation en 1 L .....	64
4.2.	Fermentation en 250 mL .....	65
4.3.	Fermentation en 15 mL .....	66
4.4.	Suivi des cinétiques fermentaires.....	67
5.	Dosages .....	68
5.1.	Biomasse.....	68
5.1.1.	Compteur de cellules.....	68
5.1.2.	Etallement sur boîte de pétri .....	68
5.1.3.	Masse sèche .....	70
5.1.4.	Dosage des protéines dans la biomasse .....	70
5.2.	Azote.....	71
5.2.1.	Ammonium.....	71
5.2.2.	Acides aminés libres .....	71
5.2.3.	Acides aminés protéinogéniques .....	73
5.3.	Métabolites carbonés.....	74



5.4.	Arômes.....	75
5.4.1.	Alcools supérieurs, esters et acides .....	75
5.4.2.	Précurseurs de thiols.....	78
5.4.3.	Autres arômes variétaux (hors thiols).....	80
5.5.	Suivi des activités enzymatiques .....	81
5.5.1.	Glycosidases .....	81
5.5.2.	B-lyases.....	82
6.	Filiation isotopique.....	83
6.1.	Quantification isotopique des acides aminés protéinogéniques.....	83
6.1.1.	Extraction des acides aminés protéinogéniques.....	84
6.1.2.	Dérivatisation à l'éthylchloroformate (ECF).....	84
6.1.3.	Dérivatisation au N,O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (BSTFA).....	84
6.1.4.	Analyses en GC-MS.....	84
6.2.	Quantification isotopique des composés d'arôme .....	87
7.	Analyses statistiques .....	89
7.1.	Détermination des paramètres cinétiques.....	89
7.2.	Plan de Box-Behnken.....	90
7.3.	Clusterisation.....	91
	<b>Résultats</b> .....	89
	<b>Chapitre 1:</b> Fermentation, croissance et production d'arômes en fonction de la source d'azote disponible.....	90
I.	Nitrogen sources preferences of non- <i>Saccharomyces</i> yeasts to sustain growth and fermentation under winemaking conditions .....	94
II.	Analysing the impact of the nature of the nitrogen source on the formation of volatile compounds to unravel the aroma metabolism of two non- <i>Saccharomyces</i> strains .....	103
	<b>Chapitre 2:</b> Suivi du devenir de l'azote dans le métabolisme par filiation isotopique.....	152
	<b>Chapitre 3:</b> Effet de la composition du moût sur la fermentation en inoculation séquentielle.....	185
I.	Mise au point et validation de dosage des activités glycosidases, protéases et $\beta$ -lyase pour une application en fermentation alcoolique .....	186
II.	Impact of must parameters on the fermentation and production of aroma compounds in sequential inoculation with <i>M. pulcherrima</i> and <i>S. cerevisiae</i> .....	204

III. Effet des paramètres fermentaires en inoculation séquentielle avec <i>T. delbrueckii</i> .....	252
IV. Suivi de la consommation de précurseurs de thiols par <i>M. pulcherrima</i> et <i>S. cerevisiae</i> .....	264
<b>Chapitre 4:</b> Influence de <i>M. pulcherrima</i> et <i>T. delbrueckii</i> en fermentation séquentielle sur la production d'arôme en moût naturel.....	274
<b>Conclusion générale et perspectives</b> .....	307
<b>Liste des figures</b> .....	318
<b>Liste des tableaux</b> .....	327
<b>Références bibliographiques</b> .....	332

# ABREVIATIONS

3MH	3-mercaptohexan-1-ol
3MHA	Acétate de 3-mercaptohexyle
4MMP	4-mercapto-4-méthylpentan-2-one
ACP	Analyse en composantes principales
ADN	Acide désoxyribonucléique
$\alpha$ -KG	$\alpha$ -cétoglutarate
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BCFA	Branched chain fatty acids
BSTFA	N,O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide
Cys-3MH, Cys-4MMP	Précurseurs cystéinylés du 3MH et de la 4MMP
DAP	Diammonium phosphate
DO	Densité optique
ECF	Ethylchloroformate
eV	Electron volt
g, mg, $\mu$ g	Gramme, milligramme, microgramme
G-3MH, G-4MMP	Précurseurs glutathionylés du 3MH et de la 4MMP
GAAC	General amino acids control
GC-MS	Gas chromatography-mass spectrometry
h, min, s	Heure, minute, seconde
HPLC	High performance liquid chromatography
KIC	$\alpha$ -keto-isocaproate
KIV	$\alpha$ -keto-isovalerate
L, mL, $\mu$ L	Litre, millilitre, microlitre
LSA	Levures sèches actives
M, mM, $\mu$ M	Molaire, millimolaire, micromolaire
MCC	Métabolisme carboné central
MCFA	Medium-chain fatty acid
mgN/L	Milligramme d'azote assimilable par litre

mol, mmol, $\mu$ mol	Mole, millimole, micromole
M. pulcherrima, MP	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
MSXXX, SMXXX	Moût synthétique contenant XXX mgN/L
m/z	Rapport masse sur charge
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamide adénine dinucléotide, forme oxydée
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide, forme réduite
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme oxydée
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme réduite
NCR	Nitrogen catabolite repression
NS	Non- <i>Saccharomyces</i>
NTU	Unité de turbidité néphélométrique
rpm	Rotation par minute
<i>S. cerevisiae</i> , SC	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SIM	Single Ion Monitoring
TCA	Tricarboxylic acid
<i>T. delbrueckii</i> , TD	<i>Torulasporea delbrueckii</i>
UFC	Unité formatrice de colonie
VPP	Voie des pentoses phosphates
YPD	Yeast extract peptone dextrose

---

# INTRODUCTION GENERALE

---

Depuis des milliers d'années, les Hommes produisent et consomment du vin. De tout temps, les Hommes ont essayé de comprendre les mécanismes jouant dans la production du vin afin de la maîtriser et de l'améliorer. Ainsi en 1789, Lavoisier fut le premier à décrire en détail la fermentation alcoolique, alors considérée comme une réaction purement chimique. En complétant ces résultats, Guy-Lussac proposa l'équation chimique décrivant la transformation du sucre en éthanol et CO<sub>2</sub> en 1810. La première levure œnologique fut observée au microscope en 1825 par Colin. Mais c'est grâce aux travaux de Cagniard-Latour, Kützing et Schwann que la levure fut considérée comme un organisme vivant. C'est également Schwann qui mis en évidence la nécessité d'une source d'azote pour le déroulement de la fermentation. Meyen, un mycologue travaillant avec Schwann, nomma ces levures *Saccharomyces*, et les divisa en plusieurs espèces : *S. cerevisiae*, *S. pomorum* et *S. vini*. Néanmoins, des doutes subsistaient sur le fait que les levures étaient des organismes vivants et non pas seulement des enzymes. Pasteur trancha le débat en 1861, en décrivant très précisément la fermentation alcoolique et le rôle des levures, y compris les différences entre fermentation aérobie et anaérobie. C'est également Pasteur qui commença à décrire la diversité observée chez les levures. Reess publia un ouvrage en 1870 décrivant plusieurs espèces de levures capables de fermenter du sucre en alcool. A partir de ces descriptions, Pasteur identifia deux espèces de levures au cours de la fermentation : une première commençant la fermentation et identifiée comme *Saccharomyces apiculatus* (maintenant appelée *Hanseniaspora uvarum*), et une deuxième terminant la fermentation appelée *Saccharomyces pastorianus* ou *ellipsoideus* (mais correspondant certainement à *S. cerevisiae*) (Chambers and Pretorius, 2010; Reed and Nagodawithana, 1988).

Ainsi, depuis le début des recherches sur la fermentation œnologique, il est établi que ce processus inclut plusieurs espèces de levures. Néanmoins, les levures non-*Saccharomyces* ont pendant longtemps été considérées comme néfastes pour la qualité des vins. En effet, la qualité des vins issus de fermentations spontanées était souvent difficile à prévoir et à contrôler, avec parfois l'apparition d'arômes indésirables. Ainsi les levures du genre *Brettanomyces* sont responsables de la production de phénols volatils donnant des odeurs d'écurie ou de sueur, indésirables à forte concentration. En 1890, Müller-Thurgau proposa le concept de l'inoculation des moûts avec une souche de levure pure sélectionnée. Cette levure était une souche de *Saccharomyces cerevisiae* précédemment isolée par Hansen (Isak S.

Pretorius, 2000). L'inoculation de *S. cerevisiae* permet en effet de limiter le développement de la flore indigène, et de mieux contrôler le procédé de fermentation. Cette espèce étant considérée comme responsable de la majeure partie de la fermentation et n'étant pas néfaste pour l'arôme des vins, elle fut le sujet de la majeure partie de la recherche appliquée à la fermentation alcoolique. En effet, *S. cerevisiae* est réputée comme l'espèce la plus adaptée aux conditions dans lesquelles se déroulent la fermentation alcoolique, principalement les fortes concentrations en sucre dans le moût de raisin, l'absence d'oxygène et les fortes concentrations en éthanol à la fin du procédé. Cette espèce a donc été sélectionnée dans le but d'être fournie aux vinificateurs. Dans un premier temps, les levures étaient sous la forme de colonies sur pente inclinée. La propagation était réalisée et contrôlée par les vinificateurs, qui ensemençaient ainsi leur moût. Cette pratique était très courante aux Etats-Unis, au Canada, en Australie et en Nouvelle Zélande dans les années 1950 (Reed and Nagodawithana, 1988). Par la suite, afin de faciliter leur usage et de limiter les risques liés à la propagation, les levures furent produites sous forme « compressée » (environ 70% d'humidité) puis sous forme de levures sèches actives (LSA). Les premières LSA furent commercialisées en 1965 et leur utilisation s'est par la suite développée en Amérique du Nord, puis une dizaine d'années plus tard en Europe (Chambers and Pretorius, 2010; Reed and Nagodawithana, 1988). Désormais, l'usage des LSA de *S. cerevisiae* est courant.

*S. cerevisiae* est l'espèce de levure la plus étudiée, à la fois dans le domaine œnologique mais aussi plus largement en microbiologie du fait de son rôle d'organisme modèle. En effet, cette espèce est facilement manipulable et cultivable dans différentes conditions, et a permis l'étude de nombreux phénomènes biologiques, génétiques et métaboliques, ainsi que le développement de nombreuses techniques de microbiologie et biologie moléculaire. *S. cerevisiae* fut le premier organisme eucaryote dont le génome fut entièrement séquencé, en 1996 (Goffeau et al., 1996). Le métabolisme de cette espèce a également été étudié très en détail. Dans le contexte de l'œnologie, ces études ont permis de comprendre les mécanismes importants liés aux métabolismes carboné, azoté et de production des arômes fermentaires notamment, aidant à la compréhension et à l'optimisation de l'utilisation de cette espèce pour la fermentation alcoolique.

Depuis quelques années, les levures non-*Saccharomyces* attirent à nouveau l'attention des vinificateurs et des chercheurs. En effet, plusieurs de ces levures présentes dans

l'environnement œnologique possèdent des propriétés intéressantes en vinification, pour la production d'arômes, d'enzymes hydrolytiques ou pour la bioprotection. Aujourd'hui quelques levures non-*Saccharomyces* sont commercialisées sous forme de LSA. Ces espèces (*Torulaspota delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima*,...) sont reconnues pour leur impact positif sur l'arôme des vins, leur participation à la libération de thiols variétaux ou encore leur production d'enzymes hydrolytiques (Barbosa et al., 2018; Belda et al., 2016; Comitini et al., 2011a). L'utilisation de ces levures non-*Saccharomyces* permet d'apporter plus de complexité aromatique, de typicité et de diversité aux vins, permettant aux producteurs de répondre aux enjeux économiques actuels de la filière. De plus, leur utilisation sous forme de LSA en association avec *S. cerevisiae* en conditions contrôlées permet de bénéficier de leurs avantages sans les risques liés à une fermentation spontanée, comme un arrêt précoce de fermentation ou l'apparition d'arômes négatifs.

L'utilisation de ces levures en vinification soulève de nouvelles questions et problématiques. En effet, ces espèces ont été moins étudiées que *S. cerevisiae*. Leurs propriétés et métabolisme sont très variés, ce qui complique leur utilisation optimale. Ces levures n'étant généralement pas capable de fermenter l'entièreté du sucre présent dans les moûts, elles sont associées à *S. cerevisiae*, soit en co-inoculation soit en inoculation séquentielle, où la levure non-*Saccharomyces* est d'accord inoculée seule dans le moût, puis la levure *S. cerevisiae* est ajoutée. Cette cohabitation dans le milieu entraîne l'apparition de phénomènes d'interaction entre les espèces (compétition pour les nutriments, synergie dans la production de métabolites, ...), encore mal connus mais pouvant impacter le résultat de la fermentation. Par exemple, une compétition pour un nutriment peut entraîner une carence pour une des espèces utilisées et diminuer son efficacité. Identifier ce problème permet la mise en place d'une nutrition adaptée pour optimiser le procédé. Ainsi, pour assurer le bon contrôle des fermentations menées avec ces espèces, il est important de comprendre leur métabolisme et leurs capacités dans les différentes conditions rencontrées.

Dans ce contexte, ce projet s'intéresse à deux espèces de levures non-*Saccharomyces* commercialisées par la société Lallemand SAS pour une application en œnologie : *Metschnikowia pulcherrima* Flavia® et *Torulaspota delbrueckii* Biodiva®. L'objectif de ce projet est d'évaluer les propriétés phénotypiques et métaboliques de ces levures dans un contexte d'inoculation séquentielle avec *S. cerevisiae*, afin d'optimiser leur utilisation dans le but



d'améliorer le profil aromatique des vins ainsi obtenus. Ce projet est réalisé en partenariat avec la société Lallemand SAS, et fait l'objet d'une collaboration avec l'IATA de Valencia en Espagne.

Tout d'abord, les besoins nutritifs des levures étudiées ont été déterminés. Ces informations sont nécessaires pour contrôler et optimiser le procédé au niveau du déroulement de la fermentation et la production d'arômes. Les spécificités des souches en terme de production d'arômes fermentaires et variétaux ont également été caractérisées. Les origines de ces spécificités ont été cherchées au niveau métabolique. Enfin, des interactions entre espèces ont été identifiées.

Les résultats obtenus dans ce projet sont divisés en quatre chapitres. Dans une première partie, le métabolisme azoté de ces levures est étudié. Les capacités de croissance et de fermentation des levures en culture pure dans un milieu ne contenant qu'une seule source d'azote sont évaluées afin de déterminer leurs préférences et de comparer leurs capacités métaboliques. La production d'arômes fermentaires lors de ces fermentations est ensuite mesurée pour évaluer l'impact des sources d'azote sur le métabolisme des arômes de ces souches. Dans une deuxième partie, le métabolisme de ces levures est étudié à travers le suivi du devenir de molécules d'acides aminés marqués au  $^{13}\text{C}$  ou au  $^{15}\text{N}$  au sein du métabolisme azoté et de production des arômes fermentaires. La troisième partie est consacrée à l'étude de l'effet des concentrations en sucre, azote et lipides du moût sur la fermentation et la production d'arômes, avec une comparaison entre l'inoculation séquentielle et la culture pure de *S. cerevisiae*. Enfin, la quatrième partie est consacrée à la mise en œuvre de ces levures en moût naturel.

---

# INTRODUCTION

# BIBLIOGRAPHIQUE

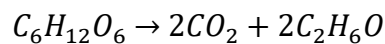
---

# 1. La fermentation œnologique

## 1.1. Présentation

La fermentation alcoolique est l'étape de transformation du moût de raisin en vin. Au cours de ce bioprocédé, les sucres présents dans le moût de raisin sont convertis en éthanol et en CO<sub>2</sub> par l'action des levures, principalement *Saccharomyces cerevisiae*.

En condition anaérobie, les levures dégradent les sucres présents dans le moût pour produire du dioxyde de carbone et de l'éthanol :



Le rendement de conversion théorique du sucre en éthanol est de 0.51 g<sub>éthanol</sub>/g<sub>sucré</sub>. Néanmoins, 8 à 10 % du glucose est utilisée pour la synthèse des précurseurs anaboliques pour la synthèse de la biomasse et le maintien de l'équilibre redox de la cellule. Le rendement expérimental est donc en moyenne de 0.47 g<sub>éthanol</sub>/g<sub>sucré</sub>. Une partie des métabolites secondaires ainsi produit est excrétée de la cellule dans le milieu. Il s'agit principalement de glycérol, succinate ou acétate, mais aussi à des concentrations plus faibles d'aldéhyde, d'alcools supérieurs ou d'esters, qui jouent un rôle important dans le profil organoleptique des vins.

Le moût de raisin est un milieu acide à pH entre 2.9 et 3.8, ayant une forte teneur en sucres (entre 150 et 260 g/L) sous la forme d'un mélange équimolaire de glucose et fructose. Ce milieu contient également de l'azote, des lipides, des vitamines et des minéraux, nécessaires à la croissance des levures.

La fermentation du moût de raisin peut débiter de manière spontanée par la présence des microorganismes naturellement présents sur les baies de raisin ou le matériel de vendange. De nombreuses espèces de levures sont présentes dans le moût (Wang et al., 2015). Ces levures peuvent avoir un impact sur la qualité organoleptique du vin, de manière positive ou négative selon les espèces. Néanmoins, aujourd'hui la pratique du levurage est très répandue. Elle consiste en l'inoculation du moût avec une ou plusieurs souches de levures sélectionnées pour leurs capacités en fermentation. Ces levures sont principalement de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*, qui est la mieux adaptée aux conditions de fermentation et surtout aux fortes concentrations en éthanol. Ces levures sont principalement conditionnées et

vendues sous forme de levures sèches actives (LSA). Le levurage permet un meilleur contrôle de la fermentation, tant sur son déroulement pour empêcher les arrêts de fermentation avant épuisement total du sucre, que sur les caractéristiques organoleptiques du vin.

## 1.2. Déroulement de la fermentation

Au cours de la fermentation, la levure fait face à différents stress entraînant une évolution de son métabolisme : pH acide et forte teneur en sucres au début de la fermentation, puis limitation en nutriments et augmentation de la concentration en éthanol. Le suivi de l'activité fermentaire des levures, sous la forme de la vitesse de dégagement de  $\text{CO}_2$ , permet de distinguer trois phases au cours d'une fermentation classique (Figure 1).

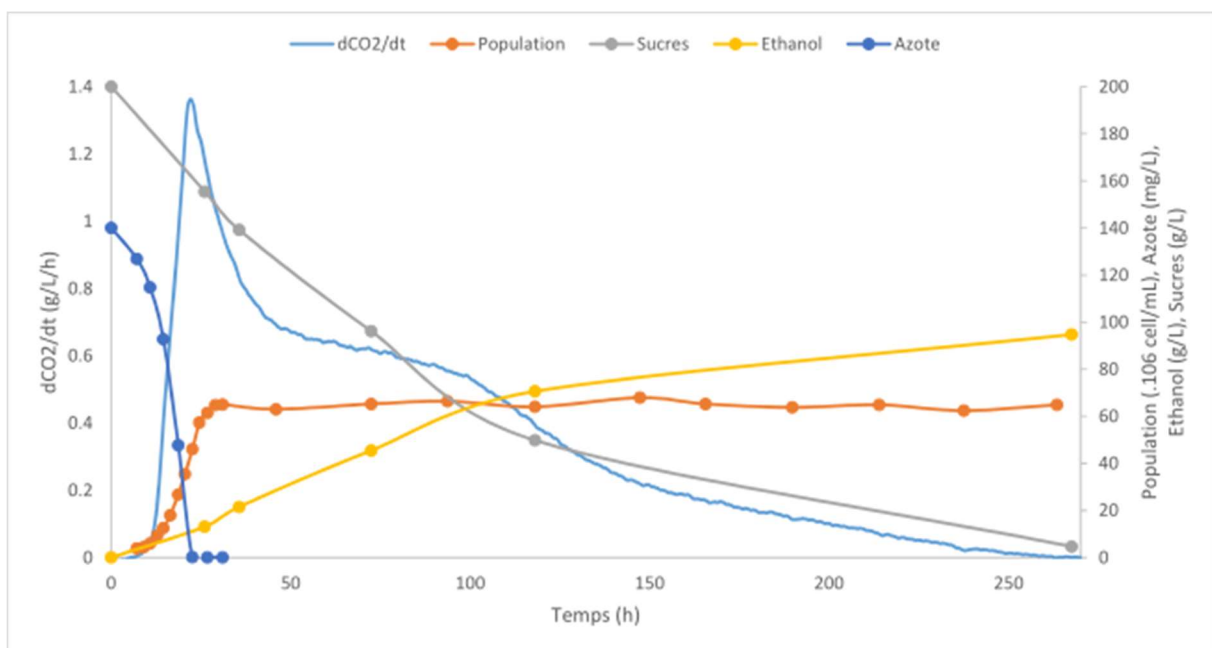


Figure 1 : Evolution des principaux paramètres fermentaires lors d'une fermentation avec *S. cerevisiae* Lalvin EC1118® en moût synthétique.

### 1.2.1. Phase de latence

La phase de latence correspond à une phase d'adaptation des levures à leur environnement (Pérez-Torrado et al., 2002). Cette phase peut durer de quelques heures à plusieurs jours en fonction des conditions de température, du taux d'inoculation des levures en cas de levurage ou de la présence dans le moût d'intrants technologiques comme le  $\text{SO}_2$ , utilisé pour inhiber le développement de la flore indigène du moût (Nadai et al., 2016). Pendant cette phase l'activité fermentaire est très faible et le milieu se sature en  $\text{CO}_2$  (environ 1.5 g/L). Les levures consomment très peu de nutriments, excepté la thiamine qui est consommée en quelques heures (Bataillon et al., 1996).

### 1.2.2. Phase de croissance

Au cours de la phase de croissance les cellules se multiplient jusqu'à atteindre la population maximale. La concentration maximale en biomasse est très variable selon les moûts, mais se situe entre 50 et 250.10<sup>6</sup> cellules/mL (Bely et al., 1990a). En général la multiplication cellulaire s'arrête à cause de l'épuisement de l'azote assimilable. Des carences en lipides ou vitamines peuvent aussi apparaître. A la fin de la phase de croissance, environ 1/3 du sucre a été consommé et les vitesses de fermentation est à son maximum.

### 1.2.3. Phase stationnaire

En phase stationnaire, les levures ne se multiplient plus mais conservent une activité fermentaire leur permettant de consommer les 2/3 du sucre restant. La viabilité cellulaire reste en général élevée et la population cellulaire conserve son niveau maximal. En revanche, l'activité fermentaire diminue jusqu'à épuisement des sucres, principalement à cause de l'augmentation de la concentration en éthanol dans le milieu. En effet, l'éthanol inhibe l'activité des transporteurs d'hexose (Salmon, 1989) et augmente la perméabilité de la membrane plasmique des levures (Jones and Greenfield, 1987).

## 2. Diversité des souches œnologiques

Les levures sont des microorganismes eucaryotes unicellulaires pouvant se reproduire de façon sexuée ou asexuée. Leur croissance est généralement rapide et maîtrisable. Environ 149 genres et 1500 espèces de levures sont connus (Kurtzman et al., 2011). La taxonomie et le classement des levures a beaucoup évolué au fur et à mesure du développement des techniques de biologie moléculaires actuelles, et principalement grâce au séquençage des génomes (Dujon and Louis, 2017; Kurtzman, 2014). Parmi ces espèces, environ 350 souches de levures ont été identifiées dans l'environnement de la vinification (baies de raisin, moût, équipement vinicole, ...) (Wang et al., 2015). Les espèces dominantes dans le moût de raisin changent au cours de la fermentation. Juste après le pressurage, les espèces dominantes sont *Aspergillus tubingensis*, *Aureobasidium pullulans*, et *Starmerella bacillaris*. Plus la fermentation avance, plus la diversité d'espèces de levures diminue, avec une domination de *Hanseniaspora uvarum* et *Starmerella bacillaris*. Enfin, *Saccharomyces cerevisiae* prend le dessus, réalise la majeure partie de la fermentation et est généralement la seule espèce retrouvée en fin de fermentation (Wang et al., 2015).

## 2.1. *Saccharomyces cerevisiae*

### 2.1.1. Présentation et rôle en fermentation

*S. cerevisiae* est un des principaux organismes modèles eucaryotes utilisés en recherche. En effet, de nombreuses connaissances ont été acquises sur cette espèce, et de puissants outils de biologie moléculaire ont été développés, facilitant la manipulation de cet organisme. *S. cerevisiae* est le premier eucaryote dont le génome a été séquencé (Goffeau et al., 1996). La souche séquencée possède 16 chromosomes et 12 millions de paires de nucléotides. Depuis son séquençage, cette souche a permis le développement de nouveaux champs de recherche et de techniques de génomique fonctionnelle et de biologie des systèmes (Botstein and Fink, 2011).

L'espèce *S. cerevisiae* joue un rôle important dans de nombreux procédés fermentaires liés à l'alimentation, principalement dans la fabrication et la conservation des aliments tels que le pain et le fromage, ainsi que des boissons fermentées comme le vin, le cidre ou la bière (Cavalieri et al., 2003; McGovern et al., 2004). *S. cerevisiae* est également devenu un outil biotechnologique, et est utilisée comme usine cellulaire pour la production de molécules à haute valeur ajoutée telles que les biocarburants, les arômes et additifs pour la chimie ou encore pour des molécules d'intérêt pharmacologique comme l'insuline ou certains vaccins.

Étant très liée aux activités humaines, *S. cerevisiae* se retrouve majoritairement dans des environnements anthropiques (brasserie, vignoble, ...), mais aussi dans des environnements naturels, tel que sur certaines plantes et fruits. Il en résulte une grande diversité génétique et phénotypique (Barbosa et al., 2012a; Blanco et al., 2013; Camarasa et al., 2011). De récentes études ont mis en lumière l'histoire évolutive de cette espèce, grâce au séquençage d'un grand nombre de souches provenant de niches diverses. Ces résultats montrent la grande diversité génétique rencontrée au sein de cette espèce, qui s'explique principalement par des mécanismes d'adaptation à différents environnements (Figure 2) (Legras et al., 2018; Peter et al., 2018).

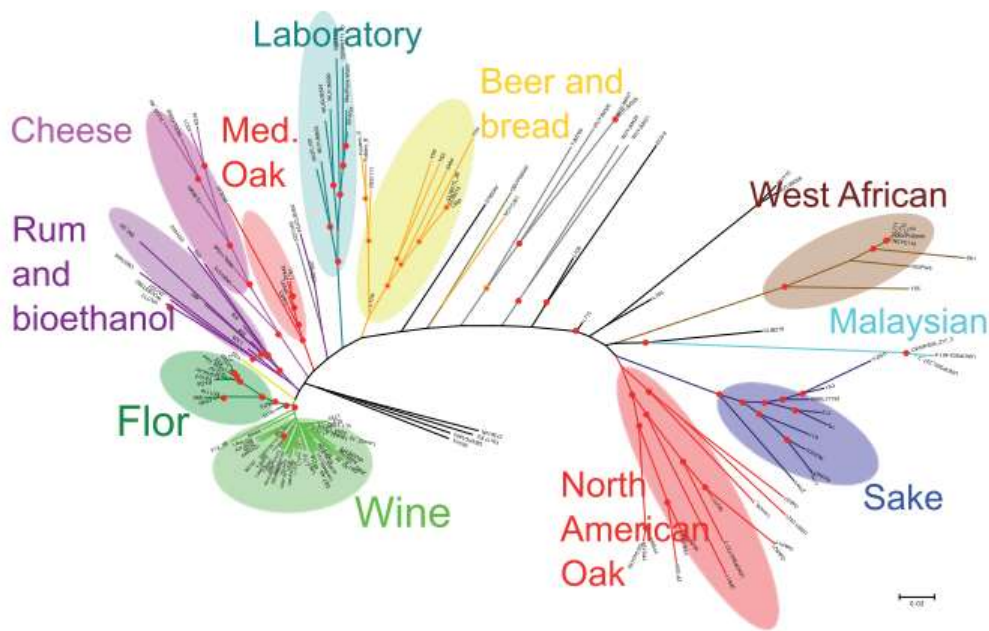


Figure 2 : Généalogie de 159 souches de *S. cerevisiae* basée sur l'étude de leurs génomes complets (Legras et al., 2018).

Des études ont caractérisé la variabilité des paramètres de croissance (taux de croissance, population maximale et taille des cellules) en conditions fermentaires (Albertin et al., 2011; Spor et al., 2009). Les résultats montrent deux comportements différents : une partie des souches génère une plus grande population de cellules de petites tailles qui consomment le glucose lentement, alors que l'autre partie des souches produit une plus faible population avec des cellules plus grosses qui consomment le glucose rapidement. Une analyse plus complète a été menée sur la diversité des traits métaboliques, cinétiques et de croissance en condition œnologique sur 72 souches, montrant le lien entre certains traits phénotypiques et l'origine des souches. Ces résultats montrent une évolution des souches due aux contraintes environnementales, mais aussi à la sélection humaine (Camarasa et al., 2011). Il existe également une diversité phénotypique au sein des souches œnologiques. Une étude menée sur un moût difficile à fermenter a montré d'importantes différences entre les souches, principalement liées à leurs besoins en azote et en oxygène (Blateyron and Sablayrolles, 2001; Julien et al., 2000a). La production de composés volatils varie également beaucoup entre les souches, mais la variabilité de la régulation de la production de ces composés est encore peu connue (Barbosa et al., 2012a; Blanco et al., 2013; Camarasa et al., 2011).

### 2.1.2. Métabolisme carboné en conditions fermentaires

*S. cerevisiae* est particulièrement adaptée aux conditions de fermentation alcoolique (pH acide, forte concentration en éthanol et SO<sub>2</sub>...). Cette espèce est aérobie facultative, Crabtree positive et possède la capacité d'adapter son métabolisme aux conditions d'aération et de disponibilité des substrats carbonés. En vinification, le milieu est riche en sucres fermentescibles (entre 150 et 260 g/L) et pauvre en oxygène (moins de quelques mg/L). Le métabolisme de la levure est donc purement fermentaire.

En l'absence de respiration, l'ATP nécessaire à la croissance cellulaire est uniquement produit par la glycolyse (Figure 3). Il s'agit d'un processus oxydatif faisant intervenir le NAD<sup>+</sup> comme accepteur d'électron et menant à la synthèse de pyruvate. Cette molécule est majoritairement convertie en acétaldéhyde par la pyruvate décarboxylase (PDC). Le reste est dégradé par le cycle des acides tricarboxyliques (TCA). L'acétaldéhyde est ensuite réduit principalement en éthanol, une partie servant aussi à la synthèse d'acétate et d'acétyl-CoA, utilisé pour la synthèse des acides gras (Fraenkel, 1986).

En fermentation, les enzymes du TCA sont soumises à une répression catabolique par le glucose (Gancedo, 2008). Cette voie ne fonctionne donc plus comme un cycle mais comme deux branches dont le produit final est le succinate (Gombert et al., 2001). La branche réductrice est la principale productrice de succinate et en produit environ les deux tiers (Camarasa, 2003). La branche oxydative est surtout active durant la phase de croissance pendant laquelle elle permet la synthèse d' $\alpha$ -cétoglutarate, élément clé du métabolisme de l'azote.

En plus de la production de pyruvate, le glucose est aussi converti en glycérol grâce à la glycérol-3-phosphate déshydrogénase. La synthèse du glycérol permet la ré-oxydation de l'excès de NADH produit lors de la production de biomasse (Nissen, 1997). Le glycérol est aussi un précurseur de la synthèse des phospholipides lors de la croissance cellulaire, et joue un rôle important dans la lutte contre le stress osmotique dû aux concentrations élevées en sucre en début de fermentation (Blomberg and Adler, 1989).

La levure est également capable de dégrader les sucres par la voie des pentoses phosphate (VPP). La VPP concerne 2 à 10 % du flux carboné (Cadière et al., 2011). Cette voie permet la majorité de la régénération du NADPH qui sert de cofacteur dans les processus anaboliques. En effet la VPP permet la régénération de 60% du NADPH lors de la croissance sur glucose, les



40% restant étant issus de l'acétaldéhyde déshydrogénase NADP-dépendante (Blank et al., 2005; Frick and Wittmann, 2005; Van Dijken and Scheffers, 1986). La VPP permet aussi la synthèse de ribose-5-phosphate et d'érythrose-4-phosphate, intermédiaires du métabolisme des acides aminés aromatiques et des nucléotides.

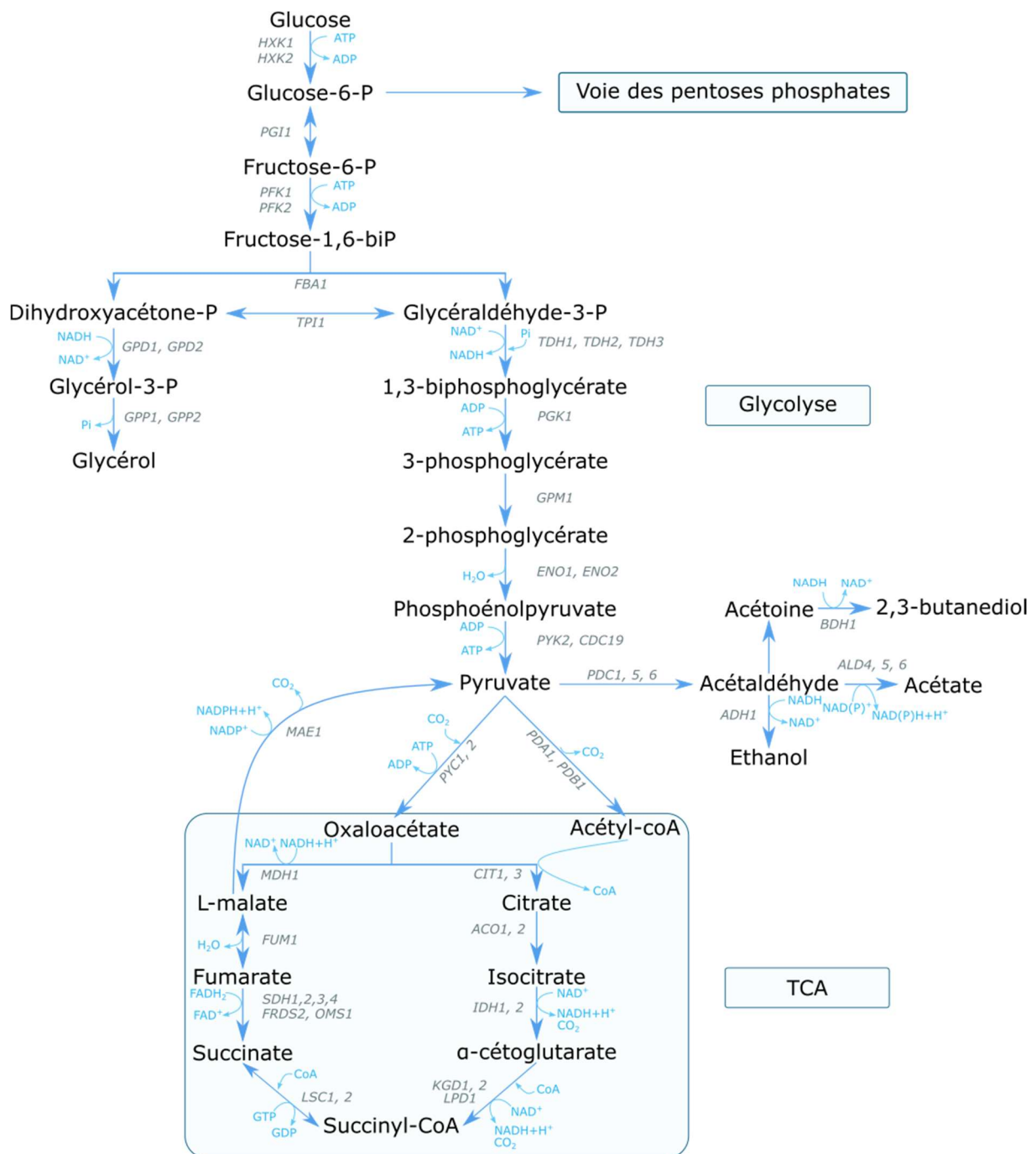


Figure 3 : Métabolisme carboné central de *S. cerevisiae* en fermentation œnologique (schéma d'après Rollero (2015)).

### 2.1.3. Métabolisme azoté en fermentation

L'azote est un nutriment important en fermentation. En effet, la quantité d'azote disponible conditionne la vitesse maximale de fermentation, la population maximale, et impacte la production d'arômes (Bely et al., 1990a; Bisson, 1991; Rollero et al., 2015). Les deux principales sources d'azote assimilable par les levures sont l'ammonium et les acides aminés.

Différents transporteurs permettent l'entrée de l'azote dans la cellule. L'ammonium est importé grâce à Mep1p, Mep2p et Mep3p (Marini et al., 1997). Pour les acides aminés, *S. cerevisiae* possède 24 transporteurs différents, ayant des spécificités pour un ou quelques acides aminés (Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012). Seul Gap1p chez *S. cerevisiae* est un transporteur général permettant l'import de tous les acides aminés (Grenson et al., 1966). *S. cerevisiae* est également capable d'importer et d'utiliser des peptides comme source d'azote. Pour cela, elle possède deux systèmes de transport : Ptr2p, Opt1p et Opt2p pour les peptides de 4 à 5 acides aminés et le glutathion (Miyake et al., 2002; Steiner et al., 1995), et Fot1p et Fot2p chez certaines souches pour les oligopeptides (Dequin and Casaregola, 2011; Marsit et al., 2016).

Plusieurs mécanismes de régulation du transport de l'azote existent chez *S. cerevisiae*. Lorsque plusieurs sources d'azote sont disponibles, le mécanisme de répression catabolique de l'azote (« nitrogen catabolic repression » NCR) entraîne l'utilisation des sources d'azote préférentielles, en inhibant les transporteurs des autres sources d'azote (Magasanik and Kaiser, 2002). Le système des senseurs SPS (Ssy1p, Prt3p et Ssy5p) permet de détecter les sources d'azote présentes dans le milieu et d'induire la transcription des perméases adaptées à ces sources d'azote (Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012). En cas de carence azotée, le contrôle général des acides aminés (« general amino acids control » GAAC) entraîne un ralentissement du métabolisme et induit la transcription de gènes pour la réponse à la carence en azote (Hinnebusch, 2005). Ces différents mécanismes de régulation des perméases expliquent l'ordre d'assimilation des différents acides aminés observé chez *S. cerevisiae* en fermentation alcoolique (Crepin et al., 2012a) (Figure 4).

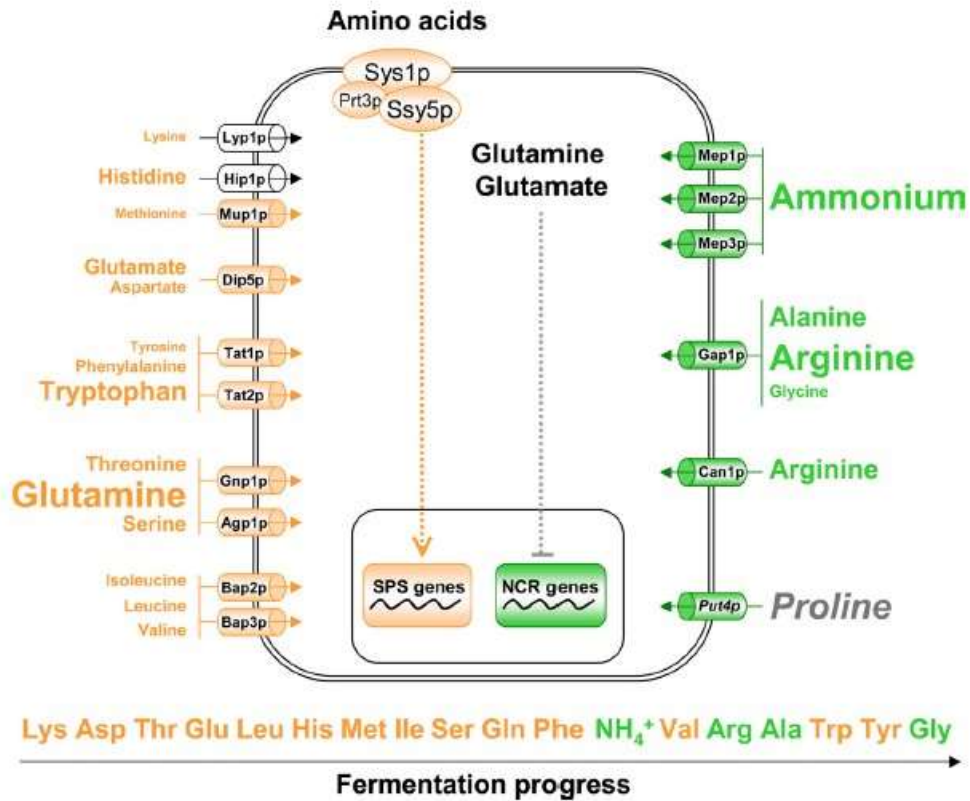


Figure 4 : Principaux transporteurs d'azote, leurs systèmes de régulation et ordre d'assimilation des sources azotées chez *S. cerevisiae* (d'après Crepin et al. (2012)).

En parallèle, plusieurs études se sont intéressées au comportement des levures en présence d'une seule source d'azote, notamment pour établir leurs préférences (Fairbairn et al., 2017; Gobert et al., 2017; Godard et al., 2007; Kemsawasd et al., 2015a). Ainsi, Godard et al. (2007) ont établi un classement des sources d'azote en fonction du temps de génération des levures poussant sur un milieu ne contenant que la source étudiée, ainsi que l'impact de ces sources sur l'expression de gènes sous contrôle du NCR ou du GAAC (Tableau 1).

Tableau 1 : Classement des sources d'azote en fonction du temps de génération et de l'expression de gènes régulés par l'azote (d'après Godard et al. (2007))

Groupe	Temps de génération	NCR	GAAC	Sources d'azote
Sources préférentielles	Court	Très actif	Inactif	NH <sub>4</sub> , Asn, Gln, Ser, Asp, Ala, Arg, Glu
Sources intermédiaires	Moyen	Peu actif	Inactif	Pro, Val, Phe
Sources non préférentielles	Long	Inactif	Actif	Leu, Ile, Met, Tyr, Thr, Trp

Les acides aminés peuvent être directement incorporés dans les protéines ou dégradés pour libérer de l'azote sous forme d'ammonium ou de glutamate et des céto-acides. Ces céto-acides peuvent être redirigés vers le métabolisme carboné, utilisés pour la synthèse de novo d'acides aminés ou utilisés dans la voie d'Ehrlich pour la production d'arômes (cf partie 3.3.2). Le glutamate et l'ammonium libérés rejoignent le métabolisme central azoté. L'ammonium peut alors réagir avec de l' $\alpha$ -cétoglutarate pour former du glutamate. Le glutamate peut lui aussi réagir avec de l'ammonium pour former de la glutamine (Figure 5). Ces réactions sont réversibles (Magasanik and Kaiser, 2002). A l'exception de l'arginine, de la lysine et de l'histidine qui sont majoritairement utilisés directement pour la synthèse de protéines, la plupart des acides aminés sont dégradés pour rejoindre le métabolisme central azoté. Ainsi, moins de 20% de la composition des protéines viennent de l'incorporation directe d'acides aminés (Crépin et al., 2017a).

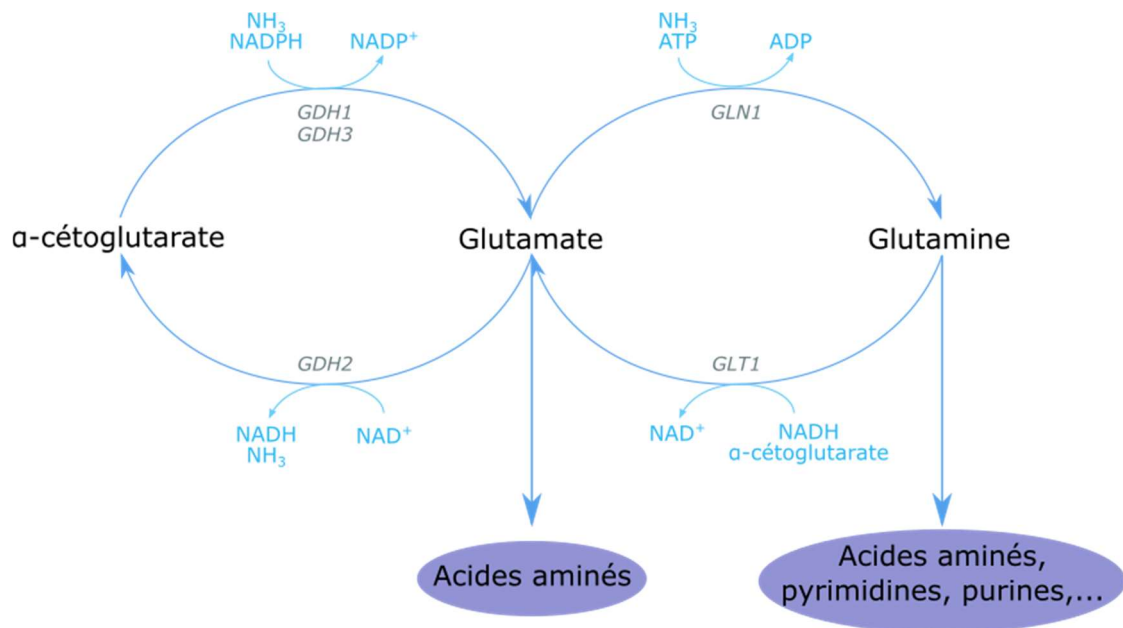


Figure 5 : Schéma du métabolisme azoté central (d'après Magasanik and Kaiser, (2002))

Les acides aminés nécessaires pour la synthèse protéique peuvent être synthétisés de novo (Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012). Cela nécessite un donneur de groupement amine et un précurseur carboné. Les principaux donneurs d'azote sont le glutamate et la glutamine, assimilés pendant la fermentation ou issus du métabolisme azoté central (Figure 5). Seules les synthèses de la tyrosine et de la phénylalanine peuvent être réalisées avec du glutamate ou de l'alanine. Les précurseurs carbonés proviennent du métabolisme carboné central ou du catabolisme des acides aminés. Différents précurseurs carbonés sont nécessaires en fonction de l'acide aminé synthétisé.

Tableau 2 : Précurseurs carbonés nécessaires à la synthèse de novo des acides aminés par *S. cerevisiae* (d'après Ljungdahl and Daignan-Fornier, (2012)).

Groupe	Précurseur carboné	Acides aminés
Glutamate	$\alpha$ -cétooglutarate	Glutamate, glutamine, arginine, proline, lysine
Acides aminés aromatiques	Phosphoénolpyruvate	Phénylalanine, tyrosine, tryptophane
Sérine	3-phosphoglycérate	Sérine, glycine, cystéine, méthionine
Aspartate	Oxaloacétate	Aspartate, asparagine, thréonine, cystéine, méthionine
Pyruvate	pyruvate	Alanine, valine, leucine, isoleucine
Histidine	5-phosphoribosyl pyrophosphate	histidine

## 2.2. Les levures non-*Saccharomyces*

Depuis plusieurs années, la recherche et les industriels étudient les levures non-*Saccharomyces* pour une application en œnologie. Ces levures sont associées avec *S. cerevisiae* pour garantir une fermentation complète. Deux méthodes d'inoculation sont alors possibles. En co-inoculation, la ou les levures non-*Saccharomyces* sont inoculées en même temps dans le moût de raisin. En inoculation séquentielle, les levures non-*Saccharomyces* sont inoculées en premiers dans le moût. *S. cerevisiae* est ensuite ajoutée après que la fermentation ait débuté, en général entre 24 h et 1/3 d'avancement de fermentation selon les souches et les fabricants.

Néanmoins, ces levures naturellement présentes dans le moût de raisin avant fermentation ont longtemps été considérées comme néfastes, parce qu'elles étaient généralement isolées au cours de fermentations incomplètes ou dans des vins ayant des caractéristiques négatives, comme une forte concentration en acide acétique et en phénols volatils (Escott et al., 2017; Jolly et al., 2013; Ribereau-Gayon and Peynaud, 1960). Des stratégies pour limiter l'implantation de ces levures ont donc été mises en place, les principales étant l'utilisation de SO<sub>2</sub> et l'inoculation des moûts avec des levures *S. cerevisiae* sélectionnées (Egli et al., 2002;

Escott et al., 2017; Ough and Crowell, 1987). L'étude de la flore indigène des moûts de raisin a cependant permis d'isoler et de caractériser des levures aux potentialités intéressantes en œnologie. Ainsi, certaines de ces levures sont désormais disponibles commercialement pour une utilisation en vinification.

### 2.2.1. Diversité et dynamique

Même si la fermentation alcoolique est principalement réalisée par *S. cerevisiae*, il existe une grande diversité de levures dans les moûts naturels. En effet, en début de fermentation, *S. cerevisiae* n'est généralement que peu présente (au maximum  $10^2$  UFC/mL) alors que la concentration en levures viables se trouve entre  $10^4$  et  $10^6$  UFC/mL (Figure 6) (Combina et al., 2005; Wang et al., 2015). Ces levures peuvent être présentes sur la baie de raisin au moment de la récolte, mais aussi venir de l'environnement et du matériel utilisé pour la vinification. Les espèces de levures les plus retrouvées appartiennent aux genres *Candida*, *Metschnikowia*, *Kluyveromyces*, *Pichia* et *Hanseniaspora* (Fleet, 2003, 2008; Jolly et al., 2006). Néanmoins, la densité et la diversité des levures dépendent de nombreux facteurs, comme la maturité du raisin, le cépage, la localisation géographique, les conditions météorologiques, l'utilisation et pesticides ou fongicides ou encore les pratiques viticoles et vinicoles (Chavan et al., 2009; Combina et al., 2005; Li et al., 2010; Raspor et al., 2006) (Figure 7).

La quantité de levures non-*Saccharomyces* diminue après les premiers jours de fermentation, au profit de *S. cerevisiae* qui se développe (Figure 6). Plusieurs phénomènes sont à l'origine de ce déclin. La plupart des levures non-*Saccharomyces* ont une faible tolérance pour les concentrations élevées en éthanol. Par exemple, la concentration à partir de laquelle la viabilité des levures décline est de 12 % pour *C. stellata*, et seulement 7 % pour *M. pulcherrima* (Combina et al., 2005). De plus, ces levures ont généralement un métabolisme oxydatif et peu fermentaire. Elles sont donc sensibles aux faibles teneurs en oxygène dissous (Holm Hansen et al., 2001).

Tableau 3 : Liste de souches de levures retrouvées en fermentation œnologique (Jolly et al., 2013; Wang et al., 2015).

<i>Aspergillus tubingensis</i>	<i>Hanseniaspora valbyensis</i>	<i>Pichia occidentalis</i>
<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Hanseniaspora vineae</i>	<i>Pichia terricola</i>
<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Lachancea kluyveri</i>	<i>Saccharomucodes ludwigii</i>
<i>Dekkera bruxellensis</i>	<i>Lachancea thermotolerans</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	<i>Starmerella bombicola</i>
<i>Hanseniaspora occidentalis</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	<i>Starmerella bacillaris</i>
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	<i>Milleromyces farinosa</i>	<i>Torulasporea delbrueckii</i>
<i>Hanseniaspora osmophila</i>	<i>Pichia fermentans</i>	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
<i>Hanseniaspora thailandica</i>	<i>Pichia kluyveri</i>	<i>Zygoascus meyeriae</i>
<i>Hanseniaspora unvarum</i>	<i>Pichia membranifaciens</i>	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>



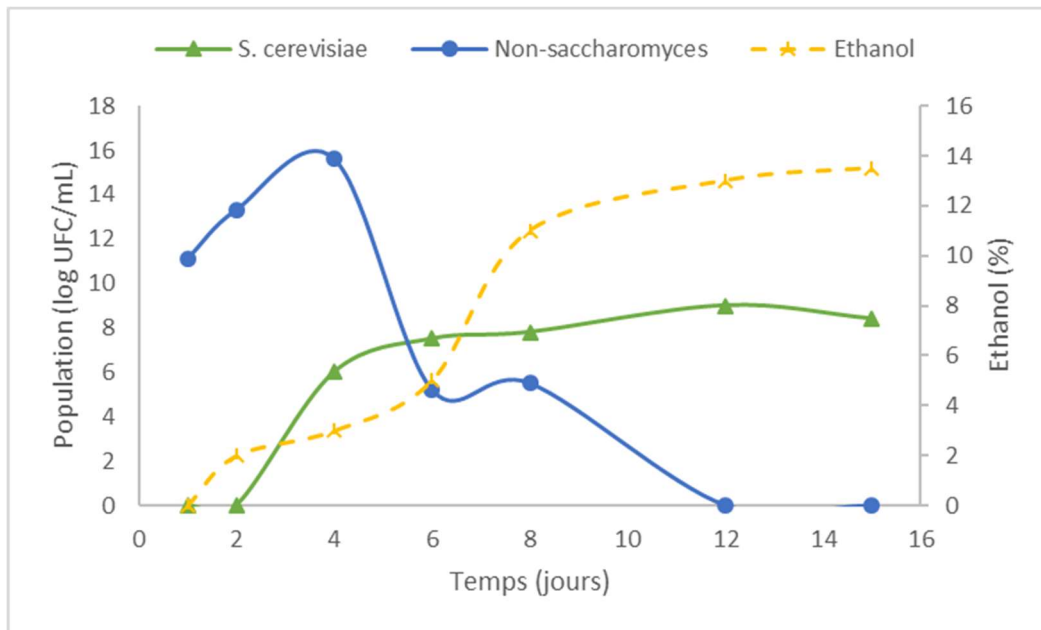


Figure 6 : Evolution des populations de *S. cerevisiae* et de non-*Saccharomyces* au cours d'une fermentation spontanée (d'après Combina et al., (2005)).

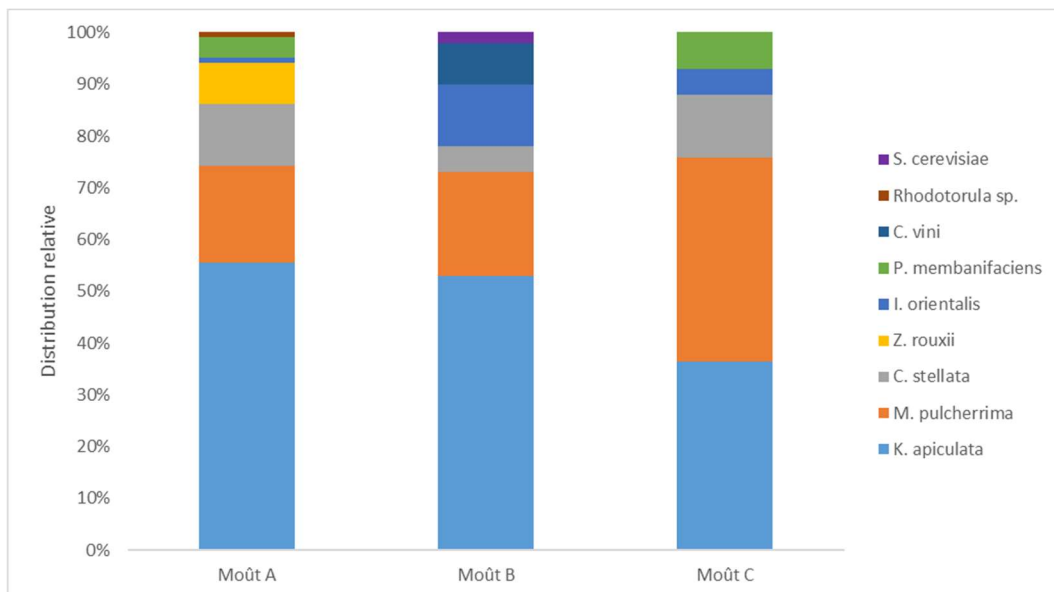


Figure 7 : Distribution des espèces trouvées sur trois moûts de Malbec (d'après Combina et al., (2005)).

L'utilisation de levures sèches actives (LSA) pour inoculer les moûts entraîne également une disparition de la diversité. Ainsi, il a été montré que *S. cerevisiae* inoculée sous forme de LSA domine le milieu immédiatement après inoculation (Egli et al., 2002; Schütz and Gafner, 1993). Néanmoins, avec certaines souches, une faible proportion (entre 2 et 8 % de la population

totale) de *H. uvarum* peut subsister dans le milieu en début de fermentation (Schütz and Gafner, 1993).

Certaines levures non-*Saccharomyces* sont également commercialisées sous la forme de LSA, pour être utilisées de différentes manières en fermentation. Certaines espèces de levures non-*Saccharomyces* ont des capacités de bio-contrôle pour le remplacement du sulfitage, notamment *T. delbrueckii*, *M. fructicola* et *Lachancea thermotolerans* (Karabulut et al., 2003; Rubio-Bretón et al., 2018; Simonin et al., 2018). L'intérêt est alors d'inoculer le moût de raisin lors de l'encuvage ou dès la récolte des raisins pour éviter que des organismes néfastes ne s'y développent.

Même si les levures non-*Saccharomyces* disparaissent rapidement après le début de la fermentation, leur présence peut néanmoins avoir un impact sur la cinétique fermentaire et le profil aromatique du vin. Les fermentations spontanées sont généralement plus longues que lors d'une inoculation avec des LSA (Egli et al., 2002). L'impact sur le profil aromatique d'une fermentation spontanée est très variables en fonction des conditions, pouvant être positif avec une augmentation de la libération de thiols et du caractère fruité avec des souches de *M. pulcherrima*, *T. delbrueckii* et *K. thermotolerans* (Egli et al., 2002; Zott et al., 2011) ou négatif avec l'apparition d'acide acétique, d'acétaldéhyde et de phénols avec des souches de *K. apiculata* ou du genre *Brettanomyces/Dekkera* (Oelofse et al., 2016; Romano et al., 1992; Zohre and Erten, 2002).

Au cours de cette thèse, deux espèces non-*Saccharomyces* ayant des propriétés positives en fermentation et déjà commercialisées ont été étudiées : *Torulaspora delbrueckii* et *Metschnikowia pulcherrima*.

### 2.2.2. *T. delbrueckii*

*Torulaspora delbrueckii* a été isolée de moûts de raisin provenant de différentes régions du monde (Australie, France, Italie, Espagne) à la fois dans des cépages blancs et rouges (Fleet, 2003; Jolly et al., 2006). Cette espèce peut produire d'importantes concentration d'éthanol, et a une bonne tolérance pour cette molécule (Belda et al., 2015; Ciani and Maccarelli, 1998). La croissance de *T. delbrueckii* semble principalement affectée par l'absence d'oxygène, et par des phénomènes d'interaction de contact cellule/cellule lorsqu'elle est utilisée en fermentation avec *S. cerevisiae* (Nissen et al., 2003; Taillandier et al., 2014).

Cette espèce est mise en avant en vinification pour sa faible production d'acides volatils (Puertas et al., 2017) et son impact positif sur la production de thiols et la complexité aromatique des vins (Belda et al., 2017; Renault et al., 2016). De plus, de par sa haute tolérance au stress osmotique, l'utilisation de cette levure est recommandée pour les vins de glace et de vendange tardive (Lallemand, 2013).

Les propriétés de *T. delbrueckii* semblent être variables selon les souches étudiées (Azzolini et al., 2015; Escribano-Viana et al., 2018; Loira et al., 2014; Renault et al., 2009). Ainsi en culture pure, cette espèce peut produire entre 2 et 9.38 % (v/v) d'éthanol en fonction des conditions (Bely et al., 2008; Ciani and Maccarelli, 1998) et conserve sa viabilité jusqu'à environ 8 % (v/v) d'éthanol (Belda et al., 2017, 2015). Cette espèce est également une faible productrice d'acide acétique et une forte productrice d'acide succinique (Ciani and Maccarelli, 1998).

Le Tableau 4 résume les résultats obtenus lors de plusieurs études sur l'utilisation de *T. delbrueckii* en fermentation alcoolique avec *S. cerevisiae*. En culture mixte avec *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* est généralement associée à une diminution de l'acidité volatile, de la concentration en acide acétique et à une augmentation de la production de glycérol (Azzolini et al., 2015; Belda et al., 2017, 2015; Hranilovic et al., 2018). Néanmoins, certaines études montrent des résultats contraires (Tableau 4). Ces différences peuvent être dues à des souches et conditions de fermentation différentes. Certaines études rapportent également une diminution de la teneur en éthanol en fin de fermentation en culture mixte avec *T. delbrueckii* (Belda et al., 2016, 2015; Brou et al., 2018; Varela, 2016), bien que cette diminution ne soit pas systématique (Comitini et al., 2011b; González-Royo et al., 2015; Hranilovic et al., 2018). L'impact de l'utilisation de *T. delbrueckii* associée à *S. cerevisiae* sur des moûts à haute teneur en sucre a été étudié par Bely et al. (2008) et a montré une réduction de l'acidité volatile et de la production d'acétaldéhyde.

L'utilisation de *T. delbrueckii* a également un impact sur la cinétique fermentaire et la durée de fermentation. La durée de fermentation peut être raccourcie ou allongée en fonction du mode d'inoculation (co-inoculation ou inoculation séquentielle) et de la concentration de l'inoculum (Ciani et al., 2006; Taillandier et al., 2014). La stratégie d'inoculation impacte également la viabilité des levures. La viabilité de *T. delbrueckii* en co-culture diminue généralement, particulièrement lors de l'inoculation de *S. cerevisiae* en inoculation séquentielle. La population de *S. cerevisiae* est également plus basse en inoculation

séquentielle qu'en culture pure ou en co-inoculation (Taillandier et al., 2014). Cela peut mener à des fermentations languissantes en inoculation séquentielle, alors qu'elles sont complètes en co-inoculation (Bely et al., 2008; Ciani et al., 2006; Taillandier et al., 2014).

En terme d'arômes, la présence de *T. delbrueckii* en fermentation est principalement associée à une augmentation de la concentration en terpènes (Hranilovic et al., 2018; Sadoudi et al., 2012) et en thiols (Belda et al., 2017; Renault et al., 2016). *T. delbrueckii* a aussi généralement un impact positif sur les esters d'acétate et en particulier sur l'acétate d'éthyle et l'acétate d'isoamyle (Azzolini et al., 2015; Comitini et al., 2011b; Renault et al., 2015). Globalement les vins fermentés avec *T. delbrueckii* sont reconnus comme étant plus fruités et complexes aromatiquement (González-Royo et al., 2015; Renault et al., 2015).

La stratégie d'inoculation a aussi un impact sur le profil aromatique. Avec *T. delbrueckii*, une baisse de la production de glycérol et une augmentation de l'acidité volatile ont été remarquées en inoculation séquentielle comparé à une co-inoculation (Bely et al., 2008). En revanche, la production d'acide acétique et d'acétate d'éthyle étaient inférieures, et les productions d'acétate d'isoamyle et de décanoate d'éthyle étaient supérieures en inoculation séquentielle (Taillandier et al., 2014). L'impact sur la production d'esters dépend des composés. Renault et al. (2015) ont remarqué que les esters majoritaires étaient plus produits en co-inoculation, mais que les esters minoritaires étaient plus produits en inoculation séquentielle. Néanmoins, ces résultats dépendent sûrement des conditions de fermentation, et notamment des taux d'inoculation des deux espèces et du moment d'ajout de *S. cerevisiae* en inoculation séquentielle (Gobbi et al., 2013; Taillandier et al., 2014).

Tableau 4 : Résultats obtenues en fermentation avec *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae*.

Moût	Méthode d'inoculation	Effets	Référence
naturel	Inoculation séquentielle A 3-4 % d'éthanol	+ de 2-phényl éthanol - de acétate isoamylique, esters d'acides gras et vinyl phénols	(Azzolini et al., 2015)
naturel	Inoculation séquentielle après consommation de 15 g/L de sucres	+ de glycérol - D'éthanol, d'acide malique, d'alcools supérieurs et acidité totale	(Belda et al., 2015)
naturel	Inoculation séquentielle après 4 jours	+ de glycérol, de pyruvate, de 3MH et 4MMP - d'éthanol et d'acide acétique	(Belda et al., 2017)
Naturel	Inoculation séquentielle après 24 h	+ phénylethyl alcool, lactones, terpenols - acide acétique, ethyl esters totaux, thiols	(Sadoudi et al., 2012)
Naturel et synthétique	Inoculation séquentielle après 24 h	+ d'alcools supérieurs, de lactones - D'acides totaux, acide acétique	(González-Royo et al., 2015)
naturel	Inoculation séquentielle après 60 h	+ de glycérol, éthyl isobutyrate, alcools supérieurs, terpènes - Acide acétique, esters d'éthyle	(Hranilovic et al., 2018)
naturel	Inoculation séquentielle après 11 jours	+ acide acétique, propanol, phénylethyl acetate, ethyl lactate, diacétyl - Glycérol, acétaldéhyde, 3-méthylbutanol	(Loira et al., 2014)
naturel	Inoculation séquentielle après 24 h	+ isobutyl acetate, isoamyl acetate, ethyl propanoate, ethyl isobutanoate, isobutyl acetate	(Renault et al., 2015)
naturel	Inoculation séquentielle après 24 h	+ de 3MH, 3MHA	(Renault et al., 2016)
Naturel (forte teneur en sucres)	Co-inoculation	- Acidité volatile, rendement éthanol, acétaldéhyde	(Bely et al., 2008)
Naturel	Co-inoculation	+ ethyl acetate, alcools supérieurs - Acidité volatils	(Comitini et al., 2011b)
Naturel	Co-inoculation	+ esters, isoamyl acetate, phénylethyl acetate, isobutyl acetate	(Renault et al., 2015)

### 2.2.3. *M. pulcherrima*

*Metschnikowia pulcherrima* est une espèce souvent retrouvée en début de fermentation spontanée. Ses capacités fermentaires sont faibles (Contreras et al., 2014; Sadineni et al., 2012). De plus, sa croissance en condition de fermentation est limitée par l'absence d'oxygène et les fortes concentrations en sucre (Jolly et al., 2006).

L'intérêt de l'utilisation de *M. pulcherrima* en fermentation réside dans ses activités enzymatiques. En effet, il a été montré que cette espèce possède une forte activité glycosidique permettant la libération d'arômes variétaux (voir partie 3.2.2) (Rodríguez et al., 2004; Rodríguez et al., 2010a). Cette espèce posséderait également une activité protéase extracellulaire (Reid et al., 2012), et certaines souches pourraient être impliquées dans la libération des thiols variétaux (Zott et al., 2011). En culture pure, *M. pulcherrima* produit plus de glycérol que *S. cerevisiae*, mais moins de SO<sub>2</sub>, d'acétaldéhyde et d'alcools supérieurs (à l'exception de l'isobutanol) (Sadineni et al., 2012).

Oro et al., (2014) ont mis en évidence une activité antimicrobienne de *M. pulcherrima* sur plusieurs espèces des genres *Brettanomyces/Dekkera*, *Hanseniaspora* et *Pichia*, mais pas contre *S. cerevisiae*. En revanche, *M. pulcherrima* pourrait avoir un impact négatif sur la croissance de *S. cerevisiae* de par sa production d'acide pulcherrimique (Capozzi et al., 2015).

En fermentation avec *S. cerevisiae*, *M. pulcherrima* conduit également à une concentration plus importante en glycérol et une diminution de l'acide acétique dans les vins (Tableau 5) (Comitini et al., 2011b; González-Royo et al., 2015; Sadoudi et al., 2012). Cette souche a aussi été testée pour réduire de la concentration en éthanol dans les vins, ce qui a été concluant dans certaines conditions (Contreras et al., 2014; Quirós et al., 2014; Varela et al., 2016).

Au niveau aromatique, la présence de *M. pulcherrima* en association avec *S. cerevisiae* entraîne généralement une augmentation de la production d'alcools supérieurs (Rodríguez et al., 2010a; Sadoudi et al., 2012). En revanche, son impact sur les esters d'éthyl et d'acétate varie avec les conditions de fermentation (Comitini et al., 2011b; Hranilovic et al., 2018; Rodríguez et al., 2010a; Varela et al., 2016). Globalement, les vins fermentés avec *M. pulcherrima* apparaissent plus floraux et avec des arômes de fumé (González-Royo et al., 2015).

Tableau 5 : Résultats obtenus en fermentation avec *M. pulcherrima* et *S. cerevisiae*.

Moût	Méthode d'inoculation	Effets	Référence
Naturel et synthétique	Inoculation séquentielle après 36 h	+ alcools supérieurs, phénols volatils, lactones - acétaldéhyde, esters	(González-Royo et al., 2015)
Naturel	Inoculation séquentielle après 60 h	+ esters d'acétate, glycérol - Acide acétique, esters d'éthyle	(Hranilovic et al., 2018)
Naturel	Inoculation séquentielle après 5 jours	+ alcools supérieurs, phényléthyl acétate - Esters d'acétate	(Rodríguez et al., 2010a)
Naturel	Inoculation séquentielle après consommation de 50 % du sucre	+ ethyl acetate, acidité volatile, esters d'éthyle, phényléthyl acetate, isobutyl acetate, isoamyl acetate - 2 méthylbutyl acétate, hexyl acetate	(Varela et al., 2016)
Naturel	Co-inoculation	+ glycérol, isoamyl acétate - Acidité volatile, esters d'éthyle	(Comitini et al., 2011b)
Naturel	Inoculation séquentielle après 24 h	+ alcools supérieurs, terpénols, esters d'éthyl, acides gras - thiols, acide acétique,	(Sadoudi et al., 2012)
Naturel	Co-inoculation	+ ethyl acetate, isobutyl acetate, ethyl hexanoate, ethyl octanoate - Ethanol, acidité totale	(Zohre and Erten, 2002)
Naturel	Inoculation séquentielle après 1 h	Pas de différence	(Jolly et al., 2003)

### 3. Les arômes

#### 3.1. Les arômes du vin

Le vin est un produit complexe, impliquant de nombreuses molécules dans ses caractéristiques organoleptiques. Ses propriétés aromatiques sont définies par des composés volatils provenant du raisin, de la fermentation ou du vieillissement (Lambrechts and Pretorius, 2000; Swiegers et al., 2005a) dont les principaux sont listés dans le Tableau 6.

Les arômes sont des molécules ayant un faible point d'ébullition, leur permettant d'être volatiles à température ambiante et d'être perçues par le système olfactif. Un grand nombre de molécules ont ces propriétés, notamment les aldéhydes, alcools, cétones, acides, lactones, esters et les terpènes. Entre 600 et 800 molécules aromatiques sont présentes dans le vin (Rapp, 1998). Chaque molécule a une concentration minimale à partir de laquelle elle peut être perçue par l'homme, appelée seuil de perception. Cette concentration dépend principalement de la molécule et de la matrice dans laquelle elle se trouve (Tableau 6) (Jones

et al., 2008; Rapp, 1998). Néanmoins, plusieurs molécules présentes en-dessous de leurs seuils de perception peuvent tout de même avoir un impact sur le profil aromatique, grâce à des effets d'interaction entre les molécules (Chambers and Koppel, 2013; Pineau et al., 2009).

Il existe différentes catégories d'arômes. Les arômes variétaux sont présents dans le moût de raisin sous forme libre ou de précurseurs. Les arômes fermentaires sont produits par les levures pendant la fermentation. Les arômes de vieillissement sont formés pendant la maturation du vin par réaction chimique à partir de molécules volatiles produites dans les étapes précédentes, ou par diffusion des molécules volatiles du bois.

Les arômes variétaux et fermentaires ainsi que leurs voies de libération et de production sont détaillés dans les parties 3.2 et 3.3.



Tableau 6 : Principaux composés d'arômes trouvés dans le vin (d'après Swiegers et al. (2005)).

Composés	Concentration dans le vin (mg/L)	Seuil de perception (mg/L)	Descripteurs
Acétate d'éthyle	22.5 – 63.5	7.5 <sup>a</sup>	Solvant, fruité
Acétate d'isoamyle	0.1 – 3.4	0.03 <sup>a</sup>	Banane, poire
Acétate de phényléthyle	0 – 18.5	0.25 <sup>a</sup>	Floral, rose, fruité
Acétate d'isobutyle	0.01 – 1.6	1.6 <sup>d</sup>	Banane, fruité
Acétate d'hexyle	0 – 4.8	0.7 <sup>b</sup>	Bonbon, parfum
Butanoate d'éthyle	0.01 – 1.8	0.02 <sup>a</sup>	Floral, fruité
Hexanoate d'éthyle	0.03 – 3.4	0.05 <sup>a</sup>	Pomme verte
Octanoate d'éthyle	0.05 – 3.8	0.02 <sup>a</sup>	Savon doux
Décanoate d'éthyle	0 – 2.1	0.2 <sup>e</sup>	Floral, savon
Propanol	9.0 – 68	500 <sup>b</sup>	Piquant, âpre
Butanol	0.5 – 8.5	150 <sup>a</sup>	Spiritueux
Isobutanol	9.0 – 174	40 <sup>a</sup>	Spiritueux
Alcool isoamylique	6.0 – 490	30 <sup>a</sup>	Apre, vernis à ongle
Hexanol	0.3 – 12.0	4 <sup>b</sup>	Vert, herbacé
2-phényléthanol	4.0 – 197	10 <sup>a</sup>	Floral, rose
Acide acétique	100 – 1150	280 <sup>a</sup>	Vinaigre
Acétaldéhyde	10 – 75	100 <sup>b</sup>	Xérès, pomme abimée
Diacétyl	< 5	0.2 <sup>b</sup> / 2.8 <sup>c</sup>	Beurré
Glycérol	5 – 14 g/L	5.2 g/L <sup>b</sup>	Sans odeur, goût doux
Linalol	0.0017 – 0.010	0.0015 <sup>f</sup> / 0.025 <sup>e</sup>	Rose
Géranol	0.001 – 0.044	5 <sup>f</sup> / 30 <sup>a</sup>	Rose
Citronellol	0.015 – 0.042	8 <sup>f</sup> / 100 <sup>a</sup>	Citronnelle
2-acétyl-1-pyrroline	Traces	0.0001 <sup>f</sup>	Goût de souris
2-acétyltétrahydropyridine	0.0048 – 0.1	0.0016 <sup>f</sup>	Goût de souris
4-éthylphénol	0.012 – 6.5	0.14 <sup>f</sup> / 0.6 <sup>c</sup>	Médicinal, basse-cour
4-éthylguaïacol	0.001 – 0.44	0.033 <sup>a</sup> / 0.11 <sup>c</sup>	Phénolique, doux
4-vinylphénol	0.04 – 0.45	0.2 <sup>f</sup>	Pharmaceutique
4-vinylguaïacol	0.0014 – 0.71	10 <sup>f</sup>	Clou de girofle

<sup>a</sup> 10% éthanol, <sup>b</sup> vin, <sup>c</sup> vin rouge, <sup>d</sup> bière, <sup>e</sup> vin synthétique, <sup>f</sup> eau

### 3.2. Les arômes variétaux

Les arômes variétaux libérés pendant la fermentation alcoolique viennent de l'hydrolyse de précurseurs non-aromatiques par l'action des levures. Différentes catégories d'arômes variétaux sont trouvées dans le vin.

### 3.2.1. Thiols variétaux

Les thiols variétaux sont des molécules soufrées très recherchées surtout dans les vins blancs. En effet, au contraire des composés soufrés légers tels que l' $\text{H}_2\text{S}$  ou l'éthanethiol qui sont associés à des descripteurs négatifs, la 4-mercapto-4-méthylpentan-2-one (4MMP), l'acétate de 3-mercaptohexyle (3MHA) et le 3-mercaptohexan-1-ol (3MH), sont associés à des descripteurs positifs. La 4MMP a une odeur de buis et de bourgeon de cassis avec un seuil de perception de 0.8 ng/L en solution hydro-alcoolique (Murat et al., 2001). Les 3MH et 3MHA ont des odeurs de fruit de la passion et pamplemousse avec un seuil de perception à 60 et 4 ng/L respectivement (Murat et al., 2001). Ces molécules sont principalement retrouvées dans les vins de Sauvignon Blanc, Gewürztraminer, Colombard et Muscat (Murat et al., 2001; Tominaga et al., 2000). Les 4MMP et 3MH sont libérés à partir de précurseurs présents dans le moût sous l'action d'une  $\beta$ -lyase qui catalyse l'hydrolyse de la liaison thioester entre le précurseur et la molécule aromatique (Tominaga et al., 1995). Différents types de précurseurs ont été identifiés. Les précurseurs cystéinylés (Cys-3MH et Cys-4MMP) ont été identifiés pour la première fois dans le Sauvignon Blanc (Tominaga et al., 1998) puis dans de nombreux cépages (Roland et al., 2010b) et les précurseurs glutathionylés (G3MH et G4MMP) dans du moût de Melon B. (Roland et al., 2010a). Les précurseurs glutathionylés sont généralement présent en plus faibles quantités dans les moûts que les précurseurs cystéinylés (Tableau 7). Néanmoins les concentrations mesurées pour ces précurseurs ne sont pas suffisantes pour expliquer la production de thiols. En effet, en utilisant des précurseurs marqués, Subileau et al. (2008a) ont montré que seulement 5 à 7 % de la 3MH produite avec un Sauvignon Blanc provenait du Cys-3MH. D'autres molécules sont donc impliquées dans cette production. Récemment, de nouveaux précurseurs de thiols ont été identifiés et quantifiés dans le moût : l'(E)-2-hexanol (Schneider et al., 2006), le précurseur glutathionylé S-conjugué du 3-mercaptohexanal (G-3MHAI) (Thibon et al., 2016), le précurseur cystéinyl-glycine S-conjugué du 3MH (CysGly-3MH) (Capone et al., 2011) et le  $\gamma$ -glutamyl-cysteine S-conjugué de la 3MH ( $\gamma$ GluCys-3MH) (Bonnafox et al., 2018). Toutefois, l'origine d'une partie importante des thiols libérés en fermentation reste non élucidée.

Tableau 7 : Concentrations en précurseurs de thiols dans différents cépages.

Cépage	Concentrations dans le moût (µg/L)				Références
	Cys-3MH	G3MH	Cys-4MMP	G4MMP	
Melon B.	< 1.05	< 0.20	1.07 – 3.83	Nd	
Sauvignon Blanc	7.95 – 39.3	1.35 – 7.51	2.59 – 6.23	0.03 – 4.31	(Roland et al., 2010a)
Riesling	58.25 – 59.88	0.68 – 2.02	< 0.42	0.47 – 1.84	
Gewürztraminer	58.25 – 59.88	5.57 – 7.06	0.54 – 0.82	0.101 – 0.22	
Chardonnay	7 - 38	111 - 517			(Capone et al., 2010)
Sauvignon Blanc	21 - 55	245 – 642			
Riesling	10 - 18	97 – 275			
Pinot Gris	13 - 27	338 - 467			
Sauvignon Blanc	58 - 150	10 - 21	7 - 18	7 - 21	(Cerreti et al., 2015)

Bonnaffoux et al. (2018) ont étudié les cinétiques de dégradation de ces précurseurs et leurs liens sur un moût de Sauvignon blanc fermenté avec *S. cerevisiae* Levulia® Esperide et Anchor® VIN13 (Figure 8). Il apparaît que les consommations du CysGly-3MH et CysGly-4MMP se font rapidement en début de fermentation et entraînent la production de Cys-3MH et Cys-4MMP respectivement. En revanche, la consommation de  $\gamma$ GluCys-3MH et  $\gamma$ GluCys-4MMP se fait plus tardivement et n'entraîne pas la production du précurseur cystéinylé. Enfin, le G-4MMP est peu dégradé alors que le G-3MH semble être dégradé en  $\gamma$ GluCys-3MH et en Cys-3MH (Bonnaffoux et al., 2018).

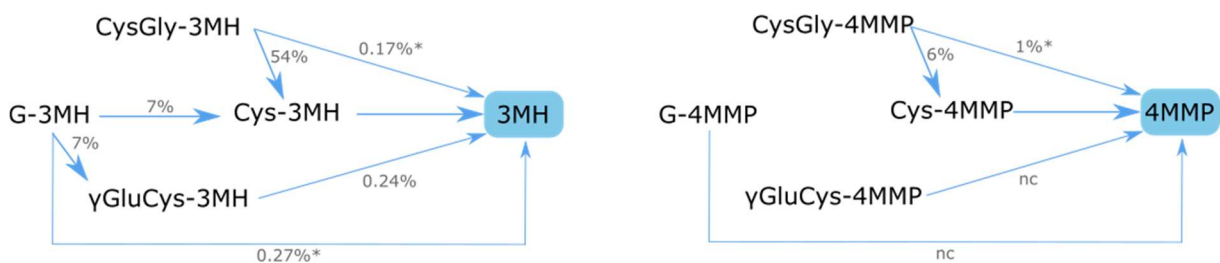


Figure 8 : Schéma des relations entre précurseurs de thiols et leur taux de conversion d'après Bonnaffoux et al. (2018). \* : taux de conversion ne tenant pas compte de la quantité non consommée de précurseur. nc : non calculé.

Le mécanisme de libération des thiols par la levure n'est pas encore complètement élucidé. Une étude visant à mettre en évidence la libération de 4MMP à partir de cys-4MMP fut

réalisée *in vitro* avec une enzyme extraite de *Eubacterium limosum* et une tryptophanase purifiée de *E. coli* qui montrent une activité  $\beta$ -lyase cystéine-S-conjuguée (Tominaga et al., 1995). Plusieurs gènes de *S. cerevisiae* ont ensuite été identifiés comme potentiellement impliqués dans la libération de thiols. La délétion des gènes *BNA3* (*YJL060W*), *GLO1* (*YML004C*), *CYS3* (*YAL012W*) et *IRC7* (*YFR055C*) entraîne ainsi une diminution de 41% à 54% de la libération de 4MMP en présence de fortes concentrations en précurseurs (Howell et al., 2005). L'activité  $\beta$ -lyase de *IRC7* a été confirmée dans un moût avec des concentrations moyennes de cys-3MH et cys-4MMP, avec une réduction de la production de 3MH de 41% et de 96% pour la production de 4MMP après délétion de ce gène. Le gène *BNA3* semble avoir un effet seulement en présence de fortes concentrations de précurseurs (Thibon et al., 2008). Le plus faible impact de la délétion de *IRC7* sur la production de 3MH pourrait s'expliquer par la stéréosélectivité de ce gène. Il a en effet été montré que *IRC7* libère plus de (R)-3MH (Wakabayashi et al., 2004). Néanmoins, il semble plausible que *IRC7* soit nécessaire et suffisant pour la libération de 4MMP, mais que d'autres gènes soient impliqués pour la libération de 3MH (Roncoroni et al., 2011). Par exemple, l'activité de l'enzyme codée par le gène *STR3* a également été montrée sur les cys-3MH et cys-4MMP, la surexpression de ce gène entraînant également une surproduction de 3MH (Holt et al., 2011).

La régulation du gène *IRC7* peut expliquer les différences observées dans la production de thiols entre les souches. Le gène *IRC7* a deux isoformes, une forme complète et une forme tronquée de 38 paires de bases. Seul le gène entier est actif pour la libération de thiols. Mais 75% des souches *S. cerevisiae* possèderaient la forme tronquée (Belda et al., 2016). De plus, chez *S. cerevisiae* le gène *IRC7* est situé à 4.5 kb du télomère du chromosome 6. Ce gène pourrait donc être impacté par un phénomène de « subtelomeric silencing » (Ehrentaut et al., 2010). Cela est cohérent avec les taux de libération de thiols plus importants observés chez d'autres espèces comme *S. uvarum*, dont le gène *IRC7* est plus éloigné (10 kb) du télomère (Holt et al., 2018; Knight et al., 2018). De plus, *IRC7* serait réprimé par la présence de certaines sources d'azote à travers le NCR (nitrogen catabolic repression). Il a notamment été montré que l'activité de *IRC7* était réprimée par la protéine Ure2p impliquée dans le NCR (Thibon et al., 2008).

Le transport des précurseurs dans la cellule n'est pas encore élucidé. Plusieurs transporteurs d'acides aminés ou de peptides ont été testés, mais seuls Opt1p et Gap1p ont une influence

significative sur la libération de thiols. Néanmoins, d'autres transporteurs sont sûrement impliqués (Cordente et al., 2015; Santiago and Gardner, 2015a; Subileau et al., 2008a). Le mécanisme de dégradation des précurseurs glutathionylés n'est pas non plus élucidé. L'enzyme Ecm38p semble permettre la dégradation du G3MH en glutamate et cys-gly-3MH, mais n'a pas d'impact sur la dégradation du G4MMP (Cordente et al., 2015). Une autre étude montre que le gène *CIS2* joue un rôle dans la libération de cys-3MH à partir de G3MH (Santiago and Gardner, 2015a) (Figure 9).

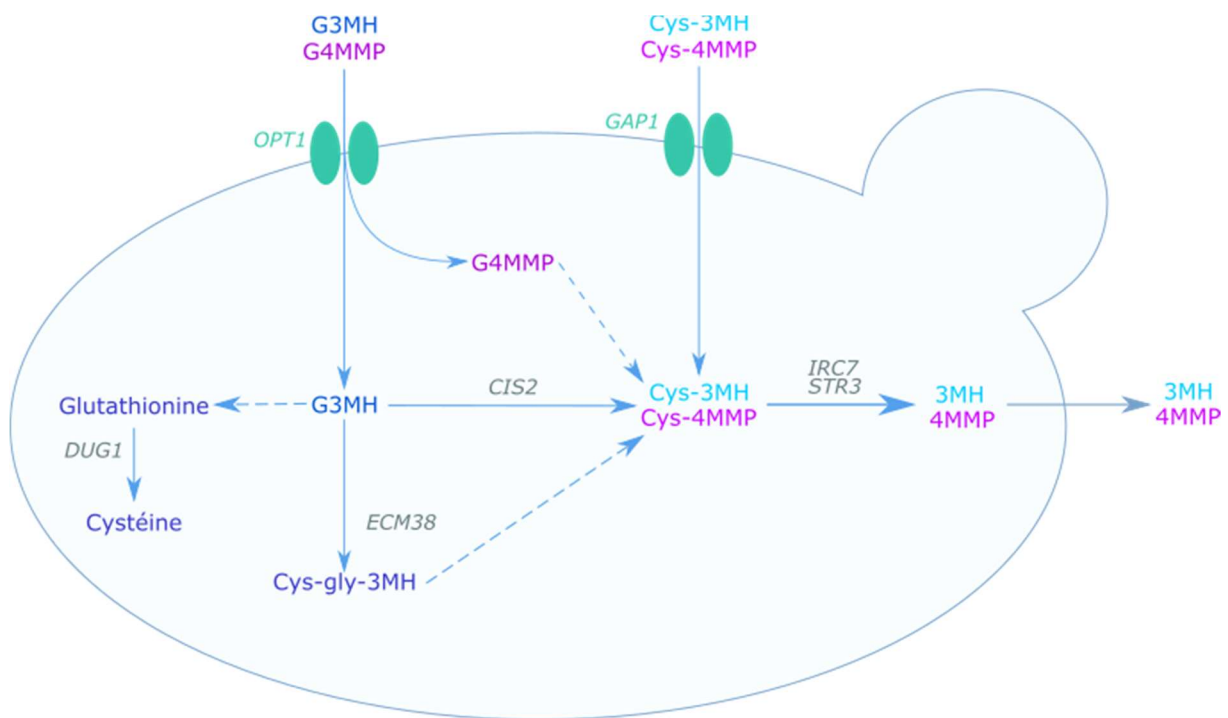


Figure 9 : Dégradation des précurseurs de thiols chez *S. cerevisiae* (d'après Cordente et al., (2015) et Santiago and Gardner, (2015)) Traits pleins : voies connues, traits pointillés : voies supposées.

### 3.2.2. Terpènes variétaux

Les terpènes du vin peuvent avoir plusieurs origines. Certains cépages comme le Muscat produisent des moûts riches en terpènes libres (Marais, 1983). Certaines de ces molécules comme le linalool, le nerol ou  $\alpha$ -terpineol peuvent être synthétisées *de novo* par les levures (Carrau et al., 2005). Enfin, certains sont libérés par réaction enzymatique à partir de précurseurs non aromatiques présents dans le moût (Swiegers et al., 2005a). Les types de précurseurs et leurs concentrations varient suivant les cépages (Gunata et al., 1985) (Tableau 8). Les précurseurs sont composés d'un aglycone lié à un  $\beta$ -D-glucopyranoside, lui-même pouvant être lié à un autre sucre, principalement un  $\alpha$ -L-rhamnopyranose ou un  $\alpha$ -L-

arabinofuranose. L'aglycone peut être un terpène (linalol, géraniol, nérol, citronello,  $\alpha$ -terpinéol) mais aussi un alcool tel que l'héxanol ou le phényléthanol, un C<sub>13</sub>-noriprénoïde ou un phénol volatil (Spagna et al., 2002; Swangkeaw et al., 2011; Villena et al., 2007).

Tableau 8 : Concentrations en terpènes libres et liés dans des moûts de différents cépages (d'après Gunata et al. (1985)).

Cépage	Concentrations dans le moût ( $\mu\text{g/L}$ )					
	Terpènes totaux		Géraniol		Linalol	
	Libre	Lié	Libre	Lié	Libre	Lié
Muscat d'Alexandrie	4040	1513	1507	342	1839	1084
Muscat de Frontignan	1398	1640	396	107	207	1409
Gewurztraminer	4325	282	3356	218	22.5	5.6
Riesling	276	58	65	26	87	19.4
Cabernet-Sauvignon	26	5.3	12	3.6	4.2	1.7
Ugni blanc	83	2.8	54	2.6	8.5	0.2

La libération des terpènes se fait en deux étapes (Figure 10). Tout d'abord la liaison (1 $\rightarrow$ 6) entre les deux sucres du précurseur est clivée par une  $\alpha$ -L-rhamnosidase ou une  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase en fonction de la composition du précurseur. Puis une  $\beta$ -glucosidase libère l'aglycone (Gunata et al., 1988). C'est cette dernière enzyme qui a été le plus étudiée. Plusieurs espèces de levures produisent des  $\beta$ -glucosidases, notamment *Hanseniaspora sp*, *Pichia anomala* et *S. cerevisiae* (Hernandez, 2003; Swangkeaw et al., 2011). Des études ont montrés que les  $\beta$ -glucosidases produites par ces deux premières espèces sont inhibées par le glucose et l'éthanol (Swangkeaw et al., 2011). Des études étudiant l'activité  $\beta$ -glucosidase au cours de la fermentation alcoolique montrent que cette activité varie au cours du temps (Zamuz et al., 2004). L'activité est plus forte en début de fermentation, devient indétectable en culture pure avec *S. cerevisiae* mais continue jusqu'en fin de fermentation en culture pure et mixte avec *T. delbrueckii* (Maturano et al., 2012). Peu d'information sont disponible sur les gènes codant pour des glycosidases chez *S. cerevisiae*. En revanche, certains gènes ont été identifiés chez d'autres espèces : *BGL1* et *BGL2* chez *Saccharomycopsis fibuligera* codant pour une  $\beta$ -glucosidase et *ABF2* chez *Aspergillus niger* codant pour une  $\beta$ -L-arabinofuranosidase (Swiegers et al., 2005a).

Des préparations enzymatiques commerciales produites à partir d'*Aspergillus spp.* peuvent être utilisées en vinification pour augmenter la libération de terpènes. Néanmoins, ces enzymes ne sont pas spécifiques aux précurseurs du moût de raisin et peuvent entraîner des hydrolyses négatives pour la qualité du produit final (Riou et al., 1998).

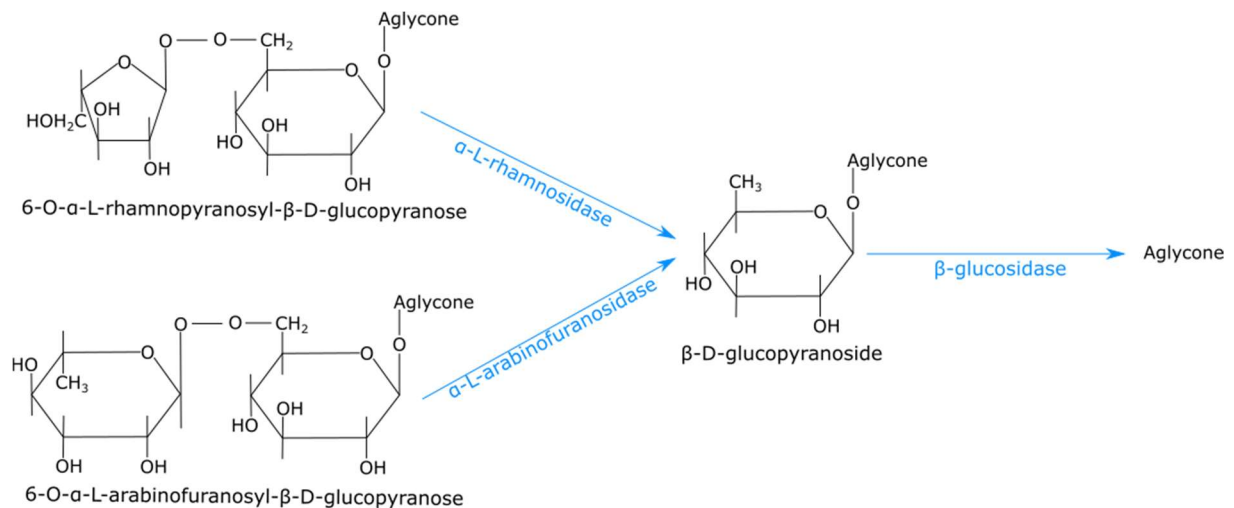


Figure 10 : Schéma de l'action des glycosidases pour la libération de terpènes (d'après Gunata et al. (1988)).

### 3.3. Les arômes fermentaires

#### 3.3.1. Présentation

Les arômes fermentaires sont des composés volatils produits par le métabolisme de la levure au cours de la fermentation alcoolique. Les arômes les plus produits par *S. cerevisiae* sont les alcools supérieurs et les esters.

Les alcools supérieurs sont considérés comme peu favorables au profil aromatique des vins, à l'exception du 2-phényléthanol qui a des notes florales de rose. A des niveaux modérés (inférieurs à 300 mg/L), les alcools supérieurs peuvent participer au caractère fruité et à la complexité aromatique des vins. Mais au-dessus de 400 mg/L, ces alcools sont délétères et peuvent entraîner une odeur forte et piquante (Bell and Henschke, 2005).

Les levures produisent aussi des acides gras linéaires ou ramifiés. Même si uniquement l'acide octanoïque peut influencer seul la qualité d'un vin, un mélange d'acides gras peut avoir un impact sur le vin (Shinohara, 1985). En effet, le seuil de perception pour un mélange d'acides hexanoïque, octanoïque et décanoïque a été évalué à 10 mg/L, concentration qui peut être atteinte dans certains vins (Shinohara, 1985).

Les esters peuvent avoir un fort effet sur les notes fruités et florales du vin. On distingue deux catégories d'esters : les esters d'acétate et les esters d'éthyle. Les esters d'acétate tels que l'acétate d'éthyle, l'acétate d'isoamyle et l'acétate de phényléthyle, dérivent des alcools supérieurs. Les esters d'éthyle comme l'hexanoate d'éthyle et l'octanoate d'éthyle sont synthétisés à partir des acides gras (Verstrepen et al., 2003). De plus, des esters d'éthyle peuvent être produits à partir d'acides gras ramifiés synthétisés par la voie d'Ehrlich, mais apparaissent principalement au cours du vieillissement des vins (Lytra et al., 2017; Pineau et al., 2009). Les esters d'éthyle participent à l'arôme des vins jeunes avec des notes fruitées agréables. Certains esters d'acétate contribuent aux notes florales et fruités (acétate d'amyle, d'isoamyle et de 2-phényléthyle). Néanmoins, à forte concentration, certains esters peuvent devenir moins favorables et apporter des notes de solvant. La contribution des esters à l'arôme du vin est difficile à décrire car dépend du type de vin, et met en jeu des mécanismes d'interactions et de synergies (Escudero et al., 2007; Ferreira et al., 2000a).

### 3.3.2. Métabolisme des arômes

La synthèse des arômes fermentaires est un mécanisme complexe qui dépend à la fois du métabolisme de l'azote de par la dégradation des acides aminés et la voie d'Ehrlich, et du métabolisme des sucres de par la glycolyse et le TCA (Figure 11).



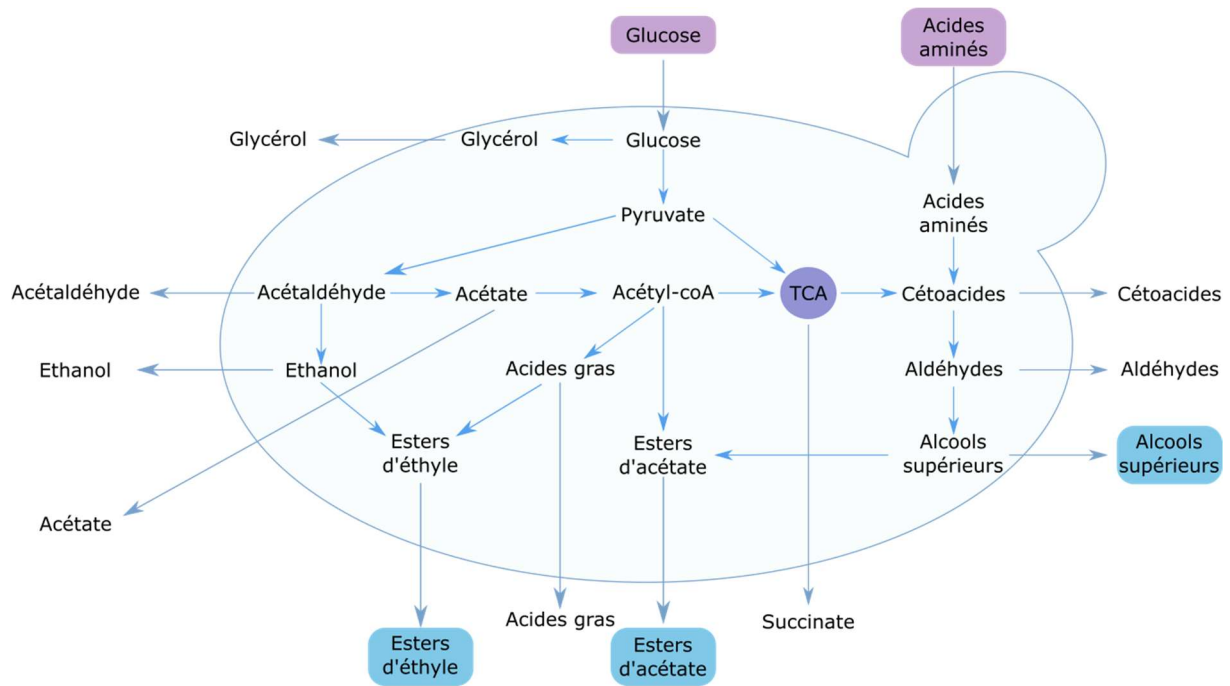


Figure 11 : Schéma des métabolismes carbonés et azotés et leur implication dans la synthèse des arômes (d'après Swiegers et al. (2005)).

### 3.3.2.1. Alcools supérieurs

Les alcools supérieurs sont synthétisés à partir de cétoacides provenant du catabolisme des acides aminés à travers la voie d'Ehrlich pour la leucine, valine, isoleucine, thréonine et la phénylalanine, ou synthétisés de novo à partir du métabolisme carboné central (Lambrechts and Pretorius, 2000). Chez *S. cerevisiae*, les alcools supérieurs sont synthétisés en trois étapes (Hazelwood et al., 2008) (Figure 12).

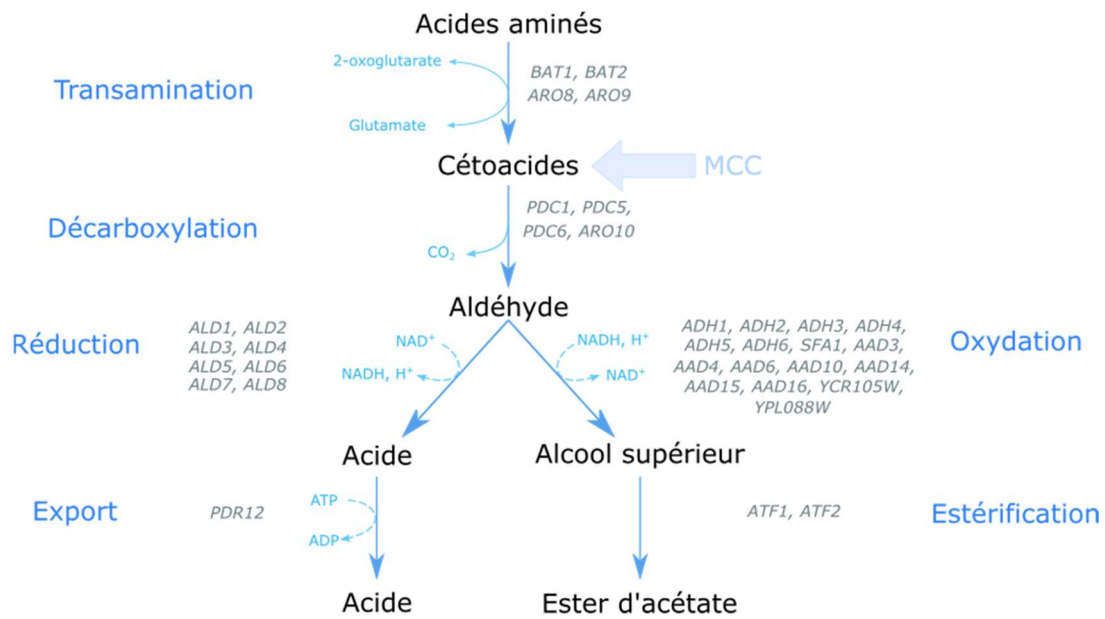


Figure 12 : Voie d'Ehrlich (d'après Hazelwood et al., (2008)

L'acide aminé est tout d'abord converti en cétoacide par une transamination catalysée par les enzymes codées par les gènes *BAT1* et *BAT2*. Du glutamate est formé au cours de cette réaction, en faisant un métabolite clé de la redistribution de l'azote.

Le cétoacide est ensuite converti en aldéhyde. Cette réaction met en jeu plusieurs gènes en fonction de la nature du cétoacide (Hazelwood et al., 2008). Parmi ces gènes on trouve *PDC1*, *PDC5* et *PDC6* codant pour des pyruvate décarboxylases (Hohmann et al., 1992), et *ARO10* codant pour une phénylpyruvate décarboxylase (Dickinson et al., 2003; Vuralhan et al., 2003).

L'aldéhyde subit finalement soit une réduction pour être converti en acide, soit une oxydation pour être converti en alcool supérieur. Ces réactions mettent en jeu un nombre important de gènes n'ayant pas une spécificité importante.

Même si la voie d'Ehrlich est la principale voie de formation des alcools supérieurs, la plupart de ces composés peuvent être formés directement via le métabolisme carboné central (Bell and Henschke, 2005; Hazelwood et al., 2008) (Figure 13). Ainsi la majorité des cétoacides impliqués dans la synthèse des alcools supérieurs sont des intermédiaires du TCA ou de la glycolyse. Par exemple, les précurseurs de l'isobutanol et de l'alcool isoamylique peuvent être formés à partir du métabolisme du pyruvate (Figure 13). De plus, il a été montré que seulement une faible partie des alcools supérieurs est synthétisée à partir du squelette

carboné des acides aminés correspondants, la majorité provenant de composés produits par le MCC (Crépin et al., 2017a; Rollero et al., 2017). La synthèse des alcools supérieurs peut donc se faire tout au long de fermentation, alors même que tout l'azote est consommé au cours du premier tiers de la fermentation (Molina et al., 2007).

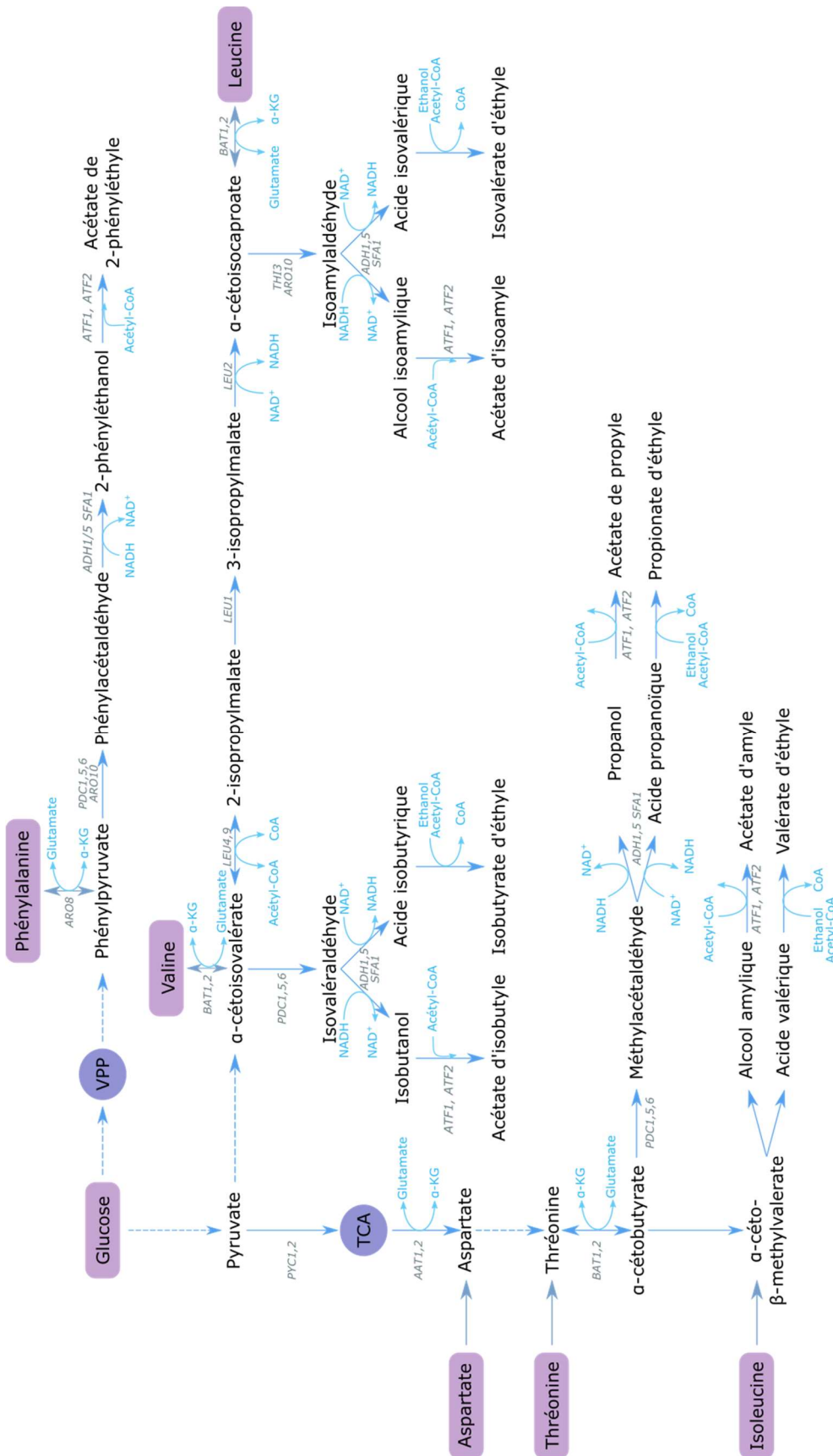


Figure 13 : Voie d'Ehrlich et connexion avec le métabolisme carboné (d'après Bell and Henschke, (2005); Bloem et al. (2016).

### 3.3.2.2. Esters d'acétate

Les esters d'acétate sont synthétisés à partir d'un alcool et d'un acétyl-coA (Figure 13). Cette synthèse est catalysée par des alcools acétyltransférases, codées par les gènes *ATF1* et *ATF2* chez *S. cerevisiae* (Malcorps and Dufour, 1992; Minetoki et al., 1993). Ainsi la concentration finale d'esters d'acétate est corrélée avec l'activité de ces gènes (Saerens et al., 2008). L'enzyme Atf1p est la plus importante. Elle est responsable de la production de 80% de l'acétate d'isoamyle, 75% de l'acétate de phényléthyle et près de 40% de l'acétate d'éthyle (Verstrepen et al., 2003). De plus, lorsque le gène *ATF1* est surexprimé, la production d'acétate d'isoamyle est multipliée par plus de 100 (Lilly et al., 2000; Verstrepen et al., 2003). Néanmoins, la production d'acétate d'isobutyle, d'acétate d'éthyle et d'acétate de propyle est maintenue même après délétion des gènes *ATF1* et *ATF2*, laissant penser qu'un troisième gène est impliqué (Lilly et al., 2000; Verstrepen et al., 2003).

Il existe également des estérases chez *S. cerevisiae* qui entraînent une diminution de l'accumulation des esters dans le milieu. Fukuda et al. (1998) et Lilly et al. (2000) ont montré que le gène *IAH1* entraîne l'hydrolyse de la plupart des esters. Il existe donc un équilibre entre la synthèse des esters et leur hydrolyse.

La production des esters d'acétate est donc dépendante de la disponibilité en acétyl-coA et en alcools supérieurs, mais aussi des activités enzymatiques de synthèse et d'hydrolyse (Saerens et al., 2010). Néanmoins, l'activité enzymatique est le facteur ayant le plus d'influence pour la production des esters (Lilly et al., 2000; Verstrepen et al., 2003).

### 3.3.2.1. Acides gras

Les acides gras sont des molécules dérivées du métabolisme des lipides. A cause de leur toxicité pour la cellule, ces molécules sont soit excrétées soit transformées en esters (cf partie 3.3.2.2)(Bisson, 1991; Fleet, 2003). On trouve majoritairement des acides gras saturés à nombre pair d'atomes de carbones. Ces composés peuvent avoir deux origines : la synthèse des acides gras à longue chaîne et le catabolisme des acides gras à longue chaîne via la  $\beta$ -oxydation (Schreier and Jennings, 1979). La voie anabolique est majoritaire, la  $\beta$ -oxydation nécessitant la présence d'oxygène, n'est active qu'au début de la fermentation (Schreier and Jennings, 1979). Les acides gras sont formés successivement par l'ajout de deux atomes de carbone venant du malonyl-CoA sur un acyl-CoA. L'acétyl-coA est le premier acyl-coA de la chaîne d'élongation des acides gras (Figure 14). Ce composé est principalement formé par

décarboxylation du pyruvate. Les réactions du processus d'élongation sont réalisées par un complexe multienzymatique comprenant sept unités appelé Fatty Acyl Synthase (FAS) 1/2 (Lynen et al., 1980). La voie de la  $\beta$ -oxydation est constituée par une série de réactions permettant la libération d'une molécule d'acétyl-coA à partir d'un acide gras. Cela donne donc un acide gras avec une chaîne plus courte de deux atomes de carbone.

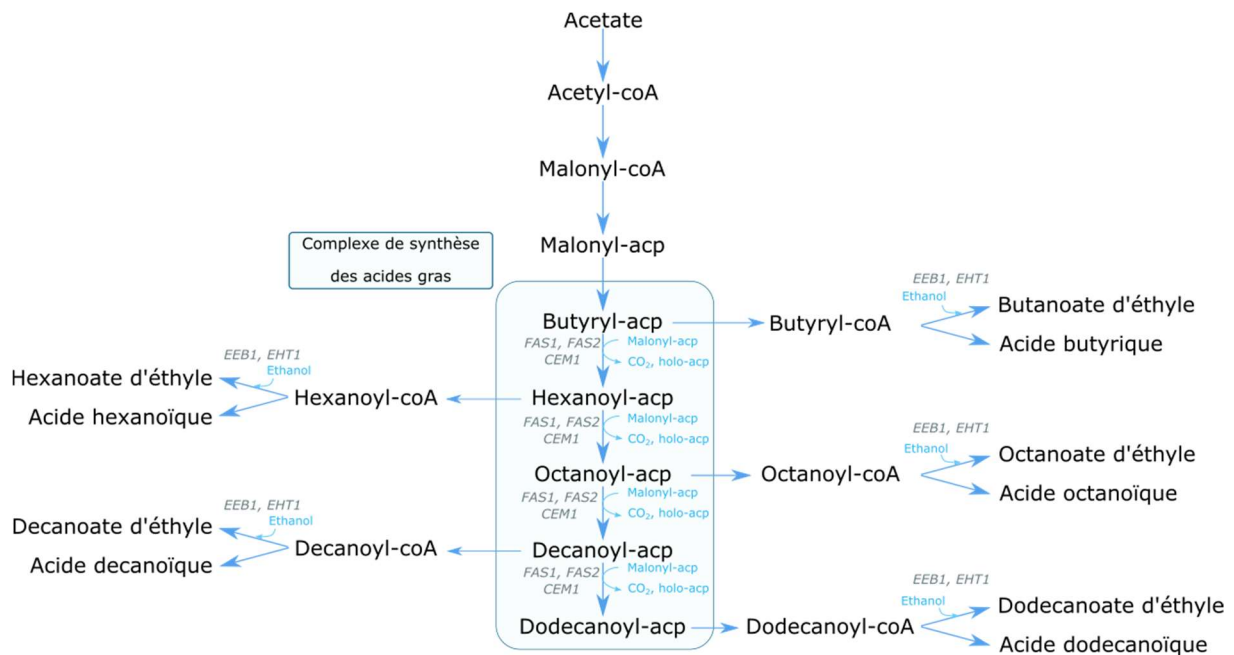


Figure 14 : Synthèse des acides gras et des esters d'éthyle (d'après Saerens et al., (2010))

### 3.3.2.2. Esters d'éthyle

Les esters d'éthyle sont synthétisés à partir d'éthanol et d'acyl-coA. La réaction est catalysée par des acyl-coA/éthanol O-acyltransférases codées par les gènes *EHT1* et *EEB1* (Figure 14). La majorité des esters sont synthétisés par Eeb1p. Cette enzyme possède aussi une activité estérase des esters à courte chaîne et peut donc être impliquée dans le métabolisme des lipides. En revanche, Eht1p ne catalyse que la synthèse d'hexanoate d'éthyle à partir d'éthanol et d'hexanoyle-CoA (Saerens et al., 2008).

A l'inverse des esters d'acétate, le facteur influant le plus la production des esters d'éthyle est la disponibilité en acyl-CoA (Saerens et al., 2008). De plus, la surexpression des gènes *EHT1* et *EEB1* n'entraîne pas de surproduction de ces composés. Cela peut s'expliquer par la double fonction de ces enzymes qui ont une activité de synthèse mais aussi une activité estérase (Saerens et al., 2006).

## 4. Effet des paramètres environnementaux

### 4.1. Sucre et éthanol

La teneur en sucre des moûts de raisin varie suivant plusieurs paramètres, notamment la variété et le climat. Une étude menée sur 98 cultivars a trouvé des concentrations en sucres variant de 93.5 g/L à 256 g/L, avec une valeur médiane de 150 g/L (Liu et al., 2006). Néanmoins, ces valeurs sont amenées à augmenter de par le réchauffement climatique et le choix des vinificateurs de privilégier une récolte à maturité polyphénolique (Mira de Orduña, 2010).

De fortes concentrations en sucres ont un impact négatif sur la fermentation et principalement sur la croissance des levures (Arroyo-López et al., 2009; D'Amato et al., 2006; Ribereau-Gayon et al., 2006). Cette sensibilité est due au stress osmotique, mais aussi aux hautes concentrations en éthanol qu'entraînent de fortes teneurs en sucre (Mauricio and Salmon, 1992; Nishino et al., 1985). Elle se manifeste à la fois au niveau de la vitesse de croissance et de la population maximale en fin de culture. La diminution du taux de croissance en présence de fortes concentrations en sucre est variable selon les espèces (Charoenchai et al., 1998; Mestre Furlani et al., 2017). Ainsi, alors que le taux de croissance de *T. delbrueckii* passe de 0.15 à 0.09 h<sup>-1</sup> entre 200 et 300 g/L de sucres, le taux de croissance de *M. pulcherrima* dans les mêmes conditions n'est pas impacté (Charoenchai et al., 1998). En revanche, la concentration maximale de biomasse est modulée par la concentration en sucre pour toutes les espèces testées dans cette étude. D'autre part, dans le cadre de cultures mixtes non-*Saccharomyce/S. cerevisiae*, une variation de la concentration initiale en sucre de 200 à 240 g/L de sucre n'a pas entraîné de différence significative sur les paramètres fermentaires (Lleixà et al., 2016), l'écart étant peut-être trop faible. Les auteurs ont tout de même noté que l'implantation de *S. cerevisiae* était plus rapide avec une plus haute concentration en sucre.

La concentration en sucre dans le milieu peut également affecter les activités enzymatiques, notamment celle des glycosidases. Il a été constaté que les activités  $\beta$ -glucosidases des levures œnologiques étaient moins sensibles au sucre que celle des  $\beta$ -glucosidases extraites d'autres organismes comme *A. niger* (Palmeri and Spagna, 2007). Néanmoins, Pogorzelski and Wilkowska (2007) ont montré que l'activité  $\beta$ -glucosidase de *S. cerevisiae* était réduite de 40 % dans un milieu contenant 200 g/L de sucres, mais aussi de 50 % dans un milieu contenant 5 % d'éthanol. Les niveaux d'inhibition par le sucre et l'éthanol sont également dépendant des souches de levures étudiées (Cordero Otero et al., 2003).

## 4.2. Azote

L'azote est disponible à différentes concentrations dans le moût suivant les cépages, les conditions climatiques et la maturité du raisin au moment des vendanges. Les teneurs en azote des moûts varient donc de 60 à 400 mg/L (Bell and Henschke, 2005; Bely et al., 1990a). L'azote est présent de 5 à 10 % sous forme de protéines, de 25 à 40 % sous forme de peptides, de 25 à 30 % sous forme d'acides aminés et enfin de 3 à 10 % sous forme d'ion ammonium (Ribereau-Gayon et al., 2006). On définit comme azote assimilable (Yeast assimilable nitrogen ou YAN en anglais) les sources d'azote que la levure peut métaboliser, principalement l'ammonium et les acides aminés (Bell and Henschke, 2005).

### 4.2.1. Impact de l'azote sur le déroulement de la fermentation

L'azote est un nutriment limitant pour la croissance des levures. Une carence en azote peut entraîner une fermentation languissante ou des arrêts de fermentation. On considère qu'une concentration minimale de 120 à 140 mg/L d'azote initial est nécessaire pour avoir une fermentation complète par *S. cerevisiae* (Agenbach, 1977; Bely et al., 1990a). Pour corriger les carences, des ajouts d'azote sont réalisés sous la forme de diammonium phosphate (DAP) ou de produits commerciaux complexes préparés à partir d'autolysats de levures, et pouvant donc contenir des acides aminés et des peptides.

Avec *S. cerevisiae*, l'ajout d'azote a un impact sur la cinétique fermentaire, qui dépend du moment d'ajout (Figure 15). Si l'azote est ajouté avant l'inoculation ou en phase de croissance, il entraîne une augmentation de la population et de la vitesse maximale de fermentation (Manginot et al., 1998). Si l'ajout est réalisé en phase stationnaire, seule la vitesse de fermentation est impactée (Beltran et al., 2005). Dans tous les cas, un ajout d'azote entraîne une diminution de la durée de fermentation (Bely et al., 1990a).



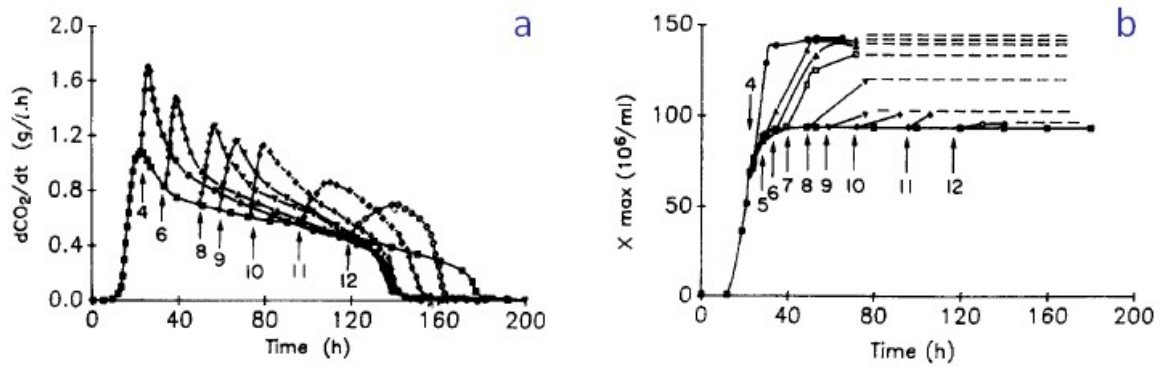


Figure 15 : Impact du moment d'ajout de DAP sur la cinétique fermentaire (a) et sur la population cellulaire (b). Les flèches indiquent le moment d'ajout. (Bely et al., 1990a)

La quantité d'azote disponible affecte également les fermentations par des levures non-*Saccharomyces*, même si les effets observés sont différents. Toutes les espèces n'ont en effet pas les mêmes besoins en azote. En culture pure, il semble que l'azote ne soit pas limitant pour *H. guillermondii*, car aucune différence n'a été observée sur la croissance, la vitesse de fermentation, la consommation d'azote et la production de biomasse entre un moût contenant 175 mgN/L et le même moût enrichi pour atteindre 387 mgN/L (Lage et al., 2014). Néanmoins, ces concentrations sont peut-être trop hautes pour être limitantes pour cette espèce. En revanche, *T. delbrueckii* fermente plus rapidement et a une meilleure viabilité avec un moût riche en azote (324 mgN/L), même si sa vitesse de croissance n'est pas modifiée (Taillandier et al., 2014). *T. delbrueckii* est tout de même capable de terminer la fermentation en culture pure avec une faible concentration en azote (100 mgN/L) (Valera et al., 2019). Plus généralement, il semble que la production de biomasse soit positivement corrélée avec la quantité d'azote consommée par la plupart des levures non-*Saccharomyces* (Rollero et al., 2018a).

La disponibilité en azote affecte aussi le déroulement de la fermentation en culture mixte. Lleixà et al. (2016) ont montré qu'en co-inoculation avec *H. uvarum*, *C. zemplinina*, *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae*, la quantité initiale d'azote a un impact sur la cinétique fermentaire, et une concentration initiale inférieure à 100 mgN/L entraîne un arrêt de fermentation. L'azote impacte aussi la persistance des non-*Saccharomyces* face à *S. cerevisiae*, notamment avec *H. uvarum* qui semble plus compétitive en début de fermentation avec une concentration d'azote élevée, mais que l'on retrouve pendant plus longtemps en fermentation avec une concentration en azote plus faible (Valera et al., 2019).

En inoculation séquentielle, la concentration initiale en azote a un impact direct sur le développement de *S. cerevisiae*. En effet, avec un moût contenant 170 mgN/L, *T. delbrueckii* est capable de consommer presque tout l'azote en 48 h, ce qui limite l'implantation de *S. cerevisiae* lors de son inoculation (Taillandier et al., 2014) (voir partie 5.2.).

#### 4.2.2. Impact de l'azote sur la production d'arômes

De nombreuses études ont été menées sur l'impact de l'ajout d'azote sur la production d'arômes par *S. cerevisiae*. Néanmoins, les résultats sont parfois contradictoires du fait de la diversité dans les souches utilisées et des conditions expérimentales. En particulier, le moment d'ajout de l'azote (avant inoculation ou en cours de fermentation) ainsi que la nature de l'azote (minéral ou organique) ont un effet important sur la production d'arômes. Au contraire, peu d'études se sont intéressées à l'impact de l'azote sur la production d'arômes par les levures non-*Saccharomyces* en culture pure ou en culture mixte avec *S. cerevisiae*.

La production d'alcools supérieurs par *S. cerevisiae* est impactée par la teneur en azote suivant deux schémas. Premièrement, la production de propanol est proportionnelle à la quantité d'azote consommée (Beltran et al., 2005; Carrau et al., 2008; Mouret et al., 2014a). Le propanol est donc considéré comme un marqueur métabolique de la quantité d'azote disponible. Néanmoins, la production de propanol dépend également de la nature (minéral ou organique) de l'azote disponible, surtout en cas d'ajout en phase stationnaire (Seguinot et al., 2018). Les autres alcools supérieurs ont un comportement différent. Leur production augmente lorsque la concentration initiale en azote augmente jusqu'à atteindre un seuil situé autour de 200 à 300 mgN/L. Lorsque la concentration en azote augmente au-delà de cette limite, la production en alcools supérieurs diminue (Beltran et al., 2005; Jiménez-Martí et al., 2007; Mouret et al., 2014a; Vilanova et al., 2007a). Ce phénomène peut s'expliquer par une redistribution des flux autour des  $\alpha$ -cétoacides dans la voie d'Ehrlich. En présence de faibles concentrations d'azote, la croissance cellulaire est limitée et donc la faible demande en acides aminés conduit à une production limitée de cétoacides et par conséquent d'alcools supérieurs. Lorsque la disponibilité en azote augmente, la demande en acides aminés augmente, entraînant une induction de la production de cétoacides par le métabolisme carboné central, qui va excéder les besoins et permettre la production d'une forte concentration d'alcools supérieurs. Lorsque la disponibilité en azote augmente au-delà de 250

mgN/L, la demande en acide aminé est telle qu'une grande partie des cétoacides produits par le MCC sont dirigés vers la production de protéines (Rollero et al., 2017).

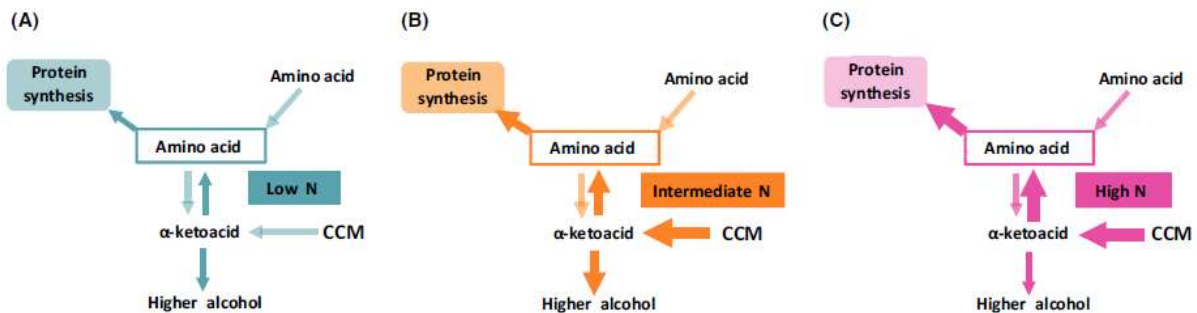


Figure 16 : Distribution des flux autour des cétoacides en fonction de la concentration initiale en azote. A : 70 mgN/L, B : 250 mgN/L, C : 425 mgN/L. (Rollero et al., 2017)

La production d'esters d'acétate est également impactée par la teneur en azote. Un ajout d'azote entraîne généralement une augmentation de la concentration finale en esters d'acétate (Beltran et al., 2005; Mouret et al., 2014a; Rollero et al., 2015; Torrea et al., 2011). Cet effet est dû à la surexpression des gènes *ATF1* et *ATF2* codant pour les alcools acétyltransférases permettant de convertir les alcools supérieurs en esters d'acétate (Fujiwara et al., 1999; Seguinot et al., 2018; Verstrepen et al., 2003). Les esters d'éthyle sont également impactés par les ajouts d'azote, même si le lien avec leur métabolisme de production n'est pas direct. Ainsi, la production d'esters d'éthyle augmente lors d'un ajout d'azote (Mouret et al., 2014a; Rollero et al., 2015). Cet effet pourrait être dû à l'utilisation des  $\alpha$ -cétoacides pour la synthèse des dérivés acyl-coA. La synthèse des acyl-coA pourrait aussi être induite à cause des forts besoins en lipides pour la production de biomasse.

Un effet de l'azote sur la libération de thiols a également été montré, même si les mécanismes entrant en jeu ne sont pas clairement établis. Le lien entre l'azote et la libération des thiols se ferait par le NCR. Harsch and Gardner (2013) ont montré que la délétion de plusieurs gènes impliqués dans le NCR ou le métabolisme des acides aminés (dont *TOR1*, *URE2* et *GLN3*) avait un effet sur la libération de thiols. Néanmoins la délétion de ces gènes entraîne surtout une diminution de la production de 3MHA, molécule produite à partir de l'acétylation du 3MH principalement par le gène *ATF1* (Swiegers et al., 2006). L'effet du NCR sur la libération de 3MH et 4MMP a été proposé à deux niveaux : sur l'incorporation des précurseurs dans la cellule et sur la libération des thiols à partir des précurseurs (Subileau et al., 2008b; Thibon et al., 2008). Subileau et al. (2008b) ont montré que lors d'un ajout de DAP, qui constitue une

source d'azote préférentielle pour la levure et qui donc prolonge l'activation du NCR, la production de thiols est plus faible. Ils ont également montré que l'activation ou la répression du transporteur Gap1p a un impact sur la production de ces composés. Leur hypothèse est donc que l'ajout de DAP pourrait retarder le transport des précurseurs dans la cellule à cause d'une régulation du NCR sur *GAP1* (Beltran et al., 2005). Au contraire, Thibon et al. (2008) proposent que le NCR n'impacte pas le transport de précurseurs mais la libération des thiols par le gène *IRC7*, dont la transcription serait réprimée par Ure2p. Enfin, des résultats contraires ont été observés après l'ajout de DAP ou d'urée en fermentation : Subileau et al. (2008b) ont observé une diminution de la production de thiols après un ajout de DAP et une augmentation après un ajout d'urée ; Harsch and Gardner (2013) ont obtenus une augmentation de la production de thiols après ajout de DAP ou d'urée. Néanmoins, les souches utilisées étaient différentes, ainsi que les concentrations en azote de départ et d'ajout. Ces différentes observations montrent que les systèmes de régulation œuvrant sur la régulation de la production de thiols sont encore mal connus.

Le lien entre l'azote et la production d'arômes par les levures non-*Saccharomyces* semble plus variable. Par exemple, la production d'arômes par *H. guilliermondii* n'est pas influencée par la quantité d'azote disponible (Lage et al., 2014). Au contraire, d'autres espèces comme *W. anomalus* voient leur production d'arômes impactée par la composition en azote du moût (Rollero et al., 2018a). Néanmoins, ces aspects n'ont été que peu étudiés jusqu'à présent.

#### 4.3. Lipides et oxygène

Les stérols et acides gras sont des éléments essentiels en fermentation pour le maintien de l'intégrité des membranes et la résistance à l'éthanol (Alexandre et al., 1994; Lafon-Lafourcade et al., 1979). En condition anaérobie, les levures ne peuvent pas synthétiser les stérols et acides gras, car cela nécessite de l'oxygène (Andreasen and Stier, 1954, 1953). Les levures doivent donc trouver ces composés dans leur milieu. Dans le cas du moût de raisin, les lipides sont présents dans les bourbes. Les bourbes sont des particules solides provenant des pépins, de la peau des raisins ou de rafles après pressurage de la vendange. Ces particules contiennent des lipides sous forme de stérols et d'acides gras. Les stérols du moût sont composés à 80 % de  $\beta$ -sitostérol. Les acides gras sont présents à moitié sous forme saturée et à moitié sous forme insaturée (Casalta et al., 2016). Les quantités de bourbes dans le moût varient suivant les pratiques viticoles et le niveau de débourbage. Le débourbage est l'étape

de clarification des vins, par élimination d'une partie des bourbes. Si le débouillage est insuffisant, des arômes herbacés et terreux peuvent apparaître (Bertrand et al., 1978). Si le débouillage est excessif, cela peut entraîner des carences en lipides, pouvant mener à des fermentations languissantes ou incomplètes dues à une forte mortalité cellulaire chez *S. cerevisiae* (Julien et al., 2000a; Sablayrolles et al., 1996). Mauricio et al. (1991) ont également observé un arrêt de croissance prématuré chez *T. delbrueckii* lors d'une fermentation en anaérobiose sans source de lipides. D'autre part, en condition anaérobiose, un ajout de lipides a pour conséquence de stimuler le métabolisme et la croissance cellulaire en maintenant leur viabilité (Mauricio et al., 1998, 1991; Varela et al., 2012). Une concentration plus élevée en lipides en début de fermentation a aussi pour effet d'allonger la phase de latence de *T. delbrueckii* en culture pure, et d'augmenter sa viabilité ce qui lui permet de se maintenir dans le milieu avec *S. cerevisiae* dans les cas de co-culture (Brou et al., 2018).

Une technique utilisée en vinification pour augmenter les teneurs en lipides des levures est l'oxygénation. Apporter de l'oxygène dans le milieu permet aux levures de synthétiser des ergostérols et des phospholipides, ce qui a un effet positif sur leur croissance et leur résistance à l'éthanol (Mauricio et al., 1998, 1991; Morales et al., 2015; Pina et al., 2004). Cette effet est d'autant plus marqué sur les levures non-*Saccharomyces*, dont *M. pulcherrima*, *T. delbrueckii*, *H. uvarum* et *H. guilliermondii* (Mauricio et al., 1991; Morales et al., 2015; Pina et al., 2004).

Enfin, la disponibilité en lipides a un impact sur la production d'arômes. Lorsque les acides gras insaturés sont disponibles en grande quantité dans le milieu, leur synthèse *de novo* est réduite, ce qui réduit également la production d'esters d'éthyle et d'acétate d'isoamyle chez *S. cerevisiae* (Yunoki et al., 2005). La diminution de la production d'esters d'éthyle a également été observée après un ajout d'acides gras (Saerens et al., 2008). Enfin, les acides gras répriment l'expression du gène *ATF1*, responsable de la synthèse des esters d'acétate (Fujii et al., 1994; Fujiwara et al., 1999).

#### 4.4. Température

La fermentation alcoolique étant un processus exothermique, il est nécessaire d'en réguler la température. En effet, une température de fermentation trop élevée peut entraîner une baisse de la viabilité chez les levures (Jolly et al., 2006) et une évaporation plus importante des composés volatils (Mouret et al., 2014a).

L'impact de la température sur les levures dépend des espèces et des souches (Torija et al., 2003a). Néanmoins plusieurs études ont observé un effet négatif de températures élevées sur la viabilité des levures à partir de 25 °C (Fleet, 1990; Torija et al., 2003a). La croissance de plusieurs *non-Saccharomyces* comme *K. apiculata*, *T. delbrueckii*, *P. anomala* et *M. pulcherrima* est meilleure à 10 °C qu'à 25 °C (Bilbao et al., 1997; Charoenchai et al., 1998; Heard and Fleet, 1988). En revanche, la vitesse de croissance de *S. cerevisiae* est plus faible à basse température (Torija et al., 2003a). Ainsi en culture mixte à basse température, les levures *non-Saccharomyces* survivent plus longtemps dans le milieu face à *S. cerevisiae* (Heard and Fleet, 1988). Une température plus basse augmente également la tolérance à l'éthanol des levures, avec un effet plus marqué sur les levures *non-Saccharomyces* (Charoenchai et al., 1998; Gao and Fleet, 1988; Heard and Fleet, 1988; Torija et al., 2003a). Ces effets pourraient s'expliquer par un changement de la composition en lipides de la membrane en fonction de la température, principalement un changement du degré d'insaturation des acides gras (Beltran et al., 2008; Torija et al., 2003b).

La température de fermentation a aussi un effet sur la concentration finale en arômes dans le vin, d'une part par un effet sur le métabolisme de *S. cerevisiae* et d'autre part sur la modification de l'évaporation des composés volatils. La contribution de ces effets dépend de la classe chimique des composés, ainsi que de leurs caractéristiques physicochimiques, principalement leur volatilité et hydrophobicité (Morakul et al., 2011). L'effet de la température sur les alcools supérieurs dépend ainsi des composés. La production totale (quantité totale produite par la levure, indépendamment de l'évaporation) d'isobutanol augmente avec la température, alors que la production d'alcool isoamylique est maximale à 24°C. Le propanol n'est en revanche pas affecté par la température (Mouret et al., 2014a). L'effet d'une température élevée est toujours négatif sur les concentrations en esters d'éthyle et d'acétate, principalement à cause de leur forte évaporation (Beltran et al., 2008; Molina et al., 2007; Mouret et al., 2014a). Un effet de la température sur la production de thiols a également été observé, avec une production de 3MH, 3MHA et 4MMP plus importante à 20°C qu'à 13°C (Masneuf Pomarede et al., 2006).

#### 4.5. Vitamines et oligo-éléments

Les vitamines sont nécessaires pour la croissance et la production d'arômes (Hagen et al., 2008; Wang et al., 2003). Une carence en vitamine peut entraîner une diminution de la

biomasse et de la viabilité, ainsi qu'un ralentissement de la vitesse fermentaire (Ough et al., 1989).

L'inositol ou vitamine B7 participe à la synthèse des membranes et à la résistance contre l'éthanol (Furukawa et al., 2004). L'acide folique ou vitamine B9 joue un rôle de donneur de groupement méthyl dans la synthèse des purines et de la méthionine (Thomas and Surdin-Kerjan, 1997). La biotine est nécessaire à l'activation de l'acétyl-coA carboxylase au cours de la synthèse de novo des acides gras (Forch et al., 1975). Une carence en biotine peut mener à une production insuffisante d' $\alpha$ -cetoglutarate et par conséquent à une baisse de production des acides aminés (Lynen et al., 1980). L'acide pantothénique est un élément composant le coenzyme A. En quantité insuffisante, la concentration en acétyl-coA est réduite, ce qui entraîne une réduction de la production d'acides gras (Wang et al., 2003). La thiamine intervient sous forme de thiamine pyrophosphate dans plusieurs voies métaboliques dont la voie des pentoses phosphate et la voie d'Ehrlich (Li et al., 2010). Cette vitamine est rapidement consommée en début de fermentation, notamment par les levures non-*Saccharomyces*. Cela peut entraîner une carence pour *S. cerevisiae*, et par conséquent un risque de fermentation lente ou incomplète (Bataillon et al., 1996).

Les minéraux et ions métalliques jouent également un rôle pendant la croissance cellulaire et la fermentation, ainsi que dans la production d'arômes (Ibanez et al., 2008; Pereira, 1988). Certains éléments comme le zinc, le manganèse et le molybdène entraînent une accélération de la croissance cellulaire, une réduction de l'acidité totale et une augmentation de l'éthanol (Pereira, 1988).

#### 4.6. Dioxyde de soufre

Le dioxyde de soufre (SO<sub>2</sub> ou sulfites) est ajouté dans les moûts pour réduire le développement de microorganismes néfastes et limiter les phénomènes d'oxydation (Bakker et al., 1998). Le SO<sub>2</sub> total ajouté dans le moût se sépare en SO<sub>2</sub> libre et SO<sub>2</sub> combiné avec différentes molécules comme les sucres ou les anthocyanes. C'est le SO<sub>2</sub> libre qui a le plus fort impact sur la croissance des levures (Ough and Crowell, 1987). Un ajout de SO<sub>2</sub> dans le moût entraîne un retard du début de la fermentation due à l'allongement de la phase de latence (Blouin and Peynaud, 2012; Yang, 1975). L'ajout de SO<sub>2</sub> réduit de manière importante la croissance et la viabilité des levures non-*Saccharomyces* (Bokulich et al., 2015; Ciani and Pepe, 2002; Egli et al., 2002). Le SO<sub>2</sub> impacte les cellules à plusieurs niveaux : inhibition de la glycolyse, blocage du

transport de nutriment, réaction avec l'ATP ou encore blocage des ponts disulfures (Ough and Crowell, 1987).

Certaines espèces de levures comme *S. cerevisiae* sont moins sensibles au SO<sub>2</sub> et peuvent donc se développer dans un moût sulfité. Cette résistance a été liée à la présence du gène *SSU1* et plus précisément à l'allèle *SSU1-R* (Avram and Bakalinsky, 1997; Yuasa et al., 2004). Ce gène est présent chez plusieurs espèces du genre *Saccharomyces*, notamment *S. cerevisiae*, *S. bayanus* et *S. fermentati* (Yuasa et al., 2004). Néanmoins, certaines espèces non-*Saccharomyces* sont capables de croître dans des milieux sulfités. Ainsi *M. pulcherrima* peut se développer dans un moût contenant jusqu'à 2 mM de SO<sub>2</sub> (Barbosa et al., 2018).

## 5. Interactions entre les levures

En biologie, une interaction désigne un effet que deux organismes présents dans le même environnement ont l'un sur l'autre. Une interaction peut être intra- ou inter-espèce, positive, neutre ou négative pour l'un ou l'autre des organismes concernés (Martin and Schwab, 2012) (Tableau 9).

Tableau 9 : Les différents types d'interaction et leurs effets sur les organismes.

Effet sur		Nom de l'interaction
Espèce A	Espèce B	
Positif	Positif	Mutualisme
Positif	Neutre	Commensalisme
Positif	Négatif	Parasitisme
Neutre	Neutre	Neutralisme
Neutre	Négatif	Amensalisme
Négatif	Négatif	Compétition

Ces interactions peuvent être observées au cours de la fermentation alcoolique lors de la présence de plusieurs espèces dans le moût, lors d'une fermentation spontanée ou d'une fermentation en culture mixte. Dans ce dernier cas, plusieurs mécanismes d'interaction entre les levures non-*Saccharomyces* et *S. cerevisiae* ont été observés.

### 5.1. Interaction de contact cellule-cellule

Le phénomène de contact cellule-cellule est bien connu pour les cellules animales, où le contact entre les cellules permet de stopper la croissance cellulaire lorsqu'une forte densité



de cellule est atteinte (Fiore and Degrassi, 1999; Hirano et al., 2001). Concernant les levures en fermentation alcoolique, ce phénomène a été décrit pour la première fois par Nissen et al. (2003). Les auteurs ont remarqué un arrêt de croissance précoce et une diminution de la biomasse finale de plusieurs levures non-*Saccharomyces* (dont *T. delbrueckii*) en co-inoculation comparé à des cultures pures. Les hypothèses d'une limitation en nutriment ainsi que de la production d'un composé toxique par *S. cerevisiae* ont été écartés. Néanmoins, l'ajout d'une forte concentration de cellules de *S. cerevisiae* viables entraîne un arrêt de croissance des non-*Saccharomyces*, mais pas un ajout de cellules mortes. Des interactions de contact cellule-cellule ont donc été suspectées. L'utilisation d'un tube de dialyse pour séparer physiquement les deux espèces étudiées a conduit à une croissance identique à celle obtenue en culture pure pour les deux espèces. De façon similaire, l'utilisation d'un fermenteur à deux compartiments séparés par une membrane permettant une séparation des cellules mais l'homogénéité du milieu a montré que la viabilité de *T. delbrueckii* diminue lorsqu'on la met en contact avec *S. cerevisiae*, dont la viabilité ne change pas (Renault et al., 2013). *S. cerevisiae* entrainerait donc la mort des cellules de *T. delbrueckii* par contact cellule-cellule. Le mécanisme de ce phénomène n'est pas connu. Les hypothèses envisagées sont une interaction de type ligand-récepteur sur la membrane des cellules, ou la production d'un composé toxique formant un gradient de concentration qui deviendrait toxique autour des cellules de *S. cerevisiae* (Renault et al., 2013).

Néanmoins, ce phénomène n'est pas le seul impliqué dans les résultats observés en cultures mixtes. En effet, Renault et al. (2013) ont aussi noté que *T. delbrueckii* avait un effet sur la croissance de *S. cerevisiae* même en l'absence de contact, et dans l'étude de Taillandier et al. (2014) utilisant le même bioréacteur, aucune différence de comportement n'est observée lorsque les cellules de *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae* sont en contact ou séparées.

## 5.2. Compétition pour la consommation de nutriments

La présence de plusieurs espèces dans un même milieu contenant une quantité de nutriment limitée peut entraîner l'apparition de compétition pour la consommation de ces nutriments, surtout ceux présents en quantité limitante pour la croissance, comme l'oxygène, l'azote et les vitamines.

Plusieurs non-*Saccharomyces* ont été identifiées comme étant sensibles à la faible disponibilité en oxygène en condition œnologique. Cette caractéristique pourrait expliquer la

baisse de viabilité observée en début de fermentation mixte, notamment pour *T. delbrueckii*, *K. thermotolerans* (Holm Hansen et al., 2001) ou encore *S. bacillaris* (Englezos et al., 2018). En effet, même si cette sensibilité n'est pas spécifique aux cultures mixtes ou séquentielles, elle induit une moins bonne implantation des levures non-*Saccharomyces* dans ces conditions. De plus, il a été montré que des ajouts d'oxygène en fermentation permettait de favoriser la croissance de *S. bacillaris* (Englezos et al., 2018) et d'augmenter le temps de survie de ces levures (Englezos et al., 2018; Holm Hansen et al., 2001).

La compétition pour la consommation de l'azote assimilable a aussi été étudiée. En effet, plusieurs espèces non-*Saccharomyces* peuvent consommer des quantités importantes d'azote (Medina et al., 2012; Prior et al., 2019; Rollero et al., 2018b; Taillandier et al., 2014). Cela peut donc entraîner une diminution de la quantité d'azote disponible pour *S. cerevisiae*, surtout en inoculation séquentielle, ce qui peut mener à des fermentations languissantes ou incomplètes (Medina et al., 2012; Taillandier et al., 2014). Dans la majorité des cas, un ajout d'azote permet d'atteindre la fin de fermentation plus rapidement (Medina et al., 2012; Rollero et al., 2018b). A l'inverse, des études ont montré que certaines espèces non-*Saccharomyces* ont une activité protéolytique permettant la libération d'azote assimilable au cours de la fermentation, permettant une meilleure fermentation de *S. cerevisiae*, ce qui illustre un phénomène de synergie (Dizy and Bisson, 2000; Prior et al., 2019).

Dans certains cas, l'ajout d'azote ne suffit pas à retrouver une vitesse de fermentation correcte. En effet, certaines vitamines comme l'acide pantothénique ou la thiamine peuvent être consommées en début de fermentation par les levures non-*Saccharomyces*, induisant une carence pour *S. cerevisiae* (Bataillon et al., 1996; Wang et al., 2003). Medina et al. (2012) ont montré qu'un ajout de vitamines (myo-inositol, pyridoxine, acide nicotinique, panthoténate, thiamine,...) était bénéfique lors de fermentation avec *M. pulcherrima* et *H. uvarum*. Enfin, Rollero et al. (2018b) ont montré que l'ajout d'un produit commercial complexe permettait d'accélérer la fermentation en co-culture avec *Z. meyeriae*, montrant un besoin en vitamines, lipides ou minéraux.

### 5.3. Production de composés toxiques et effet killer

Le principal composé toxique produit au cours de la fermentation est l'éthanol. Les levures non-*Saccharomyces* ont en règle générale une faible tolérance à l'éthanol, bien inférieure aux

concentrations que peut produire *S. cerevisiae*, ce qui permet à cette espèce de dominer le milieu (I. S. Pretorius, 2000).

Il a été montré que des acides gras produits au cours de la fermentation ont un impact négatif sur la croissance de *S. cerevisiae* et de *K. marxianus*, en particulier les acides octanoïque et décanoïque (Viegas et al., 1989). Ces composés pourraient s'insérer dans la membrane, en augmenter la perméabilité et modifier l'organisation et l'activité des enzymes membranaires (Viegas et al., 1989).

Enfin, plusieurs études montrent que les levures non-*Saccharomyces* comme *S. cerevisiae* peuvent produire et être sensibles à des toxines ayant un effet killer. Une levure killer est définie comme ayant la capacité de produire, sécréter et être résistante à une toxine entraînant la mort de levures y étant sensibles (Yap et al., 2000). Différentes toxines ont été identifiées suivant les espèces de levures étudiées (Magliani et al., 1997). Elles ont comme point commun d'être d'origine protéique, d'avoir un effet killer en conditions acides (entre pH 3 et 6) et d'être inactivées à haute température (à partir de 25°C) (Golubev, 2006). En revanche le mécanisme d'action diffère selon les toxines. Par exemple les toxines K1 de *S. cerevisiae* se lient aux récepteurs Kre1p de la membrane plasmique, créant ainsi un canal ionique dans la membrane, ce qui entraîne la mort de la cellule. En revanche, les toxines K28 entraîne l'arrêt de la synthèse d'ADN, et ainsi l'apoptose des cellules (Magliani et al., 1997). Albergaria et al. (2010) ont identifié dans le surnageant de culture de *S. cerevisiae* une fraction protéique entre 2 et 10 kDa ayant un effet négatif sur la croissance de *K. thermotolerans*, *T. delbrueckii* et *H. guilliermondii*, et entraînant la mort de *K. marxianus*. Les études suivantes ont montré que ces peptides étaient sécrétés par *S. cerevisiae* à la fin de la phase de croissance, et dérivait de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (Branco et al., 2014). Ces peptides affecteraient l'intégrité de la membrane des levures sensibles, modifiant le pH intracellulaire (Branco et al., 2015).

#### 5.4. Changements transcriptomiques

Un enjeu pour aller plus loin dans la compréhension des interactions levure/levure est d'évaluer l'impact de la présence de plusieurs espèces de levure sur l'expression de leurs gènes respectifs (Alonso-del-Real et al., 2019; Barbosa et al., 2015; Curiel et al., 2017; Shekhawat et al., 2019; Tronchoni et al., 2017). Cela n'a été rendu possible que récemment grâce au séquençage des génomes de plusieurs non-*Saccharomyces*, notamment celui de *P.*

*guillermondii* en 2009 (Butler et al., 2009), *T. delbrueckii* en 2011 (Gordon et al., 2011), *H. uvarum* en 2017 (Langenberg et al., 2017), et finalement *M. pulcherrima* en 2018 (Venkatesh et al., 2018).

Différentes fonctions cellulaires peuvent être affectées en cultures mixtes. Plusieurs études ont montré une augmentation de la transcription de gènes impliqués dans la glycolyse (Tronchoni et al., 2017) ou dans le transport des sucres (Alonso-del-Real et al., 2019). Le métabolisme de l'azote est également sujet à des modifications, et notamment le NCR, des transporteurs d'oligopeptides comme OPT1 ou le métabolisme de certains acides aminés comme la méthionine, la cystéine, la phénylalanine et l'alanine (Alonso-del-Real et al., 2019; Curiel et al., 2017; Shekhawat et al., 2019). L'utilisation d'autres nutriments tels que le fer et le cuivre peut être accélérée (Shekhawat et al., 2019), ainsi que la biosynthèse de vitamines (Barbosa et al., 2015). Enfin, une régulation positive des gènes impliqués dans le maintien de l'intégrité de la membrane cellulaire a été observée (Shekhawat et al., 2019). De manière générale, la surexpression de gènes normalement actifs dans les stades plus avancés de la fermentation lorsque les nutriments commencent à être épuisés, pourraient servir à accélérer la consommation des nutriments pour favoriser la croissance des levures et diminuer la disponibilité des nutriments dans le milieu pour les espèces concurrentes.

Ces effets sont observés chez *S. cerevisiae* ainsi que chez les autres espèces présentes dans le milieu, mais parfois à des intensités et des timings différents (Alonso-del-Real et al., 2019; Shekhawat et al., 2019; Tronchoni et al., 2017). Enfin, les modifications transcriptomiques observées en culture mixtes peuvent dépendre des conditions de culture. Alonso-del-Real et al. (2019) ont ainsi obtenus un nombre de gènes différemment exprimés chez *S. cerevisiae* en co-culture plus important à 12°C qu'à 20°C.

---

# MATERIELS ET METHODES

---

## 1. Levures

Plusieurs espèces de levures ont été utilisées dans ce travail : *Saccharomyces cerevisiae* Lalvin QA23<sup>®</sup> et Lalvin EC1118<sup>®</sup>, *Torulasporea delbrueckii* Biodiva<sup>®</sup>, *Metschnikowia pulcherrima* Flavia<sup>®</sup> ainsi que *Metschnikowia fructicola* Gaia<sup>®</sup> et LYCC7706. Toutes ces levures ont été fournies par la société Lallemand SAS sous forme de géloses inclinées. Elles ont ensuite été transférées dans un milieu YEPD contenant 15% afin d'être conservées à -80°C.

A chaque utilisation, les levures sont prélevées du stock glycérol, étalées sur une boîte contenant du YEPD-agar et incubées au moins 48h à 28°C. Une colonie est prélevée sur cette boîte puis inoculée dans un tube stérile contenant 5 mL de YEPD liquide mis à incuber à 28°C sous agitation pendant 6 à 12 h. 1 mL de ce tube est ensuite utilisé pour inoculer un erlenmeyer stérile contenant 25 mL de YEPD. Cette pré-culture est incubées 24 h à 28°C sous agitation. Si besoin en fonction des taux d'inoculation et des volumes de milieux à inoculer, une pré-culture supplémentaire est réalisée en inoculant 50 mL de YEPD avec 5 mL de la pré-culture précédente, les conditions d'incubation restant les mêmes.

Avant inoculation du fermenteur, la population cellulaire est dénombrée (voir partie 5.1.1) et le volume nécessaire à l'inoculation est calculé. Un volume suffisant est prélevé de la pré-culture et centrifugé 5 min à 2000 rpm. Le culot cellulaire est ensuite rincé avec de l'eau physiologique stérile (9 g/L de NaCl) centrifugé à nouveau et repris dans de l'eau physiologique. Le volume nécessaire est ensuite introduit dans le fermenteur.

## 2. Milieux synthétiques

Un moût synthétique (MS) mimant les caractéristiques moyennes du moût de raisin naturel est utilisé (Bely et al., 1990a) (Tableau 10). Ce milieu acide (pH= 3.4) contient une forte teneur en sucres (entre 180 et 220 g/L de glucose et fructose a un ration 50/50) ainsi qu'une teneur réduite en azote assimilable (entre 80 et 300 mgN/L). L'azote assimilable est défini comme la somme de l'azote ammoniacale et l'azote constituant les acides aminés présent dans le moût, à l'exception de l'azote de la proline en anaérobiose, un des atomes d'azote de l'arginine ainsi que les atomes d'azote présents dans les cycles du tryptophane et de l'histidine. Entre 2 et 8 mg/L de lipides sont également ajoutés sous la forme de phytostérols et d'acides gras (acides oléique, linoléique, palmitique et stéarique) (Tableau 13).

Les tableaux 11 à 15 présentent la composition d'un moût synthétique contenant 200 g/L de sucre, 200 mgN/L d'azote assimilable et 5 mg/L de phytostérols.

Après préparation, les moûts synthétiques sont conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Tableau 10 : Composition d'un moût synthétique contenant 200 g/L de sucres, 200 mg/L d'azote assimilable et 5 mg/L de phytostérols. Le pH est ajusté à 3.4 avec une solution de NaOH à 10 M.

Composés	Quantité par litre
Glucose	100 g
Fructose	100 g
Acide malique	6 g
Acide citrique	6 g
Phosphate de potassium	0.75 g
Sulfate de potassium	0.5 g
Sulfate de magnésium	0.25 g
Chlorure de calcium	0.155 g
Chlorure de sodium	0.2 g
Chlorure d'ammonium	0.216 g
Solution mère d'oligo-éléments (Tableau 11)	1 mL
Solution mère de vitamines (Tableau 12)	10 mL
Solution mère de phytostérols (Tableau 13)	0.33 mL
Solution mère d'acides aminés (Tableau 15)	6.16 mL
Solution mère de chlorure de fer (Tableau 14)	1 mL

Tableau 11 : Composition de la solution mère d'oligo-éléments. La solution est stérilisée par filtration à 0.22 µm et conservée à 4°C.

Composés	Quantité par litre
Sulfate de manganèse monohydraté	4 g
Sulfate de zinc heptahydraté	4 g
Sulfate de cuivre pentahydraté	1 g
Iodure de potassium	1 g
Chlorure de cobalt hexahydraté	0.4 g
Acide borique	1 g
Ammonium heptamolybdate	1 g

Tableau 12 : Composition de la solution mère de vitamines. Cette solution est conservée à -20 °C.

Composés	Quantité par litre
Myo-inositol	2 g
Pantothénate de calcium	0.15 g
Thiamine, hydrochloride	0.025 g
Acide nicotinique	0.2 g
Pyridoxine	0.025 g
Biotine	3 mL

Tableau 13 : Composition de la solution mère de phytostérols. Cette solution est conservée à 4 °C et chauffée à 50°C avant utilisation.

Composés	Quantité par litre
Phytostérols	1.5 g
Tween 80	50 mL
Ethanol pur	Qsp 100 mL



Tableau 14 : Composition de la solution mère de chlorure de fer. Cette solution est conservée à 4 °C.

Composés	Quantité par litre
Chlorure de fer (III) hexahydraté	20 g

Tableau 15 : Composition de la solution mère d'acides aminés. Cette solution est conservée à -20 °C.

Composés	Quantité par litre
Acide aspartique	3.4 g
Acide glutamique	9.4 g
Alanine	11.1 g
Arginine	28.6 g
Cystéine	1 g
Glutamine	38.6 g
Glycine	1.4 g
Histidine	2.5 g
Isoleucine	2.5 g
Leucine	3.7 g
Lysine	1.3 g
Méthionine	2.4 g
Phénylalanine	2.9 g
Proline	46.8 g
Sérine	6 g
Thréonine	5.8 g
Tryptophane	13.7 g
Tyrosine	1.4 g
Valine	3.4 g

### 3. Moûts naturels

Deux moûts naturels ont été utilisés : un Colombard du Gers de 2017 et un Sauvignon Blanc de 2017. Les caractéristiques de ces moûts sont présentées dans le Tableau 16.

Tableau 16 : Caractéristiques des moûts naturels utilisés.

	Colombard	Sauvignon
Glucose (g/L)	87.4	92.8
Fructose (g/L)	91.4	92.4
Sucre total (g/L)	178.8	185.2
Acides aminés (mgN/L)	105.9	172.4
Ammonium (mgN/L)	50.0	64.6
Azote assimilable (mgN/L)	155.9	237.1
Turbidité (NTU)	40	240
Phytostérols ajoutés (mg/L)	4	0
SO <sub>2</sub> libre (mg/L)	2.19	10.06
SO <sub>2</sub> total (mg/L)	14.1	38.91

## 4. Fermentation et suivi cinétique

Les fermentations sont réalisées à différentes échelles, de 15 mL à 1L. Avant inoculation, le milieu et le fermenteur sont pasteurisés à vapeur fluente pendant 15 min.

### 4.1. Fermentation en 1 L

Les fermenteurs sont en verre, équipés d'une cloche remplie d'eau afin de permettre le dégagement de CO<sub>2</sub> tout en maintenant l'anaérobiose ainsi que de septum permettant les prélèvements en évitant l'entrée d'oxygène (Figure 17). Un barreau aimanté dans le fermenteur et un agitateur magnétique (200 rpm) permettent de garder le milieu homogène.

La pasteurisation entraînant une désoxygénation du milieu, de l'air comprimé est bullé de manière stérile dans chaque fermenteur pendant 40 min afin de rétablir une concentration en oxygène dissous à l'équilibre avec l'air (Figure 17).

Les fermentations se déroulent à température constante (entre 20 et 24°C). Pour cela, le fermenteur est placé dans une pièce climatisée (entre 14 et 18°C), et est équipé d'une sonde de température mesurant la température dans la phase liquide ainsi que d'une lampe chauffante. Un système de régulation déclenche l'allumage de lampe si la température du milieu est trop basse, ou son arrêt si elle est trop haute. Le milieu est mis à température avant inoculation.

Les fermenteurs sont placés sur des balances individuelles pour effectuer le suivi cinétique (voir partie 4.4).

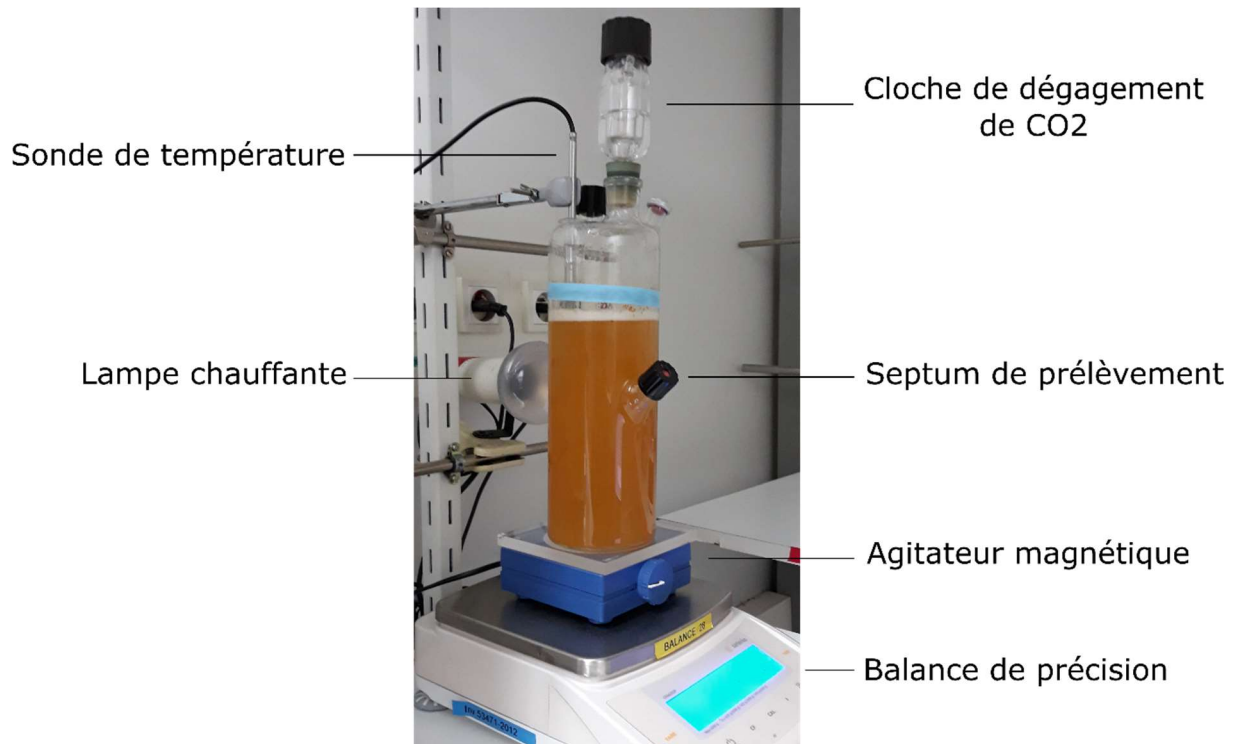


Figure 17 : Photo d'un fermenteur de 1L.

#### 4.2. Fermentation en 250 mL

Comme les fermenteurs de 1L, ces fermenteurs sont en verre et équipés d'une cloche remplie d'eau, d'un barreau aimanté et d'un septum (Figure 18). Pour le maintien de la température, les fermenteurs sont placés dans une enceinte à température régulée (Infors ou pièce climatisée dédiée). La durée de bullage d'air comprimé est de 20 min par fermenteur pour atteindre l'équilibre. Le suivi cinétique se fait manuellement par pesée des fermenteurs, de 1 à 5 fois par jour en fonction de l'activité fermentaire.

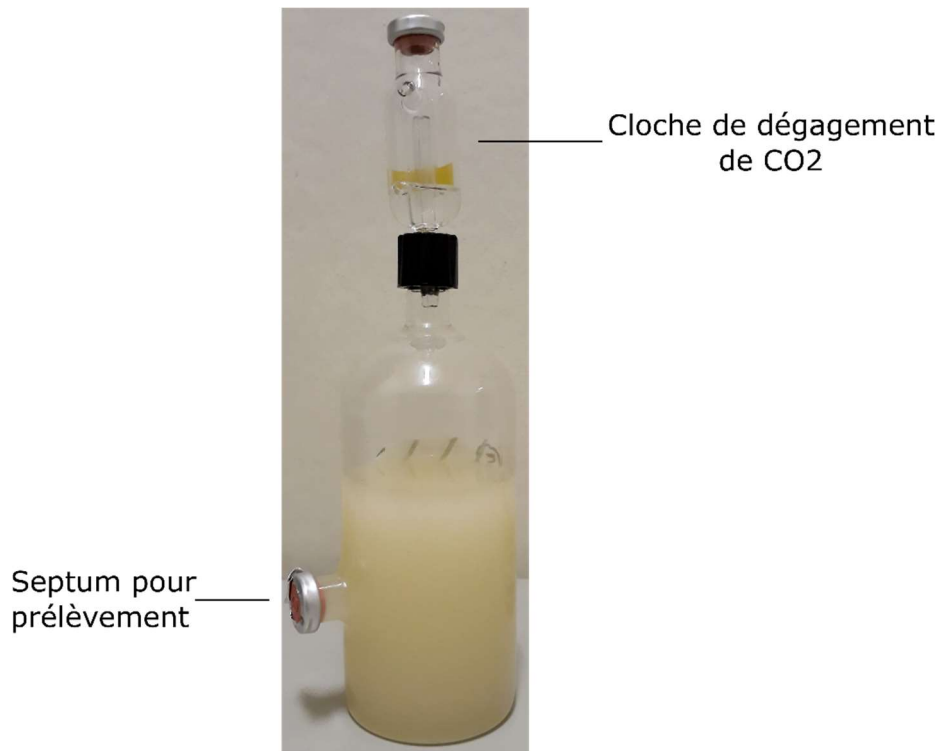


Figure 18 : Photo d'un fermenteur de 250mL.

#### 4.3. Fermentation en 15 mL

Les fermentations en 15 mL sont réalisées dans des tubes en verre, équipés d'un bouchon percé bouché avec une pointe à filtre stérile pour permettre la libération du CO<sub>2</sub>. Un barreau aimanté permet l'homogénéisation du milieu (Figure 19). Les tubes sont placés dans des racks, eux-mêmes placés sur des plaques agitantes. Le système est situé dans une pièce à température régulée. Un bras robotisé (PhenoFerm) contrôlé par le logiciel PlateButler® saisit les tubes un par un pour les placer sur une balance afin de les peser, puis les repositionne sur le rack. Les données brutes de pesée sont transmises à RobView, logiciel codé en interne sous LabVIEW, permettant le calcul des principaux paramètres de suivi de la fermentation (CO<sub>2</sub> cumulé, vitesse de dégagement de CO<sub>2</sub>, ...). Ces données sont également transmises et stockées sur la base de données Alfis, consultable à partir d'une interface web.

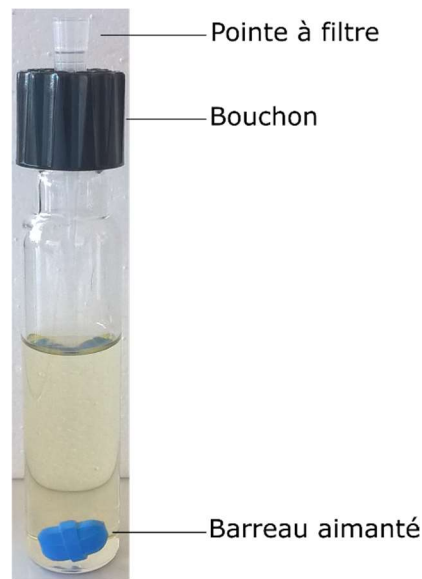


Figure 1 : Photo d'un fermenteur de 15 mL.

#### 4.4. Suivi des cinétiques fermentaires

Le suivi de l'avancement des fermentations est réalisé en mesurant la perte de poids créée par le dégagement du CO<sub>2</sub> produit par consommation du sucre.

La mesure du poids est réalisée automatiquement toutes les 20 min pour les fermenteurs de 1 L et toutes les 4 h pour ceux de 15 mL. Les balances transmettent la mesure du poids à un ordinateur équipé d'un logiciel d'acquisition développé sous LabVIEW en interne. Ce logiciel calcule entre autre la vitesse de dégagement de CO<sub>2</sub>, le cumul de CO<sub>2</sub> dégagé et stocke ces informations dans une base de données nommée Alfis.

Pour les fermenteurs de 250 mL, la mesure du poids est effectuée manuellement. Le CO<sub>2</sub> produit est calculé ainsi :

$$CO_{2,t} = CO_{2,t-1} + \frac{poids_{t-1} - poids_t}{volume_t}$$

La vitesse de dégagement de CO<sub>2</sub> est calculée à partir de la dérivée de la production de CO<sub>2</sub>.

## 5. Dosages

### 5.1. Biomasse

#### 5.1.1. Compteur de cellules

La quantité de cellule est évaluée avec un compteur électronique de particules (Counter ZB-2, Beckman Coulter). Cet appareil est équipé d'une sonde de détection avec un orifice de 100

$\mu\text{m}$  par lequel passent les cellules. Le passage des cellules non-conductrices dans la zone de détection va entraîner un changement de résistance électrique. Les cellules sont préalablement diluées dans un électrolyte (Isoton, Beckman Coulter) pour avoir une concentration située dans la gamme de mesure de l'appareil (entre 20 000 et 80 000 cellules/mL).

#### 5.1.2. Etalement sur boîte de pétri

Afin de différencier les levures *S. cerevisiae* et non-*Saccharomyces* lors des cultures mixtes, des étalements sur milieu sélectifs sont réalisés.

Le milieu WL (WL nutrient agar, Merck) est utilisé pour différencier *S. cerevisiae* des souches de l'espèce *Metschnikowia*. En effet, les colonies de *S. cerevisiae* apparaissent blanches alors que les colonies de *Metschnikowia* apparaissent brunes entourées d'un halo (image). Ce milieu contient du vert de bromocresol qui prend une couleur bleue à pH=5.5. La libération d'acide pulcherrimique par les levures *Metschnikowia* entraîne une coloration brune (Pallmann et al., 2001).

Un milieu lysine est utilisé pour différencier les levures *Saccharomyces* et *T. delbrueckii*. En effet, *S. cerevisiae* n'est pas capable de se développer sur un milieu ne contenant que de la lysine comme source d'azote (van der Aa Kühle and Jespersen, 1998). La composition du milieu est donnée ci-dessous (Tableau 17 ,Tableau 18 et Tableau 19).

Tableau 17 : Composition du milieu lysine.

Composé	Quantité
Solution 1	450 mL
Solution 2	50 mL

Tableau 18 : Composition de la solution 1 pour le milieu lysine. Cette solution est autoclavée 20 min à 121 °C.

Composé	Quantité
Agar	10 g
Glucose	28 g
YNB (w/o AA or NH <sub>4</sub> )	1 g
Eau distillée	Qsp 500 mL

Tableau 19 : Composition de la solution 2 pour le milieu lysine. Cette solution est filtrée à 0.22 µm.

Composé	Quantité
Lysine	1 g
Eau distillée	Qsp 100 mL

Pour le comptage sur boîte, l'échantillon est dilué entre 10 000 et 100 000 fois dans de l'eau physiologique. 100 µl sont alors étalés sur la boîte, mise à incuber à 28°C pendant 48 h. On obtient ainsi une concentration en UFC/mL.

#### 5.1.3. Masse sèche

La masse sèche est déterminé par filtration de 10 mL de culture sur un filtre nitrocellulose avec une taille de pore de 0.22 µm. Le filtre est rincé avec 50 mL d'eau, puis placé dans un four à 110°C pendant 4 jours. La masse sèche est calculée par la différence de masse entre le filtre après séchage et la masse initiale du filtre.

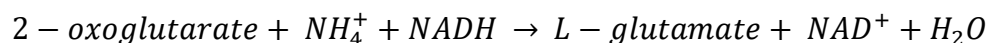
#### 5.1.4. Dosage des protéines dans la biomasse

Les cellules sont tout d'abord lysées au diméthylsulfoxyde (DMSO). L'équivalent de 10 à 15 mg de biomasse sont ainsi repris dans 50% de DMSO (un volume de DMSO pour un volume de cellules en suspension). Le mélange est incubé pendant 1 h à 110°C. Les protéines sont ensuite dosées grâce au kit BCA (Sigma-Aldrich, France). Le principe de ce kit repose sur la réduction des ions Cu<sup>2+</sup> en Cu<sup>+</sup> en milieu alcalin. Les ions ainsi formés sont dosés par spectrométrie UV-visible après réaction avec l'acide bicinchoninique (BCA), ce qui forme un complexe coloré. Une gamme étalon réalisée avec de l'albumine de sérum bovin (BSA) permet de calculer la concentration en protéine.

## 5.2. Azote

### 5.2.1. Ammonium

La concentration en ammonium des surnageants de culture est mesurée grâce à un kit enzymatique (ENZYTEC™ fluid Ammoniaque, DiaSys Diagnostic Systems Gmb). La réaction de dosage est la suivante :



La concentration d'ammonium est calculée par perte d'absorbance entre le mélange initial et 20 min après l'ajout du 2-oxoglutarate permettant la réaction. C'est donc la baisse de concentration en NADH, proportionnelle à la concentration en ammonium, qui est mesurée à 340 nm. Si besoin, les échantillons sont dilués pour rester dans la gamme de linéarité du kit.

### 5.2.2. Acides aminés libres

#### 5.2.2.1. Méthode au Biochrom

Les surnageants de culture sont tout d'abord débarrassés des macromolécules par précipitation des protéines à l'acide sulfo-salicylique (SSA). 4 volumes d'échantillons sont ainsi mélangés à 1 volume de SSA 25% (p/v) contenant de la norleucine à 2500 nmol/mL, en tant qu'étalon interne. Après une heure d'incubation à 4°C, les échantillons sont centrifugés 10 minutes à 4°C et filtrés à 0.22 µm. Les échantillons peuvent être conservés à -20°C avant analyse.

Le dosage des acides aminés libres s'effectue par chromatographie liquide sur colonne échangeuse de cations (résine anionique Ultrapac-8 Lithium-form, Serlabo, France), grâce à un Biochrom 30 type HPLC (Serlabo, France). La séparation des acides aminés est réalisée grâce à un gradient de température (de 32°C à 75°C), de pH (de 2.8 à 3.55) et de concentration en contre ions (citrate de lithium de 200 à 1650mM) grâce à l'utilisation successive de plusieurs tampons (Tableau 20, Serlabo, France). La colonne est ensuite régénérée à 75°C avec un tampon d'hydroxyde de lithium à 300 mM. La détection des acides aminés se fait par spectrométrie ultraviolet-visible grâce à la dérivation en sortie de colonne des acides aminés avec de la ninhydrine qui forme un composé absorbant à 570 nm, et dont la quantité formée est proportionnelle à la concentration en acide aminé. La proline et l'hydroxyproline ne possèdent pas de fonction amine mais une fonction imine, ils sont donc détectés à 440 nm. Les spectres obtenus sont analysés avec le logiciel Biochrom 30.



Tableau 20 : Liste des tampons utilisés pour l'analyse des acides aminés au Biochrom 30.

Tampon	Ion	Molarité	pH
Charge	Citrate de lithium	200 mM	2.2
A	Citrate de lithium	200 mM	2.8
B	Citrate de lithium	300 mM	3
C	Citrate de lithium	500 mM	3.15
D	Citrate de lithium	900 mM	3.5
E	Citrate de lithium	1650 mM	3.55
F	Hydroxyde de lithium	300 mM	

La quantification est réalisée grâce à un standard physiologique contenant un volume aminés acides et neutres (A6407, Sigma-Aldrich, France), un volume d'acides aminés basiques (A1585, Sigma-Aldrich, France), un volume de glutamine à 2500 nmol/mL et deux volumes de tampon de charge. Le standard est traité comme les échantillons.

### 5.2.3. Acides aminés protéinogéniques

Avant de pouvoir être dosés en chromatographie liquide, les acides aminés protéinogéniques doivent être hydrolysés. Néanmoins lors de cette étape, une partie de la cystéine et de la méthionine est dégradée en cystéine-H et en méthionine sulfone. Pour doser précisément ces acides aminés, une étape d'oxydation préalable à l'hydrolyse est nécessaire afin de dégrader entièrement ces acides aminés pour ensuite doser la concentration en cystéine-H et méthionine sulfone, qui sera proportionnelle à la concentration de cystéine et méthionine. En revanche, d'autres acides aminés comme la tyrosine, la phénylalanine, l'histidine et l'arginine sont perdus lors de cette étape. Il est donc nécessaire de réaliser deux préparations pour chaque échantillon : une préparation avec oxydation puis hydrolyse acide, et une préparation avec uniquement l'hydrolyse. Enfin, le tryptophane étant sensible à la chaleur en milieu acide, est entièrement détruit et ne peut donc pas être dosé. La glutamine et l'asparagine sont quant à elle dégradées en glutamate et aspartate respectivement. Les concentrations dosées pour ces deux composés correspondent donc à la somme glutamine et glutamate, et asparagine et aspartate.

L'oxydation est réalisée à partir de 1 mg de biomasse repris dans 200  $\mu\text{L}$  d'acide performique (1 volume d'eau oxygénée et 9 volumes d'acide formique). Les échantillons sont incubés 4h à 4°C. La réaction est ensuite stoppée par l'ajout de 33.6 mg de  $\text{Na}_2\text{S}_5\text{O}_4$ . L'hydrolyse acide est ensuite réalisée.

Les cellules sont hydrolysées avec de l'acide chloridrique 6N pendant 24h à 110°C. 500 nmol de norleucine sont ajoutées pour servir d'étalon interne. L'HCl est évaporé par séchage sous flux d'azote. L'échantillon est lavé deux fois avec de l'eau et une fois avec de l'éthanol, également évaporé sous flux d'azote. L'échantillon est finalement repris dans 800  $\mu\text{L}$  de tampon de charge.

Un standard d'hydrolysats est utilisé. Il est composé d'un volume de standard acides aminés hydrolysés (AA-S-18, Sigma-Aldrich), un volume de méthionine sulfone à 2500 nmol/mL en tampon de charge, un volume d'acide cystéique à 2500 nmol/mL en tampon de charge, un volume de norleucine à 2500 nmol/mL en tampon de charge et un volume de tampon de charge.

#### 5.2.3.1. Méthode NOPA

La méthode NOPA (Nitrogen by OPA) permet de déterminer la teneur en  $\alpha$ -aminoacides dans le milieu (Dukes and Butzke, 1998). Cette méthode ne permet donc pas de doser les molécules d'azote dans les cycles ni l'azote ammoniacal. Les acides  $\alpha$ -aminés sont dérivés par l'ophthalmaldéhyde (OPA) en présence de N-acétyl cystéine. On forme ainsi des isoindoles dont la concentration est mesurée à 335 nm.

0.671 g d'OPA sont dissous dans 100 mL d'éthanol 95%. Cette solution est versée dans une fiole de 1 L contenant 3.837 g de NaOH, 8.468 g d'acide borique et 0.816 g de N-acétylcystéine. Le volume est complété à 1 L avec de l'eau distillées. En parallèle, la même solution sans l'OPA est préparée pour servir de blanc. Pour le dosage, 50  $\mu\text{L}$  d'échantillons sont mélangés à 3 mL de réactif. La concentration d'acides  $\alpha$ -aminés est calculée à partir de l'absorbance lue à 335 nm grâce à une courbe de calibration réalisée avec des concentrations en isoleucine allant de 0 à 10 mM.

### 5.3. Métabolites carbonés

Les composés extracellulaires du métabolisme carboné central sont dosés par HPLC. Ces composés sont le glucose, le fructose, l'acétate, le glycérol, le succinate et le pyruvate.

L'échantillon est centrifugé 5 min à 2000 rpm, puis dilué au 1/6 ème avec une solution d'acide sulfurique à 0.005 N dégazée, qui sert aussi de phase mobile. L'appareil est constitué d'un chromatographe muni d'une pompe (HPLC 1290 Infinity, Agilent Technologies, Santa Clara, California) délivrant un débit constant de 0.6 mL/min, d'un injecteur automatique (volume d'injection 25µL), d'une pré-colonne et d'une colonne de séparation échangeuse d'anions (Phenomenex Rezex ROA) thermostatées à 60°C. Les composés sont détectés grâce à un réfractomètre ou à un spectromètre UV mesurant l'absorbance à 210 nm. Les chromatogrammes sont traités à l'aide du logiciel Agilent EZChrom. Les concentrations sont calculées grâce à un étalonnage externe.

## 5.4. Arômes

Différents types d'arômes ont été étudiés.

### 5.4.1. Alcools supérieurs, esters et acides

#### 5.4.1.1. Extractions

Les échantillons sont prélevés et immédiatement placés dans de la glace, puis centrifugés 5 min à 2000 rpm et à 4°C. Ils sont conservés à -20°C jusqu'à analyse. Les échantillons sont alors décongelés sur glace.

Une solution d'étalons deutérés est préparée avec 100 pg/mL de chacun des composés suivants : butanoate d'éthyle-*d*5, hexanoate d'éthyle-*d*5, octanoate d'éthyle-*d*5, acide butyrique-*d*7, décanoate d'éthyle-*d*5 et phényléthanol-*d*4 (Rollero et al., 2014a). Dans un tube en pyrex de 15 mL équipé d'un bouchon en téflon (Supelco, Bellefonte, Pennsylvanie, Etats-Unis), on pipete 5 mL d'échantillons et 10 µL de la solution d'étalons deutérés. L'échantillon est ensuite extrait deux fois avec 1 mL de dichlorométhane pendant 20 min sous agitation douce grâce à une table agitante. Les échantillons sont ensuite centrifugés pendant 5 min à 2000 rpm et à 4°C. La phase organique est récupérée dans un vial de 4 mL et séché avec du Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre pour éliminer toute trace de phase aqueuse. La phase organique est ensuite concentrée sous flux d'azote jusqu'à obtenir un volume de 0.5 mL. Enfin l'échantillon est transféré dans un insert (Supelco, Bellefonte, Pennsylvanie, Etats-Unis) placé dans un vial de 2 mL bouché.

#### 5.4.1.2. Analyses

Les échantillons sont analysés sur un chromatographe en phase gazeuse Hewlett Packard 6890 (Agilent Technologies, Santa Clara, Californie, USA) équipé d'un passeur CTC Combi PAL AOC-5000 (Shimadzu, Columbia, Etats-Unis) et couplé à un spectromètre de masse HP 5973 (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA). Le contrôle de l'appareil et l'analyse des données se fait par le logiciel HP G1701DA ChemStation (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA). Le chromatographe est équipé d'une colonne capillaire en silice fondue DB-WAX (30 m \* 0.250 mm \* 0.25 µm, Agilent J&W). Le gaz vecteur est de l'hélium à un débit constant de 1.0 mL/min. Le programme du four est le suivant : la température est maintenue à 40°C pendant 3 min, augmentée jusqu'à 160°C à une vitesse de 4°C/min, augmentée jusqu'à 220°C à une vitesse de 15°C/min, puis maintenue à 220°C pendant 10 min. L'injecteur et la ligne de transfert sont chauffés à 250°C. Le volume d'injection est de 2 µL. L'échantillon est injecté en mode split avec un ratio de 10 :1 et une division de 10 mL/min. La température du spectromètre de masse est de 150°C, celle de la source de 230°C et celle de la ligne de transfert de 250°C. Pour la quantification, les spectres de masse sont enregistrés en mode Selected Ion Monitoring (SIM) avec un impact électronique de +70 eV. Les ions utilisés sont présentés dans le Tableau 21. Pour chaque composé, l'ion en gras est utilisé pour la quantification, car il a le meilleur rapport signal sur bruit et le moins d'interférence avec les autres composants du vin. Les autres ions sont utilisés comme ions qualitatifs.

Pour la quantification, des courbes de calibration sont réalisées. Ces courbes sont linéaires dans la gamme de concentration étudiée. Pour chaque composé, une solution mère à 10 g/L est préparée dans de l'éthanol absolu. Pour chaque groupe de composés (esters éthyliques, acétates, alcools et acides) une solution standard est préparée à partir des solutions mères. Les solutions standards sont ensuite diluées dans une solution modèle (12% d'éthanol, 6 g/L d'acide malique, pH 3.3). Les différents points de gamme sont enfin extraits comme les échantillons.

Tableau 21 : Paramètres pour la détermination des arômes fermentaires du vin par SIM. En gras : ions cibles sur lesquels l'intégration est réalisée.

Composés	Temps de rétention (min)	Ions qualificateurs m/z	Etalons internes	Seuil (mg/L)
Propanoate d'éthyle	4.36	73-75- <b>102</b>	Butanoate d'éthyle- <i>d5</i>	1.84 <sup>1</sup>
Isobutyrate d'éthyle	4.53	71-88- <b>116</b>	Butanoate d'éthyle- <i>d5</i>	0.015 <sup>1</sup>
Acétate de propyle	4.67	43- <b>61</b> -73	Butanoate d'éthyle- <i>d5</i>	
Acétate d'isobutyle	5.51	<b>56</b> -73	Butanoate d'éthyle- <i>d5</i>	1.6 <sup>1</sup>
Butanoate d'éthyle	6.12	71- <b>88</b> -101	Butanoate d'éthyle- <i>d5</i>	0.02 <sup>1</sup>
Propanol	6.19	31-42- <b>59</b>	Butanoate d'éthyle- <i>d5</i>	
2-méthylbutanoate d'éthyle	6.56	<b>85</b> - <b>102</b>	Butanoate d'éthyle- <i>d5</i>	0.001 <sup>1</sup>
Isovalérate d'éthyle	7.01	<b>85</b> - <b>88</b>	Butanoate d'éthyle- <i>d5</i>	0.003 <sup>1</sup>
Isobutanol	7.66	43- <b>74</b>	Butanoate d'éthyle- <i>d5</i>	40 <sup>1</sup>
Acétate d'amyle	8.56	57-72- <b>74</b>	Butanoate d'éthyle- <i>d5</i>	0.16 <sup>1</sup>
Acétate d'isoamyle	8.59	55- <b>70</b> -87	Butanoate d'éthyle- <i>d5</i>	0.03 <sup>1</sup>
Valérate d'éthyle	9.01	<b>85</b> -88-101	Butanoate d'éthyle- <i>d5</i>	
Alcool isoamylique	11.45	<b>55</b> -57-70	Hexanoate d'éthyle- <i>d5</i>	30 <sup>1</sup>
Hexanol	11.96	<b>45</b> -69-87	Hexanoate d'éthyle- <i>d5</i>	4 <sup>1</sup>
Hexanoate d'éthyle	12.28	<b>88</b> -99-115	Hexanoate d'éthyle- <i>d5</i>	0.005 <sup>1</sup>
Alcool amylique	12.85	<b>55</b> -57-70	Hexanoate d'éthyle- <i>d5</i>	65 <sup>1</sup>
Acétate d'héxyle	13.57	56-69- <b>84</b>	Hexanoate d'éthyle- <i>d5</i>	0.67 <sup>1</sup>
Lactate d'éthyle	15.8	45- <b>75</b>	Octanoate d'éthyle- <i>d5</i>	14 <sup>1</sup>
Octanoate d'éthyle	18.96	<b>88</b> -101	Octanoate d'éthyle- <i>d5</i>	0.002 <sup>1</sup>
Acide propanoïque	21.92	57-73- <b>74</b>	Octanoate d'éthyle- <i>d5</i>	8.1 <sup>1</sup>
Acide isobutyrique	23.95	43- <b>73</b> -88	Acide butyrique- <i>d7</i>	200 <sup>1</sup>
Acide butanoïque	24.86	45- <b>60</b> -73	Acide butyrique- <i>d7</i>	0.22 <sup>1</sup>
Décanoate d'éthyle	25.39	<b>88</b> -101-157	Décanoate d'éthyle- <i>d5</i>	0.2 <sup>1</sup>
Acide isovalérique	25.86	<b>60</b> -61-87	Acide butyrique- <i>d7</i>	3 <sup>1</sup>
Acide 2-méthylbutanoïque	25.9	73- <b>74</b> -87	Acide butyrique- <i>d7</i>	3 <sup>1</sup>
Succinate de diéthyle	26.14	101- <b>129</b>	Décanoate d'éthyle- <i>d5</i>	
Méthionol	27.21	61-73- <b>106</b>	Décanoate d'éthyle- <i>d5</i>	1 <sup>2</sup>
Acide pentanoïque	27.75	<b>60</b> - <b>73</b>	Acide butyrique- <i>d7</i>	
Acétate de 2-phényléthyle	29.88	91- <b>104</b>	Décanoate d'éthyle- <i>d5</i>	0.25 <sup>1</sup>
Acide hexanoïque	30.77	<b>60</b> -73-87	Acide butyrique- <i>d7</i>	8 <sup>1</sup>
Dodécanoate d'éthyle	30.92	<b>88</b> -101	Décanoate d'éthyle- <i>d5</i>	
2-phényéthanol	32.36	<b>91</b> -92-122	Phényléthanol- <i>d4</i>	10 <sup>1</sup>
Acide octanoïque	35.32	<b>60</b> -73-101	Acide butyrique- <i>d7</i>	8.8 <sup>1</sup>
Acide décanoïque	37.52	60- <b>73</b> -129	Acide butyrique- <i>d7</i>	6 <sup>1</sup>
Acide dodécanoïque	39.87	<b>60</b> -73-129	Acide butyrique- <i>d7</i>	

1 : (Siebert et al., 2005)

2 : (Ferreira et al., 2000b)

#### 5.4.2. Précurseurs de thiols

Le dosage des précurseurs de thiols est réalisé par UPLC-MS/MS selon la méthode décrite par Roland et al. (2010).

L'appareil utilisé est une UPLC couplé à un MS/MS (TQD, Waters). L'UPLC est équipé d'une pré-colonne Ultrashield UHPLC Restek ainsi que d'une colonne Hypersyl Gold (100 mm \* 2.1 mm \* 1.9 µm). Le four est maintenu à 40°C. 1 µL d'échantillon est injecté. Le débit dans la colonne est de 0.4 mL/min. Deux solvants sont utilisés en mélange avec un gradient variable au cours de l'analyse. Le solvant A est composé d'acide formique à 0.1% dans de l'eau. Le solvant B contient de l'acide formique à 0.1% dans du méthanol. La proportion de solvant B dans le mélange est de 2% pendant 3 min, puis 5% pendant 2 min, 10% pendant 3 min, 20% pendant 4 min et enfin de 80% pendant la dernière minute.

Les transitions d'intérêt (Tableau 22) sont déterminées par infusion des composés purs à une concentration de 10 mg/L dans une solution contenant 0.1% d'acide formique dans un mélange 50/50 d'eau et de méthanol.

La quantification est réalisée à partir d'une gamme d'étalonnage réalisée dans l'eau.

Tableau 22 : Ions parents et filles des composés d'intérêts dans le dosage des précurseurs de thiols.

Composés	Ion parent (m/z)	Ions filles (m/z)	Type de transition
Cys-4MMP	220.03	99.2263	Quantifier
Cys-4MMP	220.03	105.1458	0
Cys-4MMP	220.03	122.1187	0
G-4MMP d10	416.1	162.44	0
G-4MMP d10	416.1	179.44	0
G-4MMP d10	416.1	269.33	Quantifier
G-4MMP	406.03	162.19	0
G-4MMP	406.03	179.22	0
G-4MMP	406.03	159.26	Quantifier
Cys-3MH d2	224.03	85.18	Quantifier
Cys-3MH d2	224.03	103.25	0
Cys-3MH	222.03	83.27	Quantifier
Cys-3MH	222.03	101.22	0
Cys-3MH	222.03	105.12	0
G-3MH d2	410.03	162.07	Quantifier
G-3MH d2	410.03	264.21	0
G-3MH d2	410.03	281.25	0
G-3MH d2	410.03	335.22	0
G-3MH	408.03	162.13	Quantifier
G-3MH	408.03	262.24	0
G-3MH	408.03	279.21	0
G-3MH	408.03	333.23	0

### 5.4.3. Autres arômes variétaux (hors thiols)

#### 5.4.3.1. Extraction

L'extraction se fait sur du surnageant de culture conservé à -20°C avant analyse. 5 mL d'échantillon sont mélangés à 20 µL de standards internes en solution, 870 µL d'acétone et 500 µL de dichlorométhane and des tubes en pyrex. Chaque tube est mélangé sur vortex pendant 20 secondes, puis centrifugé à 2 000 rpm et 4°C pendant 20 min. La phase inférieure est récupérée et placée dans un insert, lui-même placé dans un vial bouché de 2 mL.

#### 5.4.3.2. Analyse

Les analyses sont réalisées sur un GC Trace 1300 associé à un MS ISQ 7000 (Agilent Technologies, Santa Clara, Californie, USA), équipé d'un passeur TriPlus RSH, le tout piloté par le logiciel Chromeleon 7.0 (Agilent Technologies, Santa Clara, Californie, USA). La colonne est une DB-FFAP (30 m\*0.250 mm\*0.25 µm) (Agilent J&W). L'instrument est contrôlé et les

données sont stockées par le logiciel Chroméléon 7 (Dionex, ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA). L'hélium est utilisé comme gaz vecteur à un débit constant de 1.2mL/min. Le volume d'injection est de 1  $\mu$ L. L'injecteur est à une température de 240°C, et l'injection se déroule en mode splitless (splitless pendant 0.80 min). Le débit de split est de 16 mL/min, et le débit de purge est de 5 mL/min. Le programme de température du four est le suivant : 50°C pendant 1 min, augmentation de 50 à 100°C à 10°C/min, 100 à 113°C à 2°C/min, 113 à 210°C à 4°C/min, 210 à 240°C/min à 20°C/min. Le four est maintenu à 240°C pendant 10 min. La source d'ions du spectromètre de masse est fixée à 250°C, et celle de la ligne de transfert à 240°C. Afin de procéder à la quantification, les spectres de masse ont été acquis en Selected Ion Monitoring (SIM) avec impact électronique (EI) de 70eV. Les ions (qualificateurs et quantificateurs) sont présentés dans le Tableau 23.

Tableau 23: Temps de rétention et ions qualificateurs des arômes variétaux dosés par GC-MS.

Temps de rétention (min)	Molécules	Descripteur	Ions qualificateurs
9.81	Linalool	Floral	71, 93, 121, 136
13.35	$\beta$ -citral	Citron (doux)	69, 81, 94, 109
13.77	$\alpha$ -terpinéol	Lilas	81, 93, 121, 136
14.81	$\alpha$ -citral	Citron	69, 81, 94, 109
15.54	Géranyl Acétate	Rose, lavande	69, 93, 121, 136
15.85	Citronellol	Rose	69, 81, 123, 138
16.75	Nérol	Frais, Doux, Rose	69, 93, 121, 136
18.13	Géraniol	Rose	93, 121, 136
33.06	Nootkatone	Pamplemousse	133, 147, 161, 200, 218

## 5.5. Suivi des activités enzymatiques

### 5.5.1. Glycosidases

Les glycosidases sont des enzymes hydrolysant les liaisons glycosidiques. Trois glycosidases ont été étudiées : la  $\beta$ -glucosidase, l' $\alpha$ -arabinofuranosidase et l' $\alpha$ -rhamnosidase. Le principe du dosage est le même pour les trois enzymes, et fut décrit par Grimaldi et al. (2005). Un substrat lié à un chromophore est hydrolysé par l'enzyme étudiée, libérant le chromophore dont la concentration peut être mesurée par lecture de l'absorbance à 440 nm.



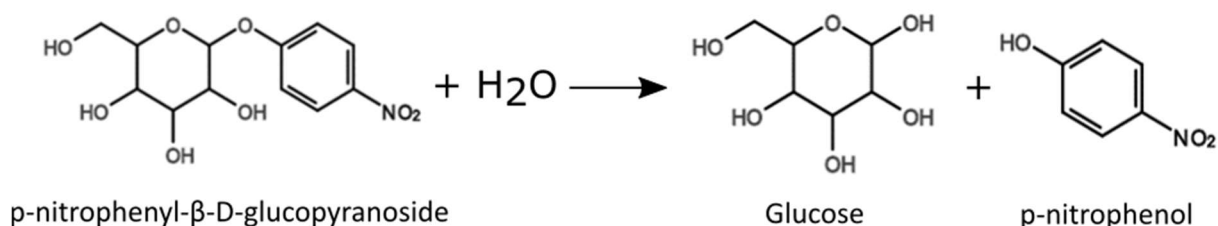


Figure 20 : Réaction du dosage de la β-glucosidase.

Le substrat utilisé dépend de l'enzyme étudiée. Toutes les molécules utilisées sont fournies par Sigma-Aldrich.

Tableau 24 : Substrats utilisés pour le dosage des activités glycosidiques.

Enzyme	Substrat
β-glucosidase	p-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside (p-NPG)
α-arabinofuranosidase	p-nitrophenyl-α-L-arabinofuranoside (p-NPA)
α-rhamnosidase	p-nitrophenyl- α-L-rhamnopyranoside (p-NPR)

Les substrats sont préparés dans un tampon citrate-phosphate à pH 3.4 à une concentration de 6 mmol/L pour le p-NPG et le p-NPR, et à une concentration de 3.69 mmol/L pour le p-NPA. Une solution de carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) à 0.5 mol/L est aussi préparée, afin de stopper la réaction et de révéler la couleur du p-nitrophénol libéré lors de la réaction.

250  $\mu\text{L}$  d'échantillon sont mélangés avec 250  $\mu\text{L}$  de substrat. Le mélange est incubé à 28°C sous agitation pendant 2 heures. 250  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  sont ensuite ajoutés pour arrêter la réaction. Le mélange est centrifugé à 5000 rpm pendant 5 min, et 200  $\mu\text{L}$  du surnageant est transféré sur une microplaque. L'absorbance est lue par un spectrophotomètre à 400 nm.

Afin de relier l'absorbance à la quantité de p-nitrophénol libérée pendant la réaction, on réalise une gamme de calibration. Pour cela on utilise une solution stock de p-nitrophénol préparée dans du tampon citrate-phosphate, que l'on dilue ensuite à différentes concentrations dans du moût synthétique frais.

### 5.5.2. B-lyases

Les β-lyases hydrolysent les précurseurs cystéinylés et glutathionylés afin de libérer des thiols variétés. Les précurseurs de thiols synthétiques étant chers et difficiles à synthétiser, on utilise le S-éthyl-cystéine comme substrat de la réaction de dosage. Il a été montré que les β-

lyases ont une bonne affinité pour ce composé (Roncoroni et al., 2011). L'hydrolyse de ce composé libère entre autre de l'éthanethiol. On mesure la concentration d'éthanethiol libéré par dosage au 5,5'-dithio-bis-[2-nitrobenzoic acid] (DTNB). La réaction produit alors du TNB<sup>2-</sup> dont la concentration peut être mesurée par lecture de l'absorbance à 400 nm (Figure 21).

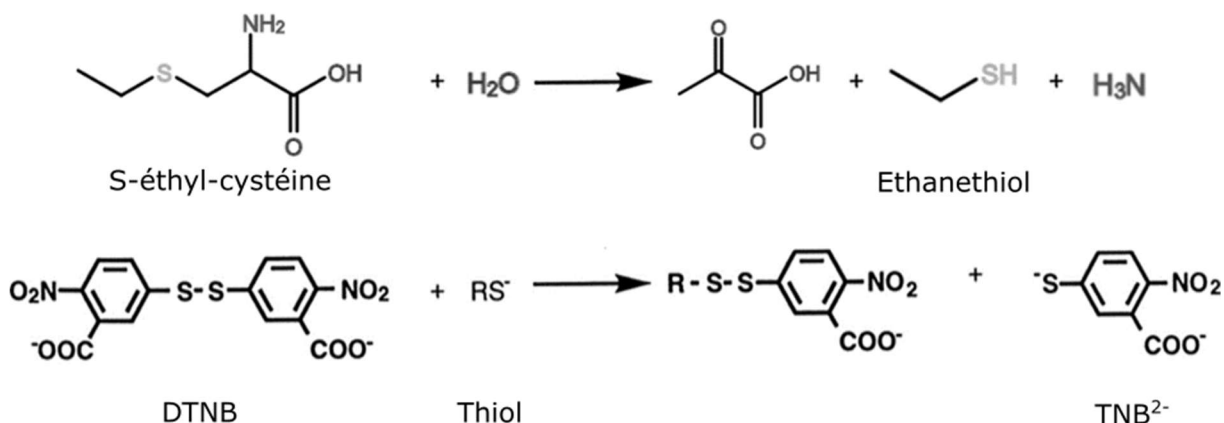


Figure 21 : Schéma réactionnel du dosage de l'activité  $\beta$ -lyase.

Une solution de S-éthyl-cystéine est préparée dans de l'eau distillée à une concentration de 5 mmol/L. Une solution tampon est préparée avec 0.1 mmol/L d'EDTA et 0.01 mmol/L de PLP (co-facteur des  $\beta$ -lyases) dans un tampon citrate-phosphate à pH 3.4. Le dosage se fait en mélangeant 250  $\mu$ L d'échantillon avec 250  $\mu$ L de S-éthyl-cystéine, 100  $\mu$ L de solution tampon et 250  $\mu$ L de DTNB. Après 2 h d'incubation à 28°C sous agitation, le mélange est centrifugé et 200  $\mu$ L du surnageant est placé dans le puit d'une microplaque. L'absorbance est lue à 400 nm. On en déduit la concentration d'éthanethiol produit grâce à une courbe de calibration préparée avec différentes concentrations d'éthanethiol.

## 6. Filiation isotopique

Pour suivre le devenir des sources azotés au sein du métabolisme, nous avons utilisé des molécules marquées <sup>13</sup>C ou <sup>15</sup>N. L'incorporation de ces molécules dans les acides aminés protéinogéniques et dans les arômes a été mesurée par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS).

### 6.1. Quantification isotopique des acides aminés protéinogéniques

Les acides aminés n'étant pas des composés volatils, une étape de dérivation est nécessaire pour leur analyse en GC-MS. Il n'existe pas de méthode de dérivation permettant d'obtenir tous les acides aminés. Nous avons donc utilisé deux méthodes : la

dérivatisation par ECF et par BSTFA. La liste des acides aminés détectés pour chaque méthode et le rapport masse sur charge ( $m/z$ ) des ions obtenus est présenté dans le Tableau 25.

#### 6.1.1. Extraction des acides aminés protéinogéniques

Avant dérivatisation, les acides aminés protéinogéniques sont extraits de la biomasse par hydrolyse acide. Les culots cellulaires conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$  sont décongelés et transférés dans des tubes pyrex, dans lesquels on ajoute 1.2 mL d'HCl 6 N. Le mélange est incubé 16 h à  $105^{\circ}\text{C}$ . 800  $\mu\text{L}$  d'eau distillées sont ensuite ajoutés et les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 5 min. Le surnageant est séparé en quatre fractions de 400  $\mu\text{L}$ . L'HCl est évaporé à  $105^{\circ}\text{C}$  pendant 4 à 5 h.

#### 6.1.2. Dérivatisation à l'éthylchloroformate (ECF)

L'échantillon de biomasse hydrolysée et séchée est resuspendu dans 200  $\mu\text{L}$  d'HCl à 20 mM et 133  $\mu\text{L}$  de pyridine/éthanol (1/4). La dérivatisation est réalisée en ajoutant 50  $\mu\text{L}$  d'ECF. L'extraction des dérivés se fait par l'ajout 500  $\mu\text{L}$  de dichlorométhane. Après 5 min de centrifugation à 10000 rpm, la phase organique est récupérée pour injection en GC-MS.

#### 6.1.3. Dérivatisation au N,O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA)

L'échantillon obtenu après hydrolyse est resuspendu dans 200  $\mu\text{L}$  d'acétonitrile. La dérivatisation se fait par l'ajout de 20  $\mu\text{L}$  de BSTFA et incubation pendant 4 h à  $135^{\circ}\text{C}$ . Après centrifugation, la phase organique est récupérée pour être injectée en GC-MS.

#### 6.1.4. Analyses en GC-MS

L'appareil de GC-MS utilisé est le même que pour les composés volatils (cf partie 5.4.1.2).

2  $\mu\text{L}$  d'échantillon sont injectés dans la colonne via un injecteur à une température de  $230^{\circ}\text{C}$  en mode « split » avec un ratio de 3:1. La colonne utilisée est de type DB-17MS (30 m \* 0.250 mm \* 0.15  $\mu\text{m}$ ) de Agilent Technologies. Le gaz vecteur est de l'hélium à un débit constant de 1.2 mL/min.

Les molécules sont séparées grâce à un gradient de température dépendant du type de dérivatisation. Pour les échantillons dérivatisés à l'ECF, la température initiale du four est à  $130^{\circ}\text{C}$  pendant 3 min. La température monte ensuite à une vitesse de  $15^{\circ}\text{C}/\text{min}$  pour atteindre  $260^{\circ}\text{C}$ , maintenue pendant 20 min. Pour la dérivatisation au BSTFA, la température initiale est de  $110^{\circ}\text{C}$  pendant 1 min. La température augmente de  $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$  jusqu'à  $154^{\circ}\text{C}$ , puis de  $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  jusqu'à  $300^{\circ}\text{C}$ . Cette température est maintenue pendant 10 min.

Le spectromètre de masse fonctionne en mode SIM (Selected Ion Monitoring) pour sélectionner les ions d'intérêts (Tableau 25), avec un impact électronique positif de 70 eV. La température des quadripôles est de 150°C. La température de la source est de 250°C pour la dérivatisation à l'ECF et 300°C pour la dérivatisation au BSTFA. La ligne de transfert est maintenue à 250°C.

Les chromatogrammes sont analysés avec le logiciel MSD Chemstation. Le taux d'enrichissement de chaque acide aminé est calculé comme le rapport des aires de l'ion avec une masse M+1 et de l'ion avec une masse M (non enrichi) grâce au logiciel Isocor qui tient compte de l'enrichissement naturel de l'azote ou du carbone (Millard et al., 2012).

Tableau 25: Liste des acides aminés et de leurs clusters d'ions pour l'analyse GC-MS par dérivation BSTFA et ECF.

Acides aminés	Formule complète	Ion	Formule d'ion	Clusters d'ions	Dérivation	Formule	Masse
Arginine	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	Arg 174	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	174-175-176-177-178-179	BSTFA	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> F <sub>3</sub> NOSi <sub>2</sub>	257
Alanine	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub> N	Ala 116	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> N	116-117-118-119	ECF	C <sub>3</sub> O <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	73
Glycine	C <sub>2</sub> O <sub>2</sub> NH <sub>5</sub>	Gly 102	CNH <sub>3</sub>	102-103-104	ECF	C <sub>3</sub> O <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	73
		Gly 175	C <sub>2</sub> O <sub>2</sub> NH <sub>3</sub>	175-176-177	ECFb	C <sub>5</sub> O <sub>2</sub> H <sub>10</sub>	102
Valine	C <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> H <sub>11</sub>	Val 144	C <sub>4</sub> NH <sub>9</sub>	144-145-146-147-148-149	ECF	C <sub>3</sub> O <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	73
Leucine	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> O <sub>2</sub> N	Leu 158	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> N	158-159-160-161-162-163-164	ECF	C <sub>3</sub> O <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	73
Isoleucine	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> O <sub>2</sub> N	Ile 158	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> N	158-159-160-161-162-163-165	ECF	C <sub>3</sub> O <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	73
Thréonine	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>	Thr 146	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO	146-147-148-149-150	ECF	C <sub>3</sub> O <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	73
		Thr 175	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NO <sub>2</sub>	175-176-177-178	ECFb	C <sub>5</sub> O <sub>2</sub> H <sub>10</sub>	102
Serine	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>	Ser 132	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO	132-133-134-135	ECF	C <sub>3</sub> O <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	73
		Ser 175	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> NO <sub>2</sub>	175-176-177-178	ECFb	C <sub>5</sub> O <sub>2</sub> H <sub>10</sub>	102
Proline	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	Pro 142	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> N	142-143-144-145-146-147	ECF	C <sub>3</sub> O <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	73
Aspartate	C <sub>4</sub> O <sub>4</sub> NH <sub>7</sub>	Asp 188	C <sub>3</sub> O <sub>2</sub> NH <sub>4</sub>	188-189-190-191-192	ECFb	C <sub>5</sub> O <sub>2</sub> H <sub>10</sub>	102
Glutamate	C <sub>5</sub> O <sub>4</sub> NH <sub>9</sub>	Glu 202	C <sub>4</sub> O <sub>2</sub> NH <sub>6</sub>	202-203-204-205-206-207	ECFb	C <sub>5</sub> O <sub>2</sub> H <sub>10</sub>	102
Phénylalanine	C <sub>9</sub> O <sub>2</sub> NH <sub>11</sub>	Phe 192	C <sub>8</sub> NH <sub>9</sub>	192-193-194-195-196-197-198-199-200-201	ECF	C <sub>3</sub> O <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	73
Lysine	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Lys 156	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub>	156-157-158-159-160-161-162	ECFc	C <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	56
Histidine	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	His 327	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> N <sub>3</sub>	327-328-329-330-331-332-333	ECFd	C <sub>9</sub> O <sub>6</sub> H <sub>15</sub>	219

## 6.2. Quantification isotopique des composés d'arôme

Les échantillons sont préparés comme décrit dans la partie 5.4.1.1. La méthode d'analyse GC-MS est la même que celle décrite dans la partie 5.4.1.2.

Les composés analysés sont choisis en fonction de leurs liens avec la molécule marquée utilisée et leurs implications dans son métabolisme. Les clusters d'ions qualitatifs et quantitatifs pour chaque composé volatil sont choisis en tenant compte de toutes les fragmentations possibles, en minimisant au maximum la présence de l'abondance naturelle de carbone 13, et en évitant les mélanges contenant différents ions marqués. La liste des composés détectés et le rapport  $m/z$  des ions attendus est présenté dans le Tableau 26.

Les chromatogrammes obtenus sont analysés avec le logiciel MSD Chemstation. Les taux d'enrichissement des composés sont calculés grâce au logiciel Isocor.

Tableau 26: Liste des composés volatils d'intérêt et leur cluster d'ions correspondant pour l'analyse GC-MS.

Composés volatiles	Formule complète	Ion	Formule d'ion	Cluster d'ions	Temps de rétention (min)
Isobutanoate d'éthyle	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	Isobutanoate d'éthyle 116	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	116-117-118-119-120-121	4.55
Acétate d'isobutyle	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	Acétate d'isobutyle 56	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub>	56-57-58-59-60	5.55
Propanol	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O	Propanol 42	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub>	42-43-44-45	6.23
		Propanol 60	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O	60-61-62-63	
Isovalerate d'éthyle	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	Isovalerate d'éthyle 88	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub>	88-89-90-91-92-93	7.04
Isobutanol	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O	Isobutanol 43	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	41-42-43-44-45-46-47	7.7
		Isobutanol 74	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O	74-75-76-77-78	
Acétate d'isoamyle	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	Acétate d'isoamyle 70	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub>	70-71-72-73-74-75	8.62
Alcool isoamylique	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O	Alcool isoamylique 70	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub>	70-71-72-73-74-75	11.43
		Alcool isoamylique 55	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub>	55-56-57-58-59	
Acide isobutyrique	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	Acide isobutyrique 73	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	73-74-75-76-77-78	22.9
Acide isovalérique	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	Acide isovalérique 60	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	60-61-62-63-64-65	25.88
Acétate de phényléthyle	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	Acétate de phényléthyle 91	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub>	91-92-93-94-95-96-97-98	29.88
Phényléthanol	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O	Phényléthanol 65	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub>	65-66-67-68-69-70-71-72-73	32.37
		Phényléthanol 122	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O	122-123-124-125-126-127-128-129-130	

## 7. Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel R version 3.4.3.

### 7.1. Détermination des paramètres cinétiques

Les données cinétiques obtenues sont la forme de l'évolution du CO<sub>2</sub> en fonction du temps. A partir de ces données on souhaite calculer la durée de la phase de latence ( $T_{lag}$ ), la vitesse de fermentation maximale ( $R_{max}$ ) et la durée pour l'atteindre ( $T_{Rmax}$ ), et enfin la durée de la fermentation ( $T_f$ ).

Pour les fermentations réalisées en inoculation séquentielle, les deux phases de la fermentation sont analysées séparément pour obtenir les valeurs de vitesse maximale avant et après inoculation de *S. cerevisiae*. Les paramètres cinétiques à l'exception de la durée de fermentation sont obtenus grâce à la fonction « locfitEstimParam » du package « alfiStatUtilR », développé par l'UMR MISTEA. Les données sont tout d'abord lissées grâce à la fonction « locfit ». En choisissant une fenêtre de temps appropriée au nombre de points de la cinétique, on dérive les données pour obtenir la vitesse de dégagement du CO<sub>2</sub> en fonction du temps. La vitesse maximale est donc le maximum obtenu sur ces données. La phase de latence est définie comme l'intersection de la tangente à la courbe de CO<sub>2</sub> au point de vitesse maximale ( $CO_{2,Rmax}$ ) et l'axe des abscisses (Figure 22). Ainsi l'équation de la phase de latence est :

$$T_{lag} = T_{Rmax} - \frac{CO_{2,Rmax}}{R_{max}}$$



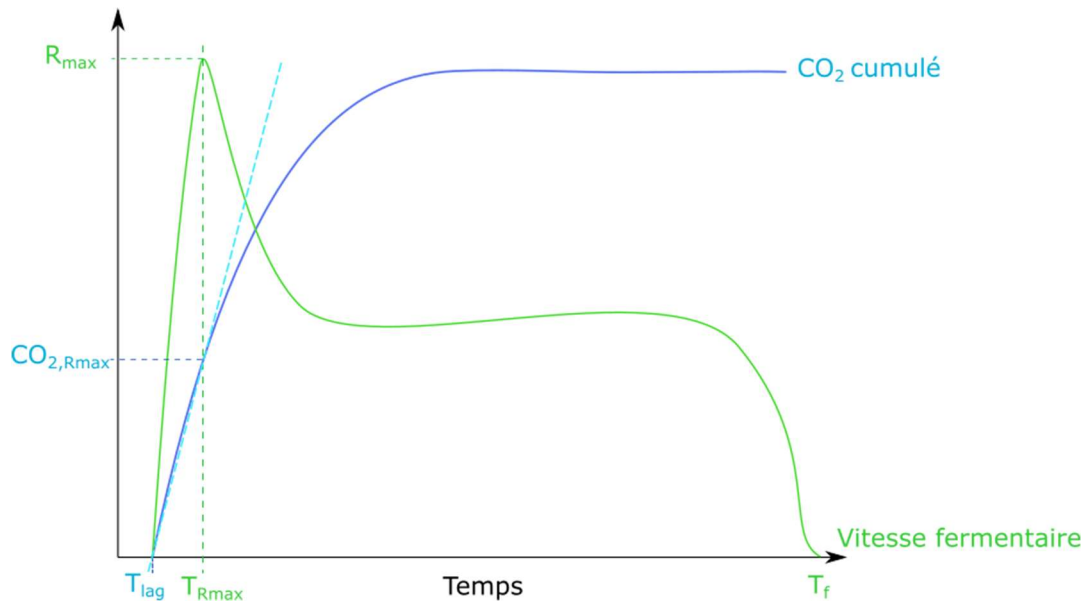


Figure 22 : Détermination des paramètres cinétiques

La durée de fermentation est définie comme le temps nécessaire pour atteindre le CO<sub>2</sub> produit maximal, avec une fourchette d'erreur réglable en fonction de la précision des mesures.

### 7.2. Plan de Box-Behnken

L'analyse des résultats s'est faite grâce au package « rsm » (Lenth, 2009). Un plan expérimental de Box-Behnken a été utilisé pour tester l'effet de trois variables indépendantes sur la production d'arômes en fermentation. Les variables testées sont les concentrations initiales en sucre, azote et lipides. 15 fermentations ont été réalisées par souche, dont 3 au centre du domaine expérimental. Trois concentrations ont été testées pour chaque variable. Les niveaux sont codés -1 (niveau bas), 0 (niveau intermédiaire) et +1 (niveau haut). La concentration réelle pour chaque niveau est calculée comme suit (Box and Behnken, 1960):

$$\begin{aligned} \text{Valeur réelle} = & \text{Valeur codée} \times \frac{\text{Valeur haute} - \text{Valeur basse}}{2} \\ & + \frac{\text{Valeur haute} + \text{Valeur basse}}{2} \end{aligned}$$

L'effet des trois variables sur chaque composé d'arôme (Y) a été modélisé avec une surface de réponse polynomiale :

$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{1,2}x_1x_2 + \beta_{1,3}x_1x_3 + \beta_{2,3}x_2x_3 \\ + \beta_{1,1}x_1^2 + \beta_{2,2}x_2^2 + \beta_{3,3}x_3^2 + \varepsilon$$

Avec  $x_1$ ,  $x_2$  et  $x_3$  les valeurs codées de l'azote, du sucre et des lipides respectivement, Y la réponse prédite,  $\beta_0$  la moyenne générale,  $\beta_i$  les coefficients linéaires,  $\beta_{i,j}$  les coefficients quadratiques et  $\beta_{i,j}$  les coefficients d'interaction. L'erreur  $\varepsilon$  est indépendante et suit une loi normale  $N(0, \sigma^2)$ .

Si nécessaire d'après les critères d'adéquation au modèle, un modèle simplifié (sans interaction ou terme quadratique) a été appliqué à certains composés.

Les hypothèses du modèle linéaire (normalité et homoscedasticité des variances) sont vérifiées avec les graphiques diagnostiques adaptés. La précision et l'adéquation de chaque modèle polynomial décrit ci-dessus sont évalués par un test de « lack of fit », un test de Fisher et le coefficient de détermination ajusté  $\text{adj}R^2$ .

### 7.3. Clusterisation

Lors de l'analyse de l'impact d'une source d'azote unique sur la cinétique fermentaire de plusieurs souches, des clusters ont été formés pour regrouper les conditions donnant un résultat similaire. Les clusters ont été réalisés sur les courbes de cumul de  $\text{CO}_2$  lissées sur un vecteur temps commun. La classification hiérarchique est réalisée en calculant la distance euclidienne entre les points de  $\text{CO}_2$  à un même point de temps, et en appliquant une méthode d'agrégation de Ward avec un nombre de clusters fixé à 7.

---

# RESULTATS

---

---

# CHAPITRE 1

---

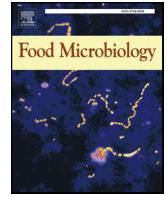
## FERMENTATION, CROISSANCE ET PRODUCTION D'AROMES EN FONCTION DE LA SOURCE D'AZOTE DISPONIBLE

Les capacités de *M. pulcherrima*, *M. fructicola*, *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae* en fermentation ont été évaluées lors d'expérimentations sur milieux synthétiques ne contenant qu'une seule source d'azote.

Lors de ces expérimentations, plusieurs paramètres ont été étudiés. Dans un premier temps, les cinétiques fermentaires et de croissance de ces souches ont été mesurées. Les performances des levures ont ensuite été comparées en fonction de la source d'azote disponible dans le milieu. Ces observations nous ont permis de caractériser les souches non-*Saccharomyces* étudiées en comparaison avec *S. cerevisiae*, et d'établir leurs préférences en terme de sources azotées en fermentation. Enfin, les cinétiques de consommation d'azote de ces souches sur un milieu synthétique contenant un mélange d'acides aminés ont été déterminées.

Dans un second temps, les productions d'arômes fermentaires par *M. pulcherrima*, *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae* en moût synthétique avec une seule source d'azote ont été dosées en fin de fermentation. Ces résultats permettent d'éclairer le fonctionnement du métabolisme de ces souches, et l'impact que peuvent avoir les différentes sources d'azote sur ce métabolisme.

# I. Nitrogen sources preferences of non-*Saccharomyces* yeasts to sustain growth and fermentation under winemaking conditions



## Nitrogen sources preferences of non-*Saccharomyces* yeasts to sustain growth and fermentation under winemaking conditions

Ying Su<sup>a,1</sup>, Pauline Seguinot<sup>b,1</sup>, Isabelle Sanchez<sup>c</sup>, Anne Ortiz-Julien<sup>d</sup>, José Maria Heras<sup>e</sup>, Amparo Querol<sup>a</sup>, Carole Camarasa<sup>b</sup>, José Manuel Guillamón<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Biotecnología de Alimentos, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Valencia, Spain

<sup>b</sup> UMR SPO: INRA, Université Montpellier, Montpellier SupAgro, 34060, Montpellier, France; Lallemand SAS, 31700, Blagnac, France

<sup>c</sup> UMR MISTEA: INRA, Montpellier SupAgro, 34060, Montpellier, France

<sup>d</sup> Lallemand SAS, 31700, Blagnac, France

<sup>e</sup> Lallemand Bio, 28521, Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

*Torulaspora delbrueckii*  
*Metschnikowia pulcherrima*  
*Metschnikowia fructicola*  
Nitrogen preference  
Nitrogen uptake

### ABSTRACT

Wine-related non-*Saccharomyces* yeasts are becoming more widely used in oenological practice for their ability to confer wine a more complex satisfying aroma, but their metabolism remains unknown. Our study explored the nitrogen utilisation profile of three popular non-*Saccharomyces* species, *Torulaspora delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima* and *Metschnikowia fructicola*. The nitrogen source preferences to support growth and fermentation as well as the uptake order of different nitrogen sources during wine fermentation were investigated. While *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae* strains shared the same nitrogen source preferences, *Metschnikowia* sp. Displayed a lower capacity to efficiently use the preferred nitrogen compounds, but were able to assimilate a wider range of amino acids. During alcoholic fermentation, the non-*Saccharomyces* strains consumed different nitrogen sources in a similar order as *S. cerevisiae*, but not as quickly. Furthermore, when all the nitrogen sources were supplied in the same amount, their assimilation order was similarly affected for both *S. cerevisiae* and non-*Saccharomyces* strains. Under this condition, the rate of nitrogen source consumption of non-*Saccharomyces* strains and *S. cerevisiae* was comparable. Overall, this study expands our understanding about the preferences and consumption rates of individual nitrogen sources by the investigated non-*Saccharomyces* yeasts in a wine environment. This knowledge provides useful information for a more efficient exploitation of non-*Saccharomyces* strains that improves the management of the wine fermentation.

### 1. Introduction

In the past 50 years, the inoculation of selected *Saccharomyces cerevisiae* strains has become increasingly prevalent in winemaking. It is an excellent way to control alcoholic fermentation by ensuring the complete exhaustion of sugars and avoiding the formation of undesirable off-flavours. During wine fermentation, the predominant non-*Saccharomyces* yeasts in grape juice are rapidly outcompeted by *S. cerevisiae* because they poorly adapt to increasing ethanol concentrations and to low levels of dissolved oxygen (Bauer and Pretorius, 2000; Boulton et al., 1995; Bisson, 1999). Some of these non-conventional yeasts have attracted more attention as they positively modify the wine chemical composition and, consequently, improve wine flavour and bouquet. (Padilla et al., 2016). However, as a result of their low ethanol

tolerance, these species are unable to achieve complete sugar consumption. Consequently, in order to take advantage of their phenotypic specificities while avoiding stuck or sluggish fermentations, they are usually combined in industry with *S. cerevisiae* in sequential or co-inoculation. In this context, both the growth and the metabolic activity of non-*Saccharomyces* yeasts may impact *S. cerevisiae* performance in mixed culture fermentation mainly due to their nutrient consumption (Medina et al., 2012; Taillandier et al., 2014).

Nitrogen availability in grape must is a key parameter for the wine fermentation progress as it acts at many levels. Firstly, nitrogen is an important nutrient for sustaining yeast growth and, for the vast majority of fermentations, it is the limiting factor for biomass production (Bell and Henschke, 2005; Martínez-Moreno et al., 2012; Mendes-Ferreira et al., 2004; Varela et al., 2004). Nitrogen also plays a key role

\* Corresponding author.

E-mail address: [guillamon@iata.csic.es](mailto:guillamon@iata.csic.es) (J.M. Guillamón).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

in fermentation kinetics and fermentation duration because insufficient nitrogen source availability in must can lead to stuck or sluggish fermentation (Bely et al., 1990; Mendes-Ferreira et al., 2004). Lastly, the catabolism of nitrogen sources, together with central carbon metabolism, is involved in the synthesis of fermentative aroma precursors in wine yeasts (Barbosa et al., 2012; Bell and Henschke, 2005).

Grape musts contain a wide range of yeast assimilable nitrogen (YAN) sources, including not only amino acids and ammonium, but also urea, citrulline, ornithine and small peptides (Kevvai et al., 2016). The utilisation of these compounds during wine fermentation has been extensively described in *S. cerevisiae*. Nitrogen source quality, in terms of the capacity to support yeast growth and fermentation activity, has been evaluated in this species (Cooper, 1982; Fairbairn et al., 2017; Godard et al., 2007; Gutiérrez et al., 2013), with major differences between poor nitrogen sources, such as tryptophan, tyrosine, threonine or methionine, and rich nitrogen sources like ammonium, glutamine or asparagine. When provided as a mixture during fermentation, some nitrogen compounds are taken up early by yeasts, such as lysine, aspartate or threonine, while others (arginine, glycine, tryptophan, etc.) are consumed later (Jiraneck et al., 1995; Crépin et al., 2012; Rollero et al., 2018). Indeed many processes required for the uptake and growth in lower quality nitrogen sources are suppressed in the presence of a higher quality nitrogen source (Godard et al., 2007). Nitrogen sources are sequentially assimilated through various transporters that are regulated by two main systems: nitrogen catabolite repression (NCR) and the Ssy1p-Ptr3p-Ssy5 (SPS) system (Crépin et al., 2012; Godard et al., 2007; Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012). Consistently with phenotypic changes, the nitrogen source available in the medium determines the transcription level of almost 10% of all the genes in *S. cerevisiae* (Godard et al., 2007). The different regulation pathways triggered by various nitrogen sources can explain this transcriptional reprogramming.

Unlike *S. cerevisiae*, very little is known about the physiology and behaviour of non-*Saccharomyces* yeasts during wine fermentation, and their consumption profiles and preferences for amino acids have been poorly explored. In previous studies, Kemsawasd et al. (2015) studied the influence of pure nitrogen sources on the growth, glucose consumption and ethanol production of four wine-related non-*Saccharomyces* yeast species, and revealed that the effect of nitrogen sources on yeast growth and fermentation performance is species-specific. Furthermore, Gobert et al. (2017) and Rollero et al. (2018) investigated the nitrogen source uptake order by wine-related non-*Saccharomyces* strains while fermenting natural and synthetic grape musts, respectively. Both studies highlighted the importance of monitoring nutrient concentration during sequential fermentations with *S. cerevisiae* to avoid stuck or sluggish fermentations. Consequently, a comprehensive analysis of the efficiency of amino acids, used as the sole nitrogen source, to sustain the growth and fermentation performances of non-*Saccharomyces* species can be regarded as valuable research. This information would be essential for implementing the sequential or co-fermentation of these species with *S. cerevisiae*.

For this purpose, four commercially available non-*Saccharomyces* strains, which belong to the species *Torulaspora delbrueckii*, *Metschnikowia fructicola* and *Metschnikowia pulcherrima* were chosen to explore their nitrogen source management under fermentation and growth conditions. This study generally highlights the differences between the *S. cerevisiae* and non-*Saccharomyces* species in single nitrogen source preferences and the assimilation order of each compound in mixed nitrogen sources. Furthermore, the lack of relationship between the sequence of consumption of amino acids and their capacity to support growth are highlighted, regardless of species.

## 2. Material and methods

### 2.1. Strains and media

All the yeast strains herein used were provided by Lallemand Inc. (France). These strains are *S. cerevisiae* Lalvin QA23<sup>®</sup> (SC), *Torulaspora delbrueckii* Biodiva<sup>®</sup> (TD), *Metschnikowia pulcherrima* Flavia<sup>®</sup> (MP), *Metschnikowia fructicola* Gaia<sup>®</sup> (MFa) and *Metschnikowia fructicola* LYCC7706 (MFb).

Yeast extract peptone dextrose (YPD) medium (20 g/L glucose, 20 g/L peptone, 10 g/L yeast extract) and SD medium (20 g/L glucose, 0.17 g/L yeast nitrogen base with 0.23 g/L NH<sub>4</sub>Cl) were used for yeast propagation.

A synthetic grape must (SM) base without nitrogen was prepared based on the recipe of Bely et al. (1990) with some modifications. This medium contains 200 g/L of sugar as a mixture of 50% glucose, 50% fructose and 5 mg/L of phytosterols. The concentrations of organic acids, minerals and vitamins were the same as those described by Su et al. (2019). The concentration of the different nitrogen sources was adjusted to specific levels, and detailed concentrations are explained in the following sections. When small volume (growth experiment) was needed, synthetic must was sterilised by filtration through 0.22 µm pore-size membrane filters (Thermo scientific). When large volume was needed (fermentation experiment), synthetic must was sterilised by steam pasteurisation for 15 min.

### 2.2. Determination of the growth rate, lag phase length and biomass yield in different nitrogen sources

The growth of the four non-*Saccharomyces* strains and one *S. cerevisiae* control strain in the different sole nitrogen sources was determined by the 96-well microtiter plate screening method, as described by Warringer and Blomberg (2003), with some modifications. In all, 27 individual nitrogen sources, including amino acids and ammonium, were used at two concentrations: 140 mg/L and 200 mg/L of YAN (Table 1). As a control fermentation, a mixed nitrogen source was used,

**Table 1**  
Concentration of each individual nitrogen sources in synthetic must.

	Assimilable nitrogen	Molecular mass (g/mol)	Concentration (g/L) for 200 mg/L of YAN	Concentration (g/L) for 140 mg/L of YAN
Ala	1	89.1	1.273	0.891
NH <sub>4</sub> Cl	1	53.5	0.764	0.535
Arg	3	174.2	0.830	0.581
Asp	1	133.1	1.901	1.331
Cys	1	121.2	1.731	1.212
Glu	1	147.1	2.102	1.471
Gln	2	146.1	1.044	0.731
Gly	1	75.1	1.072	0.751
His	1	155.2	2.217	1.552
Ile	1	131.2	1.874	1.312
Leu	1	131.2	1.874	1.312
Lys	2	146.2	1.044	0.731
Met	1	149.2	2.132	1.492
Phe	1	165.2	2.360	1.652
Pro	1	115.1	1.645	1.151
Ser	1	105.1	1.501	1.051
Thr	1	119.1	1.702	1.191
Trp	1	204.2	2.918	2.042
Tyr	1	181.2	2.588	1.812
Val	1	117.2	1.674	1.172
Ade	1	135.1	1.930	1.351
Cyt	1	111.1	1.587	1.111
GABA	1	103.1	1.473	1.031
Orn	2	168.6	1.204	0.843
Asn	2	132.1	0.944	0.661
Cit	2	175.2	1.251	0.876
Urea	2	60.1	0.429	0.300

**Table 2**  
Concentration of each individual nitrogen source in synthetic must MS140, MS300 and MS300E.

	MS140		MS300		MS300E	
	Concentration (g/L)	YAN (g/L)	Concentration (g/L)	YAN (g/L)	Concentration (g/L)	YAN (g/L)
Ala	0.048	0.008	0.103	0.016	0.095	0.015
Arg	0.123	0.030	0.264	0.064	0.062	0.015
Asp	0.015	0.002	0.031	0.003	0.143	0.015
Cys	0.004	0.000	0.009	0.001	0.130	0.015
Glu	0.040	0.004	0.085	0.008	0.158	0.015
Gln	0.166	0.032	0.357	0.068	0.078	0.015
Gly	0.006	0.001	0.013	0.002	0.080	0.015
His	0.011	0.001	0.023	0.002	0.166	0.015
Ile	0.011	0.001	0.023	0.002	0.141	0.015
Leu	0.016	0.002	0.034	0.004	0.141	0.015
Lys	0.006	0.001	0.012	0.002	0.078	0.015
Met	0.010	0.001	0.022	0.002	0.160	0.015
Phe	0.013	0.001	0.027	0.002	0.177	0.015
Pro	0.202	0.000	0.432	0.000	0.123	0.000
Ser	0.026	0.003	0.055	0.007	0.113	0.015
Thr	0.025	0.003	0.054	0.006	0.128	0.015
Trp	0.059	0.008	0.127	0.017	0.109	0.015
Tyr	0.006	0.000	0.013	0.001	0.194	0.015
Val	0.015	0.002	0.031	0.004	0.126	0.015
NH <sub>4</sub> Cl	0.151	0.040	0.324	0.085	0.057	0.015

which was made up of a mixture of 70% of amino acids and 30% of ammonium chloride (Table 2).

To assess the growth parameters, yeast cells were first pre-cultured in YPD medium overnight before being transferred to SD medium, which contains only 60 mg/L YAN, to be cultivated for 24 h to eliminate the influence of the nitrogen-rich YPD medium. Cells were washed and inoculated into SM with different nitrogen sources at a density of  $10^6$  yeast cells/mL. 250  $\mu$ L of inoculated SM were dispensed to each microtiter plate well. Each condition was assayed in triplicate. Microtiter plates were incubated in a SPECTROstar Nano<sup>®</sup> microplate reader (BGM Labtech, Offenburg, Germany) at 25 °C with 500 rpm orbital shaking. Growth curves were monitored by recording the increase in optical density (OD) at wavelength 600 nm every 30 min. The growth parameters (lag phase  $\lambda$ , maximal specific growth rate  $\mu_{max}$ ) were deduced from the growth curve by directly fitting OD measurements versus time to the Gompertz equation proposed by Zwietering et al. (1990), which takes the following expression:

$$y = D * \exp\{-\exp[(\mu_{max} * e) / D] * (\lambda - t) + 1\}$$

where  $y = \ln(OD_t / OD_0)$ ,  $OD_0$  is the initial OD and  $OD_t$  is the OD at time  $t$ ;  $D = \ln(OD_{\infty} / OD_0)$  is the OD value reached with  $OD_{\infty}$  as the asymptotic maximum. R script (statistical software R, v.3.0) was used to facilitate the calculations of  $\mu_{max}$  and  $\lambda$  with the Gompertz equation.

### 2.3. Fermentation kinetic experiment

Fermentations were conducted with synthetic must containing sole nitrogen sources with four non-*Saccharomyces* strains and one *S. cerevisiae* control strain. Two nitrogen concentrations, 140 mg/L and 200 mg/L, were used, and the detailed concentration of each nitrogen source is shown in Table 1. Fermentations were carried out in 15 mL glass tubes closed with a filter tip to allow the release of CO<sub>2</sub>. Tubes were kept at 24 °C with continuous magnetic stirring (260 rpm). Fermentations were followed by monitoring released CO<sub>2</sub> by weighing tubes every 4 h. The experiment was carried out in duplicate. This measure was automatically taken by a robotic device (Bloem et al., 2018).

### 2.4. Nitrogen source uptake order during alcoholic fermentation

Alcoholic fermentations were carried out at 25 °C with a mixture of nitrogen sources to disclose the uptake order of the different nitrogen

sources during fermentation. Firstly, fermentations were conducted with SM140 and SM300 (synthetic must of 140 and 300 mg/L YAN), whose composition is described in Table 2. Out of the two *M. fructicola* strains, only MFa (Gaia) was used for assessing the nitrogen uptake order. Samples were taken every 4 h until 48 h of fermentation. Fermentations were also conducted with SM300E in which an equal amount of each nitrogen sources (in terms of YAN) was supplied. For the SM300E fermentations, the *T. delbrueckii* and the *M. pulcherrima* strains, together with the control *S. cerevisiae*, were included in the experiment. Samples were taken every 4 h until 24 h. Yeast cells were removed from samples by centrifugation. The residual nitrogen in samples was analysed by UHPLC equipped with a UV detector (Thermo Scientific, MA, USA). The HPLC analysis method was based on Gómez-Alonso et al. (2007), but with some modifications. Samples were derivatised by diethylethoxymethylenemalonate (DEEMM). An accucore<sup>®</sup> C18 (Thermo scientific) LC column was used to separate amino acids.

### 2.5. Statistical analysis

All the experiments were carried out at least in duplicate. To study the growth on different media, heatmaps were plotted by Mev MultiExperiment Viewer, hierarchical clustering was performed with Euclidean distance metrics and group clustering was based on group averages (average linkage). The area under the curve (AUC) was calculated by the R statistical software, v. 3.0., with the growth curver package (Sprouffske, 2018).

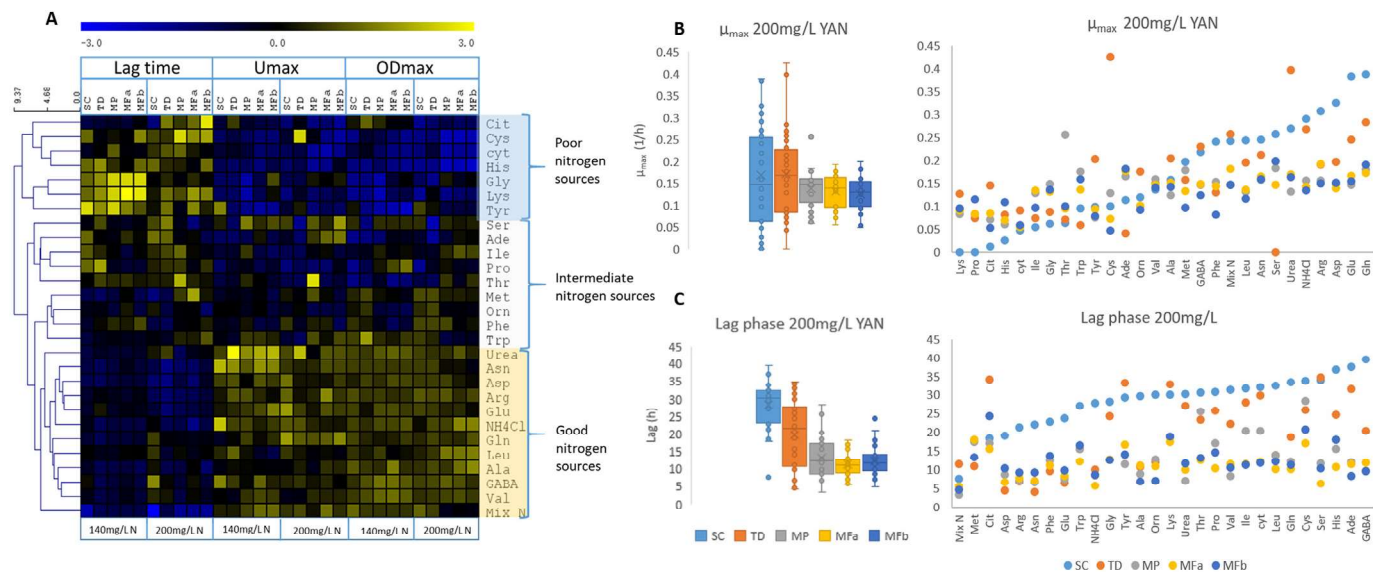
The CO<sub>2</sub> production curves were smoothed on the same time vector using the cellGrowth package, version 1.22.0 (Gagneur and Neudecker, 2012). These data were clustered by employing the Euclidean distance between CO<sub>2</sub> points at the same time, and by the Ward aggregation method. The number of clusters was set at seven. A principal component analysis (PCA) was carried out with the FactoMineR package (Le et al., 2008).

## 3. Results

### 3.1. Influence of the single nitrogen source on the yeast growth rate, lag phase length and biomass yield

The lag phase, growth rate ( $\mu_{max}$ ) and maximum OD ( $OD_{max}$ ) of four non-*Saccharomyces* and one *S. cerevisiae* strains were compared during growth in 27 different single nitrogen sources (140 or 200 mg/L YAN).





**Fig. 1.** (A) Growth parameters of the different strains grown in synthetic must with only one nitrogen source. Each row on the heatmap represents the sole nitrogen source used for growth. Three growth parameters, lag phase time, maximum growth rate ( $\mu_{\max}$ ) and maximum OD ( $OD_{\max}$ ), and two nitrogen concentrations, 140 mg/L and 200 mg/L, are compared on the heatmap. For each growth parameter, data were normalised by the mean value of all the nitrogen sources within the same strain and at the same nitrogen concentration. Hierarchical clustering was done based on Euclidean distance. The colour scheme from blue to yellow represents the normalised value from low to high. Clustering generally separates the nitrogen sources into three clades, which represent good nitrogen sources, intermediate nitrogen sources and poor nitrogen sources. (B) Maximum growth rate and (C) lag phase of the different strains when grown on synthetic must with 200 mg/L of the sole nitrogen sources. Box plots demonstrate the distribution of all the nitrogen sources for each strain. Dot plots show the value of each sole nitrogen source by specific strains. SC: *S. cerevisiae*; TD: *T. delbrueckii*; MP: *M. pulcherrima*; MFa: *M. fructicola* (Gaia); MFb: *M. fructicola* (LYCC7706). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

The heatmap, which summarises the comparison of the growth parameters depending on the nitrogen sources, the concentrations and strains (Fig. 1A), revealed that the herein used nitrogen sources hierarchically clustered into three categories, namely good, intermediate and poor nitrogen sources. Generally, the good nitrogen sources supported a relatively shorter lag phase time, a higher maximum growth rate and a higher maximum OD. Conversely, the poor nitrogen sources only supported weak, or even no, strain growth. NH<sub>4</sub>Cl, glutamate, glutamine, aspartate, asparagine, GABA, arginine, alanine, leucine and valine were classified as good nitrogen sources for both *S. cerevisiae*, as previously reported (Godard et al., 2007; Gutiérrez et al., 2013), and the non-*Saccharomyces* species: *Torulaspora delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima* and *Metschnikowia fructicola*. Similarly, cysteine, cytosine, citrulline, lysine, glycine, tyrosine and histidine poorly sustained the growth of all the strains. Surprisingly according to our results, proline, which has always been considered an unassimilable nitrogen source for *S. cerevisiae* strains under anaerobic conditions, was clustered in the intermediate nitrogen sources because the non-*Saccharomyces* strains, especially the *Metschnikowia* strains, efficiently used proline for growth.

A further analysis of the dataset revealed marked differences in the growth rate (Fig. 1B) and the lag phase time (Fig. 1C), depending on both the nature of the nitrogen source and the yeast species. The *Metschnikowia* strains displayed poorer growth performance for most nitrogen sources and a narrower variance in their growth characteristics according to the nitrogen source. However, the *Metschnikowia* strains exhibited greater growth capacity than *S. cerevisiae* in some nitrogen sources, such as isoleucine, glycine, threonine, histidine, citrulline and proline. The *Metschnikowia* and *T. delbrueckii* strains were able to use lysine as a sole nitrogen source, whereas *S. cerevisiae* was unable to metabolise it. On the contrary, *S. cerevisiae* grew much faster than the *Metschnikowia* strains in aspartate, asparagine, glutamine, glutamate, GABA, arginine and urea. *T. delbrueckii* took an intermediate position with higher  $\mu_{\max}$  than the *Metschnikowia* strains, but a lower  $\mu_{\max}$  than *S. cerevisiae* in the richer nitrogen sources. To summarise these specific growth traits, it was concluded that *S. cerevisiae* had a higher  $\mu_{\max}$  than

the non-*Saccharomyces* strains when grown on good nitrogen sources, while the non-*Saccharomyces* strains displayed better growth performances than *S. cerevisiae* on the poorest nitrogen sources (proline, cysteine, lysine and histidine).

Interestingly enough, although the non-*Saccharomyces* strains, especially the *Metschnikowia* strains, showed less growth capabilities than *S. cerevisiae*, the non-*Saccharomyces* strains displayed approximately a 10-h shorter lag phase than *S. cerevisiae* for more than half the single nitrogen sources. Only under the mix-N condition did the lag phase time of *S. cerevisiae* substantially lower and reach a similar value to the non-*Saccharomyces* strains.

Two YAN concentrations (140 mg/L and 200 mg/L), which correspond to the nitrogen levels commonly found in natural grape must, were assayed for each pure nitrogen source in our study. No substantial differences were observed for either the lag phase time or the maximum growth rate between both concentrations for most nitrogen sources (Suppl. Figures 1-2), except for the poorer nitrogen sources (lysine, glycine, histidine, proline and tyrosine). The increased concentration of these poorer nitrogen sources yielded an increase in  $\mu_{\max}$  and a reduction in the lag phase. Finally, as expected, a higher maximum OD value was obtained with 200 mg/L YAN than with 140 mg/L YAN for almost all the nitrogen sources (Suppl. Figure 3).

### 3.2. Capability of nitrogen sources to sustain fermentation

In parallel, four fermentation parameters were assessed: the fermentation lag phase, the maximal fermentation rate, the time to reach this maximum and the ability of strains to complete fermentation. A wide range of fermentation profiles was obtained from the five strains (Fig. 2). By applying Ward's agglomerative hierarchical clustering procedure to compare the profiles at 200 mg/L YAN, seven representative clusters of specific behaviours were differentiated (Fig. 2). Clusters 1, 2 and 3 collected most of the *S. cerevisiae* and *T. delbrueckii* fermentations, characterised by high fermentation rates from 0.55 g/L/h to 0.99 g/L/h, which allowed fermentation to be completed in less

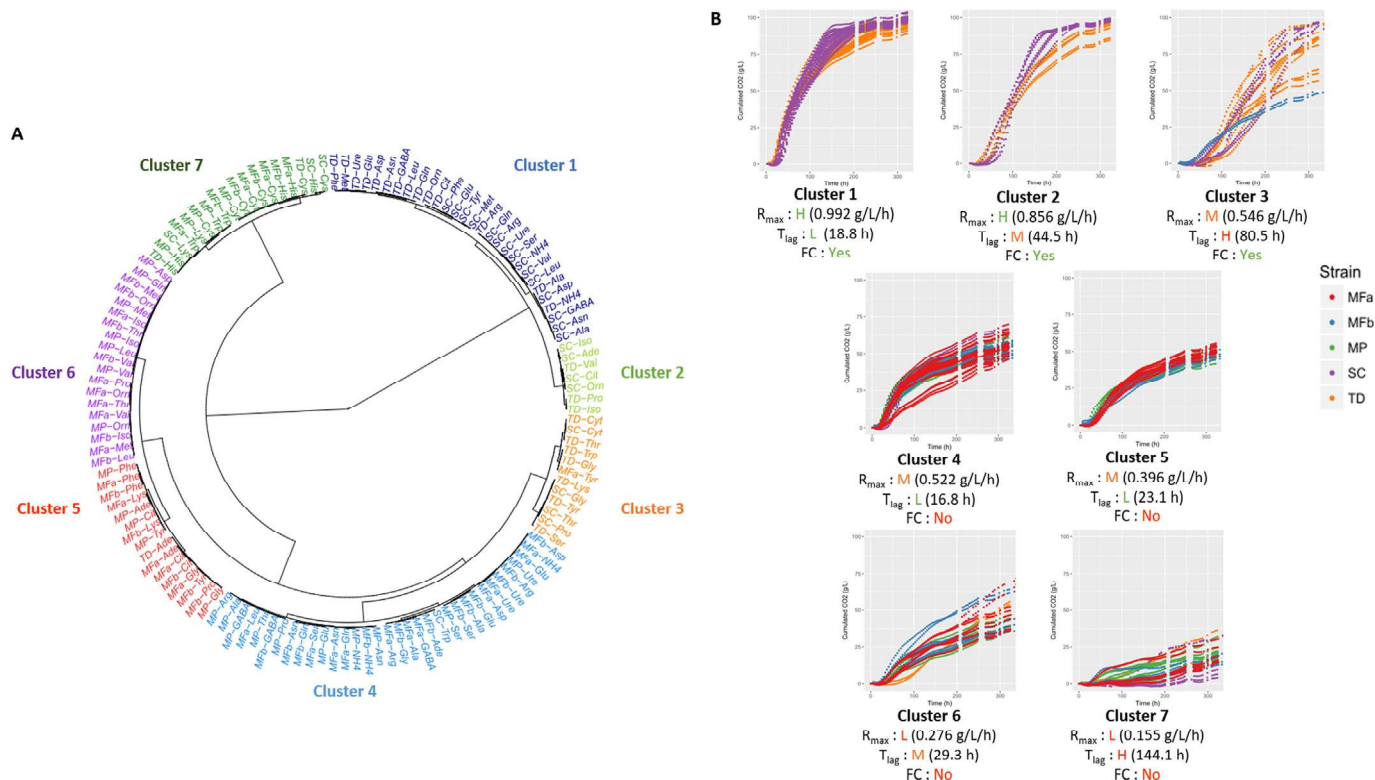


Fig. 2. Clustering of the fermentation profiles obtained on 27 media containing only one N source with the five studied strains. The means of the fermentation parameters were calculated for each cluster. **R<sub>max</sub>**: Maximum fermentation rate (g CO<sub>2</sub>/L/h). **T<sub>lag</sub>**: lag phase time (h) **FC**: fermentation completion. **H**: high, **M**: medium, **L**: low.

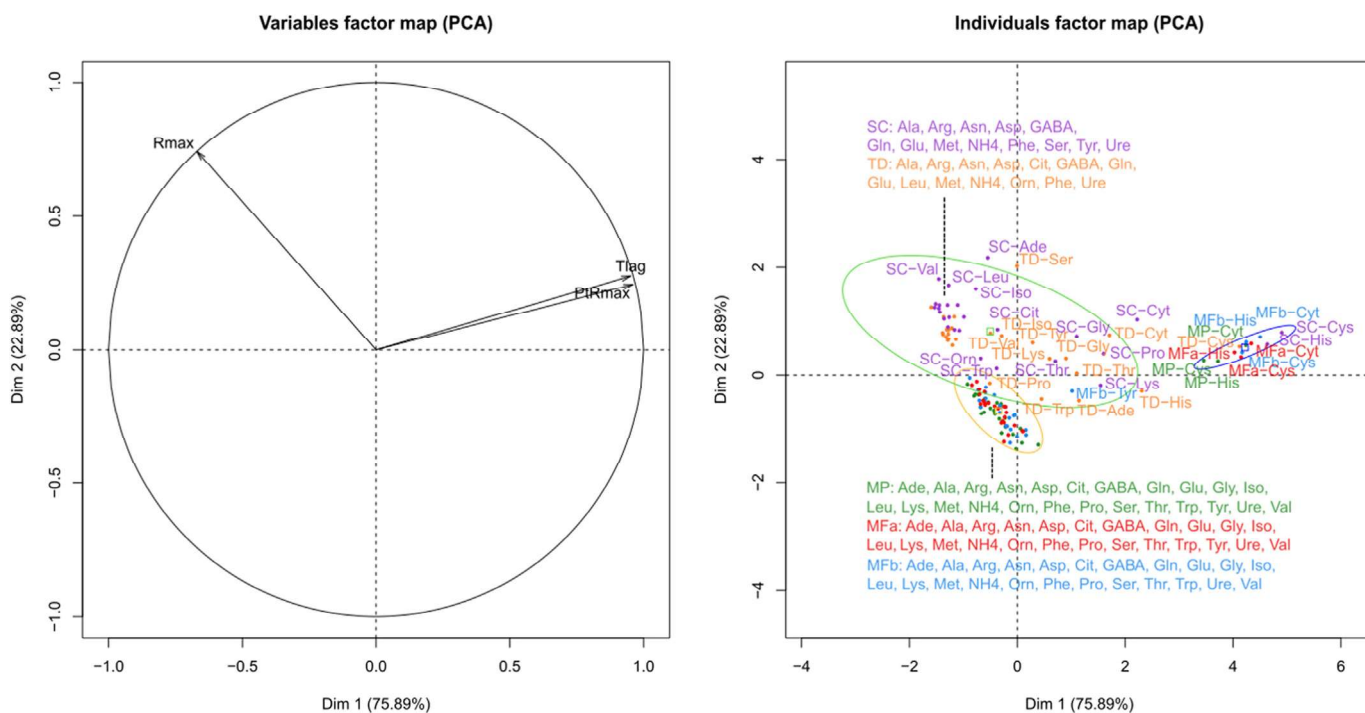


Fig. 3. Principal component analysis of the fermentation parameters obtained with the five strains in the 27 media. **R<sub>max</sub>**: Maximum fermentation rate; **T<sub>lag</sub>**: lag phase time; **PtR<sub>max</sub>**: time to reach R<sub>max</sub>. Labels indicate the strain and the nitrogen source available in the medium. Points are coloured depending on the strain; SC: purple, TD: orange, MP: green, MFa: red and MFb: blue. Labels of overlapping points are shifted over or under the points following the dashed lines. The conditions form three groups, highlighted by the light green, yellow and dark blue confidence ellipses (confidence level of 0.95). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

than 350 h. These three clusters were differentiated by lag phase length, which was shorter in Cluster 1 (a mean lag phase of 18.8 h), intermediate for Cluster 2 (mean value of 44.5 h), but much longer in Cluster 3 (a mean lag phase of 80.5 h). Clusters 4, 5 and 6 grouped the fermentations in which sugars were not exhausted. All these conditions corresponded to the cultures carried out with *Metschnikowia* sp., apart from the *S. cerevisiae* and *T. delbrueckii* fermentations on tryptophan and adenine, respectively. Under these conditions, fermentation activity was moderate, and a sharp drop in the fermentation rate occurred after approximately 50 h of fermentation. The average duration of the lag phases was shorter than in Clusters 1–3, and varied from 16.8 h to 29.3 h. This reduction in the fermentation lag phases agrees with the above-mentioned shorter growth lag phases for *Metschnikowia* sp. Finally, Cluster 7 grouped the conditions that were unable to support efficient fermentation, in which the lag phase was long and the fermentation rate was very slow. Histidine and cysteine were the only identified amino acids as being unable to support fermentation for all four species.

To further investigate the effect of the different nitrogen sources on the fermentation performance of the four yeast species, three quantitative parameters, which describe fermentation kinetics (lag phase duration, maximal fermentation rate and time to reach this maximum; Fig. 3) were compared by a PCA analysis. The first principal component explained 76% of the variance in the dataset on the basis of lag phase duration and the time to reach the maximal fermentation rate. A group of individuals (blue circle), which corresponded mainly to the fermentations done with cysteine and histidine as the nitrogen source, for which the four species' activity was very limited, was clearly distinguished from the other conditions according to these two parameters. A clear differentiation was also observed on the second axis between the fermentation parameters obtained with *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae* (light green circle) on the one hand, and with *Metschnikowia* sp. on the other hand (yellow circle). The fermentations performed by the *Metschnikowia* strains had a low  $R_{max}$ , but a shorter lag phase. *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae* achieved better performances with higher fermentation rates. These strains were also characterised by a wider variety of profiles depending on the amino acid, with differentiation based mainly on the fermentation rate (Fig. 3). For example, *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae* both had a low fermentation rate on cytosine and glycine. However, *S. cerevisiae* obtained a high fermentation rate for adenine, whereas *T. delbrueckii* proved less effective on this medium. Overall, most of the amino acids that efficiently supported fermentation were comparable for the five strains (Table 3). These

**Table 3**  
Classification of nitrogen sources depending on their ability to sustain fermentation.

	<i>T. delbrueckii</i>		<i>Metschnikowia</i> sp.		<i>S. cerevisiae</i>		
++	Ala	Urea	Ala	NH <sub>4</sub>	Ala	Met	
	Arg	Leu	Arg	Ser	Arg	NH <sub>4</sub>	
	Asn	Met	Asn	Urea	Asn	Phe	
	Asp	NH <sub>4</sub>	Asp		Asp	Ser	
	Cit	Orn	GABA		GABA	Tyr	
	GABA	Phe	Gln		Gln	Urea	
	Gln		Glu		Glu	Val	
	Glu		Leu		Leu		
	+	Cyt	Ile	Ade	Orn	Cyt	Trp
		Gly	Pro	Cit	Pro	Gly	
Lys			Gly	Thr	Pro		
Ser			Lys	Val	Thr		
Thr			Phe	Trp	Ade		
Trp			Tyr		Cit		
Tyr			Ile		Ile		
Val			Met		Orn		
-		Ade		Cys		Cys	
		Cys		Cyt		His	
	His		His		Lys		

amino acids included alanine, aspartate, asparagine, GABA, glutamate, ammonium and urea.

Furthermore, even if *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae* similarly responded to the majority of amino acids, some differences can be highlighted between these species (Suppl. Figures 4-5, Table 3). In general, *S. cerevisiae* had higher fermentation rates than *T. delbrueckii*, especially on adenine, glycine, tryptophan, tyrosine, valine and serine. Conversely, *T. delbrueckii* fermented more efficiently than *S. cerevisiae* on lysine, and exhibited a shorter lag phase and a higher fermentation rate on citrulline and ornithine. No significant differences in fermentation performances were observed between *M. pulcherrima* and *M. fructicola*, apart from the more efficient fermentation on lysine for *M. fructicola*.

Finally, the nitrogen concentration (140 or 200 mg/L of YAN) did not impact the classification of nitrogen sources. Higher maximal fermentation rates were obtained for higher nitrogen concentrations, except for the fermentation of *T. delbrueckii* on adenine, and the fermentation of *S. cerevisiae* on cysteine and histidine (Suppl. Figure 4). Lag phases were longer on the medium containing the lower nitrogen concentration (140 mg/L of YAN), especially for the non-*Saccharomyces* yeasts (Suppl. Figure 5).

### 3.3. Correlation between the growth and fermentation activity of each strain by using a single nitrogen source

The correlation between maximum growth rate  $\mu_{max}$  and maximum fermentation rate  $R_{max}$  by using different nitrogen sources at 200 mg/L YAN was calculated (Fig. 4). A generally good correlation was observed between both parameters. However, this correlation was better for the *Metschnikowia* strains than for *S. cerevisiae* and *T. delbrueckii*. For the last two strains, the two parameters were well correlated when the  $\mu_{max}$  values were under  $0.1 \text{ h}^{-1}$ . Only for the amino acids that supported poor growth, the fermentation capacity was limited by biomass (a linear correlation between  $\mu_{max}$  comprised between 0 and  $0.1 \text{ h}^{-1}$ ). When using the richer nitrogen sources, *S. cerevisiae* and *T. delbrueckii* showed higher growth rates ( $\mu_{max}$  higher than  $\approx 0.1$ ), but  $R_{max}$  reached a constant value around  $0.95 \text{ g/L/h}$  for *T. delbrueckii* and  $1.1 \text{ g/L/h}$  for *S. cerevisiae*. As the maximum growth rates were lower than  $0.1 \text{ h}^{-1}$  for the *Metschnikowia* strains with all the nitrogen sources, a linear correlation was observed between  $R_{max}$  and  $\mu_{max}$  for these strains.

For all the strains, some specific nitrogen sources did not show the aforementioned correlation between  $\mu_{max}$  and  $R_{max}$ . They were mainly poor nitrogen sources like Cys, His and Ade, which supported neither good growth nor high fermentation speed. Special cases were observed for *T. delbrueckii*, with Cys sustaining high  $\mu_{max}$ , but very low  $R_{max}$ , or Ser showing low  $\mu_{max}$ , but high  $R_{max}$ .

### 3.4. Nitrogen sources utilisation efficiency by different strains during alcoholic fermentation

To explore the sequential utilisation of different nitrogen sources by each yeast strain during synthetic must fermentation, fermentations were carried out with SM140 and SM300, which respectively corresponded to intermediate and high nitrogen availability conditions (Table 2). As the behaviour of two *Metschnikowia fructicola* strains was similar, only one of them (MFa Gaia) was included. To gain a clearer view of the nitrogen consumption profiles in each strain and for each fermentation condition, the AUC of each individual nitrogen source was calculated, which represents information about the time to start consumption, the maximum consumption rate and the maximum consumption percentage (Fig. 5A). Thus the nitrogen sources with higher AUC values could be considered an earlier and more complete consumed compound. Conversely, a low AUC value represented slow and partial nitrogen source consumption. The box plots in Fig. 5B–C represent a general distribution of the AUC values of 19 nitrogen sources for the different strains in SM140 and SM300 for 24 h of fermentation.



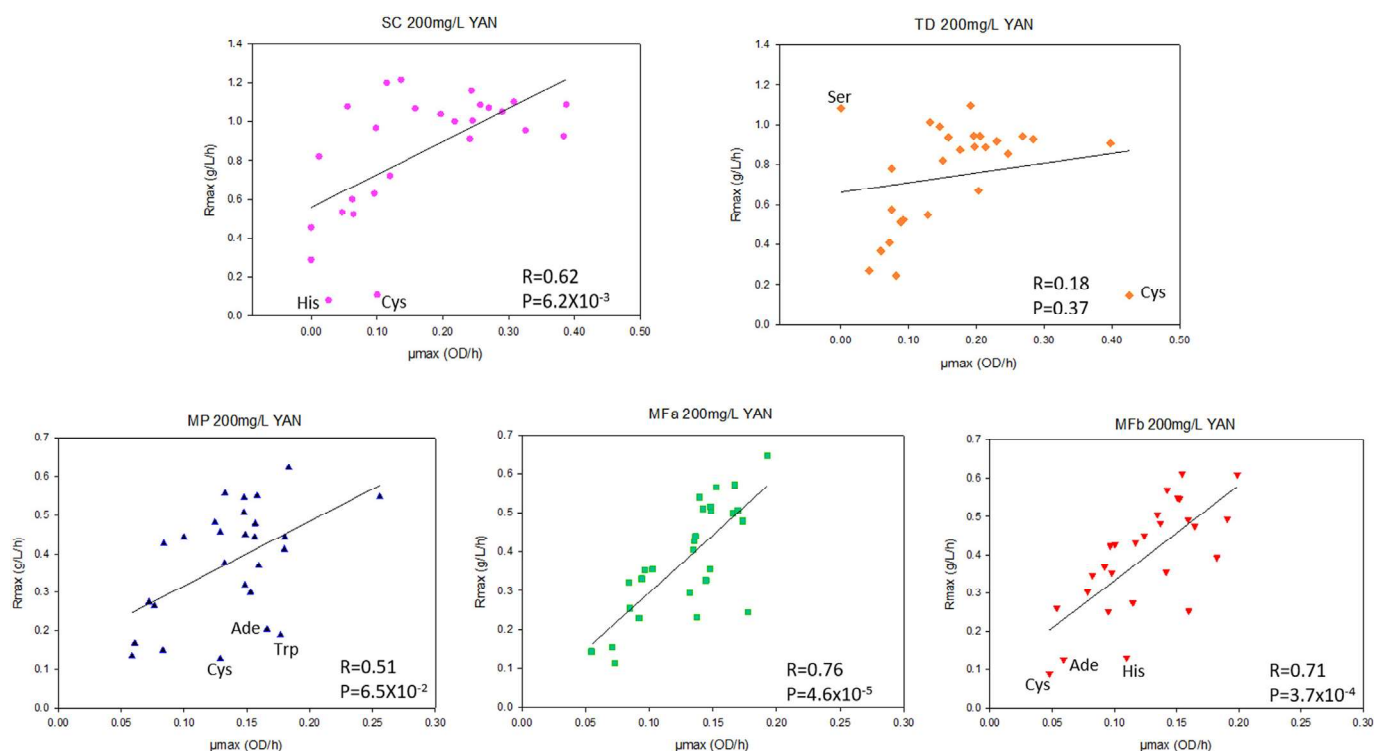


Fig. 4. Pearson's correlation analysis between the maximum growth rate ( $\mu_{max}$ ) and the maximum fermentation rate ( $R_{max}$ ) for each strain. Linear regression (black line) is displayed. The squared Pearson correlation coefficient (R) and the p-value (P) are provided in this figure.

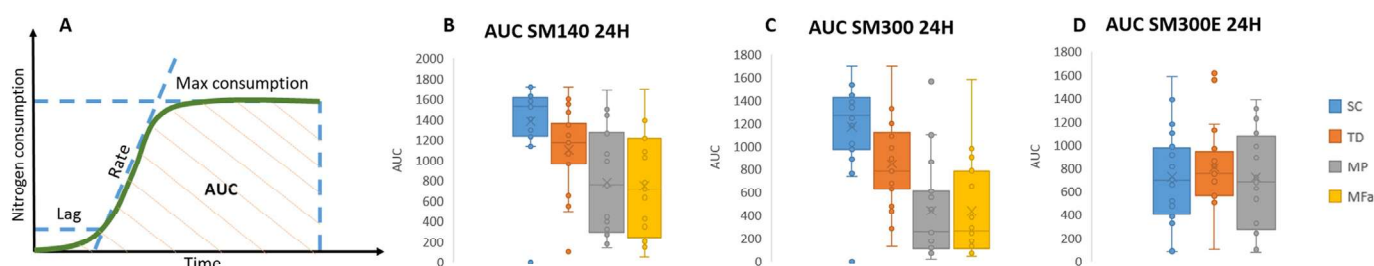
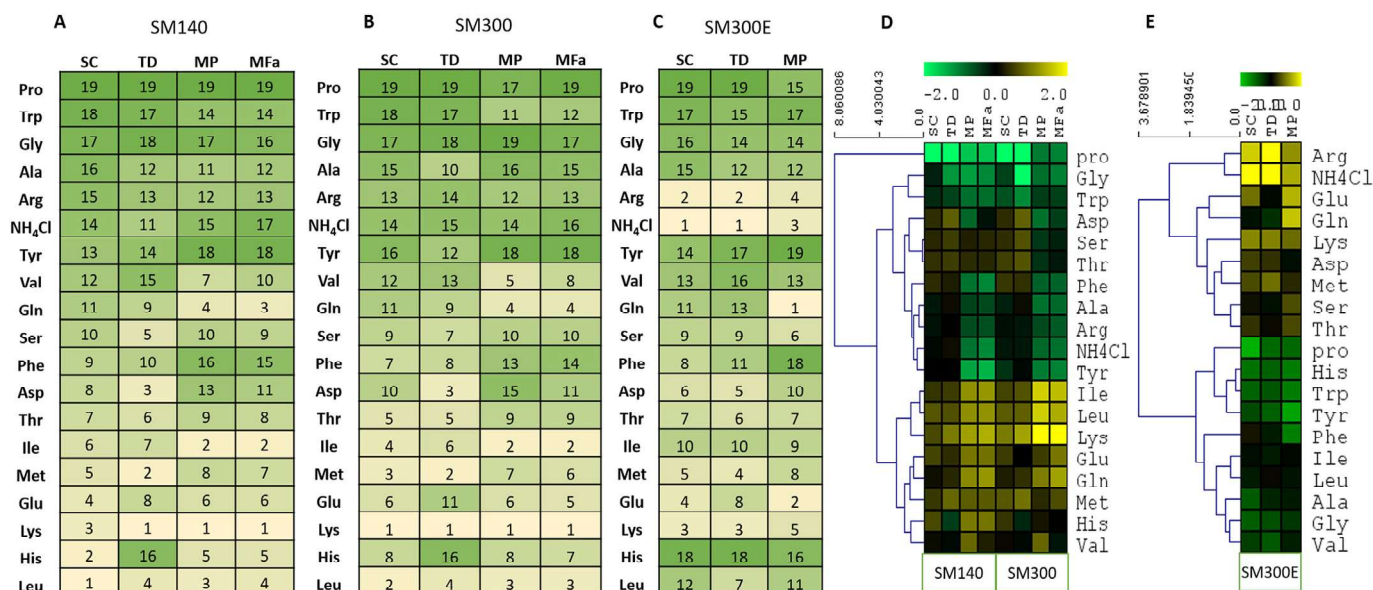


Fig. 5. (A) AUC provides the summary information of the lag phase, consumption rate and maximum consumption percentage. AUC values of the different strains with (B) SM140, (C) SM300 and (D) SM300E.

These plots clearly show a quicker and better utilisation efficiency of most nitrogen sources by *S. cerevisiae* and *T. delbrueckii* than by the *Metschnikowia* strains. These AUC values were ranked to represent the nitrogen sources uptake order by each strain (Fig. 6A–B). Each species showed a specific order of assimilation of the nitrogen substrates. However, nitrogen concentration barely influenced this order of assimilation. This result illustrated that, without changing the proportion of the different nitrogen sources, increasing the nitrogen concentration did not significantly influence the nitrogen source uptake order. The representation of the AUC values on a heatmap hierarchically clustered the nitrogen sources into four categories (Fig. 6D). Firstly, nitrogen sources lysine, leucine, isoleucine, histidine, methionine, glutamate, glutamine, and valine were the most rapidly consumed by all the studied strains. Of these, lysine was the first nitrogen source to be consumed in most cases. Of the early consumed nitrogen sources, differences appeared in the order of uptake in distinct strains. Remarkably, Ile, Gln and Val were more quickly depleted by the *Metschnikowia* strains, whereas His and Glu were poorly or slowly consumed by *T. delbrueckii*. It is noteworthy that all these early consumed amino acids were transported to yeast cells through SPS regulated permeases. The second group of nitrogen sources consumed at a moderate speed was made up of Tyr,  $NH_4$ , Arg, Ala, Phe, Thr, Ser, and Asp. Once again,

specific differences were observed among the studied strains for this group of amino acids. *T. delbrueckii* consumed Asp and Ser more quickly than the other strains. *S. cerevisiae* and *T. delbrueckii* also showed a higher uptake speed for Phe than the *Metschnikowia* strains. The third group was formed by Gly and Trp, which were the last amino acids to be consumed, despite the fact that the *Metschnikowia* strains consumed Trp earlier than other amino acids. Finally, Pro was clustered alone and represented the nitrogen source that was practically not consumed under any condition (only partial consumption by *T. delbrueckii* in SM140 was detected).

The individual consumption of each nitrogen source is shown in Supplementary Figs. 6 and 7. All the nitrogen sources were completely depleted by the *S. cerevisiae* strain within the first 24 h of both fermentations, except for proline, which was not consumed at all within the studied time frame. With the *T. delbrueckii* strain, most nitrogen sources were consumed within the first 48 h during both fermentations, with some exceptions. Trp and Gly were partially consumed in SM300 (60% and 30%, respectively) and Pro was partially consumed (48%) in SM140, but was not consumed at all in SM300 within the studied time frame. For both *Metschnikowia* strains, the depletion of different nitrogen sources was clearly slower. In SM300, only lysine, the two branched-chain amino acids (BCAA) leucine and isoleucine and



**Fig. 6.** Ranking of the nitrogen source uptake order of (A) SM140, (B) SM300 and (C) SM300E. (D) Heatmap of the AUC values of SM140 and SM300. (E) Heatmap of the AUC values of SM300E. The nitrogen sources with a low ranking number indicate that they were quickly consumed during alcoholic fermentation; Conversely, the nitrogen sources with a high ranking number indicate that they were slowly consumed or were not assimilated within the first 48 h of fermentation. The colour key from green to yellow represents the AUC value from low to high. Data were normalised by the mean value of each strain. Hierarchical clustering was done by Euclidean distance metrics. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

glutamine were almost fully consumed (more than 90%). *M. pulcherrima* consumed more than 90% of valine, the third BCAA, but only 50% of this amino acid was depleted by *M. fructicola*. This could indicate a specific preference of *M. pulcherrima* for this amino acid compared to *M. fructicola*, but more strains should be studied to confirm this hypothesis. For both *Metschnikowia* strains, glutamate, glutamine, histidine and methionine were moderately utilised, with consumption exceeding 50% in 48 h. Proline and glycine were not consumed within the first 48 h.

### 3.5. Influence of the initial concentration on the nitrogen source uptake order

To assess the influence of the initial concentration of the different nitrogen sources on the uptake order, fermentations were carried out by the strains of *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* and *M. pulcherrima* on a synthetic grape must with an equal amount (in YAN terms) of each nitrogen source and a final YAN concentration of 300 mg/L (SM300E; Table 2). Strangely enough, the equal proportion of each nitrogen source in the final YAN substantially changed the general uptake profile compared to SM300. By comparing the distribution of the AUC values (Fig. 5C–D), the first point to be underlined is that, unlike the results of the SM300 fermentations, no major differences were observed in the general nitrogen source consumption efficiency for the three strains. The analysis of the distribution of the consumed nitrogen sources showed a delayed uptake of some nitrogen sources by *S. cerevisiae* (Suppl. Figure 8) because several amino acids had only been partially consumed after 24 h, but they had all been completely depleted in SM300 after 20 h (except Pro). Interestingly, these amino acids poorly sustained yeast growth and fermentation (Trp, Gly and His), whereas SM300E seemed to favour the uptake of many amino acids for the *M. pulcherrima* and *T. delbrueckii* strains, with more amino acids completely depleted after 24 h (Suppl. Figure 8).

The SM300E AUC values were also represented on a heatmap (Fig. 6E). To better compare them with SM140 and SM300, the uptake order is shown in Fig. 6C. NH<sub>4</sub>Cl and Arg were the fastest nitrogen sources to be consumed by the *S. cerevisiae* and *T. delbrueckii* strains in SM300E, while these nitrogen sources were ranked from position 13 to 15 in SM300 (Fig. 6B). We should bear in mind that these compounds

are the most abundant nitrogen sources in SM300 and their concentrations sharply drop in SM300E. Although both NH<sub>4</sub>Cl and Arg were also rapidly depleted by the *M. pulcherrima* strain, Gln and Glu were preferentially consumed by it. Another major difference between SM300E and SM300 was observed for Leu and Ile as their consumption was significantly delayed in the SM300E fermentations by the three strains. Valine was more quickly exhausted by the *M. pulcherrima* strain when nitrogen sources were provided in similar amounts. All these BCAAs were provided in bigger quantities in SM300E. Lys was also one of the quickest amino acids to be consumed in the three strains, but took longer than NH<sub>4</sub>Cl and Arg depletion. For proline, all the strains showed the assimilation of this amino acid in SM300E (*T. delbrueckii* even completely depleted it), but it was not assimilated in SM300.

## 4. Discussion

Mixed culture fermentations of the non-*Saccharomyces* yeasts and *Saccharomyces cerevisiae* involve different synergic or antagonistic interactions between species and strains, including competition for nutrients, especially nitrogen sources, which play a significant role in winemaking (Rollero et al., 2018). Consequently, understanding the nitrogen resource management by non-*Saccharomyces* yeasts is essential to modulate the implementation of different species in sequential inoculations. This study provides a comprehensive overview of the nitrogen assimilation of four non-*Saccharomyces* industrial strains by comparing their nitrogen source preferences in terms of not only growth and fermentation performances, but also of their consumption sequence of these nitrogen sources.

During cultures with good nitrogen sources, *T. delbrueckii* displayed high growth and fermentation rate, similar to the performance of *S. cerevisiae*. This could be due to the close phylogenetic relationship between those two species (Kurtzman and Robnett, 2003). Both these species displayed a high degree of specialisation in their nitrogen preferences, with wide variability in the characteristic parameters of their capacity to grow and complete wine fermentation depending on the nitrogen source. Based on their efficiency to support growth, as measured by the generation time, amino acids and ammonium have been previously classified as “preferred”, “intermediate” and “non-preferred”

nitrogen sources for lab and wine *S. cerevisiae* strains (Cooper, 1982; Godard et al., 2007; Gutiérrez et al., 2013). Interestingly, the growth characteristics of both commercial *S. cerevisiae* and *T. delbrueckii* strains are consistent with this classification, apart from some specific amino acids likely reflecting differences in the genetic background between both species. For example, *T. delbrueckii* exhibited substantial growth in a lysine medium, whereas *S. cerevisiae*, in which the key enzymes involved in the lysine degradation pathways have not yet been identified (Bhattacharjee, 1992; Neshich et al., 2012), was unable to grow when using this amino acid as the sole nitrogen source. On the contrary, glutamine, glutamate and aspartate, which are key elements of the central core of nitrogen metabolism, supported *S. cerevisiae* growth more efficiently than that of *T. delbrueckii*.

Previous studies (Prior et al., 2019; Barbosa et al., 2018) have revealed the poor fermentation activity of the *Metschnikowia* strains in synthetic and natural grape musts. In the present study, the phenotypic traits of the *Metschnikowia* strains also stood out from those of the other two species as they were unable to complete wine fermentation, regardless of the nature of the nitrogen source, and they generally exhibited comparatively low growth and fermentation rates. Compared to the *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae* species, the characteristics of the *Metschnikowia* strains were less influenced by the nature of nitrogen sources, even though these compounds had been differentiated between preferred and non-preferred nitrogen sources. Consequently, their fitness during growth and fermentation on poor nitrogen sources, including lysine, histidine and threonine, was better than that of *S. cerevisiae*. Notably, *Metschnikowia* strains are able to use proline more efficiently than *S. cerevisiae*. The presence of dissolved oxygen during microplate cultivations may favour proline consumption. However, the growth conditions were the same for both non-*Saccharomyces* and *S. cerevisiae*. Thus, our results indicate that proline might be differently metabolised by these species. This observation also indicates that the nitrogen quality plays a more relevant role in controlling the growth of the *S. cerevisiae* and *T. delbrueckii* yeasts than that of the *Metschnikowia* strains. Finally, the *Metschnikowia* strains were characterised by a shorter lag phase compared to the *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae* species for most nitrogen sources. This shorter lag phase, a fermentation trait during the wine fermentation process to which very little attention has been paid (Novo et al., 2003), confers the *M. pulcherrima* and *M. fruticola* species a great competitive advantage for establishing in grape juice and starting fermentation, despite the rise in ethanol and oxygen depletion favouring the progressive imposition of *S. cerevisiae*. Our previous observations indicated that, in mixed culture fermentations, increasing the abundance of some non-preferred nitrogen sources could favour the competitiveness of *Metschnikowia* strains. These considerations may be particularly relevant for winemaking as the metabolic activities of the non-*Saccharomyces* species, including *M. pulcherrima* and *M. fruticola*, have been reported to impart a positive impact on the sensory quality of wines (Ruiz et al., 2018).

The literature reported that good growth fitness is not necessarily associated with the good fermentation performance of a particular yeast (Crépin et al., 2012; Gutiérrez et al., 2013; Kemsawasd et al., 2015; Prior et al., 2019; Su et al., 2019). In our study, very good correlations between these two parameters were observed for the *Metschnikowia* strains in most individual nitrogen sources. However, this correlation only remained for the nitrogen sources with  $\mu_{\max}$  values below  $0.1 \text{ h}^{-1}$  in the case of the *S. cerevisiae* and *T. delbrueckii* strains. In these strains, the most preferred nitrogen sources clearly improved the growth rate, but this growth did not impact the fermentation rate. When fermentations were carried out in good nitrogen sources, YAN concentration may become the main limiting factor for the yeast carrying capacity, which in turn limited the maximum fermentation rate.

The four commercial wine species consumed the available nitrogen in synthetic must with an assimilation sequence that was generally conserved between strains. The differentiation between the early (including Leu, Met, Ile, Thr, Glu, His) and late (ammonium, Ala, Arg and

Tyr) consumed amino acids, reported for a collection of 14 *S. cerevisiae* strains (Crépin et al., 2012), *P. kluyveri*, *T. delbrueckii*, *M. pulcherrima* and *L. thermotolerans* (Prior et al., 2019), also applied to all the yeasts that were herein characterised. In *S. cerevisiae*, this nitrogen source ranking is explained mainly by two molecular mechanisms: the Ssy1p-Ptr3p-Ssy5 (SPS) system, which regulates the permeases involved in transporting early assimilated amino acids, and the nitrogen catabolite repression (NCR) system, which controls the uptake of late consumed nitrogen compounds (Beltran et al., 2004; Godard et al., 2007; Ljungdahl, 2009; Crépin et al., 2012). However, some exceptions to this general pattern were evidenced in the non-*Saccharomyces* strains, which are worth pointing out in the winemaking context as they could result in the limited availability of a specific nitrogen compound to support *S. cerevisiae* growth in mixed or sequential fermentations. In particular, aspartate and serine were consumed earlier by *T. delbrueckii* than other strains, while isoleucine, valine, glutamine and tryptophan were exhausted more quickly during fermentation with the *Metschnikowia* species. Given the similarity of the nitrogen source uptake profiles between the *S. cerevisiae* and non-*Saccharomyces* strains, we hypothesised that similar regulatory mechanisms like NCR and SPS could also be present in the *T. delbrueckii* and *Metschnikowia* strains. Lleixà et al. (2018) recently demonstrated that the NCR mechanism also operated in *Hanseniaspora vineae*. Furthermore, changes in the concentration of nitrogen sources also affected the consumption sequence of N-containing molecules differentially between the *S. cerevisiae* and non-*Saccharomyces* strains. Compared to the concentrations usually found in natural grape must (used in SM, Bely et al., 1990), when all the nitrogen sources were supplied at the same concentration, *S. cerevisiae* slowed down the uptake of many nitrogen sources, whereas the non-*Saccharomyces* strains more efficiently took up these compounds, with the consequent reduced fitness advantage of *S. cerevisiae* over other species. This observation likely reflects the adaptation of *S. cerevisiae* wine strains to grape must environments in order to efficiently use a scarce nitrogen resource. It also indicates that the competitiveness of the different species during co- or sequential fermentations can be modulated by modifying nitrogen source compositions and concentrations. The uptake of arginine and ammonium was most significantly affected by their concentration in SM. The delayed consumption of these nitrogen sources under wine fermentation conditions can be explained by their high concentration in grape juice, combined with a repressed uptake by NCR. Nonetheless, the uptake of some nitrogen sources was not affected by their availability in the medium, like lysine, which was early consumed in both media, or tryptophan and proline, which were exhausted later regardless of the nitrogen resource composition. With lysine, this behaviour could be related to the kinetic properties of major lysine transporter Lyp1p, which allows the fast and efficient uptake of this compound (Bianchi et al., 2016).

In a population of *S. cerevisiae* wine strains, a positive correlation has been reported between the growth efficiency and uptake rate of nitrogen provided as a mixture of ammonium and amino acids (Gutiérrez et al., 2012). This can be extended to the species employed herein with the strains displaying the least growth capacity (*Metschnikowia* strains) with the lowest nitrogen consumption rate, and *vice versa*. However, no correlation was found between the uptake order of the different nitrogen sources and their capacity to support growth and fermentation activity as some of the most rapidly consumed nitrogen sources poorly sustained yeast growth. Conversely, some late consumed sources supported good growth and fermentation capacity. The most paradigmatic example is the early consumption of lysine, although this amino acid poorly supports the growth of the non-*Saccharomyces* strains or is unable to sustain *S. cerevisiae* growth. Conversely, alanine was consumed late, but is considered a preferred nitrogen source because it efficiently sustains the growth and fermentation of wine yeast species. The differences between these two classifications can be explained by the fact that the sequence of assimilation of nitrogen sources is controlled by the regulation of the permeases involved in transporting



these molecules, while different mechanisms underlie the efficiency of nutrients to sustain growth. Hence the carbon derivatives resulting from the catabolism of most preferred nitrogen sources produces C-compounds that are directly assimilable by the central carbon metabolism, while the transamination of less efficient sources leads to the formation of keto-acids, which are converted into higher alcohols (Godard et al., 2007; Gutiérrez et al., 2013).

## 5. Conclusions

Nitrogen source preference and the metabolism of wine-related non-*Saccharomyces* species are very important for the wine industry. This work thoroughly studied the nitrogen preferences and its utilisation profile of a *T. delbrueckii* and three *Metschnikowia* commercial strains. Regardless of the nitrogen source, clear differences were observed between the *T. delbrueckii* and *Metschnikowia* strains. The *T. delbrueckii* strain showed a similar growth character and fermentation performance to *S. cerevisiae*, whereas the *Metschnikowia* strains exhibited a much lower growth rate and less fermentation activity. However, the *Metschnikowia* strains were able to grow much better than *S. cerevisiae* in the so-called poor nitrogen sources. This result, together with a shorter lag phase than *S. cerevisiae*, can confer these species a great competitive advantage for starting fermentation. In addition, the initial proportion of nitrogen sources in the medium has important influence on their assimilation order, especially for arginine and ammonium, and consequently on the fitness of the species. The non-*Saccharomyces* strains had a similar nitrogen source uptake profile with *S. cerevisiae*, which indicates that similar nitrogen regulation systems may also exist in the non-*Saccharomyces* species during alcoholic fermentation. Overall, these results point out that an appropriate management of the nitrogen nutrition during mixed fermentation is required for an optimal use of the non-*Saccharomyces* species during winemaking.

## Conflict of interests

The authors declare that they have no conflict of interests.

## Acknowledgements

The authors thank Lallemand Inc. for supporting the project and PS PhD fellowship. YS thanks Generalitat Valencia for granting her PhD fellowship. The authors thank Christian Picou and Marc Perez for technical assistance and to Helen Warburton for reviewing the quality of the English language of this article.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103287>.

## References

- Barbosa, C., Esteves, M., Chambel, L., Lage, P., Mendes-Faia, A., Mendes-Ferreira, A., 2018. Molecular and phenotypic characterization of *Metschnikowia pulcherrima* strains from Douro wine region. *Fermentation* 4 (1), 8. Available from: <https://doi.org/10.3390/fermentation4010008>.
- Barbosa, C., Mendes-Faia, A., 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.10.003>.
- Bauer, F.F., Pretorius, I.S., 2000. Yeast stress response and fermentation efficiency: how to survive the making of wine—A review. *South African J. Enol. Vitic.* 21, 27–51.
- Bell, S.J., Henschke, P.A., 2005. Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* 11, 242–295.
- Beltran, G., Novo, M., Rozès, N., Mas, A., Guillamón, J.M., 2004. Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentations. *FEMS Yeast Res.* 4 (6), 625–632. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2003.12.004>.
- Bely, M., Sablayrolles, J., Barre, P., 1990. Description of alcoholic fermentation kinetics: its variability and interest. *Am. J. Enol. Vitic.* 41, 319–324.
- Bhattacharjee, J.K., 1992. Evolution of the  $\alpha$ -amino adipate pathway for the synthesis of lysine in fungi. In: Mortlock, R.P. (Ed.), *The Evolution of Metabolic Function*. CRC Press, London.
- Bianchi, F., van 't Klooster, J.S., Ruiz, S.J., Luck, K., Pols, T., Urbatsch, I.L., Poolman, B., 2016. Asymmetry in inward- and outward-affinity constant of transport explain unidirectional lysine flux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci. Rep.* 6 (April), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep31443>.
- Bisson, L.E., 1999. Stuck and sluggish fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 50, 107–119.
- Bloem, A., Rollero, S., Seguinot, P., Crépin, L., Perez, M., Picou, C., Camarasa, C., 2018. Workflow based on the combination of isotopic tracer experiments to investigate microbial metabolism of multiple nutrient sources. *J. Vis. Exp.* <https://doi.org/10.3791/56393>.
- Boulton, R.B., Singleton, V.L., Bisson, L.E., Kunkee, R.E., 1995. *Principles and Practices of Wine Making*. Chapman Hall, New York.
- Cooper, T., 1982. Nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*, pp. 39–99.
- Crépin, L., Nidelet, T., Sanchez, I., Dequin, S., 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. <https://doi.org/10.1128/AEM.02294-12>.
- Fairbairn, S., McKinnon, A., Musarurwa, H.T., Ferreira, A.C., Bauer, F.F., 2017. The impact of single amino acids on growth and volatile aroma production by *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02554>.
- Gagneur, J., Neudecker, A., 2012. cellGrowth: Fitting Cell Population Growth Models. R Package Version 1.220.
- Goibert, 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. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02175>.
- Godard, P., Urrestarazu, A., Vissers, S., Kontos, K., Bontempi, G., van Helden, J., Andre, B., 2007. Effect of 21 different nitrogen sources on global gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 27, 3065–3086. <https://doi.org/10.1128/MCB.01084-06>.
- Gómez-Alonso, S., Hermosín-Gutiérrez, I., García-Romero, E., 2007. Simultaneous HPLC analysis of biogenic amines, amino acids, and ammonium ion as aminoenone derivatives in wine and beer samples. *J. Agric. Food Chem.* 55, 608–613. <https://doi.org/10.1021/jf062820m>.
- Gutiérrez, A., Beltran, G., Warringer, J., Guillamón, J.M., 2013. Genetic basis of variations in nitrogen source utilization in four wine commercial yeast strains. *PLoS One* 8, e67166. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067166>.
- Gutiérrez, A., Chiva, R., Sancho, M., Beltran, G., Arroyo-López, F.N., Guillamón, J.M., 2012. Nitrogen requirements of commercial wine yeast strains during fermentation of a synthetic grape must. *Food Microbiol.* 31, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.02.012>.
- Jiranek, V., Langridge, P., 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.
- Kemsawasd, V., Viana, T., Ardö, Y., 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. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6835-3>.
- Kevvai, K., Kütt, M.L., Nisamedtinov, I., Paalme, T., 2016. Simultaneous utilization of ammonia, free amino acids and peptides during fermentative growth of *Saccharomyces cerevisiae*: simultaneous utilization of ammonia, free amino acids and peptides. *J. Inst. Brew.* 122, 110–115. <https://doi.org/10.1002/jib.298>.
- Kurtzman, C.P., Robnett, C.J., 2003. Phylogenetic relationships among yeasts of the “*Saccharomyces* complex” determined from multigene sequence analyses. *FEMS Yeast Res.* 3, 417–432. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(03\)00012-6](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(03)00012-6).
- Le, S., Josse, J., Husson, F., 2008. FactoMineR: an R package for multivariate analysis. *J. Stat. Softw.* 25. <https://doi.org/10.18637/jss.v025.i01>.
- Ljungdahl, P.O., 2009. Amino-acid-induced signalling via the SPS-sensing pathway in yeast. *Biochem. Soc. Trans.* 37 (1), 242–247. <https://doi.org/10.1042/BST0370242>.
- Ljungdahl, P.O., Daignan-Fornier, B., 2012. Regulation of amino acid, nucleotide, and phosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 190, 885–929. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.133306>.
- Lleixà, J., Martín, V., Giorello, F., Portillo, M.C., Carrau, F., Beltran, G., Mas, A., 2018. Analysis of the NCR mechanisms in *Hanseniaspora vineae* and *Saccharomyces cerevisiae* during winemaking. *Front. Genet.* 9, 747. <https://doi.org/10.3389/fgenet.2018.00747>.
- Martínez-Moreno, R., Morales, P., Gonzalez, R., Mas, A., Beltran, G., 2012. Biomass production and alcoholic fermentation performance of *Saccharomyces cerevisiae* as a function of nitrogen source. *FEMS Yeast Res.* 12, 477–485. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2012.00802.x>.
- Medina, K., Boido, E., Dellacassa, E., Carrau, F., 2012. Growth of non-*Saccharomyces* yeasts affects nutrient availability for *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 157, 245–250. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.012>.
- Mendes-Ferreira, A., Mendes-Faia, A., Leao, 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02331.x>.
- Neshich, I.A., Kiyota, E., Arruda, P., 2012. Genome-wide analysis of lysine catabolism in bacteria reveals new connections with osmotic stress resistance. *ISME J.* 7 (12), 2400–2410. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.123>.
- Novo, M., Beltran, G., Torija, M.J., Poblet, M., Rozès, N., Guillamón, J.M., Mas, A., 2003. Changes in wine yeast storage carbohydrate levels during preadaptation, rehydration and low temperature fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.05.001>.

- [org/10.1016/S0168-1605\(03\)00253-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00253-8).
- Padilla, B., Gil, J.V., Manzanares, P., 2016. Past and future of non-*Saccharomyces* yeasts: from spoilage microorganisms to biotechnological tools for improving wine aroma complexity. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00411>.
- Prior, K.J., Bauer, F.F., Divol, B., 2019. The utilisation of nitrogenous compounds by commercial non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine. *Food Microbiol.* 79, 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.12.002>.
- Rollero, S., Bloem, A., Ortiz-Julien, A., Camarasa, C., 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. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00196>.
- Ruiz, J., Belda, I., Beisert, B., Navascués, E., Marquina, D., Calderón, F., Rauhut, D., Santos, A., Benito, S., 2018. Analytical impact of *Metschnikowia pulcherrima* in the volatile profile of Verdejo white wines. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 8501–8509. <https://CRAN.R-project.org/package=growthcurver>.
- Su, Y., Origone, A.C., Rodriguez, M.E., Querol, A., Guillamón, J.M., Lopes, C.A., 2019. Fermentative behaviour and competition capacity of cryotolerant *Saccharomyces* species in different nitrogen conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 291, 111–120. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.11.020>.
- Taillandier, P., Lai, Q.P., Julien-Ortiz, A., Brandam, C., 2014. Interactions between *Torulaspota delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* in wine fermentation: influence of inoculation and nitrogen content. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 30, 1959–1967. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1618-z>.
- Varela, C., Pizarro, F., Agosin, E., 2004. Biomass content governs fermentation rate in nitrogen-deficient wine musts. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3392–3400. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.6.3392-3400.2004>.
- Warringer, J., Blomberg, A., 2003. Automated screening in environmental arrays allows analysis of quantitative phenotypic profiles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 20, 53–67. <https://doi.org/10.1002/yea.931>.
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., van 't Riet, K., 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1875.



## II. Analysing the impact of the nature of the nitrogen source on the formation of volatile compounds to unravel the aroma metabolism of two non-*Saccharomyces* strains

Pauline Seguinot<sup>1,2</sup>, Audrey Bloem<sup>1</sup>, Pascale Brial<sup>1</sup>, Emmanuelle Meudec<sup>1</sup>, Anne Ortiz-Julien<sup>2</sup>, Carole Camarasa<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>: UMR SPO: INRA, Université Montpellier, Montpellier SupAgro, 34060, Montpellier, France

<sup>2</sup>: Lallemand SAS, 31700, Blagnac, France

\* Corresponding author: carole.camarasa@inra.fr

### 1. Abstract

Even though non-*Saccharomyces* yeasts were regarded as spoilage microorganisms for a long time, their abilities to improve and diversify the aromatic profile of wines is now well recognized. Consequently, their use in combination with *S. cerevisiae* strains during winemaking has attracted substantial attention over the last decade. However, our limited understanding of the metabolism and physiology of these species remains a barrier to promoting efficient exploitation of their full potential. In this study, we further explored the metabolism involved in the production of fermentative volatile compounds of two commercial non-*Saccharomyces* strains, *T. delbrueckii Biodiva*<sup>™</sup> and *M. pulcherrima Flavia*<sup>®</sup>, in comparison with the reference wine yeast *S. cerevisiae* Lalvin EC1118<sup>®</sup>. After growing these strains in the presence of 24 different N-compounds, particular attention was paid to the influence of the nitrogen source on the profile of aroma compounds synthesised by these yeasts (higher alcohols and acids, medium-chain fatty acids and their acetate or ethyl esters derivatives). A comprehensive analysis of the dataset showed that these three species were able to produce all the fermentative aromas, regardless of the nitrogen source, demonstrating the key contribution of the central carbon metabolism to the formation of volatile molecules. Nevertheless, we also observed some specific phenotypic traits for each of the strains in their assimilation capacities for the various nitrogen nutrients as well as in their response to the

nature of the nitrogen source in terms of the production of volatile molecules. These observations revealed the intricacy and interconnection between the networks involved in nitrogen consumption and aroma production. These differences are likely related to the genetic backgrounds of the strains.

Overall, this study expands our understanding of the metabolic processes responsible for the formation of volatile compounds during wine fermentation and their variations according to species and the nature of the nitrogen source. This knowledge provides a new platform for the more efficient exploitation of non-*Saccharomyces* strains during winemaking, improving the management of the fermentation.

Keywords: alcoholic fermentation; *M. pulcherrima*; *T. delbrueckii*; sole nitrogen source; metabolic specificities; fermentative volatile compounds.

## 2. Introduction

During wine fermentation, *S. cerevisiae* strains are responsible for most of the sugar consumption and ethanol and CO<sub>2</sub> production. However, in grape musts, *S. cerevisiae* is less present among the vast array of yeasts available, and the most commonly found ones in this environment are *Candida*, *Metschnikowia*, *Kluyveromyces*, *Pichia* and *Hanseniaspora* (Fleet, 2003, 2008; Jolly et al., 2006). In the case of spontaneous fermentations, the amount of non-*Saccharomyces* yeasts decreases after the first few days of fermentation, while *S. cerevisiae* colonizes the medium. This phenomenon is mainly due to the low tolerance of non-*Saccharomyces* species to high ethanol concentrations and low oxygen availability (Combina et al., 2005; Holm Hansen et al., 2001). Furthermore, the use of active dry yeasts to inoculate the must is now a common practice in wine making, and as a consequence of the inoculation of a large amount of *S. cerevisiae* in the must, the development of the indigenous flora is prevented (Egli et al., 2002; Schütz and Gafner, 1993).

The wine aroma can be defined as the complex mixture of over a thousand volatile compounds, including volatile molecules derived from yeast metabolism: higher alcohols and acids as well as their acetate and ester derivatives. In this context, non-*Saccharomyces* yeasts have recently received renewed interest for enological applications, especially with the aim of diversifying the aroma profiles of wines. Currently, strains from *Torulaspora delbrueckii* (Azzolini et al., 2015; Belda et al., 2017; Puertas et al., 2017; Renault et al., 2015),

*Metschnikowia pulcherrima* (Comitini et al., 2011; González-Royo et al., 2015; Rodríguez et al., 2010; Ruiz et al., 2018 ), and *Lachancea thermotolerans* (Benito et al., 2015; Comitini et al., 2011a; Gobbi et al., 2013; Shekhawat et al., 2019) have been purposely characterized to meet this requirement. Many of these non-*Saccharomyces* strains have shown great abilities to improve the sensory qualities of wines. Some of these yeasts are now commercialised for use in co- or sequential inoculations, *S. cerevisiae* being still essential to ensure the completion of the fermentation.

However, despite the increasing data now available on the production of aromas by non-*Saccharomyces* yeasts under enological conditions, few studies are dedicated to understanding their metabolism, unlike the literature available on *S. cerevisiae*. At present, the reactions involved in the production of aroma compounds as well as their links to nitrogen and sugar metabolism in this species are well known. Regarding the formation of higher alcohols and acids,  $\alpha$ -ketoacids have been described as key metabolic intermediates. These precursors are first derived from the catabolism of a fraction of the consumed amino acids in varying proportions depending on the nature of the amino acids. Moreover,  $\alpha$ -ketoacids are synthesised by central carbon metabolism (Lambrechts and Pretorius, 2000). In addition to their use in the production of amino acids,  $\alpha$ -ketoacids are catabolised through the Ehrlich pathway, resulting in the formation of higher alcohols and acids. This metabolic route consists of decarboxylation to afford aldehydes followed by a reduction or an oxidation step to produce higher alcohols or acids, respectively (Hazelwood et al., 2008). Acids may be esterified to produce ethyl esters, while higher alcohols participate in the synthesis of acetate esters by reaction with acetyl-coA catalysed by alcohol acetyltransferases (Malcorps and Dufour, 1992; Minetoki et al., 1993). Fatty acids are produced from acetyl-coA through lipid metabolism by an enzymatic complex formed by *FAS1* and *FAS2* (Saerens et al., 2010). Their ethyl esters are synthesized from ethanol and acyl-coA by acyl-coA/ethanol O-acyltransferases.

The fermentation characteristics of wine yeasts have been studied according to the nature of the amino acid provided as the sole nitrogen source (Fairbairn et al., 2017; Godard et al., 2007; Kemsawasd et al., 2015). These studies have mainly focused on *S. cerevevise*, analysing the influence of the nitrogen source on the transcriptomic response (Godard et al., 2007) or on growth and aroma production (Fairbairn et al., 2017). Kemsawasd et al., (2015) studied the impact of 21 nitrogen sources on *S. cerevisiae* and four non-*Saccharomyces* yeasts, including

*T. delbrueckii* and *M. pulcherrima*, but fermentation conditions used are unlike those found in winemaking.

In this context, analysing the impact of individual nitrogen sources on the production of volatile compounds by *S. cerevisiae* and non-*Saccharomyces* wine strains related to the metabolic network will contribute significantly to our understanding of the operative metabolism involved in the formation of aroma and its regulation in such species. With this aim, we compared the profiles of nitrogen consumption and aroma production between *Torulaspora delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces cerevisiae*, with the latter being used as a reference. Yeasts were growing in a synthetic medium mimicking natural must but with only one nitrogen source at the time. The results revealed that the species had similar abilities to produce all the fermentative aroma compounds regardless of the nitrogen source, but important differences between the species were observed, suggesting specificities in their metabolism of aroma production and/or its regulation. As they provide new insights into metabolism in these yeasts, these results are of interest for their rational use in enological fermentation.

### 3. Materials and Methods

#### 3.1. Synthetic media

A synthetic medium base without nitrogen was prepared as described by Bely et al., (1990). This medium contains 200 g/L of sugar as a mix of 50 % glucose and 50 % fructose. Lipids were provided as 5 mg/L of phytosterols, from a stock solution prepared with 1.5 g of  $\beta$ -sitosterol (> 70%, Sigma-Aldrich, 85451) dissolved in 100 mL of Tween 80 /absolute ethanol (1:1, v/v). Twenty-four nitrogen sources were added at final concentrations of 200 mg/L of assimilable nitrogen (Table 1). A complete medium containing 200 mg N/L as 1/3 ammonium and 2/3 amino acids as described by Bely et al., (1990) was used as the control (SM200).

Table 1 : Concentration of the 24 nitrogen sources used in the synthetic media.

	Assimilable nitrogen	Molecular mass (g/mol)	Concentration (g/L) for 200 mg/L of YAN
Alanine (Ala)	1	89.1	1.273
Ammonium (NH <sub>4</sub> )	1	53.5	0.764
Arginine (Arg)	3	174.2	0.830
Aspartate (Asp)	1	133.1	1.901
Cysteine (Cys)	1	121.2	1.731
Glutamate (Glu)	1	147.1	2.102
Glutamine (Gln)	2	146.1	1.044
Glycine (Gly)	1	75.1	1.072
Histidine (His)	1	155.2	2.217
Isoleucine (Ile)	1	131.2	1.874
Leucine (Leu)	1	131.2	1.874
Lysine (Lys)	2	146.2	1.044
Methionine (Met)	1	149.2	2.132
Phenylalanine (Phe)	1	165.2	2.360
Serine (Ser)	1	105.1	1.501
Threonine (Thr)	1	119.1	1.702
Tryptophan (Trp)	1	204.2	2.918
Tyrosine (Tyr)	1	181.2	2.588
Valine (Val)	1	117.2	1.674
GABA	1	103.1	1.473
Ornithine (Orn)	2	168.6	1.204
L-asparagine (Asn)	2	132.1	0.944
L-citrulline (Cit)	2	175.2	1.251
Urea	2	60.1	0.429

### 3.2. Yeasts strains

Three yeast strains have been studied: *Torulaspora delbrueckii* Biodiva™, *Metschnikowia pulcherrima* Flavia® and *Saccharomyces cerevisiae* Lalvin EC1118®. All strains were provided by Lallemand SAS (Blagnac, France). The yeasts were kept in glycerol at -80 °C. Before use, they were inoculated on YPD agar plates and incubated at 28 °C for 4 days. A colony was transferred to a tube containing 5 mL of liquid YPD and incubated at 28 °C under agitation for 12 hours. This yeast suspension was then used to inoculate an Erlenmeyer flask containing 20 mL of fresh YPD. The cultures were grown for 24 hours at 28 °C under agitation. Finally, the content of the Erlenmeyer flask was centrifuged at 2000 rpm for 5 minutes. The cells were resuspended in the same volume of YNB medium without amino acids or ammonium to avoid nitrogen storage. For the inoculation, the cells in the pre-culture were counted by a Coulter

counter. The necessary volume was centrifuged, and the cells were resuspended in sterile physiological water. The cells were inoculated at  $1.10^6$  cells/mL.

### 3.3. Fermentations

Fermentations were performed in 15-mL glass tubes. The hole in the caps was fitted with a filtered sterile tip to allow the release of CO<sub>2</sub>. The tubes, which each contained a stir bar, were filled with medium by weight, plugged with cotton and steam pasteurized for 15 minutes. The caps were also sterilized. The tubes were transferred to racks on a magnetic stirrer table in a room held at 24 °C. The tubes were inoculated and closed with cap and tip under sterile conditions. The progress of the fermentation was followed by weighing the tubes to calculate the amount of CO<sub>2</sub> produced. The weighing process was automatically performed by a robotic device (PhenOFerm).

### 3.4. Measurement of the remaining nitrogen concentration

At the end of the fermentation (fermentation rate < 0.05 g/L/h), the medium was centrifuged at 5000 rpm for 5 minutes, and the supernatant was retrieved and kept at -20 °C until analysis. The assimilable amino acid concentration was measured using the NOPA method (nitrogen by OPA) as described by Dukes and Butzke, (1998). A calibration curve was prepared using known concentrations of isoleucine.

However, this method does not allow the measurement of ammonium. To this end, an ENZYTEC™ fluid Ammoniaque kit (DiaSys Diagnostic Systems Gmb) was used according to the manufacturer's instructions. The total amount of assimilable nitrogen remaining was the sum of the concentration of assimilable amino acid and the concentration of ammonium, expressed in milligrams of nitrogen per litre (mg N/L).

### 3.5. Measurement of the volatile compound concentrations

The volatile compounds, except tyrosol and tryptophol, were measured as described by Rollero et al., (2014). Ten microliters of a solution of deuterated standard was added to 5 mL of sample. The volatile compounds were extracted using 1 mL of dichloromethane. After shaking for 20 minutes and centrifuging for 5 minutes at 5 000 rpm and 4 °C, the organic phase was retrieved. The aqueous phase was extracted a second time. The total organic phase was dried with Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under nitrogen flux to obtain a final volume of 0.5 mL.

The samples were analysed on a Hewlett Packard 6890 (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) gas chromatography equipped with a CTC Combi PAL AOC-5000 (Shimadzu, Columbia, USA) autosampler and an HP 5973 (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) mass spectrometer. The gas chromatograph was equipped with a DB-WAX (30 m \* 0.250 mm \* 0.25 µm, Agilent J&W) column. The carrier gas was helium at a flow rate of 1.0 mL/min and a linear velocity of 36 cm/s in constant flow mode. The initial oven temperature was 40 °C for 3 minutes, and the temperature was then increased to 160 °C at a rate of 4 °C/min. The temperature then increased to 220 °C at a 15 °C/min rate and then kept at 220 °C for 10 min. The mass spectrometry detection parameters were the same as those described by Rollero et al., (2014).

Calibrations were performed for all the measured compounds at the same time and with the same method as was used to analyse the samples.

Tryptophol and tyrosol separations were performed using a Waters Acquity UPLC-DAD system (Milford, MA), on a (150 × 1 mm i.d.) Acquity BEH C18 column (Waters, Milford, MA; 1.7µm), operated at 35°C. Mobile phase consisted of water/formic acid (98/2, v/v) (eluent A) and methanol/formic acid (98/2, v/v) (eluent B). The flow rate was 0.08 mL/min. The elution program was as follows: isocratic for 1 min with 2% B, 2-15% B (1-7 min), isocratic with 15% B (7-9 min), 15-30% B (9-12 min), isocratic with 30% B (12-14 min), 30-50% B (14-20 min). Quantities were evaluated from peak areas at 280 nm, using external calibration curves established by the standards of tyrosol and tryptophol (Tryptophol, Sigma Aldrich, St Louis, MO; Tyrosol, Extrasynthese, Genay, France).

### 3.6. Reproducibility of the data and statistical analysis

In view of the high number of both experimental conditions (3 strains growing on 24 different nitrogen sources) and analytical measurements comprised in the experimental design, the whole data was presented using one replicate per condition. However, a subset of fermentations (3 strains x 6 nitrogen sources) were carried out in triplicate and the measured parameters submitted to a statistical analysis to assess the reliability of the data. First, we detected no substantial variation between the independent determinations (4 biological replicates) of the production of volatile compounds (Supplementary data 1). Then, the reproducibility of measurements was evaluated determining the intra-class correlation coefficients (Quan and Shih, 1996). These coefficients ranged between 80% and 99%, with a

mean value of 96%. (Supplementary data 2), showing high similarity of the values obtained with the same experimental conditions (strain, medium). The reliability of the data set indicated the feasibility of our approach for investigating the impact of nitrogen sources on the production of aromas by the 3 strains *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* and *M. pulcherrima*.

## 4. Results and discussion

To elucidate the contributions of nitrogen-containing compounds to the formation of the major aromas (fusel alcohols, acetate esters, ethyl esters and acids) during wine fermentation and to better understand the regulation of the involved pathways, three strains representative of the species *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* and *M. pulcherrima* were grown on synthetic media. These media were prepared to mimic the average composition of grape must but contained a single nitrogen source at 200 mg N/L (Table). A medium containing a mixture of amino acids and ammonium was used as a reference (SM200).

### 4.1. Nitrogen consumption

The comparison of the residual nitrogen concentrations at the end of the fermentations (Figure 1) revealed that most of the nitrogen was consumed (more than 90 % of the initial concentration) by the species *S. cerevisiae*, *M. pulcherrima* and *T. delbrueckii*. Interestingly, urea and non-proteinogenic amino acids, such as GABA, ornithine and citrulline, were efficiently metabolized by these yeasts. However, some exceptions have to be noted. First, histidine and, to a lesser extent, cysteine were poorly assimilated by the three yeast strains. Lysine was one of three amino acids that was not entirely depleted by the three strains when it was used as the sole nitrogen nutrient. However, a substantial consumption of lysine by *S. cerevisiae* was observed (180 mgN/L), which contrasted with a limited growth reported under these conditions (Kemsawasd et al., 2015; Su et al., 2020). This may be explained by the capacity of *S. cerevisiae* to import lysine, in particular using the specific permease Lyp1p (Sychrova and Chevallier, 1993) combined with the inability of this specie to further catabolise this amino acid (Bhattacharjee, 1992, Brunke et al., 2014). Regarding the species specificities in comparison with the wine reference species *S. cerevisiae* that efficiently consumed all the other amino acids, *M. pulcherrima* Flavia® never consumed all of the available nitrogen. This limited consumption of the nitrogen source should be viewed in relation to the low capacity of this species to grow and complete the wine fermentation regardless of the nitrogen source (Su et al., 2020). Significant amounts of residual nitrogen were found when phenylalanine,



tyrosine, GABA and to a lesser extent arginine and leucine were used as the sole nitrogen sources. Conversely, *T. delbrueckii* Biodiva™ was able to entirely consume 200 mg N/L of phenylalanine, arginine, alanine, glutamate and leucine but was unable to exhaust 200 mg N/L of glycine or threonine. Overall, these results indicated differences between the enzymatic resources involved in the uptake and use of nitrogen sources by these strains. As an example, the presence of a large amount of residual glycine combined with the low efficiency of this amino acid to support growth (Su et al., 2020) during *T. delbrueckii* fermentation is consistent with a low efficiency or lack of either the Gap1p permease, involved in the uptake of this nutrient, or of the enzymes that catalyse the release of the amine group from glycine, Agx1p and Gcv2p (Piper et al., 2002; Schlösser et al., 2004).

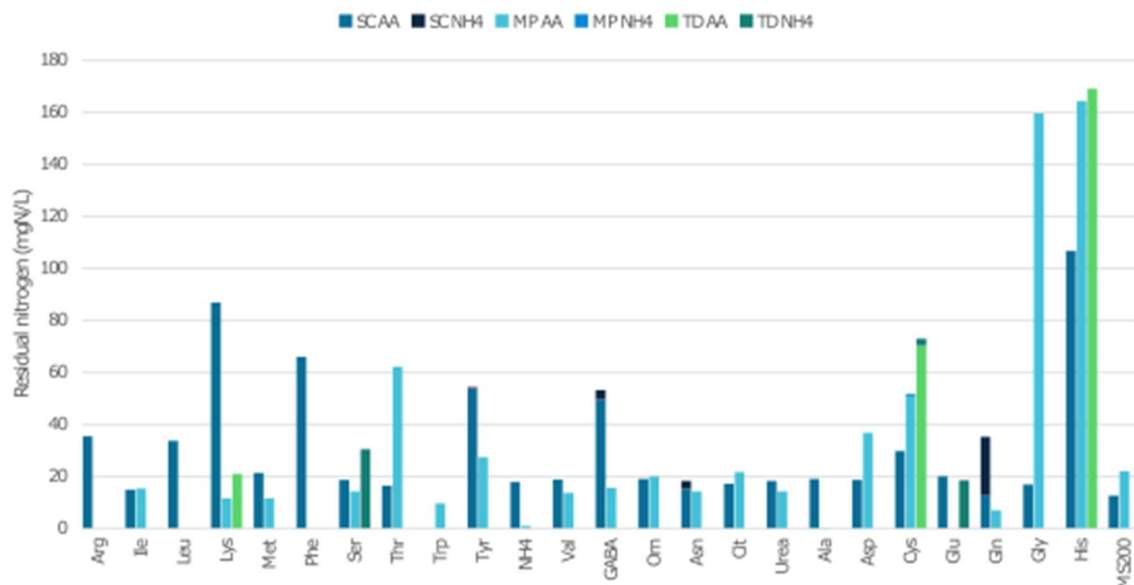


Figure 1 : Concentrations of residual amino acids and nitrogen at the end of the fermentation depending on the medium and the strain. SC: *S. cerevisiae* Lalvin EC1118®; MP: *M. pulcherrima* Flavia®; TD: *T. delbrueckii* Biodiva™; AA: amino acids; NH<sub>4</sub>: ammonium.

It is also noteworthy that under some conditions, ammonium production was observed. This is the case for *S. cerevisiae* Lalvin EC1118® in the presence of glutamate and serine and *M. pulcherrima* Flavia® in the presence of glutamine, asparagine, GABA and tyrosine. The excretion of ammonium likely reflects an intracellular accumulation of this compound as a result of an imbalance between the activity of the transaminases involved in the generation of the intracellular nitrogen pool and the activity of the central nitrogen core, responsible for the redistribution of nitrogen for the *de novo* synthesis of amino acids (Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012).

#### 4.2. Overview of the production of aroma compounds by three wine yeast strains grown with 24 different sole nitrogen sources

Measuring the concentrations of 32 volatile compounds that are of interest in winemaking and are representative of yeast metabolism at the end of each fermentation provided a comprehensive picture of the aroma profile of the three wine species. Because the three species displayed differences in their fermentation capacities, the data were normalized with respect to the sugar consumed and expressed in  $\mu\text{mol}$  of produced volatile compound per mol of consumed sugar. To assess the contribution and role of the nature of the nitrogen sources on the aroma metabolism, the volatile molecules were classified into 8 groups according to the metabolic pathways involved in their formation: compounds produced by threonine metabolism (Grp Thr), leucine metabolism (Grp Leu), isoleucine metabolism (Grp Ile), valine metabolism (Grp Val), phenylalanine metabolism (Grp Phe), medium-chain fatty acids (Grp MCFA), ethyl esters derived from MCFA (Grp EE) and other compounds (including methionol and diethyl succinate) (Figure 2, Supplementary data 3, 4 and 5).

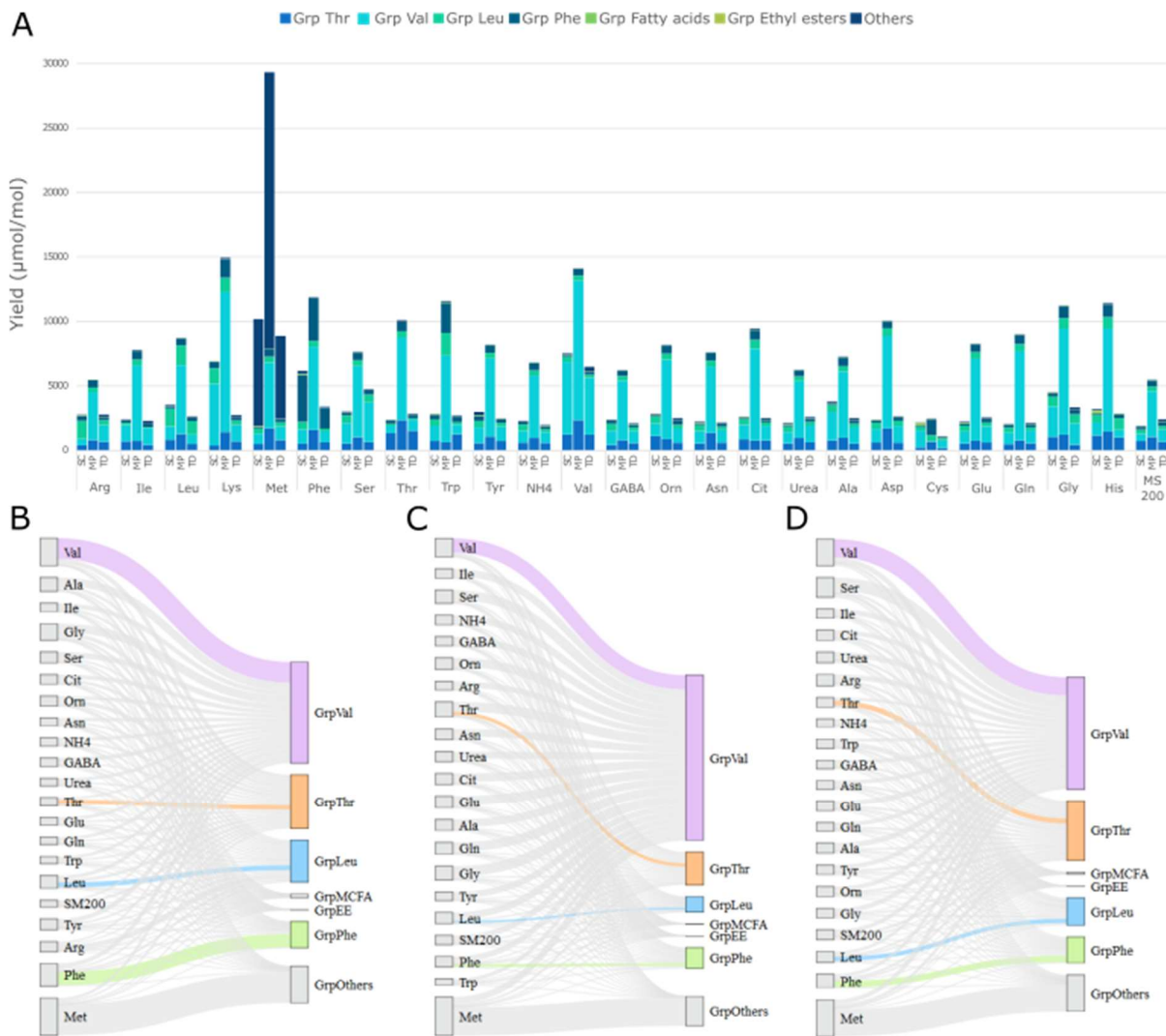


Figure 2: Production yield of aroma compounds depending on the strain and the medium (A), and Sankey diagrams representing the repartition of consumed nitrogen sources (on the left) to aroma production (on the right) for *S. cerevisiae* Lalvin EC1118® (B), *M. pulcherrima* Flavia® (C) and *T. delbrueckii* Biodiva™ (D). Fluxes representing a direct pathway between an amino acid and the compounds directly produced from it through the Ehrlich Pathway are coloured. Aroma compounds are grouped depending on their metabolic pathway of production. SC: *S. cerevisiae* Lalvin EC1118®; MP: *M. pulcherrima* Flavia®; TD: *T. delbrueckii* Biodiva™.

Furthermore, the formation by the three yeasts of tyrosol and tryptophol, which derive from the catabolism of tyrosine and tryptophan through the Ehrlich pathway, respectively, were measured under a subset of conditions: in presence of aromatic amino acids (Phe, Tyr or Trp), valine and ammonium as sole nitrogen source and during SM200 fermentations (Figure 3, Supplementary data 6).

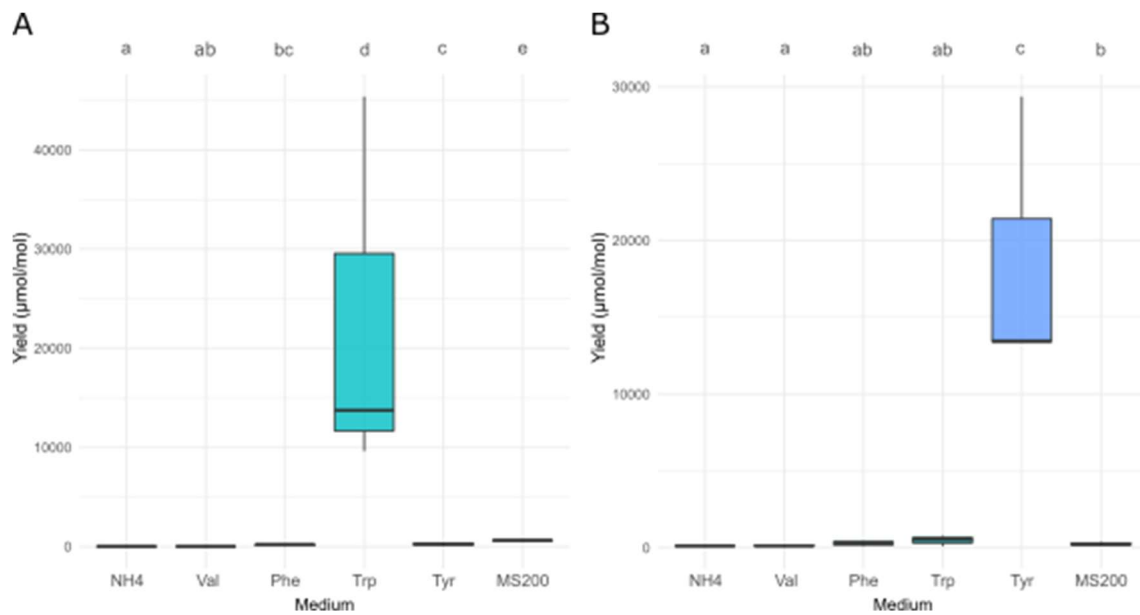


Figure 3: Box plot of the production yields of tryptophol (A) and tyrosol (B) depending on the medium for the three studied strains. Letters a,b,c,d, and e indicates that statistical significance depending on the medium ( $p < 0.05$ ).

The first major outcome to be highlighted is that all the volatile compounds, regardless of their chemical family (fusel alcohol, acid, acetate ester, or ethyl ester) or the metabolic pathway involved in their synthesis, are produced by all three species. Regardless of the provided nitrogen source, the production of these compounds was observed at levels comparable or higher to those of the SM200 reference fermentations depending on the conditions (Figure 2 and Figure 3). As an example, when valine was used as the sole nitrogen source, the formation of isobutanol, isobutyric acid, isobutyl acetate and ethyl butyrate, which are directly derived from valine assimilation via the Ehrlich pathway (Grp Val), was largely increased, but substantial production of all other volatile molecules was also observed. Conversely, compounds originating from the metabolism of leucine, threonine, phenylalanine or isoleucine were synthesized under all conditions, even if the metabolic route involved in their assimilation does not directly result in the formation of their  $\alpha$ -keto-acid precursor (Figure 2). Furthermore, no direct correlation between the amount of consumed nitrogen and the production yields of volatile compounds was found (Supplementary data 7). The ability of wine yeasts to produce the entire range of aroma compounds regardless of the nature of the nitrogen nutrient supporting the growth has been partially observed with other *S. cerevisiae* strains (Fairbairn et al., 2017; Lage et al., 2014). This behaviour is to be seen in the context of the model previously proposed to explain the management of the nitrogen resources by *S.*

*cerevisiae* during alcoholic fermentation (Crepin et al., 2017; Rollero et al., 2017; Bloem et al., 2018). Thus, isotopic tracer experiments revealed that the consumed nitrogen sources are substantially catabolised, resulting in intracellular accumulation of nitrogen (Crepin et al., 2017). Subsequently, the formation of all  $\alpha$ -keto-acid precursors via the central carbon metabolism for the *de novo* synthesis of proteinogenic amino acids increased. The further removal of these molecules in excess over the anabolic requirements via the formation of volatile compounds, as intermediates in the Ehrlich pathway (Rollero et al., 2017), explains the abilities of yeasts to produce substantial amount of all the fermentative aroma compounds, regardless of the nitrogen source used. In addition to this general pattern, we observed that the production yield of fermentative aroma compounds varied depending on the nature of the nitrogen source (Figure 2 and Figure 3). Overall, the three strains exhibited profiles similar to those observed under the reference SM200 conditions when ammonium, amino acids related to core nitrogen metabolism (aspartate, asparagine, glutamate, and glutamine) or non-proteinogenic amino acids were used as the sole nitrogen source. Conversely, the synthesis of aroma compounds was increased by using glycine and most of the amino acids in the Ehrlich pathway, which was usually due to the overproduction of the volatile compounds derived directly from their catabolism. Furthermore, depending on the nature of the provided nitrogen source, the formation of volatile compounds belonging to specific chemical families (MCFAs and ethyl esters) may vary. The further analysis of these specific trends, in view of the metabolic routes responsible for the synthesis of the volatile molecules, provided new insights into the incidence of the assimilation of nitrogen-containing molecules by *S. cerevisiae* for aroma metabolism.

#### 4.3. Specific trends in aroma compound production by *S. cerevisiae* depending on the nature of the nitrogen source

The most substantial changes in the synthesis of volatile compounds were observed when amino acids catabolised through the Ehrlich pathway ('Ehrlich amino acids'), namely, methionine, leucine, valine, isoleucine, tryptophan, tyrosine and phenylalanine, were provided as the sole nitrogen sources during fermentation (Figure 3 and Figure 4).

Under these conditions, a pronounced overproduction of the aroma compounds in line with the available amino acids, namely, the corresponding higher alcohol, ester acetate, branched-chain fatty acid (BCFA) and ethyl ester, occurred (Supplementary data 3 and 6). For example,

during fermentations in the presence of valine compared to fermentations using ammonium, the production yield of isobutanol, isobutyl acetate, isobutyric acid and ethyl butyrate were increased by factors ranging from 2.5 to 40, while the production of the other volatile molecules remained similar. Surprisingly, under these conditions, no variations were found in the formation of isoamyl alcohol and its derivatives, although the  $\alpha$ -keto acid intermediate derived from valine,  $\alpha$ -keto-isovalerate, may be converted into  $\alpha$ -keto-isocaproate, the precursor for isoamyl alcohol synthesis, through an acetyl-CoA dependent metabolic route (Chang et al., 1984). In parallel, a decrease in the formation of MCFAs was observed in the presence of valine (Figure 5), which has been reported as a marker for a limitation in acetyl-CoA (Bloem et al., 2016). Consequently, insufficient amount of intracellular acetyl-CoA to convert  $\alpha$ -keto-isovalerate into  $\alpha$ -keto-isocaproate is a possible cause of this observation.

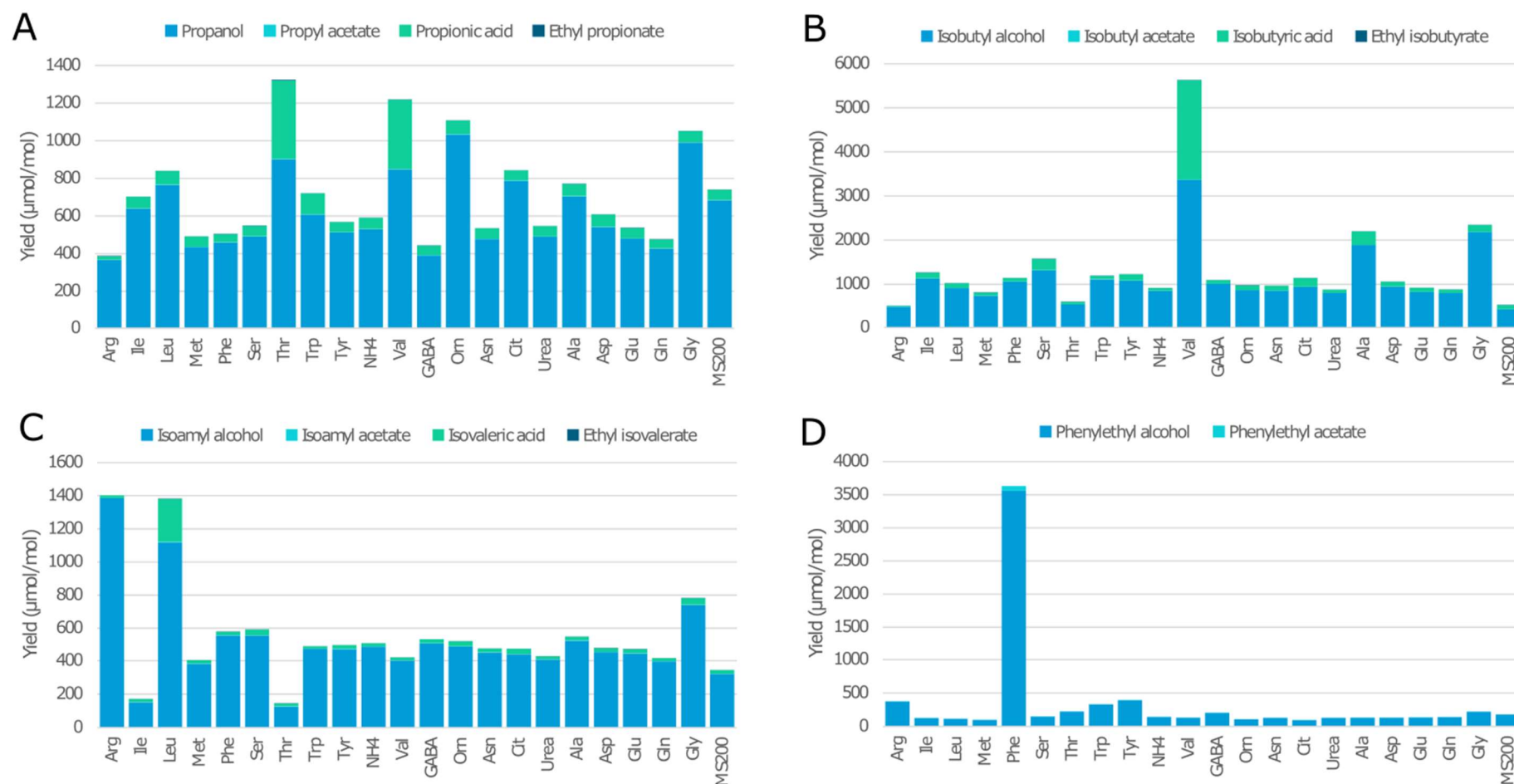


Figure 4: Production yield of aroma compounds grouped by metabolic pathway produced by *S. cerevisiae* Lalvin EC1118® depending on the nitrogen source available in the medium. A: Grp Thr, B: Grp Val, C: Grp Leu, D: Grp Phe.

An extreme behaviour was found regarding the production yields of tyrosol and tryptophol, which were increased by factors up to 120 and 4000 during fermentations in presence of tyrosine and tryptophan as sole nitrogen source, respectively (Figure 3).

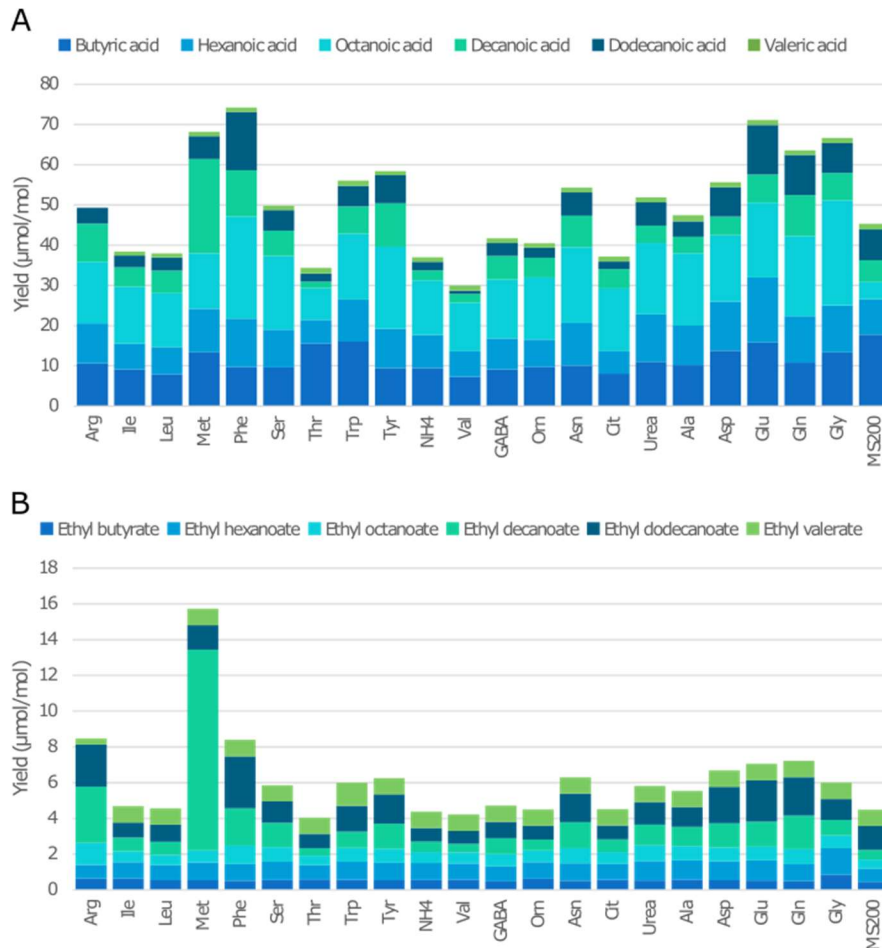


Figure 5: Production yield of MCFA (A) and ethyl esters derived from MCFA (B) produced by *S. cerevisiae* Lalvin EC1118® depending on the nitrogen source available in the medium.

This high impact of Ehrlich amino acids has to be regarded as a consequence of the assimilation pattern of these amino acids. Indeed, the transamination step in amino acid degradation, essential to the subsequent redistribution of nitrogen for the *de novo* synthesis of proteinogenic amino acids (Crépin et al., 2017), results in the release of  $\alpha$ -keto acid intermediates within the cells (Hazelwood et al., 2008; Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012; Magasanik and Kaiser, 2002). The Ehrlich pathway is then the more efficient metabolic route for removing the surplus of  $\alpha$ -keto acids derived from methionine, branched and aromatic amino acids. However, not all of the consumed amino acids were converted into their corresponding volatile molecules. Moreover, the yields of aroma production substantially varied according to the nature of the nitrogen compound; 0.64  $\mu$ M of methionol was produced



per  $\mu\text{M}$  of methionine consumed, and only 0.11  $\mu\text{M}$  of related volatile compounds – isoamyl alcohol, isoamyl acetate, isovaleric acid, ethyl isovalerate – was produced per  $\mu\text{M}$  of leucine consumed (Figure 1, Figure 2 and Supplementary data 8). To explain these observations, different main features must be considered. First, measuring the concentrations of volatile compounds in the liquid phase resulted in an underestimation of the actual production of these molecules from yeast metabolism. Indeed, during fermentation, a substantial fraction of the volatile compounds synthesized by yeast is lost due to the transfer of the molecules from the liquid phase to the gas phase of the fermenter, resulting in a loss of compounds with the exhausted  $\text{CO}_2$ , and the size of this fraction depends on the chemical structure of the molecule (Morakul et al., 2011). Furthermore, the general pattern reported for the management of complex nitrogen resources during wine fermentation is based on an important catabolism of the consumed branched and aromatic amino acids at the expense of their direct use for biomass formation, combined with an efficient *de novo* synthesis of proteinogenic amino acids to fulfil anabolic requirements (Crépin et al., 2017; Rollero et al., 2017). This model may differ when a single source of nitrogen is provided: a higher portion of the consumed amino acid provided as the sole nitrogen source may be directed directly towards biomass biosynthesis. This proportion may vary according to the needs of the strains, which differ between amino acids (Bloem et al., 2018). Furthermore, other metabolic pathways that remain to be elucidated may be involved in the intracellular fate of consumed amino acids.

Less directly, a substantial increase in the production of the higher alcohols and acids originating from the Ehrlich pathway was generally observed during *S. cerevisiae* growth on glycine and arginine (Figure 4, Supplementary data 3). During lysine fermentation, the production yield of isobutyl acetate and isobutyl ethanol increased by a factor of approximately 2.5 compared with ammonium fermentation. Using isotopic tracer experiments with  $^{13}\text{C}$ -glycine, branched amino acids (leucine, valine and isoleucine) have been reported as final products from glycine catabolism (Villas-Bôas et al., 2005), in addition to pyruvate (via the formation of serine, Kastanos et al. (1997)). Thus, the higher levels of branched higher alcohols and acids formed during growth on glycine are likely due to increased intracellular formation of their  $\alpha$ -keto acid intermediates. In presence of arginine as sole nitrogen source, the intracellular availability of glutamate is likely increased, as a key

compound of arginine catabolism (Romagnoli et al., 2014). Therefore, under these conditions, the *de novo* formation of glutamate from pyruvate is likely reduced, which may lead to a redirection of fluxes from this metabolic intermediate toward the production of isoamyl alcohol.

The use of amino acids catabolised through the Ehrlich pathway also had pronounced effects on the balance between the higher alcohol and its corresponding acid, related to a greater increase in the formation of the acid compared to that observed in alcohol production (Supplementary data 9). Thus, as examples, a 6-fold increase in the ratio between the productions of isovaleric acid and isoamyl alcohol was observed in the presence of leucine as the sole nitrogen source compared with fermentation on ammonium, and the ratio between isobutyric acid and isobutanol was up to 9-fold higher with valine than with ammonium as the nitrogen source. Moreover, during fermentation on glycine, the formation of branched acids and higher alcohols increased, but to lesser extents, and the ratios of acid/alcohol remained nearly unchanged (varied by factors between 0.8 and 1.3 according to the compounds). The last step of the Ehrlich pathway consists either in the reduction of the aldehyde intermediate to produce a higher alcohol or in its oxidation in a fusel acid (Hazelwood et al., 2008). During glucose fermentation by *S. cerevisiae* under winemaking conditions, higher alcohols are the major products of this pathway, and limited formation of fusel acids is observed (Bloem et al., 2016; Carrau et al., 2008). However, the nature of the nitrogen source modulates the balance between oxidation and reduction of the aldehyde intermediate, and the opposite situation has been reported when methionine, leucine or phenylalanine were provided as sole nitrogen source (Boer et al., 2007; Vuralhan et al., 2003). The change in the acid/higher alcohol balance when nitrogen is provided as an Ehrlich amino acid reflects a redistribution of fluxes around the aldehyde node when this molecule is massively over-produced within the cells. This may be explained by a larger increase in the efficiency of aldehyde dehydrogenase, which is involved in acid production, compared with alcohol dehydrogenase activity under these specific conditions. The metabolic pathway we demonstrated must be reframed in the broader context of the intracellular redox balance. Favouring the production of the acid at the expense of the production of higher alcohol results increases the need for oxidized co-factors NAD(P), which in turn impact all metabolic pathways.

Interestingly, the formation of volatile compounds derived from  $\alpha$ -ketobutyrate (KIB), which is the  $\alpha$ -keto acid corresponding to threonine (propanol, propanoic acid, propyl acetate and ethyl propionate), followed a specific pattern in response to the nature of the nitrogen source (Figure 4). In the presence of threonine, valine, leucine and isoleucine, the production yields of all these volatile derivatives were moderately increased by 124 %, 106 %, 42 % and 20 % compared with the total production of these molecules in ammonium medium, respectively. In the case of threonine, this increase appears to be a direct outcome of the need to remove the surplus of KIB generated by the catabolism of this nitrogen source. Conversely, in the case of the other branched amino acids, the increased formation of volatile compounds from KIB is an indirect consequence of the higher activity of enzymes of the Ehrlich pathway under these conditions. The decarboxylases and oxidoreductases (alcohol dehydrogenases and aldehyde dehydrogenases) involved in this metabolic route exhibit low substrate specificity and are involved in the catabolism of both KIB and all branched  $\alpha$ -keto acids (Hazelwood et al., 2008). More surprisingly, we found that the use of glycine and ornithine resulted in a specific increase in the formation of propanol (Figure 4). This higher alcohol is an end product of threonine catabolism, and its formation may be regarded as a way to modulate the instantaneous intracellular pool of threonine. Thus, propanol is synthesized exclusively throughout the nitrogen consumption phase, reflecting the concurrent nitrogen assimilation activity (Clement et al., 2013; Mouret et al., 2014). When ornithine and glycine, which poorly support fermentation by *S. cerevisiae*, are used as sole nitrogen sources, nitrogen is consumed over a longer period (Gobert et al., 2017; Kemsawasd et al., 2015, Su et al. 2020), which may explain the higher production of propanol under these conditions.

The synthesis of acetate esters increased with the same proportions as the formation of higher alcohols, with a few exceptions (Supplementary data 10). The important total concentration of acetate esters measured when phenylalanine, tyrosine and, to a lesser extent, tryptophan were used as nitrogen sources is overwhelmingly due to a larger production of phenylethyl acetate, which increased by factors of 71, 7 and 2, respectively. This observation can likely be explained by an increase in the activity of alcohol acetyl transferase, which is specific to the acetylation of all aromatic higher alcohols in the presence of a large concentration of an aromatic amino acid (Lilly et al., 2000; Verstrepen et al., 2003).

Finally, the impact of the nature of the nitrogen source on the production of MCFA and ethyl esters by *S. cerevisiae* was limited in comparison with the formation of compounds from the other families (Figure 5, Supplementary data 3). The most important changes were observed for the production of decanoic acid, between 0.5 and 25.5  $\mu\text{mol/mol}$  of consumed sugar, and for the synthesis of its ethyl derivative, the production yield of which varied between 0.4 and 11.7  $\mu\text{mol/mol}$  of consumed sugar. More broadly, we found that the formation of total MCFA was increased by a factor greater than 1.6 only in the presence of glutamate, glutamine, glycine, phenylalanine, methionine and tyrosine. Moreover, the formation of the ethyl esters changed in the same direction as that of linear fatty acids (Figure 27). In yeast, acetyl-CoA is the precursor for the synthesis of short and MCFAs catalysed by the NADPH-dependent fatty acid synthase complex (Tehlivets et al., 2007; Toke and Martin, 1996). We hypothesize that the variations in the formation of MCFAs and their ethyl ester derivatives observed with some amino acids as the sole nitrogen source are due to an intracellular NADP/NADPH imbalance resulting from their catabolism. Actually, providing methionine as the nitrogen source may limit its *de novo* NADPH-consuming biosynthesis (Cherest et al., 1969), which increased NADPH availability, facilitating the formation of fatty acids.

#### 4.4. Specificities in aroma compound formation by *T. delbrueckii* Biodiva™ and *M. pulcherrima* Flavia® strains in connection with the nature of nitrogen source

To gain a better understanding of the aroma metabolism of *M. pulcherrima* and *T. delbrueckii*, which have not been studied to the same extent as *S. cerevisiae*, we first reviewed the main differences in the formation of the volatile compounds categorized according to their chemical family through a box-plot comparison (Figure 6). Overall, compared with *S. cerevisiae*, the *T. delbrueckii* strain produced similar amounts of fusel alcohols and acids but lower quantities of MCFAs, MCFA ethyl ester derivatives and acetate esters. Moreover, this strain showed the highest capacity to synthesize branched ethyl esters. Regarding *M. pulcherrima*, this strain produced more higher alcohols and acetate esters but showed a lower ability to produce the other classes of volatile molecules, in particular fatty acids and their ester derivatives. A low ability to produce fatty acids has been previously reported for other strains of the species *M. pulcherrima* and *T. delbrueckii* (Belda et al., 2015; Comitini et al., 2011; González-Royo et al., 2015).

Then, the specificities of the two non-*Saccharomyces* strains in terms of the formation of volatile compounds in relation to the nature of the nitrogen source were further investigated. The first point to note was their acetate ester production profiles. In the presence of their amino acid precursors, the productions of phenylethyl acetate, isobutyl acetate, isoamyl acetate and propyl acetate by *M. pulcherrima* was increased by factors of 2 to 4 compared to those measured during fermentation using ammonium (Figure 7). These variations were similar to those observed with *S. cerevisiae*, apart from phenylethyl acetate, which was increased 80-fold. The production of acetate esters by *T. delbrueckii* followed a different pattern: while the limited formation of branched acetate esters remained unchanged when branched amino acids were provided as the nitrogen source, the production yield of the aromatic acetate ester phenylethyl acetate was 40-times higher when phenylalanine was used as the sole nitrogen source instead of ammonium (Supplementary data 5).

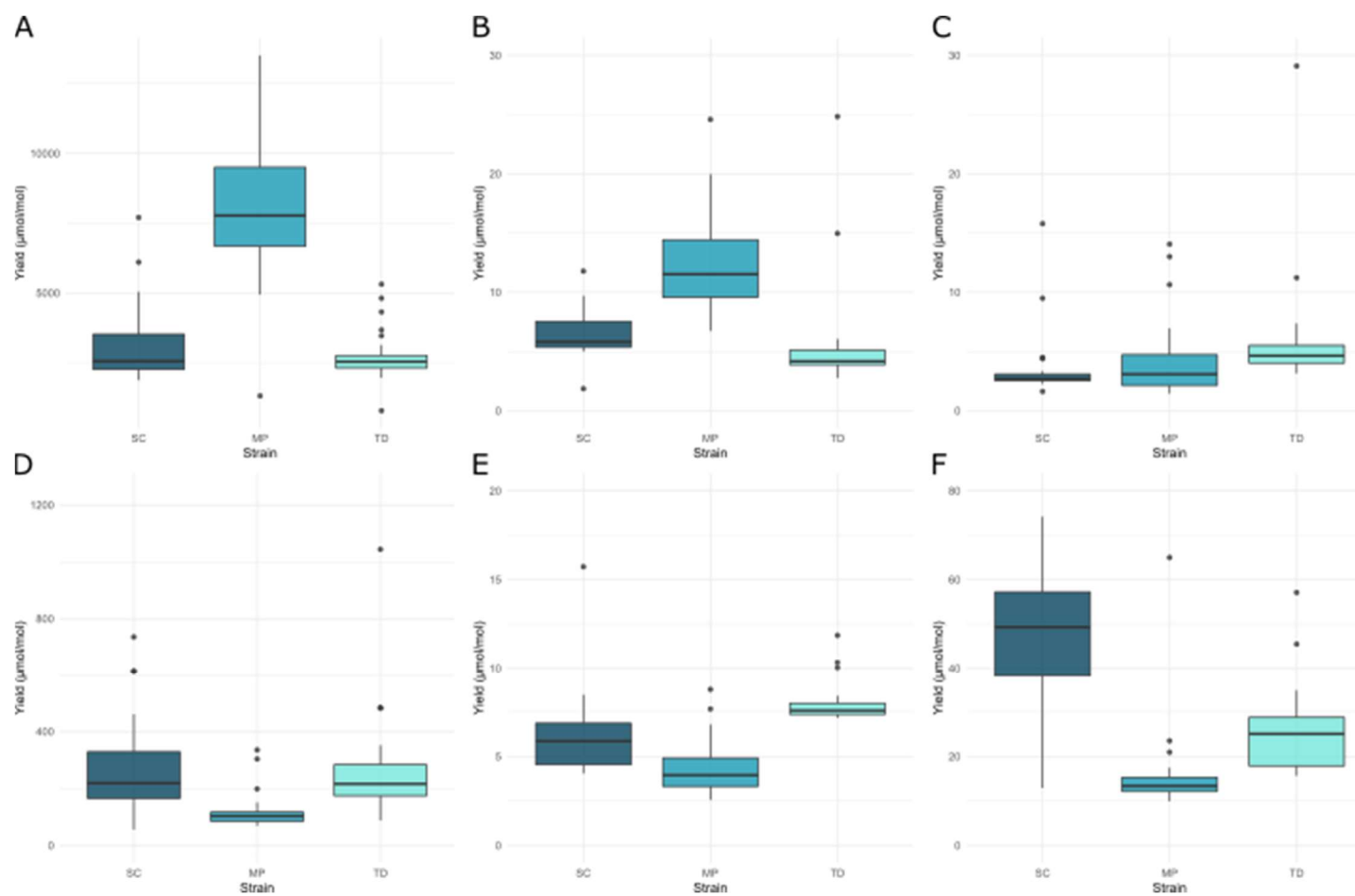


Figure 6: Box plots representing the production yield of aroma compounds depending on their chemical class for the three strains. A: Higher alcohols; B: acetate esters; C: ethyl esters from the Ehrlich pathway; D: BCFA, E: ethyl esters of fatty acids; F: fatty acids. SC: *S. cerevisiae* Lalvin EC1118®; MP: *M. pulcherrima* Flavia®; TD: *T. delbrueckii* Biodiva™.

In *S. cerevisiae*, the alcohol acetyl transferases Atf1p and Atf2p have been reported to catalyse the conversion of a wide range of higher alcohols in acetate esters, with a major contribution by Atf1p (Fujii et al., 1994; Lilly et al., 2000). Furthermore, a recent polygenic analysis of *S. cerevisiae* revealed that the fatty acid synthetase encoded by the gene *FAS2* and the Tor1p regulatory factor are involved in the formation of phenylethyl acetate but not in the synthesis of branched acetate esters (Trindade de Carvalho et al., 2017). Our results suggest that the genes and alleles that mediate the formation of acetate esters from higher alcohols differ between the strains. *M. pulcherrima* likely possesses efficient alleles coding for a broad range of acetate ester-producing enzymes, unlike *T. delbrueckii*, which, in contrast, displays substantial alcohol acetyl transferase activity with phenylethanol. Consistent with this, performing a local alignment search (BLAST) of the genes identified in *S. cerevisiae* as taking part in acetate ester formation in the genome of *T. delbrueckii* revealed the presence of genes with more than 89 % homology to the sequences of *S. cerevisiae* *TOR1* and *FAS2*, while no genes similar to *ATF1* or *ATF2* were identified (data not shown).

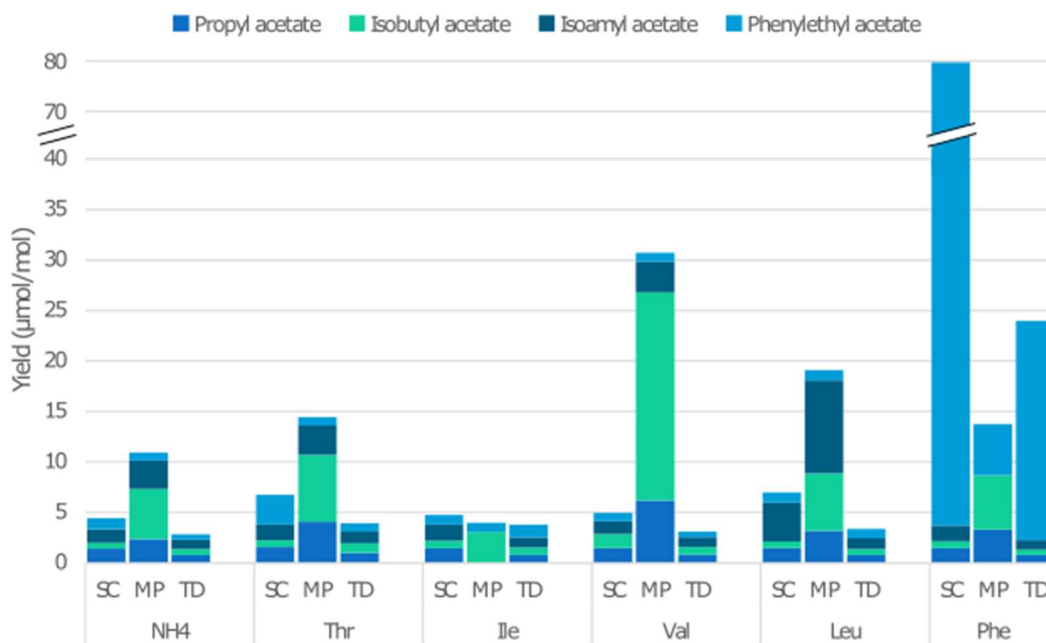


Figure 7: Production yield of acetate esters on media containing either ammonium, threonine, isoleucine, valine, leucine or phenylalanine by *S. cerevisiae* Lalvin EC1118® (SC); *M. pulcherrima* Flavia® (MP) and *T. delbrueckii* Biodiva™ (TD).

The two non-*Saccharomyces* species exhibited substantial differences in their ability to produce branched volatile compounds related to valine and leucine. Regarding branched higher alcohols, the production of isobutanol by *M. pulcherrima* was considerably higher

compared with that of *T. delbrueckii*, regardless of the nature of the nitrogen source (Figure 8), confirming previous data obtained during fermentations using a complex nitrogen source (Prior et al., 2019). In contrast, the formations of isoamyl alcohol by the two strains were comparable. These observations indicate limited conversion of  $\alpha$ -keto-isovalerate (KIV), the isobutanol precursor, into  $\alpha$ -keto-isocaproate (KIC), the starting point in isoamyl alcohol synthesis, in *M. pulcherrima*. This may be explained by the low efficiency of the enzymes involved in the KIV-KIC pathway in this species due to genetic variations in their coding sequence that modulate their kinetic parameters and/or to changes in the intracellular availability of their substrates. It has been reported that in *S. cerevisiae*, the activity of the isopropyl malate synthase that catalyses the condensation of KIV with acetyl-CoA (Roeder and Kohlhaw, 1980) is affected by the acetyl-CoA concentration within the cells (Bloem et al., 2016). Differences between *M. pulcherrima* and the two other strains in the formation of MCFAs, which also requires acetyl-CoA as a two-carbon donor in a cyclic condensation process, are in agreement with a reduced intracellular pool of this precursor in this species.

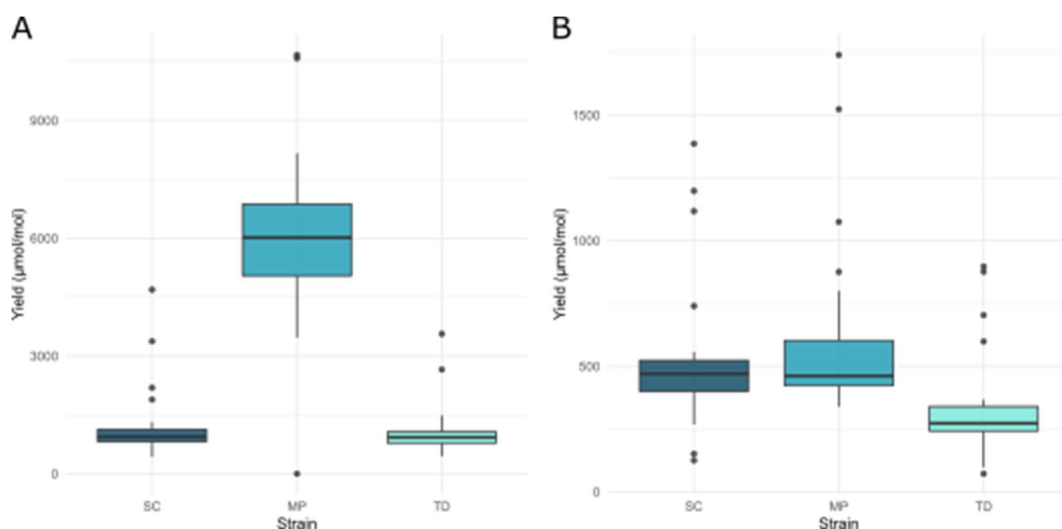


Figure 8: Box plots representing the production yield of isobutyl alcohol (A) and isoamyl alcohol (B) on all tested media. SC: *S. cerevisiae* Lalvin EC1118®; MP: *M. pulcherrima* Flavia®; TD: *T. delbrueckii* Biodiva™.

Finally, the responses in terms of production of volatile compounds to the nature of the nitrogen source by *M. pulcherrima* and *T. delbrueckii* strains were similar to those of *S. cerevisiae*. The main differences were in the absence of impact of glycine on the production of branched volatile compounds, especially aroma compounds produced from threonine and valine (Figure 2). This observation suggests that the alternative pathway for glycine



assimilation reported in *S. cerevisiae* (Villas-Bôas et al., 2005) that is likely responsible for the increased formation of branched aromas when nitrogen was provided as glycine instead of ammonium, was not operative in the two non-*Saccharomyces* strains. The second exception was specific to the *T. delbrueckii* strain, and it showed a higher production of branched volatile compounds when serine was used as the nitrogen source in comparison with ammonium as the nitrogen source. The formation of aroma compounds derived from KIV was increased by a factor up to 3.9 in the case of isobutanol, whereas the production of aroma compounds from KIC was increased by a factor of up to 2.8 (for isovaleric acid). In yeast, serine catabolism consists of a combined deamination and dehydration step, resulting in the formation of pyruvate, which is the starting point for the synthesis of branched  $\alpha$ -keto-acids. Using a BLAST analysis, 70 % identity was found between the *S. cerevisiae* and *T. delbrueckii* sequences of the *CHA1* gene, responsible for this one-step degradation of serine, which may explain the more efficient degradation of serine by *T. delbrueckii* and, consequently, the higher production of compounds from the isoamyl alcohol and isobutanol pathways.

## 5. Conclusion

This research, demonstrating the capacity of *S. cerevisiae* Lalvin EC1118®, *T. delbrueckii* Biodiva™ and *M. pulcherrima* Flavia® strains to produce the full range of fermentative aroma compounds regardless of the nature of the nitrogen source, highlights the major role of central carbon metabolism in the synthesis of volatile compounds. Nonetheless, differences between strains were emphasized, in their response to the nature of the nitrogen source in terms of the amount of consumed nitrogen and the production of volatile molecules. These variations have been understood in the context of the metabolic features of the three strains as well as of the specificities in their genetic background. The molecular basis underlying these characteristics needs to be further explored. Overall, our findings provide new insights into the metabolic pathways involved in volatile compound synthesis and their regulation by nitrogen sources in these species. This knowledge will provide tips and guidelines to facilitate the management of nitrogen additions for yeast nutrition during sequential fermentation as well as for improved control of the aromatic profile of wines.

## 6. Acknowledgements

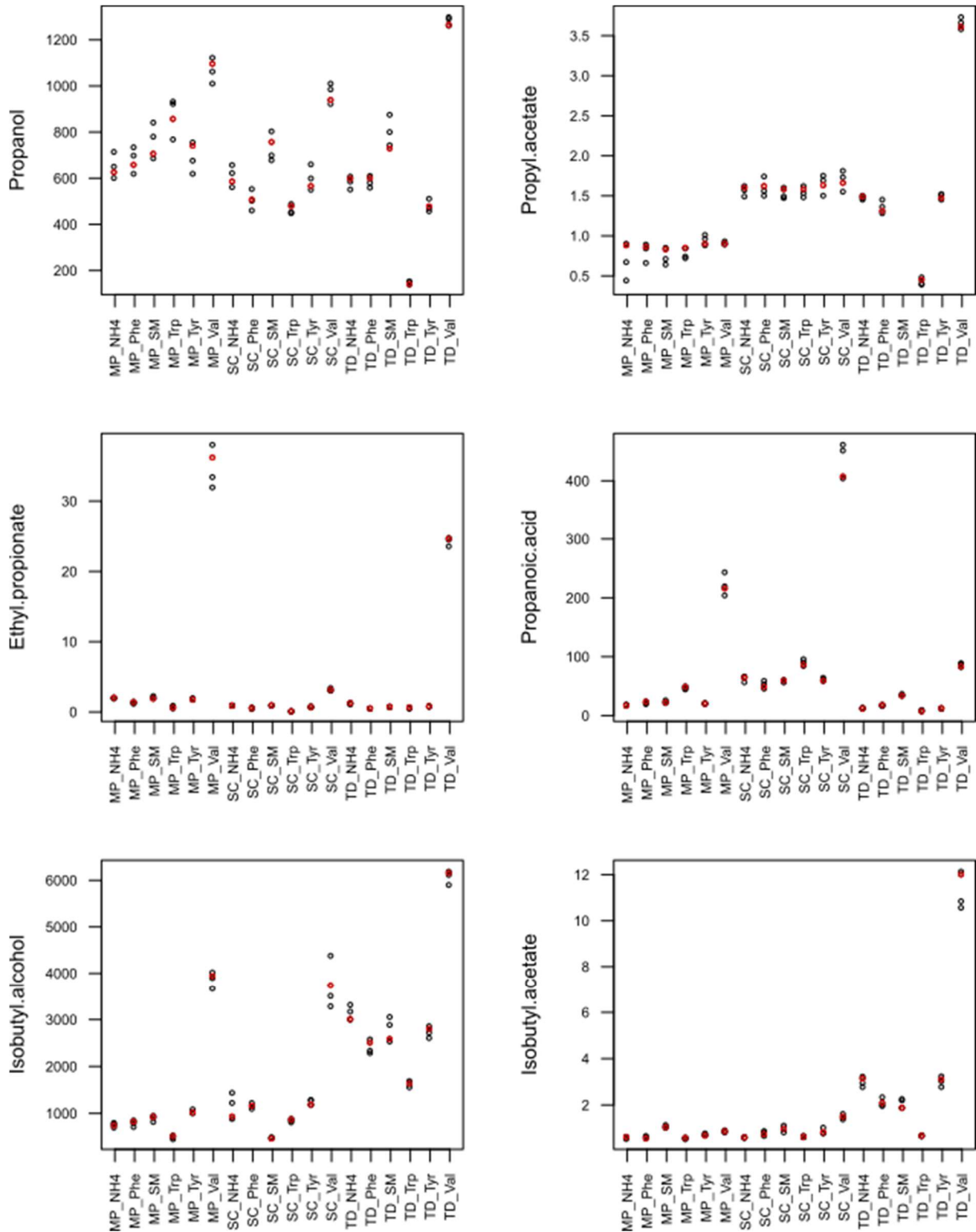
The authors would like to thank Christian Picou, Marc Pérez and Jeremy Balard for technical assistance, and Springer Nature for reviewing the English language quality of this article.

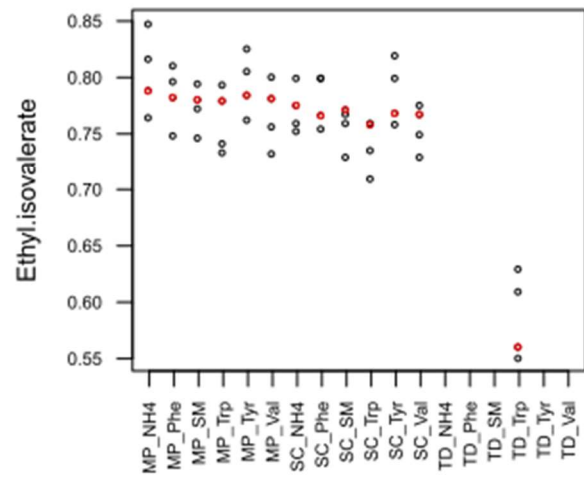
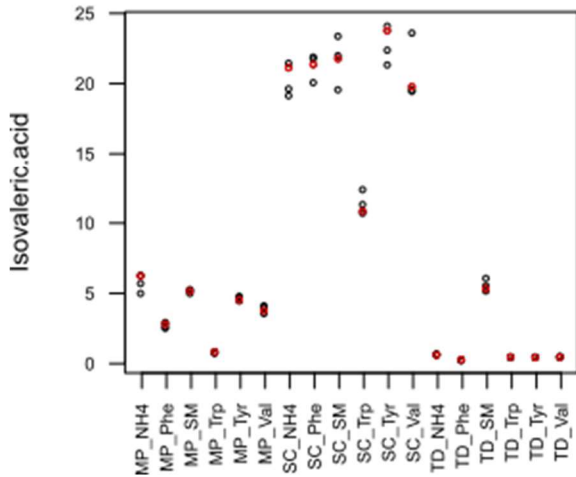
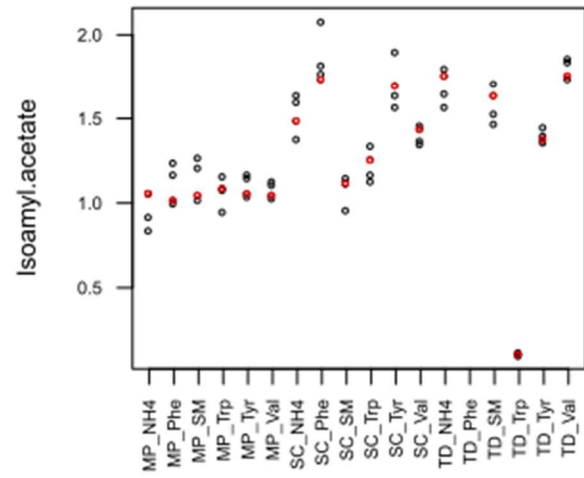
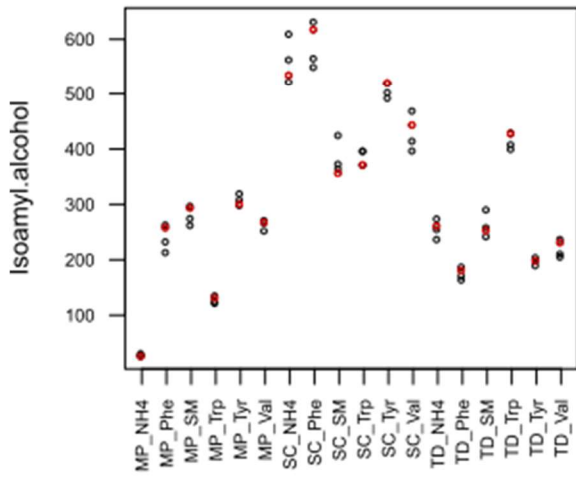
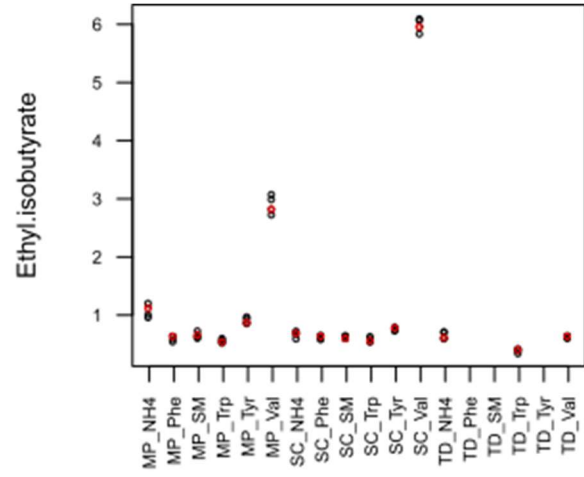
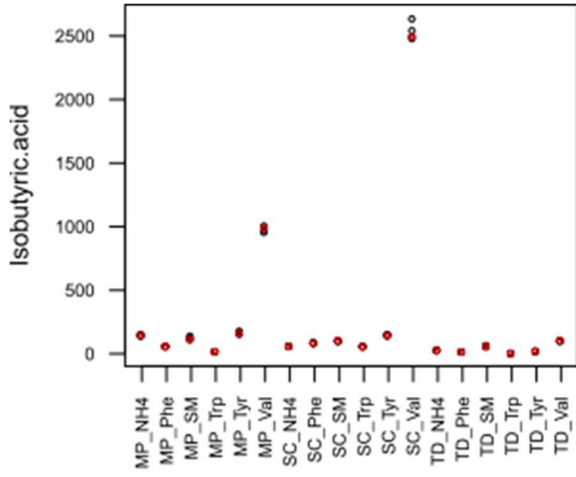
## 7. Fundings

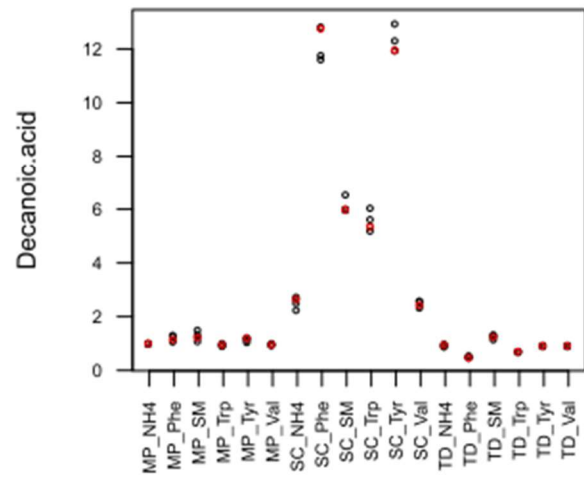
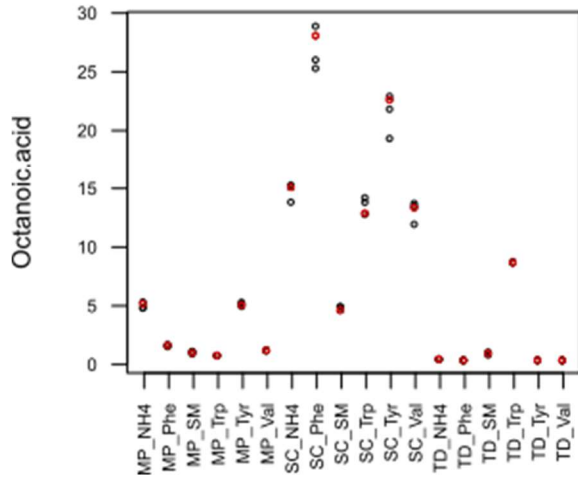
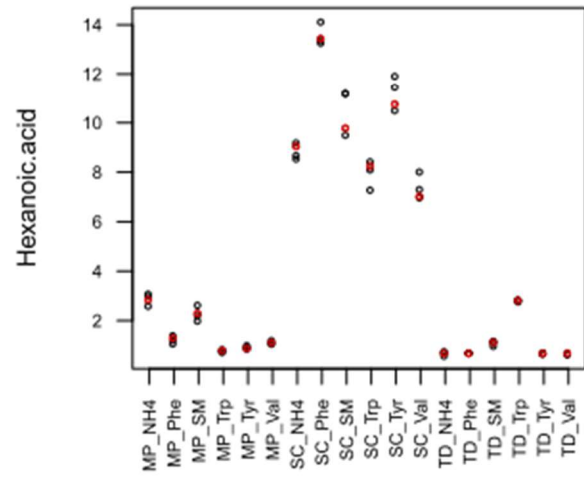
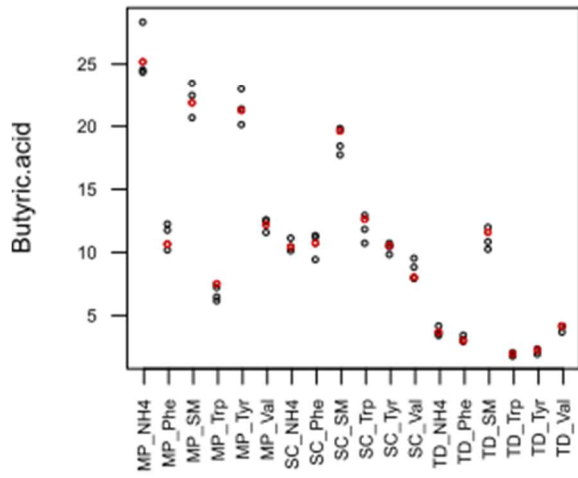
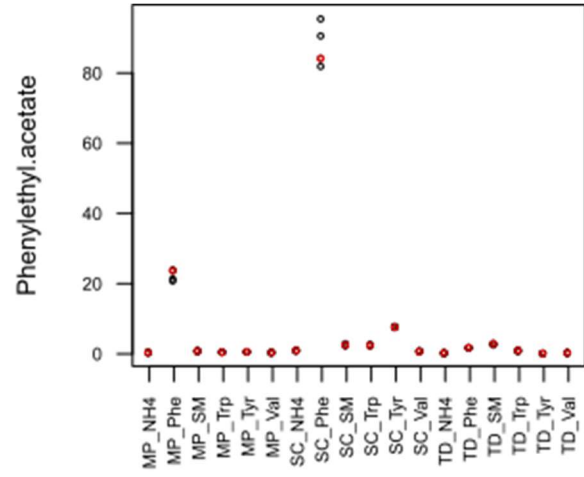
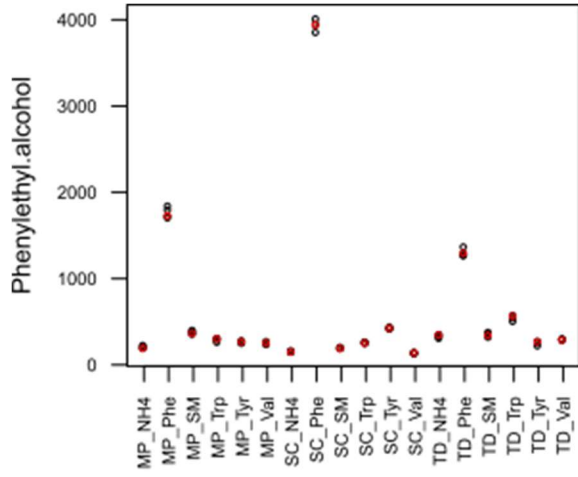
This work was supported by the French Ministry of Higher Education and Research (grant CIFRE n° 2016/0326).

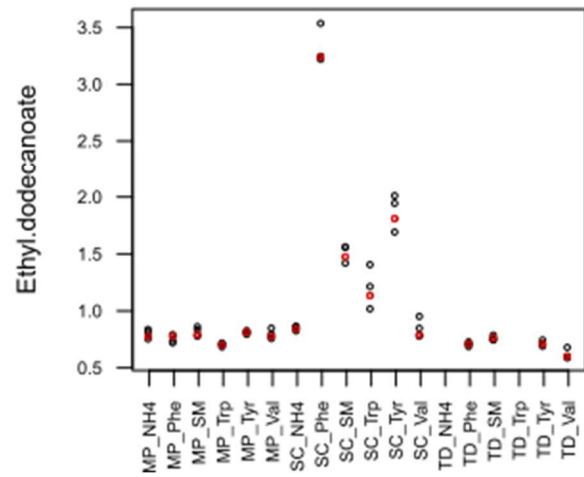
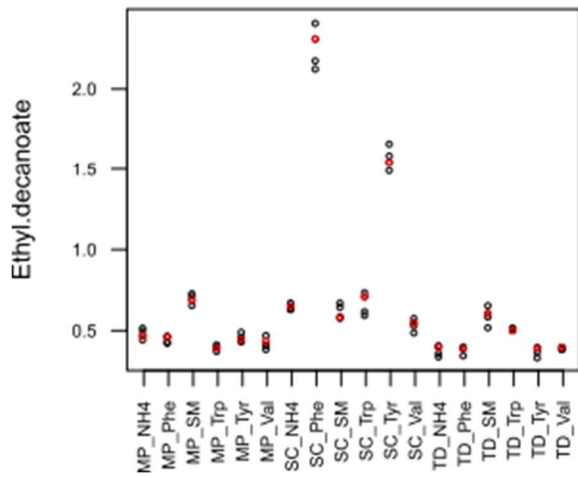
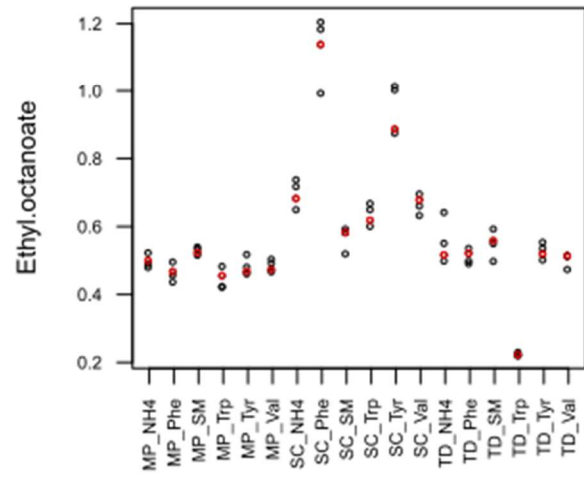
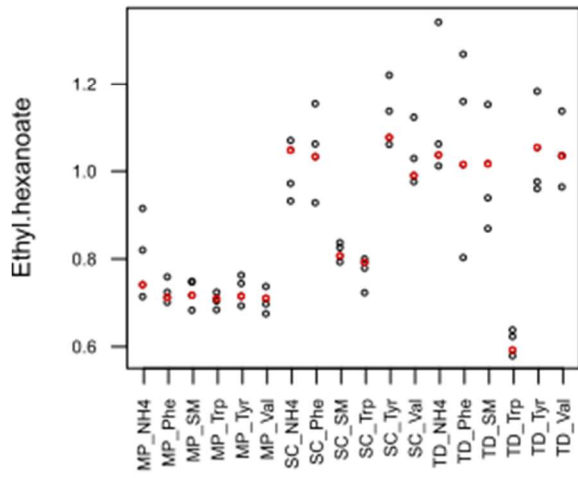
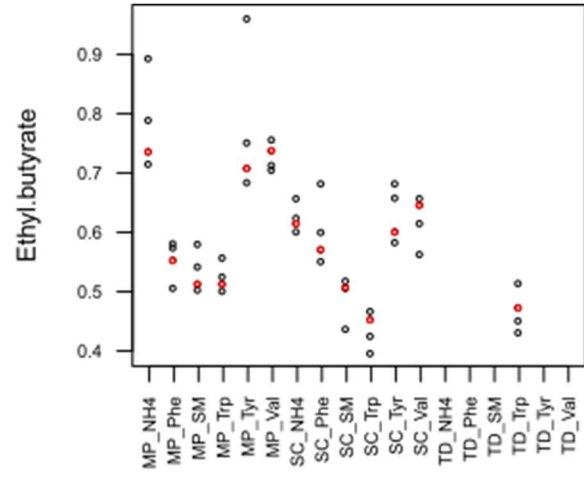
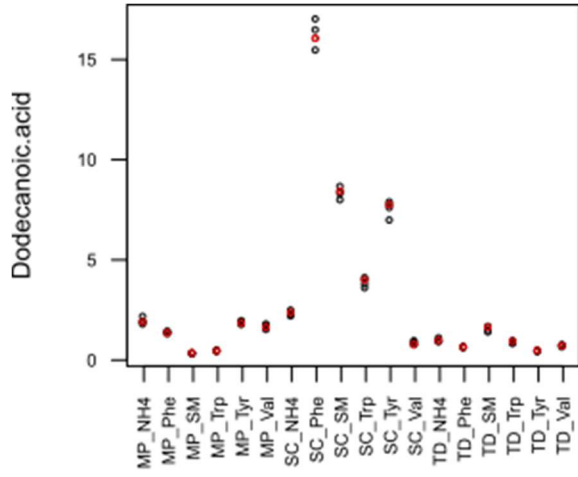
## 8. Supplementary data

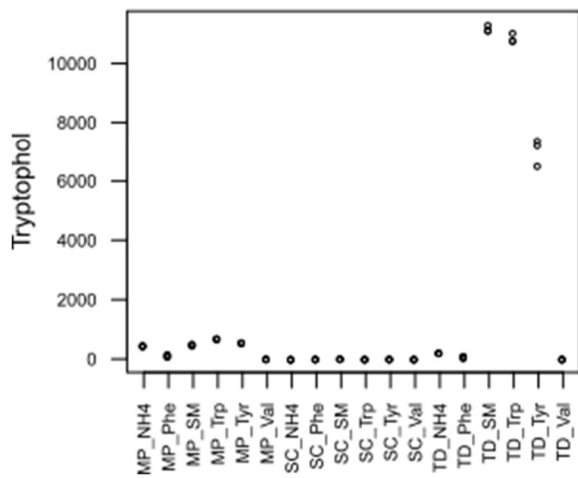
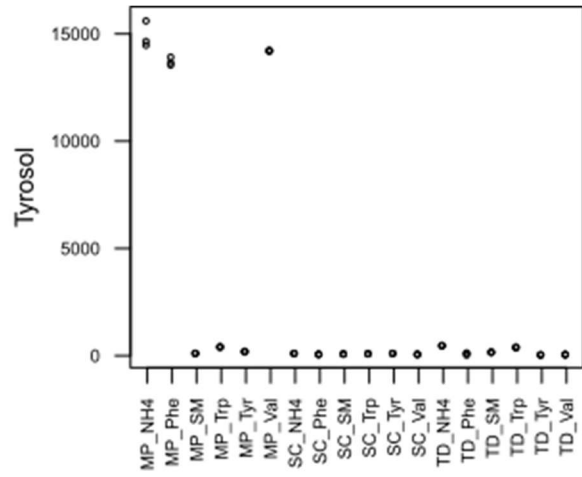
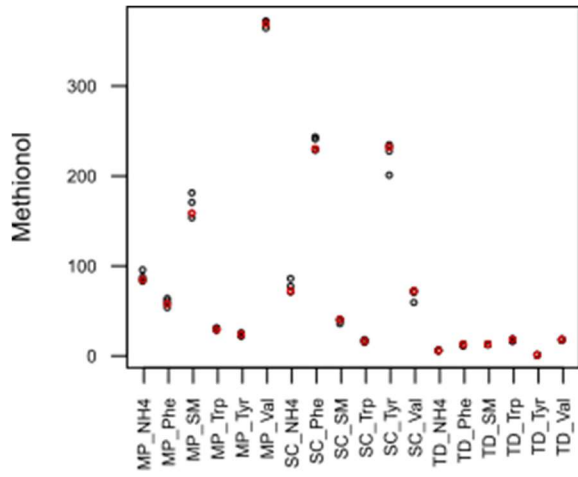
Supplementary data 1 : Production (in  $\mu\text{M}$ ) of aromas depending on fermentation conditions, for the subset done in triplicate (black dots) and the complete data set with one replicate (red dots). Conditions are labelled as strain-medium. MP: *M. pulcherrima* Flavia®; TD: *T. delbrueckii* Biodiva™; SC: *S. cerevisiae* Lalvin EC1118®.











Supplementary data 2: Intra-class correlation coefficient (ICC) of the conditions done at least in triplicate.

Parameters	Between-conditions variance	Within-conditions variance	ICC (%)
Propanol	62960	2173	96.7
Propyl acetate	1	0	98.5
Ethyl propionate	89	0	99.5
Propanoic acid	10505	69	99.3
Isobutyl alcohol	2293267	26024	98.9
Isobutyl acetate	6	0	99.3
Isobutyric acid	370488	321	99.9
Ethyl isobutyrate	2	0	99.8
Isoamyl alcohol	22234	429	98.1
Isoamyl acetate	0	0	94.9
Isovaleric acid	77	1	99.2
Ethyl isovalerate	0	0	79.3
Phenylethyl alcohol	858155	803	99.9
Phenylethyl acetate	432	2	99.5
Butyric acid	50	1	98.7
Hexanoic acid	19	0	99.4
Octanoic acid	66	0	99.4
Decanoic acid	14	0	99.6
Dodecanoic acid	16	0	99.7
Ethyl butyrate	0	0	80.7
Ethyl hexanoate	0	0	79.3
Ethyl octanoate	0	0	96.0
Ethyl decanoate	0	0	99.0
Ethyl dodecanoate	1	0	98.8
Methionol	10373	34	99.7
Tyrosol	29354585	22904	99.9
Tryptophol	14000411	13909	99.9



Supplementary data 3: Production yield (in  $\mu\text{mol/mol}$ ) of the aroma compounds depending on the media for fermentation by *S. cerevisiae* Lalvin EC1118®. FA: fatty acids; EE: ethyl esters. Yields are calculated by dividing the concentration measured by GC-MS (in  $\mu\text{M}$ ) by the amount of sugar consumed during the fermentation (in M). Fermentation data for these conditions are described by Su et al. (2020).

		Arg	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Ser	Thr	Trp	Tyr	NH4	Val	GABA
<b>Grp Thr</b>	Propanol	367.51	639.69	766.51	307.63	435.30	458.88	491.24	902.15	608.15	512.49	530.12	848.05	391.05
	Propyl acetate	0.43	1.48	1.49	3.06	1.44	1.46	1.46	1.61	2.01	1.48	1.45	1.50	1.44
	Propionic acid	19.15	61.99	71.40	60.05	54.61	44.92	55.74	417.10	110.39	54.57	58.79	367.59	50.56
	Ethyl propionate	1.24	0.46	0.58	0.66	0.57	0.57	0.62	2.68	0.23	0.71	0.89	2.94	0.43
<b>Grp Val</b>	Isobutyl alcohol	485.47	1131.70	911.78	4689.91	742.63	1057.42	1317.90	545.31	1112.21	1084.70	853.54	3375.49	1007.92
	Isobutyl acetate	0.24	0.72	0.63	1.45	0.56	0.69	0.76	0.66	0.83	0.77	0.57	1.37	0.59
	Isobutyric acid	21.15	131.72	112.60	92.59	69.90	81.34	257.22	55.04	77.95	134.50	57.64	2250.93	85.02
	Ethyl isobutyrate	0.39	0.72	0.65	1.20	0.58	0.58	0.99	0.55	0.72	0.71	0.63	5.38	0.61
<b>Grp Leu</b>	Isoamyl alcohol	1386.37	151.53	1117.54	1198.30	380.66	556.98	555.96	125.34	470.62	470.03	483.02	400.29	503.51
	Isoamyl acetate	0.10	1.61	3.87	2.31	1.31	1.56	1.83	1.54	1.59	1.53	1.34	1.29	1.33
	Isovaleric acid	15.18	16.88	260.53	8.83	21.40	19.28	33.72	17.89	13.77	21.45	19.08	17.85	27.04
	Ethyl isovalerate	0.00	0.70	0.93	1.48	0.69	0.69	0.70	0.70	0.96	0.69	0.70	0.69	0.71
<b>Grp Phe</b>	Phenylethyl alcohol	374.93	126.46	116.02	497.97	98.74	3555.94	148.34	224.68	331.19	390.53	144.49	132.79	203.08
	Phenylethyl acetate	0.93	0.96	1.02	0.64	0.82	75.97	1.48	2.93	3.38	7.05	1.07	0.81	1.51
<b>Grp Fatty Acids</b>	Butyric acid	10.63	9.12	7.98	4.67	13.34	9.69	9.59	15.62	16.04	9.50	9.49	7.27	9.12
	Hexanoic acid	9.93	6.44	6.69	2.66	10.85	12.12	9.38	5.82	10.45	9.71	8.17	6.35	7.71
	Octanoic acid	15.33	14.15	13.39	1.87	13.74	25.33	18.38	7.94	16.36	20.42	13.64	12.08	14.63
	Decanoic acid	9.45	4.80	5.65	0.45	23.51	11.51	6.32	1.56	6.79	10.78	2.41	2.21	5.90
	Dodecanoic acid	3.95	2.96	3.23	1.36	5.63	14.49	5.03	2.02	5.11	7.02	2.17	0.75	3.18
	Valeric acid	0.00	0.96	0.99	1.90	1.13	1.04	1.14	1.42	1.31	0.97	1.14	1.27	1.18
<b>Grp Ethyl esters</b>	Ethyl butyrate	0.63	0.63	0.55	0.83	0.55	0.51	0.56	0.60	0.57	0.54	0.55	0.58	0.48
	Ethyl hexanoate	0.76	0.92	0.84	1.34	0.98	0.93	1.03	0.78	1.00	0.97	0.95	0.89	0.84
	Ethyl octanoate	1.24	0.61	0.58	0.89	0.68	1.03	0.80	0.53	0.78	0.80	0.62	0.61	0.70
	Ethyl decanoate	3.15	0.77	0.74	0.94	11.23	2.08	1.36	0.44	0.90	1.39	0.59	0.50	0.88
	Ethyl dodecanoate	2.36	0.84	0.95	1.50	1.37	2.92	1.19	0.78	1.44	1.64	0.76	0.72	0.91
<b>Others</b>	Ethyl valerate	0.33	0.91	0.91	1.97	0.91	0.91	0.91	0.91	1.28	0.91	0.91	0.92	0.91
	Methionol	32.42	70.14	93.30	7.26	8260.23	208.17	77.55	27.75	22.13	209.59	65.90	65.82	52.23
	Diethyl succinate	0.27	0.31	0.30	0.41	0.28	0.28	0.37	0.26	0.31	0.30	0.42	0.31	0.60
	Ethyl lactate	7.12	18.23	18.09	12.92	30.56	20.92	13.08	9.07	12.98	23.24	20.63	19.08	23.20
	Hexyl acetate	0.44	0.85	0.84	1.82	0.85	0.85	0.85	0.85	1.17	0.87	0.88	0.84	0.85

	Orn	Asn	Cit	Urea	Ala	Asp	Cys	Glu	Gln	Gly	His	MS200	
<b>Grp Thr</b>	Propanol	1033.45	478.00	788.06	490.11	705.31	541.18	122.16	479.69	426.83	990.78	701.56	683.66
	Propyl acetate	1.60	1.45	1.53	1.45	1.49	1.45	13.72	1.44	1.44	1.62	31.87	1.43
	Propionic acid	73.02	55.50	52.81	55.16	64.13	66.54	92.07	57.35	48.25	59.18	425.88	54.66
	Ethyl propionate	1.13	0.72	0.90	0.73	0.79	1.18	0.00	0.89	0.59	1.31	0.00	0.93
<b>Grp Val</b>	Isobutyl alcohol	862.94	861.16	940.41	798.89	1890.93	947.89	1210.29	823.43	798.41	2191.07	815.13	429.98
	Isobutyl acetate	0.74	0.58	0.69	0.57	0.95	0.59	4.82	0.55	0.55	1.63	11.10	0.90
	Isobutyric acid	113.70	99.63	199.94	74.13	304.27	107.11	106.29	91.78	81.67	153.99	159.16	98.84
	Ethyl isobutyrate	0.75	0.66	0.90	0.59	1.11	0.69	4.33	0.66	0.62	0.82	10.06	0.55
<b>Grp Leu</b>	Isoamyl alcohol	484.06	448.82	437.92	407.09	520.05	451.53	268.55	443.29	396.04	739.78	523.69	321.92
	Isoamyl acetate	1.85	1.34	1.78	1.29	1.74	1.27	8.98	1.17	1.17	3.24	20.83	1.01
	Isovaleric acid	29.08	21.63	31.23	18.03	26.83	22.93	10.13	24.82	18.36	38.43	14.50	19.65
	Ethyl isovalerate	0.71	0.69	0.71	0.69	0.70	0.70	6.73	0.70	0.69	0.72	15.46	0.70
<b>Grp Phe</b>	Phenylethyl alcohol	103.88	130.75	95.01	128.66	131.67	132.92	77.66	137.47	138.57	222.03	98.17	180.30
	Phenylethyl acetate	1.03	1.19	0.60	1.01	1.34	1.53	2.85	1.32	1.18	2.38	6.24	2.48
<b>Grp Fatty Acids</b>	Butyric acid	9.77	10.06	8.02	11.07	10.17	13.81	14.63	15.81	10.81	13.34	43.87	17.76
	Hexanoic acid	6.75	10.55	5.58	11.78	9.90	12.18	16.94	16.21	11.55	11.71	33.18	8.83
	Octanoic acid	15.45	18.93	15.65	17.68	17.93	16.53	75.84	18.56	19.86	26.12	30.17	4.24
	Decanoic acid	4.91	7.76	4.86	4.33	4.16	4.59	24.52	6.99	10.23	6.79	9.68	5.41
	Dodecanoic acid	2.44	5.78	1.83	5.77	3.75	7.34	27.76	12.32	9.99	7.47	56.46	7.62
	Valeric acid	1.18	1.23	1.25	1.22	1.52	1.20	12.08	1.21	1.13	1.25	23.54	1.43
<b>Grp Ethyl esters</b>	Ethyl butyrate	0.62	0.52	0.57	0.53	0.59	0.54	3.57	0.54	0.50	0.85	8.19	0.46
	Ethyl hexanoate	0.93	0.97	0.88	1.08	1.08	1.07	6.17	1.13	0.94	1.48	14.35	0.73
	Ethyl octanoate	0.66	0.86	0.68	0.87	0.79	0.78	4.51	0.76	0.85	0.71	9.51	0.53
	Ethyl decanoate	0.61	1.45	0.71	1.16	1.07	1.34	3.91	1.41	1.88	0.88	11.66	0.53
	Ethyl dodecanoate	0.77	1.58	0.77	1.26	1.11	2.04	6.94	2.30	2.15	1.17	15.80	1.33
	Ethyl valerate	0.91	0.91	0.91	0.91	0.91	0.91	8.93	0.91	0.91	0.91	20.76	0.92
<b>Others</b>	Methionol	28.77	37.40	14.90	55.82	64.43	41.86	0.00	61.10	51.12	16.90	0.00	37.09
	Diethyl succinate	0.44	0.32	0.36	0.33	0.39	0.39	1.83	0.46	0.41	0.27	4.24	0.64
	Ethyl lactate	17.35	18.05	19.33	15.88	15.00	12.80	28.73	12.14	11.91	19.32	64.06	19.65
	Hexyl acetate	0.84	0.84	0.84	0.84	0.85	0.84	8.20	0.84	0.84	0.84	19.03	0.86

Supplementary data 4: Production yield (in  $\mu\text{mol/mol}$ ) of the aroma compounds depending on the media for fermentation by *M. pulcherrima* Flavia®. FA: fatty acids; EE: ethyl esters. Yields are calculated by dividing the concentration measured by GC-MS (in  $\mu\text{M}$ ) by the amount of sugar consumed during the fermentation (in M). Fermentation data for these conditions are described by Su et al. (2020).

	Arg	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Ser	Thr	Trp	Tyr	NH4	Val	GABA	
<b>Grp Thr</b>	Propanol	782.09	699.26	1223.27	1300.94	1682.80	1527.61	995.00	2266.52	583.91	1027.05	947.55	2175.20	747.74
	Propyl acetate	1.75	0.00	3.18	6.53	3.97	3.34	2.00	4.10	1.87	3.17	2.37	6.20	2.60
	Propionic acid	16.48	20.71	42.88	102.00	17.41	48.39	27.91	79.80	35.03	28.88	20.38	145.19	37.90
	Ethyl propionate	1.97	1.45	2.97	13.01	3.38	1.52	1.44	4.57	3.00	1.94	2.14	29.71	3.83
<b>Grp Val</b>	Isobutyl alcohol	3649.24	5848.57	5271.79	10671.63	5052.29	6394.38	5447.21	6327.22	6691.68	6016.61	4767.92	10586.60	4547.67
	Isobutyl acetate	2.73	3.07	5.70	18.75	4.70	5.37	4.31	6.62	2.85	6.69	5.00	20.62	6.13
	Isobutyric acid	49.68	54.89	60.49	190.15	53.36	53.48	64.84	67.77	37.69	51.55	54.90	188.50	66.91
	Ethyl isobutyrate	0.00	1.03	1.00	0.00	0.96	0.00	0.00	0.88	1.69	0.00	0.99	1.11	0.87
<b>Grp Leu</b>	Isoamyl alcohol	366.57	423.09	1523.54	1075.15	454.02	461.44	467.55	479.99	1739.60	426.43	413.83	398.77	362.39
	Isoamyl acetate	1.94	0.00	9.21	6.10	0.00	0.00	2.01	2.92	0.46	2.96	2.78	3.02	2.13
	Isovaleric acid	1.39	1.19	10.05	8.04	0.89	0.87	0.98	1.17	2.10	1.04	1.08	0.87	1.96
	Ethyl isovalerate	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.27	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>Grp Phe</b>	Phenylethyl alcohol	580.58	626.59	538.18	1406.52	584.39	3306.05	551.16	711.84	2324.39	591.70	560.88	512.91	407.08
	Phenylethyl acetate	0.70	0.90	1.00	1.64	0.95	5.08	0.65	0.81	4.79	0.75	0.79	0.88	0.68
<b>Grp Fatty Acids</b>	Butyric acid	6.31	9.12	8.48	9.50	6.73	7.76	7.39	4.78	8.17	4.94	6.11	7.25	6.23
	Hexanoic acid	1.07	1.30	1.25	2.43	1.25	1.80	0.95	1.06	11.55	1.50	1.12	1.21	1.08
	Octanoic acid	1.46	0.80	0.78	1.51	0.76	1.10	0.58	0.65	35.53	0.94	0.84	0.75	0.66
	Decanoic acid	1.55	1.72	1.66	3.20	1.62	2.38	1.24	1.41	2.98	2.02	1.55	1.62	1.41
	Dodecanoic acid	2.74	1.32	1.30	1.80	0.92	1.26	0.99	0.94	3.97	1.11	1.62	1.31	1.16
	Valeric acid	1.07	1.28	1.22	2.51	0.00	1.75	0.98	1.10	2.77	1.41	1.15	1.37	1.05
<b>Grp Ethyl esters</b>	Ethyl butyrate	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.92	0.00	0.00	0.00	0.00
	Ethyl hexanoate	1.42	1.78	1.74	3.64	1.75	2.58	1.36	1.56	2.41	2.26	1.64	1.78	1.57
	Ethyl octanoate	0.73	0.95	0.92	1.78	0.90	1.33	0.68	0.78	0.91	1.11	0.82	0.88	0.77
	Ethyl decanoate	0.56	0.73	0.71	1.37	0.69	1.00	0.52	0.60	2.06	0.85	0.64	0.69	0.60
	Ethyl dodecanoate	0.00	1.30	1.26	0.00	1.24	1.81	0.00	1.07	0.00	1.53	0.00	0.00	0.00
	Ethyl valerate	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.47	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>Others</b>	Methionol	4.64	56.20	7.24	93.66	21451.25	35.03	27.09	112.99	93.06	4.16	10.70	32.99	17.42
	Diethyl succinate	0.37	0.52	0.48	0.89	0.45	0.66	0.34	0.39	0.00	0.55	0.42	0.44	0.40
	Ethyl lactate	9.25	14.42	13.35	17.95	14.55	16.79	10.31	11.45	0.00	15.37	12.66	11.29	11.51
	Hexyl acetate	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.84	0.00	0.00	0.00	0.00

	Orn	Asn	Cit	Urea	Ala	Asp	Cys	Glu	Gln	Gly	His	MS200	
<b>Grp Thr</b>	Propanol	832.57	1298.01	710.21	925.02	956.27	1661.37	617.44	715.31	720.84	1169.40	1340.42	995.18
	Propyl acetate	0.00	3.16	2.61	2.54	2.13	3.96	6.31	1.83	2.32	2.80	4.89	0.00
	Propionic acid	23.87	38.68	36.34	28.92	24.46	32.31	29.77	23.93	30.45	42.13	92.47	47.68
	Ethyl propionate	1.23	2.20	2.77	1.75	1.62	3.79	14.06	1.12	1.90	2.02	10.64	1.10
<b>Grp Val</b>	Isobutyl alcohol	6115.06	5101.63	7030.05	4333.89	5042.74	7087.66	0.00	6305.49	6873.15	8163.92	7900.43	3467.66
	Isobutyl acetate	4.40	5.34	9.48	5.26	4.31	8.27	10.27	4.29	7.16	6.74	9.54	2.55
	Isobutyric acid	64.09	64.15	107.72	67.31	59.91	68.53	40.05	59.09	64.90	71.26	98.81	83.53
	Ethyl isobutyrate	0.91	0.91	0.00	0.81	0.95	1.02	0.00	0.98	0.00	1.05	0.00	0.00
<b>Grp Leu</b>	Isoamyl alcohol	466.56	455.56	669.87	370.14	445.43	602.69	455.94	515.83	555.24	800.40	875.98	339.03
	Isoamyl acetate	2.23	2.24	3.25	2.29	2.49	3.55	0.00	2.54	3.69	3.68	4.43	2.19
	Isovaleric acid	1.33	1.47	3.15	1.08	0.97	1.34	0.74	0.93	1.37	2.29	5.12	7.19
	Ethyl isovalerate	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>Grp Phe</b>	Phenylethyl alcohol	631.21	581.02	741.20	452.96	658.49	537.06	1199.98	600.55	685.74	930.15	966.66	470.24
	Phenylethyl acetate	0.70	0.79	0.89	0.75	0.88	0.82	3.67	0.88	0.83	1.19	1.10	4.17
<b>Grp Fatty Acids</b>	Butyric acid	4.74	7.58	5.53	7.73	5.46	7.42	4.39	7.13	7.33	7.60	6.78	15.56
	Hexanoic acid	1.11	1.12	1.37	1.01	1.05	1.19	2.69	1.15	1.22	1.29	1.87	1.54
	Octanoic acid	0.67	0.69	0.82	0.61	0.69	0.78	1.81	0.74	0.76	0.80	1.15	1.36
	Decanoic acid	1.46	1.50	1.80	1.29	1.40	1.60	3.63	1.48	1.60	1.72	2.48	1.69
	Dodecanoic acid	0.96	1.33	1.21	1.10	1.05	1.60	2.32	1.19	1.23	1.36	1.25	2.24
	Valeric acid	1.12	1.14	1.44	1.04	1.03	1.21	2.61	1.14	1.22	1.32	1.80	1.12
<b>Grp Ethyl esters</b>	Ethyl butyrate	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Ethyl hexanoate	1.56	1.56	2.00	1.45	1.05	1.77	4.18	1.56	1.83	1.93	2.78	1.36
	Ethyl octanoate	0.80	0.82	0.98	0.71	0.77	0.87	1.98	0.80	0.89	0.95	1.38	0.75
	Ethyl decanoate	0.63	0.64	0.77	0.55	0.59	0.67	1.50	0.61	0.68	0.73	1.06	0.82
	Ethyl dodecanoate	0.00	0.00	0.00	0.99	1.05	0.00	0.00	1.10	0.00	1.31	0.00	1.03
	Ethyl valerate	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>Others</b>	Methionol	11.08	18.43	80.75	14.64	37.05	24.13	29.46	25.03	24.16	15.90	73.63	18.58
	Diethyl succinate	0.41	0.41	0.50	0.35	0.38	0.44	0.99	0.41	0.44	0.48	0.69	0.52
	Ethyl lactate	11.62	11.61	11.62	9.88	10.15	14.79	16.73	12.99	12.99	12.45	10.54	10.55
	Hexyl acetate	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Supplementary data 5 : Production yield (in  $\mu\text{mol/mol}$ ) of the aroma compounds depending on the media for fermentation by *T. delbrueckii* Biodiva™. FA: fatty acids; EE: ethyl esters. Yields are calculated by dividing the concentration measured by GC-MS (in  $\mu\text{M}$ ) by the amount of sugar consumed during the fermentation (in M). Fermentation data for these conditions are described by Su et al. (2020).

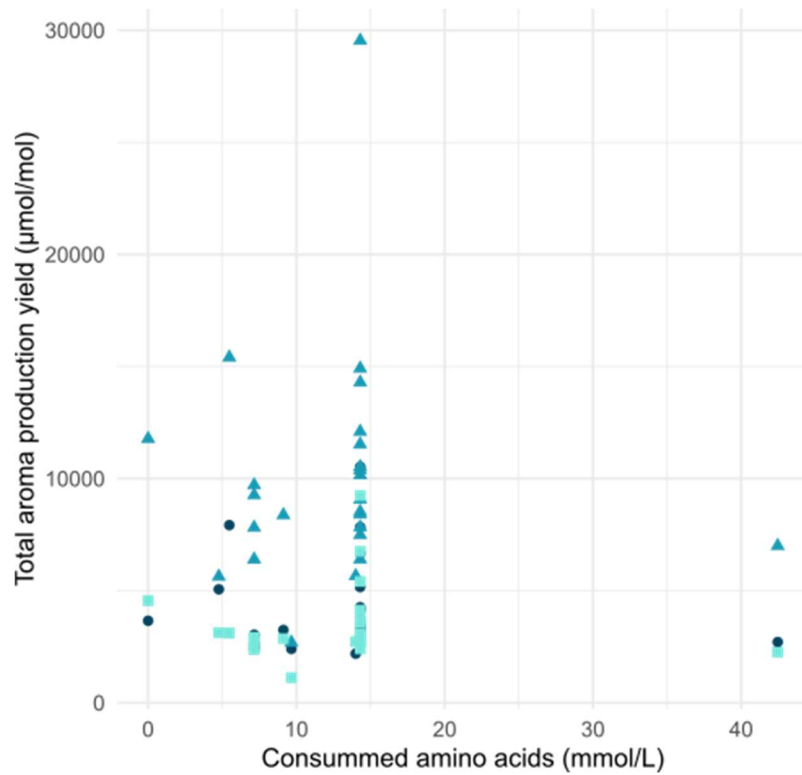
		Arg	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Ser	Thr	Trp	Tyr	NH4	Val	GABA
Grp Thr	Propanol	648.63	422.76	475.02	685.53	482.82	600.09	600.81	1357.61	1175.65	699.77	566.09	988.71	544.19
	Propyl acetate	0.82	0.80	0.81	0.92	0.77	0.79	0.86	1.03	1.18	0.85	0.80	0.82	0.81
	Propionic acid	20.92	14.45	18.42	17.42	314.03	22.39	38.23	139.09	68.17	20.07	16.33	195.13	16.12
	Ethyl propionate	1.79	1.84	2.01	4.08	1.77	1.34	1.57	26.95	0.97	1.76	1.91	32.78	2.35
Grp Val	Isobutyl alcohol	1066.91	1116.34	605.52	1136.66	893.26	760.95	2655.72	790.77	723.81	972.90	683.20	3563.94	781.91
	Isobutyl acetate	0.66	0.75	0.59	0.60	0.53	0.54	0.85	0.94	0.84	0.67	0.58	0.80	0.61
	Isobutyric acid	230.56	163.68	125.73	123.84	155.47	59.41	420.81	56.70	29.95	156.70	136.67	840.04	164.24
	Ethyl isobutyrate	1.04	0.87	0.76	0.92	0.88	0.59	1.66	0.69	0.76	0.84	1.02	2.56	0.94
Grp Leu	Isoamyl alcohol	368.35	72.21	876.78	339.86	319.52	235.47	598.74	97.60	181.06	283.11	246.06	242.25	259.51
	Isoamyl acetate	0.95	1.00	1.06	1.13	0.95	0.93	1.49	1.13	1.49	0.99	0.95	0.94	0.95
	Isovaleric acid	6.41	4.95	167.11	4.17	5.81	2.61	15.64	3.13	1.21	4.32	5.65	3.44	7.01
	Ethyl isovalerate	0.71	0.70	0.84	0.77	0.71	0.71	0.73	0.84	1.07	0.74	0.71	0.70	0.71
Grp Phe	Phenylethyl alcohol	224.05	248.85	265.71	217.32	247.21	1577.29	314.04	255.58	426.59	261.64	182.17	237.11	215.65
	Phenylethyl acetate	0.69	1.26	0.95	0.45	0.56	21.74	1.10	0.83	0.99	0.81	0.54	0.55	0.52
Grp Fatty Acids	Butyric acid	17.52	13.59	18.22	12.77	13.55	9.73	9.99	10.36	10.37	19.96	22.73	11.04	20.18
	Hexanoic acid	3.43	0.67	1.82	0.86	1.89	1.20	1.78	0.82	1.13	0.86	2.59	1.03	3.05
	Octanoic acid	4.94	0.61	2.29	0.76	2.58	1.55	1.58	0.66	1.17	1.23	4.72	1.16	3.96
	Decanoic acid	1.14	0.88	1.10	0.97	0.96	1.07	0.92	1.04	1.34	1.02	1.18	0.88	1.14
	Dodecanoic acid	0.75	1.34	1.20	1.03	1.76	1.27	1.51	2.09	0.68	1.78	1.75	1.51	5.18
	Valeric acid	1.39	0.65	0.71	0.77	0.74	0.82	0.70	0.74	0.96	0.81	1.03	2.27	0.91
Grp Ethyl esters	Ethyl butyrate	0.57	0.56	0.60	0.71	0.55	0.50	0.61	0.64	0.70	0.66	0.66	0.56	0.65
	Ethyl hexanoate	0.68	0.65	0.66	0.71	0.66	0.65	0.68	0.77	0.97	0.67	0.67	0.65	0.68
	Ethyl octanoate	0.47	0.42	0.43	0.46	0.45	0.43	0.43	0.50	0.63	0.44	0.45	0.43	0.48
	Ethyl decanoate	0.42	0.37	0.43	0.41	0.52	0.42	0.38	0.43	0.55	0.42	0.43	0.40	0.54
	Ethyl dodecanoate	0.66	0.69	0.67	0.74	0.69	0.71	0.69	0.81	0.98	0.77	0.68	0.70	0.74
	Ethyl valerate	0.88	0.88	0.88	0.96	0.88	0.89	0.89	1.06	1.34	0.92	0.88	0.88	0.88
Others	Methionol	164.04	213.01	74.80	162.34	6417.19	53.41	73.81	51.32	41.10	23.36	77.14	333.27	58.28
	Diethyl succinate	0.41	0.27	0.35	0.29	0.34	0.35	0.27	0.32	0.37	0.29	0.58	0.29	0.58
	Ethyl lactate	7.21	6.55	5.77	6.69	7.83	8.52	12.74	12.57	17.67	6.77	9.17	6.06	6.84
	Hexyl acetate	0.84	0.81	0.83	0.89	0.83	0.82	0.82	0.98	1.24	0.86	0.83	0.82	0.83

	Orn	Asn	Cit	Urea	Ala	Asp	Cys	Glu	Gln	Gly	His	MS200	
<b>Grp Thr</b>	Propanol	586.11	571.04	757.87	610.39	504.75	573.54	130.95	589.63	534.27	390.55	912.04	637.65
	Propyl acetate	0.81	0.80	0.82	0.80	0.79	0.83	3.29	0.81	0.81	1.14	1.04	0.76
	Propionic acid	15.46	20.28	18.73	20.89	14.09	20.57	56.28	23.49	18.42	32.32	86.58	21.12
	Ethyl propionate	2.55	3.35	2.79	2.75	1.84	2.55	3.96	3.21	3.13	4.63	4.82	1.80
<b>Grp Val</b>	Isobutyl alcohol	927.08	809.42	952.97	1086.73	1037.95	1064.06	446.53	1026.29	824.54	1483.24	557.02	843.68
	Isobutyl acetate	0.88	0.63	0.66	0.67	0.60	0.54	2.32	0.85	0.71	0.77	0.00	0.96
	Isobutyric acid	155.20	178.02	175.65	200.40	245.61	244.36	109.28	218.86	173.18	168.03	31.12	108.98
	Ethyl isobutyrate	1.02	0.95	0.87	0.98	1.08	1.24	2.02	1.11	1.05	0.98	1.03	0.60
<b>Grp Leu</b>	Isoamyl alcohol	302.75	261.72	252.83	289.41	272.80	364.92	169.29	300.43	216.75	703.52	897.33	265.45
	Isoamyl acetate	0.95	0.95	0.95	0.95	0.94	0.98	3.92	0.97	0.95	1.39	0.25	0.94
	Isovaleric acid	7.36	6.18	5.27	5.84	6.46	7.94	3.35	7.28	5.42	8.65	1.93	4.70
	Ethyl isovalerate	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71	3.09	0.71	0.72	1.03	0.00	0.70
<b>Grp Phe</b>	Phenylethyl alcohol	282.90	211.98	196.51	221.40	213.74	236.64	31.43	219.99	192.00	312.54	258.13	336.99
	Phenylethyl acetate	0.62	0.49	0.57	0.48	0.59	0.66	1.62	0.56	0.49	1.31	1.20	0.91
<b>Grp Fatty Acids</b>	Butyric acid	14.11	20.94	18.71	17.97	17.40	23.73	18.21	17.74	16.20	12.15	23.32	19.74
	Hexanoic acid	1.60	2.33	1.75	2.19	2.52	2.84	3.98	1.36	1.74	1.73	6.76	2.09
	Octanoic acid	1.98	2.66	2.22	2.69	3.60	4.61	10.20	1.78	1.89	2.47	20.45	0.96
	Decanoic acid	1.04	1.02	0.90	1.13	1.08	1.16	3.94	1.13	1.05	1.30	1.94	1.13
	Dodecanoic acid	0.51	0.88	0.62	0.31	2.63	1.71	4.20	1.41	1.16	1.20	3.04	0.35
	Valeric acid	0.74	0.97	0.89	1.03	1.03	0.85	4.95	0.84	0.96	1.01	1.60	1.00
<b>Grp Ethyl esters</b>	Ethyl butyrate	0.57	0.64	0.56	0.59	0.56	0.75	1.85	0.57	0.59	0.67	1.09	0.46
	Ethyl hexanoate	0.65	0.67	0.65	0.66	0.66	0.69	2.76	0.66	0.66	0.95	1.39	0.65
	Ethyl octanoate	0.44	0.49	0.43	0.46	0.45	0.50	1.83	0.44	0.45	0.62	0.53	0.47
	Ethyl decanoate	0.54	0.67	0.42	0.57	0.46	0.51	2.16	0.48	0.48	0.53	0.00	0.62
	Ethyl dodecanoate	0.79	0.76	0.67	0.72	0.70	0.69	2.81	0.71	0.69	0.96	2.07	0.72
	Ethyl valerate	0.88	0.88	0.88	0.89	0.88	0.88	3.84	0.88	0.88	1.28	0.86	0.89
<b>Others</b>	Methionol	177.89	61.24	88.24	95.35	155.68	82.14	46.80	116.13	105.93	181.89	42.64	143.65
	Diethyl succinate	0.40	0.37	0.33	0.35	0.38	0.47	0.98	0.45	0.39	0.34	0.00	0.55
	Ethyl lactate	5.72	5.83	5.44	6.69	5.78	8.68	24.35	5.77	5.18	7.87	0.00	5.50
	Hexyl acetate	0.81	0.82	0.82	0.83	0.82	0.83	3.55	0.82	0.82	1.19	1.09	0.82

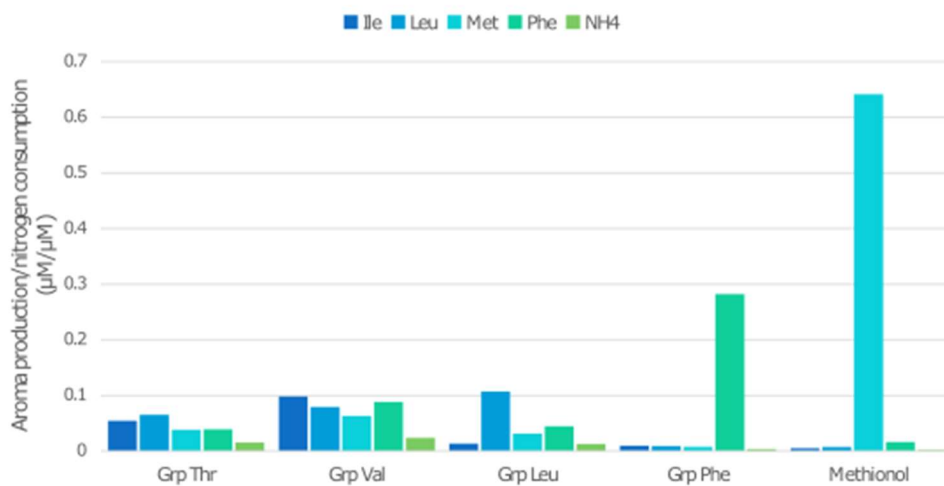
Supplementary data 6: Production yield (in  $\mu\text{mol/mol}$ ) of tyrosol and tryptophol depending on the strains and the media. Results are presented as mean  $\pm$  standard deviation. MP: *M. pulcherrima* Flavia®; TD: *T. delbrueckii* Biodiva™; SC: *S. cerevisiae* Lalvin EC1118®.

	SC						TD						MP					
	Tyrosol			Tryptophol			Tyrosol			Tryptophol			Tyrosol			Tryptophol		
NH4	126.5	$\pm$	7.0	3.2	$\pm$	1.0	88.2	$\pm$	6.9	6.7	$\pm$	4.9	157.5	$\pm$	14.8	18.8	$\pm$	2.2
Val	114.2	$\pm$	5.5	5.7	$\pm$	1.0	127.5	$\pm$	4.1	10.1	$\pm$	1.5	200.8	$\pm$	8.2	34.7	$\pm$	1.6
Phe	456.0	$\pm$	10.4	197.0	$\pm$	2.0	80.2	$\pm$	1.8	7.7	$\pm$	0.7	317.1	$\pm$	138.9	218.5	$\pm$	95.3
Trp	533.6	$\pm$	26.7	13726.1	$\pm$	192.2	102.0	$\pm$	5.7	9629.3	$\pm$	627.9	793.9	$\pm$	3.9	45383.4	$\pm$	430.7
Tyr	13450.6	$\pm$	548.5	411.4	$\pm$	14.7	13393.7	$\pm$	22.1	15.9	$\pm$	2.2	29364.5	$\pm$	404.8	277.0	$\pm$	96.9
SM200	399.1	$\pm$	8.5	625.0	$\pm$	13.1	206.0	$\pm$	19.8	504.2	$\pm$	11.6	194.1	$\pm$	10.3	657.3	$\pm$	40.8

Supplementary data 7: Production yield of aroma compounds depending on the amount of amino acid consumed during the fermentation. Dark blue circles: *S. cerevisiae* Lalvin EC1118®; Green squares: *M. pulcherrima* Flavia®; blue triangles: *T. delbrueckii* Biodiva™.

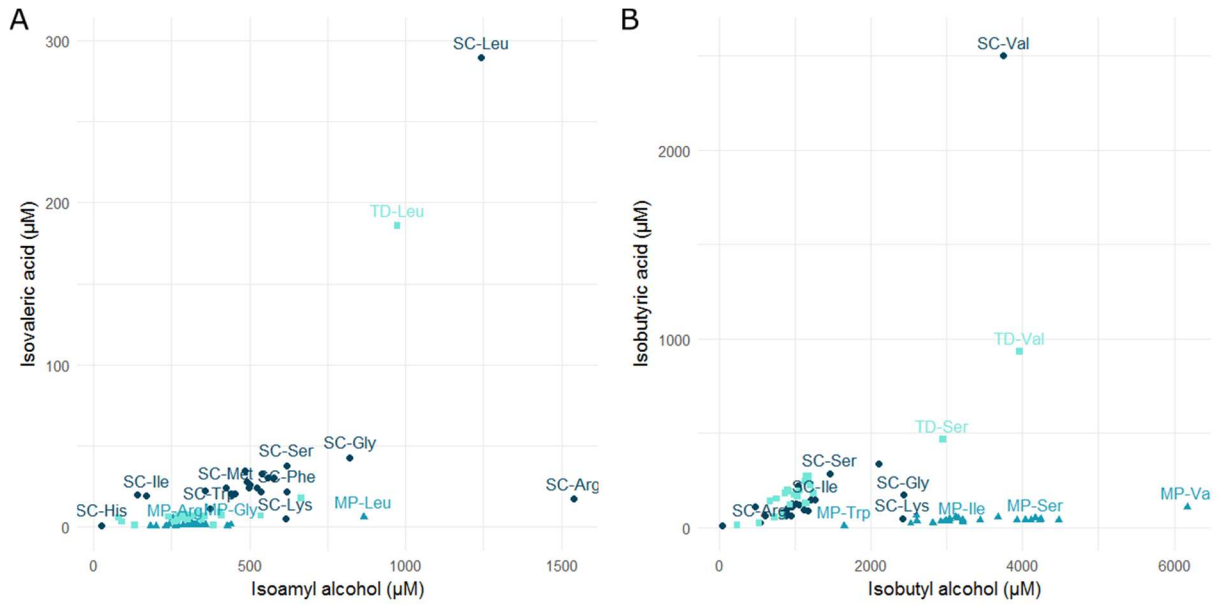


Supplementary data 8 : Yield of aroma compounds over nitrogen consumption for *S. cerevisiae* Lalvin EC1118® depending on the production pathways and the amino acid available in the media.

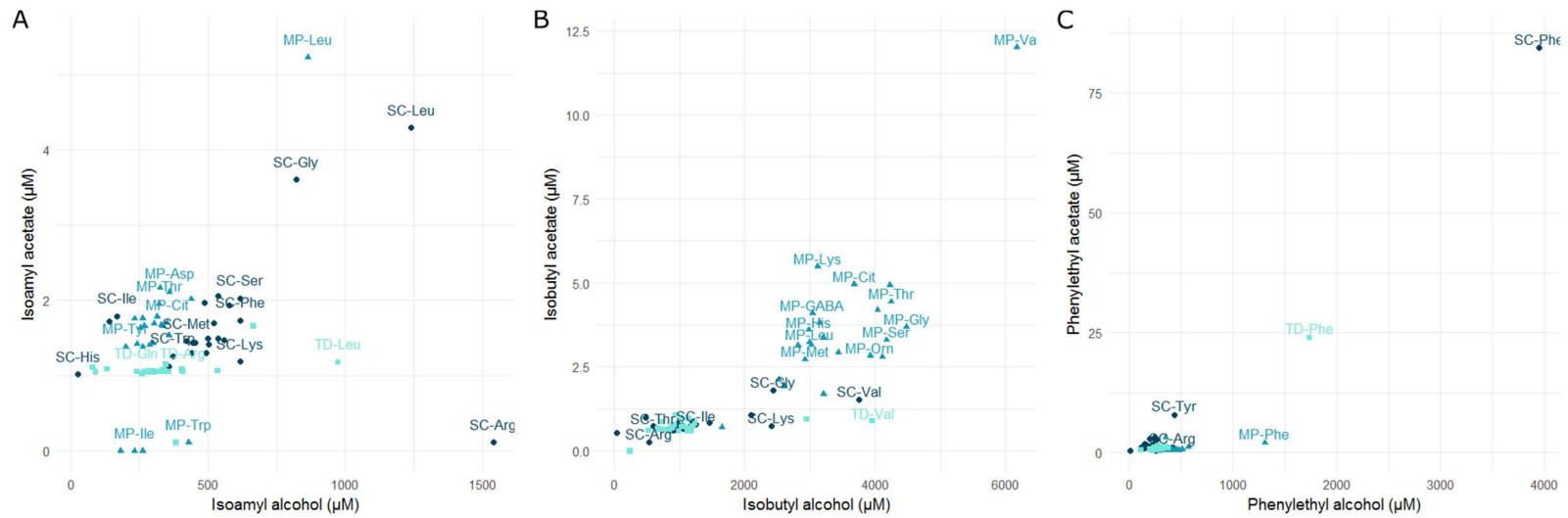




Supplementary data 9: Production of isovaleric acid (A) and isobutyric acid (B) depending on the production of the corresponding higher alcohols. Dots are labelled SS-MMM with SS being the name of the strain and MMM the fermentation medium. SC: *S. cerevisiae* Lalvin EC1118®; MP: *M. pulcherrima* Flavia®; TD: *T. delbrueckii* Biodiva™. Circles: *S. cerevisiae*; triangles: *M. pulcherrima*; squares: *T. delbrueckii*.



Supplementary data 10: Production of isoamyl acetate (A), isobutyl acetate (B) and phenylethyl acetate (C) depending on the production of the corresponding higher alcohols. Dots are labelled SS-MMM with SS being the name of the strain and MMM the fermentation medium. SC: *S. cerevisiae* Lalvin EC1118®; MP: *M. pulcherrima* Flavia®; TD: *T. delbrueckii* Biodiva™ Circles: *S. cerevisiae*; triangles: *M. pulcherrima*; squares: *T. delbrueckii*.



## 9. References

- Azzolini, M., Tosi, E., Lorenzini, M., Finato, F., Zapparoli, G., 2015. Contribution to the aroma of white wines by controlled *Torulaspota delbrueckii* cultures in association with *Saccharomyces cerevisiae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 31, 277–293. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1774-1>
- Belda, I., Navascués, E., Marquina, D., Santos, A., Calderon, F., Benito, S., 2015. Dynamic analysis of physiological properties of *Torulaspota delbrueckii* in wine fermentations and its incidence on wine quality. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 1911–1922. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6197-2>
- Belda, I., Ruiz, J., Beisert, B., Navascués, E., Marquina, D., Calderón, F., Rauhut, D., Benito, S., Santos, A., 2017. Influence of *Torulaspota delbrueckii* in varietal thiol (3-SH and 4-MSP) release in wine sequential fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 257, 183–191. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.028>
- Bely, M., Sablayrolles, J., Barre, P., 1990. Description of alcoholic fermentation kinetics : its variability and interest. *Am. J. Enol. Vitic.* 41, 319–324.
- Benito, S., Hofmann, T., Laier, M., Lochbühler, B., Schüttler, A., Ebert, K., Fritsch, S., Röcker, J., Rauhut, D., 2015. Effect on quality and composition of Riesling wines fermented by sequential inoculation with non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. Food Res. Technol.* 241, 707–717. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2497-8>
- Bhattacharjee, J.K., 1992. Evolution of alpha-Aminoadipate Pathway for the Synthesis of Lysine in Fungi, in: *The Evolution of Metabolic Function*. pp. 47–80.
- Bloem, A., Rollero, S., Seguinot, P., Crépin, L., Perez, M., Picou, C., Camarasa, C., 2018. Workflow Based on the Combination of Isotopic Tracer Experiments to Investigate Microbial Metabolism of Multiple Nutrient Sources. *J. Vis. Exp.* <https://doi.org/10.3791/56393>
- Bloem, A., Sanchez, I., Dequin, S., Camarasa, C., 2016. Metabolic Impact of Redox Cofactor Perturbations on the Formation of Aroma Compounds in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 174–183. <https://doi.org/10.1128/AEM.02429-15>
- Boer, V.M., Tai, S.L., Vuralhan, Z., Arifin, Y., Walsh, M.C., Piper, M.D.W., de Winde, J.H., Pronk, J.T., Daran, J.-M., 2007. Transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* to preferred and nonpreferred nitrogen sources in glucose-limited chemostat cultures. *FEMS Yeast Res.* 7, 604–620. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2007.00220.x>
- Brunke, S., Seider, K., Richter, M.E., Bremer-Streck, S., Ramachandra, S., Kiehntopf, M., Brock, M., Hube, B., 2014. Histidine Degradation via an Aminotransferase Increases the Nutritional Flexibility of *Candida glabrata*. *Eukaryot. Cell* 13, 758–765. <https://doi.org/10.1128/EC.00072-14>

- Carrau, F.M., Medina, K., Farina, L., Boido, E., Henschke, P.A., Dellacassa, E., 2008. Production of fermentation aroma compounds by *Saccharomyces cerevisiae* wineyeasts: effects of yeast assimilable nitrogen on two model strains. *FEMS Yeast Res.* 8, 1196–1207. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00412.x>
- Chang, L.F., Cunningham, T.S., Gatzek, P.R., Chen, W.J., Kohlhaw, G.B., 1984. Cloning and characterization of yeast *Leu4*, one of two genes responsible for alpha-isopropylmalate synthesis. *Genetics* 108, 91–106.
- Cherest, H., Eichler, F., de Robichon-Szulmajster, H., 1969. Genetic and Regulatory Aspects of Methionine Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 97, 328.
- Clement, T., Perez, M., Mouret, J.R., Sanchez, I., Sablayrolles, J.M., Camarasa, C., 2013. Metabolic Responses of *Saccharomyces cerevisiae* to Valine and Ammonium Pulses during Four-Stage Continuous Wine Fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 2749–2758. <https://doi.org/10.1128/AEM.02853-12>
- Combina, M., Elía, A., Mercado, L., Catania, C., Ganga, A., Martinez, C., 2005. Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. *Int. J. Food Microbiol.* 99, 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.08.017>
- Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., Ciani, M., 2011. Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.* 28, 873–882. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.12.001>
- Crépin, L., Truong, N.M., Bloem, A., Sanchez, I., Dequin, S., Camarasa, C., 2017. Management of Multiple Nitrogen Sources during Wine Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 83, e02617-16. <https://doi.org/10.1128/AEM.02617-16>
- Dukes, B.C., Butzke, C.E., 1998. Rapid Determination of Primary Amino Acids in Grape Juice Using an o-Phthaldialdehyde/N-Acetyl-L-Cysteine Spectrophotometric Assay. *Am. J. Enol. Vitic.* 49, 125.
- Egli, C.M., Edinger, W.D., Mitrakul, C.M., Henick-Kling, T., 2002. Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effect on the sensory character of Riesling and Chardonnay wines. *J. Appl. Microbiol.* 85, 779–789. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00521.x>
- Fairbairn, S., McKinnon, A., Musarurwa, H.T., Ferreira, A.C., Bauer, F.F., 2017. The Impact of Single Amino Acids on Growth and Volatile Aroma Production by *Saccharomyces cerevisiae* Strains. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02554>
- Fleet, G., 2003. Yeast interactions and wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 11–22. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00245-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00245-9)

- Fleet, G.H., 2008. Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Res.* 8, 979–995. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00427.x>
- Fujii, T., Nagasawa, N., Iwamatsu, A., Bogaki, T., Tamai, Y., Hamachi, M., 1994. Molecular cloning, sequence analysis, and expression of the yeast alcohol acetyltransferase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2786–2792.
- Gobbi, M., Comitini, F., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., Ciani, M., 2013. *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: A strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine. *Food Microbiol.* 33, 271–281. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.10.004>
- 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. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02175>
- Godard, P., Urrestarazu, A., Vissers, S., Kontos, K., Bontempi, G., van Helden, J., Andre, B., 2007. Effect of 21 Different Nitrogen Sources on Global Gene Expression in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 27, 3065–3086. <https://doi.org/10.1128/MCB.01084-06>
- González-Royo, E., Pascual, O., Kontoudakis, N., Esteruelas, M., Esteve-Zarzoso, B., Mas, A., Canals, J.M., Zamora, F., 2015. Oenological consequences of sequential inoculation with non-*Saccharomyces* yeasts (*Torulasporea delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima*) and *Saccharomyces cerevisiae* in base wine for sparkling wine production. *Eur. Food Res. Technol.* 240, 999–1012. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2404-8>
- Hazelwood, L.A., Daran, J.-M., van Maris, A.J.A., Pronk, J.T., 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. <https://doi.org/10.1128/AEM.02625-07>
- Holm Hansen, E., Nissen, P., Sommer, P., Nielsen, J.C., Arneborg, N., 2001. The effect of oxygen on the survival of non-*Saccharomyces* yeasts during mixed culture fermentations of grape juice with *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Microbiol.* 91, 541–547. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01426.x>
- Jolly, N.P., Augustyn, O.P.H., Pretorius, I.S., 2006. The Role and Use of Non-*Saccharomyces* Yeasts in Wine Production. *Afr J Enol Vitic* 27.
- Jolly, N.P., Augustyn, O.P.H., Pretorius, I.S., 2003. The Use of *Candida pulcherrima* in Combination with *Saccharomyces cerevisiae* for the Production of Chenin blanc Wine. *South Afr. J. Enol. Vitic.* 24. <https://doi.org/10.21548/24-2-2641>

- Kastanos, E.K., Woldman, Y.Y., Appling, D.R., 1997. Role of Mitochondrial and Cytoplasmic Serine Hydroxymethyltransferase Isozymes in *de Novo* Purine Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 36, 14956–14964. <https://doi.org/10.1021/bi971610n>
- Kemsawasd, V., Viana, T., Ardö, Y., 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. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6835-3>
- Lage, P., Barbosa, C., Mateus, B., Vasconcelos, I., Mendes-Faia, A., Mendes-Ferreira, A., 2014. *H. guilliermondii* impacts growth kinetics and metabolic activity of *S. cerevisiae*: The role of initial nitrogen concentration. *Int. J. Food Microbiol.* 172, 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.031>
- Lambrechts, M.G., Pretorius, I.S., 2000. Yeast and its Importance to Wine Aroma - A Review. *South Afr. J. Vitic.* 21.
- Lilly, M., Lambrechts, M.G., Pretorius, I.S., 2000. Effect of Increased Yeast Alcohol Acetyltransferase Activity on Flavor Profiles of Wine and Distillates. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 744–753. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.2.744-753.2000>
- Ljungdahl, P.O., Daignan-Fornier, B., 2012. Regulation of Amino Acid, Nucleotide, and Phosphate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 190, 885–929. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.133306>
- Magasanik, B., Kaiser, C.A., 2002. Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 290, 1–18.
- Malcorps, P., Dufour, J.-P., 1992. Short-chain and medium-chain aliphatic-ester synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 210, 1015–1022. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb17507.x>
- Minetoki, T., Bogaki, T., Iwamatsu, A., Fujii, T., Hamachi, M., 1993. The Purification, Properties and Internal Peptide Sequences of Alcohol Acetyltransferase Isolated from *Saccharomyces cerevisiae* Kyokai No. 7. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57, 2094–2098. <https://doi.org/10.1271/bbb.57.2094>
- Morakul, S., Mouret, J.-R., Nicolle, P., Trelea, I.C., Sablayrolles, J.-M., Athes, V., 2011. Modelling of the gas–liquid partitioning of aroma compounds during wine alcoholic fermentation and prediction of aroma losses. *Process Biochem.* 46, 1125–1131. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.01.034>
- Mouret, J.R., Perez, M., Angenieux, M., Nicolle, P., Farines, V., Sablayrolles, J.M., 2014. Online-Based Kinetic Analysis of Higher Alcohol and Ester Synthesis During Winemaking Fermentations. *Food Bioprocess Technol.* 7, 1235–1245. <https://doi.org/10.1007/s11947-013-1089-5>

- Piper, M.D.W., Hong, S.-P., Eißing, T., Sealey, P., Dawes, I.W., 2002. Regulation of the yeast glycine cleavage genes is responsive to the availability of multiple nutrients. *FEMS Yeast Res.* 2, 59–71. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2002.tb00069.x>
- Prior, K.J., Bauer, F.F., Divol, B., 2019. The utilisation of nitrogenous compounds by commercial non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine. *Food Microbiol.* 79, 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.12.002>
- Puertas, B., Jiménez, M.J., Cantos-Villar, E., Cantoral, J.M., Rodríguez, M.E., 2017. Use of *Torulaspota 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. <https://doi.org/10.1111/jam.13375>
- Quan, H., Shih, W.J., 1996. Assessing Reproducibility by the Within-Subject Coefficient of Variation with Random Effects Models. *Biometrics* 52, 1195. <https://doi.org/10.2307/2532835>
- Renault, P., Coulon, J., de Revel, G., Barbe, J.-C., Bely, M., 2015. Increase of fruity aroma during mixed *T. delbrueckii/S. cerevisiae* wine fermentation is linked to specific esters enhancement. *Int. J. Food Microbiol.* 207, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.037>
- Rodríguez, M.E., Lopes, C.A., Barbagelata, R.J., Barda, N.B., Caballero, A.C., 2010. Influence of *Candida pulcherrima* Patagonian strain on alcoholic fermentation behaviour and wine aroma. *Int. J. Food Microbiol.* 138, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.12.025>
- Roeder, P.R., Kohlhaw, G.B., 1980. Alpha-isopropylmalate synthase from yeast. A zinc metalloenzyme. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Enzymol.* 613, 482–487. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(80\)90103-5](https://doi.org/10.1016/0005-2744(80)90103-5)
- Rollero, S., Bloem, A., Camarasa, C., Sanchez, I., Ortiz-Julien, A., Sablayrolles, J.-M., Dequin, S., Mouret, J.-R., 2014. Combined effects of nutrients and temperature on the production of fermentative aromas by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6210-9>
- Rollero, S., Mouret, J.-R., Bloem, A., Sanchez, I., Ortiz-Julien, A., Sablayrolles, J.-M., Dequin, S., Camarasa, C., 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.* <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12749>
- Romagnoli, G., Knijnenburg, T.A., Liti, G., Louis, E.J., Pronk, J.T., Daran, J.-M., 2014. Deletion of the *Saccharomyces cerevisiae* *ARO8* gene, encoding an aromatic amino acid transaminase, enhances phenylethanol production from glucose: *ARO8* deletion enhances phenylethanol production. *Yeast.* <https://doi.org/10.1002/yea.3015>
- Ruiz, J., Belda, I., Beisert, B., Navascués, E., Marquina, D., Calderón, F., Rauhut, D., Santos, A., Benito, S., 2018. Analytical impact of *Metschnikowia pulcherrima* in the volatile profile of



Verdejo white wines. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 8501–8509. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9255-3>

Saerens, S.M.G., Delvaux, F.R., Verstrepen, K.J., Thevelein, J.M., 2010. Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Biotechnol.* 3, 165–177. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2009.00106.x>

Schlösser, T., Gätgens, C., Weber, U., Stahmann, K.-P., 2004. Alanine: glyoxylate aminotransferase of *Saccharomyces cerevisiae*—encoding gene AGX1 and metabolic significance. *Yeast* 21, 63–73. <https://doi.org/10.1002/yea.1058>

Schütz, M., Gafner, J., 1993. Analysis of yeast diversity during spontaneous and induced alcoholic fermentations. *J. Appl. Bacteriol.* 75, 551–558. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb01594.x>

Shekhawat, K., Patterton, H., Bauer, F.F., Setati, M.E., 2019. RNA-seq based transcriptional analysis of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lachancea thermotolerans* in mixed-culture fermentations under anaerobic conditions. *BMC Genomics* 20. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5511-x>

Su, Y., Seguinot, P., Sanchez, I., Ortiz-Julien, A., Heras, J.M., Querol, A., Camarasa, C., Guillamón, J.M., 2020. Nitrogen sources preferences of non-*Saccharomyces* yeasts to sustain growth and fermentation under winemaking conditions. *Food Microbiol.* 85, 103287. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103287>

Sychrova, H., Chevallier, M.R., 1993. Cloning and sequencing of the *Saccharomyces cerevisiae* gene *LYP1* coding for a lysine-specific permease. *Yeast* 9, 771–782. <https://doi.org/10.1002/yea.320090711>

Tehlivets, O., Scheuringer, K., Kohlwein, S.D., 2007. Fatty acid synthesis and elongation in yeast. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1771, 255–270. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.07.004>

Toke, D.A., Martin, C.E., 1996. Isolation and Characterization of a Gene Affecting Fatty Acid Elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 271, 18413–18422. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.31.18413>

Trindade de Carvalho, B., Holt, S., Souffriau, B., Lopes Brandão, R., Foulquié-Moreno, M.R., Thevelein, J.M., 2017. Identification of Novel Alleles Conferring Superior Production of Rose Flavor Phenylethyl Acetate Using Polygenic Analysis in Yeast. *mBio* 8. <https://doi.org/10.1128/mBio.01173-17>

Villas-Bôas, S.G., Højer-Pedersen, J., Åkesson, M., Smedsgaard, J., Nielsen, J., 2005. Global metabolite analysis of yeast: evaluation of sample preparation methods. *Yeast* 22, 1155–1169. <https://doi.org/10.1002/yea.1308>



Vuralhan, Z., Morais, M.A., Tai, S.-L., Piper, M.D.W., Pronk, J.T., 2003. Identification and characterization of phenylpyruvate decarboxylase genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4534–4541.

---

# CHAPITRE 2

---

## SUIVI DU DEVENIR DE L'AZOTE DANS LE METABOLISME PAR FILLIATION ISOTOPIQUE

*M. pulcherrima* et *T. delbrueckii* ont montré plusieurs spécificités métaboliques lors de l'étude de leurs capacités fermentaires et de production d'arômes en fonction de la source azotée disponible dans le milieu. Afin d'étudier plus en détail le métabolisme azoté de ces levures non-*Saccharomyces*, des acides aminés marqués au  $^{13}\text{C}$  ou  $^{15}\text{N}$  ont été utilisés en fermentation. Le devenir des atomes marqués de ces molécules a été suivi à travers le métabolisme azoté jusqu'aux acides aminés protéinogéniques et à la production d'arômes fermentaires. Le suivi de plusieurs molécules marquées permet d'avoir une vue d'ensemble du métabolisme de ces souches, dans le but d'établir et de comparer leurs flux métaboliques.

## 1. Introduction

Yeasts play a crucial part in alcoholic fermentation, ensuring the bioconversion of sugar to ethanol but also the production of fermentative aromas. The main yeast strain involved in this winemaking step is *S. cerevisiae*, mainly because of its high ethanol tolerance and its adaptation to oxygen and nutrient limitations. However, in a very competitive market, winemakers are looking for ways to diversify their products. The wide variety of yeasts naturally present in the winemaking environment and their diverse characteristics are an important resource to be explored. Indeed, while non-*Saccharomyces* yeasts were all seen as detrimental for the quality of wine, recent studies have brought to light their potentialities, by selecting strains with interesting properties, mainly for aroma production. However, the non-*Saccharomyces* yeast research area is quite new, with a large scope to further investigate. Thus, few information is yet available about these yeasts compared to *S. cerevisiae*. Studies have determined the impact of non-*Saccharomyces* yeasts belonging to several genera (*Torulaspota*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Candida* or *Lachancea* for example) on the fermentation kinetic and the properties of the wine produced (for reviews, see Padilla et al., (2016) and Varela (2016)). Their metabolism and especially nitrogen metabolism has been addressed, determining the preferred and non-preferred nitrogen sources of several strains and pointing out specific features compared with *S. cerevisiae* (Gobert et al., 2017; Kemsawasd et al., 2015; Su et al., 2020). In addition, recently, studies have been carried out to investigate the underlying mechanisms, at the level of the regulation of gene expression (Lleixà et al. 2018) or that of fluxes partitioning in the metabolic network (Rollero et al., 2019). However, these works are focused on a species, and can not be extrapolated to other yeast, due the important variability between non-*Saccharomyces* strains regarding the management of the nitrogen resource (Rollero et al., 2018).

The metabolism of *S. cerevisiae* has been extensively researched. Many studies have been carried out to draw a comprehensive picture of the mechanisms responsible for the import and the use of nitrogen sources during winemaking, as well as the involved regulation mechanisms. Nitrogen is imported into cells by different transporters, controlled by three regulation systems: the Nitrogen Catabolic Repression (NCR), the SPS sensors and the General Amino acids Control (GAAC) (Hinnebusch, 2005; Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012; Magasanik and Kaiser, 2002). The combination of these different regulation mechanisms

explains the order of nitrogen sources consumption observed with *S. cerevisiae* (Crepin et al., 2012b). Once in the cells, amino acids can be either directly incorporated into proteinogenic amino acids or degraded. A recent study using labelled amino acids showed that the amount of directly incorporated amino acids into biomass is low, except for arginine, histidine and lysine (Crépin et al., 2017). The largest part of amino acids is catabolised to release nitrogen as ammonium or glutamate and ketoacids. Ketoacids can be used for the *de novo* synthesis of amino acids, catabolised toward the central carbon metabolism (CCM) or toward the production of aroma compounds through the Ehrlich pathway. Ammonium and glutamate are redirected toward the core nitrogen metabolism composed of reversible reactions between ammonium, glutamate and glutamine, and provide the necessary nitrogen for the *de novo* synthesis of amino acids (Magasanik and Kaiser, 2002). The carbon skeleton required to achieve the *de novo* synthesis of amino acids can originate from the degradation of consumed amino acids or be provided by the CCM. Thus, an interconnection exists between the carbon and nitrogen metabolisms. The fluxes through these metabolisms depend on the amount of available nitrogen that affects the proportion of amino acids directly incorporated into the biomass, the contribution of the CCM and finally the aroma production (Barbosa et al., 2012; Olivares-Marin et al., 2018; Quirós et al., 2013; Rollero et al., 2017). Furthermore, a recent study revealed substantial changes in the flux partitioning between *S. cerevisiae* et *K. marxianus* during wine fermentation, explaining some specific metabolic traits of the non-*Saccharomyces* yeast (Rollero et al., 2019).

In this context, the aim of this study is to gain information on the fate of nitrogen sources through the metabolism network of two non-*Saccharomyces* commercial yeasts used in winemaking: *Metschnikowia pulcherrima* Flavia® and *Torulaspota delbrueckii* Biodiva®. These strains have shown metabolic specificities compared to *S. cerevisiae*, especially for volatile compounds production (Azzolini et al., 2015; González-Royo et al., 2015; Varela et al., 2017) that could be beneficial to understand. *M. pulcherrima* is known to produce high concentrations of isobutanol (González-Royo et al., 2015) and *T. delbrueckii* for its high production of phenylethanol and low production of ethyl esters (Azzolini et al., 2015; Sadoudi et al., 2012). To this end, <sup>13</sup>C or <sup>15</sup>N labelled nitrogen sources were added to a synthetic must used for fermentation in pure culture with *M. pulcherrima* or *T. delbrueckii*. To highlight the fate of these labelled molecules, the isotopic enrichment, *i.e.* the proportion of labelled atoms

found in some key molecules of the nitrogen metabolism was measured by GC-MS. The isotopic enrichment was determined into the proteinogenic amino acids during experiments using  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  labelled nitrogen sources, and into aroma compound produced through the Ehrlich pathway when  $^{13}\text{C}$ -labelled amino acids were used. Results will provide a deeper understanding of the management of nitrogen sources by these strains during fermentation, and provide insights for the better management of nitrogen resources.

## 2. Material and methods

### 2.1. Strains and fermentation conditions

Two non-*Saccharomyces* yeasts commercialized by Lallemand SAS were studied: *Metschnikowia pulcherrima* Flavia® and *Torulaspora delbrueckii* Biodiva®. Yeasts were stored in glycerol (30% weight/vol) at - 80°C. Before inoculation, the strains were pre-cultured in YEPD at 28°C under agitation during 24 hours. Cell concentration of the pre-cultures was measured with a Coulter counter. The necessary volume of pre-culture to have an initial concentration of  $5.10^6$  cells/mL was washed with physiological water before inoculation.

Fermentations were performed in 300 mL-fermenters containing 250 mL of medium, under agitation (250 rpm) at 24°C. Fermenters were sterilized and equipped with a fermentation lock to maintain anaerobiosis while allowing the  $\text{CO}_2$  release.

A synthetic medium (SM) reproducing the composition of a grape must was used (Bely et al., 1990b). It contained 100 g/L of glucose, 100 g/L of fructose, 5 mg/L of phytosterols (as  $\beta$ -sitosterols dissolved into Tween 80) and trace elements as described by Rollero et al. (2016). Nitrogen was provided as a mixture of 1/3 ammonium and 2/3 amino acids at a concentration of 300 mg/L of yeast assimilable nitrogen (YAN). For each fermentation set, one of the nitrogen source was replaced by a labelled molecule provided by Euriso-top: ammonium chloride ( $^{15}\text{N}$  [99%]), L-arginine ( $\text{U-}^{15}\text{N}_4$  [98%]), L-glutamine ( $^{15}\text{N}_2$  [98%]), L-leucine ( $^{13}\text{C}_6$  [98%]) or L-valine ( $^{13}\text{C}_5$  [98%]). The medium was sterilized by filtration (pore size 0.22  $\mu\text{m}$ , Sartorius Sartolab) and used to fill the sterile fermenters. All fermentations were performed in duplicate.

### 2.2. Measure of consumed amino acids

The concentration of residual ammonium was measured enzymatically using the ENZYTEC kit according to the manufacturer instructions (ENZYTEC™ fluid Ammoniaque, DiaSys Diagnostic

Systems Gmb). The concentration of residual amino acids was measured by liquid chromatography (Biochrom 30, Biochrom) and spectrophotometric revelation after ninhydrin derivatization as described by Crepin et al. (2012).

### 2.3. Quantification of proteinogenic amino acids

The dry cell weight was determined filtering 10 mL of culture through nitrocellulose filters with pore sizes of 0.22  $\mu\text{m}$ , and rinsed with 50 mL of water. Filters were dried 48 h at 105°C. The dry weight was determined by the weight difference before use and after drying.

The total protein cellular content was measured using a bicinchoninic acid (BCA) assay kit (BCA1, Sigma-Aldrich). Proteins were first extracted suspending the cells pellets in 1 mL mixture DMSO/ physiological water (50 % vol/vol) for one hour at 105°C. To assess the relative composition of amino acids in biomass, cells pellets were incubated overnight at -20°C with 1 mL of trichloroacetic acid (10% vol/vol in acetone) to precipitate the cellular proteins, which were then hydrolysed with 6N HCl for 24 hours at 105°C. After determination of the amino acids profile by liquid chromatography (described in section 2.2), the proportion of each amino acids was calculated as the amount of the studied amino acid divided by the total amount of all amino acids. Then, the concentration of each proteinogenic amino acids was calculated by multiplying the proportion of amino acids previously obtained by the concentration of biomass proteins and the dry weight.

### 2.4. Measure of isotopic enrichment of intracellular amino acids

Two mg of dried biomass were hydrolysed in 1.2 mL of 6N HCl during 16 hours at 105°C. Eight hundred  $\mu\text{L}$  of water were added to the sample, that was centrifuged during 5 min at 5 000 rpm. The supernatant was retrieved and distributed into four 400  $\mu\text{L}$  fractions in glass tubes. Samples were dried during 4 to 5 hours at 105 °C until a syrup consistence was obtained, and used for derivatization.

Ethylchloroformate (ECF) derivatization was done by dissolving dried samples into 200  $\mu\text{L}$  of HCl (20 mM) and 133  $\mu\text{L}$  of pyridine-ethanol (1:4). Fifty  $\mu\text{L}$  of ECF were then added. Derivatized amino acids were extracted by adding 500  $\mu\text{L}$  of dichloromethane. After centrifugation at 10 000 rpm during 5 min, the supernatant was collected for GC-MS injection.

A N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) derivatization was also performed to measure the isotopic enrichment of arginine. The dried sample was dissolved into 200  $\mu\text{L}$  of

acetonitrile before adding 200  $\mu\text{L}$  of BSTFA. The sample was incubated during 4 hours at 135°C. The extract was directly injected in GC-MS.

GC-MS analysis were performed with a Hewlett-Packard (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) 6890 gas chromatograph, equipped with a CTC Combi PAL autosampler (AOC-5000; Shimadzu, Columbia, MD, USA) and associated with a HP 5973 mass spectrometry detector. The instrument was controlled and the data were analysed using HP Chemstation software. A DB-17MS column was used (30 m\*0.25 mm\*0.15  $\mu\text{m}$ , Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Helium was used as the carrier gas at a constant flow rate of 1.2 mL/min. 2  $\mu\text{L}$  of sample were injected with a split ration of 3:1 through an inlet at 230°C.

For ECF derivatives, the initial temperature of the oven was 130°C and was maintained during 3 min. The temperature was increase by a gradient of 15°C/min up to 260°C. This temperature was held during 20 min.

For BSTFA derivatives, the oven was initially at 110°C for 1 min. A gradient of 2°C/min was applied up to 154°C. A second gradient of 5°C/min up to 300°C was then performed. The final temperature of 300°C was maintained during 10 min.

The temperature of the mass quadrupole was set at 150°C. The temperature of the source was set at 250°C for ECF derivatives and at 300°C for BSTFA derivates. The transfer line was at 250°C. The mass spectroscope was used in selected ion monitoring (SIM) mode with a positive ion electron impact of 70 eV. The ions monitored in SIM were the same that those described by Crépin et al., (2017).

The obtained data were processed through the IsoCor software to correct the isotopic enrichment measured for natural labelling (Millard et al., 2012).

### 2.5. Extraction and quantification of volatile compounds and their isotopic enrichment

Volatile compounds were extracted as described by Rollero et al., (2014). One hundred  $\mu\text{g/L}$  of deuterated internal standard were added to 5 mL of culture supernatant. Extractions were performed by addition of 1 mL of dichloromethane, agitation during 20 min, centrifugation during 5 min at 5 000 rpm. The organic phase was collected and the process was repeated a second time. The total organic phase was then dried with sodium sulfate and concentrated under nitrogen flow to obtain a final volume of 500  $\mu\text{L}$ .

Analysis were performed using a Hewlett-Packard GC-MS device. The GC was fitted with a DB-WAX column (30 m \* 0.250 mm \* 0.25 µm, Agilent J&W). Helium was used as the carrier gas at a constant flow of 1.0 mL/min. The oven was initially at 40°C during 3 min. The temperature was then increased by a gradient of 4°C/min up to 160°C, and then by 15°C/min up to 220°C. This final temperature is maintained during 10 min. The injector and transfer line are at 250°C. Two µL of sample are injected with a split of 10:1. The mass spectrometer temperature is at 150°C and the source is at 230°C. The mass spectrometer was used in SIM mode. The ions followed are those described by Crépin et al (2017). The concentration of volatile compounds was determined by an external calibration using a calibration curve. The enrichment percentage was measured by assessing the intensity of the ion cluster and correcting it for natural labelling using the IsoCor software.

### 2.6. Calculation of flux quantification

The concentration of labelled molecule was obtained by multiplying the total concentration of this molecule by the isotopic enrichment percentage. The unlabelled concentration was the difference between the total concentration and the labelled concentration. The flux percentages of one labelled nitrogen source incorporated into a molecule was calculated as the ratio between the labelled concentration (in mM) of the studied compound and the total concentration of consumed nitrogen source (in mM).

## 3. Results

To elucidate how *M. pulcherrima* Flavia® and *T. delbrueckii* Biodiva® manage the nitrogen resources during fermentation to sustain their growth but also to produce volatile compounds, we assessed the fluxes distribution in the nitrogen metabolic network using a quantitative approach relying on mass balances and isotopic tracer experiments. For each strains, 10 fermentations were performed under the same conditions (medium, fermentation management), but with a different labelled nitrogen source each time. This design takes advantage of the high reproducibility of fermentations achieved under controlled conditions, and its feasibility was demonstrated with *S. cerevisiae* (Crépin et al., 2017; Rollero et al., 2017).

### 3.1. Fate of consumed nitrogen through proteinogenic amino acids

We first explored the way in which the two non-*Saccharomyces* species redistribute the nitrogen from the three main sources (ammonium, glutamine and arginine) to fulfill their



anabolic requirements.  $^{15}\text{N}$ -labelled molecules of arginine, glutamine or ammonium were provided during fermentation and the amount of labelled nitrogen in the proteinogenic amino acids was measured by GC-MS.

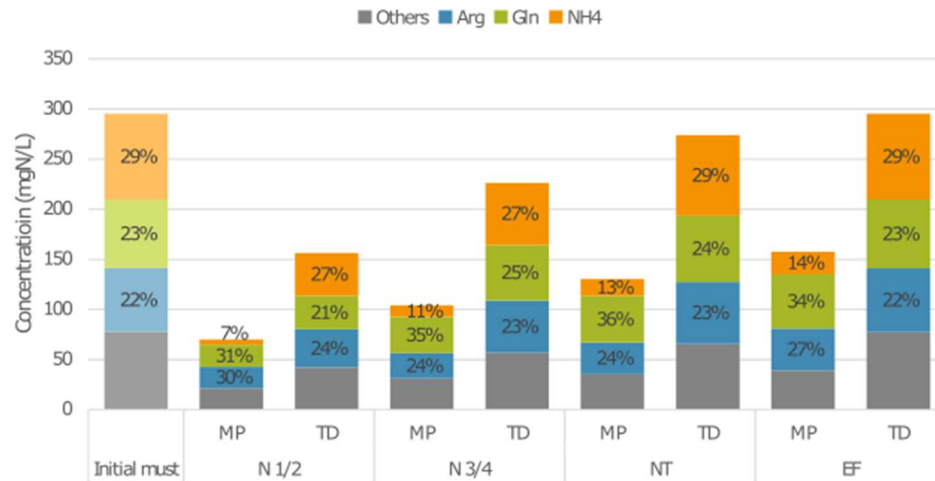


Figure 1: Consumption of amino acids (in mgN/L) during the fermentation with *M. pulcherrima* Flavia® (MP) or *T. delbrueckii* Biodiva® (TD). Labels indicate the proportion of the studied amino acids among the total amount of consumed amino acids. The concentration of amino acids in the initial must is represented on the left. N ½ : half of initial nitrogen consumed; N ¾ : ¾ of initial nitrogen consumed; NT: end of growth phase; EF : end of fermentation.

Arginine, glutamine and ammonium represented more than the half of consumed nitrogen by both *M. pulcherrima* and *T. delbrueckii* (Figure 1, Supplementary data 1). However, differences between species were first observed in the amount and the nature of the consumed nitrogen sources. *T. delbrueckii* consumed all available nitrogen during the fermentation while *M. pulcherrima* consumed only half of initial nitrogen, including 66% of initial arginine, 79% of initial glutamine but only 26% of initial ammonium. Ammonium was the largest nitrogen provider for *T. delbrueckii* accounting for 29% of total consumed nitrogen, followed by glutamine (23%) and arginine (22%). Glutamine provided 34% of total consumed nitrogen for *M. pulcherrima*, followed by arginine (27%) and ammonium (14%). Even if all three sources were uptaken since the beginning of the fermentation, their relative contribution to the total consumed nitrogen varied throughout the fermentation depending on the species. *T. delbrueckii* assimilated glutamine, arginine and ammonium in the same proportion during the fermentation, which correspond to the proportion of these nitrogen sources in the medium. On the contrary, *M. pulcherrima* consumed more arginine and glutamine than ammonium,

with a consumption accounting for less than 15% of the total consumed nitrogen during the fermentation.

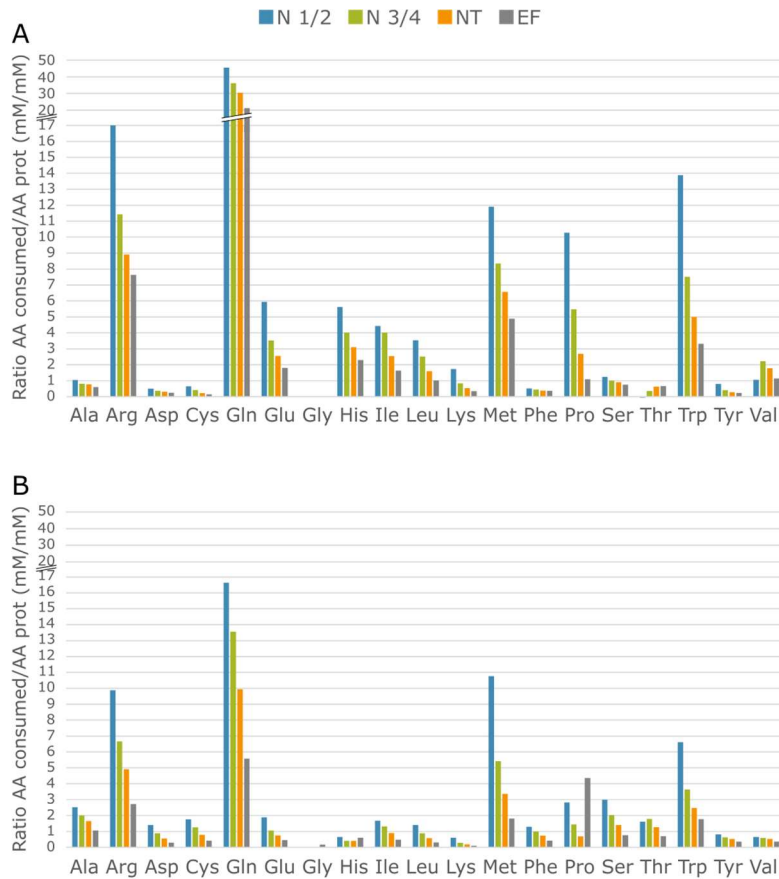


Figure 2: Ratio between the concentration of consumed amino acids and the concentration of the corresponding proteinogenic amino acids (mM/mM) for *M. pulcherrima* (A) and *T. delbrueckii* (B) at different stages of fermentation. Ratio > 1 indicate that the amino acids is enough in theory to meet anabolic requirements. N  $\frac{1}{2}$  : half of initial nitrogen consumed; N  $\frac{3}{4}$ :  $\frac{3}{4}$  of initial nitrogen consumed; NT: end of growth phase; EF : end of fermentation.

We then compared the consumption of each amino acids with the anabolic requirements for these molecules determined by measuring the proteinogenic amino acids content in biomass (Figure 2). The consumed amino acids were not always enough to cover the need of the corresponding proteinogenic amino acids. Concerning *T. delbrueckii*, only a few amino acids (alanine, arginine, glutamine, methionine and tryptophan) were consumed in sufficient amounts to cover the anabolic requirements through fermentation (ratio >1 in Figure 2). The consumption of the other amino acids was too low to cover the need for proteins biosynthesis, emphasizing the importance of *de novo* synthesis of amino acids and nitrogen redistribution through the metabolism. The non-*Saccharomyces* strain *M. pulcherrima* displayed a similar

behaviour, but in this case, more amino acids (additional nitrogen sources: glutamate, leucine, isoleucine, histidine) were consumed in adequate amounts to fulfil the anabolic requirements. This difference can be explained by the limited growth of *M. pulcherrima*, decreasing the anabolic requirement for amino acids. The ratio obtained for valine with *M. pulcherrima* stood out compared to the other amino acids, as the ratio increased during the growth phase and then decrease to be around 1 at the end of the fermentation. This evolution could be the sign of a decorrelation between the consumption of this amino acid and its requirement in biomass.

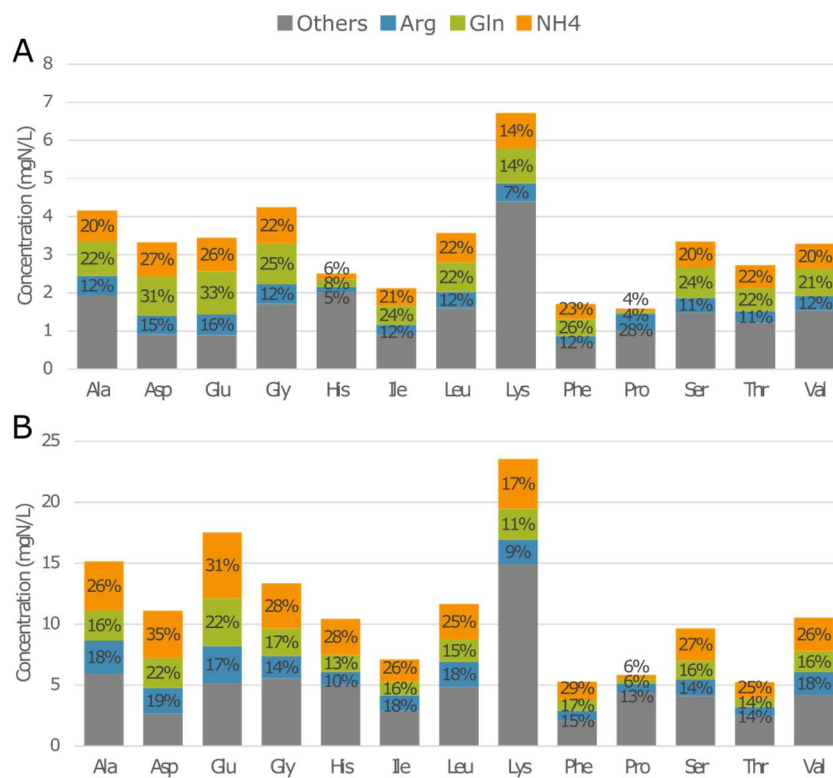


Figure 3: Amount of labelled nitrogen recovered into proteinogenic amino acid (in mgN/L) at the end of the fermentation (EF) for *M. pulcherrima* (A) and *T. delbrueckii* (B). Labels indicates the proportion of labelled nitrogen from the different sources into the proteinogenic amino acids.

By combining data from the three <sup>15</sup>N-labelling experiments, we obtained a comprehensive picture of the nitrogen distribution into proteinogenic amino acids from the main nitrogen sources in the medium, and the contribution of the *de novo* synthesis to proteinogenic amino acids against direct incorporation (Figure 3). Irrespectively of the labelled nitrogen source used, labelled nitrogen was recovered into all the proteinogenic amino acids measured, even if the amount of amino acids consumed was greater than the anabolic requirements. This is

true for leucine of which more than 56% was synthesized *de novo* by *M. pulcherrima* while this specie assimilated a higher amount of leucine than its needs for protein synthesis (Figure 2). Interestingly, the ratio between the amount of nitrogen originating from arginine, from ammonium and from glutamine was similar in all the proteinogenic amino acids, with only a few exceptions. Furthermore, no correlation was found comparing the ratio between the consumption of amino acids and its proteinogenic content on one hand, and their enrichment pattern on the other hand. From this data set, taking into account the contribution of nitrogen from other amino acids to the *de novo* synthesis, it appeared that 62 and 76% of *M. pulcherrima* and *T. delbrueckii* proteinogenic amino acids were newly synthesized from a common nitrogen pool. These observations reflected an important *de novo* synthesis of proteinogenic amino acids combined with a redistribution of nitrogen from consumed amino acids, as previously observed with *S. cerevisiae* (Crépin et al., 2017).

The part of *T. delbrueckii* proteinogenic amino acids originating from the consumption of ammonium, glutamine and arginine ranged between 17 and 33%, 13 and 22% and 10 and 19% respectively. *M. pulcherrima* showed differences in this distribution, as the part of isotopic enrichment from ammonium, glutamine and arginine varied from 6 to 26%, 21 to 33% and 21 to 33% respectively. These observations reflected the preferential consumption of glutamine by *M. pulcherrima* compared with ammonium and the efficient uptake of ammonium by *T. delbrueckii*.

Exceptions to this general pattern first concerned histidine and lysine. The first specificity to be highlighted for both the NS species was the low incorporation of arginine, glutamine and ammonium in proteinogenic lysine (below 37 %), compared with the other amino acids (more than 53 %). This observation reflected a poor *de novo* synthesis of proteinogenic lysine through the general pattern involving the intracellular nitrogen pool via transamination reactions. Furthermore, a direct incorporation of consumed lysine (2.3 mg/L) was not sufficient to cover the anabolic requirements for *T. delbrueckii* and *M. pulcherrima*, for which lysine accounted for an important fraction of proteins (7 % for both strains, Figure 3). This suggests a specific pathway for lysine synthesis in these strains. We also observed differences in the labeling pattern of proteinogenic histidine, suggesting differences in the metabolic origin of proteinogenic histidine between *T. delbrueckii* and *M. pulcherrima*. Indeed, at least 52% of proteinogenic histidine was *de novo* synthesized using nitrogen from ammonium,

arginine and glutamine in *T. delbrueckii*, while a very limited fraction (19 %) of nitrogen from these sources was redistributed toward histidine in *M. pulcherrima*. Differences must be seen in correlation with the anabolic requirements for histidine, more than 4 times higher in *T. delbrueckii* than in *M. pulcherrima*. Thus, direct incorporation of histidine covered most of the anabolic requirements in *M. pulcherrima* but not in *T. delbrueckii*.

Apart from arginine, glutamate and aspartate were the proteinogenic amino acids in which the proportion of labelled nitrogen recovered was the highest. It represented 75% and 70% of the total amount of proteinogenic glutamate and 73% and 76% of the total amount of proteinogenic aspartate for *M. pulcherrima* and *T. delbrueckii* respectively. For *M. pulcherrima*, the highest enrichment of these compounds was obtained with labelled glutamine (31 and 33% of aspartate and glutamate), while it was obtained with labelled ammonium for *T. delbrueckii* (35 and 31% of aspartate and glutamate). In both cases, these results show that glutamine and aspartate are important compounds in the nitrogen metabolism of these strains, as molecules involved in the nitrogen central core.

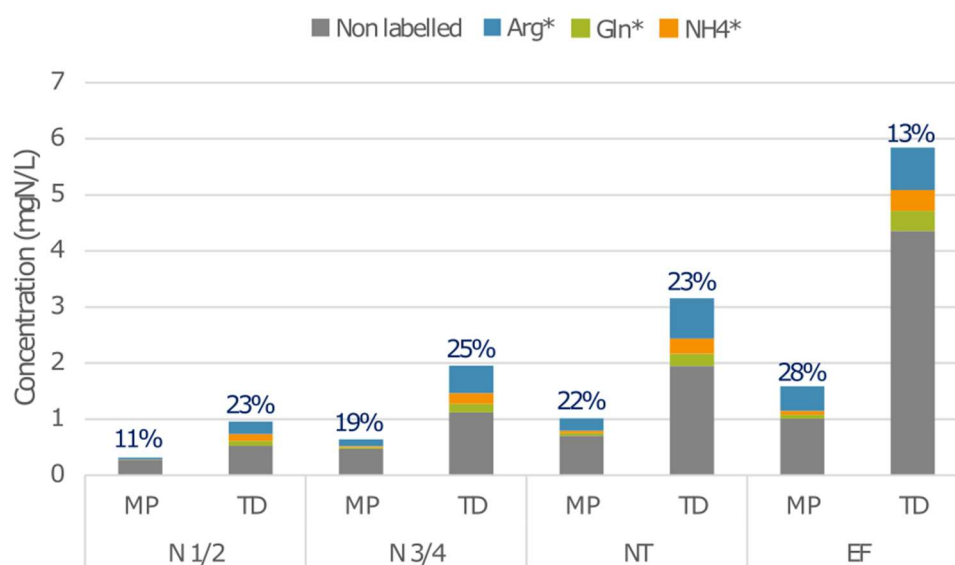


Figure 4: Concentrations of labelled and non-labelled proteinogenic proline during the fermentation for *M. pulcherrima* (MP) and *T. delbrueckii* (TD). Labelled nitrogen provided by arginine (Arg\*), glutamine (Gln\*) or ammonium (NH<sub>4</sub>\*). N 1/2: half of initial nitrogen consumed; N 3/4: 3/4 of initial nitrogen consumed; NT: end of growth phase; EF: end of fermentation.

The incorporation pattern of labelled nitrogen in proteinogenic proline was also different from the others amino acids (Figure 4). Only 25% for *T. delbrueckii* and 36% for *M. pulcherrima* of nitrogen from arginine, ammonium and glutamine were found in proteinogenic proline, with

a predominant amount of nitrogen from arginine at the expense of the two other nitrogen sources. The proportion of nitrogen from labelled arginine increased during the fermentation with *M. pulcherrima* to reach 28% of proteinogenic proline at the end of the fermentation. On the contrary, for *T. delbrueckii*, this proportion remained stable at 25% of proteinogenic proline during the growth phase, and decreased to 13% at the end of the fermentation. These data first revealed a limited de novo synthesis of proline for both the strains, suggesting a substantial contribution of direct incorporation in proteins of consumed proline. Furthermore, the labeling pattern of proteinogenic proline of *M. pulcherrima* and *T. delbrueckii* reflected their profile of arginine consumption, with an early arginine uptake by *T. delbrueckii* and, at the opposite, a delayed arginine assimilation by *M. pulcherrima* (Figure 1).

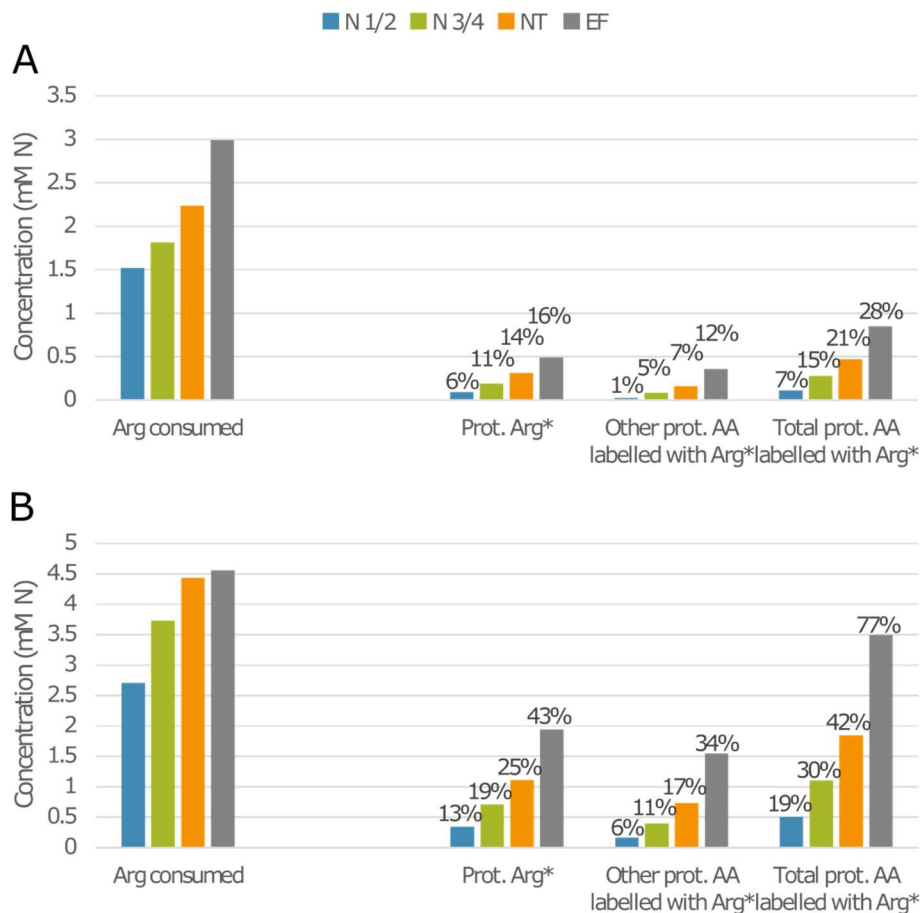


Figure 5: Fate of labelled arginine among the proteinogenic amino acids for *M. pulcherrima* (A) and *T. delbrueckii* (B). Concentrations are expressed as mM of nitrogen. Labels indicate the percentage of consumed arginine recovered into the different categories (in labelled proteinogenic arginine or other proteinogenic amino acids). N 1/2: half of initial nitrogen consumed; N 3/4: 3/4 of initial nitrogen consumed; NT: end of growth phase; EF: end of fermentation.

The repartition of consumed arginine was different from those of glutamine and ammonium that were efficiently catabolized as soon as they entered the cells. As a consequence, the nitrogen from ammonium and glutamine was used for de novo synthesis of proteinogenic amino acids and recovered in proteins in the early stages of growth. First, the enrichment percentage of proteinogenic arginine was high on medium containing labelled arginine (94% for *M. pulcherrima* and 87% for *T. delbrueckii* at the end of the fermentation, Supplementary data 2). This observation demonstrated that the main metabolic origin of proteinogenic arginine is a direct incorporation of consumed arginine. However, this fate represented only 6% of nitrogen provided by the consumption of arginine during the growth phase (N 1/2) and 16% at the end of the fermentation for *M. pulcherrima*, 13% at N 1/2 to 43% at the end of the fermentation for *T. delbrueckii* (Figure 5). The amount of arginine catabolised and

incorporated into others proteinogenic amino acid was extremely low during the first stages of growth (1 % and 6% at half nitrogen consumption for *M. pulcherrima* and *T. delbrueckii*, respectively), but progressively increased to reach 12% of consumed nitrogen from arginine for *M. pulcherrima* and 34% for *T. delbrueckii* during the stationary phase. Thus, a large part of consumed arginine was not recovered into proteinogenic amino acids. The remaining arginine could have been stored intracellularly at the beginning of the fermentation to be used during the later stages of the fermentation as shown with *S. cerevisiae* (Crépin et al., 2014). Indeed, the concentration of labelled nitrogen recovered into proteinogenic amino acids increased at the end of the fermentation for *T. delbrueckii* to reach 77% of consumed arginine. This phenomenon was also seen for *M. pulcherrima* even if less marked, the proportion of consumed arginine recovered into proteins being only of 28%.

### 3.2. Influence of the CCM to the production of carbon skeleton for amino acids

<sup>13</sup>C-labelled molecules of leucine and valine were used in fermentation to compare the fate of their carbon skeleton in two species. The experimental design we implemented allowed to quantify the relative contribution of the *de novo* synthesis to proteinogenic leucine and valine versus the direct incorporation of their consumed counterparts, but also to assess the part of volatile compounds originated from the catabolism of these amino acids.

Leucine and valine were totally consumed by both yeasts strains, with an earlier consumption for leucine than valine (Supplementary data 1). The amount of labelled carbon in proteinogenic leucine and valine was measured to determine the proportion of consumed leucine and valine directly incorporated into their respective proteinogenic amino acids (Figure 6).



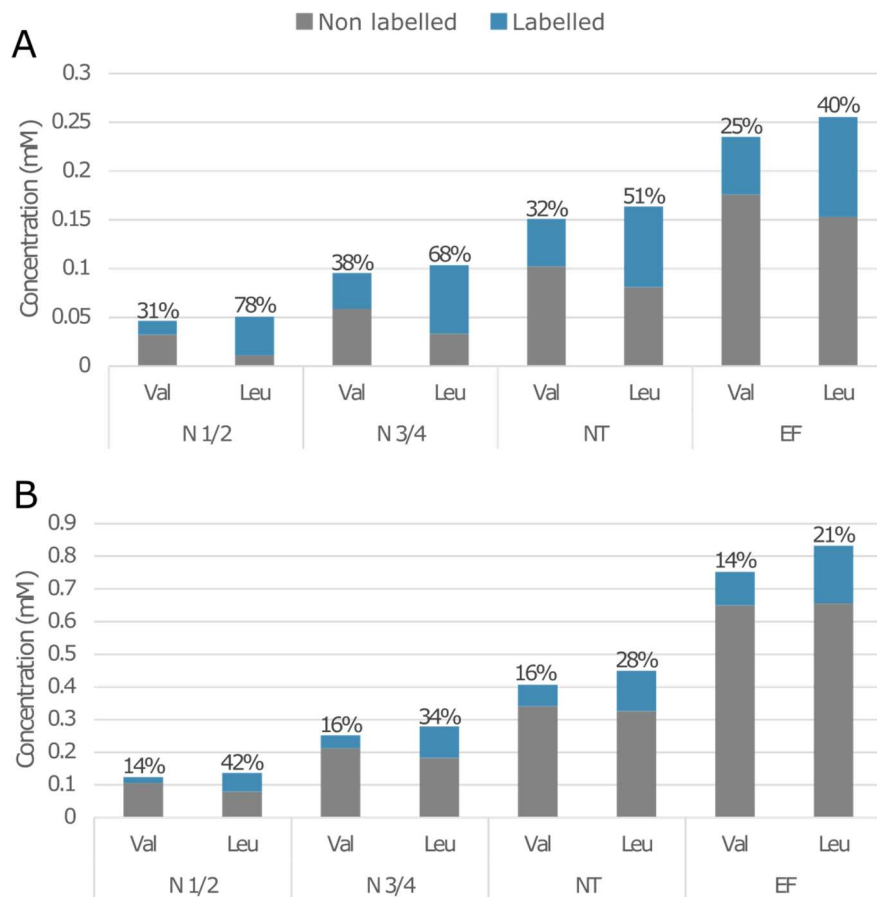


Figure 6: Amount of labelled proteinogenic valine and leucine recovered in fermentation with the corresponding labelled amino acids for *M. pulcherrima* (A) and *T. delbreuckii* (B). Percentages indicate the proportion of labelled amino acids over its total concentration. N 1/2: half of initial nitrogen consumed; N 3/4: 3/4 of initial nitrogen consumed; NT: end of growth phase; EF: end of fermentation.

Important variations in the origin of carbon skeleton of proteinogenic leucine and valine were observed depending on the strain and the nature of amino acid. First, we showed a low isotopic enrichment of proteinogenic valine throughout the fermentation, which indicates a limited direct incorporation of consumed valine into proteins (under 25% and 14% at the end of the fermentation for *M. pulcherrima* and *T. delbrueckii* respectively), and an important contribution of *de novo* synthesis via precursors from the CCM. However, incorporation profiles are different between the two studied strains. The enrichment percentage stayed constant around 14% during the fermentation for *T. delbrueckii*. For *M. pulcherrima*, the enrichment percentage was higher, between 31 and 38% in growth phase, and decreased to 25% at the end of the fermentation. These evolutions have to be regarded in relation with the profile of consumption of this amino acid by the two species, that remained lower than the

anabolic requirements during *T. delbrueckii* fermentation, but not during *M. pulcherrima* fermentation.

The enrichment percentage of consumed leucine into proteins was higher than for valine for both species, with 40% and 21% of enrichment for *M. pulcherrima* and *T. delbrueckii* respectively at the end of the fermentation. However, the contribution of the CCM is still the main source of carbon skeleton for the synthesis of proteinogenic leucine, except for *M. pulcherrima* during the growth phase. Thus, *M. pulcherrima* needs for proteinogenic leucine were covered at 78% at N<sub>1/2</sub> and 68% at N<sub>3/4</sub> by direct incorporation of consumed leucine. This high incorporation of leucine is likely related to its early consumption during growth. The percentage then decreased in the later stages of the fermentation, in parallel with the lowering of leucine consumption. During *T. delbrueckii* fermentation, the profile of leucine isotopic enrichment followed the same pattern, but with a smaller range of variations. This may be explained by the higher anabolic requirements of *T. delbrueckii*, compared with *M. pulcherrima*, which resulted in a larger *de novo* synthesis of leucine from unlabelled precursors of the CCM, even if the species incorporated in proteins similar absolute amounts of labelled leucine.

### 3.3. Fate of valine and leucine carbon skeleton during fermentation

Valine and leucine are two amino acids directly catabolised through the Ehrlich pathway, leading to the production of higher alcohols, acetate esters, branched-chain fatty acids and their derivatives ethyl esters. To further analyse the fate of consumed leucine and valine within the cells, we measured the isotopic enrichment of the volatile compounds deriving from leucine and valine assimilation through the Ehrlich pathway, in addition to that of their proteinogenic counterparts (Figure 7 and Figure 8).

An important fraction of consumed leucine was incorporated into proteinogenic leucine for both yeasts (Figure 7). The part of consumed leucine directed toward its corresponding proteinogenic amino acid was of 39% for *M. pulcherrima* and 68% for *T. delbrueckii* at the end of the fermentation. Interestingly, the proportion of consumed leucine directed toward the production of isoamyl alcohol, calculated from mass and isotopic balances, was higher in *M. pulcherrima* (6% of consumed leucine) than in *T. delbrueckii* (2%). It confirms that the repartition of the flux of consumed leucine differ between the two species, leading mostly to the incorporation into proteins for *T. delbrueckii*, while a larger part is catabolized through the

rest of the metabolism for *M. pulcherrima*. The isotopic enrichment of isoamyl alcohol during *M. pulcherrima*, of over 11%, was particularly high compared with those measured with *T. delbrueckii* or previously reported with *S. cerevisiae* fermentations (Crépin et al., 2017b). Thus, a substantial fraction of isoamyl alcohol produced by *M. pulcherrima* originated from consumed leucine, indicating that the leucine availability in the medium may directly affect the formation of isoamyl alcohol during *M. pulcherrima* fermentations. A small fraction of consumed leucine was found into isobutanol, mainly with *M. pulcherrima* representing 5% of consumed leucine.

The analysis of the compounds presented here allow to recover 72% of the consumed leucine by *T. delbrueckii* and only 50% of consumed leucine by *M. pulcherrima*. This suggests that a fraction of leucine may be stored or converted into others compounds.

The incorporation into proteinogenic valine represented 22% of consumed valine for *M. pulcherrima* and 38% for *T. delbrueckii* (Figure 8). This difference between species was related to the different pattern of valine consumption between the strains and their different anabolic requirements throughout the fermentation (Figure 2). It also underlined the important part of catabolism in the fate of amino acids in the cells.

The catabolism of valine through the Ehrlich pathway accounted for a large part of the fate of this amino acids for the two studied species. For *M. pulcherrima*, a large part of consumed valine (> 37.3%) was directed toward the production of volatile compounds deriving from  $\alpha$ -ketoisovalerate (isobutanol, isobutyric acid, isobutyl acetate). For this strain, the enrichment percentage of isobutanol was between 33 and 40% during the growth phase, and decreased to 16% during the stationary phase, as the result of the 3-time increase in the production of isobutanol. Consequently, 16% of isobutanol was directly produced by the catabolism of consumed valine at the end of the fermentation. For this specie, results showed that the conversion between  $\alpha$ -ketoisovalerate and  $\alpha$ -ketoisocaproate was quite low (6%), which led to a low contribution of valine to the production of isoamyl alcohol (2%) and proteinogenic leucine (4%).

The distribution of flux through the metabolic network from consumed valine in *T. delbrueckii* was different. In this species, most of  $\alpha$ -ketoisovalerate produced from the catabolism of consumed valine was directed toward the production of  $\alpha$ -ketoisocaproate (18%) at the

expense of the formation of volatile compounds, isobutanol and isobutyric acids, which accounted only for 1% and 7% of the consumed leucine. Moreover, it is noteworthy that the production of isobutyric acid was favoured in this specie. Furthermore, an important fraction of  $\alpha$ -ketoisocaproate from valine assimilation was directed toward the production of proteinogenic leucine (15% of consumed valine), while the formation of isoamyl alcohol was limited (3% of consumed valine). Overall, these observations reflected that the management of amino acids by *T. delbrueckii* is mainly directed toward the amino acid production.

## 4. Discussion

Nitrogen is a notably important nutrient in fermentation. Indeed, it is a key component of biomass as proteins and it participates in the formation of aroma compounds involved in the organoleptic properties of wines. Nitrogen is available under different forms in grape must, mainly as amino acids and ammonium. Few information is available concerning the nitrogen metabolism by non-*Saccharomyces* species, because these yeast were considered spoilage and thus not as studied as *S. cerevisiae*. The preferred and non-preferred nitrogen sources of several non-*Saccharomyces* strains were studied (Gobert et al., 2017; Kemsawasd et al., 2015; Su et al., under review) and the presence of the NCR regulation mechanism was identified in *Hanseniaspora vineae* (Lleixà et al., 2018).

Here we reported differences in the pattern of nitrogen consumption of two wine strains of non-*Saccharomyces* species: *M. pulcherrima* Flavia® and *T. delbrueckii* Biodiva®. First, that the inability of *M. pulcherrima* to consume 300 mg/L of nitrogen (consumption of 157 mg/L representing 53% of the initial YAN) must be balanced against the *T. delbrueckii* capacity to exhaust all the available nitrogen resource. These strains also differed in the order of consumption of nitrogen sources, with a preferential consumption of valine by *M. pulcherrima*, while *T. delbrueckii* was characterised by an earlier uptake of arginine, in comparison with other yeast species. These specificities, in agreement with a recent work of Su et al. (2020) indicate that the mechanisms controlling the nitrogen sources assimilation varied between the two species and with *S. cerevisiae*, but they remained to be elucidated.

Once nitrogen sources entered into the cells, amino acids can be directly incorporated into proteinogenic amino acids, or be catabolized to release nitrogen as ammonium or glutamate and ketoacids. Using labelled molecules of arginine, glutamine and ammonium, the

management and the redistribution of nitrogen from these three most abundant nitrogen sources of grape juice were investigated. As what was observed with *S. cerevisiae*, consumed nitrogen was mostly catabolized to be used in the *de novo* biosynthesis of proteinogenic amino acids. Thus, nitrogen provided by ammonium and glutamine were recovered in all the proteinogenic amino acids, at an average level of 21 and 19% of the total concentration of proteinogenic amino acids for *M. pulcherrima* and 15 and 25 % for *T. delbrueckii*, for labelled glutamine and ammonium respectively. However, specificities have to be pointed out. Previous study showed that *S. cerevisiae* uses glutamine and ammonium in the same way for proteins synthesis (Crépin et al., 2017). In our study, *T. delbrueckii* used preferentially for the *de novo* synthesis of amino acids the nitrogen from ammonium at the expense of that of glutamine. This observation suggested differences between *S. cerevisiae* and *T. delbrueckii* in the management of intracellular pools of ammonium, glutamine and glutamate, that would reflect *T. delbrueckii* specificities in the regulation of the nitrogen central core. On the contrary, *M. pulcherrima* showed a low incorporation of nitrogen from ammonium in proteins. This limited use of ammonium as nitrogen donor for proteinogenic amino acids synthesis is most likely associated with the weak capacity of *M. pulcherrima* to uptake this nitrogen source (consumption two-time lower than that of *S. cerevisiae* and *T. delbrueckii*).

Regarding the third major nitrogen source, we found that most of the proteinogenic arginine originated from consumed arginine for both strains. The metabolic origin of arginine in *M. pulcherrima* and *T. delbrueckii* was similar to that reported for *S. cerevisiae*. However, the isotopic enrichment of proteinogenic arginine measured in *M. pulcherrima* and *T. delbrueckii*, from 87% to 94%, depending on the fermentation stage, was slightly lower than that previously reported *S. cerevisiae*, which remained constant at 98% throughout the fermentation (Crépin et al., 2017). Furthermore, labelling nitrogen were found into proteinogenic arginine during fermentations carried out in presence of <sup>15</sup>N-glutamine or <sup>15</sup>N-ammonium. This indicate that the *de novo* synthesis of arginine by the *ArgR/Mcm1* pathway, that leads to the production of ornithine, citrulline and arginine from glutamine and glutamate, is not totally repressed by the intracellular concentration of arginine in *M. pulcherrima* and *T. delbrueckii* (Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012).

A part of consumed arginine was not recovered into proteins: only 77% and 28% of consumed arginine were found into proteinogenic amino acids for *T. delbrueckii* and *M. pulcherrima*

respectively. Several elements suggest that a part of the consumed arginine is stored in cells. The cell growth of *M. pulcherrima* being limited, its needs in nitrogen are lower than those of *S. cerevisiae* or *T. delbrueckii*. Consequently, the catabolism of arginine, quite costly in ATP, co-factors and NADPH, is unnecessary as other nitrogen sources are available. Concerning *T. delbrueckii*, an increase in the proportion of labelled nitrogen from consumed arginine in the proteinogenic amino acids is observed at the end of the fermentation when all nitrogen sources in the medium are depleted. This result could indicate a remobilization of previously stored arginine.

Overall, compared with the other amino acids, the fraction of proteinogenic histidine and leucine *de novo* synthesized is low, as shown by the weak isotopic enrichment of these compounds measured throughout fermentations carried out in presence of labeled ammonium, glutamine or arginine. This difference could be due to a higher direct incorporation of their counterparts taken from the medium in proteins. The inability of the two NS species to use histidine to support their growth has been previously demonstrated (Su et al., 2020). This work also reported that *T. delbrueckii* displayed a reduced fermentative activity when lysine was provided as sole nitrogen source, while *M. pulcherrima* was unable to grow under these conditions. These observations suggested that *M. pulcherrima* and *T. delbrueckii* are not able to catabolise lysine and histidine, as it has been already shown for *S. cerevisiae* (Brunke et al., 2014; Ye et al., 1991). The high concentration of lysine in proteinogenic amino acids and the quick consumption of this amino acid by both yeasts could indicate a high demand of this amino acids, and Thus the direct incorporation into proteins of the consumed lysine and histidine could be more beneficial for the yeast than a *de novo* synthesis of these molecules, which is energy and co-factors consuming (Zabriskie and Jackson, 2000; Alifano et al., 1996) and was preferentially used in *T. delbrueckii* and *M. pulcherrima*. However, the consumed amounts were not sufficient to meet the anabolic requirements, important in these species, and a small fraction of proteinogenic lysine and histidine were still *de novo* synthesized. However, these comments must be lessened in the case of the metabolic origin of histidine in *T. delbrueckii*, for which the isotopic enrichment was higher, suggesting more efficient or alternative pathways for histidine metabolism.

Isotope tracers experiments using  $^{13}\text{C}$ -labeled valine and leucine allowed to elucidate, at least in part, the fate of consumed valine and leucine in *M. pulcherrima* and *T. delbrueckii*, showing

a general pattern similar to that of *S. cerevisiae* (Crépin et al. 2017), with a substantial contribution of catabolism. However, the partitioning and the fate of consumed leucine and valine in the metabolic network differed between the two strains and with *S. cerevisiae*, reflecting a different management of nitrogen resources.

First, important production yields of isobutanol and isoamyl alcohol were found during *M. pulcherrima* fermentations, combined with a higher isotopic enrichment in these volatile molecules compared with those measured with *S. cerevisiae* and *T. delbrueckii*. These observations showed that the consumed amino acids were mainly directed toward the catabolism in this strain. This behaviour is consistent with the limited growth of *M. pulcherrima* during wine fermentation, and consequently, to its low anabolic requirements in terms of amino acids. The first consequence was the decrease in the formation of keto-acids from the CCM as precursors of de novo synthesis of amino acids by this strain, as shown by the higher isotopic enrichment of volatile molecules produced by this strain (10 %) compared to that measured during *S. cerevisiae* or *T. delbrueckii* wine fermentations (1%). Then, the formation of volatile molecules through the Ehrlich pathway is likely an efficient way to eliminate keto-acids, toxic compounds for the yeasts (Swiegers et al., 2005). The substantial contribution of the catabolism of leucine and valine to the production of volatile compounds by *M. pulcherrima* is of technological interest. Therefore, it would be possible to consider the modulation of these compounds by the nitrogen nutrition management of *M. pulcherrima*, used in combination with *S. cerevisiae* (mixed or sequential inoculation). Finally, the low isotopic enrichment measured in proteinogenic leucine and isoamyl alcohol during *M. pulcherrima* fermentation in presence of labeled valine revealed a limited capacity of this strain to convert  $\alpha$ -ketoisovalerate into  $\alpha$ -ketoisocaproate. It may be explained by a deficit in acetyl-coA in this strain, which is used as co-substrate in the first step of the conversion of  $\alpha$ -ketoisovalerate into  $\alpha$ -ketoisocaproate by *LEU4* and *LEU9* (Bell and Henschke, 2005). We already assumed that the intracellular availability of acetyl-CoA was limited in this strain, because of its low ability to produce acetate, acetate esters, medium-chain fatty acids and their ethyl esters derivatives (Chapter 1-II).

The behaviour of *T. delbrueckii*, in agreement with the efficient and important growth capacities of this strain, was quite different. Accordingly, this species displayed low productions of volatile compounds, and the labelling provided by valine or leucine was mainly

recovered in proteinogenic counterparts, at the expense of higher alcohols. This fluxes partitioning revealed that *T. delbrueckii* showed an optimal management of nitrogen resources to fulfill anabolic requirements, mainly directed the consumed nitrogen sources toward the formation of proteins.

Drawing up mass and isotopic balances revealed that only 72% and 64% of the labelling provided by consumed leucine and valine were recovered in the measured compounds (proteinogenic amino acids, higher alcohols, acetate esters, branched acids) during *T. delbrueckii* fermentation, respectively. Recovered fraction of 50% and 65% were obtained with *M. pulcherrima* fermentations. First, the lost by stripping and evaporation of a fraction of the analysed compounds has to be taken into account to explain these observations (Mouret et al., 2014). Indeed, up to 0.7% of isoamyl alcohol and 21% of isoamyl acetate can be lost by evaporation at 24°C, temperature at which the fermentations were done. In addition to these analytical limitations, other metabolic routes may be considered for the assimilation of valine and leucine, leading to the production of metabolites we did not analysed in this work. The catabolism of these amino acids could also provide carbon for the production of compounds not measured in this study. A previous study investigating the production of volatile compounds on sole nitrogen sources showed that *M. pulcherrima* produce a high concentration of propyl acetate and ethyl propionate when fermenting only with leucine as a nitrogen source (Chapter 1-II). These compounds were not produced in our conditions, and the enrichment of propanol, formed through the same pathway was under 1%. Labeled atoms could also have been redirected toward other metabolic pathways linked to valine and leucine degradation in other organisms, as the biosynthesis of terpenoid backbone through the mevalonate pathway, connected to leucine degradation in archaea, eukaryote and bacteria (Buhaescu and Izzedine, 2007; VanNice et al., 2014). The degradation of valine and leucine can also provide precursors for the biosynthesis of macrolides, molecules with antibiotic activity such as erythromycin, in bacteria and fungi (Hertweck, 2009; Xue et al., 1998). Finally, leucine and valine could be stored in the cells without being degraded, as suspected for arginine.

The nitrogen metabolism of *M. pulcherrima* and *T. delbrueckii* was investigated using  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$ -labelled molecules. Results show that consumed nitrogen sources are mainly catabolised to be used for the novo synthesis of amino acids, apart from arginine that is directly



incorporated into proteins. Differences between the strains has been observed, as *T. delbrueckii* used preferentially ammonium over glutamine, while the incorporation of ammonium was low in *M. pulcherrima*. The fate of valine and leucine also differed between the two species. In *M. pulcherrima*, amino acids are directed toward catabolism, producing high amount of ketoacids subsequently transformed into higher alcohols. The management of nitrogen was more efficient in *T. delbrueckii*, with most of the amino acids directed toward the formation of proteins. These results are of interest to understand the nitrogen metabolism of *M. pulcherrima* and *T. delbrueckii* and their specificities, to enhance their use in fermentation.

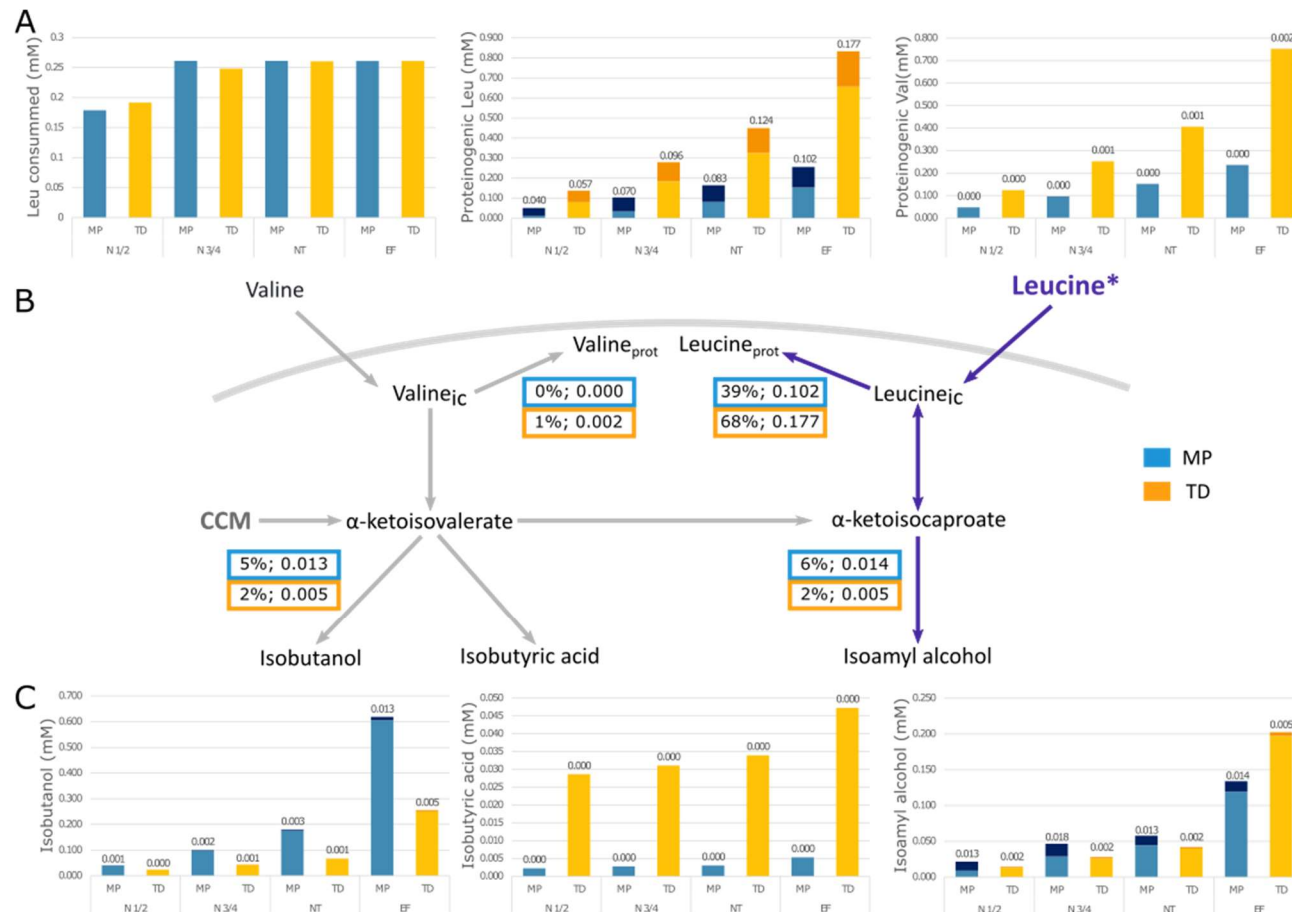


Figure 7: Repartition of carbon from leucine through the metabolism of *M. pulcherrima* and *T. delbrueckii*. A: Concentrations (mM) of consumed leucine, proteinogenic leucine and proteinogenic valine. B: Fluxes of consumed leucine through the metabolism in percentage of consumed leucine and in mM at the end of the fermentation. C: Concentrations (mM) of produced isobutanol, isobutyric acid and isoamyl alcohol. Blue bars: *M. pulcherrima*, yellow bars: *T. delbrueckii*, light colors: non-labelled concentration, dark colors: labelled concentrations, labels over the bars indicate the concentration in mM of the labelled part of each compounds. N 1/2: half of initial nitrogen consumed; N 3/4: 3/4 of initial nitrogen consumed; NT: end of growth phase; EF: end of fermentation.

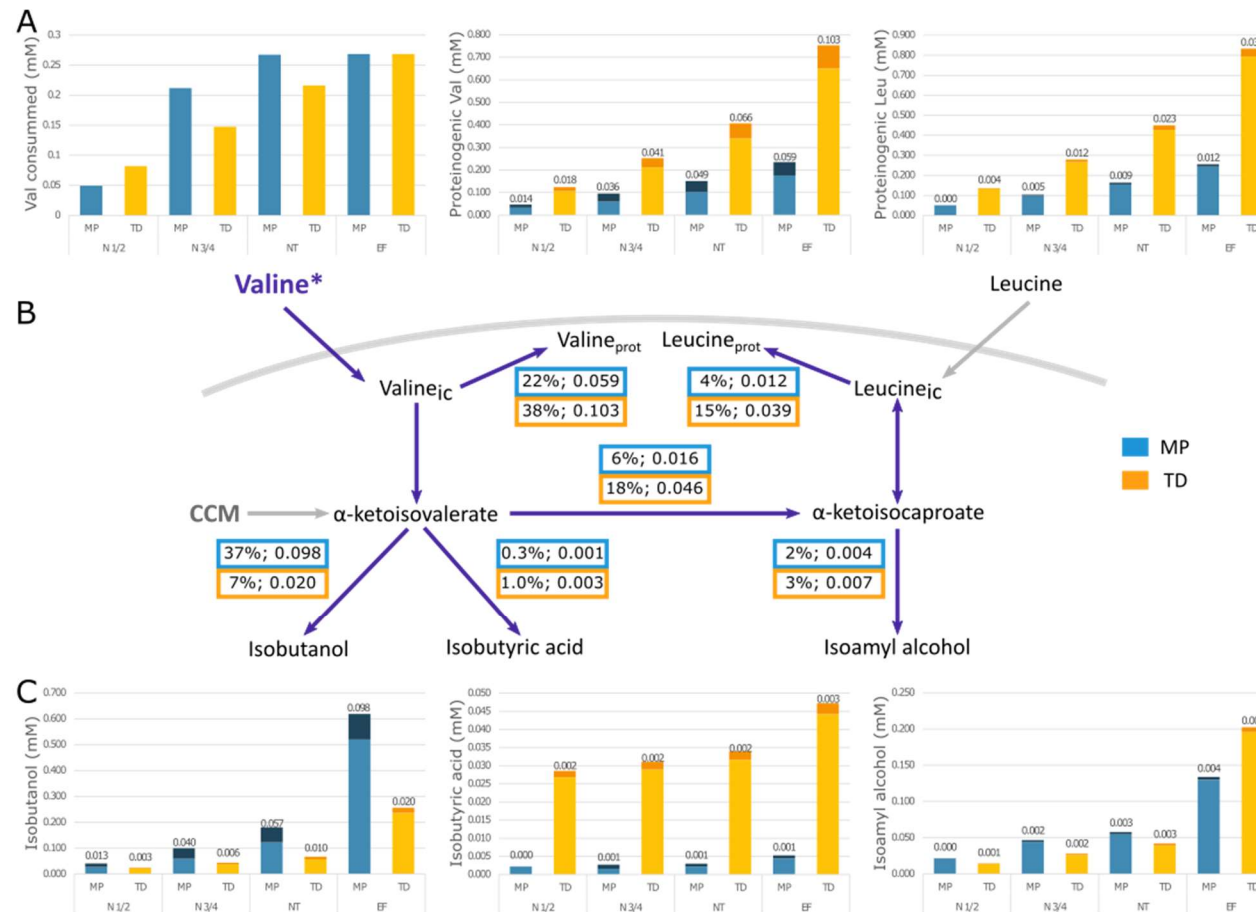


Figure 8: Repartition of carbon from valine through the metabolism of *M. pulcherrima* and *T. delbrueckii*. A: Concentrations (mM) of consumed valine, proteinogenic valine and proteinogenic leucine. B: Fluxes of consumed valine through the metabolism in percentage of consumed valine and in mM at the end of the fermentation. C: Concentrations (mM) of produced isobutanol, isobutyric acid and isoamyl alcohol. Blue bars: *M. pulcherrima*, yellow bars: *T. delbrueckii*, light colors: non-labelled concentration, dark colors: labelled concentrations, labels over the bars indicate the concentration in mM of the labelled part of each compounds. N 1/2: half of initial nitrogen consumed; N 3/4: 3/4 of initial nitrogen consumed; NT: end of growth phase; EF: end of fermentation.

## 5. Supplementary data

Supplementary data 1: Nitrogen sources concentration (in mgN/L) in the must and consumed by *M. pulcherrima* or *T. delbrueckii* during the fermentation. N ½: half of initial nitrogen consumed; N ¾: ¾ of initial nitrogen consumed; NT: end of growth phase; EF: end of fermentation.

	<i>M. pulcherrima</i>					<i>T. delbrueckii</i>			
	Must	N 1/2	N 3/4	NT	EF	N 1/2	N 3/4	NT	EF
Ala	16.1	0.9	1.4	2.1	2.5	6.3	10.1	13.5	16.1
Arg	63.8	21.3	25.4	31.4	41.9	37.9	52.2	62.1	63.8
Asp	3.3	0.3	0.5	0.7	0.8	2.6	3.3	3.3	3.3
Cys	1.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.7	1.1	1.1	1.1
Gln	68.4	21.9	36.2	46.5	54.3	33.5	55.7	65.8	68.4
Glu	8.1	4.0	4.9	5.7	6.2	5.5	6.3	7.1	8.1
Gly	2.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	2.3
His	2.1	0.9	1.4	1.7	1.9	0.4	0.5	0.8	2.1
Ile	3.5	1.9	3.5	3.5	3.5	2.0	3.2	3.5	3.5
Leu	3.7	2.5	3.7	3.7	3.7	2.7	3.5	3.6	3.7
Lys	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3
Met	2.1	0.8	1.2	1.4	1.7	2.0	2.1	2.1	2.1
NH4	85.6	5.2	11.5	16.9	22.2	42.7	61.7	80.5	85.6
Phe	2.3	0.2	0.3	0.4	0.6	1.1	1.8	2.1	2.3
Ser	7.4	0.8	1.4	2.0	2.5	4.7	6.6	7.3	7.4
Thr	3.7	0.0	0.0	0.0	0.0	1.4	3.2	3.6	3.7
Trp	14.9	8.3	9.2	9.6	10.0	9.2	10.3	11.3	14.9
Tyr	1.0	0.1	0.1	0.2	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
Val	3.8	0.7	3.0	3.7	3.8	1.1	2.1	3.0	3.8

Supplementary data 2: Concentrations (in mgN/L) of labelled nitrogen recovered into proteinogenic amino acid (in mgN/L) at the end of the fermentation.

		Arg*				Gln*				NH4*				Non labelled			
		N 1/2	N3/4	NT	EF	N 1/2	N3/4	NT	EF	N 1/2	N3/4	NT	EF	N 1/2	N3/4	NT	EF
<i>M. pulcherrima</i>	Ala	0.02	0.12	0.27	0.51	0.23	0.43	0.63	0.91	0.05	0.26	0.48	0.82	0.52	0.88	1.30	1.93
	Arg	1.27	2.70	4.35	6.88	0.19	0.38	0.60	0.93	0.19	0.37	0.59	0.96	0.00	0.00	0.00	0.00
	Asp	0.03	0.12	0.22	0.49	0.23	0.45	0.70	1.02	0.06	0.27	0.51	0.91	0.33	0.51	0.70	0.91
	Glu	0.04	0.14	0.21	0.55	0.28	0.52	0.80	1.13	0.08	0.28	0.45	0.88	0.27	0.46	0.74	0.89
	Gly	0.06	0.14	0.27	0.51	0.26	0.49	0.73	1.06	0.09	0.30	0.57	0.96	0.43	0.80	1.16	1.72
	His	0.01	0.05	0.08	0.13	0.02	0.08	0.13	0.20	0.01	0.05	0.09	0.16	0.45	0.84	1.31	2.02
	Ile	0.01	0.05	0.10	0.25	0.09	0.21	0.33	0.50	0.02	0.11	0.25	0.45	0.30	0.50	0.67	0.92
	Leu	0.01	0.08	0.17	0.42	0.12	0.30	0.50	0.78	0.03	0.17	0.40	0.77	0.55	0.90	1.21	1.60
	Lys	0.01	0.11	0.20	0.48	0.12	0.36	0.60	0.92	0.04	0.28	0.53	0.93	1.15	1.98	2.99	4.40
	Phe	0.01	0.04	0.09	0.20	0.10	0.21	0.31	0.45	0.02	0.12	0.23	0.39	0.21	0.33	0.47	0.67
	Pro	0.04	0.12	0.23	0.44	0.00	0.03	0.04	0.07	0.00	0.02	0.04	0.07	0.28	0.47	0.71	1.01
	Ser	0.04	0.10	0.13	0.38	0.20	0.35	0.55	0.80	0.07	0.24	0.46	0.68	0.35	0.67	1.00	1.50
	Thr	0.03	0.07	0.14	0.30	0.15	0.28	0.43	0.61	0.05	0.17	0.34	0.60	0.31	0.58	0.84	1.22
Val	0.01	0.07	0.16	0.38	0.13	0.28	0.46	0.71	0.03	0.15	0.35	0.66	0.48	0.84	1.15	1.54	
<i>T. delbrueckii</i>	Ala	0.25	0.67	1.22	2.72	0.47	0.96	1.39	2.48	0.72	1.41	2.41	4.01	1.04	2.02	3.14	5.93
	Arg	4.83	9.96	15.51	27.23	0.67	1.41	2.36	4.26	0.67	1.38	2.43	4.37	0.00	0.00	0.00	0.00
	Asp	0.21	0.50	0.95	2.10	0.47	1.00	1.51	2.46	0.70	1.37	2.25	3.88	0.45	0.86	1.29	2.67
	Glu	0.35	0.89	1.48	3.05	0.84	1.67	2.29	3.92	1.02	1.99	3.49	5.39	0.67	1.33	2.21	5.16
	Gly	0.19	0.44	0.84	1.84	0.39	0.83	1.31	2.26	0.58	1.18	2.00	3.70	1.04	2.01	3.04	5.55
	His	0.15	0.35	0.61	1.06	0.30	0.62	0.92	1.41	0.68	1.33	2.00	2.93	0.58	1.18	2.09	5.03
	Ile	0.11	0.27	0.55	1.28	0.21	0.45	0.69	1.11	0.32	0.63	1.05	1.86	0.53	1.03	1.56	2.88
	Leu	0.17	0.43	0.89	2.09	0.31	0.69	1.07	1.79	0.47	0.97	1.63	2.94	0.97	1.82	2.70	4.85
	Lys	0.20	0.50	0.99	2.00	0.44	1.02	1.58	2.55	0.67	1.41	2.33	4.09	2.55	4.95	7.81	14.92
	Phe	0.07	0.16	0.33	0.78	0.17	0.37	0.56	0.90	0.26	0.52	0.86	1.51	0.37	0.72	1.10	2.10
	Pro	0.22	0.49	0.72	0.76	0.09	0.15	0.22	0.35	0.12	0.20	0.27	0.38	0.53	1.12	1.95	4.36
	Ser	0.13	0.29	0.61	1.36	0.28	0.60	0.95	1.55	0.40	0.84	1.48	2.65	0.78	1.51	2.17	4.10
	Thr	0.05	0.14	0.31	0.73	0.10	0.26	0.43	0.71	0.17	0.38	0.70	1.33	0.54	1.00	1.41	2.48
Val	0.17	0.42	0.82	1.88	0.33	0.69	1.05	1.69	0.51	1.00	1.61	2.78	0.72	1.42	2.21	4.19	

## 6. References

- Azzolini, M., Tosi, E., Lorenzini, M., Finato, F., Zapparoli, G., 2015. Contribution to the aroma of white wines by controlled *Torulaspota delbrueckii* cultures in association with *Saccharomyces cerevisiae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 31, 277–293. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1774-1>
- Barbosa, C., Mendes-Faia, A., 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.10.003>
- Bell, S.-J., Henschke, P.A., 2005. Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* 11, 242–295.
- Bely, M., Sablayrolles, J., Barre, P., 1990. Description of alcoholic fermentation kinetics : its variability and interest. *Am. J. Enol. Vitic.* 41, 319–324.
- Brunke, S., Seider, K., Richter, M.E., Bremer-Streck, S., Ramachandra, S., Kiehntopf, M., Brock, M., Hube, B., 2014. Histidine Degradation via an Aminotransferase Increases the Nutritional Flexibility of *Candida glabrata*. *Eukaryot. Cell* 13, 758–765. <https://doi.org/10.1128/EC.00072-14>
- Buhaescu, I., Izzedine, H., 2007. Mevalonate pathway: a review of clinical and therapeutical implications. *Clin. Biochem.* 40, 575–584. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2007.03.016>
- Crépin, L., Nidelet, T., Sanchez, I., Dequin, S., 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. <https://doi.org/10.1128/AEM.02294-12>
- Crépin, L., Sanchez, I., Nidelet, T., Dequin, S., Camarasa, C., 2014. Efficient ammonium uptake and mobilization of vacuolar arginine by *Saccharomyces cerevisiae* wine strains during wine fermentation. *Microb. Cell Factories* 13. <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0109-0>
- Crépin, L., Truong, N.M., Bloem, A., Sanchez, I., Dequin, S., Camarasa, C., 2017. Management of Multiple Nitrogen Sources during Wine Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 83, e02617-16. <https://doi.org/10.1128/AEM.02617-16>

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. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02175>

González-Royo, E., Pascual, O., Kontoudakis, N., Esteruelas, M., Esteve-Zarzoso, B., Mas, A., Canals, J.M., Zamora, F., 2015. Oenological consequences of sequential inoculation with non-Saccharomyces yeasts (*Torulaspora delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima*) and *Saccharomyces cerevisiae* in base wine for sparkling wine production. *Eur. Food Res. Technol.* 240, 999–1012. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2404-8>

Hertweck, C., 2009. The biosynthetic logic of polyketide diversity. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 48, 4688–4716. <https://doi.org/10.1002/anie.200806121>

Hinnebusch, A.G., 2005. Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast. *Annu. Rev. Microbiol.* 59, 407–450. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.59.031805.133833>

Kemsawasd, V., Viana, T., Ardö, Y., 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. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6835-3>

Ljungdahl, P.O., Daignan-Fornier, B., 2012. Regulation of Amino Acid, Nucleotide, and Phosphate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 190, 885–929. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.133306>

Lleixà, J., Martín, V., Giorello, F., Portillo, M.C., Carrau, F., Beltran, G., Mas, A., 2018. Analysis of the NCR Mechanisms in *Hanseniaspora vineae* and *Saccharomyces cerevisiae* During Winemaking. *Front. Genet.* 9, 747. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00747>

Magasanik, B., Kaiser, C.A., 2002. Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 290, 1–18.

Millard, P., Letisse, F., Sokol, S., Portais, J.-C., 2012. IsoCor: correcting MS data in isotope labeling experiments. *Bioinformatics* 28, 1294–1296. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts127>

Mouret, J.R., Camarasa, C., Angenieux, M., Aguera, E., Perez, M., Farines, V., Sablayrolles, J.M., 2014. Kinetic analysis and gas–liquid balances of the production of fermentative aromas during winemaking fermentations: Effect of assimilable nitrogen and temperature. *Food Res. Int.* 62, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.02.044>

Olivares-Marin, I.K., Madrigal-Perez, L.A., Canizal-Garcia, M., García-Almendárez, B.E., González-Hernández, J.C., Regalado-Gonzalez, C., 2018. Interactions between carbon and nitrogen sources depend on RIM15 and determine fermentative or respiratory growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 4535–4548. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8951-3>

Padilla, B., Gil, J.V., Manzanares, P., 2016. Past and Future of Non-Saccharomyces Yeasts: From Spoilage Microorganisms to Biotechnological Tools for Improving Wine Aroma Complexity. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00411>

Quirós, M., Martínez-Moreno, R., Albiol, J., Morales, P., Vázquez-Lima, F., Barreiro-Vázquez, A., Ferrer, P., Gonzalez, R., 2013. Metabolic Flux Analysis during the Exponential Growth Phase of *Saccharomyces cerevisiae* in Wine Fermentations. *PLoS ONE* 8, e71909. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071909>

Rollero, S., Bloem, A., Camarasa, C., Sanchez, I., Ortiz-Julien, A., Sablayrolles, J.-M., Dequin, S., Mouret, J.-R., 2014. Combined effects of nutrients and temperature on the production of fermentative aromas by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6210-9>

Rollero, S., Bloem, A., Ortiz-Julien, A., Bauer, F.F., Camarasa, C., Divol, B., 2019. A comparison of the nitrogen metabolic networks of *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Environ. Microbiol.* <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14756>

Rollero, S., Bloem, A., Ortiz-Julien, A., Camarasa, C., Divol, B., 2018. Fermentation performances and aroma production of non-conventional wine yeasts are influenced by nitrogen preferences. *FEMS Yeast Res.* 18. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foy055>

Rollero, S., Mouret, J.-R., Bloem, A., Sanchez, I., Ortiz-Julien, A., Sablayrolles, J.-M., Dequin, S., Camarasa, C., 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.* <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12749>

Rollero, S., Mouret, J.-R., Sanchez, I., Camarasa, C., Ortiz-Julien, A., Sablayrolles, J.-M., Dequin, S., 2016. Key role of lipid management in nitrogen and aroma metabolism in an evolved wine yeast strain. *Microb. Cell Factories* 15. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0434-6>

Sadoudi, M., Tourdot-Maréchal, R., Rousseaux, S., Steyer, D., Gallardo-Chacón, J.-J., Ballester, J., Vichi, S., Guérin-Schneider, R., Caixach, J., Alexandre, H., 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. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.06.006>

Su, Y., Seguinot, P., Sanchez, I., Ortiz-Julien, A., Heras, J.M., Querol, A., Camarasa, C., Guillamón, J.M., 2020. Nitrogen sources preferences of non-Saccharomyces yeasts to sustain growth and fermentation under winemaking conditions. *Food Microbiol.* 85, 103287. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103287>

Swiegers, J.H., Bartowsky, E.J., Henschke, P.A., Pretorius, I.S., 2005. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Aust. J. Grape Wine Res.* 11, 139–173. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00285.x>

VanNice, J.C., Skaff, D.A., Keightley, A., Addo, J.K., Wyckoff, G.J., Mizioro, H.M., 2014. Identification in *Haloferax volcanii* of Phosphomevalonate Decarboxylase and Isopentenyl Phosphate Kinase as Catalysts of the Terminal Enzyme Reactions in an Archaeal Alternate Mevalonate Pathway. *J. Bacteriol.* 196, 1055–1063. <https://doi.org/10.1128/JB.01230-13>

Varela, C., 2016. The impact of non-Saccharomyces yeasts in the production of alcoholic beverages. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7941-6>

Varela, C., Barker, A., Tran, T., Borneman, A., Curtin, C., 2017. Sensory profile and volatile aroma composition of reduced alcohol Merlot wines fermented with *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum*. *Int. J. Food Microbiol.* 252, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.04.002>

Xue, Y., Zhao, L., Liu, H. -w., Sherman, D.H., 1998. A gene cluster for macrolide antibiotic biosynthesis in *Streptomyces venezuelae*: Architecture of metabolic diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 12111–12116. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.21.12111>

Ye, Z.-H., Garrad, R.C., Winston, M.K., Bhattacharjee, J.K., 1991. Use of  $\alpha$ -amino adipate and lysine as sole nitrogen source by *Schizosaccharomyces pombe* and selected pathogenic fungi. *J. Basic Microbiol.* 31, 149–156. <https://doi.org/10.1002/jobm.3620310215>

Zabriskie, T.M., Jackson, M.D., 2000. Lysine biosynthesis and metabolism in fungi. *Nat. Prod. Rep.* 17, 85–97.

---

# CHAPITRE 3

---

## EFFET DE LA COMPOSITION DU MOÛT SUR LA FERMENTATION EN INOCULATION SEQUENTIELLE

Afin de déterminer l'impact de la composition initiale du moût sur le déroulement de la fermentation et les caractéristiques du produit final, l'effet des concentrations initiales en sucre, azote et lipides dans un moût synthétique a été étudié.

En première partie, la validation des méthodes de dosage pour le suivi des activités enzymatiques des glycosidases, protéases et  $\beta$ -lyases est présentée.

Dans une deuxième partie, l'impact de la présence de *M. pulcherrima* en fermentation séquentielle avec *S. cerevisiae*, ainsi que l'effet de la composition du moût ont été étudiés. Un plan expérimental de Box-Behnken a été mis en œuvre afin de tester 3 concentrations pour chacune des variables, et permettre l'analyse des effets simples, quadratiques et des interactions entre les variables. Les cinétiques de fermentations, les concentrations en biomasses des deux souches, ainsi que les productions d'arômes fermentaires et de thiols ont été suivis. Ce même plan expérimental a été également été mis en œuvre avec *T. delbrueckii*.

Enfin, la variation des concentrations en précurseurs de thiols en fermentation avec *M. pulcherrima*, *S. cerevisiae* ou en fermentation séquentielle avec ces deux souches ont été mesurées, dans le but d'expliquer les résultats obtenus en deuxième partie, sur la production de thiols en fermentation séquentielle avec *M. pulcherrima*.

# I. Mise au point et validation de dosage des activités glycosidases, protéases et $\beta$ -lysase pour une application en fermentation alcoolique

## 1. Introduction

La production d'enzymes hydrolytiques par les levures non-*Saccharomyces* présente un intérêt en fermentation œnologique. Les glycosidases et  $\beta$ -lyases hydrolysent des composés non-aromatiques présents dans le moût de raisin pour libérer des arômes. D'autres enzymes telles que les protéases hydrolysent des peptides pour libérer de l'azote assimilable par les levures.

Afin d'exploiter au mieux ces enzymes, il est nécessaire de pouvoir suivre leur activité pendant la fermentation. Quelques méthodes sont disponibles pour cela, mais ne sont pas toujours quantitatives, requièrent des équipements lourds comme des GC-MS ou font l'objet d'un protocole long et compliqué. Ces contraintes limitent leurs utilisations pour un suivi de ces activités en fermentation.

Certains arômes variétaux comme les terpènes sont présents dans le moût de raisin sous forme glycosylées, non aromatiques. Ces composés peuvent être hydrolysés par des glycosidases pour libérer les composés aromatiques (Hu et al., 2016; Swiegers et al., 2005). L'action de ces enzymes se fait en deux étapes, avec tout d'abord une  $\alpha$ -L-rhamnosidase ou d'une  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase en fonction de la structure du précurseur, puis une  $\beta$ -glucosidase (Gunata et al., 1985; Swiegers et al., 2005). Pour être actives en fermentation, ces enzymes doivent être tolérantes à de fortes concentrations en éthanol et glucose, et à un pH faible. Certaines souches de *S. cerevisiae* produisent des  $\beta$ -glucosidases, mais qui ont une activité faible en fermentation due aux contraintes précédemment citées (Hernandez, 2003; Swiegers et al., 2005). Un grand nombre d'espèces de levures non-*Saccharomyces* ont été étudiées à la recherche d'une activité glycosidase. Certaines souches d'*Hanseniaspora*, *Torulaspora*, *Pichia* et *Metschnikowia* ont montré une activité glycosidase importante en conditions de fermentation (Comitini et al., 2011; Hu et al., 2016; Maturano et al., 2015; Strauss et al., 2001).

Les thiols volatils jouent un rôle significatif dans le profil aromatique des vins blancs. Les principaux thiols sont le 4-mercapto-4-méthylpentan-2-one (4MMP), le 3-mercaptohexanol (3MH) et le 3-mercaptohexyl (3MHA). Les 4MMP et 3MH sont présent dans le moût sous formes de précurseurs cystéinylés et glutathionylés, hydrolysés par des  $\beta$ -lyases pour libérer les composés aromatiques. Le 3MH peut ensuite être acétylé pour former du 3MHA (Gros et al., 2013; Holt et al., 2012; Roncoroni et al., 2011; Swiegers et al., 2005). Quelques souches de *S. cerevisiae* montrent une activité  $\beta$ -lyase, ainsi que plusieurs espèces non-*Saccharomyces* comme *T. delbrueckii* (Belda et al., 2016; Santiago and Gardner, 2015b).

Les protéases présentent un intérêt en fermentation car elles peuvent augmenter la quantité d'azote disponible pour les levures, ce qui pourrait impacter la cinétique fermentaire et le la production d'arômes. En dégradant les protéines du raisin, les protéases peuvent aussi augmenter la stabilité des vins et remplacer l'utilisation de bentonite pour éviter la formation d'un trouble (Chasseriaud et al., 2015). Plusieurs études montrent les capacités de levures non-*Saccharomyces* pour la production de ces enzymes (Charoenchai et al., 1997; Maturano et al., 2015; Ni-orn, 2008).

L'objectif est de développer des protocoles de dosage de ces activités enzymatiques applicables en fermentation alcoolique. Ces dosages devront être faciles et rapides à utiliser, quantitatifs et adaptés aux conditions de fermentation, principalement en terme de pH.

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1. Dosages enzymatiques

#### 2.1.1. Glycosidases

Les glycosidases hydrolysent la liaison glycosidique entre un sucre et une autre molécule. Trois glycosidases sont étudiées : la  $\beta$ -glucosidase, la  $\alpha$ -arabinofuranosidase and la  $\alpha$ -rhamnosidase. Le principe du dosage est le même pour ces trois enzymes et est une adaptation de la méthode proposée par Grimaldi et al., (2005). Un substrat lié à un chromophore est hydrolysé par la glycosidase, libérant le chromophore (Figure 1). La libération de cette molécule peut être suivie en mesurant l'absorbance à 440 nm.

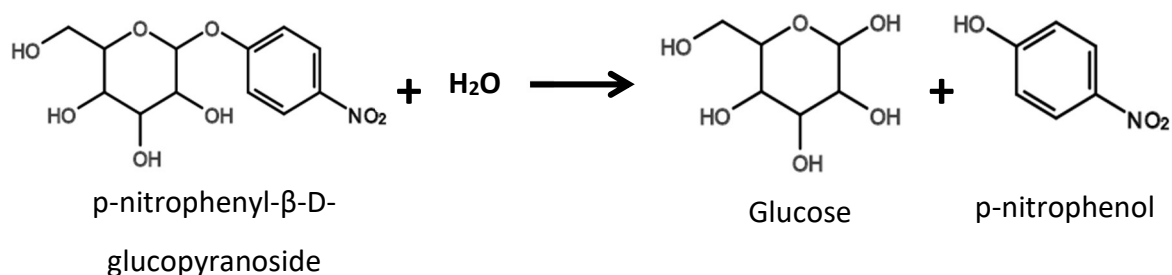


Figure 1: Principe de dosage des glycosidases.

Le dosage est réalisé en utilisant un substrat approprié à chaque enzyme (Tableau 1).

Tableau 1: Substrats utilisés pour le dosage des glycosidases.

Enzymes	Substrats
β-glucosidase	p-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside (p-NPG)
α-arabinofuranosidase	p-nitrophenyl-α-L-arabinofuranoside (p-NPA)
α-rhamnosidase	p-nitrophenyl- α-L-rhamnopyranoside (p-NPR)

Les substrats sont préparés dans un tampon de McIlvaine à pH 3.4 à une concentration de 6 mmol/L pour le p-NPG et le p-NPR, et à 3.7 mmol/L pour le p-NPA. Une solution de carbonate de sodium (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) à 0.5 mol/L est utilisée pour arrêter la réaction et révéler la couleur du p-nitrophénol.

Dans un tube, 250 μL de l'échantillon (échantillon de culture, surnageant, suspension de cellules ou extraits cellulaires) sont mélangés à 250 μL de substrat. Le mélange est incubé à 28°C sous agitation pendant 2 heures. 250 μL de la solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> sont ensuite ajoutés pour arrêter la réaction. Le tube est centrifugé à 5000 rpm pendant 5 min, puis 200 μL du surnageant sont transférés dans le puit d'une microplaque. L'absorbance est lue à 440 nm.

Une courbe de calibration est réalisée pour relier l'absorbance à la quantité de p-nitrophenol libéré. Cette calibration est réalisée avec une solution stock de p-nitrophénol préparé dans du tampon McIlvaine, ensuite diluée à différentes concentrations dans le milieu étudié (moût synthétique ou naturel non inoculé).

Des tests préliminaires ont montré que le dosage en moût naturel est faussé par la présence de polyphénols, qui absorbent également à 440 nm à pH faible. Ces polyphénols sont éliminés

par le traitement des échantillons avec de la polyvinylpolypyrrolidone (PVPP). La PVPP est réhydratée dans 10 fois son poids en eau sous agitation pendant 1 heure. Cette solution est filtrée pour récupérer la poudre hydratée. La PVPP est ajoutée à l'échantillon avec une concentration de 30 g/L, sous agitation pendant une heure. Le mélange est centrifugé (5 min à 5000 rpm) puis filtré (0.20 µm) pour éliminer la PVPP. L'échantillon peut ensuite être traité comme présenté ci-dessus. Des tests avec des enzymes commerciales ont montré que ce traitement n'interfère pas avec l'activité des enzymes étudiées.

### 2.1.2. β-lyases

Les β-lyases catalysent l'hydrolyse des composés glutathionylés et cystéinylés, libérant des thiols volatils.

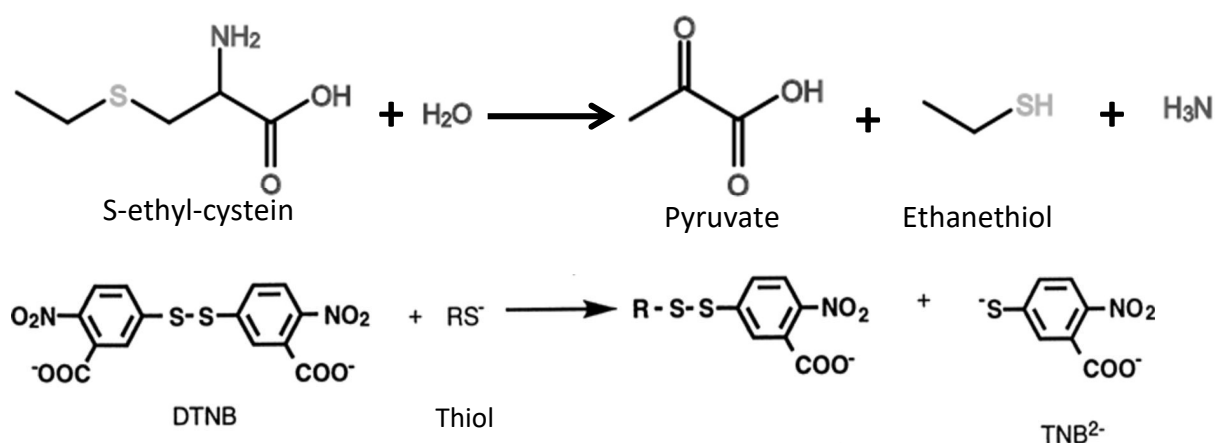


Figure 2: Principe de dosage des β-lyases

Le dosage est basé sur la mesure de la quantité d'éthanethiol produit par la réaction. Les β-lyases dégradent le S-éthyl-cystéine en pyruvate, éthanethiol et ammonium. L'éthanethiol est ensuite dosé avec du 5,5'-dithio-bis-[2-nitrobenzoate] (DTNB). Le DTNB réagit avec le groupe thiol de l'éthanethiol pour produire du TNB<sup>2-</sup> qui absorbe à 400 nm (Roncoroni et al., 2011).

Le coût des précurseurs de thiols synthétiques étant très élevé, le S-éthyl-cystéine a été utilisé comme équivalent. Il a été montré que les β-lyases ont une bonne affinité pour ce composé (Roncoroni et al., 2011). Une solution de S-éthyl-cystéine est préparée dans de l'eau à une concentration de 5 mmol/L. Un tampon de réaction est préparé avec de l'EDTA à 0.1 mmol/L et du PLP (un coenzyme) à 0.1 mmol/L dans du tampon McIlvaine.

La réaction est réalisée en mélangeant 250 µL de S-éthyl-cystéine, 100 µL de tampon de réaction, 250 µL de DTNB et 250 µL d'échantillon. Après 2 heures d'incubation à 28°C sous

agitation, le mélange est centrifugé et 200  $\mu$ L du surnageant sont placés dans le puit d'une microplaque. L'absorbance est lue à 400 nm.

Ce dosage n'est pas applicable pour les échantillons obtenus en moût naturel, pour des raisons encore non déterminées. L'activité  $\beta$ -lyase peut tout de même être déterminée sur des échantillons de cellules préalablement lavées et resuspendues dans du tampon. Pour les dosages en moût synthétique, un blanc est réalisé sans ajout de S-ethyl-cystein afin de s'affranchir de la production de composés soufrés qui pourraient réagir avec le DTNB.

L'absorbance est reliée à la quantité d'ethanethiol produit pendant la réaction grâce à une courbe de calibration réalisée avec plusieurs concentration d'ethanethiol dilué dans le milieu étudié.

### 2.1.3. Protéases

L'activité protéase est mesurée avec le principe proposé par Chasseriaud et al. (2015). L'échantillon est mélangé avec de l'azocaséine, qui une fois dégradée par les protéases, libère un colorant.

Une solution d'azocaséine à 0.3 g/L est préparée dans du NaOH à 0.1 mol/L. La réaction est stoppée et la coloration du groupe azo est révélée par ajout d'acide trichloroacétique à 0.1 mol/L.

250  $\mu$ L d'échantillon sont mélangés avec 250  $\mu$ L d'azocaséine. Après incubation pendant 2 heures à 28°C sous agitation, 250  $\mu$ L d'acide trichloroacétique sont ajoutés. Le mélange est centrifugé à 5000 rpm pendant 5 min, puis le surnageant est disposé dans le puit d'une microplaque. L'absorbance est lue à 400 nm.

Comme nous ne disposons pas d'une solution contenant uniquement le colorant pour faire une gamme de calibration, plusieurs solutions d'azocaséine à différentes concentrations ont été préparées, et une protéase commerciale avec une forte activité (5 U/mL) a été utilisée pour hydrolyser totalement l'azocaséine. L'absorbance a ensuite pu être lue afin de lier la concentration en colorant libérée et l'absorbance.

### 2.2. Validation de méthode

La linéarité, reproductibilité, sensibilité, précision et l'influence du milieu ont été vérifiés comme décrit par Bendicho et al. (2002).



Comme certaines de ces enzymes ne sont pas disponibles commercialement, ni facilement extraites et purifiées à partir de levures, la validation s'est déroulée avec des cellules entières en suspension. La concentration de ces cellules a été modifiée pour obtenir différentes concentrations d'enzymes.

#### 2.2.1. Culture cellulaire

Des levures de *Metschnikowia pulcherrima* Flavia® ont été cultivées dans du moût synthétique ou naturel pendant 2 à 4 jours avant d'être récupérée. Les échantillons de culture ont été centrifugés 5 min à 5000 rpm. Les culots cellulaires sont lavés avec le milieu étudié avant une seconde centrifugation et resuspension dans le milieu étudié.

#### 2.2.2. Impact du milieu

Les essais présentés ci-dessous sont réalisés dans trois milieux différents : un moût synthétique mimant un début de fermentation (200 g/L de sucres, 200 mg/L d'azote assimilable et 5 mg/L de phytostérols), un moût synthétique mimant une fin de fermentation (45 g/L de sucres, 1 mg/L de phytostérols, plus d'azote et 90 g/L d'éthanol) et un moût naturel (Sauvignon).

#### 2.2.3. Linéarité

La linéarité entre la concentration en enzyme et l'absorbance a été testée avec différentes concentration et dilution de cellules, comme présenté dans le Tableau 2.

Tableau 2: Dilution et concentrations des cellules pour l'étude de la linéarité. X représente la concentration en cellules dans la culture au moment du prélèvement.

Concentration relative	X/10	X/3	X	3X	5X
<b>Volume prélevé (mL)</b>	1	1	3	9	5
<b>Volume final (mL)</b>	10	3	3	3	1

Les différents dosages ont été réalisés à partir de cultures différentes, la concentration « X » n'est donc pas toujours la même.

La gamme est complétée avec du moût non inoculé comme blanc. Les dosages sont réalisés en triplicat.

#### 2.2.4. Reproductibilité

Les dosages ont été reproduits six fois avec le même échantillon de vérifier la reproductibilité des méthodes.

#### 2.2.5. Sensibilité

La sensibilité des méthodes a été déterminée par le calcul de la limite de détection (LOD) et la limite de quantification (LOQ) avec la méthode du blanc décrite par l'IUPAC (Long and Winefordner, 1983). La limite de détection est décrite comme la plus petite quantité d'une substance qui peut être distinguée d'un blanc, et est calculé ainsi :

$$LOD = \overline{Abs_{blanc}} + 3\sigma_{blanc}$$

Avec  $\overline{Abs_{blanc}}$  : la valeur moyenne de la mesure pour le blanc

$\sigma_{blanc}$  : la déviation standard des mesures du blanc

Le facteur 3 représente un risque de 0.13 % de conclure à la présence d'enzyme alors qu'il n'y en a pas.

La limite de quantification est la quantité à partir de laquelle deux concentrations d'enzyme différentes peuvent être séparées.

$$LOQ = \overline{Abs_{blanc}} + 10\sigma_{blanc}$$

Le facteur 10 représente un risque de 0.5 ‰ de conclure à la présence d'enzyme alors qu'il n'y en a pas.

#### 2.2.6. Précision

La précision représente la proximité entre la valeur mesurée et la valeur théorique. Elle est déterminée en calculant le pourcentage de recouvrement après des ajouts dosés.

Deux niveaux d'ajouts ont été testés, et chaque mesure répétée 6 fois. 100 µL d'un échantillon cellulaire de concentration X/3 (niveau I) ou 150 µL d'un échantillon de concentration X/10 ont été ajoutés, menant à des concentrations relatives de 0.19X et 1.26X respectivement. Grâce à la courbe de linéarité entre la concentration relative et l'absorbance obtenue en première partie de validation, nous pouvons calculer l'absorbance attendue pour ces concentrations relatives. Le pourcentage de recouvrement peut donc être calculé :

$$\text{Recouvrement (\%)} = 100 - \frac{\text{Abs}_{\text{échantillo}} - \text{Abs}_{\text{théorique}}}{\text{Abs}_{\text{théorique}}}$$

Plus ce pourcentage est proche de 100 %, plus la méthode est précise.

#### 2.2.7. Calibration

Pour lier l'absorbance mesurée à la concentration de produit libéré, des droites de calibration sont réalisées. Pour les glycosidases et la β-lyase, les produits des réactions de dosage sont disponibles commercialement. Différentes concentrations de ces produits sont préparées dans le milieu étudié et l'absorbance est lue à 400 nm. Le produit de la réaction de dosage des protéases n'est pas disponible commercialement. Pour s'affranchir de ce problème, une enzyme commerciale est mélangée à différentes concentrations de substrats. L'enzyme est présente en excès pour s'assurer que tout le substrat est dégradé.

Une équation de droite est obtenue :

$$C_{\text{produit}}^{\circ} (\mu\text{mol/mL}) = a \text{Abs}_{400 \text{ nm}} + b$$

Il est donc possible de calculer l'activité enzymatique :

$$\text{Activité (U/mL)} = \frac{a \text{Abs}_{400 \text{ nm}} + b}{\text{temps de réaction (min)}}$$

Avec U correspondant à la quantité d'enzyme libérant 1 µmol de produit par minute.

### 3. Résultats

#### 3.1. Glycosidases

Le dosage de la  $\beta$ -glucosidase a été validé dans les trois milieux, alors que les dosages de l' $\alpha$ -arabinofuranosidase et l' $\alpha$ -rhamnosidase n'ont été validés que sur moût synthétique en début de fermentation à cause du coût des substrats.

##### 3.1.1. Linéarité

La linéarité du dosage de la  $\beta$ -glucosidase a été testée dans trois milieux, avec différentes concentrations en suspension cellulaires (Tableau 2). Les résultats sont présentés sur la Figure 3.

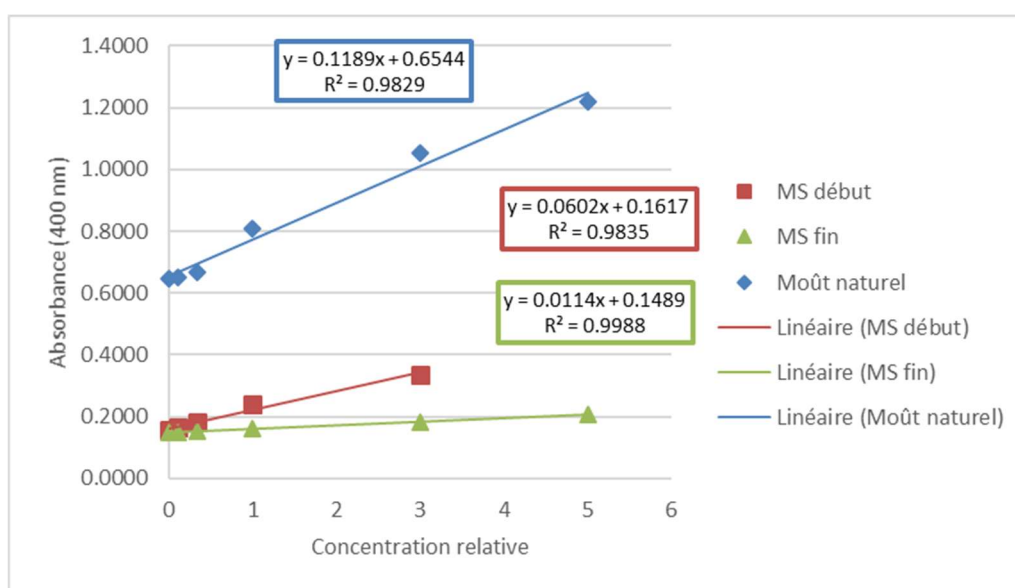


Figure 3: Relation entre la concentration relative en  $\beta$ -glucosidase et l'absorbance mesurée à 400 nm. MS : moût naturel.

Les caractéristiques des droites de calibration peuvent donc être déterminées (Tableau 3).

Tableau 3: Pente (a) et abscisse à l'ordonnée (b) des droites de calibration obtenues pour la  $\beta$ -glucosidase sur différents milieux. MS : moût synthétique.

Milieu	a	b	$R^2$
MS début	$0.0602 \pm 0.0005$	$0.1617 \pm 0.0013$	0.9835
MS fin	$0.0114 \pm 0.0002$	$0.1489 \pm 0.0006$	0.9988
Moût naturel	$0.1189 \pm 0.0038$	$0.6544 \pm 0.0096$	0.9829

La même procédure a été répétée pour l' $\alpha$ -arabinofuranosidase et l' $\alpha$ -rhamnosidase, mais seulement sur mout synthétique (Tableau 4).

Tableau 4: Pente (a) et abscisse à l'ordonnée (b) des droites de calibration obtenues pour l' $\alpha$ -arabinofuranosidase et l' $\alpha$ -rhamnosidase sur moût synthétique.

Enzyme	a	b	R <sup>2</sup>
$\alpha$ -arabinofuranosidase	0.0063 $\pm$ 0.0008	0.1919 $\pm$ 0.0027	0.991
$\alpha$ -rhamnosidase	0.0054 $\pm$ 0.0008	0.2043 $\pm$ 0.0006	0.997

La linéarité a été obtenue dans toutes les conditions. L'ordonnée à l'origine est plus élevée en moût naturel à cause de la couleur de ce moût. Les pentes ne peuvent pas être comparées entre les différents milieux car les cultures cellulaires utilisées pour ces dosages n'étaient pas les mêmes. Néanmoins, les pentes obtenues pour l' $\alpha$ -arabinofuranosidase et l' $\alpha$ -rhamnosidase sont plus faibles que pour la  $\beta$ -glucosidase, sûrement parce que ces enzymes sont moins produites que la  $\beta$ -glucosidase.

### 3.1.2. Reproductibilité

La reproductibilité des méthodes a été évaluée par six dosages sur le même échantillon (Tableaux 5 et 6).

Tableau 5: Résultats de reproductibilité pour la sur les différents milieu. MS : moût synthétique

Milieu	Absorbance moyenne	Ecart type	Erreur %
MS début	0.2406	0.0035	1%
MS fin	0.1625	0.0018	1%
Moût naturel	0.8086	0.0102	1%

Tableau 6: Résultats de reproductibilité pour l' $\alpha$ -arabinofuranosidase et l' $\alpha$ -rhamnosidase en moût synthétique.

Enzyme	Absorbance moyenne	Ecart type	Erreur %
$\alpha$ -arabinofuranosidase	0.1967	0.0036	2%
$\alpha$ -rhamnosidase	0.2095	0.0020	1%

Dans toutes les conditions testées, l'écart type et le pourcentage d'erreur étaient faibles, indiquant une bonne reproductibilité.

### 3.1.3. Sensibilité

La sensibilité de la méthode a été testée en calculant les limites de détection et de quantification (Tableaux 7 et 8).

Tableau 7: Limite de détection (LOD) et de quantification (LOQ) pour le dosage de la  $\beta$ -glucosidase dans différents milieux.

Milieu	LOD	LOQ
MS début	0.1037	0.1570
MS fin	0.1482	0.1489
Moût naturel	0.6638	0.6999

Pour la  $\beta$ -glucosidase, les limites de détection et de quantification étaient faibles comparées à l'absorbance obtenue avec des échantillons de fermentation. Par exemple, nous avons obtenu une absorbance moyenne de 0.8086 pour l'échantillon en moût naturel (Tableau 5). Cette absorbance est supérieure à la LOQ obtenue dans les mêmes conditions (0.6999) (Tableau 7) et peut donc être considérée comme exploitable.

Tableau 8: Limite de détection (LOD) et quantification (LOQ) pour les dosages l' $\alpha$ -arabinofuranosidase et de l' $\alpha$ -rhamnosidase et en moût synthétique.

Enzyme	LOD	LOQ
$\alpha$ -arabinofuranosidase	0.2085	0.2483
$\alpha$ -rhamnosidase	0.2074	0.2143

Pour l' $\alpha$ -arabinofuranosidase et l' $\alpha$ -rhamnosidase, les valeurs de ces paramètres sont plus élevées que pour la  $\beta$ -glucosidase (Tableau 8). Par exemple, nous avons obtenu une absorbance moyenne de 0.2095 pour l' $\alpha$ -rhamnosidase en fermentation (Tableau 6). Cette valeur se situe entre la LOD et la LOQ (Tableau 8), ce qui signifie la présence d'une activité enzymatique, mais a des valeurs trop faibles pour être quantifiée dans ces conditions.

### 3.1.4. Précision

La précision de la méthode a été mesurée en calculant le taux de recouvrement après des ajouts dosés (Tableaux 9 et 10).

Tableau 9: Pourcentage de recouvrement pour la  $\beta$ -glucosidase dans différents milieux.

Milieu	Recouvrement (%)	
	Niveau I	Niveau II
MS début	99.99	99.98
MS fin	99.99	99.95
Moût naturel	99.98	99.97

Tableau 10: Pourcentage de recouvrement pour l' $\alpha$ -arabinofuranosidase et l' $\alpha$ -rhamnosidase en mout synthétique.

Enzyme	Recouvrement (%)	
	Niveau I	Niveau II
$\alpha$ -arabinofuranosidase	99.99	99.78
$\alpha$ -rhamnosidase	99.99	99.81

Pour toutes les enzymes et milieux testés, les pourcentages de recouvrement sont très proches de 100%, montrant la bonne précision de la méthode.

### 3.1.5. Droite de calibration

Une droite de calibration a été obtenue entre 0 et 0.1  $\mu\text{mol/mL}$  de p-nitrophénol (Tableau 11).

Tableau 11: Relation entre la concentration en p-nitrophenol et l'absorbance dans différents milieux. Abs : absorbance mesurée ; C° : concentration.

Milieu	Equation des droites de calibration	R <sup>2</sup>
Tampon	$C^\circ (\mu\text{mol/mL}) = 0.079 \text{ Abs} - 0.0086$	0.9999
Mout synthétique	$C^\circ (\mu\text{mol/mL}) = 0.0845 \text{ Abs} - 0.01$	0.9999
Mout naturel	$C^\circ (\mu\text{mol/mL}) = 0.0949 \text{ Abs} - 0.0936$	0.9948

Ces équations sont utilisées pour relier l'absorbance mesurée lors du dosage à la concentration de p-nitrophenol obtenue, et donc à l'activité des enzymes.

## 3.2. Protéases

Des tests préliminaires ont montré que les levures non-*Saccharomyces* ne produisent pas de protéases lors de cultures en moût synthétique, peut-être du fait de l'absence de peptides dans ce milieu. Pour la validation de la méthode en moût synthétique, des cellules cultivées en moût naturel ont été lavées et resuspendues en moût synthétique.

### 3.2.1. Linéarité

La linéarité a été obtenue dans toutes les conditions, même si les coefficients de détermination  $R^2$  étaient plus faibles que ceux obtenus pour les autres enzymes (Tableau 12).

Tableau 12: Pente (a) et ordonnée à l'origine (b) de la relation de linéarité entre la concentration relative en protéases et l'absorbance dans différents milieux.

Milieu	a	b	$R^2$
MS début	0.0080 ± 0.0020	0.1659 ± 0.0025	0.9817
MS fin	0.0092 ± 0.0013	0.1401 ± 0.0022	0.9578
Moût synthétique	0.0246 ± 0.0022	0.1411 ± 0.0021	0.9876

### 3.2.2. Reproductibilité

Une bonne reproductibilité a été obtenue pour toutes les conditions (Tableau 13).

Tableau 13: Résultats de reproductibilité pour le dosage des protéases dans différents milieux.

Milieu	Abs(X) moyenne	Ecart type	Erreur %
MS début	0.1740	0.0042	2%
MS fin	0.1597	0.0085	5%
Moût synthétique	0.1527	0.0038	2%

### 3.2.3. Sensibilité

Les LOD et LOQ obtenues pour ce dosage sont corrects (Tableau 14). Néanmoins, la LOQ obtenue en moût synthétique au début de la fermentation était légèrement élevée.

Tableau 14: Limite de détection (LOD) et de quantification (LOQ) pour le dosage des protéases dans différents milieux.

Milieu	LOD	LOQ
MS début	0.1823	0.2145
MS fin	0.1472	0.1709
Moût synthétique	0.1484	0.1524

### 3.2.4. Précision

De bonnes valeurs de recouvrement ont été obtenues dans les conditions testées, indiquant une bonne précision de la méthode (Tableau 15).



Tableau 15: Pourcentages de recouvrement obtenus pour le dosage des protéases dans différents milieux.

Milieu	Recouvrement (%)	
	Niveau I	Niveau II
MS début	99.97	99.94
MS fin	99.97	99.83
Moût naturel	99.98	99.94

### 3.2.5. Droite de calibration

Une droite de calibration a été obtenue entre 0 et 0.3 g/L d'azocaséine (Tableau 16).

Tableau 16: Equation des droites de calibration obtenues en moût synthétique et naturel.

Milieu	Equation de la droite de calibration	R <sup>2</sup>
Mout synthétique	Abs = 0.695 C°(μmol/mL) + 0.1098	0.9913
Mout naturel	Abs = 0.6907 C°(μmol/mL) + 0.1939	0.9949

### 3.3.B-lyase

La validation du dosage des β-lyases a été réalisée en moût synthétique mimant un début et une fin de fermentation, ainsi que dans une solution tampon. La validation n'a pas été faite en moût naturel, car un composé de ce milieu interfère avec le dosage. Des cellules cultivées en moût naturel ont donc été resuspendues dans un tampon de McIlvaine (pH 3.4).

#### 3.3.1. Linéarité

La linéarité a été obtenue dans tous les milieux (Tableau 17). Le coefficient de détermination R<sup>2</sup> était plus faible en moût naturel, probablement à cause de l'étape de resuspension des cellules dans le tampon.

Tableau 17: Pente (a) et ordonnée à l'origine (b) de la droite reliant la concentration relative entre les  $\beta$ -lyases et l'absorbance.

Milieu	a	b	R <sup>2</sup>
MS début	0.0528 ± 0.0006	0.4249 ± 0.0182	0.9738
MS fin	0.0204 ± 0.0010	0.3701 ± 0.0032	0.9878
Mout naturel/ tampon	0.0198 ± 0.0009	0.4250 ± 0.0067	0.9686

### 3.3.2. Reproductibilité

Le pourcentage d'erreur obtenu était faible dans toutes les conditions (Tableau 18). La méthode est donc reproductible.

Tableau 18: Résultats de reproductibilité pour la méthode de dosage des  $\beta$ -lyases.

Milieu	Abs(X) moyenne	Ecart type	Erreur %
MS début	0.4990	0.0098	2%
MS fin	0.3947	0.0065	2%
Mout naturel/ tampon	0.4540	0.0099	2%

### 3.3.3. Sensibilité

La LOD et LOQ étaient faibles comparées aux absorbances obtenues lors de notre validation (Tableau 13). Cette méthode permet donc une quantification avec des absorbances faibles.

Tableau 19: Limite de détection (LOD) et de quantification (LOQ) pour le dosage des  $\beta$ -lyases.

Milieu	LOD	LOQ
MS début	0.4050	0.4127
MS fin	0.3777	0.3986
Mout naturel/ tampon	0.4186	0.4313

### 3.3.4. Précision

Les pourcentages de recouvrement obtenus étaient très proches de 100% indiquant une bonne précision de la méthode (Tableau 20).

Tableau 20: Pourcentages de recouvrement pour le dosage des  $\beta$ -lyases.

Milieu	Recouvrement (%)	
	Niveau I	Niveau II
MS début	99.98	99.91
MS fin	99.96	99.96
Mout naturel/ tampon	99.97	99.96

### 3.3.5. Droite de calibration

Une droite de calibration a été obtenue pour des concentrations de 0.09 et 0/21  $\mu\text{mol/mL}$  d'éthanethiol (Tableau 21).

Tableau 21: Relation entre la concentration en éthanethiol et l'absorbance dans différents milieux.

Milieu	Equation de droite	R <sup>2</sup>
Tampon	Abs = 0.9183 C° ( $\mu\text{mol/mL}$ ) + 0.3487	0.993
Mout synthétique	Abs = 0.8582 C° ( $\mu\text{mol/mL}$ ) + 0.3369	0.9897

## 4. Conclusion

Trois méthodes de dosage colorimétrique ont été adaptées pour le suivi de l'activité enzymatique des glycosidases, protéases et  $\beta$ -lyases en fermentation alcoolique. Ces méthodes sont quantitatives, faciles à mettre en œuvre et adaptées aux conditions de la fermentation alcoolique. Leur fiabilité a été vérifiée grâce à un protocole de validation. L'utilisation de ces tests peut permettre l'étude des activités enzymatiques des levures au cours de la fermentation en fonction de différents paramètres environnementaux.

## 5. Références bibliographiques

- Belda, I., Ruiz, J., Navascués, E., Marquina, D., Santos, A., 2016. Improvement of aromatic thiol release through the selection of yeasts with increased  $\beta$ -lyase activity. *Int. J. Food Microbiol.* 225, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.03.001>
- Bendicho, S., Martí, G., Hernández, T., Martín, O., 2002. Determination of proteolytic activity in different milk systems. *Food Chem.* 79, 245–249. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00126-7](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00126-7)
- Charoenchai, C., Fleet, G.H., Henschke, P.A., Todd, B.E.N., 1997. Screening of non-Saccharomyces wine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. *Aust. J. Grape Wine Res.* 3, 2–8.
- Chasseriaud, L., Miot-Sertier, C., Coulon, J., Iturmendi, N., Moine, V., Albertin, W., Bely, M., 2015. A new method for monitoring the extracellular proteolytic activity of wine yeasts during alcoholic fermentation of grape must. *J. Microbiol. Methods* 119, 176–179. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.10.025>
- Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., Ciani, M., 2011. Selected non-Saccharomyces wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.* 28, 873–882. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.12.001>
- Grimaldi, A., Bartowsky, E., Jiranek, V., 2005. A survey of glycosidase activities of commercial wine strains of *Oenococcus oeni*. *Int. J. Food Microbiol.* 105, 233–244. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.04.011>
- Gros, J., Tran, T.T.H., Collin, S., 2013. Enzymatic release of odourant polyfunctional thiols from cysteine conjugates in hop: Enzymatic release of hop thiols. *J. Inst. Brew.* 119, 221–227. <https://doi.org/10.1002/jib.80>
- Gunata, Y.Z., Bayonove, C.L., Baumes, R.L., Cordonnier, R.E., 1985. The aroma of grapes I. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components. *J. Chromatogr. A* 331, 83–90. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(85\)80009-1](https://doi.org/10.1016/0021-9673(85)80009-1)
- Hernandez, L., 2003. Beta-Glucosidase activity in a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. *Int. J. Food Microbiol.* 80, 171–176. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00149-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00149-6)

- Holt, S., Cordente, A.G., Curtin, C., 2012. Saccharomyces cerevisiae STR3 and yeast cystathionine  $\beta$ -lyase enzymes: The potential for engineering increased flavor release. *Bioengineered* 3, 180–182. <https://doi.org/10.4161/bbug.19566>
- Hu, K., Qin, Y., Tao, Y.-S., Zhu, X.-L., Peng, C.-T., Ullah, N., 2016. Potential of Glycosidase from Non- Saccharomyces Isolates for Enhancement of Wine Aroma: Wine aroma improvement by glycosidase.... *J. Food Sci.* 81, M935–M943. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13253>
- Long, G., Winefordner, J.D., 1983. Limit of detection : a closer look at the IUPAC definition. *Anal. Chem.* 55.
- Maturano, Y.P., Assof, M., Fabani, M.P., Nally, M.C., Jofré, V., Rodríguez Assaf, L.A., Toro, M.E., Castellanos de Figueroa, L.I., Vazquez, F., 2015. Enzymatic activities produced by mixed Saccharomyces and non-Saccharomyces cultures: relationship with wine volatile composition. *Antonie Van Leeuwenhoek* 108, 1239–1256. <https://doi.org/10.1007/s10482-015-0578-0>
- Ni-orn, C., 2008. Impact of protease activity of yeasts on wine fermentation and formation of volatile and non-volatile metabolites. Institute of Nutritional Science, Germany.
- Roncoroni, M., Santiago, M., Hooks, D.O., Moroney, S., Harsch, M.J., Lee, S.A., Richards, K.D., Nicolau, L., Gardner, R.C., 2011. The yeast IRC7 gene encodes a  $\beta$ -lyase responsible for production of the varietal thiol 4-mercapto-4-methylpentan-2-one in wine. *Food Microbiol.* 28, 926–935. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.01.002>
- Santiago, M., Gardner, R.C., 2015. The IRC7 gene encodes cysteine desulphydrase activity and confers on yeast the ability to grow on cysteine as a nitrogen source: IRC7 encodes a cysteine desulphydrase and confers growth on cysteine as N source. *Yeast* 32, 519–532. <https://doi.org/10.1002/yea.3076>
- Strauss, M.L., Jolly, N.P., Lambrechts, M.G., van Rensburg, P., 2001. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-Saccharomyces wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.* 91, 182–190.
- Swiegers, J.H., Bartowsky, E.J., Henschke, P.A., Pretorius, I.S., 2005. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Aust. J. Grape Wine Res.* 11, 139–173. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00285.x>

## II. Impact of must parameters on the fermentation and production of aroma compounds in sequential inoculation with *M. pulcherrima* and *S. cerevisiae*

### 1. Abstract

Non-*Saccharomyces* yeasts are currently widely used in winemaking to enhance aroma profile diversity among wines. The use of *M. pulcherrima* Flavia® in sequential inoculations with *S. cerevisiae* Lalvin QA23® was compared to pure cultures of *S. cerevisiae*. Moreover, various concentrations of sugar, nitrogen and lipids were tested in synthetic must to assess their impact on fermentation and its outcomes using a Box-Behnken design. The importance of managing nutrient availability, especially that of nitrogen and lipids, was confirmed. Significant differences in the final concentrations of fermentative and varietal aromas depending on the initial must composition were obtained under both inoculation strategies. Comparisons between pure cultures and sequential inoculation confirmed the positive impact of *M. pulcherrima* on the production of positive aromas. In particular, the release of varietal thiols was strongly increased in the presence of this strain. The mechanism of this release still needs to be investigated.

### 2. Introduction

After being considered spoilage yeasts for decades, the potential of non-*Saccharomyces* (NS) species to increase the aromatic complexity and improve the sensory properties of wines has been acknowledged, and some NS strains are already available in the market as active dried yeasts. Non-*Saccharomyces* strains have been successfully used to decrease the final content of ethanol in wines (Brou et al., 2018; Contreras et al., 2014; Varela et al., 2016) or for the diversification of the aromatic profile of the product, increasing both the formation of fermentative aromas and the release of varietal aromas due to their capacity to excrete hydrolytic enzymes (Belda et al., 2017; Egli et al., 2002; Rodríguez et al., 2010; Zott et al., 2011). Among these compounds, thiols play a central role, particularly in white wines, as they possess sought-after aromas of box tree, citrus and passion fruit. These molecules include 3-

mercaptohexan-1-ol (3MH), 3-mercaptohexylacetate (3MHA) and 4-mercapto-4-methylpentan-2-one (4MMP). Regarding the formation of these molecules, 3MH and 4MMP are released during fermentation by the action of hydrolytic enzymes, the  $\beta$ -lyases, on non-odorous precursors present in grape must (Roncoroni et al., 2011). Glutathione and cysteine S-conjugates as well as cysteinyl-glycine S-conjugates and  $\gamma$ -glutamyl-cysteine S-conjugates have been identified as thiol precursors in various grape varieties. Furthermore, 3MH may be formed by sulphur addition to E-(2)-hexenal, but these pathways account for a limited part of total thiol formation. 3MHA is synthesized by the acetylation of 3MH by Atf1p (Roland et al., 2011).

Among the non-*Saccharomyces* species studied, *Metschnikowia pulcherrima* stands out because of presenting properties of technological interest. Despite its weak fermentation ability (Contreras et al., 2014; Sadineni et al., 2012), this species possesses a high glycosidase activity, enabling the release of norisoprenoids and terpenes from their glycosylated precursors (Rodríguez et al., 2010b), as well as extracellular protease activity that can reduce protein haze formation and increase the liberation of nitrogen sources (Reid et al., 2012). In some strains,  $\beta$ -lyase activity involved in the release of varietal thiols has also been identified (Zott et al., 2011). Finally, adding *M. pulcherrima* before *S. cerevisiae* substantially changes the profile of fermentative compounds and aromas produced during winemaking. During *M. pulcherrima* / *S. cerevisiae* fermentation, a higher concentration of glycerol and a lower concentration of acetate have been obtained (Comitini et al., 2011; González-Royo et al., 2015; Sadoudi et al., 2012). This species has also been associated with a reduction in the final content of ethanol (Contreras et al., 2014; Quirós et al., 2014; Varela et al., 2016). Finally, combining *M. pulcherrima* with *S. cerevisiae* results in changes in the formation of aromas, with an increase in the final concentration of higher alcohols (Rodríguez et al., 2010b; Sadoudi et al., 2012) and variations in the production of ethyl esters and acetate esters depending on the fermentation conditions (Comitini et al., 2011; Hranilovic et al., 2018; Rodríguez et al., 2010; Varela et al., 2016). Overall, wines fermented with *M. pulcherrima* are perceived as more floral, with smoky aromas (González-Royo et al., 2015).

The key role of nutrient availability in fermentation performance and the formation of volatile compounds has been reported in pure cultures of *S. cerevisiae*. The initial concentration of sugar defines the final amount of ethanol and the fermentation duration, in addition to

affecting yeast growth (Arroyo-López et al., 2009; D'Amato et al., 2006; Ribereau-Gayon et al., 2006). Lipid deficiency can lead to stuck or sluggish fermentation because of a reduction in yeast viability (Julien et al., 2000; Sablayrolles et al., 1996). Under oxygen limitation conditions, yeasts are unable to synthesize sterols and fatty acids in the absence of extracellular lipids (Andreasen and Stier, 1954, 1953). In contrast, high concentrations of lipids negatively impact the production of ethyl esters by *S. cerevisiae* (Rollero et al., 2014; Saerens et al., 2008).

Because it is both the limiting factor for yeast growth in most fermentations and a parameter modulating the formation of aroma, the impact of nitrogen availability and composition has been intensively studied. Nitrogen deficiency in grape juice often results in stuck or sluggish fermentation (Bely et al., 1990). Regarding the formation of volatile molecules, in pure *S. cerevisiae* cultures, nitrogen has a quadratic impact on the production of higher alcohols and a positive effect on that of ethyl and acetate esters (Beltran et al., 2005; Jiménez-Martí et al., 2007; Mouret et al., 2014; Rollero et al., 2017). Nitrogen availability during fermentation has an impact on the release of varietal thiols, but the effect is not well characterized. Thus, opposite effects of nitrogen addition (as ammonium) have been reported, either increasing (Harsch and Gardner, 2013) or decreasing the release of thiols (Subileau et al., 2008) depending on the study.

Interactions exist between these parameters, as the effect of the initial concentration of lipids on growth, fermentation kinetics and volatile compound profiles vary with nitrogen availability (Casalta et al., 2013). Lipid limitation is more detrimental to cell viability when the nitrogen content of the must is high (Duc et al., 2017), and a positive interaction between nitrogen and lipids in the production of isobutanol and isoamyl alcohol has been reported (Rollero et al., 2014).

As the use and study of non-*Saccharomyces* yeasts is recent, little is known about their metabolism and phenotypic characteristics in fermentation or about the impact of nutrient availability on their metabolic activity. Furthermore, because of the usually poor fermentation capabilities of non-*Saccharomyces* yeasts, *S. cerevisiae* is still needed to ensure the completion of fermentation. Thus, different inoculation strategies are implemented: co-inoculation, where both yeast species are inoculated at the same time in the must, or sequential inoculation, where the non-*Saccharomyces* yeast is inoculated first, followed by the



inoculation of *S. cerevisiae* after one day or two. In this context, nutrients are shared between the two yeast species, and thorough knowledge about the effect of substrate availability on fermentation is essential for the efficient management of the process. In fact, during sequential inoculation, the rapid consumption of nutrients present at low concentrations in the medium by non-*Saccharomyces* species may prevent the implantation of *S. cerevisiae*. For example, a decrease in nitrogen availability due to *T. delbrueckii* consumption strongly decreases the growth of *S. cerevisiae* (Taillandier et al., 2014). However, these issues have been poorly addressed.

The objective of this study was to assess the effects of the initial concentrations of sugar, nitrogen and lipids on the dynamics and outcomes of sequential fermentation with *M. pulcherrima* and *S. cerevisiae*. To address this issue, a Box-Behnken experimental design (Box and Behnken, 1960) was adopted, allowing us to identify the simple and quadratic effects as well as the interaction effects of the tested variables on growth and fermentation parameters and the production of metabolites, with a focus on aroma production and the release of varietal thiols. The same design was applied to *S. cerevisiae* in pure cultures to identify the similarities and differences between these two inoculation strategies. The results are expected to provide insights into the mechanisms underlying the influence of the tested parameters on fermentation outcomes and how to better manage these parameters during fermentation to shape the characteristics of the wine.

## 3. Materials and Methods

### 3.1. Strains and media

*Metschnikowia pulcherrima* Flavia® and *Saccharomyces cerevisiae* Lalvin QA23® were provided by Lallemand SAS (Blagnac, France). The yeasts were preserved in glycerol (20% vol/vol) at -80 °C. All the fermentations were carried out using a synthetic medium simulating the composition of grape juice (Bely et al., 1990) with variable contents of sugars, yeast assimilable nitrogen (YAN) and lipids. The concentrations (3 different levels for each parameter) were chosen to be as different as possible while remaining within the range of concentrations found in natural grape musts (Table 22 and Table 23). A base synthetic medium was prepared omitting sugar, nitrogen and lipids and divided into three batches in which different concentrations of sugars (glucose:fructose 1:1) were added: 180 g/L, 220 g/L and 260

g/L. Each of the 3 media were subdivided into 3 parts that were further complemented with stock solutions of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (100 g/L) and amino acids (Rollero et al., 2014) to achieve a final concentration of 80 mgN/L, 190 mgN/L or 300 mgN/L. The medium was supplemented just before inoculation with phytosterols at 2, 5 or 8 mg/L. The stock solution of phytosterols was composed of 15 g/L of phytosterols (85451, Sigma Aldrich) in Tween 80 and ethanol (1:1, v/v).

Table 22: Concentrations of the studied parameters.

Parameters	Levels			Unit
	-1	0	1	
Sugar	180	220	260	g/L
Nitrogen	80	190	300	mg N/L
Lipids	2	5	8	mg/L

Table 23: Conditions tested for the Box-Behnken design.

Conditions	Sugar (g/L)	Nitrogen (mg N/L)	Lipids (mg/L)
180-80-5	180	80	5
180-190-2	180	190	2
180-190-8	180	190	8
180-300-5	180	300	5
220-80-2	220	80	2
220-80-8	220	80	8
220-190-5a	220	190	5
220-190-5b	220	190	5
220-190-5c	220	190	5
220-300-2	220	300	2
220-300-8	220	300	8
260-80-5	260	80	5
260-190-2	260	190	2
260-190-8	260	190	8
260-300-5	260	300	5

To study the production of varietal thiols, the synthetic media were supplemented with thiol precursors supplied by Nyséos (Montpellier, France) at concentrations of 105.1  $\mu\text{g/L}$  of cysteinylated 3-mercaptohexan-1-ol (C3MH), 539.5  $\mu\text{g/L}$  glutathionylated 3-mercaptohexan-1-ol (G3MH), 9.5  $\mu\text{g/L}$  of cysteinylated 4-mercapto-4-methylpentan-2-one (C4MMP) and 10.9  $\mu\text{g/L}$  glutathionylated 4-mercapto-4-methylpentan-2-one (G4MMP).

### 3.2. Fermentation conditions

Glass flasks of 330 mL were filled with 250 mL of medium and steam pasteurized for 15 min. After cooling, air was aseptically bubbled in the liquid phase under agitation for 20 min to reach an O<sub>2</sub> concentration in equilibrium with the air. This step was performed to ensure the same concentration of dissolved O<sub>2</sub> in all the fermenters after pasteurization. The aeration time needed was determined by measuring the concentration of dissolved O<sub>2</sub> with a non-invasive optical oxygen metre (Fibox 3 LCD trace, PreSens). The flasks were closed with fermentation locks allowing the release of CO<sub>2</sub> without the entry of oxygen.

Before use, the yeasts were inoculated on YPD agar plates and incubated at 28 °C for 4 days. A colony was transferred to a tube containing 5 mL of liquid YPD and incubated at 28 °C under agitation for 12 hours. This cell suspension was used to inoculate 20 mL of fresh YPD in an Erlenmeyer flask. The pre-culture was grown at 28 °C under agitation for 24 hours, and the cell concentration was measured using a Coulter counter (Model Z2, Beckman-Coulter, Margency, France). The appropriate volume for inoculation was centrifuged for 5 min at 2500 rpm, and the cells were resuspended in sterile physiological water. Fermenters were first inoculated with *M. pulcherrima* Flavia® at 1.10<sup>7</sup> cells/mL. After 48 hours of fermentation, *S. cerevisiae* Lalvin QA23® was added to the medium at 5.10<sup>6</sup> cells/mL. For pure cultures, *S. cerevisiae* was inoculated alone at 5.10<sup>6</sup> cells/mL. Fermentation was performed at 22 °C under agitation (280 rpm). Fermentation progress was monitored by regularly weighing the fermenters to calculate the amount of CO<sub>2</sub> released.

### 3.3. Analytical methods

The ammonium concentration was measured enzymatically by using a commercial kit (ENZYTECTM fluid Ammoniaque, DiaSys Diagnostic Systems Gmb). The total amino acid concentration was measured using the NOPA method (Nitrogen by OPA) as described by (Dukes and Butzke, 1998). To determine the composition of amino acids more precisely, samples were analysed by cation exchange chromatography with a Biochrom 30 system (Biochrom, Cambridge, UK) as described by Crepin et al. (2012).

The concentrations of glucose, fructose, ethanol, glycerol and acetate were measured by HPLC (HPLC 1290 Infinity, Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) with a Phenomenex Rezex ROA column (Agilent Technologies). The eluent solution consisted of 0.005 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at a flow rate of 0.6 mL/min. The acetate concentration was determined with a UV detector at

210 mm. Other compounds were detected with a refractive index detector. Data treatment was performed with the Agilent EZChrom software package.

Volatile thiol (3MH, 3MHA and 4MMP) concentrations were measured by the company Nyséos (Montpellier, France) as described by Deroite et al. (2018). Quantification was performed via the stable isotope dilution assay. 4MMP was derivatized with EDTA, L-cysteine and *O*-methylhydroxylamine hydrochloride and then quantified using a Trace Ultra gas chromatograph (GC) equipped with a Triplus Autosampler coupled with a TSQ 8000 triple quadrupole mass spectrometer detector from ThermoScientific (Austin, Texas, USA). Data treatment was performed using Xcalibur software (ThermoScientific, Austin, Texas, USA). 3MH and 3MHA were derivatized with *N*-phenylmaleimide. Derivatized compounds were injected onto a ProtID HPLC-polymeric chip (ZORBAX 300SB-C18, 40 nL, 5 µm and 75 µm \* 43 µm, 5 µm). Compounds were eluted with Agilent Series 1260 Infinity nano-LC (Agilent, Santa Clara, California, USA) connected to an Agilent 6460 triple quadrupole mass spectrometer (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Data analysis was performed with Agilent Mass Hunter ChemStation software.

Fermentative aromas were measured by GC-MS following the method described by Rollero et al., (2014). Ten microliters of a solution of the deuterated standard at 100 ng/L was added to 5 mL of sample. Volatile compounds were extracted using 1 mL of dichloromethane. After shaking for 20 minutes and 5 min of centrifugation at 5 000 rpm at 4 °C, the organic phase was retrieved. This step was repeated for the aqueous phase. The total organic phase was dried with Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated under nitrogen flux to obtain a final volume of 0.5 mL.

Samples were analysed in a Hewlett Packard 6890 (Agilent Technologies) gas chromatograph equipped with a CTC Combi PAL AOC-5000 (Shimadzu, Columbia, Etats-Unis) autosampler and an HP 5973 (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) mass spectrometry detector. The gas chromatograph was equipped with a DB-WAX (30 m \* 0.250 mm \* 0.25 µm, Agilent J&W) column. The carrier gas was helium applied at a flow rate of 1.0 mL/min and a linear velocity of 36 cm/s in constant flow mode. The initial oven temperature was 40 °C for 3 min, which was then increased to 160 °C at a rate of 4 °C/min and finally to 220 °C at 15 °C/min, then kept at 220 °C for 10 min. The mass spectrometry detection parameters were previously described by Rollero et al. (2014). Response factors were calculated from calibration curves obtained with standard solutions prepared in hydroalcoholic solutions containing volatile

molecules with various concentrations (Table 24), processed at the same time and via the same method as the samples.

Table 24: Concentration ranges (in mg/L) of volatile compounds measured by GC-MS.

	Concentration range (mg/L)	
	minimum	maximum
Propanol	0.50	20.12
Isobutanol	0.59	29.88
Isoamyl alcohol	0.78	39.30
Phenylethanol	0.66	33.28
Isobutyl acetate	0.05	2.49
Isoamyl acetate	0.05	2.81
Phenylethyl acetate	0.06	3.43
Ethyl isobutyrate	0.05	2.65
Ethyl hexanoate	0.07	3.72
Ethyl octanoate	0.05	2.97
Ethyl decanoate	0.05	2.68
Isobutyric Acid	0.04	2.23
Hexanoic Acid	0.42	17.08
Octanoic Acid	0.41	20.80
Decanoic Acid	0.05	2.14

### 3.4. Measure of $\beta$ -lyase activity

$\beta$ -lyase activity was evaluated in a colorimetric reaction described by Roncoroni et al., (2011). The determination was based on the quantification of the amount of ethanethiol produced from the degradation of the specific substrate S-ethyl-cysteine by  $\beta$ -lyase enzymes. The reaction was performed by mixing 250  $\mu$ L of S-ethyl-cysteine, 100  $\mu$ L of reaction buffer, 250  $\mu$ L of DTNB and 250  $\mu$ L of culture supernatant. The reaction buffer was prepared with EDTA at 0.1 mmol/L and PLP (a coenzyme) at 0.1 mmol/L in McIlvaine buffer (pH 3.4). To avoid interference with other sulphur compounds potentially produced during fermentation, a blank was set up by replacing the S-ethyl-cysteine with the same volume of water. After 2 hours of incubation at 28 °C under agitation, the mixture was centrifuged before reading the absorbance at 400 nm. The increase in absorbance was proportional to the amount of ethanethiol produced by the enzymatic reaction.

### 3.5. Data treatment

The main parameters describing the fermentation kinetics were calculated from the measured CO<sub>2</sub> production over time. The fermentation duration corresponded to the time needed to

reach the theoretical final CO<sub>2</sub> concentration depending on the initial sugar content of the medium. The lag phase duration was calculated as the intersection between the x-axis and the tangent at the inflexion point of the CO<sub>2</sub> production curve. The time derivative of the CO<sub>2</sub> production was calculated to obtain the fermentation rate. In pure culture, the maximal value of the fermentation rate was referred to as R<sub>max</sub>, and the time required to reach this rate was referred to as T<sub>Rmax</sub>. In sequential inoculations, the maximal fermentation rate obtained before the inoculation of *S. cerevisiae* was referred to as R<sub>max,MP</sub> and the time required to reach it as T<sub>Rmax,MP</sub>. Conversely, the maximal fermentation rate obtained after the inoculation of *S. cerevisiae* was referred to as R<sub>max,SC</sub>, and the time required to reach it was T<sub>Rmax,SC</sub>.

Statistical analysis and response surface representation were performed using R (version 3.4.3) and rsm library (Lenth, 2009).

The effect of the parameters on the experimental results was modelled with a polynomial response surface:

$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{1,2}x_1x_2 + \beta_{1,3}x_1x_3 + \beta_{2,3}x_2x_3 + \beta_{1,1}x_1^2 + \beta_{2,2}x_2^2 + \beta_{3,3}x_3^2 + \varepsilon$$

where:

Y: observed result

x<sub>1</sub>, x<sub>2</sub>, x<sub>3</sub>: coded values of sugar, nitrogen and lipids concentrations

β<sub>0</sub>: intercept term

β<sub>i</sub>: linear coefficient

β<sub>i,j</sub>: interaction coefficient

β<sub>i,i</sub>: quadratic coefficient

ε: independent error term

The reliability of the model was evaluated by the lack of fit test, the Fisher test and the adjusted coefficient of determination, adjR<sup>2</sup>. According to these indicators, the model was simplified by removing the interaction and/or the quadratic term if necessary.

Principal component analysis (PCA) was carried out with the FactoMineR package (Le et al., 2008).

## 4. Results

To address the issue of the effect of nutrient availability on fermentation progress under *M. pulcherrima* / *S. cerevisiae* sequential inoculation, the growth and fermentation performance as well as the production profiles of carbon central metabolites (CCM) and volatile compounds were compared between *S. cerevisiae* pure cultures and sequential fermentation using varying concentrations of lipids, sugars and nitrogen in both cases. To optimize the number of experiments necessary to test three factors at three levels, a Box-Behnken experimental design was used, consisting of fifteen fermentations under thirteen different conditions, as summarized in Table 23. By fitting the results with the model equation, we can determine the effect of each factor on the studied parameters as well as the interactions between the factors. By supplementing the synthetic must with thiol precursors, the production of thiols and the enzymatic activity of  $\beta$ -lyases can be assessed.

Regardless of the inoculation strategy and nutrient availability, all the fermentations reached dryness, with a residual sugar concentration lower than 2 g/L at the end of culture.

### 4.1. Fermentation kinetics

Substantial differences in the fermentation kinetics were observed between *S. cerevisiae* pure culture and sequential fermentation with *M. pulcherrima* and *S. cerevisiae* (Figure 4A). As widely reported (Beltran et al., 2005; Bely et al., 1990; Mendes-Ferreira et al., 2004), the rate of *S. cerevisiae* fermentation was maximal after approximately 24 hours, after which it decreased continuously throughout the process. In contrast, fermentative activity evolved in two steps during sequential fermentation, showing a first maximum during the first 48 hours, when only *M. pulcherrima* supported fermentation, followed by a second maximum after inoculation with *S. cerevisiae* and corresponding to a higher fermentation rate.

To provide an overview of the effect of nutrients on fermentation progress, the main fermentation traits (maximal fermentation rate before and after *S. cerevisiae* inoculation,  $R_{\max}$  MP and  $R_{\max}$  SC, respectively; the time to reach this maximum,  $T_{R_{\max}}$ ; the lag phase duration; and the fermentation duration) were measured in sequential inoculation and in pure cultures and represented using principal component analyses (PCAs) (Figure 4B and C). Similar

responses were obtained for the two inoculation protocols, for which the two first axes of the PCA representation explained 89% of the total variance. Individuals were separated depending on both the sugar concentration along the vertical axis and the nitrogen concentration along the horizontal axis. Overall, an increase in the sugar concentration led to an increase in the lag phase and fermentation durations, as well as an increase in the time to reach the maximal fermentation rate,  $R_{\max}$ , both before and after *S. cerevisiae* inoculation. Otherwise, increased nitrogen availability led to a higher  $R_{\max}$  before and after *S. cerevisiae* inoculation, reducing the fermentation duration but extending the lag phase duration.



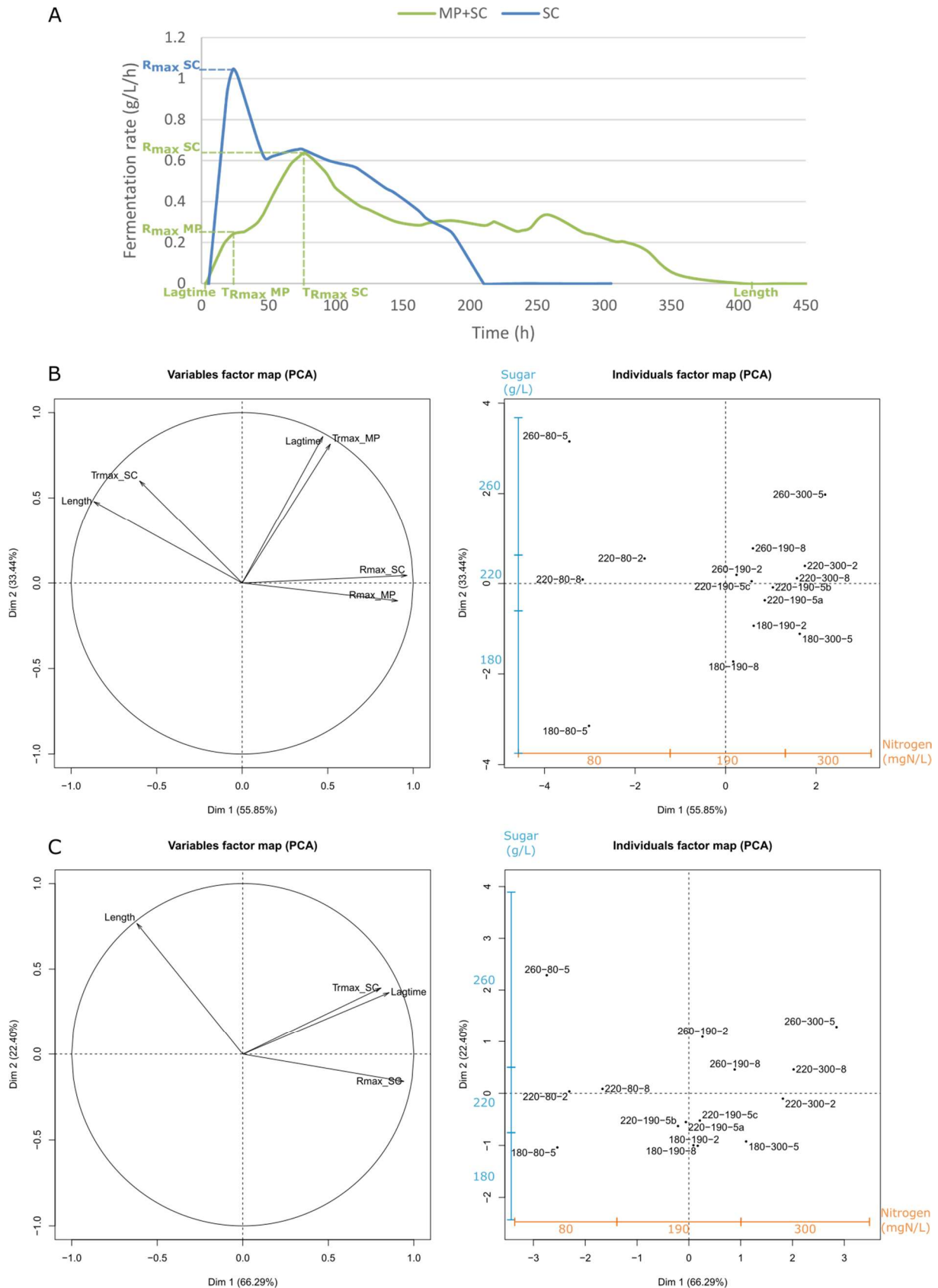


Figure 4: Example of the fermentative kinetics (A) of *M. pulcherrima* and *S. cerevisiae* in sequential inoculation (MP+SC, green line) and *S. cerevisiae* in pure cultures (SC, blue line) and principal component analysis (PCA) of fermentative parameters in sequential inoculation of

*M. pulcherrima* and *S. cerevisiae* (B) and in pure cultures of *S. cerevisiae* (C).  $R_{max\_MP}$ : maximal fermentation rate reached before the inoculation of *S. cerevisiae*;  $R_{max\_SC}$ : maximal fermentation rate reached after the inoculation of *S. cerevisiae*;  $Tr_{max\_MP}$  and  $Tr_{max\_SC}$ : time to reach  $R_{max}$  before and after the inoculation of *S. cerevisiae*. Individuals are identified as S-N-L, where S: sugar concentration; N: nitrogen concentration and L: lipid concentration. The blue and orange axes indicate the repartition of individuals according to the concentrations of sugar and nitrogen.

A more thorough analysis (Figure 5) revealed the consequences of early inoculation with *M. pulcherrima* for fermentation performance. First, the maximal fermentation rate during sequential fermentation, varying from 0.2 to 0.8 g/L/h depending on nitrogen availability, was always lower than that measured in *S. cerevisiae* pure cultures (between 0.4 and 1.4 g/L/h) (Figure 5A and B). It is noteworthy that the increase in  $R_{max}$  with the nitrogen concentration was less pronounced during sequential fermentation compared with pure culture modalities and that nitrogen availability had no impact on the fermentation rate of *M. pulcherrima*.

During *S. cerevisiae* fermentation, the lag phase (Figure 5C), which was between 10 and 16 hours, was shorter when nitrogen was limiting (80 mg N/L). This effect of nitrogen availability was not found in *M. pulcherrima* / *S. cerevisiae* sequential fermentation, for which the lag phase varied from 6 to 11 hours. Finally, nutrient availability had the same effect on the duration of sequential fermentation and pure cultures, with a substantial increase in the duration when nitrogen was limiting (80 mg N /L). An interaction between nitrogen and the initial sugar concentration was observed, with a more pronounced effect of the sugar concentration on the fermentation duration under a low nitrogen concentration compared with the other conditions (190 and 300 mg N/L, Figure 5D).

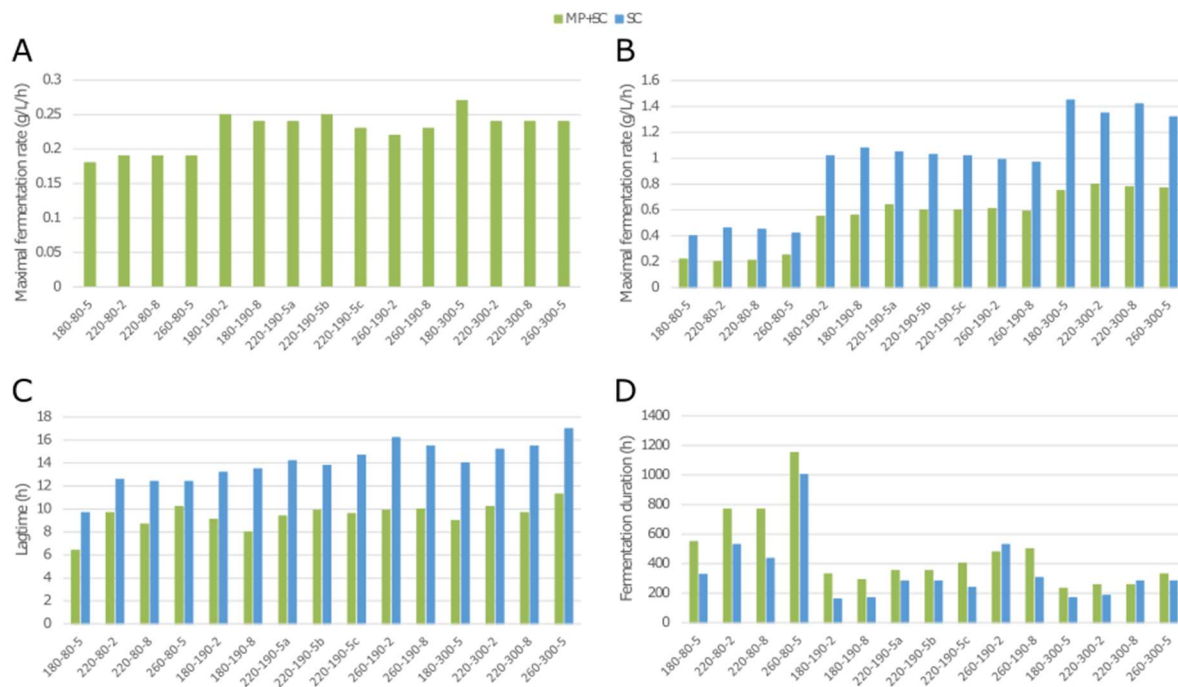


Figure 5: Parameters describing the fermentation kinetics depending on the medium composition and inoculation strategy. A: Maximal fermentation rate for *M. pulcherrima* Flavia®; B: maximal fermentation rate for *S. cerevisiae* Lalvin QA23®; C: lag phase duration; D: fermentation duration. MP+SC, green bars: sequential fermentation. SC, blue bars: pure cultures of *S. cerevisiae*. Conditions are labelled as sugar-nitrogen-lipids.

#### 4.2. Nitrogen consumption and biomass production

The growth of the two species was investigated in association with the nitrogen consumption profile during pure and sequential fermentation. The residual nitrogen concentration in the medium was first measured after 48 hours of fermentation with *M. pulcherrima* before the inoculation of *S. cerevisiae* (Figure 6). The consumption of nitrogen by *M. pulcherrima* was strongly dependent on the initial YAN concentration and accounted for 84, 47 and 39% of the nitrogen provided during fermentation with 80, 190 or 300 mg N/L, respectively. However, the amount of consumed nitrogen (between 65 and 122 mg N/L) did not significantly affect the *M. pulcherrima* population after 48 hours of fermentation, which displayed similar levels regardless of nutrient availability (Figure 7A). Finally, it is noteworthy that no significant increase in the *M. pulcherrima* population was found after *S. cerevisiae* addition (Figure 7A and B), indicating that *M. pulcherrima* did not grow after 48 h in sequential fermentation.

While the available nitrogen sources were almost entirely consumed by *M. pulcherrima* when nitrogen was limiting, the sources can be differentiated on the basis of their level of consumption depending on the nitrogen concentration (190 or 300 mg N/L). Branched amino

acids, glutamine, glutamate and lysine were exhausted 48 hours after *M. pulcherrima* addition, regardless of the initial YAN concentration. Other amino acids such as arginine, serine and threonine were largely consumed in the presence of 190 mg N/L, but their assimilation remained incomplete (55%) when 300 mg N/L was supplied in the medium. Finally, only a fraction of the provided arginine, ammonium, alanine and aromatic amino acids was consumed when nitrogen was present in excess in the medium. As a result, the composition of the nitrogen resources when *S. cerevisiae* was added differed according to the initial YAN concentration, even though ammonium, arginine, alanine and tryptophan were the most abundant compounds in all the conditions (Supplementary data 1).

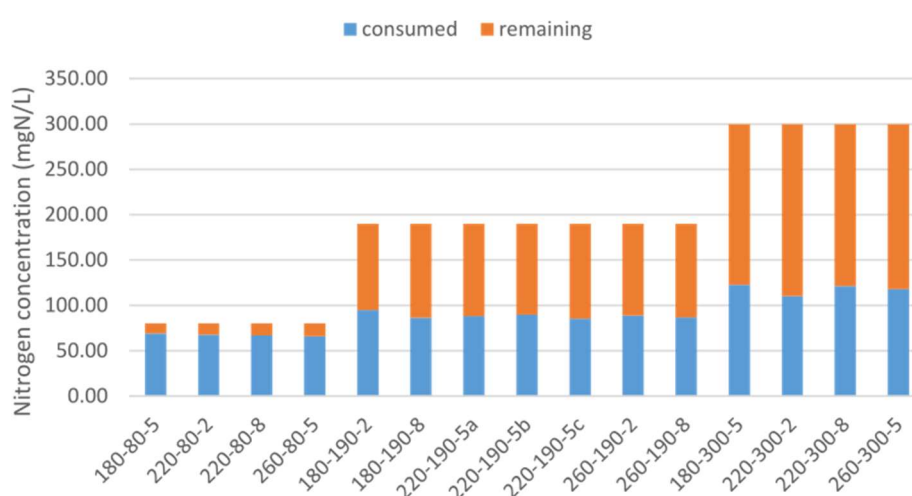


Figure 6: Concentrations of assimilable nitrogen consumed (blue bars) and remaining (orange bars) after 48 h of fermentation with *M. pulcherrima*, depending on the conditions. Conditions are labelled as sugar-nitrogen-lipids.

The concentration of remaining nitrogen had a substantial effect on the implantation of *S. cerevisiae* (Figure 6, Figure 7B and C). The population of *S. cerevisiae* 48 hours after inoculation was small under conditions with 80 mgN/L of initial nitrogen ( $18 \times 10^6$  cells/mL on average), consistent with the low amount of available YAN (less than 13 mg N/L), but the population reached  $50 \times 10^6$  cells/mL and  $75 \times 10^6$  cells/mL in the presence of 190 mg N/L and 300 mg N/L, respectively. At the end of fermentation, the *S. cerevisiae* population varied between 82 and  $150 \times 10^6$  cells/mL according to the initial nitrogen availability, while no viable *M. pulcherrima* cells were detected (Figure 7C). It is noteworthy that this response to changes in nitrogen availability in terms of the final population was similar to that observed in *S. cerevisiae* pure cultures, in which the final population increased from 72 to  $185 \times 10^6$  cells/mL with an increase in the initial nitrogen content from 80 to 300 mg/L (Supplementary data 2).

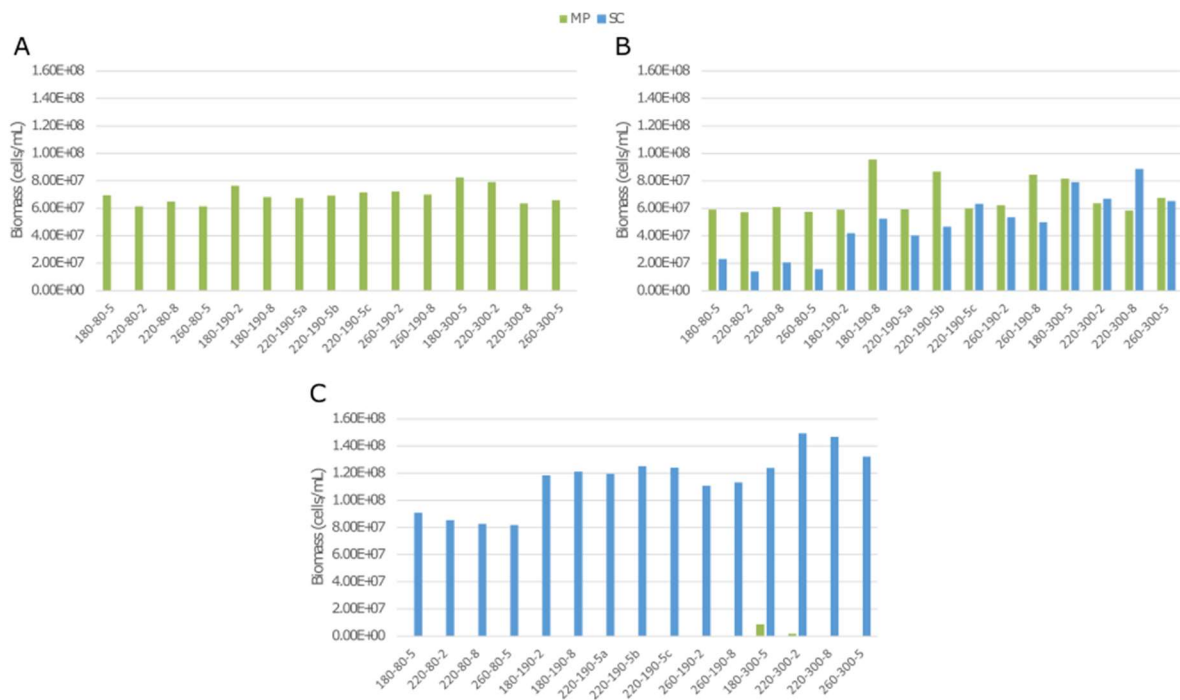


Figure 7: Biomass concentrations (cells/mL) during fermentation in sequential inoculation of *M. pulcherrima* (MP, green bars) and *S. cerevisiae* (SC, blue bars). A: 48 h after the inoculation of *M. pulcherrima*; B: 48 h after the addition of *S. cerevisiae*; C: at 90% of fermentation progress. Conditions are labelled as sugar-nitrogen-lipids.

#### 4.3. Production of ethanol, acetate and glycerol

The production of ethanol, acetate and glycerol was measured after 48 hours of fermentation with *M. pulcherrima* and at the end of fermentation in sequential inoculation and in pure cultures of *S. cerevisiae* (Figure 8).

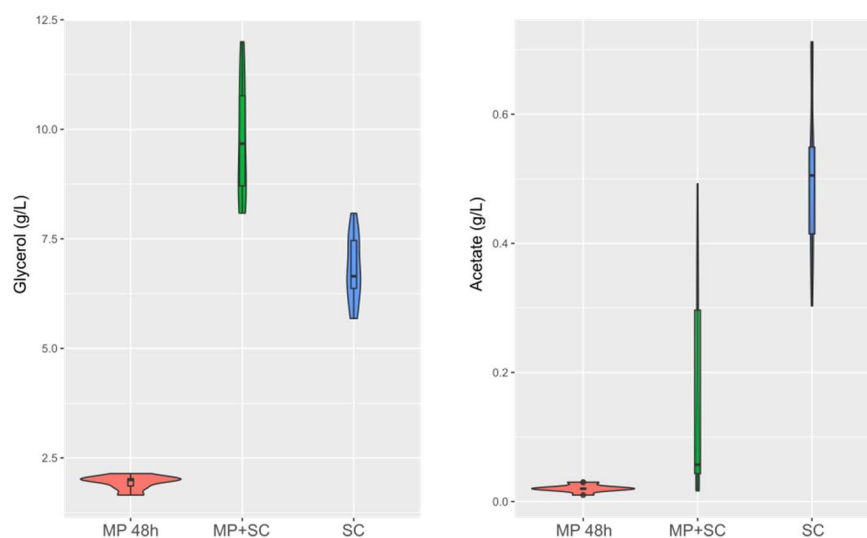


Figure 8: Production of glycerol and acetate in g/L at the end of fermentation (or at 48 h of fermentation if specified) in pure cultures of *S. cerevisiae* (SC), in sequential inoculation at 48 h (MP 48 h) or at the end of the fermentation (MP+SC). At 48 h of fermentation, only *M. pulcherrima* is present in the medium.

First, it is noteworthy that the production of ethanol at the end of fermentation was lower in sequential inoculation than in pure cultures of *S. cerevisiae* (Table 25). The difference was 8-9 g/L on average, regardless of the composition of the medium, while the sugar consumption was similar for the two inoculation modalities. This observation is consistent with the differences in the ethanol production yield between the studied species. We observed a lower ethanol production yield for *M. pulcherrima* ( $0.424 \text{ g}_{\text{EtOH}}/\text{g}_{\text{sugar}}$ , calculated 48 h before the inoculation of *S. cerevisiae*) compared to *S. cerevisiae* ( $0.487 \text{ g}_{\text{EtOH}}/\text{g}_{\text{sugar}}$  during pure culture).

Table 25: Concentrations of ethanol in g/L and in %vol at the end of fermentation in sequential inoculation (MP+SC) or in pure cultures (SC) depending on the initial sugar concentration in the medium.

Initial sugar concentration (g/L)	Mean ethanol concentration (g/L)		Difference %	Mean Abv (%vol)		
	MP+SC	SC		MP+SC	SC	Difference
180	80.97	89.57	10%	10.3	11.4	1.1
220	102.58	110.83	7%	13.0	14.0	1.0
260	123.28	131.23	6%	15.6	16.6	1.0

The lower formation of ethanol during sequential inoculation was combined with increased formation of glycerol and succinate by up to + 4.7 g/L and + 1.1 g/L, respectively



(Supplementary data 3). Therefore, the production of glycerol in the presence of *M. pulcherrima* was between 8.1 and 12.0 g/L and was higher than the formation of glycerol during *S. cerevisiae* pure fermentation (5.7 and 8.1 g/L), irrespective of the initial must composition (Supplementary data 3).

In contrast, acetate production was considerably decreased when *M. pulcherrima* was inoculated first (Figure 8). The final concentrations of acetate were between 0.03 and 0.49 g/L, with a mean value of 0.16 g/L, in sequential inoculation and between 0.30 and 0.71 g/L, with a mean value of 0.51 g/L, in pure cultures. This was likely related to the low capacity of *M. pulcherrima* to produce acetate (0.01 g/L to 0.03 g/L produced in 48 hours). Interestingly, during fermentation with 190 or 300 mg N/L, the production of acetate remained limited after *S. cerevisiae* inoculation (yield < 0.2 mg<sub>acetate</sub>/g<sub>Sugar</sub>) and did not exceed 0.06 g/L at the end of sequential fermentation. In contrast, when nitrogen was limiting, the yield of acetate production after *S. cerevisiae* inoculation was higher, ranging from 1.7 to 2.2 mg<sub>acetate</sub>/g<sub>Sugar</sub>, resulting in a final acetate concentration of 0.4 g/L.

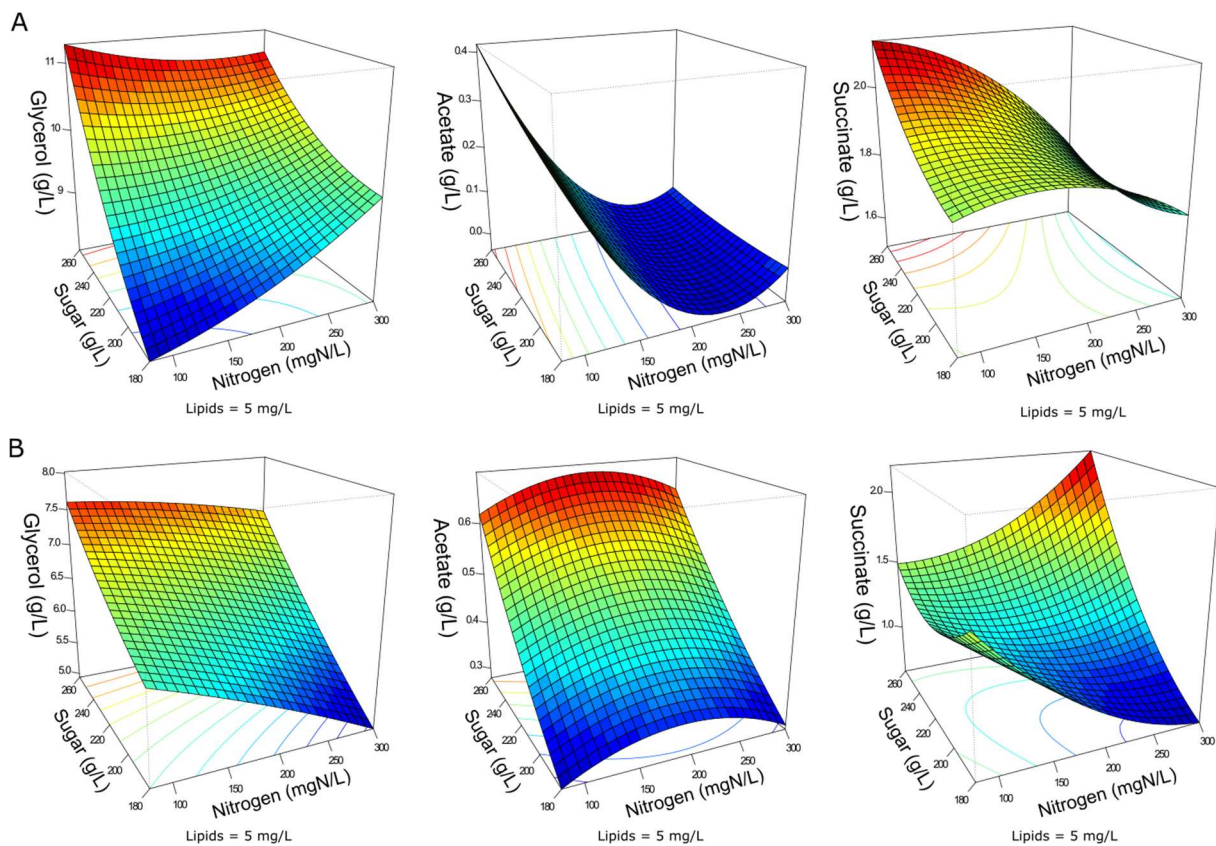


Figure 9: Response surfaces of glycerol, acetate and succinate for fermentation in sequential inoculation (A) or in pure cultures of *S. cerevisiae* (B) in relation to the variation of sugar, lipids and nitrogen. For all graphs, the lipid concentration is fixed at 5 mg/L.

This observation indicated differential production of acetate during sequential fermentation depending on the initial YAN concentrations. Then, to obtain an overview of the effect of nutrient availability on the production of glycerol, acetate and succinate, the dataset was analysed with a quadratic model fitting the response surfaces from the Box-Behnken design (Table 26, Figure 9). For *S. cerevisiae* in pure culture, a positive effect of sugar on the production of glycerol, succinate and acetate was observed, combined with simple or quadratic negative effects of nitrogen on glycerol and acetate, respectively. Last, a positive interaction effect between sugar and nitrogen was observed on the production of succinate. The implementation of sequential inoculation with *M. pulcherrima* resulted in important changes in the impact of nutrient availability on the formation of glycerol, acetate and succinate. Most notably, the negative effect of nitrogen on glycerol production observed in *S. cerevisiae* in pure cultures was reversed by the presence of *M. pulcherrima*, as a positive effect of nitrogen availability was found in sequential fermentation (Figure 9). Moreover, an interaction between nitrogen and sugar occurred, as the effect of nitrogen was positive when the concentration of sugar was low but was slightly negative when the concentration of sugar was high. Otherwise, the strong effect of nitrogen on the production of acetate during sequential fermentation was confirmed by the evidence of a negative simple effect of nutrient combined with a slight positive quadratic effect. This pattern contrasted with that observed in *S. cerevisiae* pure cultures, in which sugar availability exerted the main effect.

Table 26: Effects of must parameters on the production of glycerol and acetate by *M. pulcherrima* in pure cultures after 48 h of fermentation (MP), *M. pulcherrima* and *S. cerevisiae* in sequential inoculation (MP+SC) and *S. cerevisiae* in pure cultures (SC). +: positive effect, -: negative effect. Green:  $p < 0.001$ , blue:  $p < 0.01$ , orange:  $p < 0.05$ . N: nitrogen, S: sugar, L: lipids.

		Simple effects			Quadratic effects			Interactions		
		N	S	L	N <sup>2</sup>	S <sup>2</sup>	L <sup>2</sup>	N:S	N:L	S:L
MP	glycerol	+	+	+	-					
	succinate	+		+	-					
	acetate	+	-		+		+	-		
MP+SC	glycerol	+	+			+		-		
	succinate	-	+	+					+	
	acetate	-	+		+					
SC	glycerol	-	+	+				+		
	succinate		+					+		
	acetate		+		-					



#### 4.4. Fermentative aromas

The variability in the production of fermentative aromas depending on both the inoculation procedure and nutrient availability was then assessed by comparing the production of 30 volatile compounds after 48 hours of *M. pulcherrima* fermentation and at the end of sequential fermentation or *S. cerevisiae* pure culture (Figure 10). The complete dataset (Supplementary data 4 and Supplementary data 5) was analysed with the model associated with the Box-Behnken design (Table 27) and represented with response surfaces (Figure 11 and Figure 12).

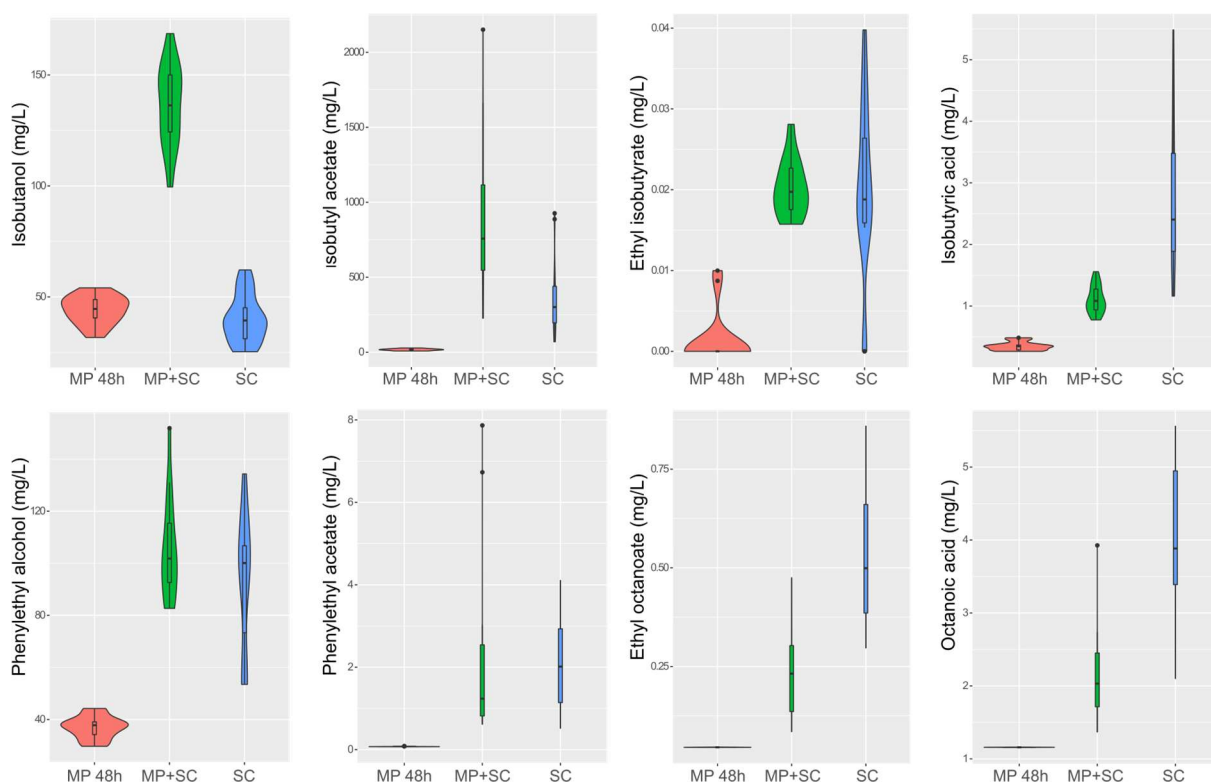


Figure 10: Combined violin and box plot representation of some aroma compounds produced by *M. pulcherrima* in pure cultures after 48 h of fermentation (MP), *M. pulcherrima* and *S. cerevisiae* in sequential inoculation after 90% of fermentation progress (MP+SC) and *S. cerevisiae* in pure cultures after 90% of fermentation progress (SC).

The production of fatty acids and their corresponding esters was lower in sequential inoculation than in pure cultures of *S. cerevisiae* (Figure 10). This difference was increased for medium-chain fatty acids such as decanoic acid. Fatty acids and their ethyl ester derivatives globally presented the same response to environmental parameter changes irrespective of the inoculation method (Table 27). All the compounds were positively impacted by the concentration of nitrogen. In sequential inoculation, sugar positively influenced the

production of fatty acid ethyl esters. Negative effects of lipids on the production of ethyl hexanoate and hexanoic acid in sequential inoculation and the production of ethyl hexanoate, hexanoic acid and ethyl octanoate in pure cultures of *S. cerevisiae* were observed.

The production of fatty acids and their corresponding ethyl esters was lower in sequential inoculation than in *S. cerevisiae* pure cultures (Figure 10). This difference was increased for fatty acids with the longest chains, with 2-fold and 4.7-fold decreases in the production of hexanoic and decanoic acids, respectively. Overall, the production of these two families of volatile molecules showed the same response to environmental parameter changes irrespective of the inoculation protocol (Table 27). The formation of medium-chain fatty acids and their ethyl ester derivatives was positively affected by the sugar concentration but was mainly affected by nitrogen availability, while lipid availability had a very limited effect. A negative effect of lipids was observed only for the production of the compounds with the shortest carbon chains, specifically for the production of ethyl hexanoate and hexanoic acid in sequential inoculation and the production of ethyl hexanoate, hexanoic acid and ethyl octanoate in pure cultures of *S. cerevisiae*.

The effects of sugar, nitrogen and lipids on the compounds produced through the Ehrlich pathway depends on their formation pathway. The production of propanol and its derivatives (propyl acetate, propionic acid and ethyl propionate) was similar regardless of the inoculation strategy. Only the production of propionic acid was lower in sequential inoculation with *M. pulcherrima*. These compounds showed similar responses to changes in nutrient availability, characterized mainly by higher production with higher nitrogen availability.

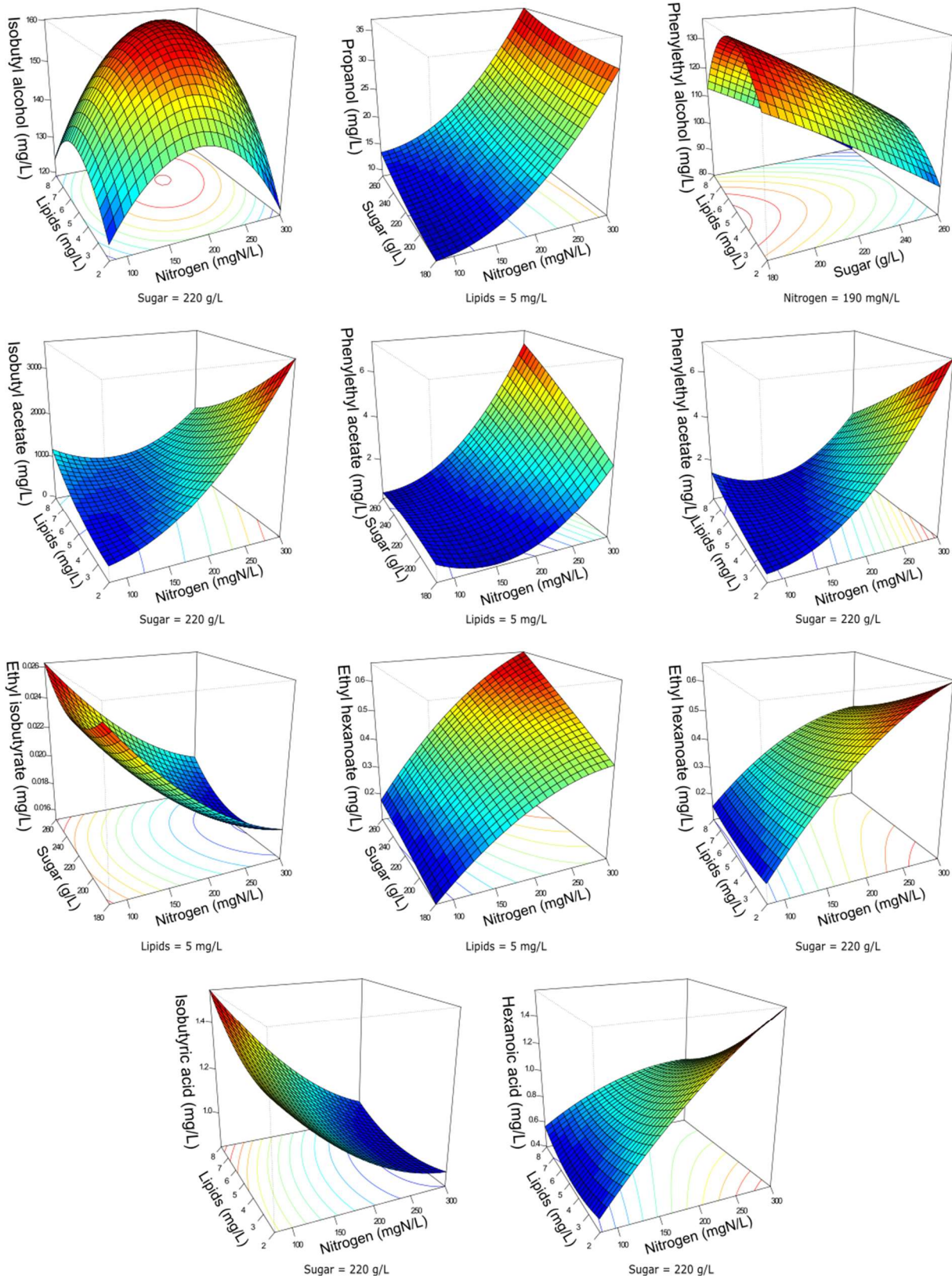


Figure 11: Response surfaces of fermentative aromas in relation to the variation of sugar, lipids and nitrogen in sequential inoculation. For all graphs, one parameter is fixed.

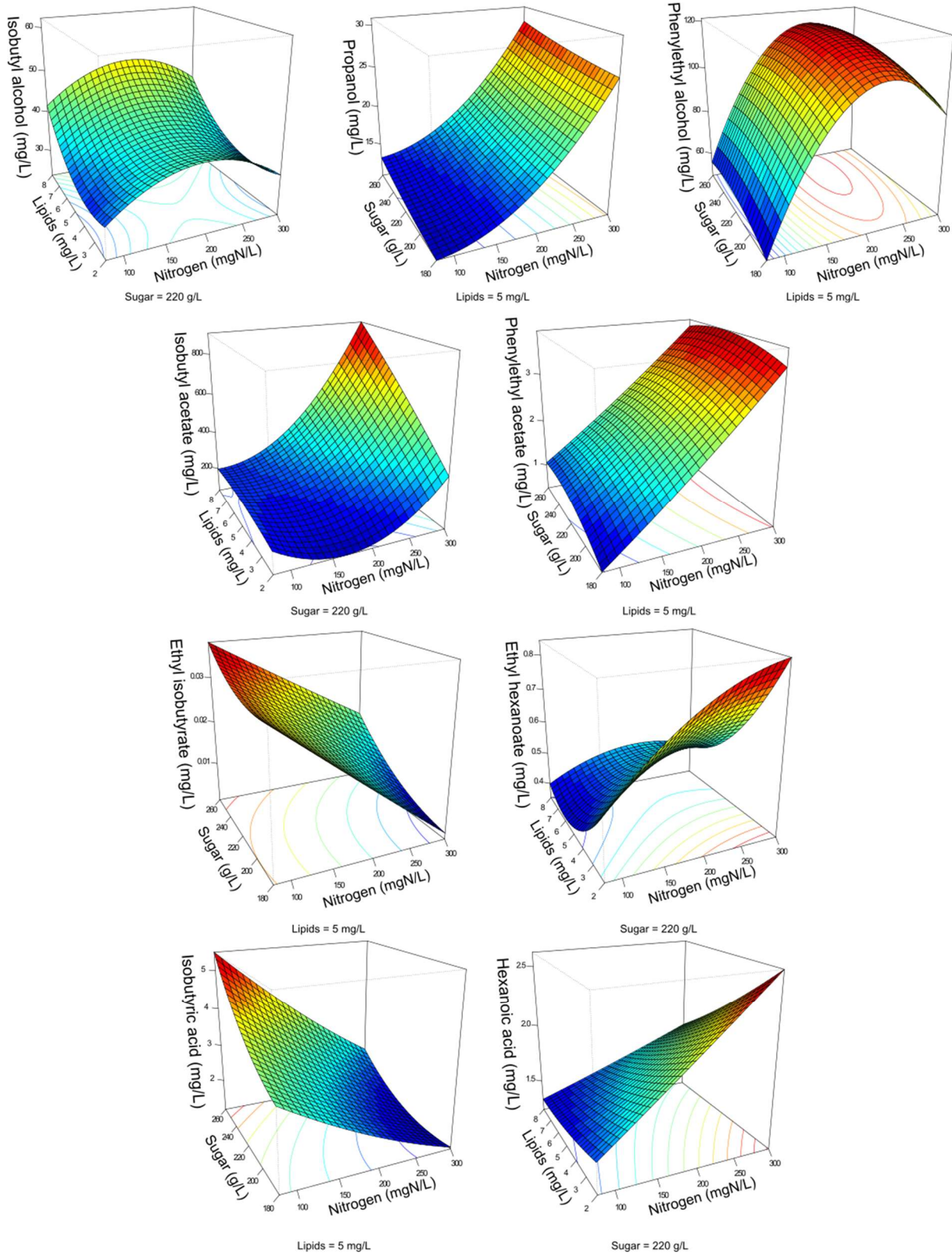


Figure 12: Response surfaces of fermentative aromas in relation to the variation of sugar, lipids and nitrogen in pure cultures of *S. cerevisiae*. For all graphs, one parameter is fixed.



Table 27: Effects of must parameters on the production of the main fermentative aromas by *M. pulcherrima* and *S. cerevisiae* in sequential inoculation (MP+SC) and *S. cerevisiae* in pure cultures (SC). +: positive effect, -: negative effect. Green:  $p < 0.001$ , blue:  $p < 0.01$ , orange:  $p < 0.05$ . N: nitrogen, S: sugar, L: lipids.

		Simple effects			Quadratic effects			Interactions		
		N	S	L	N <sup>2</sup>	S <sup>2</sup>	L <sup>2</sup>	N:S	N:L	S:L
MP+SC	Propanol	+	+		+					
	Isobutanol				-					
	Isoamyl alcohol		+		-					
	Phenylethanol		-				-			
	Isobutyl acetate	+								
	Isoamyl acetate	+	+	-	+			+	-	
	Phenylethyl acetate	+	+	-	+			+	-	
	Ethyl isobutyrate	-								
	Ethyl hexanoate	+	+	-	-					
	Ethyl octanoate	+	+							
	Ethyl decanoate	+	+					+		
	Isobutyric Acid	-		+				+		+
	Hexanoic Acid	+		-		-				
	Octanoic Acid	+								
	Decanoic Acid	+	+		-					
	SC	Propanol	+							
Isobutanol			+	+	-				+	
Isoamyl alcohol			+		-					
Phenylethanol		+			-					
Isobutyl acetate		+	+	+	+				+	
Isoamyl acetate		+	+		+			+		
Phenylethyl acetate		+								
Ethyl isobutyrate		-	+	+						
Ethyl hexanoate		+		-			+			
Ethyl octanoate		+		-						
Ethyl decanoate		+								
Isobutyric Acid		-	+	+						
Hexanoic Acid		+	-	-						
Octanoic Acid		+								
Decanoic Acid		+	+							

The final concentration of compounds from the isobutanol family was highly impacted by the presence of *M. pulcherrima*. Indeed, the production of isobutanol in pure cultures of *S. cerevisiae* was between 25 and 62 mg/L, while in sequential inoculation, it ranged between 99 and 167 mg/L. The production of isobutyl acetate was also 3 times higher with *M. pulcherrima* than in pure cultures of *S. cerevisiae*. In contrast, the production of isobutyric acid was 2.5 times lower in sequential inoculation. The three tested parameters affected the

production of these compounds by *S. cerevisiae*. However, almost only nitrogen had an effect on the production of these compounds. Nitrogen had a quadratic effect on the production of isobutanol, where maximal production was observed in the presence of 200 mgN/L of assimilable nitrogen. The production of isobutyl acetate increased with nitrogen availability. In contrast, the production of isobutyric acid decreased with increasing concentrations of nitrogen. Only the production of isobutyric acid was positively impacted by the concentration of lipids.

The effect of sequential inoculation with *M. pulcherrima* on the production of compounds derived from isoamyl alcohol was less pronounced than it was for isobutanol. The production of isoamyl alcohol was increased by an average of 15%, and the production of isoamyl acetate was increased by 44% in sequential inoculation. In contrast, the production of isovaleric acid was decreased by 73% in sequential inoculation. Consequently, the effect of *M. pulcherrima* on the way in which the nutrient concentration impacted the production of these compounds was weak.

Similar to other higher alcohols, nitrogen had a quadratic effect on the production of isoamyl alcohol. Nitrogen had a positive effect on the production of isoamyl acetate, in interaction with a negative effect of lipids. Nitrogen had a negative effect on the production of isovaleric acid. Finally, sugar had a positive effect on the production of all these compounds.

The production of phenyl ethanol in sequential inoculation was higher than in pure cultures of *S. cerevisiae* in the conditions with low levels of nitrogen and similar to that when nitrogen availability was higher. The production of this compound in pure cultures is impacted by the nitrogen concentration in a quadratic manner, but the effect of nitrogen disappears under fermentation with *M. pulcherrima*. In contrast, a positive effect of nitrogen on the production of phenyl ethyl acetate was present under both inoculation conditions. In addition, phenyl ethyl acetate production was subject to a positive effect of sugar and a positive interaction between sugar and nitrogen as well as a negative effect of lipids and a negative interaction between lipids and nitrogen.

#### 4.5. Varietal thiols

Finally, we investigated the incidence of the inoculation procedure and nutrient availability on thiol liberation during wine fermentation (Figure 13, Figure 14, and Table 28).

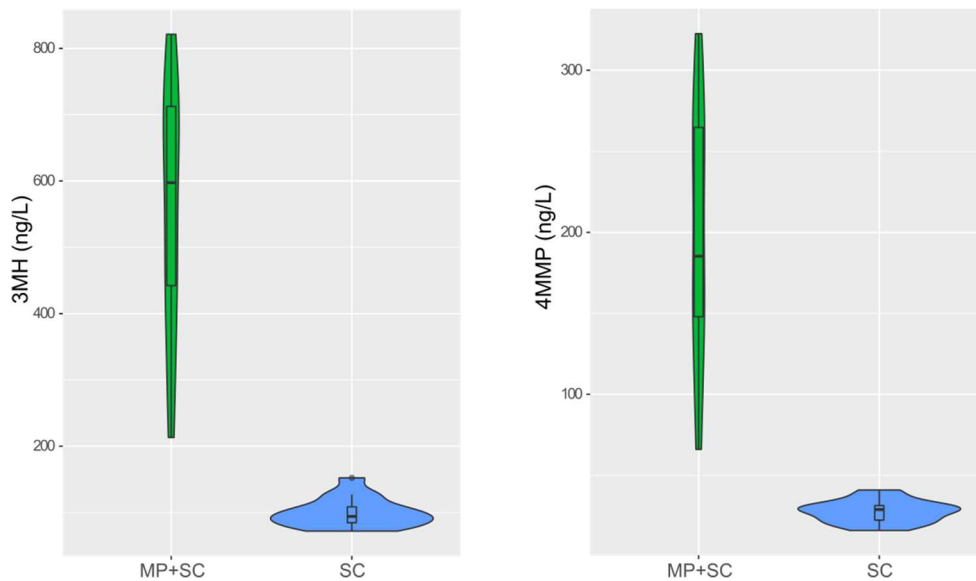


Figure 13: Violin plot of the production of 3MH and 4MMP in sequential inoculation (MP+SC) or in pure cultures of *S. cerevisiae* (SC), at 90% of fermentation progress.

Regardless of the fermentation conditions, the sequential inoculation of *M. pulcherrima* and *S. cerevisiae* led to a marked increase in thiol release compared to that in *S. cerevisiae* pure cultures (Figure 13). Indeed, in pure cultures of *S. cerevisiae*, the production of 3MH was between 72 and 152 ng/L, and the production of 4MMP was between 16 and 41 ng/L. No 3MHA was produced. In sequential inoculation, the production of 3MH was between 273.7 and 821.3 ng/L, and the production of 4MMP was between 66.0 and 326.2 ng/L. 3MHA was produced in some conditions, at levels up to 32.3 ng/L. It is also noteworthy that after 48 hours of fermentation with *M. pulcherrima* in pure cultures, no thiol release was measured.

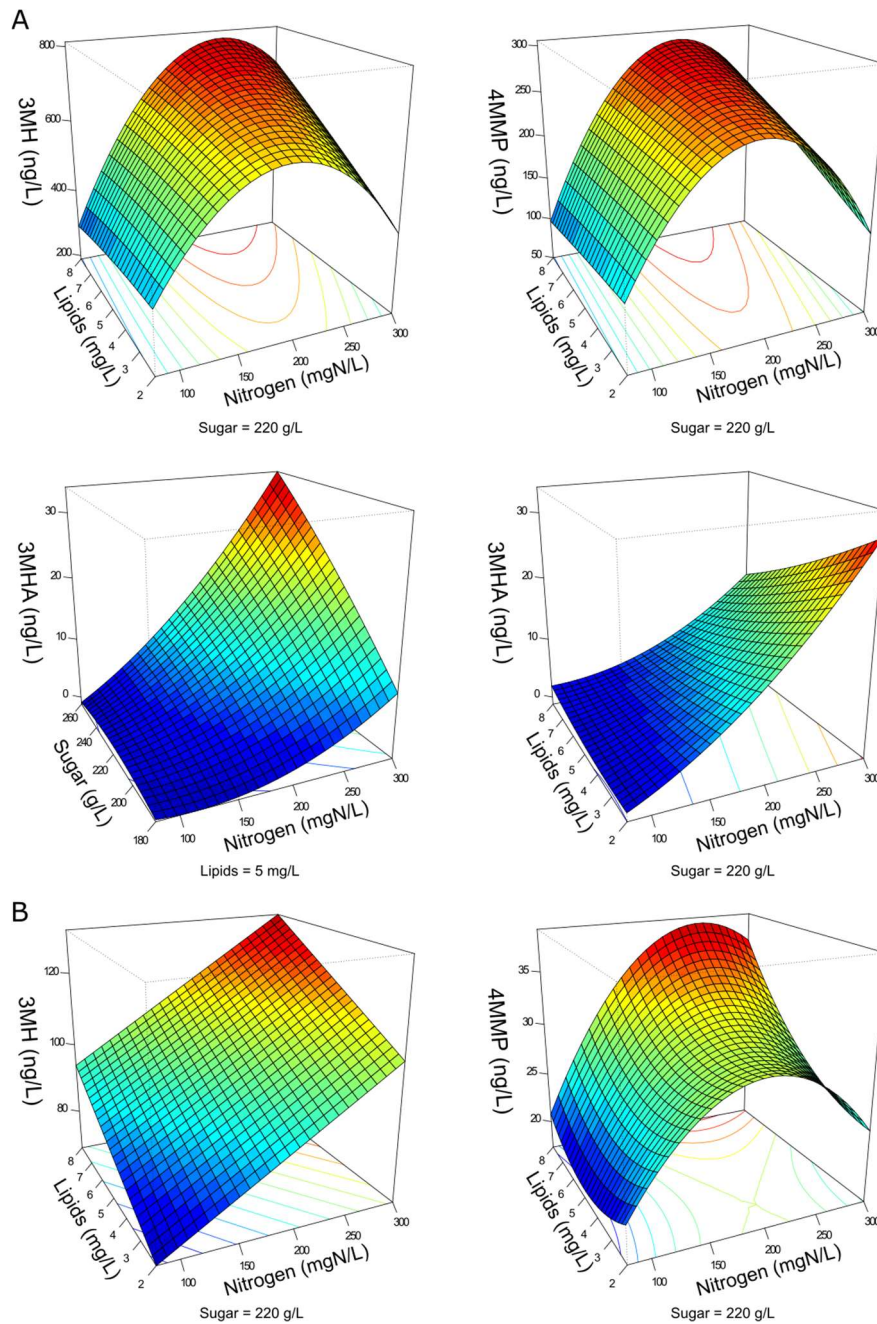


Figure 14: Response surfaces of thiol production in sequential inoculation (A) or in pure cultures of *S. cerevisiae* (B).

High variability was observed in the production of thiols, especially in sequential inoculation with *M. pulcherrima*. The production of thiols was mainly impacted by the initial amount of nitrogen (Table 28). We observed a quadratic impact of nitrogen on the production of 3MH and 4MMP. The production of these compounds increased up to an initial nitrogen concentration of 200 mg N/L and decreased with higher concentrations. The impact of nitrogen on the production of 3MHA was positive irrespective of the concentration of nitrogen. In sequential inoculation, the initial concentration of sugar also had a positive impact



on the production of thiols. The production of 3MH was positively impacted by the concentration of lipids in the medium. In sequential inoculation, we also noticed an interaction between nitrogen and lipids, which was positive for the production of 3MH and 4MMP and negative for the production of 3MHA.

Table 28: Effects of must parameters on the release of thiols by *M. pulcherrima* and *S. cerevisiae* in sequential inoculation (MP+SC) and *S. cerevisiae* in pure cultures (SC). +: positive effect, -: negative effect. Green:  $p < 0.001$ , blue:  $p < 0.01$ , orange:  $p < 0.05$ . N: nitrogen, S: sugar, L: lipids.

		Simple effects			Quadratic effects			Interactions		
		N	S	L	N <sup>2</sup>	S <sup>2</sup>	L <sup>2</sup>	N:S	N:L	S:L
MP+SC	3MH	+	+	+	-				+	
	3MHA	+	+	-	+			+	-	
	4MMP	+	+		-				+	
SC	3MH	+		+						
	4MMP	+			-					

#### 4.6. Enzymatic activity

Thiols are varietal aromas released from non-aromatic precursors during fermentation by the action of  $\beta$ -lyases produced by yeasts.  $\beta$ -lyase activity was followed during fermentation using an enzymatic reaction (Figure 15).

In sequential inoculation,  $\beta$ -lyase activity reached two maxima. The first one occurred between 24 and 48 hours depending on the conditions. The activity then decreased before increasing again and reaching a second maximum at approximately 96 h of fermentation. In contrast,  $\beta$ -lyase activity in pure cultures of *S. cerevisiae* showed only one maximum. This maximum was reached at 24 h of fermentation under conditions with 90 mgN/L of initial nitrogen and between 48 and 72 h of fermentation for the other conditions. When the activities were compared between sequential inoculation and the pure cultures of *S. cerevisiae*, the same magnitude of activity was observed. Nitrogen availability seemed to be the parameter with the main impact on  $\beta$ -lyase activity.

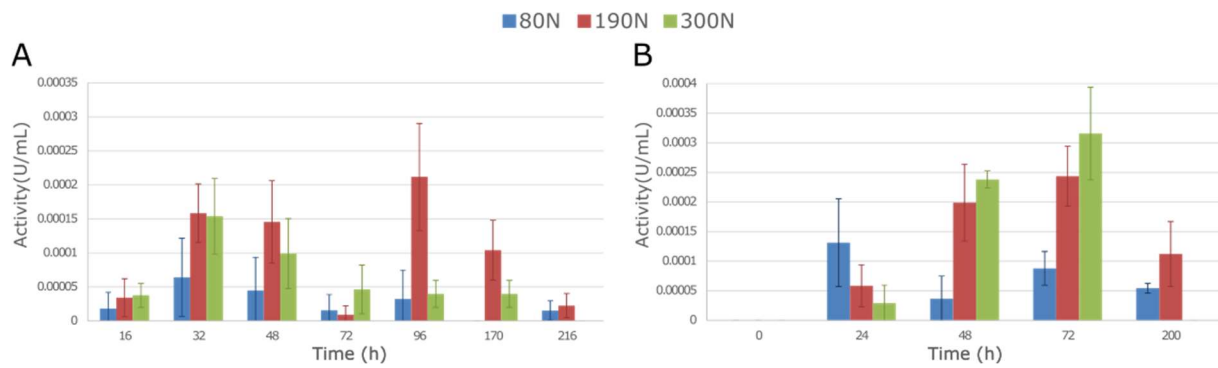


Figure 15: Mean  $\beta$ -lyase activity depending on the initial nitrogen concentration during fermentation in sequential inoculation (A) and in pure cultures of *S. cerevisiae* (B). 80 mgN/L: blue bars, 190 mgN/L: red bars, 300 mgN/L: green bars.

## 5. Discussion

Currently, the use of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed fermentation with *S. cerevisiae* has become a ubiquitous practice in winemaking, with the aim of improving the complexity of wines. Thus, it has been reported that early inoculation of *M. pulcherrima* results in changes in the characteristics of wines (González-Royo et al., 2015; Rodríguez et al., 2010; Varela et al., 2016). However, this procedure may also affect fermentation performance as well as the effect of environmental parameters on both the process and profile of carbon metabolite and volatile compound production.

### 5.1. Nitrogen consumption by *M. pulcherrima* alters the fermentation kinetics in sequential inoculation

We first found that sequential fermentation with *M. pulcherrima* associated with *S. cerevisiae* took longer than fermentation in *S. cerevisiae* pure cultures, lasting up to 250 hours, regardless of the lipid, nitrogen and sugar concentrations in the medium. The poor fermentation capabilities of *M. pulcherrima*, for which the fermentation rate did not exceed 0.27 g/L/h, combined with the delay of *S. cerevisiae* inoculation, were the first elements to be taken into account to explain this observation. In addition, the consumption of nutrients, particularly nitrogen, by *M. pulcherrima* during the first 48 hours of the process may also play a part in lengthening the duration of sequential fermentation. Indeed, early inoculation with a non-*Saccharomyces* yeast strain often results in decreased *S. cerevisiae* fermentation performance due to nitrogen limitation (Medina et al., 2012; Rollero et al., 2018; Taillandier et al., 2014). During *M. pulcherrima* / *S. cerevisiae* sequential fermentation, this is of particular relevance in the presence of low initial YAN levels. In fact, when nitrogen was limiting (80

mg/L), the substantial consumption of nitrogen sources during the *M. pulcherrima* pure culture stage, up to 80% of the provided YAN, prevented the further implantation of *S. cerevisiae*, leading to a slow-down of fermentation. In the case of moderate and high initial YAN contents, the residual nitrogen level was higher at the time of *S. cerevisiae* addition, between 95 and 190 mg N/L, but some specific nitrogen sources, such as branched amino acids, glutamate and glutamine, were exhausted. As a consequence, the nitrogen resources available to promote further *S. cerevisiae* implantation were mainly composed of proline, tryptophan, glycine and alanine, which support the growth and fermentation of the yeast poorly (Fairbairn et al., 2017; Godard et al., 2007). Overall, early inoculation with *M. pulcherrima* resulted in a 1.7- to 2-fold decrease in the maximal fermentation rate of *S. cerevisiae*.

Nitrogen sources can be divided into three groups according to their profile of consumption by *M. pulcherrima* in the first 48 hours of growth depending on the initial YAN concentration. Glutamate, glutamine, lysine and branched amino acids were depleted regardless of the YAN concentration in the medium. Arginine, glycine, ammonium and aromatic amino acids were exhausted when YAN was limited but were consumed at low levels in the presence of moderate or high nitrogen concentrations. Finally, the proportions of consumed alanine, threonine, serine, methionine, aspartic acid and histidine gradually decreased with increasing YAN availability. These observations are in accordance with the sequence of the consumption of nitrogen sources by *M. pulcherrima* previously reported by (Su et al., 2020). Furthermore, these results revealed that appropriate management of yeast nutrition during *M. pulcherrima* / *S. cerevisiae* sequential fermentation, such as the addition of nitrogen at the time of the inoculation of *S. cerevisiae*, can be beneficial to achieve the completion of fermentation, as previously recommended for co-fermentation with other non-conventional species (Medina et al., 2012; Rollero et al., 2018b).

As a general rule, the lag phase of sequential fermentation during which *M. pulcherrima* was the only yeast in the medium was shorter than that of *S. cerevisiae* pure cultures. This result was consistent with previous findings indicating a shorter lag phase for *M. pulcherrima* (Su et al., 2020). The changes in the lag phase duration in response to changes in nutrient availability were similar for both strains. The increase in the lag phase associated with the sugar concentration may be explained by higher osmotic stress in the presence of high sugar

concentrations, as delayed growth and fermentation have been observed in response to an increase in osmotic stress (Hohmann, 2002; Mager and Siderius, 2002; Slaninová et al., 2000).

### 5.2. Interactions between *M. pulcherrima* and *S. cerevisiae* change the distribution of carbon fluxes

One of the main reasons for the renewed interest in non-*Saccharomyces* yeasts is the potential of some species used in combination with *S. cerevisiae* during wine fermentation to reduce the ethanol content of wine (Canonico et al., 2016; Contreras et al., 2014; Quirós et al., 2014). The effectiveness and feasibility of these approaches depend on the species, strains and fermentation conditions involved (Ciani et al., 2016; Contreras et al., 2015). Under varying initial concentrations of lipids, sugar and nitrogen, we observed that sequential fermentation involving *M. pulcherrima* and *S. cerevisiae* strains resulted in a reduction in the ethanol level by 8 g/L on average compared to *S. cerevisiae* pure cultures (Table 26). This is in agreement with results in the literature indicating decreases between 7.1 and 13.2 g/L (Ciani et al., 2016; Contreras et al., 2015). No significant effect of nutrient availability on the reduction in ethanol content during sequential fermentation was evidenced.

A substantial decrease in ethanol production inevitably implies carbon rerouting towards the formation of other central metabolites to maintain both mass and redox balances during fermentation. Thus, higher production of glycerol, with an average increase of 50%, was found for *M. pulcherrima* in sequential inoculation compared with *S. cerevisiae* in pure cultures (Comitini et al., 2011; Hranilovic et al., 2018). This observation can be explained first by the high capacity of *M. pulcherrima* to produce glycerol during the first part of the fermentation (between 1.65 and 2.14 g/L of glycerol produced after 48 hours). In addition, as *M. pulcherrima* growth had ceased when *S. cerevisiae* was inoculated and glycerol is mainly produced during the yeast growth phase, the production of this metabolite during the second stage of fermentation may be attributed to *S. cerevisiae* alone. Interestingly, during this second stage, the glycerol production yield ( $0.046 \text{ g}_{\text{glycerol}}/\text{g}_{\text{sugar}}$ ) was higher than in *S. cerevisiae* pure cultures ( $0.031 \text{ g}_{\text{glycerol}}/\text{g}_{\text{sugar}}$ ). Consequently, the higher glycerol production in sequential fermentation may be related partly to the positive interaction between the two yeast species, promoting glycerol production by *S. cerevisiae*.

While sugar availability, controlling the glycolytic flux (Klein et al., 1998), modulated glycerol production during sequential fermentation and *S. cerevisiae* pure cultures similarly, the

impact of nitrogen varied according to the inoculation modality. In *S. cerevisiae* pure cultures, the negative effect of nitrogen (in line with previous studies) may be explained by lower requirements in the NAD-consuming *de novo* synthesis of amino acids when nitrogen is provided in large amounts. As a consequence, the oxidation of NADH through the formation of glycerol was limited. Conversely, the formation of glycerol increased with the nitrogen concentration when *M. pulcherrima* was inoculated first. This difference may be partly attributable to the specific response of *M. pulcherrima* to an increased nitrogen concentration in terms of glycerol production, which was higher than that of *S. cerevisiae* (Supplementary data 3). Another reason may be the interactions that occurred between the two yeast species, particularly the changes triggered by *M. pulcherrima* early growth in the *S. cerevisiae* growth environment, particularly regarding redox status and the composition and availability of nitrogen resources.

Whereas no significant impact of lipid availability on acetate production was observed, contrary to previous works (Albers et al., 1996; Rollero et al., 2014; Vilanova et al., 2007), the formation of acetate was strongly affected by the early addition of *M. pulcherrima*, with much lower production during sequential fermentation than during pure culture. This decrease was dependent on nitrogen availability, as it was less pronounced when nitrogen was limiting but still substantial. The poor ability of *M. pulcherrima* to produce acetate, which was positively modulated by the nitrogen concentration, was not sufficient to explain the drastic reduction in acetate formation during sequential fermentation, again highlighting the key role of interactions between the species.

### 5.3. The impact of nutrient availability depends on the inoculation strategy

The major consequences of early *M. pulcherrima* inoculation before *S. cerevisiae* fermentation on the aroma profile and on its modulation by nutrient availability were associated with the low capacity of this NS strain to produce acetate. This limited capacity likely resulted in the limitation of cytosolic acetyl-CoA, which is mainly synthesized from acetate by acetyl-CoA synthase during fermentation (van Roermund et al., 1995), in turn explaining the low production of medium-chain fatty acids and their ethyl ester derivatives from the precursor acetyl-CoA that we observed in sequential fermentation. For both inoculation modalities, the production of ethyl esters and fatty acids was positively impacted by nitrogen, in agreement with previous studies on *S. cerevisiae* pure cultures (Garde-Cerdán and Ancín-Azpilicueta,

2008; Rollero et al., 2014; Torrea et al., 2011) and negatively controlled by lipid availability. This can be explained by the interconnection of the two types of metabolism, as nitrogen and lipids impact the regulation of *ATF1* (Saerens et al., 2008; Swiegers et al., 2005).

Generally, early inoculation with *M. pulcherrima* has a limited impact on the formation of higher alcohols and acetate esters during fermentation, and the variations of these products in response to changes in nutrient availability were close to those previously described for *S. cerevisiae* pure culture (Mouret et al., 2014a; Rollero et al., 2014). In particular, similar production of propanol, isoamyl alcohol and methionol was observed for the two inoculation procedures, and the synthesis of isoamyl acetate and phenylethyl acetate at low or intermediate nitrogen concentrations remained unchanged. However, some exceptions deserve to be highlighted. First, while a substantial increase in phenylethanol formation associated with the nitrogen content was shown for during *S. cerevisiae* pure cultures, no significant effect of nitrogen was observed on the final production of phenylethyl ethanol during *M. pulcherrima* / *S. cerevisiae* sequential fermentation. This observation may be related to the high contribution of *M. pulcherrima* in the production of this compound, which was approximately 40 mg/L after 48 hours, regardless of the nitrogen concentration in the medium. Another important difference was related to the production of isobutanol and, to a lesser extent, isobutyl acetate, which was substantially higher in sequential fermentation than in pure cultures as a consequence of the high capacity of *M. pulcherrima* to produce isobutanol (Comitini et al., 2011; Sadoudi et al., 2012). This observation may be explained by differences in the management of the  $\alpha$ -ketoisovalerate (KIV) pool between the two species, with a lower flux towards  $\alpha$ -ketoisocaproate (KIC) being observed in *M. pulcherrima* compared to *S. cerevisiae* as a result of the limited formation of acetyl-coA, the co-substrate for the conversion of KIV to KIC, in *M. pulcherrima*. Finally, comparison of the production of higher alcohols and acetate esters produced via the reductive branch of the Ehrlich pathway with that of compounds from the oxidative branch (medium-chain fatty acids and ethyl esters) revealed increased formation of reduced compounds during sequential fermentation at the expense of the production of oxidized molecules. The reorientation of the carbon flux between these branches suggests a modification of the  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  balance in sequential inoculation related to the metabolic specificities of *M. pulcherrima* and its further consequences for *S. cerevisiae* metabolism. Concerning acetate esters, the model indicates a

positive effect of nitrogen, a negative effect of lipids and a negative interaction between these two parameters in sequential inoculation. The effect of lipids is in accordance with previous investigations of the impact of lipid supplementation on the production of acetate esters (Fujii et al., 1997; Malcorps et al., 1991). However, this result differed from those we obtained with *S. cerevisiae* in pure culture. The negative effect of lipids on acetate ester production can be explained by the repression of the expression of the *ATF1* gene by lipids (Fujii et al., 1997; Fujiwara et al., 1999). Moreover, *ATF1* overexpression is induced by nitrogen (Fujiwara et al., 1999; Verstrepen et al., 2003)

#### 5.4. Varietal thiol production is increased in sequential inoculation

Recent studies have highlighted the potential of non-*Saccharomyces* species to improve the varietal aroma contents of wines, including that of polyfunctional thiols (Anfang et al., 2009; Renault et al., 2016; Ruiz et al., 2018; Zott et al., 2011). Our work revealed a pronounced effect of early inoculation with *M. pulcherrima* on the production of these mercaptans, increasing the formation of 3MH and 4MMP by a factor of 2 to 9 and leading to the formation of 3MHA in detectable amounts. The differences in the levels of thiol production between sequential and pure cultures were striking. As an example, while the formation of 3MH by *S. cerevisiae* in pure cultures varied from 72 to 152 ng/L depending on the culture conditions, the range of 3MH production during sequential fermentation was between 213 and 821 ng/L. However, this molecule was not produced by *M. pulcherrima* during the first 48 hours of fermentation. Consequently, the high thiol release observed when *M. pulcherrima* was inoculated prior to *S. cerevisiae* did not result from cumulative production by the two species but reflected a positive interaction between them. Similar overproduction of these molecules has been previously reported during *Torulaspora delbrueckii* / *S. cerevisiae* sequential fermentation (Renault et al., 2016). In this case, the synergetic interaction was explained by the specificities of the two species regarding the degradation of thiol precursors: *T. delbrueckii* only assimilated glutathionylated conjugates, whereas *S. cerevisiae* preferentially converted cysteinylated precursors (Winter et al., 2011). Thus, the efficient degradation of glutathionylated precursors by *T. delbrueckii* increased the availability of cysteinylated precursors, which were then further hydrolysed to thiols by *S. cerevisiae*. A similar mechanism might occur during *M. pulcherrima* / *S. cerevisiae* sequential fermentation, but this assumption requires experimental confirmation.

These results differed from reports in the literature that sequential inoculation with *M. pulcherrima* mostly resulted in a decrease in the final concentrations of varietal thiols, except for that of 4MMP in some conditions (Ruiz et al., 2018; Sadoudi et al., 2012). These differences could be explained by the strains used and their variable capacity to release varietal thiols (Ruiz et al., 2018). Interestingly, higher variability in the final concentration of thiols according to nutrient availability was observed in sequential inoculation than in pure cultures. In sequential inoculation, the final concentrations of 3MH and 4MMP were mainly affected by the nitrogen content of must, with a quadratic effect, showing a maximum at 200 mg/L of initial YAN. Different phenomena could explain the effect of nitrogen. At initial YAN concentrations of up to 200 mg/L, the remaining nitrogen concentration was limiting when *S. cerevisiae* was added, which may lead *S. cerevisiae* to hydrolyse more thiol precursors to retrieve amino acids. Thus, a recent study investigating the impact of the must composition on the release of thiols suggested that thiol precursors could be hydrolysed to alleviate the lack of some amino acids (Alegre et al., 2017). At higher initial nitrogen concentrations, the limitation of thiol release was most likely modulated by nitrogen catabolic repression (NCR), which was active in the presence of preferential nitrogen sources and repressed the synthesis of specific permeases of non-preferred sources. However, the NCR target genes have not yet been clearly identified, which are involved in either the transport of precursors into the cell (Subileau et al., 2008b) or the transcription of  $\beta$ -lyases (Thibon et al., 2008). Furthermore, we observed a correlation between the concentrations of 3MH and 4MMP and  $\beta$ -lyase activity (Supplementary data 6). This activity is therefore regulated by nitrogen availability in some way.

The production of 3MHA was also variable depending on nutrient availability under both inoculation strategies. A positive impact of nitrogen, a negative effect of lipids and an interaction between nitrogen and lipids were observed. The effect of lipids was in agreement with the negative effect of linoleic acids on 3MHA reported by Casu et al., (2016). The profile of 3MHA production depending on nutrient availability was close to that reported for acetate esters (Rollero et al., 2014). This is in agreement with the molecular basis of the formation of this molecule from 3MH, which involves Atf1p (Swiegers et al., 2007), which is also responsible for acetate ester production and repressed by unsaturated fatty acids (Fujii et al., 1997; Verstrepen et al., 2003).



## 6. Conclusion

This work was conducted with two main objectives: the comparison of pure cultures of *S. cerevisiae* and sequential inoculation with *M. pulcherrima*; and the assessment of how nutrient availability impacts fermentation progress and results under these two inoculation strategies. Early inoculation with *M. pulcherrima* had a clear impact on fermentation, characterized by a positive impact on the production of positive aroma compounds, especially varietal thiols, and reductions in acetate, ethanol and acid production. These differences result from interactions between the two species that are still unclear and will necessitate thorough studies. The management of must parameters appears to be crucial, especially regarding the initial concentrations of nitrogen and lipids. As *M. pulcherrima* consumes nitrogen in the first stage of fermentation, winemakers need to be aware of the risk of nitrogen deficiencies for *S. cerevisiae*, which can lead to sluggish fermentation. The effects of nitrogen addition during fermentation are worth investigating. Different optimum nutrient concentrations were obtained depending on the target aroma compound. Indeed, the maximal production of thiols was obtained with 200 mg/L of YAN and high concentrations of lipids, while the maximal concentration of acetate esters was obtained with moderate concentrations of nitrogen and low concentrations of lipids. However, validation of these results in different natural grape musts and in industrial conditions is mandatory to confirm these results.

## 7. Supplementary data

Supplementary data 1: Amino acid composition of the medium in mg N/L after 48 hours of fermentation with *M. pulcherrima*. Conditions are labelled as sugar-nitrogen-lipids.

	180-80-5	220-80-2	220-80-8	260-80-5	180-190-2	180-190-8	220-190-5a	220-190-5b	220-190-5c	260-190-2	260-190-8	180-300-5	220-300-2	220-300-8	260-300-5
Proline	10.82	11.21	12.20	11.86	29.46	32.54	30.31	30.30	30.68	28.16	29.85	47.31	46.78	45.02	45.18
Alanine	0.00	0.13	0.05	0.21	2.63	4.36	4.37	3.79	4.11	3.58	3.80	11.62	12.46	11.74	11.80
Arginine	0.00	0.00	0.00	0.00	12.48	17.67	19.85	18.66	19.13	19.15	19.36	38.25	43.69	40.06	41.09
Aspartate	0.09	0.10	0.10	0.12	0.31	0.52	0.61	0.55	0.60	0.59	0.59	1.88	2.06	1.93	2.02
Glutamine	0.00	0.00	0.00	0.00	0.09	0.09	0.10	0.09	0.10	0.09	0.09	1.49	3.32	2.64	3.80
Glutamate	0.00	0.03	0.02	0.03	0.08	0.11	0.08	0.09	0.09	0.08	0.09	1.01	1.65	1.49	1.76
Glycine	0.00	0.22	0.18	0.36	1.06	1.37	1.23	1.23	1.21	1.11	1.18	2.18	2.18	2.17	2.04
Histidine	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.66	0.88	0.55	0.82
Isoleucine	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.04	0.04	0.04	0.05	0.04	0.04	0.03	0.03	0.05
Leucine	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Lysine	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Methionine	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.06	0.02	0.04	0.04	0.05	0.48	0.69	0.61	0.67
Phenylalanine	0.00	0.06	0.01	0.11	0.74	0.80	0.88	0.86	0.86	0.82	0.82	1.60	1.69	1.62	1.58
Serine	0.00	0.04	0.03	0.06	0.25	0.55	0.63	0.47	0.55	0.49	0.54	3.27	3.95	3.65	3.83
Threonine	0.00	0.02	0.01	0.03	0.11	0.36	0.44	0.30	0.36	0.33	0.36	2.71	3.32	3.07	3.22
Tryptophan	0.00	0.45	0.21	1.09	4.78	5.17	5.40	5.28	5.30	5.22	4.91	8.22	9.01	6.11	8.09
Tyrosine	0.00	0.04	0.02	0.09	0.42	0.46	0.45	0.45	0.45	0.43	0.42	0.77	0.78	0.75	0.74
Valine	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04	0.08	0.16	0.18	0.27
NH4	0.00	0.00	0.00	0.00	42.53	39.47	37.22	37.94	40.86	41.07	40.78	55.71	56.87	56.87	55.13
Total	10.95	12.35	12.90	14.02	95.12	103.54	101.81	100.20	104.52	101.37	103.08	177.43	189.64	178.65	182.22

Supplementary data 2: Biomass concentration in cells/mL at different times of fermentation in sequential inoculation or in pure cultures of *S. cerevisiae*. MP: *M. pulcherrima*, SC: *S. cerevisiae*. 90%: 90% of fermentation progress. Conditions are labelled as sugar-nitrogen-lipids.

Conditions	Sequential inoculation						Pure culture SC
	48h		96h		90%		90%
	MP	SC	MP	SC	MP	SC	SC
180-80-5	6.94E+07	0.00E+00	5.91E+07	2.32E+07	0.00E+00	9.09E+07	9.11E+07
220-80-2	6.13E+07	0.00E+00	5.72E+07	1.40E+07	0.00E+00	8.54E+07	8.35E+07
220-80-8	6.50E+07	0.00E+00	6.08E+07	2.06E+07	0.00E+00	8.27E+07	7.94E+07
260-80-5	6.13E+07	0.00E+00	5.76E+07	1.57E+07	0.00E+00	8.19E+07	7.18E+07
180-190-2	7.64E+07	0.00E+00	5.92E+07	4.19E+07	0.00E+00	1.18E+08	1.66E+08
180-190-8	6.82E+07	0.00E+00	9.56E+07	5.24E+07	0.00E+00	1.21E+08	1.63E+08
220-190-5a	6.74E+07	0.00E+00	5.93E+07	4.02E+07	0.00E+00	1.20E+08	1.57E+08
220-190-5b	6.93E+07	0.00E+00	8.68E+07	4.66E+07	0.00E+00	1.25E+08	1.37E+08
220-190-5c	7.15E+07	0.00E+00	6.00E+07	6.34E+07	0.00E+00	1.24E+08	1.47E+08
260-190-2	7.23E+07	0.00E+00	6.23E+07	5.35E+07	0.00E+00	1.11E+08	1.26E+08
260-190-8	7.00E+07	0.00E+00	8.45E+07	4.99E+07	0.00E+00	1.13E+08	1.38E+08
180-300-5	8.25E+07	0.00E+00	8.15E+07	7.90E+07	8.69E+06	1.24E+08	1.77E+08
220-300-2	7.90E+07	0.00E+00	6.38E+07	6.71E+07	1.67E+06	1.49E+08	1.85E+08
220-300-8	6.36E+07	0.00E+00	5.85E+07	8.87E+07	0.00E+00	1.47E+08	1.15E+08
260-300-5	6.59E+07	0.00E+00	6.77E+07	6.54E+07	0.00E+00	1.32E+08	1.82E+08

Supplementary data 3: Concentrations in g/L of ethanol, glycerol, succinate and acetate at 90% of fermentation progress in sequential inoculation and in pure cultures of *S. cerevisiae*. Conditions are labelled as sugar-nitrogen-lipids.

Conditions	Sequential fermentation				Pure culture SC			
	Ethanol	Glycerol	Succinate	Acetate	Ethanol	Glycerol	Succinate	Acetate
180-80-5	75.9	7.9	1.85	0.28	81.9	6.2	1.29	0.27
220-80-2	91.2	9.5	1.95	0.34	88.5	6.4	1.22	0.42
220-80-8	94.1	9.4	1.91	0.31	98.5	7.1	1.41	0.43
260-80-5	107.4	11.3	2.10	0.44	107.8	7.8	1.49	0.63
180-190-2	78.5	8.7	1.75	0.01	84.3	5.6	0.88	0.35
180-190-8	75.8	8.8	1.92	0.01	85.3	5.9	0.97	0.36
220-190-5a	83.9	9.2	1.80	0.02	100.7	6.5	1.07	0.50
220-190-5b	90.2	9.6	1.93	0.02	99.5	6.3	1.04	0.49
220-190-5c	91.0	9.6	1.94	0.02	100.0	6.5	1.07	0.49
260-190-2	109.5	10.6	1.92	0.06	113.6	6.9	1.35	0.65
260-190-8	109.3	11.1	2.12	0.02	123.5	8.0	1.41	0.69
180-300-5	81.7	9.5	1.77	0.00	60.1	4.8	0.64	0.27
220-300-2	95.4	9.6	1.51	0.05	95.9	5.8	0.96	0.43
220-300-8	91.8	10.3	1.82	0.01	102.2	6.4	0.90	0.46
260-300-5	106.8	11.0	1.74	0.04	118.0	7.1	2.46	0.64

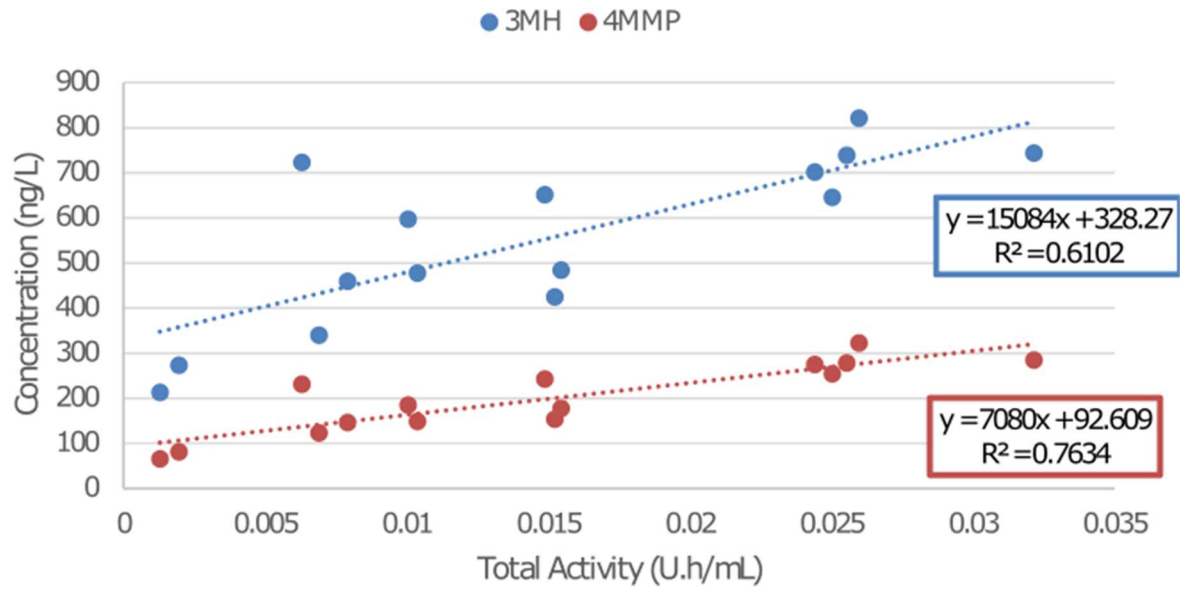
Supplementary data 4: Concentrations in mg/L of aromas at 90% of fermentation progress in sequential inoculation. Conditions are labelled as sugar-nitrogen-lipids.

	180-80-5	220-80-2	220-80-8	260-80-5	180-190-2	180-190-8	220-190-5a	220-190-5b	220-190-5c	260-190-2	260-190-8	180-300-5	220-300-2	220-300-8	260-300-5
Propanol	9.76	10.54	8.38	13.89	17.42	15.29	17.05	10.66	28.77	20.17	16.87	28.79	31.86	36.94	38.77
Isobutyl alcohol	146.48	115.07	125.62	123.07	135.79	153.59	147.86	99.54	168.66	146.50	136.31	125.67	118.46	153.63	152.13
Isoamyl alcohol	53.94	51.98	54.07	62.75	68.57	66.21	76.88	54.98	86.91	89.69	76.38	52.36	47.04	66.18	68.69
Phenylethyl alcohol	151.90	96.46	88.82	96.42	114.27	105.75	116.51	84.65	131.01	101.82	82.69	125.72	103.08	99.03	83.83
Isobutyl acetate	226.81	536.23	538.47	571.44	321.18	606.84	835.08	815.78	758.49	757.37	1209.37	1661.92	4184.77	1410.75	2151.14
Isoamyl acetate	0.27	0.38	0.31	0.51	0.76	0.53	0.95	0.71	1.12	1.87	1.06	1.60	3.94	1.65	3.24
Phenylethyl acetate	0.69	0.62	0.75	0.87	0.96	0.77	1.71	1.24	2.35	2.42	1.11	2.67	7.87	3.02	6.73
Ethyl isobutyrate	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
Ethyl hexanoate	0.13	0.17	0.12	0.17	0.32	0.31	0.43	0.29	0.40	0.58	0.45	0.42	0.68	0.45	0.63
Ethyl octanoate	0.09	0.10	0.09	0.12	0.15	0.23	0.31	0.17	0.21	0.31	0.30	0.25	0.42	0.28	0.48
Ethyl decanoate	0.11	0.10	0.11	0.12	0.13	0.30	0.36	0.25	0.23	0.33	0.39	0.27	0.41	0.42	0.62
Isobutyric acid	1.36	1.32	1.56	1.41	1.04	1.24	1.09	0.78	1.02	1.08	1.09	0.94	0.88	0.94	0.86
Hexanoic acid	0.41	0.49	0.46	0.48	1.07	0.89	0.94	0.86	0.89	1.01	0.83	1.05	1.68	0.92	1.12
Octanoic acid	1.37	1.56	1.41	1.55	1.87	1.99	2.26	2.03	2.01	2.60	2.54	2.36	3.93	2.13	2.74
Decanoic acid	0.29	0.59	0.50	0.68	0.97	1.01	1.50	1.67	1.02	2.41	2.94	0.86	2.38	1.15	2.01

Supplementary data 5: Concentrations in mg/L of aromas at 90% of fermentation progress in pure cultures of *S. cerevisiae*. Conditions are labelled as sugar-nitrogen-lipids.

	180-80-5	220-80-2	220-80-8	260-80-5	180-190-2	180-190-8	220-190-5a	220-190-5b	220-190-5c	260-190-2	260-190-8	180-300-5	220-300-2	220-300-8	260-300-5
Propanol	14.21	11.03	15.59	11.82	17.12	15.61	21.74	16.44	15.92	25.42	18.99	26.21	31.77	31.25	26.82
Isobutyl alcohol	29.09	27.43	39.73	40.95	30.48	39.38	53.64	38.86	38.88	56.40	62.15	25.31	31.84	49.28	40.14
Isoamyl alcohol	48.29	44.58	60.73	56.33	56.96	56.20	84.69	60.92	60.44	70.69	63.37	38.75	49.68	50.64	47.06
Phenylethyl alcohol	53.51	53.67	54.86	56.86	102.88	104.81	134.31	117.16	95.73	124.16	105.60	89.81	107.88	100.10	95.09
Isobutyl acetate	213.30	194.28	197.14	301.05	173.65	342.42	69.59	213.51	398.34	94.69	526.67	480.84	339.12	887.23	926.67
Isoamyl acetate	0.31	0.32	0.36	0.39	0.69	0.54	0.70	0.73	0.77	0.81	0.88	1.33	1.75	1.69	1.86
Phenylethyl acetate	0.69	0.52	0.70	1.09	1.20	2.00	2.43	2.33	1.64	2.02	2.35	3.50	4.11	3.43	3.50
Ethyl isobutyrate	0.03	0.02	0.03	0.04	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.00	0.00	0.02	0.02
Ethyl hexanoate	0.40	0.47	0.41	0.39	0.82	0.45	0.47	0.54	0.56	0.73	0.44	0.53	0.83	0.51	0.53
Ethyl octanoate	0.31	0.30	0.40	0.35	0.76	0.37	0.44	0.50	0.64	0.85	0.45	0.50	0.86	0.68	0.63
Ethyl decanoate	0.31	0.24	0.53	0.36	0.97	0.61	0.83	0.88	1.18	1.00	0.73	1.00	1.42	1.47	1.11
Isobutyric acid	3.46	3.03	4.61	5.48	1.85	2.01	2.65	2.28	2.40	3.50	4.26	1.16	1.38	1.70	1.92
Hexanoic acid	1.40	1.52	1.36	1.28	2.39	1.70	1.12	1.75	1.82	1.70	1.46	2.28	2.58	1.79	2.19
Octanoic acid	2.95	3.67	3.28	3.39	5.32	3.88	2.10	3.81	4.74	3.39	4.32	4.69	5.20	5.16	5.56
Decanoic acid	3.36	4.21	5.06	5.12	5.93	5.28	1.72	5.44	7.78	8.31	8.05	6.09	5.11	8.63	8.36

Supplementary data 6: Correlation between 3MH (blue dots) or 4MMP (red dots) and the total  $\beta$ -lyase activity measured during sequential fermentation.



## 8. Bibliography

- Albers, E., Larsson, C., Lidén, G., Niklasson, C., Gustafsson, L., 1996. Influence of the nitrogen source on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3187–3195.
- Alegre, Y., Culleré, L., Ferreira, V., Hernández-Orte, P., 2017. Study of the influence of varietal amino acid profiles on the polyfunctional mercaptans released from their precursors. *Food Res. Int.* 100, 740–747. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.081>
- Andreasen, A.A., Stier, T.J., 1954. Anaerobic nutrition of *Saccharomyces cerevisiae*. II. Unsaturated fatty acid requirement for growth in a defined medium. *J. Cell. Comp. Physiol.* 43, 271–281.
- Andreasen, A.A., 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. <https://doi.org/10.1002/jcp.1030410103>
- Anfang, N., Brajkovich, M., Goddard, M.R., 2009. Co-fermentation with *Pichia kluyveri* increases varietal thiol concentrations in Sauvignon Blanc. *Aust. J. Grape Wine Res.* 15, 1–8. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2008.00031.x>
- Arroyo-López, F.N., Orlić, S., Querol, A., Barrio, E., 2009. Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of *Saccharomyces cerevisiae*, *S. kudriavzevii* and their interspecific hybrid. *Int. J. Food Microbiol.* 131, 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.01.035>
- Belda, I., Ruiz, J., Beisert, B., Navascués, E., Marquina, D., Calderón, F., Rauhut, D., Benito, S., Santos, A., 2017. Influence of *Torulasporea delbrueckii* in varietal thiol (3-SH and 4-MSP) release in wine sequential fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 257, 183–191. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.028>
- Beltran, G., Esteve-Zarzoso, B., Rozès, N., Mas, A., 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. <https://doi.org/10.1021/jf0487001>
- Bely, M., Sablayrolles, J., Barre, P., 1990. Description of alcoholic fermentation kinetics : its variability and interest. *Am. J. Enol. Vitic.* 41, 319–324.
- Box, G.E.P., Behnken, D.W., 1960. Some New Three Level Designs for the Study of Quantitative Variables. *Technometrics* 2, 455. <https://doi.org/10.2307/1266454>
- Brou, P., Taillandier, P., Beaufort, S., Brandam, C., 2018. Mixed culture fermentation using *Torulasporea delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* with direct and indirect contact: impact of anaerobic growth factors. *Eur. Food Res. Technol.* 244, 1699–1710. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3095-3>
- Canonico, L., Comitini, F., Oro, L., Ciani, M., 2016. Sequential Fermentation with Selected Immobilized Non-*Saccharomyces* Yeast for Reduction of Ethanol Content in Wine. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00278>
- Casalta, E., Cervi, M.F., Salmon, J.M., Sablayrolles, J.M., 2013. White wine fermentation: interaction of assimilable nitrogen and grape solids: Interaction of assimilable nitrogen and grape solids on alcoholic fermentation under oenological conditions. *Aust. J. Grape Wine Res.* 19, 47–52. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2012.00205.x>
- Casu, F., Pinu, F.R., Fedrizzi, B., Greenwood, D.R., Villas-Boas, S.G., 2016. The effect of linoleic acid on the Sauvignon blanc fermentation by different wine yeast strains. *FEMS Yeast Res.* 16, fow050. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fow050>



- Ciani, M., Morales, P., Comitini, F., Tronchoni, J., Canonico, L., Curiel, J.A., Oro, L., Rodrigues, A.J., Gonzalez, R., 2016. Non-conventional Yeast Species for Lowering Ethanol Content of Wines. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00642>
- Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., Ciani, M., 2011. Selected non-Saccharomyces wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.* 28, 873–882. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.12.001>
- Contreras, A., Hidalgo, C., Henschke, P.A., Chambers, P.J., Curtin, C., Varela, C., 2014. Evaluation of Non-Saccharomyces Yeasts for the Reduction of Alcohol Content in Wine. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 1670–1678. <https://doi.org/10.1128/AEM.03780-13>
- Contreras, A., Hidalgo, C., Schmidt, S., Henschke, P.A., Curtin, C., 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.027>
- Crepin, L., Nidelet, T., Sanchez, I., Dequin, S., 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. <https://doi.org/10.1128/AEM.02294-12>
- D’Amato, D., Corbo, M.R., Nobile, M.A.D., Sinigaglia, M., 2006. Effects of temperature, ammonium and glucose concentrations on yeast growth in a model wine system. *Int. J. Food Sci. Technol.* 41, 1152–1157. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.01128.x>
- Deroite, A., Legras, J.-L., Rigou, P., Ortiz-Julien, A., Dequin, S., 2018. Lipids modulate acetic acid and thiol final concentrations in wine during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* × *Saccharomyces kudriavzevii* hybrids. *AMB Express* 8, 130. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0657-5>
- Duc, C., Pradal, M., Sanchez, I., Noble, J., Tesnière, C., Blondin, B., 2017. A set of nutrient limitations trigger yeast cell death in a nitrogen-dependent manner during wine alcoholic fermentation. *PLOS ONE* 12, e0184838. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184838>
- Dukes, B.C., Butzke, C.E., 1998. Rapid Determination of Primary Amino Acids in Grape Juice Using an o-Phthaldialdehyde/N-Acetyl-L-Cysteine Spectrophotometric Assay. *Am. J. Enol. Vitic.* 49, 125.
- Egli, C.M., Edinger, W.D., Mitrakul, C.M., Henick-Kling, T., 2002. Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effect on the sensory character of Riesling and Chardonnay wines. *J. Appl. Microbiol.* 85, 779–789. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00521.x>
- Fairbairn, S., McKinnon, A., Musarurwa, H.T., Ferreira, A.C., Bauer, F.F., 2017. The Impact of Single Amino Acids on Growth and Volatile Aroma Production by *Saccharomyces cerevisiae* Strains. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02554>
- Fujii, T., Kobayashi, O., Yoshimoto, H., Furukawa, S., Tamai, Y., 1997. Effect of aeration and unsaturated fatty acids on expression of the *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyltransferase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 910–915.
- Fujiwara, D., Kobayashi, O., Yoshimoto, H., Harashima, S., Tamai, Y., 1999. Molecular mechanism of the multiple regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* ATF1 gene encoding alcohol acetyltransferase. *Yeast* 15, 1183–1197.

- [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(19990915\)15:12<1183::AID-YEA444>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(19990915)15:12<1183::AID-YEA444>3.0.CO;2-J)
- Garde-Cerdán, T., 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. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.03.018>
- Godard, P., Urrestarazu, A., Vissers, S., Kontos, K., Bontempi, G., van Helden, J., Andre, B., 2007. Effect of 21 Different Nitrogen Sources on Global Gene Expression in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 27, 3065–3086. <https://doi.org/10.1128/MCB.01084-06>
- González-Royo, E., Pascual, O., Kontoudakis, N., Esteruelas, M., Esteve-Zarzoso, B., Mas, A., Canals, J.M., Zamora, F., 2015. Oenological consequences of sequential inoculation with non-*Saccharomyces* yeasts (*Torulaspora delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima*) and *Saccharomyces cerevisiae* in base wine for sparkling wine production. *Eur. Food Res. Technol.* 240, 999–1012. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2404-8>
- Harsch, M.J., Gardner, R.C., 2013. Yeast genes involved in sulfur and nitrogen metabolism affect the production of volatile thiols from Sauvignon Blanc musts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 223–235. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4198-6>
- Hohmann, S., 2002. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* MMBR 66, 300–372.
- Hranilovic, A., Li, S., Boss, P.K., Bindon, K., Ristic, R., Grbin, P.R., Van der Westhuizen, T., Jiranek, V., 2018. Chemical and sensory profiling of Shiraz wines co-fermented with commercial non-*Saccharomyces* inocula: Chemical and sensory impact of mixed yeast inocula. *Aust. J. Grape Wine Res.* 24, 166–180. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12320>
- Jiménez-Martí, E., Aranda, A., Mendes-Ferreira, A., Mendes-Faia, A., del Olmo, M. lí, 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* 92, 61–75. <https://doi.org/10.1007/s10482-006-9135-1>
- Julien, A., Roustan, J.-L., Dulau, L., Sablayrolles, 2000. Comparison of Nitrogen and Oxygen Demands of Enological Yeasts: Technological Consequences. *Am. J. Enol. Vitic.* 51, 215–221.
- Klein, C.J., Olsson, L., Nielsen, J., 1998. Glucose control in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of Mig1 in metabolic functions. *Microbiol. Read. Engl.* 144 ( Pt 1), 13–24. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-1-13>
- Le, S., Josse, J., Husson, F., 2008. FactoMineR : An R Package for Multivariate Analysis. *J. Stat. Softw.* 25. <https://doi.org/10.18637/jss.v025.i01>
- Lenth, R.V., 2009. Response-Surface Methods in R , Using **rsm**. *J. Stat. Softw.* 32. <https://doi.org/10.18637/jss.v032.i07>
- Mager, W., Siderius, M., 2002. Novel insights into the osmotic stress response of yeast. *FEMS Yeast Res.* 2, 251–257. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(02\)00116-2](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(02)00116-2)
- Malcorps, P., Cheval, J.M., Jamil, S., Dufour, J.P., 1991. A New Model for the Regulation of Ester Synthesis by Alcohol Acetyltransferase in *Saccharomyces Cerevisiae* during Fermentation. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 49, 47–53. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-49-0047>

- Medina, K., Boido, E., Dellacassa, E., Carrau, F., 2012. Growth of non-Saccharomyces yeasts affects nutrient availability for *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 157, 245–250. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.012>
- Mendes-Ferreira, A., Mendes-Faia, A., Leao, 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02331.x>
- Mouret, J.R., Camarasa, C., Angenieux, M., Aguera, E., Perez, M., Farines, V., Sablayrolles, J.M., 2014. Kinetic analysis and gas–liquid balances of the production of fermentative aromas during winemaking fermentations: Effect of assimilable nitrogen and temperature. *Food Res. Int.* 62, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.02.044>
- Quirós, M., Rojas, V., Gonzalez, R., 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.024>
- Reid, V.J., Theron, L.W., du Toit, M., Divol, B., 2012. Identification and partial characterization of extracellular aspartic protease genes from *Metschnikowia pulcherrima* IWBT Y1123 and *Candida apicola* IWBT Y1384. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 6838–6849. <https://doi.org/10.1128/AEM.00505-12>
- Renault, P., Coulon, J., Moine, V., Thibon, C., Bely, M., 2016. Enhanced 3-Sulfanyhexan-1-ol Production in Sequential Mixed Fermentation with *Torulaspora delbrueckii*/*Saccharomyces cerevisiae* Reveals a Situation of Synergistic Interaction between Two Industrial Strains. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00293>
- Ribereau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donáeche, B., 2006. *Handbook of Enology: Volume 1.* John Wiley & Sons, Chichester.
- Rodríguez, M.E., Lopes, C.A., Barbagelata, R.J., Barda, N.B., Caballero, A.C., 2010. Influence of *Candida pulcherrima* Patagonian strain on alcoholic fermentation behaviour and wine aroma. *Int. J. Food Microbiol.* 138, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.12.025>
- Roland, A., Schneider, R., Razungles, A., Cavelier, F., 2011. Varietal Thiols in Wine: Discovery, Analysis and Applications. *Chem. Rev.* 111, 7355–7376. <https://doi.org/10.1021/cr100205b>
- Rollero, S., Bloem, A., Camarasa, C., Sanchez, I., Ortiz-Julien, A., Sablayrolles, J.-M., Dequin, S., Mouret, J.-R., 2014. Combined effects of nutrients and temperature on the production of fermentative aromas by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6210-9>
- Rollero, S., Bloem, A., Ortiz-Julien, A., Camarasa, C., 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. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00196>
- Rollero, S., Mouret, J.-R., Bloem, A., Sanchez, I., Ortiz-Julien, A., Sablayrolles, J.-M., Dequin, S., Camarasa, C., 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.* <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12749>

- Roncoroni, M., Santiago, M., Hooks, D.O., Moroney, S., Harsch, M.J., Lee, S.A., Richards, K.D., Nicolau, L., Gardner, R.C., 2011. The yeast IRC7 gene encodes a  $\beta$ -lyase responsible for production of the varietal thiol 4-mercapto-4-methylpentan-2-one in wine. *Food Microbiol.* 28, 926–935. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.01.002>
- Ruiz, J., Belda, I., Beisert, B., Navascués, E., Marquina, D., Calderón, F., Rauhut, D., Santos, A., Benito, S., 2018. Analytical impact of *Metschnikowia pulcherrima* in the volatile profile of Verdejo white wines. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 8501–8509. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9255-3>
- Sablayrolles, J.-M., Dubois, C., Manginot, C., Roustan, J.-L., Barre, P., 1996. Effectiveness of combined ammoniacal nitrogen and oxygen additions for completion of sluggish and stuck wine fermentations. *J. Ferment. Bioeng.* 82, 377–381. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(96\)89154-9](https://doi.org/10.1016/0922-338X(96)89154-9)
- Sadineni, V., Kondapalli, N., Obulam, V.S.R., 2012. Effect of co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima* on the aroma and sensory properties of mango wine. *Ann. Microbiol.* 62, 1353–1360. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0383-6>
- Sadoudi, M., Tourdot-Maréchal, R., Rousseaux, S., Steyer, D., Gallardo-Chacón, J.-J., Ballester, J., Vichi, S., Guérin-Schneider, R., Caixach, J., Alexandre, H., 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. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.06.006>
- Saerens, S.M.G., Delvaux, F., Verstrepen, K.J., Van Dijck, P., Thevelein, J.M., Delvaux, F.R., 2008. Parameters Affecting Ethyl Ester Production by *Saccharomyces cerevisiae* during Fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 454–461. <https://doi.org/10.1128/AEM.01616-07>
- Slaninová, I., Šesták, S., Svoboda, A., Farkaš, V., 2000. Cell wall and cytoskeleton reorganization as the response to hyperosmotic shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 173, 245–252. <https://doi.org/10.1007/s002030000136>
- Su, Y., Seguinot, P., Sanchez, I., Ortiz-Julien, A., Heras, J.M., Querol, A., Camarasa, C., Guillamón, J.M., 2020. Nitrogen sources preferences of non-*Saccharomyces* yeasts to sustain growth and fermentation under winemaking conditions. *Food Microbiol.* 85, 103287. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103287>
- Subileau, M., Schneider, R., Salmon, J.-M., 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. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00400.x>
- Swiegers, J.H., Bartowsky, E.J., Henschke, P.A., Pretorius, I.S., 2005. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Aust. J. Grape Wine Res.* 11, 139–173. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00285.x>
- Swiegers, J.H., Capone, D.L., Pardon, K.H., Elsey, G.M., Sefton, M.A., Francis, I.L., Pretorius, I.S., 2007. Engineering volatile thiol release in *Saccharomyces cerevisiae* for improved wine aroma. *Yeast* 24, 561–574. <https://doi.org/10.1002/yea.1493>
- Taillandier, P., Lai, Q.P., Julien-Ortiz, A., Brandam, C., 2014. Interactions between *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* in wine fermentation: influence of inoculation and nitrogen content. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 30, 1959–1967. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1618-z>

- Thibon, C., Marullo, P., Claisse, O., Cullin, C., Dubourdieu, D., Tominaga, T., 2008. Nitrogen catabolic repression controls the release of volatile thiols by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *FEMS Yeast Res.* 8, 1076–1086. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00381.x>
- Torrea, D., Varela, C., Ugliano, M., Ancin-Azpilicueta, C., Leigh Francis, I., 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.092>
- van Roermund, C.W., Elgersma, Y., Singh, N., Wanders, R.J., Tabak, H.F., 1995. The membrane of peroxisomes in *Saccharomyces cerevisiae* is impermeable to NAD(H) and acetyl-CoA under in vivo conditions. *EMBO J.* 14, 3480–3486. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb07354.x>
- Varela, C., Sengler, F., Solomon, M., Curtin, C., 2016. Volatile flavour profile of reduced alcohol wines fermented with the non-conventional yeast species *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum*. *Food Chem.* 209, 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.024>
- Verstrepen, K., Derdelinckx, G., Dufour, J., Winderickx, J., Pretorius, I., Thevelein, J., Delvaux, F., 2003. The alcohol acetyl transferase gene is a target of the cAMP/PKA and FGM nutrient-signalling pathways. *FEMS Yeast Res.* 4, 285–296. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(03\)00166-1](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(03)00166-1)
- Vilanova, M., Ugliano, M., Varela, C., Siebert, T., Pretorius, I.S., 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. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1145-z>
- Winter, G., Van Der Westhuizen, T., Higgins, V.J., Curtin, C., Ugliano, M., 2011. Contribution of cysteine and glutathione conjugates to the formation of the volatile thiols 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) and 3-mercaptohexyl acetate (3MHA) during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: Contribution of precursors to 3MH and 3MHA release. *Aust. J. Grape Wine Res.* 17, 285–290. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2011.00127.x>
- Zott, K., Thibon, C., Bely, M., Lonvaud-Funel, A., Dubourdieu, D., Masneuf-Pomarede, I., 2011. The grape must non-*Saccharomyces* microbial community: Impact on volatile thiol release. *Int. J. Food Microbiol.* 151, 210–215. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.026>

### III. Effet des paramètres fermentaires en inoculation séquentielle avec *T. delbrueckii*

#### 1. Introduction

Le même plan d'expérience que présenté précédemment a également utilisé pour évaluer la contribution de *T. delbrueckii* Biodiva® lors de fermentations séquentielles avec *S. cerevisiae* Lalvin QA23® en fonction de la disponibilité en nutriments. *T. delbrueckii* a comme particularité d'avoir des capacités de croissance et de fermentation élevée en culture pure (Su et al. 2020, Chapitre 1).

*T. delbrueckii* a été inoculée à une concentration de  $1.10^7$  cellules/mL à partir de d'une pré-culture sur YEPD. *S. cerevisiae* a été inoculée 24 heures plus tard, à une concentration de  $5.10^6$  cellules/mL.

#### 2. Résultats

##### 2.1. Implantation de *S. cerevisiae* et consommation d'azote

*T. delbrueckii* atteint des concentrations de biomasse élevées en peu de temps (Tableau 29). La population moyenne *T. delbrueckii* après 24h de culture était comprise entre  $1,4.10^8$  et  $2,2.10^8$  cellules/mL, alors que *S. cerevisiae* atteint entre  $6,5.10^7$  et  $1,4.10^8$  cellules/mL dans les mêmes conditions. La composition du moût n'a pas d'effet significatif sur la population de *T. delbrueckii*, contrairement à ce qui est généralement observé pour *S. cerevisiae*, où l'azote a pour effet d'augmenter la concentration en biomasse (Bely et al., 1990). Le fort développement de *T. delbrueckii* entraîne une faible implantation de *S. cerevisiae*, qui très inférieure aux données obtenues en fermentation séquentielle avec *M. pulcherrima*. Ainsi, 48 heures après inoculation, la proportion de *S. cerevisiae* est au maximum de 20% de la population cellulaire totale (condition avec 180 g/L de sucre-190 mg/L d'azote -2 mg/L de lipides) avec une moyenne de 12%. A la fin de la fermentation, *T. delbrueckii* est toujours la levure majoritaire dans la plupart des fermentations, à l'exception des conditions 260-190-2 et 260-80-5 pour lesquelles aucunes levures *T. delbrueckii* n'ont été retrouvées. Ces conditions ont mené à des fermentations languissantes (Annexe 7), ce qui a pu entraîner une faible viabilité au moment du prélèvement. Dans les autres conditions, la population de *T. delbrueckii* varie entre  $1,4.10^8$  (condition 180-80-5) et  $2,4.10^8$  cellules/mL (condition 220-300-



8). La population de *S. cerevisiae* est comprise entre  $8,7 \cdot 10^6$  (condition 180-300-5) et  $1,9 \cdot 10^8$  (condition 260-190-2) cellules/mL, sauf pour la conditions 220-300-8 où *S. cerevisiae* n'est pas détectée en fin de fermentation (Tableau 29).

Tableau 29: Populations de *T. delbrueckii* (TD) et *S. cerevisiae* (SC) en cellules/mL à différent temps de fermentation en fonction des conditions. 90%: 90 % d'avancement de la fermentation. Les conditions sont décrites comme sucre-azote-lipides.

	24h		72h		90%	
	TD	SC	TD	SC	TD	SC
180-80-5	1.73E+08	0.00E+00	1.73E+08	1.63E+07	1.45E+08	4.26E+07
220-80-2	1.75E+08	0.00E+00	1.53E+08	2.44E+07	1.58E+08	1.57E+07
220-80-8	1.37E+08	0.00E+00	1.62E+08	2.73E+07	1.71E+08	2.36E+07
260-80-5	1.39E+08	0.00E+00	1.44E+08	2.77E+07	0.00E+00	8.50E+06
180-190-2	2.07E+08	0.00E+00	1.64E+08	4.10E+07	2.02E+08	1.08E+07
180-190-8	1.41E+08	0.00E+00	2.13E+08	1.19E+07	1.81E+08	1.02E+07
220-190-5a	2.21E+08	0.00E+00	2.03E+08	4.48E+07	1.95E+08	4.76E+07
220-190-5b	1.53E+08	0.00E+00	1.92E+08	2.95E+07	1.50E+08	7.38E+07
220-190-5c	1.68E+08	0.00E+00	2.03E+08	2.25E+07	2.06E+08	2.68E+07
260-190-2	1.67E+08	0.00E+00	1.68E+08	2.09E+07	0.00E+00	7.00E+06
260-190-8	1.44E+08	0.00E+00	2.05E+08	2.68E+06	1.80E+08	4.28E+07
180-300-5	1.73E+08	0.00E+00	1.73E+08	3.82E+07	2.03E+08	8.74E+06
220-300-2	1.41E+08	0.00E+00	2.06E+08	2.38E+07	1.72E+08	5.24E+07
220-300-8	1.85E+08	0.00E+00	1.97E+08	3.11E+07	2.37E+08	0.00E+00
260-300-5	1.51E+08	0.00E+00	2.11E+08	0.00E+00	1.61E+08	5.03E+07

Le fort développement de *T. delbrueckii* s'accompagne d'une consommation d'azote importante, supérieure à celle de *S. cerevisiae* (Figure 16). Pour les conditions avec 80 mgN/L d'azote initial, la totalité de l'azote a été consommée en 24h, à l'exception de la proline dont la concentration résiduelle est en moyenne de 3,8 mgN/L (Annexe 7). Pour les fermentations en présence de teneurs en azote intermédiaires ou élevées, en moyenne 158 mgN/L d'azote ont été consommés, indépendamment de la concentration initiale. Pour les conditions avec 190 mgN/L d'azote initial, tous les acides aminés sont consommés en quasi-totalité à l'exception de la proline, la glycine, le tryptophane et l'ammonium. En plus de ces acides aminés, des quantités notables d'alanine, d'arginine, de glutamate, de glutamine et d'histidine sont retrouvées dans les milieux contenant initialement 300 mgN/L après 24 heures de fermentation avec *T. delbrueckii*. Ces résultats sont en accord avec les études menées sur la consommation d'azote par *T. delbrueckii* en culture pure (Su et al. 2020).

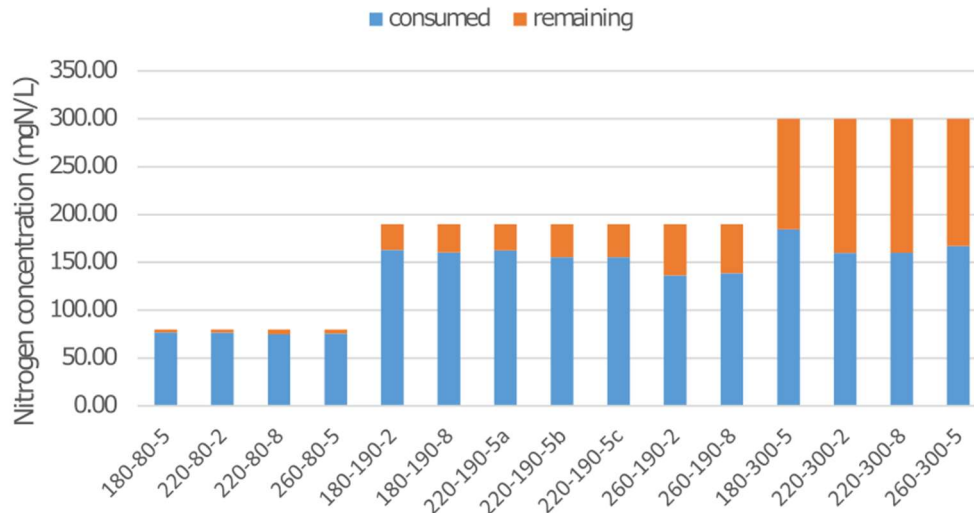


Figure 16 : Concentrations d'azote consommé (en bleu) et restant (en orange) après 24 heures de fermentation avec *T. delbrueckii* (en mg/L d'azote assimilable). Les conditions sont indiquées sous la forme sucre-azote-lipides.

Au contraire des fermentations avec *M. pulcherrima*, pour lesquelles la croissance de l'espèce NS est pratiquement terminée au moment de l'inoculation de *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* est encore en phase de croissance au moment de l'ajout de *S. cerevisiae*. De ce fait, les deux espèces sont en compétition vis-à-vis de la ressource azotée du moût. La disponibilité en azote pour *S. cerevisiae* est donc plus faible qu'en culture pure, ce qui participe à la diminution de sa population. En effet, même en présence de teneurs en azote résiduel de l'ordre de 140 mgN/L (condition 220-300-2), l'implantation de *S. cerevisiae* ne dépasse pas  $5,2 \cdot 10^7$  cellules/mL, alors que la concentration obtenue avec le même milieu en culture pure de *S. cerevisiae* est de  $1,7 \cdot 10^8$  cellules/mL (Chapitre 3-II). En revanche, la population de *T. delbrueckii* continue d'augmenter, passant de  $1,4 \cdot 10^8$  cellules/mL avant l'inoculation de *S. cerevisiae* à  $2 \cdot 10^8$  cellules/mL après 72 heures de fermentation.

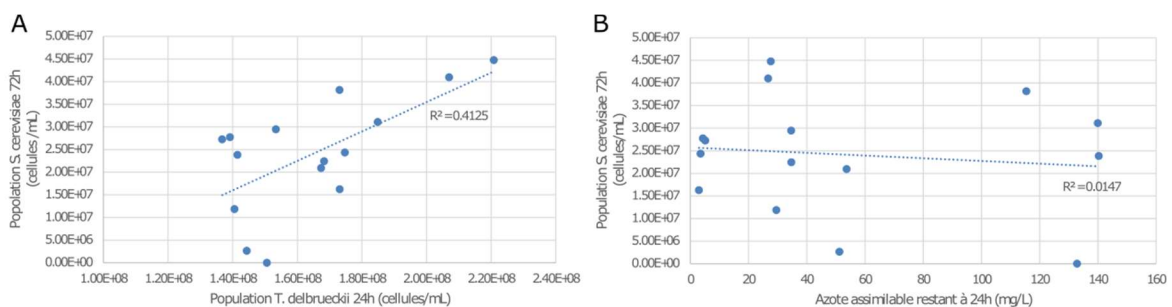


Figure 17 : Evolution de la population de *S. cerevisiae* après 72h de fermentation en fonction de la population de *T. delbrueckii* à 24h (A) et de la quantité d'azote restant à 24h (B).



L'implantation et la croissance de *S. cerevisiae* ne dépendent pas uniquement de la population de *T. delbrueckii* ou de la quantité d'azote restant au moment de l'inoculation de *S. cerevisiae*, les corrélations entre ces paramètres étant faibles (Figure 17). La composition en azote est également modifiée par *T. delbrueckii* en première partie de fermentation (Annexe 8). Après 24 heures de fermentation par *T. delbrueckii* dans les conditions avec 300 mg/L d'azote initial, le moût est composé (hors proline) de 58% d'ammonium, 22% d'arginine, 6% de tryptophane, 3% d'alanine et moins de 2% de glutamine. Il est possible que cette composition ne favorise pas le développement de *S. cerevisiae*. De plus, l'analyse de l'effet des paramètres du moût sur la population maximale de *S. cerevisiae* au cours de la fermentation montre un effet du sucre en plus d'un effet de l'azote (Figure 18). L'implantation et le développement de *S. cerevisiae* dans ces conditions est donc influencé par plusieurs paramètres comme l'azote, le sucre et le développement de *T. delbrueckii*. De plus, d'autres paramètres non étudiés ici pourraient moduler la croissance de *S. cerevisiae*, comme la concentration en certaines vitamines (Ough et al., 1989).

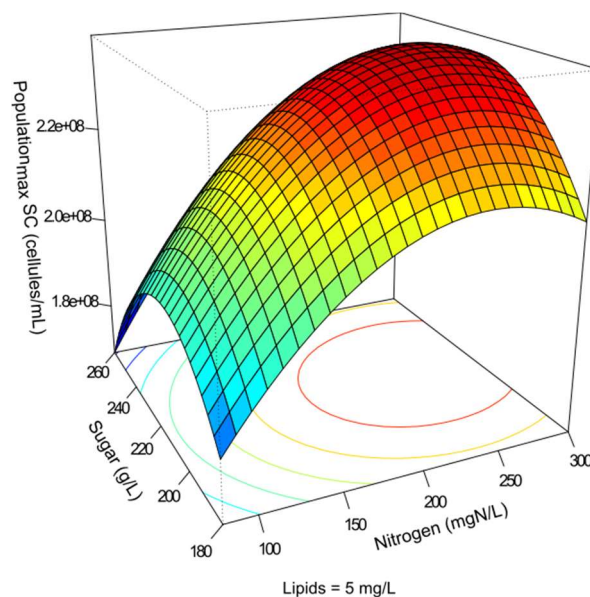


Figure 18: Influence des concentrations initiales en azote et en sucre sur la population maximale de *S. cerevisiae* en culture pure. La concentration en lipides est fixée à 5 mg/L.

## 2.2. Production des métabolites du métabolisme carboné central

L'effet des paramètres environnementaux sur la production des principales molécules du métabolisme carboné central a été évalué en fermentation séquentielle avec *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae*, et leurs productions dans ces conditions ont été comparées à une culture pure de *S. cerevisiae* (Figure 19 et Tableau 30).

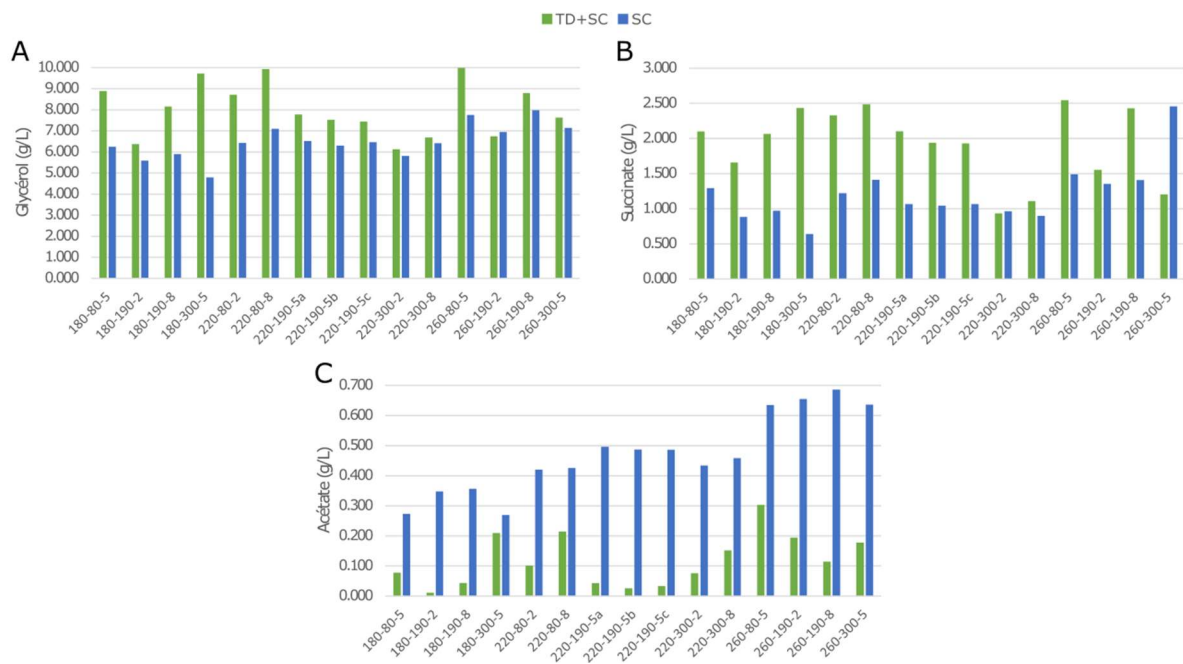


Figure 19: Production de glycérol (A), succinate (B) et acétate (C) en inoculation séquentielle (vert) et en culture pure de *S. cerevisiae* (bleu) en fonction des conditions. Les conditions sont codées sous la forme sucre-azote-lipides.

La concentration finale de glycérol est plus élevée en inoculation séquentielle qu'en culture pure (Figure 19, Annexe 9). La production de glycérol était en moyenne 25% plus importante avec *T. delbrueckii*, ce qui correspond à une surproduction de 1,5 g/L en moyenne. L'écart était d'autant plus grand que la concentration initiale en azote était faible, avec des augmentations supérieures à 2,2 g/L. Cette différence peut s'expliquer par la grande capacité de production de *T. delbrueckii* (Belda et al., 2015; Hranilovic et al., 2018), d'en moyenne 1,7 g/L de glycérol en 24h. Cette espèce étant majoritaire tout au long de la fermentation, le rendement global de production de glycérol est plus élevé en inoculation séquentielle (0,040 g/g en moyenne) qu'en culture pure avec *S. cerevisiae* (0,031 g/g en moyenne). Le modèle associé au plan d'expérience de Box-Benhken que nous avons utilisé a été appliqué pour déterminer l'incidence des paramètres sur la production de glycérol. Un effet négatif de la concentration en azote dans le moût a été mis en évidence, mais avec une faible significativité (Tableau 30). Ce résultat est en accord avec ce qui a été observé pour *S. cerevisiae*, ce qui suggère des mécanismes de régulation de ce composé similaires entre ces deux espèces. En effet, la présence de concentrations plus importantes en acides aminés dans le milieu entraîne une baisse de la biosynthèse de ces composés par les levures, et donc de la quantité de NADH

produit, ce qui se traduit par une plus faible production de glycérol (Albers et al., 1996; Rollero et al., 2014; Vilanova et al., 2007).

La production de succinate est généralement plus élevée en inoculation séquentielle qu'en culture pure avec *S. cerevisiae* (Figure 19), excepté pour les conditions 220-300-2 et 260-300-5. La différence est plus marquée que pour le glycérol, avec en moyenne 73% de surproduction de succinate en inoculation séquentielle, correspondant en moyenne à une augmentation de 0,71 g/L en fin de fermentation. Comme pour le glycérol, cette différence peut s'expliquer par une capacité plus élevée de production de ce composé par *T. delbrueckii*, menant à un rendement de production global sur la fermentation plus élevé en inoculation séquentielle (en moyenne 0,010 g/g contre 0,006 g/g pour *S. cerevisiae* en culture pure). La production de succinate en inoculation séquentielle est également modulée négativement par l'azote.

A l'inverse des deux composés précédents, la production d'acétate est plus faible en inoculation séquentielle qu'en culture pure (Figure 19), certainement du fait que *T. delbrueckii* est une espèce faible productrice d'acétate (González-Royo et al., 2015; Sadoudi et al., 2012). Le rendement de production d'acétate est de 0,56 mg/g en fermentation séquentielle contre 2,21 mg/g en culture pure. La production de ce composé en inoculation séquentielle est positivement affectée par la teneur en sucre. La disponibilité en azote exerce aussi un effet quadratique, qui mène à un minimum de production de ce composé pour des concentrations en azote initial autour de 190 mgN/L comme observé sur la Figure 19. Comme pour les fermentations séquentielles avec *M. pucherrima*, la concentration en lipides n'a pas d'effet sur ce composé contrairement à ce qui a été observé chez *S. cerevisiae* (Rollero et al., 2014; Varela et al., 2012).

Tableau 30: Effet de l'azote (N), du sucre (S) et des lipides (L) sur la production en fin de fermentation du glycérol, de l'acétate et du succinate en inoculation séquentielle. \* : faible adéquation entre les données et le modèle ( $R^2 < 0,85$ ). + : effet positive, - : effet négatif. Vert :  $p < 0,001$ , bleu:  $p < 0,01$ , orange:  $p < 0,05$ .

	Effets simples			Effets quadratiques			Interactions		
	N	S	L	N <sup>2</sup>	S <sup>2</sup>	L <sup>2</sup>	N:S	N:L	S:L
Glycérol*	-								
Succinate*	-								
Acétate		+		+	+		-		

### 2.3. Production des arômes volatils

La production des arômes fermentaires a été comparée entre fermentation séquentielle et culture pure de *S. cerevisiae* (Figure 20, Annexe 10). L'impact de la composition du moût sur la production de ces arômes a été étudié grâce au modèle de Box-Behnken appliqué aux résultats de l'inoculation séquentielle (Tableau 31).

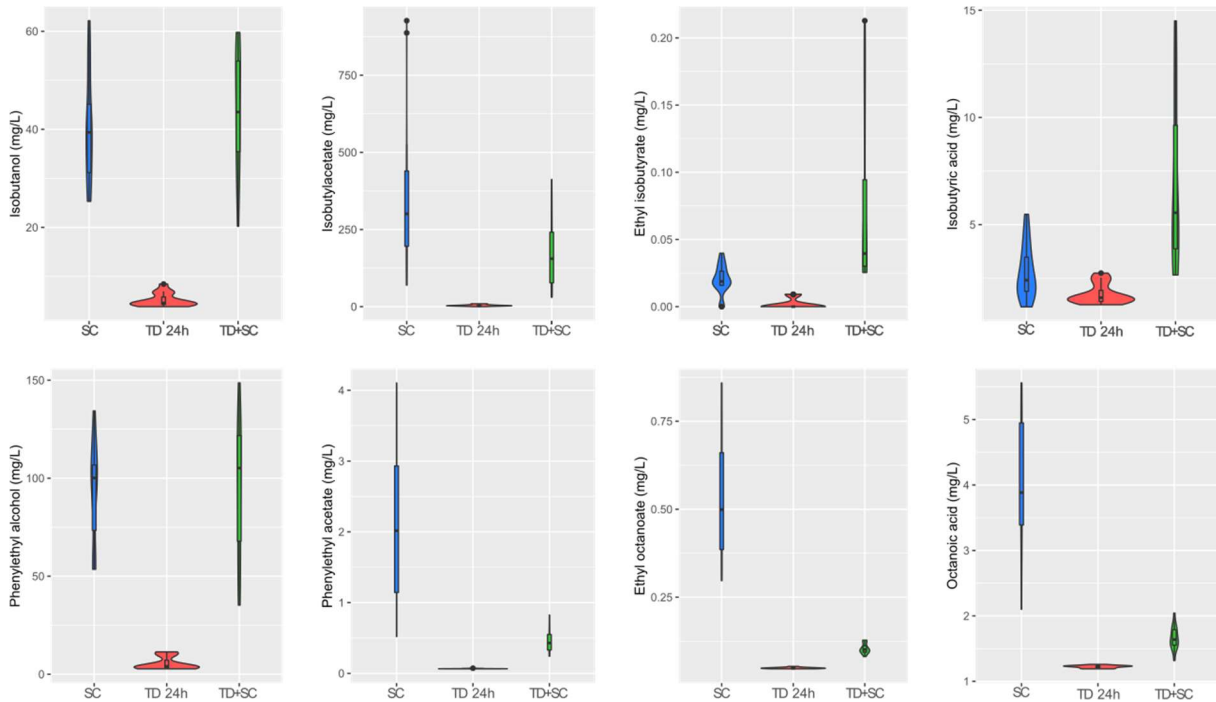


Figure 20: Diagrammes en violon et en boîte comparant les productions de certains arômes fermentaires entre différentes modalités. SC : *S. cerevisiae* en culture pure en fin de fermentation; TD 24h : *T. delbrueckii* en culture pure après 24 heures de fermentation; TD+SC : inoculation séquentielle en fin de fermentation.

La production de propanol est plus importante en inoculation séquentielle qu'en culture pure, 26,8 mg/L contre 20 mg/L en moyenne. La production de propanol étant liée à la croissance cellulaire (Mouret et al., 2014), la production plus rapide et plus importante de biomasse par *T. delbrueckii* peut expliquer la plus forte production de propanol avec cette souche. Après 24h de fermentation, le rendement de production de propanol est de 0,19 mg/g pour *T. delbrueckii* contre 0,11 mg/g pour *S. cerevisiae* dans des conditions similaires (Seguinot et al., 2018). La réponse aux paramètres du moût est également différente en inoculation séquentielle (Tableau 31). Alors que la production de propanol par *S. cerevisiae* est seulement influencée positivement par la teneur en azote, en inoculation séquentielle ce paramètre a un effet quadratique, en plus des effets négatifs des teneurs en sucre et lipides.

Tableau 31: Effet des concentrations en azote (N), sucre (S) et lipides (L) dans le moût sur la production des arômes fermentation en inoculation séquentielle. \* : faible adéquation entre les données et le modèle ( $R^2 < 0,85$ ). +: effet positive, - : effet négatif. Vert :  $p < 0.001$ , bleu:  $p < 0.01$ , orange:  $p < 0.05$ , gris : non applicable.

	Effets simples			Effets quadratiques			Interactions		
	N	S	L	N <sup>2</sup>	S <sup>2</sup>	L <sup>2</sup>	N:S	N:L	S:L
Propanol	+	-		-		-			
Isobutanol	-	-		+		-			
Isoamyl alcohol	-	-		+					
Phenylethanol	-	-		+					
Isobutyl acetate						+			
Isoamyl acetate*									
Phenylethyl acetate	+		+						
Ethyl isobutyrate	-	+		+			-		
Ethyl hexanoate	+	-					-		
Ethyl octanoate	+	+		-					
Ethyl decanoate	+	+	+	-	+			+	-
Isobutyric Acid	-	-	+	+					
Hexanoic Acid	+	-		-					
Octanoic Acid	+	-		-					
Decanoic Acid	+								
3MH	-	+							
4MMP			-	-					

Des teneurs finales similaires pour les deux modalités ont été mesurées en fin de fermentation dans le cas des autres alcools supérieurs de la voie d'Ehrlich (Figure 20). De précédents résultats ont montrés que *T. delbrueckii* est une forte productrice de ces composés (Chapitre 1-II). L'effet de l'azote sur la production des alcools supérieurs est inversement quadratique, avec un minimum atteint autour de 250 mgN/L d'azote. Cet effet est l'inverse de celui observé pour *S. cerevisiae* (Chapitre 3-II; Rollero et al., 2014). Cette différence peut être due à un mécanisme de gestion de l'azote différent de celui proposé pour *S. cerevisiae*, où la plus forte production d'alcools supérieurs avec des concentrations moyennes en azote assimilable (200 mg/L) permet de réguler la trop forte concentration en cétoacides apportés par le métabolisme carboné central en réponse à l'augmentation de la demande pour la synthèse protéique (Rollero et al., 2017). On note aussi un effet négatif de la concentration en sucre sur la production de ces composés, et un effet quadratique négatif des lipides sur la production d'isobutanol.

Les concentrations finales d'esters d'acétate en inoculation séquentielle sont plus faibles que les teneurs obtenues en fermentation en souche pure de *S. cerevisiae*. Cette observation peut être mise en relation avec les faibles capacités de production d'esters d'acétate précédemment observées avec *T. delbrueckii* (Chapitre 1-II). De plus, il n'existe que peu de variabilité dans la production de cette famille de molécules en fonction des conditions (Figure 20). Le modèle associé au plan expérimental de Box-Benhken nous a permis d'identifier uniquement un effet quadratique négatif des lipides sur la production d'isobutyl acetate, ainsi que des effets positifs de l'azote et des lipides sur le phenylethyl acetate, qui sont à relier avec la modulation de la production d'acétate par les conditions environnementales (van Roermund et al., 1995).

La production des acides et leurs dérivés esters venant de la voie d'Ehrlich est augmentée lorsque *T. delbrueckii* est inoculée en début de fermentation, et notamment la production d'acide isobutyrique, qui augmente de 2,8 mg/L en moyenne avec *S. cerevisiae* en culture pure à 6,9 mg/L en fermentation séquentielle avec *T. delbrueckii* (Figure 20). Des rendements plus importants pour la production d'éthyle esters provenant de la voie d'Ehrlich ont déjà été observés avec *T. delbrueckii* en culture pure sur milieux ne contenant qu'une seule source d'azote (en moyenne 7,2  $\mu\text{mol/mol}$  avec *T. delbrueckii* et 4,9  $\mu\text{mol/mol}$  avec *S. cerevisiae*, Chapitre 1-II). La production d'acide isobutyrique par *T. delbrueckii* a aussi été observée en culture pure au Chapitre 2, avec une production de 4,2 mg/L en fin de fermentation. En fermentation séquentielle avec *T. delbrueckii*, l'effet de la composition du moût est similaire sur la formation des acides venant de la voie d'Ehrlich et de leurs dérivés esters. L'azote a un effet quadratique et le sucre un effet négatif sur la production de ces molécules. Les lipides ont un effet positif seulement sur la production des acides. L'effet de l'azote est différent de celui observé avec *S. cerevisiae* en culture pure, où l'azote a un effet négatif sur la formation des acides de la voie d'Ehrlich et de leurs dérivés esters d'éthyle. Ainsi, une différence de réponse à la disponibilité en azote entre culture pure de *S. cerevisiae* et fermentations séquentielles, pour lesquelles la majorité de l'activité métabolique est assurée par *T. delbrueckii*, est observée à la fois sur la production des alcools supérieurs de la voie d'Ehrlich et sur celle de leurs acides correspondants, ce qui pourrait être le signe d'une gestion du squelette carboné des composés azotés au travers de la voie d'Ehrlich très différente entre *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii*.

La production des acides gras et leur dérivés esters est au contraire plus faible en inoculation séquentielle, en lien avec les faibles capacités de production de ces composés par *T. delbrueckii* (Chapitre 1-II). La production d'acide octanoïque est ainsi en moyenne de 1,7 mg/L en fermentation séquentielle, contre 4,1 mg/L avec *S. cerevisiae* en culture pure. Ces résultats sont cohérents avec la plus faible production d'acétate mesurée en fermentation séquentielle avec *T. delbrueckii*, et montrent une limitation des flux de la voie de l'acétaldéhyde, limitant par conséquent la production d'acétyl-coA et ses dérivés. Ce phénomène est aussi observé avec d'autres souches en fermentation séquentielle, comme *M. pulcherrima* (Chapitre 3-II) ou *S. bacillaris* par exemple (Englezos et al., 2019). L'effet des paramètres sur la production des acides gras en fermentation séquentielle est similaire à tous ces composés : l'azote a un effet quadratique et le sucre un effet négatif. Ces paramètres ont le même effet sur les esters d'éthyle correspondant, à l'exception du sucre qui a un effet positif sur la production d'éthyl octanoate et décanoate (Tableau 31). L'effet quadratique de l'azote n'a pas été observé avec *M. pulcherrima* en fermentation séquentielle ou *S. cerevisiae* en culture pure (Chapitre 3-II, Rollero et al., (2014)). En revanche, l'effet positif du sucre sur la production des éthyl octanoate et décanoate est similaire à celui observé avec *M. pulcherrima* en fermentation séquentielle.

Nous nous sommes également intéressés à la libération de thiols variétaux à partir de leurs précurseurs, qui ont été ajoutés dans le milieu synthétique : 105.1 µg/L de Cys-3MH, 539.5 µg/L de G3MH, 9.5 µg/L de Cys-4MMP et 10.9 µg/L de G4MMP (Figure 21, Annexe 11). La libération de 3MH en inoculation séquentielle est en moyenne plus faible qu'en culture pure avec *S. cerevisiae*, mais présente une plus grande variabilité : les concentrations en 3MH vont de 53 à 291 ng/L avec une moyenne de 122 ng/L en fin de fermentation séquentielle avec *T. delbrueckii*, alors que les concentrations obtenues avec *S. cerevisiae* en culture pure vont de 72 à 152 ng/L avec une moyenne de 100 ng/L. En revanche la production de 4MMP est toujours plus faible en inoculation séquentielle. Il est intéressant de noter que *T. delbrueckii* est capable de libérer ces deux composés en culture pure dès 24 heures de fermentation. Nos observations sont en contradiction avec de précédentes études montrant une production plus importante de thiol lors d'inoculation séquentielle avec *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae* (Belda et al., 2016; Renault et al., 2016). Cette différence pourrait venir du faible développement de *S. cerevisiae* dans nos conditions.

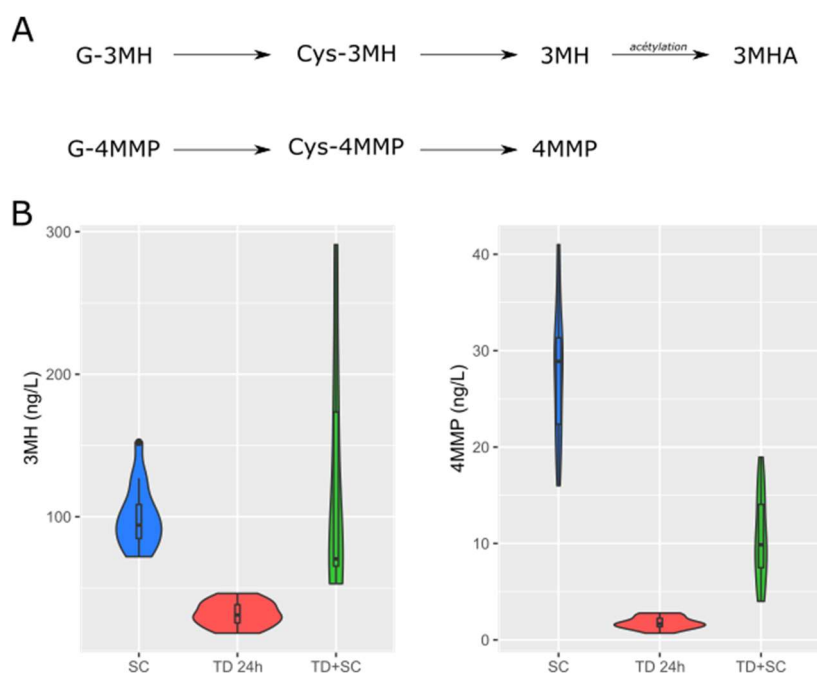


Figure 21: Lien entre les thioles et leurs précurseurs (A) et diagrammes en violon et boîte comparant la production de 3MH et 4MMP en fonction des conditions d'inoculation (B). SC : *S. cerevisiae* en culture pure en fin de fermentation; TD 24h : *T. delbrueckii* en culture pure après 24 heures de fermentation; TD+SC : inoculation séquentielle en fin de fermentation.

La libération de 3MH est affectée négativement par la concentration en azote et positivement par la concentration en sucre (Tableau 31). Ces effets diffèrent de la réponse de *S. cerevisiae* en culture pure à la modification de la teneur en azote du milieu en terme de production de 3MH, puisque la libération de 3MH est plus élevée en présence de concentrations plus importantes d'azote (Chapitre 3-II). On obtient ainsi une moyenne de 187 ng/L de 3MH avec 80 mg/L d'azote assimilable initial, 118 ng/L avec 190 mg/L et 63 ng/L de 3MH avec 300 mg/L d'azote initial en fermentation séquentielle. Par comparaison, les concentrations moyennes en 3MH mesurées en culture pure avec *S. cerevisiae* étaient de 77, 104 et 115 ng/L avec 80, 190 et 300 mg/L d'azote assimilable respectivement. Cette différence peut illustrer des mécanismes différents pour la libération de ces composés. La libération de 4MMP est quant à elle négativement impactée par la concentration en lipides, et l'azote à un effet quadratique négatif, de manière similaire à *S. cerevisiae*.

### 3. Conclusion

L'étude des effets des paramètres azote, sucre et lipides sur la production des arômes fermentaires et des thioles variétaux en fermentation séquentielle *T. delbrueckii* / *S. cerevisiae*



montre des différences avec les résultats obtenus en fermentation séquentielle *M. pulcherrima* / *S. cerevisiae* ou en culture pure *S. cerevisiae*. On remarque notamment un effet inverse de l'azote sur la production des alcools supérieurs par *T. delbrueckii* en fermentation séquentielle : la production de ces composés atteint son minimum autour de 200 mgN/L d'azote alors que la production d'alcools supérieurs par *S. cerevisiae* en culture pure atteint son maximum à cette concentration. De plus, l'effet de l'azote sur la libération des thiols variétaux est négatif avec *T. delbrueckii* en fermentation séquentielle, alors qu'il était quadratique ou positif avec *S. cerevisiae* en culture pure et *M. pulcherrima* en fermentation séquentielle. Le point le plus important à souligner est que, contrairement aux fermentations en inoculation séquentielle avec *M. pulcherrima*, l'implantation de *S. cerevisiae* reste limitée par rapport à *T. delbrueckii* qui reste la levure majoritaire tout au long de la fermentation. Les résultats obtenus reflètent donc principalement les capacités métaboliques de cette espèce. Comme précédemment observé (Chapitre 1-II), *T. delbrueckii* en culture pure produit des concentrations comparables d'alcools supérieurs à *S. cerevisiae*, mais moins d'esters. *T. delbrueckii* est également capable de libérer des thiols en culture pure, mais la concentration finale obtenue en fermentation séquentielle *T. delbrueckii* / *S. cerevisiae* pour ces composés est plus faible qu'en culture pure de *S. cerevisiae*. Ainsi, il serait intéressant d'essayer d'augmenter l'implantation de *S. cerevisiae*, par des ajouts d'azote ou un travail sur les taux et timing d'inoculation, pour essayer de favoriser la production d'esters et de thiols.

Enfin, du fait de la faible implantation de *S. cerevisiae*, on peut se demander quelle est la contribution effective de *S. cerevisiae* à la production d'arômes au cours de la fermentation séquentielle, ou, en d'autres termes, si la production de ces composés est quasi exclusivement liée à *T. delbrueckii*. Il est difficile de répondre en absence de données sur les concentrations d'arômes en fin de fermentation pour *T. delbrueckii* en culture pure dans les mêmes conditions. Néanmoins, compte tenu des faibles concentrations finales en phényléthyl acetate et ethyl esters en fermentation séquentielle *T. delbrueckii* / *S. cerevisiae* (Figure 20), composés que *T. delbrueckii* produit en faible quantité (Chapitre 1-II), on peut supposer que la contribution de *S. cerevisiae* aux productions de composés volatils est restée limitée, du moins pour les molécules précitées.

## IV. Suivi de la consommation de précurseurs de thiols par *M. pulcherrima* et *S. cerevisiae*

### 1. Introduction

L'utilisation de *M. pulcherrima* Flavia® en inoculation séquentielle a permis d'obtenir une concentration finale en thiols variétaux plus élevée qu'en culture pure avec *S. cerevisiae* Lalvin QA23®. En revanche, *M. pulcherrima* Flavia® ne libère pas de thiols variétaux au bout de 48 heures. Afin d'expliquer cette surproduction en inoculation séquentielle, l'hypothèse d'une première hydrolyse des précurseurs glutathionylés par *M. pulcherrima*, libérant des précurseurs cystéinylés plus facilement transformables en thiols variétaux par *S. cerevisiae* a été proposée (Figure 22).

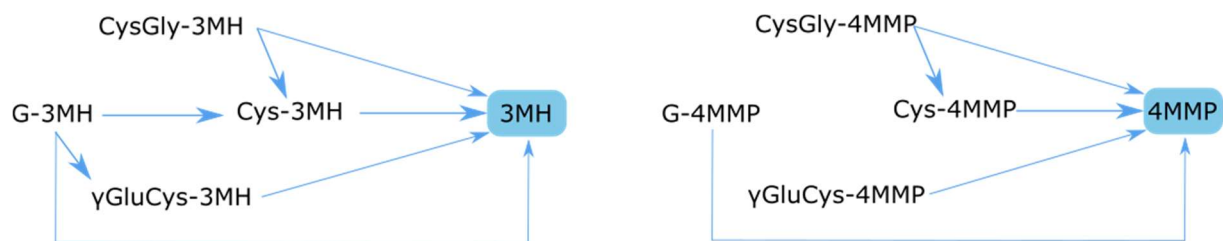


Figure 22 : Schéma des relations entre précurseurs de thiols d'après Bonnaffoux et al. (2018).

Afin d'étudier cette hypothèse, le devenir de précurseurs synthétiques en moût synthétique a été suivi en présence de *M. pulcherrima*, *S. cerevisiae*, ou ces deux souches en inoculation séquentielle.

### 2. Matériels et méthodes

#### 2.1. Plan expérimental

Trois conditions d'inoculation ont été testées :

- *M. pulcherrima* en culture pure (codée MP)
- *S. cerevisiae* en culture pure (SC)
- *M. pulcherrima* et *S. cerevisiae* en inoculation séquentielle (MP+SC)

Des précurseurs synthétiques ont été ajoutés à un moût synthétique suivant plusieurs modalités :

- Condition témoin sans ajout de précurseur (codée 0)
- Ajout de 500 µg/L de G-3MH (codée G)
- Ajout de 200 µg/L de cys-3MH (codée C)

La combinaison des différentes inoculations et concentrations en précurseurs constitue 9 modalités de fermentation. Deux triplicat sont réalisés pour chaque modalité, afin d'alterner les prélèvements pour que le changement de volume fermentaire ne soit pas supérieur à 10% du volume initial afin de ne pas changer le rapport volume/gaz dans les fermenteurs.

## 2.2.Souches

Les souches utilisées sont *M. pulcherrima* Flavia® et *S. cerevisiae* Lalvin QA23®. Les pré-cultures sont réalisées comme présenté dans la partie II. *M. pulcherrima* est inoculée à une concentration de  $1.10^7$  cellules/mL et *S. cerevisiae* a une concentration de  $5.10^6$  cellules/mL.

## 2.3.Milieu

Le milieu utilisé est du moût synthétique contenant 200 g/L de glucose/fructose (50:50), 200 mg/L d'azote assimilable et 5 mg/L de phytostérols. La composition détaillée du milieu est présentée dans la partie Matériels et Méthodes.

Les fermentations se déroulent dans des fermenteurs de 250 mL à 22°C sous agitation (250 rpm). Le suivi des cinétiques fermentaires est réalisé par mesure de la perte de poids 3 à 5 fois par jour.

## 2.4.Analyses

Des prélèvements sont réalisés régulièrement pendant la fermentation. 5 mL d'échantillons sont prélevés dans un tube contenant 30 µL d'une solution de métabisulfite de sodium à 20 g/L. Le mélange est vortexé puis centrifugé 5 min à 2 500 rpm et 4°C. Le surnageant est réparti dans 2 eppendorf de 2 mL. 25 µL d'une solution de G-3MH deutéré à 40 mg/L et de cys-3MH deutéré à 20 mg/L sont ajoutés dans le premier eppendorf. 20 µL d'une solution de 3MH deutéré à 100 µg/L sont ajoutés dans le second eppendorf. Les échantillons sont ensuite conservés à -20°C jusqu'à analyse.

Les analyses sont réalisées comme présenté dans le paragraphe 5.4.2 de la partie Matériels et Méthodes.

### 3. Résultats et discussion

L'évolution de la concentration des précurseurs de la 3MH dans le milieu de culture a été suivie dans les différentes conditions (Figure 23). Tout d'abord, lorsqu'aucun précurseur n'est ajouté en début de fermentation, leur concentration reste nulle tout au long de la fermentation, ce qui indique que les levures ne synthétisent pas *de novo* ces molécules.

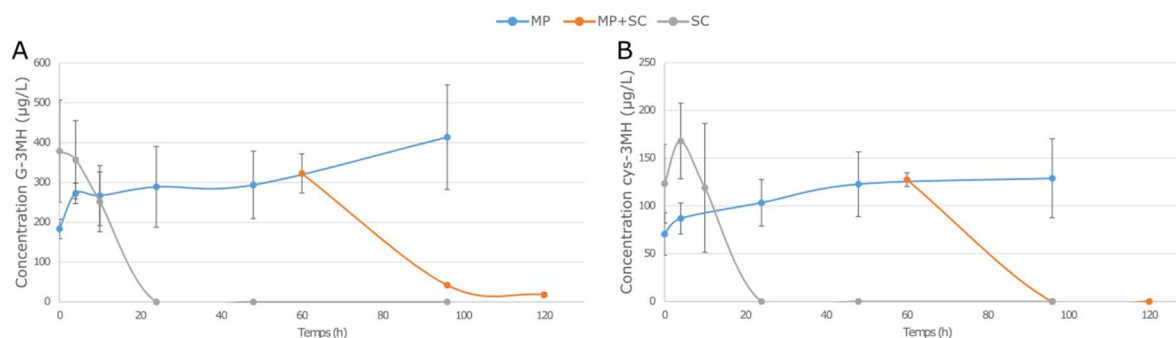


Figure 23: Suivi de l'évolution des concentrations en G-3MH (A) et cys-3MH (B) au cours de la fermentation en fonction de la stratégie d'inoculation. MP : *M. pulcherrima* en culture pure ; MP+SC : *M. pulcherrima* et *S. cerevisiae* en inoculation séquentielle ; SC : *S. cerevisiae* en culture pure.

Il faut ensuite souligner qu'il existe une grande variabilité dans les résultats mesurés pour chaque triplicat, ce qui produit des écart-types importants. Cette variabilité pourrait s'expliquer par une évolution des échantillons au cours de leur conservation. En effet le volume d'échantillon prélevé est faible par rapport aux procédés de prélèvement utilisés précédemment, ce qui augmente les risques liés à une évolution chimique des composés, notamment par des phénomènes d'oxydation. Il est donc important d'améliorer et de mieux maîtriser les étapes de prélèvement et de stockage des échantillons. De plus, les concentrations mesurées à  $T_0$  ne correspondent pas aux concentrations théoriquement ajoutées. Il est possible que les précurseurs, du fait de leur forte réactivité chimique, se soient combinés avec d'autres molécules présentes dans le moût (comme les acides gras) ou qu'ils se soient oxydés à cause de l'oxygène présent dans les fermenteurs.

Pour les modalités avec présence de G-3MH ou cys-3MH, différents profils sont observés en fonction de la modalité d'inoculation. *S. cerevisiae* en culture pure convertit entièrement la G-3MH et la cys-3MH en moins de 24 heures. Dans la littérature, différentes études ont porté sur la détermination des niveaux de conversion de la G-3MH, et la compilation des données obtenues semblent indiquer que la proportion de G-3MH métabolisée dépend des conditions

de fermentation. Bonnaffoux et al., (2018) rapportent des quantités de G-3MH dégradées de l'ordre de 400 µg/L avec la souche Levulia® Esperide sur Sauvignon Blanc (200 g/L de sucres, 240 mg/L d'azote assimilable, 100 NTU), similaires à ce que nous obtenons dans cette étude, alors qu'une dégradation plus faible, de l'ordre de 90 µg/L a été observé par Renault et al., (2016) avec la souche Zymaflore® X5 également sur Sauvignon Blanc (203 g/L de sucres 210 mg/L d'azote assimilable). Lors de culture pure de *M. pulcherrima*, aucune dégradation de ces précurseurs n'est détectée. Il semblerait que la concentration en G-3MH après 90 heures de fermentation soit plus élevée que la concentration initiale. La variabilité des résultats sur le dosage de cys-3MH ne permet pas de conclure sur l'augmentation ou non de ce composé avec *M. pulcherrima* en culture pure. Dans le cas de fermentation séquentielle, les concentrations de G-3MH et cys-3MH diminuent dès que *S. cerevisiae* est ajoutée, jusqu'à épuisement du cys-3MH et une dégradation d'environ 280 µg/L de G-3MH.

En présence de G-3MH, aucune production de cys-3MH n'a été mise en évidence pour l'ensemble des fermentations quelles que soient les souches utilisées. De même, nous n'avons pas observé de formation de G-3MH lorsque le précurseur cys-3MH est présent dans le milieu. Les levures étudiées ne sont donc pas capables de convertir le G-3MH en cys-3MH et inversement. Notre hypothèse pour expliquer la surproduction de thiols en inoculation séquentielle avec *M. pulcherrima* comparé à une culture pure de *S. cerevisiae* proposait que *M. pulcherrima* était capable d'hydrolyser le G-3MH pour libérer du cys-3MH qui serait ensuite converti en thiols par *S. cerevisiae*. Ces résultats infirment cette hypothèse.

Le fait que la concentration de G-3MH augmente avec *M. pulcherrima* est surprenant. Peu d'information sont disponibles sur les mécanismes de synthèse de cette molécule dans la littérature et cette observation suggère l'existence d'une nouvelle voie de formation de cette molécule.

Ces données doivent être complétées avec les valeurs de productions de thiols, actuellement en cours de dosage. Mais nous devons faire face à des problèmes méthodologiques liés à la procédure d'échantillonnage. Au cours de leur analyse, il est apparu que les échantillons étaient trop oxydés pour obtenir des résultats exploitables. Une étape de réduction supplémentaire est donc nécessaire. Ce problème montre que comme pour l'analyse des précurseurs, les étapes de prélèvement et de conservation des échantillons doivent être améliorées. Il indique aussi qu'il est nécessaire d'appréhender la question de la production

des thiols en fermentation en combinant les aspects microbiologiques et métaboliques aux aspects chimiques liés à la réactivité des molécules étudiées. Ces molécules sont en effet très réactives en conditions de fermentation, et peuvent s'oxyder ou former des adduits avec des molécules présentes dans le vin comme les catéchines, épicatechines et l'acide caftarique (Nikolantonaki et al., 2012; Petit et al., 2019; Roland et al., 2011).

## 4. Conclusion

Cette étude préliminaire sur la consommation des précurseurs de thiols par *M. pulcherrima* et *S. cerevisiae* en culture pure et en inoculation séquentielle nous permet de réfuter le modèle d'interaction que nous avons proposé. En effet, il apparaît que *M. pulcherrima* n'est pas capable de convertir le G-3MH pour libérer du cys-3MH. Un autre modèle doit être envisagé pour expliquer nos précédents résultats. Les fortes concentrations en thiols obtenues en fin de fermentation en inoculation séquentielle pourraient être le résultat d'un autre type d'interaction entre les levures. L'existence d'autres voies de synthèse peut être envisagée, à partir de précurseurs différents de ceux étudiés ici comme par exemple à partir de l'(E)-2-hexenal (Schneider et al., 2006). Des phénomènes d'interaction entre les souches pourraient aussi influencer la libération de thiols. La mort et la lyse des cellules de *M. pulcherrima* pourrait libérer des protéines dans le milieu, qui pourraient être hydrolysées en sources d'azote utilisables par *S. cerevisiae* (grâce à une activité protéase par exemple). La présence d'azote supplémentaire pourrait augmenter la libération de thiols par *S. cerevisiae*, en accord avec l'effet positif de l'azote sur la libération de 3MH par *S. cerevisiae* montré au Chapitre 3-II. Des études complémentaires sont nécessaires pour élucider ce phénomène. Ces résultats soulèvent des questions supplémentaires sur l'origine de l'augmentation de la production de thiols en inoculation séquentielle. Notamment la production de G-3MH par *M. pulcherrima* semble étonnante. Néanmoins, ces expériences auraient besoin d'être reproduites, après avoir amélioré et fiabilisé des protocoles de prélèvement et de conservation des échantillons, afin d'avoir une vision plus précise des phénomènes intervenant dans la consommation de précurseurs de thiols et la libération de thiols.

## 5. Annexes

Annexe 7 : Paramètres fermentaires pour les fermentation séquentielles avec *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae*. Rmax : vitesse maximale de fermentation ; Trmax : temps pour atteindre le Rmax ; Durée F° : durée de la fermentation. Les conditions sont décrites comme sucre-azote-lipides.

	Rmax (g/L/h)	Trmax (h)	Phase de latence (h)	Durée F° (h)
180-80-5	0.57	28	11	355
220-80-2	0.58	45	15	553
220-80-8	0.58	36	13	530
260-80-5	0.56	37	14	1028
180-190-2	0.94	37	15	163
180-190-8	0.89	36	14	187
220-190-5a	0.92	36	14	293
220-190-5b	0.94	36	15	293
220-190-5c	0.95	36	16	293
260-190-2	0.89	38	17	916
260-190-8	0.94	37	17	796
180-300-5	1.09	38	15	139
220-300-2	1.08	37	18	187
220-300-8	1.15	39	18	187
260-300-5	1.14	38	19	553

Annexe 8: Concentration (en mg/L d'azote assimilable) en acides aminés et ammonium restant dans le milieu après 24 heures de fermentation avec *T. delbrueckii* en fonction des conditions. Les conditions sont décrites comme sucre-azote-lipides.

Condition	Pro	Ala	Arg	Asn	Gln	Glu	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val	NH4	Total	
180-80-5	2.84	0.00	0.00	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.97
220-80-2	3.38	0.00	0.00	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.50
220-80-8	3.91	0.00	0.00	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.10	5.13
260-80-5	4.20	0.00	0.00	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.32
180-190-2	26.16	0.03	0.00	0.09	0.16	0.05	0.21	0.00	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	26.76
180-190-8	26.93	0.25	0.00	0.09	0.52	0.10	0.75	0.06	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.06	0.02	0.62	0.02	0.04	0.00	0.00	29.52
220-190-5a	26.21	0.08	0.00	0.10	0.33	0.07	0.41	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.02	0.26	0.00	0.02	0.00	0.00	27.66
220-190-5b	28.58	0.71	0.00	0.10	1.03	0.22	1.33	0.36	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.09	0.04	1.95	0.05	0.14	0.00	0.00	34.66
220-190-5c	28.18	0.80	0.00	0.10	0.95	0.25	1.39	0.40	0.05	0.00	0.00	0.00	0.06	0.09	0.04	2.05	0.05	0.15	0.00	0.00	34.69
260-190-2	29.67	1.05	0.00	0.12	0.97	0.40	1.55	0.71	0.03	0.00	0.00	0.00	0.07	0.09	0.05	2.86	0.08	0.24	15.74	0.00	53.71
260-190-8	28.35	1.23	0.00	0.12	1.12	0.41	1.74	0.63	0.03	0.00	0.00	0.00	0.07	0.08	0.04	2.60	0.09	0.26	14.35	0.00	51.22
180-300-5	44.87	1.84	12.51	0.14	1.20	1.04	2.22	1.36	0.04	0.03	0.00	0.00	0.12	0.13	0.05	4.89	0.17	0.54	44.13	0.00	115.41
220-300-2	45.30	3.31	23.32	0.19	1.88	2.30	2.53	1.51	0.06	0.07	0.00	0.00	0.28	0.25	0.15	5.81	0.29	0.99	51.92	0.00	140.30
220-300-8	44.09	3.62	20.94	0.18	1.94	2.48	2.69	1.46	0.09	0.08	0.00	0.00	0.30	0.26	0.18	5.53	0.31	1.08	54.62	0.00	139.95
260-300-5	43.85	2.89	19.22	0.18	1.76	1.87	2.37	1.42	0.04	0.06	0.00	0.00	0.27	0.23	0.13	5.42	0.27	0.81	51.85	0.00	132.85



Annexe 9: Concentrations en glycérol, succinate et acétate (en g/L) en fin de fermentation avec *T. delbrueckii* en fermentation séquentielle en fonction des conditions. Les conditions sont décrites comme sucre-azote-lipides.

Condition	Glycérol	Succinate	Acétate
180-80-5	8.89	2.10	0.08
220-80-2	8.71	2.33	0.10
220-80-8	9.93	2.49	0.21
260-80-5	9.98	2.55	0.30
180-190-2	6.38	1.66	0.01
180-190-8	8.15	2.06	0.04
220-190-5a	7.78	2.10	0.04
220-190-5b	7.52	1.94	0.03
220-190-5c	7.44	1.93	0.03
260-190-2	6.75	1.55	0.19
260-190-8	8.79	2.43	0.11
180-300-5	9.71	2.44	0.21
220-300-2	6.13	0.93	0.08
220-300-8	6.69	1.11	0.15
260-300-5	7.63	1.21	0.18

Annexe 10: Concentration en arômes fermentaires (en mg/L) en fin de fermentation avec *T. delbrueckii* en fonction des conditions. Les conditions sont décrites comme sucre-azote-lipides.

Conditions	Propanol	Isobutyl alcohol	Isoamyl alcohol	Phenylethyl alcohol	Isobutyl acetate	Isoamyl acetate	Phenylethyl acetate	Ethyl isobutyrate	Ethyl hexanoate	Ethyl octanoate	Isobutyric acid	Hexanoic acid	Octanoic acid
180-80-5	16.78	55.27	53.05	75.17	249.44	0.08	0.26	0.13	0.15	0.08	13.90	0.79	1.64
220-80-2	20.44	59.76	72.61	109.54	30.55	0.14	0.35	0.17	0.17	0.10	11.25	0.55	1.32
220-80-8	18.76	59.60	58.60	79.34	326.62	0.14	0.32	0.19	0.17	0.10	14.50	0.80	1.70
260-80-5	19.09	54.11	58.37	88.77	412.24	0.26	0.53	0.21	0.17	0.10	10.88	0.82	2.04
180-190-2	23.77	40.36	41.92	128.47	43.69	0.04	0.24	0.03	0.13	0.09	4.89	0.60	1.53
180-190-8	22.75	53.73	51.86	119.32	155.39	0.07	0.43	0.04	0.12	0.10	8.38	0.66	1.66
220-190-5a	25.77	49.76	52.12	148.64	121.23	0.08	0.41	0.05	0.15	0.09	6.38	0.58	1.59
220-190-5b	22.55	43.52	46.21	110.11	184.72	0.08	0.34	0.04	0.14	0.10	5.64	0.72	1.85
220-190-5c	22.26	41.99	45.76	124.13	84.61	0.07	0.30	0.03	0.13	0.09	4.41	0.59	1.53
260-190-2	30.92	38.24	42.59	105.15	69.66	0.24	0.64	0.04	0.20	0.11	3.59	0.63	1.56
260-190-8	25.01	52.53	51.50	127.88	232.95	0.16	0.61	0.06	0.16	0.09	5.55	0.60	1.78
180-300-5	39.29	31.28	37.08	52.25	39.31	0.14	0.44	0.03	0.15	0.13	3.98	0.72	1.54
220-300-2	38.44	20.23	25.24	35.21	322.65	0.98	0.83	0.03	0.23	0.12	2.65	0.77	1.83
220-300-8	36.67	32.64	42.97	60.54	99.70	0.15	0.46	0.03	0.15	0.13	3.76	0.61	1.58
260-300-5	38.90	28.36	32.30	43.30	191.87	0.62	0.57	0.03	0.22	0.13	3.01	0.71	1.80

Annexe 11: Concentrations (en ng/L) en 3MH et 4MMP en fin de fermentation séquentielle avec *T. delbrueckii*. Les conditions sont décrites comme sucre-azote-lipides.

Conditions	3MH	4MMP
180-80-5	107	4
220-80-2	183	8
220-80-8	192	5
260-80-5	265	9
180-190-2	58	16
180-190-8	70	15
220-190-5a	67	10
220-190-5b	62	13
220-190-5c	112	10
260-190-2	164	16
260-190-8	291	12
180-300-5	63	9
220-300-2	53	19
220-300-8	69	5
260-300-5	67	7

# CHAPITRE 4

---

## INFLUENCE DE *M. PULCHERRIMA* ET *T. DELBRUECKII* EN FERMENTATION SEQUENTIELLE SUR LA PRODUCTION D'AROMES EN MOUT NATUREL

L'utilisation de moût synthétique présente plusieurs avantages, parmi lesquels la possibilité de choisir les concentrations des principaux composants. Néanmoins, malgré le fait que la composition des moûts synthétiques utilisés dans ce projet soit proche d'un moût naturel, il est impossible de reproduire exactement un moût de raisin, notamment concernant la présence de précurseurs d'arômes variétaux. Des fermentations en moût naturel ont donc été réalisées avec *M. pulcherrima* et *T. delbrueckii* en inoculation séquentielle pour évaluer l'impact de ces levures sur la production d'arômes fermentaires et la libération d'arômes variétaux.

## 1. Introduction

Très récemment, plusieurs études ont été menées afin de déterminer les préférences en terme de sources d'azote des espèces *T. delbrueckii* et *M. pulcherrima* (Gobert et al., 2017; Kemsawasd et al., 2015 ; Su et al., 2020). Nos travaux ont permis de compléter les connaissances sur ces espèces, en caractérisant le lien entre leur consommation d'azote et leur production d'arômes fermentaires (Chapitre 1-II), le devenir de l'azote dans les cellules (Chapitre 2) et l'effet des paramètres principaux du moût sur le déroulement de la fermentation en inoculation séquentielle et le profil aromatique du produit obtenu (Chapitre 3-II et III). Toutefois, ces études ont été menées en moût synthétique. Ce moût donne la possibilité de choisir et contrôler ses caractéristiques, d'être disponible en grande quantité toute l'année et permet de réaliser des expérimentations en conditions standardisées. Néanmoins, malgré une composition proche d'un moût de raisin classique, il ne contient pas tous les composants d'un moût naturel (notamment les précurseurs d'arômes), ce qui peut affecter le métabolisme des levures et leurs interactions. En effet, certains composés sont produits à différentes concentrations sur moût synthétique et sur moût naturel, notamment l'acide acétique, dont la formation est de 2 à 4 fois plus importante sur moût synthétique que sur moût naturel (González-Royo et al., 2015). C'est pourquoi il est important de caractériser les souches étudiées également sur moût naturel, pour vérifier que les résultats obtenus en moût synthétique sont transposables en moût naturel.

D'autre part, outre la formation de thiols, l'utilisation de moût naturel permet de caractériser la production d'autres arômes variétaux, comme les lactones et les terpènes. Ces composés sont principalement produits par hydrolyse de précurseurs glycosidiques non aromatiques présents dans les moûts (Maicas and Mateo, 2005). Ces molécules présentent des arômes positifs variés, allant de la noix de coco à la rose. L'hydrolyse des précurseurs se fait par des glycosidases (Introduction Bibliographique, paragraphe 3.2.2.). La levure *S. cerevisiae* est décrite comme présentant une faible capacité à libérer de tels arômes (Carrau et al., 2005). Au contraire, l'utilisation d'espèces de levure non-*Saccharomyces*, comme *C. zemplina* ou *M. pulcherrima*, permet de libérer ces arômes à des concentrations plus importantes (Sadoudi et al., 2012).

Dans ce contexte, des fermentations ont été réalisées sur deux moûts, un Colombard et un Sauvignon blanc, ayant une provenance et une composition différente, notamment au niveau

de la ressource azotée, afin d'évaluer l'incidence de la variabilité de la matière première sur les profils fermentaires. *M. pulcherrima* et *T. delbrueckii* ont été utilisées en inoculation séquentielle avec *S. cerevisiae* et des cultures de *S. cerevisiae* en culture pure ont été menées en tant que contrôle. Enfin, l'effet d'un ajout d'azote au moment de l'inoculation de *S. cerevisiae* a été testé. Les cinétiques fermentaires, l'implantation des levures, la consommation en azote ainsi que la production d'arômes ont été mesurés.

## 2. Plan expérimental et méthodes utilisées

### 2.1. Plan expérimental

Trois conditions d'inoculation ont été testées : *M. pulcherrima* et *S. cerevisiae* en inoculation séquentielle, *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae* en inoculation séquentielle et *S. cerevisiae* en culture pure. Deux conditions d'ajout d'azote ont été étudiées : sans ajout et avec ajout de 20 g/hL de FermaidO® au moment de l'inoculation de *S. cerevisiae*. Enfin, deux moûts ont été utilisés. Cela donne donc un total de 12 conditions, réalisées en triplicata ce qui correspond à 36 fermentations (Figure 1).

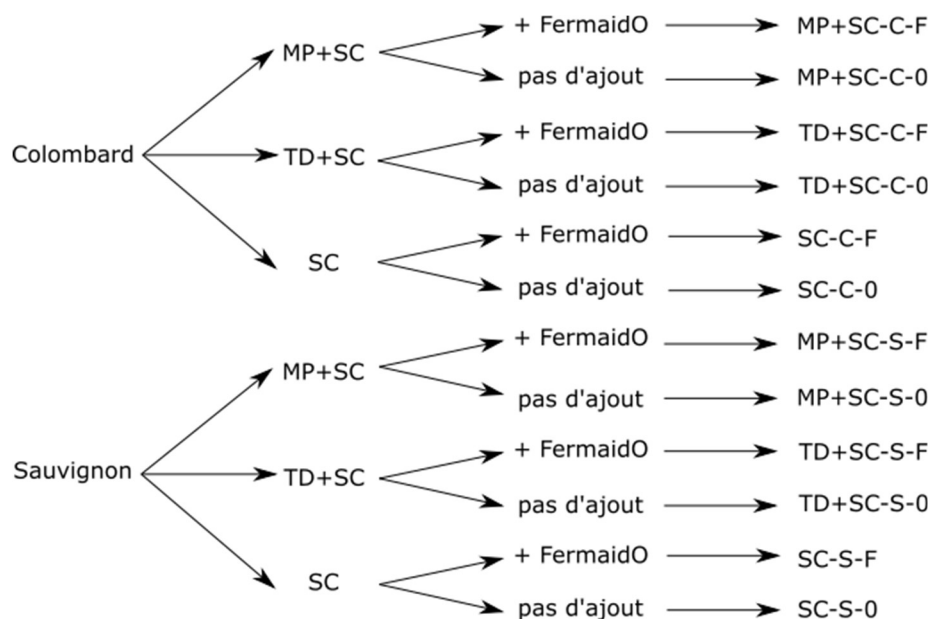


Figure 1: Représentation schématisée du plan expérimental. MP+SC: inoculation séquentielle de *M. pulcherrima* et *S. cerevisiae*; TD+SC: inoculation séquentielle de *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae*; SC: Culture pure de *S. cerevisiae*. La dernière colonne présente la codification des différentes modalités.

Les deux moûts de raisin utilisés dans cette étude sont un moût de Colombard du Gers récolté en 2017 et un moût de Sauvignon Blanc vendangé en 2018. Ces moûts ont été fournis par

Lallemand SAS. Leur conservation s'est faite à -20°C jusqu'à utilisation. La composition de ces deux moûts est disponible dans le Tableau 1.

Du fait de la faible teneur en bourbes du moût de Colombard, un ajout de 4 mg/L de phytostérols a été réalisé.

Tableau 1: Composition des moûts utilisés.

	Colombard	Sauvignon
Glucose (g/L)	87.4	92.8
Fructose (g/L)	91.4	92.4
Sucre total (g/L)	178.8	185.2
Acides aminés (mgN/L)	105.9	172.4
Ammonium (mgN/L)	50.0	64.6
Azote assimilable (mgN/L)	155.9	237.1
Turbidité (NTU)	40	240
Phytostérols ajoutés (mg/L)	4	0
SO <sub>2</sub> libre (mg/L)	2.19	10.06
SO <sub>2</sub> total (mg/L)	14.1	38.91

Les souches *M. pulcherrima* Flavia<sup>®</sup>, *T. delbrueckii* Biodiva<sup>®</sup> et *S. cerevisiae* QA23<sup>®</sup>, conservées dans du glycérol à -80°C, ont tout d'abord été propagées dans du YEPD pendant 24 heures à 28°C sous agitation. La population cellulaire dans ces pré-cultures a été dénombrée avec un compteur Coulter. L'inoculation a été réalisée avec 1.10<sup>7</sup> cellules/mL pour *M. pulcherrima* et 5.10<sup>6</sup> cellules/mL pour *T. delbrueckii*. *S. cerevisiae* a été inoculée à 5.10<sup>6</sup> cellules/mL après 24 heures de fermentation de *T. delbrueckii* et 48 heures de fermentation pour *M. pulcherrima*.

Un comptage sur boîte a été réalisé avant l'inoculation de *S. cerevisiae* puis à 90% d'avancement de la fermentation, en utilisant des milieux sélectifs permettant de discriminer les deux espèces de levure, comme présenté au paragraphe 5.1.2 de la partie Matériels et Méthodes.

## 2.2. Mise en œuvre et suivi des fermentations

Les fermentations ont été réalisées dans des fermenteurs de 300 mL remplis avec 250 mL de moût (voir Matériels et Méthodes, paragraphe 4.2). Les fermentations se sont déroulées dans une pièce à température maintenue à 22°C. Le suivi de la cinétique fermentaire se fait par mesure de la perte de poids. Les pesées sont réalisées manuellement 3 à 5 fois par jour.

### 2.3. Dosages

Les protocoles de dosage sont détaillés dans le Chapitre 5 de la partie Matériel et Méthodes.

Le dosage de l'azote assimilable dans les moûts et avant inoculation de *S. cerevisiae* s'est fait en deux parties. Tout d'abord l'ammonium a été dosé par le kit enzymatiques ENZYTEC™ fluid Ammoniaque (DiaSys Diagnostic Systems Gmb). D'autre part, la concentration en acide aminés assimilables a été dosée par la méthode du NOPA (Nitrogen by OPA).

Le glucose, fructose, éthanol, glycérol et l'acétate ont été dosés par HPLC.

Les arômes fermentaires et les arômes variétaux (hors thiols) ont été dosés par GC-MS après extraction au dichlorométhane. Les précurseurs de thiols ont été dosés par UPLC-MS/MS.

### 2.4. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec R (version 3.5.3). Une ANOVA a été réalisée pour déterminer la significativité des variables sur la production d'arôme. Le seuil de significativité pour la p-value a été fixé à 0.05. La normalité de la distribution des résidus ainsi que l'homogénéité de la variance ont été vérifiés. L'effet étant significatif a une p-value de 0.05, un test DHS de Tukey a été appliqué pour vérifier deux à deux la significativité de l'écart des moyennes.

L'ACP a été réalisée grâce au package FactoMineR (Le et al., 2008).

## 3. Résultats

L'impact de l'utilisation de *M. pulcherrima* et *T. delbrueckii* en inoculation séquentielle par rapport à une utilisation de *S. cerevisiae* en culture pure, et un ajout d'azote au moment de l'inoculation de *S. cerevisiae* ont été testés sur deux moûts naturels. Le déroulement de la fermentation a été suivi, et les caractéristiques du produit final ont été mesurées.

### 3.1. Fermentation, biomasse et consommation d'azote

Le suivi de la production de CO<sub>2</sub> par pesée a permis de calculer les vitesses de fermentation (Figure 2).



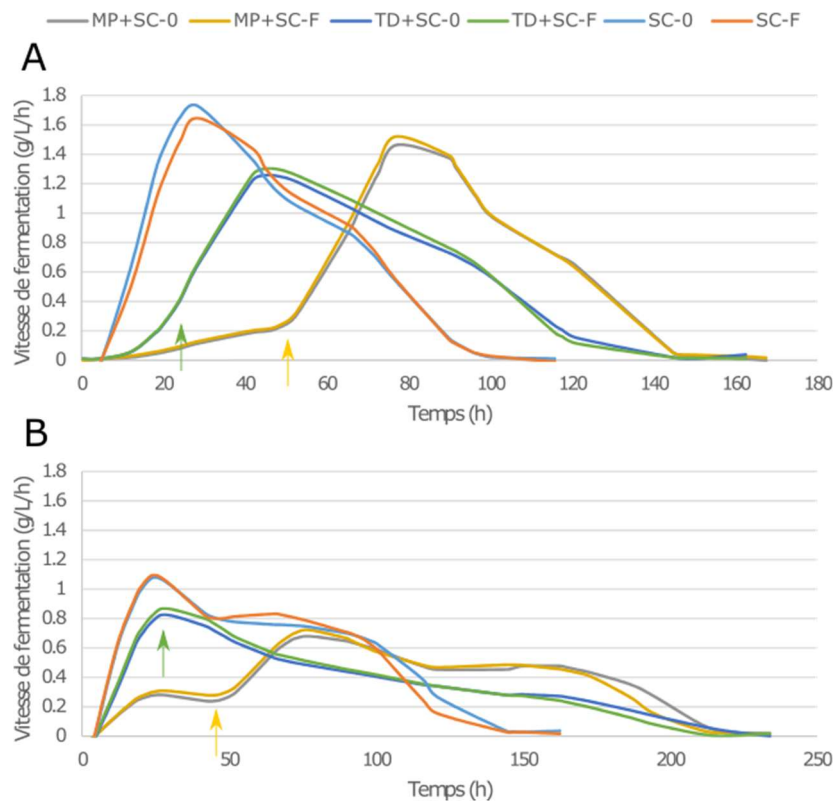


Figure 2: Vitesse de production de CO<sub>2</sub> pour les différentes conditions de fermentation sur Sauvignon (A) et Colombar (B). Les vitesses représentées sont la moyenne des triplicats (voir l'Annexe 1 pour le détail des triplicats). Gris : inoculation séquentielle de *M. pulcherrima* et *S. cerevisiae* sans ajout ; orange : inoculation séquentielle de *M. pulcherrima* et *S. cerevisiae* avec ajout d'azote ; Bleu foncé : inoculation séquentielle de *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae* sans ajout ; vert : inoculation séquentielle de *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae* avec ajout d'azote ; Bleu clair : *S. cerevisiae* en culture pure sans ajout ; orange : *S. cerevisiae* en culture pure avec ajout d'azote. Flèches : inoculation de *S. cerevisiae* après *T. delbrueckii* (flèche verte) ou *M. pulcherrima* (flèche jaune).

Pour les deux modalités, l'activité fermentaire des non-*Saccharomyces* est plus faible sur Sauvignon que sur Colombar, avec également une phase de latence plus longue. Cette différence est très probablement liée à la différence de concentration en SO<sub>2</sub> entre ces deux moûts. En effet, plusieurs études ont montré que les espèces non-*Saccharomyces* avaient une grande sensibilité au SO<sub>2</sub>, ce composé inhibant leur croissance proportionnellement à sa teneur dans le milieu et de façon beaucoup plus importante que chez *S. cerevisiae* (Bokulich et al., 2015; Ciani and Pepe, 2002; Egli et al., 2002). En lien avec ce phénomène, nous avons observé pour les deux espèces NS des populations cellulaires plus faibles sur Sauvignon, dont la concentration en SO<sub>2</sub> est plus de 2.5 fois plus élevée que dans le Colombar (Figure 3). Cela peut expliquer les variations d'activité fermentaires en fonction du milieu : la population de *T.*

*delbrueckii* n'est que de  $3,63 \cdot 10^7$  UFC/mL sur Sauvignon alors qu'elle est de  $1,63 \cdot 10^8$  UFC/mL sur Colombar. De même, la population de *M. pulcherrima* est de  $1,85 \cdot 10^7$  UFC/mL sur Sauvignon contre  $4,40 \cdot 10^7$  UFC/mL sur Colombar.

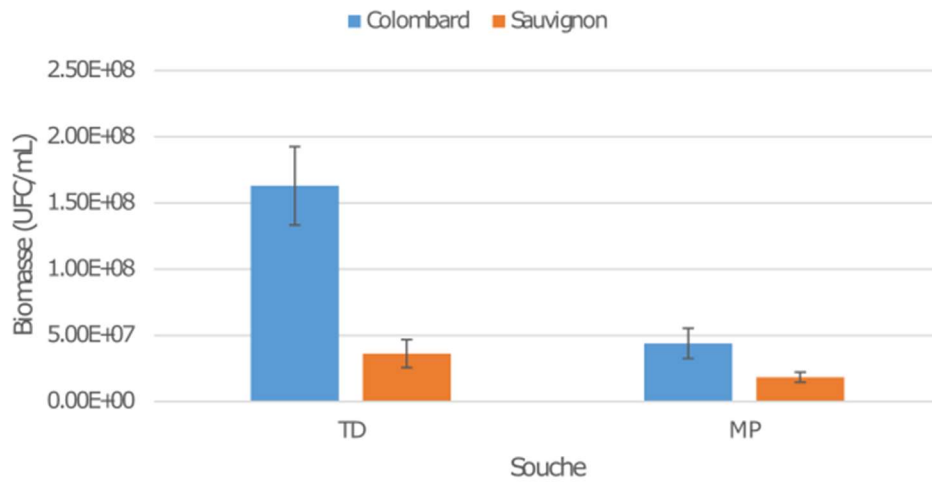


Figure 3: Concentration en biomasse pour *T. delbrueckii* (TD) et *M. pulcherrima* (MP) sur Colombar (en blue) ou Sauvignon (orange) avant inoculation de *S. cerevisiae*.

Une conséquence de la croissance modérée des levures NS sur moût Sauvignon est leur plus faible consommation d'azote assimilable sur ce milieu pendant la première partie de la fermentation (Figure 4). Ainsi la concentration en azote assimilable résiduel après 24 h de fermentation avec *T. delbrueckii* sur Colombar est très faible, de l'ordre de 14 mg/L d'azote assimilable sous forme d'acides aminés. Le détail de la composition de ces acides aminés n'est pas disponible pour cette fermentation. Néanmoins, d'après des travaux précédents, on peut s'attendre à ce qu'il reste principalement du tryptophane, de la glycine et de la proline (Su et al., 2020). Dans le cas de la fermentation de *M. pulcherrima* sur Colombar, 85 mg/L d'azote assimilable ont été dosés après 48h de fermentation de *M. pulcherrima*. Des concentrations supérieures en azote assimilable sont mesurées sur milieu Sauvignon, de 190 et 205 mg/L après fermentation de *T. delbrueckii* et *M. pulcherrima* respectivement.

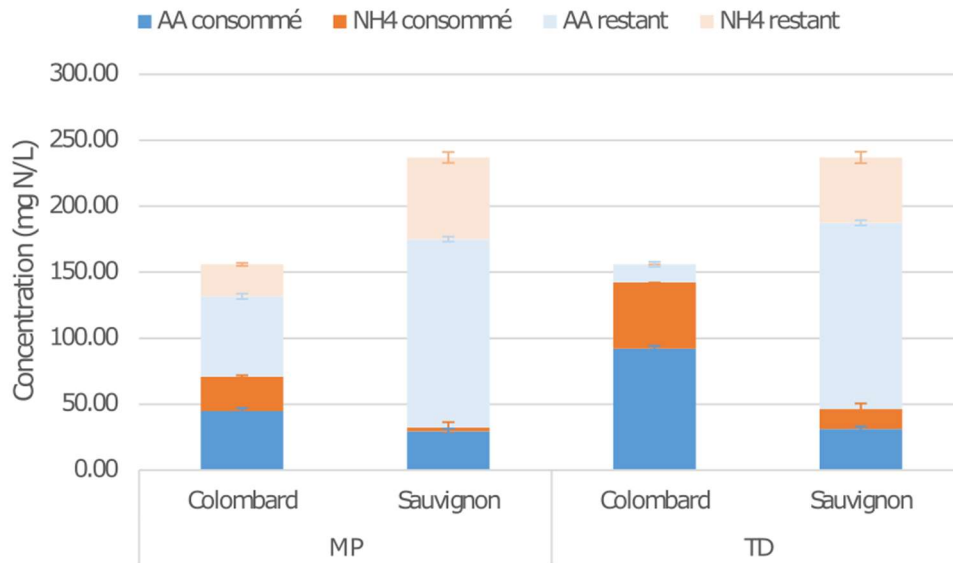


Figure 4: Quantités d'azote consommées et restantes après fermentation de *M. pulcherrima* (MP) pendant 48h et *T. delbrueckii* (TD) pendant 24h en culture pure, sur les deux moûts. Bleu foncé : Acides aminés consommés ; orange : ammonium consommé ; bleu clair : acides aminés restants ; orange clair : ammonium restant.

De la même façon, l'implantation de *S. cerevisiae* variait en fonction des conditions de milieu et de la souche NS utilisée (Figure 5). Du fait du plus faible développement des levures non-*Saccharomyces* sur Sauvignon, on s'attend à une plus forte implantation de *S. cerevisiae* avec ce moût. Cela a été effectivement observé au cours de fermentations séquentielles *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae*. En effet, la population de *S. cerevisiae* a atteint une concentration entre  $4,60 \cdot 10^7$  et  $5,30 \cdot 10^7$  UFC/mL sur Sauvignon, contre  $2,20 \cdot 10^7$  à  $2,40 \cdot 10^7$  UFC/mL sur Colombard, soit une augmentation d'un facteur 2 environ. En conséquence, alors que les populations de *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae* sont équivalentes sur Sauvignon, la population de *T. delbrueckii* est 7 fois plus importante que celle de *S. cerevisiae* sur Colombard. Cette implantation très limitée de *S. cerevisiae* en fermentation séquentielle avec *T. delbrueckii* explique l'absence d'augmentation de la vitesse fermentaire lors de l'inoculation de cette espèce, ce phénomène de reprise de fermentation étant généralement observé lors de fermentation séquentielle avec d'autres espèces comme *K. marxianus* ou *L. thermotolerans* (Hranilovic et al., 2018; Rollero et al., 2018) (Figure 2). Sur moût Colombard, la croissance de *S. cerevisiae* est très faible (la population mesurée en fin de culture est 6 fois inférieure à celle obtenue lors de culture de *S. cerevisiae* en souche pure) et c'est donc *T. delbrueckii* qui est responsable de l'activité fermentaire. Cela se traduit par une fermentation languissante, avec

un allongement de la fermentation de plus de 70 heures par rapport à *S. cerevisiae* en culture pure, soit une augmentation de 50% de la durée de fermentation (Annexe 4). Sur Sauvignon, l'implantation de *S. cerevisiae* est modérée, ce qui permet de terminer la fermentation seulement 35 heures plus tard que *S. cerevisiae* en culture pure, soit une augmentation de 35% de la durée de fermentation.

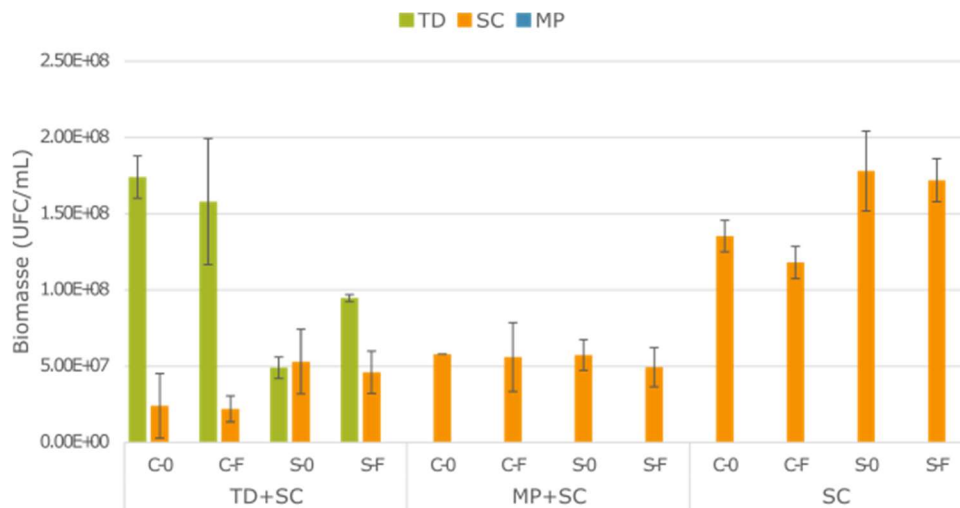


Figure 5: Concentration en biomasse à 90% d'avancement de fermentation, pour les trois souches étudiées en fonction des conditions. TD : *T. delbrueckii* ; SC : *S. cerevisiae* ; MP : *M. pulcherrima*.

Un schéma différent a été mis en évidence lors des fermentations séquentielles avec *M. pulcherrima* / *S. cerevisiae*. Dans ce cas, seules les levures *S. cerevisiae* étaient détectables en fin de fermentation (Figure 5), et les populations finales de cette souche étaient équivalentes sur les deux moûts, autour de  $5,60 \cdot 10^7$  UFC/mL, malgré les différences entre les concentrations d'azote au moment de l'ajout de *S. cerevisiae* (Figure 4). Au niveau de la cinétique fermentaire, une reprise de l'activité a été observée dans les deux conditions au moment de l'ajout de *S. cerevisiae* (Figure 2), mais les profils étaient différents. Sur Sauvignon, la croissance et l'activité de *M. pulcherrima* en début de fermentation sont restées faibles, ce qui explique que l'allure des cinétiques après ajout de *S. cerevisiae* soit similaire à celle obtenue pour *S. cerevisiae* en culture pure. Une vitesse maximale de fermentation de l'ordre de 1,5 g/L/h et une durée de fermentation à partir de l'ajout de *S. cerevisiae* de 102 heures ont en effet été observées. Sur Colombard, la croissance plus importants de *M. pulcherrima* a conduit à une diminution de la vitesse maximale de fermentation atteinte par *S. cerevisiae*

(0,7 contre 1,1 g/L/h en culture pure) et à un allongement de la durée de fermentation par *S. cerevisiae* (162 heures, contre 140 heures en culture pure) (Annexe 4).

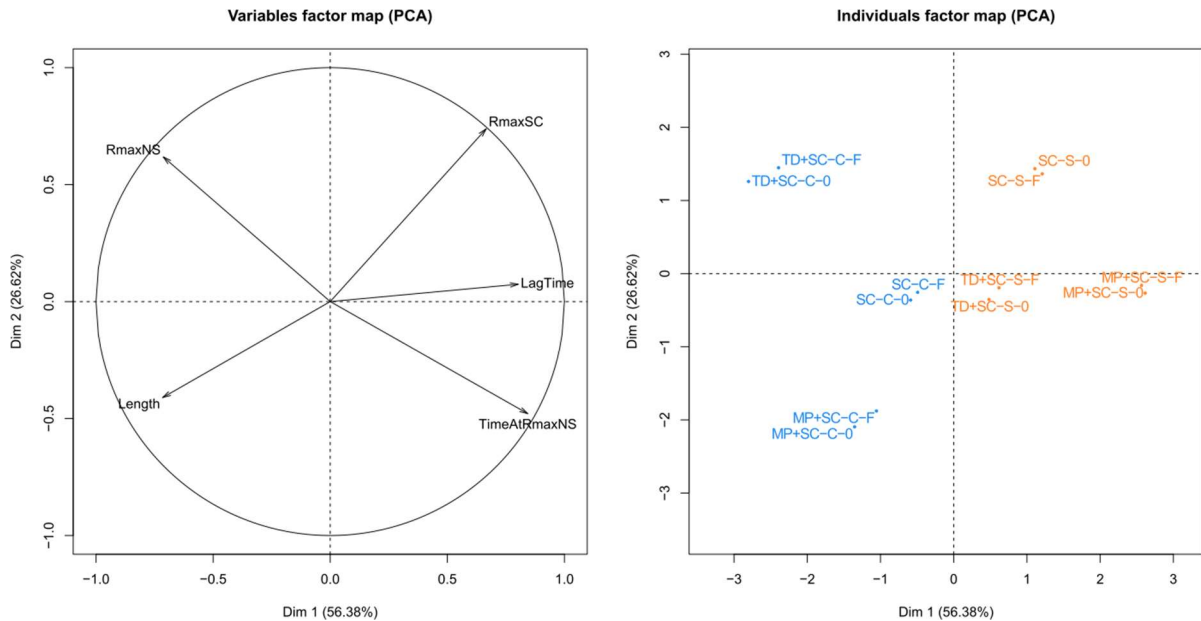


Figure 6: ACP représentant les différentes conditions de fermentation en fonction des paramètres fermentaires. RmaxNS : vitesse fermentaire maximale de la levure non-*Saccharomyces* ; RmaxSC : vitesse fermentaire maximale de *S. cerevisiae* ; LagTime : durée de la phase de latence ; TimeAtRmaxNS : durée pour atteindre la vitesse fermentaire maximale de la levure non-*Saccharomyces*. Length : durée de la fermentation. En bleu : conditions en Colombar ; orange : conditions en Sauvignon. MP+SC : inoculation séquentielle de *M. pulcherrima* et *S. cerevisiae* ; TD+SC : inoculation séquentielle de *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae* ; SC : *S. cerevisiae* en culture pure. F : avec ajout d'azote ; 0 : sans ajout.

Ces données ont été synthétisées par une ACP représentant les paramètres fermentaires obtenus pour chaque condition (Figure 6), dont les deux premières composantes expliquent 83 % de la variance. Le premier axe sépare les individus en fonction du moût utilisé. Sur milieu Sauvignon, de manière générale, les fermentations présentent une phase de latence plus longue, une vitesse maximale de fermentation par les non-*Saccharomyces* plus faible mais une vitesse maximale de fermentation par *S. cerevisiae* plus élevée. Les modalités d'inoculation sont également clairement différenciées. En revanche, peu de différences sont visibles entre les individus avec et sans ajout de produit azoté. Cela est en accord avec l'absence de différence significative observée sur les paramètres étudiés.

Ces résultats illustrent une interaction entre les espèces en fermentation. En effet, la croissance en première partie de fermentation de *M. pulcherrima* et sa consommation d'azote

sont faibles. Il reste ainsi suffisamment d'azote pour assurer la croissance de *S. cerevisiae*. Néanmoins, on aurait pu s'attendre à ce que la population de *S. cerevisiae* soit plus élevée sur Sauvignon compte-tenu de la faible consommation d'azote par *M. pulcherrima*. Il est possible que *M. pulcherrima* ait consommé des sources d'azote préférentielles de *S. cerevisiae*, ralentissant sa croissance, des vitamines ou que la mortalité de *S. cerevisiae* sur ce moût en fin de fermentation soit plus élevée. De même, la consommation d'azote par *T. delbrueckii* est restée faible sur Sauvignon, ce qui a permis le développement de *S. cerevisiae*. Contrairement à *M. pulcherrima*, cette souche a tout de même été capable d'augmenter et de maintenir sa population en présence de *S. cerevisiae*. De plus, il est intéressant de noter que sur Sauvignon, l'azote ajouté au moment de l'inoculation de *S. cerevisiae* a été préférentiellement utilisé pour la croissance de *T. delbrueckii*, ce qui est probablement lié au fait qu'à ce stade de la fermentation, cette souche était en phase de croissance alors que *S. cerevisiae* était en phase de latence. Ainsi, sur Sauvignon, la population finale de *T. delbrueckii* en fin de fermentation pour la condition avec ajout d'azote est pratiquement deux fois supérieure à celle obtenue pour la condition sans ajout d'azote, alors que la population finale de *S. cerevisiae* est inchangée entre les deux conditions. Sur Colombard, la quasi-totalité de l'azote du moût de raisin est consommée par *T. delbrueckii* lors de l'inoculation par *S. cerevisiae* et l'ajout d'azote n'a pas incidence significative sur la croissance des deux espèces. De plus, l'ajout d'azote est peut-être trop faible (équivalent à 24 mg N/L) pour avoir un effet marqué.

### 3.2. Production de composés du métabolisme carboné central

Les productions d'éthanol, de glycérol et d'acétate ont été mesurées à 90% d'avancement de fermentation. Les rendements de production ont été calculés en fonction du sucre consommé (Figure 7). Une analyse ANOVA montre que le moût et la souche ont un effet significatif avec une p-value inférieure à 0,05 pour ces trois rendements. En revanche, l'ajout d'azote n'a pas d'effet sur la production de ces composés (Annexe 2).

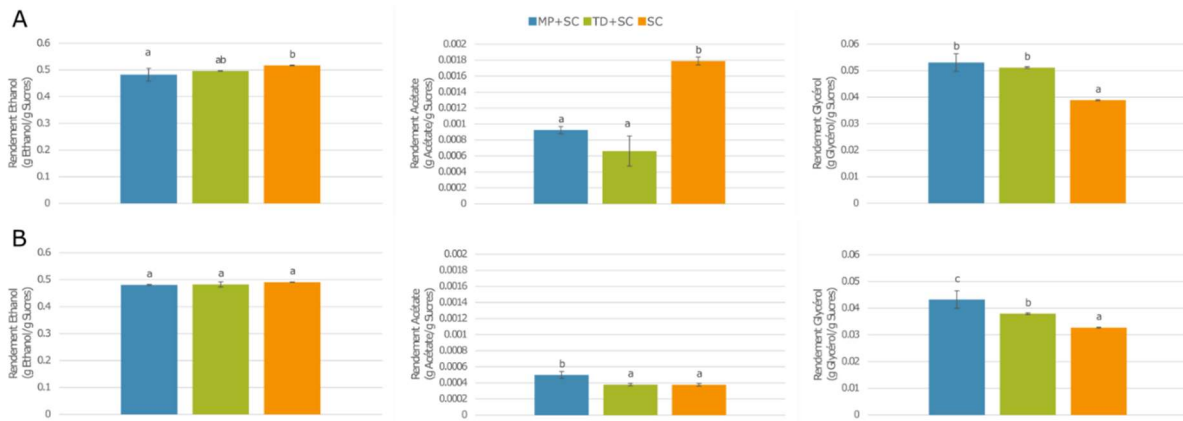


Figure 7: Rendements en éthanol, acétate et glycérol par rapport au sucre consommé, à 90% d'avancement de fermentation sur Colombard (A) et Sauvignon (B) pour les conditions sans ajout d'azote. Bleu : inoculation séquentielle de *M. pulcherrima* et *S. cerevisiae* ; Vert : Inoculation séquentielle de *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae* ; Orange : *S. cerevisiae* en culture pure. A, b et c indiquent des différences significatives entre les modes d'inoculation ( $p < 0.05$ ).

L'utilisation de levures non-*Saccharomyces* en culture mixte a été proposée pour réduire la teneur finale des vins en éthanol (Belda et al., 2016; Contreras et al., 2014; Varela et al., 2016). De plus, dans une précédente étude sur moût synthétique, l'utilisation de *M. pulcherrima* en inoculation séquentielle a entraîné une diminution de la concentration finale en éthanol d'environ 8 g/L (Chapitre 3-II). Sur Colombard, le rendement de production d'éthanol est significativement plus faible avec *M. pulcherrima* en inoculation séquentielle que *S. cerevisiae* en culture pure. La valeur obtenue pour *T. delbrueckii* est intermédiaire. En revanche sur Sauvignon, il n'y a pas de différence significative. Les mêmes résultats sont obtenus lorsqu'un ajout d'azote a été réalisé au moment de l'inoculation de *S. cerevisiae* (Annexe 5).

Les rendements de production de glycérol sont plus élevés en inoculation séquentielle que lors de culture pure de *S. cerevisiae*. Sur Colombard, une augmentation de 35% de ce rendement est observée en inoculation séquentielle, pour les deux espèces NS utilisées. Sur Sauvignon, le rendement de production de glycérol est 15% plus élevé en inoculation séquentielle avec *T. delbrueckii* et 30% plus élevé avec *M. pulcherrima*. De façon surprenante, les niveaux de production de glycérol sur Colombard (179 g/L de sucre, 156 mg/L d'azote assimilable) sont plus élevés que sur Sauvignon (185 g/L de sucre, 237 mg/L d'azote assimilable). Cela va à l'inverse de l'effet de la disponibilité de ces nutriments sur la production de glycérol observée sur moût synthétique (Chapitre 3-II) et décrit dans la littérature (Albers et al., 1996; Rollero et al., 2014; Vilanova et al., 2007). Cette observation peut toutefois être

expliquée par la présence de SO<sub>2</sub> - composé qui n'a pas été ajouté lors des expérimentations en milieu synthétique - dans les moûts naturels. En effet, nous avons montré que la production de glycérol par les non-*Saccharomyces* contribuait de façon importante à l'augmentation de la concentration finale en glycérol en inoculation séquentielle (Chapitre 3-II et III). Or, la production de glycérol se produit essentiellement pendant la phase de croissance des levures (Modig et al., 2007). Ainsi la quantité plus élevée de SO<sub>2</sub> dans le Sauvignon a eu pour effet de limiter de façon plus importante la croissance des non-*Saccharomyces*, et donc leur production de glycérol par rapport au milieu Colombard.

En ce qui concerne les rendements de production d'acétate, nous avons mis en évidence une incidence de la modalité d'inoculation en interaction avec la nature du moût utilisé. Sur Colombard, le rendement de production de l'acétate est plus faible en fermentation séquentielle (0,92 mg/g avec *M. pulcherrima*, 0,66 mg/g avec *T. delbrueckii*) qu'en culture pure (1,79 mg/g). Par contre, la mise en place d'une inoculation séquentielle module de façon très différente la production d'acétate lors de fermentation sur Sauvignon. Dans ce cas, les rendements de production d'acétate en fermentation séquentielle *T. delbrueckii* / *S. cerevisiae* sont similaires à ceux obtenus en culture pure sur ce milieu (0,38 mg/g) et l'utilisation de *M. pulcherrima* en fermentation séquentielle avec *S. cerevisiae* conduit à une augmentation significative de ce rendement (0,50 mg/g). Globalement, les productions d'acétate sur moût Sauvignon sont beaucoup plus faibles que sur Colombard. Ces observations peuvent être expliquées par la différence de composition, notamment au niveau des teneurs en sucre et en azote, entre les deux milieux. Nous avons montré, sur milieu synthétique, que la disponibilité en azote et en sucre contrôlait la formation d'acétate de façon très différente entre fermentation séquentielle levure NS / *S. cerevisiae* et culture pure de *S. cerevisiae* (Chapitre 3-II et III). Ainsi, l'incidence d'une pré-inoculation par une levure NS sur la production d'acétate en fermentation peut s'inverser en fonction des teneurs en nutriments du milieu.

### 3.3. Production d'arômes

#### 3.3.1. Arômes fermentaires

Les arômes issus du métabolisme des levures ont été dosés par GC-MS à 90% d'avancement de fermentation. Ces résultats ont été analysés par une ANOVA, qui montre un effet significatif ( $p$ -value < 0.05) du mode d'inoculation et du moût pour presque tous les composés analysés (Figure 8 and Figure 9).



De façon globale, la production des alcools supérieurs et des acides branchés est plus faible sur Sauvignon que sur Colombard. Par exemple, la concentration en phényléthanol est de 89 et 105 mg/L en inoculation séquentielle sur Colombard avec *M. pulcherrima* et *T. delbrueckii* respectivement, et de 34 et 32 mg/L avec *M. pulcherrima* et *T. delbrueckii* respectivement sur Sauvignon. La production des esters d'éthyle dérivés des acides branchés est en règle générale équivalente entre les deux moûts, à l'exception des éthyles d'isobutyrate et d'isovalérate, produits plus faiblement sur Sauvignon en inoculation séquentielle avec *T. delbrueckii* (respectivement 0,07 mg/L et 0 mg/L contre 0,19 mg/L et 0,08 mg/L sur Colombard). Enfin, la production des acétate d'esters, des acides gras linéaires et de leurs dérivés ester d'éthyles est plus élevée sur Sauvignon. Par exemple, la production d'isoamyl acétate était de 1,42 mg/L avec *M. pulcherrima* en inoculation séquentielle sur Colombard et de 8,15 mg/L sur Sauvignon. Les écarts observés entre les moûts peuvent être rapportés à leur composition. En effet, plusieurs études se sont intéressées à l'effet de la composition du moût sur la production d'arômes fermentaires en moût synthétique chez *S. cerevisiae* (Beltran et al., 2005; Charoenchai et al., 1998; Rollero et al., 2014) et en inoculation séquentielle (Chapitre 3-II et III). La plus forte production de propanol sur Sauvignon peut s'expliquer par le fait que la concentration en azote dans le Sauvignon est plus élevée (Carrau et al., 2008; Mouret et al., 2014). De plus, il a été montré que la production d'alcools supérieurs par la voie d'Ehrlich augmentait avec la disponibilité en azote assimilable jusqu'à environ 200 mg/L, puis diminuait (Mouret et al., 2014), ce qui peut expliquer la plus forte production de ces composés avec le Colombard. La production plus importante d'esters d'acétate observée sur Sauvignon est en accord avec les effets positifs de la teneur en azote sur la formation de ces molécules rapportés par Rollero et al. (2014) lors de fermentations de *S. cerevisiae*. Pour les acides issus de la voie Ehrlich et les esters d'éthyle correspondants, nous avons identifié un effet négatif de l'azote et un effet positif des lipides (Chapitre 3-II). En fermentation en moût naturel, c'est l'effet négatif de l'azote qui semble prendre le dessus, avec une plus faible production de ces composés sur Sauvignon. Enfin, pour les acides gras et leur esters d'éthyle correspondant, la plus forte production sur Sauvignon (forte teneur en azote) traduit bien la réponse positive de la formation de ces molécules à l'augmentation de la teneur en azote.

L'effet de la modalité d'inoculation est beaucoup plus spécifique à chaque composé. Par exemple, on note une forte production d'acide isobutyrique en inoculation séquentielle avec

*T. delbrueckii* par rapport aux autres modalités (18,4 mg/L sur Colombard, contre 2,5 mg/L avec *S. cerevisiae* en culture pure). La forte production d'acide isobutyrique par *T. delbrueckii* a déjà été rapportée sur milieu synthétique (Chapitres 2 et 3-III, Renault et al., (2015)) et se confirme en moût naturel. A l'inverse, la production d'isoamyl acetate dans ces conditions est plus faible en fermentation séquentielle *T. delbrueckii* / *S. cerevisiae* (0,1 mg/L sur moût Colombard) qu'en culture pure de *S. cerevisiae* (1,1 mg/L). Des données contradictoires concernant l'incidence d'une pré-inoculation avec *T. delbrueckii* sur la production d'isoamyl acétate en fermentation sont rapportées dans la littérature, qui mentionnent une diminution de la production de ce composé (Azzolini et al., 2015) ou à l'inverse une augmentation de sa formation (Renault et al., 2015). Ces différences peuvent être attribuées à un effet souche ou à des différences de mise en œuvre de la fermentation, notamment sur le timing d'inoculation de *S. cerevisiae*. Une inoculation précoce de la fermentation avec *M. pulcherrima*, conduit à une augmentation de la production d'isobutanol, accompagnée d'une augmentation de la production d'isobutyl acetate. Sur Colombard, la production d'isobutanol avec *M. pulcherrima* est de 105 mg/L contre 26 mg/L avec *S. cerevisiae* en culture pure. Cette forte production d'isobutanol est en accord avec ce que nous avons observé avec *M. pulcherrima* en culture pure (Chapitre 2) et en inoculation séquentielle sur moût synthétique (Chapitre 3-II).

Toutefois, un effet global du mode d'inoculation sur l'ensemble des acides gras à chaîne linéaire étudiés et de leurs dérivés ethyl esters a été mis en évidence. Par rapport à des fermentations par une souche pure de *S. cerevisiae*, des diminutions de la formation de ces composés de 72% et de 42% en moyenne sont respectivement obtenues lors d'une inoculation séquentielle avec *T. delbrueckii* ou *M. pulcherrima*. Ces observations rejoignent celles faites sur moût synthétique (Chapitre 3-II et III) et sur moût naturel (Comitini et al., 2011a; Hranilovic et al., 2018; Sadoudi et al., 2012). La faible production de ces composés pourrait être un indicateur d'une carence en acetyl-coA pour ces levures, comme discuté dans les Chapitres 1-II et 3-II.



Figure 8: Concentrations en arômes fermentaires en fin de fermentation pour les modalités sans ajout d'azote sur Colombard (A) et Sauvignon (B). Bleu : Inoculation séquentielle de *M. pulcherrima* et *S. cerevisiae*; Vert : inoculation séquentielle de *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae*; Orange : culture pure de *S. cerevisiae*. A,b,c, représentent un effet significatif du mode d'inoculation (p<0.05).

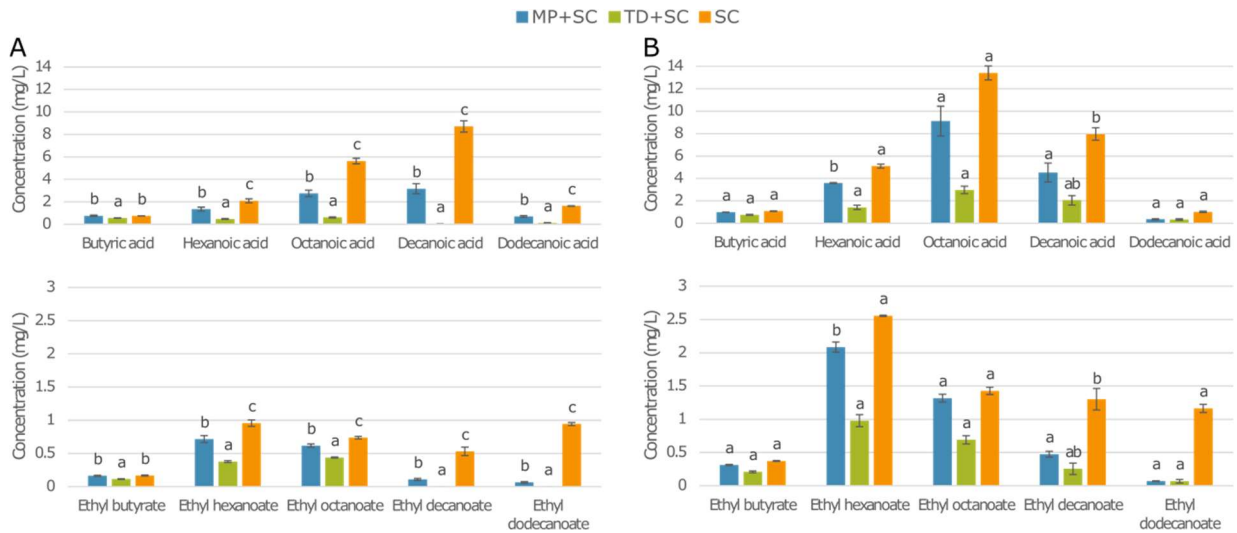


Figure 9: Concentrations en acides et esters d'éthyle du métabolisme des acides gras en fin de fermentation pour les modalités sans ajout d'azote sur Colombard (A) et Sauvignon (B). Bleu : Inoculation séquentielle de *M. pulcherrima* et *S. cerevisiae*; Vert : inoculation séquentielle de *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae*; Orange : culture pure de *S. cerevisiae*. A,b,c, représentent un effet significatif du mode d'inoculation ( $p < 0.05$ ).

### 3.3.2. Arômes variétaux (hors thiols)

La production de certains arômes variétaux dont les dérivés terpéniques, les lactones, le benzaldéhyde et l'alcool benzylique ont été dosés par GC-MS (Tableau 2). Une analyse ANOVA du jeu de données a montré que le moût et la modalité d'inoculation avaient un effet significatif ( $p < 0,05$ ) sur la production de ces arômes, au contraire de l'ajout d'azote au moment de l'inoculation. L'effet de la modalité d'inoculation pour chaque moût est représenté dans le Tableau 2.

Tableau 2: Concentrations (en µg/L) en arômes variétaux (hors thiols) en fin de fermentation pour les modalités sans ajout d'azote. TD : *T. delbrueckii* ; MP : *M. pulcherrima* ; SC : *S. cerevisiae* ; T0 : moût de départ. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne±carte-type. A,b,c, représentent un effet significatif du mode d'inoculation (p<0.05). Les valeurs grisées sont inférieures à la limite de quantification. nd : non détecté.

	Colombard				Sauvignon			
	T0	MP+SC	TD+SC	SC	T0	MP+SC	TD+SC	SC
Benzaldehyde	4.71	12.57 ± 0.37 <sup>ab</sup>	10.8 ± 0.53 <sup>a</sup>	14.99 ± 1.76 <sup>b</sup>	39.4	10.95 ± 0.57 <sup>b</sup>	9.42 ± 0.38 <sup>a</sup>	9.67 ± 0.42 <sup>a</sup>
Benzyl Alcohol	nd	19.44 ± 1.94 <sup>b</sup>	18.87 ± 0.59 <sup>b</sup>	10.66 ± 1.19 <sup>a</sup>	nd	114.86 ± 13.44 <sup>c</sup>	84.28 ± 4.58 <sup>b</sup>	39.91 ± 1.77 <sup>a</sup>
4-vinyl guaiacol	nd	62.09 ± 5.54 <sup>b</sup>	nd <sup>a</sup>	66.42 ± 7.45 <sup>b</sup>	nd	52.08 ± 10.53 <sup>b</sup>	20.78 ± 11.38 <sup>a</sup>	102.81 ± 12.9 <sup>c</sup>
Alpha-terpineol	1.21	2.53 ± 0.38 <sup>a</sup>	3.23 ± 0.07 <sup>b</sup>	2.45 ± 0.05 <sup>a</sup>	nd	nd <sup>a</sup>	1.61 ± 0.26 <sup>b</sup>	nd <sup>a</sup>
Citronellol	nd	8.1 ± 0.19 <sup>c</sup>	6.58 ± 0.23 <sup>a</sup>	7.06 ± 0.15 <sup>b</sup>	5.41	5.47 ± 0.15 <sup>a</sup>	6.69 ± 0.29 <sup>b</sup>	5.91 ± 0.22 <sup>a</sup>
Geraniol	nd	7.32 ± 0.11 <sup>b</sup>	8.47 ± 1.09 <sup>b</sup>	2.55 ± 0.28 <sup>a</sup>	nd	8.99 ± 0.45 <sup>b</sup>	12.92 ± 1.68 <sup>b</sup>	3.64 ± 0.14 <sup>a</sup>
Linalol	nd	8.14 ± 0.57 <sup>b</sup>	10.53 ± 0.49 <sup>c</sup>	4.34 ± 0.2 <sup>a</sup>	nd	2.43 ± 0.3 <sup>b</sup>	2.77 ± 0.29 <sup>b</sup>	0.3 ± 0.22 <sup>a</sup>
Nerol	nd	nd <sup>a</sup>	6.95 ± 1.97 <sup>b</sup>	7.65 ± 2.17 <sup>b</sup>	nd	nd <sup>a</sup>	6.42 ± 0.17 <sup>c</sup>	5.82 ± 0.13 <sup>b</sup>
B-ionone	nd	26.9 ± 2.06 <sup>c</sup>	4.97 ± 1.01 <sup>b</sup>	nd <sup>a</sup>	nd	4.84 ± 0.86 <sup>b</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>
delta-octalactone	nd	1.09 ± 0.17 <sup>a</sup>	2.78 ± 0.15 <sup>b</sup>	2.55 ± 0.22 <sup>b</sup>	nd	2.77 ± 0.17 <sup>a</sup>	3.2 ± 0.19 <sup>a</sup>	4.58 ± 1.91 <sup>a</sup>
delta-nonalactone	nd	35.92 ± 12.02 <sup>a</sup>	3.4 ± 0.19 <sup>a</sup>	4.07 ± 0.14 <sup>a</sup>	nd	15.65 ± nd <sup>a</sup>	24.09 ± 1.38 <sup>a</sup>	108.73 ± 5.58 <sup>b</sup>
gamma-nonalactone	nd	5.49 ± 0.16 <sup>b</sup>	4.88 ± 0.06 <sup>a</sup>	5.31 ± 0.29 <sup>ab</sup>	nd	4 ± 0.11 <sup>a</sup>	3.1 ± 0.12 <sup>a</sup>	4.01 ± 1.12 <sup>a</sup>
delta-decalactone	nd	3.5 ± 1.09 <sup>a</sup>	7.31 ± 0.13 <sup>b</sup>	6.76 ± 1.39 <sup>b</sup>	nd	8.79 ± 0.81 <sup>a</sup>	6.95 ± 0.15 <sup>a</sup>	13.53 ± 1.19 <sup>b</sup>
gamma-decalactone	nd	4.53 ± 0.23 <sup>b</sup>	5.45 ± 0.05 <sup>c</sup>	3.71 ± 0.06 <sup>a</sup>	nd	2.71 ± 0.12 <sup>a</sup>	2.82 ± 0.05 <sup>a</sup>	2.95 ± 0.17 <sup>a</sup>

L'utilisation de *T. delbrueckii* en inoculation séquentielle entraîne une augmentation marquée de la formation de composés terpéniques par rapport à *S. cerevisiae* en culture pure, principalement sous la forme de géraniol sur Sauvignon et de linalol sur Colombard, en accord avec les données de la littérature : des niveaux de production compris entre 4,4 et 4,6 µg/L de géraniol et 3,6 et 10,5 µg/L de linalol ont été détectés sur des moûts de Soave et de Chardonnay (Azzolini et al., 2015). Des concentrations plus élevées (74,8 µg/L de géraniol et 44,5 µg/L de linalol) ont été dosées dans des vins produits en fermentation mixte *T. delbrueckii* / *S. cerevisiae* sur Sauvignon (Sadoudi et al., 2012). Les concentrations en terpènes obtenues avec *M. pulcherrima* sont faibles, à l'exception de la β-ionone, qui est produite à des concentrations quantifiables uniquement avec cette modalité. Les productions élevées de composés terpéniques obtenues en fermentation séquentielles impliquant des levures non-*Saccharomyces* doivent être mises en relation avec les fortes activités glycosidases de ces espèces, dont *M. pulcherrima* et *T. delbrueckii* (Charoenchai et al., 1997; Hu et al., 2016; Ruiz et al., 2018). De plus, ces composés et particulièrement les monoterpénols sont des molécules très réactives pouvant subir des transformations chimiques (comme la transformation du géraniol en linalol et nerol) mais également être transformées par les levures. Des études ont notamment montré que *S. cerevisiae* a la capacité de transformer le géraniol en citronellole (Gamero et al., 2011; King and Dickinson, 2003; Steyer et al., 2013). La limitation de ce phénomène en inoculation séquentielle pourrait par exemple expliquer les concentrations plus importantes en géraniol obtenues lors de ces fermentations.

L'utilisation de levures non-*Saccharomyces* modifie également le profil des dérivés benzéniques. Avec *S. cerevisiae* en culture pure, on obtient des concentrations modérées de benzaldéhyde sur Colombard et de benzyl alcool sur Sauvignon. Cette différence montre un effet du moût sur l'équilibre des deux formes. En inoculation séquentielle avec *T. delbrueckii*, on retrouve majoritairement la forme alcool, avec des concentrations significativement supérieures à celles obtenues avec *S. cerevisiae* (Azzolini et al., 2015, 2012). La forme alcool est également la plus abondante dans les vins produits par fermentation séquentielle *M. pulcherrima* / *S. cerevisiae*, avec une concentration finale presque 3 fois supérieure à celle obtenue avec *S. cerevisiae* sur Sauvignon.

L'utilisation de *M. pulcherrima* permet également d'obtenir une concentration plus élevée de  $\delta$ -nonalactone sur Colombar. A l'inverse, la production de  $\delta$ -nonalactone est plus élevée avec *S. cerevisiae* en culture pure sur Sauvignon.

Enfin, nous avons montré que la concentration de 4-vinyl guaiacol diminue pour les modalités en inoculation séquentielle comparée à *S. cerevisiae* en culture pure. Sur Sauvignon la concentration de ce composé diminue d'un facteur 2 avec *M. pulcherrima* et d'un facteur 5 avec *T. delbrueckii*. Sur Colombar, la concentration obtenue avec *M. pulcherrima* n'est pas significativement différente de celle obtenue en culture pure. En revanche, aucune production n'est détectée lorsqu'une pré-inoculation avec *T. delbrueckii* est réalisée. Ces observations présentent un intérêt technologique, car le 4-vinyl guaiacol est un composé négatif sur l'arôme des vins (Swiegers et al., 2005).

### 3.3.3. Précurseurs de thiols

La concentration en précurseurs de thiols a été mesurée dans les moûts, avant l'inoculation de *S. cerevisiae* et en fin de fermentation pour les différentes modalités (Figure 10 et Figure 11).

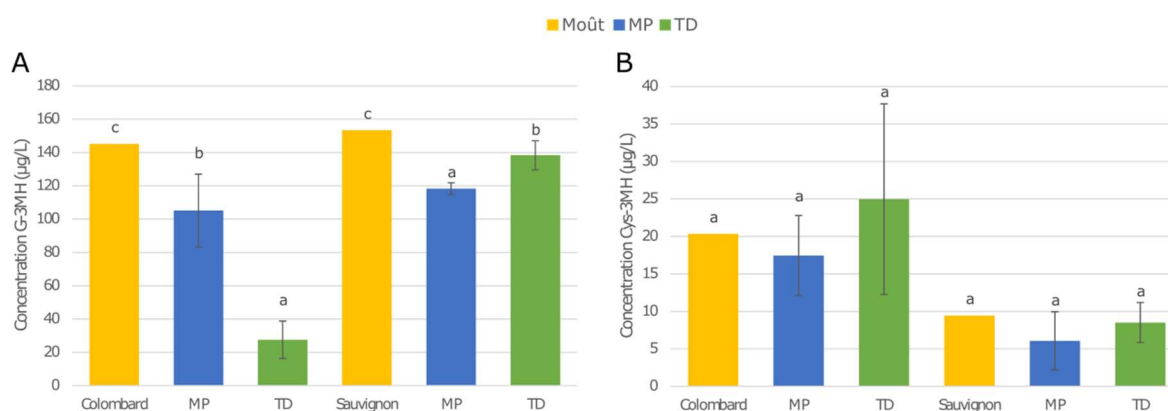


Figure 10: Concentrations en G-3MH (A) et cys-3MH (B) mesurées dans les moûts (en jaune) et avant inoculation de *S. cerevisiae*. Bleu : *M. pulcherrima*; vert : *T. delbrueckii*. A,b,c, représentent un effet significatif du mode d'inoculation ( $p < 0.05$ ).

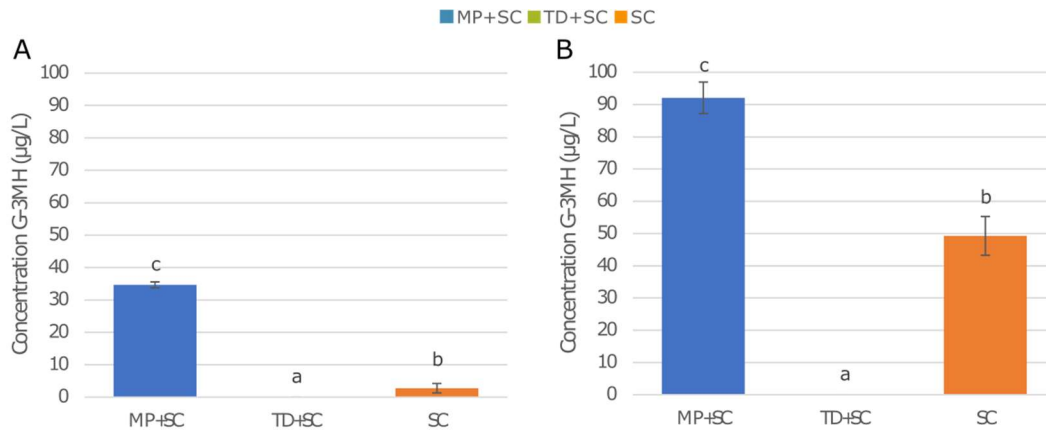


Figure 11: Concentrations en G-3MH mesurées à 90% d'avancement de la fermentation sur Colombar (A) et Sauvignon (B). Bleu : Inoculation séquentielle de *M. pulcherrima* et *S. cerevisiae*; Vert : inoculation séquentielle de *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae*; Orange : culture pure de *S. cerevisiae*. A,b,c, représentent un effet significatif du mode d'inoculation ( $p < 0.05$ ).

L'ajout du produit azoté n'ayant pas eu d'effet significatif sur les concentrations mesurées, seuls les résultats obtenus sans ajout d'azote sont présentés. Les résultats obtenus avant l'inoculation de *S. cerevisiae* montrent que les non-*Saccharomyces* ont consommé du G-3MH, mais pas de cys-3MH. De façon intéressante, la consommation de G-3MH par *T. delbrueckii* est plus importante que celle de *M. pulcherrima* sur Colombar, alors qu'à l'inverse, sur Sauvignon, les niveaux de consommation de G-3MH sont moins élevés et cette molécule est davantage consommée par *M. pulcherrima*. Cela souligne l'importance des interactions entre les souches et le milieu sur un grand nombre de traits phénotypique. A 90% d'avancement, la consommation de cys-3MH est complète quelles que soient les conditions de fermentation, alors que seules les fermentations en inoculation séquentielle avec *T. delbrueckii* conduisent à un épuisement du G-3MH. La concentration en G-3MH résiduelle mesurée lors de cultures pures de *S. cerevisiae* sur Colombar est très faible, mais atteint 49 µg/L sur Sauvignon. De même la concentration en G-3MH restant après fermentation avec *M. pulcherrima* est plus élevée sur Sauvignon, avec 92 µg/L contre 35 µg/L sur Colombar.

Aucune conversion du G-3MH en cys-3MH n'a pu être mise en évidence, contrairement à ce qui a pu être observé lors de fermentations séquentielles avec *T. delbrueckii* en moût naturel (Renault et al., 2016). Il est tout de même possible que la cys-3MH qui serait ainsi formée soit immédiatement transformée, ou que le G-3MH soit dégradé en d'autres précurseurs intermédiaires (Bonnaffoux et al., 2018).



Le dosage des thiols est en cours sur ces fermentations. Sans les valeurs de libération de thiols associées à ces consommations de précurseurs, il est difficile de conclure sur le devenir des précurseurs consommés, ainsi que de comparer avec de précédentes études. Néanmoins, on peut tout de même remarquer que les levures non-*Saccharomyces* modulent la consommation de précurseurs et donc potentiellement la libération de thiols.

## 4. Discussion

L'utilisation de levures non-*Saccharomyces* se développe de plus en plus en vinification pour la diversification des profils aromatiques des vins. Certaines de ces souches sont disponibles sous forme de levures sèches actives (LSA), ce qui facilite leur utilisation. Néanmoins, l'intérêt pour ces levures étant récent, de nombreuses inconnues demeurent sur les origines de leurs propriétés particulières. De plus, la majorité des études sont menées en moût synthétique qui, même avec des caractéristiques proches du moût naturel, ne possède pas tous les composés trouvés naturellement. C'est pourquoi il est intéressant de tester les hypothèses formulées sur moût synthétique en moût naturel.

Les résultats obtenus montrent une interaction entre le développement des souches non-*Saccharomyces* en première partie de fermentation et l'implantation de *S. cerevisiae* en deuxième partie de fermentation. En effet, une croissance substantielle des levures non-*Saccharomyces* conduit à une consommation d'azote plus importante, diminuant ainsi la disponibilité de ce nutriment pour *S. cerevisiae*. De plus, d'autres nutriments qui ne sont pas dosés ici comme les vitamines doivent également être consommés par les levures non-*Saccharomyces*, entraînant de possibles carences pour *S. cerevisiae*. Ainsi, les résultats montrent que l'implantation et l'activité fermentaire de *S. cerevisiae* fut plus faible sur Colombard, où les non-*Saccharomyces* ont eu une plus forte activité que sur Sauvignon où leur développement fut faible. Cela a également un impact sur le profil aromatique en fin de fermentation. Par exemple, la production de phényléthanol, que les levures non-*Saccharomyces* produisent, n'a pas été impactée en fermentation sur Sauvignon (où les levures non-*Saccharomyces* se sont peu développées) alors que la différence est bien marquée sur Colombard, avec une production significativement plus importante en inoculation séquentielle qu'en culture pure. Ces phénomènes d'interaction liés à la consommation de nutriments ont été décrits avec plusieurs non-*Saccharomyces* en culture

mixte (Medina et al., 2012; Rollero et al., 2018; Taillandier et al., 2014). Un autre mécanisme d'interaction pouvant impacter la croissance est la production de composés toxiques par *T. delbrueckii*. Des études ont par exemple montré que la production d'acides gras a un effet négatif sur la croissance de *S. cerevisiae*, ainsi que la production de toxines à effet killer (Magliani et al., 1997; Viegas et al., 1989).

Ces expérimentations n'ont pas montré d'effet significatif de l'ajout d'azote sur le déroulement de la fermentation ou les caractéristiques principales du produit final. Cela est sûrement dû au fait que la dose d'azote disponible en début de fermentation était suffisamment élevée, supérieure à 150 mg/L, et que la quantité ajoutée était faible (environ 20 mg/L d'azote assimilable). Il est tout de même surprenant que l'ajout d'azote au moment de l'inoculation de *S. cerevisiae* après *T. delbrueckii* sur Colombard n'ait pas permis une implantation plus forte de *S. cerevisiae*. Il est possible que l'azote ajouté soit préférentiellement consommé par *T. delbrueckii* qui présente une grande activité fermentaire et de croissance au moment de l'inoculation de *S. cerevisiae*, qui doit s'adapter aux conditions du milieu avant de débiter sa croissance. Ainsi, il serait peut-être intéressant d'ajouter l'azote plus tardivement après l'inoculation de *S. cerevisiae*, ou d'attendre que *T. delbrueckii* soit en phase stationnaire pour inoculer *S. cerevisiae* et faire un ajout d'azote.

La teneur en SO<sub>2</sub> dans les moûts apparaît comme un paramètre très important lors de l'usage de levures non-*Saccharomyces*. En effet, les souches utilisées dans cette étude semblent très sensibles au SO<sub>2</sub>, leur activité fermentaire en culture pure ayant été très faible sur Sauvignon. Néanmoins, l'usage de SO<sub>2</sub> a permis de ralentir la croissance de *T. delbrueckii* permettant ainsi à *S. cerevisiae* de s'implanter plus facilement. Une bonne gestion du SO<sub>2</sub> est donc nécessaire pour permettre le développement des levures non-*Saccharomyces*, mais pourrait aussi être un outil pour limiter leur croissance si celle-ci est trop prononcée au point d'empêcher l'implantation de *S. cerevisiae*. En effet, une implantation limitée de *S. cerevisiae* pourrait entraîner une fermentation incomplète. Enfin, l'exemple du Sauvignon montre que fixer le moment de l'inoculation de *S. cerevisiae* en fonction du temps n'est pas toujours pertinent. En effet dans ce cas, *T. delbrueckii* ne s'était que très peu développée au moment de l'ajout de *S. cerevisiae*. Une inoculation en fonction de l'avancement de la fermentation aurait été plus adapté.

L'utilisation de levures non-*Saccharomyces* en inoculation séquentielle a montré un intérêt au niveau organoleptique. *M. pulcherrima* en inoculation séquentielle a permis d'obtenir des concentrations en isoamyl acetate 30% plus élevées que *S. cerevisiae* sur Sauvignon, ainsi que la libération de lactones et  $\beta$ -ionone. Une réduction de la production d'acides (à l'exception de l'acide isobutyrique) d'un facteur 2 à 5 a été observée avec *T. delbrueckii*, ainsi qu'une production de phénylethanol 50% plus élevée que *S. cerevisiae* et des concentrations finales en géraniol et linalol 2 à 4 fois supérieures à celles obtenues en culture pure. De plus, une inoculation précoce par *M. pulcherrima* ou *T. delbrueckii* entraîne une diminution de la production de 4-vinyl guaiacol et conduit à une libération plus importante de composés terpéniques, en lien avec leurs fortes activités glycosidase (Charoenchai et al., 1997; Hu et al., 2016; Ruiz et al., 2018). La modification des niveaux de production des arômes fermentaires en inoculation séquentielle peut être le résultat de l'addition des productions des deux souches utilisées ou d'interaction entre les levures comme pour certains nutriments, pouvant provoquer des modifications de l'expression des gènes des espèces mises en contact (Alonso-del-Real et al., 2019; Medina et al., 2012; Rollero et al., 2018; Tronchoni et al., 2017). L'intensité de ces effets varie également entre les deux moûts testés. Cela montre l'importance de la composition du moût sur la production des arômes fermentaires et la libération des arômes variétaux. Néanmoins, la mesure de certains arômes ne peut pas rendre compte du profil aromatique global d'un vin. La dégustation par un jury de vin produits dans ces conditions serait la manière la plus fiable de juger de l'effet réel de l'utilisation de ces souches non-*Saccharomyces* pour les consommateurs.

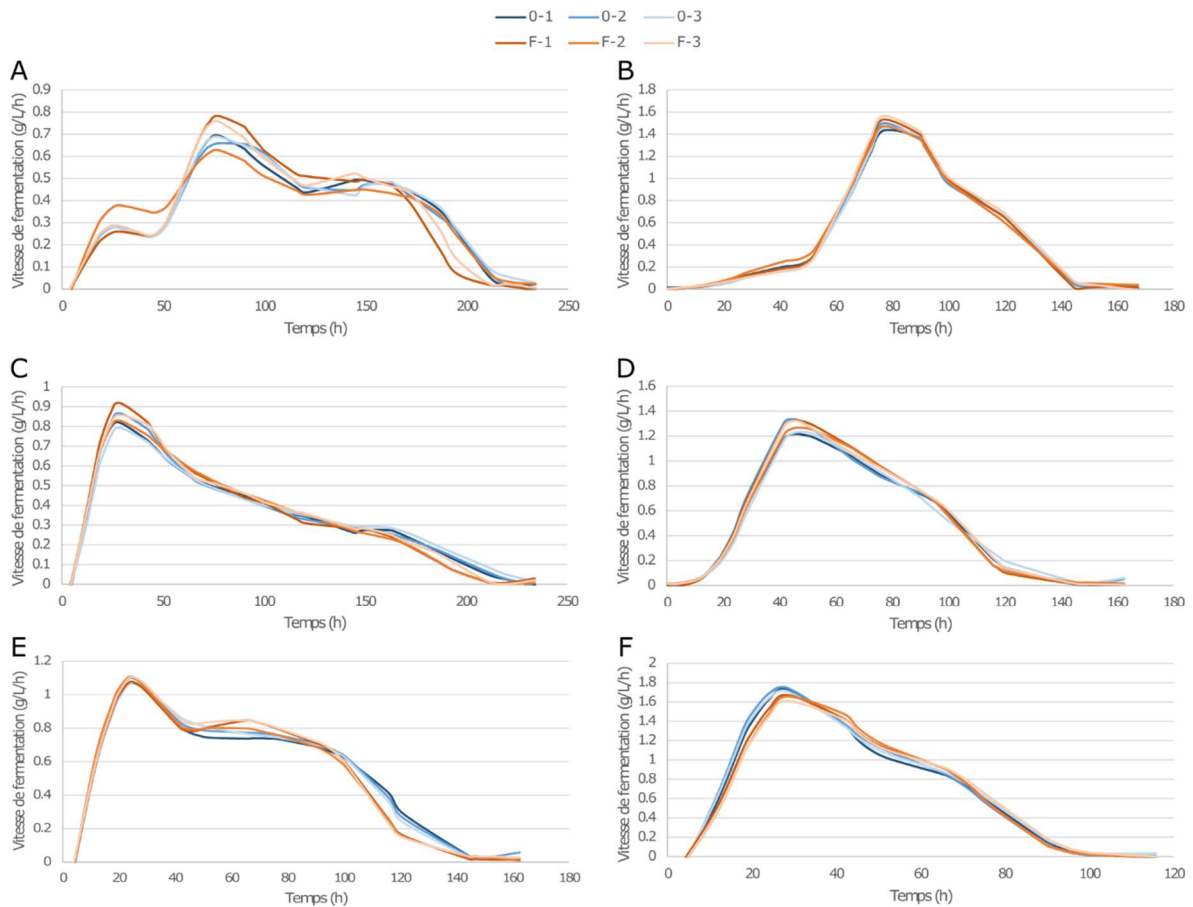
## 5. Conclusion

L'utilisation de levures non-*Saccharomyces* associées à *S. cerevisiae* en inoculation séquentielle sur deux moûts naturels a montré des différences significatives sur la composition des vins. L'utilisation de ces souches permet donc une modulation du profil aromatique des vins. Néanmoins, une bonne gestion du procédé est nécessaire. Tout d'abord, l'utilisation de SO<sub>2</sub> doit être particulièrement maîtrisé lors de l'utilisation de *M. pulcherrima* et *T. delbrueckii*. A forte dose, le SO<sub>2</sub> empêche en effet le développement de ces levures et limite donc leur impact sur la fermentation. De plus, les caractéristiques du moût influent sur la production des arômes fermentaires. Le cépage a également une incidence sur la libération des arômes variétaux. En revanche, l'ajout d'azote réalisé au moment de l'inoculation de *S.*

*cerevisiae* n'a pas donné de résultats significatif avec la dose utilisée. Enfin, une réflexion est nécessaire sur les modalités d'inoculation, en particulier sur le moment d'ajout de *S. cerevisiae* pour garantir son implantation.

## 6. Annexes

Annexe 1: Cinétiques fermentaires de *M. pulcherima* en fermentation séquentielle sur Colombar (A) et Sauvignon (B), *T. delbrueckii* en fermentation séquentielle sur Colombar (C) et Sauvignon (D) et *S. cerevisiae* en culture pure sur Colombar (E) et Sauvignon (F). Bleu : sans ajout d'azote (0), orange : avec ajout d'azote (F). 1,2,3 : réplicats.



Annexe 2: Résultats de l'ANOVA (p-value) pour les rendements de production des métabolites carbonés et la concentration des arômes fermentaires à 90% d'avancement de la fermentation.

	Souche	Moût	Ajout azote
Yglycérol	4.64E-15	7.66E-15	0.22
Yacétate	1.10E-07	1.42E-11	0.79
Yéthanol	3.78E-04	1.64E-04	0.37
Propanol	3.71E-04	1.45E-15	0.32
Isobutanol	6.47E-16	9.96E-14	0.60
Isoamyl alcool	1.47E-03	3.11E-10	0.10
Phenylethanol	4.37E-10	< 2.2e-16	0.32
Isobutyl acetate	<2E-16	<2e-16	0.17
Isoamyl acetate	3.42E-16	< 2.2e-16	0.62
Phenylethyl acetate	<2E-16	<2E-16	0.16
Ethyl isobutyrate	< 2E-16	< 2E-16	0.04
Ethyl hexanoate	< 2E-16	< 2E-16	0.55
Ethyl octanoate	9.38E-14	7.23E-16	0.27
Ethyl decanoate	< 2.2E-16	1.02E-14	0.54
Acide isobutyrate	< 2E-16	< 2E-16	0.02
Acide hexanoique	< 2E-16	< 2E-16	0.29
Acide octanoate	3.67E-15	6.30E-14	0.77
Acide decanoate	5.40E-16	4.06E-02	0.09

Annexe 3: Résultats de l'ANOVA (p-value) pour les concentrations en précurseurs de thiols avant l'inoculation de *S. cerevisiae* (avant SC), la concentration en G3MH à 90% d'avancement (90%) et les concentrations en arômes variétaux hors thiols à 90% d'avancement de la fermentation. NA : non applicable.

	Souche	Moût	Ajout azote
G3MH (avant SC)	< 2E-16	< 2E-16	NA
Cys-3MH (avant SC)	3.73E-01	6.06E-04	NA
G3MH (90%)	< 2E-16	< 2E-16	0.45
Benzaldehyde	2.88E-06	3.40E-11	0.36
Benzyl Alcohol	< 2E-16	< 2E-16	0.59
4-vinyl guaiacol	2.32E-14	1.87E-05	0.00
Alpha-terpineol	2.10E-07	5.06E-16	0.49
Citronellol	0.8236	1.04E-07	0.30
Geraniol	4.90E-10	2.55E-03	0.33
Linalol	6.49E-15	< 2E-16	0.71
Nerol	3.67E-09	6.25E-01	0.07
B-ionone	< 2E-16	8.05E-15	0.40
delta-octalactone	6.24E-05	8.13E-06	0.72
delta-nonolactone	1.08E-07	6.17E-06	0.67
gamma-nonolactone	5.29E-04	1.33E-10	0.93
delta-decalactone	8.00E-07	5.72E-10	0.18
gamma-decalactone	5.56E-13	< 2E-16	0.50

Annexe 4: Paramètres décrivant la cinétique fermentaire. RmaxNS : vitesse fermentaire maximale de la levure non-*Saccharomyces* ; RmaxSC : vitesse fermentaire maximale de *S. cerevisiae* ; LagTime : durée de la phase de latence ; TimeAtRmaxNS : durée pour atteindre la vitesse fermentaire maximale de la levure non-*Saccharomyces*. Length : durée de la fermentation. En bleu : conditions en Colombard ; orange : conditions en Sauvignon. MP+SC : inoculation séquentielle de *M. pulcherrima* et *S. cerevisiae* ; TD+SC : inoculation séquentielle de *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae* ; SC : *S. cerevisiae* en culture pure. F : avec ajout d'azote ; 0 : sans ajout. NA : non applicable.

	RmaxNS		TimeAtRmaxNS		RmaxSC		TimeAtRmaxSC		Phase de latence		Durée de fermentation	
MP+SC-S-0	0.21	± 0.02	48	± 0	1.57	± 0.03	81	± 1	26	± 1	145	± 0
MP+SC-S-F	0.23	± 0.05	48	± 0	1.62	± 0.06	80	± 0	25	± 2	145	± 1
TD+SC-S-0	0.16	± 0.03	24	± 0	1.23	± 0.06	47	± 4	16	± 2	137	± 14
TD+SC-S-F	0.16	± 0.02	24	± 0	1.27	± 0.03	47	± 2	16	± 2	127	± 15
SC-S-0	NA		NA		1.73	± 0.02	29	± 1	14	± 1	90	± 0
SC-S-F	NA		NA		1.68	± 0.03	32	± 1	16	± 0	90	± 0
MP+SC-C-0	0.27	± 0.01	29	± 1	0.70	± 0.02	75	± 1	11	± 0	214	± 5
MP+SC-C-F	0.31	± 0.06	31	± 2	0.74	± 0.09	76	± 2	12	± 1	197	± 12
TD+SC-C-0	1.21	± 0.05	24	± 0	1.28	± 0.06	24	± 0	17	± 0	211	± 0
TD+SC-C-F	1.28	± 0.02	24	± 0	1.35	± 0.24	24	± 0	17	± 0	195	± 0
SC-C-0	NA		NA		1.08	± 0.02	25	± 0	11	± 0	145	± 0
SC-C-F	NA		NA		1.10	± 0.02	25	± 1	11	± 0	137	± 14



Annexe 5: Rendements en glycérol, acétate et éthanol (en g/g<sub>sucre consommé</sub>) par rapport au sucre consommé à 90% d'avancement de la fermentation. MP+SC : fermentation séquentielle avec *M. pulcherrima* et *S. cerevisiae* ; TD+SC : fermentation séquentielle avec *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae* ; SC : *S. cerevisiae* en culture pure. 0 : sans ajout d'azote ; F : avec ajout d'azote.

	Colombard						Sauvignon					
	Yglycérol		Yacétate		Yéthanol		Yglycérol		Yacétate		Yéthanol	
MP+SC-0	5.31E-02	± 5.31E-02	9.24E-04	± 4.55E-05	4.82E-01	± 2.40E-02	4.3E-02	± 2.5E-04	5.0E-04	± 4.4E-05	4.8E-01	± 2.1E-03
TD+SC-0	5.12E-02	± 5.12E-02	6.61E-04	± 1.88E-04	4.97E-01	± 9.54E-04	3.8E-02	± 4.6E-04	3.8E-04	± 1.5E-05	4.8E-01	± 9.5E-03
SC-0	3.89E-02	± 3.89E-02	1.79E-03	± 4.85E-05	5.17E-01	± 1.35E-03	3.3E-02	± 1.7E-04	3.8E-04	± 1.7E-05	4.9E-01	± 6.6E-04
MP+SC-F	5.28E-02	± 5.28E-02	6.41E-04	± 2.43E-04	4.92E-01	± 4.13E-03	4.4E-02	± 2.0E-03	3.8E-04	± 3.3E-04	4.8E-01	± 3.0E-03
TD+SC-F	5.03E-02	± 5.03E-02	9.56E-04	± 2.11E-04	4.89E-01	± 1.22E-02	3.6E-02	± 2.2E-03	3.5E-04	± 1.5E-05	4.6E-01	± 2.8E-02
SC-F	3.80E-02	± 3.80E-02	1.55E-03	± 2.77E-04	5.16E-01	± 1.42E-03	3.3E-02	± 4.1E-04	2.7E-04	± 2.4E-04	4.9E-01	± 1.5E-03

Annexe 6: Concentrations en arômes fermentaires (en mg/L) à 90% d'avancement en fermentation séquentielle avec *M. pulcherrima* et *S. cerevisiae*. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne  $\pm$  écart-type.

	Colombard				Sauvignon			
	Sans ajout		Avec ajout d'azote		Sans ajout		Avec ajout d'azote	
Propanol	14.23	$\pm$ 1.11	12.22	$\pm$ 3.61	35.76	$\pm$ 3.62	40.63	$\pm$ 0.65
Isobutyl alcohol	104.67	$\pm$ 4.82	114.24	$\pm$ 6.00	56.44	$\pm$ 6.38	64.50	$\pm$ 7.84
Isoamyl alcohol	62.49	$\pm$ 3.06	58.18	$\pm$ 5.73	38.11	$\pm$ 4.21	40.79	$\pm$ 1.20
Phenylethyl alcohol	89.25	$\pm$ 4.30	88.16	$\pm$ 5.97	34.55	$\pm$ 3.16	39.52	$\pm$ 5.27
Isobutyl acetate	0.29	$\pm$ 0.01	0.31	$\pm$ 0.06	1.11	$\pm$ 0.06	1.16	$\pm$ 0.08
Isoamyl acetate	1.42	$\pm$ 0.09	1.18	$\pm$ 0.79	8.15	$\pm$ 0.37	8.50	$\pm$ 0.32
Phenylethyl acetate	0.35	$\pm$ 0.03	0.26	$\pm$ 0.16	2.03	$\pm$ 0.13	2.19	$\pm$ 0.01
Ethyl isobutyrate	0.06	$\pm$ 0.00	0.07	$\pm$ 0.00	0.06	$\pm$ 0.00	0.06	$\pm$ 0.00
Ethyl hexanoate	0.72	$\pm$ 0.05	0.61	$\pm$ 0.20	2.09	$\pm$ 0.08	2.01	$\pm$ 0.16
Ethyl octanoate	0.62	$\pm$ 0.02	0.59	$\pm$ 0.09	1.32	$\pm$ 0.06	1.15	$\pm$ 0.05
Ethyl decanoate	0.11	$\pm$ 0.02	0.08	$\pm$ 0.05	0.47	$\pm$ 0.04	0.46	$\pm$ 0.03
Isobutyric acid	1.44	$\pm$ 0.13	1.48	$\pm$ 0.02	1.16	$\pm$ 0.03	1.20	$\pm$ 0.05
Hexanoic acid	1.35	$\pm$ 0.17	1.24	$\pm$ 0.27	3.60	$\pm$ 0.04	3.47	$\pm$ 0.27
Octanoic acid	2.75	$\pm$ 0.29	2.24	$\pm$ 0.93	9.12	$\pm$ 1.33	7.96	$\pm$ 1.52
Decanoic acid	3.16	$\pm$ 0.45	2.42	$\pm$ 1.13	4.53	$\pm$ 0.84	3.98	$\pm$ 0.73

Annexe 7: Concentrations en arômes fermentaires (en mg/L) à 90% d'avancement en fermentation séquentielle avec *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae*. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne  $\pm$  écart-type.

	Colombard						Sauvignon					
	Sans ajout			Avec ajout d'azote			Sans ajout			Avec ajout d'azote		
Propanol	16.28	$\pm$ 1.81		14.74	$\pm$ 0.77		33.37	$\pm$ 3.96		34.98	$\pm$ 4.00	
Isobutyl alcohol	84.11	$\pm$ 7.01		78.68	$\pm$ 4.87		36.47	$\pm$ 5.22		36.74	$\pm$ 4.32	
Isoamyl alcohol	60.21	$\pm$ 6.52		49.64	$\pm$ 4.45		41.09	$\pm$ 5.18		41.25	$\pm$ 4.97	
Phenylethyl alcohol	104.95	$\pm$ 10.35		115.20	$\pm$ 4.41		31.65	$\pm$ 2.91		29.97	$\pm$ 3.43	
Isobutyl acetate	0.05	$\pm$ 0.00		0.05	$\pm$ 0.00		0.15	$\pm$ 0.01		0.16	$\pm$ 0.01	
Isoamyl acetate	0.09	$\pm$ 0.01		0.08	$\pm$ 0.00		3.24	$\pm$ 0.40		3.34	$\pm$ 0.25	
Phenylethyl acetate	0.05	$\pm$ 0.00		0.07	$\pm$ 0.00		0.43	$\pm$ 0.03		0.43	$\pm$ 0.01	
Ethyl isobutyrate	0.19	$\pm$ 0.01		0.18	$\pm$ 0.00		0.07	$\pm$ 0.00		0.07	$\pm$ 0.00	
Ethyl hexanoate	0.38	$\pm$ 0.01		0.41	$\pm$ 0.00		0.98	$\pm$ 0.09		1.03	$\pm$ 0.05	
Ethyl octanoate	0.44	$\pm$ 0.01		0.44	$\pm$ 0.01		0.69	$\pm$ 0.06		0.70	$\pm$ 0.06	
Ethyl decanoate	0.00	$\pm$ 0.00		0.00	$\pm$ 0.00		0.25	$\pm$ 0.09		0.23	$\pm$ 0.02	
Isobutyric acid	18.45	$\pm$ 0.88		17.04	$\pm$ 1.27		4.38	$\pm$ 0.26		4.21	$\pm$ 0.16	
Hexanoic acid	0.47	$\pm$ 0.04		0.45	$\pm$ 0.07		1.42	$\pm$ 0.20		1.42	$\pm$ 0.07	
Octanoic acid	0.60	$\pm$ 0.05		0.59	$\pm$ 0.09		2.98	$\pm$ 0.34		2.78	$\pm$ 0.26	
Decanoic acid	0.04	$\pm$ 0.00		0.03	$\pm$ 0.01		2.05	$\pm$ 0.42		1.66	$\pm$ 0.16	

Annexe 8: Concentrations en arômes fermentaires (en mg/L) à 90% d'avancement en culture pure avec *S. cerevisiae*. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne  $\pm$  écart-type.

	Colombard						Sauvignon					
	Sans ajout			Avec ajout d'azote			Sans ajout			Avec ajout d'azote		
Propanol	14.25	$\pm$ 0.14		15.69	$\pm$ 1.16		29.54	$\pm$ 0.30		28.21	$\pm$ 1.08	
Isobutyl alcohol	25.88	$\pm$ 0.89		26.45	$\pm$ 1.46		27.60	$\pm$ 2.41		25.38	$\pm$ 1.28	
Isoamyl alcohol	64.70	$\pm$ 1.37		62.39	$\pm$ 4.20		49.56	$\pm$ 2.27		46.19	$\pm$ 3.56	
Phenylethyl alcohol	49.95	$\pm$ 1.18		55.46	$\pm$ 7.04		27.09	$\pm$ 1.10		26.08	$\pm$ 1.15	
Isobutyl acetate	0.07	$\pm$ 0.00		0.07	$\pm$ 0.01		0.22	$\pm$ 0.00		0.20	$\pm$ 0.01	
Isoamyl acetate	1.15	$\pm$ 0.13		1.25	$\pm$ 0.18		6.19	$\pm$ 0.09		6.11	$\pm$ 0.24	
Phenylethyl acetate	0.19	$\pm$ 0.01		0.21	$\pm$ 0.02		0.62	$\pm$ 0.02		0.58	$\pm$ 0.04	
Ethyl isobutyrate	0.07	$\pm$ 0.00		0.06	$\pm$ 0.00		0.06	$\pm$ 0.00		0.06	$\pm$ 0.00	
Ethyl hexanoate	0.96	$\pm$ 0.05		0.99	$\pm$ 0.04		2.56	$\pm$ 0.01		2.59	$\pm$ 0.03	
Ethyl octanoate	0.74	$\pm$ 0.02		0.77	$\pm$ 0.06		1.43	$\pm$ 0.05		1.48	$\pm$ 0.13	
Ethyl decanoate	0.53	$\pm$ 0.06		0.57	$\pm$ 0.07		1.30	$\pm$ 0.16		1.31	$\pm$ 0.08	
Isobutyric acid	2.55	$\pm$ 0.05		2.48	$\pm$ 0.22		1.52	$\pm$ 0.02		1.48	$\pm$ 0.07	
Octanoic acid	5.63	$\pm$ 0.25		6.60	$\pm$ 0.63		13.41	$\pm$ 0.62		14.62	$\pm$ 1.18	
Hexanoic acid	2.09	$\pm$ 0.17		2.02	$\pm$ 0.05		5.10	$\pm$ 0.18		5.15	$\pm$ 0.44	
Decanoic acid	8.71	$\pm$ 0.50		11.78	$\pm$ 1.75		7.96	$\pm$ 0.55		9.75	$\pm$ 0.90	

---

CONCLUSION  
GENERALE  
ET PERSPECTIVES

---

Cette étude avait pour objectif d'approfondir nos connaissances sur la physiologie de deux levures non-*Saccharomyces*, *Metschnikowia pulcherrima* Flavia® et *Torulasporea delbrueckii* Biodiva®, qui sont commercialisées sous la forme de levures sèches actives et utilisées dans l'industrie du vin. Il s'est agi en particulier d'évaluer leurs capacités phénotypiques et métaboliques en fermentation alcoolique dans un contexte d'inoculation séquentielle avec *S. cerevisiae*. Ces connaissances sont essentielles pour exploiter au mieux les spécificités et potentialités de ces levures en œnologie, notamment pour moduler et améliorer le profil aromatique des vins, tout en assurant le bon déroulement de la fermentation. Ce projet s'appuie d'une part sur une étude détaillée du métabolisme de ces deux souches de levure, reposant sur un volet analytique important pour déterminer leurs profils métaboliques et enzymatiques et leurs besoins nutritifs en azote ainsi que sur une analyse quantitative de la distribution des flux dans leur réseau métabolique, et d'autre part sur l'étude des conséquences de l'utilisation des non-*Saccharomyces* en inoculation séquentielle sur le déroulement du procédé de fermentation et le profil aromatique des vins en fonction de la disponibilité en nutriments.

Au cours de la première partie de ce travail, afin de caractériser les propriétés métaboliques des deux souches non-*Saccharomyces*, nous avons cherché à mieux comprendre comment ces levures géraient la ressource azotée pendant la fermentation. En effet, la disponibilité et la composition en azote sont des paramètres cruciaux en fermentation alcoolique, à différents titres. Tout d'abord, la teneur en azote a été identifiée comme étant le facteur limitant de la croissance des levures pour une grande majorité des fermentations. Ensuite, le catabolisme des acides aminés peut conduire à la formation d'arômes fermentaires, comme les alcools supérieurs et leurs esters d'acétate. Enfin, chez *S. cerevisiae*, les sources d'azote ont des efficacités variables sur la croissance et l'activité fermentaire. Il est nécessaire de vérifier si les levures non-*Saccharomyces* ont une réponse similaire à *S. cerevisiae* concernant l'azote, en terme de capacités fermentaires et de croissance, ainsi que sur la production d'arômes. Ce travail s'est porté dans un premier temps sur la caractérisation conjointe des capacités de croissance et de fermentation des espèces étudiées sur source seule d'azote. Il a été mené dans le cadre d'une collaboration avec Ying Su, José Manuel Guillamón et Amparo Querol de l'IATA de Valencia, en combinant des outils d'acquisition en ligne pour le suivi de la croissance en microplaque et le suivi de la dynamique fermentaire (robot de fermentation PhenOFerm,

permettant le suivi automatisé de la perte de poids liée à l'avancement de la fermentation). Ces approches complétées par un traitement statistique ont permis d'obtenir des données fiables et précises, condition nécessaire pour comparer les souches et mettre en évidence leurs particularités. Pour chacune des trois espèces, les sources d'azote ont été classées en fonction de leur efficacité à assurer la croissance d'une part, et le déroulement de la fermentation d'autre part. Il a été établi que la grande majorité des sources azotées, à l'exception de la cystéine et l'histidine, permettent la croissance et la fermentation des levures non-*Saccharomyces*, même si les capacités fermentaires de *M. pulcherrima* sont plus faibles que celles de *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae*. En effet, *M. pulcherrima* est négativement affectée par les conditions fermentaires, notamment l'absence d'oxygène et les fortes concentrations en éthanol (Jolly et al., 2013). Les phases de latence des levures non-*Saccharomyces* sont apparues plus courtes que celles de *S. cerevisiae*, laissant présager que ces espèces pourraient s'implanter et commencer à consommer les nutriments du milieu avant *S. cerevisiae* en fermentation mixte. De façon générale, il existe une bonne corrélation entre l'efficacité des sources d'azote vis-à-vis de la croissance et de l'activité fermentaire, avec quelques exceptions. Par exemple, *T. delbrueckii* montre un faible taux de croissance mais de bonnes performances fermentaires lorsque l'azote est apporté sous forme de sérine ou de cystéine. Ces observations montrent un découplage de la glycolyse et de l'assimilation de l'azote pour la croissance. Enfin, il est apparu que le classement des sources azotées est similaire entre les espèces, à l'exception de la lysine qui permet la fermentation de *T. delbrueckii* au contraire des autres souches, ou de la phénylalanine qui ne permet pas une fermentation efficace par *M. pulcherrima*. Globalement, les mécanismes principaux d'assimilation de l'azote pour la croissance identifiés chez *S. cerevisiae* sont retrouvés chez les espèces non-*Saccharomyces* étudiées, avec toutefois des spécificités en fonction des souches pour l'assimilation de certains acides aminés.

Ces observations sur source d'azote unique ne sont pas représentatives de la consommation de la ressource azotée en fermentation alcoolique, où tous les composés sont présents en mélange dans le moût. Pour aller plus loin dans la compréhension de la gestion de la ressource azotée par *T. delbrueckii* et *M. pulcherrima*, nous avons alors comparé l'ordre d'assimilation des composés azotés présents dans un jus de raisin modèle à celui de *S. cerevisiae*, montrant ainsi une séquence de consommation globalement similaire entre les trois espèces. Toutefois,

la consommation de l'azote par *T. delbrueckii* est plus lente que celle de *S. cerevisiae*, et le tryptophane et la glycine ne sont pas entièrement consommés par cette souche. *M. pulcherrima* est caractérisée par une consommation partielle de la plupart des sources azotées, à l'exception de la lysine, des acides aminés branchés (leucine, isoleucine, valine) du glutamate et de la glutamine qui sont presque entièrement consommés.

Ce premier travail nous a permis d'avoir une idée générale des capacités de croissance et de fermentation des deux levures non-*Saccharomyces* étudiées en fonction de la source azotée. La gestion de l'azote par *M. pulcherrima* et *T. delbrueckii* est régie par les mêmes mécanismes principaux que *S. cerevisiae*, mais avec des particularités qui ont été identifiées. Les origines de ces particularités, certainement liées à des différences dans les propriétés des enzymes ou dans les niveaux d'expression des gènes impliqués dans les voies de catabolisme de certains acides aminés, restent à élucider. Ces hypothèses sont à vérifier, par exemple par séquençage des gènes impliqués et mesure de leur niveau d'expression, pour identifier les bases moléculaires à l'origine des différences observées. Ces connaissances doivent permettre de mieux gérer la nutrition azotée des levures en fermentations mixtes et notamment de prévenir les carences azotées de *S. cerevisiae* en fermentation séquentielle, lorsque l'azote a été partiellement consommé en première partie de fermentation par une levure non-*Saccharomyces*. La quantité d'azote et la nature de l'azote consommé dépendent de la souche non-*Saccharomyces*. En fermentation séquentielle avec *T. delbrueckii*, une quantité importante d'azote est consommée en première partie, et on observe une compétition avec *S. cerevisiae* pour toutes les sources azotées. Un ajout d'azote au moment de l'inoculation de *S. cerevisiae* est donc nécessaire. Avec *M. pulcherrima*, seules certaines sources d'azote sont entièrement consommées et peuvent devenir limitantes pour *S. cerevisiae*. L'ajout d'un nutriment adapté pourrait être bénéfique dans cette condition.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes attachés à déterminer si les similarités observées dans la gestion des ressources azotées par les souches étudiées se retrouvaient dans leurs capacités à produire des composés volatils. La comparaison des profils de production de 32 composés volatils par les 3 souches étudiées au cours de fermentations sur seule source d'azote (25 conditions) nous a permis d'obtenir une image globale des capacités de production d'arômes par les trois espèces, ainsi que de la régulation des métabolismes impliqués en lien avec la nature de la source azotée. Le premier élément à souligner à partir



de l'analyse de notre jeu de données est qu'une très grande majorité des arômes fermentaires ont été produits quelles que soient la source d'azote et la souche utilisées. Cela montre que la présence de l'acide aminé précurseur n'est pas requise pour la synthèse des arômes issus de la voie d'Ehrlich, en accord avec plusieurs études ayant montré une forte contribution du métabolisme carboné central dans la synthèse de précurseurs cétoacides pour la production des alcools supérieurs, des acides branchés et de leurs dérivés (Crépin et al., 2017b; Rollero et al., 2017). En revanche, des différences importantes sur les niveaux de synthèse d'arômes ont été observées en fonction de la source d'azote disponible. Ainsi, les composés issus de la voie d'Ehrlich sont surproduits lorsque leurs acides aminés précurseurs étaient disponibles dans le milieu. Cette surproduction s'explique car la voie d'Ehrlich permet la transformation des cétoacides et aldéhydes formés au cours de la dégradation des acides aminés. Or, l'élimination de ces composés est nécessaire car ils sont toxiques pour les levures. Notre étude a également pointé les spécificités de production des grandes familles d'arômes (alcools supérieurs, esters d'acétate, acides gras) des levures non-*Saccharomyces* par rapport à *S. cerevisiae*, qui se retrouvent sur l'ensemble des conditions. La formation d'alcools supérieurs et d'acides branchés par *T. delbrueckii* est similaire à celle de *S. cerevisiae*, mais cette souche se caractérise par une faible capacité de formation d'acides gras et d'esters. A l'inverse, *M. pulcherrima* produit des quantités importantes d'alcools supérieurs, mais sa formation de composés volatils appartenant aux autres familles reste limitée. La faible production d'acides gras par *M. pulcherrima* et *T. delbrueckii* est à mettre en lien avec la production d'acétate limitée de ces deux souches (Chapitre 3), l'ensemble de ces observations traduisant très probablement une faible disponibilité en acetyl-CoA intracellulaire.

Afin d'aller plus loin dans l'étude du métabolisme azoté et de formation des arômes de *M. pulcherrima* et *T. delbrueckii*, des approches d'analyse quantitative du métabolisme ont été mises en place, basées sur des expériences de traçage isotopique à partir de sources d'azote marquées au  $^{13}\text{C}$  ou au  $^{15}\text{N}$ . Ce travail a révélé que, comme cela a été établi pour *S. cerevisiae* et *K. marxianus* (Crépin et al., 2017b; Rollero et al., 2019b), une grande fraction des acides aminés consommés, à l'exception de l'arginine, la lysine et l'histidine, est principalement catabolisée aux dépens d'une incorporation directe dans la biomasse. Toutefois, des différences majeures dans la distribution des flux dans le réseau métabolique ont été mises en évidence entre les différentes espèces, qui traduisent une gestion différente de la

ressource azotée à l'intérieur de la cellule. Il est clairement apparu que le métabolisme de *T. delbrueckii* était principalement dirigé vers la synthèse des acides aminés protéinogéniques, ce qui montre une utilisation optimale de l'azote pour la production de biomasse. Ce comportement est à mettre en regard avec la croissance rapide et importante de cette souche pendant les premières heures de la fermentation (Chapitre 1). La répartition des flux chez *M. pulcherrima* est complètement opposée, avec une contribution moins importante du métabolisme carboné central à la formation de précurseurs cétoacides par rapport aux autres espèces et une utilisation importante de ces intermédiaires vers la formation des alcools supérieurs. Cela est à corréliser avec le taux de croissance plus faible observé chez cette souche, qui conduit donc à des besoins anaboliques instantanés en acides aminés moins élevés. Une conséquence de cette distribution de flux est que le catabolisme des acides aminés contribue de façon substantielle à la production des alcools supérieurs comme observé au Chapitre 1, ce qui est intéressant à noter d'un point de vue technologique. La gestion de la composition en acides aminés du moût pourrait être un levier pour moduler la production des alcools supérieurs par *M. pulcherrima*. Cette hypothèse est à vérifier expérimentalement sur moût synthétique, en mesurant l'effet de la modification de la composition en acides aminés sur les flux en azote et carbone dans les cellules, puis lors de fermentations sur moûts naturels ayant des profils en acides aminés contrastés. Il serait aussi intéressant de compléter ces résultats par l'étude de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme azoté et de production d'arômes, afin de déterminer l'origine des résultats obtenus, notamment en ce qui concerne les différences observées entre les souches sur leur consommations d'azote et le devenir de cet azote dans les cellules. Enfin, une partie des squelettes carbonés issus de la dégradation de la leucine et de la valine marquées n'a pas été retrouvée dans les molécules dosées. Il est possible d'une partie des arômes produits lors de la fermentation ait été perdue par évaporation ou par « stripping » par le CO<sub>2</sub>. Le carbone issu du catabolisme des acides aminés a aussi pu être utilisé pour la synthèse de molécules qui n'ont pas été dosées lors de notre étude. Il serait intéressant d'identifier ces molécules et leurs voies de synthèse, notamment s'il s'agit de molécules aromatiques. Enfin, l'étude du métabolisme des acides aminés aromatiques en utilisant la même approche permettrait de compléter les observations faites au Chapitre 1, ce qui impliquerait le développement de méthodes d'analyse pour quantifier leurs produits de conversion.

La deuxième partie de ce projet était orientée vers la caractérisation de l'impact des levures non-*Saccharomyces* sur la fermentation lors de leur utilisation en inoculation séquentielle avec *S. cerevisiae*. En condition de fermentation séquentielle, la disponibilité en nutriments (principalement l'azote, les sucres et lipides) joue un rôle clé qu'il est important d'appréhender, puisqu'elle module l'activité de la levure non-*Saccharomyces* en première partie de fermentation, mais a aussi une incidence marquée sur l'implantation de *S. cerevisiae* en deuxième partie du procédé à travers des phénomènes de compétition entre les espèces pour les ressources du milieu. En parallèle, un effet important des teneurs en sucres, lipides et azote sur le déroulement de la fermentation avec *S. cerevisiae* a été établi. Ainsi, pour prendre en compte la variabilité de la disponibilité en nutriments en fonction des moûts, différentes concentrations en sucres, azote et lipides ont été étudiées par le biais d'un plan expérimental de Box-Behnken. Trois concentrations ont été testées pour chaque paramètre. Ces concentrations ont été choisies pour avoir un impact mesurable sur la fermentation tout en restant dans des concentrations naturellement rencontrées dans les moûts de raisin. De plus, des précurseurs de thiols synthétiques ont été rajoutés au moût synthétique, et la production de thiols avant l'inoculation de *S. cerevisiae* et en fin de fermentation a été mesurée afin d'évaluer l'apport des levures non-*Saccharomyces* dans la libération de thiols variétaux. En effet, *M. pulcherrima* et *T. delbrueckii* ont été décrites dans la littérature comme favorisant la libération de thiols (Belda et al., 2017; Zott et al., 2011). Plus généralement, les levures non-*Saccharomyces* se caractérisent par des capacités d'excrétion d'enzymes hydrolytiques supérieures à *S. cerevisiae* (Charoenchai et al., 1997). Trois grandes familles d'enzymes ont été décrites : les glycosidases pour la libération de terpènes variétaux, les protéases pour l'hydrolyse de peptides et les  $\beta$ -lyases pour la libération de thiols variétaux. Au cours de ce projet, des protocoles permettant la mesure quantitative de l'activité de ces trois catégories d'enzymes ont été mis au point. L'adaptation de ces protocoles pour une utilisation en fermentation alcoolique a été compliquée par plusieurs difficultés méthodologiques liées à des phénomènes d'interférence avec des composés du moût, notamment les polyphénols. Seule l'activité  $\beta$ -lyase a été suivie dans ce projet, mais il serait intéressant de poursuivre ce travail en incluant l'étude des glycosidases et des protéases, et en approfondissant le lien entre activité enzymatique et libération de composés volatils.

La modélisation associée au plan de Box-Behnken et la représentation sous forme de surfaces de réponses nous ont permis d'évaluer, pour chaque modalité d'inoculation, l'effet de chaque paramètre mais aussi de leurs interactions sur la croissance, les performances fermentaires, la production des métabolites carbonés et la synthèse de composés volatils. Ce travail montre clairement que, comme établi pour des fermentations en culture pure avec *S. cerevisiae*, la disponibilité en azote est le paramètre qui influe le plus le procédé en fermentation séquentielle *M. pulcherrima* / *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* / *S. cerevisiae*, à la fois sur la cinétique fermentaire et sur la synthèse d'arômes. Des interactions entre les nutriments ont aussi été observées, principalement entre l'azote et les lipides. L'effet des paramètres était très dépendant des composés. Par exemple, avec *M. pulcherrima* en inoculation séquentielle, la production maximale de thiols a été obtenue avec une concentration moyenne en azote, alors que la plus forte production en esters d'acétate a été obtenue avec des concentrations en azote plus élevées. La gestion des nutriments doit donc se faire en fonction du profil aromatique souhaité, ce qui nécessite de faire des compromis sur les arômes à favoriser. Le développement d'outils prédisant la production d'arômes en fonction des paramètres fermentaires, similaires à ce qui existe avec *S. cerevisiae* (Mouret et al., 2015), pourrait faciliter l'exploitation de ces résultats. Cette étude a également établi que la réponse aux variations de la disponibilité en nutriments dépendait fortement du protocole d'inoculation, notamment pour les composés du métabolisme carboné central et les alcools supérieurs. Cette variabilité est le résultat des spécificités métaboliques des levures utilisées. Par exemple, la réponse de la production de glycérol à la disponibilité en azote était inversée en inoculation séquentielle avec *M. pulcherrima* comparée à une culture pure de *S. cerevisiae*, du fait de la forte production de cette molécule par la levure non-*Saccharomyces*.

Ces résultats donnent une image complète de l'incidence de la disponibilité en nutriments en fermentation séquentielle. Néanmoins, une de ses limitations de ces fermentations est qu'elles ont été réalisées en moût synthétique, et que des niveaux de production de métabolites et des réponses différentes aux modifications de paramètres environnementaux peuvent être obtenues sur moût naturel. En effet, certains composés du moût naturel ne sont pas présents dans le moût synthétique mais pourrait influencer sur l'activité des levures de manière négative (composés toxiques ou inhibiteurs de certaines enzymes) ou au contraire avoir un effet positif (précurseurs d'arômes variétaux ou peptides par exemple (Marsit et al.,

2016)). C'est pourquoi nous avons réalisé des fermentations en inoculation séquentielle avec *M. pulcherrima* ou *T. delbrueckii* sur deux moûts naturels, Colombard et Sauvignon Blanc. L'inoculation précoce de ces deux moûts par une levure non-*Saccharomyces* a conduit à une modification significative du profil aromatique des vins produits confirmant les résultats établis en moût synthétique. En particulier, la différence de teneur en azote, lipides et sucres entre les deux moûts a permis d'expliquer les variations de production d'arômes fermentaires entre milieu Colombard et milieu Sauvignon blanc, en accord avec les réponses obtenues en moût synthétique. Ce travail a également montré l'intérêt des fermentations séquentielles pour la libération d'arômes variétaux. La présence de *M. pulcherrima* et *T. delbrueckii* a en effet favorisé la libération de composés terpéniques, probablement grâce à leurs capacités de production et d'excrétion d'enzymes hydrolytiques responsables du clivage des précurseurs non-odorants de ces molécules.

Ces travaux apportent de nouvelles données pour la compréhension des mécanismes impliqués dans la libération des thiols variétaux, notamment en fermentation séquentielle avec *M. pulcherrima*. En moût synthétique, une interaction positive entre *M. pulcherrima* et *S. cerevisiae* pour la formations de thiols à partir de précurseurs cystéinylés et glutathionylés a été mise en évidence par le dosage des thiols et de l'activité  $\beta$ -lyase. Le premier modèle proposé pour expliquer ce résultat était que *M. pulcherrima* dégradait les précurseurs glutathionylés pour former des précurseurs cystéinylés, qui seraient plus facilement hydrolysables sous cette forme par *S. cerevisiae* pour libérer des thiols. Un travail préliminaire a été mené en fin de thèse sur la dégradation des précurseurs par *M. pulcherrima* et a invalidé l'hypothèse proposée. Il serait intéressant de poursuivre ce travail afin d'établir les bilans de conversion des précurseurs en thiols lors de fermentations séquentielles, et de tester d'autres hypothèses comme la production de thiols à partir de l'(E)-2-hexanal, pour approfondir la compréhension des mécanismes mis en jeu.

L'ensemble de nos travaux a souligné les interactions négatives entre *S. cerevisiae* et les levures non-*Saccharomyces*, illustrées par une implantation de *S. cerevisiae* plus faible en fermentation séquentielle qu'en culture pure. Dans le cas de *T. delbrueckii*, une compétition pour l'azote a lieu entre les deux levures, menant à un faible développement de *S. cerevisiae*. Néanmoins, l'ajout d'azote au moment de l'inoculation de *S. cerevisiae* n'améliore pas de manière substantielle l'implantation de cette espèce mais entraîne un regain de croissance de

*T. delbrueckii*. Ce phénomène peut s'expliquer par une différence d'état physiologique entre les deux espèces : immédiatement après son inoculation, *S. cerevisiae* est en phase de latence alors que *T. delbrueckii* est en phase de croissance. Or, d'un point de vue technologique, il est préférable d'avoir une bonne implantation de *S. cerevisiae*. Une stratégie pouvant être proposée pour moduler l'activité de *T. delbrueckii* serait l'utilisation de SO<sub>2</sub>. En effet, nous avons observé un meilleur développement de *S. cerevisiae* combiné à une croissance plus faible de *T. delbrueckii* lors de fermentations sur un moût naturel riche en SO<sub>2</sub>. Il conviendrait donc d'analyser plus en détail l'effet du SO<sub>2</sub> en fermentation séquentielle, ainsi que la modulation des taux d'inoculation des deux espèces. Avec *M. pulcherrima*, la limitation de la croissance de *S. cerevisiae* n'est pas liée à une carence en azote. En revanche, il est possible que l'épuisement de certaines sources préférentielles (Chapitre 1) conduise à une croissance plus faible. D'autres mécanismes pourraient également expliquer le faible développement de *S. cerevisiae* avec *M. pulcherrima* et *T. delbrueckii*, comme une carence en vitamines liées à leurs consommations par les levures non-*Saccharomyces*, ou la production par ces espèces de composés toxiques. Les mécanismes impliqués restent à élucider afin de définir une stratégie permettant une meilleure croissance de *S. cerevisiae* en fermentation séquentielle.

L'ensemble de nos résultats a permis d'identifier les caractéristiques métaboliques et phénotypiques des souches de *M. pulcherrima* et *T. delbrueckii* étudiées, dont certaines pourraient être à l'origine des phénomènes d'interaction entre levures non-*Saccharomyces* et *S. cerevisiae* en inoculation séquentielle. Pour approfondir nos connaissances sur les mécanismes à l'origine de ces interactions, une étude des modifications survenant au niveau des profils d'expression génique a été entreprise par séquençage des ARN à différents stades de la fermentation séquentielle : avant et après mise en contact des deux souches. Ce plan expérimental doit permettre d'évaluer l'incidence réciproque de la présence d'une souche sur le profil d'expression génique de l'autre, et ainsi apporter des éléments de compréhension des mécanismes moléculaires mis en jeu. Plusieurs difficultés ont été rencontrées lors de cette expérimentation, notamment pour l'extraction de l'ARN de *M. pulcherrima*. Ensuite, cette analyse nécessite d'avoir un génome de référence robuste pour les souches étudiées. Or actuellement, peu de souches de *T. delbrueckii* (4) et *M. pulcherrima* (1) ont été séquencées (Gordon et al. 2011, Venkatesh et al. 2018). Du fait de ce peu d'information, l'exploitation des

données est difficile et demande la mise en place d'outils statistiques spécifiques, actuellement en cours.

Ce projet a montré l'intérêt de l'utilisation de *M. pulcherrima* et *T. delbrueckii* en fermentation, pour leur influence sur la productions d'arômes fermentaires et variétaux. Les particularités métaboliques de ces levures ont été étudiées, montrant l'importance de l'azote et expliquant certains traits phénotypiques observés en fermentation. Cependant, il a soulevé un certain nombre de questions scientifiques qui restent à élucider, notamment :

- au niveau des bases moléculaires à l'origine des spécificités de ces deux espèces, en terme de capacité de production des composés volatils ou de réponse à des changements de disponibilité en nutriments dans le milieu ;
- au niveau des mécanismes impliqués dans les interactions entre souches, dont certaines ont une incidence positive, (production de thiols en fermentation séquentielle *M. pulcherrima* / *S. cerevisiae*) ou négative (difficultés d'implantation de *S. cerevisiae* avec *T. delbrueckii*).

Les fermentations réalisées pour ce projet ont été faites en laboratoire, à petite échelle et à partir de levains. Une validation des résultats en conditions réelles est indispensable, sur moût naturel et en utilisant des levures sèches actives. De plus, la caractérisation des produits obtenus après fermentation s'est toujours faite par mesure de la concentration de certains arômes par GC-MS. Bien que permettant d'avoir une idée du profil aromatique des produits ainsi testés, ces dosages ne prennent pas en compte la complexité du profil aromatique des vins, les interactions chimiques qui peuvent exister entre les différentes molécules et surtout la perception des produits par les consommateurs. L'analyse des vins par un jury de dégustation est indispensable pour confirmer les résultats.

Enfin, seules deux souches de levures non-*Saccharomyces* ont été étudiées. Or il existe une grande diversité naturelle au sein de ces espèces dans l'environnement œnologique. Il conviendra maintenant d'établir quelles sont les conclusions de ce travail qui présentent un caractère générique et à l'inverse quelles sont celles qui sont souche-spécifiques.

# LISTE DES FIGURES

## Introduction bibliographie et Matériels et Méthodes

Figure 1 : Evolution des principaux paramètres fermentaires lors d'une fermentation avec <i>S. cerevisiae</i> Lalvin EC1118® en moût synthétique. ....	10
Figure 2 : Généalogie de 159 souches de <i>S. cerevisiae</i> basée sur l'étude de leurs génomes complets (Legras et al., 2018). ....	13
Figure 3 : Métabolisme carboné central de <i>S. cerevisiae</i> en fermentation œnologique (schéma d'après Rollero (2015)).....	15
Figure 4 : Principaux transporteurs d'azote, leurs systèmes de régulation et ordre d'assimilation des sources azotées chez <i>S. cerevisiae</i> (d'après Crepin et al. (2012)).....	17
Figure 5 : Schéma du métabolisme azoté central (d'après Magasanik and Kaiser, (2002)) ....	19
Figure 6 : Evolution des populations de <i>S. cerevisiae</i> et de non- <i>Saccharomyces</i> au cours d'une fermentation spontanée (d'après Combina et al., (2005)). ....	23
Figure 7 : Distribution des espèces trouvées sur trois moûts de Malbec (d'après Combina et al., (2005)). ....	23
Figure 8 : Schéma des relations entre précurseurs de thiols et leur taux de conversion d'après Bonnaffoux et al. (2018). * : taux de conversion ne tenant pas compte de la quantité non consommée de précurseur. nc : non calculé. ....	33
Figure 9 : Dégradation des précurseurs de thiols chez <i>S. cerevisiae</i> (d'après Cordente et al., (2015) et Santiago and Gardner, (2015)) Traits pleins : voies connues, traits pointillés : voies supposées.....	35
Figure 10 : Schéma de l'action des glycosidases pour la libération de terpènes (d'après Gunata et al. (1988)). ....	37
Figure 11 : Schéma des métabolismes carbonés et azotés et leur implication dans la synthèse des arômes (d'après Swiegers et al. (2005)). ....	39
Figure 12 : Voie d'Ehrlich (d'après Hazelwood et al., (2008) .....	40
Figure 13 : Voie d'Ehrlich et connexion avec le métabolisme carboné (d'après Bell and Henschke, (2005); Bloem et al. (2016))......	42
Figure 14 : Synthèse des acides gras et des esters d'éthyle (d'après Saerens et al., (2010))..	44



Figure 15 : Impact du moment d'ajout de DAP sur la cinétique fermentaire (a) et sur la population cellulaire (b). Les flèches indiquent le moment d'ajout. (Bely et al., 1990a).....	47
Figure 16 : Distribution des flux autour des cétoacides en fonction de la concentration initiale en azote. A : 70 mgN/L, B : 250 mgN/L, C : 425 mgN/L. (Rollero et al., 2017) .....	49
Figure 17 : Photo d'un fermenteur de 1L.....	65
Figure 18 : Photo d'un fermenteur de 250mL.....	66
Figure 19 : Photo d'un fermenteur de 15 mL.....	67
Figure 20 : Réaction du dosage de la $\beta$ -glucosidase. ....	82
Figure 21 : Schéma réactionnel du dosage de l'activité $\beta$ -lyase. ....	83
Figure 22 : Détermination des paramètres cinétiques .....	90

## Chapitre 1

Figure 1 : Concentrations of residual amino acids and nitrogen at the end of the fermentation depending on the medium and the strain. SC: <i>S. cerevisiae</i> Lalvin EC1118®; MP: <i>M. pulcherrima</i> Flavia®; TD: <i>T. delbrueckii</i> Biodiva™; AA: amino acids; NH <sub>4</sub> : ammonium. ....	111
Figure 2: Production yield of aroma compounds depending on the strain and the medium (A), and Sankey diagrams representing the repartition of consumed nitrogen sources (on the left) to aroma production (on the right) for <i>S. cerevisiae</i> Lalvin EC1118® (B), <i>M. pulcherrima</i> Flavia® (C) and <i>T. delbrueckii</i> Biodiva™ (D). Fluxes representing a direct pathway between an amino acid and the compounds directly produced from it through the Ehrlich Pathway are coloured. Aroma compounds are grouped depending on their metabolic pathway of production. SC: <i>S. cerevisiae</i> Lalvin EC1118®; MP: <i>M. pulcherrima</i> Flavia®; TD: <i>T. delbrueckii</i> Biodiva™. ....	113
Figure 3: Box plot of the production yields of tryptophol (A) and tyrosol (B) depending on the medium for the three studied strains. Letters a,b,c,d, and e indicates that statistical significance depending on the medium (p<0.05). ....	114
Figure 4: Production yield of aroma compounds grouped by metabolic pathway produced by <i>S. cerevisiae</i> Lalvin EC1118® depending on the nitrogen source available in the medium. A: Grp Thr, B: Grp Val, C: Grp Leu, D: Grp Phe. ....	117
Figure 5: Production yield of MCFA (A) and ethyl esters derived from MCFA (B) produced by <i>S. cerevisiae</i> Lalvin EC1118® depending on the nitrogen source available in the medium. ....	118

Figure 6: Box plots representing the production yield of aroma compounds depending on their chemical class for the three strains. A: Higher alcohols; B: acetate esters; C: ethyl esters from the Ehrlich pathway; D: BCFA, E: ethyl esters of fatty acids; F: fatty acids. SC: <i>S. cerevisiae</i> Lalvin EC1118®; MP: <i>M. pulcherrima</i> Flavia®; TD: <i>T. delbrueckii</i> Biodiva™.....	124
Figure 7: Production yield of acetate esters on media containing either ammonium, threonine, isoleucine, valine, leucine or phenylalanine by <i>S. cerevisiae</i> Lalvin EC1118® (SC); <i>M. pulcherrima</i> Flavia® (MP) and <i>T. delbrueckii</i> Biodiva™ (TD).....	125
Figure 8: Box plots representing the production yield of isobutyl alcohol (A) and isoamyl alcohol (B) on all tested media. SC: <i>S. cerevisiae</i> Lalvin EC1118®; MP: <i>M. pulcherrima</i> Flavia®; TD: <i>T. delbrueckii</i> Biodiva™. ....	126

## Chapitre 2

Figure 1: Consumption of amino acids (in mgN/L) during the fermentation with <i>M. pulcherrima</i> Flavia® (MP) or <i>T. delbrueckii</i> Biodiva® (TD). Labels indicate the proportion of the studied amino acids among the total amount of consumed amino acids. The concentration of amino acids in the initial must is represented on the left. N ½ : half of initial nitrogen consumed; N ¾: ¾ of initial nitrogen consumed; NT: end of growth phase; EF : end of fermentation.....	159
Figure 2: Ratio between the concentration of consumed amino acids and the concentration of the corresponding proteinogenic amino acids (mM/mM) for <i>M. pulcherrima</i> (A) and <i>T. delbrueckii</i> (B) at different stages of fermentation. Ratio > 1 indicate that the amino acids is enough in theory to meet anabolic requirements. N ½ : half of initial nitrogen consumed; N ¾: ¾ of initial nitrogen consumed; NT: end of growth phase; EF : end of fermentation.....	160
Figure 3: Amount of labelled nitrogen recovered into proteinogenic amino acid (in mgN/L) at the end of the fermentation (EF) for <i>M. pulcherrima</i> (A) and <i>T. delbrueckii</i> (B). Labels indicates the proportion of labelled nitrogen from the different sources into the proteinogenic amino acids.....	161
Figure 4: Concentrations of labelled and non labelled proteinogenic proline during the fermentation for <i>M. pulcherrima</i> (MP) and <i>T. delbrueckii</i> (TD). Labelled nitrogen provided by arginine (Arg*), glutamine (Gln*) or ammonium (NH4*). N ½: half of initial nitrogen consumed; N ¾: ¾ of initial nitrogen consumed; NT: end of growth phase; EF : end of fermentation...	163

Figure 5: Fate of labelled arginine among the proteinogenic amino acids for *M. pulcherrima* (A) and *T. delbrueckii* (B). Concentrations are expressed as mM of nitrogen. Labels indicate the percentage of consumed arginine recovered into the different categories (in labelled proteinogenic arginine or other proteinogenic amino acids). N  $\frac{1}{2}$ : half of initial nitrogen consumed; N  $\frac{3}{4}$ :  $\frac{3}{4}$  of initial nitrogen consumed; NT: end of growth phase; EF: end of fermentation. .... 165

Figure 6: Amount of labelled proteinogenic valine and leucine recovered in fermentation with the corresponding labelled amino acids for *M. pulcherrima* (A) and *T. delbreuckii* (B). Percentages indicate the proportion of labelled amino acids over its total concentration. N  $\frac{1}{2}$ : half of initial nitrogen consumed; N  $\frac{3}{4}$ :  $\frac{3}{4}$  of initial nitrogen consumed; NT: end of growth phase; EF: end of fermentation..... 167

Figure 7: Repartition of carbon from leucine through the metabolism of *M. pulcherrima* and *T. delbrueckii*. A: Concentrations (mM) of consumed leucine, proteinogenic leucine and proteinogenic valine. B: Fluxes of consumed leucine through the metabolism in percentage of consumed leucine and in mM at the end of the fermentation. C: Concentrations (mM) of produced isobutanol, isobutyric acid and isoamyl alcohol. Blue bars: *M. pulcherrima*, yellow bars: *T. delbrueckii*, light colors: non-labelled concentration, dark colors: labelled concentrations, labels over the bars indicate the concentration in mM of the labelled part of each compounds. N  $\frac{1}{2}$ : half of initial nitrogen consumed; N  $\frac{3}{4}$ :  $\frac{3}{4}$  of initial nitrogen consumed; NT: end of growth phase; EF: end of fermentation. .... 176

Figure 8: Repartition of carbon from valine through the metabolism of *M. pulcherrima* and *T. delbrueckii*. A: Concentrations (mM) of consumed valine, proteinogenic valine and proteinogenic leucine. B: Fluxes of consumed valine through the metabolism in percentage of consumed valine and in mM at the end of the fermentation. C: Concentrations (mM) of produced isobutanol, isobutyric acid and isoamyl alcohol. Blue bars: *M. pulcherrima*, yellow bars: *T. delbrueckii*, light colors: non-labelled concentration, dark colors: labelled concentrations, labels over the bars indicate the concentration in mM of the labelled part of each compounds. N  $\frac{1}{2}$ : half of initial nitrogen consumed; N  $\frac{3}{4}$ :  $\frac{3}{4}$  of initial nitrogen consumed; NT: end of growth phase; EF: end of fermentation. .... 177

### Chapitre 3

Figure 1: Principe de dosage des glycosidases.....	188
Figure 2: Principe de dosage des $\beta$ -lyases.....	189
Figure 3: Relation entre la concentration relative en $\beta$ -glucosidase et l'absorbance mesurée à 400 nm. MS : moût naturel. ....	194
Figure 4: Example of the fermentative kinetics (A) of <i>M. pulcherrima</i> and <i>S. cerevisiae</i> in sequential inoculation (MP+SC, green line) and <i>S. cerevisiae</i> in pure cultures (SC, blue line) and principal component analysis (PCA) of fermentative parameters in sequential inoculation of <i>M. pulcherrima</i> and <i>S. cerevisiae</i> (B) and in pure cultures of <i>S. cerevisiae</i> (C). Rmax_MP: maximal fermentation rate reached before the inoculation of <i>S. cerevisiae</i> ; Rmax_SC: maximal fermentation rate reached after the inoculation of <i>S. cerevisiae</i> ; Trmax_MP and Trmax_SC: time to reach Rmax before and after the inoculation of <i>S. cerevisiae</i> . Individuals are identified as S-N-L, where S: sugar concentration; N: nitrogen concentration and L: lipid concentration. The blue and orange axes indicate the repartition of individuals according to the concentrations of sugar and nitrogen.....	215
Figure 5: Parameters describing the fermentation kinetics depending on the medium composition and inoculation strategy. A: Maximal fermentation rate for <i>M. pulcherrima</i> Flavia®; B: maximal fermentation rate for <i>S. cerevisiae</i> Lalvin QA23®; C: lag phase duration; D: fermentation duration. MP+SC, green bars: sequential fermentation. SC, blue bars: pure cultures of <i>S. cerevisiae</i> . Conditions are labelled as sugar-nitrogen-lipids.....	217
Figure 6: Concentrations of assimilable nitrogen consumed (blue bars) and remaining (orange bars) after 48 h of fermentation with <i>M. pulcherrima</i> , depending on the conditions. Conditions are labelled as sugar-nitrogen-lipids.....	218
Figure 7: Biomass concentrations (cells/mL) during fermentation in sequential inoculation of <i>M. pulcherrima</i> (MP, green bars) and <i>S. cerevisiae</i> (SC, blue bars). A: 48 h after the inoculation of <i>M. pulcherrima</i> ; B: 48 h after the addition of <i>S. cerevisiae</i> ; C: at 90% of fermentation progress. Conditions are labelled as sugar-nitrogen-lipids.....	219
Figure 8: Production of glycerol and acetate in g/L at the end of fermentation (or at 48 h of fermentation if specified) in pure cultures of <i>S. cerevisiae</i> (SC), in sequential inoculation at 48 h (MP 48 h) or at the end of the fermentation (MP+SC). At 48 h of fermentation, only <i>M. pulcherrima</i> is present in the medium.....	220

Figure 9: Response surfaces of glycerol, acetate and succinate for fermentation in sequential inoculation (A) or in pure cultures of <i>S. cerevisiae</i> (B) in relation to the variation of sugar, lipids and nitrogen. For all graphs, the lipid concentration is fixed at 5 mg/L.....	221
Figure 10: Combined violin and box plot representation of some aroma compounds produced by <i>M. pulcherrima</i> in pure cultures after 48 h of fermentation (MP), <i>M. pulcherrima</i> and <i>S. cerevisiae</i> in sequential inoculation after 90% of fermentation progress (MP+SC) and <i>S. cerevisiae</i> in pure cultures after 90% of fermentation progress (SC).....	223
Figure 11: Response surfaces of fermentative aromas in relation to the variation of sugar, lipids and nitrogen in sequential inoculation. For all graphs, one parameter is fixed.....	225
Figure 12: Response surfaces of fermentative aromas in relation to the variation of sugar, lipids and nitrogen in pure cultures of <i>S. cerevisiae</i> . For all graphs, one parameter is fixed. ....	226
Figure 13: Violin plot of the production of 3MH and 4MMP in sequential inoculation (MP+SC) or in pure cultures of <i>S. cerevisiae</i> (SC), at 90% of fermentation progress. ....	229
Figure 14: Response surfaces of thiol production in sequential inoculation (A) or in pure cultures of <i>S. cerevisiae</i> (B). ....	230
Figure 15: Mean $\beta$ -lyase activity depending on the initial nitrogen concentration during fermentation in sequential inoculation (A) and in pure cultures of <i>S. cerevisiae</i> (B). 80 mgN/L: blue bars, 190 mN/L: red bars, 300 mgN/L: green bars.....	232
Figure 16 : Concentrations d'azote consommé (en bleu) et restant (en orange) après 24 heures de fermentation avec <i>T. delbrueckii</i> (en mg/L d'azote assimilable). Les conditions sont indiquées sous la forme sucre-azote-lipides.....	254
Figure 17 : Evolution de la population de <i>S. cerevisiae</i> après 72h de fermentation en fonction de la population de <i>T. delbrueckii</i> à 24h (A) et de la quantité d'azote restant à 24h (B). ....	254
Figure 18: Influence des concentrations initiales en azote et en sucre sur la population maximale de <i>S. cerevisiae</i> en culture pure. La concentration en lipides est fixée à 5 mg/L. ....	255
Figure 19: Production de glycérol (A), succinate (B) et acétate (C) en inoculation séquentielle (vert) et en culture pure de <i>S. cerevisiae</i> (bleu) en fonction des conditions. Les conditions sont codées sous la forme sucre-azote-lipides. ....	256
Figure 20: Diagrammes en violon et en boîte comparant les productions de certains arômes fermentaires entre différentes modalités. SC : <i>S. cerevisiae</i> en culture pure en fin de fermentation; TD 24h : <i>T. delbrueckii</i> en culture pure après 24 heures de fermentation; TD+SC : inoculation séquentielle en fin de fermentation. ....	258

Figure 21: Lien entre les thiols et leurs précurseurs (A) et diagrammes en violon et boîte comparant la production de 3MH et 4MMP en fonction des conditions d'inoculation (B). SC : <i>S. cerevisiae</i> en culture pure en fin de fermentation; TD 24h : <i>T. delbrueckii</i> en culture pure après 24 heures de fermentation; TD+SC : inoculation séquentielle en fin de fermentation. ....	262
Figure 22 : Schéma des relations entre précurseurs de thiols d'après Bonnaffoux et al. (2018). ....	264
Figure 23: Suivi de l'évolution des concentrations en G-3MH (A) et cys-3MH (B) au cours de la fermentation en fonction de la stratégie d'inoculation. MP : <i>M. pulcherrima</i> en culture pure ; MP+SC : <i>M. pulcherrima</i> et <i>S. cerevisiae</i> en inoculation séquentielle ; SC : <i>S. cerevisiae</i> en culture pure. ....	266

## Chapitre 4

Figure 1: Représentation schématique du plan expérimental. MP+SC: inoculation séquentielle de <i>M. pulcherrima</i> et <i>S. cerevisiae</i> ; TD+SC: inoculation séquentielle de <i>T. delbrueckii</i> et <i>S. cerevisiae</i> ; SC: Culture pure de <i>S. cerevisiae</i> . La dernière colonne présente la codification des différentes modalités. ....	276
Figure 2: Vitesse de production de CO <sub>2</sub> pour les différentes conditions de fermentation sur Sauvignon (A) et Colombard (B). Les vitesses représentées sont la moyenne des triplicats (voir l'Annexe 1 pour le détail des triplicats). Gris : inoculation séquentielle de <i>M. pulcherrima</i> et <i>S. cerevisiae</i> sans ajout ; orange : inoculation séquentielle de <i>M. pulcherrima</i> et <i>S. cerevisiae</i> avec ajout d'azote ; Bleu foncé : inoculation séquentielle de <i>T. delbrueckii</i> et <i>S. cerevisiae</i> sans ajout ; vert : inoculation séquentielle de <i>T. delbrueckii</i> et <i>S. cerevisiae</i> avec ajout d'azote ; Bleu clair : <i>S. cerevisiae</i> en culture pure sans ajout ; orange : <i>S. cerevisiae</i> en culture pure avec ajout d'azote. Flèches : inoculation de <i>S. cerevisiae</i> après <i>T. delbrueckii</i> (flèche verte) ou <i>M. pulcherrima</i> (flèche jaune). ....	279
Figure 3: Concentration en biomasse pour <i>T. delbrueckii</i> (TD) et <i>M. pulcherrima</i> (MP) sur Colombard (en blue) ou Sauvignon (orange) avant inoculation de <i>S. cerevisiae</i> . ....	280
Figure 4: Quantités d'azote consommées et restantes après fermentation de <i>M. pulcherrima</i> (MP) pendant 48h et <i>T. delbrueckii</i> (TD) pendant 24h en culture pure, sur les deux moûts. Bleu	

foncé : Acides aminés consommés ; orange : ammonium consommé ; bleu clair : acides aminés restants ; orange clair : ammonium restant.....	281
Figure 5: Concentration en biomasse à 90% d'avancement de fermentation, pour les trois souches étudiées en fonction des conditions. TD : <i>T. delbrueckii</i> ; SC : <i>S. cerevisiae</i> ; MP : <i>M. pulcherrima</i> .....	282
Figure 6: ACP représentant les différentes conditions de fermentation en fonction des paramètres fermentaires. RmaxNS : vitesse fermentaire maximale de la levure non- <i>Saccharomyces</i> ; RmaxSC : vitesse fermentaire maximale de <i>S. cerevisiae</i> ; LagTime : durée de la phase de latence ; TimeAtRmaxNS : durée pour atteindre la vitesse fermentaire maximale de la levure non- <i>Saccharomyces</i> . Length : durée de la fermentation. En bleu : conditions en Colombard ; orange : conditions en Sauvignon. MP+SC : inoculation séquentielle de <i>M. pulcherrima</i> et <i>S. cerevisiae</i> ; TD+SC : inoculation séquentielle de <i>T. delbrueckii</i> et <i>S. cerevisiae</i> ; SC : <i>S. cerevisiae</i> en culture pure. F : avec ajout d'azote ; 0 : sans ajout.....	283
Figure 7: Rendements en éthanol, acétate et glycérol par rapport au sucre consommé, à 90% d'avancement de fermentation sur Colombard (A) et Sauvignon (B) pour les conditions sans ajout d'azote. Bleu : inoculation séquentielle de <i>M. pulcherrima</i> et <i>S. cerevisiae</i> ; Vert : Inoculation séquentielle de <i>T. delbreuckii</i> et <i>S. cerevisiae</i> ; Orange : <i>S. cerevisiae</i> en culture pure. A,b et c indiquent des différences significatives entre les modes d'inoculation ( $p < 0.05$ ). .....	285
Figure 8: Concentrations en arômes fermentaires en fin de fermentation pour les modalités sans ajout d'azote sur Colombard (A) et Sauvignon (B). Bleu : Inoculation séquentielle de <i>M. pulcherrima</i> et <i>S. cerevisiae</i> ; Vert : inoculation séquentielle de <i>T. delbrueckii</i> et <i>S. cerevisiae</i> ; Orange : culture pure de <i>S. cerevisiae</i> . A,b,c, représentent un effet significatif du mode d'inoculation ( $p < 0.05$ ). .....	289
Figure 9: Concentrations en acides et esters d'éthyle du métabolisme des acides gras en fin de fermentation pour les modalités sans ajout d'azote sur Colombard (A) et Sauvignon (B). Bleu : Inoculation séquentielle de <i>M. pulcherrima</i> et <i>S. cerevisiae</i> ; Vert : inoculation séquentielle de <i>T. delbrueckii</i> et <i>S. cerevisiae</i> ; Orange : culture pure de <i>S. cerevisiae</i> . A,b,c, représentent un effet significatif du mode d'inoculation ( $p < 0.05$ ). .....	290
Figure 10: Concentrations en G-3MH (A) et cys-3MH (B) mesurées dans les moûts (en jaune) et avant inoculation de <i>S. cerevisiae</i> . Bleu : <i>M. pulcherrima</i> ; vert : <i>T. delbrueckii</i> . A,b,c, représentent un effet significatif du mode d'inoculation ( $p < 0.05$ ). .....	293

Figure 11: Concentrations en G-3MH mesurées à 90% d'avancement de la fermentation sur Colombard (A) et Sauvignon (B). Bleu : Inoculation séquentielle de *M. pulcherrima* et *S. cerevisiae*; Vert : inoculation séquentielle de *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae*; Orange : culture pure de *S. cerevisiae*. A,b,c, représentent un effet significatif du mode d'inoculation ( $p < 0.05$ ).  
..... 294



# LISTE DES TABLEAUX

## Introduction bibliographique et Matériels et Méthodes

Tableau 1 : Classement des sources d'azote en fonction du temps de génération et de l'expression de gènes régulés par l'azote (d'après Godard et al. (2007)).....	18
Tableau 2 : Précurseurs carbonés nécessaires à la synthèse de novo des acides aminés par <i>S. cerevisiae</i> (d'après Ljungdahl and Daignan-Fornier, (2012)). .....	20
Tableau 3 : Liste de souches de levures retrouvées en fermentation œnologique (Jolly et al., 2013; Wang et al., 2015). .....	22
Tableau 4 : Résultats obtenues en fermentation avec <i>T. delbrueckii</i> et <i>S. cerevisiae</i> . .....	27
Tableau 5 : Résultats obtenus en fermentation avec <i>M. pulcherrima</i> et <i>S. cerevisiae</i> . .....	29
Tableau 6 : Principaux composés d'arômes trouvés dans le vin (d'après Swiegers et al. (2005)). .....	31
Tableau 7 : Concentrations en précurseurs de thiols dans différents cépages. ....	33
Tableau 8 : Concentrations en terpènes libres et liés dans des moûts de différents cépages (d'après Gunata et al. (1985)). .....	36
Tableau 9 : Les différents types d'interaction et leurs effets sur les organismes.....	54
Tableau 10 : Composition d'un moût synthétique contenant 200 g/L de sucres, 200 mg/L d'azote assimilable et 5 mg/L de phytostérols. Le pH est ajusté à 3.4 avec une solution de NaOH à 10 M.....	61
Tableau 11 : Composition de la solution mère d'oligo-éléments. La solution est stérilisée par filtration à 0.22 µm et conservée à 4°C.....	62
Tableau 12 : Composition de la solution mère de vitamines. Cette solution est conservée à -20 °C. ....	62
Tableau 13 : Composition de la solution mère de phytostérols. Cette solution est conservée à 4 °C et chauffée à 50°C avant utilisation.....	62
Tableau 14 : Composition de la solution mère de chlorure de fer. Cette solution est conservée à 4 °C.....	63
Tableau 15 : Composition de la solution mère d'acides aminés. Cette solution est conservée à -20 °C. ....	63

Tableau 16 : Caractéristiques des moûts naturels utilisés.....	64
Tableau 17 : Composition du milieu lysine. ....	69
Tableau 18 : Composition de la solution 1 pour le milieu lysine. Cette solution est autoclavée 20 min à 121 °C.....	70
Tableau 19 : Composition de la solution 2 pour le milieu lysine. Cette solution est filtrée à 0.22 µm.....	70
Tableau 20 : Liste des tampons utilisés pour l'analyse des acides aminés au Biochrom 30. ..	73
Tableau 21 : Paramètres pour la détermination des arômes fermentaires du vin par SIM. En gras : ions cibles sur lesquels l'intégration est réalisée. ....	77
Tableau 22 : Ions parents et filles des composés d'intérêts dans le dosage des précurseurs de thiols.....	80
Tableau 23: Temps de rétention et ions qualificateurs des arômes variétaux dosés par GC-MS. ....	81
Tableau 24 : Substrats utilisés pour le dosage des activités glycosidiques. ....	82
Tableau 25: Liste des acides aminés et de leurs clusters d'ions pour l'analyse GC-MS par dérivatisation BSTFA et ECF. ....	86
Tableau 26: Liste des composés volatils d'intérêt et leur cluster d'ions correspondant pour l'analyse GC-MS.....	88

## Chapitre 1

Table 1 : Concentration of the 24 nitrogen sources used in the synthetic media.....	107
---	-----

## Chapitre 3

Tableau 1: Substrats utilisés pour le dosage des glycosidases. ....	188
Tableau 2: Dilution et concentrations des cellules pour l'étude de la linéarité. X représente la concentration en cellules dans la culture au moment du prélèvement.....	192
Tableau 3: Pente (a) et abscisse à l'ordonnée (b) des droites de calibration obtenues pour la β-glucosidase sur différents milieux. MS : moût synthétique. ....	194
Tableau 4: Pente (a) et abscisse à l'ordonnée (b) des droites de calibration obtenues pour l'α-arabinofuranosidase et l'α-rhamnosidase sur moût synthétique. ....	195
Tableau 5: Résultats de reproductibilité pour la sur les différents milieu. MS : moût synthétique.....	195

Tableau 6: Résultats de reproductibilité pour l'α-arabinofuranosidase et l'α-rhamnosidase en moût synthétique.....	195
Tableau 7: Limite de détection (LOD) et de quantification (LOQ) pour le dosage de la β-glucosidase dans différents milieux. ....	196
Tableau 8: Limite de détection (LOD) et quantification (LOQ) pour les dosages l'α-arabinofuranosidase et de l'α-rhamnosidase et en moût synthétique. ....	196
Tableau 9: Pourcentage de recouvrement pour la β-glucosidase dans différents milieux. ..	197
Tableau 10: Pourcentage de recouvrement pour l'α-arabinofuranosidase et l'α-rhamnosidase en mout synthétique.....	197
Tableau 11: Relation entre la concentration en p-nitrophenol et l'absorbance dans différents milieux. ....	197
Tableau 12: Pente (a) et ordonnée à l'origine (b) de la relation de linéarité entre la concentration relative en protéases et l'absorbance dans différents milieux. ....	198
Tableau 13: Résultats de reproductibilité pour le dosage des protéases dans différents milieux. ....	198
Tableau 14: Limite de détection (LOD) et de quantification (LOQ) pour le dosage des protéases dans différents milieux.....	198
Tableau 15: Pourcentages de recouvrement obtenus pour le dosage des protéases dans différents milieux. ....	199
Tableau 16: Equation des droites de calibration obtenues en moût synthétique et naturel. ....	199
Tableau 17: Pente (a) et ordonnée à l'origine (b) de la droite reliant la concentration relative entre les β-lyases et l'absorbance.....	200
Tableau 18: Résultats de reproductibilité pour la méthode de dosage des β-lyases.....	200
Tableau 19: Limite de détection (LOD) et de quantification (LOQ) pour le dosage des β-lyases. ....	200
Tableau 20: Pourcentages de recouvrement pour le dosage des β-lyases. ....	201
Tableau 21: Relation entre la concentration en éthanethiol et l'absorbance dans différents milieux. ....	201
Table 22: Concentrations of the studied parameters.....	208
Table 23: Conditions tested for the Box-Behnken design.....	208
Table 24: Concentration ranges (in mg/L) of volatile compounds measured by GC-MS. ....	211

Table 25: Concentrations of ethanol in g/L and in %vol at the end of fermentation in sequential inoculation (MP+SC) or in pure cultures (SC) depending on the initial sugar concentration in the medium. ....	220
Table 26: Effects of must parameters on the production of glycerol and acetate by <i>M. pulcherrima</i> in pure cultures after 48 h of fermentation (MP), <i>M. pulcherrima</i> and <i>S. cerevisiae</i> in sequential inoculation (MP+SC) and <i>S. cerevisiae</i> in pure cultures (SC). +: positive effect, -: negative effect. Green: p<0.001, blue: p<0.01, orange: p<0.05. N: nitrogen, S: sugar, L: lipids. ....	222
Table 27: Effects of must parameters on the production of the main fermentative aromas by <i>M. pulcherrima</i> and <i>S. cerevisiae</i> in sequential inoculation (MP+SC) and <i>S. cerevisiae</i> in pure cultures (SC). +: positive effect, -: negative effect. Green: p<0.001, blue: p<0.01, orange: p<0.05. N: nitrogen, S: sugar, L: lipids.....	227
Table 28: Effects of must parameters on the release of thiols by <i>M. pulcherrima</i> and <i>S. cerevisiae</i> in sequential inoculation (MP+SC) and <i>S. cerevisiae</i> in pure cultures (SC). +: positive effect, -: negative effect. Green: p<0.001, blue: p<0.01, orange: p<0.05. N: nitrogen, S: sugar, L: lipids.....	231
Tableau 29: Populations de <i>T. delbrueckii</i> (TD) et <i>S. cerevisiae</i> (SC) en cellules/mL à différent temps de fermentation en fonction des conditions. 90%: 90 % d'avancement de la fermentation. Les conditions sont décrites comme sucre-azote-lipides.....	253
Tableau 30: Effet de l'azote (N), du sucre (S) et des lipides (L) sur la production en fin de fermentation du glycerol, de l'acétate et du succinate en inoculation séquentielle. * : faible adéquation entre les données et le modèle ( $R^2 < 0,85$ ). +: effet positive, - : effet négatif. Vert : p<0.001, bleu: p<0.01, orange: p<0.05. ....	257
Tableau 31: Effet des concentrations en azote (N), sucre (S) et lipides (L) dans le moût sur la production des arômes fermentation en inoculation séquentielle. * : faible adéquation entre les données et le modèle ( $R^2 < 0,85$ ). +: effet positive, - : effet négatif. Vert : p<0.001, bleu: p<0.01, orange: p<0.05, gris : non applicale. ....	259

## Chapitre 4

Tableau 1: Composition des moûts utilisés. ....	277
Tableau 2: Concentrations (en µg/L) en arômes variétaux (hors thiols) en fin de fermentation pour les modalités sans ajout d'azote. TD : <i>T. delbrueckii</i> ; MP : <i>M. pulcherrima</i> ; SC : <i>S.</i>	

*cerevisiae* ; T0 : moût de départ. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne±carte-type. A,b,c, représentent un effet significatif du mode d'inoculation ( $p<0.05$ ). Les valeurs grisées sont inférieures à la limite de quantification. nd : non détecté. .... 291

# RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## A

Agenbach, W.A., 1977. A study of must nitrogen content in relation to incomplete fermentations, yeast production and fermentation activity. *Proc. South Afr. Soc. Enol. Vitic.* 66–87.

Albergaria, H., Francisco, D., Gori, K., Arneborg, N., Gírio, F., 2010. *Saccharomyces cerevisiae* CCMI 885 secretes peptides that inhibit the growth of some non-*Saccharomyces* wine-related strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, 965–972. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2409-6>

Albers, E., Larsson, C., Lidén, G., Niklasson, C., Gustafsson, L., 1996. Influence of the nitrogen source on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3187–3195.

Albertin, W., Marullo, P., Aigle, M., Dillmann, C., de Vienne, D., Bely, M., Sicard, D., 2011. Population size drives industrial *Saccharomyces cerevisiae* alcoholic fermentation and is under genetic control. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 2772–2784. <https://doi.org/10.1128/AEM.02547-10>

Alegre, Y., Culleré, L., Ferreira, V., Hernández-Orte, P., 2017. Study of the influence of varietal amino acid profiles on the polyfunctional mercaptans released from their precursors. *Food Res. Int.* 100, 740–747. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.081>

Alexandre, H., Rousseaux, I., Charpentier, C., 1994. Relationship between ethanol tolerance, lipid composition and plasma membrane fluidity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. *FEMS Microbiol. Lett.* 124, 17–22. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb07255.x>

Alonso-del-Real, J., Pérez-Torrado, R., Querol, A., Barrio, E., 2019. Dominance of wine *Saccharomyces cerevisiae* strains over *S. kudriavzevii* in industrial fermentation competitions is related to an acceleration of nutrient uptake and utilization: Competition by nutrient uptake acceleration. *Environ. Microbiol.* <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14536>

Andreasen, A.A., Stier, T.J., 1954. Anaerobic nutrition of *Saccharomyces cerevisiae*. II. Unsaturated fatty acid requirement for growth in a defined medium. *J. Cell. Comp. Physiol.* 43, 271–281.

Andreasen, A.A., 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. <https://doi.org/10.1002/jcp.1030410103>

Anfang, N., Brajkovich, M., Goddard, M.R., 2009. Co-fermentation with *Pichia kluyveri* increases varietal thiol concentrations in Sauvignon Blanc. *Aust. J. Grape Wine Res.* 15, 1–8. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2008.00031.x>

Arroyo-López, F.N., Orlić, S., Querol, A., Barrio, E., 2009. Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of *Saccharomyces cerevisiae*, *S. kudriavzevii* and their interspecific hybrid. *Int. J. Food Microbiol.* 131, 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.01.035>

Avram, D., Bakalinsky, A.T., 1997. SSU1 encodes a plasma membrane protein with a central role in a network of proteins conferring sulfite tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 179, 5971–5974. <https://doi.org/10.1128/jb.179.18.5971-5974.1997>

Azzolini, M., Fedrizzi, B., Tosi, E., Finato, F., Vagnoli, P., Scrinzi, C., Zapparoli, G., 2012. Effects of *Torulasporea delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed cultures on fermentation and aroma of Amarone wine. *Eur. Food Res. Technol.* 235, 303–313. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1762-3>

Azzolini, M., Tosi, E., Lorenzini, M., Finato, F., Zapparoli, G., 2015. Contribution to the aroma of white wines by controlled *Torulasporea delbrueckii* cultures in association with *Saccharomyces cerevisiae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 31, 277–293. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1774-1>

## B

Bakker, J., Bridle, P., Bellworthy, S.J., Garcia-Viguera, C., Reader, H.P., Watkins, S.J., 1998. Effect of sulphur dioxide and must extraction on colour, phenolic composition and sensory quality of red table wine. *J. Sci. Food Agric.* 78, 297–307. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199811\)78:3<297::AID-JSFA117>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199811)78:3<297::AID-JSFA117>3.0.CO;2-G)

Barbosa, C., Lage, P., Esteves, M., Chambel, L., Mendes-Faia, A., Mendes-Ferreira, A., 2018. Molecular and Phenotypic Characterization of *Metschnikowia pulcherrima* Strains from Douro Wine Region. *Fermentation* 4, 8. <https://doi.org/10.3390/fermentation4010008>

Barbosa, C., Mendes-Faia, A., Lage, P., Mira, N.P., Mendes-Ferreira, A., 2015. Genomic expression program of *Saccharomyces cerevisiae* along a mixed-culture wine fermentation with *Hanseniaspora guilliermondii*. *Microb. Cell Factories* 14. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0318-1>

Barbosa, C., Mendes-Faia, A., 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.10.003>

Bataillon, M., Rico, A., Sablayrolles, J.-M., Salmon, J.-M., Barre, P., 1996. Early thiamin assimilation by yeasts under enological conditions: Impact on alcoholic fermentation kinetics. *J. Ferment. Bioeng.* 82, 145–150. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(96\)85037-9](https://doi.org/10.1016/0922-338X(96)85037-9)

Belda, I., Navascués, E., Marquina, D., Santos, A., Calderon, F., Benito, S., 2015. Dynamic analysis of physiological properties of *Torulasporea delbrueckii* in wine fermentations and its incidence on wine quality. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 1911–1922. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6197-2>

Belda, I., Ruiz, J., Beisert, B., Navascués, E., Marquina, D., Calderón, F., Rauhut, D., Benito, S., Santos, A., 2017. Influence of *Torulasporea delbrueckii* in varietal thiol (3-SH and 4-MSP) release in wine sequential fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 257, 183–191. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.028>

Belda, I., Ruiz, J., Navascués, E., Marquina, D., Santos, A., 2016. Improvement of aromatic thiol release through the selection of yeasts with increased  $\beta$ -lyase activity. *Int. J. Food Microbiol.* 225, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.03.001>

Bell, S.-J., Henschke, P.A., 2005. Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* 11, 242–295.

Beltran, G., Esteve-Zarzoso, B., Rozès, N., Mas, A., 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. <https://doi.org/10.1021/jf0487001>

Beltran, G., Novo, M., Guillamón, J.M., Mas, A., Rozès, N., 2008. Effect of fermentation temperature and culture media on the yeast lipid composition and wine volatile compounds. *Int. J. Food Microbiol.* 121, 169–177. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.030>

Bely, M., Sablayrolles, J., Barre, P., 1990. Description of alcoholic fermentation kinetics : its variability and interest. *Am. J. Enol. Vitic.* 41, 319–324.

- Bely, M., Stoeckle, P., Masneuf-Pomarède, I., Dubourdieu, D., 2008. Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 122, 312–320. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.023>
- Bendicho, S., Martí, G., Hernández, T., Martín, O., 2002. Determination of proteolytic activity in different milk systems. *Food Chem.* 79, 245–249. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00126-7](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00126-7)
- Benito, S., Hofmann, T., Laier, M., Lochbühler, B., Schüttler, A., Ebert, K., Fritsch, S., Röcker, J., Rauhut, D., 2015. Effect on quality and composition of Riesling wines fermented by sequential inoculation with non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. Food Res. Technol.* 241, 707–717. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2497-8>
- Bertrand, A., Marly-Brugerolle, C., Sarre, Ch., 1978. Influence du débourage des moûts et du sulfitage sur les teneurs en substances volatiles des vins et des eaux-de-vie. 1. Etude des vins. *OENO One* 12, 35. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.1978.12.1.1412>
- Bilbao, A., Irastorza, A., Duenas, M., Fernandez, K., 1997. The effect of temperature on the growth of strains of *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* in apple juice fermentation. *Lett. Appl. Microbiol.* 24, 37–39. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.1997.00340.x>
- Bisson, L.F., 1991. Influence of nitrogen on yeast and fermentation of grapes. Presented at the Proc. Int. Symp. on Nitrogen in Grapes and Wine, Seattle, pp. 78–89.
- Blanco, P., Mirás-Avalos, J.M., Pereira, E., Orriols, I., 2013. Fermentative aroma compounds and sensory profiles of Godello and Albariño wines as influenced by *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains: Influence of yeast strains on wine chemical and sensory properties. *J. Sci. Food Agric.* 93, 2849–2857. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6122>
- Blank, L., Lehmebeck, F., Sauer, U., 2005. Metabolic-flux and network analysis in fourteen hemiascomycetous yeasts. *FEMS Yeast Res.* 5, 545–558. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.09.008>
- Blateyron, L., Sablayrolles, J.M., 2001. Stuck and slow fermentations in enology: statistical study of causes and effectiveness of combined additions of oxygen and diammonium phosphate. *J. Biosci. Bioeng.* 91, 184–189. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(01\)80063-3](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(01)80063-3)
- Bloem, A., Sanchez, I., Dequin, S., Camarasa, C., 2016. Metabolic Impact of Redox Cofactor Perturbations on the Formation of Aroma Compounds in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 174–183. <https://doi.org/10.1128/AEM.02429-15>
- Blomberg, A., Adler, L., 1989. Roles of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD<sup>+</sup>) in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 171, 1087–1092.
- Blouin, J., Peynaud, É., 2012. *Connaissance et travail du vin - 5e édition*, Oenologie. Dunod.
- Bokulich, N.A., Swadener, M., Sakamoto, K., Mills, D.A., Bisson, L.F., 2015. Sulfur Dioxide Treatment Alters Wine Microbial Diversity and Fermentation Progression in a Dose-Dependent Fashion. *Am. J. Enol. Vitic.* 66, 73–79. <https://doi.org/10.5344/ajev.2014.14096>
- Bonaffoux, H., Delpéch, S., Rémond, E., Schneider, R., Roland, A., Cavelier, F., 2018. Revisiting the evaluation strategy of varietal thiol biogenesis. *Food Chem.* 268, 126–133. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.061>
- Botstein, D., Fink, G.R., 2011. Yeast: an experimental organism for 21st Century biology. *Genetics* 189, 695–704. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.130765>
- Box, G.E.P., Behnken, D.W., 1960. Some New Three Level Designs for the Study of Quantitative Variables. *Technometrics* 2, 455. <https://doi.org/10.2307/1266454>



Branco, P., Francisco, D., Chambon, C., Hébraud, M., Arneborg, N., Almeida, M.G., Caldeira, J., Albergaria, H., 2014. Identification of novel GAPDH-derived antimicrobial peptides secreted by *Saccharomyces cerevisiae* and involved in wine microbial interactions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 843–853. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5411-y>

Branco, P., Viana, T., Albergaria, H., Arneborg, N., 2015. Antimicrobial peptides (AMPs) produced by *Saccharomyces cerevisiae* induce alterations in the intracellular pH, membrane permeability and culturability of *Hanseniaspora guilliermondii* cells. *Int. J. Food Microbiol.* 205, 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.015>

Brou, P., Taillandier, P., Beaufort, S., Brandam, C., 2018. Mixed culture fermentation using *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* with direct and indirect contact: impact of anaerobic growth factors. *Eur. Food Res. Technol.* 244, 1699–1710. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3095-3>

Brunke, S., Seider, K., Richter, M.E., Bremer-Streck, S., Ramachandra, S., Kiehnopf, M., Brock, M., Hube, B., 2014. Histidine Degradation via an Aminotransferase Increases the Nutritional Flexibility of *Candida glabrata*. *Eukaryot. Cell* 13, 758–765. <https://doi.org/10.1128/EC.00072-14>

Buhaescu, I., Izzedine, H., 2007. Mevalonate pathway: a review of clinical and therapeutical implications. *Clin. Biochem.* 40, 575–584. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2007.03.016>

Butler, G., Rasmussen, M.D., Lin, M.F., Santos, M.A.S., Sakthikumar, S., Munro, C.A., Rheinbay, E., Grabherr, M., Forche, A., Reedy, J.L., Agrafioti, I., Arnaud, M.B., Bates, S., Brown, A.J.P., Brunke, S., Costanzo, M.C., Fitzpatrick, D.A., de Groot, P.W.J., Harris, D., Hoyer, L.L., Hube, B., Klis, F.M., Kodira, C., Lennard, N., Logue, M.E., Martin, R., Neiman, A.M., Nikolaou, E., Quail, M.A., Quinn, J., Santos, M.C., Schmitzberger, F.F., Sherlock, G., Shah, P., Silverstein, K.A.T., Skrzypek, M.S., Soll, D., Staggs, R., Stansfield, I., Stumpf, M.P.H., Sudbery, P.E., Srikantha, T., Zeng, Q., Berman, J., Berriman, M., Heitman, J., Gow, N.A.R., Lorenz, M.C., Birren, B.W., Kellis, M., Cuomo, C.A., 2009. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature* 459, 657–662. <https://doi.org/10.1038/nature08064>

## C

Cadière, A., Ortiz-Julien, A., Camarasa, C., Dequin, S., 2011. Evolutionary engineered *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains with increased in vivo flux through the pentose phosphate pathway. *Metab. Eng.* 13, 263–271. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2011.01.008>

Camarasa, C., 2003. Investigation by <sup>13</sup>C-NMR and tricarboxylic acid (TCA) deletion mutant analysis of pathways for succinate formation in *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic fermentation. *Microbiology* 149, 2669–2678. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26007-0>

Camarasa, C., Sanchez, I., Brial, P., Bigey, F., Dequin, S., 2011. Phenotypic Landscape of *Saccharomyces cerevisiae* during Wine Fermentation: Evidence for Origin-Dependent Metabolic Traits. *PLoS ONE* 6, e25147. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025147>

Canonico, L., Comitini, F., Oro, L., Ciani, M., 2016. Sequential Fermentation with Selected Immobilized Non-*Saccharomyces* Yeast for Reduction of Ethanol Content in Wine. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00278>

Capone, D.L., Sefton, M.A., Hayasaka, Y., Jeffery, D.W., 2010. Analysis of Precursors to Wine Odorant 3-Mercaptohexan-1-ol Using HPLC-MS/MS: Resolution and Quantitation of Diastereomers of 3- S -Cysteinylhexan-1-ol and 3- S -Glutathionylhexan-1-ol. *J. Agric. Food Chem.* 58, 1390–1395. <https://doi.org/10.1021/jf903720w>

Capone, D.L., Sefton, M.A., Jeffery, D.W., 2011. Application of a Modified Method for 3-Mercaptohexan-1-ol Determination To Investigate the Relationship between Free Thiol and Related

- Conjugates in Grape Juice and Wine. *J. Agric. Food Chem.* 59, 4649–4658. <https://doi.org/10.1021/jf200116q>
- Capozzi, V., Garofalo, C., Chiriatti, M.A., Grieco, F., Spano, G., 2015. Microbial terroir and food innovation: The case of yeast biodiversity in wine. *Microbiol. Res.* 181, 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.10.005>
- Carrau, F.M., Medina, K., Boido, E., Farina, L., Gaggero, C., Dellacassa, E., Versini, G., Henschke, P.A., 2005. De novo synthesis of monoterpenes by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* 243, 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.11.050>
- Carrau, F.M., Medina, K., Farina, L., Boido, E., Henschke, P.A., 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. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00412.x>
- Casalta, E., Cervi, M.F., Salmon, J.M., Sablayrolles, J.M., 2013. White wine fermentation: interaction of assimilable nitrogen and grape solids: Interaction of assimilable nitrogen and grape solids on alcoholic fermentation under oenological conditions. *Aust. J. Grape Wine Res.* 19, 47–52. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2012.00205.x>
- Casalta, E., Vernhet, A., Sablayrolles, J.-M., Tesniere, C., Salmon, J.-M., 2016. Review: Characterization and Role of Grape Solids during Alcoholic Fermentation under Enological Conditions. *Am. J. Enol. Vitic.* 67, 133–138. <https://doi.org/10.5344/ajev.2015.15060>
- Casu, F., Pinu, F.R., Fedrizzi, B., Greenwood, D.R., Villas-Boas, S.G., 2016. The effect of linoleic acid on the Sauvignon blanc fermentation by different wine yeast strains. *FEMS Yeast Res.* 16, fow050. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fow050>
- Cavaliere, D., McGovern, P.E., Hartl, D.L., Mortimer, R., Polsinelli, M., 2003. Evidence for *S. cerevisiae* fermentation in ancient wine. *J. Mol. Evol.* 57 Suppl 1, S226–232. <https://doi.org/10.1007/s00239-003-0031-2>
- Cerreti, M., Esti, M., Benucci, I., Liburdi, K., de Simone, C., Ferranti, P., 2015. Evolution of S-cysteinylated and S-glutathionylated thiol precursors during grape ripening of *Vitis vinifera* L. cvs Grechetto, Malvasia del Lazio and Sauvignon Blanc: Thiol precursors in grape. *Aust. J. Grape Wine Res.* 21, 411–416. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12152>
- Chambers, E., Koppel, K., 2013. Associations of Volatile Compounds with Sensory Aroma and Flavor: The Complex Nature of Flavor. *Molecules* 18, 4887–4905. <https://doi.org/10.3390/molecules18054887>
- Chambers, P.J., Pretorius, I.S., 2010. Fermenting knowledge: the history of winemaking, science and yeast research. *EMBO Rep.* 11, 914–920. <https://doi.org/10.1038/embor.2010.179>
- Charoenchai, C., Fleet, G.H., Henschke, P.A., 1998. Effects of Temperature, pH, and Sugar Concentration on the Growth Rates and Cell Biomass of Wine Yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.* 49, 283–288.
- Charoenchai, C., Fleet, G.H., Henschke, P.A., Todd, B.E.N., 1997. Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. *Aust. J. Grape Wine Res.* 3, 2–8.
- Chasseriaud, L., Miot-Sertier, C., Coulon, J., Iturmendi, N., Moine, V., Albertin, W., Bely, M., 2015. A new method for monitoring the extracellular proteolytic activity of wine yeasts during alcoholic fermentation of grape must. *J. Microbiol. Methods* 119, 176–179. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.10.025>

- Chavan, P., Mane, S., Kulkarni, G., Shaikh, S., Ghormade, V., Nerkar, D.P., Shouche, Y., Deshpande, M.V., 2009. Natural yeast flora of different varieties of grapes used for wine making in India. *Food Microbiol.* 26, 801–808. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.05.005>
- Ciani, M., Beco, L., Comitini, F., 2006. Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 108, 239–245. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.11.012>
- Ciani, M., Maccarelli, F., 1998. Oenological properties of non-Saccharomyces yeasts associated with wine-making. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14, 199–203.
- Ciani, M., Morales, P., Comitini, F., Tronchoni, J., Canonico, L., Curiel, J.A., Oro, L., Rodrigues, A.J., Gonzalez, R., 2016. Non-conventional Yeast Species for Lowering Ethanol Content of Wines. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00642>
- Ciani, M., Pepe, V., 2002. The influence of pre-fermentative practices on the dominance of inoculated yeast starter under industrial conditions. *J. Sci. Food Agric.* 82, 573–578. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1082>
- Combina, M., Elía, A., Mercado, L., Catania, C., Ganga, A., Martinez, C., 2005. Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. *Int. J. Food Microbiol.* 99, 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.08.017>
- Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., Ciani, M., 2011. Selected non-Saccharomyces wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.* 28, 873–882. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.12.001>
- Contreras, A., Hidalgo, C., Henschke, P.A., Chambers, P.J., Curtin, C., Varela, C., 2014. Evaluation of Non-Saccharomyces Yeasts for the Reduction of Alcohol Content in Wine. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 1670–1678. <https://doi.org/10.1128/AEM.03780-13>
- Contreras, A., Hidalgo, C., Schmidt, S., Henschke, P.A., Curtin, C., 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.027>
- Cordente, A.G., Capone, D.L., Curtin, C.D., 2015. Unravelling glutathione conjugate catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of glutathione/dipeptide transporters and vacuolar function in the release of volatile sulfur compounds 3-mercaptohexan-1-ol and 4-mercapto-4-methylpentan-2-one. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 9709–9722. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6833-5>
- Cordero Otero, R.R., Ubeda Iranzo, J.F., Briones-Perez, A.I., Potgieter, N., Villena, M.A., Pretorius, I.S., Rensburg, P. van, 2003. Characterization of the  $\beta$ -Glucosidase Activity Produced by Enological Strains of Non-Saccharomyces Yeasts. *J. Food Sci.* 68, 2564–2569. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb07062.x>
- Crepin, L., Nidelet, T., Sanchez, I., Dequin, S., 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. <https://doi.org/10.1128/AEM.02294-12>
- Crépin, L., Sanchez, I., Nidelet, T., Dequin, S., Camarasa, C., 2014. Efficient ammonium uptake and mobilization of vacuolar arginine by *Saccharomyces cerevisiae* wine strains during wine fermentation. *Microb. Cell Factories* 13. <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0109-0>

Crépin, L., Truong, N.M., Bloem, A., Sanchez, I., Dequin, S., Camarasa, C., 2017. Management of multiple nitrogen sources during wine fermentation by *S. cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* AEM.02617-16. <https://doi.org/10.1128/AEM.02617-16>

Curiel, J.A., Morales, P., Gonzalez, R., Tronchoni, J., 2017. Different Non-Saccharomyces Yeast Species Stimulate Nutrient Consumption in *S. cerevisiae* Mixed Cultures. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02121>

## D

D'Amato, D., Corbo, M.R., Nobile, M.A.D., Sinigaglia, M., 2006. Effects of temperature, ammonium and glucose concentrations on yeast growth in a model wine system. *Int. J. Food Sci. Technol.* 41, 1152–1157. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.01128.x>

Dequin, S., Casaregola, S., 2011. The genomes of fermentative *Saccharomyces*. *C. R. Biol.* 334, 687–693. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2011.05.019>

Deroite, A., Legras, J.-L., Rigou, P., Ortiz-Julien, A., Dequin, S., 2018. Lipids modulate acetic acid and thiol final concentrations in wine during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* × *Saccharomyces kudriavzevii* hybrids. *AMB Express* 8, 130. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0657-5>

Dickinson, J.R., Salgado, L.E.J., 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211914200>

Dizy, Bisson, 2000. Proteolytic Activity of Yeast Strains During Grape Juice Fermentation. *Am J Enol Vitic* 51, 155–167.

Duc, C., Pradal, M., Sanchez, I., Noble, J., Tesnière, C., Blondin, B., 2017. A set of nutrient limitations trigger yeast cell death in a nitrogen-dependent manner during wine alcoholic fermentation. *PLOS ONE* 12, e0184838. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184838>

Dujon, B.A., Louis, E.J., 2017. Genome Diversity and Evolution in the Budding Yeasts (*Saccharomycotina*). *Genetics* 206, 717–750. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.199216>

Dukes, B.C., Butzke, C.E., 1998. Rapid Determination of Primary Amino Acids in Grape Juice Using an o-Phthaldialdehyde/N-Acetyl-L-Cysteine Spectrophotometric Assay. *Am. J. Enol. Vitic.* 49, 125.

## E

Egli, C.M., Edinger, W.D., Mitrakul, C.M., Henick-Kling, T., 2002. Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effect on the sensory character of Riesling and Chardonnay wines. *J. Appl. Microbiol.* 85, 779–789. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00521.x>

Ehrentraut, S., Weber, J.M., Dybowski, J.N., Hoffmann, D., Ehrenhofer-Murray, A.E., 2010. Rpd3-dependent boundary formation at telomeres by removal of Sir2 substrate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 5522–5527. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909169107>

Englezos, V., Cravero, F., Torchio, F., Rantsiou, K., Ortiz-Julien, A., Lambri, M., Gerbi, V., Rolle, L., Cocolin, L., 2018. 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. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.08.007>

Englezos, V., Pollon, M., Rantsiou, K., Ortiz-Julien, A., Botto, R., Río Segade, S., Giacosa, S., Rolle, L., Cocolin, L., 2019. *Saccharomyces cerevisiae*-*Starmerella bacillaris* strains interaction modulates chemical and volatile profile in red wine mixed fermentations. *Food Res. Int.* 122, 392–401. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.03.072>

Escott, C., Loira, I., Morata, A., Bañuelos, M.A., Suárez-Lepe, J.A., 2017. Wine Spoilage Yeasts: Control Strategy, in: Morata, A., Loira, I. (Eds.), *Yeast - Industrial Applications*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.69942>

Escribano-Viana, R., González-Arenzana, L., Portu, J., Garijo, P., López-Alfaro, I., López, R., Santamaría, P., Gutiérrez, A.R., 2018. Wine aroma evolution throughout alcoholic fermentation sequentially inoculated with non-*Saccharomyces*/*Saccharomyces* yeasts. *Food Res. Int.* 112, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.018>

Escudero, A., Campo, E., Fariña, L., Cacho, J., 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. <https://doi.org/10.1021/jf0636418>

## F

Fairbairn, S., McKinnon, A., Musarurwa, H.T., Ferreira, A.C., Bauer, F.F., 2017. The Impact of Single Amino Acids on Growth and Volatile Aroma Production by *Saccharomyces cerevisiae* Strains. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02554>

Ferreira, V., Lopez, R., Cacho, J., 2000. Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties. *J. Food Agric.* 80, 1659–1667.

Fiore, M., Degrassi, F., 1999. Dimethyl Sulfoxide Restores Contact Inhibition-Induced Growth Arrest and Inhibits Cell Density-Dependent Apoptosis in Hamster Cells. *Exp. Cell Res.* 251, 102–110. <https://doi.org/10.1006/excr.1999.4542>

Fleet, G., 2003. Yeast interactions and wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 11–22. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00245-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00245-9)

Fleet, G.H., 2008. Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Res.* 8, 979–995. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00427.x>

Fleet, G.H., 1990. Yeasts in dairy products. *J. Appl. Bacteriol.* 68, 199–211.

Forch, M., Krauss, G., Proksch, H., 1975. Wort composition and formation of lower free fatty acids. Part I: Effects of phosphorus magnesium, calcium and biotin in the concentration of free fatty acids. *J Am Soc Brew Chem* 33, 148–150.

Fraenkel, D.G., 1986. Mutants in glucose metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 317–337.

Frick, O., Wittmann, C., 2005. Characterization of the metabolic shift between oxidative and fermentative growth in *Saccharomyces cerevisiae* by comparative <sup>13</sup>C flux analysis. *Microb. Cell Factories* 4, 30. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-4-30>

Fujii, T., Kobayashi, O., Yoshimoto, H., Furukawa, S., Tamai, Y., 1997. Effect of aeration and unsaturated fatty acids on expression of the *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyltransferase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 910–915.

Fujii, T., Nagasawa, N., Iwamatsu, A., Bogaki, T., Tamai, Y., Hamachi, M., 1994. Molecular cloning, sequence analysis, and expression of the yeast alcohol acetyltransferase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2786–2792.

Fujiwara, D., Kobayashi, O., Yoshimoto, H., Harashima, S., Tamai, Y., 1999. Molecular mechanism of the multiple regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* ATF1 gene encoding alcohol acetyltransferase. *Yeast* 15, 1183–1197. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(19990915\)15:12<1183::AID-YEA444>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(19990915)15:12<1183::AID-YEA444>3.0.CO;2-J)

Fukuda, K., Yamamoto, N., Kiyokawa, Y., Yanagiuchi, T., Wakai, Y., Kitamoto, K., Inoue, Y., Kimura, A., 1998. Balance of activities of alcohol acetyltransferase and esterase in *Saccharomyces cerevisiae* is important for production of isoamyl acetate. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4076–4078.

Furukawa, K., Kitano, H., Mizoguchi, H., Hara, S., 2004. Effect of cellular inositol content on ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* in sake brewing. *J. Biosci. Bioeng.* 98, 107–113. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(04\)70250-9](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(04)70250-9)

## G

Gamero, A., Manzanares, P., Querol, A., Belloch, C., 2011. Monoterpene alcohols release and bioconversion by *Saccharomyces* species and hybrids. *Int. J. Food Microbiol.* 145, 92–97. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.034>

Gancedo, J.M., 2008. The early steps of glucose signalling in yeast. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 673–704. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00117.x>

Gao, C., Fleet, G.H., 1988. The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of the wine yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* and *Kloeckera apiculata*. *J. Appl. Bacteriol.* 65, 405–409. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1988.tb01909.x>

Garde-Cerdán, T., 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. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.03.018>

Gobbi, M., Comitini, F., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., Ciani, M., 2013. *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: A strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine. *Food Microbiol.* 33, 271–281. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.10.004>

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. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02175>

Godard, P., Urrestarazu, A., Vissers, S., Kontos, K., Bontempi, G., van Helden, J., Andre, B., 2007. Effect of 21 Different Nitrogen Sources on Global Gene Expression in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 27, 3065–3086. <https://doi.org/10.1128/MCB.01084-06>

Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S.G., 1996. Life with 6000 genes. *Science* 274, 546, 563–567.

Golubev, W.I., 2006. Antagonistic Interactions Among Yeasts, in: Péter, G., Rosa, C. (Eds.), *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 197–219. [https://doi.org/10.1007/3-540-30985-3\\_10](https://doi.org/10.1007/3-540-30985-3_10)

Gombert, A.K., Moreira dos Santos, M., Christensen, B., Nielsen, J., 2001. Network identification and flux quantification in the central metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* under different conditions of glucose repression. *J. Bacteriol.* 183, 1441–1451. <https://doi.org/10.1128/JB.183.4.1441-1451.2001>

González-Royo, E., Pascual, O., Kontoudakis, N., Esteruelas, M., Esteve-Zarzoso, B., Mas, A., Canals, J.M., Zamora, F., 2015. Oenological consequences of sequential inoculation with non-*Saccharomyces* yeasts (*Torulaspora delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima*) and *Saccharomyces cerevisiae* in base wine for sparkling wine production. *Eur. Food Res. Technol.* 240, 999–1012. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2404-8>



Gordon, J.L., Armisen, D., Proux-Wera, E., OhEigeartaigh, S.S., Byrne, K.P., Wolfe, K.H., 2011. Evolutionary erosion of yeast sex chromosomes by mating-type switching accidents. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 20024–20029. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112808108>

Grenson, M., Mousset, M., Wiame, J.M., Bechet, J., 1966. Multiplicity of the amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Evidence for a specific arginine-transporting system. *Biochim. Biophys. Acta* 127, 325–338.

Grimaldi, A., Bartowsky, E., Jiranek, V., 2005. A survey of glycosidase activities of commercial wine strains of *Oenococcus oeni*. *Int. J. Food Microbiol.* 105, 233–244. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.04.011>

Gros, J., Tran, T.T.H., Collin, S., 2013. Enzymatic release of odourant polyfunctional thiols from cysteine conjugates in hop: Enzymatic release of hop thiols. *J. Inst. Brew.* 119, 221–227. <https://doi.org/10.1002/jib.80>

Gunata, Y.Z., Bayonove, C.L., Baumes, R.L., Cordonnier, R.E., 1985. The aroma of grapes I. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components. *J. Chromatogr. A* 331, 83–90. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(85\)80009-1](https://doi.org/10.1016/0021-9673(85)80009-1)

Gunata, Z., Bitteur, S., Brillouet, J.-M., Bayonove, C., Cordonnier, R., 1988. Sequential enzymic hydrolysis of potentially aromatic glycosides from grape. *Carbohydr. Res.* 184, 139–149. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(88\)80012-0](https://doi.org/10.1016/0008-6215(88)80012-0)

## H

Hagen, K.M., Keller, M., Edwards, C.G., 2008. Survey of Biotin, Pantothenic Acid, and Assimilable Nitrogen in Winegrapes from the Pacific Northwest. *Am. J. Enol. Vitic.* 59, 432.

Harsch, M.J., Gardner, R.C., 2013. Yeast genes involved in sulfur and nitrogen metabolism affect the production of volatile thiols from Sauvignon Blanc musts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 223–235. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4198-6>

Hazelwood, L.A., Daran, J.-M., van Maris, A.J.A., Pronk, J.T., 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. <https://doi.org/10.1128/AEM.02625-07>

Heard, G.M., Fleet, G.H., 1988. The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. *J. Appl. Bacteriol.* 65, 23–28. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1988.tb04312.x>

Hernandez, L., 2003. Beta-Glucosidase activity in a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. *Int. J. Food Microbiol.* 80, 171–176. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00149-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00149-6)

Hertweck, C., 2009. The biosynthetic logic of polyketide diversity. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 48, 4688–4716. <https://doi.org/10.1002/anie.200806121>

Hinnebusch, A.G., 2005. Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast. *Annu. Rev. Microbiol.* 59, 407–450. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.59.031805.133833>

Hirano, M., Hirano, K., Nishimura, J., Kanaide, H., 2001. Transcriptional Up-regulation of p27Kip1 during Contact-Induced Growth Arrest in Vascular Endothelial Cells. *Exp. Cell Res.* 271, 356–367. <https://doi.org/10.1006/excr.2001.5384>

Hohmann, S., 2002. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* MMBR 66, 300–372.

Hohmann, S., Huse, K., Valentin, E., Mbonyi, K., Thevelein, J.M., Zimmermann, F.K., 1992. Glucose-induced regulatory defects in the *Saccharomyces cerevisiae* *byp1* growth initiation mutant and identification of MIG1 as a partial suppressor. *J. Bacteriol.* 174, 4183–4188.

Holm Hansen, E., Nissen, P., Sommer, P., Nielsen, J.C., Arneborg, N., 2001. The effect of oxygen on the survival of non-*Saccharomyces* yeasts during mixed culture fermentations of grape juice with *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Microbiol.* 91, 541–547. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01426.x>

Holt, S., Cordente, A.G., Curtin, C., 2012. *Saccharomyces cerevisiae* STR3 and yeast cystathionine  $\beta$ -lyase enzymes: The potential for engineering increased flavor release. *Bioengineered* 3, 180–182. <https://doi.org/10.4161/bbug.19566>

Holt, S., Cordente, A.G., Williams, S.J., Capone, D.L., Jitjaroen, W., Menz, I.R., Curtin, C., Anderson, P.A., 2011. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* To Release 3-Mercaptohexan-1-ol during Fermentation through Overexpression of an *S. cerevisiae* Gene, STR3 , for Improvement of Wine Aroma. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 3626–3632. <https://doi.org/10.1128/AEM.03009-10>

Holt, S., Miks, M.H., de Carvalho, B.T., Foulquié-Moreno, M.R., Thevelein, J.M., 2018. The molecular biology of fruity and floral aromas in beer and other alcoholic beverages. *FEMS Microbiol. Rev.* <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy041>

Howell, K.S., Klein, M., Swiegers, J.H., Hayasaka, Y., Eley, G.M., Fleet, G.H., Hoj, P.B., Pretorius, I.S., de Barros Lopes, M.A., 2005. Genetic Determinants of Volatile-Thiol Release by *Saccharomyces cerevisiae* during Wine Fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 5420–5426. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5420-5426.2005>

Hranilovic, A., Li, S., Boss, P.K., Bindon, K., Ristic, R., Grbin, P.R., Van der Westhuizen, T., Jiranek, V., 2018. Chemical and sensory profiling of Shiraz wines co-fermented with commercial non-*Saccharomyces* inocula: Chemical and sensory impact of mixed yeast inocula. *Aust. J. Grape Wine Res.* 24, 166–180. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12320>

Hu, K., Qin, Y., Tao, Y.-S., Zhu, X.-L., Peng, C.-T., Ullah, N., 2016. Potential of Glycosidase from Non-*Saccharomyces* Isolates for Enhancement of Wine Aroma: Wine aroma improvement by glycosidase.... *J. Food Sci.* 81, M935–M943. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13253>

## I

Ibanez, J.G., Carreon-Alvarez, A., Barcena-Soto, M., Casillas, N., 2008. Metals in alcoholic beverages: A review of sources, effects, concentrations, removal, speciation, and analysis. *J. Food Compos. Anal.* 21, 672–683. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.06.005>

## J

Jiménez-Martí, E., Aranda, A., Mendes-Ferreira, A., Mendes-Faia, A., del Olmo, M. lí, 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* 92, 61–75. <https://doi.org/10.1007/s10482-006-9135-1>

Jolly, N.P., Augustyn, O.P.H., Pretorius, I.S., 2006. The Role and Use of Non-*Saccharomyces* Yeasts in Wine Production. *Afr J Enol Vitie* 27.

Jolly, N.P., Augustyn, O.P.H., Pretorius, I.S., 2003. The Use of *Candida pulcherrima* in Combination with *Saccharomyces cerevisiae* for the Production of Chenin blanc Wine. *South Afr. J. Enol. Vitic.* 24. <https://doi.org/10.21548/24-2-2641>



Jolly, N.P., Varela, C., Pretorius, I.S., 2013. Not your ordinary yeast: non-Saccharomyces yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Res.* 14, 215–237. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12111>

Jones, P.R., Gawel, R., Francis, I.L., Waters, E.J., 2008. The influence of interactions between major white wine components on the aroma, flavour and texture of model white wine. *Food Qual. Prefer.* 19, 596–607. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2008.03.005>

Jones, R.P., Greenfield, P.F., 1987. Ethanol and the fluidity of the yeast plasma membrane. *Yeast Chichester Engl.* 3, 223–232. <https://doi.org/10.1002/yea.320030403>

Julien, A., Roustan, J.-L., Dulau, L., Sablayrolles, 2000. Comparison of Nitrogen and Oxygen Demands of Enological Yeasts: Technological Consequences. *Am. J. Enol. Vitic.* 51, 215–221.

## K

Karabulut, Smilanick, Mlikota Gabler, Mansour, Droby, 2003. Near-Harvest Applications of *Metschnikowia fructicola*, Ethanol, and Sodium Bicarbonate to Control Postharvest Diseases of Grape in Central California. *Plant Dis.*

Kemsawasd, V., Viana, T., Ardö, Y., 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. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6835-3>

King, A.J., Dickinson, J.R., 2003. Biotransformation of hop aroma terpenoids by ale and lager yeasts. *FEMS Yeast Res.* 3, 53–62. [https://doi.org/10.1016/s1567-1356\(02\)00141-1](https://doi.org/10.1016/s1567-1356(02)00141-1)

Klein, C.J., Olsson, L., Nielsen, J., 1998. Glucose control in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of Mig1 in metabolic functions. *Microbiol. Read. Engl.* 144 ( Pt 1), 13–24. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-1-13>

Knight, S.J., Klaere, S., Morrison-Whittle, P., Goddard, M.R., 2018. Fungal diversity during fermentation correlates with thiol concentration in wine: Fungal diversity correlates with wine thiol levels. *Aust. J. Grape Wine Res.* 24, 105–112. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12304>

Kurtzman, C.P., 2014. Use of gene sequence analyses and genome comparisons for yeast systematics. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 325–332. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.054197-0>

Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T., 2011. *The yeasts a taxonomic study*. Volume 1. Elsevier Science, London; Burlington, Mass.

## L

Lafon-Lafourcade, S., Larue, F., Ribereau-Gayon, P., 1979. Evidence for the Existence of “Survival Factors” as an Explanation for Some Peculiarities of Yeast Growth, Especially in Grape Must of High Sugar Concentration. *Appl. Environ. Microbiol.* 1069–1073.

Lage, P., Barbosa, C., Mateus, B., Vasconcelos, I., Mendes-Faia, A., Mendes-Ferreira, A., 2014. *H. guilliermondii* impacts growth kinetics and metabolic activity of *S. cerevisiae*: The role of initial nitrogen concentration. *Int. J. Food Microbiol.* 172, 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.031>

Lallemand, 2013. Biodiva™.

Lambrechts, M.G., Pretorius, I.S., 2000. Yeast and its Importance to Wine Aroma - A Review. *South Afr. J. Vitic.* 21.

Langenberg, A.-K., Bink, F.J., Wolff, L., Walter, S., von Wallbrunn, C., Grossmann, M., Heinisch, J.J., Schmitz, H.-P., 2017. Glycolytic Functions Are Conserved in the Genome of the Wine Yeast

- Hanseniaspora uvarum, and Pyruvate Kinase Limits Its Capacity for Alcoholic Fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 83. <https://doi.org/10.1128/AEM.01580-17>
- Le, S., Josse, J., Husson, F., 2008. FactoMineR : An R Package for Multivariate Analysis. *J. Stat. Softw.* 25. <https://doi.org/10.18637/jss.v025.i01>
- Legras, J.-L., Galeote, V., Bigey, F., Camarasa, C., Marsit, S., Nidelet, T., Sanchez, I., Couloux, A., Guy, J., Franco-Duarte, R., Marcet-Houben, M., Gabaldon, T., Schuller, D., Sampaio, J.P., Dequin, S., 2018. Adaptation of *S. cerevisiae* to Fermented Food Environments Reveals Remarkable Genome Plasticity and the Footprints of Domestication. *Mol. Biol. Evol.* 35, 1712–1727. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy066>
- Lenth, R.V., 2009. Response-Surface Methods in R , Using rsm. *J. Stat. Softw.* 32. <https://doi.org/10.18637/jss.v032.i07>
- Li, S.-S., Cheng, C., Li, Z., Chen, J.-Y., Yan, B., Han, B.-Z., Reeves, M., 2010. Yeast species associated with wine grapes in China. *Int. J. Food Microbiol.* 138, 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.009>
- Lilly, M., Lambrechts, M.G., Pretorius, I.S., 2000. Effect of Increased Yeast Alcohol Acetyltransferase Activity on Flavor Profiles of Wine and Distillates. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 744–753. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.2.744-753.2000>
- Liu, H.-F., Wu, B.-H., Fan, P.-G., Li, S.-H., Li, L.-S., 2006. Sugar and acid concentrations in 98 grape cultivars analyzed by principal component analysis. *J. Sci. Food Agric.* 86, 1526–1536. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2541>
- Ljungdahl, P.O., Daignan-Fornier, B., 2012. Regulation of Amino Acid, Nucleotide, and Phosphate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 190, 885–929. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.133306>
- Lleixà, J., Manzano, M., Mas, A., Portillo, M. del C., 2016. *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* Competition during Microvinification under Different Sugar and Nitrogen Conditions. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01959>
- Lleixà, J., Martín, V., Giorello, F., Portillo, M.C., Carrau, F., Beltran, G., Mas, A., 2018. Analysis of the NCR Mechanisms in *Hanseniaspora vineae* and *Saccharomyces cerevisiae* During Winemaking. *Front. Genet.* 9, 747. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00747>
- Loira, I., Vejarano, R., Bañuelos, M.A., Morata, A., Tesfaye, W., Uthurry, C., Villa, A., Cintora, I., Suárez-Lepe, J.A., 2014. Influence of sequential fermentation with *Torulasporea delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* on wine quality. *LWT - Food Sci. Technol.* 59, 915–922. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.06.019>
- Long, G., Winefordner, J.D., 1983. Limit of detection : a closer look at the IUPAC definition. *Anal. Chem.* 55.
- Lynen, F., Engeser, H., Foerster, E.-C., Fox, J.L., Hess, S., Kresze, G.-B., Schmitt, T., Schreckenbach, T., Siess, E., Wieland, F., Winnewisser, W., 1980. On the Structure of Fatty Acid Synthetase of Yeast. *Eur. J. Biochem.* 112, 431–442. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1980.tb06105.x>
- Lytra, G., Franc, C., Cameleyre, M., Barbe, J.-C., 2017. Study of Substituted Ester Formation in Red Wine by the Development of a New Method for Quantitative Determination and Enantiomeric Separation of Their Corresponding Acids. *J. Agric. Food Chem.* 65, 5018–5025. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00979>

## M

- Magasanik, B., Kaiser, C.A., 2002. Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 290, 1–18.
- Mager, W., Siderius, M., 2002. Novel insights into the osmotic stress response of yeast. *FEMS Yeast Res.* 2, 251–257. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(02\)00116-2](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(02)00116-2)
- Magliani, W., Conti, S., Gerloni, M., Bertolotti, D., Polonelli, L., 1997. Yeast killer systems. *Clin. Microbiol. Rev.* 10, 369–400. <https://doi.org/10.1128/CMR.10.3.369>
- Maicas, S., Mateo, J.J., 2005. Hydrolysis of terpenyl glycosides in grape juice and other fruit juices: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67, 322–335. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1806-0>
- Malcorps, P., Cheval, J.M., Jamil, S., Dufour, J.P., 1991. A New Model for the Regulation of Ester Synthesis by Alcohol Acetyltransferase in *Saccharomyces Cerevisiae* during Fermentation. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 49, 47–53. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-49-0047>
- Malcorps, P., Dufour, J.-P., 1992. Short-chain and medium-chain aliphatic-ester synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 210, 1015–1022. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb17507.x>
- Manginot, C., Roustan, J.L., Sablayrolles, J.M., 1998. Nitrogen demand of different yeast strains during alcoholic fermentation. Importance of the stationary phase. *Enzyme Microb. Technol.* 23, 511–517. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(98\)00080-5](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(98)00080-5)
- Marais, J., 1983. Terpenes in the Aroma of Grapes and Wines: A Review. *South Afr. J. Enol. Vitic.* 4. <https://doi.org/10.21548/4-2-2370>
- Marini, A.M., Soussi-Boudekou, S., Vissers, S., Andre, B., 1997. A family of ammonium transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 17, 4282–4293. <https://doi.org/10.1128/MCB.17.8.4282>
- Marsit, S., Sanchez, I., Galeote, V., Dequin, S., 2016. Horizontally acquired oligopeptide transporters favour adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast to oenological environment: Impact of HGT genes on yeast metabolic pathways. *Environ. Microbiol.* 18, 1148–1161. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13117>
- Martin, B.D., Schwab, E., 2012. Current Usage of Symbiosis and Associated Terminology. *Int. J. Biol.* 5. <https://doi.org/10.5539/ijb.v5n1p32>
- Masneuf Pomarede, I., Mansour, C., Murat, M., Tominaga, T., Dubourdieu, D., 2006. Influence of fermentation temperature on volatile thiols concentrations in Sauvignon blanc wines. *Int. J. Food Microbiol.* <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.001>
- Maturano, Y.P., Assof, M., Fabani, M.P., Nally, M.C., Jofré, V., Rodríguez Assaf, L.A., Toro, M.E., Castellanos de Figueroa, L.I., Vazquez, F., 2015. Enzymatic activities produced by mixed *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* cultures: relationship with wine volatile composition. *Antonie Van Leeuwenhoek* 108, 1239–1256. <https://doi.org/10.1007/s10482-015-0578-0>
- Maturano, Y.P., Rodríguez Assaf, L.A., Toro, M.E., Nally, M.C., Vallejo, M., Castellanos de Figueroa, L.I., Combina, M., Vazquez, F., 2012. Multi-enzyme production by pure and mixed cultures of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts during wine fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 155, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.01.015>
- Mauricio, J.C., Guijo, S., Ortega, J.M., 1991. Relationship Between Phospholipid and Sterol Contents in *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulasporea delbrueckii* and their Fermentation Activity in Grape Musts. *Am. J. Enol. Vitic.* 42, 301.

- Mauricio, J.C., Millán, C., Ortega, J.M., 1998. Influence of oxygen on the biosynthesis of cellular fatty acids, sterols and phospholipids during alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspota delbrueckii*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14, 405–410. <https://doi.org/10.1023/A:1008873430077>
- Mauricio, J.C., Salmon, J.M., 1992. Apparent loss of sugar transport activity in *Saccharomyces cerevisiae* may mainly account for maximum ethanol production during alcoholic fermentation. *Biotechnol. Lett.* 14, 577–582.
- McGovern, P.E., Zhang, J., Tang, J., Zhang, Z., Hall, G.R., Moreau, R.A., Nunez, A., Butrym, E.D., Richards, M.P., Wang, C. -s., Cheng, G., Zhao, Z., Wang, C., 2004. Fermented beverages of pre- and proto-historic China. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 17593–17598. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407921102>
- Medina, K., Boido, E., Dellacassa, E., Carrau, F., 2012. Growth of non-*Saccharomyces* yeasts affects nutrient availability for *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 157, 245–250. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.012>
- Mendes-Ferreira, A., Mendes-Faia, A., Leao, 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02331.x>
- Mestre Furlani, M.V., Maturano, Y.P., Combina, M., Mercado, L.A., Toro, M.E., 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. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox010>
- Millard, P., Letisse, F., Sokol, S., Portais, J.-C., 2012. IsoCor: correcting MS data in isotope labeling experiments. *Bioinformatics* 28, 1294–1296. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts127>
- Minetoki, T., Bogaki, T., Iwamatsu, A., Fujii, T., Hamachi, M., 1993. The Purification, Properties and Internal Peptide Sequences of Alcohol Acetyltransferase Isolated from *Saccharomyces cerevisiae* Kyokai No. 7. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57, 2094–2098. <https://doi.org/10.1271/bbb.57.2094>
- Mira de Orduña, R., 2010. Climate change associated effects on grape and wine quality and production. *Food Res. Int.* 43, 1844–1855. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.05.001>
- Miyake, T., Loch, C.M., Li, R., 2002. Identification of a multifunctional domain in autonomously replicating sequence-binding factor 1 required for transcriptional activation, DNA replication, and gene silencing. *Mol. Cell. Biol.* 22, 505–516.
- Modig, T., Granath, K., Adler, L., Lidén, G., 2007. Anaerobic glycerol production by *Saccharomyces cerevisiae* strains under hyperosmotic stress. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75, 289–296. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0821-8>
- Molina, A.M., Swiegers, J.H., Varela, C., Pretorius, I.S., Agosin, E., 2007. Influence of wine fermentation temperature on the synthesis of yeast-derived volatile aroma compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77, 675–687. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1194-3>
- Morakul, S., Mouret, J.-R., Nicolle, P., Trelea, I.C., Sablayrolles, J.-M., Athes, V., 2011. Modelling of the gas–liquid partitioning of aroma compounds during wine alcoholic fermentation and prediction of aroma losses. *Process Biochem.* 46, 1125–1131. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.01.034>
- Morales, P., Rojas, V., Quirós, M., 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. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6321-3>

Mouret, J.R., Camarasa, C., Angenieux, M., Aguera, E., Perez, M., Farines, V., Sablayrolles, J.M., 2014. Kinetic analysis and gas–liquid balances of the production of fermentative aromas during winemaking fermentations: Effect of assimilable nitrogen and temperature. *Food Res. Int.* 62, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.02.044>

Mouret, J.R., Farines, V., Sablayrolles, J.M., Trelea, I.C., 2015. Prediction of the production kinetics of the main fermentative aromas in winemaking fermentations. *Biochem. Eng. J.* 103, 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.07.017>

Murat, M.-L., Masneuf, I., Darriet, P., Lavigne, V., Tominaga, T., Dubourdieu, D., 2001. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* Yeast Strains on the Liberation of Volatile Thiols in Sauvignon blanc Wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 52, 136.

## N

Nadai, C., Treu, L., Campanaro, S., Giacomini, A., Corich, V., 2016. Different mechanisms of resistance modulate sulfite tolerance in wine yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 797–813. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7169-x>

Nikolantonaki, M., Jourdes, M., Shinoda, K., Teissedre, P.-L., Quideau, S., Darriet, P., 2012. Identification of Adducts between an Odoriferous Volatile Thiol and Oxidized Grape Phenolic Compounds: Kinetic Study of Adduct Formation under Chemical and Enzymatic Oxidation Conditions. *J. Agric. Food Chem.* 60, 2647–2656. <https://doi.org/10.1021/jf204295s>

Ni-orn, C., 2008. Impact of protease activity of yeasts on wine fermentation and formation of volatile and non-volatile metabolites. Institute of Nutritional Science, Germany.

Nishino, H., Miyazaki, S., Tohjo, K., 1985. Effect of Osmotic Pressure on the Growth Rate and Fermentation Activity of Wine Yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.* 36, 170–174.

Nissen, M.E., 1997. Reengineering Support through Measurement-driven Inference. *Int. J. Intell. Syst. Account. Finance Manag.* 6, 109–120. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1174\(199706\)6:2<109::AID-ISAF124>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1174(199706)6:2<109::AID-ISAF124>3.0.CO;2-0)

Nissen, P., Nielsen, D., Arneborg, N., 2003. Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell-cell contact-mediated mechanism. *Yeast Chichester Engl.* 20, 331–341. <https://doi.org/10.1002/yea.965>

## O

Oelofse, A., Pretorius, I.S., du Toit, M., 2016. Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during Winemaking: A Synoptic Review. *South Afr. J. Enol. Vitic.* 29. <https://doi.org/10.21548/29-2-1445>

Olivares-Marin, I.K., Madrigal-Perez, L.A., Canizal-Garcia, M., García-Almendárez, B.E., González-Hernández, J.C., Regalado-Gonzalez, C., 2018. Interactions between carbon and nitrogen sources depend on RIM15 and determine fermentative or respiratory growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 4535–4548. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8951-3>

Ough, C.S., Crowell, E.A., 1987. Use of Sulfur Dioxide in Winemaking. *J. Food Sci.* 52, 386–388. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1987.tb06620.x>

Ough, C.S., Davenport, M., Joseph, K., 1989. Effects of Certain Vitamins on Growth and Fermentation Rate of Several Commercial Active Dry Wine Yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.* 40, 208.

## P

- Padilla, B., Gil, J.V., Manzanares, P., 2016. Past and Future of Non-Saccharomyces Yeasts: From Spoilage Microorganisms to Biotechnological Tools for Improving Wine Aroma Complexity. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00411>
- Pallmann, C., Brown, J.A., Olineka, T.L., Cocolin, L., Mills, D.A., Bisson, L.F., 2001. Use of WL Medium to Profile Native Flora Fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 52.
- Palmeri, R., Spagna, G., 2007.  $\beta$ -Glucosidase in cellular and acellular form for winemaking application. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 382–389. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.07.007>
- Pereira, C.F., 1988. The importance of metallic elements in wine. A literature survey. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 186, 295–300. <https://doi.org/10.1007/BF01027030>
- Pérez-Torrado, R., Carrasco, P., Aranda, A., Gimeno-Alcañiz, J., Pérez-Ortín, J.E., Matallana, E., del Olmo, M.L., 2002. Study of the first hours of microvinification by the use of osmotic stress-response genes as probes. *Syst. Appl. Microbiol.* 25, 153–161.
- Peter, J., De Chiara, M., Friedrich, A., Yue, J.-X., Pflieger, D., Bergström, A., Sigwalt, A., Barre, B., Freil, K., Llored, A., Cruaud, C., Labadie, K., Aury, J.-M., Istace, B., Lebrigand, K., Barbry, P., Engelen, S., Lemainque, A., Wincker, P., Liti, G., Schacherer, J., 2018. Genome evolution across 1,011 *Saccharomyces cerevisiae* isolates. *Nature* 556, 339–344. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0030-5>
- Petit, E., Jacquet, R., Pouységu, L., Deffieux, D., Quideau, S., 2019. Reactivity of wine polyphenols under oxidation conditions: Hemisynthesis of adducts between grape catechins or oak ellagitannins and odoriferous thiols. *Tetrahedron* 75, 551–560. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2018.11.071>
- Pina, C., Santos, C., Couto, J.A., Hogg, T., 2004. Ethanol tolerance of five non-Saccharomyces wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae*—influence of different culture conditions. *Food Microbiol.* 21, 439–447. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2003.10.009>
- Pineau, B., Barbe, J.-C., Van Leeuwen, C., Dubourdiou, D., 2009. Examples of Perceptive Interactions Involved in Specific “Red-” and “Black-berry” Aromas in Red Wines. *J. Agric. Food Chem.* 57, 3702–3708. <https://doi.org/10.1021/jf803325v>
- Pogorzelski, E., Wilkowska, A., 2007. Flavour enhancement through the enzymatic hydrolysis of glycosidic aroma precursors in juices and wine beverages: a review. *Flavour Fragr. J.* 22, 251–254. <https://doi.org/10.1002/ffj.1784>
- Pretorius, Isak S., 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16, 675–729. [https://doi.org/10.1002/1097-0061\(20000615\)16:8<675::AID-YEA585>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/1097-0061(20000615)16:8<675::AID-YEA585>3.0.CO;2-B)
- Pretorius, I. S., 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast Chichester Engl.* 16, 675–729. [https://doi.org/10.1002/1097-0061\(20000615\)16:8<675::AID-YEA585>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/1097-0061(20000615)16:8<675::AID-YEA585>3.0.CO;2-B)
- Prior, K.J., Bauer, F.F., Divol, B., 2019. The utilisation of nitrogenous compounds by commercial non-Saccharomyces yeasts associated with wine. *Food Microbiol.* 79, 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.12.002>
- Puertas, B., Jiménez, M.J., Cantos-Villar, E., Cantoral, J.M., 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. <https://doi.org/10.1111/jam.13375>



## Q

Quirós, M., Martínez-Moreno, R., Albiol, J., Morales, P., Vázquez-Lima, F., Barreiro-Vázquez, A., Ferrer, P., Gonzalez, R., 2013. Metabolic Flux Analysis during the Exponential Growth Phase of *Saccharomyces cerevisiae* in Wine Fermentations. *PLoS ONE* 8, e71909. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071909>

Quirós, M., Rojas, V., Gonzalez, R., 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.024>

## R

Rapp, A., 1998. Volatile flavour of wine: Correlation between instrumental analysis and sensory perception. *Food Nahr.* 42, 351–363. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3803\(199812\)42:06<351::AID-FOOD351>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3803(199812)42:06<351::AID-FOOD351>3.0.CO;2-2)

Raspor, P., Milek, D., Polanc, J., Smolemozina, S., Cadez, N., 2006. Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region, Slovenia. *Int. J. Food Microbiol.* 109, 97–102. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.017>

Reed, Nagodawithana, 1988. Technology of Yeast Usage in Winemaking. *Am J Enol Vitic* 39.

Reid, V.J., Theron, L.W., du Toit, M., Divol, B., 2012. Identification and partial characterization of extracellular aspartic protease genes from *Metschnikowia pulcherrima* IWBT Y1123 and *Candida apicola* IWBT Y1384. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 6838–6849. <https://doi.org/10.1128/AEM.00505-12>

Renault, P., Coulon, J., de Revel, G., Barbe, J.-C., Bely, M., 2015. Increase of fruity aroma during mixed *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae* wine fermentation is linked to specific esters enhancement. *Int. J. Food Microbiol.* 207, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.037>

Renault, P., Coulon, J., Moine, V., Thibon, C., Bely, M., 2016. Enhanced 3-Sulfanylhexan-1-ol Production in Sequential Mixed Fermentation with *Torulaspora delbrueckii*/*Saccharomyces cerevisiae* Reveals a Situation of Synergistic Interaction between Two Industrial Strains. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00293>

Renault, P., Miot-Sertier, C., Marullo, P., Hernández-Orte, P., Lagarrigue, L., Lonvaud-Funel, A., Bely, M., 2009. Genetic characterization and phenotypic variability in *Torulaspora delbrueckii* species: Potential applications in the wine industry. *Int. J. Food Microbiol.* 134, 201–210. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.06.008>

Renault, P.E., Albertin, W., Bely, M., 2013. An innovative tool reveals interaction mechanisms among yeast populations under oenological conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 4105–4119. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4660-5>

Ribereau-Gayon, J., Peynaud, E., 1960. *Traité d'Oenologie*, Beranger. ed. Paris.

Ribereau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donáeche, B., 2006. *Handbook of Enology: Volume 1*. John Wiley & Sons, Chichester.

Riou, C., Salmon, J.M., Vallier, M.J., Günata, Z., Barre, P., 1998. Purification, characterization, and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant beta-glucosidase from *Aspergillus oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3607–3614.

Rodríguez, M.E., Lopes, C.A., Barbagelata, R.J., Barda, N.B., Caballero, A.C., 2010a. Influence of *Candida pulcherrima* Patagonian strain on alcoholic fermentation behaviour and wine aroma. *Int. J. Food Microbiol.* 138, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.12.025>

- Rodriguez, M.E., Lopes, C.A., Broock, M., Valles, S., Ramon, D., Caballero, A.C., 2004. Screening and typing of Patagonian wine yeasts for glycosidase activities. *J. Appl. Microbiol.* 96, 84–95. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02032.x>
- Roland, A., Schneider, R., Razungles, A., Cavelier, F., 2011. Varietal Thiols in Wine: Discovery, Analysis and Applications. *Chem. Rev.* 111, 7355–7376. <https://doi.org/10.1021/cr100205b>
- Roland, A., Vialaret, J., Moniatte, M., Rigou, P., Razungles, A., Schneider, R., 2010a. Validation of a nanoliquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the identification and the accurate quantification by isotopic dilution of glutathionylated and cysteinylated precursors of 3-mercaptohexan-1-ol and 4-mercapto-4-methylpentan-2-one in white grape juices. *J. Chromatogr. A* 1217, 1626–1635. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.01.031>
- Roland, A., Vialaret, J., Razungles, A., Rigou, P., Schneider, R., 2010b. Evolution of S-Cysteinylated and S-Glutathionylated Thiol Precursors during Oxidation of Melon B. and Sauvignon blanc Musts. *J. Agric. Food Chem.* 58, 4406–4413. <https://doi.org/10.1021/jf904164t>
- Rollero, S., 2015. Impact des paramètres environnementaux sur la synthèse des arômes fermentaires par *Saccharomyces cerevisiae* en fermentation oenologique. Montpellier.
- Rollero, S., Bloem, A., Camarasa, C., Sanchez, I., Ortiz-Julien, A., Sablayrolles, J.-M., Dequin, S., Mouret, J.-R., 2014. Combined effects of nutrients and temperature on the production of fermentative aromas by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6210-9>
- Rollero, S., Bloem, A., Ortiz-Julien, A., Bauer, F.F., Camarasa, C., Divol, B., 2019. A comparison of the nitrogen metabolic networks of *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Environ. Microbiol.* <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14756>
- Rollero, S., Bloem, A., Ortiz-Julien, A., Camarasa, C., Divol, B., 2018a. Fermentation performances and aroma production of non-conventional wine yeasts are influenced by nitrogen preferences. *FEMS Yeast Res.* 18. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foy055>
- Rollero, S., Bloem, A., Ortiz-Julien, A., Camarasa, C., Divol, B., 2018b. Altered Fermentation Performances, Growth, and Metabolic Footprints Reveal Competition for Nutrients between Yeast Species Inoculated in Synthetic Grape Juice-Like Medium. *Front. Microbiol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00196>
- Rollero, S., Mouret, J.-R., Bloem, A., Sanchez, I., Ortiz-Julien, A., Sablayrolles, J.-M., Dequin, S., Camarasa, C., 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.* <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12749>
- Rollero, S., Mouret, J.-R., Sanchez, I., Camarasa, C., Ortiz-Julien, A., Sablayrolles, J.-M., Dequin, S., 2016. Key role of lipid management in nitrogen and aroma metabolism in an evolved wine yeast strain. *Microb. Cell Factories* 15. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0434-6>
- Romano, P., Suzzi, G., Comi, G., Zironi, R., 1992. Higher alcohol and acetic acid production by apiculate wine yeasts. *J. Appl. Bacteriol.* 73, 126–130. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1992.tb01698.x>
- Roncoroni, M., Santiago, M., Hooks, D.O., Moroney, S., Harsch, M.J., Lee, S.A., Richards, K.D., Nicolau, L., Gardner, R.C., 2011. The yeast IRC7 gene encodes a  $\beta$ -lyase responsible for production of the varietal thiol 4-mercapto-4-methylpentan-2-one in wine. *Food Microbiol.* 28, 926–935. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.01.002>



Rubio-Bretón, P., Gonzalo-Diago, A., Iribarren, M., Garde-Cerdán, T., Pérez-Álvarez, E.P., 2018. Bioprotection as a tool to free additives winemaking: Effect on sensorial, anthocyanic and aromatic profile of young red wines. *LWT* 98, 458–464. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.08.050>

Ruiz, J., Belda, I., Beisert, B., Navascués, E., Marquina, D., Calderón, F., Rauhut, D., Santos, A., Benito, S., 2018. Analytical impact of *Metschnikowia pulcherrima* in the volatile profile of Verdejo white wines. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 8501–8509. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9255-3>

## S

Sablayrolles, J.-M., Dubois, C., Manginot, C., Roustan, J.-L., Barre, P., 1996. Effectiveness of combined ammoniacal nitrogen and oxygen additions for completion of sluggish and stuck wine fermentations. *J. Ferment. Bioeng.* 82, 377–381. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(96\)89154-9](https://doi.org/10.1016/0922-338X(96)89154-9)

Sadineni, V., Kondapalli, N., Obulam, V.S.R., 2012. Effect of co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspota delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima* on the aroma and sensory properties of mango wine. *Ann. Microbiol.* 62, 1353–1360. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0383-6>

Sadoudi, M., Tourdot-Maréchal, R., Rousseaux, S., Steyer, D., Gallardo-Chacón, J.-J., Ballester, J., Vichi, S., Guérin-Schneider, R., Caixach, J., Alexandre, H., 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. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.06.006>

Saerens, S.M.G., Delvaux, F., Verstrepen, K.J., Van Dijck, P., Thevelein, J.M., Delvaux, F.R., 2008. Parameters Affecting Ethyl Ester Production by *Saccharomyces cerevisiae* during Fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 454–461. <https://doi.org/10.1128/AEM.01616-07>

Saerens, S.M.G., Delvaux, F.R., Verstrepen, K.J., Thevelein, J.M., 2010. Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Biotechnol.* 3, 165–177. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2009.00106.x>

Saerens, S.M.G., Verstrepen, K.J., Van Laere, S.D.M., Voet, A.R.D., Van Dijck, P., Delvaux, F.R., Thevelein, J.M., 2006. The *Saccharomyces cerevisiae* EHT1 and EEB1 genes encode novel enzymes with medium-chain fatty acid ethyl ester synthesis and hydrolysis capacity. *J. Biol. Chem.* 281, 4446–4456. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512028200>

Salmon, J.M., 1989. Effect of Sugar Transport Inactivation in *Saccharomyces cerevisiae* on Sluggish and Stuck Enological Fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 953–958.

Santiago, M., Gardner, R.C., 2015a. Yeast genes required for conversion of grape precursors to varietal thiols in wine. *FEMS Yeast Res.* 15, fov034. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov034>

Santiago, M., Gardner, R.C., 2015b. The IRC7 gene encodes cysteine desulphhydrase activity and confers on yeast the ability to grow on cysteine as a nitrogen source: IRC7 encodes a cysteine desulphhydrase and confers growth on cysteine as N source. *Yeast* 32, 519–532. <https://doi.org/10.1002/yea.3076>

Schneider, R., Charrier, F., Razungles, A., Baumes, R., 2006. Evidence for an alternative biogenetic pathway leading to 3-mercaptohexanol and 4-mercapto-4-methylpentan-2-one in wines. *Anal. Chim. Acta* 563, 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.01.057>

Schreier, P., Jennings, W.G., 1979. Flavor composition of wines: A review. *C R C Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 12, 59–111. <https://doi.org/10.1080/10408397909527273>

Schütz, M., Gafner, J., 1993. Analysis of yeast diversity during spontaneous and induced alcoholic fermentations. *J. Appl. Bacteriol.* 75, 551–558. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb01594.x>

- Seguinot, P., Rollero, S., Sanchez, I., Sablayrolles, J.-M., Ortiz-Julien, A., Camarasa, C., Mouret, J.-R., 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. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.04.005>
- Shekhawat, K., Patterton, H., Bauer, F.F., Setati, M.E., 2019. RNA-seq based transcriptional analysis of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lachancea thermotolerans* in mixed-culture fermentations under anaerobic conditions. *BMC Genomics* 20. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5511-x>
- Shinohara, T., 1985. Gas Chromatographic Analysis of Volatile Fatty Acids in Wines. *Agric. Biol. Chem.* 49, 2211–2212. <https://doi.org/10.1080/00021369.1985.10867054>
- Siebert, T.E., Smyth, H.E., Capone, D.L., Neuwöhner, C., Pardon, K.H., Skouroumounis, G.K., Herderich, M.J., Sefton, M.A., Pollnitz, A.P., 2005. Stable isotope dilution analysis of wine fermentation products by HS-SPME-GC-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 381, 937–947. <https://doi.org/10.1007/s00216-004-2992-4>
- Simonin, S., Alexandre, H., Nikolantonaki, M., Coelho, C., Tourdot-Maréchal, R., 2018. Inoculation of *Torulaspota delbrueckii* as a bio-protection agent in winemaking. *Food Res. Int.* 107, 451–461. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.034>
- Slaninová, I., Šesták, S., Svoboda, A., Farkaš, V., 2000. Cell wall and cytoskeleton reorganization as the response to hyperosmotic shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 173, 245–252. <https://doi.org/10.1007/s002030000136>
- Spagna, G., Barbagallo, R.N., Palmeri, R., Restuccia, C., Giudici, P., 2002. Properties of endogenous  $\beta$ -glucosidase of a *Saccharomyces cerevisiae* strain isolated from Sicilian musts and wines. *Enzyme Microb. Technol.* 31, 1030–1035. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00233-8](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00233-8)
- Spor, A., Nidelet, T., Simon, J., Bourgais, A., de Vienne, D., Sicard, D., 2009. Niche-driven evolution of metabolic and life-history strategies in natural and domesticated populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Evol. Biol.* 9, 296. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-296>
- Steiner, H.-Y., Naider, F., Becker, J.M., 1995. The PTR family: a new group of peptide transporters. *Mol. Microbiol.* 16, 825–834. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02310.x>
- Steyer, D., Erny, C., Claudel, P., Riveill, G., Karst, F., Legras, J.-L., 2013. Genetic analysis of geraniol metabolism during fermentation. *Food Microbiol.* 33, 228–234. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.09.021>
- Strauss, M.L., Jolly, N.P., Lambrechts, M.G., van Rensburg, P., 2001. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.* 91, 182–190.
- Su, Y., Origone, A.C., Rodríguez, M.E., Querol, A., Guillamón, J.M., Lopes, C.A., 2019. Fermentative behaviour and competition capacity of cryotolerant *Saccharomyces* species in different nitrogen conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 291, 111–120. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.11.020>
- Su, Y., Seguinot, P., Sanchez, I., Ortiz-Julien, A., Heras, J.M., Querol, A., Camarasa, C., Guillamón, J.M., 2020. Nitrogen sources preferences of non-*Saccharomyces* yeasts to sustain growth and fermentation under winemaking conditions. *Food Microbiol.* 85, 103287. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103287>
- Subileau, M., Schneider, R., Salmon, J.-M., Degryse, E., 2008a. New Insights on 3-Mercaptohexanol (3MH) Biogenesis in Sauvignon Blanc Wines: Cys-3MH and E-Hexen-2-al Are Not the Major Precursors. *J. Agric. Food Chem.* 56, 9230–9235. <https://doi.org/10.1021/jf801626f>
- Subileau, M., Schneider, R., Salmon, J.-M., Degryse, E., 2008b. 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. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00400.x>

Swangkeaw, J., Vichitphan, S., Butzke, C.E., Vichitphan, K., 2011. Characterization of  $\beta$ -glucosidases from *Hanseniaspora* sp. and *Pichia anomala* with potentially aroma-enhancing capabilities in juice and wine. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27, 423–430. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0474-8>

Swiegers, J.H., Bartowsky, E.J., Henschke, P.A., Pretorius, I.S., 2005. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Aust. J. Grape Wine Res.* 11, 139–173. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00285.x>

Swiegers, J.H., Capone, D.L., Pardon, K.H., Eley, G.M., Sefton, M.A., Francis, I.L., Pretorius, I.S., 2007. Engineering volatile thiol release in *Saccharomyces cerevisiae* for improved wine aroma. *Yeast* 24, 561–574. <https://doi.org/10.1002/yea.1493>

Swiegers, J.H., Willmott, R., Hill-Ling, A., Capone, D.L., Pardon, K.H., Eley, G.M., Howell, K.S., de Barros Lopes, M.A., Sefton, M.A., Lilly, M., Pretorius, I.S., 2006. Modulation of volatile thiol and ester aromas by modified wine yeast, in: *Developments in Food Science*. Elsevier, pp. 113–116. [https://doi.org/10.1016/S0167-4501\(06\)80027-0](https://doi.org/10.1016/S0167-4501(06)80027-0)

## T

Taillandier, P., Lai, Q.P., Julien-Ortiz, A., Brandam, C., 2014. Interactions between *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* in wine fermentation: influence of inoculation and nitrogen content. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 30, 1959–1967. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1618-z>

Thibon, C., Böcker, C., Shinkaruk, S., Moine, V., Darriet, P., Dubourdieu, D., 2016. Identification of S-3-(hexanal)-glutathione and its bisulfite adduct in grape juice from *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc as new potential precursors of 3SH. *Food Chem.* 199, 711–719. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.069>

Thibon, C., Marullo, P., Claisse, O., Cullin, C., Dubourdieu, D., Tominaga, T., 2008. Nitrogen catabolic repression controls the release of volatile thiols by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *FEMS Yeast Res.* 8, 1076–1086. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00381.x>

Thomas, D., Surdin-Kerjan, Y., 1997. Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* MMBR 61, 503–532.

Tominaga, T., Baltenweck-Guyot, R., Gachons, C.P.D., Dubourdieu, D., 2000. Contribution of Volatile Thiols to the Aromas of White Wines Made From Several *Vitis vinifera* Grape Varieties. *Am. J. Enol. Vitic.* 51, 178.

Tominaga, T., Masneuf-Pomarède, I., Dubourdieu, D., 1995. A S-cysteine conjugate, precursor of aroma of White Sauvignon. *OENO One* 29, 227. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.1995.29.4.1123>

Tominaga, T., Peyrot des Gachons, C., Dubourdieu, D., 1998. A New Type of Flavor Precursors in *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc: S-Cysteine Conjugates. *J. Agric. Food Chem.* 46, 5215–5219. <https://doi.org/10.1021/jf980481u>

Torija, M.J., Beltran, G., Novo, M., Poblet, M., Guillamón, J.M., Mas, A., Rozès, N., 2003a. Effects of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine. *Int. J. Food Microbiol.* 85, 127–136.

Torija, M.J., Rozès, N., Poblet, M., Guillamón, J.M., Mas, A., 2003b. Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.* 80, 47–53.

Torrea, D., Varela, C., Ugliano, M., Ancin-Azpilicueta, C., Leigh Francis, I., 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.092>

Tronchoni, J., Curiel, J.A., Morales, P., Torres-Pérez, R., Gonzalez, R., 2017. Early transcriptional response to biotic stress in mixed starter fermentations involving *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspota delbrueckii*. *Int. J. Food Microbiol.* 241, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.017>

## V

Valera, M.J., Morcillo-Parra, M.Á., Zagórska, I., Mas, A., Beltran, G., Torija, M.J., 2019. Effects of melatonin and tryptophol addition on fermentations carried out by *Saccharomyces cerevisiae* and non-*Saccharomyces* yeast species under different nitrogen conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 289, 174–181. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.09.013>

van der Aa Kühle, A., Jespersen, L., 1998. Detection and identification of wild yeasts in lager breweries. *Int. J. Food Microbiol.* 43, 205–213.

Van Dijken, J.P., Scheffers, A., 1986. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 199–224.

van Roermund, C.W., Elgersma, Y., Singh, N., Wanders, R.J., Tabak, H.F., 1995. The membrane of peroxisomes in *Saccharomyces cerevisiae* is impermeable to NAD(H) and acetyl-CoA under in vivo conditions. *EMBO J.* 14, 3480–3486. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb07354.x>

VanNice, J.C., Skaff, D.A., Keightley, A., Addo, J.K., Wyckoff, G.J., Miziorko, H.M., 2014. Identification in *Haloferax volcanii* of Phosphomevalonate Decarboxylase and Isopentenyl Phosphate Kinase as Catalysts of the Terminal Enzyme Reactions in an Archaeal Alternate Mevalonate Pathway. *J. Bacteriol.* 196, 1055–1063. <https://doi.org/10.1128/JB.01230-13>

Varela, C., 2016. The impact of non-*Saccharomyces* yeasts in the production of alcoholic beverages. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7941-6>

Varela, C., Barker, A., Tran, T., Borneman, A., Curtin, C., 2017. Sensory profile and volatile aroma composition of reduced alcohol Merlot wines fermented with *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum*. *Int. J. Food Microbiol.* 252, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.04.002>

Varela, C., Sengler, F., Solomon, M., Curtin, C., 2016. Volatile flavour profile of reduced alcohol wines fermented with the non-conventional yeast species *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum*. *Food Chem.* 209, 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.024>

Varela, C., Torrea, D., Schmidt, S.A., Ancin-Azpilicueta, C., Henschke, P.A., 2012. Effect of oxygen and lipid supplementation on the volatile composition of chemically defined medium and Chardonnay wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chem.* 135, 2863–2871. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.127>

Venkatesh, A., Murray, A.L., Boyle, A.B., Quinn Farrington, L., Maher, T.J., Ó'Gaora, P., Wolfe, K.H., O'Brien, C.E., Butler, G., 2018. Draft Genome Sequence of a Highly Heterozygous Yeast Strain from the *Metschnikowia pulcherrima* Subclade, UCD127. *Genome Announc.* 6. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00550-18>

Verstrepen, K., Derdelinckx, G., Dufour, J., Winderickx, J., Pretorius, I., Thevelein, J., Delvaux, F., 2003. The alcohol acetyl transferase gene is a target of the cAMP/PKA and FGM nutrient-signalling pathways. *FEMS Yeast Res.* 4, 285–296. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(03\)00166-1](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(03)00166-1)

Viegas, C.A., Rosa, M.F., Sá-Correia, I., Novais, J.M., 1989. Inhibition of Yeast Growth by Octanoic and Decanoic Acids Produced during Ethanol Fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 21–28.

Vilanova, M., Ugliano, M., Varela, C., Siebert, T., Pretorius, I.S., 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. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1145-z>

Villena, M.A., Iranzo, J.F.Ú., Pérez, A.I.B., 2007.  $\beta$ -Glucosidase activity in wine yeasts: Application in enology. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 420–425. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.07.013>

Vuralhan, Z., Morais, M.A., Tai, S.-L., Piper, M.D.W., Pronk, J.T., 2003. Identification and characterization of phenylpyruvate decarboxylase genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4534–4541.

## W

Wakabayashi, H., Wakabayashi, M., Eisenreich, W., Engel, K.-H., 2004. Stereochemical course of the generation of 3-mercaptohexanal and 3-mercaptohexanol by beta-lyase-catalyzed cleavage of cysteine conjugates. *J. Agric. Food Chem.* 52, 110–116. <https://doi.org/10.1021/jf0305478>

Wang, C., García-Fernández, D., Mas, A., Esteve-Zarzoso, B., 2015. Fungal diversity in grape must and wine fermentation assessed by massive sequencing, quantitative PCR and DGGE. *Front. Microbiol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01156>

Wang, X.D., Bohlscheid, J.C., Edwards, C.G., 2003. Fermentative activity and production of volatile compounds by *Saccharomyces* grown in synthetic grape juice media deficient in assimilable nitrogen and/or pantothenic acid. *J. Appl. Microbiol.* 94, 349–359. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01827.x>

Winter, G., Van Der Westhuizen, T., Higgins, V.J., Curtin, C., Ugliano, M., 2011. Contribution of cysteine and glutathione conjugates to the formation of the volatile thiols 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) and 3-mercaptohexyl acetate (3MHA) during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: Contribution of precursors to 3MH and 3MHA release. *Aust. J. Grape Wine Res.* 17, 285–290. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2011.00127.x>

## X

Xue, Y., Zhao, L., Liu, H. -w., Sherman, D.H., 1998. A gene cluster for macrolide antibiotic biosynthesis in *Streptomyces venezuelae*: Architecture of metabolic diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 12111–12116. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.21.12111>

## Y

Yang, H.Y., 1975. Effect of Sulfur Dioxide on the Activity of *Schizosaccharomyces Pombe*. *Am. J. Enol. Vitic.* 26, 1.

Yap, N.A., de Barros Lopes, M., Langridge, P., Henschke, P.A., 2000. The incidence of killer activity of non- *Saccharomyces* yeasts towards indigenous yeast species of grape must: potential application in wine fermentation: killer yeast activity in winemaking. *J. Appl. Microbiol.* 89, 381–389. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01124.x>

Ye, Z.-H., Garrad, R.C., Winston, M.K., Bhattacharjee, J.K., 1991. Use of  $\alpha$ -aminoadipate and lysine as sole nitrogen source by *Schizosaccharomyces pombe* and selected pathogenic fungi. *J. Basic Microbiol.* 31, 149–156. <https://doi.org/10.1002/jobm.3620310215>

Yuasa, N., Nakagawa, Y., Hayakawa, M., Iimura, Y., 2004. Distribution of the sulfite resistance gene SSU1-R and the variation in its promoter region in wine yeasts. *J. Biosci. Bioeng.* 98, 394–397. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(04\)00303-2](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(04)00303-2)

Yunoki, K., Yasui, Y., Hirose, S., 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.

## Z

Zabriskie, T.M., Jackson, M.D., 2000. Lysine biosynthesis and metabolism in fungi. *Nat. Prod. Rep.* 17, 85–97.

Zamuz, S., Sestelo, A.B.F., Poza, M., Villa, T.G., 2004. Enzymes as Potential Markers of Wine Aging. *J. Inst. Brew.* 110, 220–226. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2004.tb00206.x>

Zohre, D.E., Erten, H., 2002. The influence of *Kloeckera apiculata* and *Candida pulcherrima* yeasts on wine fermentation. *Process Biochem.* 38, 319–324. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00086-9](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00086-9)

Zott, K., Thibon, C., Bely, M., Lonvaud-Funel, A., Dubourdieu, D., Masneuf-Pomarede, I., 2011. The grape must non-Saccharomyces microbial community: Impact on volatile thiol release. *Int. J. Food Microbiol.* 151, 210–215. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.026>

Au cours de fermentations spontanées, de nombreuses levures indigènes de la flore du moût de raisin sont impliquées dans les premières étapes du procédé de vinification. Ces levures, peu adaptées aux fortes concentrations en éthanol et aux limitations en oxygène, sont par la suite remplacées par *S. cerevisiae* dont la présence est nécessaire au bon déroulement de la fermentation. Néanmoins, les levures non-*Saccharomyces* peuvent contribuer de façon positive à la qualité organoleptique des vins. L'objectif général de cette thèse est d'apporter de nouvelles connaissances sur la physiologie de *Torulaspora delbrueckii* et *Metschnikowia pulcherrima*, deux levures non-*Saccharomyces* distribuées par la société Lallemand, afin de mieux exploiter leurs potentialités en fermentation œnologique, notamment pour la production d'arômes. Une première partie du projet a été dédiée à l'étude du métabolisme de *T. delbrueckii* et *M. pulcherrima*, tout d'abord en déterminant leurs performances fermentaires et leur production d'arômes en utilisant différentes sources d'azote. Des propriétés spécifiques à *T. delbrueckii* et *M. pulcherrima* ont été identifiées au niveau de la capacité de consommation des composés azotés et du profil de formation des arômes, même si de façon globale, l'incidence de la nature de la source d'azote est similaire à celle de *S. cerevisiae*. Le devenir de certains acides aminés dans le réseau métabolique a ensuite été élucidé par des approches de traçage isotopique, montrant une gestion différente des acides aminés par les deux levures non-*Saccharomyces* : vers la biosynthèse des protéines pour *T. delbrueckii* et vers la formation d'alcools supérieurs pour *M. pulcherrima*. La deuxième partie du projet a porté sur l'étude des levures non-*Saccharomyces* en fermentation séquentielle avec *S. cerevisiae*, en fonction de la disponibilité en nutriments. Des variations dans la réponse de la production des arômes fermentaires et variétaux (thiols) aux teneurs en sucre, azote et lipides ont été mises en évidence entre les deux modalités d'inoculation séquentielle et des fermentations de *S. cerevisiae* en souche pure, qui s'expliquent par des interactions entre *S. cerevisiae* et les levures non-*Saccharomyces* et leurs particularités métaboliques. Enfin, l'intérêt de l'utilisation de levures non-*Saccharomyces* a été évalué en moût naturel, montrant la contribution positive de ces levures sur le profil aromatique des vins. Les connaissances apportées dans ce projet permettront de définir des stratégies de gestion de la fermentation utilisant au mieux les propriétés de *T. delbrueckii* et *M. pulcherrima* pour produire des vins présentant une typicité aromatique marquée.

Mots-clés : *T. delbrueckii*, *M. pulcherrima*, fermentation alcoolique, inoculation séquentielle, arômes.

During spontaneous fermentations, many indigenous yeasts from the grape must flora are involved in the first steps of the winemaking process. These yeasts, poorly adapted to high ethanol concentration and limited oxygen availability, are later overcome by *S. cerevisiae*, required to complete the fermentation. Nevertheless, non-*Saccharomyces* yeasts may positively contribute to the organoleptic quality of wines. The main objective of this project is to provide a new knowledge on the physiology of *Torulaspora delbrueckii* and *Metschnikowia pulcherrima*, two non-*Saccharomyces* yeasts distributed by Lallemand SAS, to better exploit their potentialities during wine fermentation in particular for the production of aromas. The project was first focused on investigating *T. delbrueckii* and *M. pulcherrima* metabolisms, determining their fermentation performances and aroma production using various nitrogen sources. Strain-specific properties in terms of capability to consume the different nitrogen compounds and to synthesize volatile compounds were revealed, although the overall incidence of the nature of the nitrogen source was close to that of *S. cerevisiae*. The fate of some individual amino acids throughout the metabolic network has been then elucidated using isotopic tracer experiments, showing a different management of the nitrogen resource between the two non-*Saccharomyces* species: toward the protein biosynthesis for *T. delbrueckii* and toward the synthesis of higher alcohols for *M. pulcherrima*. The second part was dedicated to the analysis of the non-*Saccharomyces* yeasts in sequential inoculation with *S. cerevisiae*, according to nutrient availability. Substantial variations were found in the response to sugar, nitrogen and lipids content of the production of fermentative and varietal (thiols) aromas between the two modalities of sequential fermentation and *S. cerevisiae* pure culture, related to interactions between *S. cerevisiae* and the non-*Saccharomyces* yeasts and their metabolic specificities. Finally, the benefit of the use of non-*Saccharomyces* yeasts was assessed in natural must, revealing the positive impact of non-*Saccharomyces* yeasts on the aroma profile of wines. This knowledge will allow to design fermentation management strategies making best use of *T. delbrueckii* and *M. pulcherrima* properties for the production of wines with a strong aromatic character.

Key words: *T. delbrueckii*, *M. pulcherrima*, alcoholic fermentation, sequential inoculation, aromas.