Collège Doctoral du Languedoc-Roussillon

THÈSE

Pour obtenir le grade de

Docteur

Délivré par le

Centre international d'études supérieures en sciences agronomiques

Montpellier

Préparée au sein de l'école doctorale

Sciences des Procédés – Sciences des Aliments

Et de l'unité de recherche

SPO – Sciences Pour l'Œnologie

Spécialité : **Biotechnologie, Microbiologie**

Présentée par **Stéphanie Rollero**

Impact des paramètres environnementaux sur la synthèse des arômes fermentaires par *Saccharomyces cerevisiae* en fermentation œnologique

Soutenue le 10 Juillet 2015 devant le jury composé de

M. Florian BAUER, Professeur, Institute for Wine Biotechnology, Stellenbosch, Afrique du Sud	Rapporteur
M. José Manuel GUILLAMON NAVARRO, Professeur, Instituto de Agroquimica y Tecnologia de Alimentos, Valence, Espagne	Rapporteur
Mme Sophie LANDAUD, Professeur, AgroParisTech, Grignon, France	Examinatrice
Mme Sylvie DEQUIN, Directeur de Recherches, INRA, Montpellier, France	Directrice de thèse
M. Jean-Marie SABLAYROLLES, Directeur de Recherches, INRA, Montpellier, France	Directeur de thèse
Mme Anne ORTIZ-JULIEN, Responsable R&D levures et nutriments, Lallemand SAS, Blagnac, France	Invitée

Montpellier SupAgro

Collège Doctoral du Languedoc-Roussillon

THÈSE

Pour obtenir le grade de

Docteur

Délivré par le

Centre international d'études supérieures en sciences agronomiques

Montpellier

Préparée au sein de l'école doctorale

Sciences des Procédés – Sciences des Aliments

Et de l'unité de recherche

SPO – Sciences Pour l'Œnologie

Spécialité : **Biotechnologie, Microbiologie**

Présentée par **Stéphanie Rollero**

Impact des paramètres environnementaux sur la synthèse des arômes fermentaires par *Saccharomyces cerevisiae* en fermentation œnologique

Soutenue le 10 Juillet 2015 devant le jury composé de

M. Florian BAUER, Professeur, Institute for Wine Biotechnology, Stellenbosch, Afrique du Sud	Rapporteur
M. José Manuel GUILLAMON NAVARRO, Professeur, Instituto de Agroquimica y Tecnologia de Alimentos, Valence, Espagne	Rapporteur
Mme Sophie LANDAUD, Professeur, AgroParisTech, Grignon, France	Examinatrice
Mme Sylvie DEQUIN, Directeur de Recherches, INRA, Montpellier, France	Directrice de thèse
M. Jean-Marie SABLAYROLLES, Directeur de Recherches, INRA, Montpellier, France	Directeur de thèse
Mme Anne ORTIZ-JULIEN, Responsable R&D levures et nutriments, Lallemand SAS, Blagnac, France	Invitée

Montpellier SupAgro

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein de l'UMR Sciences pour l'Œnologie de Montpellier dans le cadre d'un contrat CIFRE avec la société Lallemand SAS. Je remercie donc l'UMR SPO et la société Lallemand de m'avoir accueillie et permis de réaliser cette thèse.

Je remercie Florian Bauer et Jose Guillamon, rapporteurs, qui se sont intéressés à mon travail et ont accepté de l'évaluer. Merci de vous être déplacés pour assister à ma soutenance de thèse. Je remercie également Sophie Landaud, présidente du jury, qui m'a également suivi et conseillé durant mes comités de thèse. Merci aussi à Claudie Roulland d'avoir accepté de participer aux comités de thèse et d'avoir apporté son expérience.

Cette thèse fut une aventure scientifique me permettant d'acquérir de nombreuses compétences techniques et des savoirs différents. Mais cette thèse fut bien plus que ça : une superbe aventure humaine !

Je remercie tout particulièrement Sylvie Dequin et Jean-Marie Sablayrolles, mes directeurs de thèse, pour leur encadrement scientifique et leurs conseils avisés tout au long de ces trois ans. Votre aide fut précieuse.

Je remercie chaleureusement Anne Ortiz-Julien de la société Lallemand pour son soutien et son enthousiasme au cours de ce projet. Merci d'avoir été une source d'encouragements durant ces trois années.

Je remercie tout spécialement Jean-Roch Mouret, mon encadrant de thèse, même si merci n'est pas suffisant. Merci de m'avoir dirigée, aidée, soutenue, encouragée… bref d'avoir été là à chaque instant. Merci pour ta bonne humeur, ton humour, tes coups de téléphone pour vérifier que tout allait bien à Pech Rouge, les sorties au Mas de Saporta, les sorties rugby, le ravitaillement en bonbons …. et j'en oublie sûrement. Bref, sans toi ces trois ans de thèse n'auraient définitivement pas été aussi géniaux !

Mes remerciements vont également à Carole Camarasa, ma coach en métabolisme. Merci pour ton aide et ta patience lors de mes nombreuses sollicitations et pour ton soutien de tous les jours. Merci d'avoir partagé ce superbe voyage à l'autre bout de monde où nous avons mangé des ribs, vu des pingouins et réalisé un superbe feeties !

Un énorme merci à Isabelle Sanchez (alias Miss Behnken) pour ces trois années de plan expérimental, ACP, AFM … Merci d'avoir créé Popmodel et Kinaroma. R est devenu une de mes lettres préférées. Merci aussi pour tous les « à côté », les soirées barbecues ou jeux (cette partie de Mémoire 44 ne s'oubliera jamais !) ; on aura quand même bien ri pendant trois ans.

Je remercie vivement Audrey Bloem pour son aide et ses conseils et merci d'avoir rendu la GC-MS un peu moins complexe et étrange à mes yeux. Merci d'avoir été là en dehors de la thèse : les sorties piscines, les restos pour éviter les matches de foot, les randonnées et Bordeaux par 40°C. Merci aussi d'avoir fait ta vie avec un comptable amateur de foot, je me suis tout de suite sentie moins seule et enfin quelqu'un me comprenait ! Au passage, merci à Jean-Phi d'être Jean-Phi avec ou sans chaussures. Je n'oublierai pas non plus que tous les vins ont de la cuisse ! ☺

Je n'oublie évidemment pas de remercier les Pech Rougiens, Evelyne Aguera (Allez l'OM !), Magaly Angenieux et Philippe Liénard, qui m'ont accueillie au sein de la HFD. Merci de votre aide pour les fermentations, pour avoir gérer les sautes d'humeur de la GC en ligne… et pour tout le reste !

Je remercie aussi Christian Picou (dit MacGyver) pour son aide en toutes circonstances (200 litres de moût c'est un peu compliqué mais heureusement qu'on rigole bien!) ; Marc Perez (à quand la tournée des stades ?) pour son aide pour l'HPLC et pour dompter EZChrom (qui n'est pas vraiment easy…). Je remercie également Martine Pradal pour toutes ces analyses d'acides aminés (quand le Biochrom veut bien coopérer !) ainsi que Sandrine Mallet pour la transcripto !

Merci à Peggy Rigou et Nicolas Bouvier du PTV pour avoir rendu la MSD disponible à chaque fois que j'en avais besoin (c'est-à-dire souvent et longtemps) !

Les remerciements qui suivent s'adressent à tous ceux qui de près ou de loin ont vécu tout ou partie de ces trois ans de thèse.

Vincent Farines (alias Mister Flour), merci d'avoir été un coloc de bureau génial (vive la team bureau 102 !). Trois années faites de chansons plus ou moins avouables (parce que Calogero et James Blunt c'est bien mais Destinée de Guy Marchand ça le fait beaucoup moins), des cascades de films, d'affichettes rigolotes et surtout d'achats, sous un déluge, de décos de Noël ainsi que de la plus décoration de bureau possible : le renne !

Un grand merci à Jessica Noble, ma copine de shopping (attend de voir le nouveau centre commercial de Marseille), de brunch, de patinoire (si un jour on finit par y aller), de crêpes à Odysseum et bien d'autres choses…

Un spécial big up à Manon De Puma, stéphanoise de son état (mais on te pardonne). 6 mois de stage pendant lesquels on aura cherché l'azote, le sens des cuves de spectro… Félicitations pour ton CDI, je suis sûre que tu es REFAITE !

Thomas OchandO et Pauline SeguinOt, les exilés du bureau 103, merci à vous d'être des O ! Vous savez bien tout ce que cela signifie ! Thomas, merci de ne pas avoir fui le jour de ton entretien après avoir passé une heure à m'écouter parler de ma thèse et d'avoir partagé avec moi le café de 7h30 pendant presque un an. Bon courage pour ta thèse ! Pauline, bravo tu as survécu au programme de fermentations intenses à Pech Rouge, tu ne t'es pas noyée dans tous ces chromatos. Ce fut un plaisir de t'encadrer pendant ton stage !

Merci aussi à Camille Duc (dit Michel) d'avoir partagé l'expérience Pech Rouge avec moi, d'aimer ce sport magnifique qu'est le handball (enfin quelqu'un de sensé !). Bonne chance pour ta thèse !

Je n'oublie évidemment pas tous les autres : Thibault (merci, je crois, pour tes infos toujours plus surprenantes), Julie (co-essayeuse du kitsch américain), Souhir (ma presque co-thésarde), Erick (merci d'être Corse), Virginie (avé l'accent comme on dit chez nous !), David et Matthias (vos thèses vont déchirer !), Nico, Lucie, Tiphaine, Christian B., Jean-Luc, Catherine, Frédéric, Stéphane, Thérèse, Pascale, Brigitte, Cécile, Pierre, Bruno Blondin, Delphine, Johan, les Stéphanie du sous-sol (quel beau prénom vous avez là), Lucas (vive le hand !)… merci à vous pour nos conversations, sorties et soutien mutuel !

Claire, Amélie et Valentin, merci à vous de m'avoir intégrée à votre groupe, les discussions improbables sur les documentaires télé, vos conseils et votre soutien.

Je remercie Jocelyne Billot et Marie-Andrée Couderc pour toutes les démarches administratives que vous avez prises en charge pour moi. Vous m'avez grandement facilité la tâche !

Et enfin les derniers mais non les moindres, je remercie mes soutiens de toujours, mes amis et ma famille (je vous cite pas tous vous êtes bien trop nombreux), qui ont permis que je réalise cet immense projet.
Plus spécialement, merci à ma maman (l'autre docteur de la famille mais elle est un vrai docteur qui soigne !), à Manu d'être à mes côtés depuis si longtemps et d'être resté même pendant ces 3 ans (enfin c'est toujours plus supportable qu'un match de l'OM !), et à Marie et Béa (dites Chansy et Phoky) qui ont toujours été là pour les bons et les mauvais moments, les week end délires et les cadeaux d'anniversaire ; c'est à mon tour maintenant de vous soutenir dans vos échéances respectives !

Table des matières

Communications liées à ce travail 1
Abréviations 3
Liste des figures 5
Liste des tableaux 7
Introduction générale 9
Introduction bibliographique 15
1 La fermentation alcoolique en œnologie 17
1.1. Caractéristiques de la fermentation 17
1.2. Déroulement de la fermentation 18
1.2.1. Phase de latence 19
1.2.2. Phase de croissance 19
1.2.3. Phase stationnaire 19
1.3. Métabolisme levurien en conditions œnologiques 20
1.4. Effets des principaux paramètres fermentaires 24
1.4.1. Température 24
1.4.2. Azote assimilable 25
1.4.3. Lipides 27
1.4.4. Oxygène 28
1.4.5. Sels minéraux et vitamines 28
1.5. Diversité des souches de levure 29
1.5.1. *Saccharomyces cerevisiae* : organisme modèle lié aux biotechnologies 29
1.5.2. Diversité génétique et phénotypique des souches 30
2 Les arômes du vin 33
2.1. Arômes variétaux 33
2.2. Arômes fermentaires 33
2.3. Les arômes de vieillissement 35
2.4. Voies de synthèse des arômes fermentaires 37
2.4.1. Alcools supérieurs 37
2.4.2. Esters d'acétate 40
2.4.3. Acides gras 42

2.4.4. Esters d'éthyle ... 42
2.5. Rôle et chronologie de production des arômes fermentaires ... 45
3 Effets des principaux paramètres fermentaires sur la production des arômes fermentaires . 47
3.1. Souche de levure ... 47
3.1.1. Amélioration des souches ... 47
3.1.2. Souche ECA5 ... 48
3.2. Température ... 49
3.3. Effet des ajouts d'azote ... 55
3.3.1. Alcools supérieurs ... 55
3.3.2. Esters ... 57
3.4. Effet des lipides ... 58
3.5. Effet des ajouts d'oxygène ... 59
3.6. Autres nutriments ... 60

Matériels et méthodes ... 63

1 Souches de levure ... 65
2 Milieux synthétiques ... 65
3 Mise en œuvre des fermentations et suivi de la cinétique fermentaire ... 68
3.1. Fermenteurs de 300 mL ... 68
3.2. Fermenteurs de 1.2 L ... 69
3.3. Fermenteurs de 10 L ... 70
4 Méthodes de dosage ... 71
4.1. Détermination de la biomasse ... 71
4.1.1. Population cellulaire ... 71
4.1.2. Matière sèche ... 72
4.2. Dosage des métabolites carbonés extra-cellulaires ... 72
4.3. Dosage de l'azote ... 73
4.3.1. Dosage de l'ammonium ... 73
4.3.2. Dosage des acides aminés ... 73
4.4. Suivi des composés volatils ... 75
4.4.1. Dosage hors-ligne des composés volatils dans la phase liquide ... 75
4.4.2. Dosage en ligne des composés volatils dans la phase gazeuse ... 78
4.4.3. Bilans gaz-liquide des composés volatils durant la fermentation ... 79

5 Filiation isotopique 81
5.1. Quantification isotopique des acides aminés protéinogéniques 81
5.1.1. Dérivatisation à l'éthylchloroformate (ECF) 81
5.1.2. Dérivatisation au N,N-Dimethylformamide dimethyl acetal (DMF/DMA) 83
5.1.3. Analyses en GC-MS 83
5.2. Quantification isotopique des composés d'arôme 84
6 Analyse transcriptomique 86
6.1. Prélèvement des échantillons 86
6.2. Extraction et purification des ARN totaux 86
6.3. Marquage 87
6.4. Hybridation 87
6.5. Acquisition des données transcriptomiques 88
7 Analyses statistiques et traitement des données 88
7.1. Plan expérimental de Box-Behnken 88
7.2. Traitement des données cinétiques 89
7.2.1. Modélisation des courbes de croissance cellulaire 89
7.2.2. Modélisation des courbes de consommation des sources d'azote 90
7.2.3. Lissage des arômes fermentaires 90
7.2.4. Sparse partial least square – discriminant analysis (sPLS-DA) 91
7.2.5. Etude comparative 92

Résultats 93

Chapitre 1 : Etude des effets combinés des nutriments (azote et phytostérols) et de la température sur la production d'arômes fermentaires par *Saccharomyces cerevisiae* lors de la fermentation œnologique 95

Chapitre 2 : Mise en évidence du rôle clé de la gestion des lipides sur le métabolisme de l'azote et des arômes dans une souche de levure œnologique évolué……..……..113

Chapitre 3 : Filiation isotopique ^{13}C pour élucider l'influence des paramètres environnementaux et de la souche de levure sur la production d'arômes fermentaires……..187

Discussion générale 225

Références bibliographiques 235

Annexes 253

Communications liées à ce travail

Publications

Mouret, J.R., Cadiere, A., Aguera, E., Rollero, S., Ortiz-Julien, A., Sablayrolles, J.M., Dequin, S. (2015). Dynamics and quantitative analysis of the synthesis of fermentative aromas by an evolved wine strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast Chichester Engl.* 32, 257–269.

Rollero, S., Bloem, A., Camarasa, C., Sanchez, I., Ortiz-Julien, A., Sablayrolles, J.M., Dequin, S., Mouret, J.R. (2015). Combined effects of nutrients and temperature on the production of fermentative aromas by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 99, 2291–304.

Rollero, S., Mouret, J.R., Sanchez, I., Camarasa, C., Ortiz-Julien, A., Sablayrolles, J.M., Dequin, S. Metabolic analysis of nitrogen and aroma metabolism: comparison between an evolved wine yeast strain and its ancestral strain. *To be submitted.*

Rollero, S., Mouret, J.R., Bloem, A., Sanchez, I., Ortiz-Julien, A., Sablayrolles, J.M., Dequin, S., Camarasa, C. A quantitative ^{13}C-isotope labelling-based analysis to elucidate the influence of environmental parameters and yeast strain on the production of fermentative aromas during wine fermentation. *To be submitted.*

Communications orales

Rollero, S., Mouret, J.R., Sanchez, I., Ortiz-Julien, A., Sablayrolles, J.M., Dequin, S. (2014). Effets combinés des nutriments et de la température sur la production des arômes fermentaires en conditions œnologiques par *Saccharomyces cerevisiae*. 11ème Rencontre Levure, Modèles & Outils, Bordeaux, France.

Rollero, S., Mouret, J.R., Sanchez, I., Ortiz-Julien, A., Sablayrolles, J.M., Dequin, S. (2014). Combined effects of nutrients and temperature on the production of fermentative aromas in winemaking fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. Journée de l'ED SP-SA, Montpellier, France.

Rollero, S., Mouret, J.R., Sanchez, I., Ortiz-Julien, A., Sablayrolles, J.M., Dequin, S. (2015). Influence of nutrients and temperature on the production of fermentative aromas in winemaking conditions by an evolved wine strain of *Saccharomyces cerevisiae*. Œno 2015, Bordeaux, France.

Posters

Rollero, S., Mouret, J.R., Sanchez, I., Ortiz-Julien, A., Sablayrolles, J.M., Dequin, S. (2013). Influence of nutrients and temperature on the production of fermentative aromas in winemaking conditions using a Box-Behnken design. 5th Conference on Physiology of Yeast and Filamentous Fungi, Montpellier, France.

Rollero, S., Mouret, J.R., Sanchez, I., Ortiz-Julien, A., Sablayrolles, J.M., Dequin, S. (2013). Influence of nutrients and temperature on the production of fermentative aromas in winemaking conditions using a Box-Behnken design. Journée de l'ED SP-SA, Montpellier, France.

Rollero, S., Mouret, J.R., Sanchez, I., Ortiz-Julien, A., Sablayrolles, J.M., Dequin, S. (2014). Prediction of the effects of environmental factors on the synthesis of fermentative aromas. International Conference Wine Active Compounds, Beaune, France.

Rollero, S., Mouret, J.R., Sanchez, I., Ortiz-Julien, A., Sablayrolles, J.M., Dequin, S. (2014). Prediction of the effects of environmental factors on the synthesis of fermentative aromas. Journée de l'ED SP-SA, Montpellier, France.

Rollero, S., Mouret, J.R., Sanchez, I., Ortiz-Julien, A., Sablayrolles, J.M., Dequin, S. (2014). Influence of nutrients and temperature on the production of fermentative aromas in winemaking conditions by an evolved wine strain of *Saccharomyces cerevisiae.* Macrowine, Stellenbosch, Afrique du Sud.

Rollero, S., Mouret, J.R., Sanchez, I., Ortiz-Julien, A., Sablayrolles, J.M., Dequin, S. (2015). Influence of nutrients and temperature on the production of fermentative aromas in winemaking conditions by an evolved wine strain of *Saccharomyces cerevisiae.* ASEV, Portland, USA.

Abréviations

AAT	Alcohol acetyltransferase
α-KG	α-cétoglutarate
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNc	Acide ribonucléique complémentaire
ARNm	Acide ribonucléique messager
ATP	Adénosine triphosphate
C^{gas}	Concentration molaire (mol/L) ou massique (mg/L) d'un composé dans la phase gazeuse
C^{liq}	Concentration molaire (mol/L) ou massique (mg/L) d'un composé dans la phase liquide
DAP	Di-ammonium phosphate
DEPC	Diéthylpyrocarbonate
DMF/DMA	N,N-Diméthylformamide diméthylacetal
DO	Densité optique
ECF	Ethylchloroformate
FC	Fold change
g, mg, µg	Gramme, milligramme, microgramme
GC-FID	Chromatographie en phase gazeuse avec détecteur à ionisation de flamme
GC-MS	Spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase gazeuse
GO	Gene Ontology
h, min, s	Heure, minute, seconde
HPLC	Chromatographie haute pression en phase liquide
k_i	Coefficient de partage
L, mL, µL	Litre, millilitre, microlitre
L	Quantité d'un composé perdue dans la phase gazeuse (mg/L)
LSA	Levures sèches actives
M, mM, µM	Molaire, millimolaire, micromolaire
mol, mmol, µmol	Mole, millimole, micromole
MSXX	Milieu synthétique contenant XX mgN/L
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 catabolite repression
P	Production totale d'un composé (mg/L)
Q	Débit volumique du gaz (LCO_2/L moût)
R	Constante universelle des gaz parfaits (8.314 J/mol.K)
rpm	Rotations par minute
S. cerevisiae	*Saccharomyces cerevisiae*
SIM	Selected ion monitoring
T	Température (°C ou K)
TCA	Acides tricarboxyliques
v/v	volume par volume
VPP	Voie des pentoses phosphate

Liste des figures

Figure 1. Evolution des paramètres de fermentation au cours du temps lors d'une fermentation à 24°C **4**

Figure 2. Métabolisme carboné central de *S. cerevisiae* en fermentation œnologique **8**

Figure 3. Voie des pentoses phosphate **9**

Figure 4. Influence du régime de température sur la cinétique fermentaire. Evolution de la température et de la vitesse de production de CO2 en fonction de l'avancement de fermentation **11**

Figure 5. Effet du moment d'ajouts de DAP sur la vitesse de production de CO2 (a) et sur la population cellulaire (b) **13**

Figure 6. Métabolismes carboné et azoté chez la levure et leur rôle dans la synthèse des arômes fermentaires **23**

Figure 7. Voie d'Ehrlich **24**

Figure 8. Voies de synthèse des alcools supérieurs et de leurs acétates **27**

Figure 9. Biosynthèse des acides gras et leur implication dans la formation des esters d'éthyle **30**

Figure 10. Production des alcools supérieurs par EC1118 au cours du processus fermentaire **32**

Figure 11. Production d'isobutanol (A) et d'alcool isoamylique (B) lors de fermentations réalisées à 18, 24 et 30°C avec la souche EC1118 ..... **37**

Figure 12. Production de propanol lors de fermentations réalisées à 18, 24 et 30°C avec la souche EC1118 ..... **37**

Figure 13. Production d'acétate d'isoamyle (A) et d'hexanoate d'éthyle (B) lors de fermentations réalisées à 18, 24 et 30°C avec la souche EC1118 ..... **38**

Figure 14. Accumulation dans le liquide (A) et production totale (B) de l'hexanoate d'éthyle lors de fermentations réalisées à 18, 24 et 30°C avec la souche EC1118 ..... **40**

Figure 15. Production totale d'isobutanol pour trois teneurs en azote assimilable initial lors de fermentations réalisées à 24°C avec la souche EC1118 ..... **42**

Figure 16. Corrélation linéaire entre la concentration en azote assimilable initial et la production de propanol **42**

Figure 17. Voies métaboliques dans lesquelles interviennent la thiamine et la biotine **47**

Figure 18. Photo d'un fermenteur de 300 mL **54**

Figure 19. Photo d'un fermenteur de 1,2 L **55**
Figure 20. Photo d'un fermenteur de 10 L (à gauche), avec un détail de la platine (à droite) **57**
Figure 21. Chromatogramme d'un standard physiologique au Biochrom 30 à 570 nm **60**
Figure 22. Système de CPG en ligne utilisé pour la mesure des composés volatils dans les gaz de sortie de fermentation……...**64**
Figure 23. Surfaces de réponse des souches Lalvin EC1118® et Affinity™ ECA5 pour le phényéthanol (A), l'acétate d'isoamyle (B) et l'hexanoate d'éthyle (C)……....**112**
Figure 24. Vitesse de dégagement du CO_2 pour des fermentations réalisée en MS70 (A) et MS330 (B) dans des fermenteurs de 1,1 L et 10 L à 24°C pour la souche Lalvin EC1118®.**116**

Liste des tableaux

Tableau 1. Principaux composés d'arôme trouvés communément dans le vin..... **22**
Tableau 2. Intermédiaires de la voie d'Ehrlich et leur acide aminé précurseur **25**
Tableau 3. Pertes relatives des arômes fermentaires..... **39**
Tableau 4. Effet d'un ajout d'azote sur la production des arômes fermentaires : influence de la nature de la source d'azote et du moment d'ajout..... **44**
Tableau 5. Composition du milieu synthétique utilisé pour les fermentations. Exemple du milieu avec 425 mgN/L d'azote assimilable et 5 mg/L de facteurs anaérobies **52**
Tableau 6. Composition de la solution mère d'oligo-éléments..... **52**
Tableau 7. Composition de la solution mère de vitamines **52**
Tableau 8. Composition de la solution mère de facteurs anaérobies **53**
Tableau 9. Composition de la solution mère de chlorure de fer **53**
Tableau 10. Composition de la solution mère d'acides aminés **53**
Tableau 11. Liste des composés marqués en 13C obtenus chez Eurisotop® **53**
Tableau 12. Liste des tampons utilisés pour l'analyse des acides aminés au Biochrom 30 ... **60**
Tableau 13. Paramètres pour la détermination des arômes fermentaires du vin par SIM..... **63**
Tableau 14. Liste des acides aminés et leur cluster d'ion correspondant pour l'analyse GC-MS par dérivatisation DMF/DMA (en haut) et ECF (en bas)..... **68**
Tableau 15. Liste des composés volatils d'intérêt et leur cluster d'ion correspondant pour l'analyse GC-MS..... **71**
Tableau 16. Effets des paramètres environnementaux décrits par le modèle pour la souche Affinity™ ECA5……..…… **111**
Tableau 17. Concentrations en phase liquide des principaux arômes fermentaires dans des fermenteurs de 1,1 L et 10 L à 24°C pour la souche Lalvin EC1118®……..…….....**116**

Introduction générale

Dans un marché devenu de plus en plus concurrentiel, la maîtrise de la qualité des vins est un enjeu majeur pour le vinificateur : il s'agit de répondre au mieux aux attentes des consommateurs en termes de profil sensoriel du produit. Le profil aromatique et la saveur d'un vin font partie des caractéristiques les plus importantes. Aujourd'hui, les vins dits aromatiques, présentant un caractère fruité ou floral, sont de plus en plus recherchés afin de répondre à la demande des consommateurs (Swiegers et al., 2005; Lee and Noble, 2003). L'arôme d'un vin résulte d'un mélange complexe de molécules : plus de 800 composés ont été identifiés comme participant au profil aromatique des vins (Mendes-Pinto, 2009). Certaines de ces molécules contribuent individuellement de façon significative, tandis que d'autres vont agir en synergie ou de façon antagoniste. Les composés d'arôme ont diverses origines : les arômes variétaux et leurs précurseurs apportés par la baie de raisin et caractéristiques du cépage, les arômes fermentaires synthétisés par la levure – qui contribue aussi à la révélation de certains arômes variétaux - et les arômes post-fermentaires libérés au cours du vieillissement des vins (Francis and Newton, 2005).

Les arômes fermentaires, qui font l'objet de cette étude, appartiennent à des familles chimiques différentes (alcools supérieurs, esters d'acétate, acides gras à moyenne et longue chaine et esters d'éthyle). Ils confèrent au vin des notes fruitées et florales (Swiegers et al., 2005). Les alcools supérieurs et les esters sont les composés les plus abondants ; ils sont à la fois des marqueurs organoleptiques mais aussi des marqueurs métaboliques. La formation des molécules d'arôme fait appel à un réseau métabolique fortement interconnecté, avec des intermédiaires communs à plusieurs composés volatils, et des voies de synthèse de ces intermédiaires très variées : métabolisme carboné central, métabolisme des lipides ou catabolisme des acides aminés (métabolisme azoté). De plus, ces voies de biosynthèse sont fortement régulées au niveau génétique et des différences de régulation entre souches de levure ont été mises en évidence (Rossouw et al. 2012).

Un des enjeux majeurs est la modulation maîtrisée de la production des arômes fermentaires. La première stratégie pour cela est la sélection de souches de levures appropriées. En effet, les souches de levures commercialisées en œnologie présentent des capacités très variables de production de ces composés d'intérêt (Camarasa et al., 2011; Torija et al., 2003; Torrea, 2003). Par ailleurs, de nouvelles souches aux propriétés aromatiques ont récemment été développées. C'est le cas d'une souche surproductrice d'esters récemment obtenue au laboratoire (Cadière et al. 2011).

La formation des composés volatils est également fortement dépendante de la composition du moût et des paramètres de fermentation. De nombreux facteurs ont été identifiés comme influençant la production des arômes fermentaires : la teneur et la composition en azote des moûts (Mouret et al., 2014 ; Barbosa et al., 2012), la température de fermentation (Mouret et al., 2014; Beltran et al., 2008; Molina et al., 2007) ainsi que les lipides, qui sont présents dans les bourbes œnologiques sous forme de phytostérols (Saerens et al., 2008).

Même si de plus en plus de connaissances sont disponibles sur l'impact des conditions de fermentation sur la synthèse des arômes fermentaires, elles restent partielles et parfois contradictoires. De nombreuses questions subsistent, notamment sur les interactions entre les différents paramètres environnementaux. Il est donc difficile à l'heure actuelle de traduire les résultats obtenus en préconisations précises pour la gestion de la fermentation alcoolique.

L'objectif de ce travail de thèse est précisément de mieux décrire et comprendre l'effet des principaux paramètres fermentaires (azote, phytostérols et température), en prenant en compte la variabilité due aux souches, pour fournir des connaissances indispensables à une meilleure gestion de la nutrition en fermentation œnologique.
Cette thèse s'appuie à la fois sur (i) une approche statistique à l'aide d'un plan expérimental, (ii) des outils de suivi en ligne et de contrôle de la fermentation œnologique permettant une caractérisation macroscopique fine du procédé et sur (iii) une analyse détaillée du métabolisme levurien au travers d'approches transcriptomique et de filiation isotopique.
Cette étude est principalement réalisée sur deux souches ayant des capacités de synthèse d'arômes très différentes : Lalvin EC1118® et Affinity™ ECA5. La souche Lalvin EC1118® est une souche très utilisée dans les caves et que l'on peut considérer comme une souche 'modèle'. La souche Affinity™ ECA5 a été obtenue par une stratégie d'évolution dirigée à partir de la souche Lalvin EC1118® (Cadière et al. 2011). Elle présente un métabolisme modifié avec, notamment, une production très importante de certains esters.

Dans un premier temps, pour chaque souche, nous avons réalisé à l'échelle laboratoire des fermentations sur moût synthétique, avec des niveaux très différents des trois paramètres environnementaux choisis.
Les concentrations de 33 composés volatils ont été déterminées. Un plan expérimental de Box-Behnken a été mis en place, avec une modélisation associée, afin d'identifier les paramètres les plus discriminants dans la production des différents arômes et les interactions

entre ces paramètres. Ces résultats ont ensuite été validés sur un plus grand nombre de souches.

Lors de la seconde étape du projet, pour chaque souche, nous avons effectué une analyse détaillée des fermentations conduisant aux productions d'arômes les plus contrastées. Un suivi cinétique précis des composés d'arôme a été couplé à une analyse transcriptomique pour étudier la chronologie de production des composés volatils et déterminer les différences de régulation entre souches.

Au cours de la troisième étape, nous avons complété ces approches en effectuant des analyses de filiation isotopique (utilisation de molécules marquées ^{13}C) des acides aminés afin de préciser certains points clé concernant la redistribution des sources azotées vers les composés d'arômes.

Introduction bibliographique

1 La fermentation alcoolique en œnologie

1.1. Caractéristiques de la fermentation

La fermentation alcoolique est une étape essentielle du processus de vinification. Au cours de cette fermentation, le moût de raisin est transformé par l'action de microorganismes, essentiellement des levures de type *Saccharomyces cerevisiae*. La réaction principale de ce procédé biologique est la bioconversion des sucres en éthanol et CO_2.

Le moût de raisin est un milieu à pH acide (2,9 à 3,8) possédant une forte teneur en sucre (150 à 260 g/L d'un mélange équimolaire de glucose et de fructose). Il contient aussi des nutriments indispensables à la croissance levurienne tels que les vitamines, les minéraux, les lipides et l'azote assimilable. Certains agents présents dans le moût, comme le SO_2, peuvent être inhibiteurs de la croissance.

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 (*Saccharomyces, Kloeckera, Hanseniaspora, Rhodoturula, Candida, Debaryomyces, Brettanomyces*…) qui contribuent différemment aux caractéristiques organoleptiques et à la typicité des vins (Fleet, 1993). 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.
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 effet, l'implantation d'une ou plusieurs souches de levures sélectionnées pour leur capacité fermentaire et/ou leur potentiel aromatique permet un meilleur contrôle du déroulement de la fermentation et des caractéristiques organoleptiques du vin. Lors du levurage, le moût est inoculé avec des levures conditionnées sous forme de levures sèches actives (LSA) à une concentration comprise entre 1 et $5x10^6$ cellules/mL.

En conditions anaérobies, la dégradation du glucose conduit à la formation d'éthanol et à un dégagement de gaz carbonique (CO_2) suivant la réaction :

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CO_2 + 2C_2H_6O.$$

Le rendement de conversion théorique est de 0,51 gramme d'éthanol pour 1 gramme de glucose consommé. En pratique, une partie du glucose (8 à 10%) sert à la synthèse de précurseurs anaboliques nécessaires à la synthèse de biomasse et au maintien de l'équilibre redox au sein de la cellule. Le rendement généralement observé expérimentalement est donc en moyenne de 0,47 gramme d'éthanol pour 1 gramme de glucose consommé. Une partie de ces métabolites secondaires sont excrétés dans le milieu. Ce sont majoritairement du glycérol, succinate, acétate et pyruvate et en plus faible partie des aldéhydes, des alcools supérieurs et leurs esters qui jouent un rôle important dans la qualité organoleptique du vin (cf chapitre 2).

1.2. Déroulement de la fermentation

Durant la fermentation, la levure est soumise à une succession de stress (forte teneur en sucres, pH acide, limitation en nutriments, augmentation de la concentration en éthanol…) qui nécessite une adaptation continue de son métabolisme. Lors d'une fermentation « standard » (**Figure 1**), le suivi de l'activité fermentaire des levures (exprimée en vitesse de dégagement de CO_2 : dCO_2/dt) met en évidence trois phases.

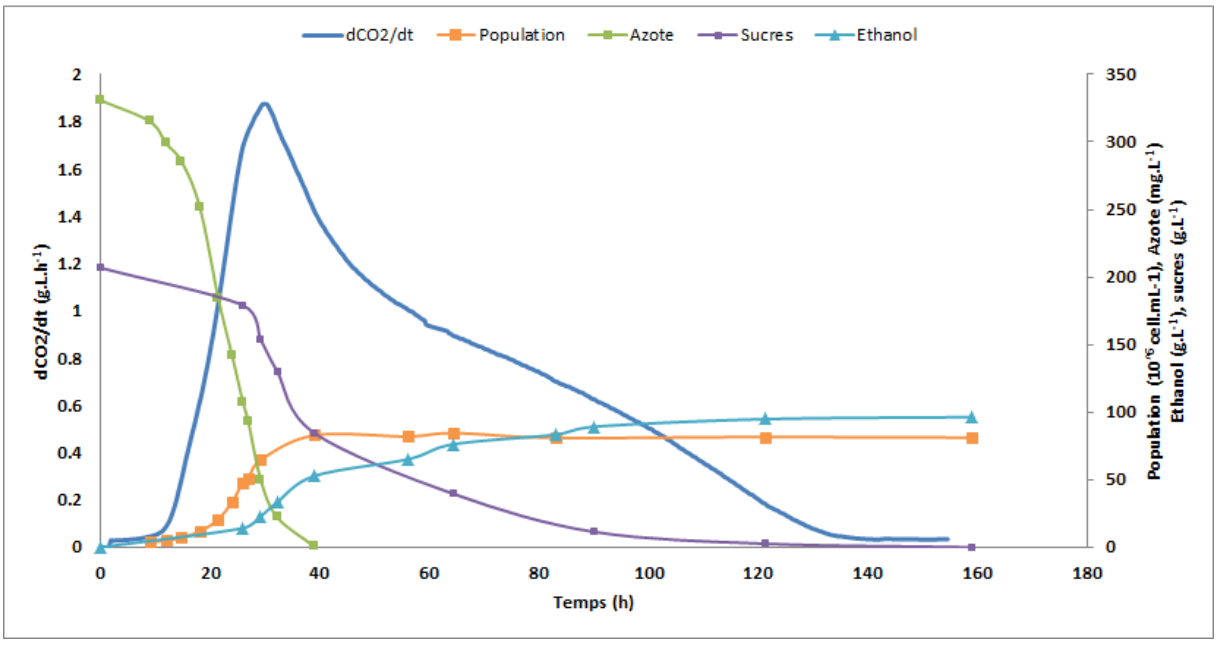


Figure 1. Evolution des paramètres de fermentation au cours du temps lors d'une fermentation à 24°C. La souche utilisée est EC1118 et le milieu est un moût synthétique à 200 g/L de sucres et 330 mg/L d'azote assimilable

1.2.1. Phase de latence

Cette phase correspond à une phase d'adaptation des levures aux conditions environnementales (Pérez-Torrado et al., 2002). Elle peut durer de quelques heures à quelques jours en fonction de la température, du taux d'inoculation et de la présence d'inhibiteurs comme le SO_2. Au cours de cette phase, l'activité fermentaire est très faible et le milieu se sature progressivement en CO_2 (environ 1,5 g/L). La composition du milieu est très peu modifiée, sauf la thiamine qui est consommée en quelques heures (Bataillon et al., 1996).

1.2.2. Phase de croissance

La phase de croissance dure jusqu'à l'obtention de la population maximale, lorsqu'environ 1/3 de la concentration en sucre a été consommé. C'est à la fin de cette phase que la vitesse de fermentation ainsi que les besoins énergétiques pour réguler la température de fermentation sont maximaux. Par contre, c'est dès le début de la phase de croissance qu'est atteint le maximum de la vitesse spécifique de fermentation qui rend compte de l'activité fermentaire moyenne de chaque levure, activité qui ne cesse de diminuer par la suite.

La population atteinte est très variable suivant les moûts. D'après Bely et al. (1990a), elle est comprise entre 50 et $250x10^6$ cellules/ml. Dans la plupart des cas, la multiplication cellulaire prend fin à cause de l'épuisement du moût en azote assimilable. De nombreux auteurs (Crépin et al., 2014; Perpete et al. 2005; Jiranek et al. 1995; Jones and Pierce 1984) ont étudié l'assimilation de l'azote et montré la complexité du transport des différentes sources d'azote assimilable (principalement acides aminés et azote ammoniacal) à l'intérieur des levures. On peut cependant retenir que l'azote ammoniacal est assimilé rapidement et en même temps que les acides aminés les plus facilement assimilables. Il est à noter que cette consommation d'azote conduit à une légère baisse du pH qui atteint sa valeur minimum à la fin de la phase de croissance.

1.2.3. Phase stationnaire

Une des particularités de la fermentation œnologique est que l'essentiel de la consommation des sucres (60-70%) a lieu durant cette phase au cours de laquelle les levures ne se multiplient plus mais conservent une activité fermentaire. La viabilité cellulaire reste généralement élevée (supérieure à 80-90%) et la population cellulaire conserve son niveau maximal tandis que l'activité fermentaire diminue progressivement jusqu'à l'épuisement des sucres du milieu. Cette baisse d'activité est principalement liée à l'augmentation de la teneur du moût en

éthanol. Celui-ci joue un rôle inhibiteur essentiel sur les transporteurs d'hexoses (Salmon, 1989).

1.3. Métabolisme levurien en conditions œnologiques

S. cerevisiae est la levure la plus utilisée en fermentation œnologique. Cette levure est particulièrement adaptée aux conditions de vinification (pH acide, fortes teneurs en éthanol et SO_2…).

S. cerevisiae est aérobie facultative et Crabtree positive. Elle possède la capacité d'adapter son métabolisme aux conditions d'aération et à la disponibilité en substrat carboné. En conditions œnologiques, les levures se trouvent dans un environnement riche en sucres fermentescibles (150 à 260 g/L selon le degré de maturité du raisin) et pauvre en oxygène (au maximum, quelques mg/L disponibles en cours de fermentation). Leur métabolisme est donc purement fermentaire.

La levure doit donc assurer la synthèse des précurseurs nécessaires à la formation de la biomasse et à sa maintenance énergétique en absence d'une chaîne respiratoire fonctionnelle. L'ATP nécessaire à la croissance cellulaire est alors produit seulement par la glycolyse (**Figure 2**). Il s'agit d'un processus oxydatif faisant intervenir le NAD^+ comme accepteur d'électrons et menant à la synthèse de pyruvate qui sera en grande majorité converti en acétaldéhyde par la pyruvate décarboxylase (PDC), une petite partie étant dégradée via le cycle des acides tricarboxyliques (TCA). L'acétaldéhyde est majoritairement réduit en éthanol mais une partie est dirigée vers la synthèse d'acétate et d'acétyl-CoA, intervenant notamment dans la synthèse des acides gras.

En conditions aérobies, le TCA assure la production d'énergie nécessaire à la croissance cellulaire, mais en fermentation, les enzymes de ce cycle sont soumises à une répression catabolique par le glucose (Gancedo, 2008). Cette voie métabolique ne fonctionne plus comme un cycle mais est constituée de deux branches : une oxydative et une réductrice dont le produit final commun est le succinate (Gombert et al., 2001). En fermentation œnologique, environ les deux tiers du succinate sont synthétisés via la branche réductrice (Camarasa et al., 2003). Mais la voie oxydative reste active, notamment pendant la phase de croissance durant laquelle elle permet la synthèse de l'α-cétoglutarate, élément clé du métabolisme de l'azote.

Le glucose n'est pas entièrement converti en pyruvate ; une partie est transformée en glycérol via la glycérol-3-phosphate deshydrogénase. La synthèse du glycérol permet la ré-oxydation

de l'excès de NADH produit lors de la production de biomasse (Nissen et al., 1997). Il est également précurseur pour la synthèse des phospholipides lors de la croissance cellulaire. Enfin, le glycérol est important dans la lutte contre le stress osmotique en début de fermentation dû aux fortes concentrations en sucres (Blomberg and Adler, 1989).

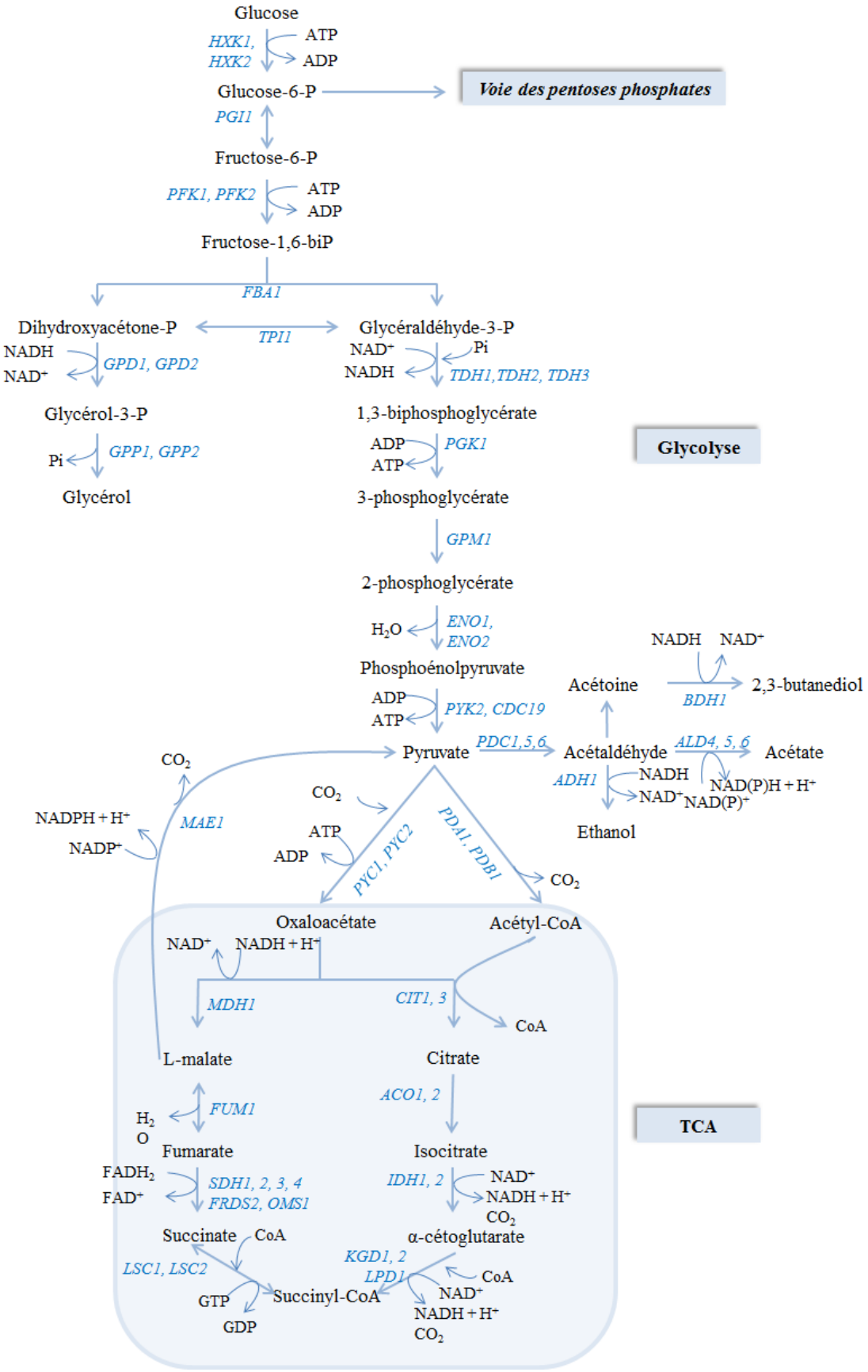


Figure 2. Métabolisme carboné central de *S. cerevisiae* en fermentation œnologique

En plus de la glycolyse, la levure est également capable de dégrader les sucres via la voie des pentoses phosphate (VPP) (**Figure 3**). Cette voie est la principale source de régénération du NADPH, qui intervient comme cofacteur dans les processus anaboliques (Vandijken and Scheffers, 1986). Lors d'une croissance sur glucose, la VPP produit environ 60% du NADPH (Blank et al., 2005; Frick and Wittmann, 2005), les 40% restants étant issus de l'activité de l'acétaldéhyde déshydrogénase NADP-dépendante qui produit de l'acétate à partir de l'acétaldéhyde.

La VPP est composée de deux phases. La première est une phase oxydative irréversible qui permet la formation de ribulose-5-phosphate et de deux NADPH. La seconde est une phase non oxydative réversible qui conduit à la synthèse du ribose-5-phosphate et de l'érythrose-4-phosphate, tous deux intermédiaires du métabolisme des acides aminés aromatiques (histidine, phénylalanine, tryptophane et tyrosine) et des nucléotides (ATP, GTP…).

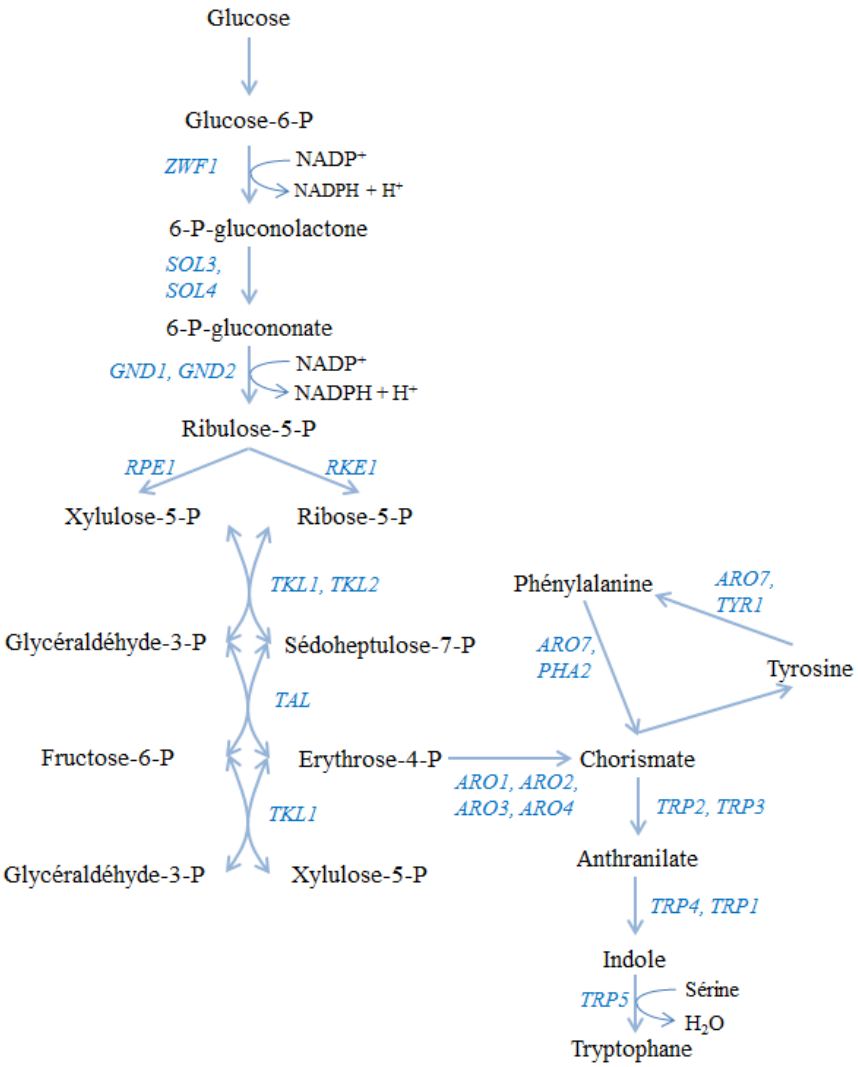


Figure 3. Voie des pentoses phosphate

1.4. Effets des principaux paramètres fermentaires

1.4.1. Température

La température est un paramètre qu'il est nécessaire de contrôler car la fermentation alcoolique est un processus très exothermique. En cuves industrielles, les pertes thermiques sont faibles et il est donc indispensable de réguler la température. En effet, une température excessive peut causer une mortalité excessive des levures et/ou être néfaste à la qualité des vins.

En pratique, les vinifications en blanc se réalisent à des températures inférieures à 20°C ; elles peuvent atteindre 30°C pour des vinifications en rouges afin de favoriser l'extraction des composés polyphénoliques contenus dans les particules solides (Williams and Boulton, 1983).

Le régime de température a un effet majeur sur la cinétique fermentaire. Il a été montré qu'entre 15 et 25°C, la vitesse de fermentation est doublée lorsque la température augmente d'environ 8°C (Bely et al., 1990a). Le profil de température doit aussi être pris en compte. En effet, une augmentation de plusieurs degrés au cours de la fermentation (cas courant en œnologie) modifie la courbe de vitesse de fermentation (**Figure 4**) (Sablayrolles and Barre, 1993). Les fermentations menées en anisotherme conduisent à des durées de fermentation et des vitesses maximales de production de CO_2 intermédiaires à celles menées en isotherme aux températures initiale et finale (Sablayrolles and Barre, 1993). Les fermentations sont plus rapides lorsque la température augmente dès le début mais une augmentation de température en phase stationnaire (pratique courante en œnologie) conserve un effet très significatif.

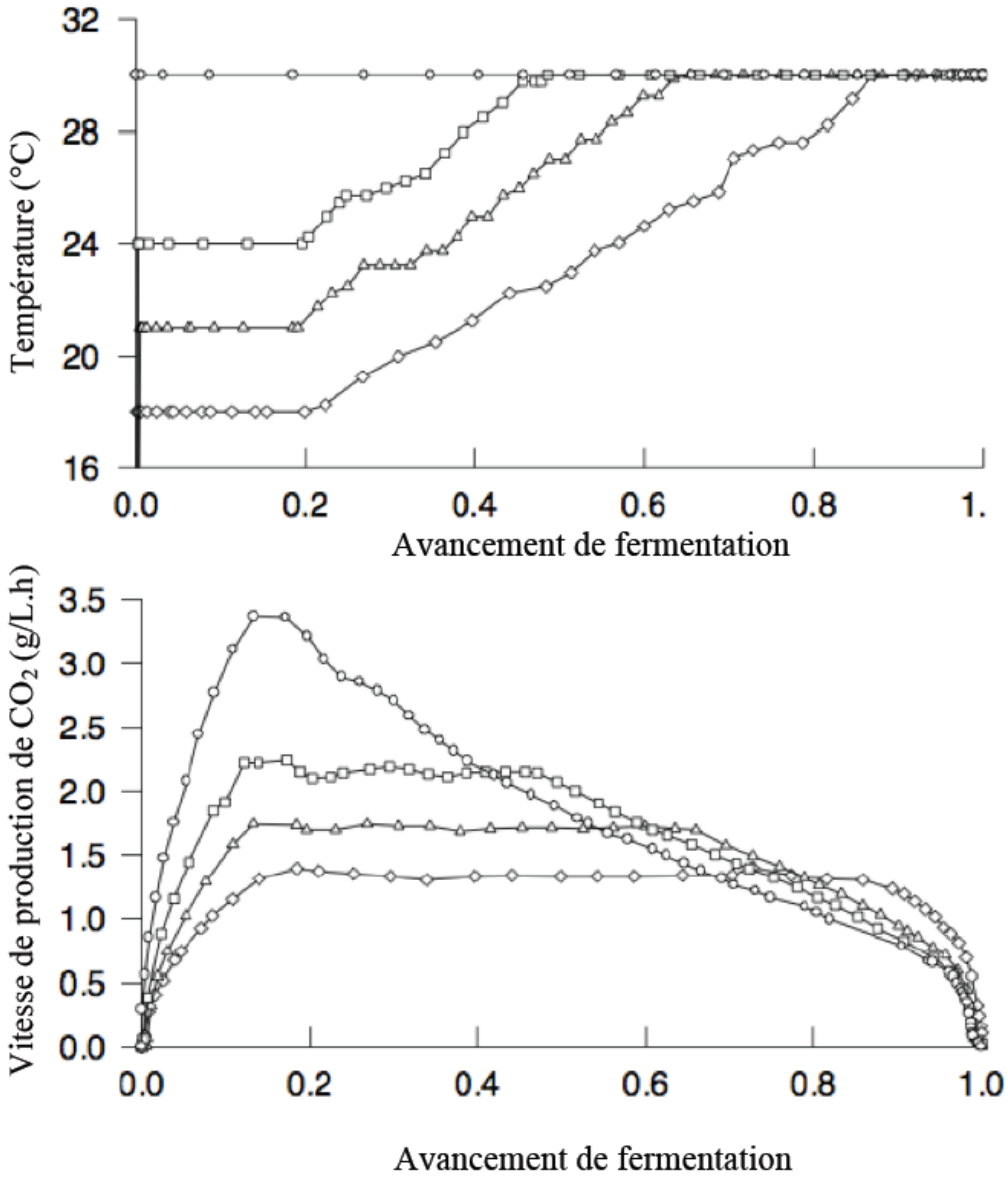


Figure 4. Influence du régime de température sur la cinétique fermentaire. Evolution de la température et de la vitesse de production de CO2 en fonction de l'avancement de fermentation (Sablayrolles and Barre, 1993)

1.4.2. Azote assimilable

Selon le cépage, le climat, la maturité des baies et les pratiques viticoles, la teneur des moûts en azote assimilable varie entre 60 et 400 mg/L (Bell and Henschke, 2005; Bely et al., 1990a). Les composés azotés sont présents majoritairement sous forme de protéines (5 à 10%), peptides (25 à 40%), acides aminés (25 à 30%) et ions ammonium (3 à 10%) (Ribéreau-Gayon, 1998).

L'azote est un élément nécessaire à la croissance des levures (pour la synthèse protéique) et au bon déroulement de la fermentation. Le besoin en azote assimilable varie selon les souches de levure. Dans les moûts, l'azote assimilable est généralement le nutriment limitant pour la croissance des levures, il joue donc un rôle essentiel sur la cinétique fermentaire.
Les carences en azote assimilable sont considérées comme les causes essentielles des fermentations dites lentes. Il existe, en effet, une relation directe entre les concentrations en azote assimilable et les vitesses maximales de production de CO_2 et la durée de la fermentation (Bely et al., 1990b). Si d'un point de vue microbiologique, l'azote est quasiment toujours limitant, l'effet de la carence est visible sur le déroulement de la fermentation lorsque sa concentration initiale est inférieure à 120-140 mg/L (Ough, 1991; Bely et al., 1990a; Agenbach, 1977).

Pour pallier les carences azotées des moûts, l'addition de sels d'ammonium (diammonium phosphate (DAP) ou diammonium sulfate) est une technique couramment utilisée en œnologie. La supplémentation en azote entraîne systématiquement une augmentation de la vitesse de fermentation (Blateyron and Sablayrolles, 2001) mais le moment d'ajout est un paramètre important à prendre en compte (**Figure 5**). Si l'ajout d'azote se fait au moment de l'inoculation ou en phase de croissance, il conduit à une hausse de la population et de la vitesse maximale de la fermentation (Manginot et al., 1997). Au contraire, si l'ajout est réalisé en phase stationnaire (après la mi-fermentation), seule la vitesse de fermentation est augmentée (**Figure 5**). Dans ce cas-là, l'azote stimule l'activité des levures via, notamment, une réactivation des systèmes de transport des sucres, sans qu'il y ait de croissance associée (Beltran et al., 2005).

En dehors de cet impact technologique, la teneur en azote des moûts a également une influence sur les caractéristiques organoleptiques des vins (voir partie 3).

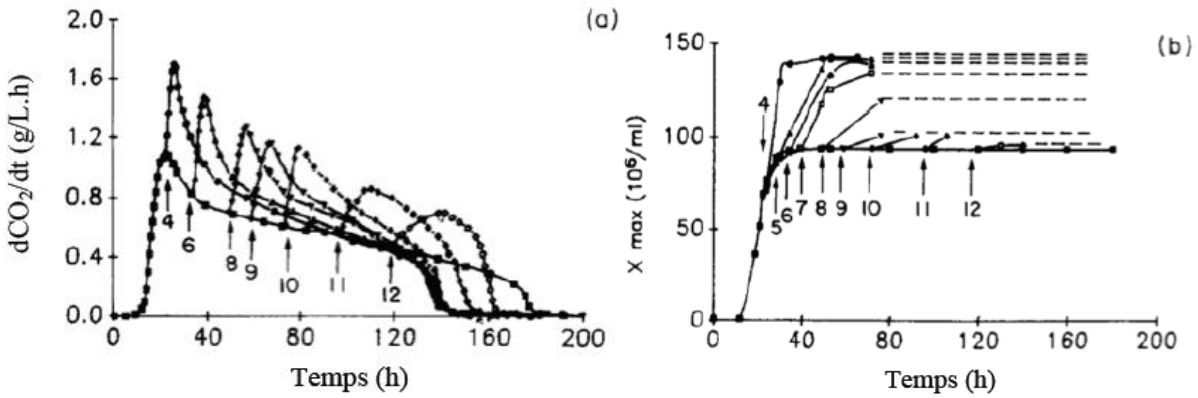


Figure 5. Effet du moment d'ajouts de DAP sur la vitesse de production de CO2 (a) et sur la population cellulaire (b) ↑: Moments de l'ajout (Bely et al., 1990b)

1.4.3. Lipides

Les stérols et les acides gras insaturés sont des composants essentiels pour le maintien de l'intégrité de la membrane de *S. cerevisiae* (Lafon-Lafourcade et al., 1979). Ils permettent entre autre d'augmenter la résistance à l'éthanol (Alexandre et al., 1994).

Ces lipides, dont la synthèse nécessite la présence d'oxygène, ne sont pas produits par la levure si la fermentation œnologique se déroule en anaérobiose stricte (Andreasen and Stier, 1953). La levure est donc dépendante de la teneur en acides gras insaturés et phytostérols présents dans les moûts. Dans les cas où les fermentations ont lieu avec des moûts clarifiés (en vinification en blanc ou en rosé), des carences en lipides peuvent apparaître suite à des débourbages excessifs. Ces carences entraînent des fermentations languissantes voire des arrêts de fermentation associés à une forte mortalité cellulaire. Il a été montré que des ajouts d'oxygène en cours de fermentation (Julien et al., 2000; Sablayrolles et al., 1996) corrigent les effets des carences en lipides en permettant une synthèse endogène d'ergostérol et vraisemblablement d'oléate (Rosenfeld et al., 2003; Blateyron and Sablayrolles, 2001).

Casalta et al. (2013) ont étudié l'effet d'un ajout de bourbes à un moût clarifié ainsi que l'interaction avec l'azote assimilable. L'ajout de bourbes, source importante de nutriments lipidiques pour la levure, a un impact important sur la viabilité cellulaire et la population maximale atteinte. Cette étude montre aussi que plus la teneur en azote assimilable augmente, plus l'effet des bourbes sur la croissance des cellules et la cinétique fermentaire est important. Il est donc nécessaire de prendre en compte le rapport azote assimilable / teneur en lipides des moûts pour optimiser le déroulement des fermentations.

1.4.4. Oxygène

La présence d'oxygène est indispensable aux levures pour la synthèse des composés lipidiques, principalement l'ergostérol, qui est un constituant essentiel de la membrane plasmique. Les besoins en oxygène sont variables selon les moûts et les souches de levure (Julien et al., 2000) mais peuvent être estimés en moyenne entre 5 et 10 mg/L. En moyenne, la quantité d'O_2 initiale présente dans les moûts est de 8 mg/L. Cependant, l'anaérobie est atteinte dès les premières heures de la fermentation. Il apparaît que les ajouts d'oxygène sont d'autant plus efficaces qu'ils sont réalisés en cours de fermentation, plus particulièrement à la fin de la phase de croissance cellulaire (Julien et al., 2000).

Couplée à des ajouts de DAP, l'oxygénation permet d'éviter quasi systématiquement les arrêts de fermentation et diminue fortement la durée de fermentation (en moyenne 40-50%) lors de fermentations languissantes (Blateyron and Sablayrolles, 2001). Par contre, elle n'a que peu d'effet dans le cas de fermentations ne présentant pas de risque d'arrêt prématuré.

Dans la pratique, les carences en oxygène posent généralement plus de problèmes dans le cas des vinifications en blanc. En effet, dans ce type de vinification, la quantité de particules solides (bourbes), susceptibles de transférer des composés lipidiques jouant le rôle de facteurs anaérobies, est faible (cf 1.4.3, Alexandre et al., 1994)

1.4.5. Sels minéraux et vitamines

Si l'azote assimilable et l'oxygène (et par extension les lipides) sont considérés comme les nutriments principaux en conditions œnologiques, d'autres composés peuvent influer sur le déroulement de la fermentation.

La teneur en magnésium peut affecter la croissance cellulaire et la dégradation des sucres (Birch et al., 2003). En effet, les ions Mg^{2+} jouent avec les phospholipides un rôle dans la stabilité de la membrane plasmique et participent à la protection des cellules vis-à-vis de différents stress, notamment l'éthanol.

Les vitamines sont présentes en quantités variables dans les moûts mais ne sont généralement pas limitantes. Ces molécules sont des cofacteurs de nombreuses réactions enzymatiques et possèdent un rôle important dans le maintien de l'activité cellulaire.

L'inositol (vitamine B7) intervient dans la synthèse des membranes et joue un rôle dans la résistance à l'éthanol (Furukawa et al., 2004). L'acide folique (vitamine B9) et son précurseur,

le para-aminobenzoate (PABA), ont un rôle de donneur de groupement méthyl dans la synthèse des bases azotées purines et de la méthionine (Thomas and Surdin-Kerjan, 1997).
La thiamine (vitamine B1) intervient comme cofacteur de nombreuses réactions enzymatiques et principalement lors de la réaction de décarboxylation du pyruvate. Cette vitamine a une importance particulière car elle est très rapidement consommée par les levures (y compris par la population indigène) et peut donc être limitante (Bataillon et al., 1996). Cela entraîne une carence induite du moût au moment de l'inoculation et peut être la cause de fermentations difficiles. L'addition de thiamine à un moût carencé restaure une cinétique fermentaire normale (Bataillon et al., 1996).

1.5. Diversité des souches de levure

1.5.1. *Saccharomyces cerevisiae* : organisme modèle lié aux biotechnologies

Les levures sont des microorganismes eucaryotes unicellulaires pouvant se reproduire de façon sexuée ou asexuée et dont la croissance est rapide et facilement maitrisable. Actuellement, environ 149 genres et 1500 espèces de levures sont connus (Kurtzman et al., 2011) parmi lesquelles des levures alimentaires, commensales ou pathogènes.
Le genre *Saccharomyces* est composé de huit espèces : *Saccharomyces paradoxus, Saccharomyces cariocanus, Saccharomyces kudriavzevii, Saccharomyces mikatae, Saccharomyces arboricolus, Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces uvarum* et *Saccharomyces eubayanus*; les souches sont généralement issues d'environnements naturels, mais peuvent être associées à l'activité humaine.

L'espèce *S. cerevisiae* joue un rôle extrêmement important, depuis des millénaires, dans de nombreux procédés fermentaires, tels que la fabrication et la conservation de produits alimentaires (pain, fromage) et de boissons fermentées (vin, bière, cidre) (McGovern et al., 2004; Cavalieri et al., 2003). La caractéristique principale de cette espèce est en effet sa capacité à fermenter rapidement les sucres, principalement en éthanol et dioxyde de carbone, à la fois en conditions aérobies et anaérobies (Otterstedt et al., 2004; van Dijken et al., 1993). Plus récemment, *S. cerevisiae* est devenue également un outil biotechnologique de choix. Cet organisme est utilisé en tant qu'usine cellulaire pour la production de molécules à haute valeur ajoutée dans de nombreux domaines, tels que la pétrochimie comme alternative à la

diminution des ressources fossiles (biocarburants), la chimie (arômes, additifs) ou la pharmacologie (insuline, vaccins).

S. cerevisiae est le premier eucaryote dont le génome a été séquencé (Goffeau, 1996). La souche séquencée, S288C, couramment utilisée en laboratoire, possède 16 chromosomes et 12 millions de paires de nucléotides. La facilité de manipulation de cette espèce ainsi que la performance des outils de biologie moléculaire qui y ont été développés font de *S. cerevisiae* un des principaux modèles eucaryotes en recherche fondamentale en biologie. Grâce à l'acquisition d'un grand nombre de connaissances sur le fonctionnement cet organisme, *S. cerevisiae* est actuellement un organisme modèle de la biologie des systèmes, qui vise à obtenir une vision intégrée du fonctionnement cellulaire en combinant la production de données multi-échelle et leur analyse par modélisation. Récemment, du fait du développement des techniques d'analyse et de séquençage haut-débit, *S. cerevisiae* a émergé comme espèce modèle en biologie de l'évolution. Les travaux actuels permettent d'appréhender la forte diversité naturelle qui existe au sein de cette espèce et qui jusque-là n'avait jamais été considérée et exploitée.

1.5.2. Diversité génétique et phénotypique des souches

S. cerevisiae est la principale levure liée aux activités humaines, et de ce fait est présente dans des environnements anthropiques (brasserie, vignoble, cave …). Elle est aussi retrouvée dans des environnements naturels tels que les plantes ou les fruits mais de manière minoritaire. Il résulte de cette diversité d'habitats une importante diversité génétique et phénotypique. De nombreuses études sont menées afin de comprendre les mécanismes d'évolution qui ont amené à la domestication de *S. cerevisiae* et d'associer le génotype au phénotype.

Plusieurs études récentes ont permis de caractériser la grande diversité phénotypique de l'espèce *S. cerevisiae* (Blanco et al., 2013; Barbosa et al., 2012; Camarasa et al., 2011).

La variabilité de traits d'histoire de vie (taux de croissance, population maximale et taille des cellules) a été étudiée dans différentes conditions fermentaires (Albertin et al., 2011; Spor et al., 2009). Ces études ont permis de dégager deux comportements différents : des souches générant une grande population avec des cellules de petites tailles consommant le glucose lentement, et des souches générant une petite population de grosses cellules qui consomment le glucose rapidement. Une démarche plus systématique a analysé la diversité de traits métaboliques, cinétiques et de croissance en conditions œnologiques sur une population de 72 souches et a mis en évidence l'émergence de certains traits phénotypiques en lien avec

l'origine des souches qui traduit une évolution phénotypique des souches pilotée à la fois par l'adaptation des levures aux contraintes environnementales et par la sélection humaine (Camarasa et al., 2011). Par exemple, les souches de levure œnologiques commerciales se différencient par leur capacité à fermenter rapidement une grande quantité de sucre et à produire peu d'acétate.

Parmi les différentes niches de *S. cerevisiae*, les levures œnologiques forment un groupe génétique bien spécifique. Il a été montré que les levures œnologiques ont une origine unique et pourraient provenir de Mésopotamie (Liti et al., 2009; Schacherer et al., 2009; Legras et al., 2007). La plupart des *S. cerevisiae* œnologiques sont diploïdes, bien qu'on puisse trouver des souches aneuploïdes. Elles sont majoritairement hétérozygotes (Bradbury et al., 2006; Mortimer, 2000) et homothalliques (70%).

Les souches œnologiques sont génétiquement complexes; leur génome présente en effet d'importants réarrangements chromosomiques dus à des insertions, délétions, translocations ou amplifications de régions qui sont apparus suite à des évènements de recombinaison, des transferts horizontaux ou des croisements inter- ou intra-espèces (Marsit and Dequin, in revision).

Le génome de la souche commerciale Lalvin EC1118® a été séquencé en 2009. Ce génome présente une divergence nucléotidique de 0.5% par rapport à la souche de laboratoire S288C. Environ 50000 SNPs (polymorphismes au niveau d'un nucléotide) et 5000 indels (insertions ou délétions d'une base) séparent les deux souches. Plusieurs translocations ont été identifiées. Trois nouvelles régions d'une taille totale de 120 kb, dont l'une présente en plusieurs exemplaires et provenant de levures éloignées ont été identifiées dans le génome de la souche œnologique (Galeote et al., 2011; Novo et al., 2009). Ces régions portent 34 nouveaux gènes qui pourraient jouer un rôle dans l'adaptation des souches œnologiques à leur environnement. Deux de ces gènes codent pour un transporteur de fructose et un transporteur d'oligopeptides qui confèrent des fonctions nouvelles ou élargies à *S. cerevisiae* (Damon et al., 2011; Galeote et al., 2010). Ces nouvelles régions sont répandues chez les souches œnologiques, alors qu'on ne les trouve pas chez des souches naturelles ou isolées dans d'autres niches écologiques (Marsit et al., 2015; Galeote et al., 2011). Récemment, une étude a mis en évidence le rôle des gènes *FOT* (transporteurs de petits peptides) qui confèrent un avantage adaptatif en augmentant la diversité des peptides pouvant être utilisés comme source d'azote par la levure (Marsit et al., 2015; Marsit, 2014).

Les levures œnologiques ont été sélectionnées pour des traits phénotypiques d'intérêt, notamment pour leur capacité à fermenter à des concentrations élevées en sucres, leur résistance à l'éthanol, au SO_2, la faible production de composés indésirables dans le vin (acétate, H_2S) ou la production importante de composés aromatiques. Elles présentent des propriétés bien distinctes de celles des autres souches de *S. cerevisiae*.

Il existe aussi de la diversité phénotypique au sein du groupe des levures œnologiques. Les cinétiques fermentaires de 20 souches de levures commerciales ont été caractérisées (Colombié et al., 2005). Cette étude, menée sur un milieu synthétique facilement fermentescible, met en évidence des différences relativement faibles. A l'inverse, une autre étude menée sur un moût difficile à fermenter a révélé des différences plus importantes entre les souches (Blateyron and Sablayrolles, 2001). Sur les 13 souches testées, 3 présentent des arrêts de fermentation avec des concentrations résiduelles en sucres importantes, 10 à 56 g/L. Ces différences sont principalement dues à des besoins variables en azote assimilable et en oxygène (Julien et al., 2000).

La production de composés volatils varie considérablement selon la souche (Blanco et al., 2013; Barbosa et al., 2012; Camarasa et al., 2011). Cependant, la variabilité de la régulation de la synthèse de ces composés a été mal documentée. Néanmoins, il a été récemment montré que des variations dans le niveau d'expression de certains facteurs de transcription (Sok2 et Rap1) sont impliquées dans des différences phénotypiques observées au sein l'espèce *S. cerevisiae*, y compris la production de composés volatils (Rossouw et al., 2012).

2 Les arômes du vin

Le vin est un produit complexe, avec de nombreuses molécules impliquées dans ses caractéristiques organoleptiques. Sa structure aromatique dépend de la présence de composés volatils aux origines diverses (Swiegers et al., 2005; Lambrechts and Pretorius, 2000). Ces molécules sont issues du raisin, de la fermentation alcoolique (qui nous intéresse particulièrement dans ce travail) ou produites lors du vieillissement. Les principales molécules d'arôme sont listées dans le **tableau 1**, avec leur seuil de perception et les concentrations habituellement rencontrées dans le vin.

2.1. Arômes variétaux

Les arômes variétaux peuvent exister (i) sous forme libre et sont alors directement perceptibles ou (ii) sous forme de précurseurs inodores dans la baie de raisin, et qui sont ensuite libérés sous forme de composés odorants au cours des différentes étapes de la vendange, de la vinification ou du vieillissement. Ces arômes sont représentatifs d'un cépage particulier et donnent donc au vin sa typicité (Francis and Newton, 2005).

Dans le raisin, seules trois classes de molécules sont présentes sous forme libre en quantité suffisante pour être perçues : les terpénols dans les cépages muscatés, les pyrazines dans les cépages de la famille des Cabernets (Darriet et al., 1991) et la rotundone identifiée initialement dans les raisins de Syrah en Australie (Wood et al., 2008). Dans les cépages « neutres », qui constituent la majorité des cépages de cuve, la plus grande partie de l'arôme variétal est présent sous forme liée, entrant dans les principales familles des composés connus: glycosylés, cysteinylés, glutathionylés, ou précurseurs de sulfure de diméthyle (PDMS). Certains de ces précurseurs sont ensuite convertis en thiols variétaux : la 4-methyl-4-mercaptopentan-2-one (4MMP), le 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) et son acétate (3MHA).

2.2. Arômes fermentaires

Contrairement aux arômes variétaux, les arômes fermentaires ne sont pas issus de la baie de raisin mais sont synthétisés par les levures au cours de la fermentation alcoolique. La nature et la concentration des arômes fermentaires dépendent de différents facteurs tels que la souche

de levure utilisée, la composition en azote du moût et la température de fermentation (Molina et al., 2007; Lambrechts and Pretorius, 2000). Les composés volatils les plus abondants synthétisés par *S. cerevisiae* sont les alcools supérieurs et les esters.

Généralement, les alcools supérieurs sont considérés comme peu favorables à la qualité aromatique du vin, à l'exception du 2-phényléthanol qui apporte des notes florales (rose). Au-delà d'une concentration de 400 mg/L, ces alcools sont délétères et peuvent entraîner une odeur forte et piquante, alors qu'à des niveaux plus modérés (inférieurs à 300 mg/L), ils peuvent participer au caractère fruité et de façon plus générale contribuer à la complexité aromatique des vins (Bell and Henschke, 2005).

D'après la bibliographie Shinohara (1985), parmi les acides gras, seul l'acide octanoïque serait susceptible d'influencer l'arôme des vins. Cependant, si les acides gras ne sont pas évalués individuellement mais en mélange, leur impact sur l'arôme augmente. En effet, (Shinohara, 1985) a déterminé un seuil de perception de 10 mg/L pour un mélange d'acides hexanoïque, octanoïque et décanoïque qui peut parfois être atteint dans certains vins.

Les acides gras ont des odeurs habituellement jugées désagréables. Cependant, certains auteurs ont établi des corrélations positives entre la teneur en acides gras et la qualité des vins (San-Juan et al., 2011), mais les esters éthyliques qui en dérivent directement seraient en fait à l'origine de ces corrélations (Etiévant 1991).

La synthèse d'esters peut avoir un effet important sur les notes fruitées et florales du vin. Il existe deux classes principales d'esters. La première correspond aux esters d'acétate (dérivant des alcools supérieurs) tels que l'acétate d'éthyle, l'acétate d'isoamyle et l'acétate de phényléthyle. La deuxième est celle des esters d'éthyle (provenant des acides gras) avec notamment l'hexanoate d'éthyle et l'octanoate d'éthyle (Verstrepen et al., 2003). La plupart des esters d'éthyle participent à l'arôme des vins jeunes et sont à l'origine de notes fruitées agréables, alors que parmi les esters d'acétate, seuls quelques-uns (acétate d'amyle, d'isoamyle et de 2-phényléthyle) contribuent aux notes florales et fruitées. Cependant à fortes concentrations, certains esters comme l'acétate d'éthyle peuvent apporter des arômes moins recherchés de type solvant. En général, la contribution des esters est dépendante du type de vin. Elle est complexe à décrire car elle met en jeu des mécanismes d'interactions et de synergies (Escudero et al., 2007; Ferreira et al., 2000).

Les voies de synthèse des arômes fermentaires seront détaillées dans le paragraphe 2.4.

2.3. Les arômes de vieillissement

Les arômes de vieillissement sont formés pendant la maturation du vin grâce à des réactions chimiques post fermentaires. Les composés variétaux subissent des transformations produisant des molécules odorantes. Les composés fermentaires tels que les esters sont hydrolysés, entraînant une modification des notes fruitées du vin. De plus, au cours de l'élevage en fût, les substances volatiles du bois diffusent dans le vin. Ces substances vont être différentes selon l'origine du bois, les conditions de fabrication et d'utilisation des fûts.

Tableau 1. Principaux composés d'arôme trouvés communément dans le vin (d'après Swiegers et al. 2005)

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

* 10% éthanol, ** vin, *** vin rouge, **** bière, ***** vin synthétique, ****** eau

2.4. Voies de synthèse des arômes fermentaires

La synthèse des arômes fermentaires est un mécanisme complexe qui dépend à la fois du métabolisme azoté via la dégradation des acides aminés (voie d'Ehrlich) et du métabolisme des sucres via la glycolyse et le TCA (**Figure 6**).

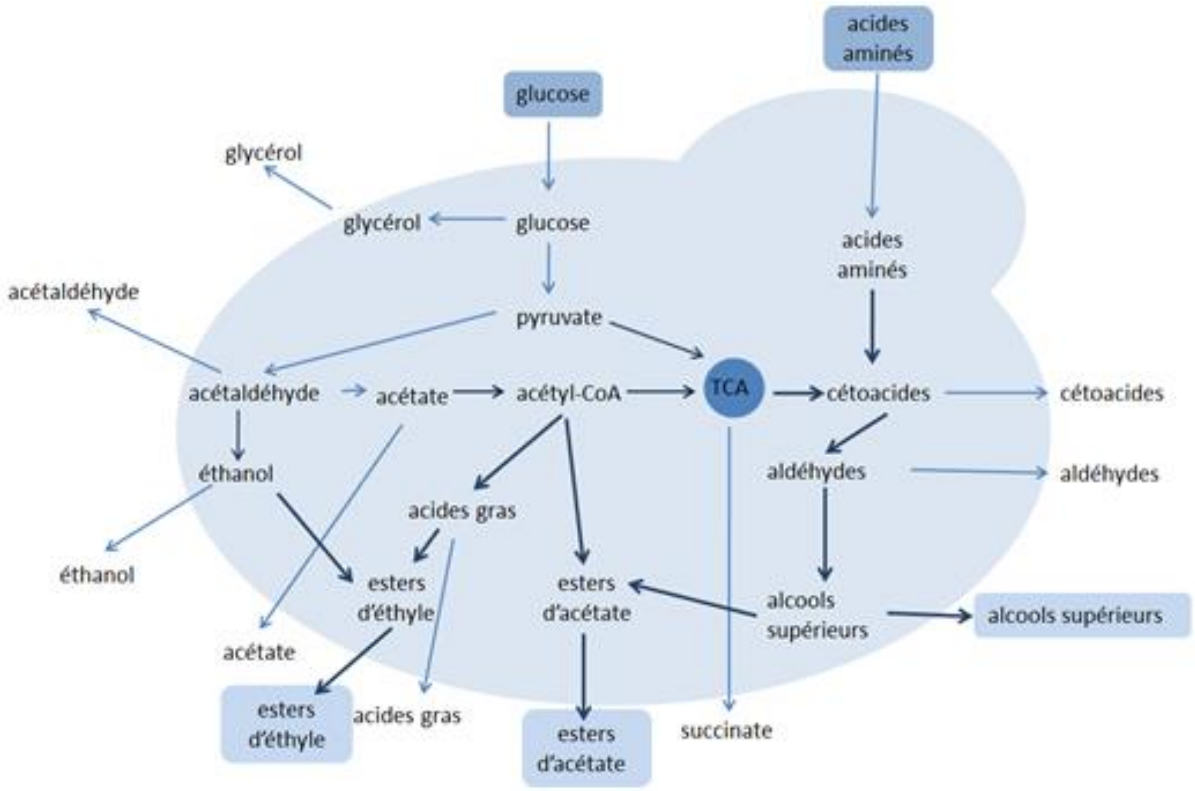


Figure 6. Métabolismes carboné et azoté chez la levure et leur rôle dans la synthèse des arômes fermentaires (d'après Swiegers et al., 2005)

2.4.1. Alcools supérieurs

La synthèse des alcools supérieurs est réalisée à partir d'un pool de cétoacides ayant deux origines possibles. Ils peuvent être issus du catabolisme des acides aminés (valine, isoleucine, leucine, thréonine et phénylalanine) à travers la voie d'Ehrlich, ou synthétisés *de novo* à partir du métabolisme carboné central (Lambrechts and Pretorius, 2000).

Chez *S. cerevisiae*, la voie métabolique de synthèse des alcools supérieurs à partir des cétoacides comporte trois étapes successives (Hazelwood et al., 2008) (**Figure 7**).

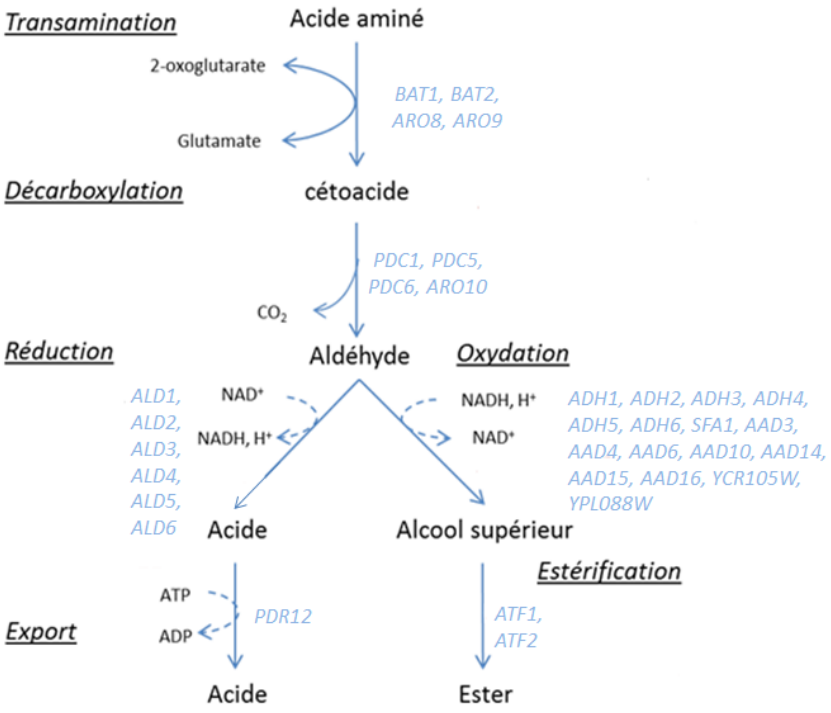


Figure 7. Voie d'Ehrlich (d'après Hazelwood et al., 2008)

Lors de la première étape, l'acide aminé est converti en α-cétoacide au cours d'une réaction de transamination catalysée par des amino-transférases codées par les gènes *BAT1* et *BAT2*. En condition de brasserie, l'expression de ces gènes varie selon la phase de fermentation : *BAT1* est préférentiellement exprimé durant la phase de croissance et réprimé pendant la phase stationnaire, et inversement pour *BAT2* (Eden et al., 2001). Au cours de cette étape, un transfert du groupement amine de l'acide aminé vers l'α-cétoglutarate permet de former du glutamate, ce qui en fait un métabolite clé de la redistribution de la source azotée.

La seconde étape voit la conversion du cétoacide en aldéhyde. Cette réaction implique cinq gènes dont *PDC1*, *PDC5* et *PDC6* qui codent pour des pyruvate décarboxylases (Hohmann, 1991), *ARO10* codant pour une phénylpyruvate décarboxylase (Dickinson, 2003; Dickinson et al., 1998; Vuralhan et al., 2003). Selon la nature du cétoacide, le(s) gène(s) impliqué(s) sera(ont) différent(s). Dans le cas de la valine, les trois enzymes Pdc1p, Pdc5p et Pdc6p peuvent décarboxyler l'α-cétoisovalerate. Aro10p est spécifiquement impliqué dans le catabolisme de la méthionine (Hazelwood et al., 2008).

Enfin, l'aldéhyde sera converti soit en acide (par une réduction), soit en alcool supérieur (par une oxydation). L'ensemble de ces réactions fait intervenir des familles de gènes qui ne présentent donc pas une grande spécificité. Les intermédiaires de la voie d'Ehrlich ainsi que leur acide aminé précurseur sont présentés dans le **tableau 2**.

Tableau 2. Intermédiaires de la voie d'Ehrlich et leur acide aminé précurseur (d'après Hazelwood et al., 2008)

Acide aminé précurseur	Acide	Alcool	Ester
Leucine	α-cétoisocaproate	Alcool isoamylique	Acétate d'isoamyle
Isoleucine	α-cétométhylvalérate	Alcool amylique	Acétate d'amyle
Valine	α-cétoisovalérate	Isobutanol	Acétate d'isobutyle
Phénylalanine	Phénylpyruvate	2-phényléthanol	Acétate de 2-phényléthyle
Tyrosine	3-indolacétate	Tyrosol	Hydroxyphénylacétate
Tryptophane	3-indolpyruvate	Tryptophol	
Méthionine	α-céto-γ-butyrate	Méthionol	
Thréonine	α-cétobutyrate	Propanol	

L'excrétion des alcools supérieurs par la cellule est certainement réalisée via un mécanisme de diffusion passive à travers la membrane (Lipinski, 2001), alors que le transport des acides est effectué par l'intermédiaire d'un transporteur membranaire codé par *PDR12* (Hazelwood et al., 2008, 2006).

Si la voie d'Ehrlich est désignée comme la voie principale de synthèse des alcools supérieurs (Hazelwood et al., 2008 ; Henschke and Jiranek 1993; Bisson, 1991), la plupart de ces composés peuvent aussi être formés à partir du glucose à travers le métabolisme carboné central (Bell and Henschke, 2005) (**Figure 8**). En effet, la majorité des cétoacides dont dérivent les alcools supérieurs sont des intermédiaires de la glycolyse ou du TCA. Par exemple, l'α-cétoisovalérate et l'α-cétoisocaproate, précurseurs de l'isobutanol et de l'alcool isoamylique respectivement, peuvent être formés directement à partir du métabolisme du pyruvate **(Figure 8**).

La fonctionnalité d'une voie de synthèse alternative à celle issue de l'acide aminé précurseur a été confirmée expérimentalement. En effet, le suivi de production des alcools supérieurs au cours de la fermentation montre que leur synthèse perdure tout au long de la fermentation

alors que la totalité de l'azote assimilable est consommée au cours du premier tiers de la fermentation (Molina et al., 2007).

2.4.2. Esters d'acétate

Les esters d'acétate sont synthétisés lors de la réaction d'un alcool (éthanol ou alcool supérieur) avec l'acétyl-CoA (**Figure 8**). La synthèse des esters d'acétate dépend principalement de l'activité des alcools acétyltransférases (AAT, EC 2.3.1.84). Chez *S. cerevisiae*, deux AAT ont été identifiées : Atf1p et Atf2p (Minetoki et al., 1993; Malcorps and Dufour, 1987). 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). Atf1p est l'enzyme la plus importante ; elle est considérée comme responsable de la synthèse de 80% d'acétate d'isoamyle, 75% d'acétate de phényléthyle et environ 40% d'acétate d'éthyle (Verstrepen et al., 2003). De plus, lors de la surexpression du gène *ATF1*, la production d'acétate d'isoamyle est multipliée par plus de 100 ; les synthèses d'acétate d'éthyle et d'acétate de phényléthyle sont entre 10 et 200 fois supérieures (Verstrepen et al. 2003; Lilly et al. 2000). 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 *ATF1* et *ATF2*, suggérant l'intervention d'une troisième enzyme (Verstrepen et al., 2003; Lilly et al., 2000).

De plus, il existe chez *S. cerevisiae* des estérases qui provoquent une diminution de l'accumulation des esters dans le milieu. Différentes études (Lilly et al., 2006; Fukuda et al., 1998) ont montré que le gène *IAH1* est responsable de l'hydrolyse de la plupart des esters, notamment de l'acétate d'isoamyle. Il est donc important de prendre en compte l'équilibre entre l'activité de synthèse des alcools acétyltransférases et celle d'hydrolyse des estérases pour obtenir un optimum de production des esters d'acétate.

En conclusion, la production des esters d'acétate dépend à la fois de la disponibilité des deux co-substrats (acétyl-CoA et alcools supérieurs) et aussi des activités enzymatiques de synthèse (alcools acétyltransférases) et d'hydrolyse (estérases) (Saerens et al., 2010). De nombreuses études ont montré que l'activité enzymatique est le facteur le plus influent pour la production de ces esters (Verstrepen et al., 2003; Lilly et al., 2000).

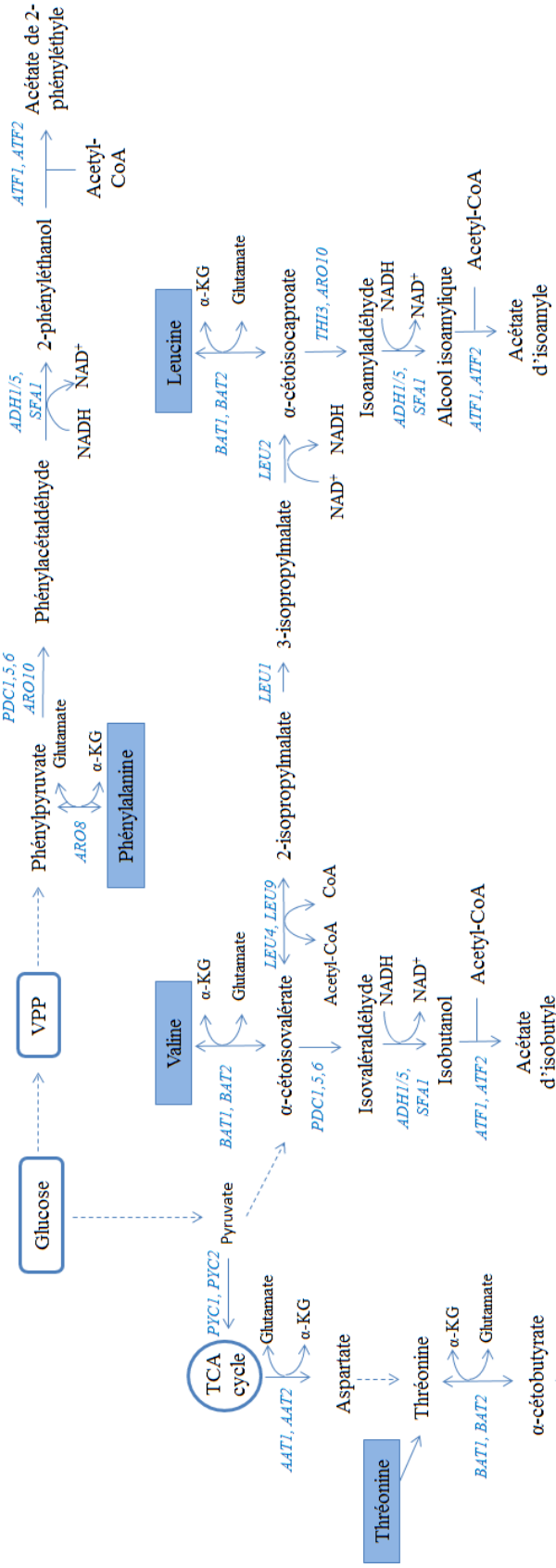


Figure 8. Voies de synthèse des alcools supérieurs et de leurs acétates (d'après Bell and Henschke 2005)

2.4.3. Acides gras

Les principaux acides produits par la levure au cours de la fermentation alcoolique sont les acides gras et les cétoacides.

Les acides gras saturés à nombre pair d'atomes de carbone, qui sont largement majoritaires, ont deux origines possibles (Schreier and Jennings, 1979): la synthèse des acides gras à longue chaîne (**Figure 9**) et le catabolisme des acides gras à longue chaîne (via la β-oxydation). La voie anabolique est la voie prépondérante alors que la β-oxydation qui nécessite la présence d'oxygène est active uniquement en début de fermentation (Schreier and Jennings, 1979).

Les acides gras sont formés successivement par ajout de deux atomes de carbone provenant du malonyl-CoA sur un acyl-CoA, l'acétyl-CoA étant le premier des acyl-CoA de cette chaîne d'élongation des acides gras (**Figure 9**). Les réactions intervenant dans ce processus d'élongation sont réalisées par un complexe multi-enzymatique constitué de sept unités (Lynen, 1967). L'acétyl-CoA est principalement formé par décarboxylation oxydative du pyruvate.

La voie de la β-oxydation est constituée par une série de réactions qui, à partir d'un acide gras, libèrent une molécule d'acétyl-CoA pour donner un acide gras à chaîne plus courte de deux atomes de carbone.

2.4.4. Esters d'éthyle

Les esters d'éthyle sont formés à partir de l'éthanol et d'acyl-CoA sous l'action des acyl-coenzyme A/éthanol O-acyltransférases codées par les gènes *EHT1* et *EEB1* (**Figure 9**). Eht1p catalyse exclusivement la synthèse d'hexanoate d'éthyle à partir d'éthanol et d'hexanoyl-CoA. Par contre, Eeb1p est une éthanol acyltransférase responsable de la majeure partie de la biosynthèse d'esters d'éthyle au cours de la fermentation ; cette enzyme possède également une activité estérase des esters à courte chaîne et peut être impliquée dans le métabolisme des lipides (Saerens et al., 2008).

Il a été montré que la surexpression de ces deux gènes n'entraîne pas une surproduction des esters d'éthyle car ces enzymes possèdent à la fois une activité de synthèse et une activité estérase (Saerens et al., 2006).

Contrairement aux esters d'acétate, le facteur ayant le plus d'influence sur la production des esters d'éthyle est la disponibilité des deux précurseurs: acyl-CoA et éthanol (Saerens et al., 2008).

De plus, les esters d'éthyle en C8 ainsi que leurs acides gras précurseurs ne sont pas entièrement excrétés dans le milieu ; un certain pourcentage produit est retenu à l'intérieur de la cellule : environ 60% pour les C8, 20% pour les 10 et quasiment 100% pour les C12 (Saerens et al., 2008).

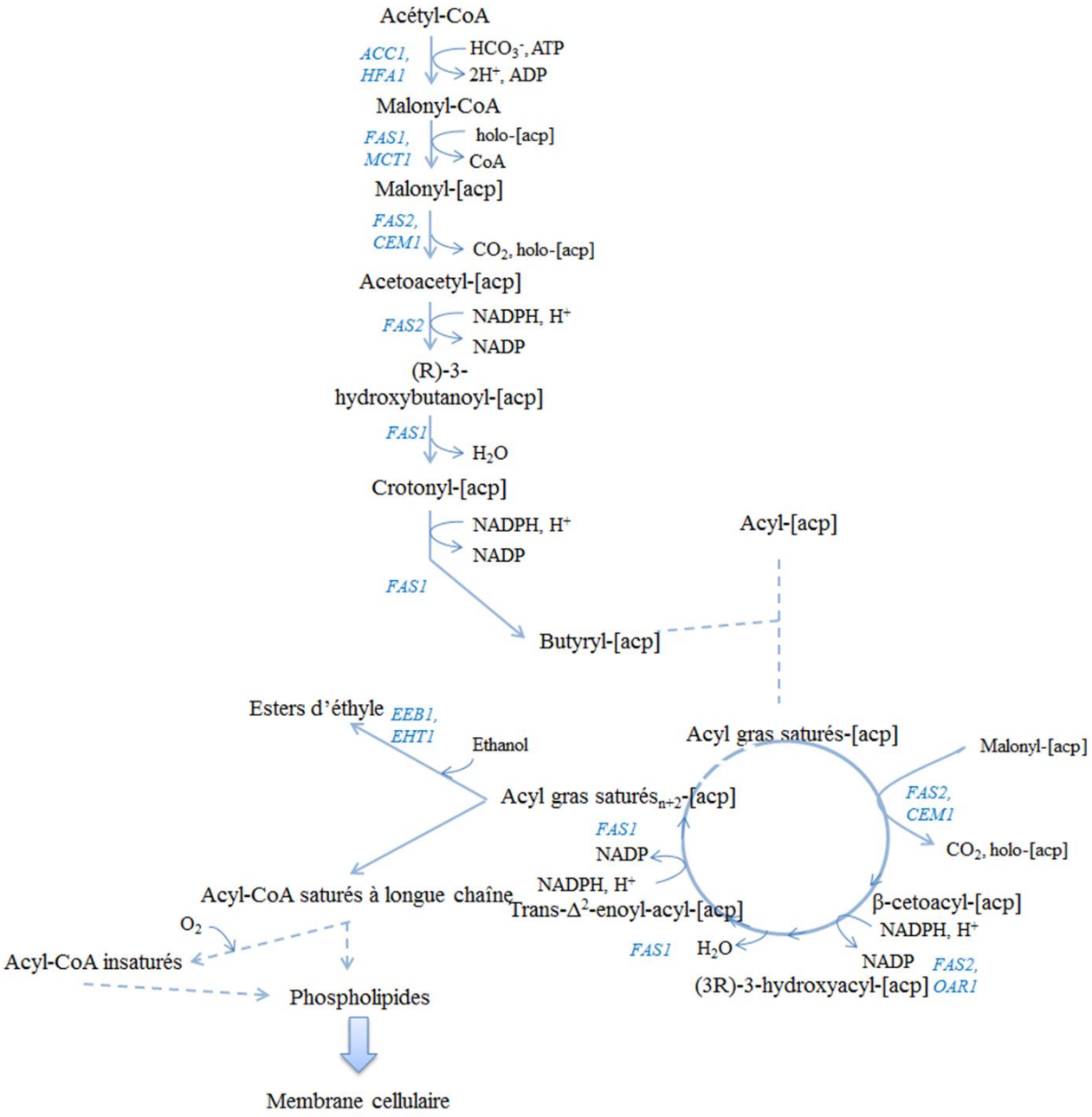


Figure 9. Biosynthèse des acides gras et leur implication dans la formation des esters d'éthyle (d'après Saerens et al., 2010)

2.5. Rôle et chronologie de production des arômes fermentaires

Pour le moment, peu d'informations sont disponibles sur le rôle et la chronologie de synthèse des arômes fermentaires par *S. cerevisiae* au cours de la fermentation alcoolique.

Le rôle de la synthèse de ces composés d'arômes chez la levure n'est pas clairement identifié, cependant plusieurs hypothèses ont été envisagées. Au vue de la nature des réactions chimiques impliquées, la formation des molécules volatiles via la voie d'Ehrlich semble jouer un rôle dans l'équilibre redox de la levure. Une autre hypothèse propose que la synthèse des alcools supérieurs ait pour but de dégrader les aldéhydes et cétoacides qui sont des composés toxiques (Bisson, 1991). Concernant les esters, les hypothèses avancées sont les suivantes (Saerens et al., 2010) : (i) la production des esters pourrait servir à la régénération du coenzyme A, (ii) les esters pourraient être utilisés comme analogues aux acides gras insaturés afin de conserver l'intégrité de la membrane plasmique, (iii) la synthèse des esters pourrait être un mécanisme de détoxification afin d'éviter l'accumulation d'acides gras à moyenne chaîne et de cétoacides toxiques. La synthèse des esters serait aussi un moyen de disséminer les levures dans la nature, en attirant les insectes (Palanca et al., 2013; Stefanini et al., 2012). Christiaens et al. (2014) ont montré que la délétion d'*ATF1* altère la réponse olfactive dans le lobe antennaire des mouches des fruits qui se nourrissent de levures. Les mouches sont beaucoup moins attirées par les cellules de levure mutantes, ce qui entraîne à son tour une moindre dispersion des levures mutantes par les mouches.

La chronologie de synthèse des arômes fermentaires a été étudiée très récemment, grâce à la mise au point d'un outil de suivi en ligne (par chromatographie en phase gazeuse) des composés volatils possédant une haute fréquence d'analyse (une acquisition par heure) (Morakul et al., 2011; Mouret et al., 2012).

Mouret et al. (2014a) montrent que la synthèse des alcools supérieurs commence dès le début de la phase de croissance. Le propanol est produit uniquement au cours de la phase de croissance (96% de la production totale pendant cette phase), correspondant à la phase de consommation de l'azote assimilable. Cet alcool supérieur peut donc être considéré comme un marqueur de la cinétique de consommation de l'azote. Par contre, les autres alcools supérieurs sont également produits pendant la phase stationnaire (production égale à 65 et 73% de la production totale au cours de cette phase pour l'isobutanol et l'alcool isoamylique, respectivement) (**Figure 10**).

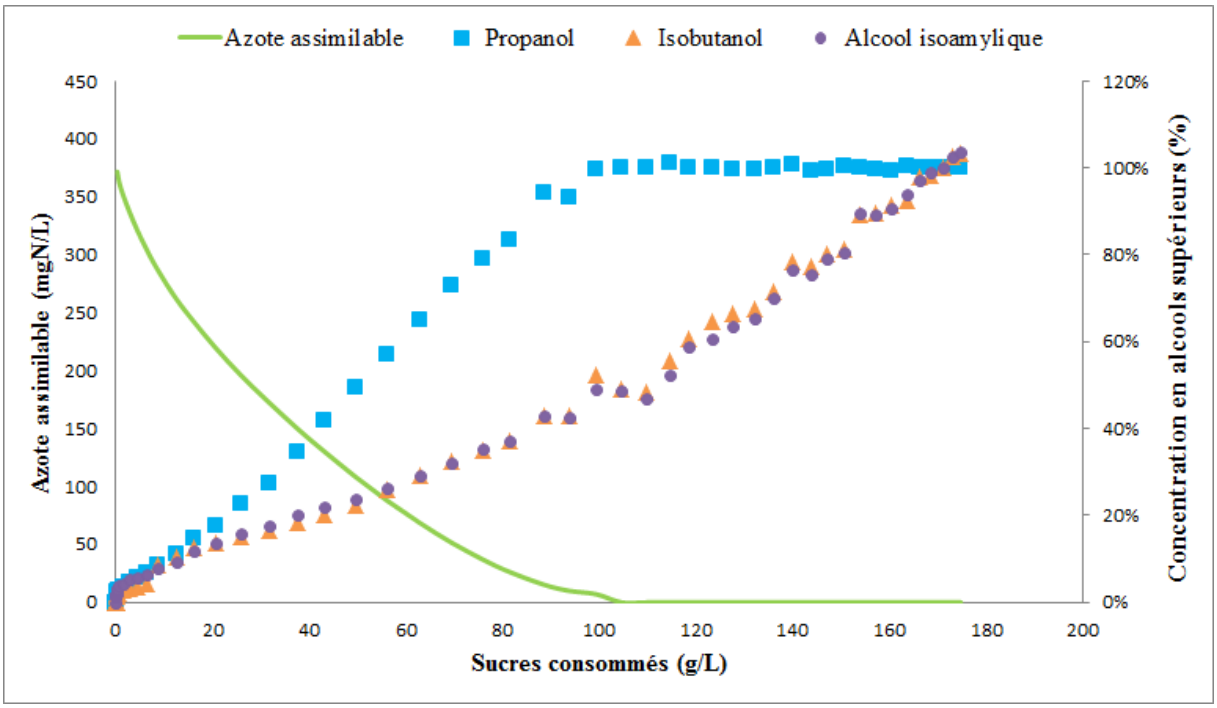


Figure 10. Production des alcools supérieurs par EC1118 au cours du processus fermentaire (d'après Mouret et al. 2014a)

La synthèse des esters, quant à elle, démarre plus tardivement que celle des alcools supérieurs et la majorité de la production a lieu au cours de la phase stationnaire (15 à 26% seulement de la production totale au cours de la phase de croissance). La production ultérieure des esters d'acétate par rapport aux alcools supérieurs confirme que la disponibilité des précurseurs, à une concentration au-dessus d'une valeur seuil, est un facteur important dans la production de ces esters. Ceci est en accord avec les résultats obtenus par Clement et al. (2013) qui ont noté que, suite à l'addition de valine au début de la phase stationnaire, l'augmentation de la production d'acétate d'isobutyle était décalée de 4 heures par rapport à celle de l'isobutanol.

Le fait que la majorité des molécules volatiles soit produite au cours de la phase stationnaire indique un lien fort avec le métabolisme carboné central (Mouret et al., 2014b) et montre que ces composés ne sont pas uniquement issus de la dégradation des acides aminés (Miller et al. 2007).

En cours de fermentation, une relation a été mise en évidence entre la production d'arômes fermentaires et la consommation de sucre, pour tous les composés considérés hormis le propanol (Mouret et al., 2014a). Pour ces composés volatils, deux phases de production linéaires consécutives sont généralement identifiées. Les durées de ces deux phases sont différents suivant les molécules ; les rendements varient en fonction de la teneur en azote initial et de la température (Mouret et al., 2014a).

3 Effets des principaux paramètres fermentaires sur la production des arômes fermentaires

Au cours de la fermentation alcoolique, plusieurs paramètres influencent la production des composés volatils, notamment celle des alcools supérieurs et des esters, et ont ainsi un impact sur les caractéristiques aromatiques des vins.

3.1. Souche de levure

3.1.1. Amélioration des souches

De nombreuses études ont montré l'impact de la souche de levure sur la production des composés volatils (Blanco et al., 2013; Barbosa et al., 2012; Rossouw et al., 2012; Camarasa et al., 2011; Molina et al., 2009; Torija et al., 2003; Torrea, 2003). En particulier, Camarasa et al. (2011) ont comparé la production des composés d'arôme, en conditions œnologiques, de 72 souches d'origines diverses. Ces auteurs ont montré que les variations phénotypiques au sein de l'espèce *S. cerevisiae* proviennent à la fois de contraintes environnementales et de la sélection humaine. En effet, les souches œnologiques commerciales se caractérisent par de fortes productions d'arômes sous forme d'esters d'acétate alors que les souches de laboratoire présentent une production accrue de butanoate d'éthyle.

En parallèle des études de diversité des souches de *S. cerevisiae*, des recherches visant à augmenter la production de composés d'arômes par les souches œnologiques ont été entreprises (Cadière et al., 2011; Pretorius and Høj, 2005; Verstrepen et al., 2003; Lilly et al., 2000). La plupart de ces travaux reposent sur des approches d'ingénierie métabolique permettant de modifier l'expression d'un ou plusieurs gènes de façon ciblée. Par exemple, Lilly et al. (2000) ont transformé la souche VIN13 afin qu'elle surexprime le gène *ATF1* pendant la fermentation et ainsi déterminer son effet sur le métabolisme de la levure et plus spécialement sur la formation d'esters acétate. Lors de la surexpression du gène *ATF1*, la production d'acétate d'isoamyle est multipliée par 100. Rossouw et al. (2012) ont montré que le phénotype d'une souche peut être modifié en changeant les niveaux d'expression des facteurs de transcription. En effet, des différences importantes dans la production de composés volatils par des souches surexprimant un facteur de transcription et des souches parentales non transformées sont observées. Les différences les plus prononcées ont été

observées lors de la surexpression de *SOK2* ou encore de *RAP1*. À la fin de fermentation, plus de la moitié des composés d'arôme mesurés étaient présents à des concentrations plus élevées dans la souche surexprimant *SOK2* par rapport à la souche parentale.

Cependant, la faible acceptabilité des organismes génétiquement modifiés dans l'industrie agroalimentaire a conduit à la recherche de stratégies alternatives pour obtenir des souches au phénotype désiré. La recherche de QTL chez la levure permet d'identifier les allèles responsables d'un phénotype. De manière générale, une fois la mutation responsable du phénotype identifiée, cette caractéristique peut être transférée à une autre souche en réalisant des croisements avec sélection assistée par marqueurs. Steyer et al. (2012) ont mis en évidence des allèles impliqués dans la production d'arômes.

Une autre approche de plus en plus utilisée pour l'amélioration des souches est l'évolution adaptative. L'objectif de cette approche consiste à isoler, à partir d'une souche parentale, des variants ayant un phénotype d'intérêt, en maintenant pendant plusieurs générations une pression de sélection adaptée.

3.1.2. Souche ECA5

La souche ECA5, utilisée dans cette thèse a été obtenue grâce à une stratégie d'évolution adaptative visant à augmenter le flux de carbone passant à travers la VPP (Cadière et al., 2011). Pour cela, la souche œnologique Lalvin EC1118® a été cultivée de façon prolongée en mode batch sur un milieu contenant du gluconate comme seule source de carbone. Ce substrat difficilement assimilable par *S. cerevisiae* est métabolisé par la VPP. Au cours de l'adaptation, différentes souches évoluées ont été sélectionnées dont la souche ECA5 qui présentait les caractéristiques métaboliques et cinétiques les plus intéressantes en conditions de fermentation.

La souche ECA5 a été caractérisée grâce à des analyses menées à différents niveaux (propriétés phénotypiques, analyse fluxomique, analyse transcriptomique) (Cadière 2010). La caractérisation phénotypique de cette souche a mis en évidence (i) de faibles besoins en azote par rapport à Lalvin EC1118®, ce qui constitue un avantage pour fermenter des moûts carencés en azote, (ii) une production plus faible d'acétate, (iii) un contenu en lipides plus élevé et (iv) une production accrue d'arômes fermentaires par rapport à la souche parentale.

L'analyse fluxomique a montré une augmentation significative du flux au travers de la VPP (1,5 fois) en accord avec la stratégie mise en place. L'analyse fluxomique, couplée à la détermination de la composition de biomasse, a également permis de démontrer que la diminution de la concentration extracellulaire en acétate est liée à une utilisation préférentielle

de ce composé pour la production d'acétyl-CoA et des lipides et non à une diminution de sa synthèse (Cadière et al., 2011).
Un flux plus important via la VPP peut expliquer les niveaux plus élevés de 2-phényléthanol et d'acétate de 2-phényléthyle produits à partir de la dégradation de la phénylalanine. Les autres esters surproduits sont synthétisés à partir de l'acétyl-CoA ou d'acyl-CoA; l'augmentation de leur production peut résulter d'un flux plus important à travers la voie de l'acétyl-CoA et la voie de synthèse des lipides (Cadière et al. 2011).
L'analyse transcriptomique réalisée en phase stationnaire a mis en évidence des modifications du métabolisme azoté (Cadière, 2010), notamment l'induction de gènes impliqués dans le transport et la synthèse d'acides aminés et de leur dégradation via la voie d'Ehrlich, qui favorise la formation des composés volatils.

Les propriétés aromatiques de ECA5 ont été validées à l'échelle pilote (fermenteurs de 10L et 100L) (Mouret et al., 2015; Cadière et al., 2012) et industrielles par la société Lallemand. Ces tests ont abouti à la mise sur le marché, en 2012, de cette souche sous le nom d'Affinity™ ECA5.

3.2. Température

La température de fermentation est un des principaux paramètres affectant les teneurs finales en composés volatils dans les vins. La température a un effet biologique sur le métabolisme de la levure ainsi qu'un effet physique en entrainant l'évaporation plus importante de certains composés volatils. L'effet de la température sur la production des alcools supérieurs est complexe. En effet, Beltran et al. (2008) ont montré que la concentration totale en alcools supérieurs (isobutanol, alcool isoamylique et 2-phényléthanol) augmente avec la température alors que Molina et al. (2007) observent une augmentation en 2-phényléthanol seulement, la teneur des autres alcools supérieurs diminuant. En se focalisant sur le comportement de l'isobutanol et de l'alcool isoamylique, on constate que la température a des effets très différents sur leurs cinétiques de synthèse (Mouret et al., 2014a) (**Figure 11**). Pour l'isobutanol, la production totale augmente avec la température, alors que ce paramètre atteint sa valeur maximale à 24°C pour l'alcool isoamylique. Le propanol n'est quant à lui pas affecté par ce paramètre (Mouret et al., 2014a) (**Figure 12**).

Inversement, l'effet néfaste des températures élevées (supérieures à 20°C) sur la concentration finale des esters (d'acétate et d'éthyle) dans les vins est toujours observé expliquant l'utilisation systématique de températures basses (entre 15 et 20°C) lors de vinifications en blanc et rosé (Mouret et al., 2014a; Beltran et al. 2008; Molina et al. 2007) (**Figure 13**).

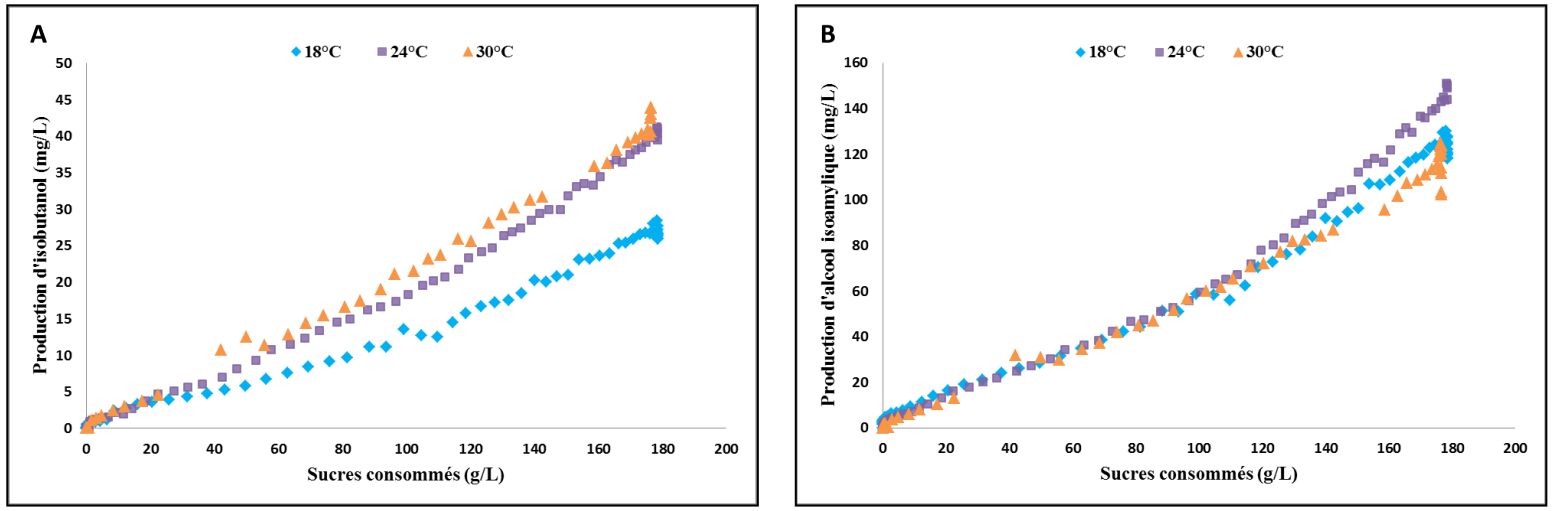


Figure 11. Production d'isobutanol (A) et d'alcool isoamylique (B) lors de fermentations réalisées à 18, 24 et 30°C avec la souche EC1118 (d'après Mouret et al. 2014a)

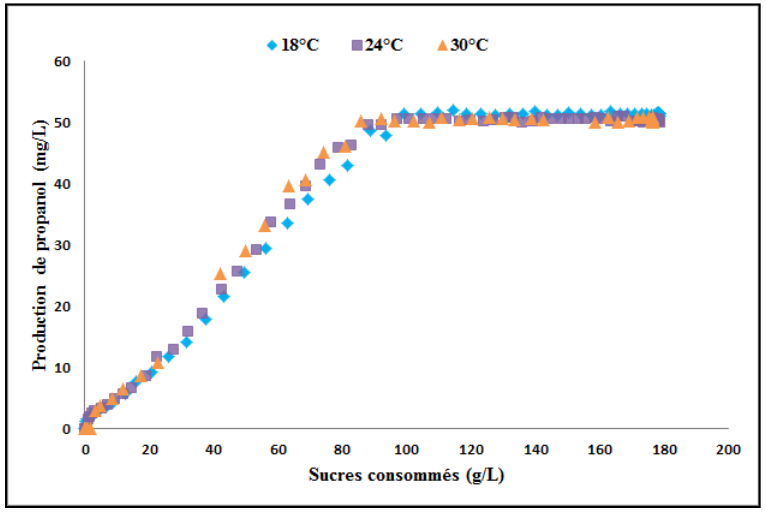


Figure 12. Production de propanol lors de fermentations réalisées à 18, 24 et 30°C avec la souche EC1118 (d'après Mouret et al. 2014a)

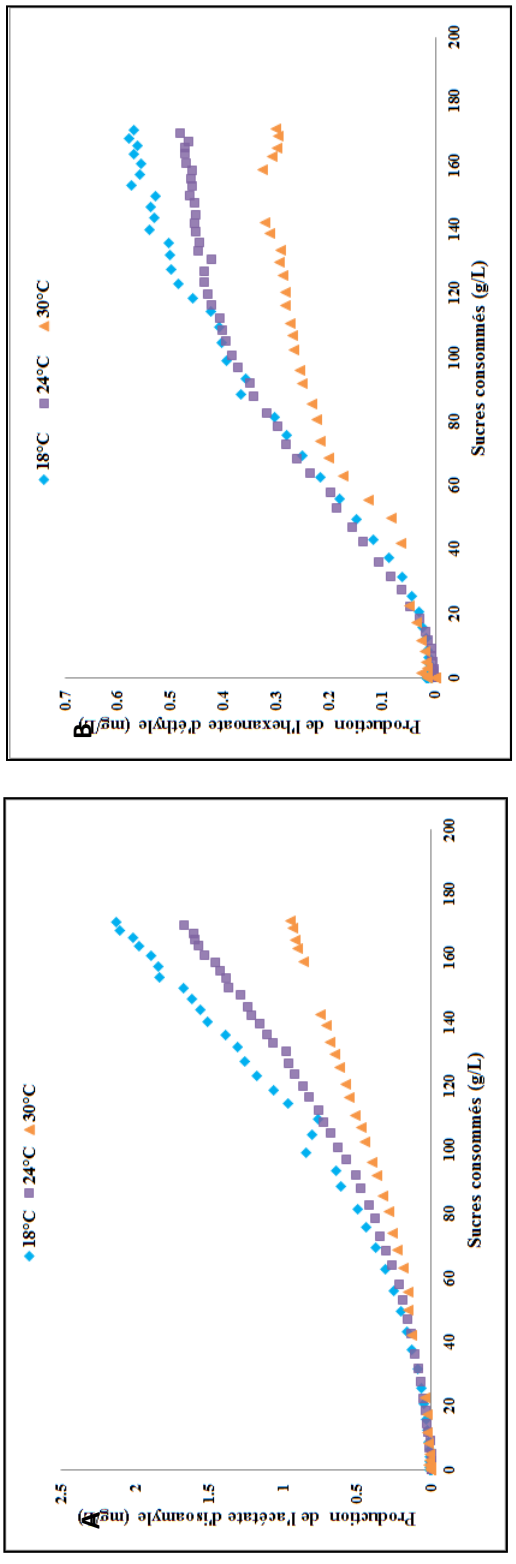


Figure 13. Production d'acétate d'isoamyle (A) et d'hexanoate d'éthyle (B) lors de fermentations réalisées à 18, 24 et 30°C avec la souche EC1118 (d'après Mouret et al. 2014a)

Grâce à des études récentes, il est devenu possible de réaliser des bilans gaz-liquide de la production des arômes fermentaires (Morakul et al., 2013, 2011). Pour six composés volatils (propanol, isobutanol, alcool isoamylique, acétate d'isoamyle, hexanoate d'éthyle et octanoate d'éthyle), la quantité accumulée dans le liquide et celle perdue dans les gaz ont été calculées. Leur somme correspond à la production totale et représente, pour chaque composé, la capacité de synthèse par la levure. Elle présente un grand intérêt pour les études visant à la compréhension du métabolisme levurien.

Avec cette approche, les pertes globales en composés d'arôme dans les gaz peuvent être calculées à n'importe quelle température (Morakul et al., 2013; Mouret et al., 2014b). Les pertes sont négligeables pour les alcools supérieurs, mais beaucoup plus importantes pour les esters, même à faible température (**Tableau 3**). Elles dépendent essentiellement de la volatilité et du caractère hydrophobe de chaque molécule. A une température donnée, le pourcentage perdu est presque indépendant de la cinétique fermentaire (Mouret et al., 2014b). Le fait que les pertes soient importantes pour les esters indique que, pour ces molécules d'intérêt, il est indispensable d'utiliser les productions totales pour évaluer l'impact des paramètres fermentaires sur le métabolisme levurien. En effet, comme indiqué en Figure 14 (avec l'exemple de l'hexanoate d'éthyle), la production totale des esters d'éthyle est identique à 18 et 24°C alors que leurs concentrations finales en phase liquide sont plus fortes à 18°C. Ce résultat indique que la plus faible accumulation de ces esters dans le liquide à 24°C est due à la perte par évaporation et non à des changements du métabolisme levurien. Par conséquent, si les seules données prises en compte pour les esters d'éthyle sont les concentrations liquides, l'effet de la température sur leur production est fortement surestimé (Mouret et al. 2014a).

Tableau 3. Pertes relatives des arômes fermentaires (d'après Mouret et al. 2014a)

Composés	18°C	24°C	30°C
Propanol	0.4%	0.6%	0.9%
Isobutanol	0.4%	0.6%	1%
Alcool isoamylique	0.5%	0.7%	1.4%
Acétate d'isoamyle	14%	21%	33%
Hexanoate d'éthyle	29%	42%	50%
Octanoate d'éthyle	26%	37%	49%

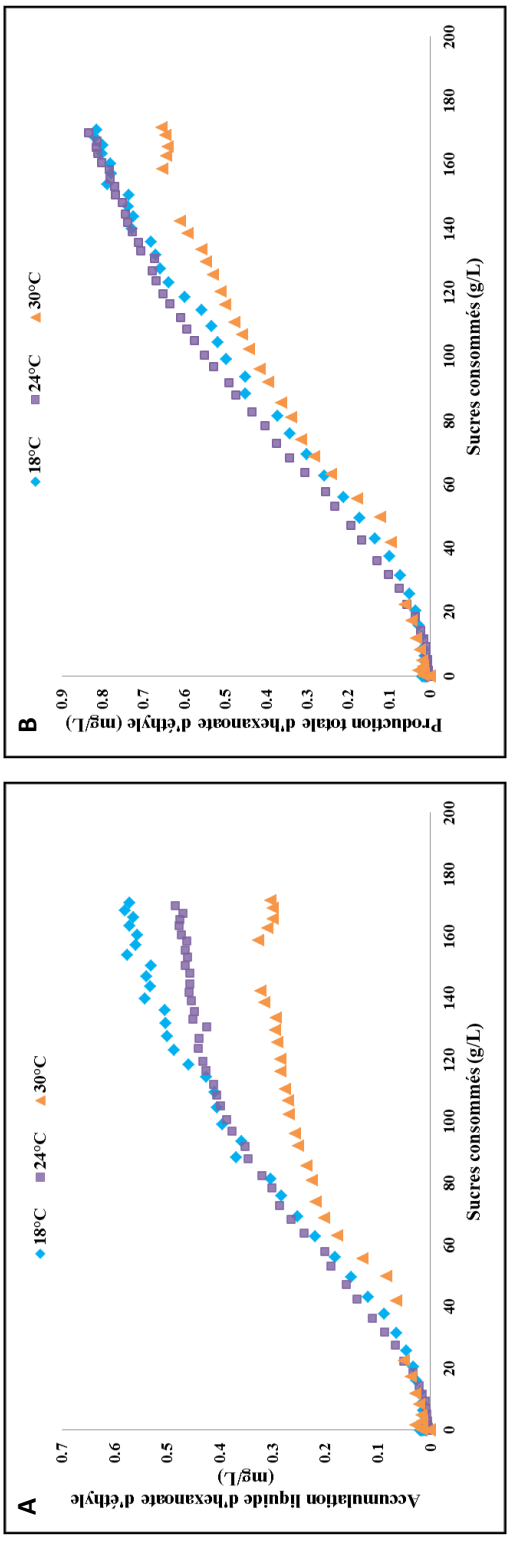


Figure 14. Accumulation dans le liquide (A) et production totale (B) de l'hexanoate d'éthyle lors de fermentations réalisées à 18, 24 et 30°C avec la souche EC1118 (d'après Mouret et al. 2014a)

3.3. Effet des ajouts d'azote

Plusieurs études ont porté sur l'impact de la supplémentation en azote des moûts sur la production de composés volatils (Mouret et al., 2014b; Clement et al., 2013; Vilanova et al., 2012; Torrea et al., 2011; Jiménez-Martí et al., 2007; Beltran et al., 2005). Les résultats obtenus lors de ces divers travaux sont difficiles à synthétiser et parfois même contradictoires, en particulier parce que les souches utilisées sont différentes mais aussi du fait de la variabilité des conditions expérimentales utilisées ; la synthèse des arômes fermentaires est en effet fortement influencée par la quantité et la forme d'azote assimilable présent initialement dans les moûts et/ou ajouté en cours de fermentation (**Tableau 4**). Néanmoins, certaines tendances peuvent être dégagées et vont être détaillées dans les paragraphes suivants.

3.3.1. Alcools supérieurs

Les alcools supérieurs qui dérivent en partie du catabolisme des acides aminés voient leur concentration influencée par la teneur en azote assimilable. Cependant, à l'exception du propanol, cette relation n'est pas monotone. En effet, l'ajout d'azote à un moût carencé (60 mgN/L) entraîne une augmentation de la production des alcools supérieurs avec un optimum entre 200 et 300 mg/L d'azote assimilable (**Figure 15**). Au-delà de ce seuil, la tendance s'inverse et la concentration en alcools supérieurs diminue lorsque la concentration initiale en azote augmente (Mouret et al. 2014a; Jiménez-Martí et al. 2007; Vilanova et al. 2007; Beltran et al. 2005).

Cette variation de l'effet de l'azote en fonction de la quantité mise en œuvre est en accord avec les observations de Yoshimoto et al. (2002). Cette étude a montré que l'expression des gènes *LEU1*, *LEU2*, *BAT1* et *BAT2* impliqués dans la synthèse des acides aminés branchés est augmentée lorsqu'il y a une faible augmentation de la concentration en azote puis est diminuée pour des additions plus importantes.

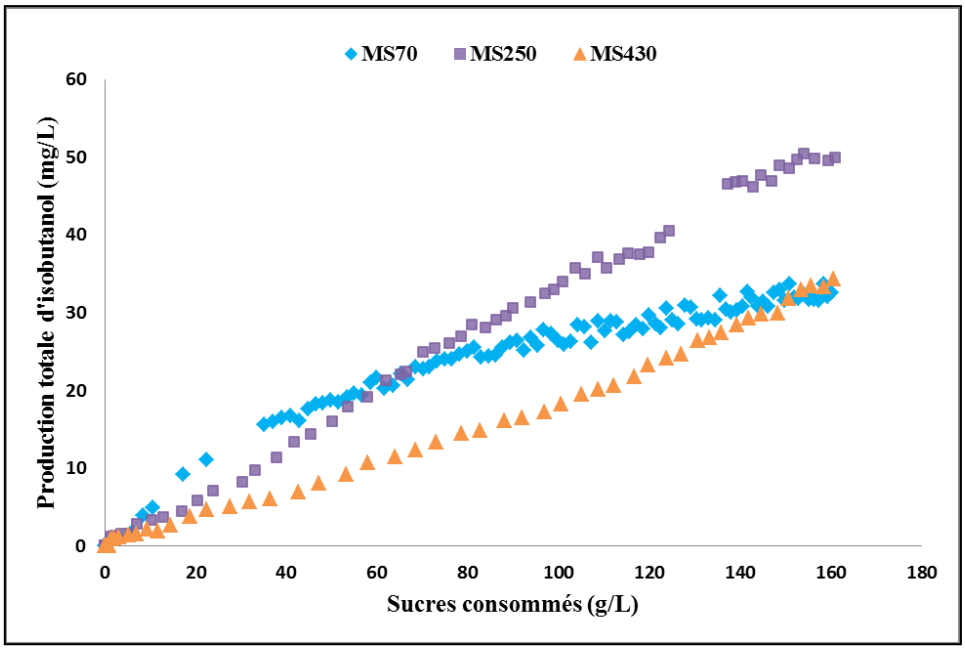


Figure 15. Production totale d'isobutanol pour trois teneurs en azote assimilable initial lors de fermentations réalisées à 24°C avec la souche EC1118 (d'après Mouret et al. 2014a)

Le propanol a un comportement très différent de celui des autres alcools supérieurs vis-à-vis de l'azote. En effet, la production de ce composé est corrélée linéairement à la concentration d'azote assimilable initial **(Figure 16)** (Mouret et al., 2014a; Carrau et al., 2008; Beltran et al., 2005). De plus, la production de ce composé est indépendante de la température de fermentation (paragraphe 3.2). Le propanol peut donc être considéré comme un marqueur métabolique quantitatif de la disponibilité en azote des moûts.

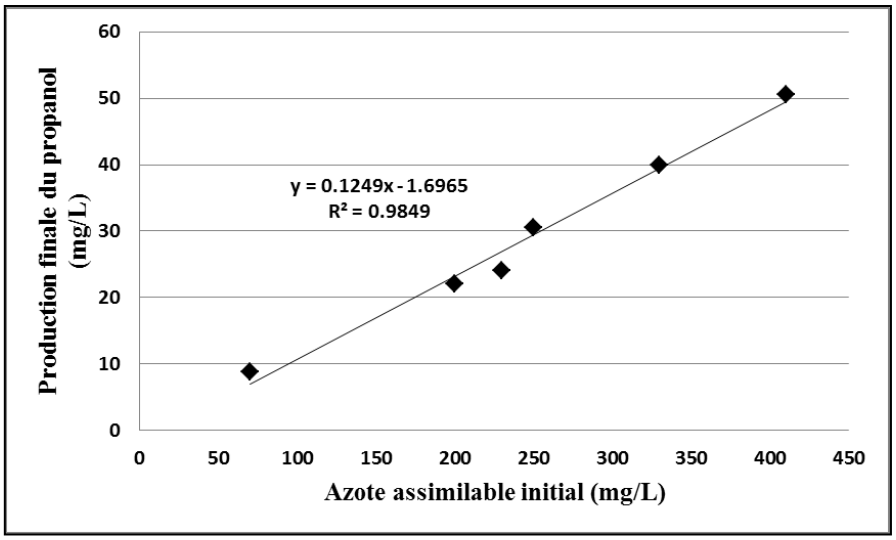


Figure 16. Corrélation linéaire entre la concentration en azote assimilable initial et la production de propanol (d'après Mouret et al. 2014a)

3.3.2. Esters

La teneur en esters d'acétate est, en règle générale, augmentée par l'ajout d'azote (Mouret et al., 2014a; Torrea et al., 2011; Miller et al., 2007; Beltran et al., 2005). Ceci est expliqué par la plus forte expression des gènes codant pour les alcools acétyltransférases, catalysant la conversion des alcools supérieurs en esters d'acétate (Verstrepen et al., 2003), lors d'une supplémentation du moût en azote.

Un ajout d'azote a également des conséquences sur la production des esters d'éthyle. La production de ce type d'esters augmente avec la teneur en azote (Mouret et al., 2014a; Miller et al., 2007). Cette observation est relativement surprenante car il n'y a aucun lien métabolique direct entre le métabolisme azoté et les voies de synthèse de ces composés. Mouret et al. (2014a) considèrent que l'effet de l'azote sur la production des esters d'éthyle peut être dû à des connexions entre le métabolisme de l'azote et le métabolisme des lipides par l'intermédiaire de la régulation redox ou la synthèse possible des dérivés acyl-CoA à partir de α-cétoacides. Une autre explication serait l'induction de la synthèse d'acyl-CoA en raison des exigences élevées de lipides pour des niveaux élevés de production de la biomasse dans les milieux à forte concentration d'azote.

L'effet d'une supplémentation en azote sur la production des composés d'arôme est complexe et dépend non seulement de la qualité (organique ou minérale) et de la quantité de la source d'azote mais aussi du moment d'ajout (**Tableau 4**). Barbosa et al. (2009) ont comparé les quantités en composés volatils produites lors de fermentations où une même quantité d'azote a été ajoutée avant inoculation ou à mi-fermentation. L'ajout d'azote réalisé à mi-fermentation entraîne une augmentation des concentrations en 2-phényléthanol et en son ester, l'acétate de 2-phényléthyle mais également de certains esters d'éthyle. Cet effet est cependant moins marqué lors de l'ajout d'un mélange d'acides aminés que lors de l'ajout d'ammonium seul (sous forme de di-ammonium phosphate). Néanmoins, il ressort de ces différentes études que l'effet de la supplémentation en azote des moûts sur la teneur en arômes fermentaires est extrêmement variable et donc difficilement prédictible. Ceci est dû au fait que le réseau métabolique lié à la formation des composés volatils est complexe et multi-régulé.

Tableau 4. Effet d'un ajout d'azote sur la production des arômes fermentaires : influence de la nature de la source d'azote et du moment d'ajout

Auteurs	Souches	Type d'ajout	Moment d'ajout	Augmentation	Diminution	Pas de changement
Torrea et al. 2011	AWRI 796	NH4+ ou AA	Avant fermentation	Esters d'acétate Esters d'éthyle	Alcools supérieurs	
Jimenez-Marti et al. 2007	Fermicru Primeur	AA	Avant fermentation	Isobutanol Alcool isoamylique 2-phényléthanol Acétate de 2-phényléthyle	Acétate d'éthyle Acétate d'isoamyle	
		NH4+	Avant fermentation	Isobutanol Alcool isoamylique 2-phényléthanol	Acétate d'éthyle Acétate d'isoamyle Acétate de 2-phényléthyle	
		AA	Fin de phase de croissance	Alcool isoamylique 2-phényléthanol Acétate de 2-phényléthyle	Isobutanol Acétate d'éthyle Acétate d'isoamyle	
		NH4+	Fin de phase de croissance		Isobutanol Alcool isoamylique 2-phényléthanol Acétate d'éthyle Acétate d'isoamyle Acétate de 2-phényléthyle	
Miller et al. 2007	ICV 254D	NH4+	Avant fermentation	Acétate d'éthyle Acétate d'isoamyle	Octanoate d'éthyle Décanoate d'éthyle	Acétate d'héxyle Butanoate d'éthyle Hexanoate d'éthyle
		AA	Avant fermentation		Acétate d'éthyle Acétate d'isoamyle Hexanoate d'éthyle Octanoate d'éthyle Décanoate d'éthyle	Acétate d'héxyle Butanoate d'éthyle
Beltran et al. 2005	QA23	NH4+ et AA	Avant fermentation	Propanol Acétate d'isobutyle Acétate d'isoamyle	Isobutanol Alcool isoamylique 2-phényléthanol Butanoate d'éthyle Hexanoate d'éthyle Octanoate d'éthyle Décanoate d'éthyle Acétate de 2-phényléthyle	
		NH4+ et AA	Fin de phase de croissance	Propanol Acétate d'isobutyle Acétate d'isoamyle Acétate de 2-phényléthyle Butanoate d'éthyle	Isobutanol Alcool isoamylique 2-phényléthanol Hexanoate d'éthyle Octanoate d'éthyle Décanoate d'éthyle	

3.4. Effet des lipides

Les stérols et les acides gras sont non seulement des composants essentiels pour le maintien de l'intégrité de la membrane des levures mais ils interviennent aussi en tant que précurseurs dans la synthèse de certains composés d'arôme (Styger et al., 2011; Swiegers et al., 2005; Lambrechts and Pretorius, 2000; Rosi and Bertuccioli, 1992).

Quand les acides gras insaturés exogènes sont disponibles en abondance, les cellules les incorporent dans leur membrane, entraînant une réduction significative de la synthèse *de novo* des acides gras. En conséquence, la production des composés d'arôme tels que les esters d'éthyle et l'acétate d'isoamyle est réduite (Yunoki et al., 2005).

Ces observations sont confirmées par Saerens et al. (2008) qui montrent qu'un ajout d'acides gras insaturés dans le milieu de fermentation provoque une diminution de la production des esters d'éthyle : la concentration en decanoate d'éthyle est réduite de 50%, celle de l'hexanoate d'éthyle de 33% et celle de l'octanoate d'éthyle de 25%. Des changements dans la concentration en hexanoate d'éthyle de cet ordre de grandeur sont suffisants pour affecter la perception aromatique. Cette étude montre aussi un effet de l'ajout des acides gras insaturés sur la production des esters d'acétate ; la concentration en acétate d'isoamyle est diminuée de 32%. Ceci est cohérent avec des observations précédentes (Fujiwara et al., 1998; Fujii et al., 1997; Malcorps and Dufour, 1992) qui montrent que les acides gras insaturés répriment l'expression du gène *ATF1* codant pour la principale alcool acétyltransférase responsable de la production de la majorité des esters d'acétate.

3.5. Effet des ajouts d'oxygène

En fermentation œnologique, l'ajout d'oxygène (ou d'air) est une pratique souhaitable (Rosenfeld et al., 2003; Blateyron and Sablayrolles, 2001). En effet, cet ajout permet de diminuer fortement les risques d'arrêt de fermentation. Cependant, son effet sur les arômes fermentaires a été moins étudié.

Pour Varela et al. (2012), l'ajout d'oxygène n'affecte pas la concentration totale en esters mais diminue le ratio esters d'acétate par rapport aux esters d'éthyle. Cet effet peut être dû à la répression par l'oxygène de l'expression du gène *ATF1* codant pour l'acétyltransférase responsable de la conversion des alcools supérieurs en esters d'acétate (Plata et al., 2005; Fujii et al., 1997; Malcorps and Dufour, 1992). Ceci est en accord avec les travaux de Valero et al. (2002) montrant qu'il existe un meilleur ratio esters d'acétate / alcools supérieurs dans un moût sans oxygénation initiale, confirmant ainsi qu'il existe une meilleure conversion des alcools supérieurs en esters en absence d'oxygène.

D'autres études indiquent que les esters d'acétate ne sont pas les seuls composés d'arôme impactés négativement par un ajout d'oxygène; les productions d'esters d'éthyle et d'acides gras sont aussi sensiblement diminuées en conditions aérobies (Saerens et al., 2010). Ces résultats sont principalement liés à une modification de la disponibilité en substrats (Saerens et al. 2010).

3.6. Autres nutriments

Les vitamines sont généralement présentes en quantités suffisantes dans les moûts de raisin pour un bon déroulement de la fermentation alcoolique, mais leur addition est bénéfique pour la croissance cellulaire et peut jouer un rôle dans la production des composés d'arôme (Hagen et al., 2008; Bohlscheid et al., 2007; Edwards and Bohlscheid, 2007; Wang et al., 2003) (**Figure 17**).

La biotine peut potentiellement impacter la production de nombreux arômes tels que les alcools supérieurs, les esters et les acides gras à moyenne chaîne (Lynen et al., 1980). Une carence en biotine peut entraîner une synthèse insuffisante d'α-cétoglutarate et par la suite une production réduite d'acides aminés, influençant la production des alcools supérieurs notamment (Bohlscheid et al., 2007) (**Figure 17**).

Des carences en biotine et en acide pantothénique peuvent conduire à des concentrations réduites en acides gras à moyenne chaîne et leurs esters dans le vin. La biotine est nécessaire à l'activation de l'acétyl-CoA carboxylase durant la biosynthèse *de novo* des acides gras (Forch et al. 1975). L'acide pantothénique a quant à lui un rôle de composant structurel du coenzyme A. Une telle carence entraîne donc une diminution des concentrations en acétyl-CoA. Dans les deux cas, ceci conduit à une réduction de la synthèse des acides gras, et donc à des concentrations plus faibles en acides gras à chaîne moyenne et en esters correspondants (Bohlscheid et al., 2007; Edwards and Bohlscheid, 2007; Wang et al., 2003).

La thiamine intervient sous forme de thiamine pyrophosphate (TPP) dans différentes voies métaboliques (**Figure 17**) : au niveau de la VPP pour la formation des acides aminés aromatiques, au niveau de la voie d'Ehrlich pour la formation des composés d'arôme (esters et alcools supérieurs) et au niveau de la réaction principale pour la formation d'éthanol (Li et al. 2010).

Les minéraux et les ions métalliques sont des micronutriments essentiels qui jouent des rôles physiologiques importants durant la croissance cellulaire et la fermentation alcoolique (Pereira, 1988), mais ces facteurs nutritionnels sont souvent négligés par rapport à leur contribution à l'arôme des vins (Ibanez et al., 2008). Par exemple, le zinc sert de co-facteur à un grand nombre de réactions enzymatiques. De Nicola et al. (2009) ont montré que des additions de zinc au cours de la fermentation du malt par *S. cerevisiae* augmentent les concentrations d'esters et d'alcools supérieurs (en particulier ceux en provenance des acides aminés à chaîne ramifiée) et réduisent la formation d'acétaldéhyde.

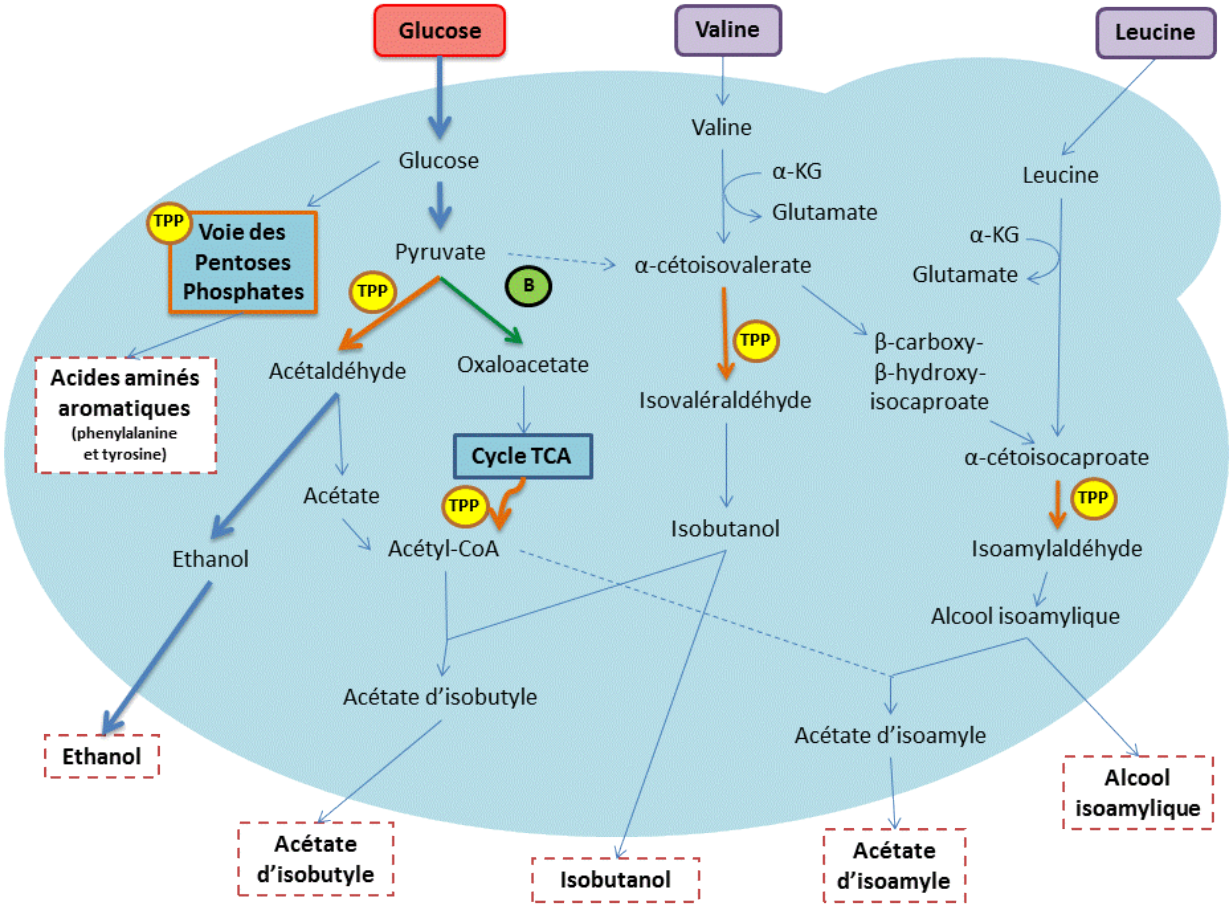


Figure 17. Voies métaboliques dans lesquelles interviennent la thiamine et la biotine (d'après Li et al. 2010)

Matériels et méthodes

1 Souches de levure

Les souches de levure *Saccharomyces cerevisiae* Lalvin EC1118® et Affinity™ ECA5 ont été utilisées pour l'ensemble des fermentations réalisées au cours de ce travail. Cinq autres souches (Lalvin ICV K1M®, Lalvin ICV D47®, Lalvin Rhône 2226®, Lalvin FC9 EDV® et UCD522) ont été utilisées lors de l'étude de l'effet du fond génétique. L'ensemble de ces souches est produit sous forme de levure sèche active (LSA) par la société Lallemand SA (Montreal, Canada). Chaque fermenteur est inoculé avec 10 g/hL de LSA préalablement réhydratés dans une solution à 50 g/L de glucose pendant 30 min à 37°C (1 g de LSA pour 10 mL de solution).

2 Milieux synthétiques

Le milieu synthétique (MS) utilisé présente les caractéristiques moyennes d'un moût de raisin (Bely et al., 1990a). Ce milieu est caractérisé par une forte concentration en sucres (glucose et fructose en proportions identiques), une teneur limitante en azote et un pH acide (pH= 3.3). On considère comme azote assimilable l'azote ammoniacal et l'azote des acides aminés à deux exceptions près : l'atome d'azote de la proline qui n'est pas assimilable en anaérobiose et un des quatre atomes de l'arginine. La composition du MS est présentée dans les tableaux 5 à 10. Les moûts synthétiques sont stockés à -20°C.

Plusieurs concentrations initiales en azote assimilable sont utilisées pour cette étude, de 70 à 425 mgN/L. L'exemple présenté dans le tableau 5 est celui qui mime un milieu avec une teneur en azote assimilable de 425 mgN/L.
Plusieurs concentrations initiales en facteurs anaérobies (phytostérols) sont utilisées au cours de cette étude, de 2 à 8 mg/L.

Pour les expériences de marquage isotopique, nous avons utilisé une source d'azote marquée en ^{13}C (Eurisotop®, France). La liste des composés azotés marqués utilisés dans cette étude est détaillée dans le tableau 11.

Tableau 5. Composition du milieu synthétique utilisé pour les fermentations. Exemple du milieu avec 425 mgN/L d'azote assimilable et 5 mg/L de facteurs anaérobies.

Composés	Quantité par litre
Glucose	100 g
Fructose	100 g
Acide malique	6 g
Acide citrique	6 g
Phosphate de potassium	0,75 g
Sulfate de potassium	0,5 g
Sulfate de magnésium	0,25 g
Chlorure de calcium	0,155 g
Chlorure de sodium	0,2 g
Chlorure d'ammonium	0,46 g
Solution mère d'oligo-éléments	1 mL
Solution mère de vitamines	10 mL
Solution mère de facteurs anaérobies	0,33 mL
Solution mère d'acides aminés	13,06 mL
Solution mère de chlorure de fer	1 mL
Le pH du milieu est ajusté à 3,3 avec une solution de NaOH 10M	

Tableau 6. Composition de la solution mère d'oligo-éléments

Composés	Quantité par litre
Sulfate de manganèse monohydraté	4 g
Sulfate de zinc heptahydraté	4 g
Sulfate de cuivre pentahydraté	1 g
Iodure de potassium	1 g
Chlorure de cobalt hexahydraté	0,4 g
Acide borique	1 g
Ammonium heptamolybdate	1 g
La solution mère d'oligo-éléments est stérilée par filtration 0,22µm et conservée à 4°C	

Tableau 7. Composition de la solution mère de vitamines

Composés	Quantité par litre
Myo-inositol	2 g
Pantothénate de calcium	0,15 g
Thiamine, hydrochloride	0,025 g
Acide nicotinique	0,2 g
Pyridoxine	0,025 g
Biotine	3 mL
La solution mère de vitamines est conservée à -20°C	

Tableau 8. Composition de la solution mère de facteurs anaérobies

Composés	Quantité par litre
Phytostérols	1,5 mg
Tween 80	50 mL
Ethanol pur	qsl 100 mL
La solution mère de facteurs anaérobies est conservée à 4°C	

Tableau 9. Composition de la solution mère de chlorure de fer

Composés	Quantité par litre
Chlorure de fer (III) hexahydraté	20 g
La solution mère de chlorure de fer est conservée à 4°C	

Tableau 10. Composition de la solution mère d'acides aminés

Composés	Quantité par litre
Acide aspartique	3,4 g
Acide glutamique	9,4 g
Alanine	11,1 g
Arginine	28,6 g
Cystéine	1 g
Glutamine	38,6 g
Glycine	1,4 g
Histidine	2,5 g
Isoleucine	2,5 g
Leucine	3,7 g
Lysine	1,3 g
Méthionine	2,4 g
Phénylalanine	2,9 g
Proline	46,8 g
Sérine	6 g
Thréonine	5,8 g
Tryptophane	13,7 g
Tyrosine	1,4 g
Valine	3,4 g
La solution mère d'acides aminés est conservée à -20°C	

Tableau 11. Liste des composés marqués en ^{13}C obtenus chez Eurisotop®

Composés	Marquage	Références
L-valine	$^{13}C5$, 97-98%	CLM-2249
L-leucine	$^{13}C6$, 97-99%	CLM-2261

3 Mise en œuvre des fermentations et suivi de la cinétique fermentaire

Les fermentations sont réalisées dans des fermenteurs à trois échelles différentes : 300 mL, 1,2 L et 10 L de volume utile. Le milieu initial est systématiquement inerté à l'argon pour obtenir l'anaérobiose. Le temps d'inertage varie en fonction de l'échelle : 20 minutes pour les fermenteurs de 300 mL, 40 minutes pour ceux de 1,2 L et 1 heure pour ceux de 10 L.
Le taux de remplissage est « normalisé » pour les différentes échelles. Ainsi, les fermenteurs de 300 mL contiennent 280 mL de milieu liquide ; ceux de 1,2 L contiennent 1,1 L ; enfin les fermenteurs de 10 L sont remplis avec 9 L de milieu.

3.1. Fermenteurs de 300 mL

Les fermenteurs sont équipés de cloches remplies d'eau pour maintenir l'anaérobiose (**Figure 18**). La fermentation se déroule à température constante (20, 24 ou 28 °C) dans des pièces maintenues à la température souhaitée et avec agitation magnétique continue (150 rpm). L'avancement de la fermentation est suivi par la libération de CO_2: la quantité de CO_2 libéré est déterminée en mesurant la perte de poids trois fois par jour.

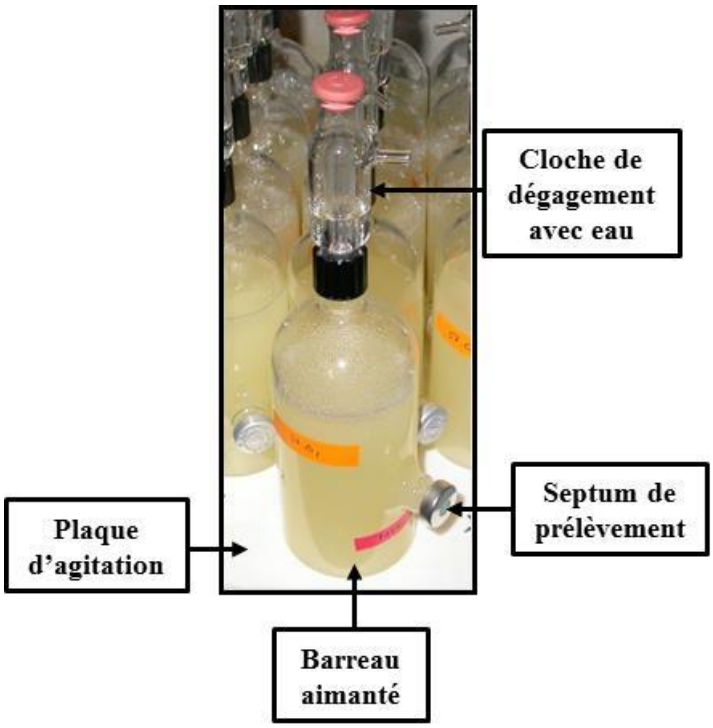


Figure 18. Photo d'un fermenteur de 300 mL

3.2. Fermenteurs de 1.2 L

Comme pour les fermenteurs décrits au paragraphe précédent, le liquide contenu dans les fermenteurs de 1,2 L est agité par un barreau aimanté (150 rpm) et l'anaérobiose est maintenue grâce à la mise en place de cloches remplies d'eau. Des opercules permettent de réaliser des prélèvements par seringue sans oxygénation du milieu (**Figure 19**).

Les fermentations se déroulent à température constante (20, 24 ou 28°C). Le maintien de la température est réalisé par l'allumage d'une lampe chauffante sous le contrôle d'une sonde thermique, la salle où a lieu la fermentation étant réfrigérée (12-18°C). Chaque fermenteur est placé sur une balance individuelle. La mesure automatique, toutes les 20 minutes, de la perte de poids du fermenteur permet de suivre le dégagement de CO_2. Cette mesure est réalisée à l'aide d'un système contrôlé par une interface IN/OUT (National Instruments) reliée à un ordinateur équipé d'un logiciel d'acquisition développé sous LabVIEW. Ce logiciel calcule entre autre la vitesse de dégagement de CO_2, le cumul de CO_2 dégagé et stocke ces informations dans une base de données consultable à partir de l'interface Alfis.

La perte de poids est corrélée de manière linéaire à la formation d'éthanol (et aux sucres métabolisés) par la formule: Ethanol (g/L) = 1,011 CO_2 (g/L) + 2.7 avec une erreur inférieure à 3% (El Haloui et al., 1988).

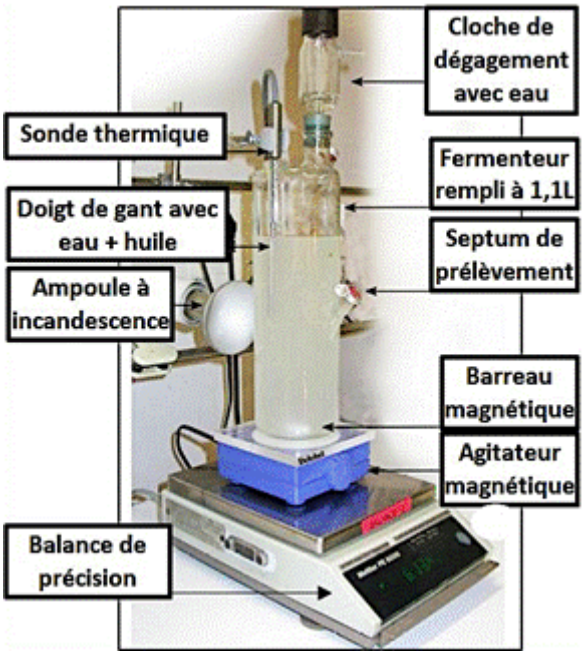


Figure 19. Photo d'un fermenteur de 1,2 L

3.3. Fermenteurs de 10 L

Les cuves de 10 L sont en acier inoxydable et possèdent une platine amovible. Cette platine possède plusieurs piquages dont un pour le prélèvement et un pour la sortie du CO_2, ainsi que deux épingles de régulation de température et un doigt de gant permettant la mesure de la température au cœur de la cuve (Aguera et al., 2005). Le piquage central est utilisé pour le prélèvement de gaz nécessaire pour le suivi en ligne des composés volatils. Ces cuves sont équipées d'un système de régulation de température précis à 0,1°C. Cette régulation est réalisée par circulation d'eau dans deux épingles (longueur de chaque épingle = 95 cm, diamètre = 12 mm). Elle est effectuée par ouverture ou fermeture d'électrovannes placées respectivement sur un circuit d'eau chaude (température : 40°C) alimenté par une chaudière et un circuit relié à un groupe froid (température de l'eau entre 10 et 15°C suivant les régimes de température souhaités) (**Figure 20**).
Le suivi de la fermentation est réalisé grâce à une mesure automatique du dégagement de CO_2 en continu à l'aide d'un débitmètre massique (Brooks TR). Ce suivi en ligne permet de calculer avec une grande précision la vitesse de production de CO_2 (dCO_2/dt). L'intégration de la vitesse de production de CO_2 permet de calculer la quantité de CO_2 dégagé et, par conséquent, d'estimer la teneur résiduelle en sucre et la concentration en alcool.

Le système de contrôle des fermentations a été développé par l'INRA. Il est piloté par un logiciel écrit en langage Labview. Ce logiciel permet : (i) le suivi des fermentations : le débit de dégagement de CO_2 est mesuré chaque 20 secondes (fréquence réglable). Sa valeur est moyennée pendant la durée comprise entre deux stockages (généralement 20 minutes). La température est mesurée par une sonde PT100 avec une fréquence d'acquisition de 5 secondes, (ii) le stockage des paramètres : temps, vitesse instantanée de dégagement de CO_2 (g/L.h), CO_2 dégagé cumulé (g/L), température consigne (°C), température mesurée (°C) et durée d'ouverture des électrovannes chaud et froid.

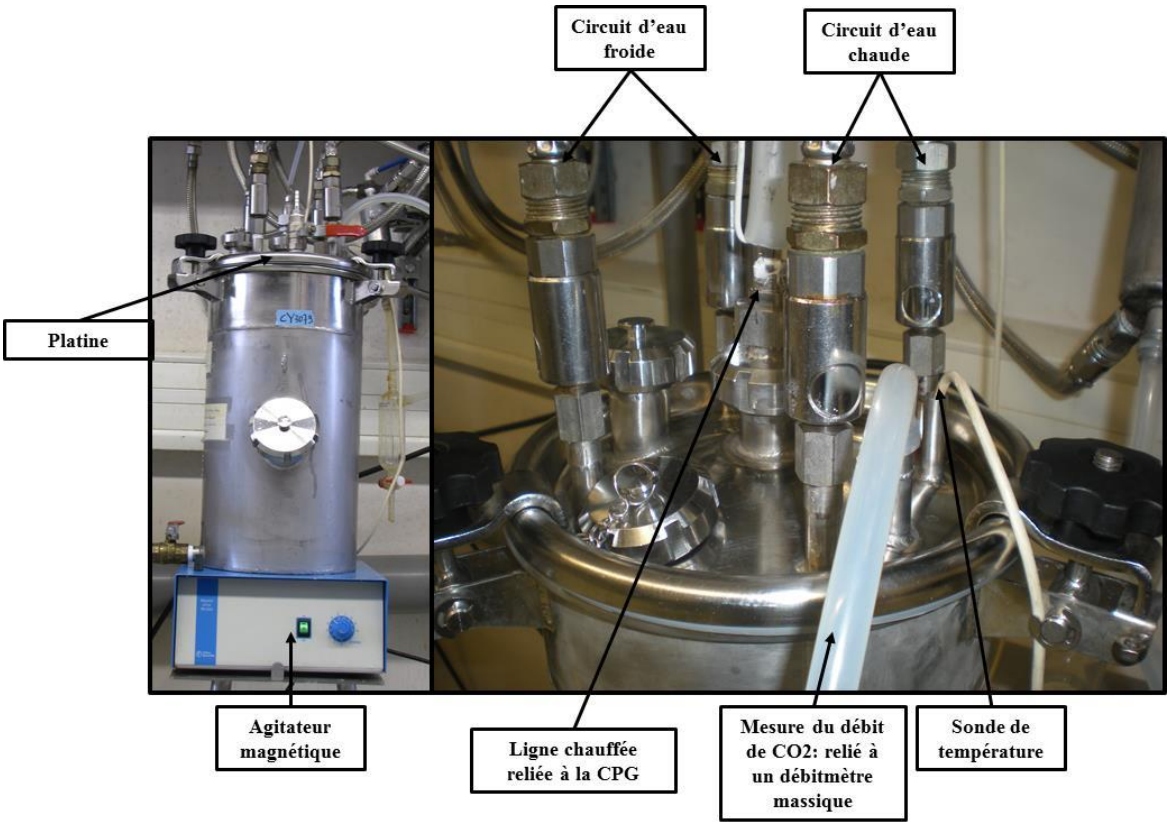


Figure 20. Photo d'un fermenteur de 10 L (à gauche), avec un détail de la platine (à droite)

4 Méthodes de dosage

4.1. Détermination de la biomasse

4.1.1. Population cellulaire

Le nombre et la taille des cellules sont évalués à l'aide d'un compteur électronique de particules (Counter ZB-2, Beckman Coulter). Le principe de fonctionnement de l'appareil repose sur les changements de résistance électrique provoqués par le passage de particules non-conductrices en suspension dans un électrolyte (Isoton, Beckman Coulter). La zone de détection est composée d'un orifice de 100 µm, placé entre deux électrodes, par lequel passent les particules. Le volume d'électrolyte déplacé par chaque particule est mesuré sous forme d'une impulsion de tension, la hauteur de cette impulsion étant proportionnelle au volume de la particule. Les échantillons sont préalablement dilués de façon à rester dans la gamme linéaire se situant entre 20 000 et 80 000 cellules/mL. Les agrégats de cellules sont ensuite détruits par sonication grâce à un générateur d'ultra-sons (Branson Sonifier, modèle 250).

Cette mesure nous permet d'obtenir un nombre de cellules par mL et de connaître le volume moyen des levures (μm^3).

4.1.2. Matière sèche

Le poids sec est déterminé en filtrant 10 mL (V) de culture sur une membrane de nitrocellulose de porosité 0,45 µm (Millipore, France) de poids sec connu (P1). La membrane est ensuite rincée 2 fois avec 10 mL d'eau distillée. Puis les membranes sont mises à sécher sur une coupelle de poids connu (P2) dans un four à 110°C de façon à évaporer toute l'eau contenue dans la biomasse. Après 48 heures, la coupelle avec la matière sèche est pesée (P3). Le poids sec de la culture est ensuite calculé par la différence de poids en fonction du volume de culture cellulaire selon la formule :

Poids sec ($g.L^{-1}$) = (P3(g) - (P2(g) + P1(g)) / V(L).

4.2. Dosage des métabolites carbonés extra-cellulaires

Le dosage des composés extra-cellulaires (acide succinique, acide acétique, glycérol, acide pyruvique, éthanol, glucose et fructose) impliqués dans le métabolisme carboné central est réalisé par chromatographie liquide haute performance (HPLC). Le milieu de culture prélevé est centrifugé 5 minutes à 2500 rpm. Le surnageant est dilué au $1/6^{ème}$ dans la phase mobile, une solution d'acide sulfurique à 0,005N dégazée. L'appareillage mis en œuvre est composé d'un chromatographe muni d'une pompe (HPLC 1290 Infinity, Agilent Technologies, Santa Clara, California) délivrant un débit constant de 0,6 mL/min, d'un injecteur automatique (volume d'injection 25 µL), d'une pré-colonne et d'une colonne de séparation échangeuse d'anions (Phenomenex Rezex ROA) thermostatées à 60°C. La détection des composés est réalisée d'une part à l'aide d'un réfractomètre et d'autre part avec un spectromètre UV mesurant l'absorbance à 210 nm. Les chromatogrammes sont traités par le logiciel Agilent EZChrom.

4.3. Dosage de l'azote

Les ions ammoniums sont dosés avec un kit enzymatique et les acides aminés libres par chromatographie.

4.3.1. Dosage de l'ammonium

L'ammonium contenu dans le surnageant de culture est dosé par réaction enzymatique à l'aide du kit ENZYTEC™ *fluid* Ammoniaque (DiaSys Diagnostic Systems GmbH, 5390). Cette méthode est basée sur la synthèse du glutamate à partir de l'ammonium et du 2-oxoglutarate par la glutamate déshydrogénase :

2-oxoglutarate + NH_4+ + NADH → L-glutamate + NAD+ + H_2O.

Le NADH étant dosable par spectrophotométrie à 340 nm, la quantité d'azote présente est calculée à partir de la perte d'absorbance entre le mélange initial et après l'ajout du 2-oxoglutarate et la réaction enzymatique totale de 20 à 30 minutes à température ambiante. Le test a été développé pour déterminer la concentration en ammoniaque entre 10 et 70 mg/L à 340 nm. En fonction du moment de prélèvement, les échantillons sont donc dilués au ½ ou plus afin de rester dans la gamme de concentration exploitée par le kit.

4.3.2. Dosage des acides aminés

Dans un premier temps, les surnageants de culture sont débarrassés des macromolécules par précipitation des protéines à l'acide sulfo-salicilique (SSA). Pour cela, 4 volumes d'échantillons sont mélangés à 1 volume de SSA 25% (p/v) contenant un étalon interne, la norleucine à 2500 nmol/mL. Après une incubation d'une heure à 4°C, les échantillons sont centrifugés pendant 10 minutes à 4°C et filtrés à 0,22 µm. Les échantillons ainsi préparés peuvent être directement analysés ou conservés 2 à 3 mois à –20°C.

Ces échantillons sont alors utilisés pour le dosage des acides aminés libres par chromatographie liquide sur colonne échangeuse de cations. Le dosage s'effectue sur Biochrom 30 type HPLC (Serlabo, France). Les acides aminés en milieu acide sont fixés sur une colonne échangeuse de cations (résine anionique Ultrapac-8 Lithium-form, Serlabo, France). Leur séparation est réalisée à l'aide d'un gradient de température (de 32°C à 75°C), de pH (de pH 2,8 à pH 3,55) et de concentration en contre ions (citrate de lithium de 200 mM à 1650 mM) grâce à l'utilisation successive de plusieurs tampons (**Tableau 12**, Serlabo, France). La colonne est ensuite régénérée à 75°C avec un tampon d'hydroxyde de lithium à

300 mM. La détection des acides aminés est réalisée par spectrométrie ultraviolet-visible grâce à la dérivation, en sortie de colonne, des acides aminés avec de la ninhydrine qui forme un composé pourpre qui absorbe à 570 nm et dont la quantité formée est proportionnelle à la concentration en acide aminé. La proline et l'hydroxiproline qui ne possèdent pas une fonction amine mais une fonction imine forment un composé jaune détectable à 440 nm. Les spectres obtenus sont analysés avec le logiciel Biochrom 30 (**Figure 21**).

Tableau 12. Liste des tampons utilisés pour l'analyse des acides aminés au Biochrom 30

Tampon	Ion	Molarité	pH
Charge	Citrate de lithium	200 mM	2,2
A	Citrate de lithium	200 mM	2,8
B	Citrate de lithium	300 mM	3
C	Citrate de lithium	500 mM	3,15
D	Citrate de lithium	900 mM	3,5
E	Citrate de lithium	1650 mM	3,55
F	Hydroxyde de lithium	300 mM	

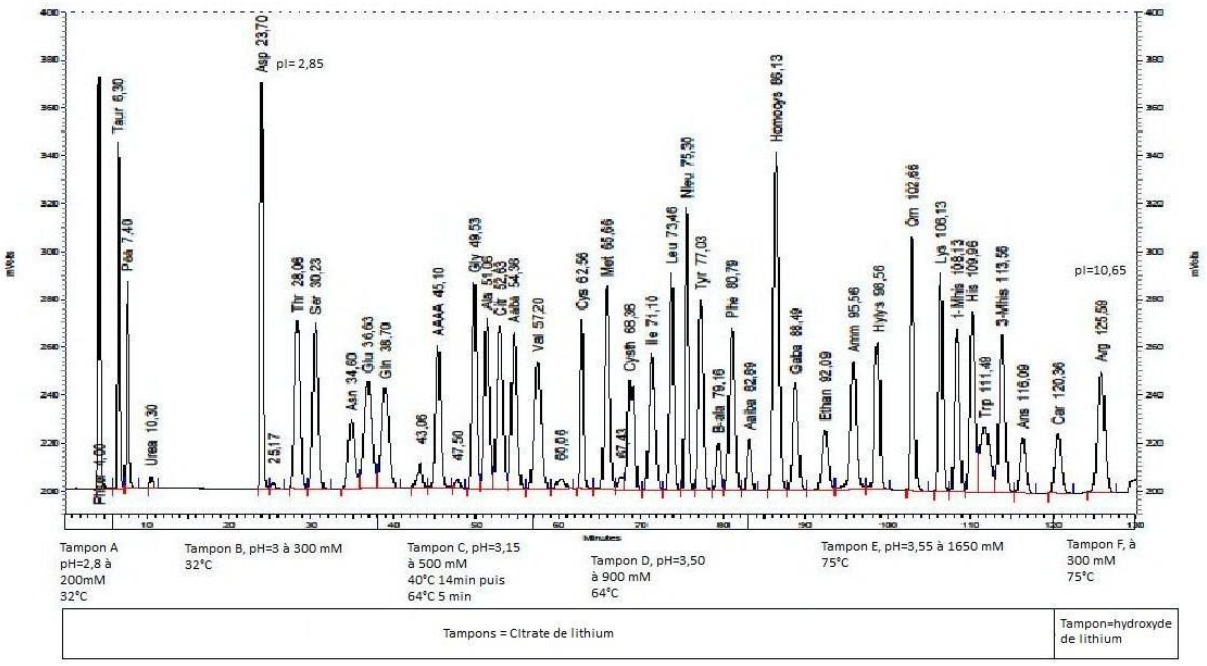


Figure 21. Chromatogramme d'un standard physiologique au Biochrom 30 à 570 nm

Pour la quantification, un standard physiologique est utilisé. Ce standard contient un volume d'acides aminés acides et neutres (A6407, Sigma-Aldrich, France) un volume d'acides aminés basiques (A1585, Sigma-Aldrich, France), un volume de glutamine à 2500 nmol/mL et deux volumes de tampon de charge. Le standard est ensuite traité comme décrit ci-dessus.

4.4. Suivi des composés volatils

4.4.1. Dosage hors-ligne des composés volatils dans la phase liquide

Préparation des échantillons pour l'analyse des composés volatils

10 µL d'une solution d'étalons deutérés (contenant le butanoate d'éthyle-*d5*, l'hexanoate d'éthyle-*d5*, l'octanoate d'éthyle-*d5*, l'acide butyrique-*d7*, le décanoate d'éthyle-*d5*, le phényléthanol-*d4*) à 100 pg/mL chacun sont ajoutés à 5 mL d'échantillon dans un tube en pyrex de 15 mL avec un bouchon en téflon (Supelco, Bellefonte, Pennsylvanie, États-Unis). Puis l'échantillon est extrait 2 fois avec 1 mL de dichlorométhane pendant 20 minutes sous agitation douce sur une table agitante. Ensuite les échantillons sont centrifugés pendant 5 minutes à 3000 rpm à 4°C. Puis, la phase organique est récupérée dans un vial de 4 ml et séchée avec du Na_2SO_4 anhydre pour éliminer toute trace d'eau. 1,5 mL de la phase organique sont transférés dans un vial et concentrés sous flux d'azote jusqu'à un volume final de 0,5 mL. L'échantillon est ensuite transféré dans un insert (Supelco, Bellefonte, Pennsylvanie, Etats-Unis), placé dans un vial qui est ensuite bouché.

Chromatographie en phase gazeuse / spectrométrie de masse

Les échantillons sont analysés avec un chromatographe en phase gazeuse Hewlett Packard 6890 (Agilent Technologies, Santa Clara, Californie, USA) équipé d'un passeur CTC Combi PAL AOC-5000 (Shimadzu, Columbia, Etats-Unis) et couplé à un détecteur de spectrométrie de masse HP 5973 (Agilent Technologies, Santa Clara, Californie, USA). L'instrument est contrôlé et les données sont analysées avec le logiciel HP G1701DA ChemStation (Agilent Technologies, Santa Clara, Californie, USA). Le chromatographe en phase gazeuse est équipé d'une colonne capillaire en silice fondue ZB-WAX (30 m * 0,25 mm * 0.5 µm, Phenomenex). L'hélium est utilisé comme gaz vecteur avec une vitesse linéaire de 36 cm/s et un débit de 1,0 mL/min en mode débit constant. La programmation de la température est la suivante : 40°C isotherme pendant 3 minutes, suivi d'une augmentation de 40°C à 220°C à 4°C/min puis le

four est maintenu à 220°C pendant 20 minutes. L'injecteur et la ligne de transfert sont chauffés à 250°C. Le volume d'injection est de 2 µL. L'échantillon est injecté en mode splitless, avec une division de 10 mL/min et un temps de splitless de 30 secondes. La température du spectromètre de masse est fixée à 150°C, celle de la source à 230°C, et la ligne de transfert est maintenue à 250°C. Pour la quantification, les spectres de masse ont été enregistrés en mode SIM (Selected Ion Monitoring) avec impact électronique d'ions positifs à 70 eV. Les ions sont présentés dans le tableau 13. L'ion en gras pour chaque composé a été utilisé pour la quantification, car il possède le meilleur rapport signal sur bruit et le moins d'interférence avec d'autres composants du vin. Les autres ions ont été utilisés comme ions qualificatifs.

Les courbes de calibration obtenues sont linéaires dans la gamme de concentration utilisée. La gamme de calibration est préparée le même jour que les échantillons avec le même mélange d'étalons deutérés. Les solutions mères à 10 g/L de chaque composé ont été préparées dans 100% d'éthanol. Une solution standard a été préparée pour chaque groupe (esters éthyliques, acétates, alcools et acides) à partir des solutions mères. Puis les solutions standards sont diluées dans une solution modèle (12% éthanol, 6 g/L d'acide malique, pH 3,3). La stabilité des solutions est régulièrement contrôlée par chromatographie en phase gazeuse à détection d'émission atomique.

Tableau 13 : Paramètres pour la détermination des arômes fermentaires du vin par SIM

Composés	Temps de rétention (min)	Ions qualificateurs m/z	Etalons internes	Seuil (mg/L)
Acétate d'éthyle	2,85	**61**, 70, 88	Butanoate d'éthyle-*d5*	7,5 [1]
Propanoate d'éthyle	3,63	73, 75, **102**	Butanoate d'éthyle-*d5*	1,84 [1]
Isobutyrate d'éthyle	3,77	71, 88, **116**	Butanoate d'éthyle-*d5*	0,015 [1]
Acétate de propyle	3,92	43, **61**, 73	Butanoate d'éthyle-*d5*	
Acétate d'isobutyle	4,64	**56**, 73	Butanoate d'éthyle-*d5*	1,6 [1]
Butanoate d'éthyle	5,15	71, **88**, 101	Butanoate d'éthyle-*d5*	0,02 [1]
Propanol	5,2	31, 42, **59**	Butanoate d'éthyle-*d5*	
2-méthylbutanoate d'éthyle	5,52	85, **102**, 115	Butanoate d'éthyle-*d5*	0,001 [1]
Isovalérate d'éthyle	5,95	85, **88**, 115	Butanoate d'éthyle-*d5*	0,003 [1]
Isobutanol	6,52	**43**, 74	Butanoate d'éthyle-*d5*	40 [1]
Acétate d'amyle	7,42	57, **72**, 74	Butanoate d'éthyle-*d5*	0,16 [1]
Acétate d'isoamyle	7,45	55, **70**, 87	Butanoate d'éthyle-*d5*	0,03 [1]
Valérate d'éthyle	7,82	**85**, 88, 101	Butanoate d'éthyle-*d5*	
Alcool isoamylique	10,08	**55**, 57, 70	Hexanoate d'éthyle-*d5*	30 [1]
Hexanol	10,59	**45**, 69, 87	Hexanoate d'éthyle-*d5*	4 [1]
Hexanoate d'éthyle	10,96	88, 99, **115**	Hexanoate d'éthyle-*d5*	0,005 [1]
Alcool amylique	11,48	**55**, 57, 70	Hexanoate d'éthyle-*d5*	65 [1]
Acétate d'hexyle	12,25	56, 69, **84**	Hexanoate d'éthyle-*d5*	0,67 [1]
Lactate d'éthyle	14,5	45, **75**	Octanoate d'éthyle-*d5*	14 [1]
Octanoate d'éthyle	17,53	88, **101**	Octanoate d'éthyle-*d5*	0,002 [1]
Acide propanoïque	20,66	57, 73, **74**	Octanoate d'éthyle-*d5*	8,1 [1]
Acide isobutyrique	21,53	43, **73**, 88	Acide butyrique-*d7*	200 [1]
Acide butanoïque	23,3	**60**, 73, 45	Acide butyrique-*d7*	0,22 [1]
Decanoate d'éthyle	23,72	**88**, 101	Decanoate d'éthyle-*d5*	0,2 [1]
Acide isovalérique	24,49	**157**	Acide butyrique-*d7*	3 [1]
Acide 2-méthylbutanoïque	24,51	**60**, 61, 87	Acide butyrique-*d7*	3 [1]
Succinate de diéthyle	24,79	73, **74**, 87	Decanoate d'éthyle-*d5*	
3-méthylthiopropanol	25,76	**101**, 129	Decanoate d'éthyle-*d5*	1 [2]
Acide pentanoïque	26,4	61, 73, **106**	Acide butyrique-*d7*	
Acétate de 2-phényléthyle	28,47	60, **73**	Decanoate d'éthyle-*d5*	0,25 [1]
Acide hexanoïque	29,3	91, **104**	Acide butyrique-*d7*	8 [1]
Dodecanoate d'éthyle	29,4	**60**, 73, 87	Decanoate d'éthyle-*d5*	
2-phényléthanol	30,9	**88**, 101	Phényléthanol-*d4*	10 [1]
Acide octanoïque	34,3	**91**, 92, 122	Acide butyrique-*d7*	8,8 [1]
Acide decanoïque	36,84	**60**, 73, 101	Acide butyrique-*d7*	6 [1]
Acide dodecanoïque	38,89	**60**, 73, 129	Acide butyrique-*d7*	

[1] (Siebert et al., 2005)
[2] (Ferreira et al., 2000)
En gras : ions cibles sur lesquels l'intégration est réalisée

4.4.2. Dosage en ligne des composés volatils dans la phase gazeuse

Le suivi des composés volatils au cours de la fermentation se fait par un système de chromatographie en phase gazeuse (CPG) en ligne. L'ensemble du dispositif expérimental permettant ce suivi en ligne est présenté en figure 22.

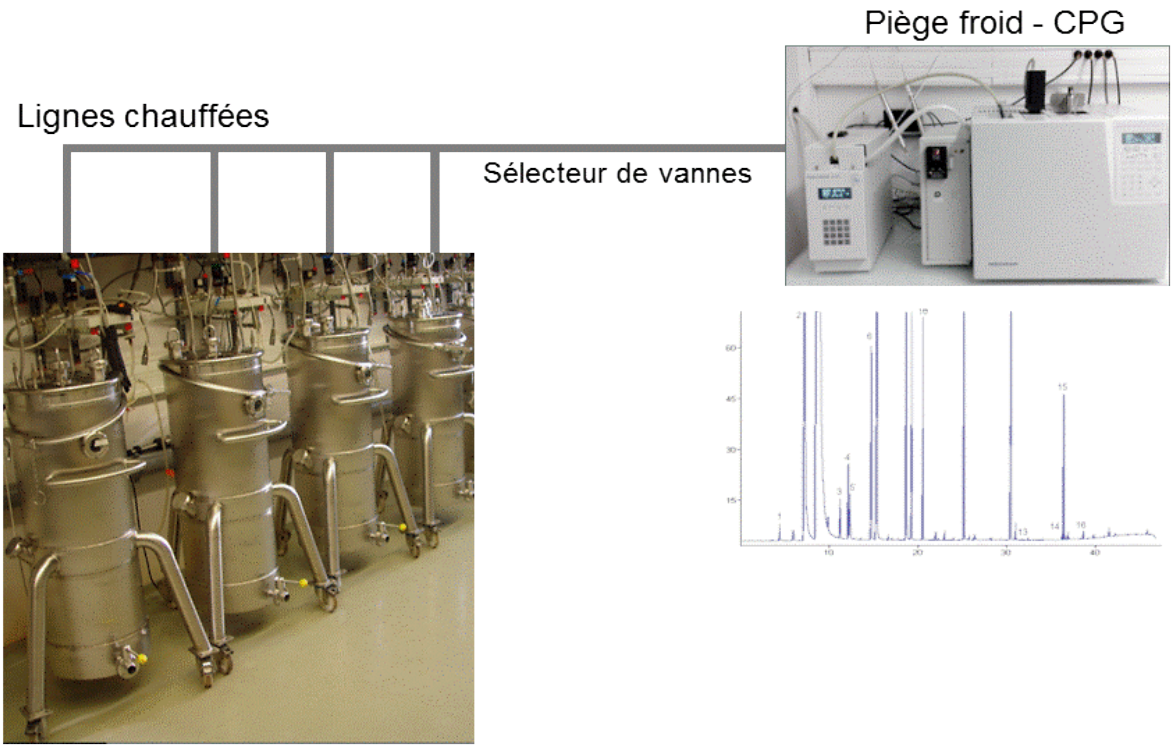


Figure 22. Système de CPG en ligne utilisé pour la mesure des composés volatils dans les gaz de sortie de fermentation

Le gaz présent dans l'espace de tête de la cuve de fermentation est pompé à un débit de 14 mL/min à travers une ligne chauffée pour éviter la condensation, concentré sur un piège froid (Tenax TM) pendant 6 minutes puis désorbé à 160°C pendant 1 minute. Le gaz est ensuite analysé à l'aide d'un chromatographe Perichrom PR2100 équipé d'une colonne ZBWax (60 m * 0.32 mm * 0.5 µm, Phenomenex, Le Pecq, France). La température de l'injecteur est fixée à 200°C. L'hélium est utilisé comme gaz vecteur à une pression constante de 120 kPa. Le programme de température du four est le suivant : palier à 38°C pendant 3 minutes, rampe à 3°C/min jusqu'à 65°C, rampe à 6°C/min jusqu'à 160°C, palier à 160°C pendant 5 minutes, rampe à 8°C/min jusqu'à 230°C et palier à 230°C pendant 5 minutes. Le détecteur utilisé est un détecteur à ionisation de flamme (FID) dont la température est fixée à 260°C.

Les aires des pics sont acquises avec le logiciel WinilabIII (Alpha MOS, Toulouse, France). Chaque analyse dure 1 h et il est possible de suivre quatre fermenteurs simultanément en utilisant un sélecteur de vannes.

Le système de CPG en ligne a été calibré à l'aide d'un système ATIS (Adsorbent Tube Injector System; Supelco, Bellefonte, PA, USA). Cet équipement génère des gaz étalons; il permet de vaporiser un échantillon liquide de référence dans un flux continu de gaz inerte. Le standard d'étalonnage (contenant des concentrations connues de propanol, isobutanol, alcool isoamylique, acétate d'isobutyle, acétate d'isoamyle, hexanoate d'éthyle et d'octanoate d'éthyle) est injecté avec une seringue à travers un septum remplaçable au centre de l'ampoule d'injection, qui est balayée en continu par un flux d'air chaud à 30 mL/min. La calibration de l'acétate d'éthyle se fait grâce au système Sonimix 6000C1 (LNI Schmidlin SA). Ce système génère un gaz standard par dilution à partir d'une bouteille de gaz étalon (Air Product, Allentown, PA, USA).

4.4.3. Bilans gaz-liquide des composés volatils durant la fermentation

Grâce au système de suivi en ligne des composés d'arômes en phase gaz, nous pouvons calculer, pour chaque arôme fermentaire, (i) la concentration en phase liquide, (ii) les pertes dans le gaz effluent et (iii) la production totale, qui est la somme des deux paramètres précédents. La production totale est un paramètre d'intérêt métabolique car elle correspond à la quantité d'arôme effectivement produite par la levure indépendamment de son devenir : accumulation dans le liquide ou perte par évaporation.

Concentration dans la phase liquide

La concentration d'un composé volatil dans le liquide ($C^{liq}(t)$) a été calculée en divisant la concentration mesurée en phase gazeuse, exprimée sous la forme $C^{gas}(t)$ en milligrammes par litre de CO_2, par la valeur du coefficient de partage k_i au moment de la mesure (Equation 1).

$$C^{liq}(t) = \frac{C^{gas}(t)}{k_i} \qquad (Equation\ 1)$$

La valeur de k_i (Equation 2) a été calculée grâce au modèle développé par Morakul et al., (2011). Cette valeur dépend de la composition du moût, caractérisé par la concentration en éthanol, et de la température.

$$lnk_i = F1 + F2 * E - \frac{F3 + F4 * E}{R}\left(\frac{1,000}{T} - \frac{1,000}{T_{ref}}\right) \quad (Equation\ 2)$$

où *E* est la concentration en éthanol (en grammes par litre) dans la phase liquide calculée à partir de la mesure du CO_2 libéré, qui est proportionnelle à la consommation de sucre; *T* est la température absolue; *Tref* correspond à la température de référence absolue de l'étude; et F1, F2, F3, et F4 sont des constantes, identifiées pour chaque composé volatil.

Pertes dans le gaz

Les pertes dans le gaz sont calculées grâce à l'équation 3.

$$L(t) = \int_0^t C^{gas}(t) * Q(t) * dt \qquad (Equation\ 3)$$

où *Q(t)* est la vitesse de dégagement du CO_2 à l'instant *t*, exprimée en litres de CO_2 par litre de moût et par heure. Les pertes relatives (*RL*), exprimées en pourcentage de la production (*P (t)*), sont déterminées de la manière suivante (Equation 4):

$$RL = \frac{L(t)}{P(t)} = \frac{\int_0^{t_{end}} C^{gas}(t) * Q(t) * dt}{C^{liq}(t_{end}) + \int_0^{t_{end}} C^{gas}(t) * Q(t) * dt} \qquad (Equation\ 4)$$

où t_{end} est le temps final de fermentation en heures.

Production totale

La production d'un composé volatil au temps *t*, exprimé sous la forme *P(t)* en milligrammes par litre de moût, est calculée en ajoutant la concentration du volatil dans la phase liquide, $C^{liq}(t)$, et la quantité du composé volatil perdue dans la phase gazeuse, *L(t)* (Equation 5).

$$P(t) = C^{liq}(t) + L(t) \qquad (Equation\ 5)$$

5 Filiation isotopique

Pour suivre la redistribution de la source azotée, nous avons utilisé des sources marquées ^{13}C. La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) a été utilisée pour déterminer la distribution isotopique dans les acides aminés protéinogéniques ainsi que dans les composés d'arôme.

5.1. Quantification isotopique des acides aminés protéinogéniques

Une étape de dérivatisation des acides aminés est nécessaire avant leur analyse par GC-MS, pour les rendre volatils. Aucune méthode de dérivatisation ne permet d'obtenir tous les acides aminés en GC-MS ; nous avons donc utilisé deux méthodes différentes : DMF/DMA et ECF. La liste des acides aminés détectés en fonction de la dérivatisation et la taille (masse sur charge m/z) des ions attendus est présentée dans le tableau 14.

Avant la dérivatisation, les acides aminés protéinogéniques sont extraits de la biomasse par hydrolyse acide. Au cours de cette étape, le culot cellulaire est repris dans 600 µL d'eau et 600 µL d'HCl 12N (37%) dans des tubes pyrex avec bouchon hermétique puis il est hydrolysé à 105°C pendant 16 à 24 h.
Après hydrolyse, un volume de 800 µL d'eau distillée est ajouté. Ensuite, l'ensemble est centrifugé à 3000 rpm pendant 10 min à 4°C puis séparé en quatre fractions de 400 µL dans des tubes pyrex. L'HCl est évaporé à 105°C et les quatre hydrolysats sont utilisés pour la dérivatisation des acides aminés.

5.1.1. Dérivatisation à l'éthylchloroformate (ECF)

L'échantillon de biomasse hydrolysée et séchée est re-suspendu dans 200 µL HCl 20 mM et 133 µL Pyridine/Ethanol (1/4). La dérivatisation est réalisée en ajoutant 50 µL de réactif ECF. Les dérivés sont ensuite extraits par 500 µL de dichlorométhane. La phase organique est récupérée après 4 min de centrifugation à 10000 rpm, puis séchée à l'aide de sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4). Après centrifugation, le surnageant peut être injecté en GC-MS.

Tableau 14. Liste des acides aminés et leur cluster d'ion correspondant pour l'analyse GC-MS par dérivatisation DMF/DMA (en haut) et ECF (en bas)

DMF/DMA																
Acide aminé	Formule complète	Composé	Formule d'ion	Cluster d'ion										Temps de rétention (min)	Dérivatisation	Formule	Masse
Alanine	C3H7O2N	Ala99	C2H4N	99	100	101	102							6,37	DMF	C3NH7	57
		Ala158	C3O2NH4	158	159	160	161								DMFb	C4NH10	72
Glycine	C2O2NH5	Gly85	CNH2	85	86	87								6,61	DMF	C3NH7	57
		Gly144	C2H2O2N	144	145	146									DMFb	C4NH10	72
Valine	C5NO2H11	Val127	C4NH8	127	128	129	130	131	132						DMF	C3NH7	57
		Val143	C2O2HN	143	144	145	146	147	148					7,37	DMFb	C4NH10	72
		Val186	C5NH8O2	186	187	188	189	190	191						DMFb	C4NH10	72
Aspartate	C4O4NH7	Asp115	CHNO	115	116	117	118	119						11,77	DMFb	C4NH10	72
		Asp216	C4O4NH3	216	217	218	219	220							DMFc	C5NH13	72
Glutamate	C5O4NH9	Glu111	C3H4N	111	112	113	114	115	116						DMF	C3NH7	57
		Glu143	C2O2NH	143	144	145	146	147	148					12,75	DMFb	C4NH10	72
		Glu230	C5O4NH5	230	231	232	233	234	235						DMFc	C5NH13	87
Phenylalanine	C9O2NH11	Phe143	C2O2NH	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	13,67	DMFb	C4NH10	72

ECF																
Acide aminé	Formule complète	Composé	Formule d'ion	Cluster d'ion										Temps de rétention (min)	Dérivatisation	Formule	Masse
Alanine	C3H7O2N	Ala116	C2H5N	116	117	118	119							3,86	ECF	C3O2H5	73
Glycine	C2O2NH5	Gly102	CNH3	102	103	104								4,19	ECF	C3O2H5	73
		Gly175	C2O2NH3	175	176	177									ECFb	C5O2H10	102
Valine	C5NO2H11	Val144	C4H9N	144	145	146	147	148	149					4,97	ECF	C3O2H5	73
Leucine	C6H13O2N	Leu158	C5NH11	158	159	160	161	162	163	164				5,67	ECF	C3O2H5	73
Isoleucine	C6H13O2N	Ile158	C5NH11	158	159	160	161	162	163	164				5,85	ECF	C3O2H5	73
Thréonine	C4H9NO3	Thr146	C3NH7O	146	147	148	149	150						6,48	ECF	C3O2H5	73
		Thr175	C2O2NH3	175	176	177	178	179							ECFb	C5O2H10	102
Serine	C3H7NO3	Ser132	C2H5ON	132	133	134	135							6,53	ECF	C3O2H5	73
		Ser175	C2O2H2N	175	176	177	178								ECFb	C5O2H10	102
Proline	C5H9NO2	Pro142	C4NH7	142	143	144	145	146	147					6,83	ECF	C3O2H5	73
Aspartate	C4O4NH7	Asp188	C3O2NH4	188	189	190	191	192						7,89	ECFb	C5O2H10	102
Glutamate	C5O4NH9	Glu202	C4H6NO2	202	203	204	205	206	207					8,81	ECFb	C5O2H10	102
Phenylalanine	C9O2NH11	Phe192	C8H9N	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	9,53	ECF	C3O2H5	73
Lysine	C6H14N2O2	Lys156	C5H12N2	156	157	158	159	160	161	162				11,95	ECFc	C2O2	56
Histidine	C6H9N3O2	His327	C5H6N3	327	328	329	330	331	332	333				12,54	ECFd	C9O6H15	219

5.1.2. Dérivatisation au N,N-Dimethylformamide dimethyl acetal (DMF/DMA)

L'échantillon de biomasse hydrolysée et séchée, est resuspendu dans 50 µL de méthanol et 100 µL d'acétonitrile. La dérivatisation est réalisée en ajoutant 300 µL de réactif DMF/DMA. Afin de sécher l'échantillon, un ajout de Na_2SO_4 est réalisé. Après centrifugation, le surnageant peut être injecté en GC-MS.

5.1.3. Analyses en GC-MS

Pour l'ensemble des échantillons, l'appareil de GC-MS utilisé est un chromatographe en phase gazeuse (G1530A, Hewlett- Packard) couplé à un spectromètre de masse quadripôle avec détecteur sélectif de masse (5973 mass selective detector, Hewlett-Packard) fonctionnant en mode d'ionisation EI (Electron Impact) à 70 eV.

Un volume de 2 µL est injecté dans la colonne via un injecteur à une température de 230°C. L'injecteur fonctionne en mode diviseur (« Split ») avec un ratio de 3:1.

La colonne utilisée est de type DB-17MS (30 m * 0.25 mm * 0.15 µm) fournie par Agilent Technologies. Dans la colonne, le débit du gaz vecteur (hélium) est constant : 1,2 mL/min pour les dérivatisation ECF et 1 mL/min pour la dérivatisation DMF/DMA.

Les échantillons sont séparés grâce à un gradient de température dont les paramètres dépendent du type de dérivatisation.

Pour les dérivatisations ECF, le four est à une température initiale de 130°C pendant 3 minutes. Ensuite, la température augmente de 15°C/min jusqu' à une température de 260°C maintenue pendant 20 minutes.

Pour les dérivatisations DMF/DMA, le four est à une température initiale de 60°C pendant 1 minute. La température augmente de 20°C/min jusqu'à une température de 130°C. Ensuite la température augmente de 4°C/min jusqu'à 150°C. Enfin la température augmente de 20°C/min jusqu'à 260°C et cette température est maintenue pendant 10 minutes.

Le spectromètre de masse fonctionne en mode SIM (Selected Ion Monitoring) afin de sélectionner uniquement les ions d'intérêt.

Les chromatogrammes obtenus sont analysés avec le logiciel MSD Chemstation.

Le taux d'enrichissement de chaque acide aminé est calculé par le rapport des aires de l'ion avec une masse M+1 et de l'ion avec une masse M (non enrichi) via le logiciel Isocor qui prend en compte le taux d'enrichissement naturel de l'azote (Millard et al., 2012).

5.2. Quantification isotopique des composés d'arôme

Les échantillons sont préparés selon le protocole décrit dans le paragraphe 4.4.1. La méthode d'analyse en GC-MS est aussi la même que celle décrite dans ce paragraphe.

Le choix des composés volatils analysés est réalisé en tenant compte de leur acide aminé précurseur ainsi que de leur éventuelle interaction dans la voie de dégradation de ces derniers. Les clusters d'ions quantitatifs et qualitatifs pour chaque composé volatil étudié ont été choisis en tenant compte de toutes les fragmentations possibles, en minimisant au maximum la présence de l'abondance naturelle de carbone 13, tout en évitant les mélanges contenant différents ions marqués. La liste des composés d'arôme détectés et la taille (masse sur charge m/z) des ions attendus est présentée dans le tableau 15.

Les chromatogrammes obtenus sont analysés avec le logiciel MSD Chemstation.

Le taux d'enrichissement de chaque composé d'arôme est calculé par le rapport des aires de l'ion avec une masse M+1 et de l'ion avec une masse M (non enrichi) via le logiciel Isocor qui prend en compte le taux d'enrichissement naturel de l'azote (Millard et al., 2012).

Tableau 15. Liste des composés volatils d'intérêt et leur cluster d'ion correspondant pour l'analyse GC-MS

Composé volatiles	Formule complete	Ion	Formule d'ion	Cluster d'ion									Temps de rétention (min)
Isobutanoate d'éthyle	C6H12O2	Isobutanoate d'éthyle 116	C6H12O2	116	117	118	119	120	121				3,95
Acétate d'isobutyle	C6H12O2	Isobutyle Acetate 56	C4H8	56	57	58	59	60					4,83
Propanol	C3H8O	Propanol 42	C3H6	42	43	44	45						5,48
		Propanol 60	C3H8O	60	61	62	63						
Isovalerate d'éthyle	C7H14O2	Isovalerate d'éthyle 88	C4H8O2	88	89	90	91	92	93				6,2
Isobutanol	C4H10O	Isobutanol 43	C3H7	43	44	45	46	47					6,86
		Isobutanol 74	C4H10O	74	75	76	77	78					
Acétate d'isoamyle	C7H14O2	Isoamyle Acetate 70	C5H10	70	71	72	73	74	75				7,69
Alcool isoamylique	C5H12O	Isoamyle Alcool 70	C5H10	70	71	72	73	74	75				10,52
		Isoamyle Alcool 55	C4H7	55	56	57	58	59					
Acide isobutyrique	C4H8O2	Acide isobutyrique 73	C3H5O2	73	74	75	76	77	78				21,95
Acide isovalérique	C5H10O2	Acide isovalérique 60	C2H4O2	60	61	62	63	64	65				24,93
Acétate de phényléthyle	C10H12O2	Acétate de phényléthyle 91	C7H7	91	92	93	94	95	96	97	98		28,6
Phényléthanol	C8H10O	Phényléthanol 65	C5H5	65	66	67	68	69	70	71	72	73	31,16
		Phényléthanol 122	C8H10O	122	123	124	125	126	127	128	129	130	

6 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 8x15 en mono-couleur. Ces puces sont constituées de plaques de verre sur lesquelles sont fixés des brins monocaténaires d'ADN complémentaires d'un ARNm.
Les ARNm sont extraits à partir de 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.

6.1. 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 3000 rpm. Le culot cellulaire est rapidement lavé dans 750 µL d'eau DEPC (eau traitée une nuit au diéthylpyrocarbonate puis stérilisée 15 min à 120°C) refroidie dans la glace. Après centrifugation à froid (4°C) 15 secondes à 13000 rpm, le surnageant est éliminé et les cellules sont congelées rapidement dans un bain de méthanol à -80°C.

6.2. Extraction et purification des ARN totaux

Les cellules sont broyées 15 min au vortex à 4°C en présence de 400 µL de Trizol et de 300 µL de billes de verre traitées à 180°C. La phase liquide est récupérée dans un tube de 13 mL. Les billes sont rincées une nouvelle fois avec 500 µL de Trizol, la phase liquide est récupérée dans le même tube. Les protéines et débris membranaires sont précipités grâce à 800 µL de chloroforme puis les échantillons sont centrifugés 15 min à 10000 rpm à 4°C (Beckman, JA20) et la phase aqueuse est récupérée. L'ARN est ensuite précipité à l'isopropanol. Le culot

formé après centrifugation 10 min à 10000 rpm (Biofuge Fresco Heraeus) est récupéré dans 1,5 mL d'éthanol 75% qui est ensuite éliminé par centrifugation et séchage au Speed-Vac. Le culot d'ARN est récupéré dans 150 µL de DEPC.
Les ARN sont quantifiés au NanoDrop et purifiés à l'aide du kit Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen 74104) puis conservés à -80°C avant marquage et hybridation.

6.3. 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 (rouge 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 260 nm et les cyanines Cy3 à 550 nm). L'efficacité du marquage est donc évaluée par le rapport DO_{550}/DO_{260}.

6.4. Hybridation

Les ARN marqués sont hybridés sur des puces de transcriptome Agilent 8x15K. 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 puit et la lame est incubée dans un four rotatif à 65°C pendant 17 h. Les échantillons et leurs réplicats 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.

6.5. Acquisition des données transcriptomiques

L'expression génétique des levures est analysée à partir de trois cultures indépendantes.
Le signal d'hybridation est détecté à l'aide d'un GenePix 4000B laser scanner (Axon Instruments). L'acquisition et la quantification des images des puces ont été réalisées avec le logiciel GenePix PRO software version 3.0.

7 Analyses statistiques et traitement des données

7.1. Plan expérimental de Box-Behnken

L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel R, version 2.14.2 (R Development Core Team 2012) et la bibliothèque rsm (Lenth, 2009).
Un plan expérimental de Box-Behnken a été choisi pour étudier les effets de trois variables indépendantes (concentrations initiales en azote et en phytostérols et température de fermentation) et pour calculer la combinaison optimale des conditions de fermentation pour la production de composés volatils avec un nombre limité d'essais expérimentaux. Ce plan a été utilisé pour étudier la production de 36 composés volatils par les souches Lalvin EC1118® et Affinity™ ECA5.
Pour chaque souche, un total de 16 expériences a été effectué, dont 4 au centre du domaine expérimental.
Dans ce dispositif expérimental, il y a trois niveaux de facteurs codés: -1, 0, 1 dans lequel -1 correspond au faible niveau de chaque facteur, 1 au niveau élevé et 0 au niveau intermédiaire. Le niveau réel de chaque facteur a été calculé avec l'équation suivante (Box and Behnken 1960):

$$Valeur\ réelle = Valeur\ codée \times \frac{valeur\ haute - valeur\ basse}{2} + \frac{valeur\ haute + valeur\ basse}{2} \qquad (Equation\ 7)$$

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

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{33} x_3^2 \qquad (Equation\ 8)$$

où x_1, x_2 et x_3 représentent les valeurs codées de, respectivement, la teneur en azote initial, la teneur en phytostérols et la température de fermentation, Y est la réponse prédite, β_0 est la moyenne générale, les β_i sont les coefficient linéaires, les β_{ii} les coefficients quadratiques, et les β_{ij} les coefficients d'interaction ; les termes d'erreur ε sont indépendants et suivent une loi N (0, σ^2).

Si nécessaire et suivant des critères d'adéquation au modèle, un modèle simplifié a été adapté pour certains composés en supprimant les termes d'interaction dans l'équation.

En outre, les hypothèses du modèle linéaire (normalité et homoscédasticité des variances) sont vérifiées avec les graphiques diagnostics usuels.

La précision et l'adéquation de chaque modèle polynomial décrit ci-dessus sont évalués par un test de « lack of fit », un test de Fisher et le coefficient de détermination ajusté adjR^2.

7.2. Traitement des données cinétiques

Ce traitement de données a été réalisé avec la version 3.1.1 du logiciel R (R Development Core Team 2014).

Grâce à la haute fréquence d'acquisition du suivi en ligne, nous avons obtenu trois groupes de données où chaque variable d'intérêt est une courbe en fonction du temps (h) que nous avons préféré exprimée en terme de sucre consommé (g/L) qui a une signification biologique. Nous avons choisi de résumer ces trois ensembles de données en lissant chaque courbe avec un modèle adéquat et ce afin d'extraire des paramètres cinétiques d'intérêt.

7.2.1. Modélisation des courbes de croissance cellulaire

Pour chaque condition de fermentation, la biomasse a été modélisée en utilisant un modèle de Weibull avec le paquet rdc (Ritz and Streibig, 2005). Le modèle à quatre paramètres de Weibull s'écrit :

$$f(x) = c + (d - c)\left[1 - exp^{-exp^{[b\,(\ln(x) - \ln(e))]}}\right] \qquad (Equation\ 9)$$

Cette fonction ascendante à quatre paramètres est asymétrique au moment du point d'inflexion e. Pour chaque fonction modélisée, nous avons extrait les critères d'intérêt: (1) le μmax défini comme le maximum du rapport f '(t)/f (t) pour chaque t, exprimé en h^{-1}; (2) le point d'inflexion exprimé en sucre consommé (g/L) et (3) le maximum de la biomasse exprimé en 10^6 cellules.

7.2.2. Modélisation des courbes de consommation des sources d'azote

Concernant la consommation des acides aminés (AA), nous avons modélisé chaque AA pour chaque condition avec le paquet rdc (Ritz and Streibig, 2005) et un modèle de Weibull. La fonction de quatre paramètres Weibull est écrite :

$$f(x) = c + (d - c)exp^{-\exp[b(ln(x) - ln(e))]} \qquad (Equation\ 10)$$

Cette fonction décroissante à quatre paramètres est asymétrique au point d'inflexion e. Pour chaque fonction modélisée, nous avons extrait des critères d'intérêt: (1) la vitesse maximale qui est le maximum de la première dérivée de la fonction exprimée en mg/L.h, (2) le point d'inflexion et (3) le point où la quantité d'AA est nulle, tous deux exprimés en sucre consommé (g/L).

Pour ces deux modélisations paramétriques (croissance cellulaire et consommation des sources d'azote), la normalité des distributions résiduelles et l'homogénéité de la variance ont été étudiées avec des graphiques de diagnostic standard; aucune violation des hypothèses n'a été détectée.

7.2.3. Lissage des arômes fermentaires

Chaque composé volatil de chaque condition a été modélisé en utilisant un modèle non-paramétrique utilisant le paquet cellGrowth (Gagneur and Neudecker, 2012). Le modèle utilisé est une régression locale permettant (1) l'extraction du point d'inflexion exprimé en sucre consommé (g/L), (2) la production maximale en mg/L et (3) la vitesse maximale (maximum de la première dérivée exprimé en mg/L.h).

Pour calculer la vitesse spécifique, nous avons extrait la première dérivée du modèle (la vitesse) et nous avons calculé le rapport entre cette dérivée et la prédiction de la population estimée ci-dessus. Enfin, nous avons extrait la vitesse spécifique maximale (SR max) et le temps où ce maximum a été atteint exprimé en sucre consommé (g /L) (PointSRmax).

L'analyse statistique a été effectuée à l'aide de la version 3.1.1 du logiciel R (R Development Core Team 2014). Le package limma (Smyth and Speed, 2003; Smyth, 2004, 2005) a été utilisé pour normaliser les données des puces à ADN en utilisant la médiane des intensités des pixels des spots pour normaliser selon la méthode quantile (normalisation entre puces).
L'ensemble des données est disponible sur la « Gene Expression Omnibus Database » (N°GSE68354).

7.2.4. Sparse partial least square – discriminant analysis (sPLS-DA)

Pour chaque moment de prélèvement (T1 : 35 g/L de CO_2 dégagé et T2 : 70 g/L de CO_2 dégagé) et sur la base des données normalisées de 6200 données d'expression pour les deux souches (Lalvin EC1118® et Affinity™ ECA5), nous avons utilisé une sparse partial least square – discriminant analysis (sPLS-DA). Cette approche exploratoire dans un contexte supervisé permet de sélectionner les transcrits les plus importants par rapport aux deux souches (Le Cao et al., 2011). Le nombre de dimensions de la sPLS-DA est fixé à deux et nous avons fixé le nombre de variables à choisir sur ces deux dimensions à 500 (250 pour chaque).

Une analyse fonctionnelle a été réalisée sur les transcrits sélectionnés par point de prélèvement, afin de mettre en évidence les groupes fonctionnels significatifs selon les Gene Ontology (GO) en utilisant le programme Genecodis (Nogales-Cadenas et al., 2009) en utilisant un t-test modifié (p-value < 0.05) corrigé par la méthode des faux positifs de Benjamini and Hochberg (1995).

Pour chaque point de prélèvement, une analyse factorielle multivariée (AMF) a ensuite été réalisée pour obtenir un aperçu de l'ensemble de données, qui consistait en 513 variables mesurées pour les deux souches (Lalvin EC1118® et Affinity™ ECA5). L'ensemble des données comprenait un ensemble d'individus décrits par deux types de variables: l'expression normalisée des 500 transcrits sélectionnés par la sPLS-DA selon les deux souches, et les 13 métabolites produits pendant la fermentation par les levures. L'AMF tient compte de la

structure des deux groupes de données et équilibre l'influence de chaque groupe de variables. Cela permet l'étude des liens entre les données d'expression et de la production des métabolites (Husson et al., 2012).

7.2.5. Etude comparative

Un t-test modifié permet de déterminer si le gène est statistiquement différentiellement exprimé entre deux conditions, ici les moments de prélèvement (p-value < 0.05). Il est appliqué une correction de Benjamini et Hochberg pour réduire le taux de faux positifs lié à la multiplicité des tests (Benjamini and Hochberg, 1995). Les gènes différentiellement exprimés ont été ordonnés et triés par classes fonctionnelles selon les Gene Ontology (GO) en utilisant le programme Genecodis (Nogales-Cadenas et al., 2009).

Résultats

Chapitre 1

Etude des effets combinés des nutriments (azote et phytostérols) et de la température sur la production d'arômes fermentaires par *Saccharomyces cerevisiae* lors de la fermentation œnologique

.

Dans la première partie de ce projet de thèse, nous avons développé un modèle pour prédire les effets combinés de la teneur initiale en azote et en phytostérols et de la température de fermentation sur la production des principaux aromes fermentaires. Pour cela, un plan expérimental de Box-Behnken et une modélisation sous forme de surfaces de réponse ont été utilisés afin d'étudier la réponse de Lalvin EC1118® aux variations de conditions de fermentation. Afin de confirmer ces observations, nous avons testé plusieurs autres souches de levures dans les deux conditions extrêmes prédites par le modèle pour évaluer l'effet du fond génétique sur la production d'arômes fermentaires et la généricité de nos conclusions.

Après cet article, nous présenterons les résultats obtenus pour la souche Affinity™ ECA5, grâce au même plan expérimental de Box-Behnken, afin de déterminer si les changements dus à l'évolution adaptative ont modifié l'impact des paramètres de fermentation sur la synthèse des molécules volatiles.

Appl Microbiol Biotechnol
DOI 10.1007/s00253-014-6210-9

APPLIED MICROBIAL AND CELL PHYSIOLOGY

Combined effects of nutrients and temperature on the production of fermentative aromas by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation

Stéphanie Rollero · Audrey Bloem · Carole Camarasa · Isabelle Sanchez · Anne Ortiz-Julien · Jean-Marie Sablayrolles · Sylvie Dequin · Jean-Roch Mouret

Received: 21 August 2014 / Revised: 27 October 2014 / Accepted: 1 November 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract Volatile compounds produced by yeast during fermentation greatly influence the organoleptic qualities of wine. We developed a model to predict the combined effects of initial nitrogen and phytosterol content and fermentation temperature on the production of volatile compounds. We used a Box–Behnken design and response surface modeling to study the response of Lalvin EC1118® to these environmental conditions. Initial nitrogen content had the greatest influence on most compounds; however, there were differences in the value of fermentation parameters required for the maximal production of the various compounds. Fermentation parameters affected differently the production of isobutanol and isoamyl alcohol, although their synthesis involve the same enzymes and intermediate. We found differences in regulation of the synthesis of acetates of higher alcohols and ethyl esters, suggesting that fatty acid availability is the main factor influencing the synthesis of ethyl esters whereas the production of acetates depends on the activity of alcohol acetyltransferases. We also evaluated the effect of temperature on the total production of three esters by determining gas–liquid balances. Evaporation largely accounted for the effect of temperature on the accumulation of esters in liquid. Nonetheless, the metabolism of isoamyl acetate and ethyl octanoate was significantly affected by this parameter. We extended this study to other strains. Environmental parameters had a similar effect on aroma production in most strains. Nevertheless, the regulation of the synthesis of fermentative aromas was atypical in two strains: Lalvin K1M® and Affinity™ ECA5, which produces a high amount of aromatic compounds and was obtained by experimental evolution.

Keywords Wine fermentation · Nitrogen · Phytosterols · Temperature · Fermentative aromas · Box–Behnken design

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00253-014-6210-9) contains supplementary material, which is available to authorized users.

S. Rollero · A. Bloem · C. Camarasa · I. Sanchez · J.-M. Sablayrolles · S. Dequin · J.-R. Mouret (✉)
INRA, UMR1083, 34060 Montpellier, France
e-mail: mouretj@supagro.inra.fr

S. Rollero · A. Ortiz-Julien
Lallemand SAS, 31700 Blagnac, France

A. Bloem
Universite Montpellier 1, UMR1083, 34060 Montpellier, France

Introduction

Nutrients and temperature are two important factors that influence wine fermentation (Luparia et al. 2004; Blateyron and Sablayrolles 2001; Valero et al. 1998; Sablayrolles and Barre 1993; Bely et al. 1990). These parameters also affect many aspects of yeast metabolism, including the formation of volatile compounds that contribute significantly to the organoleptic qualities of wines (Swiegers et al. 2005). Several studies have assessed the influence of assimilable nitrogen content on the production of fermentative aromas such as higher alcohols, their acetates and ethyl esters (reviewed in Bell and Henschke 2005). In general, there is a direct relationship between initial nitrogen content and higher alcohol concentration when nitrogen content is low, whereas an inverse relationship is found at moderate to high nitrogen quantities (Carrau et al. 2008; Jiménez-Martí et al. 2007; Vilanova et al. 2007, 2012). Acetates of higher alcohols and ethyl esters show a more simple relationship with nitrogen concentration: an increase in initial nitrogen content is associated with an increase in ester production (Torrea et al. 2011; Ugliano et al. 2010; Garde-Cerdán and Ancín-Azpilicueta 2008; Hernandez-Orte et al. 2006). Nevertheless, in some cases,

Published online: 21 November 2014

the addition of nitrogen can impair the production of esters, depending on yeast strain and chemical composition of the must (Jiménez-Martí et al. 2007; Beltran et al. 2005).

Fermentation temperature is another variable that affects the final concentration of fermentative aromas in wine (Torija et al. 2003). For example, high concentrations of esters are obtained at low temperatures (Molina et al. 2007; Beltran et al. 2006). However, the effect of temperature on the synthesis of higher alcohols is more complex. Molina et al. (2007) showed that only the concentration of 2-phenylethanol increases with increasing temperature whereas Beltran et al. (2006) observed an increase in the concentration of all higher alcohols. In these studies, the concentrations of volatile compounds were determined in the liquid phase, and therefore these values do not reflect the real capability of yeast to produce these compounds.

It recently became possible to determine the biological production and the physical evaporation of volatile compounds by performing gas–liquid balances (Morakul et al. 2011, 2013). For six volatile compounds (propanol, isobutanol, isoamyl alcohol, isoamyl acetate, ethyl hexanoate and ethyl octanoate), we calculated the amount accumulated in the liquid and the amount lost in the gas. The addition of these quantities gives the biological production of these compounds by yeast. With this approach, overall losses in the exhaust gas can be calculated at any temperature (Mouret et al. 2014a; Morakul et al. 2013). Losses in exhaust gas are negligible for higher alcohols but much greater for esters, and are essentially dependent on both the volatility and the hydrophobicity of each aroma compound (Mouret et al. 2014b; Morakul et al. 2013). At a given temperature, the overall percentage lost is almost completely independent of the fermentation kinetics (Mouret et al. 2014a).

The effect of lipids on the formation of volatile compounds produced by yeasts has been less studied than the effect of temperature (Varela et al. 2012; Mauricio et al. 1997). Moreover, these studies were carried out with the addition of ergosterol, which is a yeast sterol that is not present in grape musts.

Most previous studies examining the production of volatile compounds have investigated the effect of one or two fermentation parameters. The objective of this study was to evaluate the effect of three environmental factors simultaneously: the initial concentration of assimilable nitrogen and lipids, and the fermentation temperature. We used a mixture of phytosterols (β-sitosterol, campesterol, stigmasterol) as a lipid source as this combination closely resembles the composition of natural grape must (Lefur et al. 1994). We used a Box–Behnken design to build a model for each volatile compound describing the simple effects of these three factors as well as the interactions between these parameters (Box and Behnken 1960). We carried out gas–liquid balances for these volatile compounds (Mouret et al. 2014b; Morakul et al. 2013) and we used a mathematical model to predict the gas–liquid ratio of the fermentative aromas throughout the fermentation process (Morakul et al. 2011). These experiments were carried out with a commercial wine yeast strain. Finally, we compared the aroma production of several other yeast strains under the two extreme conditions predicted by the model to assess the effect of genetic background on the production of fermentative aromas and to evaluate the generality of our findings.

Materials and methods

Yeast strains

Seven commercial *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains were used: Lalvin EC1118®, Affinity™ ECA5, Lalvin FC9 EDV®, Lalvin ICV D47®, Lalvin ICV K1M®, Lalvin Rhône 2226® (all produced by Lallemand SA, Montreal, Canada), and UCD522 (University of California, Davis, USA). Fermentation flasks were inoculated with 10 g/hl active dry yeast previously rehydrated for 30 min at 37 °C in a 50 g/l glucose solution (1 g of dry yeast diluted in 10 ml of this solution).

Fermentation media

Fermentation was carried out on synthetic medium (SM) that simulates standard grape juice (Bely et al. 1990). The SM used in this study contained 200 g/l of sugar (100 g/l of glucose and 100 g/l of fructose); 6 g/l of malic acid; 6 g/l of citric acid; 750 mg/l of KH_2PO_4, 500 mg/l of K_2SO_4, 250 mg/l of $MgSO_4{\cdot}7H_2O$, 155 mg/l of $CaCl_2{\cdot}2H_2O$, 200 mg/l of NaCl; vitamins (mg/l): myo-inositol (20), calcium pantothenate (1.5), thiamin hydrochloride (0.223), nicotinic acid (2), pyridoxine (0.25), biotin (0.003); oligoelements (in milligram per liter): $MnSO_4{\cdot}H_2O$ (4), $ZnSO_4{\cdot}7H_2O$ (4), $CuSO_4{\cdot}5H_2O$ (1), $CoCl_2{\cdot}6H_2O$ (0.4), H_3BO_3 (1), $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ (1). The pH of the medium was adjusted to 3.3 with NaOH 10 M.

The nitrogen source was composed of ammonium chloride and amino acids. Three concentrations of assimilable nitrogen were used in the study: 70, 200, and 330 mg/l. The composition of the stock solution of amino acids was (in gram per liter): tyrosine (1.4), tryptophan (13.7), isoleucine (2.5), aspartate (3.4), glutamate (9.2), arginine (28.6), leucine (3.7), threonine (5.8), glycine (1.4), glutamine (38.6), alanine (11.1), valine (3.4), methionine (2.4), phenylalanine (2.9), serine (6.0), histidine (2.5), lysine (1.3), cysteine (1.0), and proline (46.8). To obtain 70 mg/l of assimilable nitrogen in the MS, 2.16 ml of this solution, and 75 mg/l of NH_4Cl were added to the medium; for 200 mg/l, 6.16 ml of amino acid solution, and 220 mg/l of NH_4Cl were added; and for 330 mg/l, 10.16 ml of amino acid solution, and 360 mg/l of NH_4Cl were added.

SM medium was supplemented with three different concentrations of phytosterols (85451, Sigma Aldrich): 2, 5, and

8 mg/l to satisfy the lipid requirements of yeast cells during anaerobic growth. The stock solution was composed of 15 g/l of phytosterols in Tween 80 and ethanol (1:1, *v*/*v*).

Fermentation conditions

Anaerobiosis was obtained by bubbling argon in the medium for 20 min. Fermentation was performed in 330-ml flasks, containing 280 ml of SM, equipped with fermentation locks to maintain anaerobiosis at 20, 24, and 28 °C, with continuous magnetic stirring (150 rpm). Fermentation was monitored by CO_2 release: the amount of CO_2 released was determined by measuring weight loss three times per day.

Measurement of assimilable nitrogen

Ammonium concentration was determined enzymatically (R-Biopharm, Darmstadt, Germany).

The free amino acid content of the must was determined by cation exchange chromatography, with post-column ninhydrin derivatization (Biochrom 30, Biochrom, Cambridge, UK) as described by Crépin et al. (2012).

Determination of metabolite concentrations

Ethanol, glycerol, succinate and acetate concentrations were determined by HPLC (HPLC 1290 Infinity, Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) on a Phenomenex Rezex ROA column (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) at 60 °C. The column was eluted with 0.005 N H_2SO_4 at a flow rate of 0.6 ml/min. Acetic acid concentration was determined with a UV meter at 210 nm; the concentrations of the other compounds were determined with a refractive index detector. Analysis was carried out with the Agilent EZChrom software package.

Analysis of volatile compounds by gas chromatography/mass spectrometry

Materials

Ethyl acetate, ethyl propanoate, ethyl 2-methylpropanoate, ethyl butanoate, ethyl 2-methylbutanoate, ethyl 3-methylbutanoate, ethyl hexanoate, ethyl octanoate, ethyl decanoate, ethyl dodecanoate, ethyl lactate, diethyl succinate, 2-methylpropyl acetate, 2-methylbutyl acetate, 3-methyl butyl acetate, 2-phenylethyl acetate, 2-methylpropanol, 2-methylbutanol, 3-methylbutanol, hexanol, 2-phenylethanol, propanoic acid, butanoic acid, 2-methylpropanoic acid, 2-methylbutanoic acid, 3-methylbutanoic acid, hexanoic acid, octanoic acid, decanoic acid, and dodecanoic acid were supplied by Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Labeled *d7*-butanoic acid purchased from CDS (Sainte-Foix-La-Grande, France) was used as a standard. The other polydeuterated standards were prepared as follows. *d5*-Ethyl esters were made by adding the corresponding acid chlorides drop wise to *d6*-ethanol under argon. The solution was stirred for 1 h at room temperature, washed with aqueous potassium carbonate, dried and the target products distilled as described by Siebert et al. (2005). Phenyl acetic-2,2-*d2* acid (prepared by adding 305 mg phenyl acetic-2,2-*d2* acid to 5 ml of diethyl ether anhydrous) was added to lithium aluminum deuteride (prepared by adding 143 mg of LiAl*d4* to 2 ml ether anhydrous) to synthetize *d4*-phenylethanol. The solution was prepared in an ice bath. The mixture was then stirred at room temperature for 1 h until the reaction was complete. Water (2 ml) and sulfuric acid 15 % (3.5 ml) were added, and the product, *d4*-phenylethanol was recovered with diethyl ether and distilled.

Standard solutions

Stock solutions of each compound were prepared in 100 % ethanol. A combined standard solution was prepared for each group (ethyl esters, acetates, alcohols, and acids) from the stock solutions. Solutions for calibration were prepared by adding various amounts of the combined standard solutions to synthetic wine. The stability of the solutions was verified regularly by gas chromatography-atomic emission detection.

Preparation of samples for the analysis of volatile compounds

A total of 10 μl of a solution of deuterated standards diluted in ethanol (100 μg/ml) was added to the synthetic wine (5 ml) in a 15-ml pyrex tube with a Teflon cap (Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA). One milliliter of dichloromethane was added and the mixture was gently shaken for 20 min on shaking table. The samples were centrifuged for 5 min at 2,000 rpm at 4 °C to separate the aqueous and organic phases. The organic phase was recovered in a 4-ml vial and a second extraction was performed on the remaining aqueous phase: 1 ml of dichloromethane was added, the samples were shaken for 20 min, and then centrifuged for 5 min at 2,000 rpm at 4 °C. The organic phase was added to the same 4-ml vial containing the organic phase from the first extraction. The organic phase was dried with anhydrous Na_2SO_4 to remove all traces of aqueous phase. A total of 1.5 ml of the organic phase was transferred to a vial and evaporated under nitrogen flux to a final volume of 0.5 ml. The sample was then transferred to an insert (Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA), returned to the vial and closed.

Gas chromatography/mass spectrometry analysis

Samples were analyzed with a Hewlett Packard (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) 6890 gas chromatograph equipped with a CTC Combi PAL Autosampler

AOC-5000 (Shimadzu, Columbia, USA) and coupled to a HP 5973 mass spectrometry detector (HP, now Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA). The instrument was controlled and the data analyzed with HP G1701DA ChemStation software (HP, now Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA). The gas chromatograph was fitted with a 30 m×0.25 mm Phenomenex fused silica capillary column ZB-WAX, 0.25 μm film thickness (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA). The carrier gas was helium, linear velocity 36 cm/s, flow rate 1.0 ml/min in constant flow mode. The initial oven temperature was 40 °C for 3 min. The temperature was increased by 4 °C/min until it reached 220 °C, and was held at this temperature for 20 min. The injector and the transfer line were held at 250 °C. The sample volume injected was 2 μl, and the splitter, at 10:1, was opened after 30 s. The focus liner (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) was deactivated and tapered with glass wool (2–4 mm). The mass spectrometer quadrupole temperature was set at 150 °C, the source was set at 230 °C, and the transfer line was held at 250 °C. For quantification, mass spectra were recorded in Selected Ion Monitoring (SIM) mode with positive ion electron impact at 70 eV. The ions monitored in SIM runs are shown in Electronic supplementary material (ESM) Table S1. The ion in bold for each compound was typically used for quantification, because it had the best signal-to-noise and the least interference from other wine components. The other ions were used as qualifiers.

The method of extraction and analysis of aromatic compounds (higher alcohols, esters, and fatty acids) used in this study is routinely used for the extraction of volatile compounds from a synthetic medium of fermentation. The calibration functions obtained were linear throughout the concentration range used. The reference calibrants were prepared on the same day with the same mix of deuterated standards used to spike the samples of fermentation for analysis. Spiked standard additions of unlabeled analytes at concentrations in the middle of the calibration range were prepared in reference medium (alcoholic solution, 12 % ethanol, 6 g/l malic acid, pH 3.3). New QC samples were prepared with every set of samples to build the calibration curves.

Experimental design

Statistical analysis was performed with R software, version 2.14.2 (R Development Core Team 2012) and the rsm library (Lenth 2009).

A Box–Behnken experimental design was applied to investigate the effects of three independent variables (initial nitrogen and phytosterol content and temperature of fermentation) and to calculate the optimal combination of treatment conditions for the production of volatile compounds with a limited number of experimental runs. This design was used to study the production of 36 volatile compounds for the Lalvin EC1118® strain.

A total of 16 experiments were performed, including four at the center of the experimental domain.

In this experimental design, there were three-coded factor levels: −1, 0, +1 in which −1 corresponded to the low level of each factor, 1 to the high level, and 0 to the mid-level. The actual level of each factor was calculated with the following equation (Box and Behnken 1960):

$$\text{Actual level} = \text{Coded value} \times \frac{\text{High value} - \text{Low value}}{2} + \frac{\text{High level} + \text{Low level}}{2} \quad (1)$$

The effect of the three independent variables on each volatile compound (Y) was modeled with a polynomial response surface:

$$Y = \beta_0 + \beta_{1x1} + \beta_{2x2} + \beta_{3x3} + \beta_{12x1x2} + \beta_{13x1x3} + \beta_{23x2x3} + \beta_{11x1^2} + \beta_{22x2^2} + \beta_{33x3^2} + \varepsilon \quad (2)$$

where x_1, x_2 and x_3 represent the coded values of initial nitrogen content, initial phytosterol content and temperature of fermentation, respectively, Y is the predicted response, β_0 is the intercept term, β_i is the linear coefficient, β_{ii} is the quadratic coefficient, and β_{ij} is the interaction coefficient and ε are independent N (0, σ^2) error terms.

If necessary, a simplified model was fitted for some compounds by suppressing the interactive terms of the equation according to validity criteria (ESM Table S2). The equations of the models (Eq. 2) obtained for each volatile compound are provided in ESM Table S2.

In addition, the normality of residual distributions and homogeneity of variance were studied with standard diagnostic graphs; no violation of the assumptions was detected.

The accuracy and general ability of each polynomial model described above was evaluated by a lack of fit test, the Fisher test and the adjusted coefficient of determination adjR^2.

The reliability of the fitted models was overall very good: each polynomial model gave a non-significant lack of fit test at a 0.05 threshold (except for hexanoic and octanoic acid compounds), a significant Fisher test at a 0.05 threshold (except for isoamyl alcohol and phenylethanol) and a range of adjR^2 between 42 and 99 %.

For graphical representations of the surface responses, a custom version of the persp() function was used.

To assess the effect of the genetic background of the strain, fermentation was conducted in triplicate under the two extreme conditions predicted by the model (330 mg/l of

assimilable nitrogen, 2 mg/l of phytosterols at 20 °C and 70 mg/l of assimilable nitrogen, 8 mg/l of phytosterols to 28 °C). A principal component analysis (PCA) was carried out with the FactoMineR package (Husson et al. 2012) to provide an overview of the dataset.

Calculation of losses

The quantity of isoamyl acetate, ethyl hexanoate and ethyl octanoate effectively produced by yeast (that is called total production in the next sections) was calculated from the final value of liquid content and the fermentation temperature with the following equation:

$$P = \frac{C^{\mathrm{liq}}}{(1-\%_T)} \quad (3)$$

where P is the total production of a volatile compound (expressed in milligram per liter), C^{liq} is the measured liquid concentration (expressed in milligram per liter) and $\%_T$ is the overall percentage loss depending on the fermentation temperature, T.

Table 1 Experimental conditions and fermentation time for the 16 fermentations

Experiments	Nitrogen (mg/L)	Phytosterols (mg/L)	Temperature (°C)	Time of fermentation (h)
1	330	5	28	160
2	330	8	24	187
3	330	2	24	187
4	200	2	28	189
5	200	8	28	189
6[a]	200	5	24	208
7[a]	200	5	24	208
8[a]	200	5	24	208
9[a]	200	5	24	208
10	330	5	20	217
11	200	2	20	306
12	200	8	20	306
13	70	5	28	328
14	70	2	24	408
15	70	8	24	408
16	70	5	20	573

[a] Four replicates included at the center of the experimental domain

Results

We sought to identify the effect of temperature and initial nitrogen and lipid content on the production of volatile compounds. We used a Box–Behnken design to minimize the number of factor combinations required to evaluate the effects of these three factors. Sixteen fermentations were performed with the Lalvin EC1118® strain at three different temperatures and three different nitrogen and lipid concentrations (Table 1; from 20 to 28 °C, from 70 to 330 mgN/L of assimilable nitrogen, and from 2 to 8 mg/l of phytosterols). The concentrations of metabolites and volatile compounds obtained for each fermentation are provided in Table S3.

The Box–Behnken design enabled us to plot changes to the concentrations of volatile compounds according to the three environmental parameters and also enabled us to build an associated mathematical model. With this model, we were able to assign each parameter (nitrogen, phytosterols, temperature) a "weight" and thus classify these three parameters according to their influence on the synthesis of each volatile compound (Table 2). The size of the effect can be determined from the level of significance expressed by the p value (p). Based on the sign of the β coefficients (Eq. 2) of the polynomial surface response, we can determine whether the effect of the fermentative parameter on the production of the studied volatile compound was positive or negative. We also studied the interactions between parameters (i.e., the effect of one factor depending on the value of another), as well as the non-linear effects of these parameters, called quadratic effects.

Effect of fermentation conditions on central metabolism

Regardless of the fermentation conditions used, complete dryness (residual sugars ≤2 g/l) was reached at the end of fermentation and the concentration of assimilable nitrogen at the end of the growth phase was equal to zero. The fermentation time was shorter when the initial nitrogen content and/or the temperature value were increased (Table 1), which is consistent with observations in other studies (Colombie et al. 2005; Blateyron and Sablayrolles 2001). The concentration of lipids did not affect the fermentation kinetics.

The amount of ethanol produced in all conditions was similar, whereas we observed significant differences in the concentrations of succinic acid, acetic acid and glycerol produced.

The final concentration of succinic acid was greatly influenced by nitrogen content ($p<0.001$), which had a negative effect on the production of this compound. The model also revealed positive effects for both temperature and phytosterol concentrations, an interaction between these two factors, as well as quadratic effects of all three factors. The response surfaces showed that the production of succinic acid was highest at low assimilable nitrogen content and at high temperature and lipid content (Fig. 1a).

Table 2 Effects of environmental parameters described by the model

	Simple effects			Quadratic effects			Interaction effects		
Compounds	N	P	T	N	P	T	N : P	N : T	P : T
Succinic acid	-	+	+	+	-	-			+
Acetic acid		-		-					
Glycerol	-	+	+	+		-			
Propanol	+								
Isobutanol		+	+				+		
Isoamyl alcohol		+		-			+		-
2-Phenylethanol				-					
Ethyl acetate	+								
2-Phenylethylacetate	+			-					
Isobutyl acetate	+					+			
Isoamyl acetate	+					+			
Isoamyl acetate corrected	+					+			
Ethyl hexanoate	+	-	-						
Ethyl hexanoate corrected	+	-			+				
Ethyl octanoate	+	-	-			-			
Ethyl octanoate corrected	+	-				-			
Ethyl butanoate	+	-	-	-					

Red: $p<0.001$, orange: $p<0.01$, yellow: $p<0.05$, gray: not-significant, (+): positive effect, (−): negative effect

N assimilable nitrogen, *P* phytosterols, *T* temperature

For glycerol, the model described the same simple effects as those observed for succinic acid (Fig. 1a, b), and we observed quadratic effects for nitrogen and temperature.

The production of acetic acid was mainly influenced by the lipid content. The final concentration of acetate was highest at low phytosterol content (Fig. 1c), consistent with the negative effect ($p<0.01$) given by the model. Nitrogen content had a quadratic effect on the production of this compound.

Effect of fermentation conditions on the synthesis of aromas

Overall, we observed that nitrogen concentration was the factor that had the greatest effect on a large number of volatile compounds. Its simple effect was always positive, i.e., the final concentration of volatile compounds increased with the initial nitrogen content. Temperature and lipid content had moderate effects on some compounds. Moreover, these effects were either positive or negative.

Higher alcohols

The effect of fermentative parameters depended on the higher alcohol considered (Table 2). For 2-phenylethanol, we only observed a negative quadratic effect of nitrogen (Fig. 2a). Temperature and lipid content were positively correlated with isobutanol synthesis and we also found an interaction between nitrogen and phytosterol content for this compound. These effects were clearly observable in response surface (Fig. 2b).

The synthesis of isoamyl alcohol was positively correlated with lipid content (Fig. 2c) and nitrogen content had a negative quadratic effect on the production of this compound. We also observed two interactions: one between nitrogen and phytosterol content and another between phytosterol content and temperature.

By contrast, the final concentration of propanol was only affected by the initial nitrogen content ($p<0.001$), which had a positive effect on its production (Table 2). The shape of the response surfaces of propanol was completely different from that of other higher alcohols (Fig. 2d). Propanol production was directly proportional to the initial nitrogen concentration.

Acetates of higher alcohols

Nitrogen content was positively correlated with the liquid concentration of all acetates of higher alcohols ($p<0.001$; Fig. 3), in line with other studies (Torrea et al. 2011; Ugliano

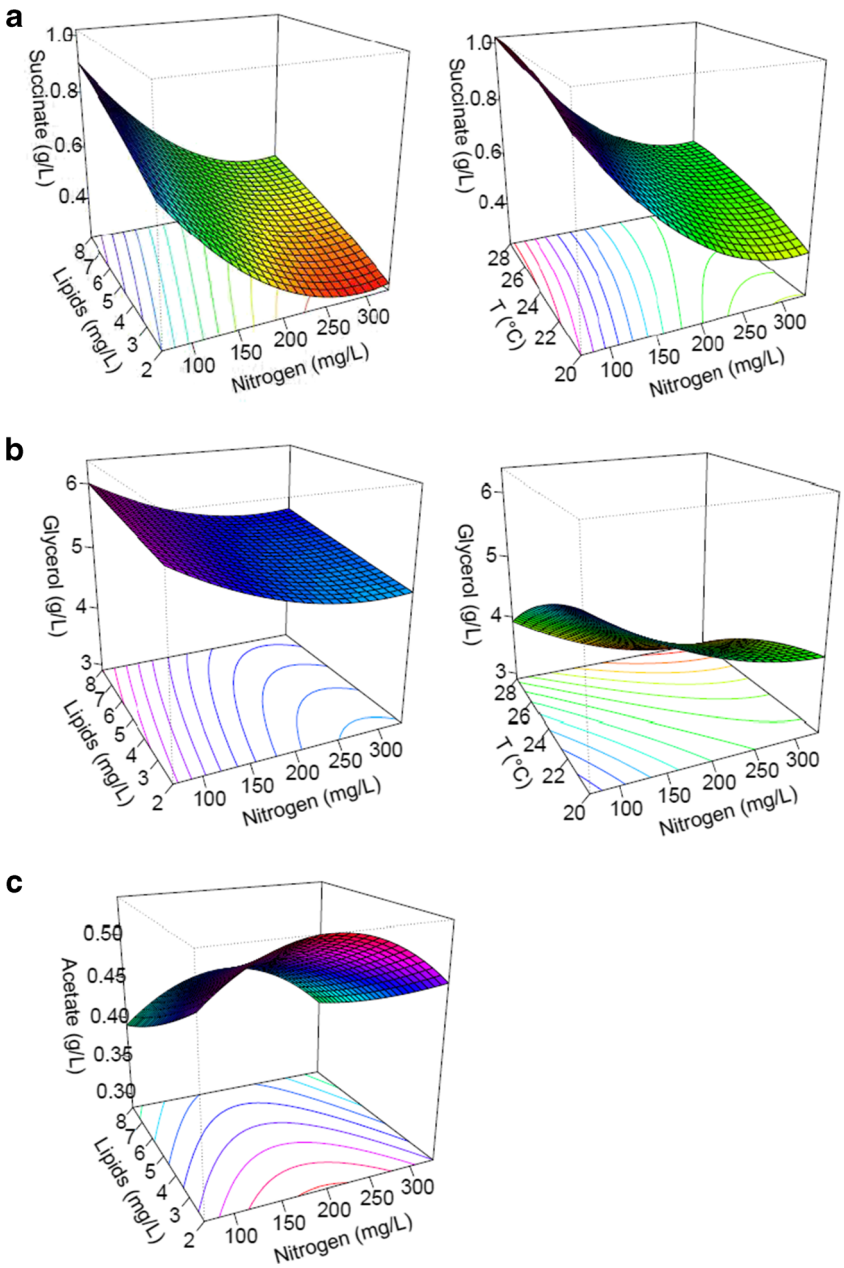


Fig. 1 Response surfaces of non-volatile compounds: succinic acid (**a**), glycerol (**b**), and acetic acid (**c**)

et al. 2010; Hernandez-Orte et al. 2006). Moreover, the model described a positive, quadratic effect of temperature on the production of isoamyl acetate and isobutyl acetate and a negative effect of nitrogen on that of 2-phenylethylacetate.

Ethyl esters

The final liquid concentration of all ethyl esters was strongly influenced by the three parameters studied (nitrogen, lipids, and temperature). Nitrogen content was positively correlated with the final liquid concentration of ethyl esters, whereas temperature and phytosterol content were negatively correlated.

Nevertheless, ethyl esters responded differently to changes in fermentation parameters and could be divided into two distinct groups according to their behavior. The compounds belonging to these two groups are distinguished by the length of their carbon chain or their molecular weight. The first group contained ethyl butanoate and ethyl hexanoate whereas the second group contained ethyl octanoate.

Initial nitrogen concentration had a similar effect on the production of the three studied ethyl esters, but the effects of temperature and lipid content were different between the two groups. The production of the three ethyl esters significantly increased with initial nitrogen content (Fig. 4; Table 2), consistent with previous studies (Torrea et al. 2011; Garde-Cerdán

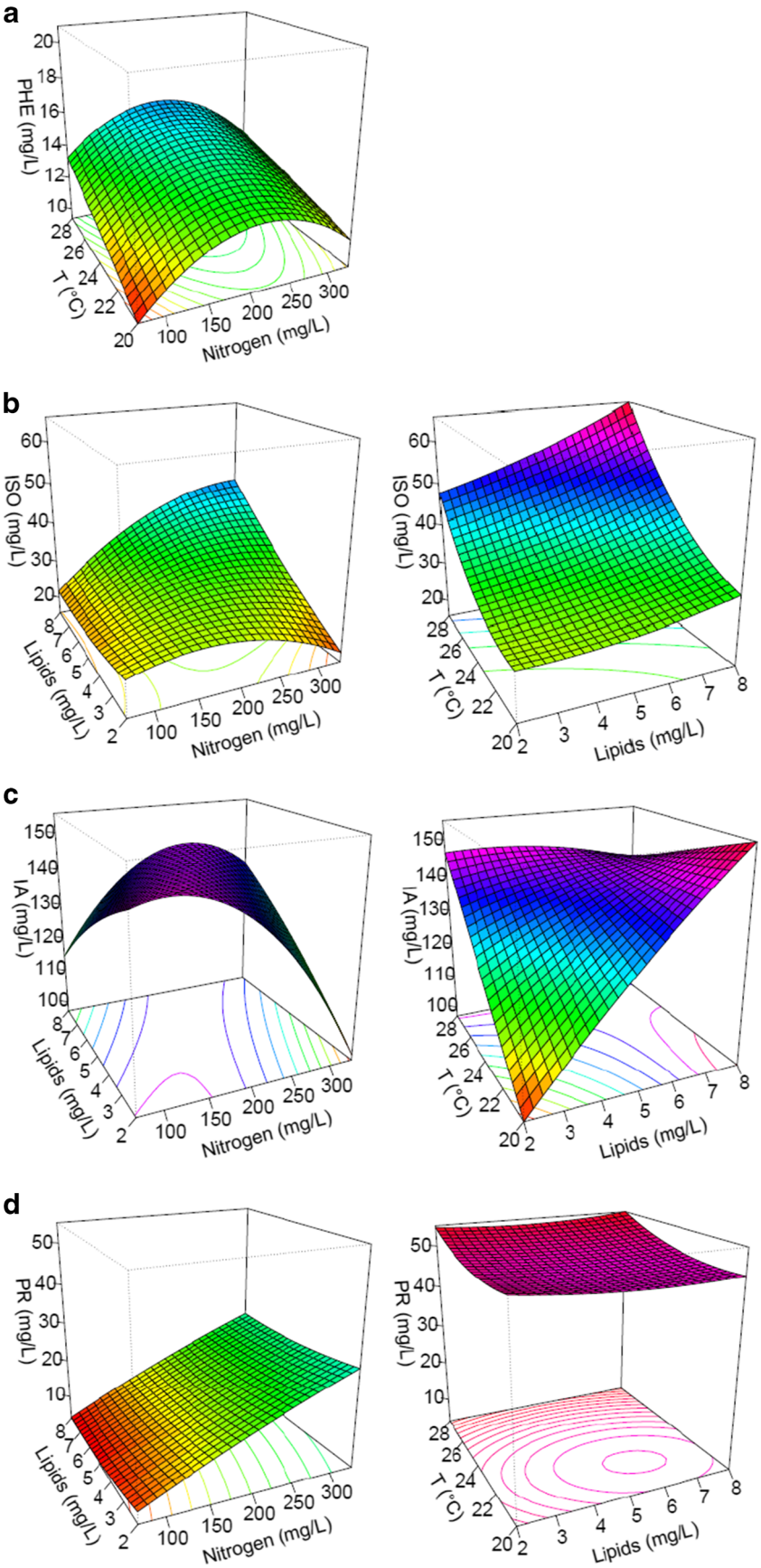


Fig. 2 Response surfaces of higher alcohols: 2-phenylethanol (*PHE*) (**a**), isobutanol (*ISO*) (**b**), isoamyl alcohol (*IA*) (**c**), and propanol (*PR*) (**d**)

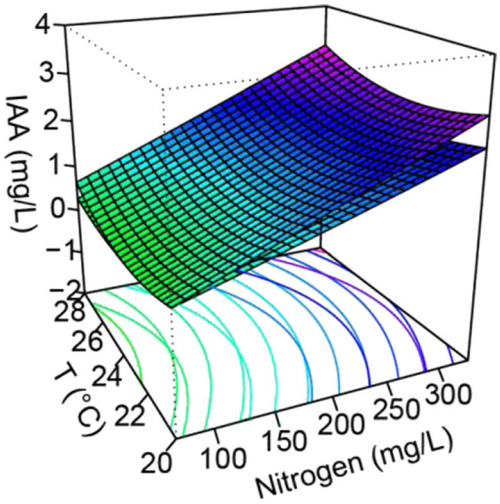


Fig. 3 Response surfaces of isoamyl acetate (*IAA*) in the liquid phase (*bottom curve*) and total production (*upper curve*)

and Ancín-Azpilicueta 2008). The final liquid concentration of ethyl butanoate and ethyl hexanoate was maximal at low temperature (20 °C), whereas the highest final concentration of ethyl octanoate was obtained at an intermediate temperature (24 °C), underlining the quadratic effect of temperature for this particular compound. Lipid concentration was negatively correlated with the synthesis of ethyl butanoate and ethyl hexanoate (Fig. 4a). However, the relationship between initial phytosterol concentration and final ethyl octanoate concentration was more complex: the lowest amount of ethyl octanoate was produced at the intermediate value of lipid content (5 mg/l), and the quantities produced at 2 and 8 mg/l of phytosterols were similar (Fig. 4b).

Calculation of the total production of esters

Yeast produces fermentative aromas which are released into the liquid phase. These compounds partly evaporate and are lost in the exhaust gas (especially esters), due to their volatility and hydrophobicity. The accumulation of volatile compounds in the liquid therefore depends on both their biological production by yeast and the physical phenomenon of evaporation. The total amount of fermentative aromas produced by yeast can be obtained by calculating the accumulated amount in the liquid phase and the amount lost in gas.

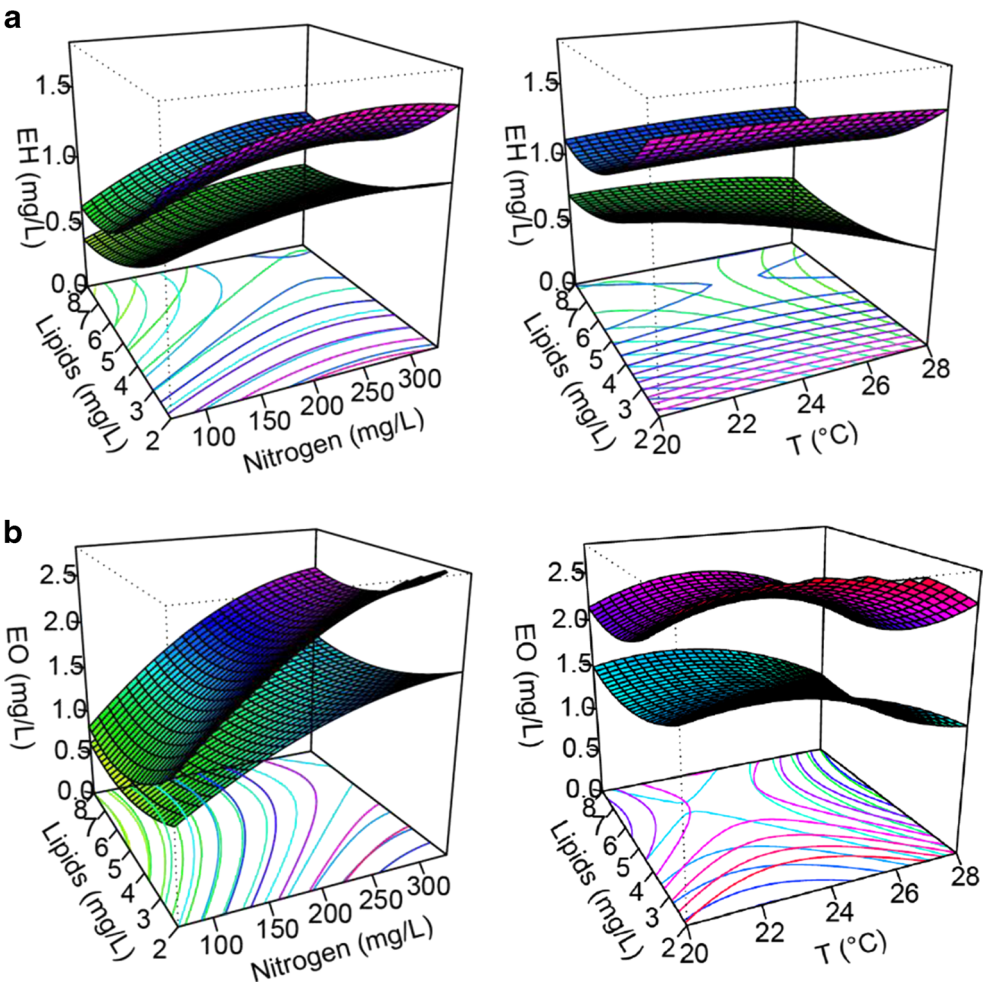


Fig. 4 Response surfaces of ethyl esters in liquid phase (*bottom curve*) and total production (*upper curve*): ethyl hexanoate (*EH*) (**a**) and ethyl octanoate (*EO*) (**b**)

We previously established a method to evaluate the percentage of volatile compounds lost in gas (Mouret et al. 2014b; Morakul et al. 2011). With this approach, we were thus able to calculate the total production of volatile compounds by yeast. Losses in the exhaust gas strongly depend on the volatile compound studied. These losses are negligible for higher alcohols (less than 1 %) but reach high values for esters (Mouret et al. 2014b; Morakul et al. 2011). Therefore, we only show here response surfaces and associated models for the total production of esters.

Temperature had a stronger quadratic effect on the total production of isoamyl acetate than on the concentration of this compound in liquid (Table 2; Fig. 3).

By contrast, the simple effect of temperature on the production of ethyl hexanoate and ethyl octanoate was lost when the total production of these compounds was considered (Fig. 4). However, the quadratic effect of temperature on the production of ethyl octanoate was still present. The response surface representing the total production of ethyl hexanoate did not change with temperature, whereas the corresponding response surface for the liquid concentration declined with increasing temperature (Fig. 4a). Similarly, the response surface of total ethyl octanoate showed less variation with temperature than the response surface of its liquid concentration, but the relationship between temperature and the total production of ethyl octanoate remained non-monotonous (Fig. 4b).

Effect of yeast genetic background

The production of volatile compounds varies substantially depending on the strain (Blanco et al. 2013; Barbosa et al. 2012; Camarasa et al. 2011); however, the variability in the regulation of the synthesis of these compounds has been poorly documented. Nevertheless, it was recently shown that variations in the expression level of individual transcription factors are involved in phenotypic differences observed within the *S. cerevisiae* species, including the production of volatile compounds (Rossouw et al. 2012). We therefore decided to extend our study to six other wine yeast strains. The production of volatile compounds was studied in two extreme conditions predicted by the model, associated with maximal (330 mg/l of assimilable nitrogen, 2 mg/l of phytosterols at 20 °C) or minimal (70 mg/l of assimilable nitrogen, 8 mg/l of phytosterols at 28 °C) production of esters.

We first found that the production of volatile compounds due to changes in fermentation conditions varied in the same direction for all tested strains. We then performed two PCA to investigate the effect of genetic background: one analysis of the concentration values considering the two conditions of fermentation as independent, and a second analysis considering the percentage of variation in the production of volatile compounds between the two conditions.

In the PCA of the concentration values (Fig. 5a), the first two dimensions accounted for 85 % of the total variation. The two conditions of fermentation were separated by axis 1, which was related to esters. The dispersion of strains was greatest when the nitrogen content was high. The Affinity™ ECA5 strain, which we previously obtained by experimental evolution (Cadière et al. 2011), showed the highest production of aroma compounds.

In the PCA representing the percentage of variation in the production of volatile compounds between the two conditions (Fig. 5b), the first two axes accounted for 72 % of the total variation. Lalvin ICV K1M® and Affinity™ ECA5 were clearly separated from the other strains. Lalvin ICV K1M® was separated from the other strains due to variations in the production of isobutanol, isobutyl, and isoamyl acetate. Affinity™ ECA5 was discriminated on the basis of the production of ethyl esters.

Discussion

In this study, we investigated the combined effect of initial assimilable nitrogen content, phytosterol content, and fermentation temperature on yeast metabolism and particularly on the synthesis of fermentative volatile compounds. We first observed notable variations in central metabolism. Although the effect of initial nitrogen concentration on succinic acid synthesis is still unclear from studies in the literature (Torrea et al. 2011; Beltran et al. 2005; Varela et al. 2004), we found a clear inverse relationship between initial nitrogen concentration and succinic acid synthesis (Fig. 1a). In the presence of a high concentration of assimilable nitrogen, especially ammonium, α-ketoglutarate is principally used to form glutamate. By contrast, at lower concentrations of assimilable nitrogen, the pool of α-ketoglutarate is partly rerouted to form succinic acid via the oxidative branch of the TCA cycle, because less glutamate is formed from α-ketoglutarate due to the low availability of nitrogen (Camarasa et al. 2003). Therefore, the synthesis of succinic acid acts as a safety valve to prevent accumulation of α-ketoglutarate.

Another important finding is the effect of a high amount of phytosterols on the production of acetic acid. Indeed, the production of acetic acid was low at high concentrations of phytosterols whereas that of succinic acid was high. A plausible explanation for these metabolic variations is that the requirement for acetyl-CoA, a precursor for lipid biosynthesis, is low in the presence of exogenous lipids (phytosterols). In addition, the pool of cytoplasmic acetyl-CoA not used to produce lipids may be converted into citrate by the citrate synthase Cit2p. Citrate may be subsequently transported to the mitochondria and participate in the synthesis of the succinic acid via the TCA cycle.

Our model showed that the tested parameters affected the production of succinic acid and glycerol to a similar extent, which may reflect the necessity for the cell to balance the production of these two compounds to fulfill redox constraints. Indeed, the synthesis of succinic acid via the oxidative branch of the TCA cycle leads to the production of NADH, and glycerol plays a major role in the reoxidation of NADH. We estimated the amount of produced and consumed NADH at the lowest and highest nitrogen concentrations tested (SM70 and SM330, the other two parameters were equal). On average, the amount of NADH produced (18.2 mmol) was comparable to the amount of NADH consumed (15.4 mmol). Thus, the redox balance is equilibrated, supporting the view of a redox link between succinic acid and glycerol.

The main objective of this study was to investigate the effect of environmental parameters on the total production of volatile compounds. We observed major effects on the production of higher alcohols. Notably, the production of propanol was positively affected by high initial nitrogen concentration and was independent of temperature and phytosterol content (Fig. 2d). Indeed, for the sixteen fermentations, there was a linear correlation between the final propanol concentration and the initial assimilable nitrogen content (regression coefficient=0.9459). Therefore, overall propanol

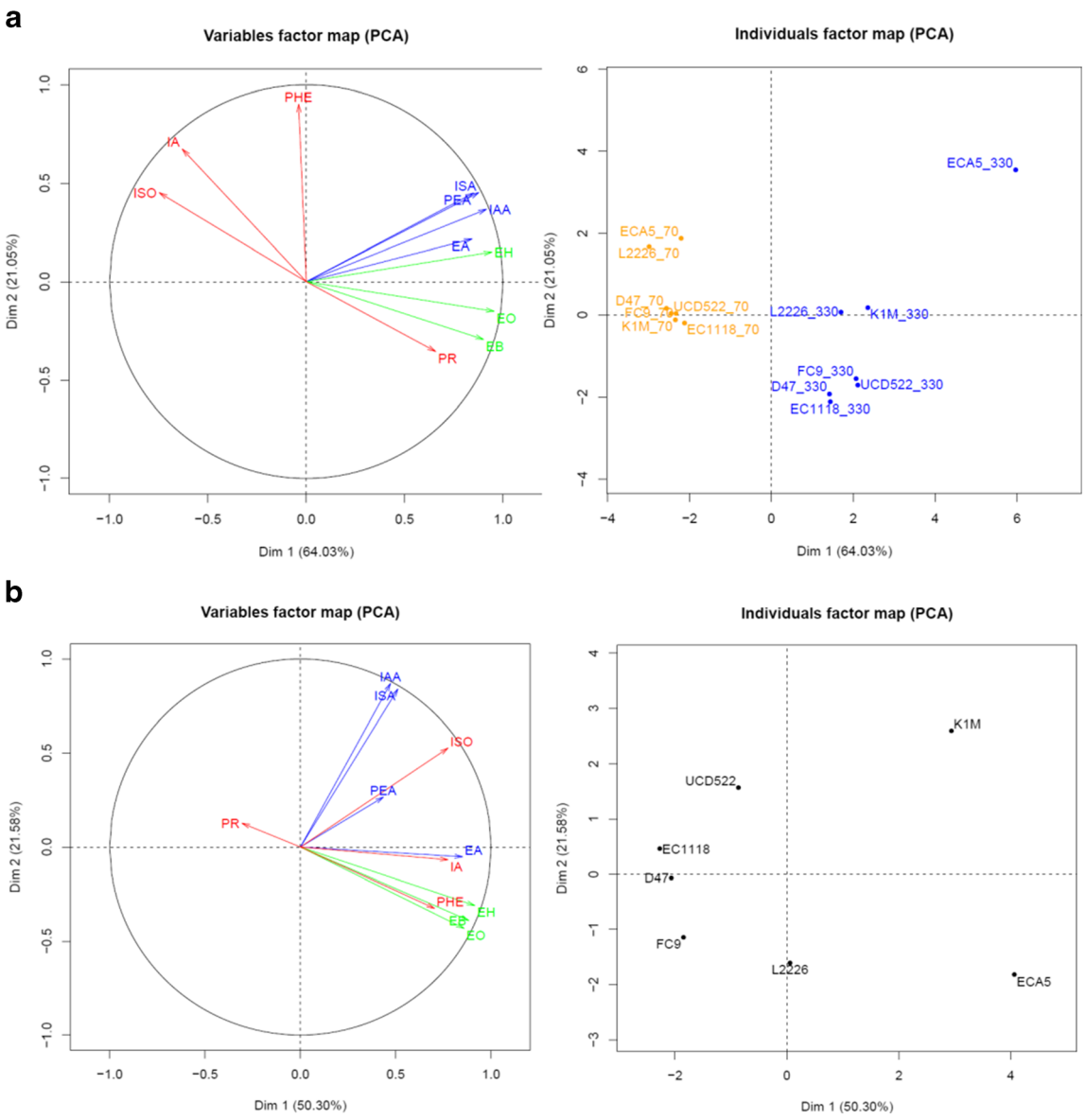


Fig. 5 Principal component analysis: with the concentration values considering the two conditions of fermentation as independent (**a**), with the percentage of variation in the production of volatile compounds between the two conditions (**b**). *PR*: propanol, *ISO*: isobutanol, *IA*: isoamyl alcohol, *PHE*: 2-phenylethanol, *EA*: ethyl acetate, *ISA*: isobutyl acetate, *IAA*: isoamyl acetate, *PEA*: 2-phenylethyl acetate, *EB*: ethyl butanoate, *EH*: ethyl hexanoate, *EO*: ethyl octanoate

production can be considered as a quantitative marker for the initial concentration of assimilable nitrogen (Mouret et al. 2014a; Clement et al. 2013). This behavior is consistent with the fact that propanol is produced from α-ketobutyrate, the synthesis of which is linked to nitrogen but not carbon metabolism (Boulton et al. 1995).

We observed a more complex effect for the other higher alcohols. Nitrogen content had a quadratic effect on 2-phenylethanol, explaining the response surface curvature around 200 mg/l of assimilable nitrogen (Fig. 2a). This optimal dose of nitrogen is consistent with previous findings (Jiménez-Martí et al. 2007; Vilanova et al. 2007). We have previously shown that an imbalance of a specific amino acid (addition of valine) led to a change in the flavor profiles (Clement et al. 2013). However, in this case, the added valine (835 mg/l) is much higher than the variability found naturally in grape must (between 8 and 140 mg/l, Sauvage et al. 1993).

Phytosterol content had a similar effect on the production of isobutanol and isoamyl alcohol (Fig. 2b, c). This effect may be partly explained by impairment in the activity of alcohol acetyl transferases in the presence of lipids. These enzymes catalyze the conversion of higher alcohols into the corresponding esters (EC 2.3.1.84). Indeed, the expression of *ATF1* is repressed by lipids (Fujii et al. 1997). By contrast, other parameters (nitrogen and temperature) affected differently the production of isobutanol and isoamyl alcohol (Table 2) and the response surfaces of these two compounds had fairly different shapes (Fig. 2b, c). In particular, nitrogen content affected the production of isoamyl alcohol but not that of isobutanol. By contrast, only the synthesis of isobutanol was affected by temperature. Thus, the production of isobutanol and isoamyl alcohol is differently regulated by the fermentation parameters, despite the fact that they are produced from a common intermediate, α-ketoisovalerate. Further studies involving the quantitative analysis of these pathways are required to understand better the regulation of the synthesis of these compounds.

Nitrogen content positively influenced the production of all acetates of higher alcohols. This effect is in line with previous findings (Mouret et al. 2014b; Torrea et al. 2011; Garde-Cerdán and Ancín-Azpilicueta 2008) and consistent with the fact that the synthesis pathways of these compounds are partly linked to nitrogen metabolism via the Ehrlich pathway (Hazelwood et al. 2008). Thus, the initial concentration of assimilable nitrogen is a major factor that influences the production of these aroma compounds and can be varied to increase the concentration of these compounds.

Temperature had a quadratic effect on the production of isoamyl acetate. The total production of this compound was lowest at 24 °C and quite similar at 20 and 28 °C. This indicates that temperature affects the regulation of the metabolic pathways involved in the production of isoamyl acetate. Therefore, variations of the final liquid concentration of this compound due to temperature are a result of both evaporation and modifications of yeast metabolism.

The production of each higher alcohol and its corresponding acetate were differently affected by the fermentative parameters. However, all acetates of higher alcohols were similarly affected by these factors. This suggests that the production of acetates of higher alcohols is more related to the enzymatic activity of alcohol acetyltransferases (Atf1 and Atf2) than to the availability of higher alcohols.

Temperature, phytosterols, and nitrogen concentrations all had significant, simple effects on the production of ethyl esters, indicating that the accumulation of ethyl esters in liquid can be modulated through several fermentation parameters. The final concentration of ethyl esters was positively correlated with initial nitrogen content, in line with previous studies (Torrea et al. 2011; Garde-Cerdán and Ancín-Azpilicueta 2008). This connection between assimilable nitrogen and ethyl esters is surprising because these volatile compounds are produced through lipid metabolism (Saerens et al. 2008; Swiegers et al. 2005). This suggests that the precursor of these esters, acyl-CoA, is synthetized from α-ketoacids. *S. cerevisiae* can synthesize isobutyryl-CoA from α-ketoisovalerate through a branched-chain α-ketoisovalerate dehydrogenase (EC 1.2.4.4). Isobutyryl-CoA could then be converted to butanoyl-CoA, the precursor of ethyl butanoate. The enzyme catalyzing this final reaction, isobutyryl-CoA mutase (EC 5.4.99.13), is present in many microorganisms, such as *Streptomyces* or *Mycobacterium* but its existence has not been reported in *S. cerevisiae*.

By contrast, the effect of phytosterols on the synthesis of ethyl esters was not surprising, as ethyl esters derive from lipid metabolism (Saerens et al. 2008; Swiegers et al. 2005). The de novo synthesis of lipids is repressed in the presence of exogenous fatty acids (Chirala 1992), which limits the extracellular accumulation of fatty acids that are used to synthesize ethyl esters. We were able to measure the concentrations of fatty acids (butanoic, hexanoic, and octanoic acid) with our assay, and could therefore estimate the effect of environmental factors (nitrogen and phytosterol contents) on the production of these molecules. The model showed that the behavior of fatty acids was quite similar to that observed for ethyl esters (data not shown). Notably, the concentration of fatty acids was negatively correlated with phytosterol concentration and positively correlated with initial nitrogen concentration. Thus, the formation of ethyl esters seems more dependent on the availability of precursors (fatty acids) than on the expression of the *EHT1* and *EEB1* genes encoding acyl coenzyme A/ethanol O-acyltransferases.

Overall, our study of the effect of temperature highlights the utility of gas–liquid balances to estimate the total production of a compound by yeast and to differentiate the physical effect (evaporation) from the metabolic effect of temperature. Indeed, we recently demonstrated that the effect of

temperature on yeast metabolism is overestimated if the concentration of metabolites in the liquid is considered in isolation (Mouret et al. 2014a, b; Morakul et al. 2013). For example, the simple effect of temperature on the synthesis of ethyl hexanoate and ethyl octanoate was no longer significant when total production was considered instead of liquid accumulation. Nonetheless, the quadratic effect was retained. These results indicate that the effect of temperature on the liquid accumulation of ethyl esters is mainly due to evaporation. Nevertheless, yeast metabolism is also affected to a small extent, especially the production of ethyl octanoate. For this particular compound, total production peaked at 24 °C (Fig. 4b). This may partly explain why ethyl octanoate and ethyl hexanoate could be classified into two distinct groups.

The main conclusions obtained with Lalvin EC1118® were valid for six other strains studied. Indeed, the production of isobutyl acetate and isoamyl acetate were correlated whereas that of their precursors, isobutanol and isoamyl alcohol, were not (Fig. 5a). This observation confirms the results described by the model showing that changes in the fermentation parameters had different effects on the accumulation of these two higher alcohols, whereas the response of their acetates was similar. The three ethyl esters were correlated in this PCA, which is consistent with the results obtained by the model showing that the response of these esters to environmental parameters was similar.

We examined the effect of genetic background on the regulation of the production of volatile compounds by studying the two PCA together. Strains were discriminated not only by the production of fermentative aromas but also by the regulation of their synthesis. Two strains, Lalvin ICV K1M® and Affinity™ ECA5, are particularly useful to illustrate these differences. The concentrations of volatile compounds produced by Lalvin ICV K1M® resembled those of the other strains; however, the regulation of their production was very unusual in this strain. The regulation of the production of volatile compounds was also atypical in the Affinity™ ECA5 strain but the quantity of compounds produced was very different from that of other strains. This was especially true of fermentation conditions in which ester synthesis was high. The Affinity™ ECA5 strain was obtained by adaptive evolution of Lalvin EC1118® (Cadière et al. 2011) and is characterized by an overproduction of higher alcohols and acetate esters (Cadière et al. 2012). Our study reveals substantial differences in the regulatory networks of these two strains, which could be ascribed to natural existing variation (Lalvin ICV K1M®) or to mutations selected during experimental evolution (Affinity™ ECA5).

In summary, we developed a model that is useful to predict the combined effects of environmental parameters on the production of fermentative aromas. Our results demonstrate the complex effect of environmental parameters on the synthesis of non-volatile and volatile compounds. This study provides new insight into the synthesis and regulation of aroma compounds and reveals that the effect of environmental parameters depends on the strain. This knowledge offers new perspectives to improve the fermentation process and to select appropriate yeast strains to maximize the production of fermentative aromas.

Acknowledgments This study was supported by the BIOFLAVOUR Cost Action FA0907.

References

Barbosa C, Mendes-Faia A, Mendes-Ferreira A (2012) The nitrogen source impacts major volatile compounds released by *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. Int J Food Microbiol 160:87–93

Bell SJ, Henschke PA (2005) Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. Aust J Grape Wine Res 11:242–295

Beltran G, Esteve-Zarzoso B, Rozes N, Mas A, Guillamon JM (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

Beltran G, Novo M, Leberre V, Sokol S, Labourdette D, Guillamon JM, Mas A, François J, Rozes N (2006) Integration of transcriptomic and metabolic analyses for understanding the global responses of low-temperature winemaking fermentations. FEMS Yeast Res 6:1167–1183

Bely M, Sablayrolles JM, Barre P (1990) Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in enological conditions. J Ferment Bioeng 70:246–252

Blanco P, Mirás-Avalos JM, Pereira E, Orriols I (2013) Fermentative aroma compounds and sensory profiles of Godello and Albariño wines as influenced by *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains. J Sci Food Agric 93:2849–2857

Blateyron L, Sablayrolles JM (2001) Stuck and slow fermentations in enology: statistical study of causes and effectiveness of combined additions of oxygen and diammonium phosphate. J Biosci Bioeng 91:184–189

Boulton RB, Singleton VL, Bisson LF, Kunkee RE (1995) Principles and practices of winemaking. Champman & Hall, New York

Box GEP, Behnken DW (1960) Some new three level designs for the study of quantitative variables. Technometrics 2:455–475

Cadière A, Ortiz-Julien A, Camarasa C, Dequin S (2011) Evolutionary engineered *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains with increased in vivo flux through the pentose phosphate pathway. Metab Eng 13:263–271

Cadière A, Aguera E, Caillé S, Ortiz-Julien A, Dequin S (2012) Pilot-scale evaluation the enological traits of a novel, aromatic wine yeast strain obtained by adaptive evolution. Food Microbiol 32:332–337

Camarasa C, Grivet JP, Dequin S (2003) Investigation by ^{13}C-NMR and tricarboxylic acid (TCA) deletion mutant analysis of pathways for succinate formation in *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic fermentation. Microbiology 149:2669–2678

Camarasa C, Sanchez I, Brial P, Bigey F, Dequin S (2011) Phenotypic landscape of *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation: evidence for origin-dependent metabolic traits. PLoS One 6:e25147

Carrau FM, Medina K, Farina L, Boido E, Henschke PA, 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

Chirala SS (1992) Coordinated regulation and inositol-mediated and fatty acid-mediated repression of fatty acid synthase genes in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc Natl Acad Sci 89:10232–10236

Clement T, Perez M, Mouret JR, Sanchez I, Sablayrolles JM, Camarasa C (2013) Metabolic responses of *Saccharomyces cerevisiae* to valine and ammonium pulses during four-stage continuous wine fermentations. Appl Environ Microbiol 79:2749–2758

Colombie S, Malherbe S, Sablayrolles JM (2005) Modeling alcoholic fermentation in enological conditions: feasibility and interest. Am J Enol Vitic 56:238–245

Crépin L, Nidelet T, Sanchez I, Dequin S, Camarasa C (2012) Sequential use of nitrogen compounds by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation: a model based on kinetic and regulation characteristics of nitrogen permeases. Appl Environ Microbiol 78:8102–8111

Fujii T, Kobayashi O, Yoshimoto H, Furukawa S, Tamai Y (1997) Effect of aeration and unsaturated fatty acids on expression of the *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyltransferase gene. Appl Environ Microbiol 63:910–915

Garde-Cerdán T, Ancín-Azpilicueta C (2008) Effect of the addition of different quantities of amino acids to nitrogen-deficient must on the formation of esters, alcohols, and acids during wine alcoholic fermentation. LWT Food Sci Technol 41:501–510

Hazelwood LA, Daran JM, van Maris AJA, Pronk JT, Dickinson JR (2008) The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. Appl Environ Microbiol 74:3920

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. Aust J Grape Wine Res 12:150–160

Husson F, Josse J, Le S, Mazet J (2012) FactoMineR: multivariate exploratory data analysis and data mining with R. R package version 1.18. http://CRAN.R-project.org/package=FactoMineR

Jiménez-Martí E, Aranda A, Mendes-Ferreira A, Mendes-Faia A, li del Olmo M (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

Lefur Y, Hory C, Bard M, Olsson A (1994) Evolution of phytosterols in Chardonnay grape berry skins during last stages of ripening. Vitis 33:127–131

Lenth RV (2009) Response-surface methods in R, using rsm. J Stat Softw 32:1–17

Luparia V, Soubeyrand V, Berges T, Julien A, Salmon JM (2004) Assimilation of grape phytosterols by *Saccharomyces cerevisiae* and their impact on enological fermentations. Appl Microbiol Biotechnol 65:25–32

Mauricio JC, Moreno J, Zea L, Ortega JM, Medina M (1997) The effects of grape must fermentation conditions on volatile alcohols and esters formed by *Saccharomyces cerevisiae*. J Sci Food Agric 75:155–160

Molina AM, Swiegers JH, Varela C, Pretorius IS, Agosin E (2007) Influence of wine fermentation temperature on the synthesis of yeast-derived volatile aroma compounds. Appl Microbiol Biotechnol 77:675–687

Morakul S, Mouret JR, Nicolle P, Trelea IC, Sablayrolles JM, Athes V (2011) Modelling of the gas–liquid partitioning of aroma compounds during wine alcoholic fermentation and prediction of aroma losses. Process Biochem 46:1125–1131

Morakul S, Mouret JR, Nicolle P, Aguera E, Sablayrolles JM, Athès V (2013) A dynamic analysis of higher alcohol and ester release during winemaking fermentations. Food Bioprocess Technol 6:818–827

Mouret JR, Camarasa C, Angenieux M, Aguera E, Perez M, Farines V, Sablayrolles JM (2014a) Kinetic analysis and gas–liquid balances of the production of fermentative aromas during winemaking fermentations: effect of assimilable nitrogen and temperature. Food Res Int 62:1–10

Mouret JR, Perez M, Angenieux M, Nicolle P, Farines V, Sablayrolles JM (2014b) Online-based kinetic analysis of higher alcohol and ester synthesis during winemaking fermentations. Food Bioprocess Technol 7:1235–1245

R Development Core Team (2012) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna

Rossouw D, Jacobson D, Bauer F (2012) Transcriptional regulation and the diversification of metabolism in wine yeast strains. Genetics 190:251–261

Sablayrolles J, Barre P (1993) Kinetics of alcoholic fermentation under anisothermal enological conditions. 1. Influence of temperature evolution on the instantaneous rate of fermentation. Am J Enol Vitic 44:127–133

Saerens SMG, Delvaux F, Verstrepen KJ, Dijck PV, Thevelein JM, Delvaux FR (2008) Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. Appl Environ Microbiol 74:454–461

Sauvage FX, Nicol MZ, Verries C, Sarris J, Pradal M, Robin JP (1993) Free amino acids and some enzymatic activities in ripe grape musts statistical analyses of the varietal effect. Sci Aliment 13:443–462

Siebert TE, Smyth HE, Capone DL, Neuwöhner C, Pardon KH, Skouroumounis GK, Herderich MJ, Sefton MA, Pollnitz AP (2005) Stable isotope dilution analysis of wine fermentation products by HS-SPME-GC-MS. Anal Bioanal Chem 381:937–947

Swiegers JH, Bartowsky EJ, Henschke PA, Pretorius IS (2005) Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. Aust J Grape Wine Res 11:139–173

Torija MJ, Beltran G, Novo M, Poblet M, Guillamón JM, Mas A, Rozès N (2003) Effects of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine. Int J Food Microbiol 85:127–136

Torrea D, Varela C, Ugliano M, Ancin-Azpilicueta C, Leigh Francis I, Henschke PA (2011) Comparison of inorganic and organic nitrogen supplementation of grape juice—effect on volatile composition and aroma profile of a Chardonnay wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae* yeast. Food Chem 127:1072–1083

Ugliano M, Travis B, Francis IL, Henschke PA (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

Valero E, Millan MC, Mauricio JC, Ortega JM (1998) Effect of grape skin maceration on sterol, phospholipid, and fatty acid contents of *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. Am J Enol Vitic 49:119–124

Varela C, Pizarro F, Agosin E (2004) Biomass content governs fermentation rate in nitrogen-deficient wine musts. Appl Environ Microbiol 70:3392–3400

Varela C, Torrea D, Schmidt SA, Ancin-Azpilicueta C, Henschke PA (2012) Effect of oxygen and lipid supplementation on the volatile composition of chemically defined medium and Chardonnay wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae*. Food Chem 135:2863–2871

Vilanova M, Ugliano M, Varela C, Siebert T, Pretorius IS, Henschke PA (2007) Assimilable nitrogen utilization and production of volatile and non-volatile compounds in chemically defined medium by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. Appl Microbiol Biotechnol 77:145–157

Vilanova M, Siebert TE, Varela C, Pretorius IS, Henschke PA (2012) Effect of ammonium nitrogen supplementation of grape juice on wine volatiles and non-volatiles composition of the aromatic grape variety Albariño. Food Chem 133:124–131

Résultats complémentaires

Etude des effets combinés des nutriments (azote et phytostérols) et de la température sur la production d'arômes fermentaires par la souche Affinity™ ECA5

Les travaux présentés dans la publication précédente décrivent les effets de trois paramètres de fermentations et leur possible interaction sur la production des arômes fermentaires par la souche Lalvin EC1118®.

Le même plan expérimental de Box-Behnken a été appliqué à la souche évoluée Affinity™ ECA5.

Même si le poids des différents facteurs varie selon la souche, les effets des paramètres environnementaux sur la synthèse des arômes fermentaires sont globalement les mêmes pour les deux souches Lalvin EC1118® et Affinity™ ECA5 (**Tableau 16** + **Table 2** de la publication).

Tableau 16. Effets des paramètres environnementaux décrits par le modèle pour la souche Affinity™ ECA5

	Effets simples			Effets quadratiques			Interactions		
Compounds	**N**	**P**	**T**	**N**	**P**	**T**	**N : P**	**N : T**	**P : T**
Propanol	+		+	+				+	
Isobutanol		+	+		-				
Alcool isoamylique	-				-		+		
2-Phenylethanol	-			-	-	-	+	-	
Acétate d'éthyle	+	-	-			-		-	
Acétate de 2-phényléthyle	+		-	-				-	
Acétate d'isobutyle	+				-				
Acétate d'isoamyle	+		-					-	
Butanoate d'éthyle	+	-	-	-					+
Hexanoate d'éthyle	+	-	-						+
Octanoate d'éthyle	+	-	-						

Rouge : p<0,001 ; orange : p<0,01 ; jaune : p<0,05 gris : non significatif
N : azote ; P : phytostérols ; T : température

De plus, ce travail nous a permis de préciser les composés « marqueurs » de la souche Affinity™ ECA5 : les alcools supérieurs (à l'exception du propanol) et les esters d'acétate sont systématiquement surproduits par cette souche dans toutes les conditions de fermentation testées (**Figure 23**). A l'inverse, la production d'esters d'éthyle ne permet pas toujours de différencier les deux souches (**Figure 23**). L'impact des paramètres environnementaux sur la

production des arômes fermentaires est similaire pour les deux souches. Toutefois, l'intensité de variation dépend de la souche étudiée, comme l'indique le fait que les surfaces de réponse ne présentent pas les mêmes allures.

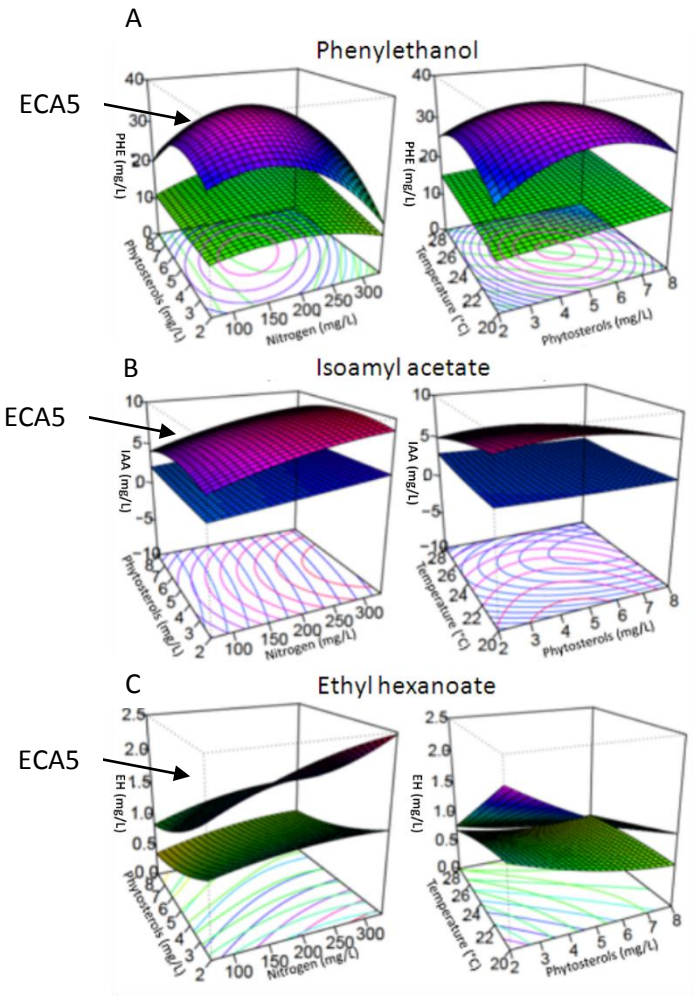


Figure 23. Surfaces de réponse des souches Lalvin EC1118® et Affinity™ ECA5 pour le phényéthanol (A), l'acétate d'isoamyle (B) et l'hexanoate d'éthyle (C)

Chapitre 2

Mise en évidence du rôle clé de la gestion des lipides sur le métabolisme de l'azote et des arômes dans une souche de levure œnologique évoluée

Précédemment, nous avons mis en évidence les effets combinés de trois paramètres environnementaux (azote, phytostérols, température) sur la production des arômes fermentaires par la souche commerciale œnologique Lalvin EC1118® et sur la souche évoluée Affinity™ ECA5. Nous avons ainsi montré que les deux souches répondent dans le même sens aux changements de conditions de fermentation. Cependant, les intensités de réponse sont très différentes. De plus, il a été montré que l'azote présente l'effet le plus marqué sur un grand nombre de composés. Toutefois, d'importantes interactions entre les facteurs environnementaux ont été mises en évidence.

Pour mieux comprendre les différences entre souches et les mécanismes mis en jeu, nous avons réalisé une analyse détaillée du métabolisme de l'azote et de production des arômes fermentaires sur Lalvin EC1118® et Affinity™ ECA5.

Pour cela, nous avons effectué, à l'échelle 10 L, un suivi fin de la cinétique de production des composés volatils grâce à un système de suivi en ligne par chromatographie en phase gazeuse et de la consommation des sources azotées. Cette étude dynamique a été couplée à une approche transcriptomique afin de mieux comprendre les régulations métaboliques impliquées. Nous nous sommes particulièrement intéressés à la bioconversion des alcools supérieurs en esters d'acétate.

Etude préliminaire

Comparaison des fermentations menées à trois échelles différentes en conditions de vinification

La première partie du travail ayant été réalisée en fermenteurs de 300 mL et le suivi cinétique des productions d'arômes fermentaires se déroulant dans des fermenteurs de 10 L, nous avons au préalable évalué s'il existait un « effet échelle » à la fois sur la cinétique fermentaire et sur la production des composés d'intérêt.

Nous avons rajouté une troisième échelle (1,1 L) qui correspond à la plus petite taille de fermenteurs à laquelle sont réalisés les suivis en ligne de la cinétique fermentaire permettant de calculer précisément les vitesses de dégagement de CO_2. La figure 24 montre que les cinétiques de fermentation à 1,1 L et 10 L sont très bien superposables, aussi bien avec un moût pauvre (70 mg/L) qu'avec un mout riche (330 mg/L) en azote.

Les concentrations finales (mesurées par GC-MS) des principaux alcools supérieurs et esters ont été comparées aux trois échelles (**Tableau 17**). Les résultats obtenus montrent que les productions sont remarquablement conservées. Il est important de préciser que ces résultats ont été obtenus avec un même ratio liquide/gaz (0,9) dans les trois types de fermenteurs.

L'ensemble des données collectées indique clairement qu'il n'y a pas d'effet échelle dans notre travail et qu'il est donc possible d'en changer sans créer d'artefact.

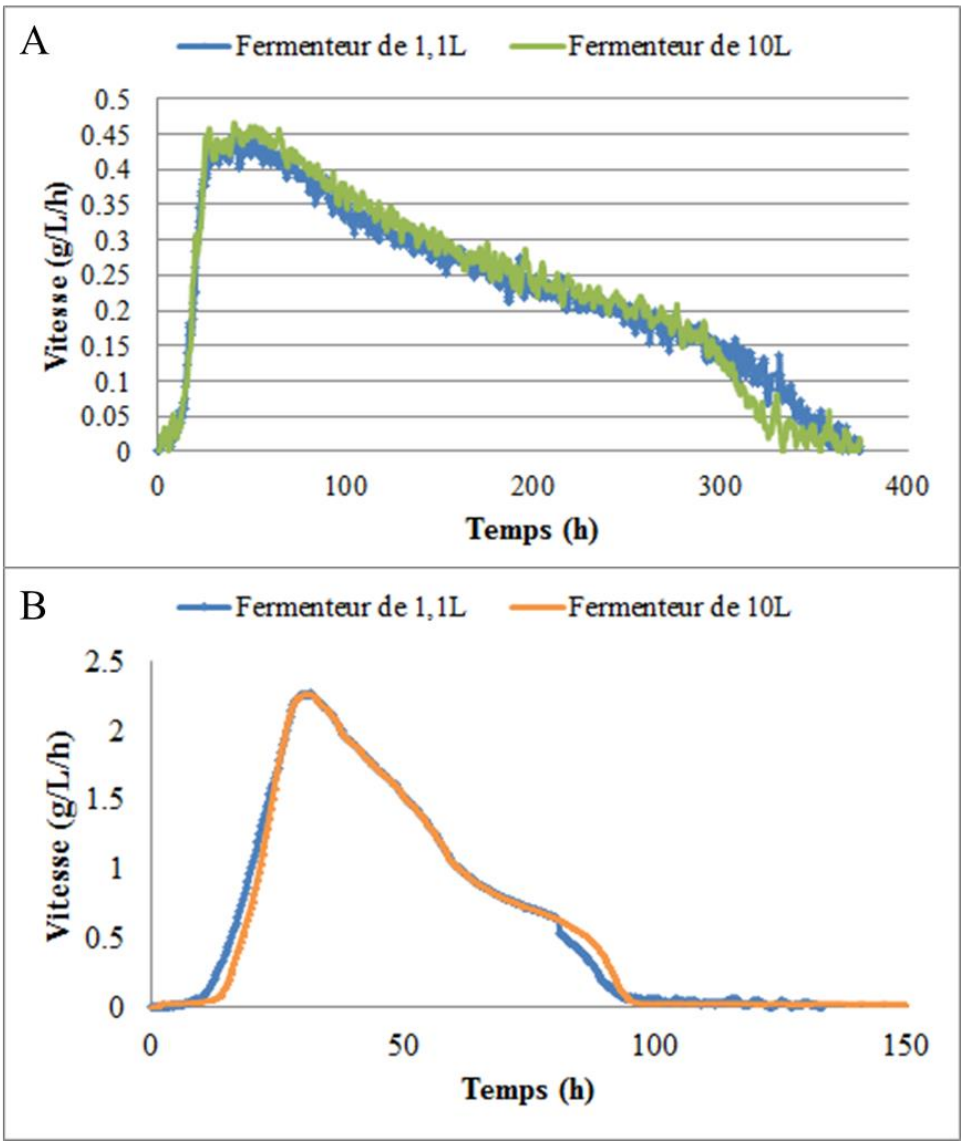


Figure 24. Vitesse de dégagement du CO_2 pour des fermentations réalisée en MS70 (A) et MS330 (B) dans des fermenteurs de 1,1 L et 10 L à 24°C pour la souche Lalvin EC1118®

Tableau 17. Concentrations en phase liquide des principaux arômes fermentaires dans des fermenteurs de 1,1 L et 10 L à 24°C pour la souche Lalvin EC1118®

Composés (mg/L)	300 mL	1,1 L	10 L	Moyenne	ET
Propanol	25.30	25.16	25.38	25.28	0.11
Isobutanol	37.21	37.45	37.31	37.32	0.12
Alcool isoamylique	114.96	115.45	112.71	114.37	1.46
Phenyléthanol	11.45	11.87	11.62	11.65	0.21
Acétate d'isobutyle	0.82	0.78	0.88	0.83	0.05
Acétate d'isoamyle	6.32	6.16	6.06	6.18	0.13
Acétate de phényl éthyle	7.35	7.85	8.34	7.85	0.50
Hexanoate d'éthyle	1.66	1.44	1.88	1.66	0.22
Octanoate d'éthyle	2.03	2.11	2.24	2.13	0.10

Key role of lipid management on nitrogen and aroma metabolism in an evolved wine yeast strain

Stéphanie Rollero[1,2,3,4], Jean-Roch Mouret[1,2,3] Isabelle Sanchez1,2,3, Carole Camarasa[1,2,3,] Anne Ortiz-Julien[4], Jean-Marie Sablayrolles[1,2,3], Sylvie Dequin[1,2,3*]

[1]INRA, UMR1083, F-34060 Montpellier, France

[2]SupAgro, UMR1083, F-34060 Montpellier, France

[3]Universite Montpellier, UMR1083, F-34060 Montpellier, France

[4]Lallemand SAS, F-31700 Blagnac, France

*Corresponding author: Phone: (33) 4 99 61 22 74; Fax: (33) 4 99 61 28 57

E-mail address: dequin@supagro.inra.fr

Abstract

We compared the dynamics of nitrogen consumption and of synthesis of fermentative aromas between an evolved aromatic wine yeast, Affinity™ ECA5, and its parental strain, Lalvin EC1118®. First, marked differences in nitrogen assimilation were observed between the two strains, in particular for amino acids transported by carriers regulated by nitrogen catabolite repression. Then, we highlighted differences in the kinetics of production of all the fermentative aromas studied, which suggest modifications in the regulation of the synthesis of these volatile molecules between the two strains. Finally, a quantitative analysis of the bioconversion of higher alcohols into acetate esters showed significant differences between the parental and the evolved strains and revealed an enhanced bioconversion yield for Affinity™ ECA5. On the basis of these data and on a transcriptomic analysis, it can be hypothesized that the higher production of acetate esters by the evolved strain is not due to higher expression of genes encoding alcohol acetyltransferases but to a greater availability of acetyl-CoA resulting from a different lipid management.

Keywords

Wine yeast, adaptive evolution, on-line monitoring, transcriptome, aroma compounds, nutrients

1. Introduction

In a market becoming increasingly competitive, optimizing the quality of wines, especially the organoleptic properties is a major challenge for the winemaker. Wine aroma is one of the principal attributes determining the preferences of wine consumers (Lee and Noble, 2003; Swiegers et al., 2005). Most fruity aroma compounds, esters in particular, are produced by yeast during alcoholic fermentation. Strategies to optimize the synthesis of aroma compounds may rely on the control of fermentation conditions, particularly through the addition of

nutrients (nitrogen sources, lipids ...). Another approach is the development of wine yeast strains with improved aroma characteristics.

Several studies have already assessed the influence of fermentation parameters (principally nitrogen addition and temperature) on the production of fermentative aromas (Molina et al., 2007; Mouret et al., 2014a; Ugliano et al., 2010; Vilanova et al., 2012). The yeast strain can also greatly influence the final concentration of these volatile compounds (Rossouw et al., 2012; Camarasa et al., 2011; Molina et al., 2009; Torija et al., 2003). It is also conceivable to develop new yeast strains with superior aromatic properties compared to available commercial wine yeasts.

Over the last decades, several strategies based on genetic engineering approaches have been extensively explored, resulting in the development of wine yeast strains with improved fermentation abilities, and with the capacities to increase the organoleptic quality of wine (Dequin, 2001; Ehsani et al., 2009; Pizarro et al., 2007; Remize et al., 2003). Despite the success of these studies, the poor consumer acceptance of genetically modified organisms (GMO) is a major obstacle to the use of these strains for winemaking. Therefore, GMO-free strategies, such as adaptive evolution approaches have become strategies of choice for improving wine yeast traits (Cadière et al., 2011; Kutyna et al., 2012; Tilloy et al., 2014).

Adaptive evolution is based on maintaining yeast during a large number of generations under conditions in which a specific selective pressure is applied. This favors the emergence of genetic variations and can result in adaptive evolution of the yeast population and in the selection of evolved variants with desired phenotypes. Using this approach, we obtained an evolved wine yeast (Affinity™ ECA5) exhibiting marked changes in central carbon metabolism, in particular an increased flux through the pentose phosphate pathway (Cadiere et al., 2011). This strain displays several novel traits that are potentially beneficial for winemaking (Cadière et al., 2011, 2012; Patent No. FR 09/05585, 20 November 2009). This strain produced, relative to the parental strain (Lalvin EC1118®), markedly less volatile

acidity but greater amounts of higher alcohols and esters; these characteristics make Affinity™ ECA5 an attractive strain for enhancing the organoleptic qualities of wine (Cadière et al., 2012). Thanks to a recently developed online monitoring system, the kinetic profiles of the production of various fermentative aroma compounds by the evolved and ancestral strains, Affinity™ ECA5 and Lalvin EC1118® were compared (Mouret et al., 2015). The high frequency of acquisition of online gas chromatography allows to determine kinetic parameters and to calculate the rates of synthesis for fermentative aromas (Mouret et al., 2014a). This innovative tool also makes it possible to determine the gas-liquid balances of aroma production to distinguish yeast metabolic synthesis from physicochemical effects (Morakul et al., 2013). Mouret et al. (2015) highlighted differences in the chronology of synthesis of fermentative aromas between the two strains, suggesting that the regulation of the synthesis of these compounds in the evolved strain differs from that in the ancestral strain, making them interesting models for metabolic studies.

The concentration of assimilable nitrogen is well known to have a major influence on fermentative aroma production (reviewed in Bell and Henschke, 2005). At low nitrogen content, a direct relationship between initial nitrogen content and higher alcohol concentration is observed, whereas an inverse relationship is found at moderate to high nitrogen quantities (Carrau et al., 2008; Jiménez-Martí et al., 2007; Vilanova et al., 2012, 2007). A more simple relationship exists between nitrogen concentration and synthesis of acetate and ethyl esters: an increase in initial nitrogen content is associated with an increase in ester production (Garde-Cerdán and Ancín-Azpilicueta, 2008; Hernandez-Orte et al., 2006; Torrea et al., 2011; Ugliano et al., 2010). Conversely, the influence of phytosterols on the synthesis of these molecules has only recently been studied (Rollero et al., 2015).

The objective of this study was to compare the kinetics of assimilation of nitrogen compounds and of production of fermentative aromas between the evolved strain and its ancestral strain.

In addition, this kinetic analysis was completed by a comparative transcriptomic study of the two strains, to elucidate the specificities of Affinity™ ECA5.

2. Materials & Methods

2.1. Yeast strains

The *S. cerevisiae* yeast strains used in this study are the commercial strains Lalvin EC1118® and Affinity™ ECA5 (Lallemand SA, Montreal, Canada), obtained by adaptive evolution of Lalvin EC1118®. Fermentation flasks were inoculated with 10 g/hl active dry yeast previously rehydrated for 30 minutes at 37°C in a 50 g/l glucose solution (1 g of dry yeast diluted in 10 ml of this solution).

2.2. Fermentation media

Fermentation was carried out on synthetic medium (SM) that simulates standard grape juice (Bely et al., 1990). The SM used in this study contained 200 g/l of sugar (100 g/l of glucose and 100 g/l of fructose); 6 g/l of malic acid; 6 g/l of citric acid; 750 mg/l of KH_2PO_4, 500 mg/l of K_2SO_4, 250 mg/l of $MgSO_4.7H_2O$, 155 mg/l of $CaCl_2.2H2O$, 200 mg/l of NaCl; vitamins (mg/l): myo-inositol (20), calcium pantothenate (1.5), thiamin hydrochloride (0.223), nicotinic acid (2), pyridoxine (0.25), biotin (0.003); oligoelements (mg/l): $MnSO_4.H_2O$ (4), $ZnSO_4.7H_2O$ (4), $CuSO_4.5H_2O$ (1), $CoCl_2.6H_2O$ (0.4), H_3BO_3 (1), $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ (1). The pH of the medium was adjusted to 3.3 with NaOH 10 M.

The nitrogen source was composed of ammonium chloride and amino acids. We used three concentrations of assimilable nitrogen: 70, 200 and 330 mg/l. The composition of the stock solution of amino acids was (in g/l): tyrosine (1.4), tryptophan (13.7), isoleucine (2.5), aspartate (3.4), glutamate (9.2), arginine (28.6), leucine (3.7), threonine (5.8), glycine (1.4), glutamine (38.6), alanine (11.1), valine (3.4), methionine (2.4), phenylalanine (2.9), serine (6.0), histidine (2.5), lysine (1.3), cysteine (1.0) and proline (46.8). To obtain 70 mg/l of

assimilable nitrogen in the MS, 2.16 ml of this solution and 75 mg/l of NH_4Cl were added to the medium; for 200 mg/l, 6.16ml of amino acid solution, and 220 mg/l of NH4Cl were added and for 330 mg/l, 10.16 ml of amino acid solution and 360 mg/l of NH_4Cl were added.

SM medium was initially supplemented with three different concentrations of phytosterols (85451, Sigma Aldrich): 2, 5 and 8 mg/l to satisfy the lipid requirements of yeast cells during anaerobic growth. The stock solution was composed of 15 g/l of phytosterols in Tween 80 and ethanol (1:1, v/v). Phytosterol additions during fermentation were performed at 8 mg/l.

2.3.Fermentation conditions

Fermentations were performed in 300 ml fermenters with musts containing three levels of assimilable nitrogen (70, 200 and 330 mgN/L), and three levels of phytosterols (2, 5 and 8 mg/l), at three temperatures (20, 24 and 28°C) were performed. The data presented in the box-plot (Figure 1) were obtained in a previous study for the Lalvin EC1118® (Rollero et al., 2015). The same Box-Behnken design (Rollero et al., 2015) was used to study the response of Affinity™ ECA5 to the changes of fermentation conditions. The concentrations of volatile compounds in the liquid phase were measured by GC-MS, using the method described in Rollero et al., 2015.

Fermentations were run in 10 l stainless steel tanks at 24°C. The amount of CO_2 released was measured accurately and automatically with a gas mass flow meter for calculation of the rate of CO_2 production (dCO_2/dt). Anaerobiosis was obtained by bubbling argon in the medium.

Each fermentation was performed once, except the condition with 330 mg/l of nitrogen and 8 mg/l of phytosterols that was done in duplicate. We previously determined that experiments run with this online monitoring system yield highly reproducible results (Mouret et al., 2014a, 2012). In this work, for all the various volatile compounds assessed, the relative standard deviation (SD) between duplicates was very low throughout the fermentation process: 3% for

propanol, 4% for isobutanol, 4% for isoamyl alcohol, 2% for ethyl acetate, 3% for isobutyl acetate, 5% for isoamyl acetate, 4% of for ethyl hexanoate and 5% for ethyl octanoate.

2.4.Cell population

During fermentation, the cell population was determined using a Coulter counter (Model Z2, Beckman-Coulter, Margency, France) fitted with a 100 µm aperture probe.

2.5.Measurement of assimilable nitrogen

Ammonium concentration was determined enzymatically (R-Biopharm, Darmstadt, Germany).

The free amino acid content of the must was determined by cation exchange chromatography, with post-column ninhydrin derivatization (Biochrom 30, Biochrom, Cambridge, UK) as described by (Crepin et al., 2012).

2.6.Analysis of volatile compounds

The concentrations of volatile compounds in the headspace of the tank were measured with an online GC device. Headspace gas was pumped from the tank at a flow rate of 14 mL/min, through a heated transfer line. Carbon compounds were concentrated in a cold trap (Tenax TM) for 6 minutes, desorbed at 160 °C for 1 minute, and analysed with a Perichrom PR2100 GC coupled to a flame ionization detector (Alpha MOS, Toulouse, France). The details of the GC method and the calibration procedure were as previously described by (Mouret et al., 2014a,b).

2.7.Volatile compound balances during fermentation

Concentrations in the liquid

The concentration of a volatile compound in the liquid [$C^{liq}(t)$] was calculated from the concentration measured online in the gas phase, expressed as $C^{gas}(t)$ in mg/l CO_2, using the partition coefficient (k_i) value (equation 1):

$$C^{liq}(t) = \frac{C^{gas}(t)}{k_i} \qquad (Equation\ 1)$$

The value of k_i (equation 2) was calculated using the model developed by Morakul et al. (2011), as a function of the fermenting must composition, characterized by ethanol concentration and temperature:

$$lnk_i = F1 + F2 * E - \frac{F3 + F4 * E}{R}\left(\frac{1,000}{T} - \frac{1,000}{T_{ref}}\right) \qquad (Equation\ 2)$$

where E is the ethanol concentration (g/l) in the liquid phase, calculated from the measurement of the amount of CO_2 released, which is proportional to sugar consumption; T is the current absolute temperature, T_{ref} the absolute reference temperature (i.e. 293.15K, or 20°C in this study). *F1*, *F2*, *F3* and *F4* are constants, identified for each volatile compound. The values of these parameters for the various molecules considered have been determined by Mouret et al. (2014a,b).

Losses in the exhaust gas

Losses into the exhaust gas were calculated using equation 3:

$$L(t) = \int_0^t C^{gas}(t) * Q(t) * dt \qquad (Equation\ 3)$$

where $Q(t)$ is the CO_2 flow rate at time $_t$, expressed in l CO_2/l must/h.

The relative losses (RL), expressed as a percentage of total production (*P (t)*) are determined as follows (Equation 4):

$$RL = \frac{L(t)}{P(t)} = \frac{\int_0^{t_{end}} C^{gas}(t) * Q(t) * dt}{C^{liq}(t_{end}) + \int_0^{t_{end}} C^{gas}(t) * Q(t) * dt} \qquad (Equation\ 4)$$

which t_{end} is the final fermentation time in hours.

Total production

The total production of a volatile compound at time *t*, expressed as *P(t)* in mg/l must, was calculated by adding the concentration in the liquid phase, expressed as $C^{liq}(t)$ in mg/l must, to the amount of the volatile compound lost in the gas phase, expressed as *L(t)* in mg/l must (equation 5):

$$P(t) = C^{liq}(t) + L(t) \qquad (Equation\ 5)$$

This production value represents the capability of the yeast to produce a volatile compound, independent of the subsequent fate of the compound - accumulation in the liquid phase or evaporation.

2.8.Data processing and statistical analyses

Statistical analysis was performed with R software, version 3.1.1 (R Development Core Team, 2014).

We obtained three data sets where each variable of interest is a curve along the time (h) that we expressed in terms of consumed sugar (g/l). We chose to summarize these three datasets in modeling each curve with an adequate model and from this to extract criteria of interest.

First of all, for each condition, the biomass was modeled using a Weibull model with the drc package (Ritz and Streibig, 2005). The one four-parameter Weibull model is written:

$$f(x) = c + (d - c)\left[1 - exp^{-exp^{[b\,(\ln(x) - \ln(e))]}}\right] \qquad (Equation\ 6)$$

This four-parameter ascending function is asymmetric with inflection point at the time e. For each modeled function, we extracted several criteria of interest: the µmax, defined as the maximal of the ratio f'(t)/f(t) for each t, expressed in h^{-1}; the inflection point, expressed in consumed sugar g/l and the maximal of biomass expressed in 10^6 cells.

Considering the amino acids (AA) consumption, we modeled each AA at each condition always with the drc package and a Weibull model. The four-parameter Weibull function is written:

$$f(x) = c + (d - c)exp^{-\exp[b(ln(x) - ln(e))]} \qquad (Equation\ 7)$$

This four-parameter decreasing function is asymmetric with inflection point at the time e. For each modeled function, we extracted the following criteria: the maximal rate which is the maximal of the first derivative of the function expressed in mg/l.h, the inflection point and the point at which the quantity of AA is null (called Point.AA0) both expressed in consumed sugar g/l.

For these two parametric models, the normality of residual distributions and homogeneity of variance were studied with standard diagnostic graphs; no violation of the assumptions was detected.

Then, each volatile compound of each condition was modeled using a non-parametric model using the cellGrowth package (Gagneur and Neudecker, 2012). The model used is a local

regression and allows extracting the inflection point expressed in consumed sugar (g/l), the maximal production in mg/l and the maximal rate (maximal of the first derivative in mg/l.h). To calculate the specific rate, we divided the first derivative of the model (the rate) by the population, as estimated above. Finally, we kept the maximal of the specific rate (SRmax) and the time where this maximum was reached expressed in consumed sugar (g/l) (PointSRmax).

To provide an overview of the data set, a principal component analysis (PCA) was carried out with the FactoMineR package (Husson et al. 2012).

A multivariate factorial analysis (MFA) was then performed for two strains (Lalvin EC1118® and Affinity™ ECA5), at two levels of nitrogen (70 and 330 g/l) and two levels of phytosterols (2 and 8 mg/l). This enables the study of links between consumption of AA and volatile compounds production (Husson et al. 2012).

2.9.Gene expression analysis

For each fermentation condition (SM330, 8 mg/l of phytosterols with the two strains), three independent fermentations were carried out in parallel and sampled when CO_2 production reached 35 and 70 g/L, corresponding to two different phases of aroma metabolism. Cells ($1x10^9$ cells) were harvested 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 8x15k gene expression microarrays (Design ID 038619 with 40 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). The hybridization signal was detected with a GenePix 4000B laser Scanner (Axon Instruments).

The limma package (Smyth and Speed, 2003) was used to import and normalize the global microarray data (quantile method for normalization between arrays). The whole data set is available on the "Gene Expression Omnibus Database" (No. GSE68354). Transcriptomic data were analyzed with two different methods.

For each CO_2 released (35 g/l and 70 g/l) and based on this normalized dataset of 6200 expression data for the two strains, we used a sparse partial least square – discriminant analysis (sPLS-DA), which is an exploratory approach in a supervised context, in order to select the most important transcripts relative to the four samples (Le Cao et al., 2011). We tuned the number of dimensions of the sPLS-DA to 2 and the number of variables to choose on these two dimensions to 500 (250 for each).

A functional analysis was performed on the selected transcripts by time point, in order to highlight significant functional groups according to the Gene Ontology (GO) process terms using the Genecodis program (Nogales-Cadenas et al., 2009) with the FDR method at a p value cutoff of 0.05 (Benjamini and Hochberg, 1995).

For each time point, a multivariate factorial analysis (MFA) was then performed to obtain an overview of the dataset, which consisted in 513 variables measured for two strains (Lalvin EC1118® and Afiinity™ ECA5) and for the two times of sampling. The data set included a set of individuals described by two types of variables: the normalized expression of the 500 transcripts selected by the sPLA-DA according to the two strains, and the 13 compounds (or ratios) produced during the fermentation by the two strains. The MFA takes into account the structure of the two groups of data and balances the influence of each group of variables. This enables the study of links between expression data and volatile compounds production (Husson et al., 2012).

To determinate the differential gene expression between experimental conditions, a modified t-test was performed by filtering on confidence at $p < 0.05$, using the Benjamini and Hochberg false discovery rate as multiple testing correction of the t-test p-values (Benjamini and Hochberg, 1995). The genes with different expression were grouped according to Gene Ontology (GO) process terms using the Genecodis program (Nogales-Cadenas et al., 2009).

3. Results

3.1. Relative performances of Affinity™ ECA5 compared to Lalvin EC1118®

In previous studies (Cadiere et al., 2011, 2012; Mouret et al., 2015)**,** the properties of Affinity™ ECA5 and of the ancestral strain Lalvin EC1118® were compared and major differences were identified. Especially, the production of fermentative aromas was enhanced for the evolved strain (Cadière et al., 2012). In the present work, we sought to evaluate the robustness of this phenotype in different environmental conditions. Thanks to a Box-Behnken design (Rollero et al., 2015), we evaluated the combined effects of three environmental parameters: initial content of assimilable nitrogen, phytosterols and temperature, with broad ranges of variations for each factor.

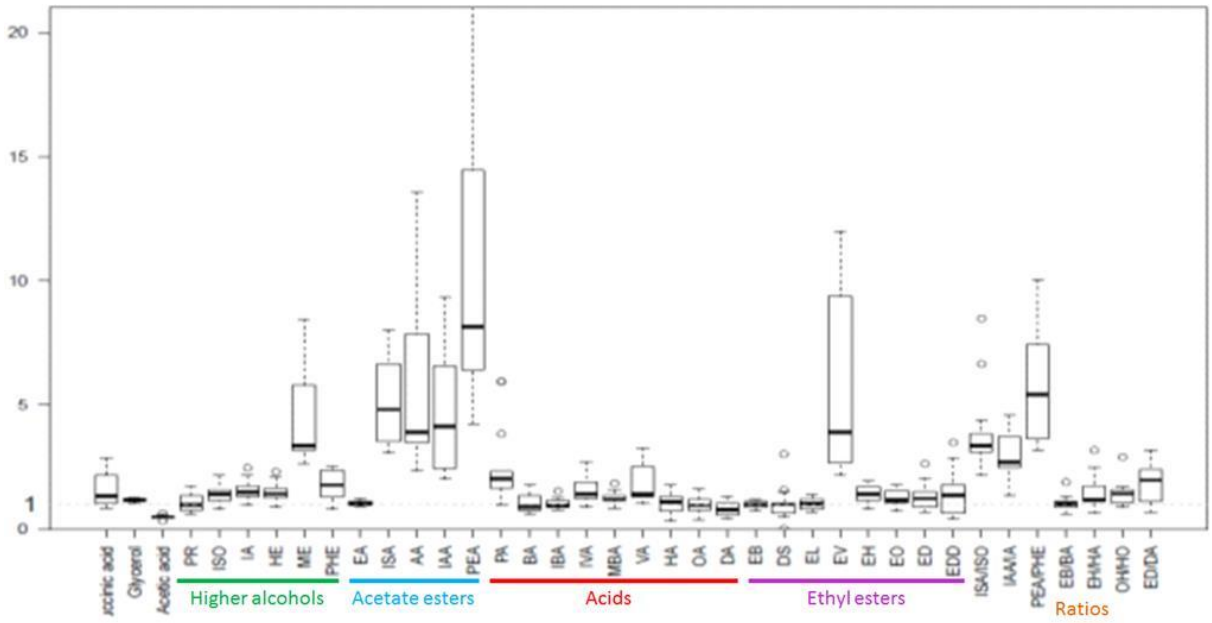


Figure 1: Ratios between final liquid concentrations of fermentative aromas produced by Affinity™ ECA5 and Lalvin EC1118®

PR: propanol; ISO: isobutanol; IA: isoamyl alcohol; HE: hexanol; ME: methionol; PHE: 2-phenylethanol; EA: ethyl acetate; ISA: isobutyl acetate; AA: amyl acetate; IAA: isoamyl acetate; PEA: 2-phenylethylacetate; PA: propanoic acid; BA: butanoic acid; IBA: isobutanoic acid; IVA: isovaleric acid; MBA: 2-methylbutanoic acid; VA: valeric acid; HA: hexanoic acid; OA: octanoic acid; DA: decanoic acid; EB: ethyl butanoate; DS: diethyl succinate; EL: ethyl lactate; EV: ethyl valerate; EH: ethyl hexanoate; EO: ethyl octanoate; ED: ethyl decanoate; EDD: ethyl dodecanoate

For each aroma compound, we plotted the ratio of final concentration obtained with the strain Affinity™ ECA5 divided by the one obtained for Lalvin EC1118® (Figure 1). These ratios were systematically greater than 1 for higher alcohols (except for propanol) and acetate esters. Conversely, we found that for the ratios for the fatty acids and ethyl esters, 1 was included in the confidence interval. So, we can conclude that regardless the conditions of fermentation Affinity™ ECA5 overproduced systematically higher alcohols (except propanol) and acetate esters compared to the ancestral strain, while under certain conditions, the production of acids and ethyl esters did not enables a discrimination between the two strains.

To better understand the mechanisms responsible for these differences, the production of volatile compounds was followed throughout fermentation using an online monitoring system

(Morakul et al., 2011) for both strains. We studied the impact of initial concentrations of nitrogen and phytosterol, which are key grape must nutrients having a great influence on aroma compounds (Rollero et al, 2015). Two levels of nitrogen (70 and 330 mg/l) and phytosterol (2 and 8 mg/l) were tested. For all fermentations, nitrogen was exhausted at the end of the growth phase and sugars were exhausted at the end of the fermentation.

3.1.1. Impact of nutrients on nitrogen metabolism

The consumption of nitrogen sources (amino acids and ammonium) was monitored throughout the cell growth phase until nitrogen exhaustion. The modeling of this consumption enables the determination of the timing (expressed in consumed sugars) of depletion of each nitrogen source (called Point.AA0) for the different culture media and strains (Figure 2).

As expected, the overall consumption phase of nitrogen was shorter in the media containing 70 mg/l of nitrogen compared to those containing 330 mg/l. Moreover, the order to assimilate nitrogen sources was generally the same for both strains and consistent with that described by Crepin et al. (2012).

With SM70 (in orange and beige on figure 2), the consumption of nitrogen source by Affinity™ ECA5 (triangles) was generally faster than for Lalvin EC1118® (circles), except for ammonium (Figure 2). We also observed an effect of the dose of phytosterols on the consumption of various nitrogen sources for the two yeast strains. Depletion of nitrogen sources occurred faster at the lowest lipid concentration (in orange); but the effect was higher for Affinity™ ECA5, especially for valine, phenylalanine, leucine. Indeed, the differences between the values of Point.AA0 obtained with 2 mg/l and 8 mg/l were greater for this strain than for the ancestral strain.

With SM330 (in blue and purple on figure 2), the dose of phytosterols still modulated the nitrogen consumption. But an increase of phytosterol content usually had an opposite effect on this consumption for the two strains. Indeed, Affinity™ ECA5 consumed nitrogen more rapidly when the must contained 2 mg/l of phytosterols (in blue); while Lalvin EC1118® generally consumed faster nitrogen with 8 mg/l (in purple). This opposite effect of lipid content on Point.AA0 values was particularly pronounced for tyrosine, tryptophan, glutamine and ammonium (Figure 2)

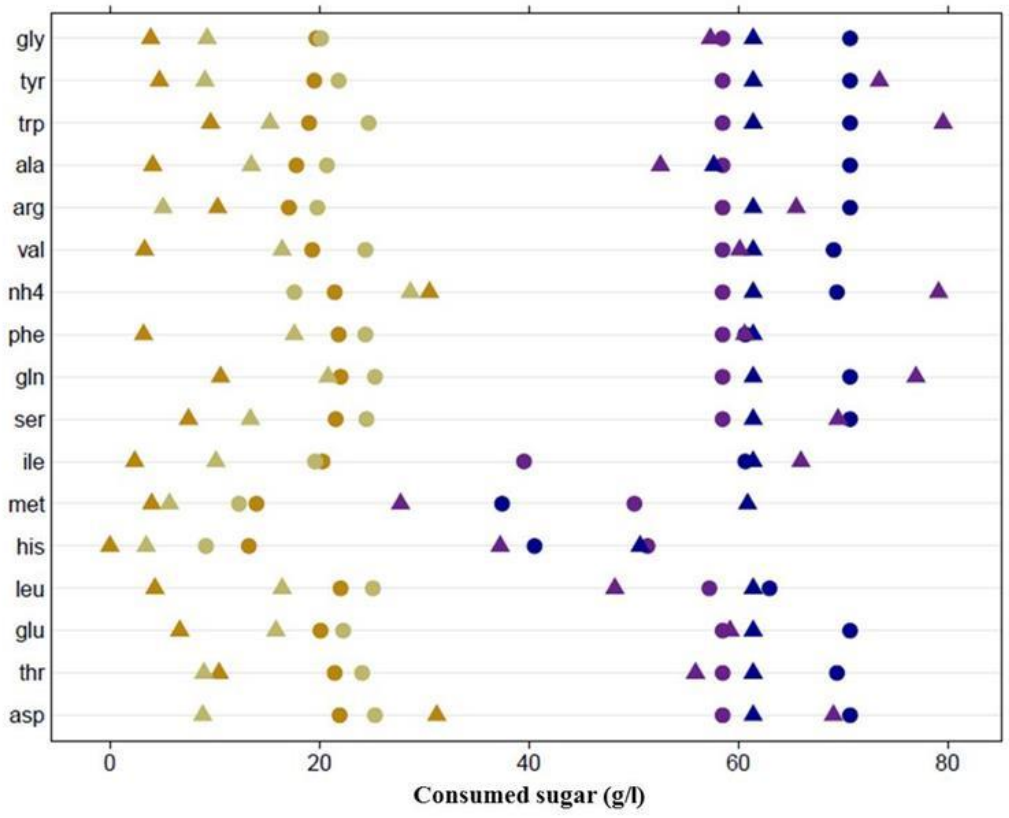


Figure 2: Timing of exhaustion of each nitrogen source (Point.AA0) expressed in consumed sugar (g/l) for each fermentation condition

Lalvin EC1118®-SM70-2 mg/l of phytoserols ( ); Lalvin EC1118®-SM70-8 mg/l of phytoserols ( ); Lalvin EC1118®-SM330-2 mg/l of phytoserols ( ); Lalvin EC1118®-SM330-8 mg/l of phytoserols ( ); Affinity™ ECA5-SM70-2 mg/l of phytoserols ( ); Affinity™ ECA5-SM70-8 mg/l of phytoserols ( ); Affinity™ ECA5-SM330-2 mg/l of phytoserols ( ); Affinity™ ECA5-SM330-8 mg/l of phytoserols ( )

Gly: glycine; Tyr: tyrosine; Trp: Tryptophan; Ala: alanine; Arg: arginine; Val: valine; NH4: ammonium; Phe: phenylalanine; Gln: glutamine; Ser: serine; Ile: isoleucine; Met: methionine; His: histidine; Leu: leucine; Glu: glutamate; Thr: threonine; Asp: aspartate

3.1.2. Impact of nutrients on fermentative aromas

We then decided to compare the capabilities of synthesis of fermentative aromas. Indeed, some amino acids are precursors of higher alcohols and acetate esters (Hazelwood et al., 2008). So we wondered if the observed differences in the nitrogen assimilation induced some variations in the production of volatile compounds.

We compared the kinetic profiles of production of fermentative aromas of the evolved and ancestral strains Affinity™ ECA5 and Lalvin EC1118® using an online GC system and making gas-liquid balances (Morakul et al., 2013; Mouret et al., 2014a) with a differentiation between accumulation in the liquid phase, losses in the gas phase and total production (sum of liquid content and gaseous losses). We present here data for the total production of fermentative aromas which reflects the true capacity of the yeast to synthesize these volatile compounds. In addition, the high measurement frequency of this original device makes it possible the calculation of the rates of total production of fermentative aromas (Mouret et al., 2014a,b). Biomass was also measured (off-line, Table S1), allowing calculation of specific rates of production. Such rates represent metabolic fluxes and are essential for understanding yeast metabolism.

From this data set, we performed a PCA, using three parameters (maximum specific rate of total production: SRmax, sugar consumption when the maximal specific rate of production:

PointSRmax and total production of each volatile compound: Max), to obtain an overview of the impact of fermentation conditions on the aroma synthesis (Figure 3). The two first PCA axes accounted for 78.4% of the total variation. The dispersion of fermentation conditions was greater for the fermentations performed with 330 mg/l of assimilable nitrogen and for the Affinity™ ECA5 strain. Another important point was the differential impact of environmental changes depending on the class of studied compounds (higher alcohols, acetate or ethyl esters). For the acetate and ethyl esters, the effect of nutrients on SRmax and Max was similar. Indeed, Max and SRmax of all esters were positively correlated and reached their maximum values for fermentations performed with Affinity™ ECA5 at high nitrogen content (Figure 3, Table 1). By contrast, the chronology of synthesis (PointSRmax) of the esters was affected differently by the changes of environmental parameters for the two classes of esters. For acetate esters, PointSRmax reached its maximal value for fermentations performed using Affinity™ ECA5 at both high nitrogen and phytosterol levels. For ethyl esters, the highest value of this parameter was obtained in SM70 for both strains (Figure 3). Finally, for ethyl esters there was the negative correlation between Max and SRmax, on the one hand; and PointSRmax on the other hand (Figure 3). Among the higher alcohols, propanol had an atypical response. Its behavior was almost similar to that observed for the acetate esters (Figure 3, Table1). SRmax and PointSRmax of isobutanol and isoamyl alcohol were similarly impacted by the nutrient contents. But these two higher alcohols differed in their total production: the maximal concentration of isobutanol was reached with at both high nitrogen and phytosterol concentrations; the maximal production of isoamyl alcohol was also obtained with Affinity™ ECA5 but at a low nitrogen concentration (Figure 3, Table 1). For isoamyl alcohol, a negative correlation between the Max and SRmax was observed.

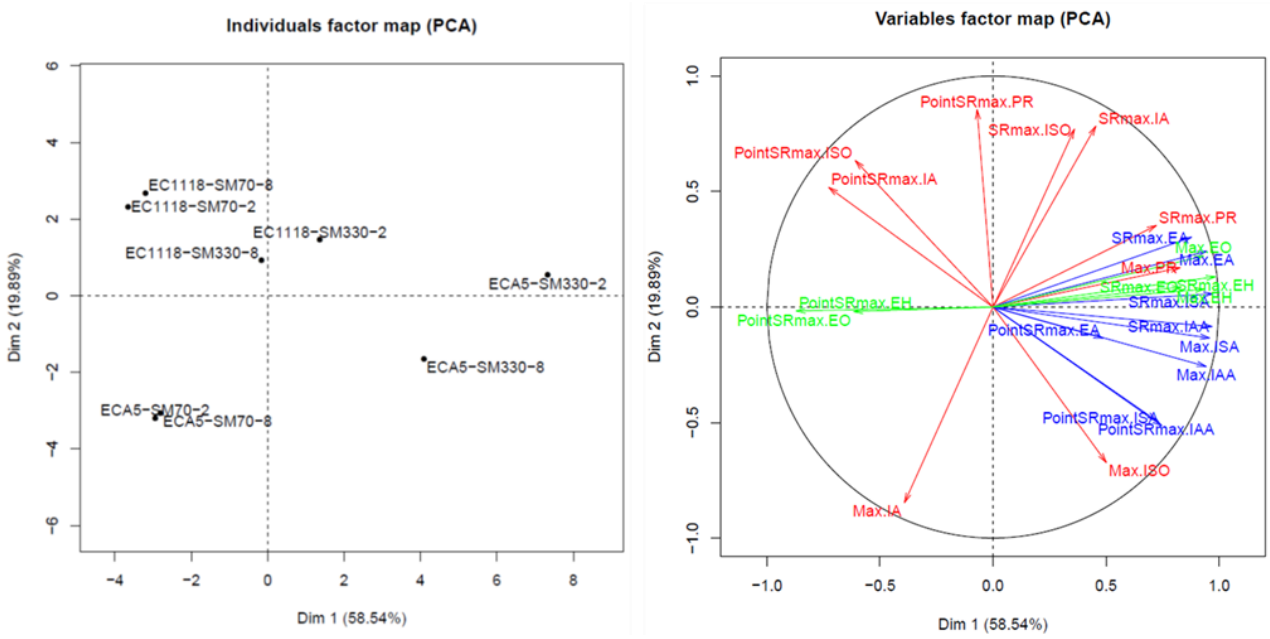


Figure 3: Principal component analysis (PCA) with the final production of volatile compounds (Max), the maximal specific rate of production (SRmax), the timing when this maximum was reached (PointSRmax).

Each fermentation is identified as X, Y, Z, where X corresponds to the strain, Y to the initial nitrogen concentration in mg N/l and Z is the phytosterol content in mg/l.

PR: propanol; ISO: isobutanol; IA: isoamyl alcohol; EA: ethyl acetate; ISO: isobutyl acetate; IAA: isoamyl acetate; EH: ethyl hexanoate; EO: ethyl octanoate

Besides this general characterization, we performed a detailed analysis of the kinetic profiles of ester production, with the example of isoamyl acetate (Figure 4). In SM330, we observed that the shape of the curve was related to the phytosterol content. At 2 mg/l of lipids, the specific production rate peaked very quickly and suddenly decreased, whereas at 8 mg/l of phytosterols, once the maximum value was reached the decrease was much slower (Figure 4). Conversely, at low nitrogen content, the shape of the curve was mainly mediated by the yeast strain with a higher production by Affinity™ ECA5 compared to Lalvin EC1118®. Finally, when comparing the maximal values of total production and of specific rate of these esters, a striking difference was observed in the ranking of fermentation conditions according to these two parameters (Figure 4, Table 1).

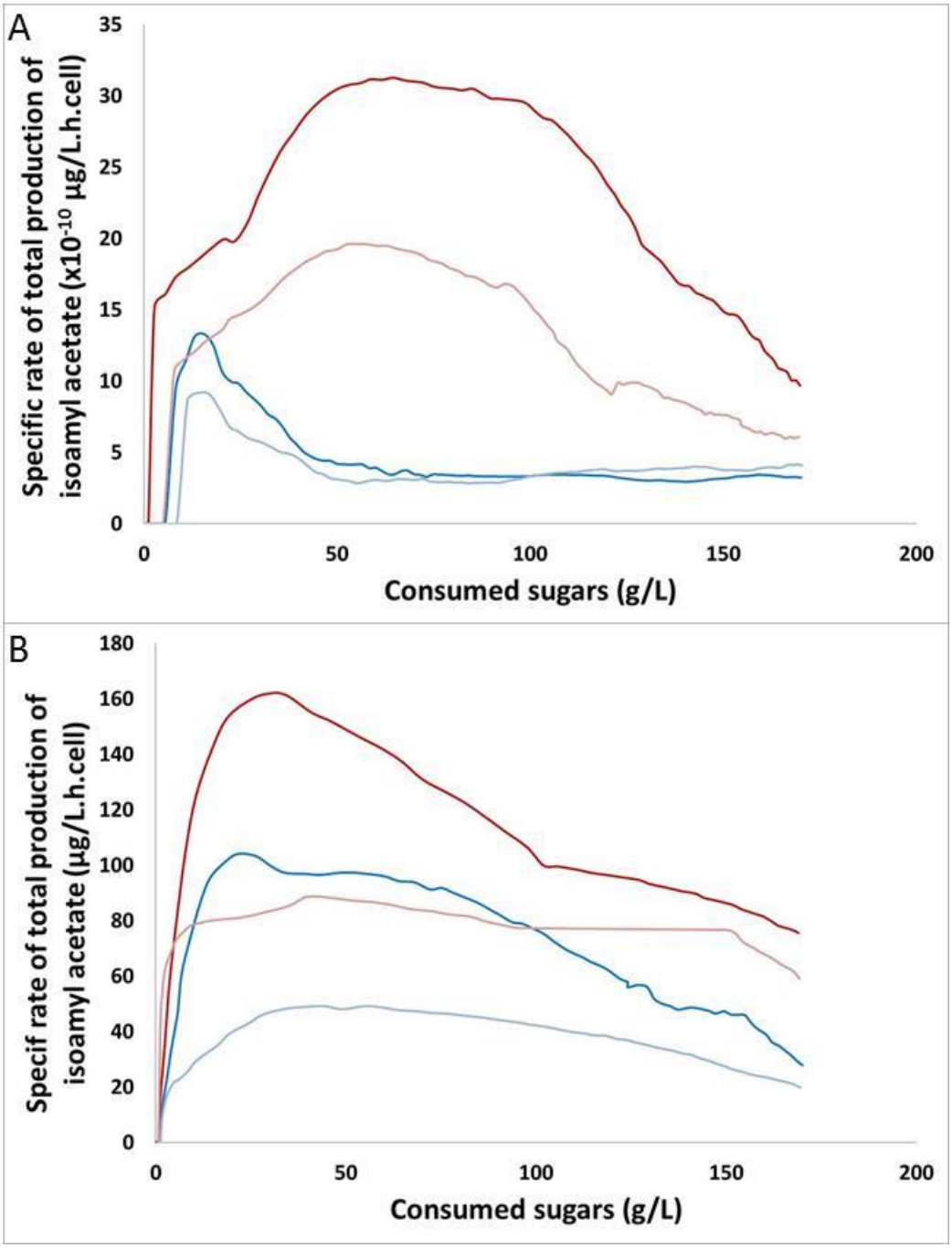


Figure 4: Changes in the specific rates of total production of isoamyl acetate in SM70 (A) or SM330 (B)

Lalvin EC1118®-2 mg/l of phytosterol (blue); Lalvin EC1118®-8 mg/l of phytosterol (light blue); Affinity™ ECA5-2 mg/l of phytosterol (red); Affinity™ ECA5-8 mg/l of phytosterol (pink)

Table 1: Total production of fermentative aromas for each fermentation condition

Initial nitrogen concentration (mglL)	Initial phytosterols concentration (mg/l)	Propanol		Isobutanol		Isoamyl alcohol	
		Total production (mg/l) by EC1118	Total production (mg/l) by ECA5	Total production (mg/l) by EC1118	Total production (mg/l) by ECA5	Total production (mg/l) by EC1118	Total production (mg/l) by ECA5
70	2	5.04	4.52	25.8	36.1	165	276
70	8	5.25	4.63	28.8	36.5	175	270
330	2	25.6	22.2	19.9	42.1	103	148
330	8	27.6	21.2	36.3	54.9	156	221

Initial nitrogen concentration (mg/l)	Initial phytosterols concentration (mg/l)	Ethyl acetate		Isobutyl acetate		Isoamyl acetate	
		Total production (mg/l) by EC1118	Total production (mg/l) by ECA5	Total production (mg/l) by EC1118	Total production (mg/l) by ECA5	Total production (mg/l) by EC1118	Total production (mg/l) by ECA5
70	2	37.7	27.1	0.05	0.23	0.45	3.29
70	8	39.7	22.9	0.05	0.19	0.43	2.14
330	2	67.7	124	0.36	1.79	3.83	13.0
330	8	52.8	73.3	0.31	1.45	2.87	12.0

Initial nitrogen concentration (mg/l)	Initial phytosterols concentration (mg/l)	Ethyl hexanoate		Ethyl octanoate	
		Total production (mg/l) by EC1118	Total production (mg/l) by ECA5	Total production (mg/l) by EC1118	Total production (mg/l) by ECA5
70	2	0.67	0.72	0.64	0.62
70	8	0.63	0.68	0.57	0.55
330	2	1.32	1.71	1.71	2.05
330	8	0.88	1.07	1.26	1.18

3.1.3. Relationship between nitrogen consumption and aroma production

Then, we studied the potential links between the consumption of amino acids and the production of fermentation aromas. For this purpose, two MFA (once for each strain) were performed with the PointSRmax for volatile compounds and the Point.AA0 for the amino acids precursors of higher alcohols (leucine, valine, and threonine), ammonium and total assimilable nitrogen (Figure 5). For Lalvin EC1118®, the two first MFA axes accounted for 98.8% of the total variation (Figure 5a), while these axes accounted for 94.6% of the total variation for Affinity™ ECA5 (Figure 5b). The relationships between the parameters related to the assimilation of amino acids and those representatives of aroma synthesis were completely

different for the two yeasts strains (Figure 5). For Lalvin® EC1118, the two classes of variables were negatively correlated (except for isobutyl acetate), whereas for Affinity™ ECA5, most of variables were positively correlated.

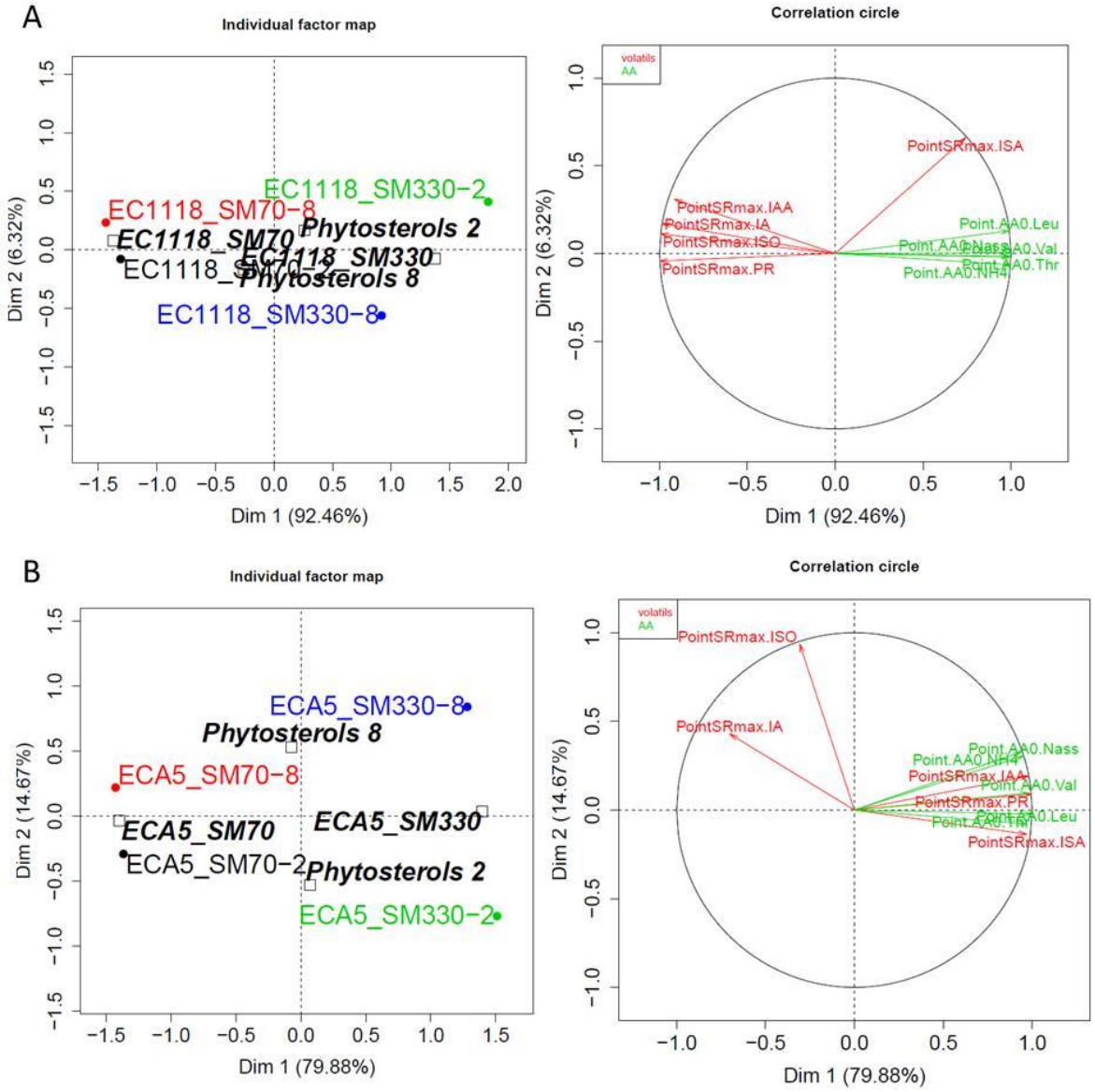


Figure 5: Multivariate factorial analysis (MFA) with the timing when amino acid was exhausted (Point.AA0) and the timing corresponding to the maximal specific rate of total production of aromas (PointSRmax) for Lalvin EC1118® (A) and Affinity™ ECA5 (B).

Each fermentation is identified as X, Y, Z, where X corresponds to the strain, Y to the initial nitrogen concentration in mg N/l and Z is the phytosterol content in mg/l.

PR: propanol; ISO: isobutanol; IA: isoamyl alcohol; EA: ethyl acetate; ISO: isobutyl acetate; IAA: isoamyl acetate; EH: ethyl hexanoate; EO: ethyl octanoate; Leu: leucine; Val: valine; Thr: threonine; NH4: ammonium; Nass: initial assimilable nitrogen

3.2. Bioconversion between higher alcohol and its acetate

In previous studies and in the general screening using the Box-Behnken design, we observed a systematic overproduction for higher alcohols and acetate esters by Affinity™ ECA5 (Figure 1). We wondered if the overproduction of acetate esters by the evolved strain was solely due to the overproduction of their higher alcohol and/or acetyl-CoA precursors or if the activity of the alcohol acetyltransferases (Atf1p and /or Atf2p) responsible of this bioconversion was also involved.

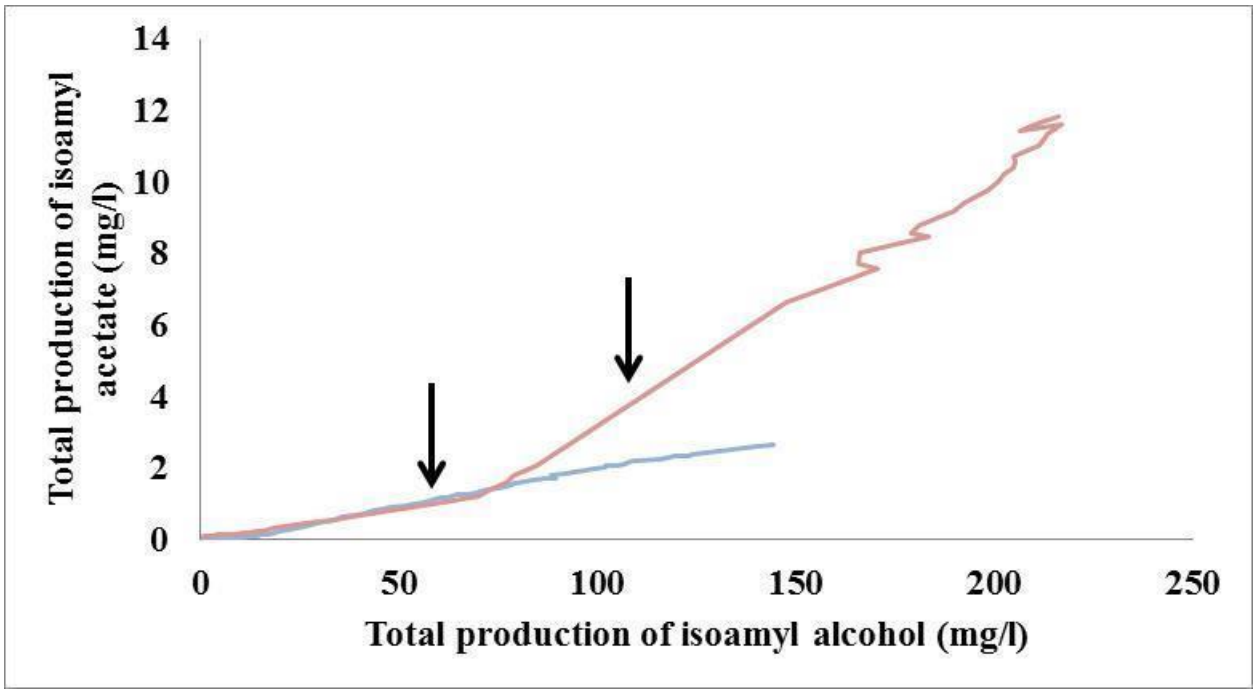


Figure 6: Changes in total isoamyl acetate production as a function of total isoamyl alcohol production in SM330 with 8 mg/l of phytosterols for Lalvin EC1118® (blue) and Affinity™ ECA5 (red).
The arrows indicate the timing of sampling for transcriptomic analyses.

Table 2: Production yields of acetate ester from its higher alcohol precursor

Production yield from higher alcohol (mg/mg) for Lalvin EC1118®		SM70 2mg/l	SM70 8mg/l	SM330 2mg/l	SM330 8mg/l
Isobutyl acetate	First phase	$2.70x10^{-3}$	$2.80x10^{-3}$	$2.55x10^{-2}$	$1.17x10^{-2}$
	Second phase				
Isoamyl acetate	First phase	$1.90x10^{-3}$	$1.60x10^{-3}$	$4.40x10^{-2}$	$2.04x10^{-2}$
	Second phase	$3.40x10^{-3}$	$3.10x10^{-3}$		

Production yield from higher alcohol (mg/mg) for Affinity™ ECA5		SM70 2mg/l	SM70 8mg/l	SM330 2mg/l	SM330 8mg/l
Isobutyl acetate	First phase	$1.30x10^{-3}$	$8.00x10^{-4}$	$1.95x10^{-2}$	$5.20x10^{-3}$
	Second phase	$1.02x10^{-2}$	$8.90x10^{-3}$	$6.51x10^{-2}$	$4.21x10^{-2}$
Isoamyl acetate	First phase	$6.00x10^{-3}$	$3.70x10^{-3}$	$9.84x10^{-2}$	$1.58x10^{-2}$
	Second phase	$1.75x10^{-2}$	$1.15x10^{-2}$		$7.07x10^{-2}$

We studied two couples higher alcohol / acetate ester: isobutanol and isobutyl acetate; and isoamyl alcohol and isoamyl acetate. For these two couples and for both strains, the conversion yield was dependent on the initial nitrogen and phytosterol content: these highest yields were obtained at high nitrogen content (330 mg/l) and low phytosterol concentration (2 mg/l) (Table 2, Figure 6). For Lalvin EC1118®, the yield throughout the fermentation was constant. By contrast, for Affinity™ ECA5, there were generally two production phases, with a yield comparable to that of Lalvin EC1118® during the first phase and a much higher yield in the second phase. The transition occurred during the stationary phase and was particularly visible with SM330 and 8 mg/l of phytosterols for Affinity™ ECA5 (Figure 6). A possible hypothesis to explain this drastic change of enzymatic activity can be related to the presence of lipids that are known to repress the expression of *ATF1* (Fujii et al., 1997).

To evaluate this hypothesis, we added phytosterol (8 mg/l) at different stages of the fermentation. These additions had no effect on the bioconversion of isoamyl alcohol to isoamyl acetate (Figure 7) and isobutanol / isobutyl acetate (data not shown) by Lalvin EC1118®. The corresponding bioconversion yields remained constant despite the additions. By contrast, the addition of phytosterols dramatically lowered the bioconversion of higher

alcohols for Affinity™ ECA5. Indeed, after each lipid addition, the yield was divided by two (Figure 7).

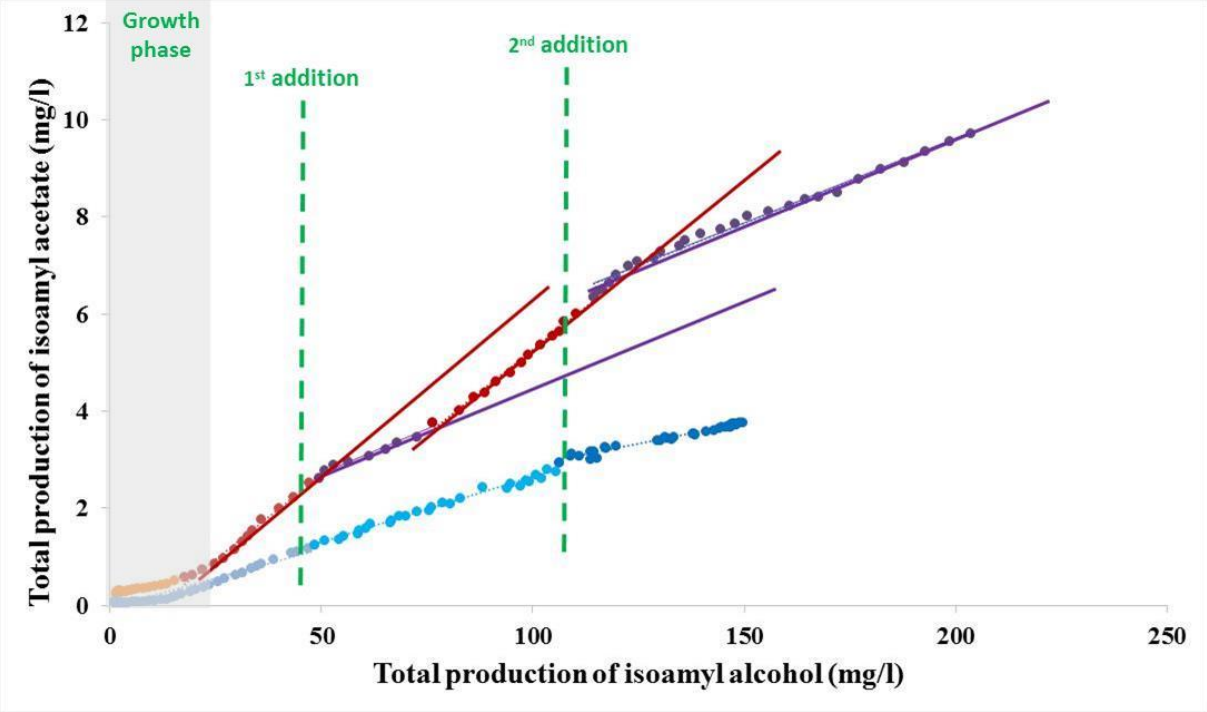


Figure 7: Changes in total isoamyl acetate production as a function of total isoamyl alcohol production in SM330 with 8 mg/l of phytosterols for Lalvin EC1118® (green) and Affinity™ ECA5 (blue and red).

For Lalvin EC1118®, three linear phases are identified; their yields of conversion are 0.0241 (R2 = 0.947); 0.0268 (R2 = 0.985); 0.0211 (R2 = 0.955), respectively.
For Affinity™ ECA5, four linear phases are identified, their yields of conversion are 0.0689 (R2 = 0.990); 0.0367 (R2 = 0.966); 0.0696 (R2 = 0.991); 0.0351 (R2 = 0.955), respectively.

To better understand the underlying mechanisms, we performed a transcriptomic analysis of the two strains. Cells were sampled at 35 g/l and 70 g/l of CO_2 released (arrows in Figure 6). For Affinity™ ECA5, the first sample was collected before the change of bioconversion yield of isoamyl alcohol to its acetate ester and the second after this shift. A sparse PLS-DA analysis was performed with the normalized transcriptomic data and the production of all fermentative aromas. This approach first allowed the selection of 500 genes (250 for each axis) that displayed the largest differences in their expression according to the strain or the sampling time. On the MFA representing the analysis (Figure 8), the first two dimensions

accounted for 93 % of the total variation and clearly discriminated sampling times (among the first axis) and strains (among the second axis). The correlation circle allowed highlighting 4 groups of genes with highly correlated expression (Figure 8, Table S2). A large part of genes belonging to the first group were identified using the Genecodis3 program as involved in sterol biosynthesis and oxidation-reduction processes (Table S3). This group appeared to be negatively correlated with the third one that was enriched with genes related to cellular amino acid biosynthetic processes. These two genes clusters were the main contributors to the differentiation between strains. Affinity™ ECA5 exhibited a high expression of genes of group 3 combined with a down-regulation of those of group 1, unlike Lalvin EC1118®. The other groups, 2 and 4, predominantly consisted of genes related to translation and DNA repair, respectively. Genes of the second group were over-expressed at 35 g/l of CO_2 released while genes of the fourth one are down-regulated compared with the sampling time 70 g/l of CO_2 released, irrespective of the strain. These two latter groups allowed the distinction of the sampling time. Interestingly, the sparse PLS-DA analysis showed a negative correlation between the genes involved in the sterol biosynthesis pathway and the aroma compounds: the expression of these genes was down-regulated when the concentration of fermentative aroma was maximal. At the opposite, a positive correlation was found between the expression of these genes and the formation of acetate.

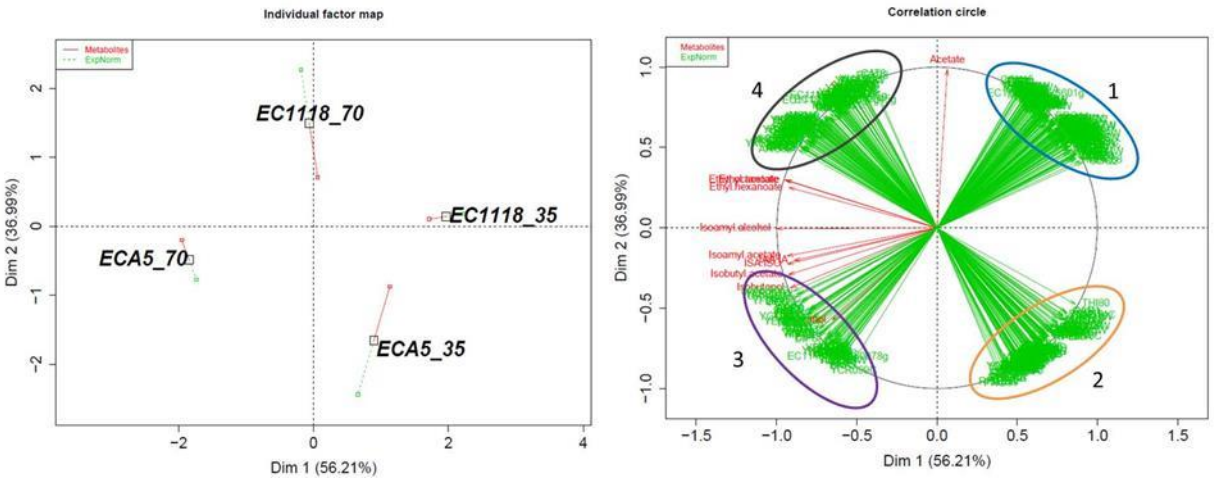


Figure 8: Multivariate factorial analysis (MFA) with the genes obtained by sparse PLS-DA and 13 metabolites or ratios. Each fermentation is identified as X, Y, where X corresponds to the strain and Y is the timing of sampling.

1: Genes involved in sterol biosynthesis and oxido-reduction process; 2: Genes involved in translation; 3: Genes involved in cellular amino acid biosynthetic process, 4: Genes involved in DNA repair.
ISA.ISO: ratio of isobutyl acetate on isobutanol; IAA.IA: ratio of isoamyl acetate on isoamyl alcohol

We then focused on differences between strains regarding the sampling times that corresponded to two different phases of acetate esters formation by Affinity™ ECA5 while the formation yield of these volatile molecules by Lalvin EC1118® remained constant. To this end, we looked for variations between strains in pair-wise comparisons (with a fold change greater than 1.8) of the genes expression profiles obtained at the two sampling times (Table S4). Unexpectedly, no changes were observed in the expression of *ATF1* or *ATF2* in the evolved strain that could explain the increased formation of acetate esters at 70 g/l of CO2 released. In contrast, substantial differences were found in the expression of many genes involved in lipids metabolism, particularly in sterols biosynthesis, that were down-regulated in Affinity™ ECA5 (Figure 9). At the same time, several genes involved in glycogen and trehalose biosynthesis and transmembrane transport were overexpressed in the evolved strain.

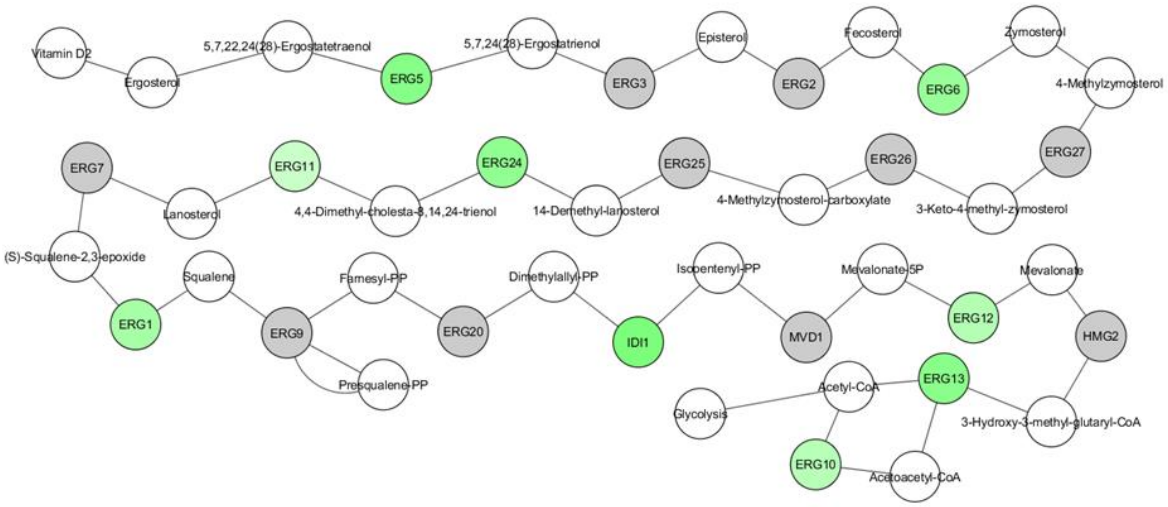


Figure 9: Comparison of expression of genes involved in the sterol biosynthesis pathway in Affinity™ ECA5 between the two sampling times.

White circles represent metabolites. Gray circles represent genes which are not differentially regulated. Green circles represent down-regulated genes.

4. Discussion

The aim of our study was to better understand the metabolic reshaping of Affinity™ ECA5 due to adaptive evolution (Cadiere et al., 2011). For this purpose, we combined two approaches. First, we studied the response of the evolved strain and its ancestral strain Lalvin EC1118® to the modification of two key environmental parameters (nitrogen and phytosterols) in combination with a precise kinetic monitoring of the production of fermentative aromas. Especially, we calculated the specific rates of production of the different fermentative aromas throughout the fermentation process; these parameters are of primary interest because they are representative of the metabolic fluxes of the yeast. Then, these kinetic data were combined with the analysis of gene expression profile. This transcriptomic analysis was performed during the stationary phase when the two strains showed the greatest differences in the production of volatile compounds, especially in the bioconversion higher alcohols in acetate esters.

We observed an interaction between nitrogen and phytosterol content for both strains, which was particularly remarkable in the media containing 330 mg/l of assimilable nitrogen and for Affinity™ ECA5. This interaction between these two nutrients resulted in differences in the kinetics profiles of both consumption of amino acids and synthesis of fermentative aromas.

Nitrogen / phytosterols interaction was stronger in SM330 than in SM70; this could be explained by the availability of lipids per cell. Indeed, in SM70, the population was lower, so each cell had enough lipids available. Conversely, in SM330, the yeast population was more important; the cells had less phytosterols available, making this parameter more discriminating. Moreover, this interaction was stronger for the strain Affinity™ ECA5 regardless the concentration of nitrogen. An analysis of biomass composition showed that the lipid content was four times higher in the evolved strain than in the ancestral strain (Cadière et al., 2011), suggesting a modification of lipid metabolism during the adaptive process.

It was interesting to note that the fermentation conditions had a different impact depending on the consumption of amino acids and on the class of studied compounds (higher alcohols, acetate or ethyl esters).

At first, we focused our attention on nitrogen assimilation. In contrast to SM70, where exhaustion of nitrogen sources occurred faster at the lowest lipid concentration for the both strains (Figure 2), in SM330, an increase of the initial phytosterol concentration had opposite effect of the rates of consumption of amino acids for the Lalvin EC1118® and Affinity™ ECA5. At 8 mg/l of phytosterols, the assimilation of nitrogen was faster for Lalvin EC1118® and slower for Affinity™ ECA5 compared to 2 mg/l (Figure 2). The amino acids for which the effect of phytosterols was different depending on the strain were mainly ammonium and late consumed amino acids (according to the classification of Crepin et al., 2012). The carriers of these nitrogen sources are encoded by genes that are controlled by the nitrogen catabolite repression (NCR). These observations suggest differences in the regulation of the

consumption of these nitrogen sources between the evolved and ancestral strains. In line with these results, the comparison of the gene expression profiles of the two strains showed an overexpression of the genes *MEP2* (coding for an ammonium transporter) and *GAP1* (coding for the carrier of alanine, arginine and glycine) in the evolved strain. The adaptive evolution could have therefore triggered changes in the transcriptional or post-transcriptional regulation of these NCR-regulated carriers.

The phytosterol content of the must also affected the consumption efficiency of nitrogen sources by the two strains. This effect could be explained by changes in plasma membrane. Indeed, the plasma membrane of yeast is composed of a set of lipids including ergosterol which plays an important role in the construction and the integrity of the membrane (van der Rest et al., 1995; Daum et al., 1998). In this study, the lipid fraction was given in the form of phytosterols (sterols present in grapes) which can be incorporated in the plasma membrane (Luparia et al., 2004). However, a significant proportion of phytosterols in the plasma membrane could perturb its properties and cause disruption of its structure (Luparia et al., 2004). Moreover, previous studies showed that lipids (especially ergosterol and sphingolipids) can form micro-domains in the membrane called lipid rafts that are important for protein sorting (Bagnat et al., 2000, 2001; Bagnat and Simons, 2002). Several nutrients transporters have been located in these domains in *S. cerevisiae*, in particular the arginine permease Can1p and the general amino acid permease Gap1p (Malínská et al., 2003; Lauwers and André, 2006). Phytosterols having a structure similar to ergosterol could have a similar role, thus explaining the differences in consumption of amino acids depending on the lipid dose in the medium.

Previous studies demonstrated that the main property of the Affinity™ ECA5 is a marked increase in fermentative aroma formation (Cadiere et al., 2011, 2012; Mouret et al., 2015). We show here that these traits are generally preserved in various conditions. The final

formation of volatile compounds by the evolved strain is substantially higher compared to Lalvin EC1118®, except for ethyl esters, which are produced at the same level by the two strains when nitrogen is limiting. These results indicate that higher alcohols (except propanol) and acetate esters can be considered as "aroma" markers of Affinity™ ECA5.

The level of ethyl esters cannot be used to discriminate the two strains under all fermentation conditions. Nevertheless, the differentiation of the strains was visible in SM330. These findings are in line with the fact that ethyl esters are produced through lipid metabolism. Indeed, in SM70, the amount of biomass formed is less important; the requirement in lipids is therefore lower. So, exogenous lipids are sufficient to meet this requirement, even at 2 mg/l, and the de novo synthesis of lipids is low. Conversely, in SM330, the requirement in lipids is higher because of a more important biomass production. Thus, there is a greater contribution of the de novo synthesis. Affinity™ ECA5 produced four times as much lipid as Lalvin EC1118® (Cadiere et al., 2011), indicating a modification of lipid metabolism. A difference in the regulation of lipid metabolism might therefore explain the overproduction of ethyl esters in a nitrogen-rich environment.

The response of higher alcohols was complex and dependent on the studied compounds. The propanol production was quite similar for the two strains as already observed in Mouret et al. (2015). Propanol had a particular behavior: its production is proportional to the initial nitrogen content. Indeed, we and others have previous shown that the synthesis of propanol exclusively depends on nitrogen metabolism (Boulton et al., 1995; Clement et al., 2013; Mouret et al., 2014; Rollero et al., 2015) and is independent on the phytosterol content (Rollero et al., 2015). For isobutanol and isoamyl alcohol, a systematic overproduction by Affinity™ ECA5 was observed. Overall, the response to environmental changes was the same for both strains, but the maximal production of each alcohol was reached for a different

condition (in SM70 for isoamyl alcohol and SM330 for isobutanol), which is consistent with previous studies (Mouret et al., 2014, 2015; Rollero et al., 2015). This overproduction revealed differences in the metabolic and/or genomic regulations of the production pathways of these higher alcohols. Indeed, the overproduction of higher alcohols by the evolved strain can be explained by a greater activation of the biosynthesis pathways of amino acid precursors, consistent with the overexpression by Affinity™ ECA5 of genes involved in amino acids biosynthetic processes (*ARG1*, *ARG3*, *ARG7*, *ARG8*, *CPA2*) identified by transcriptomic analysis. The pool of ketoacids could be more important in this strain and these would be directed to the synthesis of higher alcohols. This hypothesis is in line with the results plotted on the MFA (Figure 5): the relation between amino acids exhaustion and maximal production rate of volatile molecules is completely different between the two strains.

Concerning acetate esters, a systematic overproduction was observed for Affinity™ ECA5. The changes of environmental conditions lead to a similar response for both strains. The maximal production and the maximal specific rate of acetate esters were reached in the nitrogen-rich medium at low phytosterol content, consistent with literature (Fujii et al., 1997; Garde-Cerdán and Ancín-Azpilicueta, 2008; Mouret et al., 2014a; Rollero et al., 2015; Saerens et al., 2008; Torrea et al., 2011). The study of specific rates confirmed the impact of the strain and of the environmental parameters on the productions of these molecules. At high nitrogen content, the profiles of the specific rates of acetate ester production were governed by the lipid dose, showing the predominance of the environmental effects. The factors that affected the flux of ester synthesis seemed to be the same for both strains. Conversely, in SM70, the strain effect was dominant.

We studied more precisely the bioconversion of higher alcohols to their acetate esters. Overall, on the whole fermentation, this bioconversion was greater for Affinity™ ECA5 than for Lalvin EC1118®. The evolved strain presented two consecutive yields, with a highest

value for the second one, while the parental strain had a constant yield during the fermentation. Several hypotheses may explain this enhanced conversion. It can be due to a greater availability of precursors - higher alcohol and/or acetyl-CoA - and/or due to an increased enzymatic activity.

Several results obtained in this study are consistent with an effect related to modification in the lipid metabolism, especially on the availability of acetyl-CoA. First, for Affinity™ ECA5, 8 hours after the first addition of phytosterols, the bioconversion yield returned to its maximal value, suggesting a consumption of these sterols and so a modified management of phytosterols by the evolved strain. Secondly, the comparison of gene expression profiles of Affinity™ ECA5 between the two sampling times did not revealed modification of the expression of *ATF1* and *ATF2* genes encoding the acetyltransferases. However, down-regulation of genes involved in sterol biosynthesis pathway was observed after the change in bioconversion yield in the evolved strain. Finally, differences in the expression of various genes involved in the synthesis of acetyl-CoA (*ALD4, ALD6* and *ACS1, ACS2*) were found between the two strains (Table S5).

On the basis of all these data, we propose the following scenario. Affinity™ ECA5 assimilates more efficiently phytosterols present in the medium. As a consequence, acetyl-CoA is being less used to produce sterols, and is more available to react with higher alcohols to produce more acetate esters. This observation is consistent with the known Km for the enzyme Atf1p: 29.8 mM for isoamyl alcohol and 0.025 mM acetyl-CoA (Minetoki et al., 1993). A change in the pool of acetyl-CoA, even minor, could therefore have a major impact on the conversion of higher alcohols acetate esters. This hypothesis is supported by recent results obtained by Bloem et al. (submitted) showing the effect of the availability of acetyl-CoA on the synthesis of esters after a modification of the redox status of the cell.

In this study, we combined gene expression analysis with dynamic study of the synthesis of fermentative aromas to compare the performances of the evolved strain Affinity™ ECA5 and its ancestral strain Lalvin EC1118®. One key finding was the difference in the management of the lipid source for the evolved strain. These metabolic modifications were particularly visible on the bioconversion of higher alcohols to acetate esters, and might be due to differences in the availability of acetyl CoA. This finding is consistent with the increased flux from acetate towards acetyl-CoA and lipid synthesis in Affinity™ ECA5 (Cadiere et al., 2011).

Acknowledgements

We thank Evelyne Aguera, Magaly Angenieux and Christian Picou for technical assistance. This study was supported by the BIOFLAVOUR Cost Action (Grant No. FA0907).

References

Bagnat, M., Chang, A., Simons, K., 2001. Plasma membrane proton ATPase Pma1p requires raft association for surface delivery in yeast. Mol. Biol. Cell 12, 4129–4138.

Bagnat, M., Keränen, S., Shevchenko, A., Shevchenko, A., Simons, K., 2000. Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97, 3254–3259. doi:10.1073/pnas.060034697

Bagnat, M., Simons, K., 2002. Lipid rafts in protein sorting and cell polarity in budding yeast Saccharomyces cerevisiae. Biol. Chem. 383, 1475–1480. doi:10.1515/BC.2002.169

Bell, S.-J., Henschke, P.A., 2005. Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. Aust. J. Grape Wine Res. 11, 242–295.

Bely, M., Sablayrolles, J., Barre, P., 1990. Automatic Detection of Assimilable Nitrogen Deficiencies During Alcoholic Fermentation in Enological Conditions. J. Ferment. Bioeng. 70, 246–252. doi:10.1016/0922-338X(90)90057-4

Benjamini, Y., Hochberg, Y., 1995. Controlling the False Discovery Rate - a Practical and Powerful Approach. J. R. Stat. Soc. Ser. B-Methodol. 57, 289–300.

Boulton RB, Singleton VL, Bisson LF, Kunkee RE (1995) Principles and practices of winemaking. Champman & Hall, New York

Cadière, A., Aguera, E., Caillé, S., Ortiz-Julien, A., Dequin, S., 2012. Pilot-scale evaluation the enological traits of a novel, aromatic wine yeast strain obtained by adaptive evolution. Food Microbiol. 32, 332–337. doi:10.1016/j.fm.2012.07.010

Cadiere, A., Ortiz-Julien, A., Camarasa, C., Dequin, S., 2011. Evolutionary engineered Saccharomyces cerevisiae wine yeast strains with increased in vivo flux through the pentose phosphate pathway. Metab. Eng. 13, 263–271. doi:10.1016/j.ymben.2011.01.008

Camarasa, C., Sanchez, I., Brial, P., Bigey, F., Dequin, S., 2011. Phenotypic Landscape of Saccharomyces cerevisiae during Wine Fermentation: Evidence for Origin-Dependent Metabolic Traits. PLoS ONE 6, e25147. doi:10.1371/journal.pone.0025147

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. doi:10.1111/j.1567-1364.2008.00412.x

Clement, T., Perez, M., Mouret, J.R., Sanchez, I., Sablayrolles, J.M., Camarasa, C., 2013. Metabolic Responses of Saccharomyces cerevisiae to Valine and Ammonium Pulses during Four-Stage Continuous Wine Fermentations. Appl. Environ. Microbiol. 79, 2749–2758. doi:10.1128/AEM.02853-12

Crepin, L., Nidelet, T., Sanchez, I., Dequin, S., Camarasa, C., 2012. Sequential Use of Nitrogen Compounds by Saccharomyces cerevisiae during Wine Fermentation: a Model Based on Kinetic and Regulation Characteristics of Nitrogen Permeases. Appl. Environ. Microbiol. 78, 8102–8111. doi:10.1128/AEM.02294-12

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

Dequin, S., 2001. The potential of genetic engineering for improving brewing, wine-making and baking yeasts. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56, 577–588. doi:10.1007/s002530100700

Ehsani, M., Fernández, M.R., Biosca, J.A., Julien, A., Dequin, S., 2009. Engineering of 2,3-Butanediol Dehydrogenase To Reduce Acetoin Formation by Glycerol-Overproducing, Low-Alcohol Saccharomyces cerevisiae. Appl. Environ. Microbiol. 75, 3196–3205. doi:10.1128/AEM.02157-08

Fujii, T., Kobayashi, O., Yoshimoto, H., Furukawa, S., Tamai, Y., 1997. Effect of aeration and unsaturated fatty acids on expression of the Saccharomyces cerevisiae alcohol acetyltransferase gene. Appl. Environ. Microbiol. 63, 910–915.

Gagneur, J., Neudecker, A., 2012. cellGrowth: Fitting cell population growth models. R package version 1.8.0.

Garde-Cerdán, T., Ancín-Azpilicueta, C., 2008. Effect of the addition of different quantities of amino acids to nitrogen-deficient must on the formation of esters, alcohols, and acids during wine alcoholic fermentation. LWT - Food Sci. Technol. 41, 501–510. doi:10.1016/j.lwt.2007.03.018

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. doi:10.1128/AEM.02625-07

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. Aust. J. Grape Wine Res. 12, 150–160. doi:10.1111/j.1755-0238.2006.tb00055.x

Husson F, Josse J, Le S, Mazet J (2012) FactoMineR: multivariate exploratory data analysis and data mining with R. R package version 1.18. http://CRAN.R-project.org/package=FactoMineR

Jiménez-Martí, E., Aranda, A., Mendes-Ferreira, A., Mendes-Faia, A., Olmo, M. lí del, 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. doi:10.1007/s10482-006-9135-1

Kutyna, D.R., Varela, C., Stanley, G.A., Borneman, A.R., Henschke, P.A., Chambers, P.J., 2012. Adaptive evolution of Saccharomyces cerevisiae to generate strains with enhanced glycerol production. Appl. Microbiol. Biotechnol. 93, 1175–1184. doi:10.1007/s00253-011-3622-7

Lauwers, E., André, B., 2006. Association of yeast transporters with detergent-resistant membranes correlates with their cell-surface location. Traffic Cph. Den. 7, 1045–1059. doi:10.1111/j.1600-0854.2006.00445.x

Le Cao, K.-A., Boitard, S., Besse, P., 2011. Sparse PLS discriminant analysis: biologically relevant feature selection and graphical displays for multiclass problems. BMC Bioinformatics 12, 253. doi:10.1186/1471-2105-12-253

Lee, S.-J., Noble, A.C., 2003. Characterization of Odor-Active Compounds in Californian Chardonnay Wines Using GC-Olfactometry and GC-Mass Spectrometry. J. Agric. Food Chem. 51, 8036–8044. doi:10.1021/jf034747v

Luparia, V., Soubeyrand, V., Berges, T., Julien, A., Salmon, J.-M., 2004. Assimilation of grape phytosterols by Saccharomyces cerevisiae and their impact on enological fermentations. Appl. Microbiol. Biotechnol. 65. doi:10.1007/s00253-003-1549-3

Malínská, K., Malínský, J., Opekarová, M., Tanner, W., 2003. Visualization of protein compartmentation within the plasma membrane of living yeast cells. Mol. Biol. Cell 14, 4427–4436. doi:10.1091/mbc.E03-04-0221

Minetoki, T., Bogaki, T., Iwamatsu, A., Fujii, T., Hamachi, M., 1993. The Purification, Properties and Internal Peptide Sequences of Alcohol Acetyltransferase Isolated from *Saccharomyces cerevisiae* Kyokai No. 7. Biosci. Biotechnol. Biochem. 57, 2094–2098. doi:10.1271/bbb.57.2094

Molina, A.M., Guadalupe, V., Varela, C., Swiegers, J.H., Pretorius, I.S., Agosin, E., 2009. Differential synthesis of fermentative aroma compounds of two related commercial wine yeast strains. Food Chem. 117, 189–195. doi:10.1016/j.foodchem.2009.03.116

Molina, A.M., Swiegers, J.H., Varela, C., Pretorius, I.S., Agosin, E., 2007. Influence of wine fermentation temperature on the synthesis of yeast-derived volatile aroma compounds. Appl. Microbiol. Biotechnol. 77, 675–687. doi:10.1007/s00253-007-1194-3

Morakul, S., Mouret, J.-R., Nicolle, P., Aguera, E., Sablayrolles, J.-M., Athès, V., 2013. A Dynamic Analysis of Higher Alcohol and Ester Release During Winemaking Fermentations. Food Bioprocess Technol. 6, 818–827. doi:10.1007/s11947-012-0827-4

Morakul, S., Mouret, J.-R., Nicolle, P., Trelea, I.C., Sablayrolles, J.-M., Athes, V., 2011. Modelling of the gas–liquid partitioning of aroma compounds during wine alcoholic fermentation and prediction of aroma losses. Process Biochem. 46, 1125–1131. doi:10.1016/j.procbio.2011.01.034

Mouret, J.R., Cadiere, A., Aguera, E., Rollero, S., Ortiz-Julien, A., Sablayrolles, J.M., Dequin, S., 2015. Dynamics and quantitative analysis of the synthesis of fermentative aromas by an evolved wine strain of Saccharomyces cerevisiae. Yeast Chichester Engl. 32, 257–269. doi:10.1002/yea.3028

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

Mouret, J.R., Morakul, S., Nicolle, P., Athes, V., Sablayrolles, J.M., 2012. Gas–liquid transfer of aroma compounds during winemaking fermentations. LWT - Food Sci. Technol. 49, 238–244. doi:10.1016/j.lwt.2012.04.031

Mouret, J.R., Perez, M., Angenieux, M., Nicolle, P., Farines, V., Sablayrolles, J.M., 2014b. Online-Based Kinetic Analysis of Higher Alcohol and Ester Synthesis During Winemaking Fermentations. Food Bioprocess Technol. 7, 1235–1245. doi:10.1007/s11947-013-1089-5

Nogales-Cadenas, R., Carmona-Saez, P., Vazquez, M., Vicente, C., Yang, X., Tirado, F., Maria Carazo, J., Pascual-Montano, A., 2009. GeneCodis: interpreting gene lists through enrichment analysis and integration of diverse biological information. Nucleic Acids Res. 37, W317–W322. doi:10.1093/nar/gkp416

Pizarro, F., Vargas, F.A., Agosin, E., 2007. A systems biology perspective of wine fermentations. Yeast 24, 977–991. doi:10.1002/yea.1545

R Development Core Team (2014) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna

Remize, F., Cambon, B., Barnavon, L., Dequin, S., 2003. Glycerol formation during wine fermentation is mainly linked to Gpd1p and is only partially controlled by the HOG pathway. Yeast 20, 1243–1253. doi:10.1002/yea.1041

Ritz, C., Streibig, J.C., 2005. Bioassay analysis using R. J. Stat. Softw. 12, 1–22.

Rollero, S., Bloem, A., Camarasa, C., Sanchez, I., Ortiz-Julien, A., Sablayrolles, J.-M., Dequin, S., Mouret, J.-R., 2015. Combined effects of nutrients and temperature on the production of fermentative aromas by Saccharomyces cerevisiae during wine fermentation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 99, 2291–304. doi:10.1007/s00253-014-6210-9

Rossouw, D., Jacobson, D., Bauer, F.F., 2012. Transcriptional Regulation and the Diversification of Metabolism in Wine Yeast Strains. Genetics 190, 251–261. doi:10.1534/genetics.111.132720

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. doi:10.1128/AEM.01616-07

Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., Ideker, T., 2003. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. Genome Res. 13, 2498–2504. doi:10.1101/gr.1239303

Smyth, G.K., Speed, T., 2003. Normalization of cDNA microarray data. Methods 31, 265–273. doi:10.1016/S1046-2023(03)00155-5

Swiegers, J.H., Bartowsky, E.J., Henschke, P.A., Pretorius, I.S., 2005. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. Aust. J. Grape Wine Res. 11, 139–173.

Tilloy, V., Ortiz-Julien, A., Dequin, S., 2014. Reduction of Ethanol Yield and Improvement of Glycerol Formation by Adaptive Evolution of the Wine Yeast Saccharomyces cerevisiae under Hyperosmotic Conditions. Appl. Environ. Microbiol. 80, 2623–2632. doi:10.1128/AEM.03710-13

Torija, M.J., Beltran, G., Novo, M., Poblet, M., Guillamón, J.M., Mas, A., Rozès, N., 2003. Effects of fermentation temperature and Saccharomyces species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine. Int. J. Food Microbiol. 85, 127–136. doi:10.1016/S0168-1605(02)00506-8

Torrea, D., Varela, C., Ugliano, M., Ancin-Azpilicueta, C., Leigh Francis, I., Henschke, P.A., 2011. Comparison of inorganic and organic nitrogen supplementation of grape juice – Effect on volatile composition and aroma profile of a Chardonnay wine fermented with Saccharomyces cerevisiae yeast. Food Chem. 127, 1072–1083. doi:10.1016/j.foodchem.2011.01.092

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. doi:10.1021/jf1027137

Van der Rest, M.E., Kamminga, A.H., Nakano, A., Anraku, Y., Poolman, B., Konings, W.N., 1995. The plasma membrane of Saccharomyces cerevisiae: structure, function, and biogenesis. Microbiol. Rev. 59, 304–322.

Vilanova, M., Siebert, T.E., Varela, C., Pretorius, I.S., Henschke, P.A., 2012. Effect of ammonium nitrogen supplementation of grape juice on wine volatiles and non-volatiles composition of the aromatic grape variety Albariño. Food Chem. 133, 124–131. doi:10.1016/j.foodchem.2011.12.082

Vilanova, M., Ugliano, M., Varela, C., Siebert, T., Pretorius, I.S., Henschke, P.A., 2007. Assimilable nitrogen utilisation and production of volatile and non-volatile compounds in chemically defined medium by Saccharomyces cerevisiae wine yeasts. Appl. Microbiol. Biotechnol. 77, 145–157. doi:10.1007/s00253-007-1145-z

Table S1: Time and maximal rate of fermentation, and maximal population for each fermentation condition

	Initial nitrogen concentration (mg/l)	Initial phytosterol concentration (mg/l)	Time of fermentation (h)	Maximal rate of fermentation (g $CO_2.l^{-1}.h^{-1}$)	Maximal population (x10^6 cells/ml)
Lalvin EC1118®	70	2	365	0.54	36.8
	70	8	327	0.58	36.6
	330	2	136	1.91	90.3
	330	8	113	2.15	90.7
Affinity™ ECA5	70	2	288	0.67	38.4
	70	8	331	0.65	38.2
	330	2	111	2.42	100
	330	8	95	2.26	103

Table S2: List of genes composing each group obtained by sparse PLS-DA

Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
COQ2	PHO11	YCR099C	ARG82
MDM38	GDT1	BNA3	YPT52
PEX21	SLD5	TIR2	MTC4
BUD21	RPL18A	ADE1	IRC20
GFD2	RPS1B	ALG7	YEL1
CNS1	RPL24A	YDR089W	INO1
BUD20	BIO4	ADE17	UBC8
FUI1	PHO12	IDP1	CRP1
SFK1	HIS7	CPA2	ATG20
YAP7	RPP2A	VHC1	YML116W.A
RRN7	RPL42A	EC1118_1F14_0078g	CWC24
YNL234W	ARD1	RNR3	YNL092W
RCL1	RPS29A	RSC9	FMP21
ETT1	PHA2	VMA6	VAC7
NCS2	YOL159C	MET12	YKL071W
HRB1	RPP1A	YER134C	YLR312C
URA3	RPL4A	ENT3	PCD1
HEL2	TPN1	YER135C	RTF1
CIR2	RPS10B	ARG8	ENO1
ATP14	VBA4	RAD59	PIB1
RNH203	NIT3	RNR4	HOC1
IMP3	YDL158C	YNR068C	CSR2
RCM1	BCH1	RPN10	YRF1.6
YMR166C	UBC12	DIP5	IWR1
MEF1	YHL044W	FIG1	LGE1
DRS1	YCR087C.A	SUL2	YRF1.8
YPL068C	RPL23B	YDR090C	LIP5
BAS1	RPS26B	HUL4	VHS1
RPC82	BUD16	EST3	SNA4
CYC8	THI11	STU2	RSF1
IDP2	BUD17	TUB3	MEK1
HIP1	RPS13	MPC2	SNT309
SAH1	RPS11A	SYN8	SKM1
GEP3	RPL19A	VPS51	RIM8
ZRT1	PRD1	ARG1	YPR204W
TRM1	ENV10	VPS17	GSC2
NTE1	RBS1	ADY3	NTG2
AAD4	APT1	GUD1	SPI1
SAR1	RPL12B	ADH5	BSD2
YOR378W	RPS16A	PPM1	YBL086C
IMP4	PMT6	PCM1	PIN3
UBP10	HEM3	VPS54	YDR186C
YGL188C	RPL26A	SEC2	MLH3
ARE2	RPS10A	CEM1	RMD5

FTR1
MOT3
RIB2
MSC7
ERG12
HXT4
PXR1
AFI1
DPL1
MRPL44
BUR2
GOT1
MRPL6
YBR242W
AIM14
ACS2
ADH6
CWC2
ROX1
ESF2
ATP16
MET8
ECM7
PET309
YOL029C
NCA3
SMI1
SCC2
ERG2
NAF1
YPL216W
HSP12
MIC60
YBR096W
ERG29
ERG13
KTI12
HMG1
KTI11
ATP17
HFA1
OCA5
YDR222W
MRPL20
MNN5
ATP25
YDR056C

DPS1
RNA1
SNL1
POL5
CCT4
RPL6B
RPL35A
RPL20B
YGL039W
YNR066C
PUS7
NAT1
RPL7A
SIP3
BIO3
COG1
GIM5
RPL43B
RPL37B
DPM1
FRS1
RPL11B
RPL31B
YCR015C
DML1
THI13
SEC12
BPL1
RPL33B
YHL042W
SSH1
RPS29B
SXM1
MED1
RPL4B
RPL9B
RPL11A
WTM2
LCB1
ALG6
VPS75
KIN3
MYO5
RPL24B
TRS65
RPL36A
YML018C

YER184C
ARG7
VBA1
STV1
IRS4
YGL082W
TOS4
LHS1
SRY1
FUS1
ERJ5
LSB5
RMD6
TPD3
ARP6
FES1
DDI1
YFL065C
ARG3
YOR385W
YAR023C
YLR257W
YGR190C

SPO14
SAP155
PUT4
SHE10
RTT102
RAD4
CTH1
SPO22
JHD1
URN1
YIG1
UPS3
DAS1
SLX8
GAT2
YKL050C
YIL024C
YKL133C
VPS72
BDP1
DON1
YPT53
HSP30
RAD7
NDC80
RPI1
CLF1
BAG7
MSN4
RSB1
MND1
YLR311C
AIM23
ABM1
OSW1
MPS2
VPS24
LIN1
SKG1
SLM1
VHS3
DOT6
EC1118_1O4_6667g
GAL2
RPN4
EC1118_1N26_0045g
TOS8

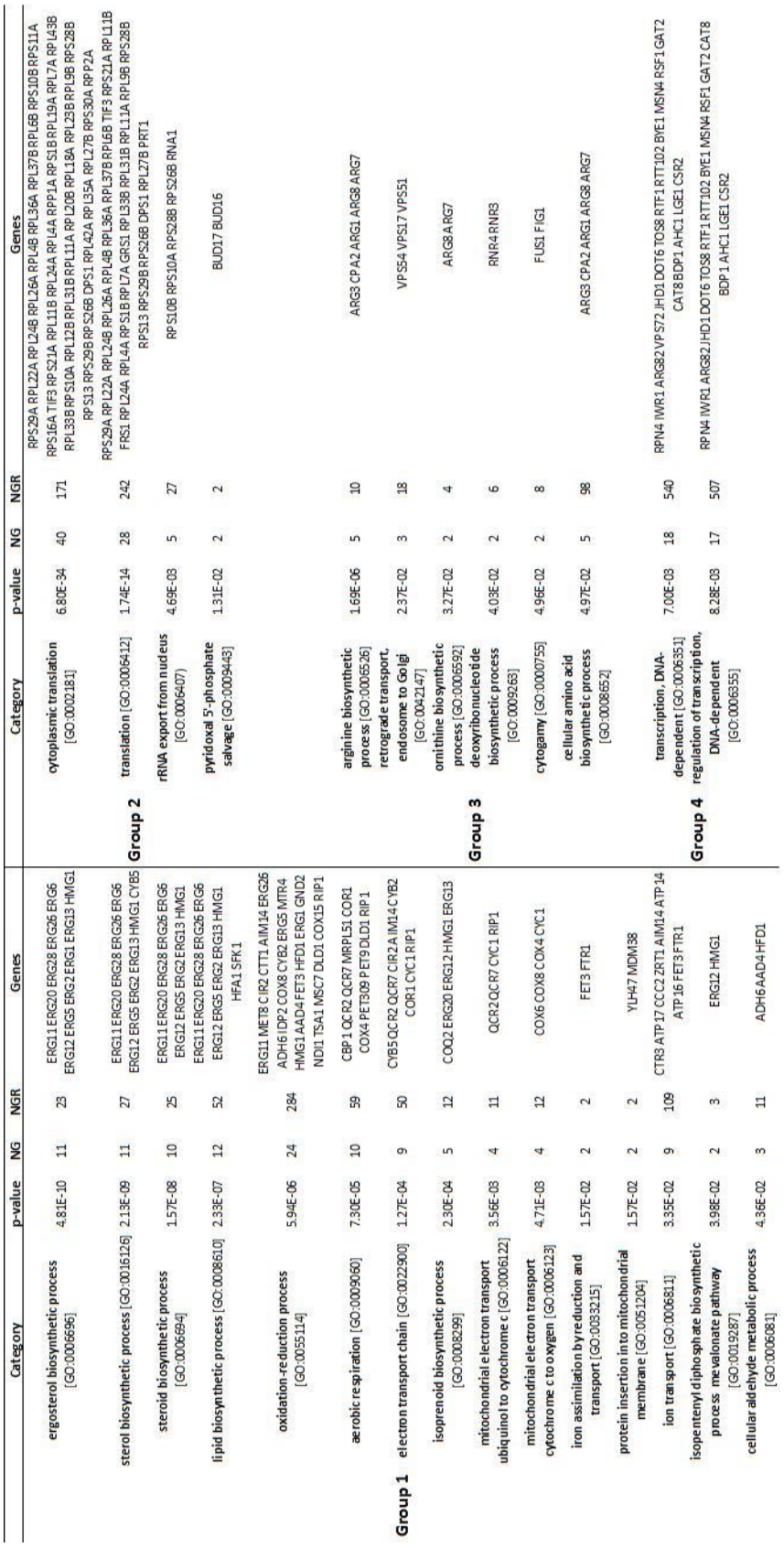
PSY2
ERG6
RMD8
GND2
YLH47
AEP2
CYC1
HYP2
YDL086W
DBP2
ALP1
YOR062C
HPF1
YJL181W
ERG20
COR1
FET3
ERG11
CBP1
ANP1
YHR078W
ERG5
OMA1
AAH1
DRE2
AVO2
CYB5
ERG26
SFM1
ERT1
NOP53
ERG1
MDV1
PSR1
ACN9
MRPL39
FAA1
IZH1
MTR4
HXT3
SLD3
NDI1
AQR1
YLR224W
MGM101
SCM4
RCF2

SRP68
LOT5
TIM50
CTR9
GRS1
MMT1
RPL27B
RVB2
RPS28B
PRT1
TIF3
PRS1
SHR3
YOR225W
RPL22A
HMF1
TRM732
RRN6
RPS30A
YBR178W
LAG1
KAP104
TAH18
RPS21A
TCD1
MET18
PML39
YDR327W
YDR514C
TRM10
RKR1
GAR1
THI80

BYE1
PDC1
YIL077C
KRE28
ATG1
YDR262W
EC1118_1O4_6656g
GIP1
ZEO1
YTA7
MKK2
PHO80
YML020W
GDH3
POP6
YGR122C.A
AHC1
YMR295C
NAB2
RAD28
YHL050C
YLR345W
TEN1
MCH2
PHM8
UFD1
YDR306C
IDP3
SML1
MDM32
YLR271W
YNL194C
YLL020C
PEX28
CAT8

QCR2
MLS1
CIN5
FCY2
MZM1
YLR407W
CYB2
CYC3
UBX6
RSM22
ASG1
SLP1
PET9
MRPL51
QCR7
RTC6
TSA1
NQM1
EC1118_1O4_6601g
IFH1
UPS2
IZH3
PKH1
ERG28
HPA2
YME2
COX8
YER053C.A
CTT1
FMP48
CCC2
DLD1
YGR079W
EST2
COX6
HFD1
YHR202W
DIA1
PDE2
CTR3
YTP1
STB5
COX4
RIP1
COX15

Table S3: Genecodis classification of genes selected by sparse PLS-DA into biological processes (NG: number of genes in our list; NGR: total number of genes in a category)



	Category	p-value	NG	NGR	Genes
Group 1	ergosterol biosynthetic process [GO:0006696]	4.81E-10	11	23	ERG11 ERG20 ERG28 ERG26 ERG6 ERG12 ERG5 ERG2 ERG1 ERG13 HMG1
	sterol biosynthetic process [GO:0016126]	2.13E-09	11	27	ERG11 ERG20 ERG28 ERG26 ERG6 ERG12 ERG5 ERG2 ERG13 HMG1 CYB5
	steroid biosynthetic process [GO:0006694]	1.57E-08	10	25	ERG11 ERG20 ERG28 ERG26 ERG6 ERG12 ERG5 ERG2 ERG13 HMG1
	lipid biosynthetic process [GO:0008610]	2.33E-07	12	52	ERG11 ERG20 ERG28 ERG26 ERG6 ERG12 ERG5 ERG2 ERG13 HMG1 HFA1 SFK1
	oxidation-reduction process [GO:0055114]	5.94E-06	24	284	ERG11 MET8 CIR2 CTT1 AIM14 ERG26 ADH6 IDP2 COX8 CYB2 ERG5 MTR4 HMG1 AAD4 FET3 HFD1 ERG1 GND2 NDI1 TSA1 MSC7 DLD1 COX15 RIP1
	aerobic respiration [GO:0009060]	7.30E-05	10	59	CBP1 QCR2 QCR7 MRPL51 COR1 COX4 PET309 PET9 DLD1 RIP1
	electron transport chain [GO:0022900]	1.27E-04	9	50	CYB5 QCR2 QCR7 CIR2 AIM14 CYB2 COR1 CYC1 RIP1
	isoprenoid biosynthetic process [GO:0008299]	2.30E-04	5	12	COQ2 ERG20 ERG12 HMG1 ERG13
	mitochondrial electron transport ubiquinol to cytochrome c [GO:0006122]	3.56E-03	4	11	QCR2 QCR7 CYC1 RIP1
	mitochondrial electron transport cytochrome c to oxygen [GO:0006123]	4.71E-03	4	12	COX6 COX8 COX4 CYC1
	iron assimilation by reduction and transport [GO:0033215]	1.57E-02	2	2	FET3 FTR1
	protein insertion into mitochondrial membrane [GO:0051204]	1.57E-02	2	2	YUH47 MDM38
	ion transport [GO:0006811]	3.35E-02	9	109	CTR3 ATP17 CCC2 ZRT1 AIM14 ATP14 ATP16 FET3 FTR1
	isopentenyl diphosphate biosynthetic process, mevalonate pathway [GO:0019287]	3.98E-02	2	3	ERG12 HMG1
	cellular aldehyde metabolic process [GO:0006081]	4.36E-02	3	11	ADH6 AAD4 HFD1
Group 2	cytoplasmic translation [GO:0002181]	6.80E-34	40	171	RPS29A RPL22A RPL24B RPL26A RPL4B RPL36A RPL37B RPL6B RPS10B RPS11A RPS16A TIF3 RPS21A RPL11B RPL24A RPL4A RPP1A RPS1B RPL19A RPL7A RPL43B RPL33B RPS10A RPL12B RPL31B RPL11A RPL20B RPL18A RPL23B RPL9B RPS28B RPS13 RPS29B RPS26B DPS1 RPL42A RPL35A RPL27B RPS30A RPP2A
	translation [GO:0006412]	1.74E-14	28	242	RPS29A RPL22A RPL24B RPL26A RPL4B RPL36A RPL37B RPL6B TIF3 RPS21A RPL11B FRS1 RPL24A RPL4A RPS1B RPL7A GRS1 RPL33B RPL31B RPL11A RPL9B RPS28B RPS13 RPS29B RPS26B DPS1 RPL27B PRT1
	rRNA export from nucleus [GO:0006407]	4.69E-03	5	27	RPS10B RPS10A RPS28B RPS26B RNA1
	pyridoxal 5'-phosphate salvage [GO:0009443]	1.31E-02	2	2	BUD17 BUD16
Group 3	arginine biosynthetic process [GO:0006526]	1.69E-06	5	10	ARG3 CPA2 ARG1 ARG8 ARG7
	retrograde transport, endosome to Golgi [GO:0042147]	2.37E-02	3	18	VPS54 VPS17 VPS51
	ornithine biosynthetic process [GO:0006592]	3.27E-02	2	4	ARG8 ARG7
	deoxyribonucleotide biosynthetic process [GO:0009263]	4.03E-02	2	6	RNR4 RNR3
	cytogamy [GO:0000755]	4.96E-02	2	8	FUS1 FIG1
	cellular amino acid biosynthetic process [GO:0008652]	4.97E-02	5	98	ARG3 CPA2 ARG1 ARG8 ARG7
Group 4	transcription, DNA-dependent [GO:0006351]	7.00E-03	18	540	RPN4 IWR1 ARG82 VPS72 JHD1 DOT6 TOS8 RTF1 RTT102 BYE1 MSN4 RSF1 GAT2 CAT8 BDP1 AHC1 LGE1 CSR2
	regulation of transcription, DNA-dependent [GO:0006355]	8.28E-03	17	507	RPN4 IWR1 ARG82 JHD1 DOT6 TOS8 RTF1 RTT102 BYE1 MSN4 RSF1 GAT2 CAT8 BDP1 AHC1 LGE1 CSR2

Table S4: Genes differentially expressed between the two sampling times for Affinity™ ECA5

Systematic name	Functional name	logFC	FC	adj.P.Val
YPR065W	ROX1	-2.428	0.186	2.11E-07
YBL043W	ECM13	-2.390	0.191	3.05E-04
YAR064W	YAR064W	-2.262	0.209	3.28E-02
YMR317W	YMR317W	-2.138	0.227	1.33E-08
YFL051C	YFL051C	-1.997	0.251	2.19E-06
YDL039C	PRM7	-1.976	0.254	1.34E-07
YLL012W	YEH1	-1.972	0.255	8.17E-05
YMR070W	MOT3	-1.969	0.255	3.22E-03
YHR213W	YHR213W	-1.870	0.274	1.71E-05
YHR213W	YHR213W	-1.866	0.274	2.45E-03
YOR192C	THI72	-1.823	0.283	2.76E-08
YLR037C	PAU23	-1.719	0.304	7.70E-05
YJR048W	CYC1	-1.708	0.306	1.93E-04
YML075C	HMG1	-1.673	0.314	1.05E-03
YLL025W	PAU17	-1.632	0.323	7.36E-04
YIR031C	DAL7	-1.625	0.324	8.23E-04
YNL331C	AAD14	-1.604	0.329	1.15E-05
YNL231C	PDR16	-1.597	0.331	1.41E-03
YDR492W	IZH1	-1.533	0.345	1.03E-04
YPL117C	IDI1	-1.528	0.347	2.75E-05
YGR065C	VHT1	-1.523	0.348	2.13E-05
YMR325W	PAU19	-1.523	0.348	2.11E-07
YOL161C	PAU20	-1.521	0.349	2.36E-04
YDL236W	PHO13	-1.517	0.350	1.73E-04
YDL037C	BSC1	-1.506	0.352	9.69E-06
YBR242W	YBR242W	-1.486	0.357	1.49E-03
YIR041W	PAU15	-1.459	0.364	4.40E-05
YNL024C	YNL024C	-1.428	0.372	8.12E-03
YNR057C	BIO4	-1.403	0.378	5.53E-05
YOR062C	YOR062C	-1.396	0.380	1.10E-05
YMR015C	ERG5	-1.395	0.380	3.55E-04
YKL224C	PAU16	-1.394	0.381	9.18E-03
YHR092C	HXT4	-1.376	0.385	1.23E-04
YOR394W	PAU21	-1.374	0.386	2.07E-04
YCR104W	PAU3	-1.368	0.387	1.29E-03
YER060W-A	FCY22	-1.366	0.388	3.68E-05
YML126C	ERG13	-1.362	0.389	9.13E-06
YLR153C	ACS2	-1.360	0.390	2.71E-05
YNL111C	CYB5	-1.355	0.391	5.07E-06
YGL261C	PAU11	-1.341	0.395	1.08E-05
YPL282C	PAU22	-1.329	0.398	3.40E-04
YMR220W	ERG8	-1.329	0.398	8.93E-05
YAL068C	PAU8	-1.325	0.399	4.94E-07

YHR039C	MSC7	-1.318	0.401	4.58E-06
YDR542W	PAU10	-1.312	0.403	2.59E-05
EC1118_1O4_6612g	EC1118_1O4_6612g	-1.312	0.403	4.70E-05
YER028C	MIG3	-1.284	0.411	2.99E-07
YNL280C	ERG24	-1.270	0.415	1.08E-03
YLR089C	ALT1	-1.263	0.417	6.75E-06
YDL141W	BPL1	-1.260	0.417	2.40E-06
YLR237W	THI7	-1.257	0.418	3.81E-07
YFL034C-A	RPL22B	-1.253	0.420	1.99E-06
YMR134W	ERG29	-1.251	0.420	5.49E-06
YOL029C	YOL029C	-1.250	0.421	1.33E-07
YLR149C-A	YLR149C-A	-1.240	0.423	1.34E-04
YGR286C	BIO2	-1.232	0.426	1.22E-05
YDR222W	YDR222W	-1.202	0.435	6.53E-04
YOL028C	YAP7	-1.194	0.437	5.87E-05
YER060W	FCY21	-1.191	0.438	8.98E-06
YML008C	ERG6	-1.191	0.438	2.05E-05
YOR051C	ETT1	-1.164	0.446	3.29E-04
YLR372W	SUR4	-1.161	0.447	6.02E-03
YIL176C	PAU14	-1.156	0.449	7.18E-03
YHL046C	PAU13	-1.156	0.449	1.96E-02
YOL159C	YOL159C	-1.153	0.450	2.07E-06
YKR075C	YKR075C	-1.143	0.453	5.13E-05
YNL141W	AAH1	-1.104	0.465	1.26E-02
YLR175W	CBF5	-1.103	0.466	1.10E-03
YOR361C	PRT1	-1.095	0.468	5.83E-03
YNR076W	PAU6	-1.090	0.470	1.09E-03
YOR182C	RPS30B	-1.089	0.470	1.05E-02
YJL025W	RRN7	-1.086	0.471	5.55E-07
YIR030C	DCG1	-1.084	0.472	5.75E-05
YDR541C	YDR541C	-1.077	0.474	1.70E-05
YHR180W	YHR180W	-1.067	0.477	1.40E-04
YHL026C	YHL026C	-1.065	0.478	2.50E-07
YLR406C	RPL31B	-1.065	0.478	7.17E-06
YBL108C-A	PAU9	-1.062	0.479	1.30E-02
YCR020C	PET18	-1.062	0.479	8.65E-03
YGL223C	COG1	-1.057	0.481	4.58E-05
YGR085C	RPL11B	-1.054	0.482	1.50E-04
YDL208W	NHP2	-1.053	0.482	5.04E-04
YHR094C	HXT1	-1.047	0.484	6.96E-03
YDR165W	TRM82	-1.043	0.485	8.14E-05
YNR065C	YNR065C	-1.041	0.486	8.89E-04
YGR036C	CAX4	-1.041	0.486	3.25E-04
YPL245W	YPL245W	-1.036	0.488	3.86E-02
YNR018W	RCF2	-1.034	0.488	2.52E-03
YIL145C	PAN6	-1.032	0.489	7.10E-04

YJL191W	RPS14B	-1.028	0.490	3.11E-05
YGR175C	ERG1	-1.024	0.492	9.85E-03
YDR284C	DPP1	-1.024	0.492	4.72E-03
YGR177C	ATF2	-1.021	0.493	4.20E-05
YHL043W	ECM34	-1.020	0.493	3.62E-04
YDR294C	DPL1	-1.020	0.493	3.11E-02
YLR461W	PAU4	-1.016	0.495	5.11E-03
YIL123W	SIM1	-1.009	0.497	1.74E-02
YGR078C	PAC10	-1.009	0.497	2.38E-04
YKL156W	RPS27A	-1.006	0.498	2.27E-03
YCR105W	ADH7	-1.005	0.498	2.75E-02
YHR019C	DED81	-1.004	0.499	2.34E-02
YGL101W	YGL101W	-0.999	0.500	1.23E-03
YBL081W	YBL081W	-0.999	0.500	1.68E-03
YBR084W	MIS1	-0.993	0.502	3.31E-05
YNR056C	BIO5	-0.986	0.505	1.91E-02
YDL244W	THI13	-0.983	0.506	1.24E-05
YPL198W	RPL7B	-0.978	0.508	1.44E-03
YPL189W	GUP2	-0.977	0.508	4.91E-04
YPL252C	YAH1	-0.977	0.508	1.70E-05
YLR287C-A	RPS30A	-0.975	0.509	1.79E-02
YNL046W	YNL046W	-0.973	0.510	2.38E-04
YAR068W	YAR068W	-0.963	0.513	2.59E-02
YGL253W	HXK2	-0.959	0.514	2.85E-03
YMR049C	ERB1	-0.958	0.515	6.47E-04
YLR367W	RPS22B	-0.951	0.517	3.35E-02
YBL068W	PRS4	-0.948	0.518	9.57E-04
YJL198W	PHO90	-0.948	0.519	3.87E-03
YBL053W	YBL053W	-0.945	0.519	3.03E-02
YNR046W	TRM112	-0.945	0.519	3.67E-02
YLR197W	NOP56	-0.945	0.520	1.03E-02
YGR049W	SCM4	-0.940	0.521	2.60E-04
YFR056C	YFR056C	-0.934	0.523	9.12E-04
YAR068W	YAR068W	-0.934	0.523	2.03E-03
YIL128W	MET18	-0.933	0.524	4.33E-03
YNR019W	ARE2	-0.931	0.525	1.27E-02
YEL065W	SIT1	-0.929	0.525	3.55E-03
YEL034W	HYP2	-0.928	0.525	2.26E-02
YOR107W	RGS2	-0.928	0.526	2.32E-03
YDL081C	RPP1A	-0.928	0.526	2.33E-02
YOR203W	YOR203W	-0.927	0.526	6.02E-05
YJR070C	LIA1	-0.926	0.526	1.64E-02
YER019W	ISC1	-0.924	0.527	1.29E-03
YDR324C	UTP4	-0.923	0.528	3.56E-04
YNL182C	IPI3	-0.923	0.528	5.32E-05
YPL093W	NOG1	-0.921	0.528	4.24E-05

YIL016W	SNL1	-0.919	0.529	7.23E-06
YHR089C	GAR1	-0.914	0.531	7.43E-05
YAL029C	MYO4	-0.910	0.532	1.55E-02
YJL208C	NUC1	-0.910	0.532	7.71E-04
YMR194W	RPL36A	-0.909	0.532	4.79E-05
YOL093W	TRM10	-0.908	0.533	6.47E-03
YIL091C	UTP25	-0.906	0.534	2.84E-03
YLR196W	PWP1	-0.906	0.534	4.93E-04
YNL128W	TEP1	-0.904	0.534	2.82E-02
YNL061W	NOP2	-0.903	0.535	2.37E-05
YOR222W	ODC2	-0.902	0.535	2.64E-04
YHL042W	YHL042W	-0.901	0.536	1.69E-02
YLR130C	ZRT2	-0.901	0.536	4.97E-03
YDL169C	UGX2	0.900	1.867	6.05E-04
YGR122C-A	YGR122C-A	0.903	1.870	4.62E-04
YDL181W	INH1	0.903	1.870	5.71E-03
YMR291W	TDA1	0.906	1.874	3.22E-03
YLR126C	YLR126C	0.906	1.874	5.50E-03
YMR031C	EIS1	0.907	1.875	4.93E-04
YOL023W	IFM1	0.908	1.877	8.12E-03
YGR254W	ENO1	0.909	1.877	1.67E-04
YJL221C	IMA4	0.909	1.878	7.52E-04
YML133C	YML133C	0.913	1.883	1.55E-02
YOR288C	MPD1	0.916	1.887	9.30E-05
YLL020C	YLL020C	0.917	1.889	1.13E-06
YMR020W	FMS1	0.922	1.895	5.43E-03
YMR188C	MRPS17	0.928	1.902	3.29E-04
YPL278C	YPL278C	0.928	1.903	1.67E-02
YML128C	MSC1	0.928	1.903	4.91E-04
YMR053C	STB2	0.928	1.903	6.14E-04
YLR107W	REX3	0.930	1.905	1.90E-02
YDL019C	OSH2	0.931	1.906	1.80E-05
YOR075W	UFE1	0.931	1.907	4.10E-04
YLR467W	YRF1-5	0.934	1.911	9.12E-03
YGL045W	RIM8	0.943	1.923	1.70E-03
YHR139C	SPS100	0.944	1.924	1.04E-05
YLR466W	YRF1-4	0.944	1.925	2.39E-05
YJR103W	URA8	0.948	1.929	2.45E-03
YNL092W	YNL092W	0.950	1.932	6.44E-03
YLL066C	YLL066C	0.951	1.933	8.08E-04
YIR017C	MET28	0.951	1.934	1.42E-02
YIL172C	IMA3	0.952	1.934	1.38E-02
YJR008W	MHO1	0.952	1.935	2.32E-04
YOR347C	PYK2	0.957	1.941	6.41E-04
YMR085W	YMR085W	0.959	1.944	2.47E-04
YDR255C	RMD5	0.965	1.952	7.25E-03

YMR315W	YMR315W	0.965	1.952	2.36E-03
YDR485C	VPS72	0.967	1.954	3.07E-03
YOL157C	IMA2	0.969	1.957	8.00E-04
YLR109W	AHP1	0.971	1.960	2.03E-03
YPL055C	LGE1	0.974	1.964	7.43E-03
YOR195W	SLK19	0.974	1.965	1.31E-03
YKL124W	SSH4	0.980	1.972	1.27E-03
YDR532C	KRE28	0.983	1.976	8.35E-05
YHR153C	SPO16	0.983	1.977	4.02E-02
YLR350W	ORM2	0.984	1.978	1.90E-02
YJL155C	FBP26	0.988	1.984	1.94E-05
YOR389W	YOR389W	0.989	1.984	4.82E-04
YIL136W	OM45	0.989	1.985	5.36E-04
YLR054C	OSW2	0.989	1.985	3.07E-03
YJL219W	HXT9	0.989	1.985	4.95E-03
YGR032W	GSC2	0.990	1.986	1.59E-04
YPR026W	ATH1	0.993	1.990	4.78E-03
YJL149W	DAS1	0.996	1.994	5.23E-05
YER002W	NOP16	0.998	1.997	3.07E-02
YMR030W	RSF1	1.002	2.003	2.86E-03
YIR038C	GTT1	1.005	2.006	4.56E-03
YMR271C	URA10	1.005	2.006	8.01E-03
YCR005C	CIT2	1.011	2.016	8.80E-06
YDR247W	VHS1	1.020	2.028	1.21E-04
YGR070W	ROM1	1.020	2.028	1.88E-04
YMR170C	ALD2	1.020	2.028	3.04E-02
YAL028W	FRT2	1.024	2.034	2.07E-05
YNL014W	HEF3	1.030	2.042	3.07E-02
YNL007C	SIS1	1.031	2.044	3.05E-03
YKL071W	YKL071W	1.031	2.044	1.80E-05
YER079W	YER079W	1.032	2.045	5.16E-05
YGR102C	GTF1	1.034	2.048	2.56E-03
YJL141C	YAK1	1.042	2.059	5.53E-05
YER162C	RAD4	1.043	2.060	8.57E-07
YER037W	PHM8	1.044	2.062	1.57E-02
YIL050W	PCL7	1.045	2.063	5.04E-04
YER088C	DOT6	1.045	2.064	4.14E-04
YML118W	NGL3	1.047	2.067	4.93E-04
YBR126C	TPS1	1.048	2.067	3.55E-02
YEL039C	CYC7	1.051	2.072	7.41E-05
YLR120C	YPS1	1.052	2.074	2.57E-02
YGL096W	TOS8	1.062	2.088	2.78E-04
YKL091C	YKL091C	1.064	2.090	8.24E-07
YOR134W	BAG7	1.065	2.093	1.74E-05
YDL206W	YDL206W	1.067	2.095	2.16E-03
YLR151C	PCD1	1.067	2.095	8.38E-03

EC1118_1F14_0089g	EC1118_1F14_0089g	1.068	2.096	1.37E-04
YMR114C	YMR114C	1.069	2.098	3.88E-06
YHR087W	RTC3	1.069	2.099	5.18E-03
YKL070W	YKL070W	1.072	2.102	3.71E-03
YGL191W	COX13	1.072	2.103	2.75E-05
YML132W	COS3	1.074	2.106	2.21E-03
YLR149C	YLR149C	1.078	2.111	2.52E-06
YOR306C	MCH5	1.079	2.112	1.16E-03
YLR247C	IRC20	1.081	2.115	1.08E-05
YDR069C	DOA4	1.084	2.120	2.14E-06
YAL062W	GDH3	1.085	2.122	9.71E-03
YJL049W	YJL049W	1.086	2.124	3.44E-03
YDR313C	PIB1	1.088	2.126	1.19E-02
YGL005C	COG7	1.089	2.127	8.67E-05
YIL144W	NDC80	1.093	2.133	9.84E-06
YBR302C	COS2	1.096	2.138	3.99E-07
YHR160C	PEX18	1.097	2.138	1.49E-02
YMR311C	GLC8	1.098	2.140	3.40E-05
YDR516C	EMI2	1.098	2.141	3.58E-05
YKL124W	SSH4	1.099	2.142	1.75E-05
YMR306W	FKS3	1.104	2.149	4.78E-02
YHR097C	YHR097C	1.104	2.149	5.67E-03
YBR147W	RTC2	1.110	2.158	2.58E-02
YDL123W	SNA4	1.118	2.171	5.00E-04
YOR019W	YOR019W	1.118	2.171	4.75E-06
YGR053C	YGR053C	1.121	2.176	3.11E-05
YNL305C	BXI1	1.122	2.177	3.87E-04
YJL163C	YJL163C	1.123	2.178	2.70E-03
YBL060W	YEL1	1.129	2.187	5.81E-04
YBR214W	SDS24	1.133	2.193	3.44E-03
YBL086C	YBL086C	1.141	2.206	2.84E-04
YOR185C	GSP2	1.145	2.211	3.56E-03
YBR285W	YBR285W	1.146	2.213	4.48E-03
YDR262W	YDR262W	1.146	2.213	1.04E-06
YPL230W	USV1	1.161	2.236	3.20E-04
YBR287W	YBR287W	1.163	2.239	4.79E-05
YJL142C	IRC9	1.172	2.253	2.95E-02
YCR091W	KIN82	1.173	2.254	3.82E-05
YNL173C	MDG1	1.173	2.254	4.58E-07
YBR298C	MAL31	1.174	2.256	6.02E-05
YMR174C	PAI3	1.175	2.258	3.33E-02
YPR184W	GDB1	1.175	2.259	5.12E-06
YMR250W	GAD1	1.179	2.264	3.07E-03
YLL055W	YCT1	1.180	2.266	9.26E-06
YER053C	PIC2	1.181	2.268	1.53E-02
YDL020C	RPN4	1.183	2.270	2.47E-06

YOR036W	PEP12	1.186	2.275	7.58E-06
YKR049C	FMP46	1.186	2.276	6.02E-05
YPL017C	IRC15	1.188	2.278	4.78E-03
YLR010C	TEN1	1.189	2.279	1.40E-04
YKR058W	GLG1	1.189	2.280	1.94E-05
YJL094C	KHA1	1.190	2.281	4.46E-05
YDR216W	ADR1	1.190	2.281	1.91E-02
YBR290W	BSD2	1.194	2.288	2.07E-05
YIL097W	FYV10	1.195	2.290	2.47E-03
YDR070C	FMP16	1.205	2.305	1.13E-04
YDR453C	TSA2	1.205	2.305	7.48E-06
YHL036W	MUP3	1.210	2.314	8.92E-05
YMR100W	MUB1	1.211	2.315	1.69E-02
YPL164C	MLH3	1.212	2.317	9.66E-06
YAL060W	BDH1	1.222	2.333	3.36E-07
YAL017W	PSK1	1.223	2.335	1.91E-02
YGR023W	MTL1	1.229	2.345	1.48E-03
YMR090W	YMR090W	1.231	2.347	5.32E-05
YLR138W	NHA1	1.233	2.350	5.94E-03
YNL136W	EAF7	1.235	2.353	1.02E-03
YDL010W	GRX6	1.235	2.354	1.09E-04
EC1118_1O4_6579g	EC1118_1O4_6579g	1.243	2.367	3.38E-04
YGL180W	ATG1	1.245	2.369	2.34E-03
YBL064C	PRX1	1.247	2.373	4.62E-04
YDL234C	GYP7	1.251	2.379	2.91E-03
YPR085C	ASA1	1.252	2.382	5.89E-07
YIL098C	FMC1	1.254	2.385	2.15E-06
YDR185C	UPS3	1.258	2.392	1.52E-02
YKL142W	MRP8	1.260	2.394	9.05E-05
YIL024C	YIL024C	1.267	2.407	4.25E-04
YIR014W	YIR014W	1.272	2.416	7.94E-04
YOR223W	YOR223W	1.274	2.418	2.14E-06
YBR068C	BAP2	1.274	2.419	1.53E-06
YBR169C	SSE2	1.284	2.435	1.74E-03
YDR273W	DON1	1.286	2.438	4.58E-07
YER103W	SSA4	1.290	2.445	1.14E-03
YOL109W	ZEO1	1.306	2.473	1.03E-02
YHL021C	AIM17	1.308	2.477	9.87E-07
YMR196W	YMR196W	1.311	2.481	2.59E-03
YGR030C	POP6	1.328	2.510	4.68E-05
YFR040W	SAP155	1.335	2.523	2.14E-04
YDL079C	MRK1	1.336	2.524	3.37E-04
YGR225W	AMA1	1.345	2.540	1.66E-04
YER142C	MAG1	1.350	2.550	1.17E-05
YDR473C	PRP3	1.357	2.561	5.63E-04
YIL101C	XBP1	1.357	2.561	1.88E-05

YOL154W	ZPS1	1.363	2.573	4.79E-05
YJL102W	MEF2	1.386	2.613	5.73E-07
YPL240C	HSP82	1.394	2.628	1.50E-06
YML034W	SRC1	1.395	2.630	1.13E-04
YDL173W	PAR32	1.397	2.634	8.61E-04
YLR177W	YLR177W	1.398	2.635	1.66E-04
YDL115C	IWR1	1.399	2.637	1.98E-04
YBR066C	NRG2	1.402	2.642	8.22E-04
YJL164C	TPK1	1.402	2.642	4.97E-06
YNL142W	MEP2	1.405	2.648	9.40E-05
YOR052C	TMC1	1.412	2.662	2.13E-04
YKL026C	GPX1	1.416	2.669	8.07E-04
YJR061W	YJR061W	1.422	2.680	2.11E-07
YPL119C	DBP1	1.424	2.683	8.68E-07
YLR178C	TFS1	1.448	2.729	3.75E-02
YPR154W	PIN3	1.455	2.742	2.45E-03
YOR049C	RSB1	1.460	2.750	6.72E-04
YNL212W	VID27	1.460	2.751	1.04E-03
YKL151C	YKL151C	1.473	2.775	1.83E-05
YLR152C	YLR152C	1.476	2.782	1.00E-07
YCL040W	GLK1	1.480	2.790	2.14E-06
YMR136W	GAT2	1.485	2.799	3.74E-06
YAL055W	PEX22	1.485	2.800	6.82E-05
YMR206W	YMR206W	1.492	2.813	2.27E-03
YGR201C	YGR201C	1.493	2.814	1.64E-05
YNL015W	PBI2	1.496	2.820	1.83E-05
YPL201C	YIG1	1.500	2.829	2.47E-03
YOR120W	GCY1	1.505	2.838	2.39E-07
YDR179C	CSN9	1.508	2.844	2.19E-06
YBR284W	YBR284W	1.516	2.859	4.70E-05
YKR034W	DAL80	1.519	2.866	1.10E-03
YLR338W	OPI9	1.535	2.897	1.22E-04
YNL194C	YNL194C	1.539	2.907	3.28E-08
YMR135C	GID8	1.542	2.913	2.59E-03
YHR140W	YHR140W	1.546	2.921	2.80E-08
YOL016C	CMK2	1.549	2.927	2.88E-03
YIL119C	RPI1	1.554	2.936	5.61E-06
YCR039C	MATALPHA2	1.556	2.940	3.32E-07
YCL067C	HMLALPHA2	1.560	2.949	2.43E-05
YPR101W	SNT309	1.562	2.952	1.55E-04
YOR173W	DCS2	1.570	2.969	2.32E-04
YDL024C	DIA3	1.573	2.976	7.08E-07
YGL184C	STR3	1.580	2.990	3.42E-05
YHR146W	CRP1	1.602	3.036	8.96E-07
YKR014C	YPT52	1.609	3.051	8.39E-05
YJL153C	INO1	1.615	3.062	1.34E-07

YJR152W	DAL5	1.620	3.074	2.82E-07
YMR040W	YET2	1.653	3.144	1.89E-07
YKL035W	UGP1	1.653	3.144	7.00E-06
YNL077W	APJ1	1.690	3.227	1.43E-05
YDL124W	YDL124W	1.702	3.254	7.58E-08
YJL034W	KAR2	1.714	3.280	2.45E-03
YDR258C	HSP78	1.721	3.297	4.27E-08
YOR257W	CDC31	1.723	3.302	3.14E-06
YHR138C	YHR138C	1.726	3.309	1.27E-03
YNL093W	YPT53	1.729	3.316	2.47E-07
YJL166W	QCR8	1.764	3.396	8.68E-07
YDL210W	UGA4	1.777	3.428	4.93E-04
YLR312C	YLR312C	1.829	3.552	7.03E-06
YAL061W	BDH2	1.840	3.579	9.17E-06
YEL060C	PRB1	1.858	3.625	1.93E-04
YMR105C	PGM2	1.881	3.682	2.31E-05
YDR533C	HSP31	1.911	3.760	1.01E-05
EC1118_1O4_6667g	EC1118_1O4_6667g	1.919	3.781	2.20E-07
EC1118_1O4_6656g	EC1118_1O4_6656g	1.988	3.967	1.62E-05
YGR008C	STF2	1.993	3.980	8.35E-06
YDR173C	ARG82	2.004	4.011	3.59E-07
YER054C	GIP2	2.029	4.082	3.42E-05
YJL144W	YJL144W	2.047	4.131	7.58E-08
YNL196C	SLZ1	2.064	4.182	9.91E-08
YMR107W	SPG4	2.093	4.267	3.82E-02
YIL045W	PIG2	2.106	4.306	1.03E-03
YGR142W	BTN2	2.113	4.325	3.03E-02
YPL186C	UIP4	2.113	4.327	4.94E-07
YAL005C	SSA1	2.116	4.334	5.95E-07
YOL052C-A	DDR2	2.130	4.376	8.85E-06
YPR030W	CSR2	2.157	4.461	3.23E-04
YPR160W	GPH1	2.174	4.513	5.56E-09
YMR251W-A	HOR7	2.183	4.542	7.08E-07
YML100W	TSL1	2.188	4.557	3.54E-06
YEL012W	UBC8	2.192	4.569	2.99E-08
YGR161C	RTS3	2.221	4.661	3.04E-02
YFR015C	GSY1	2.347	5.087	1.00E-07
YDR171W	HSP42	2.348	5.092	1.40E-07
YDR043C	NRG1	2.407	5.305	2.99E-08
YLR258W	GSY2	2.475	5.561	7.66E-07
YNR034W-A	YNR034W-A	2.526	5.761	3.56E-04
YAL054C	ACS1	2.536	5.799	1.65E-09
YLR327C	TMA10	2.602	6.073	3.46E-08
YER067W	RGI1	2.687	6.438	2.46E-06
YFR017C	IGD1	2.693	6.467	4.23E-09
YEL011W	GLC3	2.735	6.660	9.23E-09

YBR072W	HSP26	2.870	7.312	8.06E-05
YER150W	SPI1	2.907	7.501	1.65E-09
YMR081C	ISF1	2.984	7.914	3.28E-08
YCR098C	GIT1	3.152	8.891	4.23E-09
YCR021C	HSP30	3.192	9.137	3.22E-07
YOR178C	GAC1	3.547	11.685	5.26E-03
YDR342C	HXT7	3.566	11.843	4.23E-09
YOR348C	PUT4	3.807	13.999	5.56E-09
YDR343C	HXT6	3.971	15.684	1.09E-05

Table S5: Genes differentially expressed between Affinity™ ECA5 and Lalvin EC1118® for the first time of sampling

Systematic name	Functional name	logFC	FC	adj.P.Val
YMR175W	SIP18	-4.297	0.051	9.42E-09
YGR088W	CTT1	-3.742	0.075	1.65E-09
YFL014W	HSP12	-3.630	0.081	1.50E-10
YML054C	CYB2	-3.549	0.085	6.80E-12
YMR169C	ALD3	-3.522	0.087	2.37E-08
YGR201C	YGR201C	-3.205	0.108	4.28E-09
YPL223C	GRE1	-3.198	0.109	7.44E-07
YGL255W	ZRT1	-3.178	0.111	7.33E-07
YMR174C	PAI3	-3.170	0.111	1.96E-05
YBR116C	YBR116C	-2.976	0.127	1.19E-06
YPL036W	PMA2	-2.962	0.128	4.72E-07
YDR270W	CCC2	-2.945	0.130	1.74E-08
YNL112W	DBP2	-2.941	0.130	3.08E-08
YMR244W	YMR244W	-2.907	0.133	6.96E-03
YER145C	FTR1	-2.828	0.141	9.86E-09
YGR052W	FMP48	-2.758	0.148	1.30E-08
YDL223C	HBT1	-2.711	0.153	7.52E-07
YER053C-A	YER053C-A	-2.693	0.155	6.21E-08
YPR160W	GPH1	-2.651	0.159	8.08E-10
YCL036W	GFD2	-2.634	0.161	4.11E-09
YML075C	HMG1	-2.510	0.176	4.14E-05
YJL025W	RRN7	-2.471	0.180	4.14E-11
YPR151C	SUE1	-2.468	0.181	4.51E-10
YGR256W	GND2	-2.430	0.186	3.61E-04
YDR453C	TSA2	-2.401	0.189	4.28E-09
YML128C	MSC1	-2.379	0.192	2.93E-08
YGR043C	NQM1	-2.376	0.193	2.18E-05
YDL181W	INH1	-2.312	0.201	1.04E-06
YGR066C	YGR066C	-2.302	0.203	6.21E-08
YBR117C	TKL2	-2.292	0.204	3.91E-02
YNL237W	YTP1	-2.274	0.207	3.84E-08
YJR048W	CYC1	-2.272	0.207	2.09E-05
YMR250W	GAD1	-2.267	0.208	1.20E-05
YPR193C	HPA2	-2.236	0.212	7.48E-07
YNL052W	COX5A	-2.226	0.214	1.08E-08
YMR090W	YMR090W	-2.218	0.215	1.40E-07
YLR395C	COX8	-2.216	0.215	1.13E-07
YOR062C	YOR062C	-2.216	0.215	1.13E-07
YGR248W	SOL4	-2.209	0.216	8.54E-07
YLR168C	UPS2	-2.174	0.222	8.08E-10
YNL270C	ALP1	-2.144	0.226	9.42E-09
YGR065C	VHT1	-2.133	0.228	9.91E-07

YPR184W	GDB1	-2.127	0.229	9.42E-09
YPR061C	JID1	-2.125	0.229	5.97E-07
YDR492W	IZH1	-2.119	0.230	7.45E-06
YDR070C	FMP16	-2.116	0.231	4.25E-07
YNR053C	NOG2	-2.099	0.233	1.93E-05
YHR001W-A	QCR10	-2.092	0.234	1.94E-05
YFR017C	IGD1	-2.088	0.235	1.32E-07
YPL280W	HSP32	-2.071	0.238	9.42E-09
YMR105C	PGM2	-2.068	0.239	1.82E-05
YGL187C	COX4	-2.063	0.239	3.68E-08
YOL052C-A	DDR2	-2.060	0.240	2.70E-05
YKL187C	FAT3	-2.043	0.243	4.81E-05
YMR322C	SNO4	-2.040	0.243	6.25E-08
YPR065W	ROX1	-2.019	0.247	4.18E-06
YNR018W	RCF2	-2.014	0.248	8.05E-06
YPL274W	SAM3	-2.007	0.249	1.32E-08
YEL039C	CYC7	-1.994	0.251	1.13E-07
YGR079W	YGR079W	-1.976	0.254	1.98E-07
YMR256C	COX7	-1.976	0.254	4.38E-07
YBR230C	OM14	-1.973	0.255	9.61E-06
YBR072W	HSP26	-1.966	0.256	5.00E-03
YDR533C	HSP31	-1.966	0.256	1.63E-05
YIR038C	GTT1	-1.964	0.256	1.77E-05
YNL111C	CYB5	-1.963	0.257	1.35E-07
YOR338W	YOR338W	-1.945	0.260	4.29E-04
YDR222W	YDR222W	-1.943	0.260	1.04E-05
YOR173W	DCS2	-1.941	0.260	5.63E-05
YGL191W	COX13	-1.939	0.261	6.21E-08
YBR183W	YPC1	-1.922	0.264	3.06E-05
YPL281C	ERR2	-1.918	0.265	5.81E-06
YKL026C	GPX1	-1.903	0.267	9.80E-05
YGR182C	YGR182C	-1.900	0.268	2.90E-07
YML043C	RRN11	-1.887	0.270	2.39E-07
YMR070W	MOT3	-1.877	0.272	8.66E-03
YJL116C	NCA3	-1.843	0.279	8.54E-07
YEL024W	RIP1	-1.843	0.279	3.77E-07
YJL048C	UBX6	-1.827	0.282	8.47E-05
YFL030W	AGX1	-1.814	0.284	5.07E-04
YBL030C	PET9	-1.805	0.286	7.37E-07
YOR374W	ALD4	-1.804	0.286	1.62E-04
YKR046C	PET10	-1.786	0.290	2.59E-07
YNL141W	AAH1	-1.784	0.290	5.81E-04
YKR049C	FMP46	-1.781	0.291	1.41E-06
YMR015C	ERG5	-1.777	0.292	6.48E-05
YOR393W	ERR1	-1.766	0.294	8.54E-07
YKL078W	DHR2	-1.752	0.297	6.17E-06

YBR242W	YBR242W	-1.750	0.297	7.45E-04
YCR061W	YCR061W	-1.750	0.297	5.65E-03
YNL269W	BSC4	-1.738	0.300	6.72E-06
YOR317W	FAA1	-1.735	0.300	3.08E-08
YAL061W	BDH2	-1.729	0.302	3.91E-05
YNL200C	YNL200C	-1.727	0.302	1.98E-07
YBL042C	FUI1	-1.726	0.302	8.54E-07
YAL025C	MAK16	-1.720	0.304	2.15E-07
YDR223W	CRF1	-1.719	0.304	3.28E-05
YBL029W	YBL029W	-1.701	0.308	3.36E-07
YDL204W	RTN2	-1.695	0.309	1.04E-05
YCR072C	RSA4	-1.694	0.309	3.90E-07
YER053C	PIC2	-1.686	0.311	2.20E-03
YKL107W	YKL107W	-1.685	0.311	1.43E-05
YOL151W	GRE2	-1.671	0.314	1.87E-07
YOR391C	HSP33	-1.662	0.316	7.75E-05
YPL061W	ALD6	-1.656	0.317	1.27E-04
YPR191W	QCR2	-1.652	0.318	5.20E-04
YLL009C	COX17	-1.646	0.320	2.33E-05
YDL124W	YDL124W	-1.641	0.321	2.15E-07
YKL150W	MCR1	-1.638	0.321	1.13E-05
YEL034W	HYP2	-1.629	0.323	6.76E-04
YGR191W	HIP1	-1.610	0.327	6.31E-07
YER141W	COX15	-1.609	0.328	5.90E-04
YLR109W	AHP1	-1.602	0.329	3.41E-05
YJL166W	QCR8	-1.584	0.334	8.02E-06
YGR225W	AMA1	-1.579	0.335	6.80E-05
YPL186C	UIP4	-1.577	0.335	3.34E-05
YEL011W	GLC3	-1.575	0.336	1.23E-05
YKR076W	ECM4	-1.561	0.339	5.73E-04
YNL231C	PDR16	-1.558	0.340	3.36E-03
EC1118_1O4_6546g	EC1118_1O4_6546g	-1.554	0.340	4.08E-05
YDL085W	NDE2	-1.549	0.342	2.24E-03
YDR299W	BFR2	-1.542	0.343	6.56E-06
YMR002W	MIX17	-1.538	0.344	5.41E-06
YPR098C	YPR098C	-1.533	0.346	1.29E-06
YML042W	CAT2	-1.533	0.346	9.87E-04
YMR068W	AVO2	-1.524	0.348	1.10E-05
YCR057C	PWP2	-1.514	0.350	2.38E-04
YGR049W	SCM4	-1.514	0.350	3.59E-06
YHR066W	SSF1	-1.510	0.351	1.86E-03
YDR504C	SPG3	-1.505	0.352	1.18E-04
YOL155C	HPF1	-1.499	0.354	3.35E-03
YBL045C	COR1	-1.499	0.354	1.94E-04
YKL163W	PIR3	-1.496	0.354	3.02E-06
YHR139C	SPS100	-1.493	0.355	1.13E-07

YBR034C	HMT1	-1.486	0.357	3.26E-07
YDL110C	TMA17	-1.485	0.357	4.29E-05
YDR513W	GRX2	-1.483	0.358	5.34E-06
YDR406W	PDR15	-1.481	0.358	8.17E-03
YDR529C	QCR7	-1.478	0.359	1.85E-04
YBL075C	SSA3	-1.475	0.360	2.15E-07
YOL077W-A	ATP19	-1.474	0.360	1.71E-03
YLR258W	GSY2	-1.463	0.363	5.48E-04
YLL012W	YEH1	-1.460	0.364	2.75E-03
YLL008W	DRS1	-1.453	0.365	9.87E-04
YOR287C	RRP36	-1.441	0.368	2.79E-07
YMR316W	DIA1	-1.432	0.371	1.24E-05
YCR005C	CIT2	-1.428	0.372	3.16E-07
YMR302C	YME2	-1.425	0.372	2.11E-06
EC1118_1O4_6557g	EC1118_1O4_6557g	-1.423	0.373	7.24E-03
YNL119W	NCS2	-1.421	0.373	5.32E-07
YGR175C	ERG1	-1.409	0.377	1.69E-03
YDR505C	PSP1	-1.409	0.377	1.62E-06
YIL130W	ASG1	-1.408	0.377	1.04E-05
YGR159C	NSR1	-1.407	0.377	1.10E-03
YMR290C	HAS1	-1.406	0.377	8.68E-06
YPL028W	ERG10	-1.401	0.379	1.31E-03
YBR213W	MET8	-1.400	0.379	6.44E-06
YNL015W	PBI2	-1.396	0.380	8.38E-05
YER103W	SSA4	-1.393	0.381	1.20E-03
YLR038C	COX12	-1.393	0.381	3.10E-03
YLR276C	DBP9	-1.389	0.382	5.65E-06
YOR078W	BUD21	-1.387	0.382	1.05E-06
YLR223C	IFH1	-1.385	0.383	5.72E-06
YHR096C	HXT5	-1.372	0.386	1.20E-03
YLR411W	CTR3	-1.369	0.387	8.60E-06
YGR280C	PXR1	-1.367	0.388	1.14E-03
YLR063W	BMT6	-1.367	0.388	3.17E-05
YOR129C	AFI1	-1.365	0.388	3.47E-04
YJL161W	FMP33	-1.356	0.391	1.32E-05
YGL160W	AIM14	-1.350	0.392	1.40E-06
YDR083W	RRP8	-1.346	0.393	3.14E-03
EC1118_1O4_6612g	EC1118_1O4_6612g	-1.345	0.394	8.00E-05
YLR407W	YLR407W	-1.345	0.394	1.19E-03
YML093W	UTP14	-1.344	0.394	8.59E-07
YNL160W	YGP1	-1.341	0.395	2.31E-03
YHR051W	COX6	-1.340	0.395	5.81E-04
YDR511W	ACN9	-1.339	0.395	3.25E-03
YBR241C	YBR241C	-1.337	0.396	1.84E-04
YHR178W	STB5	-1.333	0.397	9.53E-06
YPL171C	OYE3	-1.333	0.397	2.79E-03

YNL195C	YNL195C	-1.329	0.398	6.42E-04
YHL024W	RIM4	-1.329	0.398	9.18E-04
YMR316C-B	YMR316C-B	-1.325	0.399	1.38E-03
YBR067C	TIP1	-1.319	0.401	9.63E-05
YBR142W	MAK5	-1.318	0.401	3.78E-06
YNL100W	MIC27	-1.304	0.405	1.47E-05
YOR052C	TMC1	-1.304	0.405	9.56E-04
YKL053C-A	MDM35	-1.303	0.405	6.62E-04
YDR496C	PUF6	-1.299	0.406	8.54E-07
YAL005C	SSA1	-1.298	0.407	3.12E-04
YGR110W	CLD1	-1.296	0.407	1.35E-04
YIL087C	AIM19	-1.295	0.407	1.15E-02
YKR087C	OMA1	-1.294	0.408	9.46E-04
YJR104C	SOD1	-1.288	0.410	1.32E-05
YOR051C	ETT1	-1.287	0.410	2.65E-04
YOL084W	PHM7	-1.287	0.410	1.41E-06
YIL169C	YIL169C	-1.280	0.412	6.96E-03
YDL086W	YDL086W	-1.277	0.413	1.76E-03
YER169W	RPH1	-1.276	0.413	1.32E-05
YHR202W	YHR202W	-1.275	0.413	8.60E-06
YHR154W	RTT107	-1.275	0.413	6.19E-05
YDL174C	DLD1	-1.274	0.413	3.30E-05
YOR205C	GEP3	-1.272	0.414	1.16E-03
YBL064C	PRX1	-1.271	0.414	8.25E-04
YMR134W	ERG29	-1.271	0.414	1.03E-05
YDL167C	NRP1	-1.270	0.415	2.40E-03
YHR065C	RRP3	-1.267	0.416	5.94E-05
YBR247C	ENP1	-1.262	0.417	1.13E-05
YNL065W	AQR1	-1.261	0.417	1.12E-04
YDR490C	PKH1	-1.259	0.418	6.28E-05
YHR039C	MSC7	-1.255	0.419	1.71E-05
YIL160C	POT1	-1.253	0.419	7.36E-04
YML126C	ERG13	-1.253	0.420	4.83E-05
YMR272C	SCS7	-1.252	0.420	3.12E-03
YOR359W	VTS1	-1.252	0.420	2.11E-05
YJL112W	MDV1	-1.248	0.421	2.18E-05
YLR069C	MEF1	-1.245	0.422	6.94E-04
YKR089C	TGL4	-1.245	0.422	1.39E-02
YMR173W	DDR48	-1.245	0.422	3.78E-06
YLR056W	ERG3	-1.243	0.422	1.24E-03
YOR044W	IRC23	-1.238	0.424	8.78E-06
YPR190C	RPC82	-1.235	0.425	9.76E-05
YKR024C	DBP7	-1.227	0.427	3.06E-06
YGR008C	STF2	-1.226	0.428	2.11E-03
YPL107W	YPL107W	-1.224	0.428	5.32E-05
YLR070C	XYL2	-1.221	0.429	1.82E-05

YEL020W-A	TIM9	-1.219	0.430	3.60E-04
YPL183C	RTT10	-1.216	0.431	2.13E-07
YDR184C	ATC1	-1.213	0.431	8.81E-04
YMR110C	HFD1	-1.212	0.432	5.15E-03
YGR209C	TRX2	-1.208	0.433	1.02E-02
YAL054C	ACS1	-1.207	0.433	1.15E-05
YHR160C	PEX18	-1.206	0.434	1.41E-02
YOL029C	YOL029C	-1.205	0.434	3.85E-07
YMR196W	YMR196W	-1.205	0.434	9.10E-03
YIL111W	COX5B	-1.202	0.435	4.32E-02
YAL008W	FUN14	-1.200	0.435	4.30E-05
YDR258C	HSP78	-1.194	0.437	7.45E-06
YCR045C	RRT12	-1.191	0.438	4.23E-04
YBR054W	YRO2	-1.191	0.438	1.52E-03
YPL068C	YPL068C	-1.186	0.439	2.15E-05
Q0075	AI5_BETA	-1.183	0.440	5.18E-03
YDR218C	SPR28	-1.182	0.441	9.86E-05
YGL101W	YGL101W	-1.179	0.442	5.95E-04
YDR527W	RBA50	-1.178	0.442	9.42E-05
YMR093W	UTP15	-1.177	0.442	1.13E-03
YHR087W	RTC3	-1.174	0.443	4.97E-03
YOL083W	ATG34	-1.173	0.443	1.25E-04
YIL125W	KGD1	-1.172	0.444	3.58E-04
YOL124C	TRM11	-1.170	0.444	1.32E-02
YLR295C	ATP14	-1.167	0.445	1.58E-04
YCL054W	SPB1	-1.165	0.446	3.90E-02
Q0080	ATP8	-1.161	0.447	1.17E-02
YFL034C-A	RPL22B	-1.160	0.448	1.09E-05
YGR239C	PEX21	-1.157	0.448	1.20E-03
YBR141C	BMT2	-1.155	0.449	1.59E-05
YGR266W	YGR266W	-1.155	0.449	1.39E-02
YER044C	ERG28	-1.154	0.449	1.57E-03
YMR229C	RRP5	-1.151	0.450	1.13E-05
YOR340C	RPA43	-1.144	0.452	2.93E-08
YJL010C	NOP9	-1.144	0.452	1.54E-05
YKL093W	MBR1	-1.144	0.453	7.48E-03
YOR187W	TUF1	-1.142	0.453	1.04E-05
YAL063C	FLO9	-1.141	0.453	2.61E-04
YDR465C	RMT2	-1.139	0.454	5.73E-03
YBL028C	YBL028C	-1.137	0.455	3.39E-03
YGR145W	ENP2	-1.134	0.456	1.05E-04
YPL117C	IDI1	-1.132	0.456	1.17E-03
YGR087C	PDC6	-1.131	0.457	5.93E-04
YDL054C	MCH1	-1.130	0.457	4.05E-02
YOR154W	SLP1	-1.129	0.457	9.53E-06
YGR021W	YGR021W	-1.121	0.460	5.93E-04

YFR011C	MIC19	-1.121	0.460	1.42E-05
YMR131C	RRB1	-1.120	0.460	1.44E-03
YHL026C	YHL026C	-1.114	0.462	3.13E-07
YOL122C	SMF1	-1.113	0.462	3.48E-03
YOR186W	YOR186W	-1.113	0.462	2.92E-05
YHR148W	IMP3	-1.111	0.463	1.32E-04
YOR360C	PDE2	-1.110	0.463	1.29E-06
YJL122W	ALB1	-1.110	0.463	3.62E-04
EC1118_1O4_6601g	EC1118_1O4_6601g	-1.110	0.463	1.94E-03
YLR326W	YLR326W	-1.107	0.464	7.61E-05
YJL108C	PRM10	-1.106	0.464	3.88E-03
YER182W	FMP10	-1.106	0.465	9.42E-06
YBR239C	ERT1	-1.105	0.465	1.10E-05
YPL043W	NOP4	-1.102	0.466	3.46E-02
YGR123C	PPT1	-1.094	0.468	4.70E-05
YIL039W	TED1	-1.090	0.470	2.05E-03
YLR203C	MSS51	-1.090	0.470	6.35E-03
YPL183W-A	RTC6	-1.088	0.470	1.37E-02
YDR248C	YDR248C	-1.086	0.471	2.28E-03
Q0250	COX2	-1.086	0.471	6.25E-03
YDL214C	PRR2	-1.084	0.472	9.60E-03
YBR172C	SMY2	-1.083	0.472	7.14E-04
YLR074C	BUD20	-1.081	0.473	4.29E-04
YAL039C	CYC3	-1.079	0.473	2.19E-04
YKR071C	DRE2	-1.075	0.475	3.50E-04
YNL002C	RLP7	-1.071	0.476	7.79E-03
YIL091C	UTP25	-1.070	0.476	1.44E-03
YBR111C	YSA1	-1.067	0.477	2.59E-04
YKR099W	BAS1	-1.062	0.479	4.17E-03
YKL195W	MIA40	-1.060	0.480	1.89E-05
YHR092C	HXT4	-1.060	0.480	2.71E-03
YLR153C	ACS2	-1.056	0.481	7.62E-04
YMR049C	ERB1	-1.056	0.481	5.73E-04
YKL094W	YJU3	-1.055	0.481	4.60E-04
YPL104W	MSD1	-1.054	0.482	1.42E-04
YOL028C	YAP7	-1.054	0.482	4.69E-04
YML028W	TSA1	-1.049	0.483	8.31E-04
YHR170W	NMD3	-1.048	0.484	6.99E-06
YOR161C	PNS1	-1.046	0.484	2.98E-04
YOR206W	NOC2	-1.046	0.484	4.52E-06
YOR095C	RKI1	-1.045	0.485	9.40E-04
YKL151C	YKL151C	-1.042	0.486	1.25E-03
YGL001C	ERG26	-1.038	0.487	4.61E-03
YFL036W	RPO41	-1.037	0.487	8.00E-05
YDR178W	SDH4	-1.035	0.488	2.61E-02
YIL155C	GUT2	-1.033	0.489	4.14E-04

YLR023C	IZH3	-1.033	0.489	1.41E-02
YJL185C	ATG36	-1.032	0.489	9.56E-04
YGR102C	GTF1	-1.032	0.489	5.00E-03
YNL115C	YNL115C	-1.027	0.491	1.72E-04
YJL045W	YJL045W	-1.027	0.491	1.97E-03
YGR255C	COQ6	-1.024	0.492	5.15E-04
YPL172C	COX10	-1.020	0.493	1.19E-04
YML122C	YML122C	-1.010	0.497	2.42E-03
YGR229C	SMI1	-1.010	0.497	4.97E-03
YML076C	WAR1	-1.008	0.497	1.44E-03
YMR089C	YTA12	-1.008	0.497	3.33E-02
YNL306W	MRPS18	-1.007	0.497	6.97E-04
YNL186W	UBP10	-1.007	0.498	8.48E-04
YBR114W	RAD16	-1.007	0.498	1.97E-03
YBR155W	CNS1	-1.006	0.498	7.16E-06
YDL150W	RPC53	-1.004	0.499	1.41E-02
YHR077C	NMD2	-1.004	0.499	6.84E-04
YNL117W	MLS1	-1.004	0.499	3.21E-03
YER045C	ACA1	-1.003	0.499	2.26E-03
YLR080W	EMP46	-1.001	0.500	3.36E-05
YMR220W	ERG8	-1.000	0.500	2.60E-03
YGR060W	ERG25	-0.998	0.501	7.76E-03
YPL146C	NOP53	-0.996	0.501	2.17E-03
YML008C	ERG6	-0.995	0.502	3.01E-04
EC1118_1O4_6579g	EC1118_1O4_6579g	-0.995	0.502	4.54E-03
YDR120C	TRM1	-0.990	0.503	7.29E-04
YNL173C	MDG1	-0.988	0.504	8.38E-06
YHL029C	OCA5	-0.984	0.506	2.60E-06
YML081C-A	ATP18	-0.983	0.506	1.68E-04
YOL010W	RCL1	-0.982	0.506	2.70E-02
YMR037C	MSN2	-0.982	0.506	2.25E-04
YML100W	TSL1	-0.981	0.507	1.28E-02
YLR064W	PER33	-0.980	0.507	3.64E-04
YPL207W	TYW1	-0.980	0.507	2.33E-05
YBL099W	ATP1	-0.977	0.508	4.12E-02
YIL096C	BMT5	-0.976	0.509	2.11E-02
YHR055C	CUP1-2	-0.976	0.509	4.57E-03
YKL148C	SDH1	-0.975	0.509	5.33E-03
YKR081C	RPF2	-0.974	0.509	4.67E-04
YMR271C	URA10	-0.974	0.509	1.74E-02
YPL198W	RPL7B	-0.972	0.510	2.96E-03
YPL012W	RRP12	-0.972	0.510	4.58E-05
YHR052W	CIC1	-0.968	0.511	5.23E-04
YKL085W	MDH1	-0.967	0.511	2.92E-05
YLR051C	FCF2	-0.963	0.513	6.83E-04
YBR169C	SSE2	-0.961	0.514	2.38E-02

YPL170W	DAP1	-0.956	0.515	4.99E-03
YNL308C	KRI1	-0.955	0.516	7.45E-04
YLR196W	PWP1	-0.955	0.516	6.62E-04
YJR080C	AIM24	-0.947	0.519	8.00E-05
YML072C	TCB3	-0.945	0.519	1.11E-03
YLR218C	COA4	-0.944	0.520	2.32E-02
YHR106W	TRR2	-0.942	0.520	2.38E-04
YPR192W	AQY1	-0.942	0.521	3.81E-03
YKL194C	MST1	-0.941	0.521	2.59E-03
YOR100C	CRC1	-0.941	0.521	6.23E-03
YDL209C	CWC2	-0.940	0.521	2.02E-03
YGR035C	YGR035C	-0.939	0.522	1.79E-03
YPR026W	ATH1	-0.938	0.522	1.30E-02
YNL062C	GCD10	-0.936	0.523	2.11E-04
YML123C	PHO84	-0.935	0.523	1.09E-04
YNR001C	CIT1	-0.934	0.523	4.64E-02
YNR054C	ESF2	-0.933	0.524	6.74E-03
YMR268C	PRP24	-0.932	0.524	2.43E-04
YJR121W	ATP2	-0.930	0.525	4.37E-03
YLL023C	POM33	-0.927	0.526	3.28E-02
YPL026C	SKS1	-0.927	0.526	7.54E-03
YOR185C	GSP2	-0.924	0.527	2.63E-02
YFR048W	RMD8	-0.922	0.528	6.10E-05
YGL029W	CGR1	-0.921	0.528	2.66E-03
YLL034C	RIX7	-0.920	0.529	3.01E-04
YBL098W	BNA4	-0.919	0.529	3.03E-03
YOR252W	TMA16	-0.918	0.529	2.94E-05
YJL062W-A	COA3	-0.918	0.529	1.41E-03
YOR119C	RIO1	-0.917	0.530	4.52E-02
YNL156C	NSG2	-0.917	0.530	2.11E-03
YNL124W	NAF1	-0.914	0.531	1.82E-05
YBR021W	FUR4	-0.914	0.531	1.13E-03
YDR449C	UTP6	-0.912	0.531	3.02E-03
YJR119C	JHD2	-0.910	0.532	5.12E-05
YGR245C	SDA1	-0.910	0.532	3.44E-02
YLR256W	HAP1	-0.909	0.532	9.02E-03
YBL039C	URA7	-0.908	0.533	1.45E-02
YDR048C	YDR048C	-0.906	0.534	3.39E-02
YBR096W	YBR096W	-0.905	0.534	4.41E-05
YKL143W	LTV1	-0.904	0.535	5.41E-05
YGR053C	YGR053C	-0.904	0.535	6.13E-04
YER150W	SPI1	-0.903	0.535	1.04E-03
Q0060	AI3	-0.903	0.535	1.35E-02
YDR031W	MIX14	-0.902	0.535	6.49E-04
YPL093W	NOG1	-0.902	0.535	1.16E-04
YFR025C	HIS2	0.904	1.871	5.70E-03

YIL173W	VTH1	0.905	1.873	1.09E-02
YLR179C	YLR179C	0.909	1.878	9.15E-03
YDL059C	RAD59	0.913	1.883	5.41E-05
YPL267W	ACM1	0.915	1.886	4.32E-02
YIR034C	LYS1	0.918	1.890	3.39E-05
YPL031C	PHO85	0.920	1.892	2.77E-02
YBR243C	ALG7	0.920	1.893	2.11E-03
YKL127W	PGM1	0.927	1.901	5.32E-05
YDR261C	EXG2	0.929	1.904	2.03E-02
YER032W	FIR1	0.929	1.905	1.29E-03
YDR487C	RIB3	0.931	1.906	7.76E-03
YDR541C	YDR541C	0.933	1.909	1.67E-04
YBR071W	YBR071W	0.936	1.913	1.24E-02
YIL123W	SIM1	0.937	1.914	4.27E-02
YCL055W	KAR4	0.938	1.915	3.62E-05
EC1118_1F14_0133g	EC1118_1F14_0133g	0.940	1.918	5.50E-05
YKL213C	DOA1	0.940	1.918	4.32E-05
YGL256W	ADH4	0.943	1.923	5.73E-03
YCL030C	HIS4	0.945	1.926	3.76E-03
YBL082C	ALG3	0.947	1.928	6.14E-03
YPR105C	COG4	0.951	1.933	9.96E-03
EC1118_1O4_6491g	EC1118_1O4_6491g	0.954	1.937	9.16E-04
YOR202W	HIS3	0.961	1.947	5.43E-03
YOR094W	ARF3	0.971	1.960	1.47E-05
YMR189W	GCV2	0.975	1.965	6.70E-04
YIR028W	DAL4	0.979	1.971	7.93E-05
YNL253W	TEX1	0.982	1.975	6.46E-03
YHR213W	YHR213W	0.983	1.976	1.13E-02
YMR120C	ADE17	0.990	1.986	6.68E-03
YOR315W	SFG1	0.992	1.989	1.58E-02
YDR408C	ADE8	0.994	1.992	2.68E-03
YOR026W	BUB3	1.001	2.002	2.90E-03
YPL156C	PRM4	1.003	2.004	1.03E-02
YAR023C	YAR023C	1.008	2.012	4.08E-05
YEL040W	UTR2	1.013	2.018	1.44E-03
YHR094C	HXT1	1.014	2.020	1.52E-02
YKL126W	YPK1	1.016	2.023	6.62E-04
YGL021W	ALK1	1.025	2.034	4.36E-03
YDL010W	GRX6	1.025	2.035	1.35E-03
YER019W	ISC1	1.026	2.036	1.08E-03
EC1118_1F14_0100g	EC1118_1F14_0100g	1.029	2.040	3.11E-05
YFR030W	MET10	1.029	2.041	2.33E-04
YNR059W	MNT4	1.034	2.048	3.28E-03
YNL128W	TEP1	1.042	2.059	2.09E-02
YCR098C	GIT1	1.044	2.062	1.41E-03
YOR326W	MYO2	1.045	2.063	3.93E-03

YJL158C	CIS3	1.045	2.064	7.20E-03
YJL060W	BNA3	1.045	2.064	1.62E-02
YEL058W	PCM1	1.051	2.072	5.33E-03
YMR161W	HLJ1	1.053	2.075	3.24E-02
YNL331C	AAD14	1.056	2.079	1.60E-03
YHR041C	SRB2	1.059	2.083	2.82E-04
YDR400W	URH1	1.060	2.085	2.28E-04
YNL312W	RFA2	1.061	2.087	6.97E-04
YKR019C	IRS4	1.067	2.095	1.04E-03
YPL214C	THI6	1.070	2.099	3.04E-06
YER136W	GDI1	1.073	2.104	2.26E-03
YDR089W	YDR089W	1.077	2.110	1.22E-04
YDL238C	GUD1	1.087	2.124	2.33E-05
YKR039W	GAP1	1.088	2.125	1.76E-03
EC1118_1F14_0111g	EC1118_1F14_0111g	1.092	2.131	2.01E-02
YLR126C	YLR126C	1.093	2.133	2.52E-03
YML124C	TUB3	1.099	2.143	1.42E-04
YBR298C	MAL31	1.101	2.145	2.67E-04
YEL066W	HPA3	1.103	2.148	1.35E-04
YLR034C	SMF3	1.103	2.148	8.23E-03
YDR380W	ARO10	1.104	2.150	4.97E-03
YIL116W	HIS5	1.109	2.157	6.59E-04
YOR248W	YOR248W	1.127	2.185	2.11E-02
YOR184W	SER1	1.130	2.189	1.23E-04
YPR167C	MET16	1.131	2.190	8.26E-06
YDL012C	YDL012C	1.133	2.194	1.25E-02
YLR194C	YLR194C	1.135	2.196	1.23E-03
YFL051C	YFL051C	1.139	2.202	1.60E-03
YKL073W	LHS1	1.142	2.207	1.51E-02
YDL215C	GDH2	1.148	2.216	1.85E-04
YIR029W	DAL2	1.155	2.227	1.85E-05
YNR050C	LYS9	1.156	2.229	5.33E-03
YCL034W	LSB5	1.174	2.256	1.24E-02
YKR091W	SRL3	1.190	2.281	3.37E-03
YBR145W	ADH5	1.190	2.282	1.15E-02
YER060W-A	FCY22	1.194	2.289	3.25E-04
YOR237W	HES1	1.209	2.311	1.07E-03
YOR247W	SRL1	1.218	2.326	7.52E-05
YFL010C	WWM1	1.219	2.327	1.41E-03
YCL064C	CHA1	1.224	2.336	9.47E-03
YHL048W	COS8	1.227	2.341	1.84E-03
YJR137C	MET5	1.229	2.344	6.04E-05
YOL016C	CMK2	1.247	2.374	2.28E-02
EC1118_1O30_0012g	EC1118_1O30_0012g	1.259	2.394	2.27E-03
YNR068C	YNR068C	1.262	2.398	1.18E-04
YNL333W	SNZ2	1.271	2.413	3.76E-06

YFR056C	YFR056C	1.276	2.422	9.56E-05
YOR192C	THI72	1.296	2.455	2.78E-06
YGL224C	SDT1	1.298	2.460	2.45E-03
YOR321W	PMT3	1.302	2.466	9.56E-05
YFL059W	SNZ3	1.326	2.507	7.00E-05
YDR354W	TRP4	1.333	2.520	1.94E-02
YOR222W	ODC2	1.354	2.556	8.28E-06
YCR020C	PET18	1.363	2.573	2.53E-03
YGL179C	TOS3	1.364	2.574	1.32E-07
YMR020W	FMS1	1.371	2.586	4.01E-04
YBR162C	TOS1	1.373	2.591	3.86E-02
YJR148W	BAT2	1.388	2.617	7.43E-05
YOR385W	YOR385W	1.406	2.650	5.18E-03
YNL024C	YNL024C	1.407	2.652	1.57E-02
YDR213W	UPC2	1.426	2.687	1.69E-03
YGL202W	ARO8	1.461	2.754	4.52E-02
YMR305C	SCW10	1.464	2.759	2.29E-02
YLR257W	YLR257W	1.483	2.795	9.46E-04
YOL064C	MET22	1.494	2.817	1.52E-03
YOL154W	ZPS1	1.508	2.844	3.66E-05
YBR040W	FIG1	1.563	2.954	4.08E-03
YOL116W	MSN1	1.574	2.978	1.37E-04
YMR304C-A	YMR304C-A	1.599	3.029	1.44E-05
YDL239C	ADY3	1.604	3.041	1.25E-04
YKR013W	PRY2	1.627	3.089	3.90E-06
YFL021W	GAT1	1.628	3.090	3.25E-06
YJL088W	ARG3	1.638	3.111	1.70E-03
YEL065W	SIT1	1.656	3.152	3.34E-05
YIR030C	DCG1	1.663	3.166	1.04E-06
YCR060W	TAH1	1.668	3.179	4.22E-02
YLR089C	ALT1	1.670	3.183	5.16E-07
YIR032C	DAL3	1.691	3.228	6.83E-04
YGL253W	HXK2	1.714	3.281	2.33E-05
YOL058W	ARG1	1.741	3.343	1.59E-04
YPL258C	THI21	1.746	3.355	2.78E-03
YDR090C	YDR090C	1.799	3.479	9.22E-03
YKR053C	YSR3	1.799	3.480	7.87E-04
YGL089C	MF(ALPHA)2	1.819	3.528	7.96E-04
YPR194C	OPT2	1.843	3.587	4.20E-04
YJR152W	DAL5	1.848	3.601	1.32E-07
YDR242W	AMD2	1.899	3.730	2.88E-04
YNL142W	MEP2	1.919	3.781	7.79E-06
YMR088C	VBA1	1.931	3.814	1.10E-06
EC1118_1O4_6513g	EC1118_1O4_6513g	2.099	4.284	1.48E-05
YOL019W	YOL019W	2.140	4.409	5.22E-03
YER185W	PUG1	2.142	4.413	2.80E-03

YNL129W	NRK1	2.192	4.568	4.90E-05
YDL145C	COP1	2.261	4.795	1.10E-03
YJL174W	KRE9	2.311	4.963	3.85E-02
EC1118_1O4_6502g	EC1118_1O4_6502g	2.349	5.094	2.70E-02
YIL165C	YIL165C	2.378	5.199	3.65E-06
YKR034W	DAL80	2.414	5.331	2.33E-05
YIL164C	NIT1	2.459	5.497	2.12E-09
YGR190C	YGR190C	2.466	5.524	1.19E-02
YIR031C	DAL7	2.559	5.892	1.82E-05
YHR029C	YHI9	2.566	5.921	1.58E-07
YJR151C	DAN4	2.778	6.859	6.21E-08
YJL172W	CPS1	3.167	8.981	6.21E-08
YCR105W	ADH7	3.188	9.112	1.56E-06
YFR055W	IRC7	3.404	10.584	1.98E-02
YPL265W	DIP5	3.519	11.464	1.42E-04
YMR317W	YMR317W	4.361	20.554	2.51E-12

Chapitre 3

Filiation isotopique ^{13}C pour élucider l'influence des paramètres environnementaux et de la souche de levure sur la production d'arômes fermentaires

Dans le chapitre précédent, nous avons mis en évidence des différences importantes entre les deux souches à différents niveaux : consommation des sources azotées, synthèse des arômes fermentaires et bioconversion des alcools supérieurs en esters d'acétate. L'ensemble de ces différences semble être dû, au moins en partie, à une modification du métabolisme des lipides chez la souche évoluée, notamment à une disponibilité plus importante en acétyl-CoA qui pourrait être utilisé pour la synthèse des esters d'acétate.

Afin d'aller plus loin dans la compréhension des différences métaboliques dues à l'évolution adaptative entre les deux souches, nous avons réalisé une expérience de filiation isotopique afin de déterminer la contribution des métabolismes azoté et carboné pour la production des composés d'arôme chez chaque souche. L'objectif est aussi de pouvoir proposer une explication quant à la surproduction systématique des alcools supérieurs et des esters d'acétate par Affinity™ ECA5.

Pour cela, des fermentations contenant soit de la leucine, soit de la valine marquée ont été réalisées. Nous avons également fait varier le contenu initial en azote et en phytostérols pour évaluer leur impact sur la distribution des flux.

A quantitative ^{13}C-isotope labelling-based analysis to elucidate the influence of environmental parameters and yeast strain on the production of fermentative aromas during wine fermentation

Stéphanie Rollero[1,2,3,4], Jean-Roch Mouret[1,2,3], Audrey Bloem[1,2,3], Isabelle Sanchez[1,2,3], Anne Ortiz-Julien[4], Jean-Marie Sablayrolles[1,2,3], Sylvie Dequin[1,2,3] and Carole Camarasa[1,2,3*]

[1]INRA, UMR1083, F-34060 Montpellier, France

[2]SupAgro, UMR1083, F-34060 Montpellier, France

[3]Universite Montpellier, UMR1083, F-34060 Montpellier, France

[4]Lallemand SAS, F-31700 Blagnac, France

*Corresponding author: Phone: (33) 4 99 61 23 36; Fax: (33) 4 99 61 28 57

E-mail address: camarasa@supagro.inra.fr

Abstract

The production of fermentative aromas by wine yeast depends both on the composition of grape must but also on yeast strain. Nitrogen and lipids are key nutrients of grape must influencing the production of fermentative aromas, and we previously showed that a strong interaction exist between these two nutrients. The objective of this study was to determine how variations in nitrogen and lipid resource can modulate the contribution of nitrogen and carbon metabolism for the production of fermentative aromas, using a wine yeast strain and an aromatic strain obtained by adaptive evolution. A quantitative analysis of the metabolism with ^{13}C-labeled leucine and valine showed that higher alcohols derived from more than 90% of the intermediates of the carbon central metabolism. We also proposed a model to explain the optimum production of higher alcohols at intermediate nitrogen content.. We also demonstrated that the phytosterol content can influence the nitrogen fluxes distribution, especially the conversion of α-cetoisovalerate to α-cetoisocaproate. Finally, we show that the overproduction of higher alcohols by the evolved strain is due to a higher contribution of precursors originating from the carbon central metabolism.

Keywords

Saccharomyces cerevisiae, winemaking fermentation, quantitative analysis of metabolism, nitrogen, phytosterols, fermentative aromas

1. Introduction

The control of the quality of wines is a major issue in the winemaking sector: in an increasingly competitive market, a key objective is to best meet consumer expectations in terms of organoleptic profile of the product (Lee and Noble, 2003; Swiegers et al., 2005). Therefore, one of the current major challenges is to optimize and control the quality of wine, including sensory level. The aroma of wine can be defined as a complex mixture of molecules of different origins: varietal aromas and their precursors brought by grapes, the fermentative aromas synthesized by yeast-which also contribute to the revelation of certain varietal aromas - and post-fermentative aromas released during aging of wines (Swiegers et al., 2005). In this study, we are particularly interested in fermentative aromas which compounds belong to different chemical families (higher alcohols, acetate esters, medium chain fatty acids and fatty acid esters). Their synthesis involves a highly interconnected metabolic network (Swiegers et al., 2005). On the one hand, these volatile compounds can be produced form very different metabolic pathways: central carbon metabolism (CCM), lipid metabolism or amino acid catabolism (nitrogen metabolism); secondly, some of these fermentative aromas derive from common precursors, while others shared enzymes involved in their metabolic routes (e.g. higher alcohols). In line with this complexity, it was shown that the production of fermentative aromas depends on many environmental factors (assimilable nitrogen, availability in lipids, temperature …).

Several studies have assessed the influence of assimilable nitrogen content on the production of fermentative aromas as higher alcohols, their acetates and ethyl esters (reviewed in Bell and Henschke 2005). Generally, a direct relationship between initial nitrogen content and higher alcohol concentrations was observed when nitrogen content was low; whereas at moderate to high nitrogen quantities, there was an inverse relationship (Carrau et al., 2008; Jiménez-Martí et al., 2007; Mouret et al., 2014; Rollero et al., 2015; Vilanova et al., 2012,

2007). Acetates and ethyl esters showed a more simple relationship with the nitrogen concentration: an increase in initial nitrogen content was associated with an increase in ester production (Garde-Cerdán and Ancín-Azpilicueta 2008; Hernandez-Orte et al. 2006; Torrea et al. 2011; Ugliano et al. 2010). Recently, several studies have shown a relationship between the composition of the nitrogen source of the must, complex mixture of ammonium and amino acids, and the production of higher alcohols and esters (Beltran et al., 2005; Jiménez-Martí et al., 2007).

Conversely, the influence of phytosterols on the synthesis of these molecules has only recently been studied (Rollero et al., 2015). The increase in lipids seemed to favour the formation of higher alcohols but caused a decrease in the production of esters.

The yeast strain can also greatly influence the final concentration of these volatile compounds (Rossouw et al., 2012; Camarasa et al., 2011; Molina et al., 2009; Torija et al., 2003). Therefore, the development of new yeast strains with improved aromatic production properties is an important issue for the wine industry. Recently, an evolved strain with an enhanced production of fermentative aromas was obtained by adaptive evolution (Cadière et al., 2011, 2012; Patent No. FR 09/05585, 20 November 2009).

In this context, to define strategies to modulate the organoleptic characteristics of wines, it is necessary to better understand the metabolic origins of the differences in production of fermentative aromas depending on environmental parameters and on the strain used. These aspects are difficult to capture only from the monitoring of produced metabolites, and isotopic filiation approaches have been described as a tool of choice to deepen the metabolic knowledge (Blank et al., 2005; Christen and Sauer, 2011; Frick and Wittmann, 2005). An overview of the management of nitrogen by the yeast during a conventional wine fermentation (240 g/L sugars, 200 mg/L YAN) has been recently provided from an experimental design based on combination of ^{13}C and ^{15}N tracer experiments (Crépin, thesis,

Crepin et al. in preparation). This approach revealed a limited incorporation of exogenous amino acids in biomass in favour of *de novo* synthesis, with the exception of leucine mostly integrated in the biomass and arginine stored in the vacuole (Crépin thesis, Crépin et al, in preparation).

The first objective of this study was to determine how variations in nitrogen and lipid resource can modulate the contribution of nitrogen and carbon metabolism for the production of fermentative aromas, using filiation experiment with ^{13}C-labeled nitrogen sources. In addition, the same strategy was used to compare the fluxes distribution for two strains with contrasting aromatic profile: Lalvin EC1118® and Affinity™ ECA5 obtained by adaptive evolution of Lavin EC1118®. This study provided a deeper knowledge on how the environmental (initial nitrogen and phytosterol contents) and genetic (two strains with different aromatic profiles) factors can influence the contribution of nitrogen or carbon metabolisms to the production of fermentative aromas.

2. Materials & Methods

2.1. Yeast strains

The *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains used in this study were the commercial strains Lalvin EC1118® and Affinity™ ECA5 (Lallemand SA, Montreal, Canada), obtained by adaptive evolution of Lalvin EC1118®. Fermentation flasks were inoculated with 10 g/hl active dry yeast previously rehydrated for 30 minutes at 37°C in a 50 g/l glucose solution (1 g of dry yeast diluted in 10 ml of this solution).

2.2. Fermentation conditions

Fermentations were performed in 330 ml fermenters equipped with fermentation locks to maintain anaerobiosis, at 24°C, with continuous magnetic stirring (150 rpm). Total

anaerobiosis was obtained by bubbling argon in the medium. Each condition was tested in duplicates.

Fermentation was carried out on synthetic medium (SM) that simulates standard grape juice (Bely et al., 1990). The SM used in this study contained 200 g/l of sugar (100 g/l of glucose and 100 g/l of fructose); 6 g/l of malic acid; 6 g/l of citric acid; 750 mg/l of KH_2PO_4, 500 mg/l of K_2SO_4, 250 mg/l of $MgSO_4.7H_2O$, 155 mg/l of $CaCl_2.2H2O$, 200 mg/l of NaCl; vitamins (mg/l): myo-inositol (20), calcium pantothenate (1.5), thiamin hydrochloride (0.223), nicotinic acid (2), pyridoxine (0.25), biotin (0.003); oligoelements (mg/l): $MnSO_4.H_2O$ (4), $ZnSO_4.7H_2O$ (4), $CuSO_4.5H_2O$ (1), $CoCl_2.6H_2O$ (0.4), H_3BO_3 (1), $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ (1). The pH of the medium was adjusted to 3.3 with NaOH 10 M.

The nitrogen source was composed of ammonium chloride and amino acids. Three concentrations of assimilable nitrogen were used: 70, 250 and 425 mg/l. The composition of the stock solution of amino acids was (in g/l): tyrosine (1.4), tryptophan (13.7), isoleucine (2.5), aspartate (3.4), glutamate (9.2), arginine (28.6), leucine (3.7), threonine (5.8), glycine (1.4), glutamine (38.6), alanine (11.1), valine (3.4), methionine (2.4), phenylalanine (2.9), serine (6.0), histidine (2.5), lysine (1.3), cysteine (1.0) and proline (46.8). To obtain 70 mg/l of assimilable nitrogen in the MS, 2.16 ml of this solution and 75 mg/l of NH_4Cl were added to the medium; for 250 mg/l, 7.63 ml of amino acid solution, and 270 mg/l of NH4Cl were added and for 425 mg/l, 12.96 ml of amino acid solution and 460 mg/l of NH_4Cl were added.

SM medium was initially supplemented with two different concentrations of phytosterols (85451, Sigma Aldrich): 2 and 8 mg/l to satisfy the lipid requirements of yeast cells during anaerobic growth. The stock solution was composed of 15 g/l of phytosterols in Tween 80 and ethanol (1:1, v/v).

The labeled nitrogen sources used were obtained from Euriso-top® (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.): L-Valine (13C5, 97-98%) (CLM-2249) and L-Leucine (13C6, 97-99%) (CLM-2261).

2.3.Analytic methods

The yeast population was measured using an electronic particle counter (Multisizer 3 Coulter Counter, Beckman Coulter) fitted with a probe with a 100-mm aperture.

Dry weights were determined by filtering 10 ml of the culture trough pre-weighed nitrocellulose filter (pore size 0.45 µm, Milipore). The filter was washed with 20 ml of distillated water and dried at 105°C during 48 hours (when no further change in weight was observed).

Residual ammonium ions in the supernatant (sample centrifugation, 3 000 g, 4°C, 10 min) were assayed spectrophotometrically using an EnzytecTM kit (5380, ENZYTECTM) according to the manufacturer's instructions. Residuals amino acids were quantified with a specific amino acid analyzer (Biochrom 30; Biochrom) as previously described (Crepin et al., 2012).

2.4.Measurement of fractional labelling of intracellular amino acids

For the analysis of the fractional labelling of intracellular amino acids, cell pellets were hydrolysed in 600 µl of HCl 12N and 600 µl of distilled water during 24 hours at 105°C. 800 µl of distilled water were then added. The sample was centrifuged at 3 000 rpm for 10 min. The supernatant was distributed into four 400 µl fractions and were dried at 105°C. Four hydrolysates were used for derivatization of amino acids.

Ethylchloroformate (ECF) derivatization was modified from Christensen and Nielsen (1999). The dried hydrolysate was dissolved in 200 µl of HCl 20 mM and 133 µl of pyridin:ethanol

(1:4). This mixture was derivatized by adding 50 µl of ECF. The derivatives were extracted into 500 µl of dichloromethane. The organic phase was collected after 4 min of centrifugation at 10 000 rpm, and then dried with Na_2SO_4.

(N, N)-Dimethylformamide dimethyl acetal (DMF/DMA) derivatization was modified from Christensen and Nielsen (1999). The dried hydrolysate was dissolved in 50 µl of methanol, 100 µl of acetonitrile and the mixture was derivatized by adding 300 µl of DMF/DMA.

GC-MS parameters

The GC-MS was a G1530A, Hewlett-Packard, gas chromatograph quadrupole mass selective detector (5973 mass selective detector, Hewlett-Packard) operated at 70 eV. The column used for all analyses was a DB-17MS (Lenght = 30 mm, ID = 250 µm, film = 0.15 µm, Agilent technologies). The MS was operated in SIM mode.

ECF derivatives: The oven temperature program was: 130°C for 3 min, increase to 260°C at a rate of 15°C min^{-1}, hold at 260°C for 20 min. The carrier gas flow was 1.2 ml $He.min^{-1}$. 2 µl were injected with a split ratio 3:1. The inlet temperature was 230°C.

DMFDMA derivatives: The oven temperature program was: 60°C for 1 min, increase to 130°C at a rate of 20°C min^{-1}, increase to 260°C at a rate of 4°C min^{-1}, hold at 260°C for 10 min. The carrier gas flow was 1 $mLHe.min^{-1}$. 2 µL were injected with a split ratio 3:1. The inlet temperature was 230°C.

The natural isotopic distribution of amino acids were simulated by the software IsoCor recently developed by the group of Millard P (Millard et al., 2012).

2.5. Measurement of fractional labelling of fermentative aromas

The samples were prepared according to the protocol described in (Rollero et al., 2015). GC-MS analysis method was also the same as described in this publication.

The obtained chromatograms were analysed with the MSD ChemStation software. The enrichment levels of aroma compounds were calculated by the area ratio of the ion with a mass M + 1 and of the ion with a mass M (unenriched) via IsoCor software. This software takes into account the natural enrichment of nitrogen (Millard et al., 2012).

3. Results

To evaluate the distribution of nitrogen sources in proteinogenic amino acids and volatile compounds, we used a quantitative approach based on isotopic filiation with two ^{13}C-labeled amino acids. Fermentations were carried out with different initial nitrogen (70, 250 or 425 mg/l) and phytosterol (2 or 8 mg/l) contents, using two commercial wine yeast strains: Lalvin EC1118® and its evolved strain Affinity™ ECA5. We chose to use the labeling on the carbon skeleton of amino acids in order to study their distribution in the whole metabolic network. This ^{13}C-labelling provides information on the amino acid fractions directly used for biomass formation and those leading to the formation of fermentative aromas, which would not have been possible using a ^{15}N-labeling. Analysis of ^{13}C-enrichment patterns enables to determine the fluxes partitioning between the direct incorporation in proteins and the catabolism of the amino acids via their α-ketoacids and also the contribution of nitrogen or carbon metabolisms to the production of fermentative aromas. We selected for this study two amino acids, leucine and valine, which are precursors of isoamyl alcohol and isobutanol respectively and have interconnected metabolic pathways. For each fermentation condition, a single nitrogen compound was supplied as a labelled molecule, whereas the others remained unlabeled. Since the nitrogen sources are sequentially assimilated during the growth phase of wine fermentation Crepin et al. (2012), we investigated the distribution of nitrogen at different stages of culture corresponding to the growth phase ($N_{1/2}$ and $N_{3/4}$), the exhaustion of the nitrogen content (N_T) and the end of fermentation (EF). We first studied the impact of

environmental parameters on the contribution of amino acids to the formation of biomass and then to the formation of fermentative aromas. Finally, we compared the distribution of nitrogen sources between two strains presenting different aroma productions.

3.1. Impact of environmental parameters on the fates of exogenous amino acids

First, we quantified the fraction of amino acids present in the biomass directly coming from exogenous amino acids on the strain Lalvin EC1118®. Overall, the fraction incorporated directly into biomass was not noticeably influenced by the amount of phytosterols (Figure 1, 2, Supplementary data).

Major features demonstrated by Crepin et al. (in preparation) in SM200 were observed in our study. First, irrespective of nitrogen content and for the two amino acids, we observed a substantial imbalance, early in the growth phase, between the level of consumption of exogenous amino acids and the content of these compounds in proteins. For example, between 0.060 and 0.367 mmol/l of leucine were present in the medium, while the content of this amino acid in biomass varied between 0.230 and 0.903 mmol/l for SM70 and SM425 respectively (Figure 3, 4, Supplementary data). Overall, the content in proteinogenic amino acids was up to 3-4 times higher than the assimilated content (Figure 3, 4, Supplementary data). In line with these data, at the end of the growth phase, the isotopic enrichment of each amino acid in proteins, corresponding to the part directly originated from the exogenous compound (Figure 1, 2, supplementary data), was lower than 30% for all nitrogen concentrations. All these observations indicate that the *de novo* synthesis of amino acids from carbon central metabolism (CCM) contributes for an important part to fulfil the anabolic demand, even in a nitrogen-rich environment.

Then, we investigated if the contribution of *de novo* amino acid synthesis throughout the fermentation was related to the sequential consumption of these compounds. For all the

environmental conditions, we observed a higher decrease over the growth in isotopic enrichment of leucine (divided by 2), which was early imported into the cells (Crepin et al., 2012; Jiranek et al., 1995), compared to the one of valine (from 13% to 11%), which was consumed later (Supplementary data). These observations pointed out the important involvement of *de novo* synthesis through CCM to fulfil the needs in amino acids for protein formation, which increased with their depletion in the medium.

We also found that the fraction of exogenous amino acids directly incorporated into the biomass at the end of the growth phase differed according to the initial nitrogen content. In SM250 and SM425, the amount of labelled leucine in proteins was quite similar to the amount consumed, while in SM70, the part of exogenous leucine into biomass only accounted for 40% of the consumed amount (Figure 1, 2, Supplementary data). A similar situation was found with ^{13}C-valine, with the fraction of exogenous amino acid into proteins representing 40% of valine consumed in SM250 and SM425, and only 20-30% in SM70 (Figure 1, 2, Supplementary data). Despite anabolic requirements (at least 2-3 times higher than the concentration provided in the medium), the direct incorporation of amino acids in proteins was limited. Finally, we observed a non-negligible and constant (about 4-5%) isotopic enrichment on leucine during fermentation in the presence of labelled valine (Figure 1, 2). This is consistent with the existence of a leucine biosynthesis pathway from the carbon backbone of valine involving the unidirectional conversion of α-ketoisovalerate into α-ketoisocaproate (Kohlhaw, 2003). Nevertheless, the fraction of valine which was involved in the conversion of α-ketoisovalerate into α-ketoisocaproate varied depending on the initial nitrogen content: for SM70 and SM425, 45-48% of consumed valine was metabolized in this pathway, while 35% were metabolized for SM250 (Figure 1, 2, Supplementary data).

3.2. Impact of the environmental parameters on the contribution of exogenous amino acids to the higher alcohol and acid formation

We then investigated the contribution of exogenous amino acids to the formation of fermentative aromas in strain Lalvin EC1118® and the effect of environmental parameters on this contribution.

Higher alcohols

Low isotopic enrichments were found in isobutanol (5-15%) and isoamyl alcohol (2-8%) in the presence of labelled valine and leucine irrespective of the initial nitrogen content (Figure 1, 2). These enrichments decreased through the fermentation (Supplementary data), indicating a strong contribution of the CCM to the formation of ketoacids precursors of higher alcohols, which increased when exogenous amino acids were depleted. The relationship between nitrogen content and higher alcohol concentrations was not monotonous: there was a direct relationship at low nitrogen content (between 70 and 250 mg/l), whereas an inverse relationship was found at moderate to high nitrogen quantities (from 250 to 425 mg/l) (Figure 1, 2). It was interesting to note that the isotopic enrichment increased with initial nitrogen content, while the quantity of amino acid metabolized in these pathways decreased (Figure 1, 2). All of these results suggested that the contribution of ketoacids originating from CCM varied according to the initial nitrogen content of the medium. We also observed an enrichment of isoamyl alcohol in fermentations conducted with ^{13}C-valine (Figure 1, 2). Thus, part of the valine, after transamination, was transformed into α-ketoisocaproate precursor of isoamyl alcohol through CCM.

At high phytosterol content, the concentration of higher alcohols was higher than at low lipid concentration. In SM250 at low phytosterol content, the concentration of isobutanol was 0.403 mM, while at 8 mg/l of phytosterol it was 0.709 mM. In addition, the amount of higher

alcohol (in mM) produced from the carbon backbone of labeled amino acids tended to increase with the increase in phytosterols: in SM425 for isobutanol, this amount was equal to 0.052 mM and 0.066 mM for 2 and 8 mg/l of phytosterols, respectively (Figure 1,2). However, this impact is not exactly the same for isoamyl alcohol and isobutanol. Indeed, for isoamyl alcohol the highest increase occurred at low nitrogen content (increase of 18% in SM70), while for isobutanol it operated at high nitrogen concentration (increase of 21% in SM425), suggesting different regulations of the biosynthesis pathways of these two higher alcohols.

Acids

Regarding isovaleric and isobutyric acids, their formation as well as the labeling incorporation in these molecules did not present exactly the same responses to changes in environmental parameters. The isovaleric acid concentration decreased with the increase of initial nitrogen content, while isobutyric acid concentration decreased between 70 and 250 mg/l, and remained more or less stable between 250 and 425 mg/l (Figure 1, 2). The redox state of cells may explain this response, since their formation involves many deshydrogenases (Schoondermark-Stolk et al., 2005). Biomass production requires the consumption of NADPH and NAD^+. In nitrogen-poor medium, growth is limited, resulting in NAD^+ excess. One of the possible ways of using this cofactor is the synthesis of acids via the Erhlich pathway (Hazelwood et al., 2008). Moreover, Bloem et al. (submitted) have shown that a perturbation of redox cofactors resulted in a decrease in the production of these volatiles compounds.

On the other hand, the dose of phytosterols affected differently these two acids: at low phytosterol content, the yeast produced more isobutyric acid than at 8 mg/l, especially when the medium was poor in nitrogen (Figure 1, 2). Conversely, the effect of phytosterol content was less marked for the isovaleric acid and the highest concentration was reached for 8 mg/l

of phytosterols (Figure 1, 2). As observed for higher alcohols, the isotopic enrichments remained low and tended to increase with the nitrogen content (from 6 to 11% for SM70 and SM425 respectively), but we did not observe a real impact of the lipid dose. Moreover, we observed an enrichment of isovaleric acid in fermentations conducted with ^{13}C-valine (Figure 1, 2), confirming the conversion of a part of consumed valine into α-ketoisocaproate intermediate.

Overall, these data show that the initial nitrogen content significantly affected the formation of all of the aroma compounds, while the amount of phytosterols had a moderate effect.

3.3. Impact of the yeast strain on the contribution of nitrogen metabolism to the fermentative aroma production

Although yeast strains have variable capabilities to produce aroma compounds (Camarasa et al., 2011; Rossouw et al., 2012, Blanco et al., 2013), the variability of the partitioning of nitrogen fluxes remains poorly documented. We therefore decided to compare the contribution of valine and leucine to the synthesis of fermentative aromas for two strains with contrasting aromatic profile: the strain Lalvin EC1118® and the evolved strain Affinity™ ECA5, obtained by adaptive evolution of Lalvin EC1118® and presenting an enhanced aroma production (Cadiere et al., 2011).

Regarding the direct assimilation of labeled amino acids into biomass, no substantial differences can be observed between the two strains in all conditions (Figure 1, 2, 5, 6 Supplementary data). However, differences between strains were observed for the biosynthesis pathways of fermentative aromas. First, the impact of the initial nitrogen variations observed for Lalvin EC1118® and the existence of a maximal production of higher alcohols for the intermediate nitrogen content were also found for the evolved strain. However, a systematic overproduction of these compounds by Affinity™ ECA5 was

observed: under the same conditions (250 mg/l of nitrogen and 2 mg/l of phytostérols), the concentration of isobutanol was 0.403 mM for Lalvin EC1118® and 0.671 mM for Affinity™ ECA5). This was accompanied by a decrease in the isotopic enrichment and more generally in the fraction of exogenous amino acids involved in the biosynthesis pathways of the aroma compounds (Figure 1, 2, 5, 6). In the case of isobutanol, the isotopic enrichment varied from 5 to 15% and from 2 to 11%, with a contribution of consumed valine up to 32% and 27 %, for Lalvin EC1118® and Affinity™ ECA5, respectively. This suggested an increased flux from CCM for the synthesis of α-ketoacids precursors in the evolved strain.

The impact of the strain on acid synthesis was more complex. The production of isovaleric acid for the two strains was affected in the same way by changes of environmental parameters: a decrease was observed when the nitrogen content became higher (from 0.0103 mM to 0.0042 mM for Lalvin EC1118® and from 0.0122 mM to 0.0021 mM for Affinity™ ECA5), but the reduction was more important for the evolved strain (Figure 1, 2, 5, 6). In addition, the isotopic enrichment was globally the same between both strains (2-6% among the conditions) (Figure 1, 2, 5, 6), suggesting that the contribution of exogenous amino acids was not really affected by changes in fermentation conditions. Conversely, the difference in the production of isobutyric acid by the two strains was highly dependent on the environmental conditions (Figure 1, 2, 5, 6, Supplementary data). Lalvin EC1118® overproduced this acid compared to Affinity™ ECA5 at low (0.0106 mM for Lalvin EC1118® and 0.008 mM for Affinity™ ECA5) or high (0.0102 mM for Lalvin EC1118® and 0.0055 mM for Affinity™ ECA5) nitrogen content. This difference was more pronounced at high phytosterol content (Figure 1, 2, 5, 6). The isotopic enrichment in this molecule was globally lower for the evolved strain (for example, in SM425, 11% for Lalvin EC1118® and 4% for Affinity™ ECA5).

Finally, the part of labeled valine metabolized towards the formation α-ketoisovalerate to α-ketoisocaproate was systematically higher for the evolved strain Affinity™ ECA5 irrespective of the fermentation conditions (for example in SM250 at low phytosterol content, the fraction of valine metabolized was 39% for Lalvin EC1118® and 57% for Affinity™ ECA5) (Figure 1, 2, 5, 6).

4. Discussion

In this work, we investigated the effect of variations of initial contents in nitrogen and phytosterols on the fate of nitrogen sources to fulfill the anabolic requirements but also to produce fermentative aromas. We focused our studies on the metabolism of branched amino acids and their derivatives, thanks to filiation experiments with ^{13}C labeled valine and leucine.

One of the major finding of a previous study of the fate of nitrogen sources during fermentation was the important contribution of the catabolism of consumed amino acids at the expense of their direct incorporation into biomass (Crepin thesis; Crepin et al. in preparation). This behavior was surprising since a massive incorporation of these nitrogen compounds into proteins was expected regarding the low amount of these molecules provided in the medium compared with the anabolic requirements.

In our work, we show that catabolism of a substantial fraction of consumed valine and, to a lesser extent, of consumed leucine were similarly found irrespective of the initial nitrogen content. Moreover, the contribution of catabolism of these N-compounds largely increased with the decrease of nitrogen availability. This is particularly relevant for leucine, one of the most abundant amino acids in biomass (Lange and Heijnen, 2001), of which approximately 70% were directly incorporated into proteins in media containing moderate to high concentrations of nitrogen. This important direct incorporation into biomass specific to this

branched amino acid may be explained by (i) its low efficiency to support yeast growth as sole nitrogen source (Godard et al., 2007) and (ii) its early importation into the cells through SPS-controlled transporters Bap2p and Bap3p (Gaber et al., 2003; Iraqui et al., 1999), before the implementation of the redistribution of nitrogen from consumed amino acids to *de novo* synthesis of N-containing compounds. Conversely, in nitrogen-poor medium, the direct incorporation of exogenous leucine into biomass was strongly limited (30%). Regarding valine, a decrease in its direct incorporation into proteins was observed in SM70 compared with nitrogen-rich media. It has been recently demonstrated that during growth in a complex nitrogen resource, yeasts catabolized a large part of consumed amino acids to fulfill an intracellular nitrogen pool further used, in combination with CCM precursors, for the *de novo* synthesis of proteinogenic amino acids corresponding to anabolic requirements (Crepin et al. in preparation). Our latter observations suggested that, to overcome the nitrogen deficiency, yeast favored the catabolism of all the available consumed amino acids to fulfill this intracellular pool of nitrogen for an improved management of a limited N-resource.

In yeast, α-ketoacids have been reported as the major precursors of higher alcohols and their acetate derivatives through the Erhlich pathway (Hazelwood et al., 2008) These intermediates may originate from CCM or directly derive from amino acids, via a transamination step. As a consequence, the formation of volatile compounds belonging to these two chemical families as well as their metabolic origin - namely the CCM contribution and the catabolism of amino acids - may vary depending on environmental factors, particularly on the availability of the nitrogen resource.

As observed for amino acids, very low isotopic enrichments were found in isobutanol and isoamyl alcohol irrespective of environmental conditions. This clearly indicates that these volatile compounds are synthesized from α-ketoacids precursors originating mainly from

CCM, with a limited contribution of the catabolism of exogenous amino acids. This also explains that these higher alcohols are synthesized throughout wine fermentation, even after nitrogen exhaustion (Mouret et al., 2014). Moreover, as already observed in numerous studies (Jiménez-Martí et al., 2007; Mouret et al., 2014; Rollero et al., 2015; Vilanova et al., 2012), a maximal production of these higher alcohols was observed at the moderate dose of nitrogen (250 mg/l). In this study we showed that these variations in the formation of branched higher alcohols in response to nitrogen availability are related to with a redistribution of fluxes around the α-ketoisovalerate and the α-ketoisocaproate nodes: the fraction of catabolized amino acids recovered into higher alcohols decreased with the increased nitrogen content in the medium, while the labeling incorporation in these volatile molecules slightly increased. On the basis or our data, we propose a model to explain the differences in isobutanol and isoamyl alcohol formation (Figure 7). Under nitrogen limitation conditions (70 mg/l, Figure 7a), the anabolic requirements in leucine and valine are limited: a substantial part of amino acids are converted into α-keto acids and the surplus of these precursors (also originated from the CCM) is limited compared with anabolic needs, resulting in a moderate production of higher alcohols. When nitrogen content increases moderately (250 mg/l, Figure 7b), the intracellular pool in α-ketoacids increased excessively, mainly from synthesis via CCM, with respect to the increase in requirements for anabolism, which results in a marked increase in the flux towards the formation of higher alcohols. Finally, for a higher increase in nitrogen content (425 mg/l, Figure 7c), the intracellular α-ketoacids were mainly directed towards the synthesis of amino acids at the expense of higher alcohol formation, which results in a decreased flux to the formation of aromas compared to the previous conditions.

The impact of phytosterols on the biosynthesis pathways of higher alcohols and acids was more complex. Overall, more alcohols were produced at high phytosterol content. However, our results highlighted an interaction between nitrogen and lipids with a more pronounced

effect on isoamyl alcohol with respect to isobutanol. In the same way the production of the two acids varied according to the dose of lipids and nitrogen. Simultaneously, the quantitative analysis of fluxes distribution in the metabolic network revealed that α-ketoisovalerate was largely directed towards α-ketoisocaproate, its conversion into isobutanol and isobutyric acid accounting for less than one third of the total flux. As a consequence, the different response of the formation of isobutyl-derivatives and isoamyl-compounds to nitrogen and lipid availability may be explained by the regulation related to these environmental parameters of the synthesis of α-ketoisocaproate from α-ketoisovalerate. This synthesis involves *LEU4*, *LEU2* and *LEU1*, controlled by the complex Leu3p-α-isopropylmalate, which is sensitive to the level of nitrogen (Kohlhaw, 2003). Thus, it can first act as a repressor in leucine-replete medium or as an activator when the α-isopropylmalate (intermediate in the biosynthesis of leucine) accumulates in medium deficient in leucine (Sze et al., 1992). In addition, the expression of *LEU3* is regulated by the general amino acid control system mediated by the transcription factor Gcn4 (Zhou et al., 1987), which also controls the expression of genes involved in the synthesis pathway of leucine (*ILV3*, *LEU4*, *BAT1* and *BAT2*) (Hsu et al., 1982; Hu and Kohlhaw, 1995). Another hypothesis to explain the different response of α-ketoisovalerate and α-ketoisocaproate derivatives is the availability of acetyl-CoA, which is related to the lipid metabolism. The first step of this conversion requires acetyl-CoA (Roeder and Kohlhaw, 1980). Thus, a change in the availability of acetyl-CoA could thus explain the most important responses of isoamyl-derivatives to changes in the environment compared to isobutyl-compounds. A difference in the response of isoamyl alcohol and isobutanol formation has previously been reported in the case of redox perturbation, where the availability of acetyl-CoA was modified according to the redox status of the cell (Celton et al., 2012 ; Bloem et al., submitted).

Another factor that can modulate the formation of volatile molecules is the yeast strain. The evolved strain Affinity™ ECA5 overproduces higher alcohols and acetate esters, and exhibits changes in nitrogen assimilation and in lipid metabolism compared with its ancestral strain Lalvin EC1118® (Cadiere et al., 2011; Chapitre II). In this study, the isotopic filiation-based approach allowed the identification of the metabolic features of the evolved strains underlying its phenotypic specific traits regarding formation of higher alcohols. We first show that the overproduction of higher alcohols by Affinity™ ECA5 is not due to an extended catabolism of amino acids (the amount of volatile compounds coming directly from the amino acids was lower for this strain), but is the consequence of a greater contribution of the precursors originating from CCM. We also demonstrate that the flux of precursors from the CCM tends to be pulled towards the production of α-ketoisocaproate from α-ketoisovalerate rather than to the formation of isobutanol in the evolved strain. The over-expression of genes involved in the biosynthesis of leucine as a consequence of adaptive evolution may be responsible for this greater flux in Affinity™ ECA5. Transcriptomic studies comparing the evolved strain to its ancestral strain showed an overexpression of many Gcn4 targets genes, including *LEU1*, *LEU2*, *ILV5*, *BAT1* (Cadière, thesis). Moreover, recent studies highlighted the different management of lipid sources by the evolved strain and suggested that this could result from an increased availability of acetyl-CoA (Cadiere et al., 2011; Chapitre II). As a consequence, the first step of conversion of α-ketoisovalerate to α-ketoisocaproate that requires acetyl-CoA, may be favoured in the evolved strain.

Overall, this study highlights the potential of isotopic filiation approaches to gain new insight into the metabolism of nitrogen and aroma compounds and to explore the metabolic diversity between yeast strains. A future challenge will be to predict and to adjust the formation of aroma compounds, which remains a complex task since their production depends on the

amount and nature of nutrients but also on the yeast strain used to perform the fermentation. The combination of the knowledge gained at the intracellular level with kinetics data such as specific rates and dynamics of production will pave the way to the development of an explanatory, dynamic and predictive model of the production of fermentative aromas.

References

Barbosa, C., Mendes-Faia, A., Mendes-Ferreira, A., 2012. The nitrogen source impacts major volatile compounds released by Saccharomyces cerevisiae during alcoholic fermentation. Int. J. Food Microbiol. 160, 87–93.

Bell, S.-J., Henschke, P.A., 2005. Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. Aust. J. Grape Wine Res. 11, 242–295.

Beltran, G., Esteve-Zarzoso, B., Rozes, N., Mas, A., Guillamon, J.M., 2005. Influence of the Timing of Nitrogen Additions during Synthetic Grape Must Fermentations on Fermentation Kinetics and Nitrogen Consumption. J. Agric. Food Chem. 53, 996–1002.

Bely, M., Sablayrolles, J., Barre, P., 1990. Automatic Detection of Assimilable Nitrogen Deficiencies During Alcoholic Fermentation in Enological Conditions. J. Ferment. Bioeng. 70, 246–252.

Blanco, P., Mirás-Avalos, J.M., Pereira, E., Orriols, I., 2013. Fermentative aroma compounds and sensory profiles of Godello and Albariño wines as influenced by *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains: Influence of yeast strains on wine chemical and sensory properties. J. Sci. Food Agric. 93, 2849–2857.

Blank, L.M., Kuepfer, L., Sauer, U., 2005. Large-scale C-13-flux analysis reveals mechanistic principles of metabolic network robustness to null mutations in yeast. Genome Biol. 6, R49.

Cadière, A., Aguera, E., Caillé, S., Ortiz-Julien, A., Dequin, S., 2012. Pilot-scale evaluation the enological traits of a novel, aromatic wine yeast strain obtained by adaptive evolution. Food Microbiol. 32, 332–337. doi:10.1016/j.fm.2012.07.010

Cadiere, A., Ortiz-Julien, A., Camarasa, C., Dequin, S., 2011. Evolutionary engineered Saccharomyces cerevisiae wine yeast strains with increased in vivo flux through the pentose phosphate pathway. Metab. Eng. 13, 263–271. doi:10.1016/j.ymben.2011.01.008

Cadière, A., 2010. Ingénierie de la voie des pentoses phosphate chez *Saccharomyces cerevisiae* - Applications en œnologie. Thèse, Montpellier, France.

Camarasa, C., Sanchez, I., Brial, P., Bigey, F., Dequin, S., 2011. Phenotypic Landscape of Saccharomyces cerevisiae during Wine Fermentation: Evidence for Origin-Dependent Metabolic Traits. PLoS ONE 6, e25147. doi:10.1371/journal.pone.0025147

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. doi:10.1111/j.1567-1364.2008.00412.x

Celton, M., Goelzer, A., Camarasa, C., Fromion, V., Dequin, S., 2012. A constraint-based model analysis of the metabolic consequences of increased NADPH oxidation in Saccharomyces cerevisiae. Metab. Eng. 14, 366–379. doi:10.1016/j.ymben.2012.03.008

Christensen, B., Nielsen, J., 1999. Isotopomer analysis using GC-MS. Metab. Eng. 1, 282–90. doi:10.1006/mben.1999.0117

Christen, S., Sauer, U., 2011. Intracellular characterization of aerobic glucose metabolism in seven yeast species by 13C flux analysis and metabolomics. Fems Yeast Res. 11, 263–272. doi:10.1111/j.1567-1364.2010.00713.x

Crepin, L., 2012. Variabilité dans l'utilisation de l'azote chez *Saccharomyces cerevisiae* et conséquences sur la production de biomasse en fermentation œnologique. Thèse, Montpellier, France.

Crepin, L., Nidelet, T., Sanchez, I., Dequin, S., Camarasa, C., 2012. Sequential Use of Nitrogen Compounds by Saccharomyces cerevisiae during Wine Fermentation: a Model Based on Kinetic and Regulation Characteristics of Nitrogen Permeases. Appl. Environ. Microbiol. 78, 8102–8111. doi:10.1128/AEM.02294-12

Crepin, L., Sanchez, I., Nidelet, T., Dequin, S., Camarasa, C., 2014. Efficient ammonium uptake and mobilization of vacuolar arginine by Saccharomyces cerevisiae wine strains during wine fermentation. Microb. Cell Factories 13, 109. doi:10.1186/s12934-014-0109-0

Frick, O., Wittmann, C., 2005. Characterization of the metabolic shift between oxidative and fermentative growth in Saccharomyces cerevisiae by comparative C-13 flux analysis. Microb. Cell Factories 4, 30. doi:10.1186/1475-2859-4-30

Gaber, R.F., Ottow, K., Andersen, H.A., Kielland-Brandt, M.C., 2003. Constitutive and hyperresponsive signaling by mutant forms of Saccharomyces cerevisiae amino acid sensor Ssy1. Eukaryot. Cell 2, 922–929. doi:10.1128/EC.2.922-929.2003

Garde-Cerdán, T., Ancín-Azpilicueta, C., 2008. Effect of the addition of different quantities of amino acids to nitrogen-deficient must on the formation of esters, alcohols, and acids during wine alcoholic fermentation. LWT - Food Sci. Technol. 41, 501–510. doi:10.1016/j.lwt.2007.03.018

Godard, P., Urrestarazu, A., Vissers, S., Kontos, K., Bontempi, G., van Helden, J., Andre, B., 2007. Effect of 21 different nitrogen sources on global gene expression in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Mol. Cell. Biol. 27, 3065–3086. doi:10.1128/MCB.01084-06

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. doi:10.1128/AEM.02625-07

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. Aust. J. Grape Wine Res. 12, 150–160. doi:10.1111/j.1755-0238.2006.tb00055.x

Hsu, Y.P., Kohlhaw, G.B., Niederberger, P., 1982. Evidence that alpha-isopropylmalate synthase of Saccharomyces cerevisiae is under the “general” control of amino acid biosynthesis. J. Bacteriol. 150, 969–972.

Hu, Y., Kohlhaw, G.B., 1995. Additive Activation of Yeast LEU4 Transcription by Multiple cis Elements. J. Biol. Chem. 270, 5270–5275. doi:10.1074/jbc.270.10.5270

Iraqui, I., Vissers, S., Bernard, F., De Craene, J.O., Boles, E., Urrestarazu, A., Andre, B., 1999. Amino acid signaling in Saccharomyces cerevisiae: a permease-like sensor of external amino acids and F-box protein Grr1p are required for transcriptional induction of the AGP1 gene, which encodes a broad-specificity amino acid permease. Mol. Cell. Biol. 19, 989–1001.

Jiménez-Martí, E., Aranda, A., Mendes-Ferreira, A., Mendes-Faia, A., Olmo, M. lí del, 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. doi:10.1007/s10482-006-9135-1

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.

Kohlhaw, G.B., 2003. Leucine Biosynthesis in Fungi: Entering Metabolism through the Back Door. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 67, 1–15. doi:10.1128/MMBR.67.1.1-15.2003

Lange, H.C., Heijnen, J.J., 2001. Statistical reconciliation of the elemental and molecular biomass composition of Saccharomyces cerevisiae. Biotechnol. Bioeng. 75, 334–344. doi:10.1002/bit.10054

Lee, S.-J., Noble, A.C., 2003. Characterization of Odor-Active Compounds in Californian Chardonnay Wines Using GC-Olfactometry and GC-Mass Spectrometry. J. Agric. Food Chem. 51, 8036–8044. doi:10.1021/jf034747v

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

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

Molina, A.M., Guadalupe, V., Varela, C., Swiegers, J.H., Pretorius, I.S., Agosin, E., 2009. Differential synthesis of fermentative aroma compounds of two related commercial wine yeast strains. Food Chem. 117, 189–195. doi:10.1016/j.foodchem.2009.03.116

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

Roeder, P., Kohlhaw, G., 1980. Alpha-Isopropylmalate Synthase from Yeast - a Zinc Metalloenzyme. Biochim. Biophys. Acta 613, 482–487. doi:10.1016/0005-2744(80)90103-5

Rollero, S., Bloem, A., Camarasa, C., Sanchez, I., Ortiz-Julien, A., Sablayrolles, J.-M., Dequin, S., Mouret, J.-R., 2015. Combined effects of nutrients and temperature on the production of fermentative aromas by Saccharomyces cerevisiae during wine fermentation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 99, 2291–304. doi:10.1007/s00253-014-6210-9

Rossouw, D., Jacobson, D., Bauer, F.F., 2012. Transcriptional Regulation and the Diversification of Metabolism in Wine Yeast Strains. Genetics 190, 251–261. doi:10.1534/genetics.111.132720

Schoondermark-Stolk, S.A., Tabernero, M., Chapman, J., ter Schure, E.G., Verrips, C.T., Verkleij, A.J., Boonstra, J., 2005. Bat2p is essential in Saccharomyces cerevisiae for fusel alcohol production on the non-fermentable carbon source ethanol. Fems Yeast Res. 5, 757–766. doi:10.1016/j.femsyr.2005.02.005

Swiegers, J.H., Bartowsky, E.J., Henschke, P.A., Pretorius, I.S., 2005. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. Aust. J. Grape Wine Res. 11, 139–173.

Sze, J.Y., Woontner, M., Jaehning, J.A., Kohlhaw, G.B., 1992. In vitro transcriptional activation by a metabolic intermediate: activation by Leu3 depends on alpha-isopropylmalate. Science 258, 1143–1145.

Torija, M.J., Beltran, G., Novo, M., Poblet, M., Guillamón, J.M., Mas, A., Rozès, N., 2003. Effects of fermentation temperature and Saccharomyces species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine. Int. J. Food Microbiol. 85, 127–136. doi:10.1016/S0168-1605(02)00506-8

Torrea, D., Varela, C., Ugliano, M., Ancin-Azpilicueta, C., Leigh Francis, I., Henschke, P.A., 2011. Comparison of inorganic and organic nitrogen supplementation of grape juice – Effect on volatile composition and aroma profile of a Chardonnay wine fermented with Saccharomyces cerevisiae yeast. Food Chem. 127, 1072–1083. doi:10.1016/j.foodchem.2011.01.092

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. doi:10.1021/jf1027137

Vilanova, M., Siebert, T.E., Varela, C., Pretorius, I.S., Henschke, P.A., 2012. Effect of ammonium nitrogen supplementation of grape juice on wine volatiles and non-volatiles composition of the aromatic grape variety Albariño. Food Chem. 133, 124–131. doi:10.1016/j.foodchem.2011.12.082

Vilanova, M., Ugliano, M., Varela, C., Siebert, T., Pretorius, I.S., Henschke, P.A., 2007. Assimilable nitrogen utilisation and production of volatile and non-volatile compounds in chemically defined medium by Saccharomyces cerevisiae wine yeasts. Appl. Microbiol. Biotechnol. 77, 145–157. doi:10.1007/s00253-007-1145-z

Zhou, K., Brisco, P.R., Hinkkanen, A.E., Kohlhaw, G.B., 1987. Structure of yeast regulatory gene LEU3 and evidence that LEU3 itself is under general amino acid control. Nucleic Acids Res. 15, 5261–5273.

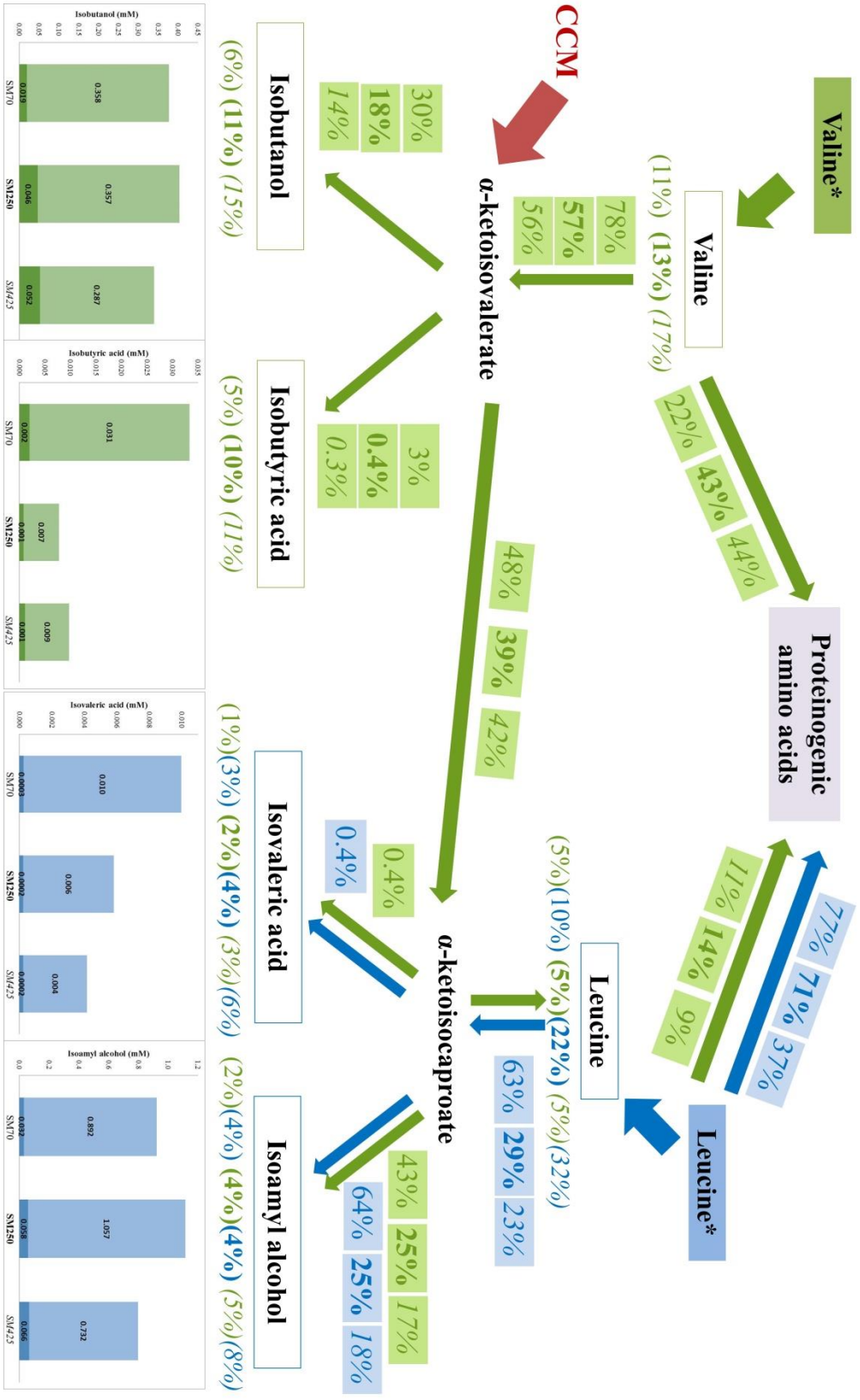


Figure 1: Quantitative analysis of the fate of valine and leucine during winemaking fermentation in the strain Lalvin EC1118® at 2 mg/l of phytosterols
X%/X%: proportion of consumed valine/leucine metabolized in the pathway
(X%)/(X%): proportion of synthesized compound from consumed valine/leucine
Normal font: SM70; **Bold font: SM250**; *Italic* font: SM425

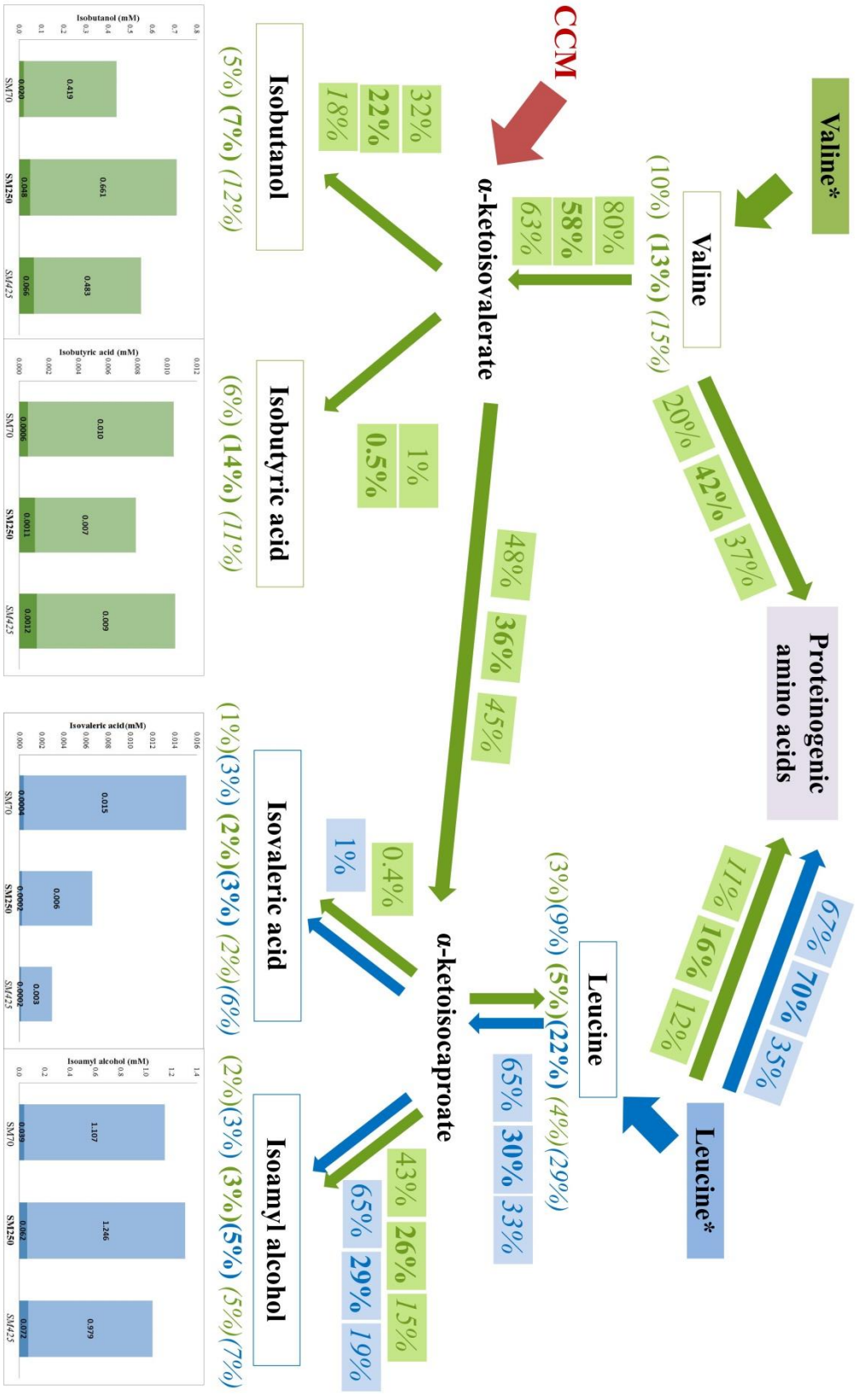


Figure 2: Quantitative analysis of the fate of valine and leucine during winemaking fermentation in the strain Lalvin EC1118® at 8 mg/l of phytosterols
X%/X%: proportion of consumed valine/leucine metabolized in the pathway
(X%)/(X%): proportion of synthesized compound from consumed valine/leucine
Normal font: SM70; **Bold font: SM250**; *Italic* font: SM425

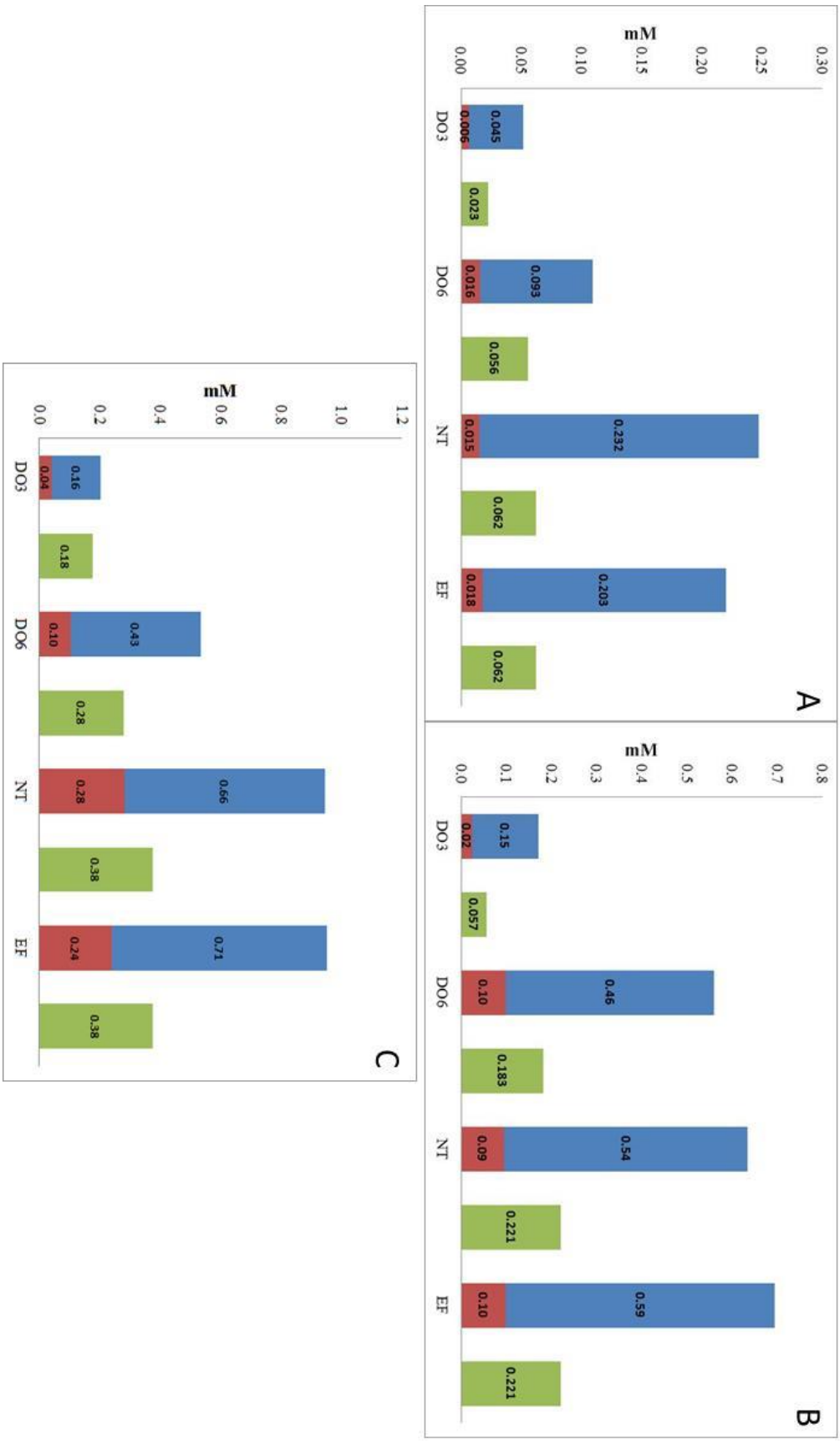


Figure 3: Comparison of the amount of amino acids (mM) of valine, directly incorporated in the biomass (red), *de novo* synthetized (blue) and consumed (green) at the 4 stages of fermentation (DO3, DO6, N_T, EF) in SM70 (A), SM250 (B) and SM425 (C) for the strain Lalvin EC1118® at 2 mg/l of phytosterols

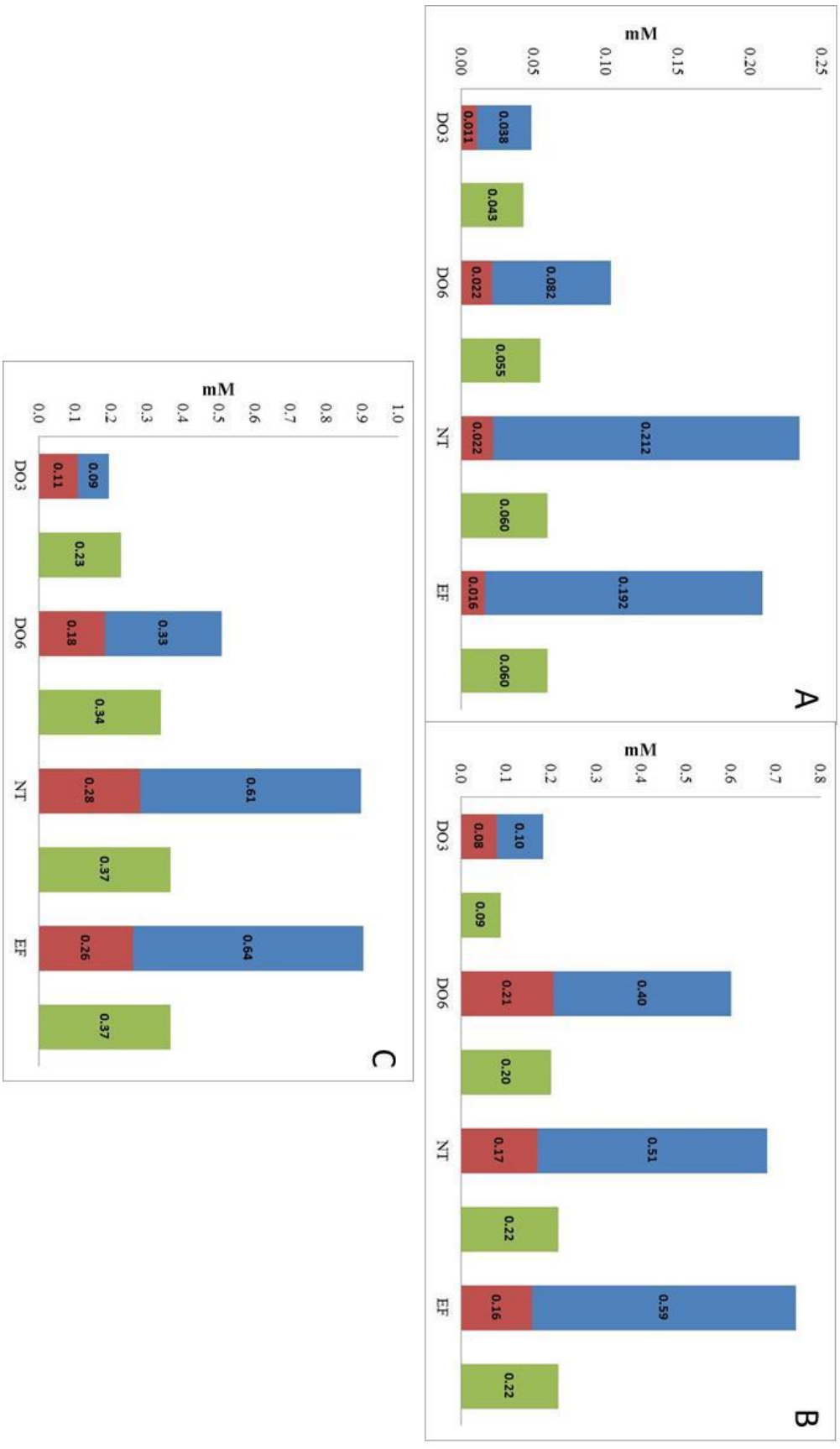


Figure 4: Comparison of the amount of amino acids (mM) of leucine, directly incorporated in the biomass (red), *de novo* synthetized (blue) and consumed (green) at the 4 stages of fermentation (DO3, DO6, N_T, EF) in SM70 (A), SM250 (B) and SM425 (C) for the strain Lalvin EC1118® at 2 mg/l of phytosterols

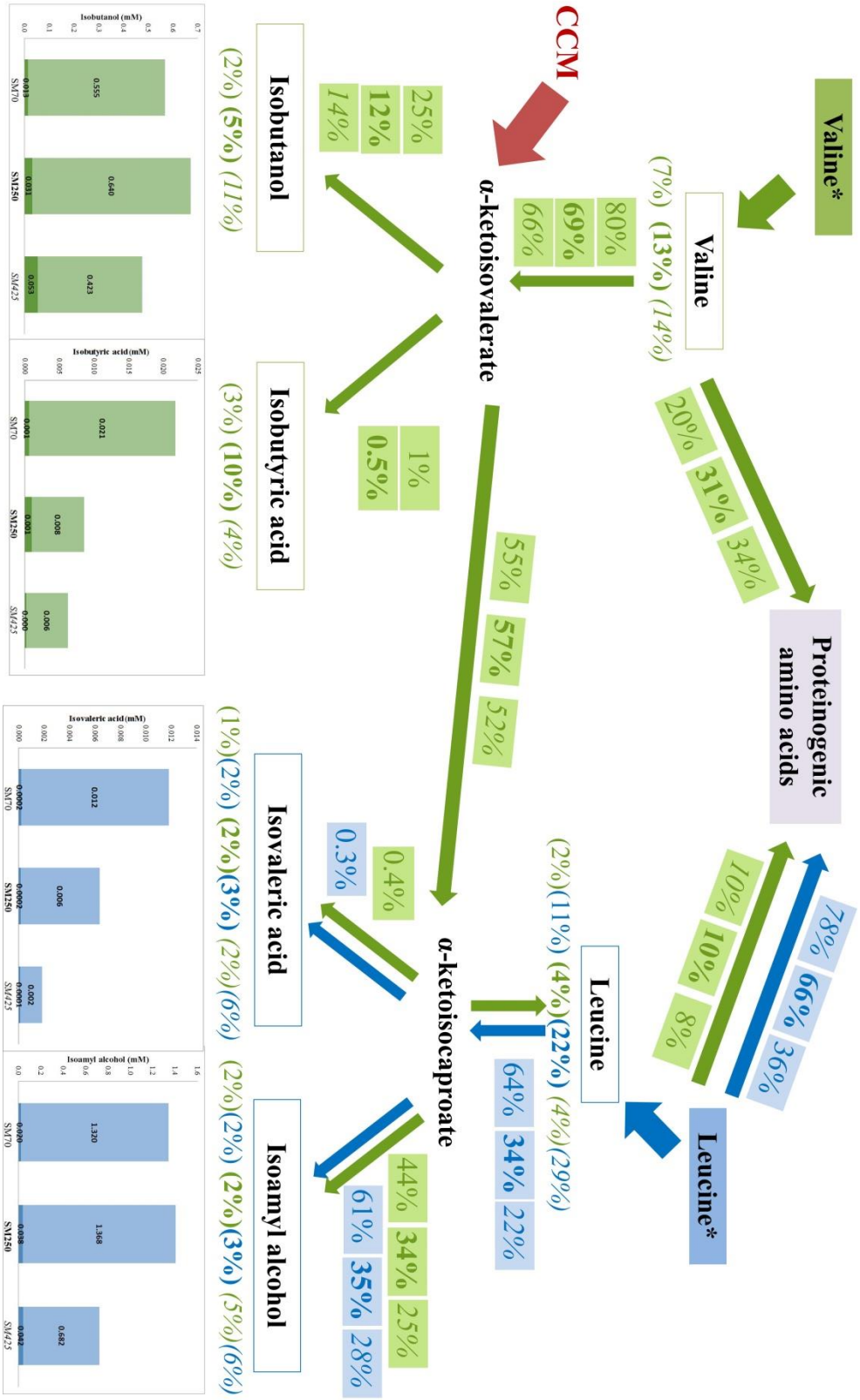


Figure 5: Quantitative analysis of the fate of valine and leucine during winemaking fermentation in the strain Affinity™ ECA5 at 2 mg/l of phytosterols
X%/X%: proportion of consumed valine/leucine metabolized in the pathway
(X%)/(X%): proportion of synthesized compound from consumed valine/leucine
Normal font: SM70; **Bold font: SM250**; *Italic* font: SM425

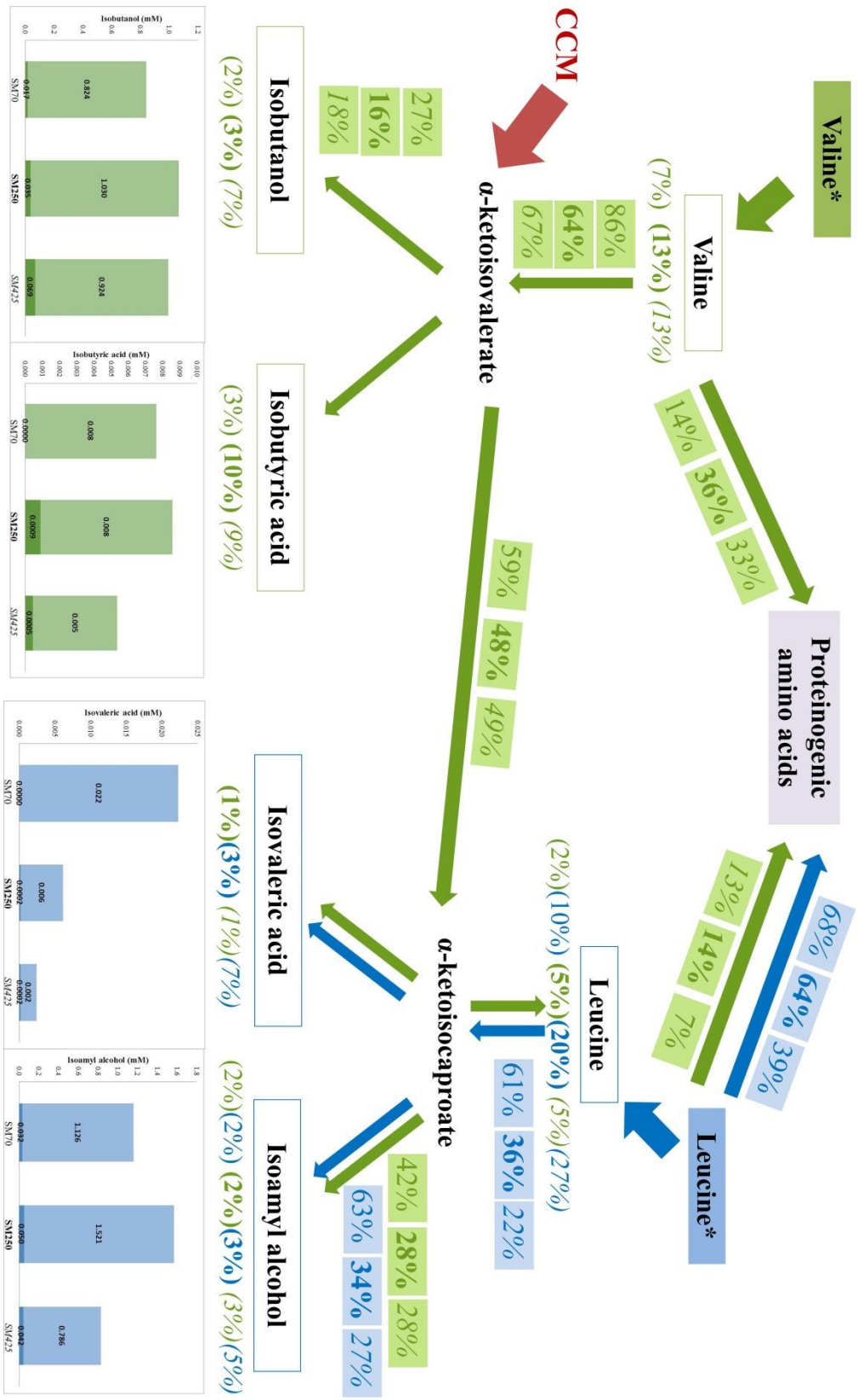


Figure 6: Quantitative analysis of the fate of valine and leucine during winemaking fermentation in the strain Affinity™ ECA5 at 8 mg/l of phytosterols
X%/X%: proportion of consumed valine/leucine metabolized in the pathway
(X%)/(X%): proportion of synthesized compound from consumed valine/leucine
Normal font: SM70; **Bold font: SM250**; *Italic* font: SM425

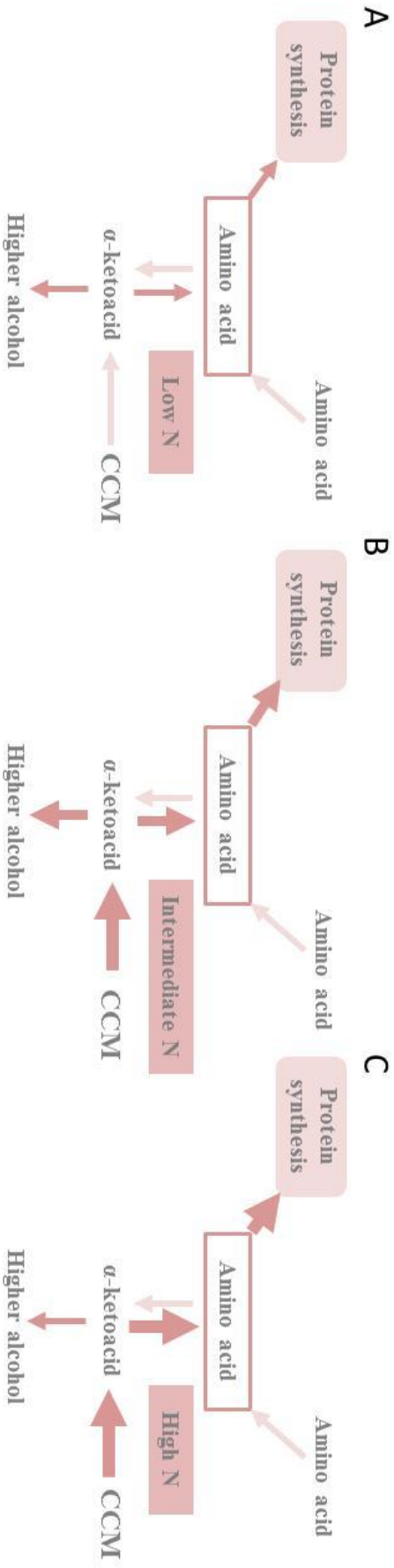


Figure 7: Distribution fluxes leading to the formation of higher alcohols according to the initial nitrogen content: SM70 (A), SM250 (B) SM425 (C)

Table S1: Comparison of valine and leucine: consumed (amount of amino acids consumed mg/l divided by the total amount of exogenous amino acids mg/l), Isotopic ^{13}C labeling and directly incorporated in the proteins (amount of exogenous amino acids founded in the proteinogenic amino acids mg/l divided by the amount of exogenous amino acids consumed mg/l) at the 4 stages of fermentation $N_{1/2}$, $N_{3/4}$, N_T and EF for Lalvin EC1118® at 2 mg/l phytosterol content

		$N_{1/2}$	$N_{3/4}$	N_T	EF
SM70_2		% Consumed			
	Leu	71	91	99	100
	Val	36	90	100	100
		% Isotopic ^{13}C labeling			
	Leu	22	18	10	8
	Val	13	12	11	8
		% directly incorporated in the proteins			
	Leu	25	39	37	27
	Val	30	28	22	28
SM250_2		% Consumed			
	Leu	41	93	100	100
	Val	26	83	100	100
		% Isotopic ^{13}C labeling			
	Leu	43	34	22	21
	Val	18	15	13	11
		% directly incorporated in the proteins			
	Leu	90	100	71	73
	Val	42	54	43	45
SM425_2		% Consumed			
	Leu	62	92	100	100
	Val	47	74	100	100
		% Isotopic ^{13}C labeling			
	Leu	56	36	32	29
	Val	20	19	17	16
		% directly incorporated in the proteins			
	Leu	47	84	77	71
	Val	24	37	44	41

Table S2: Comparison of valine and leucine: consumed (amount of amino acids consumed mg/l divided by the total amount of exogenous amino acids mg/l), Isotopic ^{13}C labeling and directly incorporated in the proteins (amount of exogenous amino acids founded in the proteinogenic amino acids mg/l divided by the amount of exogenous amino acids consumed mg/l) at the 4 stages of fermentation DO3, DO6, N_T and EF for Lalvin EC1118® at 8 mg/l phytosterol content

		$N_{1/2}$	$N_{3/4}$	N_T	EF
SM70_8		% Consumed			
	Leu	70	94	99	100
	Val	40	92	100	100
		% Isotopic ^{13}C labeling			
	Leu	21	17	9	7
	Val	12	11	10	8
		% directly incorporated in the proteins			
	Leu	25	37	35	27
	Val	25	25	20	24
SM250_8		% Consumed			
	Leu	44	92	100	100
	Val	28	84	100	100
		% Isotopic ^{13}C labeling			
	Leu	45	32	22	20
	Val	18	13	13	12
		% directly incorporated in the proteins			
	Leu	87	99	70	69
	Val	46	59	42	40
SM425_8		% Consumed			
	Leu	66	85	100	100
	Val	39	72	100	100
		% Isotopic ^{13}C labeling			
	Leu	58	37	29	25
	Val	20	18	15	13
		% directly incorporated in the proteins			
	Leu	44	88	67	59
	Val	15	47	37	33

Table S3: Comparison of valine and leucine: consumed (amount of amino acids consumed mg/l divided by the total amount of exogenous amino acids mg/l), Isotopic ^{13}C labeling and directly incorporated in the proteins (amount of exogenous amino acids founded in the proteinogenic amino acids mg/l divided by the amount of exogenous amino acids consumed mg/l) at the 4 stages of fermentation DO3, DO6, N_T and EF for Affinity™ ECA5 at 2 mg/l phytosterol content

		$N_{1/2}$	$N_{3/4}$	N_T	EF
SM70_2		% Consumed			
	Leu	94	100	100	100
	Val	74	98	100	100
		% Isotopic ^{13}C labeling			
	Leu	33	28	11	8
	Val	11	12	7	5
		% directly incorporated in the proteins			
	Leu	30	31	35	30
	Val	30	28	26	27
SM250_2		% Consumed			
	Leu	48	91	100	100
	Val	19	78	100	100
		% Isotopic ^{13}C labeling			
	Leu	45	33	22	21
	Val	20	16	13	13
		% directly incorporated in the proteins			
	Leu	85	86	66	50
	Val	35	43	31	28
SM425_2		% Consumed			
	Leu	53	90	100	100
	Val	62	71	100	100
		% Isotopic ^{13}C labeling			
	Leu	50	35	29	28
	Val	29	25	14	13
		% directly incorporated in the proteins			
	Leu	51	88	78	74
	Val	24	36	44	31

Table S4: Comparison of valine and leucine: consumed (amount of amino acids consumed mg/l divided by the total amount of exogenous amino acids mg/l), Isotopic ^{13}C labeling and directly incorporated in the proteins (amount of exogenous amino acids founded in the proteinogenic amino acids mg/l divided by the amount of exogenous amino acids consumed mg/l) at the 4 stages of fermentation DO3, DO6, N_T and EF for Affinity™ ECA5 at 8 mg/l phytosterol content

		$N_{1/2}$	$N_{3/4}$	N_T	EF
SM70_8		% Consumed			
	Leu	91	99	100	100
	Val	68	100	100	100
		% Isotopic ^{13}C labeling			
	Leu	30	27	10	7
	Val	10	11	7	5
		% directly incorporated in the proteins			
	Leu	31	30	39	26
	Val	27	28	14	24
SM250_8		% Consumed			
	Leu	59	96	100	100
	Val	32	55	100	100
		% Isotopic ^{13}C labeling			
	Leu	44	36	20	18
	Val	19	15	13	11
		% directly incorporated in the proteins			
	Leu	81	100	64	59
	Val	22	44	36	32
SM425_8		% Consumed			
	Leu	53	91	100	100
	Val	25	52	100	100
		% Isotopic ^{13}C labeling			
	Leu	50	37	25	22
	Val	10	11	7	5
		% directly incorporated in the proteins			
	Leu	51	85	68	67
	Val	24	36	33	30

Discussion générale

L'objectif de ce travail était de mieux identifier et comprendre le rôle de paramètres environnementaux clés (azote, lipides et température) sur la production des arômes fermentaires au cours du procédé de vinification. Pour mieux appréhender cette question, nous avons utilisé deux souches de levure aux profils aromatiques très contrastés : Lalvin EC1118® et Affinity™ ECA5 obtenue par évolution adaptative et présentant une production accrue d'arômes. L'étude menée repose à la fois sur une caractérisation macroscopique du procédé, grâce à un suivi cinétique précis des productions d'arôme, et sur une approche de physiologie intégrative, par la mise en œuvre d'une analyse transcriptomique et d'un suivi du devenir d'acides aminés par filiation isotopique, permettant une analyse détaillée du métabolisme levurien.

Dans un premier temps, notre étude s'est attachée à évaluer, pour chaque souche, l'effet de trois facteurs environnementaux simultanément: la concentration initiale en azote assimilable et en lipides (sous forme de phytostérols), et la température de fermentation. Grâce à la mise en place d'un plan expérimental de Box-Behnken couplé à une modélisation sous forme de surface de réponse, nous avons pu, pour chaque composé volatil étudié, modéliser les effets de chaque paramètre mais aussi leurs interactions et ainsi identifier les conditions fermentaires les plus discriminantes vis-à-vis de la production des principaux alcools supérieurs et esters. De plus, cette démarche expérimentale nous a permis de comparer les réponses des deux souches à ces variations de conditions fermentaires.

Cette étude a montré que l'azote est le facteur qui influe le plus sur la synthèse de la majorité des composés volatils ; cependant son effet est différent selon la molécule considérée (Chapitre I). La température et les phytostérols présentent des effets plus modérés mais généralement significatifs. Grâce à la réalisation de bilans gaz/liquide (Morakul et al., 2011), il a été montré que l'effet de la température sur le métabolisme levurien était surestimé. En particulier, les plus faibles concentrations en esters obtenues à température élevée sont principalement dues à des phénomènes d'évaporation et non à une modification de la physiologie du microorganisme. Les interactions entre facteurs jouent aussi un rôle important, nous avons notamment démontré une forte interaction entre l'azote et les phytostérols (Chapitre II). Ces effets ont été confirmés, avec des niveaux de réponse différents, sur un panel de 7 souches commerciales, ce qui indique leur caractère générique. L'ensemble de ces données démontre **l'importance d'une gestion commune des nutriments.**

De plus, cette étude nous a permis de confirmer la surproduction systématique des alcools supérieurs (sauf le propanol) et des esters d'acétate par la souche Affinity™ ECA5, faisant de ces molécules les composés marqueurs de la souche évoluée et suggérant des modifications métaboliques et du réseau de régulation chez cette souche (Chapitre I).

Cette première étude ne portait que sur les concentrations finales des composés d'arômes limitant ainsi les interprétations physiologiques. Pour mieux appréhender le remodelage métabolique provoquant une surproduction de composés d'intérêt aromatique, suite à l'évolution adaptative de la souche Affinity™ ECA5, une démarche intégrative mettant en œuvre des outils dédiés a été adoptée. Une analyse fine des cinétiques de production des arômes fermentaires a été réalisée grâce à un suivi en ligne, par GC et un calcul de la production totale (incluant les pertes dans la phase gaz) (Morakul et al., 2011, 2013). Ces données macroscopiques ont été complétées par une approche de physiologie intégrative basée sur une analyse du profil d'expression génique et un suivi par filiation isotopique des acides aminés précurseurs d'arômes marqués en ^{13}C de leur contribution à la synthèse des volatils.

L'étude de la consommation des acides aminés au cours de la phase de croissance nous a permis de mettre en évidence des différences dans l'assimilation des sources d'azote, entre les deux souches, notamment de l'ammonium et des acides aminés consommés tardivement (selon la classification de Crépin et al., 2012). Ces données suggèrent donc des modifications au niveau de la NCR chez la souche évoluée, et plus probablement au niveau des perméases transportant les acides aminés exogènes soumis à ce contrôle. Cette hypothèse est renforcée par l'analyse transcriptomique qui met en évidence une surexpression des gènes *MEP2* et *GAP1* (codant pour des transporteurs soumis au contrôle de la NCR) chez Affinity™ ECA5 (Chapitre II). Cette modification semble être liée à l'évolution adaptative. En effet, Crépin et al. (2012) n'ont pas mis en évidence de variations entre des souches d'origines diverses.

L'analyse dynamique de production des alcools supérieurs montre, en plus de la surproduction par la souche évoluée, des différences dans les cinétiques de synthèse de ces composés entre les deux souches, suggérant des modifications métaboliques et/ou génomiques dans la régulation des voies de biosynthèse des alcools supérieurs (Chapitre II). La surexpression des gènes impliqués dans les processus de biosynthèse des acides aminés

cellulaires chez Affinity™ ECA5 (Cadiere, 2010) nous laisse penser que la surproduction des alcools supérieurs pourrait s'expliquer par une activation plus importante des voies de biosynthèse des acides aminés précurseurs. Le pool de cétoacides intracellulaires serait donc plus important chez la souche évoluée et ils seraient dirigés plus massivement vers la synthèse des alcools supérieurs.

Afin d'aller plus loin dans la compréhension du remodelage métabolique dû à l'évolution adaptative chez la souche évoluée, nous avons étudié la contribution des métabolismes azoté et carboné à la production des arômes fermentaires. Pour cela, nous avons réalisé des expériences de filiation isotopique sur la leucine et la valine qui sont les acides aminés précurseurs de l'alcool isoamylique et de l'isobutanol respectivement.

Cette étude quantitative du métabolisme montre dans un premier temps que la part d'acide aminé directement assimilée dans les protéines est globalement la même pour les deux souches (Chapitre III) et ce malgré des différences observées dans l'assimilation des sources d'azote (Chapitre II). **Nous avons également constaté une faible contribution des sources azotées à la formation des arômes fermentaires.** Le suivi du devenir des molécules marquées a montré que la surproduction notamment des alcools supérieurs par Affinity™ ECA5 n'est pas due à un catabolisme plus important des acides aminés ; la quantité d'alcools supérieurs directement produite par ces acides aminés étant plus faible pour la souche évoluée que pour la souche initiale. Cette surproduction est donc due à une plus grande contribution des précurseurs provenant du métabolisme carboné central (Chapitre III).

L'analyse de la bioconversion des alcools supérieurs en esters d'acétate a révélé des différences importantes entre la souche évoluée et sa souche ancestrale. La souche parentale présente un rendement constant tout au long de la fermentation alors que deux rendements consécutifs sont identifiés pour la souche évoluée, le second étant plus fort (Chapitre II).
Pour comprendre qui de la disponibilité en précurseurs (alcools supérieurs et acétyl-CoA) ou de l'activité alcool acétyltransférase était responsable de ces profils de bioconversion différents entre les deux souches, nous avons effectué des ajouts de phytostérols à différents stades de la fermentation alcoolique. Ces ajouts modifient le rendement de conversion entre alcools supérieurs et esters d'acétate chez la souche évoluée. Ce rendement diminue de façon transitoire (environ 8 heures) avant de revenir à sa valeur maximale, suggérant une

assimilation de ces lipides et donc une gestion des phytostérols modifiée. De plus, la comparaison des profils d'expression génique entre les deux phases de conversion ne montre pas de modification de l'expression des gènes *ATF1* et *ATF2* chez Affinity™ ECA5. Par contre, cette analyse met en évidence la répression de gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des stérols après le changement de rendement de bioconversion. Enfin, la comparaison des données transcriptomiques des deux souches indique une répression de gènes impliqués dans la synthèse de l'acétyl-CoA (*ALD4*, *ALD6* et *ACS1*, *ACS2*) chez la souche évoluée (Chapitre II).

L'ensemble de ces résultats pointe le rôle clé de l'acétyl-CoA à divers niveaux du métabolisme. Cela nous permet de proposer une explication à la présence de deux phases de bioconversion aux rendements différents pour Affinity™ ECA5. Cette souche de levure semble assimiler plus efficacement les phytostérols présents dans le milieu. L'acétyl-CoA serait donc moins utilisé pour la synthèse des stérols; sa concentration serait donc plus forte chez la souche évoluée. Il serait alors plus disponible pour réagir avec les alcools supérieurs afin de produire plus d'esters d'acétate.

Ces observations sont à mettre en lien avec des études précédentes. Minetoki et al. (1993) a défini les Km de Atf1p pour l'acétyl-CoA (0.025 mM) et pour l'alcool isoamylique (29.8 mM) montrant qu'une modification, même mineure, du pool d'acétyl-CoA peut avoir un impact important sur la conversion des alcools supérieurs en esters d'acétate. Cette hypothèse est renforcée par les travaux de Bloem et al. (submitted) qui montrent l'implication de la disponibilité en acétyl-CoA pour la synthèse des esters dans la cas d'une modification du statut redox de la cellule.

L'acétyl-CoA est aussi important dans la conversion entre l'α-cétoisovalerate et l'α-cétoisocaproate. Le flux des précurseurs émanant du métabolisme carboné central semble être tiré vers la production d'α-cétoisocaproate chez la souche évoluée. La nécessité d'un acétyl-CoA pour réaliser la première étape de cette conversion vient renforcer l'hypothèse d'une gestion différente des lipides dans cette souche et d'une plus grande disponibilité en acétyl-CoA pour la synthèse des arômes fermentaires (Chapitre II).

Les résultats obtenus lors de la première partie de ce travail ont révélé **des différences entre Lalvin EC1118® et Affinity™ ECA5 à plusieurs niveaux : assimilation des sources azotées, synthèse des arômes fermentaires et métabolisme lipidique** au travers d'une

gestion différente des phytostérols du milieu qui entrainent des intensités de réponse différentes pour les deux souches aux variations des paramètres environnementaux.

L'ensemble de ces données est à mettre en lien avec les caractéristiques d'Affinity™ ECA5. En effet, cette souche a été obtenue par évolution adaptative sur gluconate dans le but de dévier une partie du flux de carbone vers la VPP (Cadière et al., 2011). Or cette voie permet la réoxydation du NADPH, co-facteur impliqué dans le métabolisme des acides aminés et des lipides. Ceci pourrait donc expliquer en partie les différences observées à ces niveaux.

De plus, cette souche évoluée possède 4 fois plus de lipides que la souche ancestrale (Cadière et al., 2011). Cette augmentation pourrait être due à une capacité de stockage plus importante des lipides dans les vésicules lipidiques. On peut alors imaginer qu'en début de fermentation la souche évoluée va avoir tendance à assimiler les phytostérols du milieu pour les stocker dans ces vésicules. Les stérols sont stockés sous forme de sterylesters (Goodman, 2009 ; Zweytick et al., 2000). Or le gène codant pour une des enzymes réalisant cette estérification, *ARE2*, voit son expression réprimée en seconde partie de fermentation chez Affinity™ ECA5 (données transcriptomiques Chapitre II), suggérant un stockage moins important en phase stationnaire. Ces observations nous permettent d'émettre l'hypothèse que la souche évoluée va préférentiellement stocker les stérols exogènes en début de fermentation puis dans un deuxième temps, elle pourrait les remobiliser pour palier ses besoins entrainant ainsi une synthèse *de novo* moins importante et donc une augmentation de la disponibilité en acétyl-CoA.

Enfin, la comparaison des séquences génomiques de la souche évoluée et de la souche Lalvin EC1118® a mis en évidence une mutation non-sens dans le gène *BCY1* chez Affinity™ ECA5 (données non publiées). Ce gène code pour une sous unité de la protéine kinase A impliquée dans le contrôle d'une grande diversité de voies métaboliques, notamment dans la synthèse des esters d'acétate, le contrôle de la synthèse des lipides via Snf1, une régulation de la voie TOR qui joue un rôle important dans le métabolisme de l'azote mais aussi sur l'accumulation des sucres de réserve ou la croissance filamenteuse qui sont toutes deux des caractéristiques de la souche évoluée.

Grâce à une approche intégrée, nous avons pu proposer une hypothèse expliquant la surproduction systématique des alcools supérieurs et des esters d'acétate par Affinity™ ECA5. En effet, les différents résultats obtenus tendent à montrer une modification au niveau de la gestion de la source lipidique entrainant une plus grande disponibilité en acétyl-CoA qui peut alors être utilisé dans la synthèse des composés d'arôme.

En conclusion, cette étude a permis d'aller plus loin dans la compréhension du métabolisme modifié d'Affinity™ ECA5 mais aussi de mieux comprendre comment les paramètres environnementaux influent sur la synthèse des arômes fermentaires par la levure au cours de la fermentation œnologique.

Ce travail soulève un certain nombre de questions relatives au phénotype complexe de la souche évoluée mais aussi au contrôle de la conduite des fermentations en vue de maîtriser la qualité organoleptique des vins.

Concernant la caractérisation de la souche Affinity™ ECA5, il serait intéressant d'étudier le métabolisme des lipides de cette souche comparée à sa souche ancestrale. Dans un premier temps, il faudrait déterminer précisément la composition lipidique de la souche évoluée. Cette étude pourrait être complétée par une analyse du stockage intracellulaire des lipides afin de déterminer si la souche Affinity™ ECA5 possède plus de vésicules lipidiques et quelles sont les molécules lipidiques contenues à l'intérieur. De la même façon, il serait bon de pouvoir déterminer sous quelle forme et en quelle quantité les phytostérols du milieu sont intégrés dans la membrane cellulaire chez la souche évoluée et la souche ancestrale. L'ensemble de ces données pourrait nous permettre de définir un « besoin en lipides » des souches pour mener à bien la fermentation, ce qui présenterait un intérêt majeur non seulement vis-à-vis de la production d'arômes mais aussi des performances fermentaires des souches. Enfin, l'hypothèse d'une plus grande disponibilité intracellulaire en acétyl-CoA dans la souche Affinity™ ECA5 devrait être vérifiée expérimentalement.

Afin de mieux comprendre les modifications au niveau du métabolisme azoté chez la souche évoluée, l'étude de filiation isotopique déjà menée pourrait être complétée par le marquage d'autres sources azotées à la fois sur le carbone mais aussi sur l'azote. Cette analyse pourrait être renforcée par une approche de fractionnement cellulaire pour déterminer le devenir

intracellulaire de l'azote et en particulier son stockage dans la vacuole. Ce dernier pourrait être plus important chez Affinity™ ECA5, expliquant les besoins plus faibles en azote de cette souche au cours de la fermentation.
Une quantification des acides aminés intracellulaires et des métabolites intracellulaires au cours de la fermentation pourrait aussi apporter des informations sur la gestion des pools intracellulaires (notamment des cétoacides) de cette souche.

Enfin, une analyse de flux métabolique pourrait être réalisée à l'aide d'un modèle métabolique à base de contraintes. Cette approche permettrait d'estimer la distribution des flux métaboliques vers la production des arômes fermentaires.

Pour progresser encore dans la compréhension de la régulation et du fonctionnement des voies de biosynthèse des arômes fermentaires, la filiation isotopique pourrait à nouveau être utilisée. De nouvelles sources d'azote pourront être marquées comme l'isoleucine et la phénylalanine afin de voir leur contribution directe à la production des arômes dont ils sont précurseurs. Cette technique pourra aussi être utilisée dans le cas d'une fermentation réalisée avec un acide aminé ajouté en concentration caricaturale afin de réaliser un fort déséquilibre.
L'approche par filiation isotopique pourra permettre aussi une meilleure compréhension du métabolisme des acides gras et des esters d'éthyle dont la synthèse semble liée au métabolisme azoté.

Concernant la conduite de la fermentation, plusieurs perspectives sont dégagées.
L'impact de la qualité de l'azote apporté sur la production des composés volatils devra être pris en compte, un ajout d'ammonium n'ayant pas le même effet qu'un ajout d'un mélange d'acides aminés ou même d'un acide aminé particulier.
De plus, il sera intéressant d'étudier l'impact du timing de ces ajouts. Dans notre étude, nous n'avons pratiqué que des ajouts initiaux, il sera bon de réaliser des ajouts en cours de fermentation, notamment au moment de l'entrée en phase stationnaire.

L'oxygénation est une autre pratique courante en œnologie pour favoriser l'achèvement de la fermentation. Or, l'effet d'un apport d'oxygène sur la production des arômes fermentaires est peu connu. Nos résultats permettent de mieux quantifier et comprendre l'impact des phytostérols et, de façon plus générale, des lipides. L'oxygénation, dont un effet essentiel est

la synthèse de composés lipidiques, conduit certainement à des mécanismes du même type, mais pas exclusivement. En effet, l'apport d'oxygène peut être modulé aussi bien en termes de quantité ajoutée que de moment d'ajout ou de régime d'oxygénation (ponctuel ou très progressif), ce qui en fait un outil de contrôle de la fermentation potentiellement très intéressant.

L'effet de la température méritera aussi d'être approfondi, d'une part en conditions non isothermes - courantes en œnologie - d'autre part en prenant en compte à la fois l'effet sur le métabolisme et sur les mécanismes physico-chimiques (pertes par évaporation).

Enfin, il s'agira de (i) considérer d'autres molécules, notamment celles ayant des caractéristiques indésirables telles que le H_2S et les principaux composés soufrés et (ii) vérifier la généricité de l'ensemble de ces résultats en les validant sur une large gamme de souches œnologiques et de moûts (cépages et provenance). Il sera aussi intéressant d'évaluer les performances des nutriments complexes, aujourd'hui autorisés en œnologie, sur la stimulation de la production des arômes fermentaires.

La définition du mode de conduite permettant l'obtention de vins au profil aromatique pré-défini n'est envisageable que dans le moyen-long terme. Les résultats obtenus dans cette thèse permettent des avancées très significatives dans ce sens, en premier lieu en termes de compréhension des mécanismes mais aussi pour contribuer à des préconisations d'intérêt pratique.

Références bibliographiques

A

Agenbach, W., 1977. A study of must nitrogen content in relation to incomplete fermentations, yeast production and fermentation activity. Presented at the Proceedings of South Africa Society of Enology and Viticulture. 66-88.

Aguera, E., Picou, C., Perez, M., Sablayrolles, J.M., 2005. Pilot scale vinifications (100 L). I. The controlled fermentations facility at the INRA in Pech Rouge. Vinidea.net, Wine Internet Technical Journal #4.

Albertin, W., Marullo, P., Aigle, M., Dillmann, C., de Vienne, D., Bely, M., Sicard, D., 2011. Population Size Drives Industrial *Saccharomyces cerevisiae* Alcoholic Fermentation and Is under Genetic Control. Appl. Environ. Microbiol. 77, 2772–2784.

Alexandre, H., Rousseaux, I., Charpentier, C., 1994. Ethanol Adaptation Mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol. Appl. Biochem. 20, 173–183.

Andreasen, A.A., Stier, T.J.B., 1953. Anaerobic nutrition of *Saccharomyces cerevisiae*. I. Ergosterol requirement for growth in a defined medium. J. Cell. Comp. Physiol. 41, 23–36.

B

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. J. Biosci. Bioeng. 108, 99–104.

Barbosa, C., Mendes-Faia, A., Mendes-Ferreira, A., 2012. The nitrogen source impacts major volatile compounds released by *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. Int. J. Food Microbiol. 160, 87–93.

Bataillon, M., Rico, A., Sablayrolles, J.-M., Salmon, J.-M., Barre, P., 1996. Early thiamin assimilation by yeasts under enological conditions: Impact on alcoholic fermentation kinetics. J. Ferment. Bioeng. 82, 145–150.

Bell, S.-J., Henschke, P.A., 2005. Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. Aust. J. Grape Wine Res. 11, 242–295.

Beltran, G., Esteve-Zarzoso, B., Rozès, N., Mas, A., Guillamón, J.M., 2005. Influence of the Timing of Nitrogen Additions during Synthetic Grape Must Fermentations on Fermentation Kinetics and Nitrogen Consumption. J. Agric. Food Chem. 53, 996–1002.

Beltran, G., Novo, M., Guillamón, J.M., Mas, A., Rozès, N., 2008. Effect of fermentation temperature and culture media on the yeast lipid composition and wine volatile compounds. Int. J. Food Microbiol. 121, 169–177.

Bely, M., Sablayrolles, J., Barre, P., 1990a. Automatic Detection of Assimilable Nitrogen Deficiencies During Alcoholic Fermentation in Enological Conditions. J. Ferment. Bioeng. 70, 246–252.

Bely, M., Sablayrolles, J.M., Barre, P., 1990b. Description of Alcoholic Fermentation Kinetics: Its Variability and Significance. Am. J. Enol. Vitic. 41, 319–324.

Benjamini, Y., Hochberg, Y., 1995. Controlling the False Discovery Rate - a Practical and Powerful Approach. J. R. Stat. Soc. Ser. B-Methodol. 57, 289–300.

Birch, R.M., Ciani, M., Walker, G.M., 2003. Magnesium, Calcium and Fermentative Metabolism in Wine Yeasts. J. Wine Res. 14, 3–15.

Bisson, L.F., 1991. Influence of nitrogen on yeast and fermentation of grapes 78–89.

Blanco, P., Mirás-Avalos, J.M., Pereira, E., Orriols, I., 2013. Fermentative aroma compounds and sensory profiles of Godello and Albariño wines as influenced by *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains: Influence of yeast strains on wine chemical and sensory properties. J. Sci. Food Agric. 93, 2849–2857.

Blank, L.M., Lehmbeck, F., Sauer, U., 2005. Metabolic-flux and network analysis in fourteen hemiascomycetous yeasts. FEMS Yeast Res., Fungal physiology, moving towards fungal physiomics 5, 545–558.

Blateyron, L., Sablayrolles, J.M., 2001. Stuck and slow fermentations in enology: statistical study of causes and effectiveness of combined additions of oxygen and diammonium phosphate. J. Biosci. Bioeng. 91, 184–189.

Bloem, A., Sanchez, I., Dequin, S., Camarasa, C. Metabolic impact of redox cofactor perturbations on the formation of aroma compounds in *Saccharomyces cerevisiae*. Submitted.

Blomberg, A., Adler, L., 1989. Roles of Glycerol and Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase (nad+) in Acquired Osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 171, 1087–1092.

Bohlscheid, J., Fellman, J., Wang, X., Ansen, D., Edwards, C., 2007. The influence of nitrogen and biotin interactions on the performance of *Saccharomyces* in alcoholic fermentations. J. Appl. Microbiol. 102, 390–400.

Box, G.E.P., Behnken, D.W., 1960. Some new three level designs for the study of quantitative variables. Technometrics 2:455–475

Bradbury, J.E., Richards, K.D., Niederer, H.A., Lee, S.A., Dunbar, P.R., Gardner, R.C., 2006. A homozygous diploid subset of commercial wine yeast strains. Antonie Van Leeuwenhoek Int. J. Gen. Mol. Microbiol. 89, 27–37.

C

Cadière, A. 2010. Ingénierie de la voie des pentoses phosphate chez Saccharomyces cerevisiae Applications en œnologie. Thèse Montpellier.

Cadière, A., Ortiz-Julien, A., Camarasa, C., Dequin, S., 2011. Evolutionary engineered *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains with increased in vivo flux through the pentose phosphate pathway. Metab. Eng. 13, 263–271.

Cadière, A., Aguera, E., Caillé, S., Ortiz-Julien, A., Dequin, S., 2012. Pilot-scale evaluation the enological traits of a novel, aromatic wine yeast strain obtained by adaptive evolution. Food Microbiol. 32, 332–337.

Camarasa, C., 2003. Investigation by 13C-NMR and tricarboxylic acid (TCA) deletion mutant analysis of pathways for succinate formation in *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic fermentation. Microbiology 149, 2669–2678.

Camarasa, C., Sanchez, I., Brial, P., Bigey, F., Dequin, S., 2011. Phenotypic Landscape of *Saccharomyces cerevisiae* during Wine Fermentation: Evidence for Origin-Dependent Metabolic Traits. PLoS ONE 6, e25147.

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.

Casalta, E., Cervi, M.F., Salmon, J.M., Sablayrolles, J.M., 2013. White wine fermentation: interaction of assimilable nitrogen and grape solids Interaction of assimilable nitrogen and grape solids on alcoholic fermantation under oenological conditions. Aust. J. Grape Wine Res. 19, 47–52.

Cavalieri, D., McGovern, P.E., Hartl, D.L., Mortimer, R., Polsinelli, M., 2003. Evidence for *S. cerevisiae* fermentation in ancient wine. J. Mol. Evol. 57, S226–S232. d

Christiaens, J.F., Franco, L.M., Cools, T.L., De Meester, L., Michiels, J., Wenseleers, T., Hassan, B.A., Yaksi, E., Verstrepen, K.J., 2014. The Fungal Aroma Gene ATF1 Promotes Dispersal of Yeast Cells through Insect Vectors. Cell Rep. 9, 425–432.

Clement, T., Perez, M., Mouret, J.R., Sanchez, I., Sablayrolles, J.M., Camarasa, C., 2013. Metabolic Responses of *Saccharomyces cerevisiae* to Valine and Ammonium Pulses during Four-Stage Continuous Wine Fermentations. Appl. Environ. Microbiol. 79, 2749–2758.

Colombié, S., Malherbe, S., Sablayrolles, J.-M., 2005. Modeling Alcoholic Fermentation in Enological Conditions: Feasibility and Interest. Am. J. Enol. Vitic. 56, 238–245.

Crepin, L., Nidelet, T., Sanchez, I., Dequin, S., Camarasa, C., 2012. Sequential Use of Nitrogen Compounds by Saccharomyces cerevisiae during Wine Fermentation: a Model Based on Kinetic and Regulation Characteristics of Nitrogen Permeases. Appl. Environ. Microbiol. 78, 8102–8111.

Crepin, L., Sanchez, I., Nidelet, T., Dequin, S., Camarasa, C., 2014. Efficient ammonium uptake and mobilization of vacuolar arginine by *Saccharomyces cerevisiae* wine strains during wine fermentation. Microb. Cell Factories 13, 109.

D

Damon, C., Vallon, L., Zimmermann, S., Haider, M.Z., Galeote, V., Dequin, S., Luis, P., Fraissinet-Tachet, L., Marmeisse, R., 2011. A novel fungal family of oligopeptide transporters identified by functional metatranscriptomics of soil eukaryotes. Isme J. 5, 1871–1880.

Darriet, P., Lavigne, V., Boidron, J.E., Dubourdieu, D., 1991. Caractérisation de l'arôme variétal des vins de Sauvignon par couplage CPG-Olfactometrie. J. Int. Sci. Vigne Vin. 25, 167-174.

De Nicola, R., Hall, N., Melville, S.G., Walker, G.M., 2009. Influence of Zinc on Distiller's Yeast: Cellular Accumulation of Zinc and Impact on Spirit Congeners. J. Inst. Brew. 115, 265–271.

Dickinson, J.R., Harrison, S.J., Hewlins, M.J.E., 1998. An Investigation of the Metabolism of Valine to Isobutyl Alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 273, 25751–25756.

Dickinson, J.R., 2003. The Catabolism of Amino Acids to Long Chain and Complex Alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 278, 8028–8034.

E

Eden, A., Van Nedervelde, L., Drukker, M., Benvenisty, N., Debourg, A., 2001. Involvement of branched-chain amino acid aminotransferases in the production of fusel alcohols during fermentation in yeast. Appl. Microbiol. Biotechnol. 55, 296–300.

Edwards, C.G., Bohlscheid, J.C., 2007. Impact of pantothenic acid addition on H2S production by *Saccharomyces* under fermentative conditions. Enzyme Microb. Technol. 41, 1–4.

El Haloui, N., Picque, D., Corrieu, G., 1988. Alcoholic fermentation in winemaking: On-line measurement of density and carbon dioxide evolution. J. Food Eng. 8, 17–30.

Etiévant, P. 1991. Wine: Volatiles compounds in foods and beverages. Marcel Dekker, Inc.: 483-546.

Escudero, A., Campo, E., Fariña, L., Cacho, J., Ferreira, V., 2007. Analytical Characterization of the Aroma of Five Premium Red Wines. Insights into the Role of Odor Families and the Concept of Fruitiness of Wines. J. Agric. Food Chem. 55, 4501–4510.

F

Ferreira, V., López, R., Cacho, J.F., 2000. Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties. J. Sci. Food Agric. 80, 1659–1667.

Fleet, G.H., 1993. Wine Microbiology and Biotechnology. CRC Press.

Forch, M., Krauss, G., Proksch, H. 1975. Wort composition and formation of lower free fatty acids. Part I: Effect of phosphorus, magnesium, calcium and biotin in the concentration of free fatty acids. J. Am. Soc. Brew. Chem. 33: 148-150.

Francis, I.L., Newton, J.L., 2005. Determining wine aroma from compositional data. Aust. J. Grape Wine Res. 11, 114–126.

Frick, O., Wittmann, C., 2005. Characterization of the metabolic shift between oxidative and fermentative growth in *Saccharomyces cerevisiae* by comparative C-13 flux analysis. Microb. Cell Factories 4, 30.

Fujii, T., Kobayashi, O., Yoshimoto, H., Furukawa, S., Tamai, Y., 1997. Effect of aeration and unsaturated fatty acids on expression of the *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyltransferase gene. Appl. Environ. Microbiol. 63, 910–915.

Fujiwara, D., Yoshimoto, H., Sone, H., Harashima, S., Tamai, Y., 1998. Transcriptional co-regulation of *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyltransferase gene, ATF1 and Delta-9 fatty acid desaturase gene, OLE1 by unsaturated fatty acids. Yeast 14, 711–721.

Fukuda, K., Yamamoto, N., Kiyokawa, Y., Yanagiuchi, T., Wakai, Y., Kitamoto, K., Inoue, Y., Kimura, A., 1998. Balance of Activities of Alcohol Acetyltransferase and Esterase in *Saccharomyces cerevisiae* Is Important for Production of Isoamyl Acetate. Appl. Environ. Microbiol. 64, 4076–4078.

Furukawa, K., Obata, H., Kitano, H., Mizoguchi, H., Hara, S., 2004. Effect of cellular inositol content on ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* in sake brewing. J. Biosci. Bioeng. 98, 107–113.

G

Gagneur, J., Neudecker, A., 2012. cellGrowth: Fitting cell population growth models. R package version 1.8.0.

Galeote, V., Novo, M., Salema-Oom, M., Brion, C., Valerio, E., Goncalves, P., Dequin, S., 2010. FSY1, a horizontally transferred gene in the *Saccharomyces cerevisiae* EC1118 wine yeast strain, encodes a high-affinity fructose/H+ symporter. Microbiol.-Sgm 156, 3754–3761.

Galeote, V., Bigey, F., Beyne, E., Novo, M., Legras, J.-L., Casaregola, S., Dequin, S., 2011. Amplification of a *Zygosaccharomyces bailii* DNA Segment in Wine Yeast Genomes by Extrachromosomal Circular DNA Formation. Plos One 6, e17872.

Gancedo, J.M., 2008. The early steps of glucose signalling in yeast. FEMS Microbiol. Rev. 32, 673–704.

Goffeau, A., 1996. 1996: A vintage year for yeast and Yeast. Yeast 12, 1603–1605.

Gombert, A.K., Santos, M.M. dos, 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.

Goodman, J., 2009. Demonstrated and inferred metabolism associated with cytosolic lipid droplets. Journal of Lipid Research 50, 2148-2156.

H

Hagen, K.M., Keller, M., Edwards, C.G., 2008. Survey of Biotin, Pantothenic Acid, and Assimilable Nitrogen in Winegrapes from the Pacific Northwest. Am. J. Enol. Vitic. 59, 432–436.

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.

Henschke, P. Jiranek, V. 1993. Yeasts: Metabolism of nitrogen compounds. Wine Microbiology and Biotechnology. Harwood Academic Publishers: 77-163.

Hohmann, S., 1991. Characterization of PDC6, a third structural gene for pyruvate decarboxylase in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 173, 7963–7969.

Husson, F., Josse, J., Le, S., Mazet, J., 2012. FactoMineR: Multivariate Exploratory Data Analysis and Data Mining with R. R package version 1.18. http://CRAN.R-project.org/package=FactoMineR

I

Ibanez, J.G., Carreon-Alvarez, A., Barcena-Soto, M., Casillas, N., 2008. Metals in alcoholic beverages: A review of sources, effects, concentrations, removal, speciation, and analysis. J. Food Compos. Anal., Wine: nutrients, bioactive non-nutrients and more 21, 672–683.

J

Jiménez-Martí, E., Aranda, A., Mendes-Ferreira, A., Mendes-Faia, A., del Olmo, M. lí, 2007. The nature of the nitrogen source added to nitrogen depleted vinifications conducted by a *Saccharomyces cerevisiae* strain in synthetic must affects gene expression and the levels of several volatile compounds. Antonie Van Leeuwenhoek 92, 61–75.

Jiranek, V., Langbridge, P., Henschke, P. 1995. Amino Acid and Ammonium Utilization by *Saccharomyces cerevisiae* Wine Yeast from a chemically Defined Medium. Am. J. Eno. Vitic. 46: 75-83.

Jones, Pierce. 1964. Absorption of amino acids from wort by yeasts. *J. Inst. Brew.* 70: 307-315.

Julien, A., Roustan, J.-L., Dulau, L., Sablayrolles, J.-M., 2000. Comparison of nitrogen and oxygen demands of enological yeasts: technological consequences. Am. J. Enol. Vitic. 51, 215–222.

K

Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T., 2011. The Yeasts, Fifth Edition: A taxonomic study. Elsevier Science.

L

Lafon-Lafourcade, S., Larue, F., Ribereau-Gayon, P., 1979. Evidence for the Existence of "Survival Factors" as an Explanation for Some Peculiarities of Yeast Growth, Especially in Grape Must of High Sugar Concentration. Appl. Environ. Microbiol. 38, 1069–1073.

Lambrechts, M.G. Pretorius, I.S. 2000. Yeast and its importance to wine aroma. Appl. Environ. Microbiol. 66, 744-753.

Le Cao, K.-A., Boitard, S., Besse, P., 2011. Sparse PLS discriminant analysis: biologically relevant feature selection and graphical displays for multiclass problems. BMC Bioinformatics 12, 253.

Lee, S. J., Noble, A.C., 2003. Characterisation of odor-active compounds in Californian Chardonnay wines using GC-olfactometry and GC–mass spectrometry. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 8036–8044.

Legras, J.-L., Merdinoglu, D., Cornuet, J.-M., Karst, F., 2007. Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. Mol. Ecol. 16, 2091–2102.

Lenth, R.V., 2009. Response-Surface Methods in R, Using rsm. J. Stat. Softw. 32, 1–17.

Li, M., Petteys, B., McClure, J.M., Valsakumar, V., Bekiranov, S., Frank, E., Smith J. 2010. Thiamine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by the NAD+-dependent histone deacetylase Hst1. Mol. Cell Biol. 30: 3329-3341.

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.

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. doi:10.1002/yea.1382

Lipinski, J., 2001. Automated solid phase dynamic extraction – Extraction of organics using a wall coated syringe needle. Fresenius J. Anal. Chem. 369, 57–62.

Liti, G., Carter, D.M., Moses, A.M., Warringer, J., Parts, L., James, S.A., Davey, R.P., Roberts, I.N., Burt, A., Koufopanou, V., Tsai, I.J., Bergman, C.M., Bensasson, D., O'Kelly, M.J.T., van Oudenaarden, A., Barton, D.B.H., Bailes, E., Ba, A.N.N., Jones, M., Quail, M.A., Goodhead, I., Sims, S., Smith, F., Blomberg, A., Durbin, R., Louis, E.J., 2009. Population genomics of domestic and wild yeasts. Nature 458, 337–341.

Lynen, F., 1967. Mechanism and regulation of the biosynthesis of fatty acids. Expo. Annu. Biochim. Médicale 28, 1–26.

Lynen, F., Engeser, H., Foerster, E.-C., Fox, J.L., Hess, S., Kresze, G.-B., Schmitt, T., Schreckenbach, T., Siess, E., Wieland, F., Winnewisser, W., 1980. On the Structure of Fatty Acid Synthetase of Yeast. Eur. J. Biochem. 112, 431–442.

M

Malcorps, P., Dufour, J., 1987. Ester Synthesis by *Saccharomyces cerevisiae* Localization of the Acetyl-Coa - Isoamyl Alcohol Acetyltransferase (at). J. Inst. Brew. 93, 160–160.

Malcorps, P., Dufour, J.-P., 1992. Short-chain and medium-chain aliphatic-ester synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Eur. J. Biochem. 210, 1015–1022.

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 Microb. Technol. 20, 373–380.

Marsit, S., 2014. Transferts horizontaux chez Saccharomyces cerevisae : rôle de transporteurs d'oligopeptides dans l'adaptation à l'environnement œnologique. Thèse Montpellier

Marsit, S., Mena, A., Bigey, F., Sauvage, F.-X., Couloux, A., Guy, J., Legras, J.-L., Barrio, E., Dequin, S., Galeote, V., 2015. Evolutionary advantage conferred by an eukaryote-to-eukaryote gene transfer event in wine yeasts. Mol. Biol. Evol. msv057.

Marsit, S., Dequin, S. FEMS YEAST RESEARCH, in revision.

McGovern, P.E., Zhang, J.H., Tang, J.G., Zhang, Z.Q., Hall, G.R., Moreau, R.A., Nunez, A., Butrym, E.D., Richards, M.P., Wang, C.S., Cheng, G.S., Zhao, Z.J., Wang, C.S., 2004. Fermented beverages of pre- and proto-historic China. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, 17593–17598.

Mendes-Pinto, M.M., 2009. Carotenoid breakdown products the-norisoprenoids-in wine aroma. Arch. Biochem. Biophys. 483, 236-245.

Millard, P., Letisse, F., Sokol, S., Portais, J.-C., 2012. IsoCor: correcting MS data in isotope labeling experiments. Bioinformatics 28, 1294–1296.

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.

Minetoki, T., Bogaki, T., Iwamatsu, A., Fujii, T., Hamachi, M., 1993. The Purification, Properties and Internal Peptide Sequences of Alcohol Acetyltransferase Isolated from *Saccharomyces cerevisiae* Kyokai No. 7. Biosci. Biotechnol. Biochem. 57, 2094–2098.

Molina, A.M., Swiegers, J.H., Varela, C., Pretorius, I.S., Agosin, E., 2007. Influence of wine fermentation temperature on the synthesis of yeast-derived volatile aroma compounds. Appl. Microbiol. Biotechnol. 77, 675–687.

Molina, A.M., Guadalupe, V., Varela, C., Swiegers, J.H., Pretorius, I.S., Agosin, E., 2009. Differential synthesis of fermentative aroma compounds of two related commercial wine yeast strains. Food Chem. 117, 189–195.

Morakul, S., Mouret, J.-R., Nicolle, P., Trelea, I.C., Sablayrolles, J.-M., Athes, V., 2011. Modelling of the gas–liquid partitioning of aroma compounds during wine alcoholic fermentation and prediction of aroma losses. Process Biochem. 46, 1125–1131.

Morakul, S., Mouret, J.-R., Nicolle, P., Aguera, E., Sablayrolles, J.-M., Athès, V., 2013. A Dynamic Analysis of Higher Alcohol and Ester Release During Winemaking Fermentations. Food Bioprocess Technol. 6, 818–827.

Mortimer, R.K., 2000. Evolution and variation of the yeast (*Saccharomyces*) genome. Genome Res. 10, 403–409.

Mouret, J.R., Morakul, S., Nicolle, P., Athes, V., Sablayrolles, J.M., 2012. Gas–liquid transfer of aroma compounds during winemaking fermentations. LWT - Food Sci. Technol. 49, 238–244.

Mouret, J.R., Camarasa, C., Angenieux, M., Aguera, E., Perez, M., Farines, V., Sablayrolles, J.M., 2014a. Kinetic analysis and gas–liquid balances of the production of fermentative aromas during winemaking fermentations: Effect of assimilable nitrogen and temperature. Food Res. Int. 62, 1–10.

Mouret, J.R., Perez, M., Angenieux, M., Nicolle, P., Farines, V., Sablayrolles, J.M., 2014b. Online-Based Kinetic Analysis of Higher Alcohol and Ester Synthesis During Winemaking Fermentations. Food Bioprocess Technol. 7, 1235–1245.

Mouret, J.R., Cadiere, A., Aguera, E., Rollero, S., Ortiz-Julien, A., Sablayrolles, J.M., Dequin, S., 2015. Dynamics and quantitative analysis of the synthesis of fermentative aromas by an evolved wine strain of *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast Chichester Engl. 32, 257–269.

N

Nissen, T.L., Schulze, U., Nielsen, J., Villadsen, J., 1997. Flux distributions in anaerobic, glucose-limited continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol.-Uk 143, 203–218.

Nogales-Cadenas, R., Carmona-Saez, P., Vazquez, M., Vicente, C., Yang, X., Tirado, F., Maria Carazo, J., Pascual-Montano, A., 2009. GeneCodis: interpreting gene lists through enrichment analysis and integration of diverse biological information. Nucleic Acids Res. 37, W317–W322.

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.

O

Otterstedt, K., Larsson, C., Bill, R.M., Stahlberg, A., Boles, E., Hohmann, S., Gustafsson, L., 2004. Switching the mode of metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Embo Rep. 5, 532–537.

Ough, C., Huang, Z., An, D., Dtevens, D. 1991. Amino acid uptake by four commercial yeasts at two different temperatures of growth and fermentation: effects of urea excretion and reabsorption. Am. J. Eno. Vitic.42: 26-40.

P

Palanca, L., Gaskett, A.C., Günther, C.S., Newcomb, R.D., Goddard, M.R., 2013. Quantifying Variation in the Ability of Yeasts to Attract Drosophila melanogaster. PLoS ONE 8, e75332.

Pereira, C.F., 1988. The importance of metallic elements in wine. A literature survey. Z. Für Lebensm.-Unters. Forsch. 186, 295–300.

Pérez-Torrado, R., Carrasco, P., Aranda, A., Gimeno-Alcañiz, J., Pérez-Ortín, J.E., Matallana, E., del Olmo, M., 2002. Study of the First Hours of Microvinification by the Use of Osmotic Stress-response Genes as Probes. Syst. Appl. Microbiol. 25, 153–161.

Perpete, P., Santos, G., Bodart, E., Collin, S. 2005. Uptake of aminoacids during beer production: the concept of a critical time value. J. of the Am. Soc. of Brew. Chem. 63: 23-27.

Plata, C., Mauricio, J.C., Millan, C., Ortega, J.M., 2005. Influence of glucose and oxygen on the production of ethyl acetate and isoamyl acetate by a *Saccharomyces cerevisiae* strain during alcoholic fermentation. World J. Microbiol. Biotechnol. 21, 115–121.

Pretorius, I.S., Høj, P.B., 2005. Grape and wine biotechnology: Challenges, opportunities and potential benefits. Aust. J. Grape Wine Res. 11, 83–108.

R

R Development Core Team, 2012 R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

R Core Team, 2014. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Ribereau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean., Dubourdieu, D. 1998. *Traité d'œnologie.* Dunod.

Ritz, C., Streibig, J.C., 2005. Bioassay analysis using R. J. Stat. Softw. 12, 1–22.

Rosenfeld, E., Beauvoit, B., Blondin, B., Salmon, J.-M., 2003. Oxygen Consumption by Anaerobic *Saccharomyces cerevisiae* under Enological Conditions: Effect on Fermentation Kinetics. Appl. Environ. Microbiol. 69, 113–121.

Rosi, I., Bertuccioli, M., 1992. Influences of Lipid addition on Fatty Acid composition of *Saccharomyces cerevisiae* and Aroma Characteristics of Experimental Wines. J. Inst. Brew. 98, 305–314.

Rossouw, D., Naes, T., Bauer, F.F., 2008. Linking gene regulation and the exo-metabolome: A comparative transcriptomics approach to identify genes that impact on the production of volatile aroma compounds in yeast. BMC Genomics 9, 530-548.

Rossouw, D., Jacobson, D., Bauer, F.F., 2012. Transcriptional Regulation and the Diversification of Metabolism in Wine Yeast Strains. Genetics 190, 251–261.

S

Sablayrolles, J., Barre, P., 1993. Kinetics of Alcoholic Fermentation Under Anisothermal Conditions .2. Prediction from the Kinetics Under Isothermal Conditions. Am. J. Enol. Vitic. 44, 134–138.

Sablayrolles, J.M., 2009. Control of alcoholic fermentation in winemaking: Current situation and prospect. Food Res. Int., Bioprocesses in Food Industries 42, 418–424.

Sablayrolles, J.-M., Dubois, C., Manginot, C., Roustan, J.-L., Barre, P., 1996. Effectiveness of combined ammoniacal nitrogen and oxygen additions for completion of sluggish and stuck wine fermentations. J. Ferment. Bioeng. 82, 377–381.

Saerens, S.M.G., Verstrepen, K.J., Van Laere, S.D.M., Voet, A.R.D., Van Dijck, P., Delvaux, F.R., Thevelein, J.M., 2006. The *Saccharomyces cerevisiae* EHT1 and EEB1 genes encode novel enzymes with medium-chain fatty acid ethyl ester synthesis and hydrolysis capacity. J. Biol. Chem. 281, 4446–4456.

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.

Salmon, J.M., 1989. Effect of Sugar Transport Inactivation in *Saccharomyces cerevisiae* on Sluggish and Stuck Enological Fermentations. Appl. Environ. Microbiol. 55, 953–958.

San-Juan, F., Ferreira, V., Cacho, J., Escudero, A., 2011. Quality and Aromatic Sensory Descriptors (Mainly Fresh and Dry Fruit Character) of Spanish Red Wines can be Predicted from their Aroma-Active Chemical Composition. J. Agric. Food Chem. 59, 7916–7924.

Schacherer, J., Shapiro, J.A., Ruderfer, D.M., Kruglyak, L., 2009. Comprehensive polymorphism survey elucidates population structure of *Saccharomyces cerevisiae*. Nature 458, 342–U103.

Schreier, P., Jennings, W.G., 1979. Flavor composition of wines: A review. C R C Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 12, 59–111.

Shinohara, T., 1985. Gas-Chromatographic Analysis of Volatile Fatty-Acids in Wines. Agric. Biol. Chem. 49, 2211–2212.

Siebert, T.E., Smyth, H.E., Capone, D.L., Neuwohner, C., Pardon, K.H., Skouroumounis, G.K., Herderich, M., Sefton, M.A., Pollnitz, A.P., 2005. Stable isotope dilution analysis of wine fermentation products by HS-SPME-GC-MS. Anal. Bioanal. Chem. 381, 937–947.

Smyth, G.K., Speed, T., 2003. Normalization of cDNA microarray data. Methods 31, 265–273.

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.

Spor, A., Nidelet, T., Simon, J., Bourgais, A., de Vienne, D., Sicard, D., 2009. Niche-driven evolution of metabolic and life-history strategies in natural and domesticated populations of Saccharomyces cerevisiae. Bmc Evol. Biol. 9, 296.

Stefanini, I., Dapporto, L., Legras, J.-L., Calabretta, A., Di Paola, M., De Filippo, C., Viola, R., Capretti, P., Polsinelli, M., Turillazzi, S., Cavalieri, D., 2012. Role of social wasps in *Saccharomyces cerevisiae* ecology and evolution. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 109, 13398–13403.

Steyer, D., Ambroset, C., Brion, C., Claudel, P., Delobel, P., Sanchez, I., Erny, C., Blondin, B., Karst, F., Legras, J.-L., 2012. QTL mapping of the production of wine aroma compounds by yeast. Bmc Genomics 13, 573.

Styger, G., Prior, B., Bauer, F.F., 2011. Wine flavor and aroma. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 38, 1145–1159.

Swiegers, J.H., Bartowsky, E.J., Henschke, P.A., Pretorius, I.S., 2005. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. Aust. J. Grape Wine Res. 11, 139–173.

T

Thomas, D., Surdin-Kerjan, Y., 1997. Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61, 503–532.

Torija, M.J., Beltran, G., Novo, M., Poblet, M., Guillamón, J.M., Mas, A., Rozès, N., 2003. Effects of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine. Int. J. Food Microbiol. 85, 127–136.

Torrea, D., 2003. Production of volatile compounds in the fermentation of chardonnay musts inoculated with two strains of *Saccharomyces cerevisiae* with different nitrogen demands. Food Control 14, 565–571.

Torrea, D., Varela, C., Ugliano, M., Ancin-Azpilicueta, C., Leigh Francis, I., Henschke, P.A., 2011. Comparison of inorganic and organic nitrogen supplementation of grape juice – Effect on volatile composition and aroma profile of a Chardonnay wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae* yeast. Food Chem. 127, 1072–1083.

V

Valero, E., Moyano, L., Millan, M.C., Medina, M., Ortega, J.M., 2002. Higher alcohols and esters production by *Saccharomyces cerevisiae*. Influence of the initial oxygenation of the grape must. Food Chem. 78, 57–61.

Van Dijken JP., Weusthuis RA., Pronk JT., 1993. Kinetics of growth and sugar consumption in yeasts. Antonie Van Leeuwenhoek. 63, 343-52.

Vandijken, J., Scheffers, W., 1986. Redox Balances in the Metabolism of Sugars by Yeasts. Fems Microbiol. Lett. 32, 199–224.

Varela, C., Torrea, D., Schmidt, S.A., Ancin-Azpilicueta, C., Henschke, P.A., 2012. Effect of oxygen and lipid supplementation on the volatile composition of chemically defined medium and Chardonnay wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae*. Food Chem. 135, 2863–2871.

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.

Vilanova, M., Siebert, T.E., Varela, C., Pretorius, I.S., Henschke, P.A., 2012. Effect of ammonium nitrogen supplementation of grape juice on wine volatiles and non-volatiles composition of the aromatic grape variety Albariño. Food Chem. 133, 124–131.

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

W

Wang, X., Bohlscheid, J., Edwards, C., 2003. Fermentative activity and production of volatile compounds by *Saccharomyces* grown in synthetic grape juice media deficient in assimilable nitrogen and/or pantothenic acid. J. Appl. Microbiol. 94, 349–359.

Williams, L., Boulton, R., 1983. Modeling and Prediction of Evaporative Ethanol Loss During Wine Fermentations. Am. J. Enol. Vitic. 34, 234–242.

Wood, C., Siebert, T.E., Parker, M., Capone, D.L., Elsey, G.M., Pollnitz, A.P., Eggers, M., Meier, M., Vössing, T., Widder, S., Krammer, G., Sefton, M.A., Herderich, M.J., 2008. From wine to pepper: rotundone, an obscure sesquiterpene, is a potent spicy aroma compound. J. Agric. Food Chem. 56, 3738–3744.

Y

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

Yunoki, K., Yasui, Y., Hirose, S., Ohnishi, M., 2005. Fatty acids in must prepared from 11 grapes grown in Japan: Comparison with wine and effect on fatty acid ethyl ester formation. Lipids 40, 361–367.

Z

Zweytick, D., Athenstaedt, K., Daum, G., 2000. Intracellular lipid particles of eukaryotic cells. Biochimica et Biophysica Acta 1469, 101-120.

Annexes

Yeast
Yeast 2015; **32**: 257–269.
Published online 6 August 2014 in Wiley Online Library
(wileyonlinelibrary.com) **DOI:** 10.1002/yea.3028

Special Issue Article

Dynamics and quantitative analysis of the synthesis of fermentative aromas by an evolved wine strain of *Saccharomyces cerevisiae*

J. R. Mouret[1]*, A. Cadiere[1†], E. Aguera[3], S. Rollero[1,2], A. Ortiz-Julien[2], J. M. Sablayrolles[1] and S. Dequin[1]
[1]*INRA, UMR1083, Montpellier, France*
[2]*Lallemand SAS, Blagnac, France*
[3]*INRA, UE999, Gruissan, France*

**Correspondence to: J. R. Mouret, UMR1083 Sciences for Enology, INRA, F-34060 Montpellier Cedex 1, France. E-mail: mouretj@supagro.inra.fr*
[†]Present address: EHESP Rennes, Sorbonne Paris Cité, Rennes, France AND Inserm, UMR IRSET Institut de recherche sur la santé l'environnement et le travail, Rennes, France.

Received: 13 May 2014
Accepted: 22 June 2014

Abstract

We performed a dynamic and quantitative analysis of the synthesis of fermentative aromas by an aromatic wine yeast, ECA5, obtained by adaptive evolution. During fermentation at pilot scale on synthetic and natural musts, ECA5 produced volatile compounds (higher alcohols and their acetates, ethyl esters) at higher rates than the ancestral strain, with the exception of propanol. Marked differences in the chronology of synthesis of several compounds were observed between the two strains. Overproduction of phenyl ethanol occurred mainly during the growth phase for ECA5, consistent with its higher flux through the pentose phosphate pathway, which plays a key role in biosynthetic processes. The kinetics of production of isobutanol and isoamyl alcohol were differently affected by different media (synthetic or natural must) and, in particular, according to the nature of the sterols in the media (ergosterol or phytosterols). We also observed differences in the chronology of synthesis of ethyl acetate and isoamyl acetate or ethyl esters, suggesting that the regulation of the synthesis of these compounds in the evolved strain differs from that in the ancestral strain. This study shows that a dynamic analysis of volatile compounds, using high acquisition frequency online gas chromatography, can provide novel insights into the synthesis and regulation of aromas and is thus a potentially powerful tool for strain characterization. Copyright © 2014 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: **wine yeast; adaptive evolution; online monitoring; gas–liquid balance; higher alcohols; esters**

Introduction

Wine aroma is one of the principal attributes determining the preferences of wine consumers (Lee and Noble, 2003; Swiegers *et al.*, 2005; Ugliano *et al.*, 2010). Most fruity aroma compounds, including esters in particular, are produced by yeast during alcoholic fermentation. Several studies have assessed the influence of fermentation parameters (principally temperature and nitrogen addition) on the final fermentative aroma content of the wine, focusing mostly on higher alcohols and esters (Swiegers *et al.*, 2005). The choice of yeast strain is also a determinant of the final concentration of these volatile compounds (Camarasa *et al.*, 2011; Molina *et al.*, 2009, Torija *et al.*, 2003). Therefore, the development of new wine yeast strains with improved aromatic production properties is an important issue for the wine industry. Given the poor consumer acceptance of genetically modified organisms (GMO) in the food industry, GMO-free strategies, such as experimental evolution, have recently received much attention for improving wine yeast traits (Cadiere *et al.*, 2011; Kutyna *et al.*, 2012; Tilloy *et al.*, 2014). Adaptive evolution involves maintaining

Copyright © 2014 John Wiley & Sons, Ltd.

yeast during a large number of generations in a controlled, selective environment. Strains with mutations having beneficial impact under the conditions used will increase in frequency in the population, and can then be selected as evolved variants.

Using this approach and gluconate as sole carbon source, we previously selected an evolved wine yeast (Affinity ECA5^{TM}) with increased flux through the pentose phosphate pathway. This strain displays several novel traits that are potentially beneficial for winemaking (Cadiere *et al.*, 2011, 2012; Patent No. FR 09/05585, 20 November 2009). In particular, it produced markedly less volatile acidity but greater amounts of esters (responsible for various floral and fruity notes) than the ancestral strain; these characteristics make ECA5 an attractive strain for enhancing the aromatic value of grape juices.

Although the amounts of esters and higher alcohols were consistently greater in the final product of ECA5 fermentation than the ancestral strain fermentation, the dynamics of synthesis of these compounds has not been compared between wine fermentations with the two strains. As wine fermentation involves a short growth phase followed by a long, nitrogen-limited stationary phase, the synthesis of aroma compounds varies greatly during the fermentation process.

The objective of this study was to compare the kinetics of production of the main fermentative aromas by ECA5 and its ancestral strain EC1118, in natural and synthetic musts and at pilot-scale, using a recently developed online monitoring system. The high acquisition frequency of online gas chromatography (GC) makes it possible to determine kinetic parameters and to calculate the rates of synthesis for volatile compounds (Mouret *et al.*, 2014a). We also determined the gas–liquid balances of aroma production to take losses into account and to distinguish yeast metabolic synthesis from physicochemical effects (Morakul *et al.*, 2013). This dynamic and quantitative analysis of the synthesis of major aroma compounds by the evolved and ancestral strains was expected to elucidate the metabolic basis of the evolved phenotype. In both synthetic and natural grape musts, there was a marked overproduction of acetate esters by the evolved strain. Also, there were differences in the regulation of the production of several aroma compounds between the evolved and ancestral strains. Furthermore, we also found differences in the kinetics of synthesis of some aroma compounds, depending on the nature of the sterols in the media.

Materials and methods

Fermentation

Yeast strains and culture media

The *Saccharomyces cerevisiae* strains used in this study were the commercial strains Lalvin EC1118® and Affinity ECA5^{TM} (Lallemand SA, Montreal, Canada), obtained by adaptive evolution of EC1118® (Cadiere *et al.*, 2011, 2012; Patent No. FR 09/05585, 20 November 2009). Media or musts in fermentation tanks were inoculated with 200 mg/l active dry yeast that had been rehydrated by incubation with 50 g/l glucose for 30 min at 35°C.

In this study, we used a natural must and a synthetic culture medium. The natural must was harvested in 2009 in the south of France (Maccabeu), flash-pasteurized and stored under sterile conditions. It contained 181 g/l sugar and 243 mg/l assimilable nitrogen. The synthetic medium was formulated to mimic grape musts (Bely *et al.*, 1990). It contained 120 g/l glucose, 120 g/l fructose, 6 g/l malic acid, 6 g/l citric acid, salts (0.75 g/l KH_2PO_4, 0.50 g/l K_2SO_4, 0.25 g/l $MgSO_4$, 0.155 g/l $CaCl_2$, 0.20 g/l NaCl), vitamins (20 mg/l myo-inositol, 1.5 mg/l pantothenic acid, 0.25 mg/l thiamine, 2 mg/l nicotinic acid, 0.25 mg/l pyridoxine, 0.003 mg/l biotin), trace elements (4 mg/l $MnSO_4$, 4 mg/l $ZnSO_4$, 1 mg/l $CuSO_4$, 1 mg/l KI, 0.4 mg/l $CoCl_2$, 1 mg/l H_3BO_3, 1 mg/l $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$) and anaerobic factors (0.05% v/v Tween 80, 3.75 mg/l ergosterol, 0.0005% v/v oleic acid). Tartaric acid was replaced with citric acid to prevent the formation of tartrate precipitate during freezing at –20°C. The source of nitrogen was a mixture of ammonium (30%) and amino acids (70%); the assimilable nitrogen concentration was 425 mg N/l. The amino acid content of the medium was as follows: 44.7 mg/l aspartic acid, 123.0 mg/l glutamic acid, 145.3 mg/l alanine, 374.4 mg/l arginine, 13.1 mg/l cysteine, 505.3 mg/l glutamine, 18.3 mg/l glycine, 32.7 mg/l histidine, 32.7 mg/l isoleucine, 48.4 mg/l leucine, 17.0 mg/l lysine, 31.4 mg/l methionine, 38.0 mg/l phenylalanine,

Copyright © 2014 John Wiley & Sons, Ltd.

DOI: 10.1002/yea

612.6 mg/l proline, 78.5 mg/l serine, 75.9 mg/l threonine, 179.3 mg/l tryptophan, 18.3 mg/l tyrosine and 44.5 mg/l valine.

To study the effects of sterols on the synthesis of higher alcohols, fermentations were performed at 28°C in synthetic media containing 3.75 mg/l of either ergosterol or phytosterols (ref. 85451, Sigma-Aldrich) as the lipid source. The composition of these media was the same as that of the synthetic medium described in the previous paragraph; it contained 100 g/l glucose, 100 g/l fructose and 250 mg/l assimilable nitrogen (the relative proportions of the different sources were the same as that in the medium containing 425 mg/l). A stock solution of 15 mg/l phytosterols (β-sitosterol 90%, campesterol 5% and stigmasterol 5%) was made up in Tween 80 and ethanol (1:1 v/v).

Cell population and metabolite determination

During fermentation, the cell population was determined using a Coulter counter (Model Z2, Beckman-Coulter, Margency, France) fitted with a 100 µm aperture probe. Volatile acidity (proportional to the concentration of acetic acid) was determined by the bromophenol blue method (Gallery, Thermo Fisher Scientific, Asnieres sur Seine, France).

Tanks and fermentation control

Fermentations were run at pilot scale, in 10 l stainless steel tanks at 20°C. The amount of CO_2 released was measured accurately and automatically with a gas mass flow meter, for calculation of the rate of CO_2 production (dCO_2/dt).

Each pilot-scale fermentation was performed once. We previously determined that duplicate experiments run with this online monitoring system yield highly reproducible results: for all the various volatile compounds assessed, the relative standard deviation (SD) between duplicates was very low throughout the fermentation process (Mouret *et al.*, 2012, 2014a); 4% for propanol, 3% for isobutanol, 6% for isoamyl alcohol, 3% for isoamyl acetate, 2% for ethyl hexanoate and 4% for ethyl octanoate.

Analysis of higher alcohols and esters

The concentrations of volatile compounds in the headspace of the fermentor were measured using an online GC device. Headspace gas was pumped from the tank at a flow rate of 14 ml/min through a heated transfer line. Carbon compounds were concentrated in a cold trap (Tenax TM) for 6 min, desorbed at 160°C for 1 min and analysed with a Perichrom PR2100 GC coupled to a flame ionization detector (Alpha MOS, Toulouse, France). The details of the GC method and the calibration procedure were as previously described by Mouret *et al.* (2014a).

Volatile compound balances during fermentation

Concentrations in the liquid

The concentration of a volatile compound in the liquid [$C^{liq}(t)$] was calculated from the concentration measured online in the gas phase, expressed as $C^{gas}(t)$ in mg/l CO_2, using the partition coefficient (k_i) value (equation 1):

$$C^{liq}(t) = \frac{C^{gas}(t)}{k_i} \quad (1)$$

The value of k_i (equation 2) was calculated using the model developed by Morakul *et al.* (2011), as a function of the fermenting must composition, characterized by ethanol concentration and temperature:

$$\ln k_i = F1 + F2 \times E - \frac{F3 + F4 \times E}{R}\left(\frac{1000}{T} - \frac{1000}{T_{ref}}\right) \quad (2)$$

where E is the ethanol concentration (g/l) in the liquid phase, calculated from the measurement of the amount of CO_2 released, which is proportional to sugar consumption; T is the current absolute temperature, T_{ref} the absolute reference temperature (i.e. 293.15 K, or 20°C, in this study). $F1$, $F2$, $F3$ and $F4$ are constants, identified for each volatile compound. The values of these parameters for the various molecules considered have been determined by Mouret *et al.* (2014a, 2014b).

Losses in the exhaust gas

Losses into the exhaust gas were calculated using equation 3:

$$L(t) = \int_0^t C^{gas}(t) \times Q(t) \times dt \quad (3)$$

Copyright © 2014 John Wiley & Sons, Ltd.

DOI: 10.1002/yea

where Q(t) is the CO_2 flow rate at time t, expressed in l CO_2/l must/h.

Total production

The total production of a volatile compound at time *t*, expressed as $P(t)$ in mg/l must, was calculated by adding the concentration in the liquid phase, expressed as $C^{liq}(t)$ in mg/l must, to the amount of the volatile compound lost in the gas phase, expressed as $L(t)$ in mg/l must (equation 4):

$$P(t) = C^{liq}(t) + L(t) \quad (4)$$

This production value represents the capability of the yeast to produce a volatile compound, independent of the subsequent fate of the compound – accumulation in the liquid phase or evaporation.

Calculation of the rates and specific rates of production, accumulation in the liquid phase and loss into the gas phase

The high frequency of online GC measurements (up to one measurement/h) made it possible to calculate the rates of volatile compound production, accumulation and loss, using sliding-window second-order polynomial fitting in a custom-developed Labview application. The specific rates were calculated by dividing the corresponding rates by the cell count.

Results and discussion

We compared the kinetic profiles of production of fermentative aromas of the evolved and ancestral strains ECA5 and EC1118 in a natural grape must and a synthetic medium mimicking grape must, using an innovative online GC system. We monitored 10 fermentative aroma compounds from various chemical families, and having different flavour properties, throughout the fermentation process: four higher alcohols (propanol, isobutanol, isoamyl alcohol and 2-phenylethanol), four esters of higher alcohols (ethyl acetate, isobutyl acetate, isoamyl acetate and 2-phenylethylacetate) and two ethyl esters (ethyl hexanoate and ethyl octanoate).

We previously showed that losses into the exhaust gas are highly compound-dependent: as expected, they are negligible for higher alcohols but are substantial for esters (Morakul *et al.*, 2013; Mouret *et al.*, 2014a), e.g. at 24°C, 0.61% of the isobutanol and 42% of the ethyl hexanoate are lost during the fermentation process (Mouret *et al.*, 2014a). Consequently, the amounts of higher alcohols produced by yeast can be accurately deduced from the liquid concentrations, but assessment of the metabolic capacity of yeast for the synthesis of esters requires assays of both the liquid and gas phases. We therefore determined the total production of fermentative aromas (except for 2-phenylethanol and 2-phenylethylacetate) as the sum of liquid content and gaseous loss (Table 1).

To compare the chronology of synthesis between volatile compounds, we characterized the production profile of each in terms of various representative kinetic measures (Table 2a, b): (a) start of synthesis (defined as the percentage of sugar consumed at which the product concentration first exceeded 10% of its maximum concentration); (b) end of synthesis (defined as the percentage of sugar consumed at which the product concentration reached 90% of the maximum concentration); (c) the percentage of sugar consumed at which the production rate was maximal; (d) the percentage of volatile compound produced during the growth phase.

As it was not possible to calibrate the online GC system for the measurement of 2-phenylethanol and 2-phenylethylacetate, we represented these two molecules as the peak areas obtained in gas chromatography (Table 1). As both fermentations were performed at the same temperature, the raw data can be used to compare the performances of EC1118 and ECA5.

For the two strains, the plot of total production of each volatile compound, with the exception of propanol, against sugar consumption revealed that production yield was not constant throughout the fermentation process (Figures 1a–h, 2a–h). The fermentative aroma molecules were mostly produced during the stationary phase (Table 2a, b) and the production yield was maximal during this phase (Figures 1a–h, 2a–h). Higher alcohols and esters of higher alcohols can be produced from both nitrogen (via the Erhlich pathway) and carbon metabolism (Swiegers *et al.*, 2005). As nitrogen (ammonium and amino acids) is exhausted during

Copyright © 2014 John Wiley & Sons, Ltd.

DOI: 10.1002/yea

Table 1. Total production of volatile compounds

		Propanol (mg/l)	Isobutanol (mg/l)	Isoamyl alcohol (mg/l)	Isobutyl acetate (mg/l)	Isoamyl acetate (mg/l)	Ethyl acetate (mg/l)	Ethyl hexanoate (mg/l)	Ethyl octanoate (mg/l)	2-Phenyl ethanol (mV)	2-Phenyl ethyl acetate (mV)	Volatile acidity (g/l H_2SO_4)
Natural must	EC1118	39.0	19.1	119	0.168	6.66	79.4	2.14	3.43	6.37	4.91	0.28
	ECA5	34.7	29.8	174	0.401	14.06	101.4	2.99	4.71	10.07	12.24	0.16
	Difference	−11%	56%	45%	138%	111%	28%	39%	37%	58%	149%	−43%
Synthetic medium	EC1118	48.9	30.5	150	0.177	7.83	87.7	2.34	3.97	2.64	4.70	0.64
	ECA5	45.1	50.2	144	0.832	18.64	153.8	2.64	4.08	3.31	6.24	0.55
	Difference	−8%	65%	−4%	371%	138%	75%	13%	3%	25%	33%	−14%

Difference is reported as the percentage by which production by ECA5 is greater than that by EC1118.

the stationary phase, this indicates that central carbon metabolism is the major contributor to the synthesis of these volatile compounds during wine fermentation.

Production of higher alcohols

Propanol

The pattern of production for propanol was different from that of the other volatile molecules studied. Propanol production by both yeast strains on both musts stopped at the end of the growth phase (Table 2a, b). This is consistent with previous studies indicating that propanol is a metabolic marker of the availability of intracellular nitrogen (Mouret *et al.*, 2014b). This, in turn, is consistent with propanol being generated exclusively from nitrogen metabolism by direct deamination of exogenous threonine or by interconversion between other amino acids and threonine, catalysed by aminotransferases and transaminases (Boulton *et al.*, 1995).

The overall production of this higher alcohol throughout the fermentation was similar for the two strains (Table 1). The maximum values of the production yield from sugar and of the production rate were also similar (Table 3a, b). Therefore, this part of metabolism has not been significantly modified in the evolved strain ECA5.

2-Phenylethanol

In both culture media, 2-phenylethanol production by ECA5 was systematically greater than that by EC1118 (Table 1), and most notably during the growth phase. When the maximum cell count was reached, the peak area for 2-phenylethanol was 103% higher in natural must for ECA5 than for EC1118 and 97% higher in synthetic must, whereas at the end of the fermentation process there was only 58% and 25% more in natural and synthetic musts, respectively (Table 2a, b).

A plausible explanation for higher synthesis of 2-phenylethanol by ECA5 than EC1118 is the redirection of the carbon flux from glycolysis towards the pentose phosphate (PP) pathway in the evolved strain. Indeed, 2-phenylethanol is a degradation product of phenylalanine, an amino acid produced from erythrose-4-phosphate, an intermediary of the PP pathway. Therefore, the level of 2-phenylethanol

Copyright © 2014 John Wiley & Sons, Ltd.

DOI: 10.1002/yea

Table 2. Kinetic parameters for the total production of higher alcohols and esters in natural (a) and synthetic (b) media

(a)

Natural must		Propanol	Isobutanol	Isoamyl alcohol	Isobutyl acetate	Isoamyl acetate	Ethyl acetate	Ethyl hexanoate	Ethyl octanoate	2-Phenyl ethanol	2-Phenyl ethylacetate
Start of synthesis*	EC1118	2%	5%	10%	28%	22%	28%	18%	10%	1%	1%
	ECA5	2%	2%	8%	15%	27%	23%	15%	11%	1%	1%
End of synthesis*	EC1118	41%	78%	84%	86%	97%	97%	91%	86%	80%	86%
	ECA5	38%	84%	84%	80%	90%	93%	84%	80%	71%	76%
Timing of the maximal production rate*	EC1118	18%	28%	37%	32%	41%	41%	37%	37%	–	–
	ECA5	19%	31%	38%	35%	62%	57%	38%	31%	–	–
Volatile compound produced during the growth phase (%)	EC1118	90	53	38	52	25	22	38	38	42	49
	ECA5	99	55	40	40	20	24	33	43	54	41

(b)

Synthetic medium		Propanol	Isobutanol	Isoamyl alcohol	Isobutyl acetate	Isoamyl acetate	Ethyl acetate	Ethyl hexanoate	Ethyl octanoate	2-Phenyl ethanol	2-Phenyl ethylacetate
Start of synthesis*	EC1118	5%	5%	7%	14%	22%	19%	17%	22%	14%	14%
	ECA5	4%	6%	6%	24%	32%	24%	18%	18%	2%	18%
End of synthesis*	EC1118	42%	91%	90%	69%	84%	93%	79%	84%	69%	91%
	ECA5	34%	83%	85%	77%	86%	91%	72%	86%	67%	78%
Timing of the maximal production rate*	EC1118	14%	34%	22%	28%	34%	34%	28%	42%	–	–
	ECA5	18%	30%	45%	49%	64%	45%	43%	34%	–	–
Volatile compound produced during the growth phase (%)	EC1118	88	51	38	65	38	36	53	29	28	20
	ECA5	93	45	39	29	17	25	40	35	44	29

*The start of synthesis, the end of synthesis and the timing of the maximal production rate are expressed as percentages of sugar consumed.

Copyright © 2014 John Wiley & Sons, Ltd.

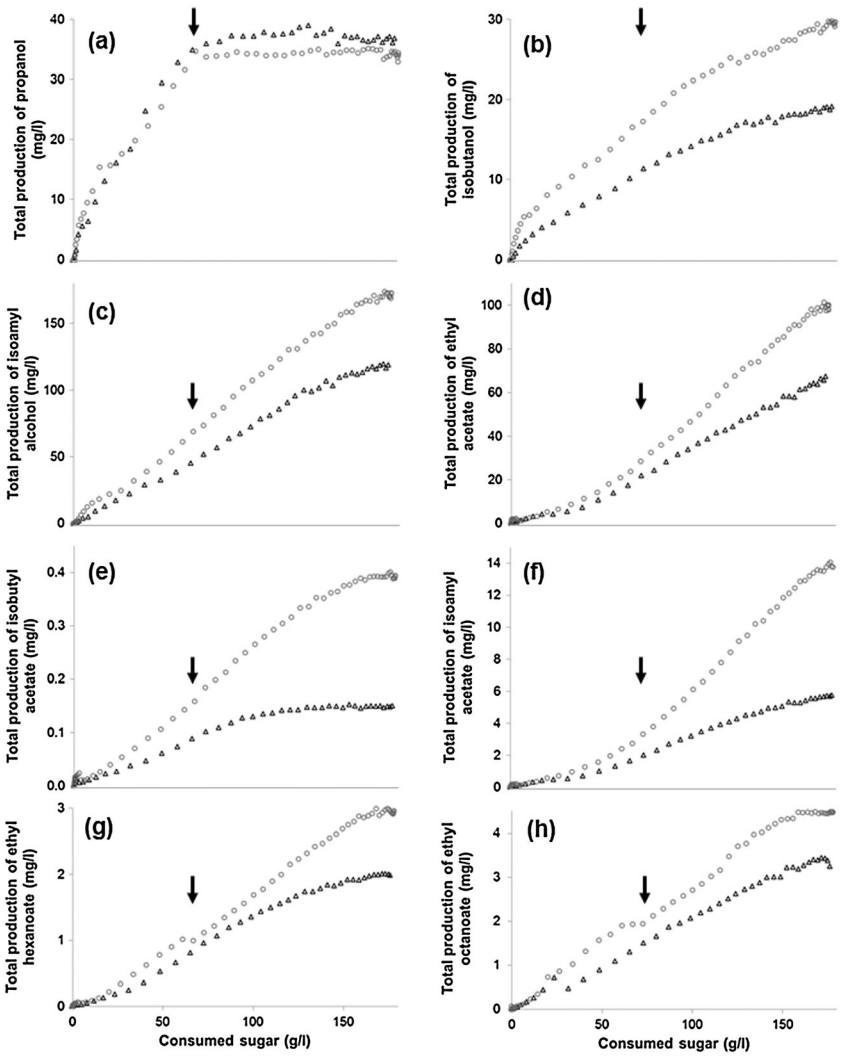


Figure 1. Total production of: (a) propanol; (b) isobutanol; (c) isoamyl alcohol; (d) ethyl acetate; (e) isobutyl acetate; (f) isoamyl acetate; (g) ethyl hexanoate; and (h) ethyl octanoate by EC1118 (▲) and ECA5 (○) in natural must as a function of sugar consumption. The growth phase ends when 67 g/l sugars are consumed, after 64 h for EC1118 and 80 h for ECA5, and is indicated by an arrow

synthesis may be considered as a metabolic indicator of the flux through the PP pathway. The greater difference in the production of 2-phenylethanol between the two strains during the growth phase is consistent with the activity of the PP pathway being maximal during this phase. The PP pathway indeed has a major role in producing NADPH and precursors for biomass synthesis.

In parallel, an inverse relationship was observed between the final production of 2-phenylethanol and that of acetic acid (determined by the measurement of volatile acidity; Table 1). As already shown by ^{13}C flux analysis (Cadiere *et al.*, 2011), the reduced acetate excretion by ECA5 is mainly due to more acetate being used for lipid biosynthesis, which is a NADPH-consuming pathway.

Isobutanol and isoamyl alcohol

More isobutanol and isoamyl alcohol were produced by ECA5 than EC1118 in natural must (Table 1), as observed by Cadiere *et al.* (2011, 2012). For each higher alcohol, the start and end of synthesis, the percentage production during the growth phase and the percentage of sugar consumed at which the production rate was maximal

Copyright © 2014 John Wiley & Sons, Ltd.

DOI: 10.1002/yea

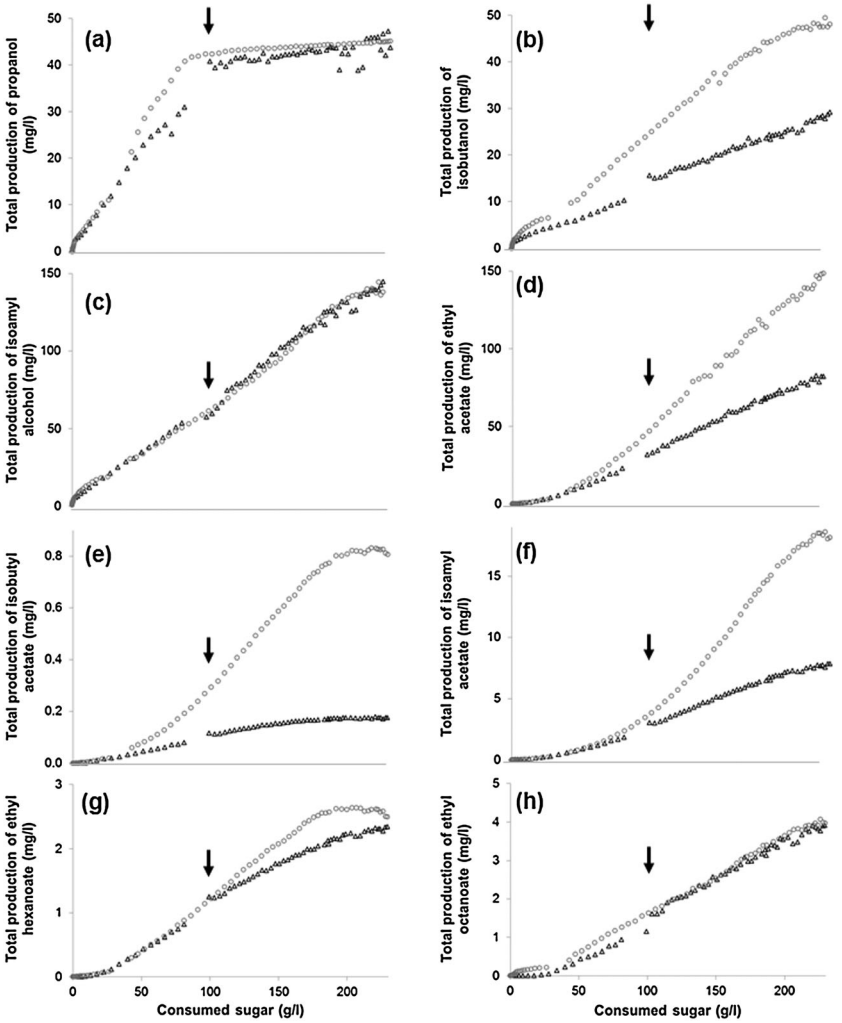


Figure 2. Total production of: (a) propanol; (b) isobutanol; (c) isoamyl alcohol; (d) ethyl acetate; (e) isobutyl acetate; (f) isoamyl acetate; (g) ethyl hexanoate; and (h) ethyl octanoate by EC1118 (▲) and ECA5 (○) in synthetic medium as a function of sugar consumption. The growth phase ends when 91 g/l sugars are consumed, after 70 h for EC1118 and 100 h for ECA5, and is indicated by an arrow

were all similar for the two strains (Table 2a). However, the maximum value of the rate of synthesis and the production yield during the stationary phase were higher for ECA5 (Table 3a). These findings indicate that the greater overall production of these two volatile molecules by ECA5 is not due to a modification of the chronology of synthesis, but rather to higher conversion of α-keto acids into their corresponding higher alcohols (Figure 3a, b). Possibly the activities or affinities of the enzymes involved in the production of isobutanol and isoamyl alcohol from their α-keto acid precursors are higher in the evolved than the parental strain. Also, the pools of α-keto acids and the distribution of their fluxes toward the synthesis of amino acids and the production of higher alcohols may differ between the two strains.

In synthetic must more isobutanol was produced by ECA5, whereas the production of isoamyl alcohol was comparable for the two strains (Table 1, Figure 2b, c). Differences in the kinetic profiles were also noted. The production rate of isobutanol peaked at the same percentage of sugar consumed for the two strains (Table 2b). By contrast, for isoamyl alcohol, the percentage of sugar consumed at which the production rate was maximal was

Copyright © 2014 John Wiley & Sons, Ltd.

DOI: 10.1002/yea

Table 3. Production yields of fermentative aroma compounds from sugars during the stationary phase; maximum value of the production rate of the different volatile compounds for in natural (a) and synthetic (b) media

(a)

Natural must		Propanol	Isobutanol	Isoamyl alcohol	Isobutyl acetate	Isoamyl acetate	Ethyl acetate	Ethyl hexanoate	Ethyl octanoate
Production yield (mg/g)	EC1118	–	9.67e-2	7.12e-1	1.14e-3	1.02e-1	4.32e-1	1.30e-2	2.06e-2
	ECA5	–	1.34e-1	1.02	2.55e-3	3.75e-1	6.60e-1	1.79e-2	2.85e-2
	Difference	–	39%	43%	124%	268%	53%	38%	38%
Maximum rate (μg/l/h)	EC1118	1004	302	1659	3.31	90.3	962	36.8	46.1
	ECA5	988	341	2025	5.29	170	1120	31.6	46.8
	Increase	–2%	13%	22%	60%	88%	16%	–14%	2%

(b)

Synthetic medium		Propanol	Isobutanol	Isoamyl alcohol	Isobutyl acetate	Isoamyl acetate	Ethyl acetate	Ethyl hexanoate	Ethyl octanoate
Production yield (mg/g)	EC1118	–	1.22e-1	6.17e-1	7.65e-4	3.85e-2	4.00e-1	1.33e-2	1.93e-2
	ECA5	–	2.21e-1	6.12e-1	5.14e-3	1.13e-1	7.68e-1	1.66e-2	1.87e-2
	Difference	–	81%	-1%	572%	194%	92%	25%	-3%
Maximum rate (μg/l/h)	EC1118	1012	300	1272	2.61	79.9	851	31.5	42.8
	ECA5	1083	594	1243	12.3	246	1735	38.4	41.1
	Increase	7%	99%	–2%	371%	208%	104%	22%	–4%

much lower for EC1118 than ECA5 (Table 2b). These findings indicate that environmental parameters affect the synthesis of these two higher alcohols by the two strains differently. One or several components of the synthetic medium may inhibit the synthesis of isoamyl alcohol by ECA5, without modifying that of isobutanol. One of the major differences between the natural and synthetic media is the lipid source: phytosterols in natural must and ergosterol in synthetic medium. To test whether the nature of the lipid source contributed to the regulation of the synthesis of these compounds, we used synthetic media containing either ergosterol or a mixture of phytosterols (β-sitosterol 90%, campesterol 5% and stigmasterol 5%) as the lipid source: we determined the final concentrations of higher alcohols in cultures of the two strains in these media. Final concentrations of isobutanol were higher for ECA5 than EC1118 for the two lipid sources (Table 4). By contrast, isoamyl alcohol production by the evolved strain was higher than that of the parental strain only in the medium containing phytosterols; in the presence of ergosterol, the final contents of isoamyl alcohol were similar for the two strains. These observations indicate that the production pathways of isobutanol and isoamyl alcohol are differently affected by the nature of the sterols available in the culture.

Production of esters

Acetates of higher alcohols

The four acetates of higher alcohols studied in this work (ethyl, isobutyl, isoamyl and phenyl acetates) were systematically produced in greater quantities by ECA5 than EC1118, as observed in other grape musts (Cadiere *et al.*, 2011, 2012). The overall production, the production yield during the stationary phase and the maximal value of the production rate were higher for the evolved than the parental strain under both fermentation conditions (Tables 1, 3a, b). Additionally, the difference in production of these esters between the two strains was larger than that of their corresponding higher alcohol precursors (Table 1). This suggests that the activity of the alcohol acetyl transferases (Atf1p and Atf2p) responsible for the bioconversion of higher alcohols into esters (Saerens *et al.*, 2010) might be higher in the evolved strain.

Copyright © 2014 John Wiley & Sons, Ltd.

DOI: 10.1002/yea

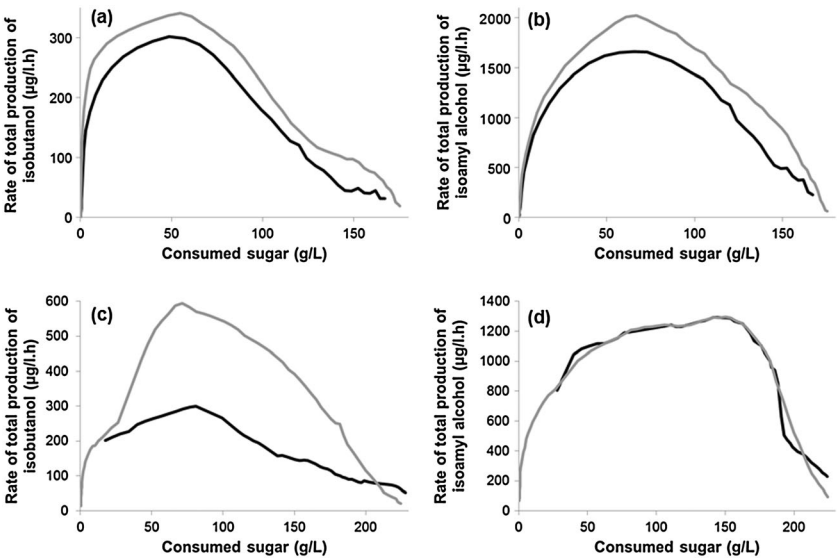


Figure 3. Rate of total production of (a) isobutanol and (b) isoamyl alcohol in natural must. Rate of total production of (c) isobutanol and (d) isoamyl alcohol in synthetic medium. On each graph, data for EC1118 (black) and ECA5 (grey) are presented

Table 4. Final concentration of higher alcohols in synthetic musts (in the liquid phase) containing either 3.75 mg/l ergosterol or phytosterols as the lipid source

		Isobutanol (mg/l)	Isoamyl alcohol (mg/l)
Ergosterol	EC1118	55.2	159
	ECA5	78.4	165
	Difference	42%	3%
Phytosterols	EC1118	40.5	105
	ECA5	60.3	134
	Difference	49%	27%

Alternatively, the coordinated increased production of acetates of higher alcohols may have been due to a higher availability of acetyl-CoA.

For ethyl acetate and isoamyl acetate, differences in the level of synthesis between the strains were coupled to differences in the chronology of production. Indeed, although the timings of the start and end of synthesis were similar for the two strains (Table 2a, b), the production profiles differed (Figure 4a–d): the rates of production of these two molecules peaked at different percentages of sugar consumed for the two strains (Table 2a, b). These observations suggest differences in the regulation of the synthesis of the acetates of higher alcohols between EC1118 and ECA5.

Ethyl esters

Greater production of ethyl hexanoate and ethyl octanoate by ECA5 was not systematic, but dependent on the fermentation medium (Table 1). A previous study (Cadiere *et al.*, 2012) comparing final production between EC1118 and ECA5 on four natural grape musts reported greater production by ECA5 on three musts, whereas the final concentrations were identical for the two strains in one must. This indicates that these ethyl esters cannot be used to differentiate between ECA5 and its parental strain under all fermentation conditions.

Although the overall production of ethyl esters was not necessarily different between strains EC1118 and ECA5 (Tables 1, 3a, b), the

Copyright © 2014 John Wiley & Sons, Ltd.

DOI: 10.1002/yea

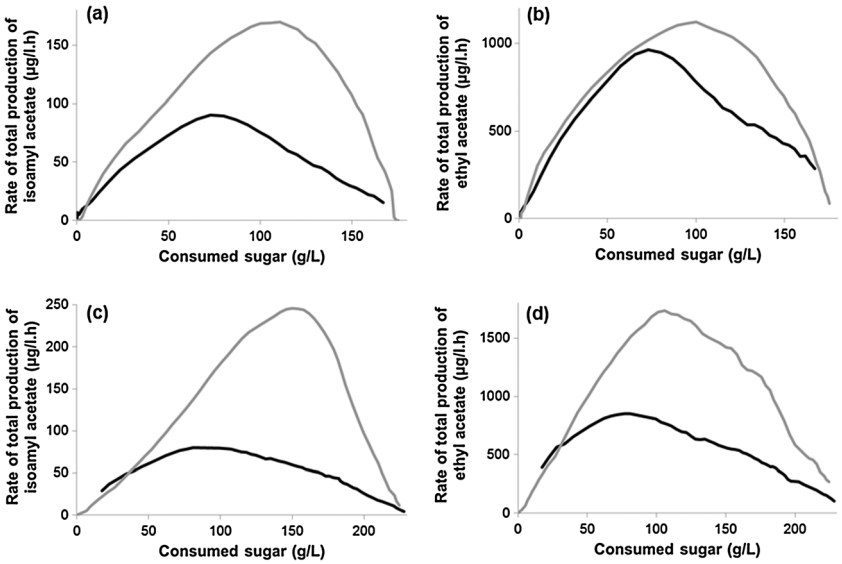


Figure 4. Rate of total production of (a) isoamyl acetate and (b) ethyl acetate in natural must. Rate of total production of (c) isoamyl acetate and (d) ethyl acetate in synthetic medium. On each graph, data for EC1118 (black) and ECA5 (grey) are presented

corresponding kinetic profiles were very different for the two strains on the two musts (Figure 5a–d). Indeed, the regulation of the synthesis of these molecules appeared to be very different between the two strains. Ethyl esters are produced through lipid metabolism, so differences in their regulation presumably reflect changes in the regulation of lipid synthesis in the evolved strain.

ECA5 produces four times as much lipid as EC1118, consistent with such a modification of lipid metabolism (Cadiere *et al.*, 2011). The different regulation of lipid metabolism in ECA5

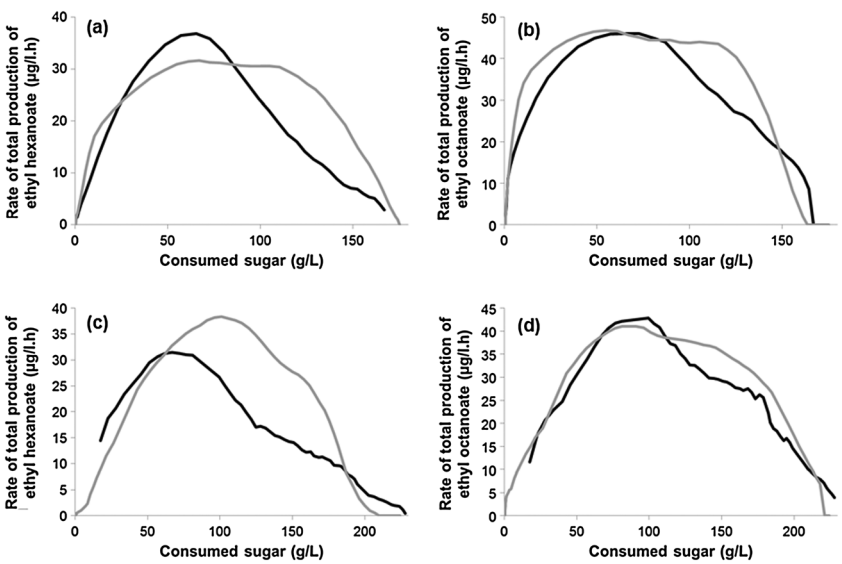


Figure 5. Rate of total production of (a) ethyl hexanoate and (b) ethyl octanoate in natural must. Rate of total production of (c) ethyl hexanoate and (d) ethyl octanoate in synthetic medium. On each graph, data for EC1118 (black) and ECA5 (grey) are presented

Copyright © 2014 John Wiley & Sons, Ltd.

DOI: 10.1002/yea

may be the consequence of the management of the pool of redox co-factors. Indeed, the NADPH surplus generated by the greater flux through the PP pathway in ECA5 than EC1118 may be used for fatty acid synthesis, which consumes large quantities of NADPH (Cadiere *et al.*, 2011).

Conclusion

In this study we used an online monitoring system to compare the kinetic profiles of synthesis of various fermentative aroma compounds between the evolved strain ECA5 and its ancestral strain EC1118 in two culture media. This original tool allowed us to observe substantial differences in the regulation of the synthesis of several volatile compounds. One key finding was that 2-phenylethanol production was systematically higher by ECA5 than EC1118, and particularly during the growth phase. This finding is entirely consistent with the strategy used to obtain the evolved strain. Indeed, this higher alcohol is a degradation product of phenylalanine, an amino acid produced in the PP pathway, which was the pathway targeted for increased flux by the adaptive evolution approach. Comparative analysis of the chronology of synthesis of aroma also revealed differences in the regulation of the synthesis of acetates of higher alcohols and ethyl esters, and systematically greater production of acetates of higher alcohols. The strain ECA5 has been reported to have reduced acetate production as the result of an increase in carbon flux from acetate towards acetyl-CoA and lipid synthesis (Cadiere *et al.*, 2011). Here, we report findings highlighting substantial differences in the regulation of metabolism in ECA5 and the ancestral strain, which presumably result from extensive reshaping of the central metabolism. Adaptive evolution can lead to large-scale rewiring of gene-regulatory networks (Dragosits and Mattanovich, 2013). Thus, in-depth analysis of the regulation of the synthesis of aroma compounds according to various fermentative parameters (temperature, nitrogen and lipid or oxygen availability) may help to elucidate the metabolic specificities of ECA5. Moreover, further insights into ECA5 metabolism might be obtained by combining gene expression analysis with dynamic study of the synthesis of aroma compounds.

Acknowledgements

We thank Magaly Angenieux and Christian Picou for technical assistance. The research generating these results was supported by the INRA Sys-Aromes programme and by ***BIOFLAVOUR*** Cost Action (Grant No. FA0907).

References

Bely M, Sablayrolles JM, Barre P. 1990. Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions. *J Ferment Bioeng* **70**: 246–252.

Boulton RB, Singleton VL, Bisson LF, Kunkee RE. 1995. Principles and Practices of Winemaking. Chapman & Hall: New York.

Cadiere A, Ortiz-Julien A, Camarasa C, Dequin S. 2011. Evolutionary engineered *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains with increased *in vivo* flux through the pentose phosphate pathway. *Metab Eng* **13**: 263–271.

Cadiere A, Aguera E, Caille S, *et al.* 2012. Pilot-scale evaluation the enological traits of a novel, aromatic wine yeast strain. *Food Microbiol* **32**: 332–337.

Camarasa C, Sanchez I, Brial P, *et al.* 2011. Phenotypic landscape of *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation: evidence for origin-dependent metabolic traits. *Plos One* **6**: e25147.

Dragosits M, Mattanovich D. 2013. Adaptive laboratory evolution – principles and applications for biotechnology. *Microb Cell Fact* **12**: 64.

Kutyna DR, Varela C, Stanley GA, *et al.* 2012. Adaptive evolution of *Saccharomyces cerevisiae* to generate strains with enhanced glycerol production. *Appl Microbiol Biotechnol* **93**: 1175–1184.

Lee SJ, Noble AC. 2003. Characterisation of odor-active compounds in Californian Chardonnay wines using GC–olfactometry and GC–mass spectrometry. *J Agr Food Chem* **51**: 8036–8044.

Molina AM, Guadalupe V, Varela C, *et al.* 2009. Differential synthesis of fermentative aroma compounds of two related commercial wine yeast strains. *Food Chem* **117**: 189–195.

Morakul S, Mouret JR, Nicolle P, *et al.* 2011. Modelling of the gas–liquid partitioning of aroma compounds during wine alcoholic fermentation and prediction of aroma losses. *Process Biochem* **46**: 1125–1131.

Morakul S, Mouret JR, Nicolle P, *et al.* 2013. A dynamic analysis of higher alcohol and ester release during winemaking fermentations. *Food Bioprocess Technol* **6**: 818–827.

Mouret JR, Morakul S, Nicolle P, *et al.* 2012. Gas–liquid transfer of aroma compounds during winemaking fermentations. *LWT- Food Sci Technol* **49**: 238–244.

Mouret JR, Perez M, Angenieux M, *et al.* 2014a. Online-based kinetic analysis of higher alcohol and ester synthesis during winemaking fermentations. *Food Bioprocess Technol* **7**: 1235–1245.

Mouret JR, Camarasa C, Angenieux M, *et al.* 2014b. Kinetic analysis and gas–liquid balances of the production of fermentative aromas during winemaking fermentations: effect of assimilable nitrogen and temperature. *Food Res Int* **62**: 1–10.

Copyright © 2014 John Wiley & Sons, Ltd.

Saerens SMG, Delvaux FR, Verstrepen KJ, Thevelein JM. 2010. Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Biotechnol* **3**: 165–177.

Swiegers JH, Bartowsky EJ, Henschke PA, Pretorius IS. 2005. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Aust J Grape Wine R* **11**: 139–173.

Torija MJ, Beltran G, Novo M, *et al.* 2003. Effects of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine. *Int J Food Microbiol* **85**: 127–136.

Tilloy V, Ortiz-Julien A, Dequin S. 2014. Reduction of ethanol yield and improvement of glycerol formation by adaptive evolution of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* under hyperosmotic conditions. *Appl Environ Microbiol* **80**: 2623–2632.

Ugliano M, Travis B, Francis IL, Henschke P. 2010. Volatile composition and sensory properties of Shiraz wines as affected by nitrogen supplementation and yeast species: rationalizing nitrogen modulation of wine aroma. *J Agr Food Chem* **58**: 12417–12425.

Copyright © 2014 John Wiley & Sons, Ltd.

DOI: 10.1002/yea

Résumé : Les arômes fermentaires (alcools supérieurs, esters) jouent un rôle important dans le profil organoleptique des vins jeunes. Leur production dépend à la fois de la souche de levure utilisée et des paramètres environnementaux. Pour comprendre le rôle de trois facteurs clés (température, azote, lipides) sur la production des arômes fermentaires, nous avons réalisé une étude comparative entre une souche évoluée aromatique Affinity™ ECA5 et sa souche ancestrale Lalvin EC1118®. Dans un premier temps, les effets combinés des trois paramètres environnementaux ont été étudiés grâce à un plan expérimental de Box-Behnken. L'azote est le facteur ayant la plus grande influence sur la majorité des composés volatils; cependant son effet est différent selon la molécule ciblée et les interactions entre facteurs sont importantes. Par ailleurs, si les deux souches répondent dans le même sens aux changements de conditions de fermentation, les intensités de réponse sont très différentes. Pour avancer dans la compréhension des mécanismes mis en jeu et en particulier dans l'analyse de l'interaction azote / lipides, nous avons combiné des études de suivi cinétique précis de la production des arômes fermentaires et une approche transcriptomique. Ces études ont révélé des différences entre les deux souches dans la chronologie de formation des arômes, suggérant des modifications dans la régulation de leur synthèse. En particulier, le rendement de conversion entre alcools supérieurs et esters d'acétate est largement supérieur chez Affinity™ ECA5, mais diminue fortement après addition de phytostérols, en lien avec une répression des gènes de la voie de synthèse des stérols. Ces résultats montrent une gestion différente des lipides par la souche évoluée et suggèrent qu'une plus grande disponibilité en acétyl-CoA pourrait être à l'origine des propriétés aromatiques de cette souche. Enfin, une approche quantitative basée sur la filiation isotopique de sources d'azote marquées ^{13}C a été réalisée. Cette étude confirme le rôle clé de l'acétyl-CoA dans une gestion différentielle du pool d'α-cetoacides responsable de la surproduction des alcools supérieurs chez Affinity™ ECA5. Globalement, ce travail a permis d'identifier les paramètres les plus efficaces pour orienter le métabolisme fermentaire vers la production d'arômes ainsi que certains mécanismes impliqués. Il a également permis de mieux caractériser le métabolisme de la souche évoluée Affinity™ ECA5. Les connaissances acquises constituent une avancée importante pour une amélioration de la gestion de la nutrition en fermentation œnologique.

Titre : Impact des paramètres environnementaux sur la synthèse des arômes fermentaires par *Saccharomyces cerevisiae* en fermentation œnologique

Mots clés : *S. cerevisiae*, arômes fermentaires, azote, phytostérols, température, fermentation œnologique, plan de Box-Behnken, suivi en ligne, filiation isotopique

Abstract: Fermentative aromas (higher alcohols, esters) have a major role in the organoleptic profile of young wines. Their production depends on both the used yeast strain and environmental parameters. To better understand the role of three key factors (temperature, nitrogen, lipids) on the synthesis of fermentative aromas, we compared an aromatic evolved strain Affinity™ ECA5 and its parent strain Lalvin EC1118®. First, the combined effects of these three parameters were investigated through an experimental Box-Behnken design. Nitrogen greatly impacted the majority of the volatile compounds but differently depending on the targeted molecule and in interaction with the other factors. Overall, both strains showed similar responses to changes in fermentation conditions but with different intensities. To improve the understanding of the involved mechanism, particularly in the study of nitrogen / lipids interaction, several approaches were combined. A precise on-line monitoring of the production kinetics of fermentative aromas coupled with transcriptomic analysis revealed differences between the two strains in the chronology of aroma synthesis, suggesting changes in the regulation of their production. In particular, the conversion yield between a higher alcohol and its acetate ester differed greatly between the two strains. We have shown that this difference was due to a different lipid management by the strain Affinity™ ECA5. Finally, a quantitative approach based on the isotopic filiation of ^{13}C labelled nitrogen sources was performed. This study confirms the key role of acetyl-CoA in a differential management of α-ketoacid pool responsible for the overproduction of higher alcohols by Affinity ™ ECA5.Overall, this project identified the most effective parameters to guide the fermentative metabolism toward the production of aromas and to better understand mechanisms involved. It also better characterized the metabolism of the evolved strain Affinity™ ECA5. These results are crucial to improve the management of nutrition in wine fermentation.

Title: Impact of environmental parameters on the synthesis of fermentative aromas by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation

Keywords: S. *cerevisiae*, fermentative aromas, nitrogen, phytosterols, temperature, wine fermentation, Box-Behnken design, online monitoring, isotopic filiation

Résumé : Les arômes fermentaires (alcools supérieurs, esters) jouent un rôle important dans le profil organoleptique des vins jeunes. Leur production dépend à la fois de la souche de levure utilisée et des paramètres environnementaux. Pour comprendre le rôle de trois facteurs clés (température, azote, lipides) sur la production des arômes fermentaires, nous avons réalisé une étude comparative entre une souche évoluée aromatique Affinity™ ECA5 et sa souche ancestrale Lalvin EC1118®. Dans un premier temps, les effets combinés des trois paramètres environnementaux ont été étudiés grâce à un plan expérimental de Box-Behnken. L'azote est le facteur ayant la plus grande influence sur la majorité des composés volatils; cependant son effet est différent selon la molécule ciblée et les interactions entre facteurs sont importantes. Par ailleurs, si les deux souches répondent dans le même sens aux changements de conditions de fermentation, les intensités de réponse sont très différentes. Pour avancer dans la compréhension des mécanismes mis en jeu et en particulier dans l'analyse de l'interaction azote / lipides, nous avons combiné des études de suivi cinétique précis de la production des arômes fermentaires et une approche transcriptomique. Ces études ont révélé des différences entre les deux souches dans la chronologie de formation des arômes, suggérant des modifications dans la régulation de leur synthèse. En particulier, le rendement de conversion entre alcools supérieurs et esters d'acétate est largement supérieur chez Affinity™ ECA5, mais diminue fortement après addition de phytostérols, en lien avec une répression des gènes de la voie de synthèse des stérols. Ces résultats montrent une gestion différente des lipides par la souche évoluée et suggèrent qu'une plus grande disponibilité en acétyl-CoA pourrait être à l'origine des propriétés aromatiques de cette souche. Enfin, une approche quantitative basée sur la filiation isotopique de sources d'azote marquées ^{13}C a été réalisée. Cette étude confirme le rôle clé de l'acétyl-CoA dans une gestion différentielle du pool d'α-cetoacides responsable de la surproduction des alcools supérieurs chez Affinity™ ECA5. Globalement, ce travail a permis d'identifier les paramètres les plus efficaces pour orienter le métabolisme fermentaire vers la production d'arômes ainsi que certains mécanismes impliqués. Il a également permis de mieux caractériser le métabolisme de la souche évoluée Affinity™ ECA5. Les connaissances acquises constituent une avancée importante pour une amélioration de la gestion de la nutrition en fermentation œnologique.

Titre : Impact des paramètres environnementaux sur la synthèse des arômes fermentaires par *Saccharomyces cerevisiae* en fermentation œnologique

Mots clés : *S. cerevisiae*, arômes fermentaires, azote, phytostérols, température, fermentation œnologique, plan de Box-Behnken, suivi en ligne, filiation isotopique

Abstract: Fermentative aromas (higher alcohols, esters) have a major role in the organoleptic profile of young wines. Their production depends on both the used yeast strain and environmental parameters. To better understand the role of three key factors (temperature, nitrogen, lipids) on the synthesis of fermentative aromas, we compared an aromatic evolved strain Affinity™ ECA5 and its parent strain Lalvin EC1118®. First, the combined effects of these three parameters were investigated through an experimental Box-Behnken design. Nitrogen greatly impacted the majority of the volatile compounds but differently depending on the targeted molecule and in interaction with the other factors. Overall, both strains showed similar responses to changes in fermentation conditions but with different intensities. To improve the understanding of the involved mechanism, particularly in the study of nitrogen / lipids interaction, several approaches were combined. A precise on-line monitoring of the production kinetics of fermentative aromas coupled with transcriptomic analysis revealed differences between the two strains in the chronology of aroma synthesis, suggesting changes in the regulation of their production. In particular, the conversion yield between a higher alcohol and its acetate ester differed greatly between the two strains. We have shown that this difference was due to a different lipid management by the strain Affinity™ ECA5. Finally, a quantitative approach based on the isotopic filiation of ^{13}C labelled nitrogen sources was performed. This study confirms the key role of acetyl-CoA in a differential management of α-ketoacid pool responsible for the overproduction of higher alcohols by Affinity ™ ECA5.Overall, this project identified the most effective parameters to guide the fermentative metabolism toward the production of aromas and to better understand mechanisms involved. It also better characterized the metabolism of the evolved strain Affinity™ ECA5. These results are crucial to improve the management of nutrition in wine fermentation.

Title: Impact of environmental parameters on the synthesis of fermentative aromas by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation

Keywords: S. *cerevisiae*, fermentative aromas, nitrogen, phytosterols, temperature, wine fermentation, Box-Behnken design, online monitoring, isotopic filiation