

THESE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DU CENTRE INTERNATIONAL D'ETUDES SUPERIEURES EN SCIENCES AGRONOMIQUES –
MONTPELLIER SUPAGRO**

Ecole Doctorale : Sciences des Procédés – Sciences des Aliments
Spécialité : Biotechnologie, Microbiologie

Présentée et soutenue publiquement par

Tiphaine CLEMENT

Le 28 septembre 2012

**Utilisation d'un fermenteur continu multi-étagé pour la
compréhension des mécanismes d'adaptation de la levure à
des ajouts d'azote en conditions œnologiques**

JURY

Pascale DARAN-LAPUJADE	Assistant professeur, University of Technology, Delft, Pays Bas	Rapporteur
Patricia TAILLANDIER	Professeur, ENSIACET, Toulouse, France	Rapporteur
Charles GHOMMIDH	Professeur, Polytech'Montpellier, Montpellier, France	Examineur
Stéphane GUILLOUET	Maître de conférences, INSA, Toulouse, France	Examineur
Carole CAMARASA	Chargée de recherche, INRA, Montpellier, France	Co-encadrante
Jean-Marie SABLAYROLLES	Directeur de Recherche, INRA, Montpellier, France	Directeur de Thèse

Remerciements

Avant toute chose je tiens à remercier mes encadrants, Carole Camarasa et Jean-Marie Sablayrolles qui m'ont confié ce projet de thèse, l'ont accompagné de leur disponibilité et de leur expérience et ont permis son achèvement avec efficacité et dans la bonne humeur.

Je remercie également les membres de mon comité de thèse Pascal Bonnarme et Stephane Guillouet ainsi que les autres membres du jury d'avoir accepté de jugé ce travail et de faire le déplacement pour écouter ma soutenance ; tout particulièrement merci aux deux rapportrices Pascale Daran-Lapujade et Patricia Taillandier pour leurs remarques et leurs questions ; merci également à Charles Ghommidh d'avoir présidé ce jury et fourni le rapport final

Je souhaite remercier tous les gens à SPO qui ont partagé leur labo et leur expérience, conseillé, prêté, ri et sué avec moi sur les pannes de machines et autres réjouissances inhérentes à la vie de la recherche

Un grand merci à Marc Pérez pour le temps passé à m'expliquer les secrets du multi-étagé (surtout la fameuse technique du comptage de gouttes), et ceux encore mieux conservés de l'HPLC et de la CPG

Un aussi grand merci à Christian Picou pour m'avoir appris la recette du MS300, alias MS425, alias la potion magique des gaulois (et oui, pour ceux qui l'ignoraient encore) et surtout la technique de l'agitation au manche à balais en cas de besoin supérieur à 50L (comme pour la bataille de Lugdunum par exemple, ou n'importe quelle manip en multi-étagé). Et surtout merci d'avoir su dompté le Coulter...

Un très grand merci à Jean-Roch Mouret d'avoir partagé son bureau, ses idées, son enthousiasme et sa bonne humeur. Merci pour les conseils et les encouragements qui ont su gonfler ma motivation dans les moments difficiles comme dans les bons jours

Un tout aussi grand merci à Isabelle Sanchez d'avoir bûché sur les plans d'expériences et les analyses de puce à ADN, et surtout d'avoir tenté de me faire

comprendre le principe des stats (bien essayé ! je crois qu'elles sont passées du côté obscure au côté moins sombre)

Un énorme merci à Pierre Delobel et Christian Brion d'avoir partagé leur savoir faire sur la manipulation de l'ARN et les analyses transcriptomiques, et leur vocabulaire comme «c'est pas EC1118, c'est MTF1309 » « flagger les spots », ou « J'men fous j'suis sur Linux »

Merci à Sylvie Dequin pour l'aide apportée sur l'analyse des données

Merci à Cécile Cadoux pour les dosages de métabolites intracellulaires

Merci à Thérèse Marlin et Martine Pradal pour les dosages d'acides aminés (et merci à Lucie d'avoir partagé le biochrom ;-))

Un merci particulier à Maeva Subileau, Didier Ollé et Jean-Luc Legras qui m'ont fait confiance et prêté leurs étudiants afin que je puisse m'essayer à l'encadrement de TP

Merci à Jocelyne Billot pour sa réactivité et son efficacité face au labyrinthe administratif.

Mais surtout, j'adresse mes sincères remerciements à tous ceux qui ont contribué à rendre la vie plus drôle, plus belle ou tout simplement plus légère pendant ces trois années ; un énorme merci donc :

A celles et ceux qui m'ont accompagné au pied du mur, poussée à gravir les sommets et maintenue en équilibre sur la corde raide : Lucie, Christian, Marie, Olivier, Magalie, Colin, Laure, Nina, Rémi et Altissimo

Ceux qui m'ont fait courir : Christian, Valentin et Amélie

Celles et ceux qui m'ont fourni un toit lors de mes errances entre deux vies et deux pieds à terre : Lucie (Encore !), Claire, Marlène, Tonio et Century 21

Ceux qui ont partagé leur loyer pendant la courte vie de notre colocation : Lucie (Décidemment !) et Nico

Ceux qui ont tenté de m'apprendre leur langue : Pookie, My, Isabel, Annalisa, Michael. Christian et Pierre (voir plus haut ;-))

Ceux qui m'ont fait découvrir les pouvoirs de la Force : Isabelle, Nicolas et Christian

A ceux qui m'ont fait rire et ont souri à mes blagues débiles autour du café de 10h (ou 10h30) : tout SPO ou presque !

Merci à FIP, Nova et madame Roux pour la bande son, Benoit Grossin pour les infos, Youtube et Topito pour les gens qui tombent

Merci à Michael pour tout le reste d'avoir donné un sens spécial à cette aventure.

Sommaire

Liste des communications liées à ce travail	xi
Liste des figures	xiii
Liste des tableaux	xv
Liste des symboles et abréviations	xvii
Introduction	1
Bibliographie	5
1 La fermentation alcoolique en œnologie	7
1.1 Caractéristiques	7
1.2 Déroulement	8
1.3 Métabolisme des levures	9
2 Importance de l'azote en fermentation œnologique	13
2.1 Rôle de l'azote	13
2.2 Les différentes sources d'azote	14
2.3 Assimilation des sources d'azote	14
2.3.1 Transporteurs et perméases	14
2.3.2 Ordre d'assimilation et utilisation des sources	17
2.4 Notion d'efficacité des sources	19
2.5 Métabolisme azoté central et synthèse des acides aminés	21
2.6 Régulation du métabolisme azoté	23
3 Synthèse des composés volatils	24
3.1 Les alcools supérieurs	25
3.1.1 Synthèse à partir des acides aminés ramifiés : la voie d'Ehrlich	26
3.1.2 Autres voies de synthèse	28
3.2 Les esters	29
3.3 Effet des ajouts d'azote sur la synthèse des composés volatils	30
4 La fermentation continue	33
4.1 Le chemostat	33
4.1.1 Principe	33
4.1.2 Fonctionnement	34
4.1.3 Intérêt et applications	35
4.2 Fermentation continue-multi-étagée	36
4.2.1 Principe	36
4.2.2 Applications	39

4.3 Procédés continus en vinification _____	39
Matériels et méthodes _____	41
1 Souches de levures _____	43
2 Milieux de culture _____	43
2.1 Milieux de fermentation _____	43
2.1.1 Composition du milieu _____	44
3 Fermentations _____	47
3.1 Pré-culture _____	47
3.1.1 Milieu _____	47
3.1.2 Conditions _____	47
3.2 Fermentation en batch _____	47
3.2.1 Matériel _____	47
3.2.2 Conduite de fermentation _____	48
3.3 Fermentation continue-multi-étagée _____	48
3.3.1 Matériel _____	48
3.3.2 Mise en œuvre du MSCF _____	50
4 Méthodes de dosage _____	50
4.1 Détermination de la quantité de biomasse _____	50
4.1.1 Mesure de la population cellulaire et volume cellulaire moyen _____	50
4.1.2 Détermination de la matière sèche _____	50
4.2 Métabolites extracellulaires _____	51
4.3 Composés volatils _____	51
4.4 Métabolites intracellulaires _____	52
4.4.1 Prélèvement et extraction _____	52
4.4.2 Séparation et quantification _____	53
4.5 Azote assimilable _____	54
4.5.1 Dosage des acides aminés libres _____	54
4.5.2 Azote minéral _____	55
5 Analyse transcriptomique _____	56
5.1 Prélèvement des échantillons _____	56
5.2 Extraction et purification des ARN totaux _____	56
5.3 Marquage _____	57
5.4 Hybridation _____	57
5.5 Acquisition des données transcriptomiques et analyse statistique _____	57

Résultats	59
Chapitre I	61
Mise au point d'un fermenteur continu multi-étagé pour reproduire les conditions de la fermentation œnologique	61
Chapitre II	79
Etude de l'effet d'un ajout pulsé d'azote sur le métabolisme de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en fermenteur continu multi-étagé	79
Chapitre III	125
Intérêt du fermenteur continu multi-étagé pour l'étude de l'adaptation métaboliques des levures à un ajout d'azote en cours de fermentation alcoolique	125
Conclusion générale	201
Références bibliographiques	213

Liste des communications liées à ce travail

Publication

Clement, T., Perez, M., Mouret, J. R., Sablayrolles, J. M. & Camarasa, C. (2011). Use of a continuous multistage bioreactor to mimic winemaking fermentation. *Int J Food Microbiol* 150, 42–49.

Clement, T., Perez, M., Mouret, J. R., Sablayrolles, J. M. & Camarasa. Study of the effect of nitrogen addition in winemaking fermentation. Interest of using a multistage continuous fermentation device. *Appl. Envir. Microb.*, submitted.

Clement, T., Perez, M., Sanchez I., Sablayrolles, J. M. & Camarasa. Interest of a multistage bioreactor to study the metabolic adaptation to nitrogen supplementation during alcoholic fermentation. *BMC Genomics*. To be submitted.

Communication orale

Clement, T., Perez, M., Mouret, J. R., Sablayrolles, J.M., & Camarasa, C. (2010). Multi-stage continuous fermentation. *CAFE meeting – Vigo, Espagne.*

Posters

Clement, T., Perez, M., Mouret, J. R., Sablayrolles, J.M., & Camarasa, C. (2011). Étude de la physiologie des levures en conditions œnologiques en fermenteur continu multi-étagé . *Journée de l'ED-SPSA*. Montpellier, France.

Clement, T., Perez, M., Mouret, J. R., Sablayrolles, J.M., & Camarasa, C. (2012). Utilisation d'un fermenteur continu multi-étagé pour l'étude du métabolisme des levures en fermentation alcoolique. *10^e rencontre Levure Modèles & Outils*. Toulouse, France.

Clement, T., Perez, M., Mouret, J. R., Sanchez, I., Sablayrolles, J.M., & Camarasa, C. (2012). Utilisation d'un fermenteur continu multi-étagé pour l'étude du métabolisme des levures en fermentation alcoolique. *Journée de l'ED-SPSA*. Montpellier, France.

Liste des figures

<i>Figure 1 Evolution des paramètres de fermentation au cours du temps lors d'une fermentation en batch à 28°C. La souche utilisée est EC1118 et le moût de fermentation contient 425 mg/l d'azote assimilable (MS425)</i>	<i>9</i>
<i>Figure 2 Métabolisme carboné central en fermentation œnologique.....</i>	<i>11</i>
<i>Figure 3 Voie des pentoses phosphates.....</i>	<i>12</i>
<i>Figure 4 Métabolisme de l'azote</i>	<i>21</i>
<i>Figure 5 Synthèse des acides aminés à partir du métabolisme carboné et de l'ammonium.</i>	<i>22</i>
<i>Figure 6 Vue d'ensemble des métabolismes carbonés et azotés chez la levure et leur rôle dans la synthèse des alcools supérieurs et des esters</i>	<i>25</i>
<i>Figure 7 Voie d'Ehrlich et synthèse des esters.</i>	<i>26</i>
<i>Figure 8 Synthèse des alcools supérieurs - influence du métabolisme carboné</i>	<i>29</i>
<i>Figure 9 Schéma du chemostat.</i>	<i>34</i>
<i>Figure 10 Schéma d'un fermenteur continu multi-étagé à i étages.</i>	<i>37</i>
<i>Figure M1 Schéma d'une cuve de fermentation.....</i>	<i>48</i>
<i>Figure M2 Schéma du fermenteur continu multi-étagé</i>	<i>49</i>
<i>Figure M3 Programme de température du four pour le dosage des composés volatils.....</i>	<i>52</i>
<i>Figure M4 Gradient d'acétate de sodium utilisé pour la séparation des sucres phosphatés</i>	<i>53</i>
<i>Figure M5 Gradient de méthanol-NaOH utilisé pour la séparation des acides organiques</i>	<i>54</i>

Liste des tableaux

<i>Tableau 1 Transporteurs membranaires des composés azotés</i>	16
<i>Tableau 2 Classement des acides aminés en fonction de leurs caractéristiques d'assimilation</i>	18
<i>Tableau 3 Classement des acides aminés en fonction de l'importance de leur présence dans le milieu et quantité nécessaire au maintien de la vitesse de fermentation à son niveau maximal)</i>	20
<i>Tableau 4 Alcools supérieurs et leurs esters, acide aminé précurseur et acide correspondant.</i>	27
<i>Tableau 5 Effet d'un ajout d'azote en vinification; influence de la nature la source ajoutée et du moment d'ajout sur les esters et alcools supérieurs.</i>	32
<i>Tableau M1 Composition générale des moûts synthétiques MS 425 et MS 100</i> _____	44
<i>Tableau M2 Composition de la solution stock d'oligo éléments et concentrations des composés dans le moût</i> _____	45
<i>Tableau M3 Composition de la solution stock de vitamines et concentrations dans le moût</i> _____	45
<i>Tableau M4 Composition de la solution stock de facteurs anaérobies et concentrations dans le moût</i>	45
<i>Tableau M5 Composition de la solution stock d'acides aminés et concentrations dans le moût</i> _____	46

Liste des symboles et abréviations

Symboles

μ	taux de croissance cellulaire (h^{-1})
C_i et C_{i-1}	concentration du composé C dans les étages i et i-1 (mg L^{-1})
D_i	taux de dilution dans l'étage i (h^{-1})
g, mg, μg	gramme, milligramme, microgramme
h, min, s	heure, minute, seconde
H_2O	eau
H_2S	sulfure d'hydrogène
K_2SO_4	sulfate de potassium
KH_2PO_4	potassium dihydrogen phosphate
KI	iodure de potassium
L, mL, μL	litre, millilitre, microlitre
MgSO_4	sulfate de magnésium
MnSO_4	sulfate de manganèse
MS100	milieu synthétique contenant 100 mgN.L^{-1}
MS425	milieu synthétique contenant 425 mgN.L^{-1}
NaCl	chlorure de sodium
NaOH	hydroxyde de sodium
NH_4Cl	chlorure d'ammonium
O_2	oxygène
Q_{e_i}	débit d'entrée dans l'étage i
$q_{s_{ci}}$	vitesse spécifique de production du composé C
Q_{s_i}	débit de sortie de l'étage i
r_{ci} et r_{xi}	vitesse de production du composé C et de la biomasse dans l'étage i
SO_2	dioxyde de soufre
SSA	acide sulfosalicylique
TCA	acides tricarboxyliques
V_i	volume réactionnel dans l'étage i
VPP	voie des pentoses phosphates
W_i	débit de sortie de l'étage i non compris dans le débit d'entrée dans l'étage i+1
X_i et X_{i-1}	concentration en biomasse dans les étages i et i-1
ZnSO_4	sulfate de zinc
$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$	éthanol
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	glucose
CaCl_2	chlorure de calcium
CO_2	gaz carbonique

Abréviations

AATs	acétyl transférases
ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
ARNc	acide ribonucléique complémentaire
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATP	adénosine triphosphate
CNM	métabolisme azoté central
CuSO ₄	sulfate de chlore
DAP	di-ammonium-phosphate
DEPC	diéthylpyrocarbonate
FC	Fold Change
MSCF	Multi-stage continuous fermentor
GAAC	general amino acids control
GABA	acide γ -aminobutyrique
GAP	general amino acid permease
GC-FID	gas chromatography flame ionization detector
GO	Gene Ontology
HEPES	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
LSA	levures sèches actives
NAD ⁺	nicotinamide adénine dinucléotide, forme oxydée
NADH	nicotinamide adénine dinucléotide, forme réduite
NADP ⁺	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme oxydée
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme réduite
NCR	nitrogen catabolique repression
PDC	pyruvate décarboxylase
rpm	rotations par minute
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
YEPD	yeast extract peptone dextrose

Introduction

La fermentation alcoolique est une étape cruciale de la vinification. Généralement réalisée en batch elle consiste principalement en la bioconversion du sucre en éthanol et divers métaboliques apportant au vin une partie de ses caractéristiques organoleptiques (glycérol, acides organiques, composés d'arômes, etc...). Le moût de raisin est un environnement peu favorable au développement des levures qui doivent notamment faire face à une forte pression osmotique et à un pH faible ; de plus au cours de la fermentation, les levures doivent s'adapter à l'appauvrissement en nutriments essentiels (azote, vitamines) et à l'accumulation d'éthanol dans le milieu. Du point de vue microbiologique, la fermentation œnologique est donc une succession de stress (Bauer et Pretorius, 2000) et la maîtrise de ce procédé implique une bonne connaissance des levures et de leur physiologie. L'étude de la réponse cellulaire et des mécanismes d'adaptation de leur métabolisme aux modifications de son environnement doit tenir compte de la complexité du milieu, et de l'aspect dynamique du procédé. Dans ces conditions il est souvent difficile d'isoler la réponse cellulaire à une perturbation donnée.

Les cultures continues permettent d'obtenir des microorganismes dans des conditions stables et contrôlées. Ce système de culture présente un intérêt particulier pour étudier la physiologie des microorganismes, leur métabolisme et modes de régulation mais aussi les mécanismes d'évolution et de compétition entre souches (Hoskisson et Hobbs, 2005). Dans le contexte du développement des approches d'étude du métabolisme au niveau global (transcriptomique, protéomique et métabolomique), qui nécessitent une grande fiabilité des données, l'utilisation de la culture continue pour l'étude des microorganismes connaît un nouvel essor (Hayes *et al.*, 2002, Piper *et al.*, 2002; Daran-Lapujade *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2004, (Bull, 2010; Hoskisson & Hobbs, 2005).

Le chemostat constitue le système de fermentation continue le plus simple et le plus répandu. Il est constitué d'une unique cuve alimentée en continue par du milieu stérile et dont le volume est maintenu constant grâce à un soutirage du milieu fermenté contenant la biomasse et les métabolites produits. Cependant, les conditions de culture offertes par cet outil sont assez peu représentatives de l'environnement naturel des microorganismes, qui sont rarement dans un milieu stable et parfaitement homogène.

Différentes variantes du chemostat ont donc été développées afin de concilier les avantages de la culture continue avec des conditions de culture se rapprochant des

conditions naturelles. C'est le cas du gradostat (Lovitt & Wimpenny, 1981) qui reproduit la dynamique d'évolution spatiale du milieu de croissance des microorganismes dans un bioréacteur multi-étagé à double alimentation, et du rétentostat (van Verseveld *et al.*, 1984) qui consiste à retenir la biomasse formée au sein de la cuve pour produire des cellules à très faible taux de croissance.

Ces bioréacteurs restent malgré tout inappropriés dans le cadre d'une étude en conditions œnologiques. En effet, la fermentation alcoolique dans ces conditions présente deux phases distinctes : une phase de croissance pendant laquelle les levures se multiplient et la population cellulaire augmente, puis une phase dite stationnaire, consécutive à l'épuisement de l'azote du milieu, pendant laquelle les cellules cessent de se diviser mais conservent néanmoins une activité fermentaire. Simuler une telle fermentation nécessite donc l'utilisation de plusieurs étages.

Le premier objectif de cette thèse est de développer un bioréacteur permettant de reproduire différents stades de la fermentation en batch, dans un **système stable et contrôlé de type continu multi-étagé**.

Par la suite, cet outil sera utilisé **pour décrire et comprendre la réponse du métabolisme levurien à un ajout d'azote en cours de fermentation**. L'azote est un nutriment essentiel au métabolisme des levures et son ajout au moût avant la fermentation ou au cours de celle-ci permet d'augmenter l'activité fermentaire et donc de réduire la durée de fermentation. L'ajout d'azote a également une influence sur la synthèse par la levure de composés volatils (alcools supérieurs, esters, H₂S), qui, suivant leur concentration, sont susceptibles d'altérer la qualité gustative du vin ou au contraire l'améliorer. La compréhension de l'effet de l'ajout d'azote sur le métabolisme fermentaire des levures est donc cruciale pour la maîtrise de cette pratique et de son impact sur la qualité du produit final.

Dans la seconde partie de ces travaux, nous avons donc concentré notre étude sur la compréhension de la réponse de la levure à un ajout d'azote réalisé en cours de fermentation, dans une **démarche intégrée** comprenant l'étude de l'impact au niveau transcriptionnel comme au niveau de la synthèse des métabolites secondaires.

Cette approche associée à des conditions de fermentation stables et contrôlées dans les différentes phases de la fermentation représente une démarche jusque-là inédite dans le domaine de l'œnologie et devrait apporter de **nouveaux éclairages sur les effets d'un ajout d'azote en cours de fermentation**.

Bibliographie

1 La fermentation alcoolique en œnologie

1.1 Caractéristiques

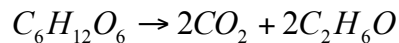
La fermentation alcoolique est une étape du processus de vinification qui repose sur la transformation d'un moût de raisin par des microorganismes, principalement des levures de type *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*).

Le jus de raisin est un milieu riche composé des principaux nutriments nécessaires à la croissance des levures (vitamines, lipides et minéraux), caractérisé par une forte teneur en sucre (200 à 260 g/L d'un mélange équimolaire de glucose et fructose) et un pH acide (2,9 à 3,8).

La fermentation du moût peut intervenir de manière spontanée par l'action des microorganismes présents naturellement sur les baies de raisins. La flore naturelle du raisin est composée de différentes espèces de levures (*Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Rhodotorula*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Brettanomyces*...) qui contribuent différemment aux caractéristiques organoleptiques et à la typicité des vins (Fleet, 1993a; Pretorius, 1999). Si certaines de ces souches peuvent contribuer positivement à la composition aromatique du vin, d'autres ont un effet délétère sur les caractéristiques organoleptiques du produit final. La technique du levurage permet une meilleure maîtrise du procédé et de la qualité finale du vin en favorisant l'implantation d'une ou plusieurs souches sélectionnées pour leurs capacités fermentaires et leur potentiel aromatique. Cette technique consiste à inoculer le moût avec un levain préparé à partir d'une souche ou d'un mélange de souches de levure conditionnées sous forme de levures sèches actives (LSA). Le taux d'inoculation des moûts est généralement de 1 à 5×10^6 cellules/mL.

Depuis une trentaine d'années la pratique du levurage s'est considérablement répandue et concerne aujourd'hui environ 80% des fermentations œnologiques (Sablayrolles, 2009).

En conditions anaérobies, la dégradation du glucose par les levures conduit à la synthèse d'éthanol et à un dégagement de gaz carbonique (CO₂) suivant la réaction suivante :



Le rendement de conversion théorique est donc de 0,51 grammes d'éthanol pour 1 gramme de glucose consommé. En pratique environ 8 à 10% du glucose est dirigé vers la synthèse de précurseurs anaboliques nécessaires à la synthèse de biomasse et au maintien de l'équilibre redox au sein de la cellule. Une partie de ces métabolites secondaires sont excrétés dans le milieu parmi lesquels on trouve majoritairement le glycérol, le succinate, l'acétate et le pyruvate et, en plus faible quantité, des aldéhydes ainsi que des alcools supérieurs et leurs esters. Ces composés influencent les caractéristiques organoleptiques des vins.

1.2 Déroulement

Le suivi de l'activité fermentaire des levures après ensemencement permet de mettre en évidence trois différentes phases d'activité des levures lors d'une fermentation « standard » (Figure 1).

i. La phase de latence correspond à une phase d'adaptation des levures aux conditions environnementales (Pérez-Torrado *et al.*, 2002). Elle est d'une durée variable (quelques heures à quelques jours) suivant les souches et les conditions de fermentation (température, présence d'inhibiteurs de l'activité fermentaire comme le SO₂). Durant cette période, l'activité fermentaire est faible et donc la production de CO₂ est limitée mais conduit progressivement à la saturation du moût (environ 1,5 g/L de CO₂).

ii. La phase de croissance durant laquelle la population cellulaire augmente jusqu'à un maximum qui peut atteindre 50 à 250 millions d'individus par millilitre suivant les fermentations (Bely *et al.*, 1990a). La vitesse de fermentation suit un profil semblable pour atteindre son maximum à peu près au même moment que la population cellulaire. La population comme la vitesse de fermentation sont principalement limitées par la disponibilité du milieu en azote assimilable.

iii. La phase stationnaire durant laquelle les cellules cessent de se multiplier mais conservent une activité fermentaire. La viabilité cellulaire demeure généralement élevée (> 90%) et la population cellulaire reste stable à son niveau maximum tandis que l'activité fermentaire diminue progressivement jusqu'à l'épuisement des sucres du

milieu. Cette diminution de l'activité est due principalement à l'épuisement du milieu en azote qui impose un arrêt de la synthèse protéique et d'autre part à l'augmentation de la teneur du moût en éthanol qui exerce un effet inhibiteur sur les transporteurs d'hexoses (Salmon, 1989 ; Jones *et al.* 1989). Une des particularités de la fermentation œnologique est que l'essentiel de la transformation du sucre (60-70%) a lieu durant cette phase.

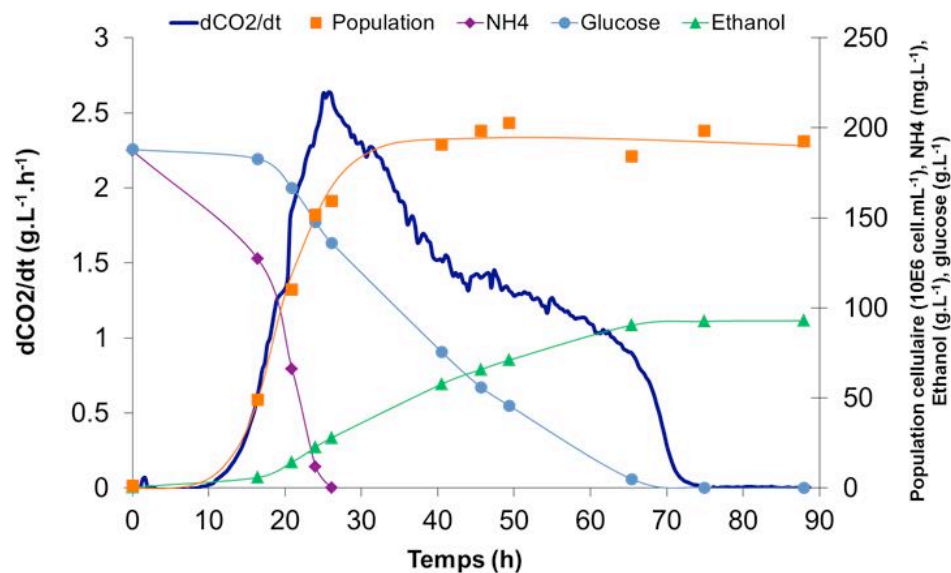


Figure 1 Evolution des paramètres de fermentation au cours du temps lors d'une fermentation en batch à 28°C. La souche utilisée est EC1118 et le milieu est un moût synthétique à 200 g/L de glucose et 425 mg/l d'azote assimilable (MS425)

Le bon déroulement de la fermentation repose donc sur la capacité des levures à assimiler les sucres et à adapter leur métabolisme à la transformation du milieu qui en découle.

1.3 Métabolisme des levures

La flore naturelle du raisin est composée de différents types de levures mais la levure majoritaire est *Saccharomyces cerevisiae*. Cette levure est en effet particulièrement adaptée aux conditions de vinification (pH acide, fortes concentrations en éthanol et en SO₂).

S. cerevisiae est aérobie facultative et Crabtree positive et présente la capacité d'adapter son métabolisme aux conditions d'aération et de disponibilité en substrat carboné. En

conditions œnologiques les levures sont dans un environnement riche en sucres fermentescibles (140 à 260 g/L suivant le degré de maturité du raisin) et pauvre en oxygène (teneur inférieure à 10mg/L d'O₂), leur métabolisme est donc purement fermentaire.

Dans ce cas la levure doit assurer la synthèse des précurseurs nécessaires à la formation de la biomasse et à sa maintenance énergétique en absence d'une chaîne respiratoire fonctionnelle. La glycolyse (figure 2) est alors la seule voie de production de l'ATP nécessaire à la croissance cellulaire. Il s'agit d'un processus oxydatif qui fait intervenir le NAD⁺ comme accepteur d'électrons et conduit à la synthèse de pyruvate qui sera ensuite soit converti en acétaldéhyde par la pyruvate décarboxylase (PDC), soit dégradé dans le cycle des acides tricarboxyliques (TCA). L'acétaldéhyde est ensuite majoritairement réduit en éthanol mais une partie est dirigée vers la synthèse d'acétate et d'acétyl-CoA, qui intervient notamment dans la synthèse des acides gras et des esters.

Le TCA (figure 2) assure la production d'énergie nécessaire à la croissance cellulaire en conditions aérobies mais, en fermentation, les enzymes de cette voie sont soumises à une répression catabolique par le glucose (Gancedo, 2008). Cette voie métabolique ne fonctionne par conséquent plus comme un cycle mais est constituée d'une branche oxydative et d'une branche réductrice dont le produit final commun est le succinate (Gombert *et al.*, 2001). En fermentation œnologique il a été montré que les deux tiers du succinate sont synthétisés via la branche réductrice (Camarasa *et al.*, 2003). Cependant la voie oxydative est également active, en particulier pendant la phase de croissance, comme voie de synthèse de l' α -cétoglutarate, élément clé du métabolisme de l'azote (Heux, 2006).

En conditions fermentaires, une partie du glucose n'est pas convertie en pyruvate mais en glycérol via la glycérol-3-phosphate deshydrogénase. La synthèse du glycérol permet de réoxyder l'excès de NADH produit lors de la synthèse de biomasse (van Dijken & Scheffers, 1986; Nissen *et al.*, 1997; Oura, 1973), mais il agit également comme précurseur pour la synthèse des phospholipides pendant la croissance cellulaire. D'autre part le glycérol joue également un rôle dans la lutte contre le stress osmotique causé en début de fermentation par la concentration élevée en sucre (Pronk *et al.*, 1996).

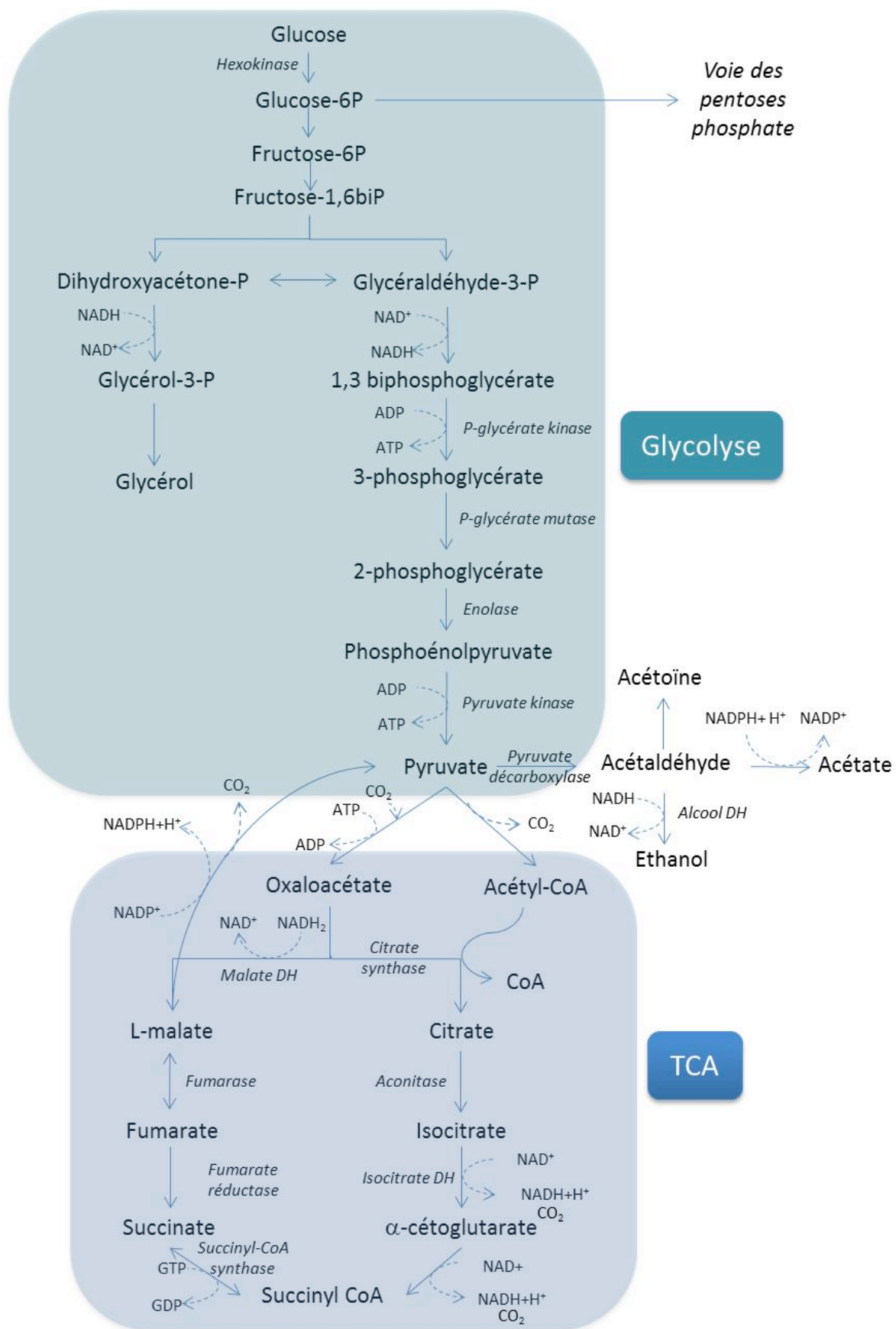


Figure 2 Métabolisme carboné central en fermentation œnologique

La levure est également capable de dégrader les sucres via la voie des pentoses phosphates (VPP) (figure 3). Cette voie joue un rôle important dans la régénération du NADPH, qui intervient principalement comme cofacteur d'oxydoréduction dans les processus anaboliques (van Dijken & Scheffers, 1986). Dans le cas d'une croissance sur glucose, environ 60% du NADPH est produit par la VPP (Blank *et al.*, 2005; Frick & Wittmann, 2005), le reste provenant de l'activité de l'acétaldéhyde déshydrogénase NADP-dépendante qui forme de l'acétate à partir de l'acétaldéhyde.

La VPP comprend une partie oxydative qui amène à la synthèse du ribulose-5-P et à la formation de deux NADPH et une partie non oxydative qui produit notamment le ribose-5P et l'érythro-4P qui sont deux intermédiaires du métabolisme des nucléotides (UTP, CTP, ATP et GTP) et des acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine, histidine et tryptophane).

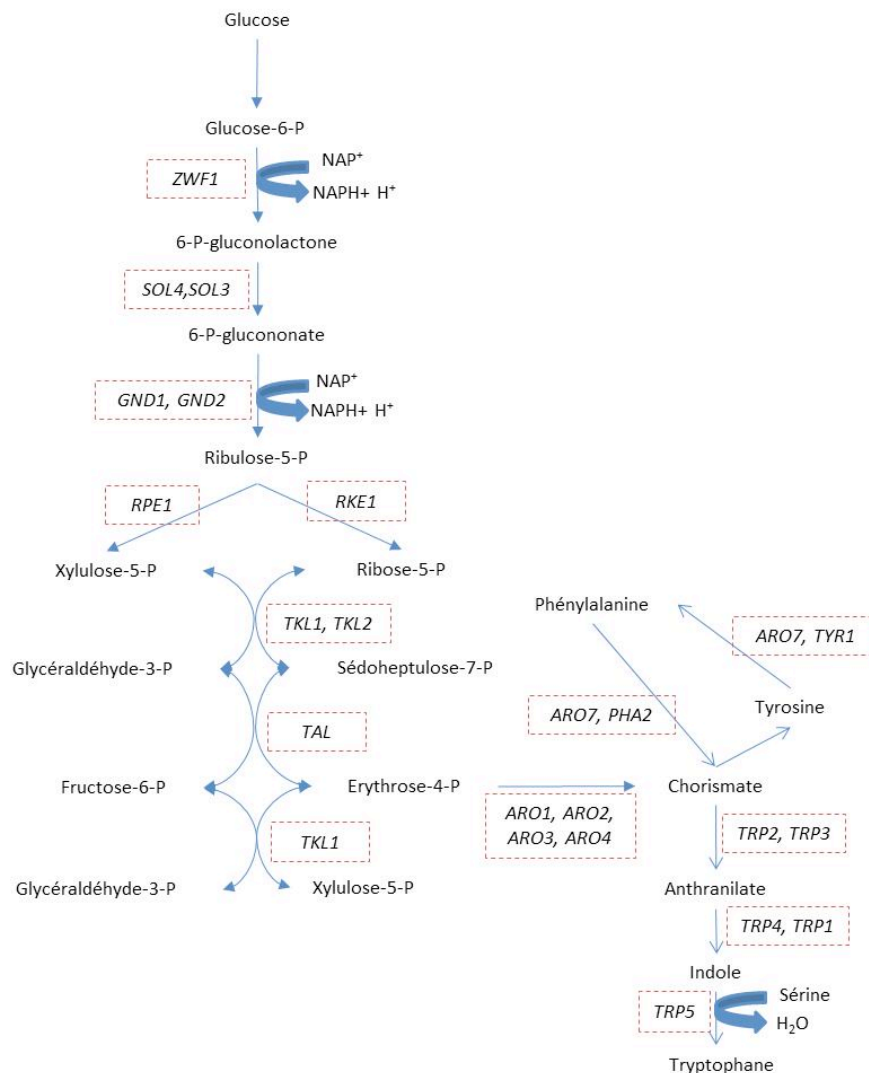


Figure 3 Voie des pentoses phosphates

2 Importance de l'azote en fermentation œnologique

2.1 Rôle de l'azote

La biomasse est composée en moyenne de 6% d'azote. Cet élément nécessaire à la synthèse protéique constitue un des éléments essentiels à la croissance des levures et au bon déroulement de la fermentation.

La demande en azote assimilable varie en fonction des souches de levure, de la teneur en sucre et des conditions de fermentation (aération du milieu, température). Il est généralement admis que 120 à 140 mgN/L sont nécessaires au bon déroulement de la fermentation en termes de cinétiques et de qualité du produit final (Agenbach, W.A, 1977; Bely *et al.*, 1990b; Jiranek *et al.*, 1995b; Ough *et al.*, 1991). La disponibilité des moûts en azote assimilable est un facteur limitant au niveau de la fermentation œnologique. En particulier, la carence des moûts en azote assimilable limite la croissance cellulaire et la vitesse d'assimilation des sucres et représente le facteur principal des fermentations dites lentes (Alexandre & Charpentier, 1998; Bely *et al.*, 1990a; Monteiro & Bisson, 1991).

L'ajout d'azote au moût est une technique communément utilisée en œnologie pour prévenir les problèmes de fermentation lente ou d'arrêt de fermentation. Généralement l'azote est ajouté sous forme de phosphate d'ammonium, avant le début de la fermentation alcoolique. La supplémentation en azote permet d'augmenter la vitesse de fermentation quelle que soit la souche utilisée ou les conditions de fermentation (Bely *et al.*, 1990b; Blateyron & Sablayrolles, 2001).

Cependant, le moment de l'ajout est un paramètre important à prendre en compte. Alors que l'ajout d'azote au moût en début de fermentation entraîne une augmentation de la population cellulaire et de la vitesse maximale de fermentation (Manginot *et al.*, 1997), le même ajout en phase stationnaire provoque une élévation de la vitesse de fermentation sans augmentation notable de la population cellulaire (Beltran *et al.*, 2005; Bely *et al.*, 1990a). L'augmentation de la vitesse de fermentation est observée quel que soit le moment d'ajout mais l'effet s'atténue progressivement au cours de la phase stationnaire (Bely *et al.*, 1990b).

Outre son impact technologique (vitesse de fermentation et capacité à terminer la fermentation), la teneur du moût en azote influence également la composition chimique du moût et donc son équilibre organoleptique (voir chapitre 3).

2.2 Les différentes sources d'azote

Le moût de raisin contient différentes sources potentielles d'azotes parmi lesquels des composés organiques comme des protéines (10 à 100 mg/L), des peptides, et des acides aminés, mais également d'autres composés en quantité plus faible (urée, allantoïne, GABA). L'azote est également présent sous forme minérale (ions ammonium). (Henschke & Jiranek, 1993).

Toutes les sources d'azote ne sont pas assimilables par les levures en conditions œnologiques, comme par exemple la proline, qui bien qu'étant l'acide aminé majoritaire (entre 150 et 1000 mg/L), n'est pas assimilée en absence d'oxygène. De même les levures œnologiques sont incapables d'utiliser les protéines du moût faute de transporteurs membranaires ou d'activité protéolytique extracellulaire (Bisson 1991 ; (Henschke & Jiranek, 1993).

Les sources d'azote utilisables par la levure constituent le pool d'azote assimilable. La teneur des moûts en azote assimilable présente une grande variabilité selon les cépages, le degré de maturité des baies et les pratiques viticoles (Bisson, 1991; Jiranek *et al.*, 1995b) et est en général comprise entre 60 et 2400 mg/L (Ough & Amerine, M.A., 1988).

2.3 Assimilation des sources d'azote

2.3.1 Transporteurs et perméases

L'ammonium libre du milieu de culture est importé dans la cellule par transport actif uniport. Les ions ammonium pénètrent à l'intérieur de la cellule à travers une perméase membranaire contre un gradient de concentration puis un proton est excrété de manière active afin de maintenir le pH intracellulaire. Les perméases impliquées dans l'assimilation de l'ammonium, Mep1p, Mep2p et Mep3p (Marini *et al.*, 1997, 1994, 2000)

sont codées par les gènes du groupe *MEP*. Ces perméases sont exprimées lorsque la concentration en ammonium du milieu est inférieure à 20mM (Dubois & Grenson, 1979) et présentent des niveaux d'affinité différents pour l'ammonium (Tableau 2).

L'entrée des acides aminés dans la cellule s'effectue à travers différentes perméases (Horák, 1997) fonctionnant en symport actif. On distingue deux types particuliers de transporteurs suivant leur mode de régulation et leur spécificité (Sophianopoulou & Dhalluin, 1995). Le premier comprend les systèmes généraux comme le système GAP (General Aminoacid Permease) capable de prendre en charge l'ensemble des acides aminés. La seconde classe de transporteurs est constituée des transporteurs spécifiques prenant en charge un seul acide aminé, (par exemple Hip1p, transporteur d'histidine (Tanaka & Fink, 1985)) ou un groupe d'acides aminés d'une même famille chimique (Can1p impliqué dans le transport des acides aminés basiques (Grenson *et al.*, 1970)). Les transporteurs connus et leurs modes de régulation sont présentés dans le Tableau 1. Les modes de régulations seront explicités au paragraphe 2.6.

Tableau 1 Transporteurs membranaires des composés azotés (Ljungdahl & Daignan-Fornier, 2012)

Gène	Source transportée	Affinité	Régulation
AGP1	Val, ile, phe, met, ser, leu, thr, cys, asn, tyr, ala, gly, gln		SPS, NCR, GAAC
BAP2	Val, ile, phe, tyr, leu, trp, met, cys, ala		SPS, GAAC
BAP3	Val, ile, phe, tyr, leu, trp, met, cys, ala, thr		SPS
GNP1	Thr, gln, ser, cys, leu, met, asn	Haute	SPS
TAT1	Tyr, trp, val, thr		SPS
TAT2	Phe, tyr, trp, gly, ala		SPS
GAP1	Tous acides aminés		NCR, GAAC
HIP1	Histidine		
MMP1	S-methyl methionine	Haute	
SAM3	S-methyl methionine	Haute	
APL1	Arginine		
CAN1	Arginine		NCR, GAAC
LYP1	Lys, met		GAAC
AGP2	Carnitine, spermidine, putrescine		
AGP3	Ser, asp, glu		
DIP5	Ser, ala, asn, asp, gln, gly, glu		NCR
PUT4	Val, ala, pro	Haute	NCR
SSY1	Tous acides aminés		
MUP1	Met, cys	Haute	SPS
MUP3	Met	Faible	GAAC
UGA4	GABA		NCR
TPO5	Polyamine (sécrétion)		
HNM1	Choline		
BIO5	Biotine		
MEP1	NH ₄	Moyenne	NCR
MEP2	NH ₄	Haute	NCR
MEP3	NH ₄	Faible	NCR

Gène	Source transportée	Affinité	Régulation
<i>DAL5</i>	Allantoate		NCR
<i>YCT1</i>	Cystéine		
<i>TNA1</i>	Acide nicotinique		
<i>VHT1</i>	Biotine		GAAC
<i>FEN2</i>	Panthothenate		
<i>FUR4</i>	Uracile		
<i>DAL4</i>	Allantoine		NCR
<i>FUI1</i>	Uridine		
<i>THI7</i>	Thiamine		Thi3
<i>THI72</i>	Thiamine		
<i>NRT1</i>	Nicotinamide		
	Thiamine		
<i>FCY2</i>	Cytosine, purine, adenine, guanine		
	Pyridoxine		
<i>TPN1</i>	Urée		GAAC
<i>DUR3</i>	di-tripeptides		NCR
<i>PTR2</i>	Oligopeptides		SPS, NCR
<i>OPT1</i>	Oligopeptides		NCR
<i>OPT2</i>	Ammonium (excrétion)		NCR
<i>ACO3</i>	Homosérine, Thr, ala, asp, Glu		SPS, GAAC
<i>AQR1</i>	Polyamine		

2.3.2 Ordre d'assimilation et utilisation des sources

Lors d'une croissance en présence de plusieurs sources d'azote, la levure assimile les acides aminés de manière séquentielle (Henschke & Jiranek, 1993). Cette observation permet de classer les principales sources d'azote du moût (Acides aminés et ammonium minéral) suivant leur vitesse d'assimilation. Une première classification établie par (Jones, M. & Pierce, J.S., 1964) (Tableau 2) en conditions brassicoles, fait état de quatre groupes de composés azotés. Les acides aminés du groupe A sont consommés rapidement après le début de la fermentation. Leur consommation est peu impactée par la présence d'ammonium dans le milieu. Les acides aminés du groupe B sont assimilés

plus lentement et plus tardivement et leur consommation est inhibée par la présence d'ammonium. Concernant les composés du groupe C, leur consommation est fortement inhibée en présence d'ammonium, elle intervient tardivement et est souvent incomplète. Le dernier groupe ne contient que la proline qui n'est pas assimilée en absence d'oxygène.

En conditions œnologiques la classification est assez proche avec toutefois une différence notable pour l'ammonium (Tableau 2) (Henschke & Jiranek, 1993; Jiranek *et al.*, 1995b).

Tableau 2 Classement des acides aminés en fonction de leurs caractéristiques d'assimilation : vitesse d'assimilation en fermentation brassicole (a) et en vinification (b)

Source d'azote	Jones et Pierce (1964) (c)	Jiranek (1995) (b)
Alanine	C	B
Ammonium	C	A
Arginine	A	A
Asparagine	A	A
Aspartate	A	A
Glutamate	A	B
Glutamine	A	A
Glycine	C	C
Histidine	B	B
Isoleucine	B	A
Leucine	B	A
Lysine	A	A
Méthionine	B	-
Phénylalanine	C	B
Proline	D	D
Serine	A	A
Thréonine	A	A
Tryptophane	C	C
Tyrosine	C	C
Valine	B	B

Une fois ingéré dans la cellule l'ammonium est assimilé via le métabolisme azoté central (CNM) qui sera présenté au paragraphe 2.4.

Le devenir des acides aminés dans la cellule dépend de leur concentration et des besoins anaboliques de la cellule.

Les acides aminés peuvent donc être :

- i. Intégrés directement dans la synthèse de protéines
- ii. Stockés au niveau de la vacuole : La membrane vacuolaire comporte plusieurs transporteurs d'acides aminés capables de prendre en charge une dizaine d'acides aminés (Arginine, histidine, lysine, tyrosine, tryptophane, leucine, isoleucine, phénylalanine, glutamine et asparagine) (Kitamoto *et al.*, 1988).
- iii. Dégradés par désamination oxydative pour donner un ion ammonium et un cétoacide qui seront pris en charge pour la synthèse d'autres acides aminés.
- iv. Dégradés par transamination pour donner un acide cétonique et du glutamate

2.4 Notion d'efficacité des sources

Parmi les différentes sources d'azote disponible, toutes ne présentent pas la même efficacité en termes de capacité à soutenir la croissance cellulaire. A partir de ce constat, plusieurs publications présentent un classement des sources, suivant différents critères. On distingue généralement les sources d'azotes « riches » ou « bonnes » des sources « pauvres » (Albers *et al.*, 1996; ter Schure *et al.*, 2000). La culture des levures en présence de « bonnes » sources (ammonium, glutamine et asparagine) présente globalement un meilleur rendement de croissance que lors d'une culture sur source « pauvre » (proline, urée, allantoïne, GABA).

Pierce a regroupé les acides aminés en fonction de la capacité de la levure à synthétiser leur céto-acide précurseur et donc de l'importance de leur présence dans le milieu de fermentation (Pierce, 1987). Le groupe 1 (Tableau 3) comprend les acides aminés dont la présence dans le moût n'est pas indispensable car leur squelette carboné est principalement issu d'autres acides aminés en début de fermentation, et dérive du métabolisme des sucres en fin de fermentation. Les céto-acides issus de la dégradation des acides aminés du groupe 2 sont directement intégrés dans la synthèse d'autres acides aminés en fin de fermentation. Leur concentration dans le moût est donc un critère non négligeable susceptible d'influencer la qualité de la fermentation. Enfin, le métabolisme carboné central contribue de manière très faible à la synthèse des acides

aminés du groupe 3, leur présence dans le moût en début de fermentation est donc indispensable à la maintenance de l'activité des levures au long de la fermentation.

Tableau 3 Classement des acides aminés en fonction de l'importance de leur présence dans le milieu (a) et quantité nécessaire au maintien de la vitesse de fermentation à son niveau maximal (en mg) (b)

Source d'azote	Pierce (1987) (a)	Manginot <i>et al.</i> (1997) (b)
Alanine	-	1.78±0.12
Ammonium	-	2.09±0.17
Arginine	3	1.84±0.14
Aspartate	1	-
Glutamate	1	1.84±0.06
Glutamine		1.70±0.09
Glycine	2	1.51±0.03(A)
Histidine	3	-
Isoleucine	2	1.92±0.29
Leucine	3	1.96±0.26
Lysine	3	-
Méthionine	1	3.48±0.06
Phénylalanine	2	-
Proline	1	-
Serine	1	1.59±0.19
Thréonine	1	1.54±0.12
Tyrosine	2	-
Valine	2	1.81±0.04

(Manginot *et al.*, 1997) ont réalisé des fermentations avec ajout continu d'azote dans le but de maintenir la vitesse de fermentation à son niveau maximal. Les résultats ont montré qu'un ajout continu d'azote permet de maintenir la vitesse de fermentation jusqu'à ce que la quantité de glucose devienne limitante (environ 80% du sucre consommés). La quantité totale d'azote nécessaire varie suivant la source apportée et cette mesure permet de classer les acides aminés en fonction de leur efficacité à maintenir la vitesse de fermentation (Tableau 3).

D'autres auteurs distinguent les sources « préférées » dont la présence entraîne la répression des voies d'utilisation des sources dites « non-préférées » (Boris Magasanik,

1992; Magasanik & Kaiser, 2002). Ces mécanismes de régulation font notamment intervenir le NCR (Nitrogen Catabolic Repression) (Voir paragraphe 2.5).

Les différences observées selon les critères considérés illustrent la difficulté de définir la notion d'efficacité des sources d'azote.

2.5 Métabolisme azoté central et synthèse des acides aminés

La levure est capable de synthétiser la plupart des acides aminés à travers un ensemble de réactions désigné sous le terme de métabolisme azoté central (Central Nitrogen Metabolism ou CNM) (figure 4). Le glutamate, la glutamine et l' α -cétooglutarate sont des éléments clés de ces voies réactionnelles. L'ammonium est assimilé par combinaison avec l' α -cétooglutarate pour former du glutamate, qui pourra à son tour se combiner à l'ammonium pour former de la glutamine. Ces deux réactions sont catalysées par une glutamate déshydrogénase dépendante du NADPH puis une glutamine synthétase produits respectifs de *GDH1* et *GLN1*. Ces deux réactions successives sont réversibles sous l'action de la glutamate synthétase et d'une glutamate déshydrogénase dépendante du NAD^+ sous le contrôle de *GLN1* et de *GDH2* respectivement.

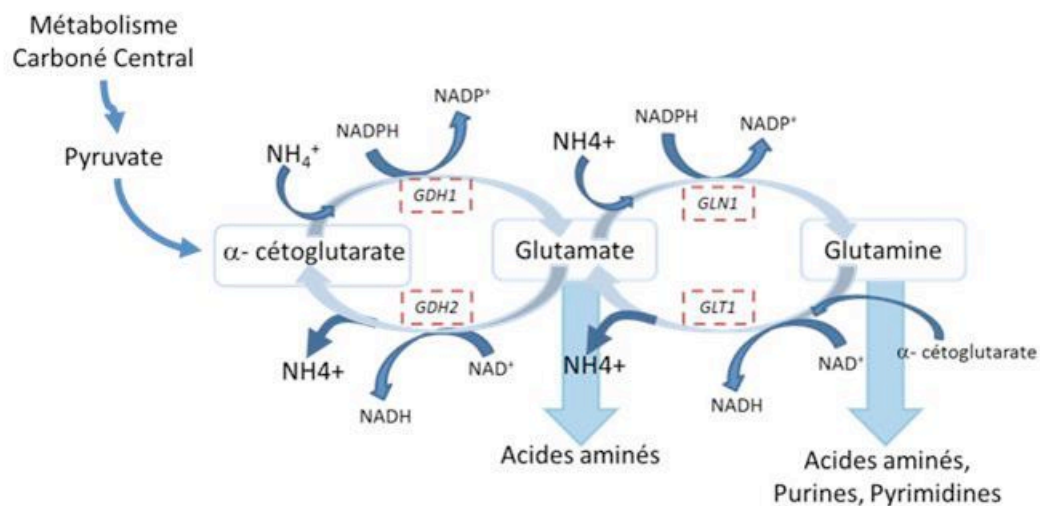


Figure 4 Métabolisme de l'azote (adapté de Magasanik et Kaiser, 2002)

Le glutamate pourra servir de donneur de groupement aminé pour la synthèse des différents acides aminés, le squelette carboné provient dans ce cas de la glycolyse (pyruvate, 3-phosphoglycérate, phosphoénolpyruvate), du TCA (α -cétooglutarate, oxaloacétate) ou de la VPP (ribose-5-P, érythrose-4-P), mais il peut être directement

dégradé pour former trois acides aminés : la proline, la lysine et l'arginine (Albers *et al.*, 1998).

La glutamine pourra être utilisée comme précurseur de l'arginine ou rentrer dans la synthèse des bases purines et pyrimidines.

Cependant le glutamate et la glutamine ne sont pas les seuls précurseurs d'acides aminés issus du CNM. Plusieurs familles d'acides sont ainsi identifiables en fonction de leur composé précurseur (Figure 5), ce qui inclue les dérivés glutamate (glutamine, arginine, proline et lysine), de la sérine (glycine, cystéine et méthionine) et de l'aspartate (asparagine, thréonine, et les acides aminés soufrés cystéine et méthionine) mais aussi du pyruvate (alanine et les acides aminés branchés valine, leucine et isoleucine) et de l'érythrose (acides aminés aromatiques : tyrosine, phénylalanine et tryptophane) (Ljungdahl & Daignan-Fornier, 2012).

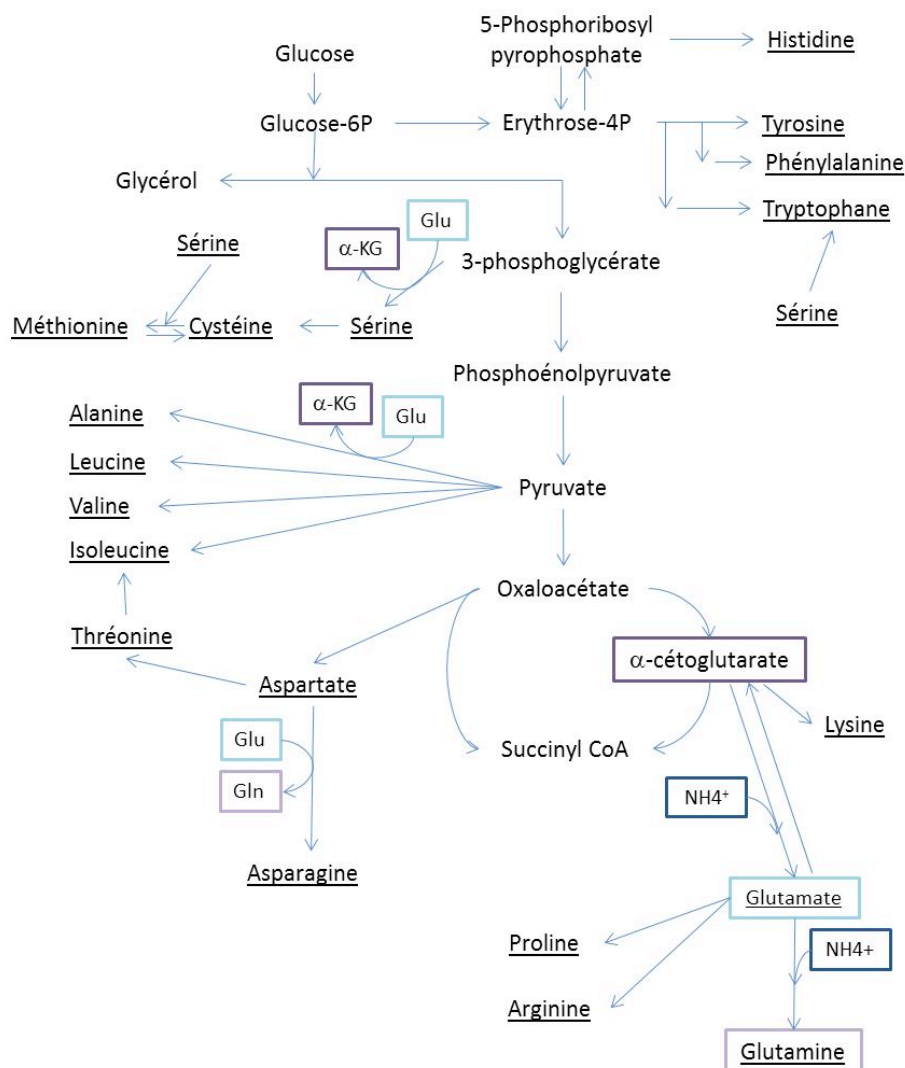


Figure 5 Synthèse des acides aminés à partir du métabolisme carboné et de l'ammonium adapté de Albers *et al* 1996.

2.6 Régulation du métabolisme azoté

La levure dispose d'un réseau de régulation complexe lui permettant d'adapter son métabolisme en fonction de la disponibilité des sources d'azote.

- i. Le premier niveau de régulation se situe au niveau des récepteurs de la membrane plasmique. Un système d'activation spécifique de l'expression des perméases désigné sous le nom de système SPS a été identifié chez *Saccharomyces cerevisiae* (Ljungdahl, 2009). Ce système est constitué d'un complexe protéique membranaire composé de trois protéines (Ssy1, Ptr3 et Ssy5) qui agit comme récepteur primaire. En réponse à la présence d'acides aminés extra-cellulaires le système active deux facteurs de transcriptions (Stp1 et Stp2) capables d'induire l'expression d'un certain nombre de gènes codant pour des perméases (Tableau 1).
- ii. La répression catabolique par l'azote désigne les mécanismes intervenant aux niveaux transcriptionnel et post-transcriptionnel et qui permettent la sélection des sources d'azote assimilées. Ce mécanisme de régulation, qui fait intervenir le concept de sources « pauvres » et « riches », est désigné par le terme NCR (Nitrogen Catabolic Repression). En présence d'une source d'azote « riche » (Ammonium, arginine, glutamine...), les gènes impliqués dans l'assimilation des autres sources d'azote sont réprimés, et ils sont par contre exprimés en cas de limitation en azote. Le premier stade de régulation opérant via le NCR se situe donc au niveau de l'expression des perméases membranaires (Tableau 1). Le second mécanisme implique la dégradation des perméases exprimées de manière constitutive (Hip1p, Lyp1p, Can1p) afin d'éviter l'accumulation des sources
- iii. Une déficience en un acide aminé ou une diminution de la synthèse protéique est capable de provoquer l'activation globale de la plupart des gènes de biosynthèse des acides aminés. (Hinnebusch, 2005). Ce mécanisme est lié au système GAAC (General Amino Acid Control).
- iv. Enfin, il existe des mécanismes de régulation plus spécifiques d'une voie de biosynthèse d'un acide aminé. Par exemple la valine, la leucine et l'isoleucine sont capables d'inhiber la plupart des enzymes communes à ces trois voies de biosynthèse (Hinnebusch, 1988; Holmberg & Petersen, 1988).

3 Synthèse des composés volatils

La structure aromatique des vins dépend notamment de la présence de composés volatils. Ces composés ont des origines variables (Lambrechts & Pretorius, 2000).

On distingue généralement 4 groupes de composés aromatiques du vin:

- i. Les arômes variétaux synthétisés à partir de précurseurs caractéristiques de certains cépages.
- ii. Les arômes pré-fermentaires formés lors des opérations de vinification (vendange, extraction, conditionnement du moût)
- iii. Les arômes fermentaires issus du métabolisme des microorganismes (levures et bactéries) présents lors de la fermentation (alcoolique et malolactique).
- iv. Les arômes de vieillissement formés pendant la maturation du vin.

Ici nous nous intéresserons aux arômes fermentaire issus du métabolisme de la levure pendant la fermentation alcoolique, parmi lesquels les alcools supérieurs et les esters sont les plus abondants.

La nature et la quantité des arômes fermentaires dépendent principalement de la souche de levure et de la composition du moût en azote (Lambrechts & Pretorius, 2000). La température de fermentation est également un facteur de variation de la composition aromatique, une température basse (15°C) favorisant les arômes fruités alors qu'une fermentation à 28°C favoriserait la formation des notes florales (Molina *et al.*, 2007). Leur synthèse procède d'un mécanisme complexe qui peut dépendre à la fois du métabolisme des sucres via la glycolyse et le TCA et du métabolisme azoté via la dégradation des acides aminés (figure 6).

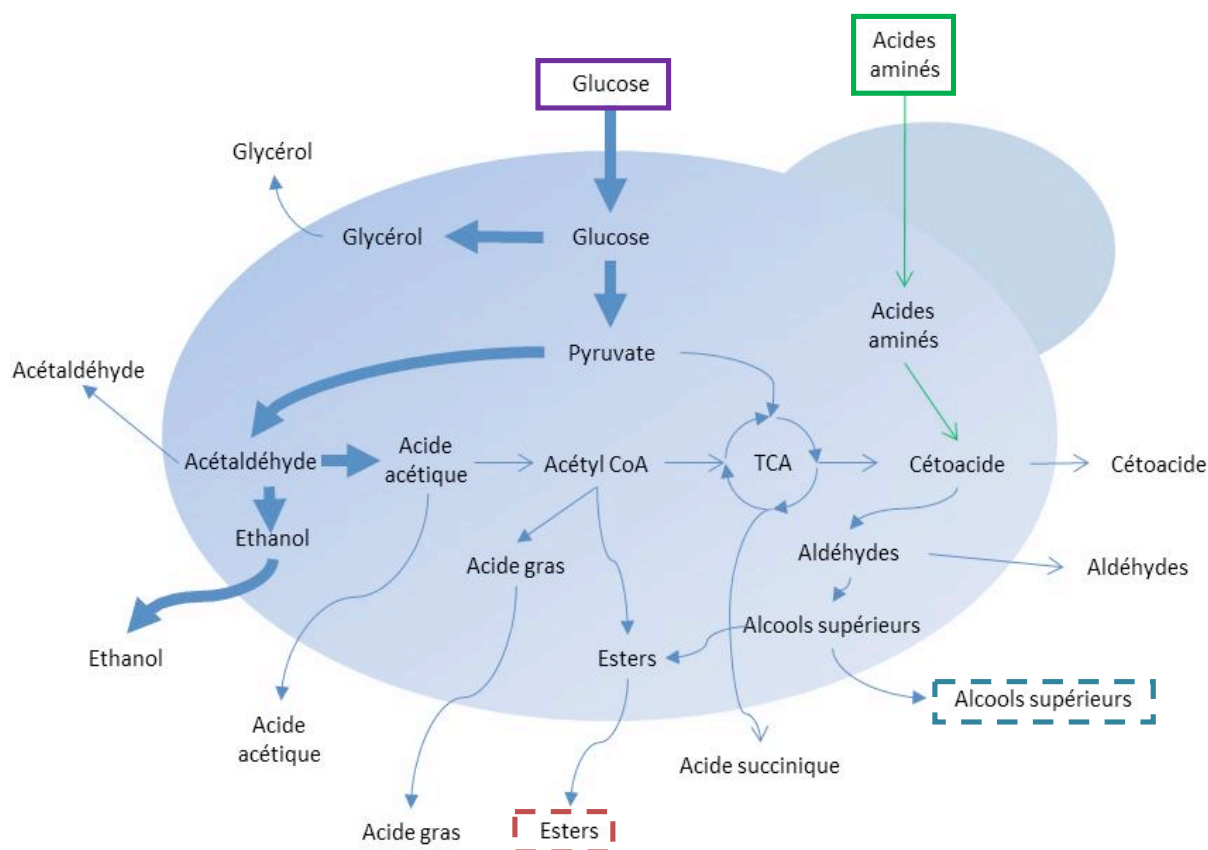


Figure 6 Vue d'ensemble des métabolismes carbonés et azotés chez la levure et leur rôle dans la synthèse des alcools supérieurs et des esters (d'après Swiegers *et al.* (2005))

3.1 Les alcools supérieurs

Les alcools supérieurs sont généralement considérés comme peu favorables à l'arôme du vin, à l'exception du 2-phényléthanol qui est associé à des notes florales (rose). Globalement délétères au-delà d'une concentration de 400 mg/L, ils peuvent contribuer à la complexité aromatique des vins et notamment participer au caractère fruité lorsqu'ils sont présents à des concentrations inférieures à 300 mg/L (Bell & Henschke, 2005; Swiegers *et al.*, 2005).

Les alcools supérieurs peuvent être issus du catabolisme des acides aminés ramifiés (valine, isoleucine, leucine, thréonine et phénylalanine) à travers la voie d'Ehrlich (Figure 7), ou synthétisés *de novo* à partir du métabolisme carboné central (Lambrechts et Pretorius, 2000).

3.1.1 Synthèse à partir des acides aminés ramifiés : la voie d'Ehrlich

La voie métabolique de synthèse des alcools supérieurs et des esters chez la levure décrite par Ehrlich (1904), comporte 3 étapes successives (Figure 7) (Hazelwood *et al.*, 2008).

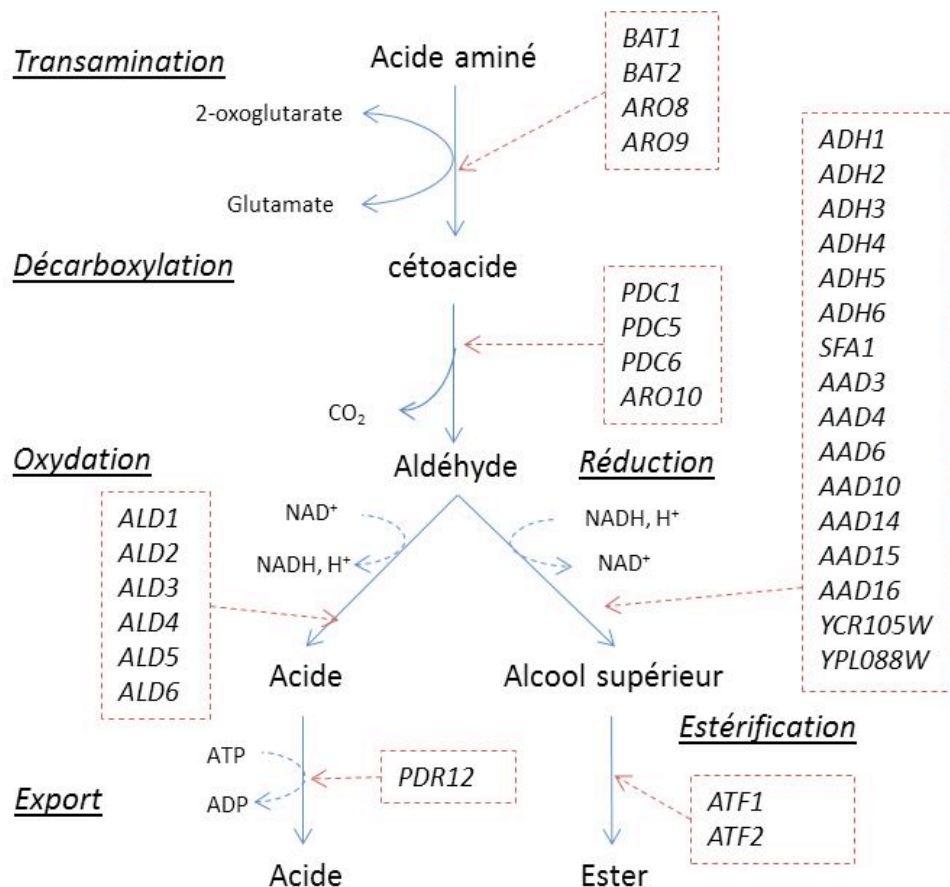


Figure 7 Voie d'Ehrlich et synthèse des esters. Adapté de Hazelwood *et al.* 2008.

La première étape est une transamination catalysée par les amino-transférases codées par les gènes *BAT1* et *BAT2*. L'expression de ces gènes varie suivant la phase de la fermentation, *BAT1* étant préférentiellement exprimé dans la phase de croissance et réprimé dans la phase stationnaire, et inversement pour *BAT2* (Eden *et al.*, 1996, 2001). Le cétoacide est ensuite converti en aldéhyde. Cette réaction implique 5 gènes incluant *PDC1*, *PDC5* et *PDC6* qui codent pour des isoformes de la pyruvate décarboxylase (Hohmann, 1991) *ARO10* qui code pour une phénylpyruvate décarboxylase et *THI3* (Dickinson *et al.*, 1998, 2003; Vuralhan *et al.*, 2003). Ce dernier est susceptible de coder pour une α -céto-isocaproate décarboxylase mais certaines études suggèrent que son

rôle se situerait plutôt à un niveau de régulation qu'au niveau catabolique (Mojzita & Hohmann, 2006). L'implication de ces gènes dépend notamment de l'acide aminé dégradé. Si dans le cas de la valine, les trois enzymes Pdc1p, Pdc5p et Pdc6p peuvent décarboxyler l' α -céto-isovalérate, *THI3* ne semble pas intervenir dans le catabolisme des acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine). Par contre, Aro10p est spécifiquement impliqué dans le catabolisme de la méthionine (Hazelwood *et al.*, 2008). L'aldéhyde formé peut ensuite être converti soit en alcool supérieur via une oxydation, soit en acide via une réduction. Les produits concernés ainsi que leur acide aminé précurseur sont présentés dans le Tableau 4.

La nature des réactions impliquées suggère que la formation des composés volatils via la voie d'Ehrlich joue un rôle dans l'équilibre rédox de la cellule. Une autre hypothèse suggère que la synthèse des alcools supérieurs a pour but de dégrader les aldéhydes qui sont des composés toxiques (Bisson, 1991).

Tableau 4 Alcools supérieurs et leurs esters, acide aminé précurseur et acide correspondant.

Acide aminé précurseur	Acide	Alcool	Esters
Leucine	α -céto-isocaproate	Alcool isoamylique	Acétate d'isoamyle
Isoleucine	α -céto-méthylvalérate	Alcool amylique	Acétate d'amyle
Valine	α -céto-isovalérate	Isobutanol	Acétate d'isobutyle
Phénylalanine	Phénylpyruvate	2-phényléthanol	Acétate de 2-phényléthyle
Tyrosine	3-indolacétate	Tyrosol	Hydroxy-phénylacétate
Tryptophane	3-indol-pyruvate	Tryptophol	
Méthionine	α -céto- γ -butyrate	Méthionol	
Thréonine	α -céto-butyrate	Propanol	

L'excrétion des alcools supérieurs par la cellule semble dépendre d'un mécanisme de diffusion passive à travers la membrane (Lipinski, 2001). Par contre, le transport des acides issus du catabolisme des acides aminés, est effectué par l'intermédiaire d'un transporteur membranaire codé par *PDR12* (Hazelwood *et al.*, 2006, 2008).

3.1.2 Autres voies de synthèse

Si la voie d'Ehrlich est couramment désignée comme la voie principale de synthèse des alcools supérieurs (Bisson, 1991; Hazelwood *et al.*, 2008; Henschke & Jiranek, 1993), ces derniers peuvent être synthétisés directement à partir du métabolisme carboné central (Bell & Henschke, 2005; Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998). Le suivi de l'évolution des alcools supérieurs sur la durée de la fermentation montre en effet que leur synthèse perdure tout au long du process alors que la totalité de l'azote assimilable est consommée au cours du premier tiers de la fermentation (Molina *et al.*, 2007).

La plupart des cétoacides dont dérivent les alcools supérieurs sont des intermédiaires de la glycolyse ou du TCA (Figure 8). Si la cellule dispose d'ions ammonium ces cétoacides rentrent dans la synthèse des acides aminés mais, en cas de faible disponibilité en azote, ces cétoacides subissent une décarboxylation puis une réduction en alcool supérieur (Oshita *et al.*, 1995). C'est le cas de l' α -cétobutyrate, précurseur du propanol qui peut être synthétisé à partir du pyruvate mais est également issu de la dégradation de la thréonine (Greenberg, 1969; Holmberg & Petersen, 1988; Petersen *et al.*, 1988). De même l'isobutanol et l'alcool isoamylique peuvent être formés directement à partir du métabolisme du glucose (Figure 8).

Cependant ces voies de synthèse ont été peu explorées et leurs rôle est encore mal défini.

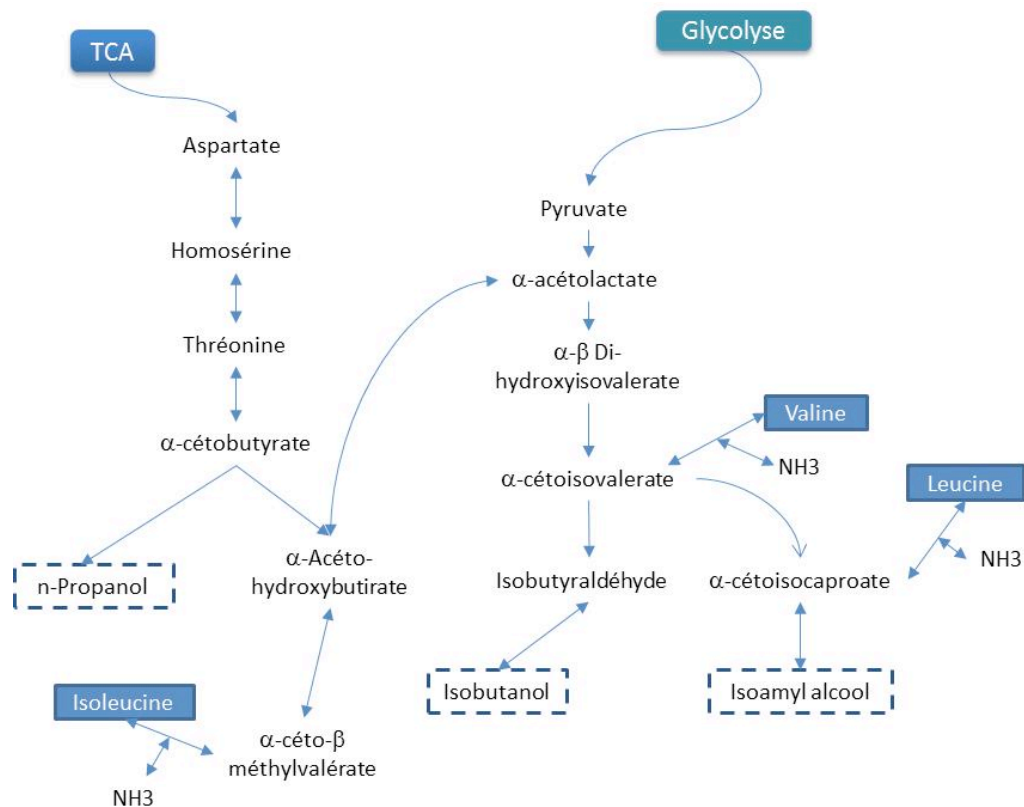


Figure 8 Synthèse des alcools supérieurs - influence du métabolisme carboné (d'après Swiegers et al. (2005))

3.2 Les esters

Contrairement aux alcools supérieurs la présence d'esters dans les vins est généralement considérée comme positive, ces composés étant associés avec des notes florales et fruitées. Cependant à forte concentration, certains esters comme l'acétate d'éthyle peuvent apporter des arômes moins recherchés de type solvant.

Les principaux esters formés sont les esters d'acétate, dérivés des alcools supérieurs (Acétate d'éthyle, Acétate d'isoamyle, acétate d'isobutyle, acétate de 2-phényléthyle) et les esters d'éthyle ou esters d'acides gras (Butanoate d'éthyle, Décanoate d'éthyle, Hexanoate d'éthyle, Octanoate d'éthyle, Dodécanoate d'éthyle). L'acétate d'éthyle est généralement le plus représenté dans les vins. La proportion des esters excrétés hors de la cellule diminue avec la longueur de la chaîne carbonée et augmente avec la température de fermentation (Nykänen & Suomalainen, 1983).

Les esters d'acétate sont synthétisés par la réaction d'un alcool supérieur avec l'acétyl-coA, qui peut être formé par décarboxylation oxydative du pyruvate ou par une activation directe de l'acétate par l'ATP. Outre la concentration cellulaire en ces deux

éléments, la synthèse des esters d'acétate dépend principalement de l'activité des deux acétyl transférases (AATs), *ATF1* et *ATF2*. En effet, en fermentation, le niveau maximum d'expression de *ATF1* et *ATF2* est corrélé avec la teneur finale en esters d'acétate (Saerens *et al.*, 2008). Cependant la synthèse d'acétate d'isobutyle, d'acétate d'éthyle et d'acétate de propyle est maintenue chez les levures présentant une délétion des deux gènes, ce qui suggère l'intervention d'une troisième enzyme (Verstrepen *et al.*, 2003).

Les esters d'acides gras sont formés à partir d'éthanol et d'acyl-CoA, sous l'action de deux acyl-CoA/ethanol transférases. *EEB1* et *EHT1* ont été identifiés comme codant pour ces enzymes, cependant leur activation ne semble pas être un facteur limitant pour la synthèse des esters d'acides gras. En effet la délétion de ces deux gènes supprime la synthèse d'hexanoate d'éthyle mais n'entraîne qu'une réduction de la teneur en octanoate d'éthyle et décanoate d'éthyle (Saerens *et al.*, 2006).

Le rôle de la synthèse d'esters chez la levure n'est pas clairement identifié, cependant plusieurs hypothèses ont été avancées, comme la régénération du coenzyme A libre dû à la carence en acides gras insaturés, la détoxification vis à vis des acides organiques ou encore leur utilisation comme analogue des acides gras insaturés pour le maintien de l'intégrité membranaire en anaérobiose (Saerens *et al.*, 2010).

3.3 Effet des ajouts d'azote sur la synthèse des composés volatils

La disponibilité du moût en azote influence le métabolisme de la levure et donc la production des métabolites secondaires dans des proportions dépendant de la source d'azote, de la souche de levure et des conditions de fermentation.

Plusieurs études ont montré un effet marqué de la supplémentation du moût en azote sur les teneurs en glycérol et en certains acides organiques, en particulier l'acide acétique (Albers *et al.*, 1998; Torrea *et al.*, 2011; Vilanova *et al.*, 2007) et l'acide succinique (Coulter & Godden, 2004). Cependant cet effet est variable suivant les souches (Pretorius, 2007). Les besoins en carbone qui en découlent sont susceptibles de diminuer les quantités de carbone disponibles pour la synthèse d'éthanol (Pretorius, 2007). Cependant les études sur le sujet ont montré un impact limité de l'ajout de DAP en début de fermentation sur le rendement en éthanol (Albers *et al.*, 1996; Barbosa *et al.*, 2009; Ugliano *et al.*, 2010).

L'impact sur les composés volatils de la supplémentation du moût en azote a fait l'objet de plusieurs études du fait de l'influence directe de ces composés sur l'équilibre aromatique des vins (Bell & Henschke, 2005; Smyth *et al.*, 2005).

La concentration en alcools supérieurs qui dérivent directement des acides aminés est influencée par la teneur en azote assimilable mais cette relation n'est pas linéaire. En effet, l'évolution de la teneur du vin en alcools supérieurs augmente avec la teneur du moût en azote assimilable pour de faibles teneurs en azote assimilable (jusqu'à 200-300 mg/L) puis diminue avec l'augmentation de la teneur en azote assimilable (Pretorius, 2007, (Carrau *et al.*, 2008; Vilanova *et al.*, 2007), à l'exception notable du propanol dont la concentration augmente avec la quantité d'azote disponible (Beltran *et al.*, 2005; Carrau *et al.*, 2008).

Cette variation de l'effet de l'ajout d'azote en fonction de la quantité mise en œuvre corrobore les observations de (Yoshimoto *et al.*, 2002) qui ont montré l'expression des gènes *LEU1*, *LEU2*, *BAT1* et *BAT2* impliqués dans la synthèse des acides aminés branchés est augmentée pour une faible augmentation de la teneur en azote puis diminue pour des ajouts plus importants.

Contrairement aux alcools supérieurs, la teneur en esters d'acétate est généralement augmentée par la supplémentation du moût. Cet effet est expliqué par une plus forte expression des gènes ATF codant pour les alcools-acyl-transférases (Verstrepen *et al.*, 2003; Yoshimoto *et al.*, 2002).

L'effet d'un ajout d'azote en cours de fermentation sur les composés volatils est complexe et dépend du type et de la quantité de la source (organique ou minérale) mais aussi du moment d'ajout (Tableau 5) (Barbosa *et al.*, 2009; Beltran *et al.*, 2005; Garde-Cerdán & Ancín-Azpilicueta, 2008; Jiménez-Martí *et al.*, 2007a; Torrea *et al.*, 2011b). Beltran en 2005 et Barbosa, 2009, ont comparé les teneurs en composés volatils lors d'une fermentation sur moût supplémenté avant fermentation et après un ajout d'azote à mi-fermentation. Il apparaît qu'un ajout d'azote réalisé à mi fermentation entraîne une augmentation des teneurs en 2-phényléthanol et en son ester, l'acétate de 2-phényléthyle mais également de certains esters d'acides gras. Cet effet est moins marqué lors d'un mélange d'acides aminés que lors de l'ajout d'ammonium seul sous forme de DAP (Di-ammonium-phosphate) (Barbosa *et al.*, 2009). Cependant, il ressort des différentes études sur le sujet que l'effet d'un ajout d'azote sur la teneur en composés volatils est extrêmement variable

Tableau 5 Effet d'un ajout d'azote en vinification; influence de la nature la source ajoutée et du moment d'ajout sur les esters et alcools supérieurs.

Auteur	Type d'ajout	Moment d'ajout	Augmentation	Diminution
Torrea <i>et al.</i> et al (2011)	NH4+ ou acides aminés	Avant fermentation	Esters d'alcool supérieur et esters d'éthyle	Isobutanol Alcool isoamylique 2-phényl-éthanol
Jiménez-Martí <i>et al.</i> (2007)	Acides aminés	Avant fermentation	Isobutanol Alcool isoamylique 2-phényl-éthanol Acétate de 2-phényléthyle	Acétate d'éthyle Acétate d'isoamyle
	NH4+	Idem	Isobutanol Alcool isoamylique 2-phényl-éthanol	Acétate d'éthyle Acétate d'isoamyle Acétate de 2-phényléthyle
	Acides aminés	Fin de phase de croissance	Alcool isoamylique 2-phényléthanol Acétate de 2-phényléthyle	Isobutanol Acétate d'éthyle Acétate d'isoamyle
	NH4+	Idem	-	Isobutanol 2-phényl-éthanol Acétate d'éthyle Acétate d'isoamyle Acétate de 2-phényléthyle
Beltran <i>et al.</i> (2005)	NH4+ et Acides aminés	Avant fermentation	Propanol Acétate d'isobutyle Acétate d'isoamyle	Isobutanol Alcool isoamylique 2-phényl-éthanol Héxanoate d'éthyle Octanoate d'éthyle Décanoate d'éthyle Acétate de 2-phényléthyle
	NH4+ et Acides aminés	Milieu de phase de croissance	Propanol Esters d'acétate Butyrate d'éthyle Acétate de 2-phényléthyle	Isobutanol Alcool isoamylique 2-phényl-éthanol Héxanoate d'éthyle Octanoate d'éthyle Décanoate d'éthyle

4 La fermentation continue

Depuis l'invention du chemostat par (Monod, 1950) et (Novick & Szilard, 1950), la culture continue a permis de faire évoluer la connaissance de la physiologie microbienne de façon considérable. Depuis, différentes variantes de ce système ont été développées qui ont conduit à une meilleure connaissance de la physiologie des microorganismes mais également à l'essor des biotechnologies dans l'industrie.

4.1 Le chemostat

4.1.1 Principe

Le principe du chemostat repose sur les travaux de Monod (1942) qui ont pointé la relation entre le taux de croissance (μ) d'une population microbienne et la concentration en substrat (S). Les différentes phases qui définissent le cycle de croissance de la population (latence, croissance et phase stationnaire) résultent de l'interaction du microorganisme avec son environnement physico-chimique.

La culture en chemostat permet de maintenir les microorganismes dans un état stable et de découpler la croissance vis à vis de l'évolution du milieu (Bull, 2010; Hoskisson & Hobbs, 2005).

4.1.2 Fonctionnement

Le chemostat est la forme la plus simple de fermentation continue.

Il s'agit d'un système ouvert, dans lequel le milieu de fermentation est alimenté en continu par du milieu stérile. Le milieu contenant microorganismes et métabolites produits est prélevé en continu, avec un débit égal au débit d'alimentation, le chemostat est donc caractérisé par un volume réactionnel constant.

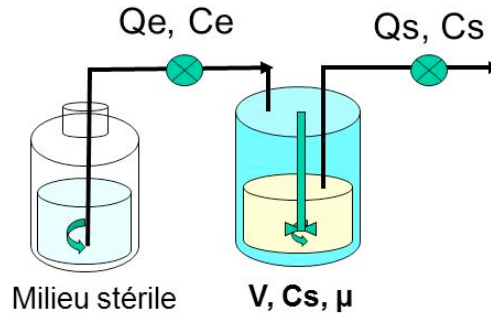


Figure 9 Schéma du chemostat. Q_e : débit d'alimentation; Q_s : débit de sortie; V : Volume réactionnel; C_e : concentration du composé C dans l'alimentation; C_s : concentration du composé C dans la cuve; μ : taux de croissance de la population cellulaire

Le taux de croissance spécifique des microorganismes (μ) est contrôlé par le substrat limitant. Le rapport du débit d'alimentation (Q_e) sur le volume (V) de milieu dans la cuve de fermentation est égal au taux de dilution D .

Pour un élément de concentration C , le bilan matière dans le chemostat peut ainsi s'écrire comme suit :

Équation 1

$$\frac{dC}{dt} = C_e \times \frac{Q_e}{V} - C_s \times \frac{Q_s}{V} + r_c = D(C_e - C_s) + r_c$$

Avec C , C_e et C_s : concentration du composé dans le réacteur, l'alimentation et le flux de sortie du réacteur ; Q_e et Q_s les débits d'alimentation et de sortie, V le volume réactionnel et r_c la vitesse de production du composé C .

Pour la biomasse, la concentration C_e est nulle et l'équation de conservation s'écrit :

Équation 2

$$\frac{dX}{dt} = -DX + r_x$$

En régime permanent le milieu a une composition constante dans le temps, $dX/dt = 0$ et le taux de croissance est défini par le taux de dilution D .

Équation 3

$$D = \frac{r_X}{X} = \mu$$

Une des contraintes particulières de ce type de système est que lorsque le taux de dilution est trop proche du taux de croissance maximal (μ_{max}) de la souche de microorganisme cultivé, le système devient instable. D'autre part, si D est supérieur à μ_{max} , le renouvellement des cellules n'est pas assuré et le réacteur se vide progressivement des microorganismes ; c'est le phénomène de « lavage » du fermenteur.

4.1.3 Intérêt et applications

La culture continue de microorganismes a permis de développer les connaissances dans de nombreux domaines de la microbiologie qui font l'objet de la revue de Alan T Bull (2010). Ces applications couvrent de nombreux domaines de la microbiologie, notamment en physiologie, métabolisme, évolution microbienne, pathogénicité et écophysiologie.

Plus récemment, la culture continue s'est imposée comme un outil nécessaire au développement des techniques post-génomiques et de la biologie des systèmes (Hoskisson et Hobbs 2005, Alan T Bull, 2010). Le caractère défini, contrôlé et stable de la culture continue permet de caractériser une population microbienne dans un état physiologique donné (sur les plans biochimique, métabolique et génétique) (Leveau et Bouix, Biotechnologie Lavoisier 1993) et d'améliorer la qualité des données en terme de reproductibilité (ter Linde *et al.*, 1999; Piper *et al.*, 2002; Wick *et al.*, 2001). L'intérêt du chemostat pour l'étude du transcriptome a été mis en évidence par (Daran-Lapujade *et al.*, 2009). Plusieurs études ont montré l'influence du taux de croissance sur le transcriptome. Un stress ou une modification des conditions de fermentation (comme par exemple une variation de température) peut modifier le taux de croissance des levures. Pour comprendre l'effet d'un stress au niveau de la levure il est donc important de pouvoir dissocier les changements d'expression consécutifs au stress de ceux résultant de la modification du taux de croissance, ce que permet le chemostat contrairement au batch.

Une des limites du chemostat pour l'étude des microorganismes est liée au fait que ce système met obligatoirement en œuvre des cellules en croissance. Les études réalisées en chemostat avec *S.cerevisiae* sont généralement réalisées à des taux de croissance supérieurs à 0.02 h^{-1} , ce qui reste relativement élevé par rapport aux taux de croissance rencontrés dans les milieux naturels (Boender *et al.*, 2009). Le rétentostat mis au point par Herbert (1961) consiste à retenir la biomasse à l'intérieur du réacteur par un système de filtration. La biomasse s'accumule progressivement dans le réacteur et son taux de croissance atteint une valeur proche de zéro lorsque la vitesse spécifique d'apport du substrat atteint le niveau minimal requis pour sa maintenance énergétique. Cet outil offre la possibilité de cultiver *S. cerevisiae* avec un taux de croissance de $0,001 \text{ h}^{-1}$ tout en maintenant une activité métabolique et une viabilité supérieure à 80% (Boender *et al.*, 2009, 2011).

La fermentation continue a également trouvé des applications industrielles dans des domaines aussi variés que la brasserie, le traitement des eaux usées, la production de molécules d'intérêt (protéines, biopolymères) ou la sélection de souches microbiennes. L'utilisation de microorganismes immobilisés a ouvert de nouvelles possibilités d'application des procédés de fermentation continue notamment pour la production de boissons. Cette technique présente de nombreux avantages par rapport à une fermentation standard, dont le maintien d'une densité cellulaire élevée et donc une plus forte productivité volumétrique, un meilleur rendement de fermentation, une plus grande tolérance aux fortes teneurs en substrat et une réduction de l'inhibition par le produit (Kourkoutas *et al.*, 2004).

4.2 Fermentation continue-multi-étagée

4.2.1 Principe

Un fermenteur multi-étagé est composé de plusieurs réacteurs branchés en série. Les caractéristiques du réacteur R1 sont identiques à celles d'un chemostat classique (taux de croissance (μ) dépendant du taux de dilution D). Les étages successifs sont alimentés en cascade par le flux de sortie du réacteur précédent et les caractéristiques du moût

(concentration en substrat et produit, teneur en biomasse...) dépendent donc de celle des étages précédents.

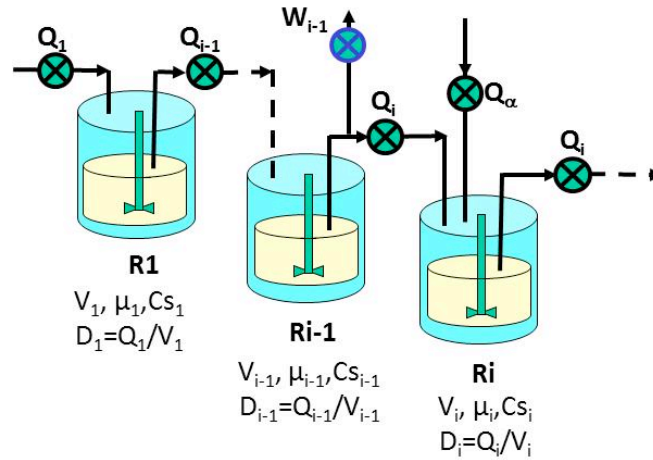


Figure 10 Schéma d'un fermenteur continu multi-étagé à i étages. V : volume de milieu ; Q : débit (ml/min), Q_1 : débit d'alimentation en milieu frais, Q_α : débit d'alimentation secondaire ; W : Débit dérivé ; μ : taux de croissance cellulaire ; C_i : concentration du composé C

Comme dans le cas du chemostat, le volume de chaque cuve est constant dans le temps. Si tous les volumes et débits sont égaux, le taux de dilution est le même dans chaque cuve mais il est possible de faire varier ce paramètre de deux manières :

- i. En faisant varier le volume d'une cuve à l'autre, D_i est alors supérieur à D_{i-1} si V_i est inférieur à V_{i-1} et inversement
- ii. En créant une dérivation entre R_{i-1} et R_i ; une partie du flux de sortie de R_{i-1} est éliminée avec un débit W_{i-1} , Q_i est alors inférieur à Q_{i-1} et donc D_i est inférieur à D_{i-1}

Les étages successifs peuvent recevoir une alimentation en substrat, avec un débit Q_α . Pour l'étage R_i , le taux de dilution s'exprime :

Équation 4

$$D_i = \frac{Q_i}{V_i} = \frac{Q_{i-1} - W_{i-1} + Q_\alpha}{V_i}$$

Pour un composé C de concentration C_s à l'étage R_i , la conservation de la matière s'écrit :

Équation 5

$$\frac{dC_i}{dt} = C_{e_i} \times \frac{Q_{e_i}}{V_i} - C_s \times \frac{Q_{s_i}}{V_i} + r_{ci} = C_{i-1} \times \frac{Q_i}{V_i} - C_i \times \frac{Q_i}{V_i} + r_{ci}$$

La conservation de la biomasse dans ce cas permet de d'écrire la relation suivante :

Équation 6

$$\frac{dX_i}{dt} = X_{i-1} \times \frac{Qe_{i-1}}{V_i} - X_{S_i} \times \frac{Qs_i}{V_i} + r_{X_i} = D_i(X_{i-1} - X_i) + r_{X_i}$$

En régime permanent, on peut donc calculer le taux de croissance de la biomasse au niveau de l'étage i :

Équation 7

$$\mu_i = \frac{D_i(X_i - X_{i-1})}{X_i}$$

De la même manière, les taux spécifiques de consommation ou de production (q_s) des nutriments et métabolites sont calculés par rapport à la teneur en biomasse :

Équation 8

$$qs_{ci} = \frac{D_i(C_i - C_{i-1})}{X_i}$$

Légende :

X_i et X_{i-1} : concentration en biomasse dans les étages i et $i-1$ ($mg L^{-1}$)

C_i et C_{i-1} : concentration du composé C dans les étages i et $i-1$ ($mg L^{-1}$)

Qe_i : débit d'entrée dans l'étage i ($L h^{-1}$)

Qs_i : débit de sortie de l'étage i ($L h^{-1}$)

W_i : débit de sortie de l'étage i non compris dans le débit d'entrée dans l'étage $i+1$ ($L h^{-1}$)

V_i : volume réactionnel dans l'étage i (L)

D_i : taux de dilution dans l'étage i (h^{-1})

r_{ci} et r_{xi} : vitesse de production du composé C et de la biomasse dans l'étage i ($mg L^{-1} h^{-1}$)

μ : taux de croissance cellulaire (h^{-1})

qs_{ci} : vitesse spécifique de production du composé C ($mg g^{-1} h^{-1}$)

4.2.2 Applications

Un des avantages de ce type de système est qu'il permet une séparation physique de la croissance cellulaire et de la synthèse de produit (Bayrock & Michael Ingledew, 2001), il est alors plus facile d'optimiser les rendements pour ces deux paramètres, en particulier en cas d'inhibition de la croissance par le produit de fermentation. Pour la production de bioéthanol, le fermenteur continu multi-étagé permet d'obtenir une meilleure productivité que le chemostat (Laluce *et al.*, 2002).

La possibilité d'apporter du substrat au niveau des étages successifs présente un intérêt en cas de limitation par une trop forte concentration en substrat ou de présence d'un composé toxique dans le milieu. Ce procédé trouve des applications notamment pour le traitement des eaux usées (Bayrock & Michael Ingledew, 2001; Lin *et al.*, 2001).

4.3 Procédés continus en vinification

Les années 1960 ont vu se développer des techniques de vinification en continu. Les étapes de macération et de fermentation sont réalisées dans un seul fermenteur alimenté par la base avec de la vendange fraîche alors que le jus fermenté est prélevé de façon régulière par le sommet (Diviès *et al.*, 1994; Fleet, 1993b).

Dans les années 1970-80 le développement de l'extraction à chaud en phase liquide (thermovinification) qui permet d'écourter la durée de macération et limite le risque de contamination microbienne a ouvert des perspectives pour le développement des techniques de vinification en continu.

Des essais menés à cette époque en fermenteur multi-étagé ont montré la possibilité d'obtenir un vin de qualité comparable à celui issu d'une vinification classique (Barre *et al.* 1980, données internes).

L'intérêt perçu était principalement économique, la vinification en continu étant synonyme d'une meilleure productivité (réduction des temps morts de production), d'une réduction de l'espace nécessaire et de la masse salariale (Ribéreau-Gayon *et al.* 1982). D'autre part, l'apport journalier de vendange fraîche limite l'échauffement de la cuve et donc les dépenses énergétique consacrées à la régulation thermique.

Cependant ces conditions de vinification sont plus favorables au développement de contaminations bactériennes, au détriment de la qualité du vin. Un autre inconvénient est que la pratique de la vinification en continu rend plus difficile la sélection des

cépages et la diversification des produits (Ribéreau-Gayon *et al.* 1998). Pour toutes ces raisons, les fermentations continues œnologiques ont été quasiment abandonnées depuis une vingtaine d'années.

Depuis, l'amélioration technologique de l'équipement des caves et les contraintes économiques ont conduit le monde du vin à évoluer et à adapter sa production aux exigences des consommateurs et à la concurrence du marché. Dans cette optique, le procédé de vinification continue a été récemment envisagé par Kassim (2012). Le fermenteur mis au point met en œuvre des levures immobilisées de type *S.cerevisiae* et *Sch.pombe* afin de réaliser en une seule étape la fermentation alcoolique et la désacidification du moût. Ce procédé s'est révélé efficace pour la production de vin sucré (10 g/L de sucre résiduel), en moins de 2 jours au lieu de 3 à 5 jours pour une fermentation classique. Bien qu'il ne soit pour l'instant pas viable économiquement, ce procédé s'avère prometteur et les perspectives envisagées comprennent l'adaptation en fermenteur bi-étagé.

Matériels et méthodes

1 Souches de levures

Deux souches de levures ont été utilisées

- La souche V5: *MAT a, ura3*. est une souche modèle de laboratoire. Obtenue à l'UMR Sciences Pour l'Œnologie, cette souche est un ségrégant haploïde isolé à partir de la souche œnologique 81-30 (Lallemand).
- La souche EC1118: souche œnologique produite par la société Lallemand

Les levures fraîches sont conservées à 4°C sur gélose YEPD (Extrait de levure 1%, peptone 2%, glucose 2%, agar 2%).

2 Milieux de culture

2.1 Milieux de fermentation

Les fermentations en conditions œnologiques sont réalisées sur un moût synthétique de composition proche d'un moût de raisin (Bely *et al.*, 1990a). Ce milieu est caractérisé notamment par une teneur élevée en sucre (200g/L de glucose), un pH acide et une teneur en azote assimilable variable. Il est désigné comme « MS n » où n représente la teneur en azote assimilable qui provient à 30% d'une source minérale (NH₄Cl) et 70% de sources organique (mélange d'acides aminés). Les travaux présentés ici ont été principalement réalisés avec un moût à forte teneur en azote assimilable (MS425) ou un moût à faible teneur en azote assimilable (MS100).

Le moût est préparé par lots de 50 L conservés à -4°C jusqu'à utilisation. Avant la fermentation le milieu est décongelé à température ambiante et stérilisé en vapeur fluante.

2.1.1 Composition du milieu

Les compositions générales pour les moûts MS425 et MS100 sont indiquées dans le tableau M1. Ces moûts sont globalement identiques, seule la teneur en azote varie.

Tableau M1 Composition générale des moûts synthétiques MS425 et MS100

	MS 425	MS 100
	(g/L)	
Glucose	200	
Acide malique	6	
Acide citrique	6	
KH ₂ PO ₄	0,75	
K ₂ SO ₄	0,5	
MgSO ₄	0,25	
CaCl ₂	0,155	
NaCl	0,2	
NH ₄ Cl	0,46	0,11
	(mL/L)	
Solution mère acides aminés	13,09	3,08
Solution mère d'oligo éléments	1	
Solution mère de vitamines	10	
Solution de facteurs anaérobies	1	

Le pH est ajusté à 3,3 avec une solution de NaOH 10 M.

Les différents composés sont ajoutés sous forme de solutions stock préparées extemporanément, aliquotées et conservées à 4°C (oligo éléments et facteurs anaérobies) ou -4°C (vitamines et acides aminés).

Les compositions des solutions stock ainsi que la teneur des composés dans le moût sont indiquées ci-dessous :

Oligo-éléments:

Tableau M2 Composition de la solution stock d'oligo éléments et concentrations des composés dans le moût

	Solution stock (g/L)	MS pour 1L (mg/L)
MnSO ₄ , H ₂ O	4	4
ZnSO ₄ , 7 H ₂ O	4	4
CuSO ₄ , 5 H ₂ O	1	1
KI	1	1
CoCl ₂ , 6 H ₂ O	0.4	0.4
H ₃ BO ₃	1	1
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	1	1
H ₂ O distillée	Qsp 1 L	

Vitamines:

Tableau M3 Composition de la solution stock de vitamines et concentrations dans le moût

	Solution mère (g/L)	MS pour 1L(mg/L)
Myo-inositol	2	20
Pantothénate de calcium	0.15	1.5
Thiamine	0.025	0.25
Acide Nicotinique	0.2	2
Pyridoxine	0.025	0.25
Biotine	3 mL*	0.003

*Solution mère de biotine à 100 mg/l préparée extemporanément.

Facteurs anaérobies:

Tableau M4 Composition de la solution stock de facteurs anaérobies et concentrations dans le moût

	Solution mère (pour 100 mL)	MS (pour 1L)
Ergostérol	1,5 g	0,15 mg
Acide oléique	0,5 mL	0,05 µL
Tween 80	50 mL	5 µL
Ethanol pur	Qsp 100 mL	

Acides aminés:

Tableau M5 Composition de la solution stock d'acides aminés et concentrations dans le moût

	Solution stock (g/L)	MS 425 pour 1L (mg/L)	MS 100 pour 1L (mg/L)
Acide aspartique	3.4	44.5	10.5
Acide glutamique	9.4	123.0	29.0
Alanine	11.1	145.3	34.2
Arginine	28.6	374.4	88.1
Cystéine	1	13.1	3.1
Glutamine	38.6	505.3	118.9
Glycine	1.4	18.3	4.3
Histidine	2.5	32.7	7.7
Isoleucine	2.5	32.7	7.7
Leucine	3.7	48.4	11.4
Lysine	1.3	17.0	4.0
Méthionine	2.4	31.4	7.4
Phénylalanine	2.9	38.0	8.9
Proline	46.8	612.6	144.1
Sérine	6	78.5	18.5
Thréonine	5.8	75.9	17.9
Tryptophane	13.7	179.3	42.2
Tyrosine	1.4	18.3	4.3
Valine	3.4	44.5	10.5
H ₂ O distillée	Qsp 1 L		

Ces acides aminés sont tous potentiellement assimilables au cours de la fermentation, à l'exception de la proline qui n'est pas assimilée en conditions anaérobies.

Dans le cas d'une fermentation avec la souche V5, les milieux sont supplémentés avec de l'uracile (50 mg/L), et de la méthionine (115 mg/L).

3 Fermentations

3.1 Pré-culture

3.1.1 Milieu

Milieu riche YEPD :

Extrait de levure	10 g
Peptone	20 g
Glucose	20 g
H ₂ O distillée	Qsp 1 L

3.1.2 Conditions

Avant leur inoculation dans le milieu de fermentation les levures sont cultivées à 28°C dans une fiole remplie au 1/10 ème de son volume et agitée à 180 rpm, 24h dans le milieu YEPD puis 24h dans le milieu de fermentation (moût synthétique).

3.2 Fermentation en batch

3.2.1 Matériel

Les fermentations en batch sont réalisées dans des cuves en verre de 2L (Biolafitte® ou Applikon®) fermées hermétiquement par une platine en acier et équipées d'une double enveloppe (Figure M1). La température est ainsi réglée à 28°C par circulation d'eau alimentée par un cryostat.

La platine est équipée d'orifices permettant d'installer un moteur et un arbre d'agitation, une canule de prélèvement, un condenseur et un bouchon plasma permettant l'ajout éventuel de liquide de manière stérile. Le milieu est agité en continu à 110 rpm par une pâle mécanique. Pour assurer une meilleur homogénéisation du milieu, la pâle d'agitation est complétée par une contre-pâle fixée à la platine.

Le gaz dégagé en cours de fermentation s'échappe à travers un condenseur (colonne réfrigérante dans laquelle circule de l'eau à 7°C) puis un débitmètre massique.

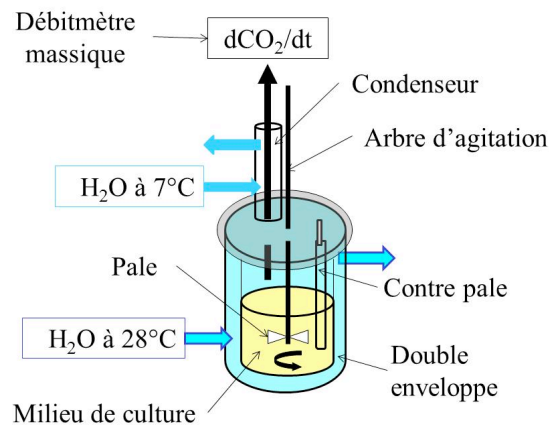


Figure M1 Schéma d'une cuve de fermentation

3.2.2 Conduite de fermentation

Au préalable, le milieu à fermenter est pasteurisé dans la cuve, 40 min à 100°C.

Après refroidissement, le moût est stabilisé à une température de 28°C puisensemencé à 10^6 cellules/mL à partir de la préculture décrite ci-dessus.

3.3 Fermentation continue-multi-étagée

3.3.1 Matériel

Le fermenteur continu multi-étagé (MSCF), (voir schéma en Figure M2) utilise plusieurs cuves identiques à celle décrite ci-dessus mais cette fois la platine comporte en plus du matériel déjà décrit, une voie d'alimentation et une canne de surverse.

Le modèle mis au point est un système à 4 étages, c'est à dire qu'il comporte 4 cuves (Ri) reliées en série par des tubes étanches à l'oxygène (Tubes Tygon Pharmed).

Le système est alimenté en continu avec un moût synthétique stérile conservé à 5°C en bonbonne de 10L.

Le milieu stérile est transféré au niveau du 1^{er} étage (cuve R1) à débit constant (Q) par une pompe péristaltique (Reglo Ismatec). Chaque cuve contient un volume (V) de milieu de culture déterminé en fonction du taux de dilution visé ($D=Q/V$), en tenant compte des contraintes de capacité des cuves de fermentation et des pompes d'alimentation (entre 500 mL et 1L dans nos conditions).

Le volume est maintenu constant grâce au système de surverse. Une canne biseautée est disposée à la surface du liquide et le milieu est transvasé en continu avec un débit

identique au débit d'alimentation. Le milieu constitué de moût synthétique partiellement fermenté et de levures est utilisé pour alimenter en continu la cuve R2, équipée du même système de surverse. Le milieu de culture est donc transféré en cascade du premier au dernier étage. Entre chaque étage une dérivation (Q_w) permet de faire varier le débit d'alimentation d'un étage à l'autre, avec $Q_1 \leq Q_2 \leq Q_3 \leq Q_4$.

Le fermenteur multiétagé est contrôlé par un logiciel (Multichem) développé sous Labview, qui permet, pour chaque étage :

- le calcul de la vitesse de dégagement de CO_2 (en g/L.h),
- à partir de cette vitesse, du volume du fermenteur et du débit d'alimentation, l'estimation de la quantité de sucre consommé et d'éthanol produit,
- le contrôle du débit de la pompe d'alimentation,
- la visualisation de l'ensemble de ces données sur une interface graphique.

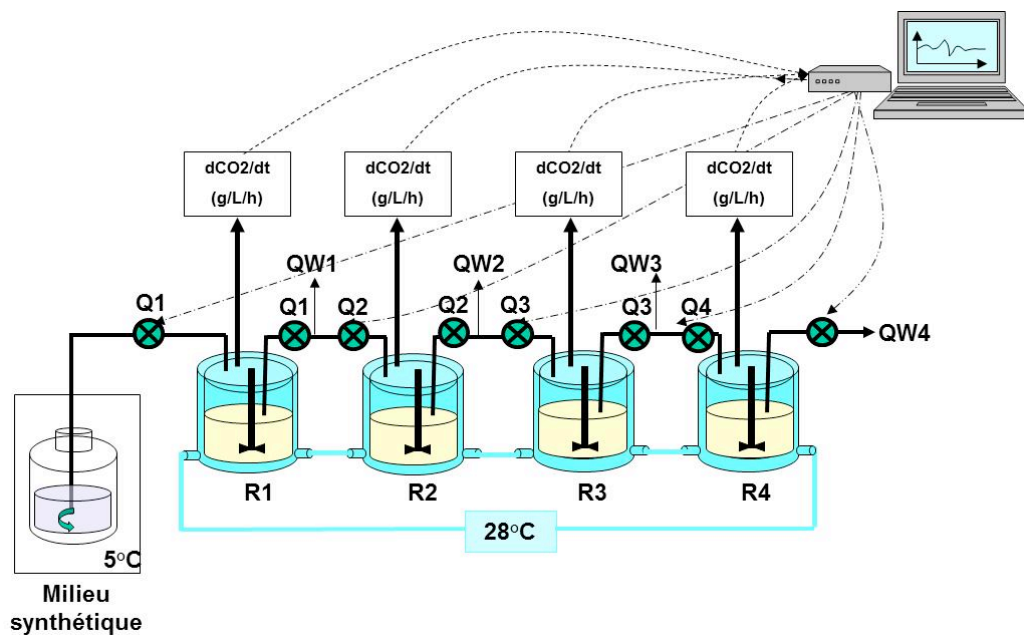


Figure M2 Schéma du fermenteur continu multi-étagé

3.3.2 Mise en œuvre du MSCF

La fermentation en MSCF démarre en mode batch, chaque cuve contenant un volume V_i de moût synthétique stérile réglé à 28°C. Le système est basculé en mode continu après environ 15 h, lorsque la vitesse de dégagement de CO₂ du premier étage atteint le niveau souhaité.

4 Méthodes de dosage

4.1 Détermination de la quantité de biomasse

4.1.1 Mesure de la population cellulaire et volume cellulaire moyen

Le nombre et la taille des cellules dans le milieu en cours de fermentation sont mesurés à l'aide d'un compteur de particules (Counter ZB-2, Beckman Coulter). Après prélèvement l'échantillon est dilué dans une solution d'électrolyte (Isoton II, Beckman Coulter) afin d'atteindre une concentration cellulaire comprise entre $4 \cdot 10^3$ et $8 \cdot 10^4$ cellules/mL. Les solutions diluées sont ensuite traitées aux ultrasons (Branson Sonifier 250) afin de séparer les agrégats.

Le principe de fonctionnement du compteur de particules repose sur les changements de résistance électrique que provoque le passage des cellules entre deux électrodes. Les particules en suspension dans l'électrolyte sont dirigées vers la zone de détection composée d'un orifice de 100 μm situé entre deux électrodes. Le volume d'électrolyte déplacé par chaque cellule est mesuré sous forme d'une impulsion électrique dont l'amplitude est proportionnelle à la taille des cellules. Ce système permet donc de mesurer précisément le nombre de particules et leur taille.

4.1.2 Détermination de la matière sèche

Le poids sec est déterminé en filtrant 15 mL du milieu de culture sur un filtre de nitrocellulose (Millipore 0,45 μm). Le filtre est ensuite rincé avec 50mL d'eau distillée puis séché au four (48h à 110°C).

4.2 Métabolites extracellulaires

Les principaux composés issus du métabolisme carboné central (glucose, éthanol, glycérol, acétate, pyruvate, succinate et α -cétoglutarate) sont dosés dans le surnageant de culture par chromatographie liquide haute performance (HPLC).

L'appareillage utilisé est composé d'un chromatographe (Hewlett Packard) muni d'une pompe (HPLC 1100, Agilent Technologies®) délivrant un débit constant de 0,6 mL/min, d'un injecteur automatique (HPLC 1100, Agilent Technologies®, volume d'injection 25 μ L), d'une pré-colonne (Bio-Rad) et d'une colonne de séparation échangeuse d'anions (Aminex HPX 87H, Bio-Rad) thermostatée à 45°C. La phase mobile est constituée d'une solution d'acide sulfurique à 0,008 N. La détection des composés est réalisée par réfractométrie (glucose, éthanol, glycérol, succinate et α -cétoglutarate) et spectrophotométrie UV à longueur d'onde fixe à 210 nm (pyruvate et acétate).

Avant injection, les échantillons sont préparés par dilution au 1/6^{ème} dans la phase mobile puis centrifugés 10 min à 12000 g.

4.3 Composés volatils

Les esters et alcools supérieurs sont dosés dans le surnageant de culture par chromatographie en phase gazeuse. La méthode utilise un analyseur GC-FID (Agilent 6850) équipé d'un injecteur « headspace » (HP7694, Hewlett Packard).

Cette technique nécessite un conditionnement préalable des échantillons à doser. L'analyse est réalisée sur 3 mL de surnageant de culture auxquels est ajouté 1g de NaCl afin de faciliter le passage en phase gazeuse des composés volatils. Afin de standardiser les conditions d'équilibre entre phase liquide et espace de tête la concentration en éthanol est ajustée à 11% v/v par l'ajout de 2 mL d'un mélange en proportions variables de 2 solutions d'acide tartrique à 12 g/L dilué dans l'eau ou dans un mélange éthanol/eau (30% v/v). Enfin un étalon interne est ajouté à l'échantillon sous forme de 50 μ L d'une solution de 4-Methylpentan-2-ol à 2 g/L.

L'incubation et l'injection sont réalisées avec un injecteur de type Headspace autosampler HT200-HTA. L'échantillon est agité et chauffé à 50°C pendant 5 min. 1 mL de gaz est prélevé dans l'espace de tête à l'aide d'une seringue préchauffée à 60°C et injecté dans la colonne de séparation BP20 (30 m x 0,53 mm x 1,0 μ m, SGE®). La température de l'injecteur est fixée à 240°C. Le gaz vecteur utilisé est l'hydrogène,

injecté au débit de 4,8 mL/min. Le programme de température du four est illustré dans la figure M3.

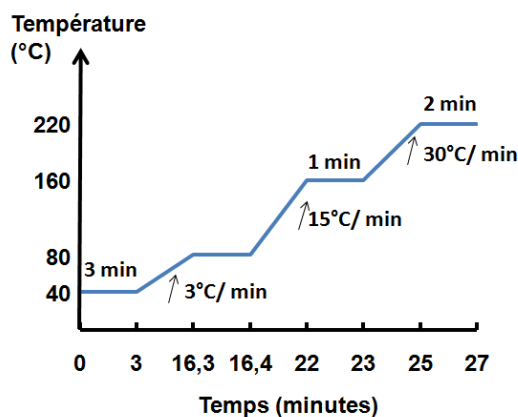


Figure M3 Programme de température du four pour le dosage des composés volatils.

La température du détecteur FID est fixée à 250°C. Les chromatogrammes sont acquis et analysés avec le logiciel Chemstation (Agilent®).

4.4 Métabolites intracellulaires

4.4.1 Prélèvement et extraction

Un échantillon de 5 mL de culture est prélevé et directement introduit dans un tube de 40 mL contenant 26 mL d'une solution de méthanol à 60% dans le tampon HEPES (175 mM, pH 7,5) à -60°C. Les tubes sont aussitôt centrifugés à -10°C (30 secondes à 5000 g) puis le surnageant est éliminé. Le culot cellulaire est lavé avec 40 mL de la solution méthanol/HEPES maintenue à -60°C puis l'étape de centrifugation est réitérée.

Pour l'extraction des métabolites intracellulaires le culot cellulaire est ensuite repris dans 5 mL d'une solution éthanol/HEPES 1M (75/25% v/v) à 80°C puis le mélange est incubé 5 min à 80°C. Les culots cellulaires en solution éthanol/HEPES sont alors congelés à -80°C.

Avant l'analyse, les échantillons sont décongelés lentement à froid puis l'éthanol est évaporé sous vide (Rotavapor). L'échantillon est placé dans un ballon à évaporer et le tube est rincé avec 2 mL d'éthanol absolu qui sont ensuite ajoutés au ballon. Le ballon est maintenu sous vide à 70°C jusqu'à obtention d'un résidu d'aspect « caramel

liquoreux ». Ce résidu est repris dans 1 à 2 mL d'eau distillée et placé dans un microtube taré. Le volume d'échantillon est déterminé par pesée.

L'extrait est ensuite centrifugé à 4°C, 10 min à 5000 g puis aliquoté en fractions de 150 à 200 µL.

4.4.2 Séparation et quantification

Le contenu en métabolites intracellulaires est analysé par chromatographie d'échange d'ions (Dionex, Sunnyvale, CA, USA). Le système chromatographique ICS3000 est composé d'une pompe quaternaire, d'un module équipé d'un détecteur ampérométrique ED50 et d'un détecteur conductimétrique couplé à un détecteur UV à photodiodes PDA. Le pilotage du système, l'acquisition des données et le retraitement se réalisent sur le logiciel Chromeleon.

Cette technique permet de déterminer les teneurs intracellulaires en :

- sucres phosphorylés : Glucose-6-P, Fructose-6-P, Fructose-1-6-P, Trehalose-6-P, Fructose-1-P,...

- acides organiques : acétique, formique, pyruvique, malique, fumarique, citrique, PEP, α-cétoglutarate...

Les sucres phosphatés sont séparés sur une colonne CarboPac PA10 équipée d'une pré-colonne PA1, par un gradient acétate de sodium dans NaOH 75 mM : 75 mM à 100 mM en 35 min puis à 350 mM en 65 min et à 500 mM en 75 min (figure M4).

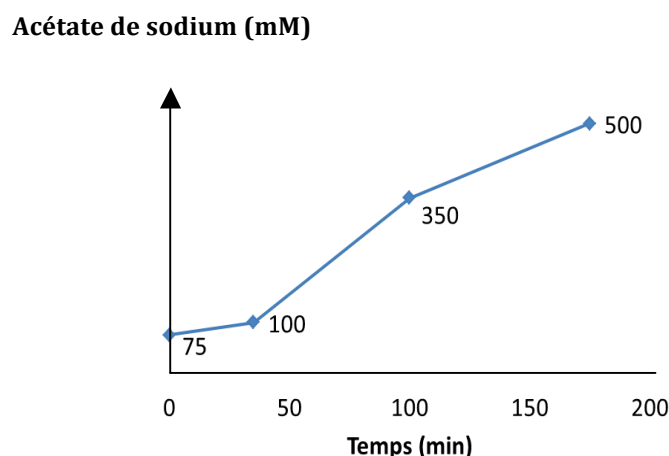


Figure M4 Gradient d'acétate de sodium utilisé pour la séparation des sucres phosphatés

La séparation des acides organiques est réalisée sur une colonne IonPac AS11 équipée d'une précolonne AG11, par l'application d'un gradient de NaOH dans du méthanol à 16% (figure M5). La concentration en éluant augmente de 0,5 à 24 mM pendant 15 min puis est amené à 27 mM en 3 min et enfin à 35 mM pendant les 6 dernières min.

La détection et la quantification des acides organiques se font en conductimétrie après une étape de suppression et en détection UV à 210 nm.

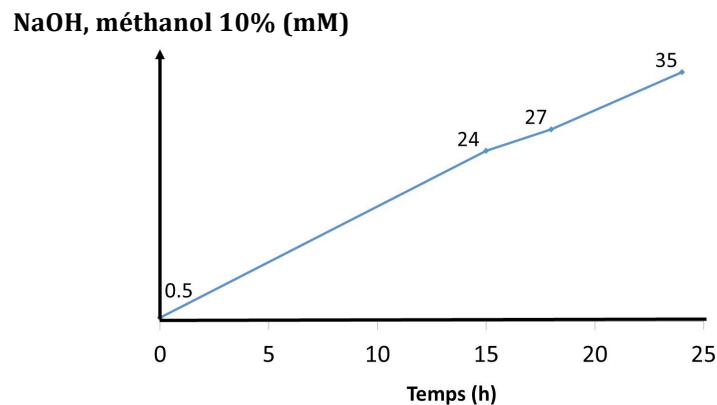


Figure M5 Gradient de NaOH-méthanol utilisé pour la séparation des acides organiques

4.5 Azote assimilable

4.5.1 Dosage des acides aminés libres

La teneur du surnageant de culture en acides aminés libres est déterminée par chromatographie ionique. La préparation préalable des échantillons permet d'éliminer les macromolécules (principalement des protéines) qui sont susceptibles de colmater ou altérer la colonne et biaiser le résultat du dosage.

La précipitation des protéines est réalisée par ajout de 200 μL d'une solution d'acide sulfosalicylique (SSA) à 800 μL de surnageant de culture. La solution SSA contient également 2,5 mmol/L de Norleucine qui fait office d'étalon interne. Les échantillons sont ensuite maintenus 1h à 4°C puis centrifugés 10 min à 12000 g et filtrés sur 0,22 μm . Les acides aminés sont séparés sur une colonne échangeuse de cations (résine anionique Ultrapac-8 Lithium-form), l'élution faisant intervenir différents tampons provoquant des gradients de température (32 à 75°C), de pH (2,8 à 3,55) et de concentration en acétate de lithium (0,2 à 1,65 M). En sortie de colonne, les composés aminés sont dérivatisés par couplage de leur groupement aminé libre à la ninhydrine, formant un composé coloré, le

pourpre de Ruhemann qui présente un maximum d'absorption à 570 nm et dont la concentration est proportionnelle à celle de l'acide aminé dérivatisé. Les chromatogrammes sont analysés à l'aide du logiciel Biochrom 30.

4.5.2 Azote minéral

L'ammonium des moûts est dosé à l'aide du kit enzymatique Enzytec™ fluid Ammonia. La méthode est basée sur la réaction entre l'ammonium et le 2-oxoglutarate catalysée par la glutamate déshydrogénase en présence de NADH :



La concentration en NADH est déterminée par mesure de l'absorbance à 340 nm. La teneur de l'échantillon en NH_4^+ est déterminée par la différence d'absorbance avant et après l'ajout de 2-oxoglutarate, la consommation du NH_4^+ étant stœchiométrique à celle du NADH.

5 Analyse transcriptomique

L'étude de l'expression des gènes est basée sur l'analyse du transcriptome constitué par l'ensemble des ARNm présents dans une cellule à un instant t et dans une situation donnée. La technique utilisée ici met en œuvre des puces à ADN ou microarrays de type Agilent 8x15K en mono-couleur. Ces puces sont constituées de plaques de verre sur lesquelles sont fixés des brins monocaténaux d'ADN complémentaires d'un ARNm.

Les ARNm sont extraits à partir des cellules prélevées dans les différentes conditions de culture et subissent une rétro-transcription puis une transcription en présence de nucléotides marqués par un fluorochrome. Les ARNc marqués sont ensuite purifiés et hybridés sur les puces. Les fragments d'ARNc marqués se fixent aux brins d'ADN par complémentarité de bases. Les différences d'expression des gènes sont évaluées en fonction de l'intensité de la fluorescence.

5.1 Prélèvement des échantillons

Le protocole d'extraction a été mis au point pour 10^9 cellules. Un volume de culture correspondant à cette quantité de cellules est prélevé et centrifugé à froid (4°C), 2 min à 2000 g. Le culot cellulaire est rapidement lavé dans 750 μL d'eau DEPC (eau traitée 1 nuit au diéthylpyrocarbonate puis stérilisée 15 min à 120°C). Après centrifugation 15 secondes à 12000 g, le surnageant est éliminé et les cellules sont congelées rapidement dans un bain de méthanol à -80°C .

5.2 Extraction et purification des ARN totaux

Les cellules sont broyées 15 min au vortex en présence de Trizol (Sigma) et de billes de verre. Les protéines et débris membranaires sont précipités au chloroforme puis les échantillons sont centrifugés 15 min à 10000 rpm (Beckman, JA20) et la phase aqueuse est récupérée. L'ARN est ensuite précipité à l'isopropanol. Le culot formé après centrifugation 5 min à 10000 rpm (Biofuge fresco Heraeus) est récupéré dans 1,5 mL d'éthanol qui est ensuite éliminé par centrifugation et séchage au Speed-Vac. Le culot d'ARN est récupéré dans 150 μL d'eau DEPC.

Les ARN sont quantifiés au NanoDrop et purifiés à l'aide d'un kit Qiagen RNeasy Mini Kit puis conservés à -80°C avant marquage et hybridation.

5.3 Marquage

Le protocole de marquage est adapté du protocole mis au point par la société Agilent (G4140-900-40_GeneExpression_One-color_v6.5-1).

Les ARN à hybrider sont rendus détectables par incorporation de fluorochromes. La technique utilisée est l'amplification linéaire mono-couleur. Les ARN ainsi que des ARN « contrôle » subissent d'abord une rétro-transcription puis une transcription *in vitro* en présence de cyanines Cy3 (rouges fluorescent dans le vert). Les cibles ARNc marquées sont ensuite purifiées (Kit Qiagen RNeasy Mini Kit) et leur qualité est testée par quantification au NanoDrop, l'ARN absorbant à 260nm et les cyanines Cy3 à 550nm. L'efficacité du marquage est donc évaluée par le rapport DO_{550}/DO_{260} .

5.4 Hybridation

Les ARN marqués sont hybridés sur des puces de transcriptome Agilent 8 x 15 k. Il s'agit d'une plaque de verre divisée en 8 zones d'hybridation (ou puits) contenant chacun environ 15000 sondes.

Chaque échantillon est déposé dans un puits et la lame est incubée dans un four rotatif à 65°C pendant 17h. Les échantillons et leurs répliqués sont répartis sur la lame de manière aléatoire afin d'éviter un éventuel effet de la qualité des puits (défaut de construction par exemple) sur le résultat.

5.5 Acquisition des données transcriptomiques et analyse statistique

L'expression génétique des levures est analysée à partir de trois ou quatre cultures indépendantes des quatre conditions étudiées (Batch : B, Etat stationnaire control : ES, Ajout de valine : V et Ajout d'ammonium : N).

Le signal d'hybridation est détecté à l'aide d'un scanner laser (Axon Instruments). L'acquisition et la quantification des images des puces ont été réalisées avec le logiciel GenePix version 3.0.

L'analyse statistique utilisée est celle de R Développement Core Team (2008).

Les données sont normalisées à l'aide du pack limma (méthode des quantils pour la normalisation des données de micropuce (Smyth & Speed, 2003; Smyth, 2004; Smyth *et al.*, 2005).

L'expression différentielle des gènes entre les différentes conditions est déterminée en utilisant un t-test modifié ($p < 0,05$) corrigé par la méthode d'élimination des faux positifs de Benjamini et Hochberg (Benjamini, 2001).

Seuls les gènes présentant un log FC (Fold Change) supérieur à $\pm 1,2$ sont considérés.

Les gènes différentiellement exprimés sont groupés d'après GO (Gene Ontology) à l'aide de Funspec (Robinson *et al.*, 2002) et Genecodis (Carmona-Saez *et al.*, 2007; Nogales-Cadenas *et al.*, 2009)

Résultats

Chapitre I

Mise au point d'un fermenteur continu
multi-étagé pour reproduire les conditions
de la fermentation œnologique

CHAPITRE I

Mise au point d'un fermenteur continu multi-étagé pour reproduire les conditions de la fermentation œnologique

La première partie de ce projet de thèse a consisté à mettre au point un bioréacteur permettant de reproduire les conditions de la fermentation alcoolique traditionnellement réalisée en batch, dans un état stable et contrôlé.

La fermentation œnologique est dans une grande partie réalisée par des levures non croissantes du fait de l'épuisement rapide de l'azote assimilable. Réaliser une fermentation à l'état stable par des levures non croissantes nécessite un découplage entre la phase de croissance de la biomasse et la phase de bioconversion du sucre en éthanol en absence de croissance.

Pour cela, nous avons testé plusieurs configurations de fermenteurs à deux ou quatre étages. Deux souches de levures différentes ont également été comparées.

Le critère d'évaluation des dispositifs testés a porté sur la comparaison de plusieurs paramètres comme la vitesse de fermentation, la teneur en biomasse et la concentration en métabolites secondaires.

Les résultats présentés ici concernent donc la mise au point du fermenteur continu multi-étagé et sa validation comme outil d'étude de la physiologie des levures en cours de fermentation.



Use of a continuous multistage bioreactor to mimic winemaking fermentation

T. Clement^{*}, M. Perez, J.R. Mouret, J.M. Sablayrolles, C. Camarasa

INRA, UMR Sciences pour l'œnologie, 2 Place Viala, 34060 Montpellier cedex 1, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 February 2011

Received in revised form 4 July 2011

Accepted 13 July 2011

Available online 27 July 2011

Keywords:

Continuous multi-stage bioreactor

Alcoholic fermentation

Yeast

Nitrogen

Wine

ABSTRACT

Continuous fermentation set-ups are of great interest for studying the physiology of microorganisms. In winemaking conditions, yeasts go through a growth phase and a stationary phase during which more than half of the sugar is fermented. A comprehensive study of wine-yeast physiology must therefore include yeasts in a non-growing phase. This condition is impossible to achieve within a chemostat, which led us to design a multi-stage fermentation device. In this study, we evaluated the ability of such a device to reproduce, in a series of steady states, the conditions of batch fermentation. Two-stage and four-stage fermentations were carried out with two different strains of *Saccharomyces cerevisiae*. The main characteristics of the fermentation process (biomass growth, by-product content of the medium) were compared with those observed in batch mode at the same stage of fermentation, which was defined by glucose uptake. The four-stage configuration showed a better ability to reproduce batch fermentation characteristics than the two-stage set-up. It also allowed to uncouple the variations of environmental parameters and proved to be a promising tool to gain new insights into yeast metabolism during alcoholic fermentation.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

One of the current challenges for the wine industry is to control the fermentation process in terms of both kinetics and quality of the resulting product. To tackle this challenge, it is essential to understand the molecular bases responsible for the adaptation of yeasts to a hostile environment on a cellular scale. Wine fermentations are traditionally conducted in batch mode and can be effectively regarded as unfavorable conditions for yeasts growth since yeasts cells are subjected to various and sequential stresses. At the beginning of fermentation, yeasts have to adapt to a hostile environment in the grape must, characterized by a low pH, a high osmolarity generated by a high sugar concentration, and a high SO₂ content. The low availability of nutrients, especially assimilable nitrogen (Blateyron and Sablayrolles, 2001) and oxygen, rapidly results in nutrient deficiency and starvation. Furthermore, as a consequence of the fermentative activity of yeasts, temperature increases and ethanol accumulates at very high concentrations, up to 12 to 16% v/v. Studying the adaptation and the mechanisms involved in the response to these harsh conditions in batch mode – by investigating global mRNA, protein and metabolite profiles – is made challenging by the dynamic of the physico-chemical characteristics of the medium, which simultaneously and incessantly change during the course of fermentation. This results in the generation of complex data patterns, often difficult to analyze.

Continuous fermentations present numerous advantages over batch processes for industrial production by microorganisms. These include higher productivities, lower reactor down-time, easier process control, less fluctuations in product quality and reduced energetic costs (Rao et al., 2009). Besides their technological advantages, continuous-culture systems, especially chemostats, offer a stable and controlled environment for cells through maintaining constant biomass and concentrations of nutrients and products. As a consequence, they have been extensively used to characterize yeast physiology and have allowed the gain of new insights in various areas, such as metabolism and its regulation, evolution, and strain selection (Hoskisson and Hobbs, 2005). Furthermore, the continuous-culture system constitutes a relevant alternative for the acquisition of reproducible, reliable, and biological homogeneous datasets required for integrative biology approaches (Boer et al., 2003; Daran-Lapujade et al., 2004; Hayes et al., 2002; Wu et al., 2004).

However, chemostats whose dilution rate determines the specific growth rate, can only be used to study growing microorganisms, whereas most of the biotechnological processes based on alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* are partially achieved by non-growing cells. For example, in winemaking fermentation, less than 40% of the sugars in the grape must are consumed during the growth phase of fermentation (7–8 generations). Hence, the remaining 60% are metabolized by non-proliferating cells during the stationary phase (Bely et al., 1990). Strategies based on immobilized or entrapped cells in an appropriate matrix, resulting in high cell density fermentors; have been intended to perform the alcoholic fermentation in continuous mode (Diviès et al., 1994; Fleet, 2000; Kourkoutas et al., 2004; Strehaiano et al., 2006). These approaches have a technological interest related to a

^{*} Corresponding author. Tel.: +33 4 99 61 25 00; fax: +33 4 99 61 28 57.
E-mail address: clement@supagro.inra.fr (T. Clement).

significantly improved efficiency of wine fermentation (Fleet, 2008), but the yeast physiology in those cases is very specific and both the physiological state of the cells and the environmental parameters considerably differ from those measured during batch cultures.

A good alternative to reproduce the partial decoupling between yeast growth and alcohol production during winemaking process is to conduct continuous fermentation in multistage bioreactors. Multi-stage bioreactor devices have been developed previously for use in alcohol production, in combination with cell immobilization (Bayrock and Ingledew, 2001; Lin et al., 2001) and also in the beverage industry in order to increase productivity and optimize the production of aromatic molecules, mainly higher alcohols and esters (Loukatos et al., 2003; Sipsas et al., 2009; Yamauchi et al., 1995). However, the potential interest of the multi-stage continuous fermentation system as a tool for investigating the metabolism and physiology of *S. cerevisiae* during alcoholic fermentation has never been explored.

The first purpose of the present study was to investigate the ability of a multi-stage continuous fermentation (MSCF) system to obtain yeasts in steady physiological states corresponding to the different phases of batch wine fermentation, including the stationary phase (non-proliferating cells). The original device we developed consists of two or more tanks connected in series, the first ones containing micro-organisms in growth phase while the last stages contain non proliferating cells. The dilution rates applied to each tank and the nitrogen content in the feeding medium – which is usually the limiting factor for yeast growth during wine making – were adjusted to exhaust this nutrient within the first stages of fermentation. As a consequence, the last fermentors in the sequence operated with resting cells (without growth), continuously supplied from the earlier tanks. We then investigated the potential interest of the use of a MSCF system for physiological studies to characterize the metabolic specificities of a commercial wine yeast.

2. Materials and methods

2.1. Culture conditions

2.1.1. Yeast strains

The first part of the study was carried out using *S. cerevisiae* V5 (MATa, ura3), a laboratory strain derived from a champagne wine strain. In the second part of the study, the commercial strain EC1118 (Lallemend SA) was used.

The inoculum was grown aerobically in shake flasks at 28 °C, first in YPD medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose) for 24 h, and then in synthetic medium. After 24 h at 28 °C, this second pre-culture was used to inoculate the bioreactor at a density of 10^6 cells/mL.

2.1.2. Medium

We used the synthetic media (SMn) described by Bely et al. (1990) where “n” corresponds to the assimilable nitrogen concentration.

The basic medium partially simulates a grape juice and contains 200 g/L glucose, 6 g/L malic acid, 6 g/L citric acid, salts (in grams per liter: KH_2PO_4 , 0.75; K_2SO_4 , 0.50; MgSO_4 , 0.25; CaCl_2 , 0.155; NaCl , 0.20), vitamins (in milligrams per liter myo-inositol, 20; panthathonic acid, 1.5; thiamine, 0.25; nicotinic acid, 2; pyridoxin, 0.25 and biotin, 0.003), trace elements (in milligrams per liter MnSO_4 , 4; ZnSO_4 , 4; CuSO_4 , 1; KI , 1; CoCl_2 , 0.4; H_3BO_3 , 1; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 1) and anaerobic factors (0.05% v/v Tween 80, 15 mg/L ergosterol, 0.005% v/v oleic acid).

Tartaric acid is quantitatively the major organic acid found in a grape must, however, to avoid the formation of tartrate precipitate during the freezing at -20 °C, this component was replaced by citric acid.

In its standard composition, the nitrogen source is a mixture of ammonium (30%) and amino acids (70%). For the different media we used in this study, the assimilable nitrogen concentrations ranged between 100 and 430 mg/L (SM140-SM430), the proportions of the different sources remaining the same. The amino acid content is composed of (in milligrams per liter, quantities stated for MS430):

proline, 650.5; glutamine, 536.5; arginine, 397.5; tryptophane, 190.4; alanine, 154.3; glutamic acid, 127.9; serine, 83.4; threonine, 80.6; leucine, 51.4; aspartic acid, 47.3; valine, 47.3; phenylalanine, 40.3; isoleucine, 34.7; histidine, 34.7; methionine, 33.4; tyrosine, 19.5; glycine, 19.5; lysine, 18.1; cysteine, 13.9.

2.2. Batch fermentations

Batch fermentations were performed in 1.1 L fermentors, magnetically stirred (500 rpm) and fitted with a fermentation lock. Release of CO_2 was monitored by automatic measurement of bioreactor weight loss every 20 min. The validity of this technique as a method of monitoring fermentation has been first demonstrated by Bezenger et al. (1985). The numerous acquisitions of CO_2 release and the weighing accuracy (0.1 to 0.01 g) made it possible to calculate rate of CO_2 production ($d\text{CO}_2/dt$) with a high degree of precision (Sablayrolles et al., 1987).

2.3. Multi-stage continuous fermentors (MSCF)

2.3.1. Fermentors

The system was made up of 2 or 4 bioreactors (LSL Biolafitte) linked in series [R1 to Ri (i being 2 or 4)] (Fig. 1). In this way each bioreactor was fed by a variable-speed peristaltic pump (Ismatec Reglo) by the outlet medium from the previous tank. The input flow rates (Q_{a_i}) were therefore controlled independently, Q_{a_i} being possible to be set at a lower level than $Q_{a_{i-1}}$ thanks to a derivation (Q_w).

The pumps were equipped with Teflon FEP tubing (Tygon® R3603) to avoid O_2 diffusion and maintain anaerobic conditions.

Each bioreactor was stirred (250 rpm) and fitted with an off-gas condenser cooled to 5 °C. The CO_2 flow rates were monitored on-line using a mass flow controller (5850 TR Brooks). The ethanol and sugar concentrations were calculated using the relationship described by El Haloui et al. (1988). The process was monitored on-line and controlled using a FieldPoint modular distributed In/Out system (National Instrument) and a home-developed LabVIEW supervision software (Fig. 1).

The temperature was regulated at 28 °C. The fermentors were sterilized separately for 40 min at 100 °C.

2.3.2. Continuous fermentations

Continuous fermentations were started 12 h after inoculation. For a given dilution rate ($D = Q/V$ (h^{-1}) where Q is the input flow rate and V is the volume of the tank), the system was considered to be in steady state after three residence times ($Rt = 1/D$).

2.4. Analytical methods

2.4.1. Cell count and cellular dry weight

During fermentation, the cell population and the cell-size distribution were determined with a Coulter Counter (model Z2, Beckman-Coulter, Margency, France) fitted with a 100- μm aperture probe.

The dry weight of yeasts (X) was determined gravimetrically using nitrocellulose filters (pore size 0.45 μm ; Millipore) from 10 mL of sample. The sample was then dried for 48 h at 100 °C.

2.4.2. Substrate and metabolite analyses

Glucose, ethanol, glycerol, and organic acids in culture supernatants were determined by HPLC using a HPX-87H Aminex ion exchange column (300 \times 7.8 mm, Bio-Rad) at 45 °C. The column was eluted with 4 mM H_2SO_4 at a flow rate of 0.6 ml/min. Acetic and α -ketoglutaric acids were determined with a Hewlett-Packard G1314A UV meter at 210 nm whereas the other compounds were determined with an Agilent G1362A refractive index detector.

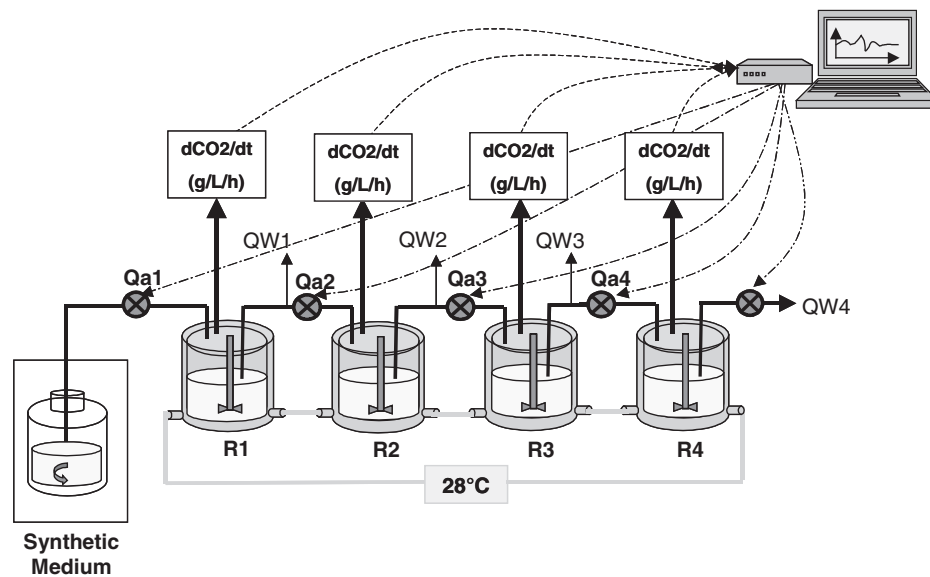


Fig. 1. Four-stage continuous fermentation device. The system is made up of four tanks (R1 to R4) linked in series. Qa and Qw refer respectively to the input flow rate and the waste flow rate which allow to set different flow rates ($Q_{a_{i+1}} < Q_{a_i}$) in the four tanks. The five pumps are monitored independently by the control software which also integrates the data coming from the mass flowmeters. Each bioreactor except the first one, was fed with cells and partially fermented medium from the previous tank. This device allows to progressively exhaust nitrogen from the medium: the first stages were run with growing cells, while the last ones operate as resting cells.

The fermentation progress was expressed as $1 - S/S_{\text{init}}$, where S is the glucose concentration in the fermentor and S_{init} is the glucose concentration in the initial medium.

2.4.3. Assimilable nitrogen

Total nitrogen concentration was determined by distillation and back titration according to the Kjeldahl mineralization methods.

Ammonium concentration was determined enzymatically (R-Biopharm, Darmstadt, Germany). Analysis of the free residual amino acids was done by cation-exchange chromatography followed by postcolumn derivatization with ninhydrin (Biochrom 30, Biochrom, Cambridge, U.K.). These analyses allow to calculate the total available nitrogen (TAN) of the medium and the residual nitrogen at the end of fermentation as the sum of ammoniacal nitrogen and nitrogen from amino acids determined experimentally before and after fermentation respectively. Total yeast assimilable nitrogen (TYAN) was determined in batch fermentation, as the difference between TAN and the final residual nitrogen.

The specific nitrogen consumption rate has been calculated in batch mode during the growth phase as the yields between the quantity of nitrogen consumed in a two hour interval (between t_1 and t_2) and the average dry weight measured from samples taken at t_1 and t_2 , multiplied by the time interval ($t_1 - t_2$).

In continuous mode, it has been calculated as the product of the dilution rate ($D; \text{h}^{-1}$) and the nitrogen consumed over the dry weight at steady state.

3. Results

3.1. Development of the continuous fermentor

3.1.1. Two-stage continuous fermentation (TSCF)

First, we evaluated the possibility of reproducing the growth and stationary phases of alcoholic fermentation of the V5 strain using a continuous two-stage fermentation. The first stage, corresponding to the growth phase, was fed with SM140 at a dilution rate of 0.076 h^{-1} , resulting in a complete nitrogen exhaustion at steady state in this tank. In order to compare the TSCF to the batch and evaluate its ability to reproduce the whole fermentation process, different dilution rates (0.033 to 0.003 h^{-1}) were applied to the second stage, operating

without growth, since no nitrogen was provided to the cells in the tank. Six different stages of the stationary phase were thus analyzed. A reference batch fermentation was carried out using the V5 strain grown in SM140 to perform a comparative analysis – based on kinetics, growth and metabolic parameters – of both operating modes for equivalent glucose consumption (fermentation progress). This study specifically focused on glycerol, acetate, and succinate, since these are markers of the redox status of yeasts during fermentative metabolism and they impact on the organoleptic properties of the wine.

During batch wine fermentation, the fermentation rate – expressed as the rate of CO_2 production – increased rapidly with yeast population, before progressively decreasing throughout the stationary phase (Fig. 2). In the first stage of the TSCF, the fermentation rate, of 1.80 g/L/h , was slightly higher than that measured in batch process for the same fermentation progress (+17%) (Fig. 2). In the second stage, the fermentation rates during continuous fermentation using different dilution rates fitted well with the batch data (difference lower than 10%).

No significant differences were found (lower than 5% in both stages) for the biomass production. Nevertheless, a two-fold decrease in yeast population was observed in the continuous mode compared with batch fermentation (Table 1), while the mean cell volume at the same time was twice as high (data not shown).

During the growth phase (first stage) of continuous fermentation, production of glycerol and acetate was consistent with those measured during batch culture (Table 1). Conversely, production of glycerol and acetate by resting cells (second stage) was 30% lower than those in batch fermentation. The largest difference was found in the production of α -ketoglutarate (α -KG), a TCA intermediate, during the growth phase. No α -KG was detected in both the first and the second reactors of TSCF, whereas up to 0.5 g/L of this compound was produced during the growth phase of batch fermentation (Table 1). Since α -KG plays a central role in nitrogen assimilation by yeast, these observations suggest that there are differences between the two modes of culture in terms of metabolism of nitrogen by the V5 strain and its regulation.

According to the overall results, the main features of batch fermentation – including fermentation performance and production of the main fermentation by-products – can be reproduced in the two-stage continuous fermentor. Nevertheless, the data-set pointed out

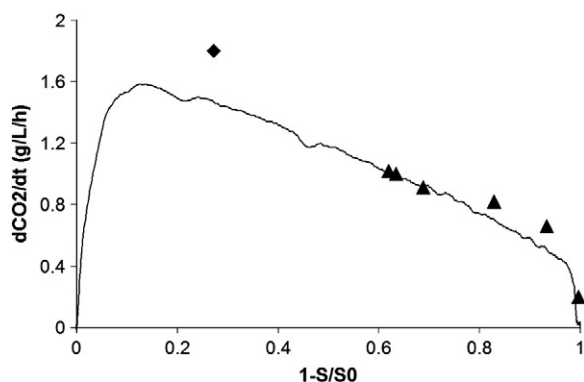


Fig. 2. Comparison of the fermentation rates between batch and two-stage continuous fermentation (TSCF). TSCF (first stage [◆]; second stage [▲]) and batch fermentation (—) were achieved on synthetic SM140 medium using the strain V5. TSCF data correspond to several steady states obtained with various dilution rates. The data are plotted versus the fermentation progress ($1 - S/S_0$) where S is the residual glucose concentration in the fermentation medium and S_0 is the initial content of glucose in the must.

substantial differences between batch and TSCF, especially with respect to cell growth and nitrogen assimilation. To improve the device, we therefore focused our attention on the growth phase and on nitrogen metabolism during fermentation using batch and continuous modes.

3.1.2. Nitrogen assimilation during the yeast growth phase

The effects of nitrogen availability on V5 fermentation performance, especially on growth and production of α -KG, was first investigated during batch fermentations on synthetic media with three different initial nitrogen concentrations (SM140, SM275 and SM430). The same media were then used to perform chemostats at various dilution rates, thereby allowing evaluation of the effects of the mode of culture.

During batch fermentation, both the maximum fermentation rate and the cell population increased with the initial nitrogen content (Fig. 3a). The influence of nitrogen concentration was however limited for the highest concentration of nitrogen (Malherbe et al., 2004). This was probably due to the inhibition of growth by ethanol accumulation. α -KG was exclusively produced during the growth phase and maximal concentration was reached when the assimilable nitrogen was totally depleted (Fig. 3b). The production of this TCA intermediate increased with the initial nitrogen content. These data indicate that production of α -KG by the V5 strain is directly related to the assimilation of nitrogen, and therefore ascertain the interest of using α -KG as an indicator of V5 nitrogen metabolism.

As observed in the batch fermentations, increasing the nitrogen availability during chemostat cultures – carried out at the same dilution rate (0.076 h^{-1}) – resulted in a considerable increase in the biomass synthesis, the fermentation rate, and the production of α -KG (Table 2). Changes in the synthesis of α -KG were the most marked since this compound, which was not excreted by V5 in the nitrogen limited chemostat (SM140), was produced up to a concentration of 820 mg/L when using SM430 as a feeding medium. In addition, this

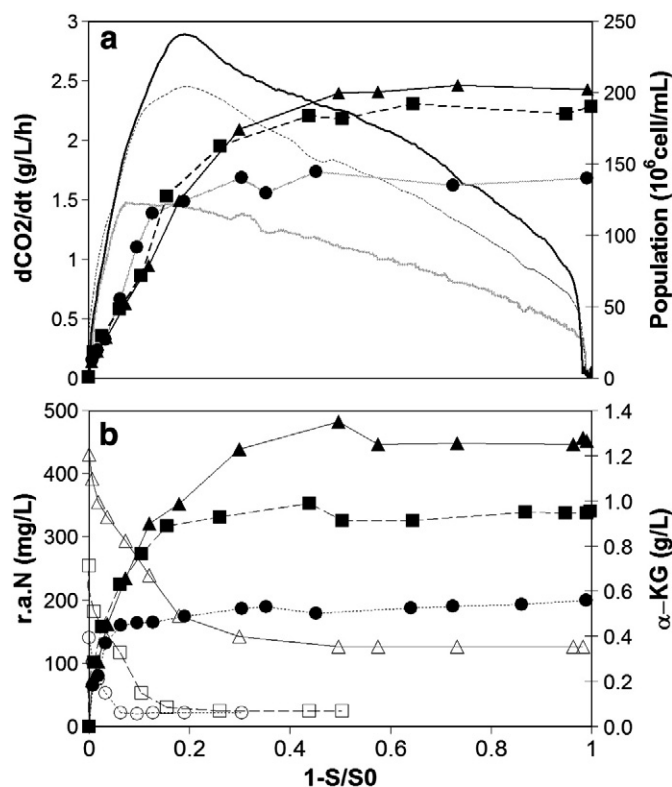


Fig. 3. Incidence of the nitrogen concentration in the medium on the fermentation performances and the growth of the strain V5. (a) Fermentation rates (SM140 (thick grey line), SM275 (dotted line) and SM430 (black line)) and cell population (SM140 (○,●), SM275 (□,■) and SM430 (△,▲)) obtained in batch fermentations. (b) Residual assimilable nitrogen (r.a.N) (open symbols) and α -ketoglutarate (α -KG) (black symbols) in batch fermentations carried out with SM140 (○,●), SM275 (□,■) and SM430 (△,▲). The data are plotted versus the fermentation progress ($1 - S/S_0$) where S is the residual glucose concentration in the fermentation medium and S_0 is the initial content of glucose in the must.

formation increased with the dilution rate of the chemostat (Table 2), and consequently with the residual nitrogen concentration in the fermentor. This suggests that the production of α -KG depended both on the residual nitrogen content in the medium and on the flux of nitrogen assimilation.

Surprisingly, with increasing dilution rates in the chemostats, the yeast population decreased whereas the average size of the cells increased (Table 2). Moreover, the yeast cell population was about twice as low and the cell volume was 20 to 40% higher compared with those measured in batch mode for the same fermentation progress. This suggests that cells probably did not undergo the last cell division in the chemostat cultures.

Overall, for the same progress of fermentation, the parameters studied exhibited lower values during chemostat culture compared with the batch process. However, the variations between batch and continuous modes were less marked at high dilutions, in which the residual nitrogen concentration was higher. The use of high dilutions,

Table 1

Comparison between batch fermentation and two-stage continuous fermentation (TSCF) at two identical rates of fermentation progress ($1 - S/S_0$, where S is the residual glucose concentration and S_0 is the initial glucose content of the must) corresponding to the main growth phases of alcoholic fermentation. Fermentations were carried out on SM140 synthetic medium (low nitrogen content), with the V5 strain.

Fermentation phase	Fermentor	$1 - S/S_0$	Population (10^6 cell/mL)	Dry weight (g/L)	Glycerol (g/L)	Acetate (g/L)	α -KG ^a (g/L)
Growth phase	TSCF_Stage 1	0.27	57	2.60	2.930	0.210	0.000
	Batch	0.27	142	2.60	2.750	0.250	0.490
Stationary phase	TSCF_Stage 2	0.90	65	3.40	4.586	0.440	0.000
	Batch	0.90	145	3.25	6.370	0.650	0.540

^a: α -ketoglutarate.

Table 2

Yeast growth characteristics, nitrogen consumption, and fermentation rate for chemostat fermentation with V5 on synthetic media with varying nitrogen contents (140 to 430 mg/L). The data were obtained for different dilutions rates (D), each one corresponding to one fermentation progress ($1 - S/S_0$, S is the residual glucose concentration and S_0 is the initial glucose content in the must).

Medium	D (h ⁻¹)	1 - S/S ₀	r.a.N ^a (mg/L)	dCO ₂ /dt (g/L/h)	Population (10 ⁶ cell/mL)	α-KG ^b (g/L)
SM140	0.076	0.272	2	1.80	58	0
SM 275	0.058	0.405	1	2.09	82	0.141
	0.066	0.341	16	2.03	69	0.304
	0.076	0.311	31	2.11	67	0.410
	0.100	0.218	33	1.94	59	0.360
SM 430	0.040	0.571	15	2.06	141	0.191
	0.054	0.482	45	2.36	112	0.727
	0.077	0.351	91	2.48	99	0.816
	0.109	0.243	121	2.42	72	0.729

^a Residual assimilable nitrogen.

^b α-Ketoglutarate.

resulting in high levels of residual nitrogen, is therefore required to suitably reproduce the growth phase of wine fermentation during continuous culture.

From these data, we concluded that a TSCF device was inappropriate for mimicking the two steps of batch fermentation. The low production of α-KG as well as the evolution of the cell population compared to the dry weight in the TSCF, suggest that the low nitrogen content in the first stage of the TSCF, required to obtain yeast in stationary phase in the second stage, impacts the physiology of the yeast and probably the cell composition.

Adding more stages would allow to progressively exhaust the nitrogen sources between the first and last fermentors, and consequently recreate an early growth phase (first tanks) as well as a stationary phase (last stage). A four-stage fermentor was set up to allow several combinations between the growth and the stationary phases and two different strains were tested.

3.2. Validation of the four-stage continuous fermentor (FSCF)

3.2.1. Biomass growth and by-products

The haploid derivative of a champagne strain, V5 and the commercial strain EC1118 were grown under four stages of continuous fermentation conditions in SM430. For the first experiments with V5, the dilution rates were set up to cover the whole fermentation process: stage 1 corresponded to the beginning of the growth phase; stage 2 corresponded to the end of the growth phase; stage 3 was at the transition phase; and stage 4 mimicked the stationary phase. Phenotypic parameters (biomass growth, fermentation rate, by-product synthesis) were compared with those obtained in batch mode for the equivalent progress of fermentation.

For both strains, the evolution of the CO₂ production rate in the FSCF was close to that observed in batch (Fig. 4). According to the main reaction which is the conversion of sugars to ethanol and carbon dioxide and despite slight differences, it can be concluded that the FSCF reproduced the four stages of the batch process properly.

No substantial differences were found in the cell population between the two modes of fermentation for EC1118 (Fig. 4b). For the strain V5, the yeast population measured in the three first stages also fitted with the batch curve. However, the cell population in the last stage was 35% lower than that in the stationary phase of batch fermentation at the same reaction progress (Fig. 4a). Nevertheless, the physiological conditions in the four-stage device were closer to those in batch fermentation than those in the TSCF device (Fig. 4, Table 1).

Metabolite levels formed by EC1118 during FSCF fermentation were similar to those in the batch process (Table 3), except from acetate (20% difference). As observed for biomass production, synthesis of glycerol and acetate by the V5 strain during the three

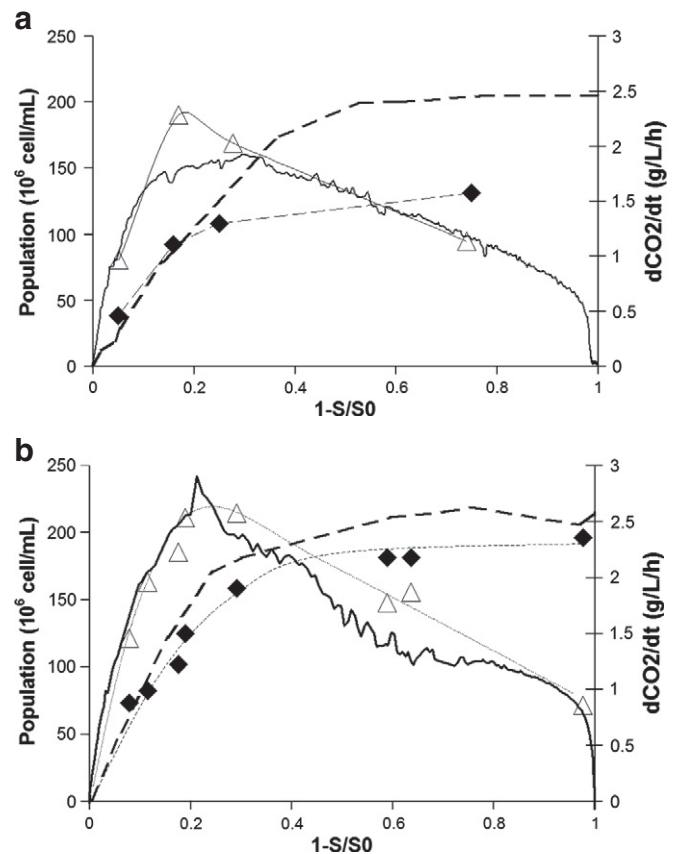


Fig. 4. Fermentation performances and growth of the strains V5 and EC1118 during batch fermentation and FSCF. Fermentation rate in batch fermentation (—) and in FSCF (---); yeast population, in batch fermentation (---) and FSCF (—◆—) obtained with the strains V5 (a) and EC1118 (b) on SM430 synthetic medium. X axis: fermentation progress (S is the residual glucose concentration in the fermentation medium and S_0 is the initial content of glucose in the must).

first stages of FSCF were close to those in batch fermentation. However, the differences between these parameters increased during the last stage and the stationary phase of batch culture. At this stage, α-KG concentrations were 70% lower in FSCF than in batch culture, whereas succinate concentrations were 50% lower (Table 3).

3.2.2. Nitrogen metabolism

To further compare the two modes of culture, assimilation of nitrogen by the two strains was investigated during batch and four-stage continuous cultures. Assimilable nitrogen was entirely exhausted during EC1118 fermentations, and both the kinetics and the sequence of assimilation of ammonium and amino acids by this strain were similar throughout the FSCF and batch-fermentation processes (Fig. 5, Table 4).

Compared with EC1118, the haploid V5 strain showed some noteworthy differences in the pattern of nitrogen assimilation. This yeast did not entirely deplete the amino acids from the medium both during FSCF and batch cultures. The main residual amino acids were arginine, histidine, and glycine, which represented about 15% of the total initial nitrogen content (Fig. 5, Table 4). The incomplete consumption of histidine by the V5 strain was surprising since this amino acid was assimilated early by the wine commercial yeast EC1118.

The main specific features observed for nitrogen assimilation during the V5 batch culture were also seen under continuous fermentation, conditions. However, during the growth phase at the same progress of fermentation, the residual ammonium concentration is 30% lower in the V5 multi-stage culture than during batch

Table 3

Concentration of the main fermentation by-products (glycerol, acetate, succinate and α -ketoglutarate (α -KG)), during the fermentation process in four-stage continuous fermentation and batch mode with V5 and EC1118 on SM430 synthetic medium. To each stage of the four stage continuous fermentator corresponds a level of fermentation progress ($1 - S/S_0$) according to the glucose consumption in the corresponding tank (S is the residual glucose concentration in the fermentation medium and S_0 is the initial content of glucose in the must).

Strain	Stage	1- S/S_0	FSCF				Batch fermentation			
			α -KG (g/L)	Succinate (g/L)	Acetate (g/L)	Glycerol (g/L)	α -KG (g/L)	Succinate (g/L)	Acetate (g/L)	Glycerol (g/L)
V5	1	0.05	0.251	0.029	0.043	0.620	0.350	0.050	0.040	0.615
	2	0.16	0.340	0.056	0.112	1.732	0.950	0.110	0.121	1.730
	3	0.25	0.392	0.072	0.174	2.633	1.150	0.150	0.215	2.600
	4	0.75	0.443	0.164	0.363	4.314	1.254	0.295	0.552	5.160
EC1118	1	0.12	0.000	0.072	0.218	0.992	0.000	0.089	0.252	0.875
	2	0.22	0.000	0.108	0.298	1.866	0.000	0.111	0.371	2.063
	3	0.34	0.000	0.156	0.336	2.760	0.000	0.139	0.455	3.000
	4	0.66	0.000	0.299	0.422	4.447	0.000	0.283	0.574	5.063

conditions. This suggests a faster assimilation of ammonium during the continuous mode of fermentation.

4. Discussion

Gathering cells in steady state corresponding to the different stages of the batch winemaking fermentation using continuous culture mode was challenging since most of this industrial process was achieved without yeast growth, during the stationary phase. Consequently, a multi-level fermentors design has to be used, with the first stages continuously feeding the last ones with resting cells. Characterization of two- and four-stage continuous fermentation (TSCF and FSCF, respectively) devices showed that at least two stages with growing cells are required. This is to properly recreate the environmental conditions and the physiological features of the yeasts at the different phases of the enological fermentation process.

Using a TSCF design, the total exhaustion of nitrogen from the medium in the first fermentor vessel was a prerequisite to obtain cells in stationary phase for the second stage. Consequently, at steady state, the residual concentration of nitrogen approached zero in both of the tanks. The physiological parameters related to growth and production of metabolites that were measured in the first stage – equivalent to a nitrogen-limited chemostat – differed considerably from those in the growth phase of batch winemaking fermentation. This is likely due to changes in the patterns of regulation of cellular metabolism related to differences in nitrogen availability between the two modes of fermentation. Yeasts have developed various ways to specifically sense the extracellular availability of amino acids and ammonium (e.g. the SPS signaling system) and to further regulate and direct metabolism according to the nitrogen content in their environment (e.g. synthesis of C-skeleton for nitrogen assimilation and storage) (Schneper et al., 2004). Indeed, it has been previously reported that in

steady state nitrogen-limiting chemostats, cells exhibit a global pattern of gene expression that is closer to that of batch cultures just prior to the limiting nutrient exhaustion (Brauer et al., 2005; Saldanha et al., 2004). As a result, in the first stage of TSCF, yeast physiology in presence or absence of nitrogen may be differently shaped during the growth phase of enological fermentation. This is particularly with respect to the ability to grow and the orientation of central carbon metabolism. Consistent with this, higher levels of accumulation of storage carbohydrates have been reported in anaerobic nitrogen-limited chemostat cultures compared with glucose-excess nitrogen-limited conditions (Hazelwood et al., 2009).

With a FSCF system, continuous fermentation can be run at least in the first fermentor vessel under conditions of excess glucose and nitrogen, similar to those of the growth phase of the batch enological process. In a series of four fermentors (in which nitrogen was exhausted in the third one), the main physiological parameters of the EC1118 wine yeast at each stage were similar to those in batch enological fermentation at the same fermentation progress. This demonstrates the feasibility of using a FSCF design to reproduce the different stages of wine making fermentation at steady state, as long as nitrogen availability in the first fermentors is sufficient.

The laboratory V5 strain, is a haploid strain derived from a Champagne wine yeast. It exhibits similar fermentation characteristics to those of its industrial parent, and is widely used as a model for studies on yeast physiology during wine fermentation (Ansanay-Galeote et al., 2001; Cambon et al., 2006). However, this strain displays several specific metabolic properties related to its genetic background. The FSCF system allowed further investigation of some traits characteristic to this strain, particularly nitrogen assimilation. A distinctive metabolic feature of V5 during wine fermentation compared with other *S. cerevisiae* strains is its ability to produce α -KG, an intermediate of the TCA pathway which is at the crossroad between carbon and nitrogen metabolisms. This

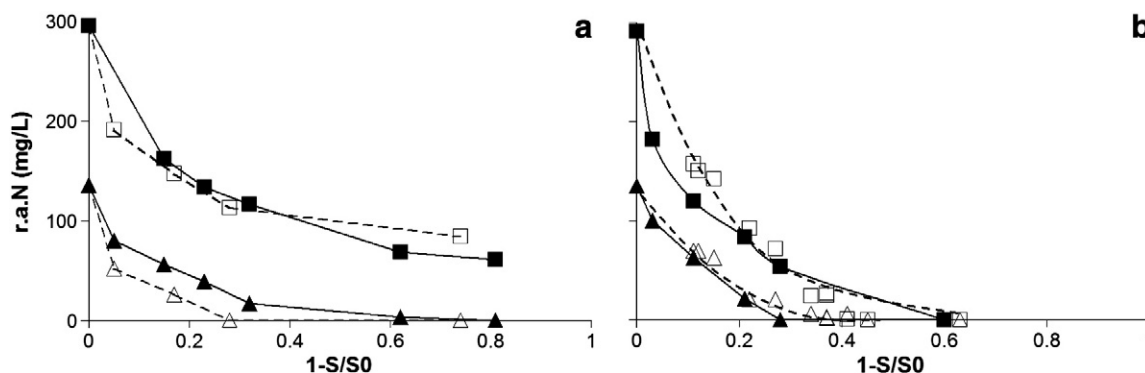


Fig. 5. Nitrogen assimilation of the strains V5 and EC1118 during batch fermentation and FSCF. Total residual assimilable nitrogen (r.a.N) (■, □) and ammonium (▲, △) as a function of fermentation progress, in batch (closed symbols) and four-stage continuous fermentation (open symbols), with V5 (a) and EC1118 (b). The data are plotted versus the fermentation progress ($1 - S/S_0$) where S is the residual glucose concentration in the fermentation medium and S_0 is the initial content of glucose in the must.

Table 4

Assimilation rate of amino-acids at the beginning and the end of fermentation. Comparison, for the same rate of progress of fermentation (1-S/S0, S is the residual glucose concentration and S0 is the initial glucose concentration of the must), of the V5 and EC1118 strains, in batch fermentation and four-stage continuous fermentation (FSCF).

	Nitrogen assimilation ratio for 1-S/S0 = 0.1				Final nitrogen assimilation ratio			
	V5		EC1118		V5		EC1118	
	Batch	FSCF	Batch	FSCF	Batch	FSCF	Batch	FSCF
Alanine	17%	31%	35%	28%	93%	95%	98%	99%
Arginine	12%	18%	21%	18%	55%	39%	100%	100%
Glycine	5%	10%	10%	5%	67%	68%	99%	100%
Tryptophane	29%	45%	40%	32%	100%	93%	100%	100%
Tyrosine	25%	20%	50%	39%	100%	90%	100%	100%
Histidine	20%	30%	>60%	>60%	84%	77%	100%	100%
Aspartate	>60%	>60%	>60%	>60%	100%	100%	100%	100%
Glutamate	>60%	>60%	>60%	>60%	100%	100%	100%	100%
Glutamine	>60%	>60%	>60%	>60%	100%	100%	100%	100%
Isoleucine	>60%	>60%	>60%	>60%	100%	100%	100%	100%
Leucine	>60%	>60%	>60%	>60%	100%	100%	100%	100%
Lysine	>60%	>60%	>60%	>60%	100%	100%	100%	100%
Methionine	>60%	>60%	>60%	>60%	100%	100%	100%	100%
Phenylalanine	>60%	>60%	>60%	>60%	100%	100%	100%	100%
Serine	>60%	>60%	>60%	>60%	100%	100%	100%	100%
Threonine	>60%	>60%	>60%	>60%	100%	100%	100%	100%
Valine	>60%	>60%	>60%	>60%	100%	100%	100%	100%
NH4	20%	50%	50%	46%	100%	100%	100%	100%
Total	50%	62%	65%	67%	83%	87%	100%	100%

compound is usually not released by yeasts, since its formation via the isocitrate dehydrogenases is finely adjusted to the requirements of α -KG for glutamate production and further use in nitrogen metabolism. During V5 wine fermentation, the excretion of α -KG – which is directly correlated to the amount of nitrogen assimilated (Fig. 6) – reflects an imbalance between the production and consumption of α -KG. This is most likely due to changes in the regulatory network of this strain. Irrespective of the nitrogen content of the medium, the specific rate of ammonium consumption by V5 was lower than 5 mg ammonium/h/(g dry weight) throughout the batch fermentations. This directly impacts on the demand for α -KG required for anabolism. In the FSCF system, it was possible to impose this specific rate at higher levels than this threshold value (25 mg ammonium/h/(g dry weight) during the first stage). In this case, production of α -KG increased linearly with nitrogen consumption, but was 3-fold lower compared with batch-mode fermentation. These observations indicate that the V5 strain most likely released α -KG to prevent intracellular accumulation of this compound due to reduced flux towards glutamate production and anabolism.

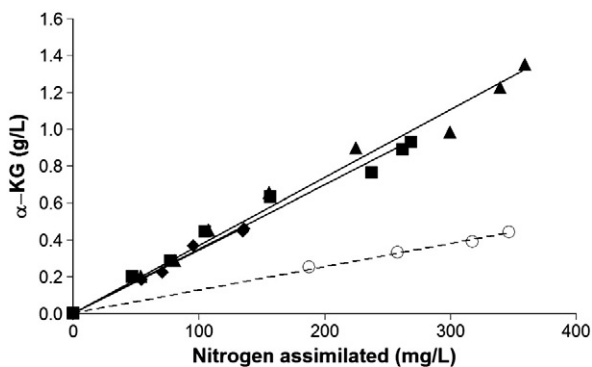


Fig. 6. Production α -ketoglutarate (α -KG) by the strain V5 during batch and FSCF depending on the initial nitrogen concentration. Synthesis of α -KG by the strain V5 as a function of nitrogen assimilation, in batch-mode fermentation (closed symbols) on synthetic medium with varying initial contents of nitrogen (SM140 [◆], SM275 [■], and SM430 [▲]), and in four-stage continuous fermentation (open symbols) with SM430 synthetic medium.

In this study, we demonstrated that it was possible to reproduce different states of batch-wine fermentation in a sequential series of steady states. This device offers new perspectives to analyze specific features of yeast physiology during wine making for two main reasons. First, the FSCF design – where cells are in a controlled and stable environment – is a relevant tool for the use of post-genomic cutting-edge technologies to investigate yeast adaptation to the extreme environment of wine fermentation. Second, this system allows to uncouple the variations of environmental parameters which are dependant during batch-process fermentation. This will help to gain new insights into yeast metabolism and its regulation during alcoholic fermentation.

Acknowledgments

This work was supported by the European Community Seventh Framework Programme (FP7/2007–2013) under grant agreement CAFE no. KBBE-212754 (<http://www.cafeproject.org>).

References

- Ansany-Galeote, V., Bruno Blondin, B., Sablayrolles, J.M., 2001. Stress effect of ethanol on fermentation kinetics by stationary-phase cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters* 677–681.
- Bayrock, D.P., Ingledew, W. Michael, 2001. Application of multistage continuous fermentation for production of fuel alcohol by very-high-gravity fermentation technology. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 27, 87–93.
- Bely, M., Sablayrolles, J.M., Barre, P., 1990. Description of alcoholic fermentation kinetics: its variability and significance. *American Journal of Enology and Viticulture* 41, 319–324.
- Bezenger, M., Navarro, J., Abbal, P., 1985. Suivi de fermentation à l'aide d'un microordinateur personnel. Application à la fermentation alcoolique en oenologie. *Industrie Agro Alimentaire* 102, 104–105.
- 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. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 91, 184–189.
- Boer, V.M., de Winde, J.H., Pronk, J.T., Piper, M.D.W., 2003. The genome-wide transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* grown on glucose in aerobic chemostat cultures limited for carbon, nitrogen, phosphorus, or sulfur. *Journal of Biological Chemistry* 278, 3265–3274.
- Brauer, M.J., Saldanha, A.J., Dolinski, K., Botstein, D., 2005. Homeostatic adjustment and metabolic remodeling in glucose-limited yeast cultures. *Molecular Biology of the Cell* 16, 2503–2517.
- Cambon, B., Monteil, V., Remize, F., Camarasa, C., Dequin, S., 2006. Effects of GPD1 overexpression in *Saccharomyces cerevisiae* commercial wine yeast strains lacking ALD6 genes. *Journal of Biological Chemistry* 281, 4688–4694.
- Daran-Lapujade, P., Jansen, M.L.A., Daran, J., van Gulik, W., de Winde, J.H., Pronk, J.T., 2004. Role of transcriptional regulation in controlling fluxes in central carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. A chemostat culture study. *Journal of Biological Chemistry* 279, 9125–9138.
- Diviès, C., Cachon, R., Cavin, J., Prévost, H., 1994. Theme 4: immobilized cell technology in wine production. *Critical Reviews in Biotechnology* 14, 135–153.
- El Haloui, N., Picque, D., Corrieu, G., 1988. Alcoholic fermentation in winemaking: on-line measurement of density and carbon dioxide evolution. *Journal of Food Engineering* 8, 17–30.
- Fleet, G.H., 2000. Alternative fermentation technology. In: Blair, R.A., Sas, A.N., Hayes, P., Hoj, P. (Eds.), *Tenth Australian Wine Industry Technical Conference*, pp. 172–177. Adelaide, Australia.
- Fleet, G.H., 2008. Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Research* 979–995.
- Hayes, A., Zhang, N., Wu, J., Butler, P.R., Hauser, N.C., Hoheisel, J.D., Lim, F.L., Sharrocks, A.D., Oliver, S.G., 2002. Hybridization array technology coupled with chemostat culture: tools to interrogate gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods* 26, 281–290.
- Hazelwood, L.A., Walsh, M.C., Luttki, M.A.H., Daran-Lapujade, P., Pronk, J.T., Daran, J., 2009. Identity of the growth-limiting nutrient strongly affects storage carbohydrate accumulation in anaerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 6876–6885.
- Hoskisson, P.A., Hobbs, G., 2005. Continuous culture—making a comeback? *Microbiology* 151, 3153–3159.
- Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, I.M., Marchant, R., Koutinas, A.A., 2004. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiology* 21 (4), 377–397.
- Lin, Y., Bayrock, D., Ingledew, W.M., 2001. Metabolic flux variation of *Saccharomyces cerevisiae* cultivated in a multistage continuous stirred tank reactor fermentation environment. *Biotechnology Progress* 17, 1055–1060.
- Loukatos, P., Kanellaki, M., Komaitis, M., Athanasiadis, I., Koutinas, A.A., 2003. A new technological approach proposed for distillate production using immobilized cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 95, 35–39.

- Malherbe, S., Fromion, V., Hilgert, N., Sablayrolles, J., 2004. Modeling the effects of assimilable nitrogen and temperature on fermentation kinetics in enological conditions. *Biotechnology and Bioengineering* 86, 261–272.
- Rao, N.N., Lütz, S., Würges, K., Minör, D., 2009. Continuous biocatalytic processes. *Organic Process Research and Development* 13, 607–616.
- Sablayrolles, J.M., Barre, P., Grenier, P., 1987. Design of a laboratory automatic system for studying alcoholic fermentations in anisothermal enological conditions. *Biotechnology Techniques* 1, 181–184.
- Saldanha, A.J., Brauer, M.J., Botstein, D., 2004. Nutritional homeostasis in batch and steady-state culture of yeast. *Molecular Biology of the Cell* 15, 4089–4104.
- Schneper, L., Düvel, K., Broach, J.R., 2004. Sense and sensibility: nutritional response and signal integration in yeast. *Current Opinion in Microbiology* 7, 624–630.
- Sipsas, V., Kolokythas, G., Kourkoutas, Y., Plessas, S., Nedovic, V.A., Kanellaki, M., 2009. Comparative study of batch and continuous multi-stage fixed-bed tower (MFBT) bioreactor during wine-making using freeze-dried immobilized cells. *Journal of Food Engineering* 90, 495–503.
- Strehaiano, P., Ramon-Portugal, F., Taillandier, P., 2006. Yeasts as biocatalysts. In: Querol, A., Fleet, G. (Eds.), *Yeasts in Food and Beverages*. Springer, Berlin Heidelberg, pp. 243–283.
- Wu, J., Zhang, N., Hayes, A., Panoutsopoulou, K., Oliver, S.G., 2004. Global analysis of nutrient control of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* during growth and starvation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 3148–3153.
- Yamauchi, Y., Okamoto, T., Murayama, H., Nagara, A., Kashihara, T., Yoshida, M., Yasui, T., Nakanishi, K., 1995. Rapid fermentation of beer using an immobilized yeast multistage bioreactor system. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 53, 261–276.

Résultats complémentaires

Les travaux présentés dans la publication décrivent la mise au point et la validation du fermenteur continu multi-étagé (MSCF) comme outil permettant de simuler une fermentation œnologique.

Des expériences complémentaires ont permis de mieux préciser encore les caractéristiques et l'intérêt de ce dispositif.

Dans un premier temps nous avons cherché à établir les relations générales permettant de relier les paramètres de fonctionnement du MSCF (taux de dilutions) avec (i) l'avancement de la fermentation (représenté par la consommation de sucre) et (ii) la synthèse des principaux produits du métabolisme carboné central ; l'objectif étant de pouvoir fixer directement les conditions opératoires du MSCF pour obtenir les levures dans un état physiologique donné, dans chaque étage.

Rappels sur le fonctionnement du MSCF

Le fermenteur que nous avons mis au point est composé de quatre cuves de volume variable (de 0.5 à 2L), alimentées en continu à un débit ajustable de manière indépendante pour chaque cuve ; le système présente donc une grande flexibilité et permet de travailler sur une large gamme de taux de dilution. Deux contraintes limitent cependant cette flexibilité : (i) le taux de croissance maximal des levures (μ_{\max}) impose le taux de dilution maximal imposable au premier étage et (ii) le débit d'alimentation de l'étage R_{i+1} ne peut pas être supérieur au débit d'alimentation de l'étage R_i .

Pour chaque étage, le volume (V_i) des cuves étant fixé, le débit d'alimentation (Q_i) de chaque cuve détermine un taux de dilution ($D_i=Q_i/V_i$) et donc un temps de passage ($t_i=1/D_i$) des micro-organismes au niveau de chaque étage. Les levures sont transférées d'une cuve à l'autre en même temps que leur milieu de culture ; il est donc possible de calculer, à chaque étage du MSCF, un temps de passage total dans le système (Tt_i), somme des temps de séjours des étages précédents et de l'étage considéré (Figure 1). Dans la suite de ce travail, nous utiliserons donc le temps de passage total comme paramètre permettant de déterminer le point de fonctionnement de chaque étage du

MSCF. En effet, l'utilisation du temps de passage total nous permet d'avoir une vision globale du MSCF en identifiant les différents étages avec un paramètre unique

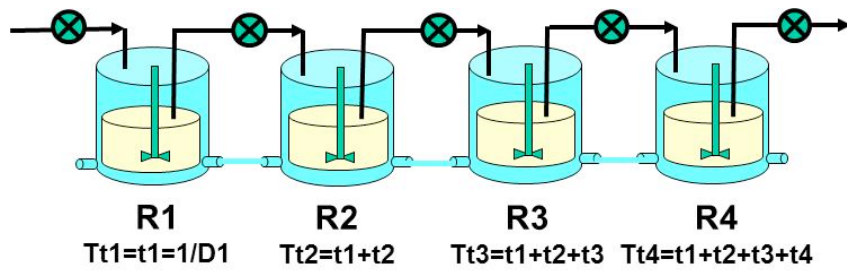


Figure R1 Schéma du MSCF et calcul des temps de passage. T_t : temps de passage total dans le système (h), t_i = temps de passage dans le réacteur R_i (h)

Etude des paramètres de fonctionnement du MSCF :

Huit fermentations en MSCF ont été réalisées sur le moût MS425 et avec la souche EC1118. Pour chaque fermentation, nous avons fait varier les débits afin de moduler le temps de passage total dans chaque fermenteur et donc le degré de bioconversion du milieu.

La figure R2 montre qu'il est, effectivement, possible – pour un milieu donné - de relier l'ensemble des données obtenues avec le temps de passage total et, donc, de prévoir la composition du milieu et l'état physiologique des levures suivant le réglage du MSCF. Ce résultat ouvre des perspectives pratiques intéressantes pour l'utilisation de cet outil.

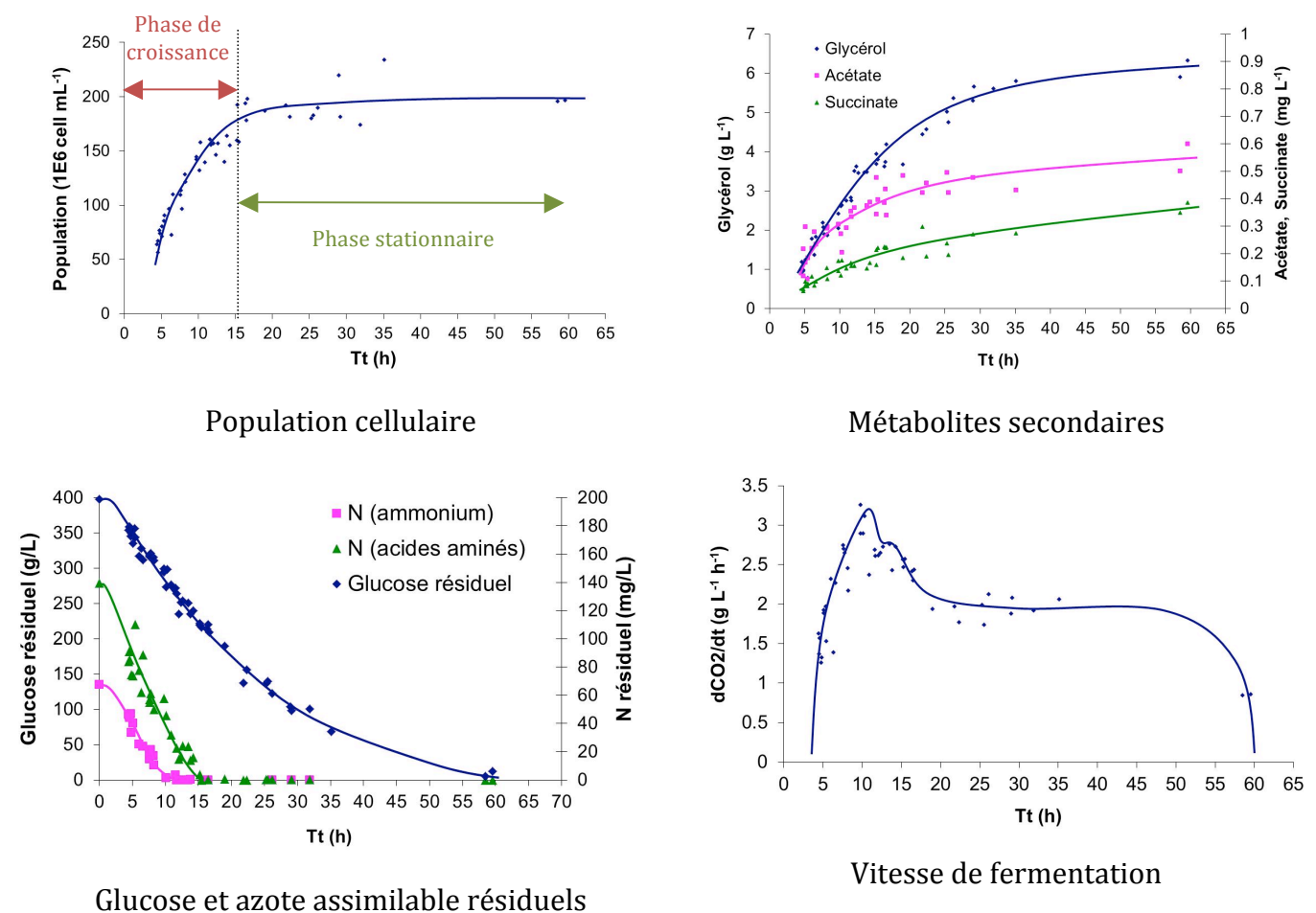


Figure R2 Représentation des paramètres mesurés en fonction du temps de passage total des levures dans le MSCF

Fiabilité du système- répétabilité des données

Afin de tester la reproductibilité des données issues du MSCF, des essais ont été réalisés en triplicats. Les réglages utilisés (Tableau R1) ont été choisis afin de placer les étages R1 et R2 en phase de croissance, R3 au moment de l'épuisement en azote et R4 en phase stationnaire.

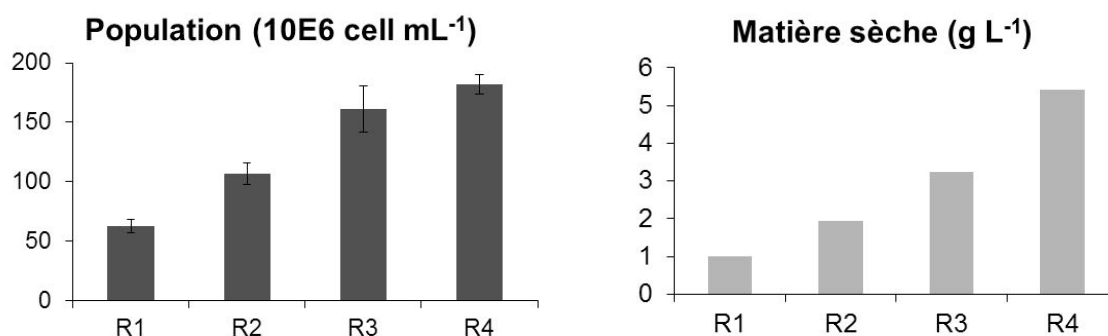
Tableau R1 Réglages du MSCF utilisés pour trois fermentations successives

	V (mL)	D (h⁻¹)	T total (h)	(1-S0)/S0
R1	700	0.22	4.5	0.12
R2	500	0.30	7.8	0.22
R3	500	0.13	12.1	0.37
R4	700	0.07	26.4	0.73

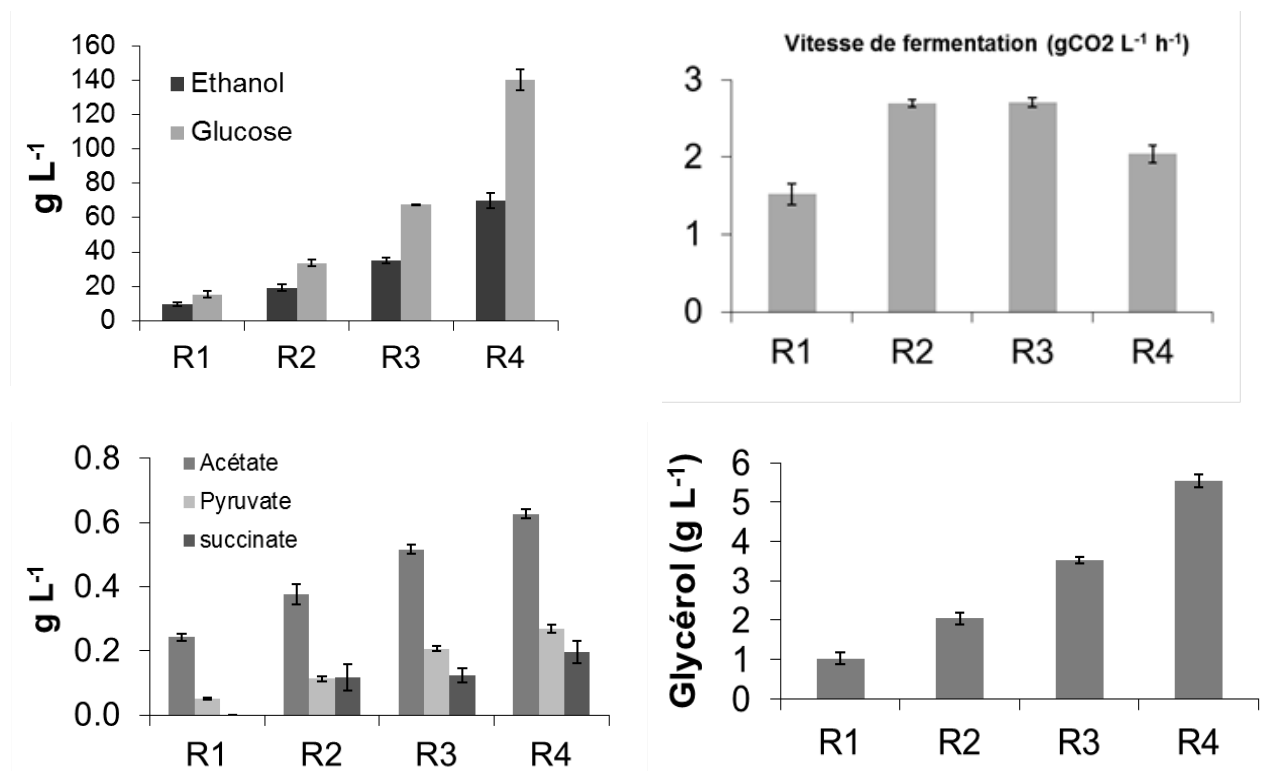
Les fermentations ont été réalisées sur un moût synthétique MS425, avec la souche EC1118. Chaque essai a été réalisé de manière indépendante.

Les résultats obtenus montrent qu'il est possible de reproduire une même expérience en MSCF avec une bonne répétabilité des paramètres de fermentation mesurés (vitesse de fermentation, croissance de la biomasse, composition en sucres de réserve, concentration du moût en métabolites secondaires).

Évolution de la biomasse :



Vitesse de fermentation et métabolites secondaires :



Sucres de réserve :

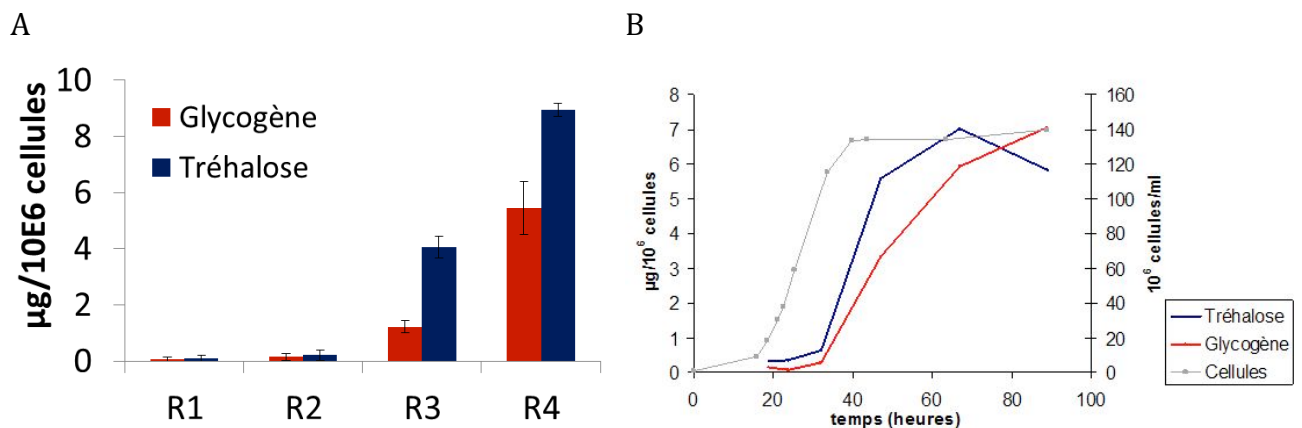


Figure R3 Sucres de réserve à chaque étage du MSCF. Données obtenues pour trois fermentations indépendantes en MSCF (A) et données obtenues en fermentation de type batch dans les mêmes conditions et avec la même souche de levure (Rossignol, 2004).

En plus des dosages de métabolites extracellulaires, nous avons également réalisé le dosage des sucres de réserve intracellulaires par une méthode enzymatique. La forte

reproductibilité de ces marqueurs intracellulaires est un indicateur supplémentaire de la précision et de la fiabilité du MSCF.

La composition cellulaire en sucres de réserve (tréhalose et glycogène) varie en cours de fermentation notamment en relation avec la disponibilité du milieu en azote et de la phase de croissance des levures. Leur synthèse joue également un rôle au niveau de la régulation du flux glycolytique et de la réponse au stress (François & Parrou, 2001). La présence de ces sucres apparaît donc comme un bon indicateur de l'état physiologique des levures. La comparaison de nos données avec celles obtenues en batch dans les mêmes conditions de fermentation et avec la même souche (Rossignol, 2004) nous a permis de vérifier la concordance de nos conditions avec celles du batch (Figure R3).

Chapitre II

Etude de l'effet d'un ajout pulsé d'azote
sur le métabolisme de *Saccharomyces
cerevisiae* en fermenteur continu multi-
étagé

CHAPITRE II

Etude de l'effet d'un ajout pulsé d'azote sur le métabolisme de *Saccharomyces cerevisiae* en fermenteur continu multi-étagé

Dans le chapitre précédent, nous avons mis en évidence la possibilité de reproduire les conditions de la fermentation alcooliques en une série de quatre états stables et contrôlés représentant quatre états successifs de la fermentation en batch. En outre, ce dispositif permet d'obtenir dans un état stable, des cellules non proliférantes, dans un état physiologique proche de l'état stationnaire du batch.

Il nous a semblé intéressant de mettre ce bioréacteur en application dans le but d'étudier la réponse cellulaire à une perturbation de l'environnement. Une des perturbations couramment rencontrées en condition de fermentation œnologique est l'ajout d'azote au milieu. L'ajout d'azote en cours de fermentation a comme effet d'accroître la vitesse de fermentation et ainsi de réduire la durée du procédé, mais il a également été observé un effet sur la synthèse des composés volatils (alcools supérieurs et esters). L'influence sur ces composés est extrêmement variable en fonction de la souche de levure utilisée, de la source d'azote ajoutée et du moment de l'ajout, et ces mécanismes sont encore mal connus.

Dans les travaux présentés dans l'article suivant nous avons poursuivi la caractérisation du MSCF et sa validation en comparant état stationnaire et batch au niveau de la production des composés volatils mais également au niveau du transcriptome.

Par la suite, nous avons réalisé un ajout pulsé d'azote dans une culture à l'état stable en début de phase stationnaire, sous forme soit d'ammonium minéral, soit de valine. Le suivi de la cinétique de production des métabolites secondaires du métabolisme carboné central, des alcools supérieurs et des esters, nous a apporté de nouveaux éclairages sur la réorganisation du métabolisme consécutif à un ajout d'azote et la manière dont cet ajout influence la synthèse des composés volatils.

**IMPACT OF NITROGEN PULSE ON YEAST METABOLISM DURING ALCOOLIC
FERMENTATION AT STEADY STATE- INTEREST OF USING A MULTI-
STAGE CONTINUOUS FERMENTOR**

Clement T*, Perez M., Mouret J.R., Sablayrolles J.M. and Camarasa C.

INRA, UMR Sciences pour l'œnologie, 2 Place Viala, 34060 Montpellier cedex 1, France.

*: To whom correspondence should be addressed

E-mail: clementt@supagro.inra.fr . Tel: (33) 4 99 61 25 00. Fax: (33) 4 99 61 28 57.

ABSTRACT

Nitrogen supplementation is widely used in winemaking fermentation for its positive impact on fermentation kinetics. Adding nitrogen during fermentation also impacts the wine composition, in particular the volatile compounds. Despite the numerous studies on the link between nitrogen supplementation and volatile compounds synthesis, the metabolic mechanisms underlying remain unclear.

We used a multistage continuous fermentor (MSCF) to study the impact of nitrogen addition in winemaking fermentation. This new fermentation device has previously proved its suitability as a tool to study yeast cells physiology in winemaking fermentation conditions. Indeed, compared to batch, the medium content is stable and well controlled. In the present study we confirmed the efficiency of the MSCF in terms of reliability and capacity to mimic batch fermentation. Then, we explored its potentiality to study the metabolic response of yeasts cells to a nitrogen addition which is a common practice in winemaking conditions, comparing a mineral source of nitrogen (NH_4Cl) to an organic source (Valine).

The experimental set up allowed us to study the impact of nitrogen addition independently of the variations in the environment resulting from the fermentation process and therefore to discriminate the modifications directly related to nitrogen assimilation from the one which result from secondary effects.

Keywords continuous multi-stage bioreactor, alcoholic fermentation, yeast, nitrogen pulse, aroma compounds

1 Introduction

Nitrogen is the main limiting nutrient of yeasts during wine fermentation. In the enological practice, it is generally assumed that a minimum of about 140 mg/L of nitrogen is necessary to complete 200 g/L sugar fermentation. However, the optimal nitrogen content in such juices should be around 300 mg/L of yeast assimilable nitrogen (YAN) (Agenbach, W.A, 1977; Bell & Henschke, 2005; Bely *et al.*, 1990b; Jiranek *et al.*, 1995c; Ough *et al.*, 1991). Low nitrogen levels in must are generally associated with reductions in yeast biomass and low fermentation rates (Alexandre & Charpentier, 1998; Bely *et al.*, 1990a; Monteiro & Bisson, 1991). To avoid fermentation problems in nitrogen deficient musts, winemakers often proceed to nitrogen supplementation.

The impact of nitrogen supplementation varies with the yeast strain used, the fermentation conditions, the timing of addition and the type of nitrogen source (Bell & Henschke, 2005; Jiménez-Martí *et al.*, 2007a; Ugliano *et al.*, 2007). Generally, nitrogen supplementation of the must before fermentation increases both the cell population and fermentation rate, whereas the addition at the beginning of the stationary phase leads to a higher fermentation rate without influencing the cell population (Beltran *et al.*, 2005; Bely *et al.*, 1990a; Blateyron & Sablayrolles, 2001). However, depending on the strain and the initial nitrogen concentration, nitrogen addition at the beginning of fermentation does not always enhance growth (Taillandier *et al.*, 2007). Addition of nitrogen also impacts the wine composition in metabolites such as glycerol, organic acids, and volatile compounds, and therefore influences the organoleptic characteristics of the final product. Several recent studies have focused on the impact of nitrogen addition on the final aroma composition of the wine (Beltran *et al.*, 2005; Hernandez-Orte *et al.*, 2006; Vilanova *et al.*, 2007; Carrau *et al.*, 2008; Torrea *et al.*, 2011).

Addition of nitrogen before the onset of fermentation is generally linked to a decrease in volatile acidity and higher alcohols (Barbosa *et al.*, 2009; Bely *et al.*, 2003) but an increase in volatile esters, which generally contributes positively to wine aroma (Bell Henschke 2005, Ugliano *et al.*, 2007). Nevertheless, excessive levels of nitrogen can be detrimental for the quality of wine due to the increased synthesis of fusel alcohols (Beltran *et al.* 2005), acetic acid (Bely *et al.* 2003), ethyl carbamate (Ough *et al.*, 1988) and/or hydrogen sulfide (Ugliano *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2003). Overall, due to the various different fermentation conditions used in these studies, the obtained results were often contradictory making it very difficult to draw any general conclusion on the relationship between YAN and the synthesis of volatile compounds (Carrau *et al.*, 2008). Consequently, the management of nitrogen, ensuring an optimal nitrogen supply throughout fermentation, remains a major challenge for winemakers (Ugliano *et al.*, 2007).

Pulse experiments in chemostats are often used to study the dynamics in the metabolic response of microorganisms to modification in their environment, such as a sudden relief of nutrient limitation (Kresnowati *et al.*, 2008; Lara *et al.*, 2009a; Sonnleitner, 1998; Taymaz-Nikerel *et al.*, 2011). In the last years, such experiments combined with fast sampling methods permitted to widen the knowledge of the adaptive mechanisms of microorganisms to their changing environments at metabolomic and transcriptomic levels (Kresnowati *et al.*, 2006; Lara *et al.*, 2009b; Schmitz *et al.*, 2002; Theobald *et al.*, 1997). Indeed, (i) steady state chemostat cultures are particularly relevant to obtain reproducible data (Bull, 2010; Hoskisson & Hobbs, 2005) and (ii) at steady state, the physiological state of microorganisms remains stable as well as the composition of the culture medium, contrarily to batch cultures (Mashego *et al.*, 2007). However, the chemostat also presents limits, especially as part of a study under winemaking

conditions. Indeed, yeasts cells are maintained in a growing state, the growth rate being controlled by the availability of a limiting nutrient. However, in winemaking, yeasts undergo two different phases: a growth phase and a stationary phase during which the cell population remains stable. The majority of the fermentation process is operated in this latter phase, which is therefore of great importance. In this context, we developed an original multi-stage continuous bioreactor (MSCF) that permits to grow yeasts in steady state and reproduces the conditions of the batch fermentation including the different phases (growth phase and stationary phase) (Clement *et al.*, 2011). This device consists of four bioreactors linked in series, and the progressive exhaustion of the limiting nutrient (assimilable nitrogen) ensures a good mimicking of the batch conditions compared to a chemostat or a two-stage continuous device.

The current study first investigated the relevance of MSCF system, in comparison with batch cultures, to analyze yeast nitrogen metabolism, regarding in particular the formation of volatile compounds, during wine stationary phase. Then, MSCF was used to perform nitrogen pulse experiments, as valine or ammonium, at steady state. This original experimental set up allowed us to explore the dynamics of yeast cells response to nitrogen supplementation performed after nitrogen exhaustion and its consequences on the synthesis of secondary metabolites.

1 Materials and methods

1.1 Yeast strain and culture medium

Fermentations were carried out with the commercial strain of *Saccharomyces cerevisiae* EC1118 (Lallemand SA). The inoculum was grown aerobically in shaken flasks at 28°C, first in YPD medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose) for 24 h, and then in synthetic medium. After 24h at 28°C, this second pre-culture was used to inoculate the bioreactor at a density of 10⁶ cells/mL. We used the synthetic medium SM100 described by (Bely *et al.*, 1990a) which mimics a grape must with 100 mg/L of yeast assimilable nitrogen (YAN).

1.2 Fermentation set-up

1.2.1 Batch fermentation

Batch fermentations were performed in 1L fermentors, continuously stirred (100 rpm) and linked to a mass flow-meter that measured on line the CO₂ release rate.

1.2.2 Four-stage continuous fermentations (MSCF)

The four-stage fermentation device was configured as described previously (Clement *et al.*, 2011). The parameters of the MSCF were set to ensure a progressive exhaustion of the nitrogen in the first two stages and thus a complete absence of any residual YAN in the third stage of the fermentor, representing the beginning of the stationary phase.

After inoculation, the fermentation started in batch mode until the fermentative activity reached its maximum (about 17h after inoculation). Then, the continuous fermentation was launched. For a given dilution rate ($D=Q/V$ (h⁻¹), where Q is the input flow rate and V is the volume of the tank, the system was considered to be in steady state after three residence times ($Rt = 1/D$).

Once the steady state was established, the four tanks were sampled for dry weight, carbon metabolites and volatile compounds analysis. Then, 100mg/L nitrogen was added in the third stage (R3), either as a solution of ammonium chloride at 26.7 g/L or as a solution of L-valine at 58.6 g/L. The small volume of stock solution added limited the perturbation of the dilution rate. Following the pulse of nitrogen, the medium was sampled hourly until the complete exhaustion of assimilable nitrogen.

1.2.3 Evolution of the medium composition in MSCF

In MSCF, the evolution of the concentration of a component C can be expressed as the sum of three different elements (Equation1): the incoming flow rate of C which depends on the concentration of C in the previous stage, the outflow rate which is a function of the concentration of C in the considered stage and the production (or consumption) rate which depends on the synthesis (or uptake) activity of the microorganism. The Equation 1 resumes the balance of C in the stage R_i.

Equation 1

$$\frac{dC_i}{dt} = C_{i-1} \times \frac{Q_{e_i}}{V_i} - C_i \times \frac{Q_{s_i}}{V_i} + r_{c_i} = D_i(C_{i-1} - C_i) + r_{c_i}$$

C_i = concentration of the compound C in the stage i (g/L)

C_{i-1} = concentration of the compound C in the stage i-1 (g/L)

Q_{e_i} = inlet medium flow rate in the stage i (L/h)

Q_{s_i} = outlet medium flow rate in the stage i (L/h)

V_i = medium volume in the stage i (L)

r_{c_i} = production (or consumption) rate of the compound C in the stage i (g/L/h)

At steady state, the composition of the medium is constant and $\frac{dC_i}{dt} = 0$. Thus, r_{c_i} can be

easily deduced from the measurement of C_i and C_{i+1} . In the case of a pulse of nutrient, the

equation 1 can be integrated assuming a constant r_{ci} in the time interval considered, as presented in equation 2.

Equation 2

$$\int_{t_1}^{t_2} C_i = D \int_{t_1}^{t_2} C_{i-1} - DCm_i \int_{t_1}^{t_2} t + r_{ci} \int_{t_1}^{t_2} t$$

C_m is the mean concentration between t_1 and t_2 and was calculated as a logarithmic mean.

Thus, the production rate of the compound C was calculated according to equation 3:

Equation 3

$$r_{ci} = \frac{C_{i2} - C_{i1}}{t_2 - t_1} + D \frac{C_{i2} - C_{i1}}{\ln\left(\frac{C_{i2}}{C_{i1}}\right)} - D.C_{i-1}$$

1.3 Analytical methods

1.3.1 Cell population and cellular dry weight

During fermentation, the cell population and the cell-size distribution were determined with a Coulter Counter (model Z2, Beckman-Coulter, Margency, France) fitted with a 100- μm aperture probe.

The dry weight of yeasts (X) was determined gravimetrically using nitrocellulose filters (pore size 0.45 μm ; Millipore) from 10 mL of sample. The sample was then dried for 48h at 100°C.

1.3.2 Substrate and metabolite analyses

Metabolites of central carbon metabolism: Glucose, ethanol, glycerol, and succinic acids in culture supernatants were determined by HPLC using a HPX-87H Aminex ion exchange column (300 x 7.8 mm, Bio-Rad) at 45 °C. The column was eluted with 8 mM H₂SO₄ at a flow rate of 0.6 mL/min. Acetic and pyruvic acids were determined with a Hewlett-

Packard G1314A UV meter at 210 nm whereas the other compounds were determined with an Agilent G1362A refractive index detector.

Volatile compounds: Volatile compounds were determined by GC-FID analysis, with a headspace autosampler and a BP20 column (SGE). In order to facilitate the extraction of the volatile compounds to the gas phase, NaCl (1 g) was added to 3mL of the fermentation sample in a 20mL vial. To standardize the equilibrium conditions between the liquid and the headspace, the ethanol concentration in the vial was adjusted to 11% by adding 2mL of a mixture of 12 g/L tartaric acid solution diluted either in water or an ethanol/water mix (30%, v/v). Then, an internal standard was added as 50 µL of 4-methylpentan-2-ol at a concentration 3 g/L. The sample vial was heated and agitated for 5 min at 50°C in a headspace autosampler HT200 equipped with a gastight syringe, preheated to 60°C. One mL of headspace gas was analysed by using a HP6890 GC coupled to a FID detector. The injector temperature was 240°C. The GC oven was equipped with a BP20 column (30m×0.53mm×1.0_m, SGE). H₂ was used as the carrier gas at a constant flow rate of 4.8 mL/min. The oven temperature program was 40°C for 3min, 3°C/min to 80°C, 15°C/min to 160°C held for 1 min, then 30 °C/min to 220°C and then held at 220°C for 2min. The detector was set at 250°C. Peak areas were acquired with Agilent Chemstation software.

1.3.3 *Assimilable nitrogen*

The ammonium concentration was determined enzymatically (Enzytec™ Fluid 5390, Thermo). Free residual amino acids were quantified by cation-exchange chromatography followed by postcolumn derivatization with ninhydrin (Biochrom 30, Biochrom, Cambridge, U.K.).

1.4 *Analysis of gene expression*

1.4.1 *Microarray preparation*

For each fermentation condition, the gene expression was analyzed from four independent samples. For the batch condition (B), four independent fermentations were carried out in parallel and sampled when glucose consumption reached 30 g/L. In the case of MSCF (ES), a multi-stage continuous fermentation was carried out and the four samples (aliquots of 1×10^9 cells) were taken at steady state, every 24h, in the third stage. Cells were collected by centrifugation at 1000 g for 5 min at 4°C and the cell pellets were washed with DEPC-treated water and then frozen in methanol at -80°C. Total RNA was extracted with Trizol reagent (Gibco BRL, Life Technologies) and was purified with the RNeasy kit (Qiagen). The quantity and the quality of the extracted RNA were checked by spectrometry (NanoDrop 1000, Thermo Scientific). We used the Agilent gene expression microarrays 8x15k (Design ID based on 016322 completed with 39 EC1118 specific genes Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Fluorescent cRNAs were synthesized from 100 ng of total RNA using the One color RNA Spike-In kit (Agilent Technologies). Labeled cRNA was purified with the RNeasy Kit (Qiagen). Microarrays were hybridized for 17 h at 65°C in a rotating hybridization oven (Corning), with the Gene Expression Hybridization kit (Agilent).

1.4.2 *Data acquisition and statistical analysis*

The hybridization signal was detected with a GenePix 4000B laser Scanner (Axon Instruments). Acquisition and quantification of array images were performed using the integrated GenePix software version 3.0. Statistical analysis was performed using R.2.13.1 (Ihaka & Gentleman, 1996). The limma package (Smyth & Speed, 2003; Smyth, 2004; Smyth *et al.*, 2005) was used to normalize the microarray data (quantile method

for normalization between arrays). To determine the differential gene expression between experimental conditions, a modified t-test was performed by filtering the confidence at $p < 0.05$, using the Benjamini and Hochberg false discovery rate as multiple testing correction of the t-test p-values (Benjamini, 2001). Only genes with a log fold change greater than 1.2 (positive or negative) in expression level were considered. The genes with different expression were grouped according to Gene Ontology (GO) process terms using Funspec (Robinson *et al.*, 2002). The complete data set is available through the Gene Expression Omnibus database (accession number GSE to be created).

2 Results

2.1 Accuracy of the MSCF for to study yeasts metabolic response to an environmental perturbation

We first investigated the interest of MSCF to analyze the metabolic response of yeast to a nitrogen addition during the stationary phase. Four independent four-stage continuous fermentations (MSCF) were carried out using dilution rates reported in table 1. Under these conditions, yeast assimilable nitrogen (YAN) was exhausted in the second stage (Table 1). In addition, maximum cell population was reached in the third stage and no significant growth was found in the last stage. This indicated that in the third stage, cells were in a physiological state similar to the beginning of the stationary phase of wine fermentation in batch. Consequently, this stage was selected for setting up nitrogen additions.

Table 1 Characteristics of the steady state in the four stages of the MSCF

	R1	R2	R3	R4
V (mL)	500	500	700	700
D (h ⁻¹)	0.27	0.24	0.11	0.10
dCO ₂ /dt (mg/L/h)	0.37 ±0.04	0.94 ±0.09	0.54 ±0.04	0.42 ±0.02
Residual YAN (mg/L)	0.97±0.02	0.02±0.02	ND	ND
Residual glucose (g/L)	186 ±7	178±5	164 ±5	151 ±5
Population (1 ^E 6 cell/mL)	30 ±3	58 ±4	79 ±4	82 ±3
Dry weight (g/L)	1.2 ±0.3	1.3 ±0.3	1.9 ±0.3	2.3 ±0.3
μ (pop)	0.272 ±0.004	0.118 ±0.016	0.031 ±0.011	0.003 ±0.003

2.1.1 Characteristics of the steady state and comparison with batch conditions

We then compared growth and metabolites production between the third stage of MSCF and batch fermentation (Table 2), at the same fermentation progress (residual glucose of 164 ± 5 g/L). Differences in biomass formation (cell population, dry weight) between

the two fermentation processes were less than 5%. In the same way, the formation of intermediates of the carbon central metabolism (CCM) and higher alcohols by EC1118 during MSCF was also close to that measured during batch fermentation, with variations ranging from 4 to 8%, except for pyruvate. Finally, the levels of esters synthesis by yeasts grown in batch or MSCF cultures were comparable. For each MSCF, the carbon balance at steady state ranged between 94 and 98%.

Table 2 Biomass and metabolites production at the beginning of stationary phase. Comparison between the third stage of MSCF at steady state (ES0) and batch culture, at the same fermentation progress (residual glucose 164 ± 5 g/L).

	ES0	Batch
Dry weight (g/L)	1.91 ± 0.04	1.91 ± 0.05
Cell population (x1E6 cell/mL)	79 ± 4	86 ± 5
g/L		
Succinate	0.220 ± 0.005	0.230 ± 0.005
Glycerol	1.78 ± 0.05	1.93 ± 0.09
Acetate	0.230 ± 0.004	0.210 ± 0.006
Ethanol	13.5 ± 0.4	15.1 ± 0.6
Pyruvate	0.078 ± 0.005	0.090 ± 0.005
mg/L		
isoamyl alcohol	52 ± 2	54 ± 4
isobutanol	15.0 ± 0.7	15.1 ± 0.7
propanol	7.6 ± 0.3	8.4 ± 0.4
ethyl acetate	3.10 ± 0.07	3.3 ± 0.1
µg/L		
ethyl hexanoate	21 ± 2	22 ± 1
ethyl octanoate	40 ± 5	ND
ethyl decanoate	52.3 ± 0.5	11.1 ± 0.8
ethyl dodecanoate	6.5 ± 0.5	ND
isoamyl acetate	41 ± 1	44 ± 2
isobutyl acetate	5 ± 1	ND

Overall, this confirmed that MSCF mimics satisfactorily batch fermentations. Consequently, this system is relevant and of interest to characterize at steady state the physiological response of yeast to nitrogen addition as usually done in winemaking.

2.1.2 Transcriptomic analysis

To further compare batch and MSCF cultures, transcriptomic analysis was performed on mRNA samples collected from the third stage of MSCF and from batch culture. For each condition, 4 independent replicates were analyzed.

The principal component analysis of the transcripts levels (Figure 1) showed a good separation between samples. The reliability of MSCF compared to batch fermentation appeared clearly as we could observe a lower dissemination of the replicates in MSCF compared to batch samples. This analysis gives an overview of the variability between the conditions studied and confirms the accuracy of using MSCF to provide reproducible transcriptomic data.

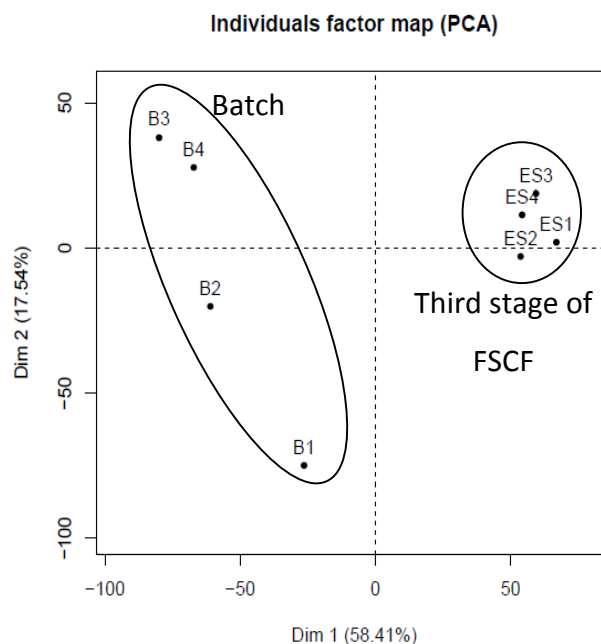


Figure 5 Principal component analysis of gene expression level in the four replicates of batch (B) and MSCF (ES).

Only 143 genes, over the 6245 tested ones, were significantly differentially expressed ($\log Fc > 1.2$ and adjusted p-value < 0.01), including 61 up-regulated and 82 down-regulated genes in MSCF compared to batch. Thus, the genes which were significantly altered between the two fermentation processes represented less than 2% of the genome (Figure 2).

Most of down-regulated genes were annotated to rRNA processing and modification, RNA binding, ribosome biogenesis and ribosomal proteins (Table 3). This functional category has been previously reported as widely regulated in response to a large number of environmental changes (Regenberg *et al.*, 2006). The main functional categories of up-regulated genes were cytokinesis (5) and cell wall organization (11), which might be associated to cell growth, in particular cell division (Colman-Lerner *et al.*, 2001; Draper *et al.*, 2009). Only few metabolic genes (16) were consistently differentially expressed between MSCF and batch cultures. However, no statistical significant enrichment for metabolic categories was found both for up- and down-regulated genes.

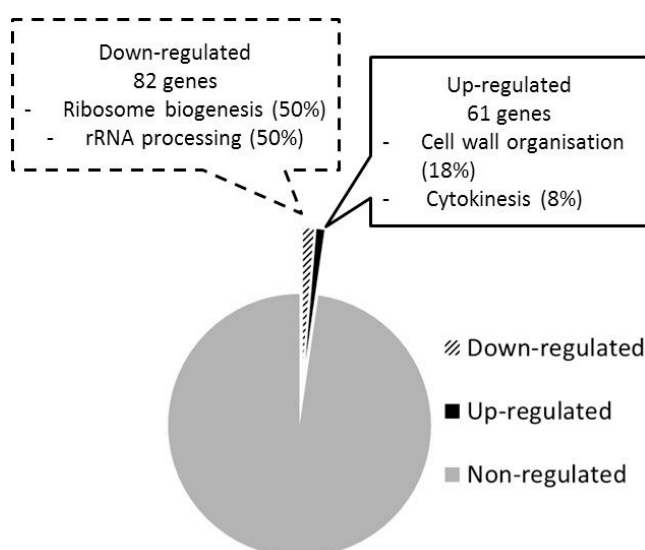


Figure 2 Regulation of the genes in batch versus

Among these genes, *TPS1*, *PGM2* and *GSY1* were down-regulated genes involved in the biosynthesis of reserve carbohydrates (François & Parrou, 2001). During batch wine fermentation, the storage of carbohydrates arose at growth arrest, in response to nitrogen depletion (Rossignol *et al.*, 2003). The under-expression of these genes was likely related to a low residual growth in the third stage of MSCF.

Overall, these data depict MSCF as an accurate tool for studying yeast metabolism during wine fermentation.

Table 3 Funspec functional classification categories (Biological functions) of genes up- or down - regulated in the third stage of MSCF compared to batch for the same fermentation progress. For each category, K corresponds to the number of genes differentially regulated in our conditions and f is the total number of genes in the category considered

Category	p-value	In Category from Cluster	k	f
<i>Up-regulated in MSCF</i>				
cellular cell wall organization [GO:0007047]	2.84E-10	CHS2 DSE1 SCW11 CRH1 DSE2 CIS3 PIR1 CTS1 SUN4 HPF1 TIR4	11	89
cytokinesis, completion of separation [GO:0007109]	2.32E-08	DSE1 SCW11 DSE2 CTS1 DSE4	5	11
<i>Down regulated in MSCF</i>				
ribosome biogenesis [GO:0042254]	<1e-14	SPB1 NOP1 UTP4 UTP5 UTP6 NSA2 DBP3 RPL8A RRP3 SSF1 MRT4 DRS1 UTP13 UTP21 ERB1 RRB1 HAS1 RLP7 NOP15 DBP2 NOG2 RCL1 NOP12 NOC2 YTM1 NOP58 RRP12 NOG1 NOP53 RRP9 NOC4	31	170
ribosomal large subunit biogenesis [GO:0042273]	3.01E-13	MAK16 ARX1 PUF6 NSA2 PRP43 MRT4 ERB1 RLP7 NOP15 YTM1 NOG1 SPB1 NOP1 SSB1 UTP4 UTP5 UTP6 NSA2 DBP3 PRP43 NSR1 RRP3 MRT4	11	37
rRNA processing [GO:0006364]	<1e-14	DRS1 UTP13 UTP21 ERB1 RRB1 HAS1 NOP15 DBP2 SSB2 NOP12 YTM1 NOP58 NOG1 NOP53 MRD1 RRP9 NOC4	29	195
maturation of LSU-rRNA from tricistronic rRNA transcript (SSU- rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA) [GO:0000463]	9.17E-10	MAK16 SPB1 NSA2 PRP43 RLP7 NOP12 NOP53	7	18
endonucleolytic cleavage in 5'-ETS of tricistronic rRNA transcript (SSU-rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA) [GO:0000480]	6.81E-07	UTP6 UTP13 RCL1 NOP58 MRD1 NOC4	6	27

2.2 *Metabolic response of S. cerevisiae to nitrogen pulses in the third stage of MSCF*

The metabolic response of the yeast EC1118 to nitrogen addition was analyzed using the MSCF device. Pulse experiments were carried out adding 100 mg/L nitrogen as ammonium or valine in the third stage of MSCF fermentation. In parallel, we performed nitrogen addition in batch fermentation, at the same fermentation progress, as a control.

2.2.1 *Growth and fermentation rate*

Following the pulse, a rapid consumption of the nitrogen source was observed in MSCF, in six hours for ammonium and nine hours for valine (Figure 3). This is likely due to the differences in the rates of assimilation of ammonium and those of valine. Indeed, the specific uptake rate of ammonium, based on the consumption balance (Equation 1), was twice as high as the one of valine (0.61 mol N/gDW/h for ammonium and 0.29 mol N/gDW/h for valine). On the other hand, in batch fermentation, the specific consumption rates calculated for ammonium and valine considering the average biomass between the pulse and the exhaustion of the nitrogen source were lower, but the ammonium consumption rate is still twice as high as the one of valine (0.40 mol N/gDW/h for ammonium and 0.21 mol N/gDW/h for valine). This observation supports the specificity and the interest of the MSCF that provides yeasts cells in a stable physiological state. Indeed, in batch fermentation, the more important accumulation of metabolites due to the dynamic process, in particular ethanol might be responsible for transporters deterioration and a decrease of the nitrogen uptake rate. The higher rates of consumption, in addition to the lower amount of assimilated nitrogen sources due to the wash out in MSCF, resulted in a shorter phase of nitrogen assimilation under these conditions compared with batch fermentation (figure 3).

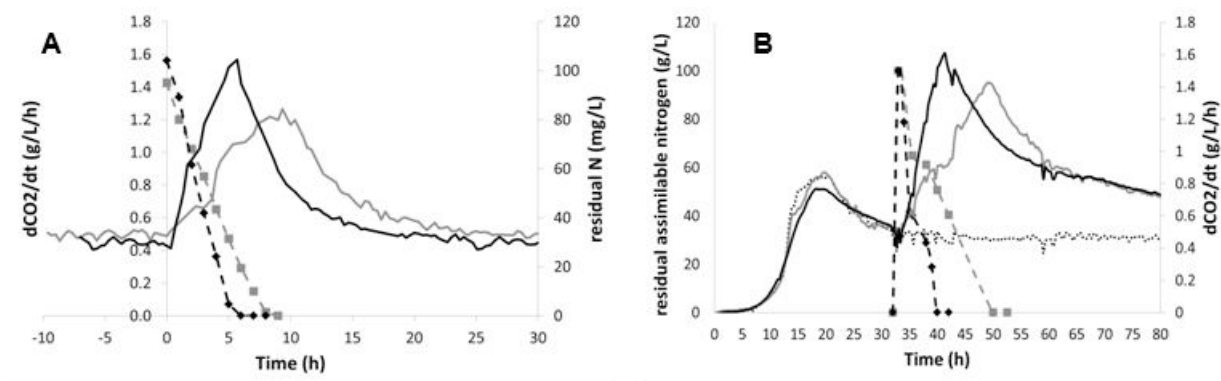


Figure 3 Evolution of CO₂ production rates (solid lines) and residual nitrogen (dash line) after a pulse of nitrogen (100 mg/L) as ammonia (black line) or valine (grey line), in MSCF (A) and during batch fermentation (B).

As expected considering previous data on batch fermentation (Bely *et al.*, 1990), addition of nitrogen triggered an important increase of the CO₂ production rate (2.8-fold for ammonium and 2.5 for valine). In both cases, the maximum fermentation rate was reached simultaneously to nitrogen exhaustion and then decreased to reach its initial level.

No significant variation of the population was observed after the pulse of nitrogen in MSCF, whatever the nitrogen source. Conversely, in batch fermentation, we observed a 10 to 20% increase of the population. This slight increase in cell population might have gone unnoticed in MSCF due to the dilution rate.

2.2.2 Production of central carbon metabolism intermediates

The main metabolic response, first presented for CCM metabolites (Figure 4), took place during the nitrogen consumption phase. The changes in metabolite concentrations in the medium during MSCF reflected modifications in their production rate, since at steady state (i.e. before addition of nitrogen), metabolites did not accumulate.

In agreement with the increase of the CO₂ production rate, nitrogen addition resulted in a transient increase in the glucose consumption and ethanol production rates (Figure 4),

more rapidly with ammonium than with valine. The glycerol production rate followed the same evolution, with a larger increase for ammonium addition. The formation of pyruvate increased after the addition of valine and to a lesser extent, when ammonium was added. Finally, a slight increase in the production of acetate was evidenced, of the same magnitude for both nitrogen sources.

Contrarily to other metabolites, succinate synthesis decreased immediately after valine or ammonium pulse and then through the whole nitrogen consumption phase. The evolution of its content in the medium is close to that due to the wash out, meaning that the synthesis was almost stopped as a direct consequence of nitrogen addition. Moreover, the succinate synthesis was restored as soon as nitrogen was exhausted. This suggested that modification in succinate synthesis was directly related to nitrogen metabolism.

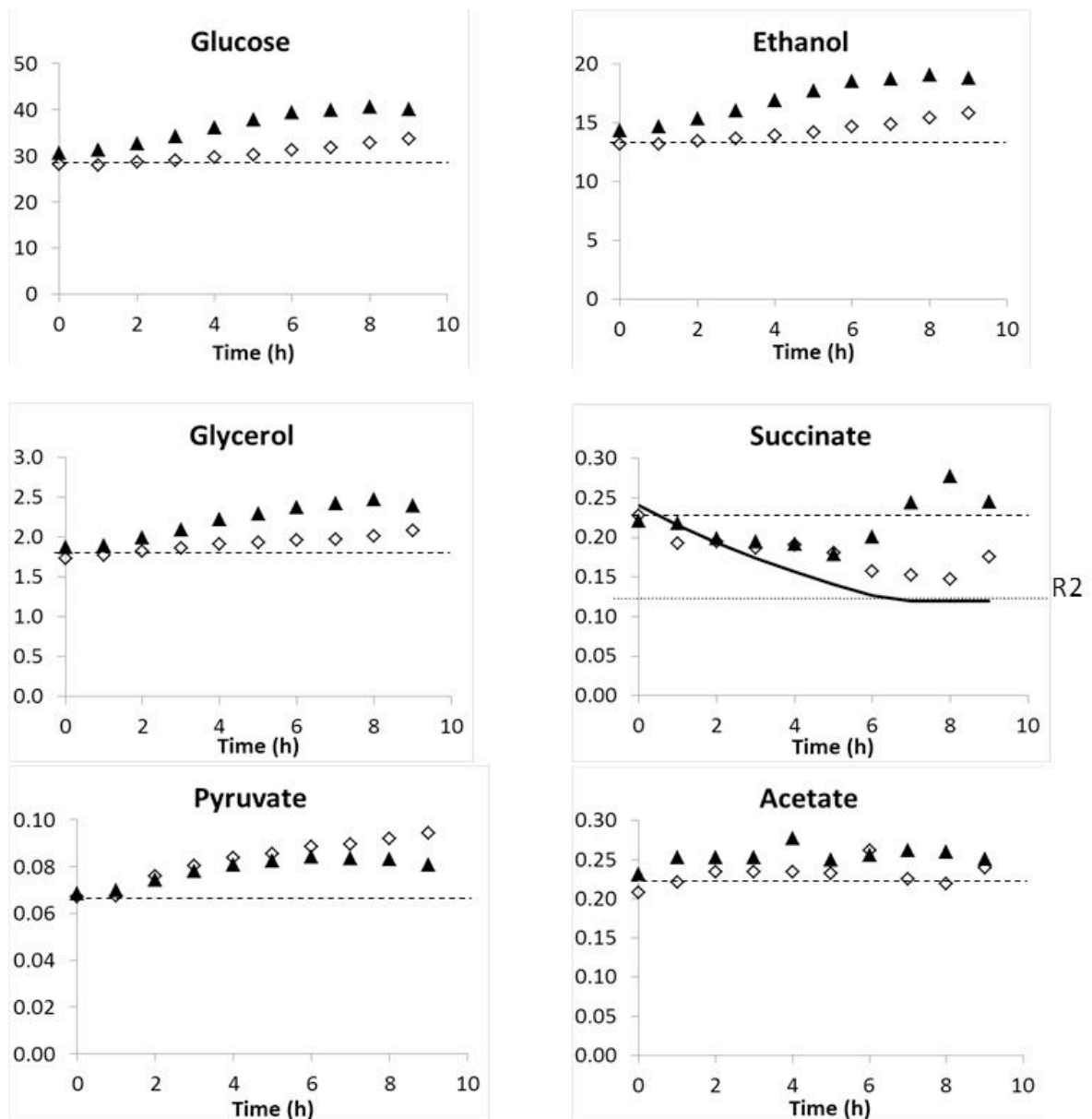


Figure 4 Evolution of metabolites content (g/L) after nitrogen pulse in the third stage of MSCF. Black triangles: ammonia; Blank diamonds: valine; stars and dash line and: control. Solid line: evolution of metabolite only due to washing of the tank (production rate = 0); then, the product concentration in the third stage R3, reaches the one of the second stage (R2).

Metabolism of higher alcohols and esters

The formation of fusel alcohols and esters in the third stage of MSCF was substantially impacted by valine or nitrogen addition (figure 5). The most obvious modifications concerned the synthesis of isobutanol and its derived ester, isobutyl acetate, which were increased respectively 10-fold and 3.5-fold after addition of valine. Isobutyl acetate increase took place with a four hours delay compared to isobutanol, suggesting a direct relationship between the formation of this acetate ester and its precursor (isobutanol) availability.

The response to ammonium addition showed a slight decrease of the synthesis of isobutanol and isoamyl alcohol. Isoamyl alcohol production also decreased after valine addition, probably due to the utilization of α -ketoisocaproate for the synthesis of leucine. Nevertheless, the synthesis activity is still present, as the concentration of isoamyl alcohol remains higher than the one predicted in case of washing.

Changes in the formation of propanol were independent from added nitrogen source. Thus, in both cases, the propanol content increased two fold until the exhaustion of the nitrogen source, and then slowly decreased.

The impact on ethyl esters was similar for both valine and ammonium pulses. The production rates of short chain ethyl esters (ethyl acetate and ethyl hexanoate) both increased with the two nitrogen sources but showed different evolution pattern as ethyl acetate increased directly after nitrogen addition to reach a plateau after two hours whereas the increase in ethyl hexanoate production rate took place two hours after the pulse. The production rate of ethyl acetate was 50% higher with valine than with ammonium. Finally, the production of ethyl decanoate was reduced but not totally stopped.

The production of hexyl acetate was stopped after addition of nitrogen, since the evolution of its concentration was the same as the washing curve.

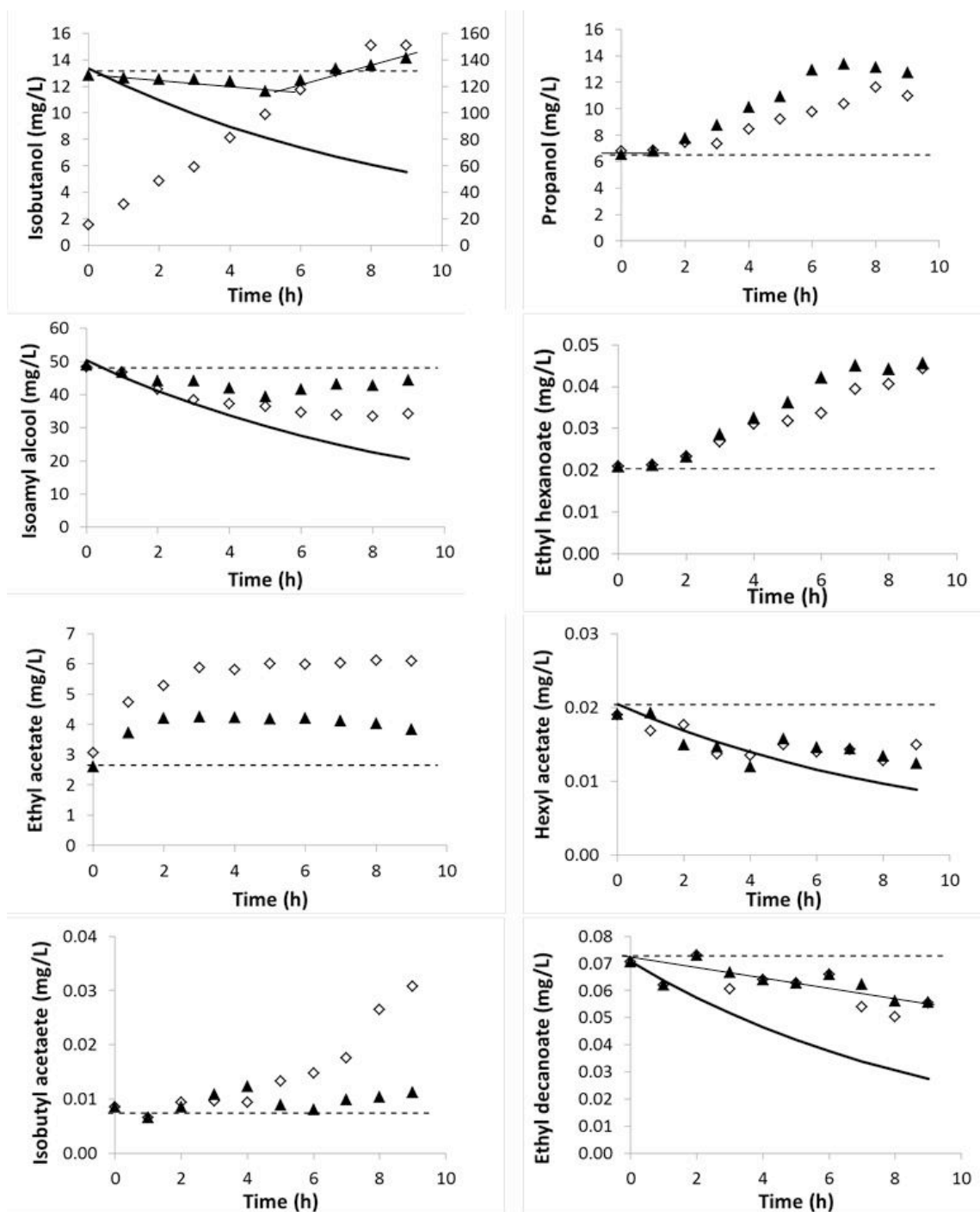


Figure 5 Evolution of the volatile compounds after nitrogen addition in MSCF. Black triangles: ammonia; Blank diamonds: valine; dash line: control. Solid line: evolution of metabolite only due to washing of the tank (production rate = 0).

2.2.3 Global metabolic re-routing resulting from nitrogen pulse

The yield of metabolite production compared to glucose consumed was calculated for each nitrogen pulse experiment (Table 4). The repartition of the carbon provided an overview of the impact of nitrogen on carbon flux within the cells. The results showed that the carbon flux through glycolysis and TCA is impacted by both ammonia and valine addition. In both cases, the flux through succinate synthesis was almost suppressed and the synthesis of acetate was reduced by 25 to 30%. The main difference between the two nitrogen sources lied with the flux towards pyruvate synthesis which was increased by 25% in the case of valine and was not impacted by ammonia.

Table 4 Production yields of the main secondary metabolites and volatile compounds compared to carbon consumed at steady state and consecutive to nitrogen addition as ammonia or valine

mCmol/Cmol glucose	Steady state	Ammonia	Valine
CO ₂	290.72	300.00	300.00
Ethanol	605.40	613.04	601.62
Glycerol	55.40	57.74	60.56
Acetate	3.77	2.86	2.70
Pyruvate	2.00	2.02	2.50
Succinate	7.51	1.46	0.16
Isobutanol	1.01	0.40	17.60
Isoamyl alcohol	4.32	1.18	1.18
Propanol	0.20	0.62	0.77
Ethyl acetate	0.09	0.23	0.45
Ethyl decanoate	0.0044	0.0020	0.0016
Ethyl hexanoate	0.0012	0.0033	0.0036
Carbon balance	97%	98%	99%

Regarding the production of volatile compounds (Table 4), the main differences between the two nitrogen sources concerned isobutanol synthesis which is synthesized from 2-keto isovalerate, originated from valine or CCM. In the case of valine addition, the remarkable increase in isobutanol production (10-fold) was not observed for

ammonium pulse. This indicated that the carbon skeleton required for its synthesis was more likely to be issued from valine degradation than from glycolysis. Nevertheless, calculation of the carbon balance between isobutanol and valine indicates that isobutanol produced with valine addition only correspond to 70% of the carbon consumed as valine.

Ammonium and valine additions were also performed in batch fermentation. The evolution of the metabolites concentrations was compared to the control fermentation, without nitrogen supplementation (Figure 6). Except 4-fold increase in propanol production triggered by nitrogen pulses (valine and ammonium) and the large increase in isobutanol formation as a result of valine addition, the metabolites production during fermentations with nitrogen pulses showed little difference compared to the control fermentation. In particular, no changes were observed in the production of succinate, pyruvate and ethyl esters, contrary to MSCF experiments. This point illustrates the fact that batch fermentation is not accurate to study yeasts response to a punctual perturbation, due to a lack of equilibrium between yeast physiology and the composition of the medium (Stanbury *et al.*, 1999).

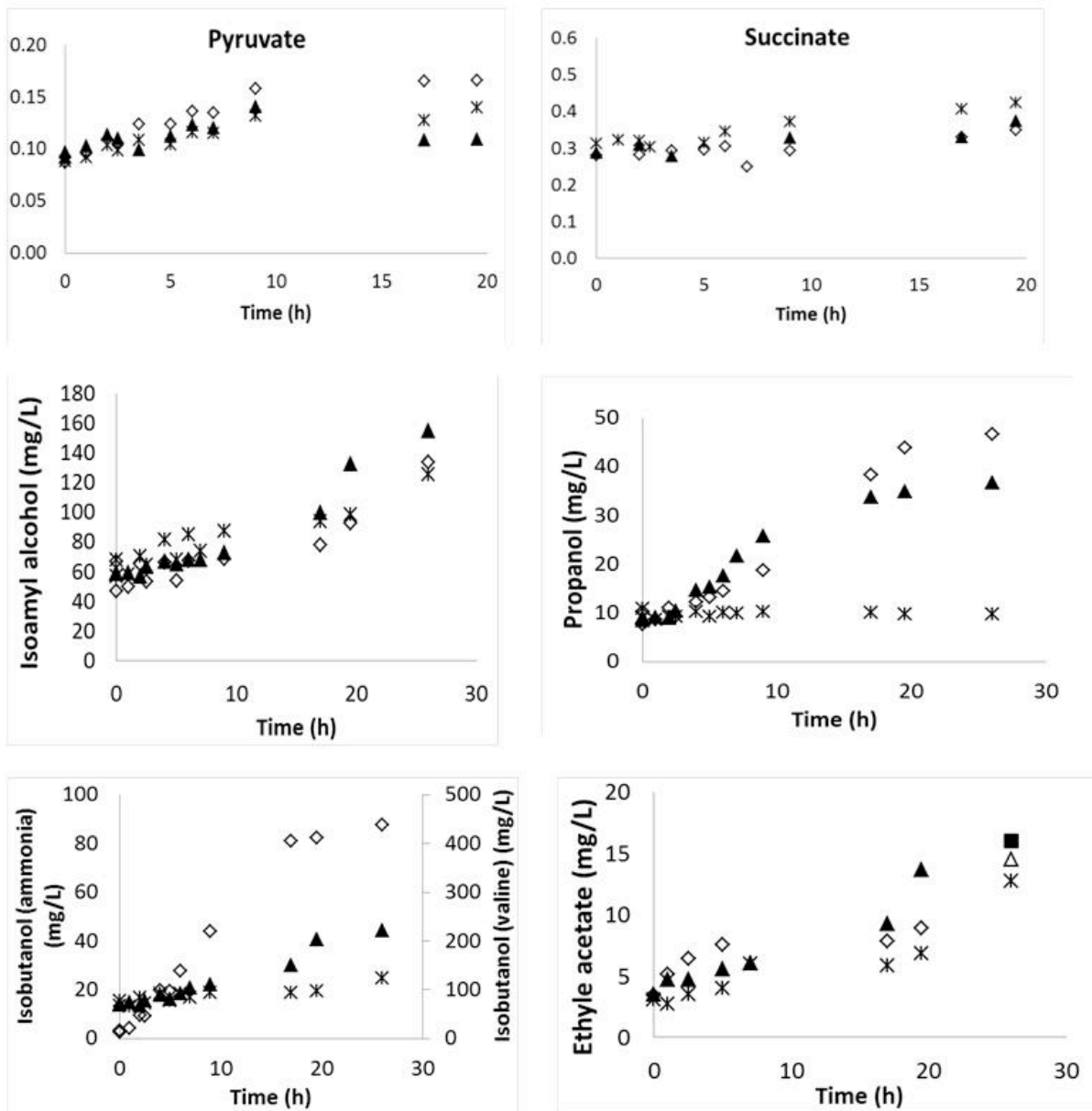


Figure 6 Evolution of propanol, isoamyl alcohol, isobutanol, ethyl acetate, (mg/L), pyruvate and succinate (g/L) after nitrogen addition in batch fermentation. Black triangle: ammonia; Blank diamond: valine; dashed line: control.

3 Discussion

Comprehensive analysis of the metabolic response of *S. cerevisiae* to nitrogen addition at the beginning of stationary phase of alcoholic fermentation was carried out using an original MSCF device. This system has been previously characterized as relevant to simulate the growth and the formation of the main fermentation products, including ethanol, CO₂, glycerol and organic acids, at different stages of industrial wine fermentation (Clement *et al.*, 2011). Focusing on the third stage of MSCF, where cells were in an equivalent physiologic state to that of the first hours of stationary phase of batch process, we showed that cells exhibited similar production of metabolites, in particular fusel alcohols and esters, volatiles compounds which derive, at least in part, from nitrogen metabolism, for batch and MSCF cultures. In addition, gene expression patterns displayed a very low variability between both fermentation modes. The only changes, associated with cytokinesis, cell wall organization (overexpression) and reserve carbohydrates synthesis (down-regulation), likely reflected slight differences in yeast growth. Thus, an extremely limited growth arose in the third stage of MSCF whereas in batch fermentation, no growth took place since nitrogen was exhausted (stationary phase). Furthermore, a higher reproducibility was found both in metabolic and transcriptomic data from MSCF compared to those of batch process. Together, these results ascertained that MSCF device combined the advantages of continuous cultures, regarding steady state and reproducibility (Hoskisson & Hobbs, 2005), and the ability to reproduce physiological state of stationary phase of wine fermentation. Consequently, MSCF is a suitable system to analyze the time-dependent metabolic response of yeast to environmental changes, independently of changes related to the transformation of medium by the fermentation process. This device was used to characterize the dynamic

of the metabolic response to nitrogen additions during the stationary phase of wine fermentation, which was, until now, poorly investigated. The few previous works, which focused exclusively on CCM metabolites formation (Schulze *et al.*, 1996) or on the production of esters (Miller *et al.*, 2007) did not provide access to the kinetics of metabolite synthesis consecutive to nitrogen addition separately from those of usual batch evolution, which can help to understand how cells adapt their metabolism to environmental modifications.

Nitrogen additions in the third stage of MSCF resulted in a substantial increase in the fermentation rate while biomass production was almost unaffected, consistent with previous observations during batch cultures (Albers *et al.*, 1996; Bely *et al.*, 2003). Torrea *et al.* (2011) reported that changes in the rate of production of CO₂ related to nitrogen addition to chardonnay must depend on the nitrogen availability but not on the nature (ammonium versus mixture of amino acids and ammonium) of the added source. Conversely, using a precise online monitoring of the CO₂ production rate, we observed that the impact of ammonium on fermentation performances, both during batch and MSCF cultures, was twice higher compared to that of valine, added at the same concentration. Comparison between the kinetics of valine and ammonium assimilation with the profiles of CO₂ production indicated that the higher effect of ammonium on the fermentation rate was related to a faster consumption of this compound compared with valine. Yeasts likely display a greater efficiency in assimilating ammonium, via the dicarboxylate permease Dip5p and the glutamate dehydrogenase Gdh1p (Boulton *et al.*, 1998; Magasanik and Kaiser, 2002), than in degrading valine through the branched amino acid permeases (Bap2p, Bap3p) and transaminases (Bat1p, Bat2p) (Dickinson *et al.*, 1998).

The MSCF cultures revealed an important re-routing of fluxes through the CCM and the metabolism of formation of volatile compounds, induced in response to valine or ammonium pulses. The most important modification was the specific increase in isobutanol and isobutyl acetate production as a consequence of valine pulse. This reflected the massive conversion of valine through the Ehrlich pathway, described as the main metabolic route for the catabolism of this amino acid (Hazelwood *et al.*, 2008). The first step of this pathway consists in a transamination resulting in the formation of glutamate, further used for amino acids biosynthesis, and of 2-keto-isovalerate, which is the precursor keto-acid of isobutanol. Consistent with that, the yield of isobutanol on valine consumed was 0.7 Cmol isobutanol/Cmol valine while the residual valine fraction (30% of assimilated valine) was likely used for protein synthesis. In the same way, the formation of pyruvate was specifically increased as a consequence of valine pulse. This compound is a central compound, intermediate of both glucose catabolism and TCA pathways. It also contributes to nitrogen metabolism, as a precursor for the synthesis of alanine and other branched chain amino acids (leucine, isoleucine) (Dickinson *et al.*, 1998; Torrea *et al.*, 2011a). The higher excretion of pyruvate after addition of valine can be explained by a reduced requirement in pyruvate for the synthesis of branched chain amino acids.

In addition to this specific response, a common response to nitrogen pulse (valine or ammonium) took place, which appeared as mainly driven by an activation of the synthesis of amino acids as a consequence of the increase in nitrogen availability. In line with this, adding nitrogen in MSCF resulted in an increase of the production of glycerol. This compound is known as to be produced to regenerate the excess of NADH released during the anabolism of amino acids (Ansell *et al.*, 1997). In addition, the formation of

propanol, which was reported as directly associated with nitrogen-containing compounds assimilation (González-Marco *et al.*, 2010; Moreira *et al.*, 2011) was considerably increased in the third stage of MSCF as a consequence of valine or ammonium pulse. Propanol is a product of the degradation of threonine through a transamination step followed by the spontaneous decarboxylation of the 2-oxobutanoate, and further reduction of propanal (Van Der Sluis *et al.*, 2002). An excess of threonine synthesis under nitrogen supplementation may be responsible for the increase in propanol production.

Other important metabolic change was the drastic decrease in the production of succinate, which was almost abolished during the nitrogen consumption phase, as well as in the formation of fusel alcohols, except isobutanol with valine pulse. Interestingly, the excretion of these metabolites was restored immediately after nitrogen exhaustion. This was likely in line with a preferential use of α -ketoacids deriving from CCM towards the formation of amino acids to fulfill requirements for protein synthesis (Schulze *et al.*, 1996) at the expense of production of succinate and higher alcohols, as isoamyl alcohol and isobutanol. Consistent with that, the expression of *LEU1*, *LEU2*, *BAT1* and *BAT2*, which are genes involved in amino acids biosynthesis, was activated when ammonium was added to nitrogen-depleted medium (Yoshimoto *et al.*, 2002). A decrease in succinate formation consecutive to nitrogen addition has been observed during wine batch fermentations in previous studies (Beltran *et al.*, 2005; Torrea *et al.*, 2011), but to a much lesser extent than in MSCF. Conversely, recent work reported a higher synthesis of isoamyl alcohol or 2-phenyl-ethanol when a mixture of amino acids was added during batch fermentation (Torrea *et al.*, 2011). This is likely due to the increase of intracellular availability of keto-acids deriving from leucine and phenylalanine (present in the added

amino acid mixture) assimilation and precursors of isoamyl alcohol and 2-phenylethanol. During the growth phase of wine fermentation, succinate was mainly produced through the TCA reductive branch (Camarasa *et al.*, 2003). The hypothesis of the decrease in succinate production during the stationary phase resulting to a redirection of carbon flux towards glutamate formation was in agreement with a synthesis of succinate via the TCA oxidative branch. This suggests that succinate may be produced through different metabolic routes, depending on the stage of fermentation.

It has been reported that acetate esters synthesis is mainly relying on the activity of two alcohol acetyltransferases *ATF1* and *ATF2* (Lilly *et al.*, 2000; Verstrepen *et al.*, 2003), which was dependent on the environmental conditions. In particular, *ATF1* expression is controlled by ethanol and heat stress, addition of glucose and nitrogen compounds (Saerens *et al.*, 2010). Changes in formation of acetate esters following ammonium or valine pulses differed according to the ester, and were more likely related to the availability of precursors rather than to modulation in the activity of enzymes. Likewise, the ethyl acetate production rate increased rapidly after nitrogen addition probably due to the increase in acetate and ethanol synthesis, since it has been reported that the intracellular precursor concentration was the main limiting factor of ethyl esters production (Saerens *et al.*, 2006). Surprisingly, we found that the production of ethyl decanoate decreased, contrary to other ethyl esters (acetate, hexanoate). This may be due to intracellular accumulation of short chain ethyl esters, possibly as UFA (unsaturated fatty acids) analogues for the membrane synthesis, as suggested by Saerens *et al.*, 2010 and Mason and Dufour (2000).

Using an original experimental set-up, this study provided new insights on the yeast cell metabolic response directly triggered by nitrogen pulse during the stationary phase of wine fermentation. In particular, the key role of the re-synthesis of amino acids in the

metabolic re-routing, independently of the added nitrogen source was highlighted. In addition to this common response, specific modifications may be induced depending on the nature of the added nitrogen source. These data underline the difficulty to modulate the production of volatile compounds, which is a current challenge for winemakers. Above all, the design of strategies to favor the formation of volatile compounds by nitrogen addition can only be conceived by integrating, at least, the definition of a target aroma compound, the knowledge of the composition of grape juice, the nature of the nitrogen source added, and the time of supplementation.

Acknowledgments

This work was supported by the European Community Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement CAFE n° KBBE-212754 (<http://www.cafe-project.org>), the INRA Sys-Arômes program and by the BIOFLAVOUR Cost Action FA0907. We would like to thank Isabelle Sanchez for microarray analysis, Pierre Delobel and Christian Brion for assistance with microarray experiments.

References

- Agenbach, W.A., 1977. A study of must nitrogen content in relation to incomplete fermentations, yeast production and fermentation activity. Presented at the Proc. S. Afr. Soc. Enol. Vitic, Beuckman, E.F, Cape Town, South Africa, pp. 66–88.
- 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.
- Alexandre, H., Charpentier, C., 1998. Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 20, 20–27.
- Ansell, R., Granath, K., Hohmann, S., Thevelein, J.M., Adler, L., 1997. The two isoenzymes for yeast NAD⁺-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by *GPD1* and *GPD2* have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. EMBO J. 16, 2179–2187.
- Barbosa, C., Falco, V., Mendes-Faia, A., Mendes-Ferreira, A., 2009. Nitrogen addition influences formation of aroma compounds, volatile acidity and ethanol in nitrogen deficient media fermented by *Saccharomyces cerevisiae* wine strains. Journal of Bioscience and Bioengineering 108, 99–104.
- Bell, S.-J., Henschke, P.A., 2005. Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. Australian Journal of Grape and Wine Research 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.
- Bely, M., Rinaldi, A., Dubourdieu, D., 2003. Influence of assimilable nitrogen on volatile acidity production by *Saccharomyces cerevisiae* during high sugar fermentation. Journal of Bioscience and Bioengineering 96, 507–512.
- Bely, M., Sablayrolles, J.M., Barre, P., 1990a. Description of Alcoholic Fermentation Kinetics: Its Variability and Significance. Am. J. Enol. Vitic. 41, 319–324.
- Bely, M., Sablayrolles, J.-M., Barre, P., 1990b. Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions. Journal of Fermentation and Bioengineering 70, 246–252.
- Benjamini, Y., 2001. The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. Ann. Statist. 29, 1165–1188.
- 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. Journal of Bioscience and Bioengineering 91, 184–189.
- Bull, A.T., 2010. The renaissance of continuous culture in the post-genomics age. Journal of industrial microbiology biotechnology 37, 993–1021.
- Camarasa, C., Grivet, J.-P., Dequin, S., 2003. Investigation by ¹³C-NMR and tricarboxylic acid (TCA) deletion mutant analysis of pathways for succinate formation in *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic fermentation. Microbiology (Reading, Engl.) 149, 2669–2678.
- 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.
- Clement, T., Perez, M., Mouret, J.R., Sablayrolles, J.M., Camarasa, C., 2011. Use of a continuous multistage bioreactor to mimic winemaking fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 150, 42–49.
- Colman-Lerner, A., Chin, T.E., Brent, R., 2001. Yeast Cbk1 and Mob2 activate daughter-specific genetic programs to induce asymmetric cell fates. *Cell* 107, 739–750.
- Dickinson, J.R., Harrison, S.J., Hewlins, M.J.E., 1998. An Investigation of the Metabolism of Valine to Isobutyl Alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 273, 25751–25756.
- Draper, E., Dubrovskiy, O., Bar, E.E., Stone, D.E., 2009. Dse1 may control cross talk between the pheromone and filamentation pathways in yeast. *Curr. Genet.* 55, 611–621.
- François, J., Parrou, J.L., 2001. Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 125–145.
- González-Marco, A., Jiménez-Moreno, N., Ancín-Azpilicueta, C., 2010. Influence of Nutrients Addition to Non limited-in-Nitrogen Must on Wine Volatile Composition. *Journal of Food Science* 75, S206–S211.
- 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.
- Hernandez-orte, P., Bely, M., Cacho, J., Ferreira, V., 2006. Impact of ammonium additions on volatile acidity, ethanol, and aromatic compound production by different *Saccharomyces cerevisiae* strains during fermentation in controlled synthetic media. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 12, 150–160.
- Hoskisson, P.A., Hobbs, G., 2005. Continuous culture - making a comeback? *Microbiology* 151, 3153–3159.
- Ihaka, R., Gentleman, R., 1996. R: A Language for Data Analysis and Graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics* 5, 299–314.
- Jiménez-Martí, E., Aranda, A., Mendes-Ferreira, A., Mendes-Faia, A., del Olmo, M.L., 2007. The nature of the nitrogen source added to nitrogen depleted vinifications conducted by a *Saccharomyces cerevisiae* strain in synthetic must affects gene expression and the levels of several volatile compounds. *Antonie Van Leeuwenhoek* 92, 61–75.
- 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.
- Kresnowati, M.T.A.P., Suarez-Mendez, C.M., van Winden, W.A., van Gulik, W.M., Heijnen, J.J., 2008. Quantitative physiological study of the fast dynamics in the intracellular pH of *Saccharomyces cerevisiae* in response to glucose and ethanol pulses. *Metab. Eng.* 10, 39–54.
- Kresnowati, M.T.A.P., van Winden, W.A., Almering, M.J.H., ten Pierick, A., Ras, C., Knijnenburg, T.A., Daran-Lapujade, P., Pronk, J.T., Heijnen, J.J., Daran, J.M., 2006. When transcriptome meets metabolome: fast cellular responses of yeast to sudden relief of glucose limitation. *Molecular Systems Biology* 2.
- Lara, A.R., Taymaz-Nikerel, H., Mashego, M.R., van Gulik, W.M., Heijnen, J.J., Ramírez, O.T., van Winden, W.A., 2009a. Fast dynamic response of the fermentative metabolism of *Escherichia coli* to aerobic and anaerobic glucose pulses. *Biotechnol. Bioeng.* 104, 1153–1161.

- 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.
- Mashego, M., Rumbold, K., De Mey, M., Vandamme, E., Soetaert, W., Heijnen, J., 2007. Microbial metabolomics: past, present and future methodologies. *Biotechnology Letters* 29, 1–16.
- Mason, A.B., Dufour, J.P., 2000. Alcohol acetyltransferases and the significance of ester synthesis in yeast. *Yeast* 16, 1287–1298.
- Miller, A.C., Wolff, S.R., Bisson, L.F., Ebeler, S.E., 2007. Yeast Strain and Nitrogen Supplementation: Dynamics of Volatile Ester Production in Chardonnay Juice Fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 58, 470–483.
- Monteiro, F.F., Bisson, L.F., 1991. Amino Acid Utilization and Urea Formation During Vinification Fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 42, 199–208.
- Moreira, N., de Pinho, P.G., Santos, C., Vasconcelos, I., 2011. Relationship between nitrogen content in grapes and volatiles, namely heavy sulphur compounds, in wines. *Food Chemistry* 126, 1599–1607.
- Ough, C.S., Crowell, E.A., Mooney, L.A., 1988. Formation of Ethyl Carbamate Precursors During Grape Juice (Chardonnay) Fermentation. I. Addition of Amino Acids, Urea, and Ammonia: Effects of Fortification on Intracellular and Extracellular Precursors. *Am. J. Enol. Vitic.* 39, 243–249.
- Ough, C.S., Huang, Z., An, D., Stevens, D., 1991. Amino Acid Uptake by Four Commercial Yeasts at Two Different Temperatures of Growth and Fermentation: Effects on Urea Excretion and Reabsorption. *Am. J. Enol. Vitic.* 42, 26–40.
- Robinson, M.D., Grigull, J., Mohammad, N., Hughes, T.R., 2002. FunSpec: a web-based cluster interpreter for yeast. *BMC Bioinformatics* 3, 35.
- Rossignol, T., Dulau, L., Julien, A., Blondin, B., 2003. Genome-wide monitoring of wine yeast gene expression during alcoholic fermentation. *Yeast* 20, 1369–1385.
- 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.
- Schmitz, M., Hirsch, E., Bongaerts, J., Takors, R., 2002. Pulse Experiments as a Prerequisite for the Quantification of in Vivo Enzyme Kinetics in Aromatic Amino Acid Pathway of *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress* 18, 935–941.
- Schulze, U., Lidén, G., Villadsen, J., 1996. Dynamics of ammonia uptake in nitrogen limited anaerobic cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.* 46, 33–42.
- Smyth, G.K., 2004. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 3, Article3.
- Smyth, G.K., Michaud, J., Scott, H.S., 2005. Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinformatics* 21, 2067–2075.
- Smyth, G.K., Speed, T., 2003. Normalization of cDNA microarray data. *Methods* 31, 265–273.
- Sonnleitner, B., 1998. Dynamic adaptation of microbes. *J. Biotechnol.* 65, 47–60.
- Stanbury, P.F., Whitaker, A., Hall, S.J., 1999. *Principles of Fermentation Technology*. Butterworth-Heinemann.
- Taillandier, P., Ramon Portugal, F., Fuster, A., Strehaiano, P., 2007. Effect of ammonium concentration on alcoholic fermentation kinetics by wine yeasts for high sugar content. *Food Microbiology* 24, 95–100.

- Taymaz-Nikerel, H., van Gulik, W.M., Heijnen, J.J., 2011. *Escherichia coli* responds with a rapid and large change in growth rate upon a shift from glucose-limited to glucose-excess conditions. *Metab. Eng.* 13, 307–318.
- Theobald, U., Mailinger, W., Baltus, M., Rizzi, M., Reuss, M., 1997. In vivo analysis of metabolic dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*: I. Experimental observations. *Biotechnol. Bioeng.* 55, 305–316.
- 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 Chemistry* 127, 1072–1083.
- Ugliano, M., Henschke, P.A., Herderich, M.J., Pretorius, I.S., 2007. Nitrogen management is critical for wine flavour and style. *Wine Industry Journal*.
- Ugliano, M., Travis, B., Francis, I.L., Henschke, P.A., 2010. Volatile Composition and Sensory Properties of Shiraz Wines As Affected by Nitrogen Supplementation and Yeast Species: Rationalizing Nitrogen Modulation of Wine Aroma. *J. Agric. Food Chem.* 58, 12417–12425.
- Van Der Sluis, C., Rahardjo, Y.S.P., Smit, B.A., Kroon, P.J., Hartmans, S., Ter Schure, E.G., Tramper, J., Wijffels, R., 2002. Concomitant extracellular accumulation of alpha-keto acids and higher alcohols by *Zygosaccharomyces rouxii*. *J. Biosci. Bioeng.* 93, 117–124.
- Verstrepen, K.J., Van Laere, S.D.M., Vanderhaegen, B.M.P., Derdelinckx, G., Dufour, J.-P., Pretorius, I.S., Winderickx, J., Thevelein, J.M., Delvaux, F.R., 2003. Expression Levels of the Yeast Alcohol Acetyltransferase Genes ATF1, Lg-ATF1, and ATF2 Control the Formation of a Broad Range of Volatile Esters. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5228–5237.
- 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.
- 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. *Journal of Applied Microbiology* 94, 349–359.

Supplementary material

Données transcriptomiques : analyse des données des micropuces pour la condition batch en début de phase stationnaire versus MSCF (troisième étage).

ORF	Functional name	logFC	FC	adj.P.Val
YHL021C	AIM17	-1.59	-3.0	9.4E-11
YIL158W	AIM20	-1.51	-2.9	6.8E-06
YPL158C	AIM44	-1.77	-3.4	2.8E-15
YGL021W	ALK1	-1.94	-3.8	2.1E-08
YKL185W	ASH1	-1.31	-2.5	1.2E-11
YAL060W	BDH1	-1.71	-3.3	2.2E-11
YJR092W	BUD4	-1.37	-2.6	8.1E-09
YPL111W	CAR1	-1.78	-3.4	2.1E-12
YBR038W	CHS2	-1.39	-2.6	2.0E-13
YJL158C	CIS3	-2.89	-7.4	9.4E-05
YGR108W	CLB1	-1.54	-2.9	1.9E-12
YPR119W	CLB2	-1.83	-3.6	3.4E-14
YGR189C	CRH1	-1.50	-2.8	3.9E-11
YLR286C	CTS1	-1.74	-3.3	1.3E-13
YKL096W	CWP1	-2.65	-6.3	8.3E-17
YJR150C	DAN1	-3.03	-8.1	7.9E-09
YER124C	DSE1	-2.24	-4.7	6.0E-16
YHR143W	DSE2	-2.69	-6.5	1.2E-13
YNR067C	DSE4	-3.74	-13.3	2.2E-23
EC1118_1N26_0012g	EC1118_1N26_0012g	-1.91	-3.8	1.1E-10
YNL327W	EGT2	-3.06	-8.3	2.4E-06
ORF	Functional name	logFC	FC	adj.P.Val
YHR104W	GRE3	-1.69	-3.2	2.7E-12
YCL035C	GRX1	-1.46	-2.7	1.4E-11
YFR015C	GSY1	-1.79	-3.4	2.2E-12
YOR237W	HES1	-1.60	-3.0	3.7E-05
YMR032W	HOF1	-1.78	-3.4	3.7E-16
YOL155C	HPF1	-2.99	-7.9	7.5E-16
YFR053C	HXK1	-1.47	-2.8	3.7E-05
YNR050C	LYS9	-1.27	-2.4	2.4E-07
YNL289W	PCL1	-1.77	-3.4	8.2E-10
YDL179W	PCL9	-1.45	-2.7	2.4E-11
YMR105C	PGM2	-1.34	-2.5	1.9E-07
YKL164C	PIR1	-2.07	-4.2	9.6E-14
YGL037C	PNC1	-1.28	-2.4	1.7E-10
YDR032C	PST2	-1.22	-2.3	1.8E-07
YHR087W	RTC3	-2.24	-4.7	5.3E-10
YGL028C	SCW11	-1.51	-2.8	8.5E-12
YIL123W	SIM1	-1.42	-2.7	1.5E-05
YGR248W	SOL4	-1.31	-2.5	7.9E-08
YGR008C	STF2	-2.15	-4.4	1.8E-05
YNL066W	SUN04	-1.61	-3.1	6.6E-09
YDR146C	SWI5	-1.41	-2.7	7.4E-06
YGR144W	THI4	-3.03	-8.1	1.1E-11

YER011W	TIR1	-1.78	-3.4	1.7E-05
YIL011W	TIR3	-3.48	-11.2	4.9E-11
YOR009W	TIR4	-2.13	-4.4	1.3E-09
YLR327C	TMA10	-1.94	-3.8	1.9E-06
YBR162C	TOS1	-2.37	-5.2	6.2E-11
YBR126C	TPS1	-1.29	-2.4	3.4E-06
YDR453C	TSA2	-1.24	-2.4	1.5E-07
YDR100W	TVP15	-1.39	-2.6	3.0E-07
YBR285W	YBR285W	-1.30	-2.5	9.9E-09
YER053C-A	YER053C-A	-1.45	-2.7	4.8E-05
YER067W	YER067W	-3.05	-8.3	2.3E-12
YIL169C	YIL169C	-2.49	-5.6	1.2E-12
YJL213W	YJL213W	-1.42	-2.7	1.1E-02
YKL091C	YKL091C	-1.75	-3.4	8.3E-06
YMR122W-A	YMR122W-A	-1.94	-3.8	1.2E-12
YNL058C	YNL058C	-1.31	-2.5	1.2E-13
YOR248W	YOR248W	-1.57	-3.0	3.5E-11
YPL272C	YPL272C	-1.24	-2.4	1.1E-08

ORF	Functional name	logFC	FC	adj.P.Val
YNL112W	DBP2	3.35	10.2	2.2E-16
YDL039C	PRM7	2.47	5.6	2.4E-10
YDL039C	PRM7	2.46	5.5	1.1E-08
YML056C	IMD4	1.88	3.7	1.3E-04
YNL141W	AAH1	1.87	3.6	1.9E-12
YNR053C	NOG2	1.85	3.6	1.1E-10
YGR159C	NSR1	1.83	3.5	1.4E-08
YPL093W	NOG1	1.80	3.5	1.5E-10
YMR290C	HAS1	1.71	3.3	1.1E-10
YOR338W	YOR338W	1.67	3.2	4.9E-10
YAL025C	MAK16	1.66	3.2	2.4E-11
YPL226W	NEW1	1.65	3.1	3.3E-07
YBR034C	HMT1	1.65	3.1	2.4E-09
YEL046C	GLY1	1.64	3.1	2.6E-14
YHR066W	SSF1	1.62	3.1	2.1E-12
YLR401C	DUS3	1.59	3.0	1.2E-10
YML043C	RRN11	1.56	2.9	2.5E-10
YCR072C	RSA4	1.55	2.9	7.8E-10
YMR049C	ERB1	1.54	2.9	1.1E-13
YBL039C	URA7	1.53	2.9	3.0E-05
YDR101C	ARX1	1.51	2.9	5.3E-13
YBL043W	ECM13	1.51	2.8	1.0E-06
YNL062C	GCD10	1.50	2.8	1.9E-08
YOL124C	TRM11	1.50	2.8	2.3E-06
YPL026C	SKS1	1.48	2.8	5.5E-09
YER052C	HOM3	1.48	2.8	1.6E-07
YOR107W	RGS2	1.47	2.8	1.2E-08
YBR141C	YBR141C	1.46	2.8	2.0E-13
YIL118W	RHO3	1.46	2.7	1.7E-14
YOR360C	PDE2	1.46	2.7	3.7E-07
YDL014W	NOP1	1.46	2.7	5.8E-13
YER126C	NSA2	1.42	2.7	2.6E-07
YOR272W	YTM1	1.42	2.7	1.1E-08
YMR131C	RRB1	1.41	2.7	1.1E-07
YGL120C	PRP43	1.41	2.7	7.0E-15
YHR065C	RRP3	1.41	2.7	4.7E-04
YDL229W	SSB1	1.40	2.6	3.3E-08
YDR449C	UTP6	1.39	2.6	1.7E-05
YOL136C	PFK27	1.37	2.6	5.2E-03
YOR310C	NOP58	1.37	2.6	8.8E-08
YGL078C	DBP3	1.36	2.6	8.0E-14
YHR092C	HXT4	1.36	2.6	2.4E-09
YPR112C	MRD1	1.36	2.6	3.1E-08
YDR496C	PUF6	1.34	2.5	9.1E-11
YBL093C	ROX3	1.33	2.5	3.0E-09
YLR222C	UTP13	1.32	2.5	1.2E-10
YER062C	HOR2	1.31	2.5	2.3E-04
YCL025C	AGP1	1.31	2.5	1.5E-02
YPR144C	NOC4	1.30	2.5	9.1E-11
YPL012W	RRP12	1.30	2.5	2.2E-11
YHR170W	NMD3	1.30	2.5	6.9E-09

ORF	Functional name	logFC	FC	adj.P.Val
YLR063W	YLR063W	1.30	2.5	3.6E-06
YOL041C	NOP12	1.29	2.4	6.0E-08
YDR398W	UTP5	1.29	2.4	2.4E-13
YMR217W	GUA1	1.27	2.4	2.2E-11
YDR035W	ARO3	1.27	2.4	3.4E-05
YLL008W	DRS1	1.27	2.4	7.1E-06
YLR407W	YLR407W	1.27	2.4	5.5E-05
YGR055W	MUP1	1.25	2.4	1.3E-09
YMR244W	YMR244W	1.25	2.4	3.4E-09
YNL248C	RPA49	1.25	2.4	2.3E-07
YOR359W	VTS1	1.25	2.4	2.0E-05
YGR152C	RSR1	1.24	2.4	1.6E-07
YGR123C	PPT1	1.24	2.4	4.7E-08
YNL209W	SSB2	1.24	2.4	1.0E-04
YOR095C	RKI1	1.24	2.4	5.4E-04
YCL054W	SPB1	1.24	2.4	1.9E-04
YDR184C	ATC1	1.23	2.3	1.9E-09
YGR079W	YGR079W	1.23	2.3	1.4E-04
YBL042C	FUI1	1.22	2.3	8.5E-11
YOL010W	RCL1	1.22	2.3	1.3E-07
YLR409C	UTP21	1.22	2.3	3.9E-07
YPR137W	RRP9	1.22	2.3	1.6E-10
YNL175C	NOP13	1.21	2.3	3.4E-10
YHL033C	RPL8A	1.21	2.3	5.6E-06
YNL110C	NOP15	1.21	2.3	1.2E-10
YOR206W	NOC2	1.21	2.3	1.9E-07
YPL146C	NOP53	1.21	2.3	6.2E-05
YNR018W	AIM38	1.21	2.3	4.1E-09
YKL009W	MRT4	1.21	2.3	1.6E-05
YNL002C	RLP7	1.21	2.3	1.9E-04
YDR324C	UTP4	1.20	2.3	1.3E-05

Chapitre III

Intérêt du fermenteur continu multi-étagé
pour l'étude de l'adaptation métabolique
des levures à un ajout d'azote en cours de
fermentation alcoolique

CHAPITRE III

INTÉRÊT DU FERMENTEUR CONTINU MULTI-ETAGÉ POUR L'ÉTUDE DE L'ADAPTATION MÉTABOLIQUE DES LEVURES A UN AJOUT D'AZOTE EN COURS LA FERMENTATION ALCOOLIQUE

Dans les chapitres précédents, nous avons montré la possibilité de reproduire, au sein du fermenteur continu multi-étagé (MSCF), les conditions de la fermentation œnologique aussi bien au niveau macroscopique (vitesse de fermentation, biomasse et synthèse de métabolites) qu'au niveau transcriptomique. Nous avons ensuite utilisé ce dispositif expérimental original pour étudier la réponse des levures à une perturbation du milieu, réalisée sous forme de pulse d'azote (ammoniacal ou aminé).

Ce dernier chapitre concerne toujours l'effet d'un ajout d'azote mais réalisé sous forme de perfusion continue dans le troisième étage du MSCF et conduisant à un nouvel état d'équilibre. L'adaptation métabolique correspondante des levures est discutée en intégrant des données issues à la fois du transcriptome et de l'analyse des métabolites intra et exocellulaires.

Les résultats sont discutés en fonction de l'impact des modifications métaboliques, plus particulièrement celles relatives à la synthèse des composés volatils (alcools supérieurs et esters).

**INTEREST OF A MULTISTAGE BIOREACTOR TO STUDY THE METABOLIC
ADAPTATION TO NITROGEN SUPPLEMENTATION DURING ALCOHOLIC
FERMENTATION**

Clement T*, Perez M., Isabelle Sanchez, Sablayrolles J.M. and Camarasa C.

INRA, UMR Sciences pour l'œnologie, 2 Place Viala, 34060 Montpellier cedex 1, France.

* : To whom correspondence should be addressed

E-mail : clementt@supagro.inra.fr . Tel: (33) 4 99 61 25 00. Fax : (33) 4 99 61 28 57.

ABSTRACT

Nitrogen supplementation to the must during wine alcoholic fermentation impacts the fermentation kinetics, the biomass growth, and the metabolites synthesis. Some of these metabolites are likely to impact the aromatic quality of wine, in particular, higher alcohols and esters.

We recently developed a multi-stage continuous bioreactor (MSCF) that permits reproducing both growth and stationary phases of alcoholic fermentation at steady state. This tool is of particular interest to study the yeast response to a perturbation of the medium, independently from the modifications due to the fermentation process.

We performed nitrogen supplementation at steady state with two different nitrogen sources: mineral ammonium and valine. We then analyzed the yeast response to nitrogen supplementation on gene expression, metabolite production, biomass growth and fermentation kinetics. This original approach provided new interesting insight on the impact of nitrogen supplementation on yeasts cell metabolism in winemaking conditions, regarding amino acid and protein synthesis, the carbon central metabolism and the volatile compounds synthesis.

2 Introduction

The nitrogen composition of grape must plays a key role in winemaking fermentation affecting both fermentation kinetics and the chemical composition of the resulting wine. The wine must contains a wide variety of potential nitrogen sources such as ammonium salts, urea, γ -amino butyric acid (GABA), proteins and peptides, but the main sources of yeast assimilable nitrogen (YAN) are free ammonium and amino acids (Cooper 1982). The nitrogen compounds enter the cells via general or specific permeases and are then (i) either directly used for protein synthesis, or (ii) catabolized via transamination to give glutamate or via deamination into ammonium and ketoacids (Cooper 1982, Magasanik 1992, Magasanik & Kaiser 2002). The latter degradation pathway is known as the Ehrlich pathway and concerns mainly the branched chain amino acids (leucine, isoleucine, valine), and the aromatic amino acids (phenylalanine, tyrosine and tryptophane), but also methionine and threonine (Hazelwood *et al.* 2008). The final product of the Ehrlich pathway is a fusel alcohol, which can be esterified to an acetate ester.

Nitrogen deficiency is one of the main causes for slow fermentations (Sablayrolles, 2009). To prevent nitrogen linked fermentation problems, grape musts are often supplemented with ammonium, which is mostly added as diammonium phosphate (DAP). This practice is known to increase the fermentation rate and, depending on the quantity added, increase or decrease H₂S formation (Ugliano *et al.* 2010). In addition, nitrogen supplementation impacts the synthesis of fusel alcohols and esters in a way depending on the fermentation conditions (e.g. temperature, yeast strain, must composition), the nature of the nitrogen source added and the timing of addition (Beltran *et al.* 2005, Carrau *et al.* 2003, Hernandez Orte *et al.* 2006, Vilanova *et al.* 2007). This complexity makes it very challenging to draw general conclusions in how nitrogen

supplementation of grape must impacts on metabolites in the resulting wine. In particular, the mechanisms underlying the effect of nitrogen addition on the synthesis of esters are still unclear (Saerens *et al.* 2010).

Nitrogen metabolism is governed by several regulating mechanisms, which depend on the nature of the nitrogen sources present in the must and act at the transcriptional level as well as on the activity and degradation of enzymes and transporters. Some of these mechanisms of regulation affect the metabolism of specific amino acids e.g. only branched chain amino acids (Kohlhaw *et al.* 2003) or only arginine (Dubois *et al.* 1978), while the general control mechanism of the amino acid biosynthesis (GAAC) acts on several amino acid biosynthetic pathways simultaneously (Jones et Fink 1982). Furthermore, the nitrogen catabolite repression (NCR) controls the use of different nitrogen sources according to the energy needed by yeast to metabolize them (Cooper 2002, Magasanik 2002). Indeed, this complex regulating system prevents the uptake of non-preferred nitrogen sources (e.g. urea, GABA, proline, methionine) by repressing their assimilation pathways as long as good nitrogen sources (e.g. glutamate, ammonium, asparagine) are present in the must. Once the preferred nitrogen source is depleted, a general derepression of genes associated with the catabolism of poor nitrogen sources is triggered.

When amino acids are present in the must, the NCR is complemented by the amino acid sensing system SPS (composed of three proteins Ssy1, Ptr3 and Ssy5) through which the cells respond to the availability of amino acids by inducing the expression of genes required for uptake and assimilation of the corresponding amino acids (Forsberg *et al.* 2001).

Chemostat cultures have been widely used to study the underlying mechanisms of regulation of nitrogen assimilation in yeasts as well as to elucidate the regulation involved in nitrogen starvation (Wu *et al.* 2002, Boer *et al.* 2006, Dikicioglu *et al.* 2011). Nevertheless, the few studies that aimed to identify the regulation mechanisms triggered by nitrogen supply in *Saccharomyces cerevisiae* were carried out in batch fermentation (Marks *et al.* 2002, Jiménez-Martí *et al.* 2008, Mendes-Ferreira *et al.* 2007). The main advantages of conducting fermentations in chemostats compared to batch are the highly increased ability to control growth conditions, which generally leads to a higher reproducibility resulting in an increased reliability of the data generated (Piper *et al.* 2002, Hoskinsson & Hobbs 2005, Wu *et al.* 2004). However, the culture conditions in chemostats do not reflect the conditions encountered by microorganisms during winemaking fermentation. In such conditions, yeasts pass through successive growth phases and are exposed to a range of stresses like high osmolarity, low pH, rapid nitrogen depletion and accumulation of ethanol. To survive these rapidly changing environmental conditions, yeasts have to adjust their gene expression and metabolism (Rossignol *et al.* 2003). In particular, the entry into stationary phase after nitrogen exhaustion triggers a major transcriptional reprogramming in yeast.

We developed a multi-stage continuous fermentation device (MSCF), which permits decomposing the fermentation process in four steady states mimicking successive moments of alcoholic fermentation during the growth phase and the stationary phase. This original tool permitted to perform continuous fermentations under conditions simulating batch fermentations, in terms of must composition and yeast physiology (Clement *et al.*, 2011). In the present work we employed the MSCF to study the impact of nitrogen addition at the beginning of the stationary phase. To better understand how the yeasts re-organise their metabolism in response to nitrogen addition, we related

transcriptomic data to intra- and extra-cellular secondary metabolites such as organic acids, higher alcohols and esters.

3 Materials and methods

3.1 Strain and fermentation medium

Fermentations were carried out with the commercial strain of *Saccharomyces cerevisiae* EC1118 (Lallemand SA), using the synthetic medium SM100 as described by Bely (1990), which mimics a grape must containing 100 mg/L of assimilable nitrogen

The inoculum was grown aerobically in shaken flasks at 28°C, first in YPD medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose) for 24 h, and then in synthetic medium. After 24h at 28°C, this second pre-culture was used to inoculate the bioreactor at a density of 10^6 cells/mL.

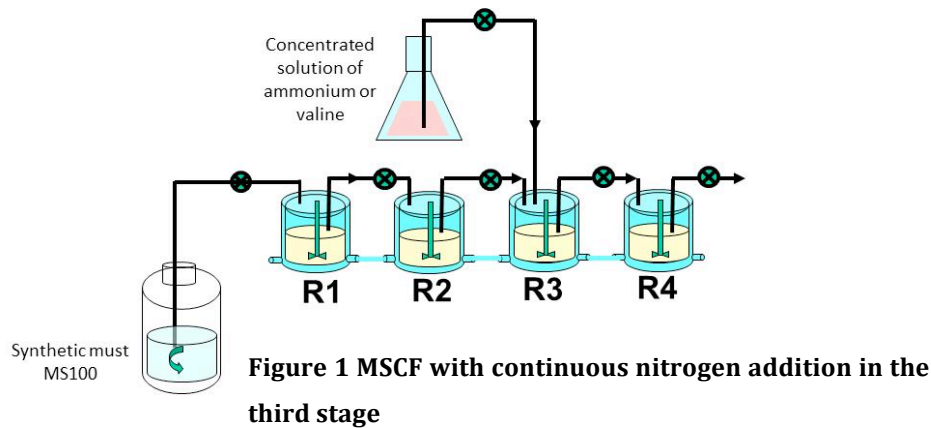
3.2 Multi-stage continuous fermentors (MSCF)

The four-stage fermentation device was configured and operated as described previously (Clement *et al.* 2011). The parameters of the MSCF were set to ensure a progressive exhaustion of the nitrogen in the first two stages and thus a complete absence of any residual YAN in the third stage of the fermentor. The settings chosen led to a residual glucose concentration of 186, 178, 164 and 151 g/L respectively in R1, R2, R3 and R4.

Once the steady state was established, the third stage of the MSCF, corresponding to the beginning of the stationary phase, was sampled for RNA extraction and metabolites measurement, as the control samples (control condition without nitrogen added, ES0). Four independent samples were harvested at 24h interval.

Then, in the same stage, nitrogen was provided as a continuous flow of a concentrated solution of valine (36 g/L) or ammonium (16.4 g/L) (figure 1), resulting in a supply of 100 mg/L additional nitrogen. The flow rate of additional nitrogen was set to less than 3% of the main medium income flow rate in order to limit changes in the dilution rate in

the considered stage. After three residence times, four independent samples were harvested at 24h interval for each condition (control: ES0, ammonium addition: N, valine addition: V).



3.3 Analytical methods

During fermentation, the cell population and the cell-size distribution were determined with a Coulter Counter (model Z2, Beckman-Coulter, Margency, France) fitted with a 100- μm aperture probe.

The dry weight of yeasts (X) was determined gravimetrically using nitrocellulose filters (pore size 0.45 μm ; Millipore) from 10 mL of sample. The sample was then dried for 48h at 100°C.

3.3.1 Substrate and metabolite analyses

Secondary metabolites of central carbon metabolism: Glucose, ethanol, glycerol, and organic acids in culture supernatants were determined by HPLC using a HPX-87H Aminex ion exchange column (300 x 7.8 mm, Bio-Rad) at 45 °C. The column was eluated with 4 mM H_2SO_4 at a flow rate of 0.6 ml min^{-1} . Acetic and α -ketoglutaric acids were

determined with a Hewlett-Packard G1314A UV meter at 210 nm whereas the other compounds were determined with an Agilent G1362A refractive index detector.

Intracellular metabolites: For intracellular metabolites, 5 ml samples from two independent replicates of each studied conditions were carried out. Cells metabolism was stopped by quenching, adding 26 ml of a buffered 60% methanol solution (methanol in 175 mM HEPES solution). The cell pellet was then collected by centrifugation (15000 g, 1 min, -10 °C) and 5 ml ethanol/HEPES (75% ethanol in 1M HEPES) at 80°C was added. Metabolites were extracted by incubating the mixture for five minutes at 80°C. The samples were cooled on ice and centrifuged at 15000 g for 10 minutes. Ethanol was removed by evaporation and the metabolites were resuspended in 250 µl ultra-pure H₂O and centrifuged at 20000 g for two minutes.

Intracellular metabolites were analyzed by high-pressure anion exchange chromatography in a Dionex ICS3000 (Dionex, USA). Sugar phosphates were separated on a CarboPac PA10 column, by applying a sodium acetate gradient from 75mM to 100mM in 35min, then to 350 mM in 65min and to 500mM in 75 min. These compounds were then detected by amperometry. Organic acids were separated on a IonPac AS11 column, with a methanol gradient (16% methanol in NaOH), from 0.5 to 24 mM for 15 min, then to 27 mM in 3 min and finally to 35 mM for the last 6min. Organics acids were then detected with a conductometric detector in UV at 210 nm.

Volatile compounds: Volatile compounds concentrations were determined by headspace gas chromatography method. Samples were prepared by adding 1 g of NaCl to 3mL of the fermentation sample in a 20mL vial, in order to facilitate the extraction of the volatile compounds to the gas phase. To standardize the equilibrium conditions between the liquid and the headspace, the ethanol concentration in the vial was adjusted to 11% by adding 2mL of a mixture of 12 g/L tartaric acid solution diluted either in water or an

ethanol/water mix (30%, v/v). 50 μ L of 4-methylpentan-2-ol at a concentration 3 g/L was added to the vial as an internal standard. The sample vial was heated and agitated for 5 min at 50°C in a headspace autosampler HT200 equipped with a gastight syringe, preheated to 60°C. One mL of headspace gas was analysed by using a HP6890 GC coupled to a FID detector. The injector temperature was 240 °C. The GC oven was equipped with a BP20 column (30m \times 0.53mm \times 1.0_m, SGE). H₂ was used as the carrier gas at a constant flow rate of 4.8 mL/min. The oven temperature program was 40°C for 3min, 3°C/min to 80 °C, 15°C/min to 160°C held for 1 min, then 30 °C/min to 220°C and then held at 220°C for 2min. The detector was set at 250°C. Peak areas were quantified with Agilent Chemstation software.

3.4 Gene expression analysis

3.4.1 Microarray preparation

Gene expression was analyzed from three independent cultures of each studied conditions: control steady state (ES0), steady state with addition of valine (V) and steady state with addition of ammonium (N). Aliquots of 1 \times 10⁹ cells were sampled from the fermentation medium when CO₂ production reached 15 g/l/h. Cells were collected by centrifugation at 1000 g for 5 min at 4°C and the cell pellets were washed with DEPC-treated water and then conserved in methanol at -80°C. Total RNA was extracted with Trizol reagent (Gibco BRL, Life Technologies) and purified with the RNeasy kit (Qiagen). The quantity and the quality of the extracted RNA were checked by spectrometry (NanoDrop 1000, Thermo Scientific). We used the Agilent gene expression microarrays 8 \times 15k (Design ID based on 016322 completed with 40 EC1118 specific genes Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Fluorescent cDNAs were synthesized from 100 ng of total RNA using the One color RNA

Spike-In kit (Agilent Technologies). Labeled cDNA was purified with the RNeasy Kit (Qiagen). Microarrays were hybridized for 17 h in 65°C in a rotative hybridization chamber (Corning), with the Gene Expression Hybridization kit (Agilent).

3.4.2 Data acquisition and statistical analysis

The hybridization signal was detected with a GenePix 4000B laser Scanner (Axon Instruments). Acquisition and quantification of array images were performed using the integrated GenePix software version 3.0. Statistical analysis was performed using R.2.13.1 (Ihaka and Gentleman, 1996). The limma package (Smyth and Speed, 2003; Smyth, 2004; Smyth *et al.*, 2005) was used to normalize the microarray data (quantile method for normalization between arrays). To determine the differential gene expression between experimental conditions, a modified t-test was performed by p-value filtering ($p < 0.05$), using the Benjamini and Hochberg false discovery rate as multiple testing correction of the t-test p-values (Benjamini, 2001). Only genes with a log fold change greater than 1.2 (positive or negative) in expression level were taken into consideration. The genes with different expression were grouped according to Gene Ontology (GO) process terms using Funspec (Robinson *et al.*, 2002) and genecodis (Carmona-Saez *et al.*, 2007; Nogales-Cadenas *et al.*, 2009). The complete data set is available through the Gene Expression Omnibus database (accession number GSE to be created).

4 Results

At steady state, control samples, corresponding to cultures without nitrogen addition (ES0) were collected from the third stage for metabolites analysis and mRNA extraction. Then, valine (condition V) or ammonium (condition N) was provided in this stage as a continuous flow –representing less than 3% of the feed rate–, resulting in a supply of 100 mg/L additional nitrogen (figure 1).

Samples, representative of valine or ammonium supplementation, were harvested at steady state, after a transition phase of 17 or 27 h depending on the nature of added nitrogen source (ammonium or valine, respectively). For each conditions (ES0, N, V), four independent samplings were carried out, at 24 h interval.

4.1 Impact of nitrogen addition on metabolite production

Comparative analysis of physiological characteristics between the three culture conditions first revealed that both cell population and dry weight of MSCF during N or V culture were around 40% higher than under ES0 conditions (Table 1). In the same way, nitrogen supplementation triggered an increase in the rate of production of CO₂ (Figure 2, Table 2).

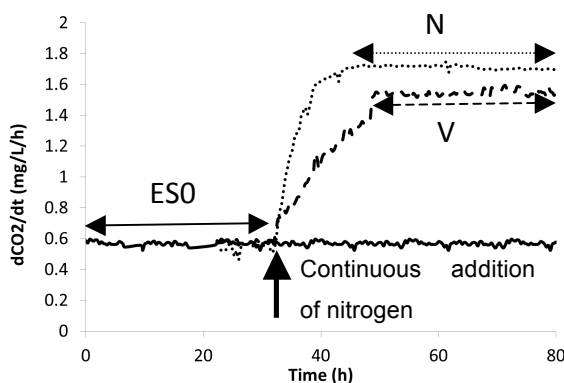


Figure 2 Evolution of the CO₂ production rate in the third stage of the MSCF. Solid line: Steady state without nitrogen addition; Dotted line: Steady state with addition of ammonium; dashed line: steady state with addition of valine

The rates of glucose consumption and ethanol production were also significantly higher with ammonium or valine addition than during the control fermentation (Table 1). Finally, the fermentative activity increased from 0.28 g CO₂/g DW/h during ES0 fermentation to 0.54 g CO₂/g DW/h and 0.61 g CO₂/g DW/h under V and N conditions, respectively.

Table 1 Characteristics of the must in the third stage without nitrogen addition (ES0) and with addition of valine (V) or ammonium (N)

	ES0	R3_+valine (V)	R3_+NH ₃ (N)
D (h ⁻¹)	0.11	0.11	0.11
dCO ₂ /dt (mg/L/h)	0.54 ±0.09	1.52 ±0.02	1.70±0.04
rAsN ¹ (mg/L)	ND	10.2±0.5	ND
Population	79 ±4	118 ±4	105 ±4
Dry weight (g/L)	1.9 ±0.4	2.8 ±0.3	2.8 ±0.3

¹Residual assimilable nitrogen

Regarding the production of metabolites involved in the central carbon metabolism (MCC), continuous nitrogen addition in the third stage of MSCF resulted in an increased formation of glycerol and pyruvate, slightly higher for ammonium supplemented culture (Table 2). Conversely, the excretion of succinate was dramatically reduced after nitrogen addition. Finally, the synthesis of acetate was differentially impacted, since an increase in its production was solely observed in the case of ammonium supplementation.

Finally, the formation of volatile compounds was impacted in different ways in response to nitrogen or valine supplementation. As expected, the addition of valine drastically increased the specific production rate of isobutanol (30 fold) as well as the formation of isobutyl acetate (Table 2). Another important modification resulting from nitrogen addition was the increase in the propanol specific production rate (10 fold and 14 fold with valine and ammonium, respectively). The synthesis of 2-phenylethanol exhibited a substantial increase under ammonium supplementation condition, while it was slightly

impacted as a consequence of valine addition. Surprisingly, the specific rates of isoamyl alcohol production, and consequently of isoamyl acetate formation, displayed a two-fold decrease with both nitrogen sources. Finally, the production rate of most of ethyl esters increased under both nitrogen addition conditions, compared to control fermentation.

Table 2 Specific substrates consumption rates and metabolite production rates in the third stage without nitrogen addition (ES0) and with addition of valine (V) or ammonium (N). Data are expressed in mol per gram of dry weight and per hour

	ES0	V	N
	<i>mmol/gDW/h</i>		
nitrogen	0	0.25 ± 0.01	0.30 ± 0.01
glucose	3.8 ± 0.2	7.3 ± 0.7	8.6 ± 0.6
	<i>g/gDW/h</i>		
biomass	0.032 ± 0.008	0.054 ± 0.005	0.060 ± 0.006
	<i>mmol/gDW/h</i>		
CO ₂	6.8 ± 0.3	11.7 ± 0.6	15.1 ± 0.7
ethanol	7 ± 1	14 ± 2	16 ± 2
glycerol	0.45 ± 0.08	0.70 ± 0.10	0.90 ± 0.10
succinate	0.040 ± 0.006	0.010 ± 0.002	0.005 ± 0.001
acetate	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.10 ± 0.02
pyruvate	0.020 ± 0.004	0.060 ± 0.006	0.070 ± 0.006
	<i>μmol/gDW/h</i>		
2-phenylethanol	8.1 ± 0.4	9.7 ± 0.5	15.7 ± 0.8
isoamyl alcohol	19.5 ± 0.8	8.6 ± 0.3	8.9 ± 0.3
propanol	1.23 ± 0.05	11.9 ± 0.5	17.0 ± 0.7
isobutanol	5.6 ± 0.3	160 ± 8	6.7 ± 0.3
ethyl acetate	0.100 ± 0.007	1.8 ± 0.1	4.4 ± 0.3
ethyl decanoate	ND	ND	0.01
ethyl hexanoate	0.010 ± 0.001	0.020 ± 0.001	0.030 ± 0.002
ethyl octanoate	ND	ND	0.01
isoamyl acetate	0.060 ± 0.004	0.040 ± 0.002	0.040 ± 0.002
isobutyl acetate	ND	0.070 ± 0.006	ND

4.2 Transcriptional analysis

The genome-wide transcriptional response of *S. cerevisiae* to nitrogen addition during the stationary phase of wine fermentation was then investigated. The expression profiles of the total gene sets obtained from the 12 fermentations (4 replicates for each condition) were compared using a principal component analysis (Figure 3), to obtain a rapid overview of the variability.

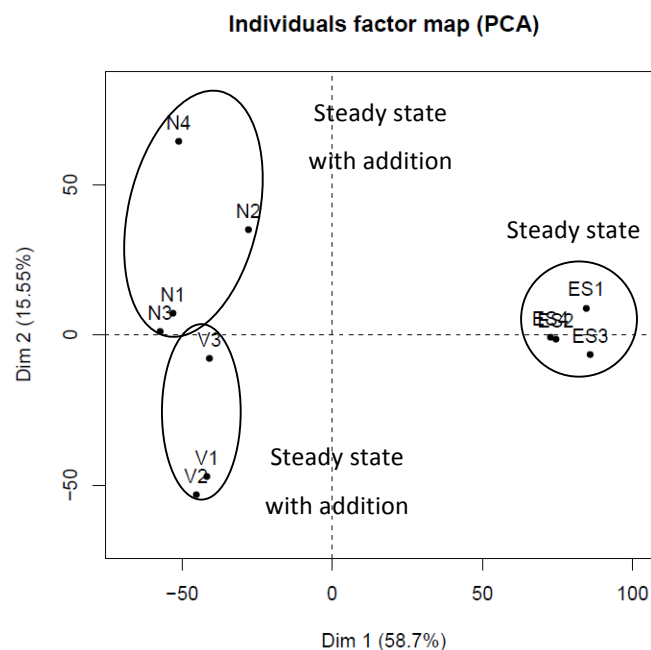


Figure 3 Principal component analysis of gene expression level in three conditions tested (without nitrogen addition (ES0), with addition of ammonium (N) and with addition of valine (V)).

The first two axes explained 74% of the total variation and the four replicates of each culture clustered close together and were separated into 3 distinct groups. The first axis explained 58% of the total variation and allowed a clear differentiation of cultures with (V, N) and without (ES) nitrogen addition, underlying the importance of this factor, irrespective to the nature of the added source, in the variations in gene expression data. The second axis, accounting for 16 % of the variance, discriminated the samples on the basis of the quality of the added nitrogen compound. Consequently, differences in the

transcriptomic response of the strain regarding the nitrogen source (valine versus ammonium) may be expected.

Pairwise analyses revealed 560 (243 down-regulated, 317 up-regulated) and 522 genes (242 down-regulated, 280 up-regulated) exhibiting a significant differential expression (cutoff fold change of 2.3) with N and V supplementation compared with control condition (ES0), respectively.

Comparison of the two gene expression patterns using Venn diagrams (Figure 4) showed that an important shared response of the strain EC1118 to valine and ammonium additions, as a large pool of genes were down (192) or up (243) regulated under both conditions. These genes accounted for about 70% of the total set of genes significantly differentially expressed under a specific condition.

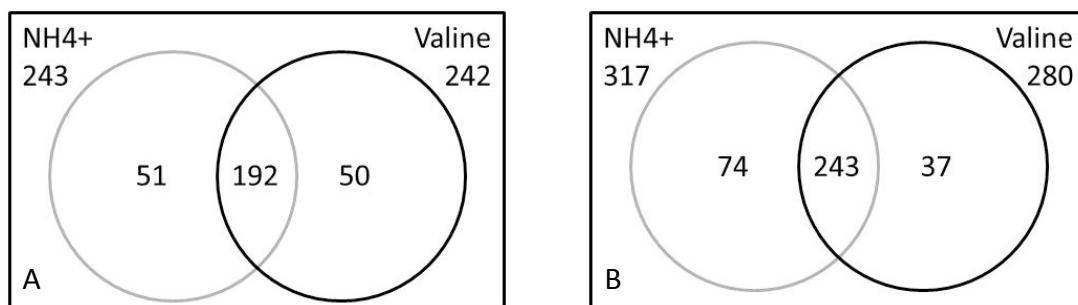


Figure 4 Venn Diagrams: Down-regulated (A) and up-regulated (B) genes in the two nitrogen addition conditions

4.2.1 Analysis of differentially expressed genes in response to nitrogen addition

Genes that were differentially expressed (cutoff fold change of 2.3) in response to nitrogen addition (both N and V) were clustered according to biological annotations with Funspec cluster GO interpreter (Bonferroni correction $p < 0.01$) (Robinson et al, 2002).

Most of the 243 up-regulated genes were identified as involved (i) in amino acids biosynthetic process (49), including in particular the synthesis of sulfur amino acids (methionine and cysteine), (ii) in translation (39) and (iii) in thiamine biosynthesis (13) (Table 3).

Higher expression of these genes as a consequence of valine or ammonium addition during the stationary phase may reflect a restart of the protein synthesis induced by increased nitrogen availability.

Conversely, 192 genes were down-regulated when nitrogen was continuously supplied in the third stage of MSCF. The majority of these genes were clearly related to respiratory metabolism, including GO biological processes such as “electron transport chain”, “aerobic respiration” and “oxidative stress response” (Table 4).

Few genes specific to the strain EC1118 (Novo *et al.*, 2009), were also differentially expressed. These included the gene EC1118_104_6491G (3.2-fold up-regulated), encoding a putative permease, member of allantoate transporter subfamily and the gene EC1118_104_6623G, encoding a protein close to a sorbitol dehydrogenase, which were 3-fold overexpressed and 2.5 fold down-regulated with both nitrogen sources, respectively.

Finally, a large set of orphan genes (66) showed at least a twofold increased (37) or decreased (39) expression levels during ammonium or valine adding experiments. The genes YOL159C and YMR304C-A were particularly up-regulated in presence of ammonium (11-fold and 8-fold) and valine (4-fold and 7-fold), respectively. Among the down-regulated genes, we noted two highly regulated genes, YMR118C (11-fold with ammonium and 4-fold with valine) and YBR116C (28-fold with ammonium and 22-fold with valine).

Globally, the categories related to metabolism accounted for a large part differentially expressed. Furthermore, the metabolic response to valine or ammonium supplementations revealed substantial variations concerning the production of metabolites from central carbon metabolism (CCM) and the synthesis of higher alcohols and esters. Consequently, further analysis of the transcriptomic response was targeted on genes involved in CCM and in the production of higher alcohols and esters in relation with nitrogen assimilation.

Table 3 Common response to nitrogen addition, Funspec classification of up-regulation response to both ammonium and valine supplementation into biological process categories. For each category, k is the number of genes differentially expressed in our conditions and f is the total number in this category.

Category	p-value	In Category from Cluster	k	f
metabolic process [GO:0008152]	<1e-14	MIS1 LYS2 ADH5 MET8 HIS7 ARO4 HIS4 ARO1 HOM2 EXG2 URH1 YDR541C HOM3 ARG5,6 RNR1 ALD5 SER3 SNZ3 MET10 TRP5 ADE5,7 CYS4 CRH1 ADE3 BAT1 IMD2 RNR3 SER33 URA2 INO1 CPS1 ACO2 ILV3 MET5 MAE1 MET1 PDC5 MET17 IMD3 IMD4 ARG7 SNZ1 ADE17 SCW10 LEU4 SNZ2 LYS9 LEU9 SER1 THI6 MET16	51	425
cellular amino acid biosynthetic process [GO:0008652]	<1e-14	CYS3 MIS1 LYS2 MET8 HIS7 ARO4 HIS4 ARO1 HOM2 HOM3 HIS1 ARG5,6 SER3 TRP2 MET6 MET10 IRC7 TRP5 ARO2 STR3 ASN2 CYS4 ADE3 ARG4 THR1 BAT1 SER33 LYS12 MET28 LYS1 MET3 ILV3 MET5 MET14 MET1 YLL058W MHT1 MET17 ILV5 ARG7 LEU4 MET2 LYS9 ARG1 ARG8 LEU9 SER1 SAM4 MET16	49	98
methionine biosynthetic process [GO:0009086]	<1e-14	MIS1 MET8 HOM2 MET6 MET10 IRC7 MET13 STR3 ADE3 MET28 MET3 MET5 MET14 MET1 YLL058W MHT1 MET17 MET2 MET22 SAM4 MET16	21	31
methionine metabolic process [GO:0006555]	3.21E-12	HOM2 SAM2 HOM3 MET13 THR1 MET3 MET14 SAM1 MET17 MET16	10	14
cysteine biosynthetic process [GO:0019344]	2.06E-11	CYS3 MET10 CYS4 MET28 MET3 MET5 MET14 MET17 MET16	9	12
cellular amino acid metabolic process [GO:0006520]	5.66E-09	CYS3 HOM2 ASP1 ARG5,6 IRC7 STR3 YHR112C URA2 MAE1 YLL058W MET17	11	31
translation [GO:0006412]	1.24E-11	RPS9B RPL13A SSB1 RPL4B RPL12A RPS26B RPL2A RPS2 RPL9A RPL26B RPS20 RPL8A RPL27A DED81 YHR020W RPL2B RPL17B RPS22A RPS4A RPL14A RPL17A RPL8B RPL15A RPS0B FRS1 RPS28B RPL38 RPS1A RPL6B RPS18B SSB2 RPP2A RPL18A RPL3 PRT1 RPS9A RPL5 CDC60 RPL11A	39	318
thiamine biosynthetic process [GO:0009228]	<1e-14	THI2 THI13 THI5 SNZ3 THI4 THI11 SNZ1 THI12 SNZ2 THI20 THI6 THI21 THI22	13	17
sulfate assimilation [GO:0000103]	4.36E-10	MET8 MET10 MET3 MET5 MET14 MET1 MET22 MET16	8	11
purine nucleotide biosynthetic process [GO:0006164]	3.75E-09	MIS1 ADE5,7 ADE3 IMD2 ADE13 IMD3 IMD4 ADE17 ADE12	9	18
oxidation-reduction process [GO:0055114]	1.20E-08	MIS1 LYS2 ADH5 MET8 HBN1 HIS4 HEM13 ARO1 HOM2 YDR541C DLD3 ARG5,6 RNR1 ALD5 SER3 MET10 MET13 ADE3 IMD2 RNR3 SER33 LYS12 LYS1 MET5 MAE1 ILV5 IMD3 IMD4 AAD14 LYS9 MET16	31	272

Table 4 Common response to nitrogen addition; Funspec classification of down-regulated response to both ammonium and valine supplementation into biological process categories. For each category, k is the number of genes differentially expressed in our conditions and f is the total number in this category

Category	p-value	In Category from Cluster	k	f
oxidation-reduction process [GO:0055114]	<1e-14	BDH1 BDH2 GDH3 ETR1 MXR2 NDE2 CTA1 TSA2 POX1 CTT1 GND2 SOD2 PUT2 GUT2 YJL045W YJR096W GPX1 MDH1 YKL107W MCR1 FOX2 FMP46 SDH2 XYL2 CYB2 AIM33 NDI1 ALD3 ALD2 COX7 COX5A SPS19 GOR1 MDH2 GRE2 GCY1 ALD4 YPR127W	38	272
electron transport chain [GO:0022900]	4.96E-11	MXR2 TRX3 GRX2 QCR7 CYC7 QCR6 QCR9 YJL045W CYC1 SDH2 YLR164W CYB2 YMR118C CYT1	14	49
mitochondrial electron transport, ubiquinol to cytochrome c [GO:0006122]	2.22E-07	QCR7 CYC7 QCR6 QCR9 CYC1 CYT1	6	11
aerobic respiration [GO:0009060]	1.05E-06	PET9 ETR1 QCR7 QCR6 COX4 COX13 QCR9 MDH1 MBR1 PET10 NCA2	11	61
metabolic process [GO:0008152]	3.84E-06	BDH1 BDH2 GDH3 ETR1 TKL2 DUR1,2 CCC2 PHM8 AGX1 POX1 NQM1 GND2 PUT2 SGA1 POT1 MDH1 YKL107W FOX2 XYL2 CYB2 ALD3 ALD2 YMR196W SPS19 GOR1 MDH2 GRE2 ALD4 PMA2 HPA2	30	425

Amino acids metabolism

One major response of adding nitrogen in the third stage of MSCF was the global activation of genes involved in the biosynthesis of amino acids (46 out of 243 up-regulated genes). Many genes associated with the biosynthesis of methionine and cysteine (*CYS3, STR3, HOM2, MET17, HOM3, CYS4, MET6, SAM4, MET2, IRC7*), of glycine, serine and threonine (*CYS3, SER1, SER3, HOM2, HOM3, THR1, CYS4, TRP5, SER33*) and lysine (*LYS2, HOM2, LYS12, LYS1, LYS9*) were up-regulated. In addition, ammonium and valine additions resulted in the overexpression of some genes involved in the anabolism of aromatic (*TRP2, TRP5, ARO2, ARO1, ARO4*) and branched chain amino acids (*LEU9, LEU4, BAT1, ILV3, ILV5*) as well as genes of the metabolism of arginine (*ARG4, ARG1,*

ARG8), aspartate (*ASN2*) and histidine (*HIS7*, *HIS4*, *HIS1*). In connection with nitrogen metabolism, the thiamine biosynthetic pathway, deriving from histidine and glycine metabolism (Jurgenson *et al.*, 2009) was also largely overexpressed (almost 90% of the genes associated with this biological process). Moreover, these genes displayed the highest response to nitrogen addition, as their expression fold-changes ranged from 32 to 80, depending on the gene and the added nitrogen source.

In, the same way, the sulfate assimilation pathway was strongly activated (72% of the genes included in this category were up-regulated), which is consistent with the activation of sulfur amino acids biosynthetic pathways. This observation was confirmed by the measurement of intracellular sulfate content, which was reduced from 10 $\mu\text{mol/gDW}$ in control steady state (ES0), to 0.4 and 0.7 $\mu\text{mol/gDW}$ under valine and ammonium supplementation, respectively (Figure 4). Here, the activation of the entire pathway might be a resultant of the increased need for de novo amino acid synthesis linked to the higher growth rate. Nevertheless, activation of the sulfate assimilation pathway have been also observed in the case of glucose addition to glucose limited culture (Dikicioglu *et al.*, 2011) In this case the authors suggested that the activation of sulfur metabolism was mainly associated to the increased need for methyl donor, necessary to ensure the transcriptional processing of rRNA to sustain the rise of the growth rate, which can also apply to our conditions. Furthermore, genes associated with methylation process *SAM1* and *SAM2* were respectively 6-fold and 3-fold up-regulated, with both valine and ammonium.

It is worth noting that the activation of the sulfate assimilation pathway by ammonium or valine addition is of technological interest, since it limits the excretion of H_2S , whose presence in high concentration is unfavorable for the quality of wine (Jiranek *et al.*, 1995; Marks *et al.*, 2003).

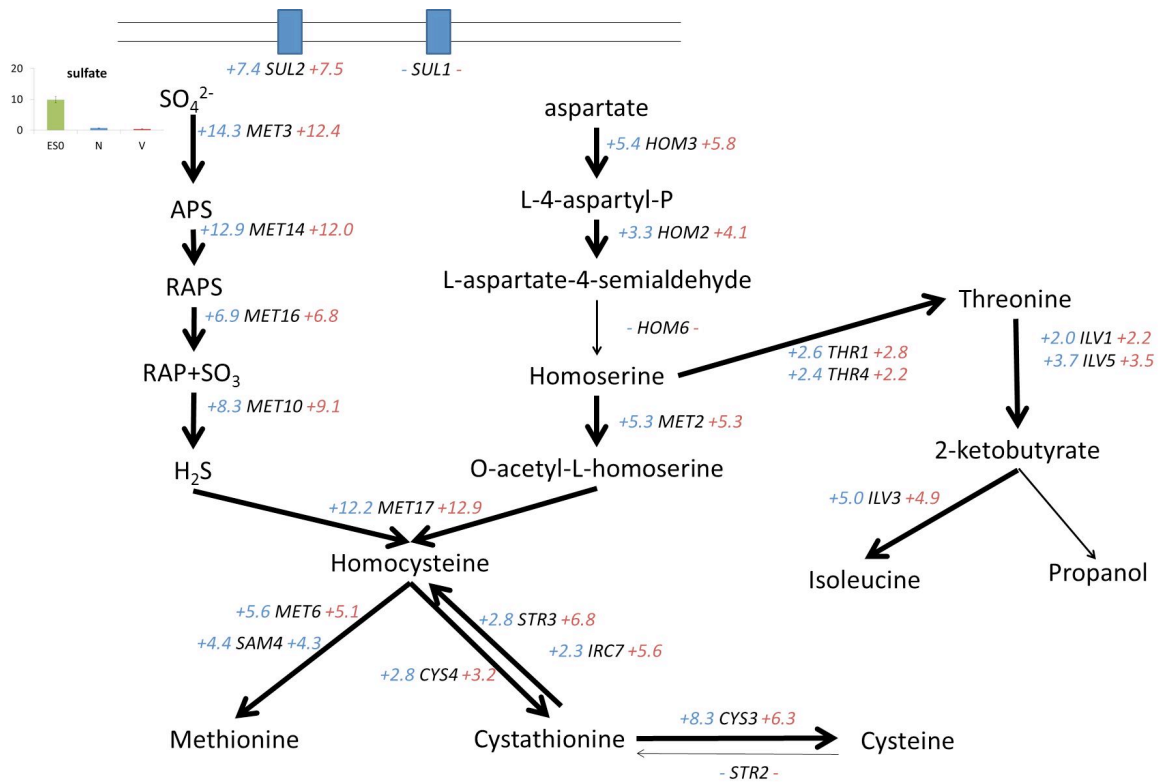


Figure 4 Influence of nitrogen addition on the regulation of sulfur metabolism. Gene expression fold change (Fc) for valine (red) and ammonium (blue) supplementations. Gene expression compared to control steady state (ES0) is expressed as Fc, in blue for valine addition and red for ammonium. Thick line: up-regulated. Dashed line: down-regulated. Thin line: not regulated. Intracellular metabolites (histograms) are expressed as a ratio compared to the concentration in the control condition (ES0).

Glucose metabolism through central carbon metabolism (CCM)

Regarding glycolytic genes, only *HXK2* was significantly regulated (2-fold overexpressed) (Figure 5). Hxk2p, is one of the 3 isoenzymes catalyzing glucose phosphorylation, and has been shown to be the major enzyme operating during growth on glucose (Walsh *et al.*, 1983; Bianconi, 2003). Apart from *HXK2*, genes of the glycolysis pathway were globally not differentially expressed consecutively to nitrogen addition. Nevertheless, the decrease in intracellular carbohydrates content confirms the higher carbon flux.

The genes most strongly repressed comprised 4 genes of the pentose phosphate pathway (PP pathway), which were down-regulated by at least a factor of 6 during cultures with nitrogen supplementation (*GND2*, *SOL4*, *TKL2* and *NQM1*). These genes encode the minor isoform of the NADP-dependent 6-phosphogluconate dehydrogenase (*GND2*) (Sinha and Maitra, 1992), one of the two isoforms of the 6-phosphogluconolactonase (*SOL4*) (Stanford *et al.*, 2004), the minor isoform of the transketolase activity (*TKL2*) (Schaaff-Gerstenschläger *et al.*, 1993) and a putative transaldolase (*NQM1*). These expression variations may result in a decrease in the carbon flux through the pentose phosphate pathway (PPP) as a consequence of nitrogen addition.

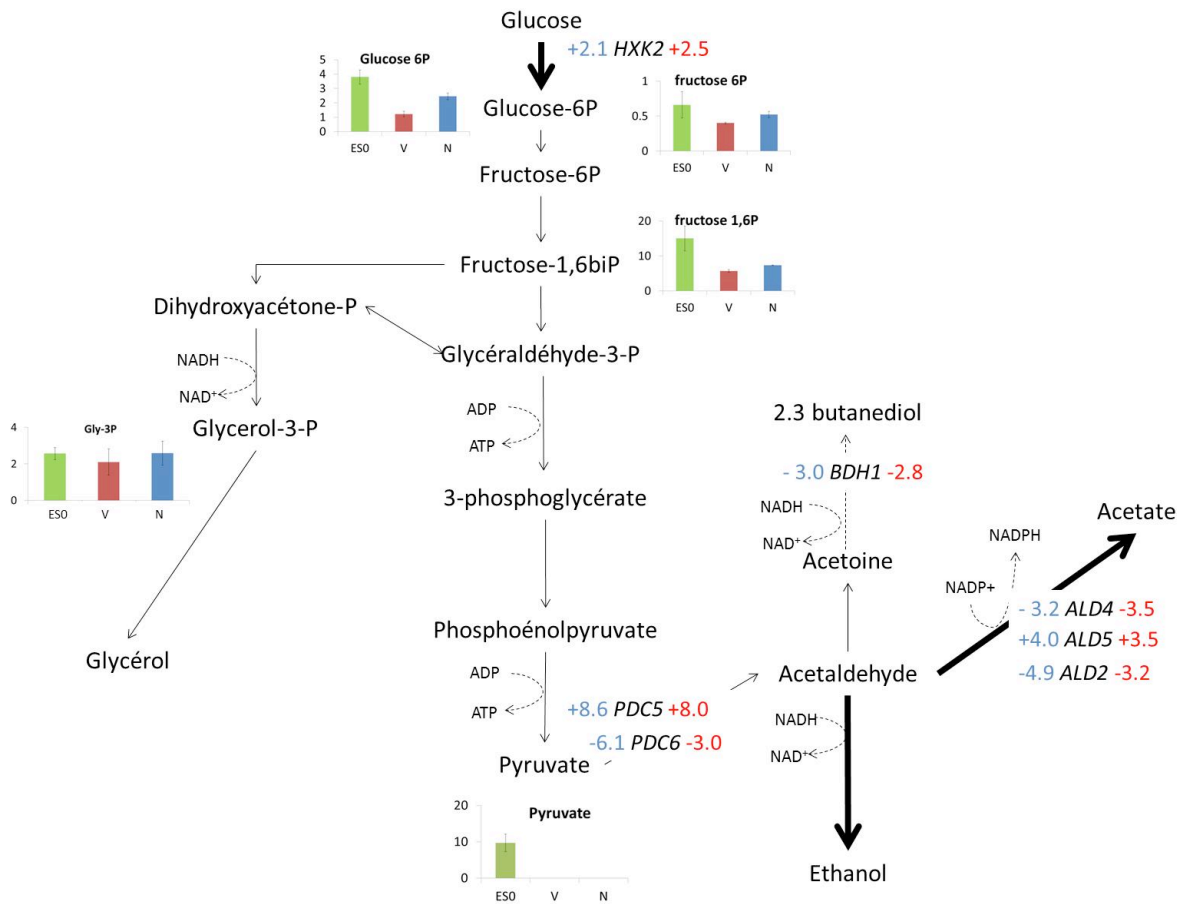


Figure 5 : Impact of nitrogen addition on central carbon metabolism. Gene expression compared to control steady state is expressed as fold change (Fc), in blue for valine addition and red for ammonium. Thick line: up-regulated. Dashed line: down-regulated. Thin line: not regulated. Histograms : Intracellular metabolites concentrations, in $\mu\text{mol/gDW}$.

The expression of genes from the ALD family was differentially regulated in response to nitrogen addition. The major mitochondrial isoform of the acetaldehyde dehydrogenase, *ALD4*, which uses both NAD and NADP as cofactor (Tessier *et al.*, 1998) as well as *ALD2* and *ALD3* encoding the cytoplasmic NAD dependent isoforms (Navarro-Aviño *et al.*, 1999) were down regulated. Conversely, *ALD5*, which encodes a mitochondrial acetaldehyde dehydrogenase using preferentially NADP (Wang *et al.*, 1998), was overexpressed. The changes in the expression profile of ALD genes, favored NADP-using enzyme in comparison to NAD-dependent isoforms, may originate from the increase in

NADPH requirements related to the renewed growth following nitrogen supplementation. Indeed, the production of acetate has been reported as one of the main sources of NADPH during growth under anaerobic glucose fermentation (Albers *et al.*, 1996; Saint-Prix *et al.*, 2004), in addition to the PP pathway. The activation of *MAE1*, which encodes the malic enzyme, described as an additional source of NADPH (Boles *et al.*, 1998), supports that the cell must balance its NADP/NAPDH pool accordingly to nitrogen additions. The overexpression of ALD genes is also consistent with the results of (Marks *et al.*, 2003) who suggested that the down-regulation of *ALD4* under DAP addition after 30% of sugar have been fermented could lead to a lower synthesis of acetic acid. Nevertheless, in our case, the specific production rate of acetate increased after addition of ammonium while it remained unchanged after addition of valine (Table 2).

Important changes were also found in the expression of TCA genes (Figure 6). The genes encoding the malate dehydrogenases (*MDH1*, *MDH2* and *MDH3*) and the fumarase (*FUM1*) which catalyze the 2 first steps of the reductive branch of TCA (Minard and McAlister-Henn, 1991; Przybyla-Zawislak *et al.*, 1999) were significantly down-regulated (more than 2.3-fold), while *KGD1* and *KGD2*, which control the decarboxylative oxidation of 2-ketoglutarate into succinate (Repetto and Tzagoloff, 1989) showed a 2-fold down regulation. At the same time, the expression of *MAE1*, which encodes the NADP-dependent malic enzyme responsible for the conversion of mitochondrial malate into pyruvate (Boles *et al.*, 1998), and that of genes related to the TCA oxidative branch, including *CIT2* (peroxisomal citrate synthase) and *ACO2* (mitochondrial aconitase) were substantially increased. The central carbon metabolism is connected to nitrogen metabolism via the synthesis of glutamate from the condensation of α -ketoglutarate with ammonium via the glutamate dehydrogenase Gdh1p (Boris Magasanik, 1992). The

corresponding gene *GDH1* was five times more expressed in presence of ammonium and twice with valine compared with control conditions. The global regulation of TCA suggests the orientation of the carbon flux towards the synthesis of α -ketoglutarate and further nitrogen metabolism. This was supported by the comparison of intracellular metabolites between the three conditions (Figure 6), showing a lower intracellular accumulation of fumarate, succinate or α -ketoglutarate when a nitrogen source was added.

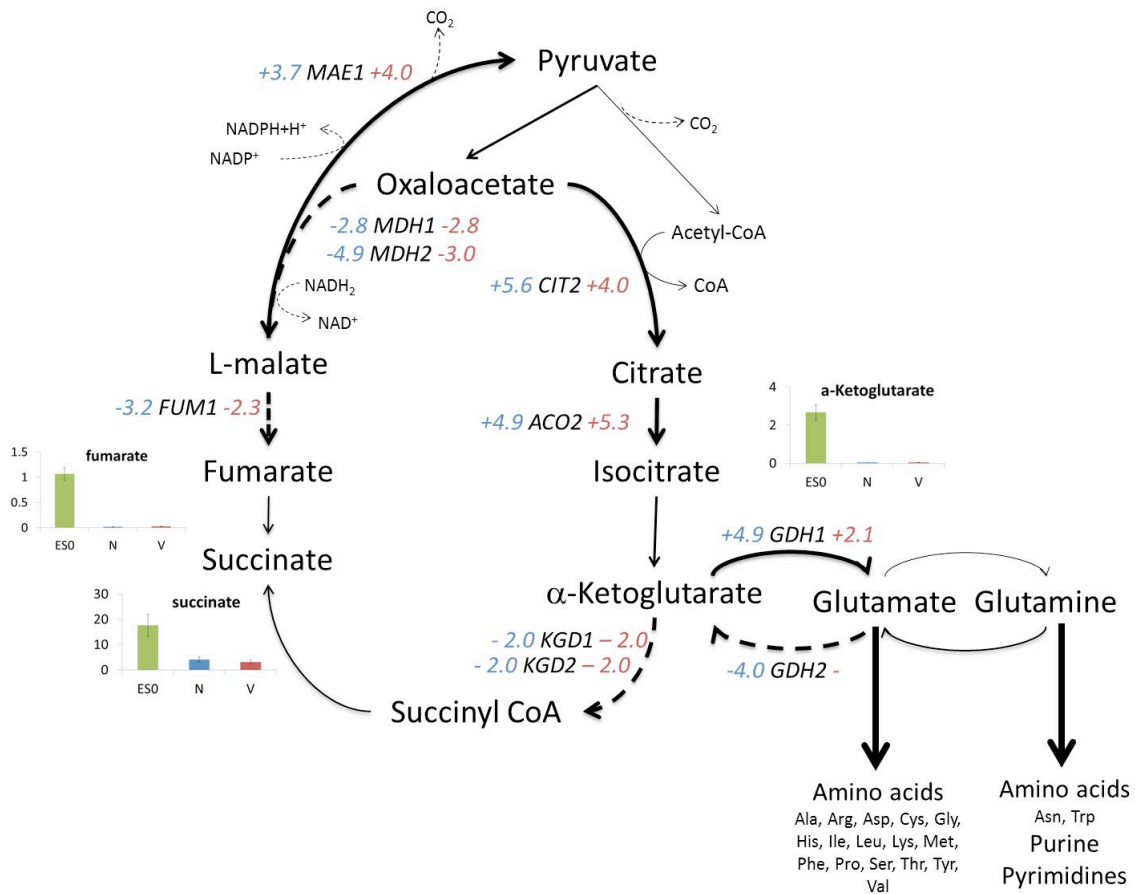


Figure 6 Influence of nitrogen addition on the TCA regulation and the synthesis of glutamate. Gene expression compared to control steady state (ESO) is expressed as fold change (Fc), in blue for valine addition and red for ammonium. Dashed line: down-regulated. Thin line: not regulated. Thick line: up-regulated. Intracellular metabolites (histograms) are expressed as a ratio compared to the concentration in the control condition (ESO).

Genes involved in the biosynthesis of volatile compounds

Interestingly, among genes displaying the highest levels of activation (above 8-fold overexpression), two genes (*PDC5* and *AAD14*) may be involved in the Ehrlich pathway, responsible for the formation of higher alcohol from keto-acids (Hazelwood *et al.*, 2008). *PDC5* encodes the minor pyruvate decarboxylase, an enzyme catalyzing the degradation of pyruvate into acetaldehyde but also the decarboxylation of other keto-acids, which is the first step of biosynthesis of fusel alcohols (Seeboth *et al.*, 1990; Dickinson *et al.*, 2003). *Aad14p* was reported as a putative aryl-alcohol dehydrogenase, potentially involved in the reduction of aldehydes into higher alcohols (Delneri *et al.*, 1999; Dickinson *et al.*, 2003). Other genes related to the catabolism of amino acids into aromatic compounds exhibiting a differential expression in response to nitrogen addition as valine or ammonium included the overexpressed genes *BAT1* and *ARO8* encoding a branched amino acid and the aromatic aminotransferases converting amino acids into ketoacids, respectively (Iraqi *et al.*, 1998; Dickinson, 2000), and *ADH5* which encodes a minor isoform of the alcohol dehydrogenase that may contribute to fusel alcohol synthesis (Smith *et al.*, 2004; Hazelwood *et al.*, 2008). Finally, *ATF2* was the only gene encoding an alcohol acetyltransferase, responsible for the volatile acetate ester production during fermentation (Mason and Dufour, 2000) which was overexpressed (around 4-fold) during MSCF with valine or ammonium supplementation.

4.2.2 Specific transcriptional response to valine or ammonium addition

Only a limited number of genes were specifically regulated following supplementation of ammonium (51 down-regulated and 74 up-regulated genes) or as a consequence of valine addition (50 under expressed and 37 overexpressed genes).

Genes specifically down-regulated by addition of ammonium were related to 'DNA dealkylation involved in DNA repair' category while most of the overexpressed genes were associated with translation, maturation of SSU-rRNA and ribosomal biogenesis biological processes. Regarding metabolic genes responsive to ammonium addition, the GDH genes showed a coordinated activation. *GDH1*, encoding the cytoplasmic NAD-dependent glutamate dehydrogenase catalyzing the production of glutamate from α -ketoglutarate, was 4.8 times up-regulated, while the gene *GDH2*, which codes the mitochondrial NADP glutamate dehydrogenase responsible for the reverse reaction, was 4-fold repressed. In addition, genes sensitive to NCR were substantially repressed, *DUR3* (3.9-fold) and *DAL5* (3-fold) which encode a plasma membrane transporter for urea and polyamines and an allantoin permease, respectively (Chisholm *et al.*, 1987; Turoscy and Cooper, 1987).

Continuous supplementation of valine in the third stage of MSCF resulted in the down-regulation of genes associated with reserve carbohydrate metabolism (*TPS1*, *TPS2*, *PGM2*) (François and Parrou, 2001). Interestingly, 3 genes potentially involved valine uptake, *AGP1* (13.5 fold), *DIP5* (11.5 fold) and *BAP2* (5.6 fold) were part of the most highly activated genes in the presence of valine. No differential expression of other genes potentially involved in valine uptake, *GAP1*, *BAP3* and *TAT1* (Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012) was observed between V and ES0 conditions. Moreover, *BAT2*, which encodes the second branched chain amino acid aminotransferases transferring -NH₂ group from valine to α -ketoglutarate to form glutamate (Dickinson, 2000; Lilly *et al.*, 2006), was almost 4 times overexpressed.

A few EC1118 specific genes were found to be specifically down-regulated by ammonium EC1118_1N26_0023g (4.2-fold), which presents similarities with the high

affinity nicotinic acid plasma membrane permease gene *TNA1*, EC1118_1N26_0012g (3.2-fold), which encodes a 5-oxoprolinase EC1118_1F14_0100g (2.2-fold), similar to YDR338C and EC1118_1N26_0045g (2.2-fold) which contains a fungal transcription factor domain (Novo *et al.*, 2009). One EC1118 gene, EC1118_1N26_0056g, which present similarities with *PUT3* (transcription factor involved in proline utilisation), was down-regulated 1.6-fold specifically under V conditions.

4.2.3 Transcription factors

We used the Genecodis3 analysis tool to detect transcription factors (TFs) whose targets are over represented in differentially expressed genes and that might regulate the response to valine or ammonium addition during the stationary phase. This analysis revealed 4 TFs (Yap1p, Gcn4p, Sfp1p and Met4p) having significantly enriched target sets for genes up-regulated under ammonium or valine conditions (Table 5). Yap1p is associated to oxidative stress response (Delaunay *et al.*, 2000) and Sfp1p controls expression ribosome biogenesis genes in response to nutrients and stress (Jorgensen *et al.*, 2002). Gcn4p is closely related to nitrogen metabolism, as a transcriptional activator of amino acid biosynthetic genes in response to amino acid starvation (Natarajan *et al.*, 2001). Met4p is involved in the general amino acid control (GAAC) (Mountain *et al.*, 1993) and the activation of sulfur amino acid pathway.

Furthermore, Gln3p, involved in nitrogen catabolite repression (NCR), was identified as a TF with a specific enrichment of target genes up-regulated with ammonium addition, as well as the growth rate dependent TFs Rap1p, ifh1p and Fhl1p (Fazio *et al.*, 2008).

On the other hand, our TF enrichment analysis indicated a role for Met4p, Met32p and Met28p in the control of the specific response to valine addition. These three transcriptional factors are involved in the regulation of the sulfur amino acid pathway.

Fifty percent of down-regulated genes in response to both ammonium and valine addition were regulated by Msn2p, Aft1p, Msn4p, Gis1p and Rpn4p. They were also highly represented. These five TFs are all involved in nutrient stress response and nutrient regulation. Msn2p and Msn4p regulate the general stress response in *S. cerevisiae* (Martínez-Pastor *et al.*, 1996; Schmitt and McEntee, 1996).

Table 5 Genecodis transcription factors analysis for up-regulated genes, in the case of ammonium or valine supplementation compared to the control steady state. Results are given as a percentage of the totality of genes in the analyzed condition.

	Transcriptions factors	N	V
Up-regulated transcripts	Yap1p	62%	61%
	Gcn4p	54%	55%
	Sfp1p , Yap1p	42%	38%
	Yap1p, Gcn4p	37%	36%
	Sfp1p, Gcn4p	35%	34%
	Yap1p, Met4p		33%
	Met4p, Gcn4p		28%
	Yap1p, Met4p, Gcn4p		21%
	Gln3p, ifh1p	19%	
	Met4p, Met32p, Met28p		9%
Down-regulated transcripts	Msn2p	44%	50%
	Msn2p, Aft1p	28%	31%
	Msn2p, Msn4p		36%
	Gis1p	26%	27%
	Rpn4p , Aft1p	23%	
	Msn2p, Msn4p, Aft1p	21%	24%
	Msn2p, Gis1p	19%	21%
	Msn2p, Rpn4p, Aft1p	18%	21%
	Aft1p, Gis1p	18%	20%

Discussion

In this work, the consequences of nitrogen addition as valine or ammonium during the stationary phase of *S. cerevisiae* wine fermentation were investigated combining metabolic and transcriptomic characterizations using an original multi stage continuous fermentor (MSCF) experimental device. The main advantage of this culture mode is to provide cells under similar physiological conditions to those of batch wine fermentation, including the stationary phase (Clement *et al.*, 2011). This allowed analyzing the metabolic modifications associated with the nutrient additions and the underlying mechanisms involved in their control at steady state, independently from the continuous evolution of environment of batch process. Relieving the nitrogen limitation with valine or ammonium addition during the stationary phase of fermentation (corresponding to the third stage of the MSCF) triggered an important reorganization of the gene expression pattern and the metabolism of *S. cerevisiae*.

Amino acid synthesis. The main consequence of this increased nitrogen availability was the strong increase in growth (40% increase), associated with the global over-expression of genes involved in translation, amino acid synthetic process and ribosomal activity. Consistent with that, previous studies reported an activation of protein synthesis through expression of RP family genes (*RPL*, *RPS*, *RPB*) as a consequence of nitrogen addition to depleted medium (Backhus *et al.*, 2001; Marks *et al.*, 2003; Dikicioglu *et al.*, 2011).

Interestingly, all metabolic pathways involved in the biosynthesis of amino acids exhibited a significant proportion of over-expressed genes, both for ammonium addition, as previously reported (Marks *et al.*, 2003) and valine supplementation. Thus, both sets of up-regulated genes (V and N) were significantly enriched for targets of the

TF Gcn4p, reported as the master transcriptional activator of amino acids transport and biosynthetic gene during amino acid starvation (Natarajan *et al.*, 2001). This was in agreement with a *de novo* synthesis of the whole amino acids pool from the added nitrogen source. Conversely, when nitrogen was provided as a mixture of amino acids (Jiménez-Martí *et al.*, 2007), most of these anabolic genes showed no change in expression, likely since added amino acids were directly incorporated into proteins. The decrease in isoamyl alcohol and isoamyl acetate production in response to nitrogen addition suggests that α -keto-isocaproate, intermediate for both synthesis of leucine and isoamyl alcohol and its acetate derivative, was preferentially used towards amino acid biosynthesis to the detriment of volatile molecules, which is consistent with the restoration of amino acid synthesis.

Glutamate is a key intermediate of the central nitrogen metabolism, which redistributes nitrogen to α -ketoacids, carbon skeletons originated from CCM, thus leading to amino acids (Boris Magasanik, 1992; Albers *et al.*, 1998). To fulfill the anabolic requirements in response to nitrogen addition, different ways were implemented by yeast to provide glutamate depending on the source. On one hand, the specific transcriptional response to valine addition was mainly focused on a significant activation of *AGP1* and *BAP2*, which encode permeases transporting valine and *BAT2*, involved in transamination of valine into 2-keto-isovalerate releasing glutamate. Consistent with that, the productions of isobutanol and isobutyl acetate, which derive from further conversion of 2-keto-isovalerate through the Ehrlich pathway, were considerably increased with valine supplementation. On the other hand, we observed that a specific coordinated regulation of the α -ketoglutarate node was set up to synthesize glutamate when ammonium was added during nitrogen-depleted fermentations. This transcriptional control was based on the up-regulation of *GDH1* combined with the down regulation of *GDH2*, *KGD1* and

KGD2 to favor the accumulation of glutamate to the expense of the formation of succinate and α -ketoglutarate. The MEP transporters (Marini *et al.*, 1997), responsible for the uptake of ammonium and encoded by *MEP1*, *MEP2* and *MEP3*, were not differentially expressed, likely since these genes, sensitive to the NCR control, were already active under the nitrogen-limited conditions characterizing the third stage of MSCF. The MEP genes are regulated by NCR and are generally repressed in presence of a good nitrogen source like ammonium (Marini *et al.*, 1997). Typically, genes involved in the transport of nitrogen sources under NCR control were down-regulated, to a more or less important extent, as a consequence of valine or ammonium supplementation. On the other hand, addition of valine triggered activation of a large set of transporters genes under control of the SPS plasma membrane amino acid sensor system (Ssy1p-Ptr3p-Ssy5p) (figure 7).

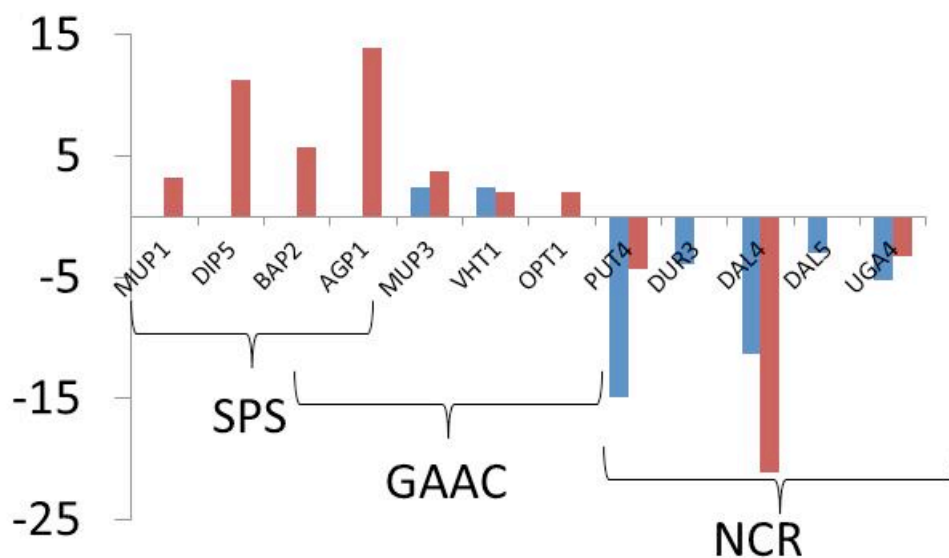


Figure 7 Gene expression (fold change) of amino acid permeases in response to supplementation of ammonium (blue) and valine (red) and known regulation mode.

Central carbon metabolism The differential expression pattern of genes involved in CCM reflects the carbon flux re-routing to favor glycolysis and formation of metabolic

precursors for amino acids synthesis, particularly at the TCA pathway level. Outstandingly, most of the differentially regulated genes of the CCM in response to nitrogen addition during the stationary phase encode minor isoforms of enzymatic activities. This suggests that cells adapt to changes in nitrogen availability by implementing a mechanism that regulates minor isoforms, allowing a fine-tuning of carbon metabolism, mainly controlled by glucose catabolite repression of major isoenzymes during fermentation.

On the other hand, the genes involved in glycolysis were little modified by the addition of nitrogen, except *HXK2* (two-fold overexpressed), which encodes the predominant hexokinase during growth on glucose. In the same time, we observed a decrease in the intracellular levels of metabolic intermediates of high glycolysis. These observations might be related to a higher glycolytic flux, compatible with the increase in fermentation rate, which was one of the major physiological consequences of adding nitrogen during the stationary phase of wine fermentation. Indeed, many factors have been proposed to play central roles in the control of glycolysis, including in particular the regulation of synthesis of glucose transport, hexose phosphorylation, and phosphofructokinase and pyruvate kinase activities (Ernandes *et al.*, 1998; Elbing *et al.*, 2004) as well as regulation through changes in metabolites levels (van den Brink *et al.*, 2008). Furthermore, this higher fermentative capacity may be attributed to the greater global protein synthesis during supplemented cultures compared with cultures without addition, as previously proposed in the case of diammonium phosphate addition during batch cultures (Marks *et al.*, 2003).

Also related to the increased fermentative capacity, the thiamine synthesis pathway was highly activated after both valine and ammonium addition. The active form of thiamine plays an essential role in fermentative metabolism, as cofactor for many enzymes,

including the pyruvate decarboxylase, involved in the first step of conversion of pyruvate into ethanol. The up-regulation of *PDC5*, may increase the thiamine demand, and consequently lead to the activation of *THI* genes, reported to be induced in presence of glucose and by thiamine depletion (Mojzita and Hohmann, 2006).

Higher alcohols and esters synthesis. Consistent with previous studies which reported a direct correlation of propanol synthesis with nitrogen consumption, (González-Marco *et al.*, 2010; Moreira *et al.*, 2011; Mouret *et al.* 2012) both ammonium and valine addition triggered a strong increase in propanol production rate, likely associated with the important activation of the sulfur amino acids, isoleucine and threonine biosynthetic pathways in response to nitrogen addition. The part of threonine which was not assimilated into proteins or used for synthesis of other amino acids (isoleucine, glycine) may be further converted into propanol (Van Der Sluis *et al.*, 2002).

The genes *BAT1* and *BAT2* code two branched chain amino acid transaminases with different roles. Bat1p is involved in branched chain amino acids biosynthesis while Bat2p plays a role in valine catabolism. Over-expression of both *BAT1* and *BAT2* triggers higher production rates of isoamyl alcohol and isobutanol (Yoshimoto *et al.*, 2002; Lilly *et al.*, 2006; Saerens *et al.*, 2008). In our study *BAT2* showed a higher expression with addition of valine which is in accordance with the role of Bat2p in valine catabolism. Isobutanol production was highly increased (almost 30-fold) in this condition. No significant differential expression of *BAT2* and *BAT1* was observed in the case of ammonium addition, were a slight increase (20%) of isobutanol was observed. In this case, the other genes like *ILV5*, which were 3.5 fold up-regulated with both sources of nitrogen, might be involved in higher production rate of isobutanol.

A higher expression of *ATF1* and *ATF2* triggers of several esters such as isoamyl, isobutyl acetate or hexyl acetate, although *ATF2* is thought to play a minor role (Verstrepen *et al.*, 2003) Several hypotheses have been proposed to explain the role of the alcohol acetyl transferases I and II in acetate esters synthesis (Procopio *et al.*, 2011). Among others, the positive impact of nitrogen compounds on esters synthesis has been explained by an activation of *ATF1* through a nitrogen sensing mechanism involving a protein kinase (Verstrepen *et al.*, 2004). In our study the addition of ammonium or valine increased the expression of *ATF2* (4.5-fold and 3.7s-fold, respectively), while *ATF1* remained at high expression level whatever the condition. Nevertheless, the production of acetate esters was affected by nitrogen addition. Isoamyl acetate and isobutyl acetate varied the same way as their precursor fusel alcohol, while ethyl acetate was highly increased, which suggests that several mechanisms account for the production of acetate esters, the one prevailing being the availability of precursors. In addition, *ATF2* appears to play an important role in the formation of acetate esters in our conditions.

Conclusion and prospects. The experimental set we used in this study provided new interesting insight on the impact of nitrogen supplementation on yeasts cell metabolism in winemaking conditions. In particular, the high reproducibility of the transcriptomic data allowed us to identify 560 significantly differently expressed genes after addition of ammonia, while 350 to 400 genes were considered in other similar studies (Marks *et al.*, 2003; Jiménez-Martí and del Olmo, 2008). Using MSCF is therefore of particular interest for genome wide microarray analysis, which can potentially provide a large set of information as far as the data are statistically reliable. More generally, it is particularly well adapted for integrated approaches including metabolomic and kinetic data.

This study opens new prospects for the understanding of yeasts metabolism, especially when disturbed by environmental changes. Regarding winemaking conditions, it will be of special interest to assess the effect of other nutrients such as oxygen or inhibitors, firstly ethanol.

Acknowledgments

This work was supported by the European Community Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement CAFE n° KBBE-212754 (<http://www.cafe-project.org>), the INRA Sys-Arômes program and by the BIOFLAVOUR Cost Action FA0907

We would like to thank Christian Brion and Pierre Delobel for assistance with microarray experiments.

References

- Albers, E., Gustafsson, L., Niklasson, C., Lidén, G., 1998. Distribution of ¹⁴C-labelled carbon from glucose and glutamate during anaerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology (Reading, Engl.)* 144 (Pt 6), 1683–1690.
- 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.
- Backhus, L.E., DeRisi, J., Bisson, L.F., 2001. Functional genomic analysis of a commercial wine strain of *Saccharomyces cerevisiae* under differing nitrogen conditions. *FEMS Yeast Res.* 1, 111–125.
- 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.
- Benjamini, Y., 2001. The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. *Ann. Statist.* 29, 1165–1188.
- Bianconi, M.L., 2003. Calorimetric determination of thermodynamic parameters of reaction reveals different enthalpic compensations of the yeast hexokinase isozymes. *J. Biol. Chem.* 278, 18709–18713.
- 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., 2007. Transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* to preferred and nonpreferred nitrogen sources in glucose-limited chemostat cultures. *FEMS Yeast Research* 7, 604–620.
- Boles, E., de Jong-Gubbels, P., Pronk, J.T., 1998. Identification and characterization of *MAE1*, the *Saccharomyces cerevisiae* structural gene encoding mitochondrial malic enzyme. *J. Bacteriol.* 180, 2875–2882.
- Boris Magasanik, 1992. 6 Regulation of Nitrogen Utilization. *Cold Spring Harbor Monograph Archive Volume II: The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces: Gene Expression.*
- Carmona-Saez, P., Chagoyen, M., Tirado, F., Carazo, J.M., Pascual-Montano, A., 2007. GENECODIS: a web-based tool for finding significant concurrent annotations in gene lists. *Genome Biol.* 8, R3.
- 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.
- Chisholm, V.T., Lea, H.Z., Rai, R., Cooper, T.G., 1987. Regulation of allantoin transport in wild-type and mutant strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 169, 1684–1690.
- Clement, T., Perez, M., Mouret, J.R., Sablayrolles, J.M., Camarasa, C., 2011. Use of a continuous multistage bioreactor to mimic winemaking fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 150, 42–49.
- Cooper, T.G., 1982. Cooper: Nitrogen Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cold Spring Harbor Monograph Archive, North America.*
- Cooper, T.G., 2002. Transmitting the signal of excess nitrogen in *Saccharomyces cerevisiae* from the Tor proteins to the GATA factors: connecting the dots. *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 223–238.

- Delaunay, A., Isnard, A.-D., Toledano, M.B., 2000. H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *EMBO J* 19, 5157–5166.
- Delneri, D., Gardner, D.C., Bruschi, C.V., Oliver, S.G., 1999. Disruption of seven hypothetical aryl alcohol dehydrogenase genes from *Saccharomyces cerevisiae* and construction of a multiple knock-out strain. *Yeast* 15, 1681–1689.
- Dickinson, J.R., 2000. Pathways of leucine and valine catabolism in yeast. *Meth. Enzymol.* 324, 80–92.
- 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.
- Dikicioglu, D., Karabekmez, E., Rash, B., Pir, P., Kirdar, B., Oliver, S.G., 2011. How yeast re-programmes its transcriptional profile in response to different nutrient impulses. *BMC Syst Biol* 5, 148.
- Dubois, E., Grenson, M., 1979. Methylamine/ammonia uptake systems in *Saccharomyces cerevisiae*: multiplicity and regulation. *Molecular and General Genetics* MGG 175, 67–76.
- Elbing, K., Larsson, C., Bill, R.M., Albers, E., Snoep, J.L., Boles, E., Hohmann, S., Gustafsson, L., 2004. Role of Hexose Transport in Control of Glycolytic Flux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* 70, 5323–5330.
- Ernandes, J.R., De Meersman, C., Rolland, F., Winderickx, J., de Winde, J., Brandão, R.L., Thevelein, J.M., 1998. During the initiation of fermentation overexpression of hexokinase PII in yeast transiently causes a similar deregulation of glycolysis as deletion of Tps1. *Yeast* 14, 255–269.
- Fazio, A., Jewett, M.C., Daran-Lapujade, P., Mustacchi, R., Usaite, R., Pronk, J.T., Workman, C.T., Nielsen, J., 2008. Transcription factor control of growth rate dependent genes in *Saccharomyces cerevisiae*: A three factor design. *BMC Genomics* 9, 341.
- Forsberg, H., Gilstring, C.F., Zargari, A., Martínez, P., Ljungdahl, P.O., 2001. The role of the yeast plasma membrane SPS nutrient sensor in the metabolic response to extracellular amino acids. *Mol. Microbiol.* 42, 215–228.
- François, J., Parrou, J.L., 2001. Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 125–145.
- González-Marco, A., Jiménez-Moreno, N., Ancín-Azpilicueta, C., 2010. Influence of Nutrients Addition to Non limited-in-Nitrogen Must on Wine Volatile Composition. *Journal of Food Science* 75, S206–S211.
- 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.
- Hernandez-orte, P., Bely, M., Cacho, J., Ferreira, V., 2006. Impact of ammonium additions on volatile acidity, ethanol, and aromatic compound production by different *Saccharomyces cerevisiae* strains during fermentation in controlled synthetic media. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 12, 150–160.
- Hoskisson, P.A., Hobbs, G., 2005. Continuous culture - making a comeback? *Microbiology* 151, 3153–3159.
- Ihaka, R., Gentleman, R., 1996. R: A Language for Data Analysis and Graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics* 5, 299–314.
- Iraqi, I., Vissers, S., Cartiaux, M., Urrestarazu, A., 1998. Characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* ARO8 and ARO9 genes encoding aromatic aminotransferases I and II reveals a new aminotransferase subfamily. *Mol. Gen. Genet.* 257, 238–248.

- Jiménez-Martí, E., Aranda, A., Mendes-Ferreira, A., Mendes-Faia, A., del Olmo, M.L., 2007. The nature of the nitrogen source added to nitrogen depleted vinifications conducted by a *Saccharomyces cerevisiae* strain in synthetic must affects gene expression and the levels of several volatile compounds. *Antonie Van Leeuwenhoek* 92, 61–75.
- Jiménez-Martí, E., del Olmo, M.L., 2008. Addition of ammonia or amino acids to a nitrogen-depleted medium affects gene expression patterns in yeast cells during alcoholic fermentation. *FEMS Yeast Res.* 8, 245–256.
- Jiranek, V., Langridge, P., Henschke, P.A., 1995. Regulation of hydrogen sulfide liberation in wine-producing *Saccharomyces cerevisiae* strains by assimilable nitrogen. *Appl Environ Microbiol* 61, 461–467.
- Jones, E., Fink, G.R., 1982. Regulation of amino acid and nucleotide biosynthesis in yeast, in: *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Metabolism and Gene Expression*. Strathern JN, Jones EW and Broach JR., Cold Spring Harbor, NY, pp. 181–299.
- Jorgensen, P., Nishikawa, J.L., Bretkreutz, B.-J., Tyers, M., 2002. Systematic identification of pathways that couple cell growth and division in yeast. *Science* 297, 395–400.
- Jurgenson, C.T., Begley, T.P., Ealick, S.E., 2009. The structural and biochemical foundations of thiamin biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 569–603.
- Kohlhaw, G.B., 2003. Leucine Biosynthesis in Fungi: Entering Metabolism Through the Back Door. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 1–15.
- Lilly, M., Bauer, F.F., Lambrechts, M.G., Swiegers, J.H., Cozzolino, D., Pretorius, I.S., 2006. The effect of increased yeast alcohol acetyltransferase and esterase activity on the flavour profiles of wine and distillates. *Yeast* 23, 641–659.
- Ljungdahl, P.O., Daignan-Fornier, B., 2012. Regulation of Amino Acid, Nucleotide, and Phosphate Metabolism in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Genetics* 190, 885–929.
- Magasanik, B., Kaiser, C.A., 2002. Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 290, 1–18.
- Marini, A., SoussiBoudekou, S., Vissers, S., Andre, B., 1997. A family of ammonium transporters in *Saccharomyces cerevisiae* RID D-1725-2010. *Mol. Cell. Biol.* 17, 4282–4293.
- Marks, V.D., van der Merwe, G.K., van Vuuren, H.J.J., 2003. Transcriptional profiling of wine yeast in fermenting grape juice: regulatory effect of diammonium phosphate. *FEMS Yeast Res.* 3, 269–287.
- Martínez-Pastor, M.T., Marchler, G., Schüller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H., Estruch, F., 1996. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J.* 15, 2227–2235.
- Mason, A.B., Dufour, J.P., 2000. Alcohol acetyltransferases and the significance of ester synthesis in yeast. *Yeast* 16, 1287–1298.
- Mendes-Ferreira, A., Mendes-Faia, A., Leão, C., 2004. Growth and fermentation patterns of *Saccharomyces cerevisiae* under different ammonium concentrations and its implications in winemaking industry. *Journal of Applied Microbiology* 97, 540–545.
- Minard, K.I., McAlister-Henn, L., 1991. Isolation, nucleotide sequence analysis, and disruption of the *MDH2* gene from *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for three isozymes of yeast malate dehydrogenase. *Mol. Cell. Biol.* 11, 370–380.
- Mouret J.R., Morakul S., Nicolle P., Aguera E., Perez M., Athes V. and Sablayrolles J.M. 2011. Interest of on-line higher alcohol and ester determinations during

- winemaking fermentations. *Fruit & Veg Processing*, 1st Euro-Mediterranean Symposium, Avignon. Communication orale + texte intégral.
- Mojzita, D., Hohmann, S., 2006. Pdc2 coordinates expression of the THI; regulon in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Genetics and Genomics* 276, 147–161.
- Moreira, N., de Pinho, P.G., Santos, C., Vasconcelos, I., 2011. Relationship between nitrogen content in grapes and volatiles, namely heavy sulphur compounds, in wines. *Food Chemistry* 126, 1599–1607.
- Mountain, H.A., Byström, A.S., Korch, C., 1993. The general amino acid control regulates *MET4*, which encodes a methionine-pathway-specific transcriptional activator of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology* 7, 215–228.
- Natarajan, K., Meyer, M.R., Jackson, B.M., Slade, D., Roberts, C., Hinnebusch, A.G., Marton, M.J., 2001. Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast. *Mol. Cell. Biol.* 21, 4347–4368.
- Navarro-Aviño, J.P., Prasad, R., Miralles, V.J., Benito, R.M., Serrano, R., 1999. A proposal for nomenclature of aldehyde dehydrogenases in *Saccharomyces cerevisiae* and characterization of the stress-inducible *ALD2* and *ALD3* genes. *Yeast* 15, 829–842.
- Nogales-Cadenas, R., Carmona-Saez, P., Vazquez, M., Vicente, C., Yang, X., Tirado, F., Carazo, J.M., Pascual-Montano, A., 2009. GeneCodis: interpreting gene lists through enrichment analysis and integration of diverse biological information. *Nucleic Acids Res.* 37, W317–322.
- Novo, M., Bigey, F., Beyne, E., Galeote, V., Gavory, F., Mallet, S., Cambon, B., Legras, J.-L., Wincker, P., Casaregola, S., Dequin, S., 2009. Eukaryote-to-eukaryote gene transfer events revealed by the genome sequence of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* EC1118. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 16333–16338.
- Piper, M.D.W., Daran-Lapujade, P., Bro, C., Regenber, B., Knudsen, S., Nielsen, J., Pronk, J.T., 2002. Reproducibility of Oligonucleotide Microarray Transcriptome Analyses AN INTERLABORATORY COMPARISON USING CHEMOSTAT CULTURES OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*. *J. Biol. Chem.* 277, 37001–37008.
- Procopio, S., Qian, F., Becker, T., 2011. Function and regulation of yeast genes involved in higher alcohol and ester metabolism during beverage fermentation. *European Food Research and Technology* 233, 721–729.
- Przybyla-Zawislak, B., Gadde, D.M., Ducharme, K., McCammon, M.T., 1999. Genetic and biochemical interactions involving tricarboxylic acid cycle (TCA) function using a collection of mutants defective in all TCA cycle genes. *Genetics* 152, 153–166.
- Repetto, B., Tzagoloff, A., 1989. Structure and regulation of *KGD1*, the structural gene for yeast alpha-ketoglutarate dehydrogenase. *Mol. Cell. Biol.* 9, 2695–2705.
- Robinson, M.D., Grigull, J., Mohammad, N., Hughes, T.R., 2002. FunSpec: a web-based cluster interpreter for yeast. *BMC Bioinformatics* 3, 35.
- Rossignol, T., Dulau, L., Julien, A., Blondin, B., 2003. Genome-wide monitoring of wine yeast gene expression during alcoholic fermentation. *Yeast* 20, 1369–1385.
- Rossouw, D., Næs, T., Bauer, F.F., 2008. Linking gene regulation and the exometabolome: A comparative transcriptomics approach to identify genes that impact on the production of volatile aroma compounds in yeast. *BMC Genomics* 9, 530.
- Sablaylorles, J.M., 2009. Control of alcoholic fermentation in winemaking: Current situation and prospect. *Food Research International* 42, 418–424.

- 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.
- 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.
- Saint-Prix, F., Bönquist, L., Dequin, S., 2004. Functional analysis of the ALD gene family of *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic growth on glucose: the NADP+-dependent Ald6p and Ald5p isoforms play a major role in acetate formation. *Microbiology (Reading, Engl.)* 150, 2209–2220.
- Schaaff-Gerstenschläger, I., Mannhaupt, G., Vetter, I., Zimmermann, F.K., Feldmann, H., 1993. *TKL2*, a second transketolase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. Cloning, sequence and deletion analysis of the gene. *Eur. J. Biochem.* 217, 487–492.
- Schmitt, A.P., McEntee, K., 1996. Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 5777–5782.
- Seeboth, P.G., Bohnsack, K., Hollenberg, C.P., 1990. *pdc1(0)* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* give evidence for an additional structural PDC gene: cloning of *PDC5*, a gene homologous to *PDC1*. *J. Bacteriol.* 172, 678–685.
- Sinha, A., Maitra, P.K., 1992. Induction of specific enzymes of the oxidative pentose phosphate pathway by glucono-delta-lactone in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 138, 1865–1873.
- Smith, M.G., Des Etages, S.G., Snyder, M., 2004. Microbial synergy via an ethanol-triggered pathway. *Mol. Cell. Biol.* 24, 3874–3884.
- Smyth, G.K., 2004. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 3, Article3.
- Smyth, G.K., Michaud, J., Scott, H.S., 2005. Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinformatics* 21, 2067–2075.
- Smyth, G.K., Speed, T., 2003. Normalization of cDNA microarray data. *Methods* 31, 265–273.
- Stanford, D.R., Whitney, M.L., Hurto, R.L., Eisaman, D.M., Shen, W.-C., Hopper, A.K., 2004. Division of labor among the yeast Sol proteins implicated in tRNA nuclear export and carbohydrate metabolism. *Genetics* 168, 117–127.
- Tessier, W.D., Meaden, P.G., Dickinson, F.M., Midgley, M., 1998. Identification and disruption of the gene encoding the K(+)-activated acetaldehyde dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 164, 29–34.
- Turoscy, V., Cooper, T.G., 1987. Ureidosuccinate is transported by the allantoin transport system in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 169, 2598–2600.
- Ugliano, M., Travis, B., Francis, I.L., Henschke, P.A., 2010. Volatile Composition and Sensory Properties of Shiraz Wines As Affected by Nitrogen Supplementation and Yeast Species: Rationalizing Nitrogen Modulation of Wine Aroma. *J. Agric. Food Chem.* 58, 12417–12425.
- van den Brink, J., Canelas, A.B., van Gulik, W.M., Pronk, J.T., Heijnen, J.J., de Winde, J.H., Daran-Lapujade, P., 2008. Dynamics of Glycolytic Regulation during Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to Fermentative Metabolism. *Appl Environ Microbiol* 74, 5710–5723.
- Van Der Sluis, C., Rahardjo, Y.S.P., Smit, B.A., Kroon, P.J., Hartmans, S., Ter Schure, E.G., Tramper, J., Wijffels, R., 2002. Concomitant extracellular accumulation of alpha-

- keto acids and higher alcohols by *Zygosaccharomyces rouxii*. J. Biosci. Bioeng. 93, 117–124.
- Verstrepen, K.J., Van Laere, S.D.M., Vanderhaegen, B.M.P., Derdelinckx, G., Dufour, J.-P., Pretorius, I.S., Winderickx, J., Thevelein, J.M., Delvaux, F.R., 2003. Expression Levels of the Yeast Alcohol Acetyltransferase Genes *ATF1*, *Lg-ATF1*, and *ATF2* Control the Formation of a Broad Range of Volatile Esters. Appl. Environ. Microbiol. 69, 5228–5237.
- Verstrepen, K.J., Van Laere, S.D.M., Vercammen, J., Derdelinckx, G., Dufour, J.-P., Pretorius, I.S., Winderickx, J., Thevelein, J.M., Delvaux, F.R., 2004. The *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyl transferase Atf1p is localized in lipid particles. Yeast 21, 367–377.
- 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.
- Walsh, R.B., Kawasaki, G., Fraenkel, D.G., 1983. Cloning of genes that complement yeast hexokinase and glucokinase mutants. J. Bacteriol. 154, 1002–1004.
- Wang, X., Mann, C.J., Bai, Y., Ni, L., Weiner, H., 1998. Molecular cloning, characterization, and potential roles of cytosolic and mitochondrial aldehyde dehydrogenases in ethanol metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 180, 822–830.
- Wu, J., Zhang, N., Hayes, A., Panoutsopoulou, K., Oliver, S.G., 2004. Global analysis of nutrient control of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* during growth and starvation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101, 3148–3153.
- Yoshimoto, H., Fukushige, T., Yonezawa, T., Sone, H., 2002. Genetic and physiological analysis of branched-chain alcohols and isoamyl acetate production in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 59, 501–508.

Données supplémentaires

Les annexes ci-après contiennent les résultats de l'analyse comparative des données d'expression obtenues dans les conditions avec ajout d'azote par rapport à la culture control (troisième étage du MSCF en état stationnaire sans ajout d'azote).

En Annexe 1 sont présentées les données « ajout d'ammonium versus control », et en Annexe 2, les données « ajout de valine versus control »

Annexe 1 :

3ieme étage supplémenté en ammonium versus 3ieme étage témoin

ORF	Functional name	logFC	FC	adj.P.Val
YHR096C	HXT5	-5.63	-49.6	5.8E-21
YOL052C-A	DDR2	-4.96	-31.0	1.7E-15
YMR118C	YMR118C	-4.80	-27.8	3.1E-20
YMR175W	SIP18	-4.73	-26.5	6.3E-13
YGR256W	GND2	-4.53	-23.2	2.5E-20
YBR116C	YBR116C	-4.50	-22.6	2.2E-22
YMR107W	SPG4	-4.27	-19.2	2.5E-16
YIL160C	POT1	-4.16	-17.9	5.8E-11
YDL223C	HBT1	-3.95	-15.4	2.4E-13
YOR348C	PUT4	-3.95	-15.4	4.3E-15
YPL036W	PMA2	-3.93	-15.2	4.2E-16
YPL223C	GRE1	-3.83	-14.2	6.2E-20
YBR117C	TKL2	-3.80	-14.0	1.1E-18
YGR201C	YGR201C	-3.75	-13.5	8.4E-18
YPR192W	AQY1	-3.72	-13.2	1.8E-15
YLR164W	YLR164W	-3.67	-12.7	1.7E-14
YDR070C	FMP16	-3.63	-12.3	7.2E-14
YGR043C	NQM1	-3.56	-11.8	8.8E-13
YIR028W	DAL4	-3.54	-11.7	7.7E-16
YBL075C	SSA3	-3.54	-11.6	1.5E-20
YMR174C	PAI3	-3.52	-11.5	3.4E-14
YGR066C	YGR066C	-3.31	-9.9	1.5E-17
YHR139C	SPS100	-3.29	-9.8	2.9E-17
YDL222C	FMP45	-3.29	-9.7	1.5E-20
YDL218W	YDL218W	-3.22	-9.3	2.8E-19
YER053C-A	YER053C-A	-3.12	-8.7	1.2E-11
YFL014W	HSP12	-2.92	-7.5	3.0E-21
YMR169C	ALD3	-2.90	-7.5	5.3E-08
YOR186W	YOR186W	-2.89	-7.4	4.7E-17
YKL107W	YKL107W	-2.86	-7.2	2.7E-16
YFL030W	AGX1	-2.86	-7.2	3.2E-11
YLR070C	XYL2	-2.85	-7.2	8.8E-09
YPR193C	HPA2	-2.84	-7.1	8.7E-15
YPR151C	SUE1	-2.65	-6.3	3.8E-16
YGR248W	SOL4	-2.60	-6.1	5.5E-15
YGR087C	PDC6	-2.55	-5.9	2.6E-19
YLR312C	QNQ1	-2.54	-5.8	6.9E-13
YIL136W	OM45	-2.47	-5.6	2.0E-15
YML128C	MSC1	-2.45	-5.5	4.4E-10
YIR038C	GTT1	-2.43	-5.4	1.3E-16
YDL210W	UGA4	-2.41	-5.3	7.3E-09
YGR088W	CTT1	-2.37	-5.2	2.1E-14
YDL085W	NDE2	-2.37	-5.2	1.1E-10
YPL186C	UIP4	-2.32	-5.0	3.2E-05
YKR049C	FMP46	-2.32	-5.0	1.7E-18
YMR170C	ALD2	-2.32	-5.0	3.1E-12
YGR190C	YGR190C	-2.32	-5.0	9.1E-11
YJR096W	YJR096W	-2.31	-4.9	5.6E-13
YAL061W	BDH2	-2.30	-4.9	6.2E-13
YDL204W	RTN2	-2.29	-4.9	1.4E-14

ORF	Functional name	logFC	FC	adj.P.Val
YOL126C	MDH2	-2.29	-4.9	6.4E-16
YPL054W	LEE1	-2.26	-4.8	3.1E-12
YBR230C	OM14	-2.24	-4.7	3.8E-16
YHR160C	PEX18	-2.24	-4.7	3.7E-16
YKL163W	PIR3	-2.22	-4.7	5.5E-14
YKR076W	ECM4	-2.21	-4.6	5.6E-05
YDR406W	PDR15	-2.20	-4.6	3.3E-16
YOL084W	PHM7	-2.20	-4.6	6.4E-16
YPL281C	ERR2	-2.13	-4.4	3.9E-04
YOR161C	PNS1	-2.13	-4.4	4.4E-10
YER096W	SHC1	-2.11	-4.3	3.8E-08
YPR149W	NCE102	-2.11	-4.3	2.3E-10
YIR027C	DAL1	-2.09	-4.3	1.5E-10
YNL195C	YNL195C	-2.09	-4.3	1.9E-15
EC1118_1N26_0023g	EC1118_1N26_0023g	-2.06	-4.2	1.2E-12
YOR393W	ERR1	-2.06	-4.2	1.6E-12
YIL099W	SGA1	-2.06	-4.2	2.1E-03
YMR322C	SNO4	-2.04	-4.1	1.1E-10
YDL215C	GDH2	-2.03	-4.1	6.3E-16
YHR138C	YHR138C	-2.00	-4.0	7.3E-11
YOR120W	GCY1	-1.99	-4.0	9.5E-11
YNL052W	COX5A	-1.98	-3.9	2.0E-07
YHL016C	DUR3	-1.98	-3.9	1.8E-10
YBL048W	YBL048W	-1.97	-3.9	1.5E-13
YDL238C	GUD1	-1.97	-3.9	2.1E-14
YLR257W	YLR257W	-1.97	-3.9	9.2E-06
YMR256C	COX7	-1.96	-3.9	8.8E-14
YCR083W	TRX3	-1.96	-3.9	9.4E-16
YOR100C	CRC1	-1.95	-3.9	5.6E-10
YPL280W	HSP32	-1.93	-3.8	5.7E-17
YMR280C	CAT8	-1.92	-3.8	3.2E-15
YIL101C	XBP1	-1.92	-3.8	7.8E-04
YDL169C	UGX2	-1.90	-3.7	7.2E-16
YER037W	PHM8	-1.89	-3.7	2.5E-03
YGL191W	COX13	-1.87	-3.7	2.2E-08
YJL045W	YJL045W	-1.86	-3.6	7.8E-14
YBR208C	DUR1,2	-1.84	-3.6	1.5E-04
YPR030W	CSR2	-1.82	-3.5	1.5E-09
YEL039C	CYC7	-1.80	-3.5	2.6E-08
YNL014W	HEF3	-1.79	-3.5	1.4E-09
YNL065W	AQR1	-1.79	-3.5	2.2E-14
YHR008C	SOD2	-1.78	-3.4	2.6E-14
YIL155C	GUT2	-1.77	-3.4	1.2E-10
YPL230W	USV1	-1.77	-3.4	5.2E-11
YJL163C	YJL163C	-1.77	-3.4	9.0E-13
YLR252W	YLR252W	-1.75	-3.4	2.5E-05
YIL087C	LRC2	-1.75	-3.4	7.6E-13
YPL262W	FUM1	-1.75	-3.4	9.1E-11
YNL202W	SPS19	-1.74	-3.3	5.6E-14
YKL109W	HAP4	-1.72	-3.3	1.5E-03
YGL187C	COX4	-1.71	-3.3	1.6E-07
YBL049W	MOH1	-1.70	-3.2	2.0E-11
YJL161W	FMP33	-1.70	-3.2	1.2E-12
YDR453C	TSA2	-1.69	-3.2	8.9E-11
YOR391C	HSP33	-1.69	-3.2	1.2E-09

ORF	Functional name	logFC	FC	adj.P.Val
YBL030C	PET9	-1.68	-3.2	2.6E-09
YOR173W	DCS2	-1.68	-3.2	1.5E-09
YNL237W	YTP1	-1.67	-3.2	2.8E-12
EC1118_1N26_0012g	EC1118_1N26_0012g	-1.67	-3.2	5.1E-10
YNL274C	GOR1	-1.67	-3.2	4.7E-06
YNL194C	YNL194C	-1.67	-3.2	2.7E-06
YNR014W	YNR014W	-1.66	-3.2	3.3E-12
YOR374W	ALD4	-1.66	-3.2	2.4E-10
YKL093W	MBR1	-1.66	-3.2	6.6E-08
YHR037W	PUT2	-1.65	-3.1	2.1E-10
YDR343C	HXT6	-1.65	-3.1	1.3E-04
YOL151W	GRE2	-1.63	-3.1	6.3E-12
YOR065W	CYT1	-1.63	-3.1	3.3E-12
YLR327C	TMA10	-1.62	-3.1	1.3E-05
YOR028C	CIN5	-1.61	-3.1	1.1E-10
YAL062W	GDH3	-1.61	-3.1	1.5E-12
YGR174C	CBP4	-1.61	-3.1	1.7E-09
YJR152W	DAL5	-1.61	-3.0	1.6E-08
YKR009C	FOX2	-1.61	-3.0	1.3E-06
YKL026C	GPX1	-1.59	-3.0	4.3E-13
YDR342C	HXT7	-1.59	-3.0	5.9E-11
YKR046C	PET10	-1.58	-3.0	3.6E-10
YAL060W	BDH1	-1.57	-3.0	2.8E-11
YKL150W	MCR1	-1.57	-3.0	8.0E-04
YDR529C	QCR7	-1.56	-3.0	4.1E-10
YPR160W	GPH1	-1.56	-3.0	1.6E-09
YER150W	SPI1	-1.56	-2.9	3.3E-06
YMR196W	YMR196W	-1.54	-2.9	2.8E-12
YKL085W	MDH1	-1.54	-2.9	8.1E-11
YLR411W	CTR3	-1.53	-2.9	6.7E-10
YER121W	YER121W	-1.53	-2.9	2.4E-09
YOR215C	AIM41	-1.53	-2.9	8.9E-13
YBR026C	ETR1	-1.53	-2.9	5.0E-15
YBL078C	ATG8	-1.52	-2.9	8.8E-09
YHR140W	YHR140W	-1.52	-2.9	3.5E-07
YIR016W	YIR016W	-1.51	-2.8	8.7E-13
YDL214C	PRR2	-1.51	-2.8	1.2E-10
YKL091C	YKL091C	-1.50	-2.8	3.9E-05
YDR513W	GRX2	-1.50	-2.8	4.9E-04
YNL015W	PBI2	-1.50	-2.8	3.9E-09
YDL049C	KNH1	-1.49	-2.8	5.6E-14
YMR250W	GAD1	-1.48	-2.8	4.5E-12
YOR289W	YOR289W	-1.47	-2.8	3.3E-08
YGR008C	STF2	-1.47	-2.8	9.9E-04
YLR254C	NDL1	-1.47	-2.8	4.2E-13
YNL234W	YNL234W	-1.47	-2.8	3.6E-05
YPL004C	LSP1	-1.45	-2.7	1.0E-03
YOR338W	YOR338W	-1.45	-2.7	2.6E-09
YNL115C	YNL115C	-1.44	-2.7	2.6E-06
YBR285W	YBR285W	-1.44	-2.7	3.0E-10
YGR052W	FMP48	-1.44	-2.7	5.7E-08
YDL024C	DIA3	-1.44	-2.7	1.3E-08
YLR294C	YLR294C	-1.44	-2.7	1.4E-11
YLR251W	SYM1	-1.44	-2.7	4.1E-12
YMR081C	ISF1	-1.44	-2.7	1.5E-05

ORF	Functional name	logFC	FC	adj.P.Val
EC1118_1O4_6623g	EC1118_1O4_6623g	-1.43	-2.7	2.5E-06
YMR323W	ERR3	-1.42	-2.7	4.9E-08
YIL055C	YIL055C	-1.42	-2.7	3.2E-13
YDR048C	YDR048C	-1.42	-2.7	5.7E-04
YJL185C	YJL185C	-1.42	-2.7	6.0E-09
YOR306C	MCH5	-1.42	-2.7	3.7E-07
YJL142C	IRC9	-1.42	-2.7	3.4E-05
YML087C	AIM33	-1.41	-2.7	3.0E-10
YLR178C	TFS1	-1.41	-2.7	6.8E-11
YNR002C	ATO2	-1.41	-2.7	1.3E-04
YER182W	FMP10	-1.41	-2.7	6.8E-11
YIR029W	DAL2	-1.41	-2.7	6.6E-10
YNL200C	YNL200C	-1.40	-2.6	3.4E-11
YPL123C	RNY1	-1.40	-2.6	1.7E-10
YDL130W-A	STF1	-1.40	-2.6	3.0E-04
YBR269C	FMP21	-1.40	-2.6	1.6E-13
YLL041C	SDH2	-1.39	-2.6	1.9E-06
YPR061C	JID1	-1.39	-2.6	8.1E-10
YML054C	CYB2	-1.36	-2.6	7.6E-09
YPR155C	NCA2	-1.36	-2.6	1.2E-15
YJL144W	YJL144W	-1.36	-2.6	2.0E-04
YIR039C	YPS6	-1.36	-2.6	5.5E-12
YGR183C	QCR9	-1.35	-2.6	3.7E-03
YER054C	GIP2	-1.35	-2.5	3.6E-09
YKL188C	PXA2	-1.35	-2.5	1.2E-02
YML081C-A	ATP18	-1.35	-2.5	3.9E-04
YDL200C	MGT1	-1.34	-2.5	3.5E-10
YIL024C	YIL024C	-1.34	-2.5	7.8E-13
YML120C	NDI1	-1.33	-2.5	1.7E-02
YKL062W	MSN4	-1.33	-2.5	7.9E-06
YHR051W	COX6	-1.33	-2.5	7.5E-14
YCR045C	YCR045C	-1.32	-2.5	1.2E-12
YGL096W	TOS8	-1.32	-2.5	3.2E-05
YDR504C	SPG3	-1.31	-2.5	1.1E-12
YDL239C	ADY3	-1.31	-2.5	1.5E-08
YER028C	MIG3	-1.31	-2.5	2.2E-07
YPR127W	YPR127W	-1.30	-2.5	3.0E-11
YDR256C	CTA1	-1.30	-2.5	1.2E-06
YCL033C	YCL033C	-1.30	-2.5	9.4E-12
YIL117C	PRM5	-1.29	-2.5	2.1E-10
YPL134C	ODC1	-1.29	-2.5	1.0E-03
YPL171C	OYE3	-1.29	-2.4	4.7E-05
YBR212W	NGR1	-1.29	-2.4	4.8E-12
YJR048W	CYC1	-1.29	-2.4	1.8E-07
YJL137C	GLG2	-1.29	-2.4	4.3E-15
YBR114W	RAD16	-1.29	-2.4	2.4E-13
YNR034W-A	YNR034W-A	-1.29	-2.4	3.3E-07
YNL270C	ALP1	-1.28	-2.4	1.7E-09
YIL045W	PIG2	-1.28	-2.4	6.7E-06
YJR008W	YJR008W	-1.28	-2.4	4.0E-03
YOR292C	YOR292C	-1.28	-2.4	6.2E-03
YDR276C	PMP3	-1.27	-2.4	4.4E-12
YDR085C	AFR1	-1.26	-2.4	8.0E-04
YPR020W	ATP20	-1.26	-2.4	1.6E-06
YDR492W	IZH1	-1.26	-2.4	1.7E-08
YDR533C	HSP31	-1.26	-2.4	3.2E-02

ORF	Functional name	logFC	FC	adj.P.Val
YDL086W	YDL086W	-1.26	-2.4	2.6E-03
YOL048C	YOL048C	-1.25	-2.4	2.2E-07
YKL050C	YKL050C	-1.25	-2.4	4.0E-02
YEL060C	PRB1	-1.25	-2.4	2.9E-11
YDR270W	CCC2	-1.25	-2.4	6.2E-10
YFR033C	QCR6	-1.24	-2.4	2.7E-06
YDL181W	INH1	-1.24	-2.4	5.6E-05
YHR209W	CRG1	-1.24	-2.4	3.9E-06
YER142C	MAG1	-1.24	-2.4	1.8E-13
YBR006W	UGA2	-1.24	-2.4	3.3E-08
YLR311C	YLR311C	-1.24	-2.4	7.8E-08
YKL151C	YKL151C	-1.23	-2.4	7.9E-13
YBL015W	ACH1	-1.23	-2.3	6.4E-09
YMR206W	YMR206W	-1.23	-2.3	3.5E-09
YGR053C	YGR053C	-1.22	-2.3	8.5E-12
YOL077W-A	ATP19	-1.22	-2.3	1.9E-07
YPR026W	ATH1	-1.22	-2.3	1.1E-04
YMR136W	GAT2	-1.22	-2.3	6.2E-15
YGR110W	YGR110W	-1.21	-2.3	3.7E-09
YAL034C	FUN19	-1.21	-2.3	2.0E-05
YLR038C	COX12	-1.21	-2.3	2.1E-06
YMR041C	ARA2	-1.21	-2.3	6.8E-04
YGL205W	POX1	-1.21	-2.3	2.8E-04
YDR178W	SDH4	-1.21	-2.3	6.3E-12
YGL208W	SIP2	-1.20	-2.3	1.3E-06
YLR080W	EMP46	-1.20	-2.3	5.8E-11
YDL004W	ATP16	-1.20	-2.3	3.8E-14

ORF	Functional name	logFC	FC	adj.P.Val
YJR156C	THI11	6.35	81.6	9.3E-15
YDL244W	THI13	6.19	72.9	5.1E-18
YFL058W	THI5	6.12	69.5	1.2E-12
YNL332W	THI12	6.10	68.4	3.1E-14
YPR121W	THI22	5.33	40.1	1.8E-19
YBR092C	PHO3	4.97	31.3	1.2E-15
YCR020C	PET18	4.36	20.5	1.4E-20
YOR192C	THI72	3.90	14.9	3.1E-20
YJR010W	MET3	3.83	14.3	3.4E-16
YGR144W	THI4	3.78	13.7	9.9E-15
YPL258C	THI21	3.77	13.6	3.1E-20
YKL001C	MET14	3.68	12.9	1.7E-10
YLR303W	MET17	3.61	12.2	4.3E-15
YMR305C	SCW10	3.50	11.3	5.6E-23
YOL159C	YOL159C	3.49	11.2	9.3E-20
YEL071W	DLD3	3.41	10.6	8.2E-17
YFL059W	SNZ3	3.40	10.5	8.4E-21
YNL333W	SNZ2	3.30	9.8	1.5E-20
YLR372W	SUR4	3.19	9.2	1.1E-21
YML123C	PHO84	3.12	8.7	9.4E-18
YNL331C	AAD14	3.12	8.7	7.7E-16
YML058W-A	HUG1	3.11	8.6	3.0E-14
YLR134W	PDC5	3.11	8.6	1.6E-12
YAL012W	CYS3	3.08	8.4	1.5E-20
YFR030W	MET10	3.05	8.3	3.1E-20
YMR304C-A	YMR304C-A	2.98	7.9	1.1E-18
YLR092W	SUL2	2.89	7.4	9.7E-19
YOR010C	TIR2	2.83	7.1	6.9E-19
YLL024C	SSA2	2.82	7.0	2.4E-16
YPR167C	MET16	2.79	6.9	1.5E-17
YJR137C	ECM17	2.68	6.4	8.6E-19
YKR013W	PRY2	2.66	6.3	9.8E-21
YER070W	RNR1	2.62	6.2	8.9E-10
YEL040W	UTR2	2.59	6.0	3.5E-17
YOR108W	LEU9	2.54	5.8	1.3E-12
YOR009W	TIR4	2.54	5.8	6.5E-12
YAR071W	PHO11	2.52	5.7	1.1E-12
YOL055C	THI20	2.52	5.7	7.0E-20
YDR438W	THI74	2.52	5.7	1.7E-20
YBR249C	ARO4	2.51	5.7	4.2E-16
YLR180W	SAM1	2.50	5.7	1.3E-13
YCR005C	CIT2	2.49	5.6	1.5E-09
YML027W	YOX1	2.49	5.6	2.0E-15
YNL289W	PCL1	2.46	5.5	1.1E-13
YNR056C	BIO5	2.45	5.5	6.3E-17
YNL277W	MET2	2.45	5.5	1.1E-17
YER052C	HOM3	2.44	5.4	1.2E-12
YER091C	MET6	2.38	5.2	2.8E-10
YIL011W	TIR3	2.35	5.1	4.0E-08
YJR016C	ILV3	2.32	5.0	5.0E-18
YIL074C	SER33	2.32	5.0	8.0E-04
YJL200C	ACO2	2.30	4.9	2.6E-06
YBR162C	TOS1	2.29	4.9	3.2E-11
YJL153C	INO1	2.28	4.8	4.7E-18

ORF	Functional name	logFC	FC	adj.P.Val
YBR240C	THI2	2.27	4.8	1.4E-09
YNL300W	YNL300W	2.27	4.8	1.2E-12
YOR375C	GDH1	2.26	4.8	1.8E-17
YJL158C	CIS3	2.25	4.8	8.9E-04
YIL123W	SIM1	2.24	4.7	1.6E-09
YOR011W	AUS1	2.23	4.7	2.4E-04
YCL030C	HIS4	2.21	4.6	4.3E-13
YGR177C	ATF2	2.16	4.5	8.1E-14
YDL039C	PRM7	2.16	4.5	1.1E-09
YCR034W	FEN1	2.15	4.4	6.9E-13
YOR248W	YOR248W	2.15	4.4	4.3E-15
YDL039C	PRM7	2.14	4.4	4.8E-08
YDL059C	RAD59	2.13	4.4	6.1E-17
YPL273W	SAM4	2.13	4.4	1.6E-15
YGL202W	ARO8	2.13	4.4	1.8E-09
YPL272C	YPL272C	2.11	4.3	2.4E-14
YPL214C	THI6	2.10	4.3	1.3E-16
YHR068W	DYS1	2.09	4.3	3.1E-20
YDL003W	MCD1	2.09	4.3	1.5E-08
YJL172W	CPS1	2.09	4.3	4.0E-05
YMR321C	YMR321C	2.08	4.2	3.5E-18
YJR150C	DAN1	2.06	4.2	2.8E-06
YGL147C	RPL9A	2.06	4.2	6.8E-14
YLL062C	MHT1	2.06	4.2	2.7E-11
YPL250C	ICY2	2.05	4.2	5.0E-09
YER081W	SER3	2.04	4.1	5.7E-14
YJL190C	RPS22A	2.02	4.1	6.3E-17
YPL081W	RPS9A	2.02	4.1	1.6E-16
YLR183C	TOS4	2.00	4.0	7.7E-16
YER055C	HIS1	2.00	4.0	2.1E-07
YDR044W	HEM13	1.99	4.0	6.8E-15
YKL029C	MAE1	1.99	4.0	3.7E-17
YEL073C	YEL073C	1.98	3.9	2.9E-17
YLL055W	YCT1	1.97	3.9	8.6E-14
YER060W-A	FCY22	1.95	3.9	6.4E-09
YLL061W	MMP1	1.94	3.8	1.2E-04
YNR058W	BIO3	1.94	3.8	2.9E-10
YIR017C	MET28	1.91	3.8	4.7E-13
YML056C	IMD4	1.91	3.7	5.3E-05
YOR315W	SFG1	1.89	3.7	8.9E-08
YAL065C	YAL065C	1.88	3.7	1.5E-17
YDR222W	YDR222W	1.85	3.6	1.7E-09
YMR096W	SNZ1	1.85	3.6	3.3E-08
YPL256C	CLN2	1.83	3.6	7.7E-09
YLR355C	ILV5	1.83	3.5	9.6E-11
YBR085W	AAC3	1.82	3.5	1.7E-12
YOL064C	MET22	1.82	3.5	9.3E-10
YNR057C	BIO4	1.82	3.5	7.7E-09
YMR116C	ASC1	1.82	3.5	1.9E-04
YOR247W	SRL1	1.81	3.5	1.2E-12
YDR502C	SAM2	1.80	3.5	2.3E-09
YLR004C	THI73	1.80	3.5	3.3E-15
YJL177W	RPL17B	1.80	3.5	1.8E-06
YER073W	ALD5	1.80	3.5	3.0E-12
YOL039W	RPP2A	1.79	3.5	4.0E-16
YOR222W	ODC2	1.79	3.4	1.9E-17

ORF	Functional name	logFC	FC	adj.P.Val
YOL120C	RPL18A	1.78	3.4	1.8E-09
YLL058W	YLL058W	1.78	3.4	1.7E-09
YHR208W	BAT1	1.78	3.4	8.0E-10
YGL076C	RPL7A	1.77	3.4	2.6E-08
YOL140W	ARG8	1.77	3.4	4.4E-10
YPL160W	CDC60	1.77	3.4	1.3E-09
YDR127W	ARO1	1.77	3.4	2.7E-12
YOR237W	HES1	1.75	3.4	4.5E-06
YGR109C	CLB6	1.75	3.4	8.5E-11
YGR108W	CLB1	1.75	3.4	1.6E-14
YHR018C	ARG4	1.73	3.3	1.1E-14
YMR199W	CLN1	1.73	3.3	3.8E-07
YLR089C	ALT1	1.72	3.3	1.5E-16
YNL334C	SNO2	1.72	3.3	1.3E-12
YDR158W	HOM2	1.72	3.3	1.1E-14
YBR213W	MET8	1.70	3.2	8.1E-14
YOL007C	CSI2	1.69	3.2	3.3E-11
YLR121C	YPS3	1.69	3.2	3.9E-09
YOR096W	RPS7A	1.69	3.2	8.5E-07
YBR021W	FUR4	1.69	3.2	1.2E-12
YPR175W	DPB2	1.68	3.2	7.1E-09
YER131W	RPS26B	1.68	3.2	4.6E-08
YBR025C	OLA1	1.68	3.2	2.1E-11
YLR448W	RPL6B	1.67	3.2	1.0E-12
YEL054C	RPL12A	1.67	3.2	5.4E-04
YNL220W	ADE12	1.66	3.2	2.6E-13
YIL018W	RPL2B	1.65	3.1	3.6E-11
YGR034W	RPL26B	1.65	3.1	2.4E-12
YBL002W	HTB2	1.65	3.1	7.3E-11
YBR189W	RPS9B	1.64	3.1	1.0E-02
YKL120W	OAC1	1.63	3.1	2.3E-13
YLR264W	RPS28B	1.63	3.1	5.8E-07
YLR367W	RPS22B	1.63	3.1	3.2E-13
YDR541C	YDR541C	1.63	3.1	5.0E-10
YMR215W	GAS3	1.63	3.1	1.4E-04
YIL145C	PAN6	1.63	3.1	2.4E-14
YMR173W-A	YMR173W-A	1.62	3.1	1.3E-07
YNL283C	WSC2	1.61	3.1	5.9E-05
YDR261C	EXG2	1.61	3.0	3.5E-04
YHR112C	YHR112C	1.60	3.0	5.2E-10
YHR020W	YHR020W	1.60	3.0	2.9E-09
YGR189C	CRH1	1.60	3.0	1.8E-12
YBR191W	RPL21A	1.60	3.0	1.5E-10
YMR120C	ADE17	1.58	3.0	2.5E-07
YLR432W	IMD3	1.58	3.0	2.5E-10
YEL029C	BUD16	1.57	3.0	5.0E-12
YML063W	RPS1B	1.56	2.9	2.0E-10
YPR102C	RPL11A	1.56	2.9	1.9E-10
YLR060W	FRS1	1.56	2.9	2.4E-14
YGL117W	YGL117W	1.56	2.9	2.5E-05
YKL006W	RPL14A	1.56	2.9	9.7E-13
YOR143C	THI80	1.55	2.9	3.7E-16
YHR216W	IMD2	1.55	2.9	5.9E-06
YNL104C	LEU4	1.54	2.9	5.5E-16
EC1118_1O4_6491g	EC1118_1O4_6491g	1.54	2.9	2.6E-08
YDL229W	SSB1	1.54	2.9	1.5E-09

ORF	Functional name	logFC	FC	adj.P.Val
YLL045C	RPL8B	1.54	2.9	1.5E-07
YJR094W-A	RPL43B	1.54	2.9	2.8E-06
YBR088C	POL30	1.54	2.9	4.8E-14
YBR084W	MIS1	1.53	2.9	2.6E-10
YGL225W	VRG4	1.52	2.9	6.9E-13
YLR406C	RPL31B	1.52	2.9	4.5E-12
YLR048W	RPS0B	1.52	2.9	3.3E-09
YDL055C	PSA1	1.52	2.9	4.8E-15
YIL066C	RNR3	1.51	2.9	1.7E-13
YOL166C	YOL166C	1.51	2.9	1.1E-08
YDR098C	GRX3	1.51	2.9	4.7E-13
YKL180W	RPL17A	1.51	2.9	1.0E-09
YOR074C	CDC21	1.50	2.8	2.0E-05
YGL125W	MET13	1.50	2.8	2.0E-04
YLR103C	CDC45	1.49	2.8	1.9E-10
YGL123W	RPS2	1.49	2.8	4.6E-11
YAL063C	FLO9	1.49	2.8	1.3E-05
YGR124W	ASN2	1.49	2.8	9.6E-09
YPL131W	RPL5	1.48	2.8	3.0E-08
YDR321W	ASP1	1.48	2.8	2.7E-09
YAL007C	ERP2	1.48	2.8	2.7E-14
YMR241W	YHM2	1.48	2.8	3.4E-08
YBR104W	YMC2	1.47	2.8	9.7E-08
YDL081C	RPP1A	1.47	2.8	5.6E-13
YDL182W	LYS20	1.47	2.8	2.2E-08
YHR215W	PHO12	1.47	2.8	1.4E-09
YLR058C	SHM2	1.47	2.8	1.6E-09
YGL184C	STR3	1.47	2.8	1.4E-14
YHR010W	RPL27A	1.46	2.8	2.4E-12
YGR155W	CYS4	1.46	2.8	1.4E-12
YBL087C	RPL23A	1.46	2.8	7.8E-08
YDR253C	MET32	1.46	2.7	5.9E-07
YER090W	TRP2	1.46	2.7	3.8E-04
YLR034C	SMF3	1.45	2.7	1.6E-15
YOR361C	PRT1	1.45	2.7	1.3E-13
YBR048W	RPS11B	1.45	2.7	7.3E-13
YDL082W	RPL13A	1.45	2.7	4.5E-11
YKR069W	MET1	1.44	2.7	8.0E-05
YFR031C-A	RPL2A	1.44	2.7	8.8E-13
YNL302C	RPS19B	1.44	2.7	5.4E-12
YHL015W	RPS20	1.44	2.7	2.3E-13
YPL163C	SVS1	1.44	2.7	1.2E-03
YML026C	RPS18B	1.43	2.7	1.4E-03
YDR025W	RPS11A	1.43	2.7	2.1E-05
YER069W	ARG5,6	1.42	2.7	9.6E-10
YOR184W	SER1	1.42	2.7	4.2E-15
YDL083C	RPS16B	1.42	2.7	7.1E-15
YMR062C	ECM40	1.42	2.7	4.1E-07
YMR122W-A	YMR122W-A	1.42	2.7	2.2E-10
YFL060C	SNO3	1.41	2.7	2.0E-04
YNL301C	RPL18B	1.41	2.7	2.0E-09
YOL014W	YOL014W	1.41	2.7	4.5E-12
YNL209W	SSB2	1.41	2.7	7.7E-06
YLR441C	RPS1A	1.41	2.7	8.3E-11
YBR145W	ADH5	1.41	2.7	2.4E-11
YDL131W	LYS21	1.41	2.7	2.6E-05

ORF	Functional name	logFC	FC	adj.P.Val
YGL026C	TRP5	1.41	2.7	2.6E-09
YJL080C	SCP160	1.40	2.6	3.9E-11
YOL058W	ARG1	1.39	2.6	7.2E-08
YFL031W	HAC1	1.39	2.6	1.1E-10
YDR064W	RPS13	1.38	2.6	2.9E-05
YGL031C	RPL24A	1.38	2.6	1.1E-03
YKL081W	TEF4	1.38	2.6	4.7E-07
YGR085C	RPL11B	1.38	2.6	1.0E-10
YGL234W	ADE5,7	1.37	2.6	2.5E-10
YHR025W	THR1	1.37	2.6	6.5E-08
YNL217W	YNL217W	1.37	2.6	2.2E-11
YHR211W	FLO5	1.37	2.6	4.0E-09
YDR400W	URH1	1.37	2.6	6.2E-13
YLR237W	THI7	1.36	2.6	4.1E-05
YER102W	RPS8B	1.36	2.6	4.5E-07
YDR144C	MKC7	1.36	2.6	5.7E-04
YMR230W	RPS10B	1.36	2.6	2.1E-07
YJR145C	RPS4A	1.36	2.6	1.1E-10
YNL067W	RPL9B	1.36	2.6	2.6E-10
YLR179C	YLR179C	1.36	2.6	3.0E-05
YMR006C	PLB2	1.36	2.6	1.7E-10
YGR191W	HIP1	1.36	2.6	1.4E-08
YJR143C	PMT4	1.35	2.6	1.3E-08
YJL130C	URA2	1.35	2.6	5.1E-05
YCL026C-B	HBN1	1.35	2.6	4.3E-13
YDL158C	YDL158C	1.35	2.5	6.6E-12
YHR019C	DED81	1.34	2.5	2.7E-07
YER117W	RPL23B	1.34	2.5	6.7E-06
YLR150W	STM1	1.33	2.5	8.2E-11
YKL128C	PMU1	1.33	2.5	8.3E-05
YLR359W	ADE13	1.33	2.5	4.1E-09
YLR301W	YLR301W	1.33	2.5	2.6E-14
YJR151C	DAN4	1.33	2.5	1.0E-10
YER011W	TIR1	1.33	2.5	3.9E-04
YKL101W	HSL1	1.32	2.5	2.6E-08
YGL148W	ARO2	1.32	2.5	2.0E-03
YDR012W	RPL4B	1.32	2.5	3.0E-03
YGR204W	ADE3	1.31	2.5	4.3E-13
YHL036W	MUP3	1.31	2.5	1.7E-03
YBL076C	ILS1	1.31	2.5	3.3E-09
YMR144W	YMR144W	1.31	2.5	3.8E-07
YLR029C	RPL15A	1.31	2.5	1.3E-09
YLR325C	RPL38	1.31	2.5	3.2E-05
YNR050C	LYS9	1.30	2.5	5.3E-08
YBR248C	HIS7	1.30	2.5	2.1E-10
YLR045C	STU2	1.30	2.5	4.0E-10
YPR196W	YPR196W	1.30	2.5	8.3E-09
YIR034C	LYS1	1.30	2.5	7.3E-07
YAR073W	IMD1	1.30	2.5	2.0E-08
YPL183C	RTT10	1.30	2.5	2.9E-09
YHL033C	RPL8A	1.30	2.5	8.0E-07
YIL094C	LYS12	1.29	2.5	1.3E-05
YAL023C	PMT2	1.29	2.4	1.4E-06
YOR203W	YOR203W	1.29	2.4	1.7E-11
YCR053W	THR4	1.29	2.4	1.4E-14
YLR340W	RPP0	1.28	2.4	2.3E-11

ORF	Functional name	logFC	FC	adj.P.Val
YKR080W	MTD1	1.28	2.4	6.6E-13
YOL090W	MSH2	1.28	2.4	1.9E-06
YHR049W	FSH1	1.28	2.4	8.8E-05
YJR154W	YJR154W	1.27	2.4	2.1E-08
YPR010C	RPA135	1.27	2.4	3.2E-12
YOL017W	ESC8	1.27	2.4	5.6E-13
YEL001C	IRC22	1.27	2.4	3.0E-06
YMR307W	GAS1	1.27	2.4	3.4E-06
YHR089C	GAR1	1.27	2.4	7.2E-08
YJL136C	RPS21B	1.26	2.4	7.6E-11
YBL081W	YBL081W	1.26	2.4	3.3E-10
YNL072W	RNH201	1.26	2.4	2.4E-12
YOR293W	RPS10A	1.26	2.4	2.0E-04
YBR115C	LYS2	1.25	2.4	1.0E-07
YGL027C	CWH41	1.25	2.4	3.3E-06
YFL022C	FRS2	1.25	2.4	3.2E-08
YDR518W	EUG1	1.25	2.4	1.9E-13
YKL043W	PHD1	1.25	2.4	9.5E-05
YGR138C	TPO2	1.25	2.4	1.0E-11
YNL069C	RPL16B	1.25	2.4	4.1E-12
YOR226C	ISU2	1.25	2.4	2.2E-08
YEL072W	RMD6	1.24	2.4	1.5E-04
YPL090C	RPS6A	1.24	2.4	7.9E-03
YGR065C	VHT1	1.24	2.4	1.8E-09
YLR388W	RPS29A	1.24	2.4	1.9E-04
YBR243C	ALG7	1.24	2.4	1.8E-10
YOR063W	RPL3	1.23	2.3	5.2E-07
YMR279C	YMR279C	1.23	2.3	1.1E-06
YDR471W	RPL27B	1.23	2.3	1.1E-11
YML018C	YML018C	1.22	2.3	1.4E-12
YKR057W	RPS21A	1.22	2.3	1.5E-06
YOL097C	WRS1	1.22	2.3	4.5E-10
YDL066W	IDP1	1.22	2.3	4.2E-08
YPR159W	KRE6	1.22	2.3	1.0E-07
YDL085C-A	YDL085C-A	1.21	2.3	4.1E-09
YKL056C	TMA19	1.21	2.3	5.9E-08
YMR143W	RPS16A	1.21	2.3	1.1E-03
YHR061C	GIC1	1.21	2.3	9.1E-08
YFR055W	IRC7	1.20	2.3	3.3E-04
YOR224C	RPB8	1.20	2.3	2.3E-12

Annexe 2 :

3ieme étage supplémenté en valine versus 3ieme étage témoin

ORF	Functional name	logFC	FC	adj.P.Val
YHR096C	HXT5	-4.91	-30.1	1.4E-18
YOL052C-A	DDR2	-4.56	-23.6	1.2E-13
YMR175W	SIP18	-4.49	-22.5	1.6E-11
YMR118C	YMR118C	-4.44	-21.8	3.5E-18
YIR028W	DAL4	-4.39	-21.0	4.9E-17
YIL160C	POT1	-4.27	-19.3	2.3E-10
YBR116C	YBR116C	-4.16	-17.8	2.1E-20
YMR107W	SPG4	-4.02	-16.2	1.0E-14
YGR256W	GND2	-3.96	-15.6	8.9E-18
YDL223C	HBT1	-3.83	-14.2	4.1E-12
YDR070C	FMP16	-3.69	-12.9	4.4E-13
YER053C-A	YER053C-A	-3.57	-11.9	4.3E-12
YPR192W	AQY1	-3.55	-11.7	5.5E-14
YBR117C	TKL2	-3.44	-10.8	1.7E-16
YBL075C	SSA3	-3.41	-10.6	5.6E-19
YPL036W	PMA2	-3.41	-10.6	1.2E-13
YLR164W	YLR164W	-3.20	-9.2	3.6E-12
YGR201C	YGR201C	-3.20	-9.2	4.1E-15
YGR066C	YGR066C	-3.14	-8.8	6.1E-16
YDL218W	YDL218W	-3.05	-8.3	1.3E-17
YDL222C	FMP45	-3.05	-8.3	1.3E-18
YMR169C	ALD3	-3.03	-8.2	1.2E-07
YHR139C	SPS100	-2.89	-7.4	6.9E-15
YMR174C	PAI3	-2.86	-7.2	3.6E-11
YPL223C	GRE1	-2.85	-7.2	1.2E-15
YGR043C	NQM1	-2.75	-6.7	2.1E-09
YOR186W	YOR186W	-2.73	-6.7	1.9E-15
YPR193C	HPA2	-2.72	-6.6	2.2E-13
YKL107W	YKL107W	-2.69	-6.5	1.2E-14
YPR151C	SUE1	-2.68	-6.4	3.0E-15
YLR070C	XYL2	-2.67	-6.3	1.7E-07
YIL136W	OM45	-2.63	-6.2	4.8E-15
YDR406W	PDR15	-2.59	-6.0	6.5E-17
YGR088W	CTT1	-2.49	-5.6	6.3E-14
YIR038C	GTT1	-2.46	-5.5	9.4E-16
YGR248W	SOL4	-2.46	-5.5	2.0E-13
YFL030W	AGX1	-2.39	-5.2	9.3E-09
YPR149W	NCE102	-2.33	-5.0	2.0E-10
YML128C	MSC1	-2.31	-5.0	9.8E-09
YFL014W	HSP12	-2.26	-4.8	8.9E-18
YNL195C	YNL195C	-2.24	-4.7	3.9E-15
YBR230C	OM14	-2.24	-4.7	4.0E-15
YIR029W	DAL2	-2.22	-4.7	1.9E-13
YOR161C	PNS1	-2.20	-4.6	1.5E-09
YDL085W	NDE2	-2.17	-4.5	4.9E-09
YDL204W	RTN2	-2.16	-4.5	4.6E-13
YOR065W	CYT1	-2.15	-4.4	5.3E-14
YKR076W	ECM4	-2.14	-4.4	2.7E-04

ORF	Functional name	logFC	FC	adj.P.Val
YMR256C	COX7	-2.13	-4.4	1.2E-13
YHR160C	PEX18	-2.12	-4.3	1.4E-14
YOR348C	PUT4	-2.09	-4.3	4.1E-08
YOL084W	PHM7	-2.09	-4.3	2.1E-14
YEL039C	CYC7	-2.06	-4.2	1.1E-08
YAL061W	BDH2	-2.04	-4.1	7.2E-11
YKR049C	FMP46	-2.02	-4.1	5.9E-16
YKL163W	PIR3	-1.99	-4.0	5.8E-12
YLR312C	QNQ1	-1.96	-3.9	1.6E-09
YER096W	SHC1	-1.93	-3.8	9.6E-07
YNL015W	PBI2	-1.93	-3.8	1.2E-10
YGL191W	COX13	-1.93	-3.8	6.6E-08
YLR252W	YLR252W	-1.93	-3.8	2.3E-05
YIL099W	SGA1	-1.91	-3.8	7.8E-03
YIL087C	LRC2	-1.88	-3.7	1.3E-12
YJR096W	YJR096W	-1.87	-3.6	4.9E-10
YPL186C	UIP4	-1.86	-3.6	1.2E-03
YNL052W	COX5A	-1.86	-3.6	2.7E-06
YIR027C	DAL1	-1.85	-3.6	1.3E-08
YIL155C	GUT2	-1.83	-3.6	4.2E-10
YGR052W	FMP48	-1.82	-3.5	3.5E-09
YMR280C	CAT8	-1.80	-3.5	1.5E-13
YOR120W	GCY1	-1.80	-3.5	5.5E-09
YPR160W	GPH1	-1.80	-3.5	5.5E-10
YNL065W	AQR1	-1.79	-3.5	2.0E-13
YDR529C	QCR7	-1.79	-3.5	1.6E-10
YKL109W	HAP4	-1.79	-3.5	2.3E-03
YJL045W	YJL045W	-1.79	-3.4	1.7E-12
YOR374W	ALD4	-1.78	-3.4	3.4E-10
YER054C	GIP2	-1.78	-3.4	7.1E-11
YCR083W	TRX3	-1.78	-3.4	1.0E-13
YGR174C	CBP4	-1.77	-3.4	1.6E-09
YJR048W	CYC1	-1.77	-3.4	2.3E-09
YDR453C	TSA2	-1.76	-3.4	2.4E-10
YNL274C	GOR1	-1.76	-3.4	7.6E-06
YGL187C	COX4	-1.76	-3.4	4.8E-07
YDL210W	UGA4	-1.75	-3.4	9.6E-06
YOR306C	MCH5	-1.75	-3.4	4.1E-08
YPR030W	CSR2	-1.74	-3.3	2.5E-08
YKL150W	MCR1	-1.73	-3.3	7.3E-04
YDR513W	GRX2	-1.73	-3.3	2.6E-04
YMR170C	ALD2	-1.72	-3.3	1.4E-08
YDR343C	HXT6	-1.72	-3.3	2.3E-04
YIL101C	XBP1	-1.71	-3.3	5.3E-03
YHR008C	SOD2	-1.71	-3.3	6.6E-13
YML087C	AIM33	-1.71	-3.3	3.6E-11
YNL237W	YTP1	-1.70	-3.3	1.5E-11
YER037W	PHM8	-1.70	-3.3	1.2E-02
YDL130W-A	STF1	-1.70	-3.2	8.2E-05
YNL014W	HEF3	-1.70	-3.2	2.6E-08
YHR138C	YHR138C	-1.69	-3.2	1.6E-08
YGR183C	QCR9	-1.68	-3.2	1.1E-03
YOL077W-A	ATP19	-1.68	-3.2	2.3E-09

ORF	Functional name	logFC	FC	adj.P.Val
YOR173W	DCS2	-1.68	-3.2	1.0E-08
YML081C-A	ATP18	-1.67	-3.2	8.1E-05
YPL281C	ERR2	-1.67	-3.2	8.7E-03
YOR393W	ERR1	-1.67	-3.2	1.3E-09
YOR100C	CRC1	-1.67	-3.2	7.7E-08
YIR016W	YIR016W	-1.66	-3.2	7.9E-13
YOL126C	MDH2	-1.65	-3.1	1.2E-11
YJL161W	FMP33	-1.64	-3.1	2.3E-11
YBL043W	ECM13	-1.64	-3.1	4.6E-07
YAL062W	GDH3	-1.63	-3.1	9.9E-12
YNL202W	SPS19	-1.63	-3.1	2.3E-12
YKL026C	GPX1	-1.63	-3.1	2.2E-12
YDR342C	HXT7	-1.61	-3.1	3.1E-10
YBR026C	ETR1	-1.61	-3.0	1.4E-14
YOL151W	GRE2	-1.60	-3.0	8.2E-11
YER150W	SPI1	-1.60	-3.0	8.8E-06
YJR008W	YJR008W	-1.60	-3.0	1.2E-03
YMR250W	GAD1	-1.59	-3.0	6.6E-12
YPL054W	LEE1	-1.59	-3.0	3.9E-08
YOR028C	CIN5	-1.58	-3.0	1.1E-09
YJL163C	YJL163C	-1.58	-3.0	9.1E-11
YMR105C	PGM2	-1.58	-3.0	1.5E-08
YBR208C	DUR1,2	-1.57	-3.0	2.2E-03
YPR044C	OPI11	-1.55	-2.9	1.4E-06
YBR242W	YBR242W	-1.55	-2.9	1.5E-02
YGR087C	PDC6	-1.55	-2.9	5.2E-13
YER121W	YER121W	-1.55	-2.9	1.2E-08
YAL060W	BDH1	-1.53	-2.9	3.3E-10
YKL085W	MDH1	-1.53	-2.9	5.8E-10
YDL214C	PRR2	-1.53	-2.9	6.1E-10
YKL093W	MBR1	-1.53	-2.9	1.4E-06
YKL091C	YKL091C	-1.53	-2.9	9.5E-05
YMR322C	SNO4	-1.52	-2.9	2.3E-07
YPR127W	YPR127W	-1.52	-2.9	6.7E-12
YNL200C	YNL200C	-1.52	-2.9	4.2E-11
YGR008C	STF2	-1.52	-2.9	1.7E-03
YPL280W	HSP32	-1.51	-2.8	2.0E-13
YER182W	FMP10	-1.51	-2.8	1.1E-10
YDR256C	CTA1	-1.50	-2.8	4.8E-07
YBR241C	YBR241C	-1.49	-2.8	3.8E-10
YGR035C	YGR035C	-1.49	-2.8	7.7E-07
YOR215C	AIM41	-1.48	-2.8	1.4E-11
YLL041C	SDH2	-1.48	-2.8	2.8E-06
YLR251W	SYM1	-1.47	-2.8	2.0E-11
YNL115C	YNL115C	-1.47	-2.8	7.9E-06
YDR492W	IZH1	-1.47	-2.8	4.7E-09
YIR039C	YPS6	-1.46	-2.8	8.0E-12
EC1118_1O4_6623g	EC1118_1O4_6623g	-1.46	-2.8	7.2E-06
YDL238C	GUD1	-1.46	-2.7	1.7E-10
YDL110C	TMA17	-1.46	-2.7	4.0E-13
YNL234W	YNL234W	-1.45	-2.7	1.3E-04
YPR020W	ATP20	-1.44	-2.7	6.9E-07
YMR070W	MOT3	-1.44	-2.7	1.7E-09

ORF	Functional name	logFC	FC	adj.P.Val
YBL048W	YBL048W	-1.44	-2.7	1.4E-09
YKR009C	FOX2	-1.44	-2.7	2.9E-05
YOR391C	HSP33	-1.44	-2.7	1.6E-07
YLR327C	TMA10	-1.43	-2.7	2.2E-04
YDR276C	PMP3	-1.43	-2.7	2.5E-12
YCL033C	YCL033C	-1.43	-2.7	7.9E-12
YLR109W	AHP1	-1.42	-2.7	4.2E-08
YPL004C	LSP1	-1.42	-2.7	3.1E-03
YBL030C	PET9	-1.41	-2.7	4.2E-07
YPR184W	GDB1	-1.41	-2.7	3.8E-07
YBR114W	RAD16	-1.41	-2.7	2.4E-13
YBR120C	CBP6	-1.41	-2.7	1.2E-04
YDR366C	YDR366C	-1.40	-2.6	1.3E-02
YPR155C	NCA2	-1.40	-2.6	6.1E-15
YLR108C	YLR108C	-1.40	-2.6	5.9E-07
YDR074W	TPS2	-1.39	-2.6	1.2E-04
YHR140W	YHR140W	-1.39	-2.6	6.2E-06
YDR048C	YDR048C	-1.39	-2.6	1.7E-03
YLR294C	YLR294C	-1.39	-2.6	2.2E-10
YGR053C	YGR053C	-1.39	-2.6	3.8E-12
YPL142C	YPL142C	-1.39	-2.6	1.6E-02
YNL194C	YNL194C	-1.38	-2.6	1.4E-04
YGL208W	SIP2	-1.38	-2.6	5.9E-07
YNR014W	YNR014W	-1.38	-2.6	1.6E-09
YLR038C	COX12	-1.37	-2.6	1.2E-06
YAL039C	CYC3	-1.36	-2.6	1.0E-10
YJL185C	YJL185C	-1.36	-2.6	7.7E-08
YKL188C	PXA2	-1.35	-2.5	2.2E-02
YHR037W	PUT2	-1.35	-2.5	8.1E-08
YPR065W	ROX1	-1.35	-2.5	3.1E-07
EC1118_1O4_6612g	EC1118_1O4_6612g	-1.34	-2.5	5.2E-07
YDL169C	UGX2	-1.34	-2.5	2.3E-11
YBL078C	ATG8	-1.34	-2.5	5.2E-07
YPL230W	USV1	-1.34	-2.5	9.5E-08
YPR061C	JID1	-1.33	-2.5	1.2E-08
YLR178C	TFS1	-1.33	-2.5	1.5E-09
YJL142C	IRC9	-1.33	-2.5	2.3E-04
YER028C	MIG3	-1.33	-2.5	8.0E-07
YOL083W	YOL083W	-1.33	-2.5	4.4E-08
YCR045C	YCR045C	-1.32	-2.5	1.0E-11
YJR104C	SOD1	-1.32	-2.5	1.5E-10
YGL205W	POX1	-1.32	-2.5	2.7E-04
YML054C	CYB2	-1.32	-2.5	8.1E-08
YML042W	CAT2	-1.31	-2.5	1.6E-10
YBL059W	YBL059W	-1.31	-2.5	1.7E-10
YNR019W	ARE2	-1.31	-2.5	1.8E-03
YMR015C	ERG5	-1.30	-2.5	3.6E-04
YOR292C	YOR292C	-1.30	-2.5	1.1E-02
YDR085C	AFR1	-1.30	-2.5	1.5E-03
YMR136W	GAT2	-1.30	-2.5	1.4E-14
YJL166W	QCR8	-1.30	-2.5	1.4E-11
YBL112C	YBL112C	-1.30	-2.5	9.4E-07
YBR212W	NGR1	-1.29	-2.5	3.6E-11

ORF	Functional name	logFC	FC	adj.P.Val
YML120C	NDI1	-1.29	-2.5	3.4E-02
YDL086W	YDL086W	-1.29	-2.4	4.4E-03
YMR196W	YMR196W	-1.29	-2.4	1.1E-09
YMR069W	NAT4	-1.28	-2.4	4.1E-11
YIR031C	DAL7	-1.28	-2.4	8.2E-07
YNL134C	YNL134C	-1.28	-2.4	1.6E-12
YLR395C	COX8	-1.27	-2.4	1.1E-13
YBL099W	ATP1	-1.26	-2.4	5.0E-10
YKL053C-A	MDM35	-1.26	-2.4	9.7E-05
YHR055C	CUP1-2	-1.26	-2.4	3.2E-05
YLR254C	NDL1	-1.26	-2.4	1.1E-10
YBL049W	MOH1	-1.26	-2.4	6.2E-08
YLR080W	EMP46	-1.26	-2.4	1.5E-10
YML075C	HMG1	-1.26	-2.4	1.6E-08
YOL155C	HPF1	-1.25	-2.4	1.6E-07
YEL034W	HYP2	-1.25	-2.4	2.1E-06
YGR086C	PIL1	-1.25	-2.4	3.4E-10
YKR046C	PET10	-1.25	-2.4	2.3E-07
YNL117W	MLS1	-1.24	-2.4	4.1E-07
YDR270W	CCC2	-1.24	-2.4	4.3E-09
YLL009C	COX17	-1.24	-2.4	9.5E-06
YOL048C	YOL048C	-1.24	-2.4	1.2E-06
YDL004W	ATP16	-1.24	-2.4	1.7E-13
YBR126C	TPS1	-1.24	-2.4	1.0E-05
YBL045C	COR1	-1.23	-2.3	7.7E-08
YOR285W	YOR285W	-1.23	-2.3	3.2E-09
Q0140	VAR1	-1.22	-2.3	2.9E-05
YER103W	SSA4	-1.22	-2.3	2.2E-09
YDR511W	ACN9	-1.21	-2.3	1.8E-11
YJR019C	TES1	-1.21	-2.3	7.5E-03
YHR053C	CUP1-1	-1.21	-2.3	5.1E-05
YFR033C	QCR6	-1.21	-2.3	1.6E-05
YJL205C	NCE101	-1.21	-2.3	8.1E-07
YIL098C	FMC1	-1.20	-2.3	7.2E-11
YMR052C-A	YMR052C-A	-1.20	-2.3	4.1E-11
YER011W	TIR1	1.20	-2.3	2.6E-03
YLR301W	YLR301W	1.20	-2.3	2.4E-12

ORF	Functional name	logFC	FC	adj.P.Val
YJR156C	THI11	5.53	46.1	2.2E-12
YFL058W	THI5	5.20	36.7	3.7E-10
YNL332W	THI12	5.13	35.0	1.5E-11
YDL244W	THI13	5.02	32.4	8.8E-15
YPR121W	THI22	5.02	32.3	1.0E-17
YBR092C	PHO3	4.46	22.1	1.6E-13
YGR144W	THI4	3.83	14.2	7.2E-14
YCR020C	PET18	3.83	14.2	3.5E-18
YCL025C	AGP1	3.76	13.5	2.8E-08
YLR303W	MET17	3.69	12.9	2.5E-14
YJR010W	MET3	3.63	12.4	1.2E-14
YKL001C	MET14	3.59	12.0	2.0E-09
YPL265W	DIP5	3.53	11.5	1.0E-17
YPL258C	THI21	3.31	9.9	1.0E-17
YCR098C	GIT1	3.30	9.9	3.2E-14
YMR305C	SCW10	3.26	9.6	4.3E-21
YOR192C	THI72	3.19	9.2	6.4E-17
YFR030W	MET10	3.18	9.1	2.7E-19
YEL071W	DLD3	3.14	8.8	6.0E-15
YLR092W	SUL2	2.99	8.0	5.8E-18
YML123C	PHO84	2.95	7.7	4.2E-16
YLL024C	SSA2	2.95	7.7	7.9E-16
YLR372W	SUR4	2.95	7.7	6.8E-20
YLR134W	PDC5	2.95	7.7	4.4E-11
YJR137C	ECM17	2.77	6.8	5.8E-18
YPR167C	MET16	2.76	6.8	2.2E-16
YGL184C	STR3	2.76	6.8	6.2E-20
YMR304C-A	YMR304C-A	2.73	6.6	1.1E-16
YML058W-A	HUG1	2.70	6.5	7.2E-12
YAL012W	CYS3	2.66	6.3	6.4E-18
YOL140W	ARG8	2.62	6.2	5.3E-13
YLR180W	SAM1	2.59	6.0	5.3E-13
YGL202W	ARO8	2.56	5.9	2.6E-10
YER052C	HOM3	2.54	5.8	4.2E-12
YOR108W	LEU9	2.53	5.8	1.2E-11
YER070W	RNR1	2.53	5.8	1.2E-08
YPL250C	ICY2	2.50	5.7	5.5E-10
YFR055W	IRC7	2.49	5.6	1.4E-08
YLR089C	ALT1	2.49	5.6	2.7E-19
YNR056C	BIO5	2.48	5.6	5.5E-16
YPL273W	SAM4	2.48	5.6	4.5E-16
YBR068C	BAP2	2.48	5.6	1.5E-15
YBR249C	ARO4	2.42	5.3	1.1E-14
YNL277W	MET2	2.41	5.3	1.9E-16
YKR013W	PRY2	2.39	5.2	1.4E-18
YOR009W	TIR4	2.38	5.2	2.2E-10
YLL055W	YCT1	2.37	5.2	9.8E-15
YNL331C	AAD14	2.36	5.1	5.0E-12
YER091C	MET6	2.36	5.1	2.3E-09
YJL200C	ACO2	2.36	5.1	7.1E-06
YOR010C	TIR2	2.33	5.0	8.8E-16

ORF	Functional name	logFC	FC	adj.P.Val
YHR068W	DYS1	2.32	5.0	6.2E-20
YMR321C	YMR321C	2.31	5.0	3.5E-18
YBR162C	TOS1	2.29	4.9	2.2E-10
YCL030C	HIS4	2.28	4.9	1.8E-12
YJR016C	ILV3	2.28	4.9	9.2E-17
YLL061W	MMP1	2.24	4.7	5.6E-05
YNL289W	PCL1	2.22	4.7	1.0E-11
YOL058W	ARG1	2.22	4.7	3.0E-11
YOL055C	THI20	2.20	4.6	2.6E-17
YOL159C	YOL159C	2.18	4.5	1.1E-13
YER069W	ARG5,6	2.17	4.5	6.0E-13
YJL172W	CPS1	2.15	4.4	8.8E-05
YPL272C	YPL272C	2.14	4.4	1.5E-13
YDL059C	RAD59	2.13	4.4	7.2E-16
YHR208W	BAT1	2.13	4.4	1.2E-10
YER055C	HIS1	2.12	4.3	3.8E-07
YHR020W	YHR020W	2.10	4.3	5.9E-11
YPL160W	CDC60	2.07	4.2	3.2E-10
YDL003W	MCD1	2.06	4.2	1.1E-07
YJL158C	CIS3	2.05	4.1	4.8E-03
YIL123W	SIM1	2.04	4.1	6.3E-08
YEL040W	UTR2	2.03	4.1	1.2E-13
YOR315W	SFG1	2.03	4.1	1.2E-07
YDR158W	HOM2	2.02	4.1	2.3E-15
YER073W	ALD5	2.02	4.0	1.9E-12
YCR005C	CIT2	2.01	4.0	5.1E-07
YLR183C	TOS4	2.01	4.0	7.0E-15
YIR017C	MET28	2.01	4.0	1.3E-12
YHR018C	ARG4	2.00	4.0	3.7E-15
YDL039C	PRM7	1.99	4.0	3.7E-08
YIL074C	SER33	1.98	4.0	7.3E-03
YAR071W	PHO11	1.98	3.9	1.7E-09
YBR104W	YMC2	1.96	3.9	2.2E-09
YLL062C	MHT1	1.95	3.9	5.9E-10
YHR112C	YHR112C	1.92	3.8	7.4E-11
YDL039C	PRM7	1.92	3.8	1.7E-06
YKL029C	MAE1	1.91	3.8	1.1E-15
YHL036W	MUP3	1.91	3.7	6.3E-05
YJL153C	INO1	1.90	3.7	3.9E-15
YGL117W	YGL117W	1.90	3.7	4.7E-06
YJR148W	BAT2	1.90	3.7	8.9E-14
YLR355C	ILV5	1.89	3.7	3.1E-10
YKL120W	OAC1	1.89	3.7	7.1E-14
YGR177C	ATF2	1.87	3.7	1.9E-11
YOL064C	MET22	1.87	3.7	3.4E-09
YNL104C	LEU4	1.86	3.6	6.5E-17
YPL214C	THI6	1.85	3.6	2.8E-14
YML027W	YOX1	1.84	3.6	2.1E-11
YNR058W	BIO3	1.83	3.6	6.0E-09
YCR034W	FEN1	1.83	3.6	2.0E-10
YFL059W	SNZ3	1.82	3.5	1.9E-13
YIL011W	TIR3	1.80	3.5	1.7E-05
YOR011W	AUS1	1.80	3.5	4.9E-03

ORF	Functional name	logFC	FC	adj.P.Val
YPL081W	RPS9A	1.79	3.4	3.1E-14
YLR179C	YLR179C	1.78	3.4	1.8E-06
YHR049W	FSH1	1.78	3.4	2.3E-06
YOR222W	ODC2	1.78	3.4	2.4E-16
YNR057C	BIO4	1.77	3.4	7.0E-08
YAL065C	YAL065C	1.77	3.4	6.4E-16
YER060W-A	FCY22	1.76	3.4	2.6E-07
YGR108W	CLB1	1.73	3.3	1.8E-13
YDR438W	THI74	1.72	3.3	2.1E-15
YOR248W	YOR248W	1.71	3.3	7.9E-12
YNL333W	SNZ2	1.71	3.3	1.2E-12
YIL164C	NIT1	1.71	3.3	6.2E-08
YDR044W	HEM13	1.70	3.2	2.5E-12
YGR155W	CYS4	1.70	3.2	3.9E-13
EC1118_1O4_6491g	EC1118_1O4_6491g	1.69	3.2	2.4E-08
YBR240C	THI2	1.69	3.2	1.9E-06
YNL220W	ADE12	1.69	3.2	1.5E-12
YNR050C	LYS9	1.66	3.2	2.5E-09
YGR055W	MUP1	1.66	3.2	5.3E-12
YHR019C	DED81	1.65	3.1	3.0E-08
YMR096W	SNZ1	1.65	3.1	1.3E-06
YFL031W	HAC1	1.65	3.1	1.7E-11
YBR085W	AAC3	1.65	3.1	1.3E-10
YJL177W	RPL17B	1.64	3.1	2.8E-05
YBR145W	ADH5	1.64	3.1	6.1E-12
YDR400W	URH1	1.64	3.1	8.2E-14
YBR088C	POL30	1.63	3.1	1.1E-13
YOR237W	HES1	1.63	3.1	4.7E-05
YBR021W	FUR4	1.63	3.1	2.2E-11
YMR116C	ASC1	1.63	3.1	1.6E-03
YLL058W	YLL058W	1.63	3.1	6.0E-08
YJR150C	DAN1	1.62	3.1	2.7E-04
YDR502C	SAM2	1.61	3.1	1.2E-07
YMR215W	GAS3	1.61	3.1	4.3E-04
YKR069W	MET1	1.60	3.0	6.2E-05
YPL256C	CLN2	1.59	3.0	5.6E-07
YNL300W	YNL300W	1.59	3.0	1.8E-08
YDR098C	GRX3	1.58	3.0	1.4E-12
YEL072W	RMD6	1.56	3.0	2.3E-05
YAL007C	ERP2	1.56	3.0	7.1E-14
YMR062C	ECM40	1.56	3.0	3.6E-07
YDL055C	PSA1	1.56	3.0	2.3E-14
YLR004C	THI73	1.56	3.0	9.0E-13
YLR264W	RPS28B	1.56	3.0	5.0E-06
YLR448W	RPL6B	1.56	2.9	4.1E-11
YAL063C	FLO9	1.56	2.9	2.5E-05
YJR109C	CPA2	1.55	2.9	5.4E-11
YBR213W	MET8	1.55	2.9	6.4E-12
YGL225W	VRG4	1.54	2.9	4.2E-12
YDR253C	MET32	1.54	2.9	1.1E-06
YOL007C	CSI2	1.54	2.9	1.9E-09
YMR307W	GAS1	1.54	2.9	5.9E-07
YER090W	TRP2	1.53	2.9	5.7E-04

ORF	Functional name	logFC	FC	adj.P.Val
YDR127W	ARO1	1.52	2.9	5.5E-10
YIL165C	YIL165C	1.52	2.9	2.3E-05
YLR048W	RPS0B	1.52	2.9	2.1E-08
YGL147C	RPL9A	1.52	2.9	5.3E-10
YER081W	SER3	1.52	2.9	4.0E-10
YMR199W	CLN1	1.51	2.8	1.4E-05
YER131W	RPS26B	1.51	2.8	1.6E-06
YHR025W	THR1	1.49	2.8	7.7E-08
YPR175W	DPB2	1.49	2.8	4.1E-07
YLR058C	SHM2	1.48	2.8	8.3E-09
YHL015W	RPS20	1.48	2.8	1.0E-12
YMR279C	YMR279C	1.48	2.8	2.0E-07
YHR216W	IMD2	1.48	2.8	4.2E-05
YIL094C	LYS12	1.48	2.8	6.3E-06
YEL029C	BUD16	1.46	2.8	1.8E-10
YPL131W	RPL5	1.46	2.8	2.1E-07
YBR189W	RPS9B	1.46	2.8	3.6E-02
YJL190C	RPS22A	1.46	2.7	1.6E-12
YBR025C	OLA1	1.45	2.7	3.1E-09
YCL026C-B	HBN1	1.45	2.7	7.0E-13
YDR261C	EXG2	1.45	2.7	2.6E-03
YMR120C	ADE17	1.45	2.7	5.0E-06
YDR321W	ASP1	1.44	2.7	2.8E-08
YLR029C	RPL15A	1.44	2.7	1.1E-09
YGL125W	MET13	1.44	2.7	8.3E-04
YOR074C	CDC21	1.44	2.7	1.2E-04
YIL018W	RPL2B	1.44	2.7	4.9E-09
YBL002W	HTB2	1.43	2.7	8.6E-09
YCR087C-A	LUG1	1.43	2.7	5.0E-06
YML056C	IMD4	1.43	2.7	3.3E-03
YIL145C	PAN6	1.43	2.7	4.2E-12
YHR041C	SRB2	1.43	2.7	3.5E-05
YMR144W	YMR144W	1.42	2.7	4.1E-07
YLL045C	RPL8B	1.42	2.7	2.6E-06
YDL229W	SSB1	1.42	2.7	4.3E-08
YIL116W	HIS5	1.42	2.7	1.1E-10
YPL163C	SVS1	1.42	2.7	3.0E-03
YLR359W	ADE13	1.42	2.7	7.5E-09
YLR060W	FRS1	1.42	2.7	2.0E-12
YLR325C	RPL38	1.42	2.7	3.5E-05
YEL054C	RPL12A	1.42	2.7	5.8E-03
YDL198C	GGC1	1.41	2.7	2.5E-08
YLR103C	CDC45	1.41	2.7	4.3E-09
YOR203W	YOR203W	1.41	2.7	1.8E-11
YNL217W	YNL217W	1.41	2.7	8.4E-11
YGR034W	RPL26B	1.41	2.7	6.1E-10
YNL209W	SSB2	1.40	2.6	3.0E-05
YHR211W	FLO5	1.40	2.6	1.4E-08
YHR010W	RPL27A	1.40	2.6	5.1E-11
YHR154W	RTT107	1.40	2.6	8.6E-06
YPL227C	ALG5	1.40	2.6	5.2E-04
YGR109C	CLB6	1.40	2.6	5.1E-08
YNL283C	WSC2	1.40	2.6	8.7E-04

ORF	Functional name	logFC	FC	adj.P.Val
YJL101C	GSH1	1.40	2.6	3.8E-09
YIR034C	LYS1	1.40	2.6	8.8E-07
YOL014W	YOL014W	1.40	2.6	4.4E-11
YMR241W	YHM2	1.40	2.6	4.8E-07
YGR124W	ASN2	1.38	2.6	2.2E-07
YHR047C	AAP1	1.38	2.6	1.1E-08
YKL180W	RPL17A	1.37	2.6	4.3E-08
YPR159W	KRE6	1.37	2.6	6.5E-08
YHL033C	RPL8A	1.36	2.6	1.5E-06
YJL034W	KAR2	1.36	2.6	1.1E-02
YDR222W	YDR222W	1.36	2.6	2.8E-06
YEL073C	YEL073C	1.36	2.6	2.2E-12
YGL026C	TRP5	1.35	2.5	3.6E-08
YJL060W	BNA3	1.35	2.5	2.0E-05
YOR247W	SRL1	1.35	2.5	5.5E-09
YHR061C	GIC1	1.35	2.5	6.1E-08
YDR012W	RPL4B	1.35	2.5	5.2E-03
YGR204W	ADE3	1.35	2.5	2.1E-12
YOL090W	MSH2	1.34	2.5	3.4E-06
YDR234W	LYS4	1.34	2.5	7.1E-08
YGR189C	CRH1	1.34	2.5	6.6E-10
YLR432W	IMD3	1.34	2.5	4.3E-08
YLR121C	YPS3	1.34	2.5	1.7E-06
YOR361C	PRT1	1.33	2.5	7.6E-12
YPL183C	RTT10	1.33	2.5	1.1E-08
YGL148W	ARO2	1.33	2.5	4.1E-03
YNL221C	POP1	1.32	2.5	1.5E-11
YJL213W	YJL213W	1.32	2.5	2.1E-02
YMR122W-A	YMR122W-A	1.32	2.5	6.5E-09
YHR144C	DCD1	1.32	2.5	1.4E-12
YPR102C	RPL11A	1.31	2.5	4.1E-08
YOR143C	THI80	1.31	2.5	1.9E-13
YLR441C	RPS1A	1.31	2.5	2.8E-09
YPR145W	ASN1	1.31	2.5	1.4E-04
YFR031C-A	RPL2A	1.30	2.5	6.7E-11
YBR084W	MIS1	1.30	2.5	4.3E-08
YJR145C	RPS4A	1.30	2.5	2.0E-09
YKL201C	MNN4	1.30	2.5	2.6E-10
YDR035W	ARO3	1.30	2.5	4.3E-05
YGR208W	SER2	1.29	2.5	3.6E-11
YKR043C	YKR043C	1.29	2.4	9.0E-07
YPL106C	SSE1	1.29	2.4	4.1E-07
YML026C	RPS18B	1.29	2.4	7.4E-03
YKL006W	RPL14A	1.29	2.4	5.1E-10
YOL120C	RPL18A	1.29	2.4	3.9E-06
YGL234W	ADE5,7	1.28	2.4	7.0E-09
YGL253W	HXK2	1.28	2.4	1.7E-07
YBR248C	HIS7	1.27	2.4	2.3E-09
YNL247W	YNL247W	1.27	2.4	4.0E-06
YDR541C	YDR541C	1.26	2.4	4.6E-07
YOR184W	SER1	1.26	2.4	7.0E-13
YJL080C	SCP160	1.25	2.4	2.6E-09
YHR065C	RRP3	1.25	2.4	2.3E-03

ORF	Functional name	logFC	FC	adj.P.Val
YGL123W	RPS2	1.24	2.4	1.5E-08
YBR115C	LYS2	1.23	2.3	6.8E-07
YDR210W	YDR210W	1.23	2.3	1.8E-05
YOL039W	RPP2A	1.23	2.3	2.3E-11
YPL226W	NEW1	1.23	2.3	5.6E-05
YAR073W	IMD1	1.23	2.3	3.1E-07
YLR409C	UTP21	1.23	2.3	6.2E-07
YLR045C	STU2	1.22	2.3	9.3E-09
YJL130C	URA2	1.22	2.3	5.2E-04
YDL082W	RPL13A	1.22	2.3	1.0E-08
YDR144C	MKC7	1.21	2.3	4.1E-03
YIL066C	RNR3	1.21	2.3	2.0E-10
YKL211C	TRP3	1.21	2.3	3.4E-03
YHR089C	GAR1	1.21	2.3	8.2E-07
YHR203C	RPS4B	1.21	2.3	1.2E-07
YOR063W	RPL3	1.20	2.3	3.3E-06

Conclusion générale

L'objectif de ce projet était, dans un premier temps, de développer un bioréacteur permettant de reproduire les différents stades de la fermentation alcoolique œnologique dans un réacteur continu, en conditions stables et contrôlées.

Après validation, cet outil a été utilisé pour étudier l'influence d'un ajout d'azote en cours de fermentation. L'étude a été réalisée dans le cadre d'une démarche intégrée, en confrontant les données transcriptomiques aux paramètres physiologiques mesurés en cours de fermentation (paramètres cinétiques, métabolites intra et exo cellulaires).

Cette approche originale a permis d'apporter un nouvel éclairage sur la réponse métabolique à un ajout d'azote et ouvre des perspectives pour l'étude d'autres problématiques.

Mise au point et validation du fermenteur continu multi-étagé (MSCF)

Une des particularités de la fermentation alcoolique étant d'être dans sa plus grande partie réalisée par des levures non proliférantes, un des enjeux était la possibilité de reproduire la phase stationnaire de fermentation. Le moyen choisi pour cela a été le choix d'un fermenteur multi-étagé (MSCF). L'élément limitant de la croissance des levures en fermentation œnologique étant la disponibilité en azote, la mise au point de ce fermenteur a principalement consisté à assurer un épuisement progressif des sources d'azote qui permette d'arriver au niveau de quantité de biomasse atteinte en batch.

Conception et réalisation du MSCF. La première partie des travaux a permis d'établir qu'un minimum de trois étages successifs est nécessaire à l'établissement d'une phase stationnaire, dans les conditions rencontrées en batch (nombre de cellules, concentration des métabolites). En effet, pour obtenir des levures non-proliférantes dans une culture continue bi-étagée, il est nécessaire d'épuiser la totalité de l'azote assimilable au niveau du premier étage. Les essais réalisés ont montré que, dans ces conditions, les points de fonctionnement dans les deux étages simulaient mal ceux observés en batch, notamment au niveau de la population cellulaire. L'ajout d'au moins un étage supplémentaire était indispensable pour permettre aux levures de croître dans un milieu non-limité en azote au niveau du premier étage. Pour optimiser encore les conditions de croissance et nous rapprocher au mieux des conditions du batch, nous avons choisi de poursuivre le travail avec 4 étages. Le réacteur développé est composé

de quatre cuves de volume variable (de 0.5 à 2L) et alimentées en continu à un débit ajustable de manière indépendante pour chaque cuve. Le système, contrôlé par un logiciel développé en interne sous Labview, présente une grande flexibilité et permet de travailler sur une grande gamme de taux de dilution.

Validation du MSCF par rapport au batch. Les essais réalisés ont permis de valider la possibilité de reproduire les conditions de fermentation du batch en quatre états stationnaires simultanés, représentatifs de quatre phases successives de la fermentation en batch. Pour un même avancement de fermentation, c'est à dire pour une même quantité de sucres résiduels, le milieu présente la même composition en métabolites secondaires dans les deux types de fermentation. En particulier les molécules marqueurs de l'équilibre rédox comme le glycérol et l'acétate, mais également les composés volatiles, qui sont issus de voies métaboliques impliquant à la fois les métabolismes carbonés et azotés, sont produits en quantité identiques ce qui suggère que les flux métaboliques sont orientés de façon très similaire en batch et en MSCF.

La comparaison du transcriptome des levures, en batch et MSCF, pour un même avancement de fermentation, a confirmé cette validation en montrant un impact limité du mode de fermentation sur le niveau d'expression génétique. Les différences observées correspondent à des processus biologiques liées à la division cellulaire, et certains gènes associés à la réponse au stress sont également sur-exprimés en MSCF. Cependant, cette réponse reste limitée et n'affecte qu'une très faible partie du génome.

Essais complémentaires. Des expériences complémentaires ont permis de mieux préciser encore les caractéristiques et l'intérêt du MSCF :

- Des essais réalisés en triplicat ont montré une bonne reproductibilité des données et ont permis de valider la fiabilité de l'outil avec deux types de moût différents (un moût « riche » contenant 425 mg/L d'azote assimilable, et un moût carencé à 100 mg/L d'azote assimilable). L'étude transcriptomique a elle aussi montré une très bonne reproductibilité des niveaux d'expression dans le MSCF.
- La flexibilité du système a été montrée, en obtenant dans les différents étages, des points de fonctionnement correspondant à des niveaux d'avancement de la fermentation compris entre 5 et 97%.

- Enfin, la compilation des données obtenues a permis d'établir un schéma prédictif de la composition du milieu en fonction des réglages appliqués.

Le fermenteur continu à 4 étages s'est donc avéré performant et parfaitement adéquat pour l'étude du métabolisme des levures œnologiques en fermentation.

La suite des travaux a été focalisée sur le début de la phase stationnaire obtenue, dans les conditions de débit choisies, au niveau du troisième étage du MSCF. En effet, il s'agit d'un moment-clé de la fermentation caractérisé, notamment, par le début de l'épuisement en azote assimilable.

Remarque : Les premiers essais réalisés avec le fermenteur à quatre étages ont mis en évidence certaines particularités de la souche de laboratoire V5 par rapport à une souche industrielle (EC1118). Il semble que V5 ait un métabolisme azoté altéré, avec une plus faible capacité d'assimilation de l'azote et une plus faible assimilation de certains acides aminés (arginine, histidine et glycine). Pour la suite du travail, nous avons donc travaillé exclusivement avec la souche EC1118.

Apport du fermenteur continu multi-étagé pour la compréhension du métabolisme de l'azote en fermentation œnologique

L'ajout d'azote au cours de la fermentation est une pratique répandue en œnologie, qui a des répercussions importantes sur le métabolisme de la levure y compris sur la synthèse de composés influant sur les caractéristiques organoleptiques des vins. Il existe donc un enjeu à mieux raisonner cette pratique et ce sujet a déjà fait l'objet de plusieurs travaux. Ceux-ci ont montré que les conséquences d'un ajout d'azote en cours de fermentation sont fonction de plusieurs paramètres, en particulier le type de source azotée et le moment d'ajout. Les mécanismes – complexes - mis en jeu sont encore mal décrits et ce sujet nous est donc apparu comme un premier champ d'application intéressant et pertinent du MSCF.

Deux dispositifs expérimentaux ont été utilisés pour réaliser des ajouts d'azote en MSCF :

- L'ajout sous forme de pulse, qui procure un aperçu de la réponse instantanée à une perturbation transitoire et permet d'évaluer la cinétique de consommation des sources et de production des métabolites. La variation de concentration d'un composé suite à un ajout pulsé reflète une modification de sa vitesse de synthèse par rapport à l'état initial.
- L'ajout continu d'une quantité constante d'azote, au niveau du troisième étage, qui modifie l'état physiologique jusqu'à un nouveau niveau d'équilibre. Les levures sont alors dans un nouvel état physiologique adapté à un niveau plus élevé de supplémentation azotée.

L'analyse des observations réalisées avec ces deux approches, couplée à l'ajout de deux sources d'azote distinctes (ammonium et valine) a permis plusieurs observations originales.

Réorganisation au niveau du cycle des acides tricarboxyliques (TCA). L'analyse de la réponse de la levure à l'ajout d'azote montre une importante réorganisation du métabolisme se traduisant, en particulier, par une augmentation du taux de croissance cellulaire et de l'activité fermentaire. L'augmentation des besoins en acides aminés pour la synthèse protéique provoque une réorientation massive du flux de carbone au niveau

du TCA, vers la synthèse d' α -cétoglutarate avec pour conséquence une réduction de l'excrétion du succinate. La chute de production du succinate est directement consécutive à l'ajout d'azote et est visible avec les deux modes d'ajout, ce qui témoigne d'un mécanisme directement lié à l'adaptation au niveau d'azote dans le milieu. Ce mécanisme est régulé au niveau transcriptionnel par l'activation des gènes de la branche oxydative du TCA impliqués dans la synthèse de l' α -cétoglutarate. Il est à noter que **ce phénomène n'est pas visible en batch**, probablement car il est masqué par la dynamique de la fermentation.

Transport des sources azotées. Les différents dispositifs expérimentaux utilisés s'avèrent également utiles pour l'étude des transporteurs d'azote. Nous avons ainsi pu observer que, en batch comme en fermentation continue, la vitesse spécifique de consommation de l'ammonium est deux fois plus élevée que pour la valine. La disponibilité des transporteurs spécifiques et le mécanisme d'assimilation de l'azote issu de la valine à travers la voie d'Ehrlich expliquent ces différences puisque l'ajout de valine provoque une importante activation des transporteurs de cet acide aminés, alors que le niveau d'expression des transporteurs d'ammonium n'est pas modifié par l'ajout d'ammonium. Ces derniers sont en effet déjà actifs alors que l'intégration de la valine nécessite la mise en place des transporteurs.

De façon surprenante, la vitesse spécifique d'assimilation des sources d'azote calculée lors de la fermentation avec ajout continu d'azote est 50% plus faible que lors d'un ajout pulsé, et la différence de vitesse de consommation entre ammonium et valine est plus faible (15% environ) que lors de l'ajout pulsé (50%). Cette observation suggère que la mise en place des mécanismes de régulation de la consommation d'ammonium tend à ralentir sa vitesse d'assimilation pour atteindre le niveau d'équilibre.

Synthèse des composés volatils. L'influence de l'ajout d'azote sur la synthèse des composés volatils est globalement identique pour les deux sources utilisées pour cette étude, à l'exception de l'importante production d'isobutanol et d'isobutyl acetate issus du catabolisme de la valine. La quantité d'isobutanol produite suite à l'ajout de valine correspond à environ 70% de la valine consommée. Quelle que soit la source d'azote ajoutée, la variation des vitesses spécifiques de production des composés volatils ne peut s'expliquer par la seule variation d'expression des gènes associés à leur voie de

synthèse. D'une manière générale, les analyses transcriptomique et métabolique montrent que le contrôle de la synthèse des esters et alcools supérieurs est régulée en premier lieu par la concentration intracellulaires en métabolites précurseurs. Ces analyses indiquent aussi que la synthèse des alcools supérieurs dépend fortement des besoins de synthèse ou d'assimilation des acides aminés. Cependant, si l'ajout d'azote au milieu de fermentation provoque une activation significative de toutes les voies de synthèse des acides aminés, la vitesse spécifique de production de l'alcool isoamylique est significativement réduite en présence d'azote, quelle que soit la source.

Nos travaux confirment la complexité de l'effet de l'ajout d'azote sur la synthèse des alcools supérieurs et la nécessité de prendre en compte le type de source azotée, avec des effets spécifiques à chaque acide aminé à prendre en compte.

Perspectives

Les travaux présentés ici ouvrent de nombreuses perspectives pour la compréhension des mécanismes d'adaptation des microorganismes à des variations de leur environnement, en particulier dans les conditions de la fermentation alcoolique.

Métabolisme azoté (suite). Malgré la complexité, du métabolisme des acides aminés en condition de fermentation, sa compréhension est un enjeu intéressant en œnologie car elle peut aider à optimiser la composition des intrants, dans le but – par exemple - de favoriser la production de certains esters. Ces connaissances ont d'autant plus d'intérêt que la législation, qui autorise actuellement uniquement l'ajout d'azote ammoniacal, est en pleine évolution

Les voies de dégradation des acides aminés par la levure sont globalement décryptées, mais de nombreuses inconnues persistent. C'est ainsi que, dans nos conditions, le devenir d'un tiers de la valine consommée est à préciser. D'autre part, si la quantité d'isobutanol produite après un ajout de valine au milieu peut expliquer 70% de la valine consommée, il reste à établir que la totalité du squelette carboné provient bien de la valine consommée. L'utilisation des techniques de marquage couplée à un ajout pulsé permettrait de lever ces zones d'ombre pour la valine comme pour d'autres acides aminés.

Les essais réalisés sur la souche V5, ont permis de mettre en évidence des particularités de cette souche par rapport à EC1118, en ce qui concerne la complétion de la division cellulaire. Cette particularité semble liée au métabolisme azotée et soulève une nouvelle fois l'importance de la gestion des ressources en azote pour la croissance cellulaire. La comparaison des deux souches au niveau transcriptomique pourrait faire apparaître des divergences intéressantes à ce sujet. De façon plus générale, une étude approfondie de l'assimilation de l'azote chez V5 pourrait permettre de mettre en évidence les mécanismes impliqués dans ces différences de croissance et l'importance du contrôle de la division cellulaire par la disponibilité des sources azotés.

Etude d'autres perturbations. L'azote assimilable n'est pas l'unique facteur de variation du métabolisme des levures et il serait intéressant d'étudier l'effet d'autres

perturbations sur une culture à l'état stable et dans les différentes phases de la fermentation.

La gestion des apports d'oxygène en cours de fermentation fait partie des problématiques d'intérêt technologique étudiées au sein de l'UMR. L'apport du MSCF pourrait être important pour préciser certains points relatifs au métabolisme de l'oxygène et à ses interactions avec les métabolismes carbonés et azotés. Cet apport serait d'autant plus pertinent et original qu'il serait couplé avec un système d'oxygénation permettant l'apport maîtrisé et programmé de micro quantités d'oxygène, à tout moment de la fermentation (Blateyron *et al.*, 1998; Moenne *et al.*, 2012).

Le MSCF peut également être un outil d'étude intéressant pour comprendre l'effet d'un inhibiteur de l'activité des levures, en premier lieu l'éthanol. Il peut, enfin être utilisé pour étudier l'effet de la modification d'un paramètre physique - tel que la température - en cours de fermentation.

Biologie des systèmes. Le MSCF constitue aussi potentiellement un outil de choix dans le domaine de la biologie des systèmes car il permet de visualiser un instantané de l'état physiologique d'une cellule et procure un avantage certain par rapport aux cultures de type batch. C'est ainsi qu'en MSCF, le calcul des vitesses spécifiques (q_s) de consommation ou de production des nutriments et métabolites, qui dérivent directement du bilan matière au sein du réacteur (voir Bibliographie §4.2.1), donnent directement accès à des valeurs de flux métaboliques.

Modélisation-contrôle. Même si le MSCF a, avant tout, été développé pour des études sur le métabolisme des levures, il peut aussi constituer un objet d'étude, pour des automaticiens, en termes de modélisation-contrôle. C'est effectivement le cas, puisqu'en complément de ce travail, et dans le cadre du projet européen CAFE (Computer Aided Food processes For control Engineering), vient de commencer la mise au point d'une loi de commande optimale des débits d'alimentation dans les différentes étages, avec pour objectif de minimiser le temps nécessaire pour atteindre un nouveau régime permanent. Cette approche sera basée sur une modélisation prédictive de la cinétique fermentaire. Elle sera menée en collaboration avec l'unité mixte de recherche MISTEA (Mathématique, Informatique et Statistiques pour l'Environnement et l'Agriculture) et exploitera des données issues de ce travail.

La problématique du métabolisme des levures en conditions œnologiques pose encore de nombreuses questions mais ce travail constitue une contribution significative en fournissant à la fois un **nouvel éclairage sur le métabolisme azoté** et **un outil innovant permettant d'appréhender de nouvelles avancées sur la connaissance du métabolisme des microorganismes.**

Références bibliographiques

- Agenbach, W.A. 1977.** A study of must nitrogen content in relation to incomplete fermentations, yeast production and fermentation activity, pp. 66–88. Presented at the Proc. S. Afr. Soc. Enol. Vitic, Cape Town, South Africa: Beuckman, E.F.
- Albers, E., Gustafsson, L., Niklasson, C., Lidén, G., 1998.** Distribution of ¹⁴C-labelled carbon from glucose and glutamate during anaerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology (Reading, Engl.) 144 (Pt 6), 1683–1690.
- 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.
- Alexandre, H., Charpentier, C., 1998.** Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 20, 20–27.
- Ansanay-Galeote, V., Bruno Blondin, B., Sablayrolles, J.M., 2001.** Stress effect of ethanol on fermentation kinetics by stationary-phase cells of *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology Letters 677–681.
- Ansell, R., Granath, K., Hohmann, S., Thevelein, J.M., Adler, L., 1997.** The two isoenzymes for yeast NAD⁺-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by *GPD1* and *GPD2* have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. EMBO J. 16, 2179–2187.
- Backhus, L.E., DeRisi, J., Bisson, L.F., 2001.** Functional genomic analysis of a commercial wine strain of *Saccharomyces cerevisiae* under differing nitrogen conditions. FEMS Yeast Res. 1, 111–125.
- Barbosa, C., Falco, V., Mendes-Faia, A., Mendes-Ferreira, A., 2009.** Nitrogen addition influences formation of aroma compounds, volatile acidity and ethanol in nitrogen deficient media fermented by *Saccharomyces cerevisiae* wine strains. Journal of Bioscience and Bioengineering 108, 99–104.
- Bayrock, D.P., Michael Ingledew, W., 2001.** Application of multistage continuous fermentation for production of fuel alcohol by very-high-gravity fermentation technology. Journal Of Industrial Microbiology and Biotechnology 27, 87-93.
- Bell, S.-J., Henschke, P.A., 2005.** Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. Australian Journal of Grape and Wine Research 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.
- Bely, M., Rinaldi, A., Dubourdiou, D., 2003.** Influence of assimilable nitrogen on volatile acidity production by *Saccharomyces cerevisiae* during high sugar fermentation. Journal of Bioscience and Bioengineering 96, 507–512.
- Bely, M., Sablayrolles, J.M., Barre, P., 1990a.** Description of Alcoholic Fermentation Kinetics: Its Variability and Significance. Am. J. Enol. Vitic. 41, 319–324.
- Bely, M., Sablayrolles, J.-M., Barre, P., 1990b.** Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions. Journal of Fermentation and Bioengineering 70, 246–252.
- Benjamini, Y., 2001.** The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. Ann. Statist. 29, 1165–1188.
- Bezenger, M., Navarro, J., Abbal, P., 1985.** Suivi de fermentation à l'aide d'un microordinateur personnel. Application à la fermentation alcoolique en oenologie. Industrie agro alimentaire 102, 104-105.

- Bianconi, M.L., 2003.** Calorimetric determination of thermodynamic parameters of reaction reveals different enthalpic compensations of the yeast hexokinase isozymes. *J. Biol. Chem.* 278, 18709–18713.
- Bisson, L. F. 1991.** Influence of nitrogen on yeast and fermentation of grapes, pp. 78–89. Presented at the Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine, Davis: American Society for Enology and Viticulture.
- Blank, L. M., Lehmbeck, F. & Sauer, U. 2005.** Metabolic-flux and network analysis in fourteen hemiascomycetous yeasts. *FEMS Yeast Res* 5, 545–558.
- Blateyron, L., Aguera, E., Dubois, C., Gerland, C. & Sablayrolles, J. M. 1998.** Control of oxygen additions during alcoholic fermentations. *Wein-Wissenschaft* 53, 131–135.
- 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. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 91, 184–189.
- Boender, L. G. M., Hulster, D., F. E. A., Maris, V., A, A. J., Daran-Lapujade, P. A. S. & Pronk, J. T. 2009.** Quantitative Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* at Near-Zero Specific Growth Rates. *Appl Environ Microbiol* 75, 5607–5614.
- Boender, L. G. M., van Maris, A. J. A., de Hulster, E. A. F., Almering, M. J. H., van der Klei, I. J., Veenhuis, M., de Winde, J. H., Pronk, J. T. & Daran-Lapujade, P. 2011.** Cellular responses of *Saccharomyces cerevisiae* at near-zero growth rates: transcriptome analysis of anaerobic retentostat cultures. *FEMS Yeast Research* 11, 603–620.
- Boer, V.M., de Winde, J.H., Pronk, J.T., Piper, M.D.W., 2003.** The genome-wide transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* grown on glucose in aerobic chemostat cultures limited for carbon, nitrogen, phosphorus, or sulfur. *Journal of Biological Chemistry* 278, 3265–3274.
- 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., 2007.** Transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* to preferred and nonpreferred nitrogen sources in glucose-limited chemostat cultures. *FEMS Yeast Research* 7, 604–620.
- Boles, E., de Jong-Gubbels, P., Pronk, J.T., 1998.** Identification and characterization of *MAE1*, the *Saccharomyces cerevisiae* structural gene encoding mitochondrial malic enzyme. *J. Bacteriol.* 180, 2875–2882.
- Boris Magasanik, 1992.** 6 Regulation of Nitrogen Utilization. Cold Spring Harbor Monograph Archive Volume II: The Molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: Gene Expression.
- Brauer, M.J., Saldanha, A.J., Dolinski, K., Botstein, D., 2005.** Homeostatic adjustment and metabolic remodeling in glucose-limited yeast cultures. *Molecular Biology of the Cell* 16, 2503–2517.
- Bull, A.T., 2010.** The renaissance of continuous culture in the post-genomics age. *Journal of industrial microbiology biotechnology* 37, 993–1021.
- Camarasa, C., Grivet, J.-P., Dequin, S., 2003.** Investigation by ¹³C-NMR and tricarboxylic acid (TCA) deletion mutant analysis of pathways for succinate formation in *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic fermentation. *Microbiology (Reading, Engl.)* 149, 2669–2678.
- Cambon, B., Monteil, V., Remize, F., Camarasa, C., Dequin, S., 2006.** Effects of *GPD1* Overexpression in *Saccharomyces cerevisiae* Commercial Wine Yeast Strains Lacking *ALD6* Genes. *Journal of Biological Chemistry* 281, 4688–4694.

- Carmona-Saez, P., Chagoyen, M., Tirado, F., Carazo, J.M., Pascual-Montano, A., 2007.** GENECODIS: a web-based tool for finding significant concurrent annotations in gene lists. *Genome Biol.* 8, R3.
- 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.
- Chisholm, V.T., Lea, H.Z., Rai, R., Cooper, T.G., 1987.** Regulation of allantoin transport in wild-type and mutant strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 169, 1684–1690.
- Clement, T., Perez, M., Mouret, J.R., Sablayrolles, J.M., Camarasa, C., 2011.** Use of a continuous multistage bioreactor to mimic winemaking fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 150, 42–49.
- Colman-Lerner, A., Chin, T.E., Brent, R., 2001.** Yeast Cbk1 and Mob2 activate daughter-specific genetic programs to induce asymmetric cell fates. *Cell* 107, 739–750.
- Cooper, T.G., 1982.** Cooper: Nitrogen Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. Cold Spring Harbor Monograph Archive, North America.
- Cooper, T.G., 2002.** Transmitting the signal of excess nitrogen in *Saccharomyces cerevisiae* from the Tor proteins to the GATA factors: connecting the dots. *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 223–238.
- Coulter, A. D. & Godden, P. W. 2004.** Succinic acid - How it is formed, what is its effect on titratable acidity, and what factors influence its concentration in wine? *Wine Industry Journal* 16–25.
- Daran-Lapujade, P., Daran, J.-M., van Maris, A. J. A., de Winde, J. H. & Pronk, J. T. 2009.** Chemostat-based micro-array analysis in baker's yeast. *Adv Microb Physiol* 54, 257–311.
- Daran-Lapujade, P., Jansen, M.L.A., Daran, J., van Gulik, W., de Winde, J.H., Pronk, J.T., 2004.** Role of transcriptional regulation in controlling fluxes in central carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. A chemostat culture study. *Journal of Biological Chemistry* 279, 9125-9138.
- Delaunay, A., Isnard, A.-D., Toledano, M.B., 2000.** H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *EMBO J* 19, 5157–5166.
- Delneri, D., Gardner, D.C., Bruschi, C.V., Oliver, S.G., 1999.** Disruption of seven hypothetical aryl alcohol dehydrogenase genes from *Saccharomyces cerevisiae* and construction of a multiple knock-out strain. *Yeast* 15, 1681–1689.
- Dickinson, J.R., 2000.** Pathways of leucine and valine catabolism in yeast. *Meth. Enzymol.* 324, 80–92.
- Dickinson, J.R., Harrison, S.J., Hewlins, M.J.E., 1998.** An Investigation of the Metabolism of Valine to Isobutyl Alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 273, 25751 –25756.
- 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.
- Dikicioglu, D., Karabekmez, E., Rash, B., Pir, P., Kirdar, B., Oliver, S.G., 2011.** How yeast re-programmes its transcriptional profile in response to different nutrient impulses. *BMC Syst Biol* 5, 148.
- Diviès, C., Cachon, R., Cavin, J., Prévost, H., 1994.** Theme 4: Immobilized cell technology in wine production. *Critical Reviews in Biotechnology* 14, 135-153.

- Draper, E., Dubrovskiy, O., Bar, E.E., Stone, D.E., 2009.** Dse1 may control cross talk between the pheromone and filamentation pathways in yeast. *Curr. Genet.* 55, 611–621.
- Dubois, E., Grenson, M., 1979.** Methylamine/ammonia uptake systems in *Saccharomyces cerevisiae*: multiplicity and regulation. *Molecular and General Genetics MGG* 175, 67–76.
- Eden, A., Simchen, G. & Benvenisty, N. 1996.** Two yeast homologs of ECA39, a target for c-Myc regulation, code for cytosolic and mitochondrial branched-chain amino acid aminotransferases. *J Biol Chem* 271, 20242–20245.
- Eden, A., Van Nedervelde, L., Drukker, M., Benvenisty, N. & Debouq, A. 2001.** Involvement of branched-chain amino acid aminotransferases in the production of fusel alcohols during fermentation in yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology* 55, 296–300.
- Ehrlich, F. 1904.** Ueber das natürliche Isomere des Leucins. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* 37, 1809–1840.
- El Haloui, N., Picque, D., Corrieu, G., 1988.** Alcoholic fermentation in winemaking: On-line measurement of density and carbon dioxide evolution. *Journal of Food Engineering* 8, 17-30.
- Elbing, K., Larsson, C., Bill, R.M., Albers, E., Snoep, J.L., Boles, E., Hohmann, S., Gustafsson, L., 2004.** Role of Hexose Transport in Control of Glycolytic Flux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* 70, 5323–5330.
- Ernandes, J.R., De Meirsmann, C., Rolland, F., Winderickx, J., de Winde, J., Brandão, R.L., Thevelein, J.M., 1998.** During the initiation of fermentation overexpression of hexokinase PII in yeast transiently causes a similar deregulation of glycolysis as deletion of Tps1. *Yeast* 14, 255–269.
- Fazio, A., Jewett, M.C., Daran-Lapujade, P., Mustacchi, R., Usaite, R., Pronk, J.T., Workman, C.T., Nielsen, J., 2008.** Transcription factor control of growth rate dependent genes in *Saccharomyces cerevisiae*: A three factor design. *BMC Genomics* 9, 341.
- Fleet, G. H. 1993.** *Wine Microbiology and Biotechnology*. Taylor & Francis.
- Fleet, G.H, 2000.** Alternative fermentation technology, dans: Tenth Australian Wine Industry Technical Conference, Blair, RA Sas, AN Hayes, P Hoj, P, Adelaide, Australia, p. 172-177.
- Fleet, G.H, 2008.** Wine yeasts for the future. *FEMS yeast research* 979-995.
- Forsberg, H., Gilstring, C.F., Zargari, A., Martínez, P., Ljungdahl, P.O., 2001.** The role of the yeast plasma membrane SPS nutrient sensor in the metabolic response to extracellular amino acids. *Mol. Microbiol.* 42, 215–228.
- François, J., Parrou, J.L., 2001.** Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 125–145.
- Frick, O. & Wittmann, C. 2005.** Characterization of the metabolic shift between oxidative and fermentative growth in *Saccharomyces cerevisiae* by comparative ¹³C flux analysis. *Microbial Cell Factories* 4, 30.
- Gancedo, J. M. 2008.** The early steps of glucose signalling in yeast. *FEMS Microbiology Reviews* 32, 673–704.
- 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 Science and Technology* 41, 501–510.

- 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.
- González-Marco, A., Jiménez-Moreno, N., Ancín-Azpilicueta, C., 2010.** Influence of Nutrients Addition to Non limited-in-Nitrogen Must on Wine Volatile Composition. *Journal of Food Science* 75, S206–S211.
- Greenberg, D. M. 1969.** Carbon catabolism of amino acids. In *Metabolic Pathways*, Academic, 3rd edn., pp. 126–128. New York: Greenberg D.M.
- Grenson, M., Hou, C. & Crabeel, M. 1970.** Multiplicity of the Amino Acid Permeases in *Saccharomyces cerevisiae* IV. Evidence for a General Amino Acid Permease. *J Bacteriol* 103, 770–777.
- Hayes, A., Zhang, N., Wu, J., Butler, P.R., Hauser, N.C., Hoheisel, J.D., Lim, F.L., Sharrocks, A.D., Oliver, S.G., 2002.** Hybridization array technology coupled with chemostat culture: Tools to interrogate gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods* 26, 281-290.
- Hazelwood, L. A., Tai, S. L., Boer, V. M., de Winde, J. H., Pronk, J. T. & Daran, J. M. 2006.** A new physiological role for Pdr12p in *Saccharomyces cerevisiae*: export of aromatic and branched-chain organic acids produced in amino acid catabolism. *FEMS Yeast Res* 6, 937–945.
- 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.
- Hazelwood, L.A., Walsh, M.C., Luttk, M.A.H., Daran-Lapujade, P., Pronk, J.T., Daran, J., 2009.** Identity of the growth-limiting nutrient strongly affects storage carbohydrate accumulation in anaerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 6876-6885.
- Henschke, P. A. & Jiranek, V. 1993.** Yeasts: Metabolism of nitrogen compounds. In *Wine Microbiology and Biotechnology*, Harwood Academic Publishers., pp. 77–163. Fleet, G.H.
- Herbert, D. 1961.** A theoretical analysis of continuous culture systems. *Continuous culture* 21–53.
- Hernandez-orte, P., Bely, M., Cacho, J., Ferreira, V., 2006.** Impact of ammonium additions on volatile acidity, ethanol, and aromatic compound production by different *Saccharomyces cerevisiae* strains during fermentation in controlled synthetic media. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 12, 150–160.
- Heux, S. 2006.** Ingénierie métabolique et analyse 13C-flux du métabolisme central des levures *Saccharomyces cerevisiae* oenologiques.
- Hinnebusch, A. G. 1988.** Mechanisms of gene regulation in the general control of amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* 52, 248–273.
- Hinnebusch, A. G. 2005.** Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast. *Annu Rev Microbiol* 59, 407–450.
- Hohmann, S. 1991** Characterization of PDC6, a third structural gene for pyruvate decarboxylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 173, 7963–7969.
- Holmberg, S. & Petersen, J. G. 1988.** Regulation of isoleucine-valine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 13, 207–217.
- Horák, J. (1997).** Yeast nutrient transporters. *Biochim Biophys Acta* 1331, 41–79.
- Hoskisson, P.A., Hobbs, G., 2005.** Continuous culture - making a comeback? *Microbiology* 151, 3153–3159.

- Ihaka, R., Gentleman, R., 1996.** R: A Language for Data Analysis and Graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics* 5, 299–314.
- Iraqi, I., Vissers, S., Cartiaux, M., Urrestarazu, A., 1998.** Characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* *ARO8* and *ARO9* genes encoding aromatic aminotransferases I and II reveals a new aminotransferase subfamily. *Mol. Gen. Genet.* 257, 238–248.
- Jiménez-Martí, E., Aranda, A., Mendes-Ferreira, A., Mendes-Faia, A., del Olmo, M.L., 2007.** The nature of the nitrogen source added to nitrogen depleted vinifications conducted by a *Saccharomyces cerevisiae* strain in synthetic must affects gene expression and the levels of several volatile compounds. *Antonie Van Leeuwenhoek* 92, 61–75.
- Jiménez-Martí, E., del Olmo, M.L., 2008.** Addition of ammonia or amino acids to a nitrogen-depleted medium affects gene expression patterns in yeast cells during alcoholic fermentation. *FEMS Yeast Res.* 8, 245–256.
- 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.
- Jiranek, V., Langridge, P., Henschke, P.A., 1995.** Regulation of hydrogen sulfide liberation in wine-producing *Saccharomyces cerevisiae* strains by assimilable nitrogen. *Appl Environ Microbiol* 61, 461–467.
- Jones, E., Fink, G.R., 1982.** Regulation of amino acid and nucleotide biosynthesis in yeast., in: *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Metabolism and Gene Expression.* Strathern JN, Jones EW and Broach JR., Cold Spring Harbor, NY, pp. 181–299.
- Jones, M. & Pierce, J.S. 1964.** Absorption of amino acids from wort by yeasts. *J Inst Brew* 307–315.
- Jorgensen, P., Nishikawa, J.L., Breikreutz, B.-J., Tyers, M., 2002.** Systematic identification of pathways that couple cell growth and division in yeast. *Science* 297, 395–400.
- Jurgenson, C.T., Begley, T.P., Ealick, S.E., 2009.** The structural and biochemical foundations of thiamin biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 569–603.
- Kitamoto, K., Yoshizawa, K., Ohsumi, Y. & Anraku, Y. 1988.** Dynamic aspects of vacuolar and cytosolic amino acid pools of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 170, 2683–2686.
- Kohlhaw, G.B., 2003.** Leucine Biosynthesis in Fungi: Entering Metabolism Through the Back Door. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 1–15.
- Kourkoutas Y, Bekatorou A, Banat IM, Marchant R, Koutinas AA 2004.** Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiology* 2004 ;21(4):377-397.
- Kresnowati, M.T.A.P., Suarez-Mendez, C.M., van Winden, W.A., van Gulik, W.M., Heijnen, J.J., 2008.** Quantitative physiological study of the fast dynamics in the intracellular pH of *Saccharomyces cerevisiae* in response to glucose and ethanol pulses. *Metab. Eng.* 10, 39–54.
- Kresnowati, M.T.A.P., van Winden, W.A., Almering, M.J.H., ten Pierick, A., Ras, C., Knijnenburg, T.A., Daran-Lapujade, P., Pronk, J.T., Heijnen, J.J., Daran, J.M., 2006.** When transcriptome meets metabolome: fast cellular responses of yeast to sudden relief of glucose limitation. *Molecular Systems Biology* 2.
- Laluce, C., Souza, C. S., Abud, C. L., Gattas, E. A. L. & Walker, G. M. 2002.** Continuous ethanol production in a nonconventional five-stage system operating with yeast

- cell recycling at elevated temperatures. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 29, 140–144.
- Lambrechts, M. G. & Pretorius, I. S. 2000.** Yeast and its importance to wine aroma- A review. *South African Journal of Enology and Viticulture* 21.
- Lara, A.R., Taymaz-Nikerel, H., Mashego, M.R., van Gulik, W.M., Heijnen, J.J., Ramírez, O.T., van Winden, W.A., 2009.** Fast dynamic response of the fermentative metabolism of *Escherichia coli* to aerobic and anaerobic glucose pulses. *Biotechnol. Bioeng.* 104, 1153–1161.
- Lilly, M., Bauer, F.F., Lambrechts, M.G., Swiegers, J.H., Cozzolino, D., Pretorius, I.S., 2006.** The effect of increased yeast alcohol acetyltransferase and esterase activity on the flavour profiles of wine and distillates. *Yeast* 23, 641–659.
- 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.
- Lin, Y., Bayrock, D., Ingledew, W.M., 2001.** Metabolic flux variation of *Saccharomyces cerevisiae* cultivated in a multistage continuous stirred tank reactor fermentation environment. *biotechnology progress* 17, 1055-1060.
- Lipinski, J. 2001.** Automated solid phase dynamic extraction – Extraction of organics using a wall coated syringe needle. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 369, 57–62.
- Ljungdahl, P. O. 2009.** Amino-acid-induced signalling via the SPS-sensing pathway in yeast. *Biochem Soc Trans* 37, 242–247.
- Ljungdahl, P.O., Daignan-Fornier, B., 2012.** Regulation of Amino Acid, Nucleotide, and Phosphate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 190, 885–929.
- Loukatos, P., Kanellaki, M., Komaitis, M., Athanasiadis, I., Koutinas, A.A., 2003.** A new technological approach proposed for distillate production using immobilized cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 95, 35-39.
- Magasanik, B., Kaiser, C.A., 2002.** Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 290, 1–18.
- Malherbe, S., Fromion, V., Hilgert, N., Sablayrolles, J., 2004.** Modeling the effects of assimilable nitrogen and temperature on fermentation kinetics in enological conditions. *Biotechnology and Bioengineering* 86, 261-272.
- Manginot, C., Sablayrolles, J. M., Roustan, J. L. & Barre, P. 1997.** Use of constant rate alcoholic fermentations to compare the effectiveness of different nitrogen sources added during the stationary phase. *Enzyme and Microbial Technology* 20, 373–380.
- Marini, A. M., Springael, J. Y., Frommer, W. B. & André, B. 2000.** Cross-talk between ammonium transporters in yeast and interference by the soybean SAT1 protein. *Mol Microbiol* 35, 378–385.
- Marini, A. M., Vissers, S., Urrestarazu, A. & André, B. (1994).** Cloning and expression of the MEP1 gene encoding an ammonium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 13, 3456–3463.
- Marini, A., SoussiBoudekou, S., Vissers, S., Andre, B., 1997.** A family of ammonium transporters in *Saccharomyces cerevisiae* RID D-1725-2010. *Mol. Cell. Biol.* 17, 4282–4293.
- Marks, V.D., van der Merwe, G.K., van Vuuren, H.J.J., 2003.** Transcriptional profiling of wine yeast in fermenting grape juice: regulatory effect of diammonium phosphate. *FEMS Yeast Res.* 3, 269–287.

- Martínez-Pastor, M.T., Marchler, G., Schüller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H., Estruch, F., 1996.** The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J.* 15, 2227–2235.
- Mashego, M., Rumbold, K., De Mey, M., Vandamme, E., Soetaert, W., Heijnen, J., 2007.** Microbial metabolomics: past, present and future methodologies. *Biotechnology Letters* 29, 1–16.
- Mason, A.B., Dufour, J.P., 2000.** Alcohol acetyltransferases and the significance of ester synthesis in yeast. *Yeast* 16, 1287–1298.
- Mendes-Ferreira, A., Mendes-Faia, A., Leão, C., 2004.** Growth and fermentation patterns of *Saccharomyces cerevisiae* under different ammonium concentrations and its implications in winemaking industry. *Journal of Applied Microbiology* 97, 540–545.
- Miller, A.C., Wolff, S.R., Bisson, L.F., Ebeler, S.E., 2007.** Yeast Strain and Nitrogen Supplementation: Dynamics of Volatile Ester Production in Chardonnay Juice Fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 58, 470–483.
- Minard, K.I., McAlister-Henn, L., 1991.** Isolation, nucleotide sequence analysis, and disruption of the *MDH2* gene from *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for three isozymes of yeast malate dehydrogenase. *Mol. Cell. Biol.* 11, 370–380.
- Moenne, I., Mouret, J. R., Sablayrolles, J. , Picou, C., Agosin, E. & Farines, V. 2012.** Characterization of bubble-free oxygenation system during alcoholic fermentation. Presented at the Macrowine 2012, Bordeaux.
- Mojzita, D., Hohmann, S., 2006.** Pdc2 coordinates expression of the THI; regulon in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Genetics and Genomics* 276, 147–161.
- Molina, A., Swiegers, J., Varela, C., Pretorius, I. & Agosin, E. 2007.** Influence of wine fermentation temperature on the synthesis of yeast-derived volatile aroma compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77, 675–687.
- Monod, J. 1950.** La technique de culture continue. Théorie et application. *Ann inst Pasteur* 390–410.
- Monteiro, F.F., Bisson, L.F., 1991.** Amino Acid Utilization and Urea Formation During Vinification Fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 42, 199–208.
- Moreira, N., de Pinho, P.G., Santos, C., Vasconcelos, I., 2011.** Relationship between nitrogen content in grapes and volatiles, namely heavy sulphur compounds, in wines. *Food Chemistry* 126, 1599–1607.
- Mountain, H.A., Byström, A.S., Korch, C., 1993.** The general amino acid control regulates *MET4*, which encodes a methionine-pathway-specific transcriptional activator of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology* 7, 215–228.
- Mouret J.R., Morakul S., Nicolle P., Aguera E., Perez M., Athes V. and Sablayrolles J.M. 2011.** Interest of on-line higher alcohol and ester determinations during winemaking fermentations. *Fruit & Veg Processing*, 1st Euro-Mediterranean Symposium, Avignon. Communication orale + texte intégral.
- Natarajan, K., Meyer, M.R., Jackson, B.M., Slade, D., Roberts, C., Hinnebusch, A.G., Marton, M.J., 2001.** Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast. *Mol. Cell. Biol.* 21, 4347–4368.
- Navarro-Aviño, J.P., Prasad, R., Miralles, V.J., Benito, R.M., Serrano, R., 1999.** A proposal for nomenclature of aldehyde dehydrogenases in *Saccharomyces cerevisiae* and characterization of the stress-inducible *ALD2* and *ALD3* genes. *Yeast* 15, 829–842.

- Nissen, T. L., Schulze, U., Nielsen, J. & Villadsen, J. 1997.** Flux distributions in anaerobic, glucose-limited continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology (Reading, Engl)* 143 (Pt 1), 203–218.
- Nogales-Cadenas, R., Carmona-Saez, P., Vazquez, M., Vicente, C., Yang, X., Tirado, F., Carazo, J.M., Pascual-Montano, A., 2009.** GeneCodis: interpreting gene lists through enrichment analysis and integration of diverse biological information. *Nucleic Acids Res.* 37, W317–322.
- Novick, A. & Szilard, L. 1950.** Description of the Chemostat. *Science* 112, 715–716.
- Novo, M., Bigey, F., Beyne, E., Galeote, V., Gavory, F., Mallet, S., Cambon, B., Legras, J.-L., Wincker, P., Casaregola, S., Dequin, S., 2009.** Eukaryote-to-eukaryote gene transfer events revealed by the genome sequence of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* EC1118. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 16333–16338.
- Nykänen, L. & Suomalainen, H. 1983.** *Aroma of beer, wine, and distilled alcoholic beverages*. Springer.
- Oshita, K., Kubota, M., Uchida, M. & Ono, M. 1995.** Clarification of the relationship between fusel alcohol formation and amino acid assimilation by brewing yeast using ¹³C-labeled amino- acid, pp. 387–394. Presented at the 25th EBC Congr.
- Ough, C.S., Crowell, E.A., Mooney, L.A., 1988.** Formation of Ethyl Carbamate Precursors During Grape Juice (Chardonnay) Fermentation. I. Addition of Amino Acids, Urea, and Ammonia: Effects of Fortification on Intracellular and Extracellular Precursors. *Am. J. Enol. Vitic.* 39, 243–249.
- Ough, C.S., Huang, Z., An, D., Stevens, D., 1991.** Amino Acid Uptake by Four Commercial Yeasts at Two Different Temperatures of Growth and Fermentation: Effects on Urea Excretion and Reabsorption. *Am. J. Enol. Vitic.* 42, 26–40.
- Oura, E. 1973.** *Energetics of yeast growth under different intensities of aeration*.
- 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.
- Petersen, J., Kielland-Brandt, M. C., Nilsson-Tillgren, T., Bornaes, C. & Holmberg, S. 1988.** Molecular Genetics of Serine and Threonine Catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 119, 527–534.
- Pierce, J. S. 1987.** The role of nitrogen in brewing. *Journal of the Institute of Brewing* 93, 378–381.
- Piper, M.D.W., Daran-Lapujade, P., Bro, C., Regenber, B., Knudsen, S., Nielsen, J., Pronk, J.T., 2002.** Reproducibility of Oligonucleotide Microarray Transcriptome Analyses AN INTERLABORATORY COMPARISON USING CHEMOSTAT CULTURES OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*. *J. Biol. Chem.* 277, 37001–37008.
- Pretorius, I. S. ;Van der W. 1999.** Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the South African Wine Industry. A review. *South African Journal of Enology and Viticulture* v. 20(2) p. 61-74.
- Procopio, S., Qian, F., Becker, T., 2011.** Function and regulation of yeast genes involved in higher alcohol and ester metabolism during beverage fermentation. *European Food Research and Technology* 233, 721–729.
- Pronk, J. T., Yde Steensma, H. & Van Dijken, J. P. 1996.** Pyruvate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 12, 1607–1633.
- Przybyla-Zawislak, B., Gadde, D.M., Ducharme, K., McCammon, M.T., 1999.** Genetic and biochemical interactions involving tricarboxylic acid cycle (TCA) function

- using a collection of mutants defective in all TCA cycle genes. *Genetics* 152, 153–166.
- Rao, N.N., Lütz, S., Würges, K., Minör, D., 2009.** Continuous biocatalytic processes. *Organic Process Research & Development* 13, 607-616.
- Repetto, B., Tzagoloff, A., 1989.** Structure and regulation of *KGD1*, the structural gene for yeast alpha-ketoglutarate dehydrogenase. *Mol. Cell. Biol.* 9, 2695–2705.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A. & Dubourdieu, D. 1998.** *Traité d'oenologie*. Dunod.
- Robinson, M.D., Grigull, J., Mohammad, N., Hughes, T.R., 2002.** FunSpec: a web-based cluster interpreter for yeast. *BMC Bioinformatics* 3, 35.
- Rossignol, T. 2004.** Analyse de l'expression du génome des levures oenologiques en fermentation alcoolique par des approches post-génomiques. Thèse doctorat, [S.l.]: [s.n.].
- Rossignol, T., Dulau, L., Julien, A., Blondin, B., 2003.** Genome-wide monitoring of wine yeast gene expression during alcoholic fermentation. *Yeast* 20, 1369–1385.
- Rossouw, D., Næs, T., Bauer, F.F., 2008.** Linking gene regulation and the exometabolome: A comparative transcriptomics approach to identify genes that impact on the production of volatile aroma compounds in yeast. *BMC Genomics* 9, 530.
- Roustan, J. L. & Sablayrolles, J. M. 2004.** Role of trehalose and glycogen in alcoholic fermentation in wine-making conditions. *Journal of Wine Research* 15, 189–202.
- Sablayrolles, J.M., 2009.** Control of alcoholic fermentation in winemaking: Current situation and prospect. *Food Research International* 42, 418–424.
- Sablayrolles, J.M., Barre, P., Grenier, P., 1987.** Design of a laboratory automatic system for studying alcoholic fermentations in anisothermal enological conditions. *Biotechnology Techniques* 1, 181-184-184.
- Saerens, S. M. G., Verstrepen, K. J., Laere, V., M, S. D., 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.
- 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.
- 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.
- Saint-Prix, F., Bönquist, L., Dequin, S., 2004.** Functional analysis of the ALD gene family of *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic growth on glucose: the NADP+-dependent Ald6p and Ald5p isoforms play a major role in acetate formation. *Microbiology (Reading, Engl.)* 150, 2209–2220.
- Saldanha, A.J., Brauer, M.J., Botstein, D., 2004.** Nutritional homeostasis in batch and steady-state culture of yeast. *Molecular Biology of the Cell* 15, 4089-4104.
- Schaaff-Gerstenschläger, I., Mannhaupt, G., Vetter, I., Zimmermann, F.K., Feldmann, H., 1993.** *TKL2*, a second transketolase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. Cloning, sequence and deletion analysis of the gene. *Eur. J. Biochem.* 217, 487–492.
- Schmitt, A.P., McEntee, K., 1996.** Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 5777–5782.

- Schmitz, M., Hirsch, E., Bongaerts, J., Takors, R., 2002.** Pulse Experiments as a Prerequisite for the Quantification of in Vivo Enzyme Kinetics in Aromatic Amino Acid Pathway of *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress* 18, 935–941.
- Schneper, L., Düvel, K., Broach, J.R., 2004.** Sense and sensibility: nutritional response and signal integration in yeast. *Current Opinion in Microbiology* 7, 624-630.
- Schulze, U., Lidén, G., Villadsen, J., 1996.** Dynamics of ammonia uptake in nitrogen limited anaerobic cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.* 46, 33–42.
- Seeboth, P.G., Bohnsack, K., Hollenberg, C.P., 1990.** *pdc1(0)* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* give evidence for an additional structural PDC gene: cloning of *PDC5*, a gene homologous to PDC1. *J. Bacteriol.* 172, 678–685.
- Sinha, A., Maitra, P.K., 1992.** Induction of specific enzymes of the oxidative pentose phosphate pathway by glucono-delta-lactone in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 138, 1865–1873.
- Sipsas, V., Kolokythas, G., Kourkoutas, Y., Plessas, S., Nedovic, V.A., Kanellaki, M., 2009.** Comparative study of batch and continuous multi-stage fixed-bed tower (MFBT) bioreactor during wine-making using freeze-dried immobilized cells. *Journal of Food Engineering* 90, 495-503.
- Smith, M.G., Des Etages, S.G., Snyder, M., 2004.** Microbial synergy via an ethanol-triggered pathway. *Mol. Cell. Biol.* 24, 3874–3884.
- Smyth, G.K., 2004.** Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 3, Article3.
- Smyth, G.K., Michaud, J., Scott, H.S., 2005.** Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinformatics* 21, 2067–2075.
- Smyth, G.K., Speed, T., 2003.** Normalization of cDNA microarray data. *Methods* 31, 265–273.
- Sonnleitner, B., 1998.** Dynamic adaptation of microbes. *J. Biotechnol.* 65, 47–60.
- Sophianopoulou, V. & Diallinas, G. 1995.** Amino acid transporters of lower eukaryotes: regulation, structure and topogenesis. *FEMS Microbiol Rev* 16, 53–75.
- Stanbury, P.F., Whitaker, A., Hall, S.J., 1999.** Principles of Fermentation Technology. Butterworth-Heinemann.
- Stanford, D.R., Whitney, M.L., Hurto, R.L., Eisaman, D.M., Shen, W.-C., Hopper, A.K., 2004.** Division of labor among the yeast Sol proteins implicated in tRNA nuclear export and carbohydrate metabolism. *Genetics* 168, 117–127.
- Strehaiano, P., Ramon-Portugal, F., Taillandier, P., 2006.** Yeasts as biocatalysts, in: Querol, A., Fleet, G. (Éd.), *Yeasts in Food and Beverages*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, p. 243-283.
- Swiegers, J. h., Bartowsky, E. j., Henschke, P. a. & Pretorius, I. s. 2005.** Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11, 139–173.
- Taillandier, P., Ramon Portugal, F., Fuster, A., Strehaiano, P., 2007.** Effect of ammonium concentration on alcoholic fermentation kinetics by wine yeasts for high sugar content. *Food Microbiology* 24, 95–100.
- Tanaka, J. & Fink, G. R. (1985).** The histidine permease gene (*HIP1*) of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 38, 205–214.
- Taymaz-Nikerel, H., van Gulik, W.M., Heijnen, J.J., 2011.** *Escherichia coli* responds with a rapid and large change in growth rate upon a shift from glucose-limited to glucose-excess conditions. *Metab. Eng.* 13, 307–318.

- ter Linde, J. J. M., Liang, H., Davis, R. W., Steensma, H. Y., van Dijken, J. P. & Pronk, J. T. 1999.** Genome-Wide Transcriptional Analysis of Aerobic and Anaerobic Chemostat Cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 181, 7409–7413.
- ter Schure, E. G., van Riel, N. A. & Verrips, C. T. 2000.** The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* 24, 67–83.
- Tessier, W.D., Meaden, P.G., Dickinson, F.M., Midgley, M., 1998.** Identification and disruption of the gene encoding the K(+)-activated acetaldehyde dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 164, 29–34.
- Theobald, U., Mailinger, W., Baltes, M., Rizzi, M., Reuss, M., 1997.** In vivo analysis of metabolic dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*: I. Experimental observations. *Biotechnol. Bioeng.* 55, 305–316.
- 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 Chemistry* 127, 1072–1083.
- Turoscy, V., Cooper, T.G., 1987.** Ureidosuccinate is transported by the allantoate transport system in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 169, 2598–2600.
- Ugliano, M., Henschke, P.A., Herderich, M.J., Pretorius, I.S., 2007.** Nitrogen management is critical for wine flavour and style. *Wine industry Journal*.
- Ugliano, M., Travis, B., Francis, I.L., Henschke, P.A., 2010.** Volatile Composition and Sensory Properties of Shiraz Wines As Affected by Nitrogen Supplementation and Yeast Species: Rationalizing Nitrogen Modulation of Wine Aroma. *J. Agric. Food Chem.* 58, 12417–12425.
- van den Brink, J., Canelas, A.B., van Gulik, W.M., Pronk, J.T., Heijnen, J.J., de Winde, J.H., Daran-Lapujade, P., 2008.** Dynamics of Glycolytic Regulation during Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to Fermentative Metabolism. *Appl Environ Microbiol* 74, 5710–5723.
- Van Der Sluis, C., Rahardjo, Y.S.P., Smit, B.A., Kroon, P.J., Hartmans, S., Ter Schure, E.G., Tramper, J., Wijffels, R., 2002.** Concomitant extracellular accumulation of alpha-keto acids and higher alcohols by *Zygosaccharomyces rouxii*. *J. Biosci. Bioeng.* 93, 117–124.
- van Dijken, J. P. & Scheffers, W. A. 1986.** Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. *FEMS Microbiology Letters* 32, 199–224.
- Verstrepen, K.J., Van Laere, S.D.M., Vanderhaegen, B.M.P., Derdelinckx, G., Dufour, J.-P., Pretorius, I.S., Winderickx, J., Thevelein, J.M., Delvaux, F.R., 2003.** Expression Levels of the Yeast Alcohol Acetyltransferase Genes *ATF1*, *Lg-ATF1*, and *ATF2* Control the Formation of a Broad Range of Volatile Esters. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5228–5237.
- Verstrepen, K.J., Van Laere, S.D.M., Vercammen, J., Derdelinckx, G., Dufour, J.-P., Pretorius, I.S., Winderickx, J., Thevelein, J.M., Delvaux, F.R., 2004.** The *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyl transferase *Atf1p* is localized in lipid particles. *Yeast* 21, 367–377.
- 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.

- 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.
- Walsh, R.B., Kawasaki, G., Fraenkel, D.G., 1983.** Cloning of genes that complement yeast hexokinase and glucokinase mutants. *J. Bacteriol.* 154, 1002–1004.
- 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. *Journal of Applied Microbiology* 94, 349–359.
- Wick, L. M., Quadroni, M. & Egli, T. 2001.** Short- and long-term changes in proteome composition and kinetic properties in a culture of *Escherichia coli* during transition from glucose-excess to glucose-limited growth conditions in continuous culture and vice versa. *Environ Microbiol* 3, 588–599.
- Wu, J., Zhang, N., Hayes, A., Panoutsopoulou, K., Oliver, S.G., 2004.** Global analysis of nutrient control of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* during growth and starvation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 3148–3153.
- Yamauchi, Y., Okamoto, T., Murayama, H., Nagara, A., Kashiwara, T., Yoshida, M., Yasui, T., Nakanishi, K., 1995.** Rapid fermentation of beer using an immobilized yeast multistage bioreactor system. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 53, 261-276.
- Yoshimoto, H., Fukushige, T., Yonezawa, T., Sone, H., 2002.** Genetic and physiological analysis of branched-chain alcohols and isoamyl acetate production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 501–508.

Résumé

Nous avons mis au point un fermenteur continu multi-étagé (MSCF) dans le but de reproduire les conditions de la fermentation alcoolique en conditions œnologiques. Ce bioréacteur permet de maintenir les levures dans un milieu stable et contrôlé tout en découplant la croissance et la phase stationnaire. Le système offre donc la possibilité d'obtenir des levures non croissantes dans un milieu de composition stable. Dans un premier temps, nous avons validé la pertinence du MSCF pour reproduire les conditions de fermentation du batch, par approche intégrée (des paramètres cinétiques, des métabolites intra et exo cellulaire et de l'expression génique). Nous avons ensuite utilisé ce bioréacteur pour étudier les mécanismes d'adaptation métabolique des microorganismes suite à un ajout d'azote, pratique largement répandue en œnologie. Plusieurs résultats originaux ont été obtenus concernant, notamment, la réorganisation du cycle TCA, le transport des sources azotées et la synthèse des alcools supérieurs et esters. La fiabilité de l'outil mis au point et l'originalité des données obtenues ouvrent des perspectives à l'utilisation du MSCF pour la compréhension du métabolisme et des mécanismes d'adaptation des levures.

Titre : Utilisation d'un fermenteur continu multi-étagé pour la compréhension des mécanismes d'adaptation de la levure à des ajouts d'azote en conditions œnologiques

Mots clés : Fermenteur continu multi-étagé, fermentation alcoolique, azote, adaptation du métabolisme

Abstract

We set up a multi-stage continuous fermentor (MSCF) to mimic the conditions of alcoholic fermentation. In this bioreactor, the yeasts are in a steady and well controlled state representative of the growth and stationary phases of the batch. The ability of the MSCF to reproduce batch fermentation was assessed using an integrated approach (measurement of kinetic parameters, intra and exo-cellular metabolites and gene expression). We then used the MSCF to study the impact of nitrogen supplementation performed during the stationary phase, on yeasts metabolism. Several original results were obtained, concerning the TCA cycle, the transport of nitrogenous sources and the synthesis of higher alcohols and esters. This work points out the interest of using the MSCF to assess the effect of medium perturbations during alcoholic fermentation, especially during the stationary phase. More generally, the accuracy of the MSCF and the originality of the data obtained open new prospects for a better understanding of yeasts metabolism and regulation mechanisms.

Title : Use of a continuous multi-stage fermentation device to understand the yeasts adaptation mechanisms to nitrogen supplementation in winemaking conditions

Keywords : Multi-stage continuous fermentor, alcoholic fermentation, nitrogen, metabolism adaptation
