

# THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE MONTPELLIER SUPAGRO

En sciences pour l'ingénieur – Biotechnologie et Microbiologie

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

Portée par l'Université de Montpellier

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

## Production d'arômes non-conventionnels par les levures au cours de la fermentation œnologique

Présentée par Guillaume BERGLER

Le 17 décembre 2020

Sous la direction de Carole CAMARASA

Devant le jury composé de

M. Gilles de REVEL, Professeur, Institut des Sciences de la Vigne et du Vin,  
Université de Bordeaux, France

M. Benoit DIVOL, Associate Professor, Institute for Wine Biotechnology,  
Université de Stellenbosch, Afrique du Sud

Mme Axelle CADIERE, Maitre de Conférences, Université de Nîmes, France

Mme Carole CAMARASA, Directrice de recherche, INRAE Montpellier, France

Mme Audrey BLOEM, Maitre de Conférences, Université de Montpellier, France

M. Michel BRULFERT, Manager Recherche & Innovation, Martell, Cognac, France

Mme Anne ORTIZ-Julien, Responsable R&D Levures et nutriments,  
Lallemand SAS, Blagnac, France

Président du jury

Rapporteur

Examinatrice

Directrice de thèse

Co-encadrante de thèse

Invité

Invitée



UNIVERSITÉ  
DE MONTPELLIER





*« Vous savez, que si vous travaillez dur, les rêves se réalisent. Se lever tôt et se coucher tard pour travailler dur et travailler même quand vous êtes fatigué(es) et que vous n'avez pas l'envie, c'est ça en fait le rêve. Ce n'est pas la destination mais le voyage qui compte. »*

**Kobe Bryant**



## Remerciements

Merci à l'UMR SPO de m'avoir accueilli pour effectuer cette thèse CIFRE, réalisée avec le groupe Pernod Ricard, et la société Lallemand.

Je remercie **Gilles de REVEL** et **Benoît DIVOL**, rapporteurs, pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse, surtout pendant cette période un peu particulière. Merci également à **Axelle CADIÈRE**, examinatrice, d'avoir montré de l'intérêt pour ce travail et pour avoir accepté de faire partie du jury. Merci également à **Stéphanie HEUX** et **Christophe NGUYEN-THE** pour avoir accepté de participer aux comités de thèse.

Merci à **Carole**, la « Mireille Mathieu de Vinassan » pour ton encadrement durant ces 3 ans. Je te remercie pour tous tes conseils distillés avec sagesse (sauf quand tu m'interdis les beignets de pastèque sous la hotte). Merci d'avoir partagé avec moi tes recettes de pâtisserie, ton amour de Mike Brant (même si Audrey disait que c'était l'époque de sa grand-mère), mais aussi de ce génie de Demis Roussos. Merci pour cette visite à Thuir où on a pu partager notre affection pour la Suze, la vraie boisson des héros. J'ai failli te remercier pour la gentillesse que tu montrais vis-à-vis de Navette, mais en fait ce n'était pas à propos. PS : Ne t'en fais pas, pour une audoise, tu n'es pas tellement une tête plate !

Merci à **Benoît COLONNA-CECCALDI** et **Michel BRULFERT**, qui m'ont donné l'opportunité d'effectuer ce travail au sein du groupe Pernod Ricard, ayant une saveur particulière pour le marseillais que je suis. Merci pour vos conseils éclairés durant ces années. Merci à **Anne ORTIZ-JULIEN** pour vos conseils avisés au cours des diverses réunions, et pour votre enthousiasme.

Merci à **Audrey**, la Pierre Richard de Bouzac (oui c'est Bonzac je sais !). Merci pour ta gentillesse extrême, tes conseils toujours plus avisés les uns que les autres. Merci pour ta bonne humeur et ta disponibilité. Je pense que tu étais l'encadrante dont j'avais besoin, qui m'a permis d'avoir un juste équilibre entre autonomie et recadrage quand je partais un peu loin. Merci pour ce voyage à Cognac, ton soutien (ou pas) quand je prenais une vague de jus de raisin (et l'Ugni blanc, ça tâche bien, quand c'est accompagné de coquilles d'escargots), les crêpes de ta maman, la raclette (même si Jean-Phi ne mange pas de fromage), et pour cette escapade à Bordeaux dont ma voiture se souvient encore. J'espère que ces 3 ans à m'encadrer n'entraveront pas ton envie de gérer d'autres thèses. En tous cas, je ne peux que le souhaiter à tes futurs doctorants.

Merci à **Thomas**, le sanglier des Corbières, pour tous tes conseils durant ces 3 ans de thèse, notamment durant l'année au cours de laquelle ce bureau 114a a été partagé. Merci aussi pour ta bonne humeur, ton aide précieuse, les séances de sport, ta poésie légendaire, ton agilité au basket de bureau qui me poussait à m'améliorer, et bien sûr, merci pour ta pugnacité à la TTFL (tu jouais le classement perso, on le sait tous, mais tu rapportais des points à SPOKC). Merci pour tout ce que tu as pu m'apprendre pendant ta présence au labo, ça me restera utile avec certitude. Et je n'oublie pas que tu as été à l'origine de mon initiation au quad à Cadaquès, qui m'a littéralement fait bouffer de la poussière.

Merci à **Stéphanie**, pour tes conseils durant toute cette thèse, pour ton aide continue, pour m'avoir relayé lors des fameuses injections nocturnes, pour ne pas avoir pris de photos

compromettantes lors de ton arrivée dans ce bureau un matin de décembre post-patinoire qui t'a amenée à me voir dans un petit duvet, affaires en train de sécher. Merci aussi de m'avoir permis de ne pas avoir fait de scènes de jalousie lorsque tu avais connaissance des nuits passées chez vous en ton absence sud-africaine. Bien sûr, merci d'être une taulière de SPOKC, malgré tes premiers choix, que l'on peut qualifier de plus que douteux (Mikhayliuk c'est qui ? Ça fait 10 ans que je regarde la NBA, et j'en sais rien !). Et merci d'avoir pris soin de ma fille pendant mon séjour estival.

Merci à **Pauline**, pour ton aide importante durant les 2 ans partagés dans ce labo. Merci pour tes conseils toujours précieux, pour ta gentillesse et pour avoir réussi à gérer ce labo 124 malgré ma présence dans les locaux, ça ne devait pas être facile tous les jours je pense. Merci pour les nombreuses discussions tardives dans le bureau du 124 (quand la porte était ouverte avec drapeau vert seulement). Merci également pour tes conseils de rythmique musicale, de danse (entrechats et grand jeté n'ont plus de secrets pour moi !), et pour ces sessions de duo musical. Et bien sûr, merci d'avoir eu pitié de la team SPOKC et de l'avoir rejointe pour ce qui s'annonçait être la saison des records, et qui s'est avérée être une saison historique, mais pour d'autres raisons.

Merci à **Manu**, le « Mandanda du jeudi soir », pour ta bonne humeur, pour tes petites blagues grivoises lors de nos trajets pour le futsal (appelé également « La terre de nos exploits »), pour ta gentillesse, ton accueil lors de ce sombre épisode neigeux simultané d'un match horrible de l'OM. Merci aussi pour m'avoir permis d'avoir quelqu'un avec qui célébrer les buts de Rolando, Mitroglou et du chouchou Radonjic, en n'oubliant pas d'insulter tous les autres clubs (le fair-play c'est bien, mais pour les autres, et pas au foot). Merci pour ta régularité en TTFL. Et surtout, attention aux éléphants roses lorsque tu sors du meilleur virage de France.

Merci à **Jean-Marie** pour l'accueil impeccable au sein de l'UMR, ainsi que pour ta disponibilité pour répondre à des questions diverses et variées, ainsi que pour tes propositions toujours plus judicieuses les unes que les autres. Un seul point négatif : il faudra songer à supporter un vrai club de rugby, et oublier le MHR.

Merci à **Pascale**, la responsable du labo 124, pour ton aide et ton soutien au cours de ces 3 ans (et quelques mois, en bonus). On aura bien rigolé pendant ces nombreux mois, tout en n'oubliant de travailler bien sûr ! Continue à bien t'occuper des doctorants comme tu t'es occupée de moi, et le labo continuera à aller comme sur des roulettes. Sans toi, la thèse n'aurait clairement pas eu la même saveur.

Un immense merci à **Christian**, qui, pendant ces 3 ans, a été d'une aide indispensable au déroulement de ma thèse. Sans toi, on sait tous que tout le monde aurait bien plus de mal à faire produire de l'alcool à ces levures. Je ne te remercie pas pour les fermenteurs que ton robot m'a fracassé le jour de mon anniversaire, n'abusons pas non plus. Plus sérieusement, merci pour ta réactivité lorsque des (nombreux) soucis sont arrivés, pour ta gentillesse extrême, et ta disponibilité malgré ton travail acharné. Merci pour avoir rendu ces 3 ans bien plus agréables. On aura bien rigolé quand même ! Bon courage pour la suite, et pour ta future retraite. Promis, on ira ensemble au Lady Dallas, on a une carte fidélité premium à aller rentabiliser.

Comment ne pas remercier **Marc**, qui aura été extrêmement important pendant ces 3 ans. Merci d'avoir « teaché » le robot pour qu'il arrête d'envoyer mes tubes contre le mur. Merci pour ta disponibilité, pour ton aide, pour tes conseils de rythmique musicale, pour tes concerts tous aussi bien les uns que les autres (Chuck Berry, très au-dessus !). Merci également pour ta bonne humeur lors de ces pauses « thé ». Bon vent pour ta retraite à venir, même si t'as encore un peu de temps. Bien sûr, tu peux nous rejoindre avec Christian à la Jonquera quand tu veux ! On pourra dire que c'est un team building du PTferm, ça passera.

Merci à **Vincent**, catalan de son état, pour les 3 ans passés, notamment pour ce petit voyage à Logroño, et pour la visite de caves plutôt que la participation à des événements moins intéressants. Merci pour les pauses thé humoristiques (je me rappellerai longtemps de la dame avec l'absence de second degré), et bien sûr pour la référence à Nana Mouskouri pendant ce fameux congrès, qui m'a relativement détendu.

Merci à **Jean-Roch**, le chef de la bande de joyeux lurons qui composent l'équipe FLAM. Merci de m'avoir conseillé lorsque je venais te voir à des heures un peu tardives, mais également pour m'avoir éclairé de nombreuses fois en début de thèse. Bien sûr, merci car je pouvais parler d'un vrai club de rugby avec toi, donc pas du MHR ni de Castres, ça change.

Merci à toute l'équipe de Pech Rouge, **Evelyne, Philippe, Yannick et Mélanie** qui m'ont aidé pendant cet épisode d'inondation simultanée de la manip répondant au doux nom de SEQTAR, m'ont apporté des solutions lorsque la situation le demandait (et elle le demandait souvent), et bien sûr pour leur bonne humeur et leur gentillesse durant ce séjour court, mais gravé dans ma mémoire.

Merci à **Auréli**e, ô digne représentante du triangle des Bermudas, tantôt tarnasse, tantôt tête plate audoise. Merci beaucoup pour tes nombreux conseils lors des étapes de validation, sans toi, on aurait eu plus de mal, et quelque chose de bien moins rigoureux. Un grand remerciement pour ta bonne humeur, notamment dans les diverses réunions, où ma chef Audrey se donnait comme mission d'empêcher nos discussions, pourtant très constructives. Bon courage pour l'encadrement de tes thésards, tu en auras besoin (et eux aussi).

Merci à toutes celles et tous ceux qui ont permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions : **Thérèse** et **Martine** pour leur gentillesse, leur réactivité et leur aide pour les différentes fois qui le nécessitaient. Merci à **Virginie** pour ses conseils génétiques et sa gouaille typiquement marseillaise. Merci à **Faiza** pour son humour décapant et toujours mesuré, et pour son efficacité de retraitement des nombreuses analyses que je lui fournissais. Également, merci au PTV (**Valérie** et **Teddy**) pour m'avoir facilité l'accès aux appareils lorsqu'ils fonctionnaient.

Merci à **Rafa** « Cariño » pour ces années passées ensemble. Voy a escribir esta frase en español para mostrarte que puedo decir otras cosas que tonterías. Merci pour ta bonne humeur, pour ta gentillesse, pour ton aide, et pour ces petites virées au centre de Montpellier. Merci pour tes conseils sur Fortnite, même si je progresse moins vite que toi (probablement que j'y joue moins cabron ??!). On se sera bien marrés pendant ces années. Je te souhaite un bon courage pour la suite et fin de ta thèse, elle sera top !

Merci à **Rafa** « grande » pour les belles parties de rigolade offertes pendant notre séjour commun. Muchas gracias para todo, y para tu ayuda cuando yo lo necesité. J'espère que je pourrai continuer à t'humilier sur les parquets ou au street, tu vas comprendre la puissance de mon shoot « cobra » Tu as toujours répondu présent pour m'aider, et je ne l'oublierai pas. Et n'oublie jamais de ir al tigre !!

Merci à **Chloé**, grande passionnée de voyages et notamment des chutes du Niagara. Merci pour la qualité de tes 6 mois, mais ce n'est pas ça que je retiendrai le plus. Merci d'avoir grandement facilité ma première expérience d'encadrement. Je ne sais pas s'il y en aura d'autres, mais tu as confirmé mon envie d'encadrer des jeunes gens pleins d'entrain. Merci surtout pour ta bonne humeur, ta disponibilité, tes talents de conteuse, tes talents artistiques (la Pokéball tient toujours, et le cadre est en lieu sûr), pour l'invitation à Couleur Tavel, et bien sûr, ta connerie qui m'aura fait rire – souvent -, et fait peur -parfois -. Tu as dignement représenté Polytech, même si MTP, c'est pas le vrai Polytech.

Merci à **Carmen** pour ton soutien, ton énergie, ta bonne humeur, et tes expressions parfois approximatives (La Virgen de la montaña). Merci **Irene** pour ton aide, ton soutien, notamment lors d'une soirée un peu compliquée faisant suite à plusieurs nuits au labo. Merci pour avoir partagé ta passion pour ton chat, il était mignon même s'il faisait la tête.

Merci à **Léa**, la chimiste cavalière, pour avoir partagé avec moi ton adoration ultime pour les CCM, seule technique absolument indispensable. Merci pour ta bonne humeur, pour les discussions enflammées sur Koh-Lanta, et pour ton humour parfois un peu épicé.

Merci à tous mes amis de prépa d'Auzeville (putain 10 ans !) qui m'ont suivi et encouragé pendant ces années de thèse.

Bien sûr, merci à **Auréline (Comak** pour les intimes) pour ton écoute bienveillante, ta gentillesse, tes conseils avisés, tes blagues pourries, ton expertise sur les levains, pour m'avoir permis de conduire cette 2CV et participer à la fête de Montcuq. Merci également pour tes explications sur le monde apicole, et pour avoir tenté de m'expliquer les différences entre cire, miel, gelée royale et propolis. Ton aventure européenne avec le Coco est une vraie source d'inspiration pour moi. Même si je suis loin de l'aventurière que tu es devenue, tu sais que je suis très chaud pour l'expédition dont on se parle depuis quelques temps ! Malgré notre éloignement, merci d'avoir réussi à quand même être présente pendant ces 3 ans (et bien avant aussi), ça n'aurait pas eu la même saveur sinon. Désolé, j'ai pas réussi à placer le mot « pragmatique ».

Merci aux mecs de la prépa. Merci **Mika** (je ne donnerai pas tes surnoms pour ne pas me faire censurer) pour les discussions enflammées sur le sublime niveau de la L1, sur le génie de Rudi, l'endurance de Payet, et bien sûr pour ton accueil aveyronnais, les moments de cuisine (j'ai encore mal au bras pour l'aïoli) et pour le partage du trajet martiniquais. Merci à **Coinche** pour m'avoir fait parrain d'une sublime créature (la bise à **Marion**, marraine officielle de mon bébé), et potentiellement futur papa de Simba. Merci à **Christophe**, au **Geo**, à **Ventelon**, et à **Adrien** pour votre soutien et pour les franches parties de rigolade.

Merci aux filles de la prépa. Bien sûr, merci aux martiniquaises **Anaïs** et **Laura**, pour leur accueil sans-faute pour ce qui restera probablement le plus beau jour de l'an de ma vie. Tout était parfait lors de ce séjour, et vous en êtes grandement responsables. Merci à **Deydey(struction)**, partenaire de route durant ce voyage martiniquais également, on se sera bien marré, nom d'une pipe ! Merci aussi à **Lorette**, pour sa gentillesse, sa disponibilité et ses conseils avisés.

Merci aux amis de Polytech. Merci à **Marion (Pelleteuse)** pour son accueil irlandais, l'observation des moutons du Connemara, des phoques insulaires, pour les quelques bières typiques, et pour ta bonne humeur qui n'aura eu de cesse de m'aider pendant ces années. Merci à **Juliette** pour accueil néerlandais, on aura bien rigolé, même si je commençais à connaître la région. Merci également aux mecs de Polytech pour les bons moments passés : les mariés (**Cédric** et **Michaël**, pas mariés ensemble, je précise), l'esthète **Gaëtan** (toujours présent pour les galéjades), et les insulaires **Alex** et **Tom**. Merci pour les bons moments partagés au cours de ces 3 ans.

Merci à **Stéphan** (et **Marie**), pour ta gentillesse, ta disponibilité, ton aide, ta surveillance de Navette, et tes initiations aux mises en bouteille artisanales (un peu tôt quand même), toujours suivies d'apéros fort sympathiques.

The last but not the least, merci à ceux qui m'accompagnent depuis quelques temps maintenant

Un merci n'est pas suffisant pour **Navette**, c'est un hommage qu'il faudrait faire. Merci à toi, ô *Mustela putorius furo* si importante depuis que je suis allé te chercher dans cette belle ville de Montauban, pas loin de la cuvette de Sapiac. Merci pour ta facilité de dressage, ta gentillesse, tes pocpoc intempestifs, ton odeur de miel de lavande (de châtaignier en état d'excitation) et ton activité débordante durant tes 6 h d'éveil (si possible la nuit). Merci de m'avoir allégé de 1000 euros pendant ces 3 ans en frais vétérinaires, ça m'a permis de rencontrer des docteurs sympas.

Merci à la famille proche : le paternel (**Alain**, ou le vieux), la maman (**Catherine**, ou la vieille, pour les intimes) et bien sûr le frangin (**Cyril**, ou le Bro). Merci pour votre soutien au cours de ces années de thèse. Sans cela, la thèse n'aurait pas pu se dérouler aussi bien, et je vous en suis reconnaissant. Message pour **Alain** et **Cyril** : revoyez un peu vos clubs à supporter, on n'en peut plus du RCT.

Merci à **Alex(andra)**, qui aura eu la patience de m'accompagner pendant les derniers mois de la thèse, une période pas forcément très aisée. Merci pour les bons moments passés, au cours des divers WE, qu'ils se déroulent au sein des Calanques ou à côté des gorilles. Et un merci d'anticipation pour les moments qui vont arriver, pour tout ce qui nous attend. Et bravo pour ta première année TTFL, au moins tu es régulière.

Je tiens à remercier **Julien**, le parrain, le « Paul Pierce du très pauvre », pour tes messages nocturnes (presque) bienveillants, pour les discussions animées sur la NBA, et bien sûr, pour les parties de 1vs1 dans ce petit gymnase. Ces sessions au cours desquelles tu m'as fait admirer ta patte gauche, et surtout ton shoot assassin à 45°, même si cela ne t'a jamais permis de

remporter un HORSE contre le « Westbrook de Saint-Gély ». La bise à **Granola** aussi, on n'est pas des bêtes.

Merci à la **famille de Coursan**, pour m'avoir accueilli de manière épisodique pour ces 3 ans de thèse, après m'avoir accueilli de manière beaucoup plus régulière avant cela. Merci pour votre bonne humeur et votre gentillesse. **Rachel**, maintenant que j'ai fini, t'as intérêt à déplier le canapé, je risque de retrouver le rythme d'avant thèse !

Cette thèse est aussi pour **Jean-Baptiste, Odette, et Marie-Thérèse**, j'espère qu'elle vous rendra fiers du travail accompli.

Enfin, merci à tous ceux qui m'ont accompagné pendant ces 3 ans : Trashtalk, Emile & Images (Olympia 2000, meilleur album), Imagine Dragons (passage obligé), à François Feldman, à François Valéry, à Jul, à Céline, à David Swann, à Jean-Marc Anthony Kabeya (chanteur du générique Pokémon), à Phil Collins, aux musiques épiques (pour le supplément d'âme au basket), à Roch Voisine, à Jean-Jacques et Michael Jones, aux Killers, à Gloria Gaynor, à Lorie, à Tal, à Kygo, à Soprano, à Patrick Sébastien (le poète), à Francis, à Modern Talking, à Tragédie, à K-Marco, à Tribal King, à Peter & Sloane, à Bande organisée, à Johnny, encore à Emile & Images, à MrBboy, à Skyrroz, à Claude et Sam, à chef Etchebest, à Russell, à SGA, et à tant d'autres ...





## Table des matières

Communications liées à ce travail.....	1
Liste des abréviations .....	2
Liste des figures.....	6
Liste des tableaux .....	9
INTRODUCTION GENERALE.....	13
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE .....	21
1. Fermentation alcoolique en œnologie .....	23
1.1. Généralités sur la fermentation alcoolique .....	23
1.2. Déroulement de la fermentation œnologique .....	24
1.2.1. Phase de latence.....	25
1.2.2. Phase de croissance levurienne .....	25
1.2.3. Phase stationnaire .....	26
1.3. Métabolisme général de la levure en conditions fermentaires.....	26
1.3.1. Métabolisme carboné central en conditions fermentaires .....	26
1.3.2. Métabolisme central azoté en conditions fermentaires .....	29
1.3.3. Métabolisme des arômes fermentaires majeurs.....	33
1.4. Diversité des souches de levures du consortium œnologique .....	41
1.4.1. Diversité de l'espèce <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	41
1.4.2. Diversité des espèces non- <i>Saccharomyces</i> .....	43
1.4.3. <i>Starmerella bacillaris</i> : diversité et intérêts œnologiques.....	44
2. Les arômes non-conventionnels .....	48
2.1. Les terpènes .....	48
2.1.1. Généralités sur les terpènes .....	48
2.1.2. Les terpènes dans le vin.....	50
2.1.3. Voies de biosynthèse des terpènes .....	52
2.2. Les dérivés benzéniques .....	62
2.2.1. Les dérivés benzéniques dans le vin.....	62
2.2.2. Voies de production des dérivés benzéniques .....	65
2.3. Les lactones .....	72
2.3.1. Les lactones dans le vin.....	72
2.3.2. Voies de bioproduction des lactones .....	73
2.3.3. Toxicité des lactones .....	78
3. Stratégies d'optimisation de la production d'arômes .....	78
3.1. Modulation du métabolisme des levures par les paramètres environnementaux et technologiques.....	79
3.1.1. Effet de l'azote .....	79

3.1.2.	Effet de la température .....	80
3.1.3.	Effet des lipides et de l'oxygène .....	81
3.1.4.	Effets des vitamines et des oligo-éléments.....	82
3.2.	Approches d'évolution dirigée .....	83
MATERIELS & METHODES.....		89
1.	Levures .....	91
2.	Milieus de fermentation .....	92
2.1.	Moûts synthétiques .....	92
2.2.	Moûts naturels .....	95
3.	Fermentations et cinétiques .....	96
3.1.	Fermentations en tubes de 15 mL.....	96
3.2.	Fermentations en fermenteurs de 300 mL .....	97
3.3.	Fermentations en fermenteur de 1 L.....	98
3.4.	Fermentations en fermenteurs de 100 L .....	99
3.5.	Suivi de la cinétique fermentaire .....	100
4.	Dosages .....	101
4.1.	Biomasse.....	101
4.1.1.	Compteur de cellules .....	101
4.1.2.	Cytométrie en flux.....	101
4.1.3.	Dénombrement sur boîtes de Petri .....	101
4.1.4.	Matière sèche.....	102
4.2.	Dosage de l'azote.....	102
4.2.1.	Ammonium.....	102
4.2.2.	Acides aminés libres.....	103
4.3.	Métabolites carbonés .....	104
4.4.	Analyses chimiques des arômes .....	105
4.4.1.	Dosage hors-ligne des arômes .....	105
4.4.1.1.	Validation de la méthode de dosage des arômes non-conventionnels.....	105
4.4.1.2.	Alcools supérieurs, esters et acides .....	108
4.4.2.	Suivi en ligne de la production d'arômes .....	111
5.	Evaluation de la viabilité cellulaire .....	111
6.	Analyse sensorielle.....	112
6.1.	Conditions générales.....	112
6.2.	Tests triangulaires .....	112
6.3.	Epreuves descriptives .....	113

RESULTATS .....	117
CHAPITRE 1 .....	119
POTENTIALITES DES LEVURES DU CONSORTIUM ŒNOLOGIQUE A PRODUIRE DES COMPOSES NON-CONVENTIONNELS LORS DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE .....	119
1. Pré-criblage de souches non- <i>Saccharomyces</i> pour leurs capacités fermentaires .....	120
2. Dispersive Liquid-Liquid Microextraction for the Quantification of Terpenes in Wines 128	
3. Validation et application de la méthode de dosage pour la production de lactones et de dérivés benzéniques en fermentation alcoolique .....	137
3.1. Validation de la méthode .....	137
3.2. Diversité de production des dérivés benzéniques par les levures œnologiques pendant la fermentation.....	140
3.3. Diversité de production des lactones par les levures du consortium œnologique pendant la fermentation alcoolique .....	142
4. Conclusion.....	145
Annexes Chapitre 1 .....	147
CHAPITRE 2 .....	161
ORIGINALITES METABOLIQUES DE <i>STARMERELLA BACILLARIS</i> PENDANT LA FERMENTATION ALCOOLIQUE ET PRODUCTION DE DERIVES BENZENIQUES ET TERPENIQUES .....	161
1. Unravelling the metabolic specificities of <i>Starmerella bacillaris</i> , in particular the production of benzene and terpene derivatives .....	162
Supplementary data .....	186
2. Impacts de <i>Starm. bacillaris</i> en fermentations séquentielles avec <i>S. cerevisiae</i> sur la production des arômes non-conventionnels .....	193
2.1. Etude de la compatibilité entre les souches de <i>Starm. bacillaris</i> et <i>S. cerevisiae</i> pour la réalisation de la fermentation séquentielle .....	194
2.1.1. Introduction bibliographique .....	194
2.1.2. Résultats : fermentations mixtes en fermenteurs de 1L .....	196
2.2. Impacts of <i>Starmerella bacillaris</i> on the production dynamics of volatile compounds during fermentation and on the sensory properties of the wines.....	201
Supplementary data .....	229
DISCUSSION GENERALE .....	233
Références bibliographiques .....	249
Annexes .....	281





## Communications liées à ce travail

### Publications

**Bergler, G., Nolleau, V., Picou, C., Pérez, M., Ortiz-Julien, A., Brulfert, M., Camarasa, C., Bloem, A., 2020.** Dispersive Liquid-Liquid Microextraction for the Quantitation of Terpenes in Wine. *J. Agric. Food Chem.* acs.jafc.9b08222. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b08222>

**Bergler, G., Picou, C., Brial, P., Ortiz-Julien, A., Brulfert, M., Camarasa, C., Bloem, A.** Unravelling the metabolic specificities of *Starmerella bacillaris*, in particular the production of benzene and terpene derivatives. A soumettre.

**Bergler, G., Aguera, E., Sire, Y., Caillé, S., Picou, E., Ortiz-Julien, A., Brulfert, M., Camarasa, C., Bloem, A.** Impacts of *Starmerella bacillaris* on the production dynamics of volatile compounds during fermentation and on the sensory properties of the wines. A soumettre.

### Communications orales

**Bergler G., Brulfert M., Ortiz-Julien A., Camarasa C. and Bloem A.** Dispersive Liquid-Liquid Microextraction for the quantification of terpenes in wines. IVAS 2019, June 24-27<sup>th</sup>, Bordeaux, France.

**Bergler G., Bloem A., Ortiz-Julien A., Colonna-Ceccaldi B. and Camarasa C.** Differences in the volatile fingerprints and fermentation performances of non-*Saccharomyces* wine yeasts. Int. Congress on Grapevine and Wine Sciences, 2018, 7-9<sup>th</sup> November, Logrono, La Rioja, Spain

### Posters

**Seguinot S., Englezos V., Bergler G., Julien-Ortiz, A., Camarasa C., Bloem, A.** *Non-Saccharomyces* yeast nitrogen consumption and metabolite production during wine fermentation. Oeno 2019, June 24-27, Bordeaux, France.

**Bergler G., Brulfert M., Ortiz-Julien A., Camarasa C. and Bloem A.** Dispersive Liquid-Liquid Microextraction for the quantification of terpenes in wines. IVAS 2019, June 24-27<sup>th</sup>, Bordeaux, France.

**Bergler G., Ortiz-Julien A., Colonna-Ceccaldi B., Camarasa C. and Bloem A.** Unusual aromatic compounds production by yeasts during enological fermentation. Microbiocccitanie, 2019, Montpellier, France.



## Liste des abréviations

4-HBD : 4-hydroxybenzaldéhyde

ACP : Analyse en composantes principales

ATP : Adénosine triphosphate

BD : Benzaldéhyde

BOH : Alcool benzylique

DAP : Di-ammonium phosphate

DO : Densité optique

eV : Electron volt

g, mg, µg : Gramme, milligramme, microgramme

GC-MS : Gas chromatography – Mass Spectrometry

h, min, s : heure, minute, seconde

hL, mL, µL : hectolitre, litre, millilitre, microlitre

LSA : Levures sèches actives

*L. thermotolerans*, LT : *Lachancea thermotolerans*

M, mM, µM : Molaire, millimolaire, micromolaire

MCC : Métabolisme carboné central

mgN/L : milligramme d'azote assimilable par litre

m/z : Rapport masse sur charge

MSXXX / SMXXX : Moût synthétique contenant XXX mg/L d'azote assimilable.

PheAA : Acide phénylacétique

PheAc : Acétate de 2-phényléthyle

PheALD : Phénylacétaldéhyde

PheOH : 2-phényléthanol

RSD : Relative standard deviation

NAD<sup>+</sup> : Nicotinamide adénine dinucléotide, forme oxydée

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide, forme réduite

NADP<sup>+</sup> : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme oxydée

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme réduite

NTU : Unité de turbidité néphélométrique

Rpm : Rotation par minute

*S. cerevisiae*, SC : *Saccharomyces cerevisiae*

*Starm. bacillaris*, SB : *Starmerella bacillaris*

SIM : Single Ion Monitoring

TCA : Tricarboxylic acid

*T. delbrueckii*, TD : *Torulasporea delbrueckii*

UFC : Unité formatrice de colonie

VPP : Voie des pentoses phosphate

YPD : Yeast Extract Peptone Dextrose





## Liste des figures

Figure 1 : Evolution des principaux paramètres fermentaires au cours du temps (h) lors d'une fermentation avec <i>S. cerevisiae</i> Lalvin EC1118® (Lallemand) en moût synthétique avec 200 g/L de sucres et 200 mg/L d'azote assimilable (Seguinot, 2019). .....	25
Figure 2 : Métabolisme carboné central de <i>S. cerevisiae</i> en fermentation alcoolique .....	28
Figure 3 : Voie des pentoses phosphates chez <i>S. cerevisiae</i> .....	29
Figure 4 : Liste des principaux transporteurs de sources d'azote avec leurs mécanismes de régulation chez <i>S. cerevisiae</i> (Crépin <i>et al.</i> , 2012).....	31
Figure 5 : Métabolisme azoté central chez <i>S. cerevisiae</i> (d'après Magasanik & Kaiser, 2002). .....	32
Figure 6 : Schéma des métabolismes carboné, azoté et soufré, et leur implication dans la biosynthèse des arômes fermentaires majeurs (d'après Swiegers <i>et al.</i> , 2005). .....	37
Figure 7 : Voie d'Ehrlich (Hazelwood <i>et al.</i> , 2008).....	38
Figure 8 : Métabolisme des sulfates et des sulfites chez <i>S. cerevisiae</i> (d'après Smith <i>et al.</i> , 2015 ; Ugliano & Henschke, 2009).....	40
Figure 9 : Arbre phylogénétique de souches de <i>S. cerevisiae</i> après étude de leur génome complet (Legras <i>et al.</i> , 2018) .....	42
Figure 10 : Structures des monoterpénols et des acétates de terpényles correspondants.....	52
Figure 11 : Voies de biosynthèse de l'IPP, précurseur des terpènes (d'après Carrau <i>et al.</i> , 2005 ; Pérez-Gil <i>et al.</i> , 2017). .....	54
Figure 12 : Représentation de la formation des produits finaux de la voie de formation des isoprénoïdes à partir des unités IPP ou DMAPP (d'après Pérez-Gil <i>et al.</i> , 2017). .....	55
Figure 13 : Schéma de la libération des terpénoïdes glycosylés (d'après Gunata, 1988). .....	57
Figure 14 : Biotransformations des monoterpénols chez les levures du consortium œnologique (d'après King & Dickinson, 2000).....	60
Figure 15 : Schéma de synthèse des terpényl acétates à partir de monoterpénols .....	61
Figure 16 : Structure des composés benzéniques étudiés .....	65
Figure 17 : Voies de production du benzaldéhyde et de l'alcool benzylique chez les levures et les plantes (d'après Martin <i>et al.</i> , 2016b).....	68
Figure 18 : Récapitulatif des voies majeures de bioproduction de la vanilline (d'après Kaur & Chakraborty, 2013).....	70
Figure 19 : Conversion de l'eugénol en acide férulique chez <i>P. fluorescens</i> (d'après Walton <i>et al.</i> , 2000) .....	71

Figure 20 : Voies métaboliques supposées pour la biotransformation de l'acide férulique en vanilline et autres métabolites (d'après Max <i>et al.</i> , 2012). .....	71
Figure 21 : Schéma général de la production biotechnologique des lactones (d'après Romero-Guido <i>et al.</i> , 2011).....	74
Figure 22 : Facteurs influençant la production de $\gamma$ -décylactone chez <i>Yarrowia lipolytica</i> à partir d'acide ricinoléique (d'après Romero-Guido <i>et al.</i> , 2011) .....	77
Figure 23 : Photo du robot PhenOFerm en configuration « tubes » .....	97
Figure 24 : Photo d'un fermenteur de 300 mL .....	98
Figure 25 : Photo d'un fermenteur de 1 L .....	99
Figure 26 : Photo de cuves de fermentation de 100 L.....	100
Figure 27 : Différenciation des espèces de <i>Starm. bacillaris</i> et <i>S. cerevisiae</i> sur milieu WL. ....	102
Figure 28 : Vitesses maximales de production de CO <sub>2</sub> des différentes souches non- <i>Saccharomyces</i> étudiées. ....	122
Figure 29 : Avancement de la fermentation des souches non- <i>Saccharomyces</i> étudiées (A) et profil de production du MCC (B). A : Diagramme en violon couplé à un box-plot, comprenant les données pour l'ensemble des souches étudiées. B : Analyse en Composantes Principales à la fin des fermentations. ....	123
Figure 30 : Analyse en Composantes Principales de la production des alcools supérieurs, esters éthyliques, esters acétiques et acides par les souches non- <i>Saccharomyces</i> . ....	125
Figure 31 : Comparaison des productions de dérivés benzéniques après fermentation sur Chardonnay (vert) et sur MS mimant la composition du Chardonnay (bleu).....	141
Figure 32 : Production des lactones par 40 souches œnologiques après fermentation sur moût synthétique (MS , bleu) et Chardonnay (CH, vert) .....	144
Figure 33: Fermentation profiles of <i>Starm. bacillaris</i> 3800 and <i>S. cerevisiae</i> EC1118.....	170
Figure 34: Central carbon metabolites produced by <i>Starm. bacillaris</i> (blue) and <i>S. cerevisiae</i> EC1118 (red) at the end of fermentation.....	171
Figure 35: Nitrogen consumption of <i>Starm. bacillaris</i> during fermentation .....	172
Figure 36: Production of benzene derivatives (A) and monoterpenols (B) after fermentation on synthetic must with <i>Starm. bacillaris</i> (blue) and <i>S. cerevisiae</i> (red). ....	173
Figure 37: Production kinetics of the studied benzene derivatives during fermentation in a medium with Phe as sole nitrogen source. ....	175
Figure 38: Maximal production of benzene derivatives by <i>Starm. bacillaris</i> (blue) and <i>S. cerevisiae</i> (red) after fermentation in different media.....	179

Figure 39: Terpenes production by <i>Starm. bacillaris</i> (blue) and <i>S. cerevisiae</i> (red) at the end of fermentation. ....	180
Figure 40: Proposed pathway for the formation of benzene derivatives by <i>Starm. bacillaris</i> . ....	183
Figure 41: Proposed pathway for the formation of monoterpenols by <i>Starm. bacillaris</i> from acetyl-CoA. ....	185
Figure 42 : Dynamiques des populations (A) et cinétiques fermentaires (B) et des fermentations séquentielles et des cultures pures de <i>Starm. bacillaris</i> et <i>S. cerevisiae</i> . ....	198
Figure 43 : Production des métabolites issus du MCC à l'issue des fermentations séquentielles. ....	199
Figure 44: Comparison of the fermentation kinetics (A), the sugar consumption (B), the <i>Starm. bacillaris</i> population in sequential fermentations (C) and the population ratios of <i>Starm. bacillaris</i> and <i>S. cerevisiae</i> during sequential fermentations (D). ....	210
Figure 45: Online monitoring of the major fermentative aromas by GC-MS after sequential fermentations (red and blue) and pure fermentation by <i>S. cerevisiae</i> (green). ....	214
Figure 46: Online monitoring of the production of acetaldehyde (A) and benzaldehyde (B) during fermentations. ....	221
Figure 47 : Cinétiques fermentaires (A) et CO <sub>2</sub> cumulé (B) au cours de la fermentation des séries PAR et AR.....	286
Figure 48 : Dosage des métabolites issus du MCC a l'arrêt des fermentations PAR. ....	287
Figure 49 : Production des décalactones à l'arrêt des fermentations. ....	287
Figure 50 : Dosage des métabolites issus du MCC a l'arrêt des fermentations AR. ....	289
Figure 51 : ACP de la production d'arômes fermentaires majoritaires dans les différentes conditions AR.....	290

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Classement des sources d'azote en fonction du temps de génération et de l'expression de gènes impliqués (Godard <i>et al.</i> , 2007).....	32
Tableau 2 : Précurseurs carbonés pour la synthèse de novo des acides aminés chez <i>S. cerevisiae</i> (d'après Ljungdahl & Daignan-Fornier, 2012). ....	33
Tableau 3 : Arômes communément trouvés dans le vin (d'après Swiegers <i>et al.</i> , 2005) .....	34
Tableau 4 : Liste non-exhaustive des principales espèces retrouvées dans le secteur œnologique (d'après Barata <i>et al.</i> , 2012 ; Wang <i>et al.</i> , 2015) .....	43
Tableau 5 : Impacts de <i>Starmarella bacillaris</i> en fermentations mixtes avec <i>S. cerevisiae</i> (d'après Englezos <i>et al.</i> , 2017).....	47
Tableau 6 : Présentation des composés d'arômes non-conventionnels étudiés au cours de cette thèse.....	49
Tableau 7 : Concentrations en monoterpénols dans des vins issus de différentes cépages (en µg/L, d'après Gunata <i>et al.</i> , 1985). ....	51
Tableau 8 : Evolutions chimiques des dérivés terpéniques dans du vin modèle (solution aqueuse à 10 % éthanol, pH 2,9 ajusté avec tartrate d'hydrogène et acide sulfurique) (d'après Pedersen <i>et al.</i> , 2003).....	60
Tableau 9 : Production d'alcool benzylique et de benzaldéhyde par certaines souches œnologiques (d'après Delfini <i>et al.</i> , 1991).....	66
Tableau 10 : Concentrations moyennes en lactones (µg/L) dans 72 vins différents (d'après Pérez-Oliveiro <i>et al.</i> , 2014). ....	73
Tableau 11 : Précurseurs des lactones étudiées.....	74
Tableau 12 : Souches non- <i>Saccharomyces</i> étudiées au cours de la thèse .....	91
Tableau 13 : Composition d'un moût synthétique contenant 200 g/L de sucres, 200 mg/L d'azote assimilable et 5 mg/L de phytostérols .....	93
Tableau 14 : Composition de la solution mère d'oligo-éléments .....	93
Tableau 15 : Composition de la solution mère de vitamines .....	94
Tableau 16 : Composition de la solution mère de phytostérols .....	94
Tableau 17 : Composition de la solution mère de chlorure de fer .....	94
Tableau 18 : Composition de la solution mère d'acides aminés.....	95
Tableau 19 : Analyses classiques des moûts naturels .....	96
Tableau 20 : Liste des tampons utilisés pour l'analyse des acides aminés au Biochrom 30 ..	103

Tableau 21 : Paramètres pour la quantification des arômes non-conventionnels par GC-MS .....	107
Tableau 22 : Paramètres pour la semi-quantification des arômes fermentaires majoritaires du vin.....	110
Tableau 23 : Tests triangulaires réalisés lors de l'analyse sensorielle. ....	113
Tableau 24 : Préparation des standards sensoriels .....	114
Tableau 25 : Etude de l'effet matrice pour les dérivés benzéniques et les lactones étudiés...	137
Tableau 26 : Paramètres de validation de la méthode développée, appliquée aux dérivés benzéniques et aux lactones étudiés .....	138
Tableau 27: Monoterpenols concentration at the end of fermentation.....	174
Tableau 28: Benzene derivative concentrations at the end of fermentation ( $\mu\text{g/L}$ ). ....	178
Tableau 29: Wines analysis after fermentations in the studied conditions. ....	212
Tableau 30: Production of major volatile compounds at the end of fermentation.....	215
Tableau 31: Offline analysis of benzene derivatives and terpenes at the end of fermentation. ....	222
Tableau 32: Triangular tests performed on produced wines by sequential fermentations or pure fermentation of <i>S. cerevisiae</i> . ....	225
Tableau 33: Results of the CATA profile for olfactory descriptors (A) and mouthfeel descriptors (B).....	226
Tableau 34: Concentrations en acide ricinoléique des séries PAR et AR.....	284





---

# **INTRODUCTION GENERALE**

---



En 1715, Jean Martell décide de s'associer avec un négociant de Bordeaux, et de fonder la maison Martell, pour développer le commerce et le négoce des eaux-de-vie de la région de Cognac. La société réussit ensuite à se développer, notamment vers l'international avec des premiers exports vers les Etats-Unis dès 1775. La société Martell fait aujourd'hui partie de la filiale Martell-Mumm-Perrier Jouët du groupe Pernod-Ricard, deuxième groupe mondial dans le secteur des vins & spiritueux avec un chiffre d'affaires de 8,9 milliards d'euros en 2018-2019. De nos jours, le cognac est exporté à plus de 95 % dans plus de 150 pays, dont 46 % vers la zone NAFTA (zone de libre-échange nord-américaine entre les Etats-Unis, le Mexique, et le Canada), et 28 % en Asie et Extrême-Orient. De par le monde, les eaux-de-vie de Cognac sont associées à l'excellence du savoir-faire français.

Afin de pouvoir obtenir ou conserver l'appellation de cognac, l'eau-de-vie doit être obtenue et vieillie en respectant un cahier des charges précis concernant les différentes étapes du procédé de fabrication. Le contrôle du respect de ces normes est confié au Bureau National Interprofessionnel du Cognac (BNIC). Tout d'abord, la zone géographique de production, englobant une partie de la Charente, a été fixée par un décret datant du 1<sup>er</sup> mai 1909. L'élaboration du cognac commence par la vendange de cépages blancs, à 90 % d'Ugni Blanc, mais également du Colombard ou de la Folle Blanche. Immédiatement après la récolte, le raisin est pressé sans sulfitage préalable de la vendange et le moût est mis à fermenter, sans étape de clarification en amont (plus de 1000 NTU). En général, les moûts obtenus sont pauvres en azote assimilable (entre 70 et 120 mgN/L d'azote assimilable), ce qui nécessite l'ajout d'azote minéral (di-ammonium phosphate) afin d'assurer une fermentation alcoolique complète. Dans le cadre de l'élaboration du cognac, la fermentation se déroule à des températures relativement élevées (supérieures à 20-22 °C), et dure entre cinq et six jours. Le vin obtenu (appelé « vin de chaudière ») est peu alcoolisé (7,5 à 10 % d'éthanol (v/v)), très acide, et peu agréable à déguster. Il est ensuite distillé selon un procédé spécifique au cognac. En effet, l'élaboration de cette eau-de-vie met en jeu une double distillation (distillation charentaise), en utilisant un alambic charentais en cuivre (réglementation établie par l'Institut National de l'Origine et de la qualité, anciennement INAO), dont la géométrie particulière permet d'effectuer une double distillation à vitesse lente, contrairement aux alambics classiques utilisés pour des distillations continues et plus rapides. La contenance de ces alambics est réglementée, avec une capacité de chaudière ne devant pas excéder 25 hL de charge. Le chauffage doit impérativement se faire à feu nu. L'alambic est également composé (i) d'un chapiteau destiné à canaliser les vapeurs et permettre un recyclage d'une partie de celles-ci ; (ii) d'un col de cygne canalisant les vapeurs vers le

serpentin, pièce permettant de condenser les vapeurs et refroidir le distillat ; (iii) d'une pipe de refroidissement, contenant l'eau pour la condensation et le refroidissement du distillat. Le vin (avec ou sans lies) est préchauffé dans un chauffe vin (permettant de récupérer des calories entre le col de cygne et le serpentin de condensation), puis distillé une première fois, jusqu'à l'obtention d'un « brouillis » titrant autour de 30 % d'éthanol (v/v). Puis, le brouillis est distillé une seconde fois (« bonne chauffe »). Durant cette étape, le distillateur sépare les premiers condensats (« têtes ») et les derniers condensats (« queues »), avant de les ajouter à un nouveau brouillis pour les redistiller. Suite à la double distillation, le liquide obtenu (le « cœur ») titre entre 68 et 72 % (v/v), et est stocké dans des fûts de chêne français des forêts du Limousin ou du Tronçais, pour l'étape de vieillissement. L'étape de vieillissement dure deux ans et demi au minimum, et se déroule dans des fûts neufs ou n'ayant contenu que des eaux-de-vie de Cognac. Au cours de cette étape, des échanges ont lieu entre l'eau-de-vie, le bois de la barrique, et l'air environnant, permettant le développement des arômes, et conférant à l'eau-de-vie une couleur ambrée. Certains arômes ne se forment que durant cette étape de vieillissement.

Dans un marché des vins et des spiritueux qui devient très concurrentiel, le fait de pouvoir diversifier son offre devient crucial pour les groupes et les vinificateurs. La diversification des produits peut se faire grâce à plusieurs leviers : packaging innovant, techniques agricoles innovantes, mais aussi et surtout par une diversification des propriétés organoleptiques des produits finis, afin de répondre au mieux aux attentes des consommateurs. Dans le procédé d'élaboration du cognac, les différentes étapes participent à la complexité aromatique du produit fini : la synthèse d'arômes fermentaires et la révélation d'arômes variétaux par les levures œnologiques, des recombinaisons chimiques et une concentration aromatique lors de la double distillation, et le développement d'arômes post-fermentaires lors du vieillissement en barriques. Néanmoins, l'étape de fermentation, bien qu'étroitement contrôlée, est souvent considérée comme un support du procédé, permettant uniquement la production d'un vin acide et peu aromatique, uniquement destiné à la distillation. Or, de nombreux travaux ont démontré l'importance de la fermentation alcoolique dans le bouquet aromatique d'un vin. Ainsi, la diversification organoleptique des produits peut également être rendue possible par une bonne maîtrise de la fermentation. Les arômes fermentaires majoritaires synthétisés par les levures (alcools supérieurs, esters acétiques, acides gras à moyenne chaîne et esters éthyliques) ont été largement étudiés, ainsi que les paramètres pouvant moduler leur synthèse durant la fermentation, qu'ils soient liés aux conditions environnementales (température, azote, lipides, ...) ou encore à la souche de levures utilisée (Camarasa *et al.*, 2011; Rollero *et al.*, 2015; Torija

*et al.*, 2003). L'espèce *Saccharomyces cerevisiae* est très majoritairement utilisée dans le secteur œnologique, car la mieux adaptée aux conditions fermentaires (fortes concentrations en sucres, faible disponibilité en O<sub>2</sub>, acidité du moût, résistance à l'éthanol...). Elle est généralement utilisée sous forme de levures sèches actives (LSA), facilitant son usage. Depuis quelques années, l'utilisation de levures non-*Saccharomyces* suscite un regain d'intérêt pour les vinificateurs et les industriels, puisque certaines présentent des caractéristiques intéressantes en vinification, que ce soit pour la production d'enzymes hydrolytiques ou encore la production d'arômes, permettant ainsi d'apporter plus de complexité et de typicité aux vins. Ces levures sont généralement associées à *S. cerevisiae* en conditions contrôlées afin de bénéficier des avantages des non-*Saccharomyces*, tout en réalisant complètement la fermentation.

Le vin est une matrice très complexe, comprenant des centaines de composés volatils qui ont été identifiés et quantifiés à des teneurs allant du mg/L au ng/L. La composition olfactive des vins est donc la résultante de nombreuses molécules volatiles et certaines peuvent jouer un rôle prononcé pour apporter aux vins des tonalités qui contribuent à la typicité du produit. Les notes d'agrumes, de fruits blancs, de fleurs, d'amande, de vanille, de café font parties des nuances aromatiques recherchées par les consommateurs. Elles peuvent être apportées par des composés volatils appartenant à diverses familles chimiques comme les terpènes (limonène, géraniol...), les sesquiterpènes (nootkatone), les dérivés benzéniques (benzaldéhyde, vanilline), les lactones ( $\delta$ - et  $\gamma$ -lactones). De façon globale, ces différents composés dérivent de précurseurs issus du métabolisme des lipides, du métabolisme carboné central, du métabolisme azoté ou du métabolisme des composés phénoliques. Un des leviers envisagés pour augmenter la teneur de ces composés volatils d'intérêt dans les boissons fermentées est de favoriser leur synthèse au cours du procédé de fermentation alcoolique. En effet, les levures sont susceptibles de synthétiser ces composés *de novo* via leurs métabolismes propres mais aussi d'agir sur la révélation de précurseurs d'arômes présents dans la matrice.

Dans ce cadre, l'objectif général de la thèse est d'étudier, dans l'optique d'optimiser, la production de molécules volatiles non conventionnelles par les levures œnologiques au cours du procédé de fermentation alcoolique et de mieux comprendre les voies métaboliques impliquées ainsi que leurs régulations. Ce travail de thèse va permettre, d'une part, de compléter nos connaissances sur la physiologie des levures et leur métabolisme, en explorant un volet très peu étudié (production des arômes non-conventionnels). D'autre part, ce travail va permettre d'avoir des retombées appliquées, pour définir des stratégies permettant de favoriser la formation de composés d'arômes particuliers dans les vins et ainsi de répondre à un enjeu actuel

de la filière, à savoir le développement de vins et d'eaux-de-vie avec un caractère marqué et une typicité.

Cette thèse s'appuie sur (i) l'utilisation d'outils innovants de mise en œuvre des fermentations : robot de fermentation unique au monde (PhenOFerm) permettant la réalisation de screenings haut-débit ; fermenteurs à l'échelle pilote équipés d'un système de suivi en ligne de la composition en composés volatils de la phase gazeuse (ii) le développement et la validation d'une méthode d'extraction et d'analyse de composés d'intérêt et sur (iii) une analyse fine du métabolisme levurien relatif à la production de certaines de ces molécules.

Pour mener à bien ce travail, dans un premier temps, une méthode d'extraction par Microextraction Dispersive Liquide-liquide (Dispersive Liquid Liquid Microextraction, DLLME) couplée à une analyse par GC-MS a été développée et validée pour une vingtaine de molécules. Cette méthode a été utilisée pour caractériser le « volatome » de 40 souches de levures (*Saccharomyces cerevisiae* et non-*Saccharomyces*) après fermentation et pour sélectionner des souches capables de synthétiser des composés aromatiques originaux soit à partir de précurseurs présents dans le raisin soit *de novo*. A l'issue des fermentations, une souche de levures non-*Saccharomyces* *Starmerella bacillaris* a été sélectionnée pour la production de terpènes et de dérivés benzéniques et une souche de *Saccharomyces cerevisiae* pour la production de lactones.

Dans un deuxième temps, le métabolisme de la souche sélectionnée de *Starmerella bacillaris* a été finement étudié afin d'élucider les voies métaboliques impliquées dans la formation des terpènes et du benzaldéhyde. Cette souche a ensuite été validée en conditions œnologiques, lors de fermentations par inoculation séquentielle à l'échelle pilote à l'UE Pech Rouge. Un suivi cinétique précis des composés volatils grâce à un outil original de suivi en ligne de la production d'arômes fermentaires majoritaires a été couplé à un suivi hors-ligne des arômes non-conventionnels pour étudier la chronologie de formation des composés volatils. Ces analyses chimiques ont été complétées par une analyse sensorielle des vins au moyen de tests triangulaires et de profil de type Check-All-That-Apply (CATA) afin d'étudier l'impact de cette souche au niveau organoleptique.

Dans un dernier temps, le métabolisme de *S. cerevisiae* menant à la production des lactones a été appréhendé, en observant l'impact de l'ajout des différents précurseurs potentiels de ces molécules.





---

# **INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE**

---



## 1. Fermentation alcoolique en œnologie

### 1.1. Généralités sur la fermentation alcoolique

La fermentation alcoolique est l'étape du procédé d'élaboration du vin au cours de laquelle le moût de raisin est transformé en vin grâce à l'action des levures. Les sucres initialement contenus dans le jus de raisin sont majoritairement convertis en éthanol et CO<sub>2</sub>. Le moût de raisin est un milieu stressant pour les levures avec une acidité faible (pH de 2,9 à 4,2) et une pression osmotique forte due aux concentrations en sucres (de 160 à 260 g/L d'un mélange plus ou moins équimolaire de glucose et de fructose). Le jus de raisin contient des nutriments essentiels à la croissance des levures tels que des vitamines, des oligo-éléments, des lipides, et également de l'azote assimilable se trouvant sous forme minérale (ammonium) et sous forme organique (acides aminés, peptides). De plus, pour maîtriser et faciliter le procédé de fabrication du vin, des intrants peuvent être ajoutés dans le moût. Un des produits largement utilisé en œnologie est le SO<sub>2</sub>, pour ses propriétés antioxydantes, anti-oxydasiques et antiseptiques.

Il existe une microflore naturelle présente sur les baies de raisin, comprenant notamment certaines espèces levuriennes pouvant appartenir à divers genres tels que *Saccharomyces*, *Hanseniaspora*, *Starmerella*, *Metschnikowia*, *Lachancea*, ... (Wang *et al.*, 2015). La fermentation peut être réalisée spontanément, par les levures présentes sur le raisin et/ou dans l'environnement du chai. La fermentation spontanée est majoritairement initiée par des levures non-*Saccharomyces*. Malgré cette présence plus importante en début de fermentation, la quantité des levures non-*Saccharomyces* diminue fortement après les premiers jours de fermentation. Cela est principalement lié à deux paramètres : (i) de nombreuses souches non-*Saccharomyces* ont une faible tolérance à l'éthanol, qui s'accumule au cours de la fermentation ; (ii) ces levures ont généralement un métabolisme oxydatif, et sont sensibles lorsque les teneurs en oxygène dissous sont faibles (Holm Hansen *et al.*, 2001). Les fermentations spontanées sont citées pour leur contribution à la diversification des profils organoleptiques des vins (Fleet, 1993). Même si les levures non-*Saccharomyces* disparaissent rapidement, leur présence peut avoir un impact sur la cinétique fermentaire et sur le profil aromatique des vins. Ainsi, certains vins obtenus par fermentation spontanée ont des profils radicalement différents en fonction des levures non-*Saccharomyces* : libération de thiols en présence de *M. pulcherrima* ou *T. delbrueckii* (Egli *et al.*, 1998; Zott *et al.*, 2011), ou au contraire, production d'acide acétique ou de phénols volatils par *H. uvarum* (ex *Kloeckera apiculata*) ou des levures du genre *Brettanomyces* (Oelofse *et al.*, 2016; Zohre & Erten, 2002).

Si cet itinéraire de vinification peut avoir un impact positif sur la qualité des vins (production d'esters ou de thiols, réduction des teneurs en éthanol), il peut être également à l'origine de l'apparition de défauts dans les vins (augmentation de l'acidité volatile, ...), ou encore de certains arrêts de fermentation.

De manière générale, la fermentation est principalement réalisée par *S. cerevisiae*, malgré sa faible présence dans les moûts de départ ( $10^2$  UFC/mL au maximum pour  $10^4$  à  $10^6$  UFC/mL de levures totales) (Combina *et al.*, 2005).

Afin de sécuriser et de maîtriser le déroulement de la fermentation alcoolique, la grande majorité des vinifications est réalisée avec un levurage des moûts (Sablayrolles, 2009). Celui-ci se fait très majoritairement avec des levures préalablement sélectionnées sur la base de leurs capacités fermentaires, mais également leurs originalités métaboliques. Les levures utilisées pour le levurage sont généralement inoculées sous forme de levures sèches actives (LSA). Le taux d'inoculation varie entre 10 et 40 g/hL ce qui correspond à plusieurs millions de cellules par millilitre.

En anaérobiose, la fermentation alcoolique se déroule suivant la réaction suivante :

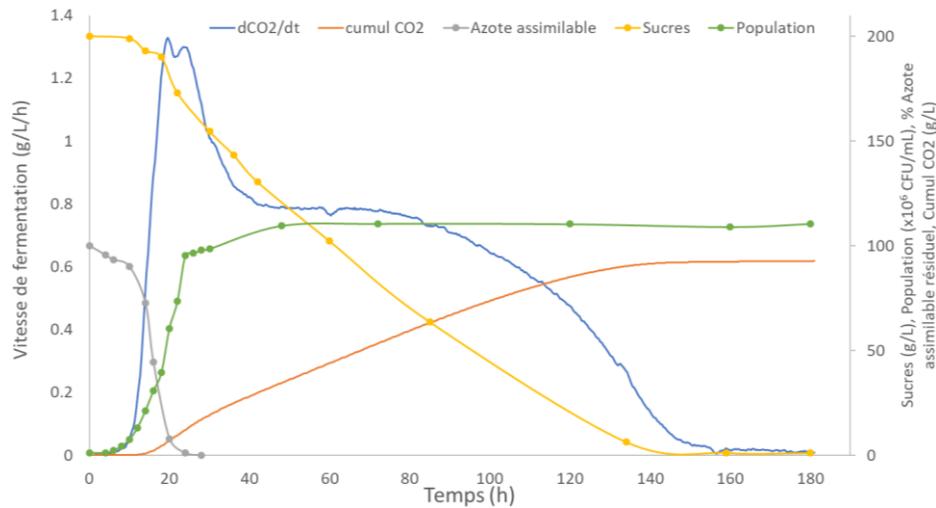


Théoriquement, le rendement massique concernant l'éthanol est de 0,51 g d'éthanol produit par gramme de glucose consommé. Néanmoins, 8 à 10 % du glucose consommé est utilisé pour la synthèse de certains précurseurs anaboliques impliqués dans la production de biomasse et pour assurer le maintien de l'équilibre rédox au sein de la cellule. Le rendement observé est donc de 0,47 g d'éthanol par gramme de glucose consommé. Ce rendement peut légèrement varier en fonction de la souche de levure utilisée pour la fermentation. D'autres métabolites issus du métabolisme carboné central (MCC) sont excrétés dans le milieu comme le glycérol, l'acétate, le succinate, l' $\alpha$ -cétoglutarate et le pyruvate. Au cours du procédé, les levures produisent dans des concentrations moindres des composés volatils de type aldéhydes, alcools supérieurs, esters acétiques d'alcools supérieurs, esters éthyliques d'acides gras, composés soufrés...contribuant à la complexité du profil olfactif des vins.

## **1.2. Déroulement de la fermentation œnologique**

Lors de la fermentation en conditions œnologiques, la levure se trouve confrontée à de multiples stress variant au cours du temps suite à l'évolution des conditions du milieu : forte teneur initiale en sucres, pH acide, stress osmotique, faibles apports en  $\text{O}_2$ , augmentation de la teneur en éthanol et limitation en certains nutriments comme l'azote, les vitamines. Lors de la

fermentation alcoolique, le suivi de l'activité fermentaire des levures permet de distinguer plusieurs phases (**Figure 1**).



**Figure 1 :** Evolution des principaux paramètres fermentaires au cours du temps (h) lors d'une fermentation avec *S. cerevisiae* Lalvin EC1118® (Lallemand) en moût synthétique avec 200 g/L de sucres et 200 mg/L d'azote assimilable (Seguinot, 2019).

### 1.2.1. Phase de latence

La phase de latence est une phase d'adaptation de la levure à son environnement, (Pérez-Torrado *et al.*, 2002). La durée de cette étape varie en fonction des espèces de levures et dépend de la température, du taux d'inoculation des levures lorsqu'un levurage est réalisé, de l'état sanitaire de la vendange ou encore de la concentration initiale en certains intrants dans le moût tels que le SO<sub>2</sub> (Blouin & Peynaud, 2012; Nadai *et al.*, 2016). Au cours de cette phase, le milieu se sature en CO<sub>2</sub> mais l'activité fermentaire est faible. Peu de nutriments sont consommés, à l'exception de la thiamine, vitamine essentielle présente entre 150 et 750 µg/L dans les moûts, qui est intégralement consommée dans les premières heures suivant l'inoculation des levures (Bataillon *et al.*, 1996; Peynaud & Lafourcade, 1977).

### 1.2.2. Phase de croissance levurienne

Durant cette phase, les cellules se multiplient et atteignent une population maximale. La population maximale est très variable et dépend de nombreux paramètres du milieu tels que l'azote assimilable initial du moût, la concentration en acides gras et stérols, la teneur en vitamines ou encore la souche de levures utilisée. Généralement, elle est comprise entre  $5.10^7$  et  $2,5.10^8$  UFC/mL (Bely *et al.*, 1990a). L'arrêt de la multiplication cellulaire et l'entrée en phase stationnaire sont généralement liés à l'épuisement en azote assimilable dans le milieu. De

plus, certaines carences en lipides et en vitamines peuvent apparaître. Pendant cette phase, environ 30 % des sucres sont consommés et la vitesse de production de CO<sub>2</sub> atteint son maximum.

### *1.2.3. Phase stationnaire*

Lors de la phase stationnaire, les levures ne se multiplient plus, mais leur activité fermentaire reste élevée, leur permettant de dégrader les sucres résiduels présents dans le milieu. Pour les fermentations avec *S. cerevisiae*, la viabilité cellulaire reste élevée. La vitesse fermentaire décroît au cours du temps jusqu'à l'épuisement total des sucres, corrélée à l'augmentation de la teneur en éthanol dans le milieu. Cela s'explique par le fait que l'éthanol augmente la perméabilité de la membrane plasmique des levures, tout en inhibant l'activité des transporteurs des hexoses (Jones & Greenfield, 1987; Salmon, 1989).

## **1.3. Métabolisme général de la levure en conditions fermentaires**

### *1.3.1. Métabolisme carboné central en conditions fermentaires*

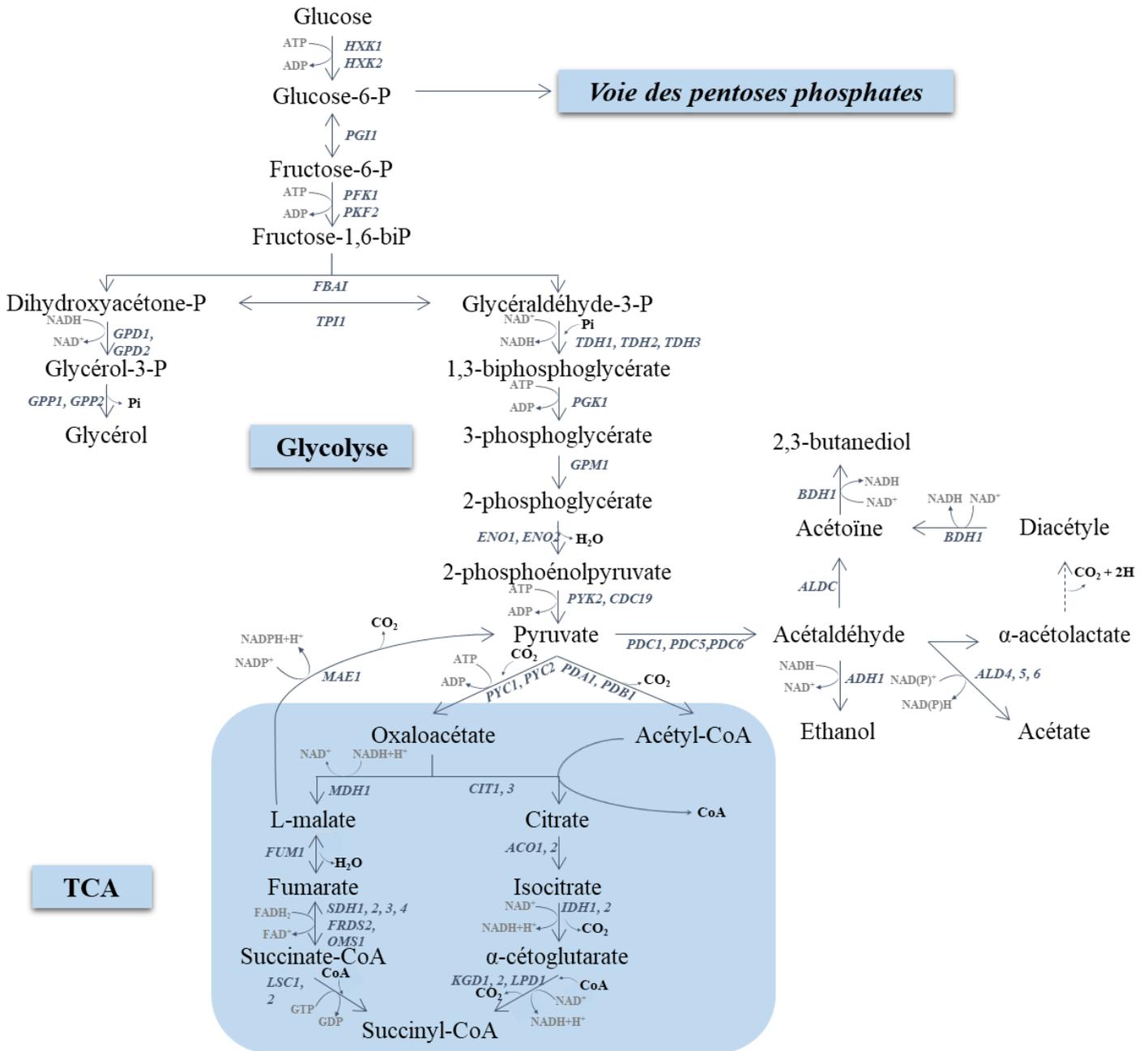
*S. cerevisiae* est l'espèce majoritairement utilisée dans le secteur œnologique, car elle est particulièrement adaptée aux contraintes et aux conditions de la fermentation alcoolique : forte teneur en sucres (pression osmotique forte), pH acide, fortes teneurs en éthanol ou encore la présence de SO<sub>2</sub>. Cette espèce est décrite comme aérobie facultative, Crabtree positive, et peut adapter son métabolisme aux conditions du milieu, en fonction de l'aération et de la disponibilité en substrats carbonés. En vinification, le métabolisme de la levure est exclusivement fermentaire, du fait des concentrations très élevées en sucres (150 à 260 g/L) et de la faible disponibilité en O<sub>2</sub> dissous.

Dans ces conditions, l'ATP, molécule clé de l'énergétique cellulaire nécessaire à la croissance cellulaire, est produit par la glycolyse (**Figure 2**). Cette voie est un processus faisant intervenir le NAD<sup>+</sup> comme accepteur final d'électrons, et aboutissant à la synthèse de pyruvate, majoritairement converti en acétaldéhyde par la pyruvate décarboxylase (Pdc). L'acétaldéhyde est ensuite réduit en éthanol et, dans une moindre mesure, sert à la synthèse d'acétate et d'acétyl-CoA, pour la synthèse des acides gras. L'autre voie de dégradation du pyruvate est *via* le cycle des acides tricarboxyliques (TCA). La glycolyse est une voie neutre d'un point de vue rédox.

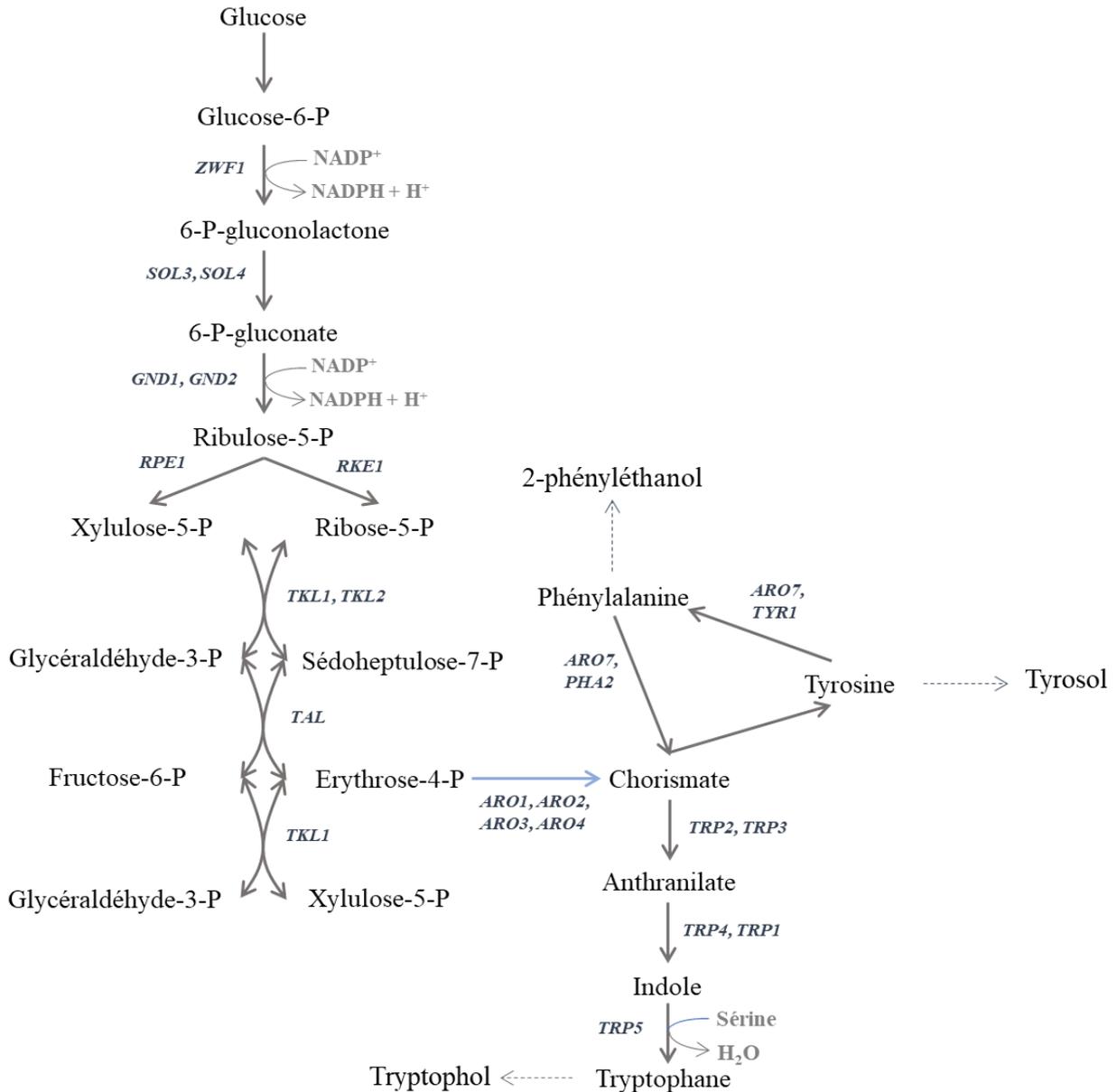
En conditions fermentaires, une répression catabolique des enzymes du TCA est exercée par le glucose présent dans le milieu (Gancedo, 2008). Ainsi, le complexe succinate déshydrogénase n'est pas actif au cours de la fermentation et cette voie ne fonctionne plus sous forme cyclique, mais comme étant la somme de deux branches ayant le succinate comme produit final (Camarasa *et al.*, 2003; Gombert *et al.*, 2001). La branche réductrice produit environ les deux tiers du succinate. La branche oxydative est principalement active lors de la phase de croissance, permettant la synthèse d' $\alpha$ -cétoglutarate, molécule clé du métabolisme azoté des levures.

Parallèlement à la production de pyruvate, le glucose est converti en glycérol, par la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (Gpd). La production de ce métabolite est importante car elle permet la ré-oxydation de NADH, synthétisé en excès lors de la production de biomasse (Nissen, 1997). De plus, le glycérol est un précurseur de la synthèse de phospholipides, et joue un rôle crucial pour lutter contre le stress osmotique provoqué par les concentrations élevées en sucres en début de fermentation (Blomberg & Adler, 1989).

Une autre voie présente chez les levures permet la dégradation des sucres : la voie des pentoses phosphate (VPP) (**Figure 3**), concernant 2 à 10 % du flux de carbone (Cadière *et al.*, 2011). Cette voie est majoritairement responsable de la régénération du NADPH, cofacteur de nombreux processus anaboliques. Lors de la croissance sur glucose, la VPP permet la régénération de 60 % du NADPH, le reste étant issu de l'acétaldéhyde déshydrogénase, enzyme NADP-dépendante (Blank *et al.*, 2005; Frick & Wittmann, 2005; van Dijken & Scheffers, 1986). Enfin, la VPP permet la synthèse de ribose-5-P et d'érythrose-4-P, intermédiaires importants du métabolisme des acides aminés aromatiques (Phe, Trp et Tyr) et des nucléotides.



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



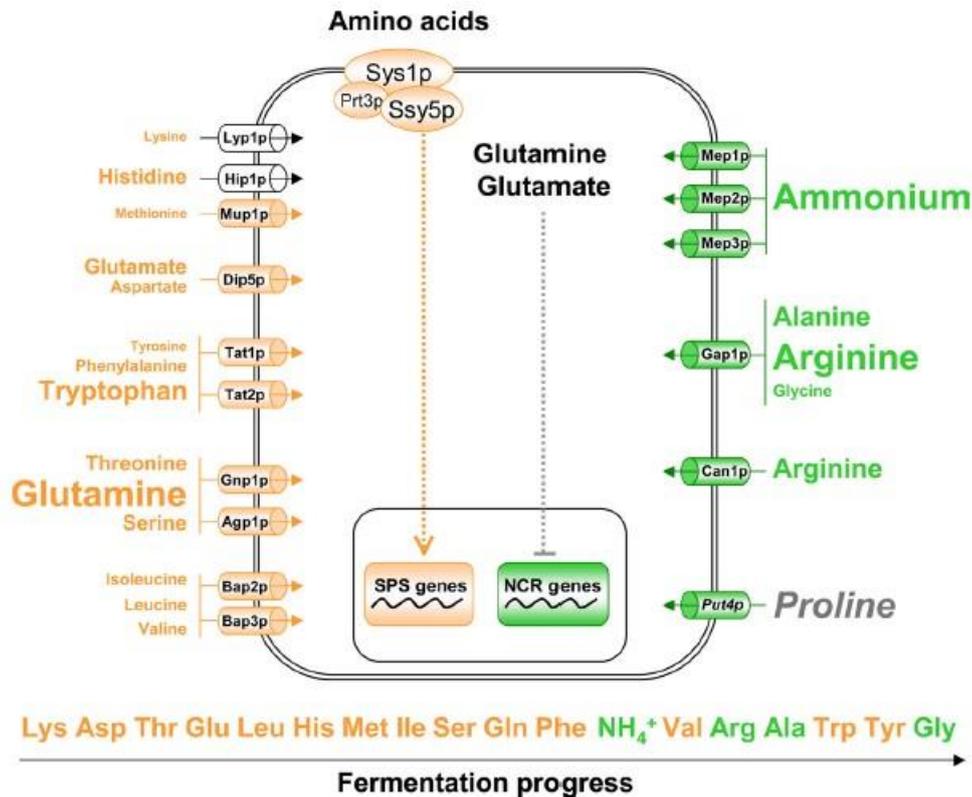
**Figure 3 :** Voie des pentoses phosphates chez *S. cerevisiae*

### 1.3.2. Métabolisme central azoté en conditions fermentaires

En fermentation, l'azote est un nutriment essentiel. De fait, la quantité d'azote assimilable disponible dans le moût conditionne de nombreux paramètres tels que la vitesse maximale de production de  $\text{CO}_2$ , la population maximale, et a un impact sur la production d'arômes fermentaires (Bely *et al.*, 1990b; Bisson, 1991; Rollero *et al.*, 2015). Les principales sources d'azote assimilable pour les levures sont l'ammonium, les acides aminés, ainsi que les peptides de petite taille (di- et tripeptides) (Cai *et al.*, 2007; Marsit *et al.*, 2016).

L'azote peut entrer dans la cellule *via* différents transporteurs. L'ammonium est importé grâce à trois transporteurs : Mep1p, Mep2p et Mep3p (Marini *et al.*, 1997). L'entrée des acides aminés dans la cellule, chez *S. cerevisiae*, est gérée par 24 transporteurs différents, chacun ayant des spécificités pour un ou plusieurs acides aminés (Ljungdahl & Daignan-Fornier, 2012). Chez *S. cerevisiae*, un seul transporteur permet l'entrée de tous les acides aminés : Gap1p (Grenson, 1966). Enfin, *S. cerevisiae* possède deux systèmes de transport pour l'import des peptides. Le premier permet l'entrée de peptides composés de quatre à cinq acides aminés et de glutathion, et met en jeu trois transporteurs : Ptr2p, Opt1p et Opt2p (Dequin & Casaregola, 2011; Marsit *et al.*, 2016). Le second est mis en place lorsqu'une carence azotée est présente, et met notamment en jeu la protéine Gcn4p (Hinnebusch, 2005).

Chez *S. cerevisiae*, le transport de l'azote est finement régulé. Ainsi, lorsque plusieurs sources d'azote sont disponibles dans le milieu, un mécanisme de répression catabolique se met en place (« Nitrogen Catabolic Repression » ou NCR), ayant pour conséquence la consommation préférentielle des sources azotées transportées par des perméases spécifiques, par l'inhibition des transporteurs des autres sources (ammonium, proline, arginine et transporteur général Gap1) (Magasanik & Kaiser, 2002). Ce mécanisme est rendu possible par un système de senseurs SPS (Ssy1p, Prt3p et Ssy5p) qui permet la détection des sources d'azote présentes dans le milieu, induisant la transcription des perméases correspondantes (Ljungdahl & Daignan-Fornier, 2012). En cas de carence azotée, un autre mécanisme se met en place : le contrôle général des acides aminés (« General Amino Acids Control » ou GAAC). Le GAAC induit un ralentissement du métabolisme fermentaire ainsi que la transcription de gènes en réponse à cette carence (Hinnebusch, 2005). Une étude menée par Crépin *et al.*, (2012) a permis de montrer que les mécanismes de régulation expliqués précédemment sont à l'origine de l'ordre d'assimilation des différents acides aminés chez *S. cerevisiae* (**Figure 4**).



**Figure 4 :** Liste des principaux transporteurs de sources d'azote avec leurs mécanismes de régulation chez *S. cerevisiae* (Crépin *et al.*, 2012).

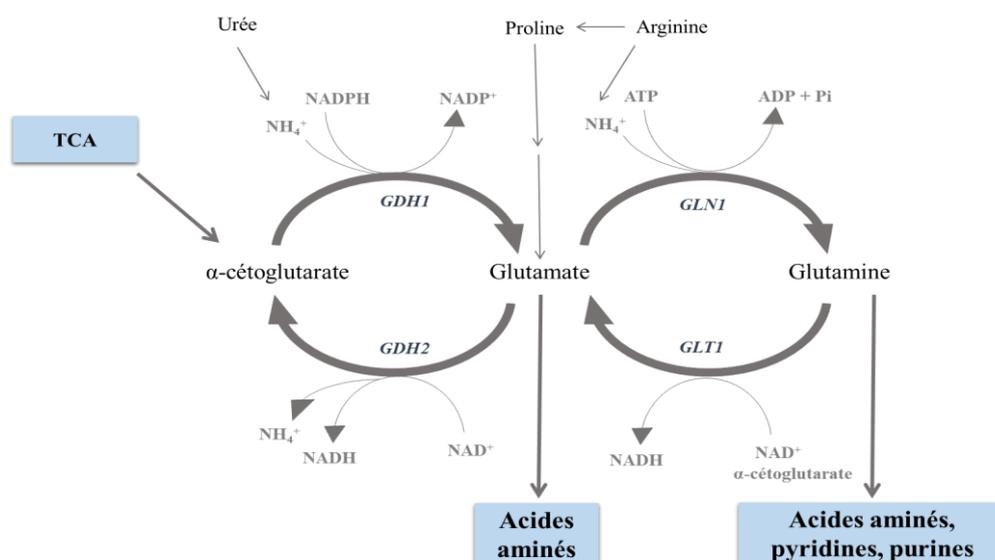
L'ordre de consommation des sources d'azote pendant la fermentation du vin est indiqué en bas. NCR : Nitrogen Catabolic Repressor ; Sensor System SPS : Ssy1p, Prt3p et Ssy5p.

En outre, certains travaux ont porté sur le comportement des levures en présence d'une seule source d'azote, afin d'établir l'efficacité de ces sources pour assurer la croissance cellulaire (Fairbairn *et al.*, 2017; Gobert *et al.*, 2017; Godard *et al.*, 2007; Kemsawasd *et al.*, 2015; Seguinot *et al.*, 2020a). La caractérisation des préférences peut être réalisée par le calcul du temps de génération des levures cultivées sur un milieu contenant une source unique d'azote, mais également en étudiant l'expression des gènes contrôlés par le NCR ou le GAAC (Godard *et al.*, 2007) (**Tableau 1**).

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

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

A l'intérieur des cellules, les différents acides aminés peuvent être stockés, directement utilisés pour la synthèse *de novo* de protéines, ou dégradés afin de libérer l'azote sous forme d'ammonium (ou glutamate) et de céto-acides. Ces derniers peuvent être réorientés vers le métabolisme carboné, au sein duquel ils seront utilisés pour la synthèse *de novo* d'acides aminés, ou pour la production d'arômes fermentaires *via* la voie d'Ehrlich (cf partie 3.2.2.). Quant à l'ammonium et au glutamate, ils rejoignent le métabolisme azoté (**Figure 5**). L'ammonium peut réagir avec l' $\alpha$ -cétoglutarate pour former du glutamate. Le glutamate peut réagir avec l'ammonium et aboutir à la synthèse de glutamine, de manière réversible (Magasanik & Kaiser, 2002).

**Figure 5** : Métabolisme azoté central chez *S. cerevisiae* (d'après Magasanik & Kaiser, 2002).

La synthèse *de novo* des acides aminés protéinogéniques s'effectue à partir d'un donneur de groupement amine et d'un précurseur carboné (Ljungdahl & Daignan-Fornier, 2012). Le glutamate et la glutamine assimilés lors de la fermentation (ou issus du métabolisme azoté) sont les principaux donneurs d'azote. L'alanine, en plus du glutamate, peut être utilisée en tant que donneur de groupement amine pour la synthèse de tyrosine et de phénylalanine, uniquement. Enfin, les précurseurs carbonés nécessaires sont issus du métabolisme carboné central (MCC) ainsi que du catabolisme des acides aminés. Les précurseurs carbonés ainsi que les acides aminés résultants sont répertoriés dans le **Tableau 2**.

**Tableau 2 :** Précurseurs carbonés pour la synthèse de novo des acides aminés chez *S. cerevisiae* (d'après Ljungdahl & Daignan-Fornier, 2012).

Précurseur carboné	Acides aminés
$\alpha$ -cétoglutarate	Glutamate, Glutamine, Arginine, Proline, Lysine
Phosphoénolpyruvate	Phénylalanine, Tyrosine, Tryptophane
3-phosphoglycérate	Sérine, Glycine, Cystéine, Méthionine
Oxaloacétate	Aspartate, Asparagine, Thréonine, Cystéine, Méthionine
Pyruvate	Alanine, Valine, Leucine, Isoleucine
5-phosphoribosyl pyrophosphate	Histidine

### *1.3.3. Métabolisme des arômes fermentaires majeurs*

Le vin est un produit extrêmement complexe dont les caractéristiques organoleptiques dépendent de nombreux composés d'arômes, aux origines diverses et variées (Lambrechts & Pretorius, 2000; Swiegers *et al.*, 2005). Ces composés sont classés en 4 grandes familles en fonction des étapes technologiques de la vinification : on distingue les composés d'arômes variétaux provenant du raisin sous forme libre odorante ou sous forme de précurseur inodore, les composés d'arômes pré-fermentaires produits en amont de la fermentation alcoolique, les

composés d'arômes issus des métabolismes levuriens et bactériens (production de *novo*) et les composés d'arômes de vieillissement produits par voie chimique essentiellement ou libérés à partir du bois de chêne des barriques en fonction du mode de vieillissement choisi. Les odeurs et arômes perçus peuvent être décrits comme positivement ou négativement selon les descripteurs associés aux molécules, et selon les concentrations (**Tableau 3**).

**Tableau 3 : Arômes communément trouvés dans le vin (d'après Swiegers *et al.*, 2005)**

Composés	Concentration dans le vin (mg/L)	Seuil de perception (mg/L)	Descripteurs
Acétate d'éthyle	22,5 – 63,5	7,5 <sup>1</sup>	Vernis
Acétate d'isoamyle	0,1 – 3,4	0,03 <sup>1</sup>	Banane, poire
Acétate de 2-phényléthyle	0 – 18,5	0,25 <sup>1</sup>	Floral, rose, fruité
Acétate d'isobutyle	0,01 – 1,6	1,6 <sup>2</sup>	Banane, fruité
Acétate d'hexyle	0 – 4,8	0,7 <sup>3</sup>	Bonbon, parfum
Butanoate d'éthyle	0,01 – 1,8	0,02 <sup>1</sup>	Floral, fruité
Hexanoate d'éthyle	0,03 – 3,4	0,05 <sup>1</sup>	Pomme verte
Octanoate d'éthyle	0,05 – 3,8	0,02 <sup>1</sup>	Savon doux
Décanoate d'éthyle	0 – 2,1	0,2 <sup>4</sup>	Savon
Propanol	9,0 – 68	500 <sup>3</sup>	Piquant, âpre
Butanol	0,5 – 8,5	150 <sup>1</sup>	Spiritueux
Isobutanol	9,0 – 174	40 <sup>1</sup>	Spiritueux
Alcool isoamylique	6,0 – 490	30 <sup>1</sup>	Amylique, âcre, solvant
Hexanol	0,3 – 6,0	4 <sup>3</sup>	Vert, herbacé
2-phényléthanol	4,0 – 197	10 <sup>1</sup>	Floral, rose
Acide acétique	100 – 1150	280 <sup>1</sup>	Vinaigre
Acétaldéhyde	10 – 75	100 <sup>1</sup>	Xérès, pomme abimée
Diacétyl	< 5	0,2 <sup>3</sup> / 2,8 <sup>3</sup>	Beurré
2-acétyl-1-pyrroline	Traces	0,0001 <sup>5</sup>	Goût de souris
2-acétyltétrahydropyridine	0,0048 – 0,1	0,0016 <sup>5</sup>	Goût de souris
4-éthylphénol	0,012 – 6,5	0,14 <sup>5</sup> / 0,6 <sup>3</sup>	Médicinal, basse-cour
4-éthylguaïacol	0,001 – 0,44	0,033 <sup>1</sup> / 0,11 <sup>3</sup>	Phénolique, doux
4-vinylphénol	0,04 – 0,45	0,2 <sup>5</sup>	Pharmaceutique

<sup>1</sup> 10% éthanol, <sup>2</sup> bière, <sup>3</sup> vin, <sup>4</sup> vin synthétique, <sup>5</sup> eau.

1.3.3.1. Généralités sur les composés d'arômes fermentaires majeurs

Les arômes fermentaires sont des molécules volatiles produites par le métabolisme levurien ou le métabolisme bactérien au cours de la fermentation alcoolique ou de la fermentation malolactique. Les composés d'arômes majoritaires produits par *S. cerevisiae* sont les alcools supérieurs, les esters et les acides gras. La production de ces différentes familles d'arômes est directement liée au MCC ainsi qu'au catabolisme des acides aminés.

**Les alcools supérieurs** sont décrits avec des notes peu favorables au profil organoleptique des vins, à l'exception du 2-phényléthanol, rappelant des notes de rose. Lorsque leur concentration totale est inférieure à 300 mg/L, ces composés participent positivement à la complexité aromatique des vins. En revanche, lorsque leur concentration est supérieure à 400 mg/L, ces molécules sont perçues négativement et peuvent amener des notes d'huile de fusel ou de solvant (Bell & Henschke, 2005; Cameleyre *et al.*, 2015; de-la-Fuente-Blanco *et al.*, 2016).

**Les acides gras à chaîne moyenne** sont des molécules avec un nombre pair d'atomes de carbone qui contribuent généralement de manière négative au bouquet aromatique des vins (San-Juan *et al.*, 2011). Lorsqu'ils sont en mélange, le seuil de perception des acides hexanoïque, octanoïque et décanoïque est évalué à 10 mg/L, mais cette concentration est rarement atteinte dans les vins (Shinohara, 1985). Ce sont cependant des molécules précurseurs des esters éthyliques linéaires, impliqués dans les notes fruitées des vins.

**Les esters** apportent des notes fruitées et florales aux vins. Deux catégories d'esters sont distinguées dans les vins selon les précurseurs impliqués dans leur formation : les esters acétiques d'alcools supérieurs et les esters éthyliques d'acides gras. Les esters acétiques d'alcools supérieurs tels que l'acétate d'isoamyle, l'acétate de 2-phényléthyle apportent des notes positives recherchées de banane et de rose pour apporter de la typicité aux vins. Néanmoins, à des concentrations trop élevées, certains esters acétiques d'alcools supérieurs tels que l'acétate d'éthyle peuvent être perçus comme des défauts car entraînant une odeur de solvant. Les esters éthyliques d'acides gras, comme l'hexanoate d'éthyle ou l'octanoate d'éthyle, sont synthétisés à partir des acides gras linéaires ou ramifiés et sont à l'origine de notes fruitées positives (Verstrepen *et al.*, 2003). Les esters éthyliques d'acides gras linéaires, liés au métabolisme des lipides, participent au bouquet des vins jeunes, mais leur concentration diminue au cours du vieillissement. Néanmoins, certains esters éthyliques ramifiés tels que le 2-méthylbutanoate d'éthyle et l'isovalérate d'éthyle, formés à partir d'acides gras ramifiés synthétisés par la voie d'Ehrlich, sont stables dans le temps, et leur concentration peut même augmenter au cours du temps, notamment par combinaison chimique de leur acide précurseur avec l'éthanol lors du vieillissement (Díaz-Maroto *et al.*, 2005; Lytra *et al.*, 2017; Pineau *et al.*,

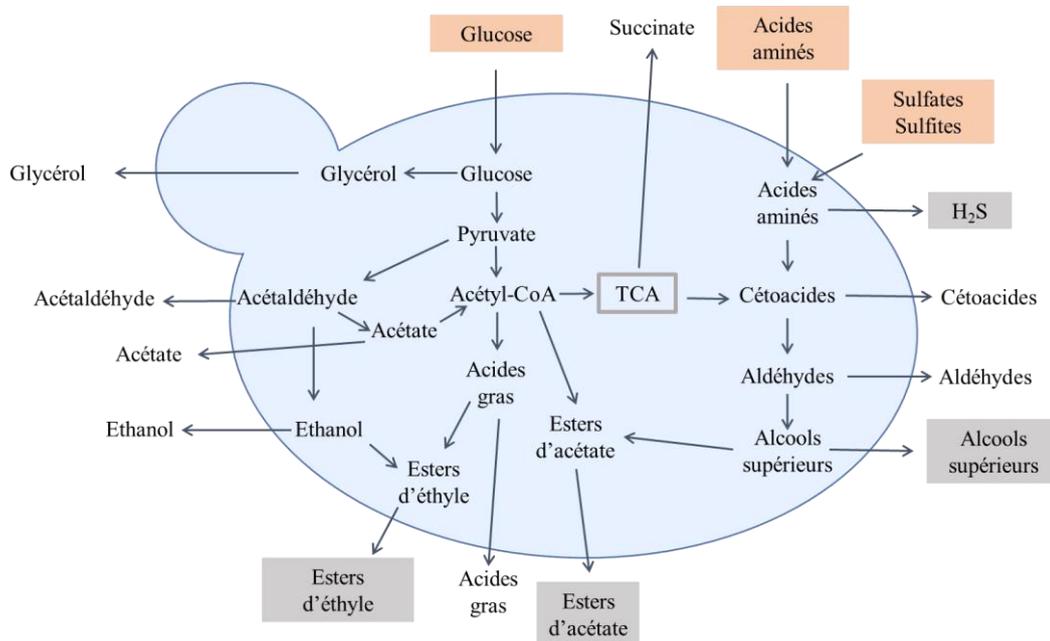
2009). Les concentrations obtenues sont ainsi la résultante du métabolisme de l'azote, de la formation des acides *via* la voie d'Ehrlich, et de la balance existant avec les alcools supérieurs. Il reste néanmoins compliqué de décrire la contribution des esters au profil organoleptique des vins car leur interaction fait apparaître des phénomènes synergiques (Escudero *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2000).

**Les composés soufrés** d'origine fermentaire sont associés à des défauts de réduction, amenant des notes d'eau croupie, de chou ou d'œuf pourri. Ces descripteurs sont liés à des composés soufrés dits légers avec un point d'ébullition inférieur à 90°C, tels que le sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S), les méthyl- et éthyl-mercaptans ainsi que les thioacétates (Park *et al.*, 1994). Les composés soufrés dits lourds avec un point d'ébullition supérieur à 90°C participent de manière plus complexe au bouquet des vins (Moreira *et al.*, 2008). Quantitativement, les composés soufrés ne sont pas les arômes fermentaires les plus produits, mais leur seuil de détection est si bas (autour du µg/L pour l'H<sub>2</sub>S et l'éthanethiol par exemple) qu'ils peuvent avoir une grande influence sur le profil organoleptique d'un vin (Goniak & Noble, 1987; Siebert *et al.*, 2009).

Il faut également noter que certains composés soufrés d'origine variétale sont positifs, tels que, le 4-mercapto-4-méthylpentan-2-one (4MMP), l'acétate de 3-mercaptohexyle (3MHA) et le 3-mercaptohexan-1-ol (3MH), dont les descripteurs associés sont les agrumes, le bourgeon de cassis ou encore le fruit de la passion. Leurs seuils de détection sont également bas, entre 0,8 et 60 ng/L (Bouchilloux *et al.*, 1998; Darriet *et al.*, 1995; Roland *et al.*, 2011; Tominaga *et al.*, 2000, 1998). Les levures ont également un rôle important dans la libération des arômes variétaux par hydrolyse de précurseurs non aromatiques présents dans le moût de raisin. Certaines molécules sont décrites comme étant majoritairement, voire exclusivement variétales, tels que les thiols ou les terpènes. La 4MMP, la 3MHA et le 3MH possèdent différents précurseurs. En effet, les 4MMP et 3MH sont libérés à partir de précurseurs par l'action d'une β-lyase qui catalyse l'hydrolyse de la liaison thioester entre le précurseur et la molécule aromatique (Tominaga *et al.*, 1995). Différents types de précurseurs ont été mis en évidence. D'une part, les précurseurs cystéinylés (Cys-3MH et Cys-4MMP) ont été identifiés pour la première fois dans le Sauvignon Blanc puis dans de nombreux cépages et, d'autre part, les précurseurs glutathionylés (G3MH et G4MMP) ont été identifiés dans du moût de Melon B. (Roland *et al.*, 2010a, 2010b; Tominaga *et al.*, 1998). Il existe également des précurseurs sous forme de dipeptides (Bonnaffoux *et al.*, 2018).

1.3.3.2. Voies de synthèse des arômes fermentaires

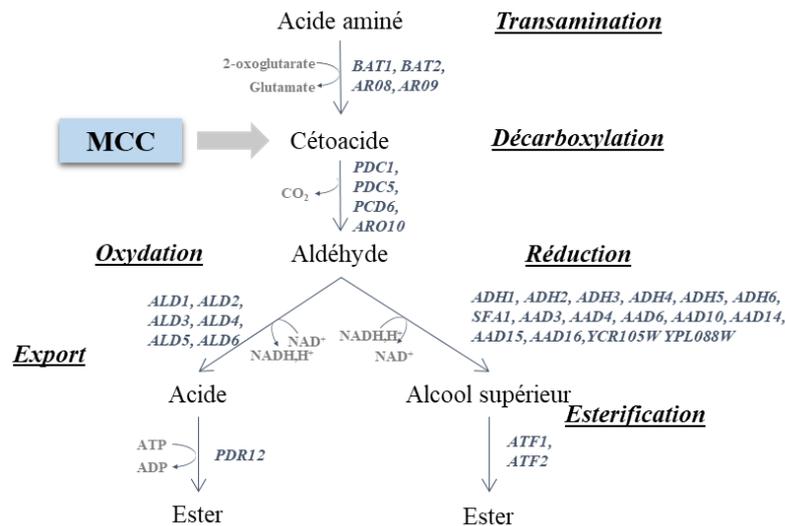
La synthèse des composés d'arômes majoritaires dans le vin est complexe, interconnectée et met en jeu le métabolisme azoté *via* la voie d'Ehrlich, le métabolisme carboné, le métabolisme soufré ainsi que le métabolisme des lipides (**Figure 6**).



**Figure 6 :** Schéma des métabolismes carboné, azoté et soufré, et leur implication dans la biosynthèse des arômes fermentaires majeurs (d'après Swiegers *et al.*, 2005).

a) Synthèse des alcools supérieurs et des esters acétiques d'alcools supérieurs

Les alcools supérieurs sont synthétisés par l'intermédiaire de cétoacides provenant du catabolisme des acides aminés *via* la voie d'Ehrlich (leucine, phénylalanine, valine, isoleucine, thréonine, méthionine) ou bien synthétisés *de novo* à partir du MCC (Lambrechts & Pretorius, 2000). Chez *S. cerevisiae*, les alcools supérieurs sont produits en 3 étapes (Hazelwood *et al.*, 2008) (**Figure 7**).



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

L'acide aminé est converti en cétoacide grâce à des aminotransférases codées par les gènes *BAT1*, *BAT2*, *ARO8* et *ARO9*. Au cours de cette étape, du glutamate est formé, confirmant son rôle de métabolite clé dans la redistribution des sources azotées. Puis, le cétoacide est converti en aldéhyde par des pyruvate décarboxylases codées par les gènes *PDC1*, *PDC5* et *PDC6*, ainsi que par une phénylpyruvate décarboxylase codée par *ARO10* (Dickinson *et al.*, 2003; Hohmann *et al.*, 1992; Vuralhan *et al.*, 2003). Ces gènes sont exprimés en fonction de la nature du cétoacide (Hazelwood *et al.*, 2008). Enfin, l'aldéhyde obtenu subit soit une oxydation aboutissant à la formation d'un acide, soit une réduction pour être converti en alcool supérieur. Ces réactions sont respectivement catalysées par une aldéhyde déshydrogénase (menant à la synthèse d'un acide) ou une alcool déshydrogénase (menant à la synthèse d'un alcool supérieur).

Il a également été montré que la plupart des alcools supérieurs peuvent être formés *via* le MCC (Bell & Henschke, 2005; Hazelwood *et al.*, 2008). En revanche, seule une faible partie des alcools supérieurs provient du squelette carboné des acides aminés correspondants. En effet, la majorité provient de composés issus du MCC, expliquant le fait que la synthèse des alcools supérieurs se fasse tout au cours de la fermentation alcoolique, malgré l'épuisement des ressources azotées (Crépin *et al.*, 2017; Molina *et al.*, 2007; Rollero *et al.*, 2017).

Les esters acétiques d'alcools supérieurs sont obtenus après réaction entre un alcool supérieur et un acétyl-CoA, grâce à des alcools acétyltransférases codées par les gènes *ATF1* et *ATF2* chez *S. cerevisiae* (Malcorps *et al.*, 1991; Minetoki *et al.*, 1993). L'enzyme Atf1p est

responsable de 80 % de la production d'acétate d'isoamyle et 75 % de l'acétate de 2-phényléthyle (Verstrepen *et al.*, 2003). Néanmoins, il est probable qu'une troisième enzyme soit impliquée car la production d'esters acétiques d'alcools supérieurs est toujours maintenue mais dans une moindre proportion après délétion des gènes *ATF1* et *ATF2* (Lilly *et al.*, 2000; Verstrepen *et al.*, 2003).

b) Synthèse des acides gras à moyenne chaîne et des esters éthyliques d'acides gras

Les acides gras sont des molécules provenant du métabolisme des lipides. Ces acides sont excrétés par les levures ou converties en esters éthyliques d'acides gras décrits ci-dessous (Bisson, 1991; Fleet, 1993). Les acides gras saturés à nombre pair d'atomes de carbone proviennent de la synthèse des acides gras à longue chaîne ou de la  $\beta$ -oxydation (Schreier & Jennings, 1979). Cette dernière nécessitant la présence d'oxygène, elle n'est active qu'en début de fermentation et est donc minoritaire. Les acides gras sont ainsi formés par l'ajout de 2 atomes de carbone sur un acyl-CoA. Le premier d'entre eux est l'acétyl-CoA, formé par décarboxylation du pyruvate. Les différentes élongations des acides gras sont catalysées par un complexe multienzymatique appelé FAS 1/2 (Fatty Acid Synthase) (Lynen *et al.*, 1980).

Les esters éthyliques d'acides gras sont le résultat de la réaction entre l'éthanol et un acide gras, catalysée par des enzymes codées par les gènes *EEB1* et *EHT1*. L'enzyme Eeb1p est la plus impliquée dans cette réaction, et est également impliquée dans le métabolisme des lipides. Eht1p n'est impliquée que dans la synthèse d'hexanoate d'éthyle (Saerens *et al.*, 2008).

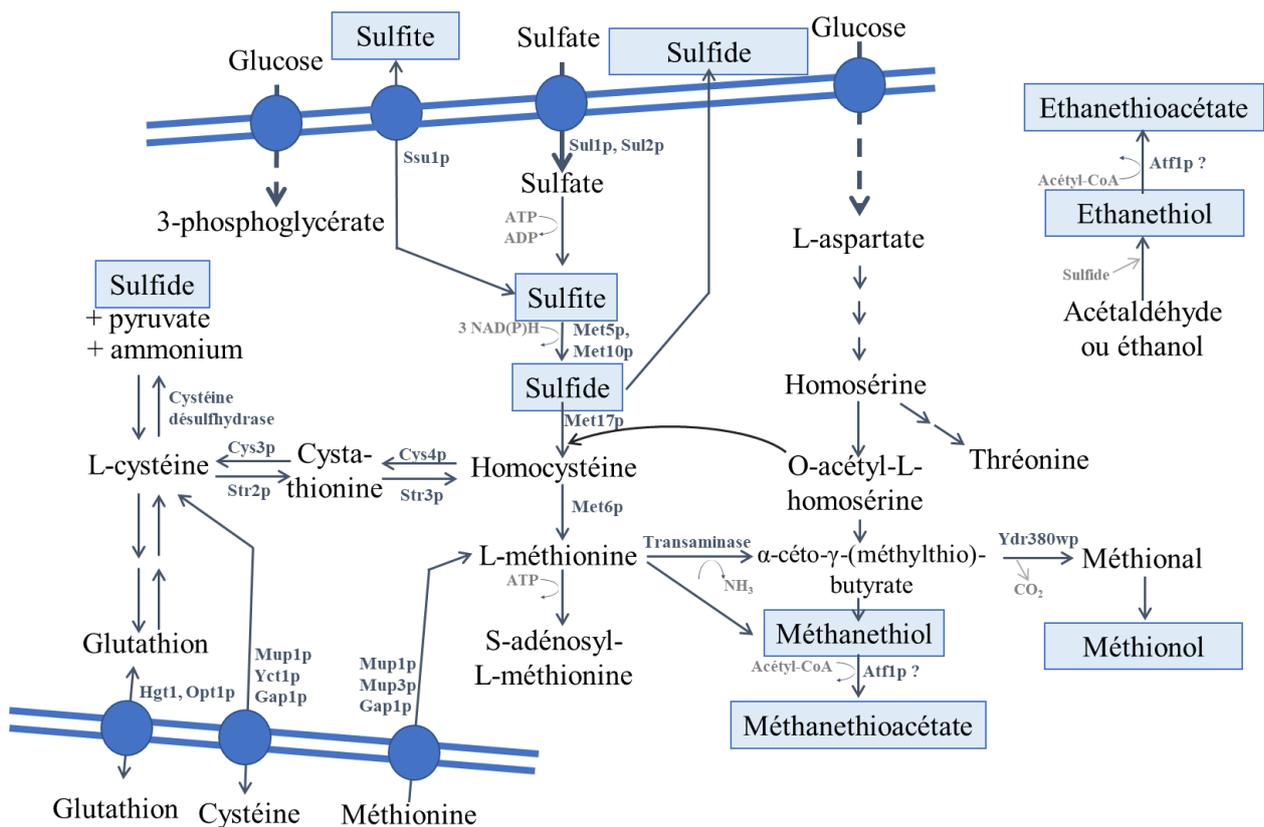
c) Synthèse des composés soufrés

De nombreuses études ont été entreprises pour expliquer l'évolution de la concentration en H<sub>2</sub>S pendant la fermentation (Rauhut, 2009; Swiegers & Pretorius, 2007; Ugliano & Henschke, 2009).

Les sulfates (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) et les sulfites (SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) sont convertis en sulfides (S<sup>2-</sup>) par *S. cerevisiae* via la séquence de réduction des sulfates (**Figure 8**) (Eschenbruch, 1974; Jiranek *et al.*, 1995; Rankine, 1963; Stratford & Rose, 1985; Vos & Gray, 1979). Malgré une fine régulation de la réduction des sulfates par les levures, celle des sulfites est incontrôlée (Jiranek *et al.*, 1995). Durant la fermentation, l'H<sub>2</sub>S est produit, et les réactions pouvant exister avec d'autres molécules présentes dans le moût sont encore mal connues. L'une des hypothèses est la présence d'autres sources d'H<sub>2</sub>S, telles que le glutathion et les acides aminés soufrés, mais les voies mises en jeu sont peu connues (Winter *et al.*, 2011).

L'H<sub>2</sub>S est ensuite converti en cystéine, méthionine et glutathion après une série de réactions enzymatiques (Smith *et al.*, 2015). Les acides aminés soufrés sont utilisés pour la synthèse protéique lors de la croissance cellulaire, tandis que les trois molécules précédemment citées peuvent ensuite être excrétées de la cellule et se retrouver dans le vin. Le glutathion peut être dégradé en cystéine et la cystéine désulfhydrase permet le relargage d'H<sub>2</sub>S à partir de cystéine en cas de carence azotée (Elskens *et al.*, 1991; Hallinan *et al.*, 1999; Tokuyama *et al.*, 1973). La méthionine peut être convertie en méthanethiol, après transamination suivie d'une activité déméthiolase (Perpète *et al.*, 2006).

Les thioacétates dérivant du méthanethiol et de l'éthanethiol sont présents dans le vin entre 0 et 180 µg/L (Fedrizzi *et al.*, 2007; Leppanen *et al.*, 1980; Mestres *et al.*, 2000). Néanmoins, leur seuil de détection est plus élevé que leur thiol correspondant, pouvant les rendre imperceptibles lors de la dégustation. A pH acide, les thioesters peuvent être hydrolysés en thiols, potentielles sources de composés soufrés volatils (Leppanen *et al.*, 1980).



**Figure 8 :** Métabolisme des sulfates et des sulfites chez *S. cerevisiae* (d'après Smith *et al.*, 2015 ; Ugliano & Henschke, 2009).

## 1.4. Diversité des souches de levures du consortium œnologique

Les levures sont des microorganismes unicellulaires eucaryotes, ayant un mode de reproduction sexué ou asexué, et dont la croissance peut être maîtrisable et relativement rapide. Environ 150 genres et 1500 espèces de levures sont connus (Kurtzman, 2011).

### 1.4.1. Diversité de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*

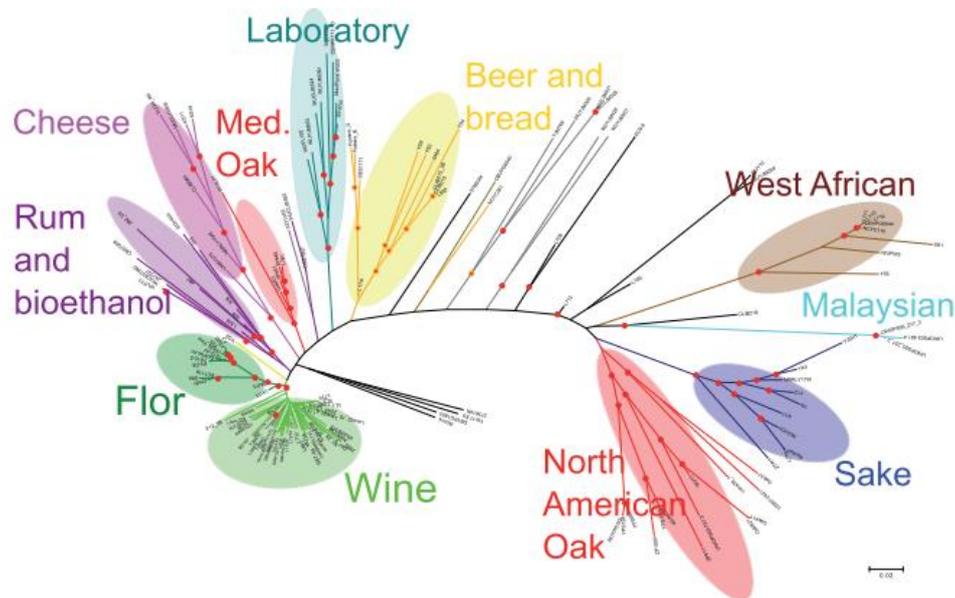
L'espèce *S. cerevisiae* a été le premier eucaryote dont le génome a été séquencé (Goffeau *et al.*, 1996). La souche S288C possède ainsi 16 chromosomes et 12 millions de paires de nucléotides. Depuis cette période, cette souche a permis le développement de nouveaux champs de recherche, tels que les réseaux d'interaction de gènes ou de protéines, ainsi que de nouvelles techniques de génomique fonctionnelle (Botstein & Fink, 2011).

Cette espèce joue un rôle crucial dans de nombreux procédés de fermentations alimentaires, permettant la fabrication, mais également la conservation de produits tels que le pain, le fromage, le vin, la bière ou encore le cidre, parmi tant d'autres (Cavalieri *et al.*, 2003; McGovern *et al.*, 2004). En parallèle, l'espèce *S. cerevisiae* est devenue un outil biotechnologique en tant qu'hôte pour la production de molécules à valeur ajoutée telles que les biocarburants ou les arômes.

Ainsi, *S. cerevisiae* est présente dans de nombreux environnements anthropiques (brasserie, vignoble, cave, ...). Elle est également retrouvée dans certains environnements naturels (plantes et fruits notamment). De par cette diversité d'environnements, des grandes diversités génétique et phénotypique existent au sein de cette espèce (Barbosa *et al.*, 2012; Blanco *et al.*, 2013; Camarasa *et al.*, 2011). Récemment, le séquençage de nombreuses souches provenant de niches écologiques différentes (vin, rhum, fromage, bière, saké, chêne...) a permis de montrer l'histoire de l'évolution de cette espèce au cours du temps (Legras *et al.*, 2018; Peter *et al.*, 2018) (**Figure 9**).

Originellement, les levures œnologiques forment un groupe spécifique, divergeant d'une souche unique, et proviendraient de Mésopotamie (Legras *et al.*, 2007; Liti *et al.*, 2009; Schacherer *et al.*, 2009). Généralement, les souches de *S. cerevisiae* œnologiques sont hétérozygotes et homothalliques (Bradbury *et al.*, 2006; Mortimer, 2000). Le génome de la souche commerciale Lalvin EC1118® présente une divergence nucléotidique de 0,5 % comparé

au génome de la souche S288C. Trois nouvelles régions (d'une taille de 120 kb) provenant d'espèces différentes ont été identifiées chez EC1118 (Galeote *et al.*, 2011).



**Figure 9** : Arbre phylogénétique de souches de *S. cerevisiae* après étude de leur génome complet (Legras *et al.*, 2018)

Ces régions portent 34 nouveaux gènes pouvant conférer des avantages pour l'adaptation des souches œnologiques à leur environnement. En effet, deux de ces gènes codent pour un transporteur de fructose et un transporteur d'oligopeptides, ayant permis à *S. cerevisiae* d'obtenir des fonctions nouvelles (Damon *et al.*, 2011; Galeote *et al.*, 2010). Une étude a mis en lumière le rôle des gènes *FOT* (transporteurs de peptides), conférant un avantage adaptatif à ces souches, en augmentant la diversité qualitative des petits peptides comme source d'azote pouvant être utilisée par la levure (Marsit *et al.*, 2015).

De plus, des études ont porté sur la variabilité de certains paramètres en conditions fermentaires, tels que le taux de croissance, la taille des cellules, ou encore la population maximale, montrant des comportements divergents pendant la fermentation (Albertin *et al.*, 2011; Spor *et al.*, 2009). Certaines souches génèrent une population maximale élevée composée de cellules de petite taille, en consommant lentement le glucose, alors que d'autres souches génèrent une population maximale plus faible, de cellules plus grosses, avec une consommation plus rapide du glucose. Une autre étude a porté sur la diversité de certains traits métaboliques, de la cinétique fermentaire et de la croissance, lors de la fermentation de 72 souches en conditions œnologiques. Camarasa *et al.* (2011) ont ainsi montré que l'évolution de ces souches était due à certaines contraintes environnementales, ainsi qu'à la sélection humaine. Enfin, un dernier

pan de la diversité des souches de *S. cerevisiae* en œnologie est lié à leur capacité à fermenter des moûts carencés en azote ou en oxygène (Blateyron & Sablayrolles, 2001; Julien *et al.*, 2000).

#### 1.4.2. Diversité des espèces non-Saccharomyces

Les levures indigènes non-*Saccharomyces* sont naturellement présentes sur la baie du raisin (ou dans le moût) ou -dans une moindre mesure- sur les équipements de la cave avant la fermentation (Pretorius *et al.*, 1999; Zott *et al.*, 2008). De nombreuses espèces ont été retrouvées en fermentation œnologique, et leur présence dépend notamment de l'origine géographique du raisin, du cépage et des pratiques viti-vinicoles (**Tableau 4**) (Barata *et al.*, 2012; Jolly *et al.*, 2006; Loureiro, 2003; Ocón *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2015).

**Tableau 4 : Liste non-exhaustive des principales espèces retrouvées dans le secteur œnologique (d'après Barata *et al.*, 2012 ; Wang *et al.*, 2015)**

Genre	Espèces prédominantes
<i>Aureobasidium</i>	<i>A. pullulans</i>
<i>Debaryomyces</i>	<i>D. hansenii</i>
<i>Hanseniaspora</i>	<i>H. guilliermondii</i> <i>H. opuntiae</i> <i>H. osmophila</i> <i>H. thailandica</i> <i>H. uvarum</i> <i>H. valbyensis</i> <i>H. vineae</i>
<i>Issatchenkia</i>	<i>I. terricola</i>
<i>Lachancea</i>	<i>L. fermentati</i> <i>L. thermotolerans</i>
<i>Metschnikowia</i>	<i>M. fructicola</i> <i>M. pulcherrima</i>
<i>Meyerozyma</i>	<i>Mey. guilliermondii</i>

Genre	Espèces prédominantes
<i>Pichia</i>	<i>P. fermentans</i> <i>P. guilliermondii</i> <i>P. kluyveri</i> <i>P. occidentalis</i> <i>P. terricola</i>
<i>Rhodotorula</i>	<i>R. mucilaginosa</i>
<i>Saccharomyces</i>	<i>S. bayanus</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>S. pastoranus</i>
<i>Schizosaccharomyces</i>	<i>Sc. Pombe</i>
<i>Starmerella</i>	<i>Starm. bombicola</i> <i>Starm. bacillaris</i>
<i>Torulasporea</i>	<i>T. delbrueckii</i>
<i>Zygosaccharomyces</i>	<i>Zy. bailiee</i> <i>Zy. rouxii</i>
<i>Wickerhamomyces</i>	<i>W. anomalus</i>

Elles ont longtemps été considérées comme pouvant détériorer la qualité du produit fini, car elles étaient isolées lors de fermentations incomplètes ou encore dans des vins présentant des défauts, de type phénols volatils ou piqûre acétique (du Toit & Pretorius, 2000; Escott *et al.*,

2017; Jolly *et al.*, 2013; Padilla *et al.*, 2016; Ribereau-Gayron & Peynaud, 1960). Afin de lutter contre ces conséquences néfastes, des stratégies ont été développées au cours du temps pour limiter le développement des levures non-*Saccharomyces*, notamment l'usage de SO<sub>2</sub> et le levurage des moûts avec des souches sélectionnées de *S. cerevisiae* (Egli *et al.*, 1998; Ough & Crowell, 1987). Néanmoins, certaines levures non-*Saccharomyces* issues du consortium œnologique ont des caractéristiques qui peuvent être intéressantes en œnologie. Ainsi, certaines de ces levures sont d'ores et déjà disponibles commercialement. Malgré ces potentialités intéressantes, il n'y a, à l'heure actuelle, aucune levure non-*Saccharomyces* commerciale capable de consommer la totalité des sucres présents dans le jus de raisin. Ainsi, elles sont toujours associées à *S. cerevisiae* afin de s'assurer de la réalisation complète de la fermentation. Dans cette optique, deux modes d'inoculation sont possibles. Le premier est la co-inoculation, au cours de laquelle la (ou les) levure(s) non-*Saccharomyces* sont inoculées en même temps, mais dans des taux différents (taux plus faible pour *S. cerevisiae*). Le deuxième mode est l'inoculation séquentielle, où la levure non-*Saccharomyces* est inoculée en premier. Dans un second temps, après le début de fermentation (après 24 h ou après 48 h) la souche de *S. cerevisiae* est inoculée.

La partie suivante fait état des particularités phénotypiques décrites chez *Starm. bacillaris*, espèce qui a été utilisée au cours de ce projet.

#### *1.4.3. Starmerella bacillaris : diversité et intérêts œnologiques*

*Starmerella bacillaris* (ex *Candida zemplanina* et *Candida stellata*) a été décrite pour la première fois par Kromer & Krum. Cette espèce est systématiquement retrouvée dans le jus de raisin à une concentration élevée (entre 10<sup>3</sup> et 10<sup>5</sup> UFC/mL), quel que soit le cépage ou la région du monde (Csoma & Sipiczki, 2008; Duarte *et al.*, 2012; Nisiotou *et al.*, 2007; Šipiczki, 2004; Šipiczki *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2014; Tristezza *et al.*, 2013; Zott *et al.*, 2011).

La diversité génétique de 163 souches de *Starm. bacillaris* provenant de 28 régions isolées dans l'environnement œnologique a été analysée par une approche de microsatellites (10 marqueurs) (Masneuf-Pomarede *et al.*, 2015). Une grande variabilité a été mise en évidence en fonction de la région de provenance, mais aucune des populations isolées n'a montré de signature génétique spécifique d'une région. *Starm. bacillaris* n'est donc pas une espèce subissant une pression de sélection dans cet environnement (Masneuf-Pomarede *et al.*, 2015). Le cycle de vie de *Starm. bacillaris* n'est pas encore élucidé à ce jour, même si certaines de ses caractéristiques sont

connues, comme son incapacité à former des ascospores, et son caractère principalement haploïde (Šipiczki, 2003).

Malgré certaines divergences génétiques, *Starm. bacillaris* possède des traits caractéristiques communs à l'ensemble de l'espèce. Cette levure est acidogène, psychrotolérante et osmotolérante, et donc adaptée à la fermentation alcoolique, notamment pour les vins doux (Pfliegler *et al.*, 2014; Rantsiou *et al.*, 2012; Šipiczki, 2004). De plus, elle possède un fort caractère fructophile, ce qui lui permet de consommer une grande partie du fructose initialement présent (Englezos *et al.*, 2018, 2017). Le rendement en éthanol est plus faible avec *Starm. bacillaris*, notamment par la production d'autres métabolites carbonés tels que le glycérol ou le pyruvate (Giovanna *et al.*, 2012; Zara *et al.*, 2014). Elle permet également l'acidification du milieu, par la production d'acides organiques provenant du MCC, notamment l'acide pyruvique (Magyar *et al.*, 2014). Cette acidification peut être bénéfique, car elle peut augmenter la stabilité microbiologique en fin de fermentation. Enfin, l'utilisation de *Starm. bacillaris* participe à la production de terpènes dans des matrices naturelles (comparée à *S. cerevisiae*), de par sa capacité à produire une large gamme d'enzymes hydrolytiques extracellulaires (Englezos *et al.*, 2015; Mestre Furlani *et al.*, 2017).

*Starm. bacillaris* étant incapable de consommer la totalité des sucres, elle est utilisée en fermentations mixtes avec *S. cerevisiae* (**Tableau 5**). Il s'agit alors de trouver un compromis dans la conduite de la fermentation, permettant à *Starm. bacillaris* d'exprimer son potentiel phénotypique sans limiter l'activité de *S. cerevisiae* en fin de procédé. Pour cela, de nombreux paramètres ont été étudiés, notamment le ratio d'inoculation entre les 2 espèces, le timing d'inoculation de *S. cerevisiae* et la consommation des nutriments (Albergaria & Arneborg, 2016; Ciani *et al.*, 2016a; Ciani & Comitini, 2015; Kemsawasd *et al.*, 2015). Comitini *et al.* (2011) ont montré qu'un ratio 10 000 : 1 en faveur de *Starm. bacillaris* permettait sa croissance et sa présence tout au long de la fermentation ainsi qu'une diminution de la concentration en éthanol et du pH du vin obtenu. Une inoculation séquentielle, avec une inoculation de *S. cerevisiae* 48 h après *Starm. bacillaris*, semble préférable à une co-inoculation. Cela permet de diminuer la concentration en éthanol du produit, au profit de la formation de glycérol. L'inoculation séquentielle permet également de limiter les problèmes observés en co-fermentations, et liés à des fermentations languissantes voire des arrêts de fermentation dus à des interactions de contact « cellule-cellule » entre les deux souches (Englezos *et al.*, 2016a; Mateo & Maicas, 2016). Pour piloter au mieux l'inoculation séquentielle, les besoins de *Starm. bacillaris*, notamment en azote ont été étudiés (Englezos *et al.*, 2018). La quantité d'azote consommée dépend de la souche utilisée, mais les tendances observées sont les mêmes. La

consommation des sources azotées par *Starm. bacillaris* est toujours incomplète, ce qui permettrait à *S. cerevisiae* de disposer d'assez de nutriments de cette nature pour consommer la fin des sucres. Englezos *et al.* (2018) ont également noté la production (ou l'excrétion) de certains acides aminés, notamment la leucine ou l'alanine.

*Starm. bacillaris* a également été étudiée comme un potentiel agent de biocontrôle. Lemos Junior *et al.*, (2020) ont montré que cette espèce permettait de limiter le développement de la pourriture grise, en empêchant la croissance de *Botrytis cinerea*, dans le domaine du cidre. Cette inhibition de la croissance est liée à la production d'alcool benzylique par *Starm. bacillaris*, molécule connue pour son action antimicrobienne et dérivant du benzaldéhyde.

**Tableau 5 : Impacts de *Starmerella bacillaris* en fermentations mixtes avec *S. cerevisiae* (d'après Englezos *et al.*, 2017).**

Méthode d'inoculation	Impact sur la composition chimique et sur les propriétés organoleptiques	Cépage	Référence
<b>Co-inoculation</b>	+ caractères floral et "banane"	Chardonnay	Soden <i>et al.</i> , 2000
	+ alcools supérieurs, esters éthyliques et acides gras à chaîne courte	Macabeu	Andorrà <i>et al.</i> , 2012
	+ glycérol, acidité totale et amines biogéniques - acétate d'éthyle, alcool isoamylique, hexanol, octanol et 2 -phényléthanol	Montepulciano d'Abruzzo	Giovanna <i>et al.</i> , 2012
	+ glycérol et polysaccharides	Moût de rouge	Comitini <i>et al.</i> , 2011
<b>Séquentielle</b>	+ glycérol et complexité aromatique	Barbera	Englezos <i>et al.</i> , 2016b
	+ glycérol et acétate d'éthyle - éthanol	Chardonnay	Soden <i>et al.</i> , 2000
	+ glycérol, pyruvate et vitisine A	Sangiovese	Romboli <i>et al.</i> , 2015
	- tyrosol, terpènes, thiols et lactones	Sauvignon blanc	Sadoudi <i>et al.</i> , 2012
	+ glycérol - éthanol	Sauvignon blanc	Ciani <i>et al.</i> , 2016
	+ glycérol et acidité totale - éthanol et pH	Barbera	Englezos <i>et al.</i> , 2016a
	+ glycérol et anthocyanines - éthanol	Barbera	Rolle <i>et al.</i> , 2018
	+ glycérol et acide acétique - éthanol	Merlot, Frappato	Giaramida <i>et al.</i> , 2016

## **2. Les arômes non-conventionnels**

Au-delà des arômes fermentaires majoritaires précédemment décrits, il existe une large gamme de composés produits par les levures. Trois familles de composés chimiques regroupant 19 molécules ont été particulièrement étudiées au cours de cette thèse : les terpènes, les dérivés benzéniques et les lactones (**Tableau 6**). Ces composés peuvent être retrouvés dans les vins à des concentrations faibles, mais leur apport peut être important pour la qualité sensorielle des vins. De plus, la formation de ces composés a été moins étudiée dans le secteur œnologique.

### **2.1. Les terpènes**

#### *2.1.1. Généralités sur les terpènes*

Par définition, les terpènes sont des polymères composés d'unités d'isoprènes de 5 atomes de carbone. Les familles de terpènes sont classées en fonction du nombre d'unités les composant : hémi-(C5), mono-(C10), sesqui-(C15), di-(C20), disesqui- et tri- (C25 et C30, respectivement). Les terpènes constituent une grande famille de composés chimiques, avec, à ce jour, plus de 70 000 molécules recensées (Pérez-Gil *et al.*, 2017). Les terpènes sont produits par la majorité des organismes vivants, quelque soit leur règne. La famille des terpènes est très diversifiée, tant au niveau structural que fonctionnel. Biologiquement, ils jouent des rôles essentiels dans de nombreux procédés. En effet, ils sont impliqués dans le métabolisme respiratoire (quinones), dans la conversion photochimique, mais également dans le transport d'électrons, ou le maintien de l'intégrité de la membrane (Gershenson & Dudareva, 2007). Les isoprénoïdes ont également de nombreuses fonctions métaboliques secondaires, dont certaines sont utilisées à l'échelle industrielle : biocarburants, pigments et parfums (Vickers *et al.*, 2015).

Les végétaux sont les organismes disposant de la plus grande diversité structurale et fonctionnelles concernant ces composés, de par leur métabolisme secondaire complexe, et leurs interactions avec leur environnement. Ainsi, les dérivés terpéniques sont des signaux chimiques émis par plusieurs plantes pour la pollinisation ou la défense contre des pathogènes. Chez les végétaux, certains terpènes ont également des propriétés odoriférantes (géranium, par exemple). Dans cette revue bibliographique, seulement les productions de monoterpénols, de terpénylacétates et de sesquiterpènes seront traitées, car ce sont des composés retrouvés dans le vin et pouvant avoir un impact organoleptique.

**Tableau 6 : Présentation des composés d'arômes non-conventionnels étudiés au cours de cette thèse.**

Familles chimiques	Molécules	Descripteurs	Seuils de perception (µg/L)	Concentrations retrouvées dans le vin (µg/L)	Précurseurs connus	Métabolismes impliqués
Terpènes	Linalool	Floral	0,6 <sup>1</sup> , 25 <sup>2,a</sup>	1-1400 <sup>g</sup>	IPP, GPP, Leucine, précurseurs variétaux <sup>j,k</sup>	Stérols, lipides, catabolisme leucine
	Géranol	Rose	5 <sup>1</sup> , 30 <sup>2,a</sup>	1-300 <sup>g</sup>		
	Nérol	Frais, Rose	300 <sup>2,a</sup>	0-100 <sup>g</sup>		
	Citronellol	Rose, nuances de citronnelle	8 <sup>1</sup> , 40 <sup>1</sup> , 100 <sup>2,a</sup>	0-25 <sup>g</sup>		
	α-terpinéol	Muguet, pin	350 <sup>1</sup> , 250 <sup>2,a</sup>	0-26 <sup>g</sup>		
	Géranyl acétate	Rose, fruité	9 <sup>1,a</sup>	nd		
	α-citral	Floral, citronné	32 <sup>1,b</sup>	nd		
	β-citral	Floral, citronné	30 <sup>1,b</sup>	nd		
	Nootkatone	Pamplemousse	1 <sup>1</sup>	nd	Valencène <sup>k</sup>	
Dérivés benzéniques	Vanilline	Vanille	320 <sup>3,c</sup>	10-600 <sup>c</sup>	Acide férulique, Eugénol, Isoeugénol, Glucose <sup>L</sup>	Métabolisme carboné, Métabolisme acides aminés, Vieillessement
	4-vinyl guaiacol	Clou de girofle	1100 <sup>1,d</sup>	0-200 <sup>h</sup>	Acide férulique <sup>L</sup>	
	Benzaldéhyde	Amande	50-350 <sup>1</sup>	0-1200000 <sup>i</sup>	Acides aminés aromatiques, précurseurs variétaux <sup>m,n</sup>	Métabolisme acides aminés aromatiques
	Alcool benzylique	Plaisant, doux, solvant	10000 <sup>1</sup>	0-520000 <sup>i</sup>		
Lactones	γ-octalactone	Noix de coco	7 <sup>1,e</sup>	4-9 <sup>f</sup>	Acide caprylique <sup>o</sup>	Lipides
	δ-octalactone	Noix de coco, animal	400 <sup>1,e</sup>	nd	nd	
	γ-nonolactone	Noix de coco, anis	30-65 <sup>1</sup>	7 à 70 <sup>f</sup>	Acide linoléique <sup>o</sup>	
	δ-nonolactone	Noix de coco, beurré	nd	nd	nd	
	γ-décalactone	Pêche	88 <sup>1,f</sup>	0 à 6 <sup>f</sup>	Acide ricinoléique <sup>o</sup>	
	δ-décalactone	Pêche, crémeux	386 <sup>1,f</sup>	60 à 300 <sup>f</sup>	Acides linoléique, ricinoléique ou autres lactones <sup>o</sup>	

<sup>1</sup> eau, <sup>2</sup> vin modèle, <sup>3</sup> vin rouge, <sup>a</sup> Pardo *et al.*, (2015), <sup>b</sup> Buttery *et al.*, (1989), <sup>c</sup> Cerdán & Ancín-Azpilicueta, (2006), <sup>d</sup> Jagtap & Bapat, (2015) <sup>e</sup> Engel *et al.*, 1988, <sup>f</sup> (Pérez-Olivero *et al.*, (2014), <sup>g</sup> Gunata *et al.*, (1985), <sup>h</sup> Boidron *et al.*, (1988), <sup>i</sup> Delfini *et al.*, (1991), <sup>j</sup> Pérez-Gil *et al.*, (2017), <sup>k</sup> Carrau *et al.*, (2005), <sup>k</sup> Fraatz *et al.*, (2009), <sup>L</sup> Kaur & Chakraborty, (2013), <sup>m</sup> Lomascolo *et al.*, (2001), <sup>n</sup> Martin *et al.*, (2016), <sup>o</sup> Romero-Guido *et al.*, (2011).

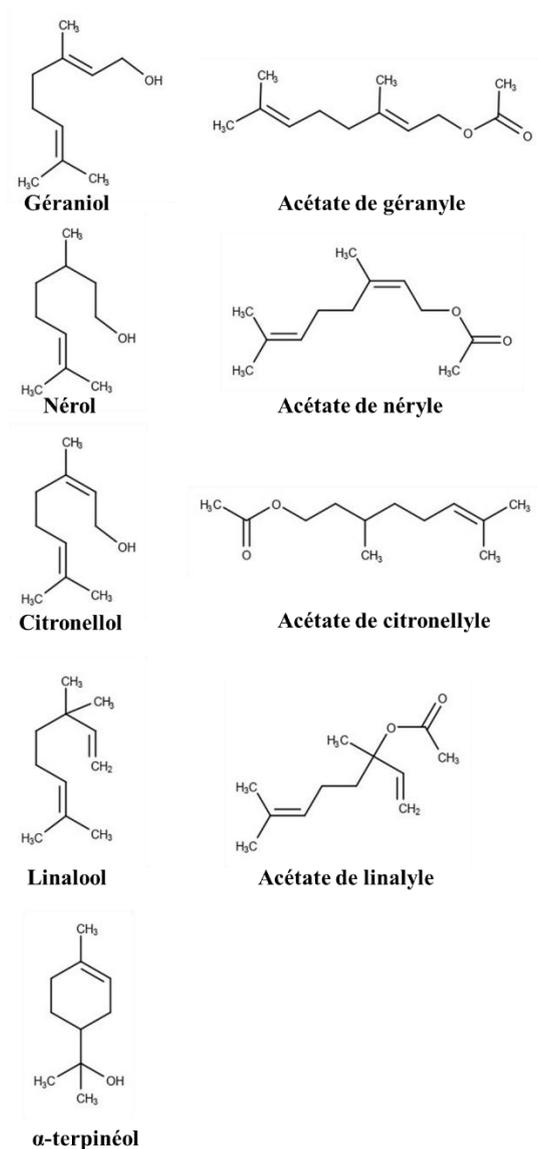
### *2.1.2. Les terpènes dans le vin*

Dans le vin, une trentaine de dérivés terpéniques a été recensée. Les dérivés terpéniques retrouvés dans le vin participent au bouquet floral du vin, avec des descripteurs de rose ou encore de lilas (Terrier & Boidron, 1972). Ils sont généralement connus et décrits comme des arômes variétaux. Les terpènes peuvent se trouver dans les vins sous forme libre, directement perceptible olfactivement, ou sous forme liée à des glycosides, sans odeur. Ces derniers seront développés dans la partie 2.1.3. Ainsi, la concentration totale en terpènes (formes libre et liée) sont notamment dépendantes des cépages étudiés (Gunata *et al.*, 1985) (**Tableau 7**). Lorsque la concentration en terpènes devient importante au-delà du mg/L, ils apportent toute leur typicité à certains vins de cépage, tels que le Muscat ou le Gewürztraminer. De manière générale, les terpènes retrouvés en plus grande quantité dans les vins sont les monoterpénols tels que le géraniol, le linalool et le nérol, ou encore des terpénylacétates tels que l'acétate de géranyle, ou son isomère l'acétate de néryle (**Figure 10**). La conversion du géraniol en citronellol est une réduction, et est enzymatique chez *S. cerevisiae* (Steyer *et al.*, 2013). Les autres réactions existantes entre les différents monoterpénols sont des isomérisations, et leur voie de production est encore discutée à ce jour.

Lors du vieillissement, l'évolution des concentrations en terpènes varie en fonction du composé étudié. En effet, certains monoterpénols (géraniol, nérol et linalool) sont présents dans les vins jeunes, puis sont réarrangés chimiquement (Bailly *et al.*, 2009; Slaghenaufi & Ugliano, 2018). Au contraire, la concentration en  $\alpha$ -terpinéol a tendance à augmenter au cours du vieillissement, probablement car il peut être le produit de la conversion chimique des autres monoterpénols (Oliveira & Ferreira, 2019). De plus, la diminution de la concentration de certains monoterpénols peut être due à leur oxydation, et à l'apparition d'oxydes de terpènes, dont le seuil de perception est 10 fois supérieur à celui des monoterpénols (Jackson, 2008).

**Tableau 7 : Concentrations en monoterpénols dans des vins issus de différentes cépages (en µg/L, d'après Gunata *et al.*, 1985).**

Cépage	Monoterpénols totaux		Géraniole		Linalool		Nérol		α-terpinéol		Citronellol	
	Liés	Libres	Lié	Libre	Lié	Libre	Lié	Libre	Lié	Libre	Lié	Libre
Muscat d'Alexandrie	4040	1513	1507	342	1839	1084	618	59	61	21	21	7,5
Muscat de Frontignan	1398	1640	396	107	207	1409	658	74	75	26	62	24
Muscat de Hambourg	1047	594	426	241	172	281	318	52	86	ND	45	19,7
Gewürztraminer	4325	282	3356	218	22,5	5,6	617	43	183	3,2	146	12
Riesling	276	58	65	26	87	19,4	10,3	5,4	114	7,4	ND	ND
Cabernet-Sauvignon	26	5,3	12	3,6	4,2	1,7	ND	ND	9,9	ND	ND	ND
Carignan	81	7,4	40	4,8	26	2,6	14,8	ND	ND	ND	ND	ND
Cinsault	314	13	69	13	5,4	ND	6,9	ND	233	ND	ND	ND
Clairette	105	2,6	34	2,6	9,5	ND	4	ND	57	ND	ND	ND
Grenache	71	11,8	40	5,2	5,4	6,6	8,2	ND	17,4	ND	ND	ND
Picpoul	105	5,8	25	5,8	2,2	ND	3	ND	75	ND	ND	ND
Syrah	36	1,7	36	1,7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ugni Blanc	83	2,8	54	2,6	8,5	0,2	6,9	ND	13,3	ND	ND	ND



**Figure 10 :** Structures des monoterpénols et des acétates de terpényles correspondants

### 2.1.3. Voies de biosynthèse des terpènes

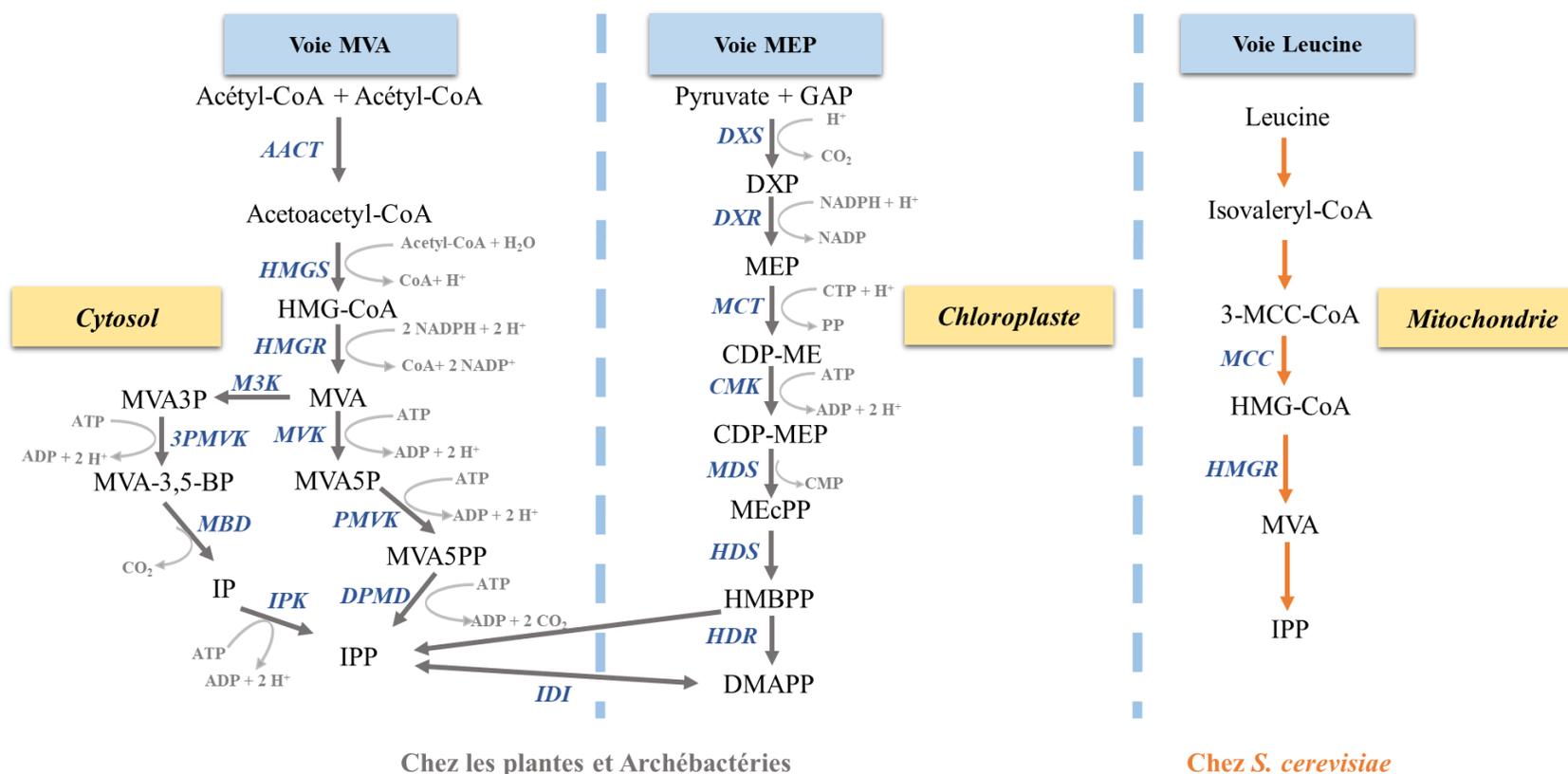
#### 2.1.3.1. Chez les plantes, Archées et bactéries

La biosynthèse des dérivés terpéniques a été largement étudiée chez les plantes. Ce procédé se déroule en 3 étapes.

- (1) Biosynthèse des précurseurs d'isoprenoïdes : isopentényl-diphosphate (IPP) et son isomère, le diméthylallyl-diphosphate (DMAPP) (**Figure 11**)
- (2) Assemblage des squelettes de polyprényl-diphosphate
- (3) Addition des groupes fonctionnels et modification du squelette carboné

Les étapes (1) et (2) sont communes à tous les organismes, mais la dernière étape est plus diversifiée, et dépend des organismes étudiés.

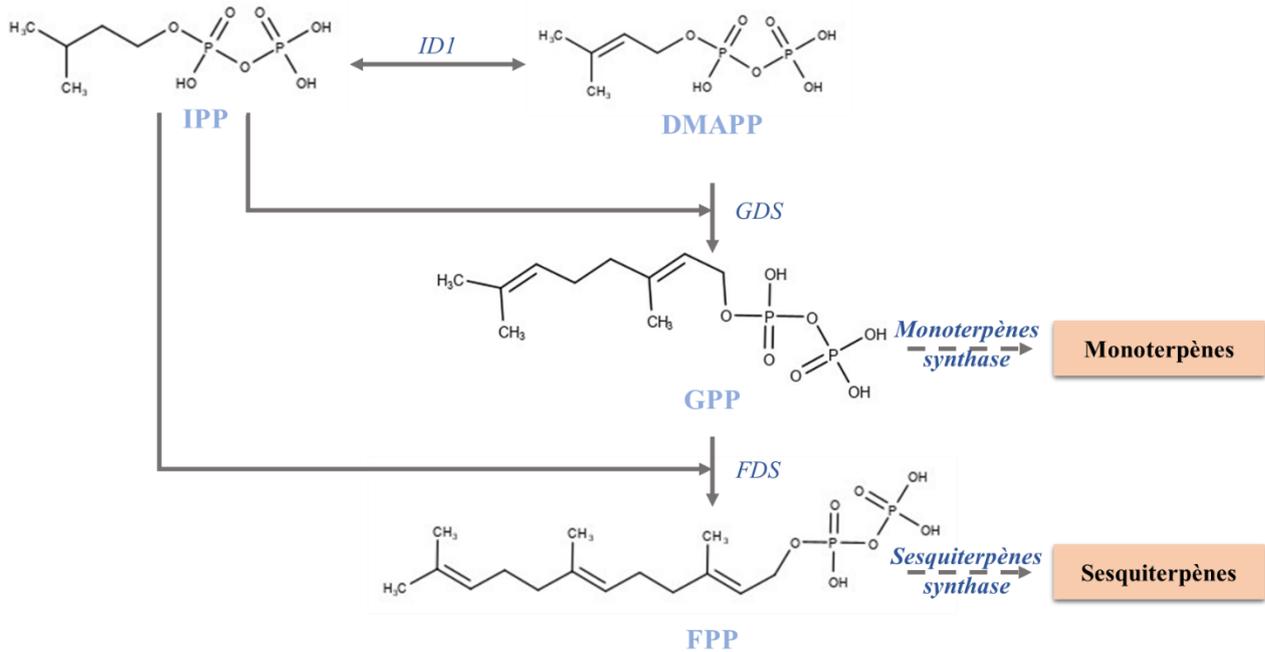
Tous les terpènes dérivent d'une unité à 5 atomes de carbone, l'IPP ou son isomère le DMAPP. Dans la nature, deux voies métaboliques indépendantes permettent la synthèse de ces précurseurs : la voie du mévalonate (MVA), présente essentiellement chez les eucaryotes et les *Archae* ; et la voie du 2-méthyl-3-érythritol-4-phosphate (MEP), présente surtout chez les bactéries. Chez les plantes, les deux voies coexistent, mais dans des compartiments différents : la voie MVA dans le cytosol et la voie MEP dans le chloroplaste. La voie MVA aboutit à la synthèse d'IPP, tandis que la voie MEP aboutit à la formation simultanée d'IPP et de DMAPP (Pérez-Gil *et al.*, 2017). Il est admis que chez les plantes, l'IPP produit par la voie MEP permet la production de monoterpènes et diterpènes tandis que celui issu de la voie MVA (dans le cytosol) permet la production de sesquiterpènes, stérols et ubiquinones (Schwender *et al.*, 1996; Wright, 1961).



**Figure 11 : Voies de biosynthèse de l'IPP, précurseur des terpènes (d'après Carrau *et al.*, 2005 ; Pérez-Gil *et al.*, 2017).**

En orange : voies supposées chez *S. cerevisiae*, par homologie de séquences des gènes *MCC* et *HMGR* avec les plantes et Archées (voies en gris). 3-MCC-CoA : 3-méthylcrotonyl-CoA ; CDP-ME : 4-diphosphocytidyl-2-C-méthyl-D-érythritol-2-phosphate ; DMAPP : diméthylallyl diphosphate ; DXP : 1-déoxy-D-xylulose 5-phosphate ; GAP : Glycéraldéhyde-3-P ; HMBPP : 4-hydroxy-3-méthylbut-2-enyl diphosphate ; HMG : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl ; IP : Isopentényl-phosphate ; IPP : isopentényl-diphosphate ; MEP : 2-C-méthyl-D-érythritol-4-phosphate ; MEcPP : 2-C-méthyl-D-érythritol 2,4-cyclodiphosphate ; MVA : acide mévalonique ; MVA5PP : 5-diphosphomévalonate. AACT : acétoacétyl-Coa thiolase ; HMGR : HMG-CoA réductase ; DPMD : 5-diphosphomévalonate décarboxylase ; IDI : isopentényl diphosphate isomérase ; MVK : mévalonate kinase ; PMVK : 5-phosphomévalonate kinase ; HDS : HMBPP synthase ; MDS : MEcPP synthase ; HDR : HMBPP réductase ; CMK : CDP-ME kinase ; MCT : MEP cytidilyltransférase

L'IPP formé par la voie MEP peut néanmoins passer du chloroplaste au cytosol (Bick & Lange, 2003). L'IPP peut également être isomérisé en DMAPP par une isopentényl diphosphate isomérase (IDI) (Banthorpe *et al.*, 1983). Puis, les prényl transférases permettent la condensation d'une molécule d'IPP sur le DMAPP afin de former le géranyl pyrophosphate (GPP, C10), précurseurs des monoterpènes (**Figure 12**).



**Figure 12 : Représentation de la formation des produits finaux de la voie de formation des isoprénoïdes à partir des unités IPP ou DMAPP (d'après Pérez-Gil *et al.*, 2017).**

DMAPP : diméthylallyl diphosphate ; FPP : Farnésyl pyrophosphate ; GPP : Géranyl pyrophosphate ; IPP : Isopentényl diphosphate.

L'étape (2) correspondant à l'assemblage des squelettes de polyprényl-diphosphate met en jeu les prényl transférases, qui peuvent aussi condenser une molécule d'IPP sur le GPP afin de former le farnésyl pyrophosphate (FPP), précurseur des sesquiterpènes. Trois différents types de réactions ont été décrites. La première catalyse des réactions « tête à queue » (produisant des transprényl diphosphates à partir de DMAPP) ; la deuxième catalyse des réactions « tête à tête » (conversion de prényl diphosphates en tri- ou tétraterpènes) ; et la dernière implique l'insertion de chaînes de prényles sur un accepteur non isoprénoïde par alkylation (Bouvier *et al.*, 2005; Oldfield & Lin, 2012).

La dernière étape (étape 3) met en jeu les terpène synthases (TPS), pouvant catalyser de nombreuses réactions (déphosphorylation et cyclisation principalement). Ces transformations sont suivies par une grande variété de modifications du squelette parental à l'origine de la grande diversité des terpènes (Pérez-Gil *et al.*, 2017). La formation des monoterpènes et des sesquiterpènes à partir de leur précurseur respectif est ainsi catalysée par des TPSs. Les différentes TPSs ont été très étudiées et des travaux ont prouvé leur grande diversité, puisque les gènes codant pour les TPSs sont généralement divisés en 7 clades basés sur leurs similarités de séquences (Bohlmann *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2011). Bien que les TPSs puissent être classées en 2 groupes en fonction de leur mécanisme réactionnel, il est généralement admis de les classer en fonction de leur spécificité de substrat. Dans cette logique, les monoterpènes synthases et sesquiterpène synthases ont un substrat en C10 et C15 respectivement, et aboutissent à la formation des monoterpènes et sesquiterpènes, respectivement (Pérez-Gil *et al.*, 2017).

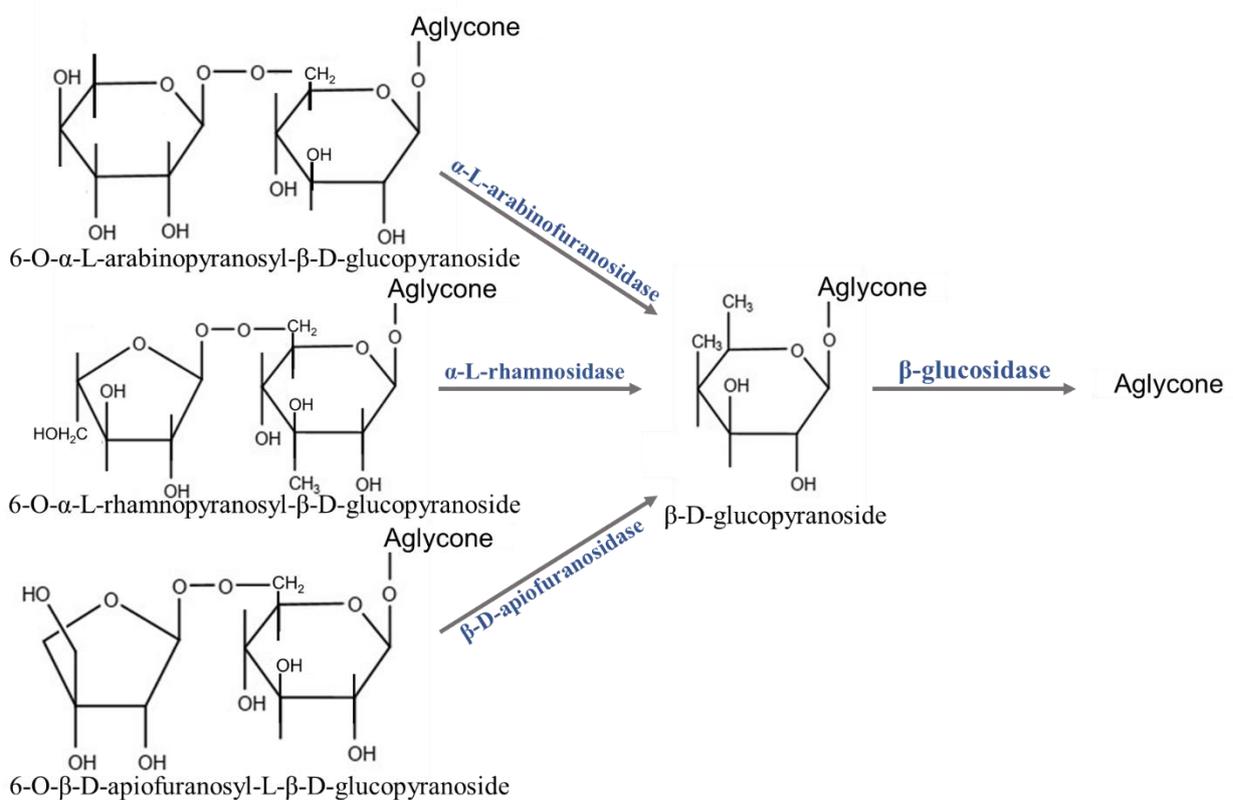
Chez *Vitis vinifera*, la concentration en terpènes -libres et liés – change au cours du développement de la baie (Gunata *et al.*, 1985; Zhang *et al.*, 2016). Néanmoins, ces variations de concentrations en terpènes (principalement en monoterpénols) sont différentes selon les cépages étudiés. Ainsi, concernant des baies de Muscat d'Alexandrie, la concentration en terpènes totaux augmente après la véraison, passant de moins de 1 mg/L lors de la véraison à un peu moins de 4 mg/L lors de la maturité de la baie. Cette augmentation est surtout liée à une plus grande concentration des terpénols liés. Contrairement à ces observations, Zhang *et al.*, (2016) ont montré que la concentration en monoterpènes et sesquiterpènes libres diminuent au cours du développement de la baie de Syrah. De plus, ces modifications de concentrations en terpènes dépendent des molécules, notamment les formes libres des monoterpénols (Fenoll *et al.*, 2009)

#### 2.1.3.2. Chez les levures du consortium œnologique

De manière générale, les terpènes sont classés en secteur œnologique dans la catégorie des arômes variétaux car ils sont présents dans le raisin sous forme libre ou sous forme de précurseurs d'arômes glycosylés. Certaines levures du consortium œnologique sont capables d'hydrolyser les précurseurs afin de libérer la partie aglycone. Une étude a mis également en lumière les capacités intrinsèques de *S. cerevisiae* à produire ces composés (Carrau *et al.*, 2005).

a) Hydrolyse des précurseurs

Les terpènes existent sous forme libre notamment dans les cépages muscatés et sont souvent à des teneurs supérieures au seuil de perception dans les vins issus de ces raisins (Marais, 1983). Les dérivés terpéniques, en particulier les monoterpénols, sont également présents dans le raisin sous forme de précurseurs glycosidiques inodores qui peuvent être hydrolysés grâce à l'action de certaines enzymes (Swiegers *et al.*, 2005). Ces précurseurs sont composés d'un aglycone lié à une partie osidique de type  $\beta$ -D-glucopyranoside, pouvant être lié en position 6-O à un  $\alpha$ -L-rhamnopyranose, un  $\alpha$ -L-arabinofuranose ou un  $\beta$ -D-apiofuranose (Gunata *et al.*, 1985; Spagna *et al.*, 2002; Villena *et al.*, 2007; Williams *et al.*, 1982) (**Figure 13**).



**Figure 13** : Schéma de la libération des terpénoïdes glycosylés (d'après Gunata, 1988).

L'aglycone peut être une molécule aromatique (terpène, alcool benzylique, thiol) ou un précurseur de composé aromatique.

Les précurseurs glycosidiques sont hydrolysés par voie enzymatique ou par voie chimique. La libération enzymatique se fait de manière séquentielle par le clivage dans un premier temps du sucre en position terminale catalysé par une  $\alpha$ -L-rhamnopyranosidase, une  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase ou une  $\beta$ -D-apiofuranosidase. Puis l'aglycone est libéré par l'action d'une  $\beta$ -D-glucosidase (Gunata *et al.*, 1988). Ces activités enzymatiques, propres aux raisins, sont

inhibées par l'acidité et le glucose du moût. Dans les conditions du moût, l'espèce *S. cerevisiae* n'est pas une très bonne productrice d'enzymes extracellulaires de type glycosidases (Delcroix *et al.*, 1994; McKay, 1990). En revanche, certaines levures non-*Saccharomyces* sont décrites avec des activités enzymatiques exocellulaires de type  $\beta$ -D-glucosidase importantes comme *Pichia membranifaciens*, *Lachancea thermotolerans*, *Hanseniaspora guilliermondii* ou encore *Metschnikowia pulcherrima* (Cordero-Bueso *et al.*, 2013; Escribano *et al.*, 2017; García *et al.*, 2016). Ces espèces sont connues pour leur production enzymatique, mais celle-ci est souche-dépendante (Ganga & Martinez, 2004). L'activité  $\beta$ -glucosidase des levures varie au cours de la fermentation alcoolique, cette enzyme pouvant être inhibée par des concentrations élevées en glucose ou en éthanol ainsi que le pH du moût (Swangkeaw *et al.*, 2011; Zamuz *et al.*, 2004). Ces répressions varient également en fonction des souches étudiées (López *et al.*, 2015). Dans certaines pratiques œnologiques, des préparations enzymatiques pectolytiques avec des activités annexes de type glycosidases sont utilisées permettant une meilleure hydrolyse des précurseurs glycosylés.

Il a également été montré qu'*Oenococcus oeni* pouvait produire des glycosidases capables de libérer certains terpènes de leur précurseurs, soulignant le rôle de la fermentation malolactique dans la révélation du potentiel aromatique des vins (Bloem *et al.*, 2006; Michlmayr *et al.*, 2012).

#### b) Métabolisme intrinsèque des levures pour la synthèse de terpènes

La synthèse *de novo* de l'ensemble des monoterpénols (géraniol, nérol, linalool, citronellol et  $\alpha$ -terpinéol), met en jeu deux voies métaboliques : la synthèse de géraniol à partir d'IPP formé *de novo*, suivi de la bioconversion du géraniol pour former les autres monoterpénols.

Pendant de nombreuses années, il était admis que *S. cerevisiae* ne pouvait pas produire ces composés intrinsèquement (King & Dickinson, 2003, 2000). En 2005, Carrau *et al.* ont observé une faible production, autour de 10  $\mu$ g/L en cumulé, de géraniol, de nérol, de linalool, de citronellol, de nérolidol et de farnésol. Cette faible production suggère l'existence de cette voie métabolique chez *S. cerevisiae*. La production de ces composés est influencée par les paramètres environnementaux comme les teneurs en azote assimilable (YAN) ainsi que les conditions rédox du milieu (anaérobiose ou microaérobiose) (Carrau *et al.*, 2005). Le linalool et le citronellol sont produits en plus grande quantité lorsque le YAN est élevé (400 mg N/L), en conditions de microaérobiose. La production de géraniol n'est pas impactée par les paramètres étudiés. En revanche, la production de nérolidol, un sesquiterpénol dérivant du

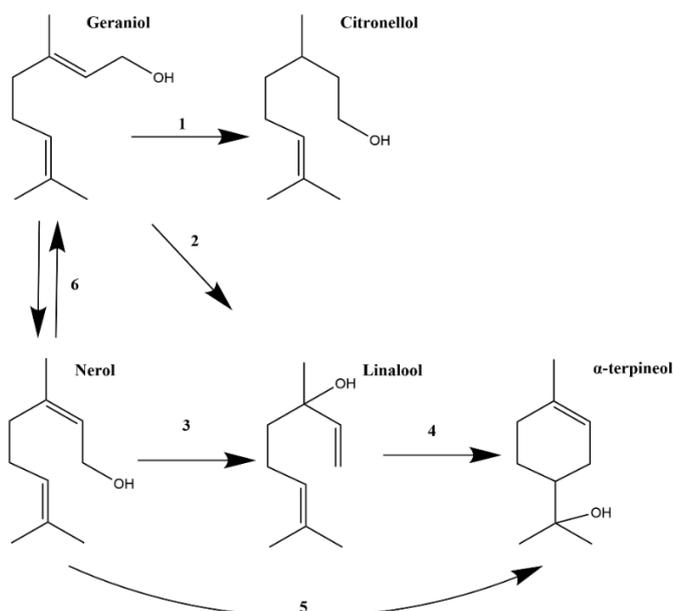
farnésyl pyrophosphate (FPP), est plus importante en conditions d'anaérobiose. En effet, cette accumulation peut être stimulée par l'inhibition de la voie de biosynthèse des stérols en anaérobiose. Les effets combinés observés entre le YAN et les conditions d'oxygénation concernant les monoterpénols ne sont pas en accord avec la voie de biosynthèse des stérols connue chez *S. cerevisiae*, suggérant une voie métabolique indépendante pour la formation des terpènes. Des blasts pour comparer la séquence du gène codant pour la Dxrp, enzyme responsable de la formation du MEP chez les plantes, contre le génome de *S. cerevisiae* n'ont pas permis de trouver d'homologie de séquences, mais certaines protéines de *S. cerevisiae* ont des séquences proches des MCCases (3-méthylcrotonyl-CoA carboxylase), enzymes à l'origine de la formation du précurseur de l'IPP. Ces travaux ont permis de proposer une nouvelle voie de formation des terpènes chez *S. cerevisiae* (Carrau *et al.*, 2005) : une voie du catabolisme de la leucine (**Figure 11**). Cette voie se déroulerait dans la mitochondrie, et aboutirait à la synthèse de géranyl diphosphate (GPP) grâce à une GPP synthase ayant l'IPP comme substrat, conduisant *in fine* à la production de géraniol. Il est généralement compliqué d'étudier le métabolisme du géraniol chez la levure car ce composé peut pénétrer dans les membranes plasmiques et intégrer la formation de composés stéroïdiens (Vaudano *et al.*, 2004).

Des équilibres et des réarrangements/réactions chimiques entre les différents monoterpénols ont lieu en solution selon les conditions du milieu (King & Dickinson, 2000; Pedersen *et al.*, 2003). Pedersen *et al.* ont étudié l'impact de la composition du milieu dans des vins modèles sur la formation des monoterpénols (**Tableau 8**). Quand le vin modèle n'est supplémenté qu'en géraniol, linalool ou nérol, la formation des autres monoterpénols est observée. En présence d' $\alpha$ -terpinéol, aucun autre monoterpénol n'est formé ce qui suggère qu'il est le produit final de cette chaîne réactionnelle.

Simultanément aux réactions chimiques, des réactions biochimiques liées au métabolisme du géraniol par les levures peuvent avoir lieu (King & Dickinson, 2000) (**Figure 14**).

**Tableau 8** : Evolutions chimiques des dérivés terpéniques dans du vin modèle (solution aqueuse à 10 % éthanol, pH 2,9 ajusté avec tartrate d'hydrogène et acide sulfurique) (d'après Pedersen *et al.*, 2003).

Composé ajouté au vin modèle	Après 24 h à 25 °C	Après 5 jours à 25 °C
Linalool (97 %)	95 % linalool 2 % $\alpha$ -terpinéol <0,5 % nérol traces de géraniol	85 % linalool 8 % $\alpha$ -terpinéol 1 % nérol 3 % géraniol
Nérol (93 %)	85 % nérol 4 % linalool 7 % $\alpha$ -terpinéol 1 % géraniol	64 % nérol 12 % linalool 21 % $\alpha$ -terpinéol 0,5 % géraniol
Géraniol (94 %) et nérol (2 %)	90 % géraniol 7 % linalool traces d' $\alpha$ -terpinéol 2,5 % nérol	72 % géraniol 22 % linalool 0,5 % $\alpha$ -terpinéol 2 % nérol
$\alpha$ -terpinéol (96 %)	96 % $\alpha$ -terpinéol nd linalool nd nérol nd géraniol	96 % $\alpha$ -terpinéol nd linalool nd nérol nd géraniol

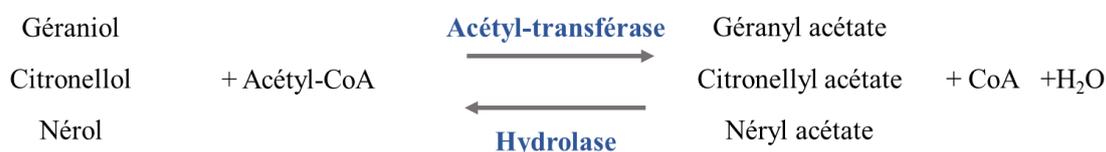


**Figure 14** : Biotransformations des monoterpénols chez les levures du consortium œnologique (d'après King & Dickinson, 2000)

**1** : réduction du géranol en citronellol, étape enzymatique chez *S. cerevisiae* (OYE2) ; **2** : Isomérisation du géranol en nérol ; **3** Isomérisation du nérol en linalool ; **4** : Isomérisation du linalool en  $\alpha$ -terpinéol ; **5** : Isomérisation du nérol en  $\alpha$ -terpinéol ; **6** : Isomérisation du nérol en géranol. Les étapes **2** à **6** n'ont pas été prouvées comme étant enzymatiques chez les levures.

Le géraniol peut être isomérisé en nérol, de manière réversible, mais l'enzyme n'est pas encore identifiée. La réduction du géraniol en citronellol serait catalysée par Oye2p, également impliquée dans la réduction du 3-méthyl-2-buten-1-ol en 3-méthylbutanol (Steyer *et al.*, 2013). En revanche, la nature de l'isomérisation du géraniol en linalool n'est pas encore connue, bien que l'hypothèse d'isomérisation chimique pH-dépendante soit privilégiée. En effet, elle est similaire à la formation de nérolidol à partir de farnésol (alcool primaire à alcool tertiaire), connue pour être pH-dépendante.

De plus, trois terpényle acétates peuvent être retrouvés dans le vin : l'acétate de géranyle et son isomère, l'acétate de néryle, ainsi que l'acétate de citronellyle. La voie de formation de ces trois molécules est présentée en **Figure 15**.



**Figure 15 : Schéma de synthèse des terpényle acétates à partir de monoterpénols**

Cette réaction est similaire à la synthèse d'esters acétiques d'alcools supérieurs. La délétion des gènes *ATF1* et *ATF2* entraîne une plus faible production de terpényle acétates (1147,8 µg/L sans délétion contre 415,2 après délétion), ce qui montre leur implication dans la conversion des monoterpénols en terpényle acétates (Steyer *et al.*, 2013). Comme pour la conversion des alcools supérieurs en esters acétiques d'alcools supérieurs, l'enzyme *Atf1p* semble avoir plus d'importance dans cette réaction. De plus, des études de bioconversion ont confirmé que *Atf1p* était capable d'acétyler efficacement le géraniol, le nérol et le citronellol. Néanmoins, pour le dernier cité, l'acétylation n'a lieu qu'en début de bioconversion, tandis qu'elle a lieu tout au long de l'expérience pour le nérol et le géraniol (Steyer *et al.*, 2013).

## **2.2. Les dérivés benzéniques**

### *2.2.1. Les dérivés benzéniques dans le vin*

Si les terpènes sont les composés volatils libérés à partir de précurseurs les plus connus en œnologie, la contribution sensorielle d'autres composés, parmi lesquels des dérivés du benzaldéhyde et de la vanilline, peut être tout aussi importante.

En effet, les dérivés benzéniques sont un groupe important dans les arômes variétaux de certains vins de Malbec, que ce soit les phénols volatils, les alcools aromatiques ou encore les aldéhydes (Sánchez-Palomo *et al.*, 2017). Certains composés phénoliques dérivent du shikimate, et sont associés à des arômes variétaux pouvant conférer des notes plaisantes de thé et d'eucalyptus (Genovese *et al.*, 2007). Les composés benzéniques ont différentes origines. En effet, certains, tels que le 4-vinyl gaïacol ou le benzaldéhyde sont produits lors de la fermentation, tandis que d'autres, tels que le furfural, proviennent du vieillissement, par la dégradation de l'hémicellulose pendant la torréfaction de la barrique (Chatonnet *et al.*, 1989). Il peut également provenir des carbohydrates présents dans les vins durant le vieillissement (Rapp & Mandery, 1986).

L'alcool benzylique peut contribuer à la palette aromatique du vin en lui conférant des notes de figue, tabac ainsi que de chocolat pour certains cépages tels que le Cabernet Sauvignon (Francis *et al.*, 1998). Le benzaldéhyde est une molécule aromatique dont le descripteur associé est l'amande amère. C'est un composé qui possède un seuil de perception assez élevé, autour de 2 mg/L. Quand les concentrations sont trop élevées, il constitue un défaut bien connu des vins, dû à un relargage des résines époxy dont la polymérisation est de mauvaise qualité. En deçà, ce composé participe à la complexité aromatique des vins, en apportant un côté amandé, grillé aux vins. Le benzaldéhyde est typiquement associé à des vins botrytisés (Goetghebeur *et al.*, 1992).

Les concentrations en benzaldéhyde dans le vin ne permettent généralement pas de reconnaître le descripteur amandé, mais il participe au bouquet global du vin, en pouvant apporter rondeur et complexité aromatique (Sánchez-Palomo *et al.*, 2017). Les concentrations en alcool benzylique et en benzaldéhyde retrouvées dans le vin sont variables selon le cépage étudié, variant de 1,7 µg/L dans du Cabernet-Sauvignon à 94,6 µg/L dans du Merlot (Jiang *et al.*, 2013). Dans les vins, le benzaldéhyde est décrit comme pouvant être formé par l'oxydation de l'alcool benzylique, par l'action des micro-organismes sur la phénylalanine ou sur des composés phénoliques du raisin, ou encore provenant de métabolites secondaires tels que l'acide phénylacétique ou l'acide *para*-hydroxybenzoïque (Delfini *et al.*, 1991; Gomez-Cordoves &

Khayyat, 1983; Wildenradt & Singleton, 1974). De manière générale, dans de nombreuses variétés neutres, les composés benzéniques sont les constituants majeurs de la fraction glycosidique aromatique (Cabrita *et al.*, 2006; García-Muñoz *et al.*, 2011; Gómez García-Carpintero *et al.*, 2012).

Les concentrations en benzaldéhyde augmentent de manière significative avec l'état de la maturité de la vendange. En effet, elles passent de 98,9 µg/L à maturité du raisin, à 136,9 µg/L, trois semaines plus tard (Zhao *et al.*, 2019). Des expériences d'ajout de précurseurs glycosylés, provenant de plusieurs variétés de raisins (Muscat, Chardonnay, Grenache, Tempranillo, Cabernet Sauvignon et Syrah), associées à un vieillissement accéléré ont montré une concentration plus importante de benzaldéhyde et d'alcool benzylique après 9 semaines de vieillissement, suggérant un rôle du vieillissement dans les concentrations retrouvées dans les vins, mais également une incidence du cépage utilisé (Loscos *et al.*, 2010).

La révélation de ces molécules au cours de la fermentation est variable selon les souches utilisées et certaines levures sont intrinsèquement capables de les produire (Delfini *et al.*, 1991)

La vanilline est le principal composé activement odorant de la vanille (Clark, 1990). Le 4-vinylgâïacol est un phénol volatil, avec des notes épicées de clou de girofle, dont la production est souvent accompagnée de 4-vinylphénol, un phénol volatil connu pour apporter des notes négatives de gouache dans les vins. Ces molécules, considérées comme des arômes variétaux, sont des aglycones liés à des précurseurs glycosylés présents dans les vins, de la même manière que les terpènes (**Figure 12**). Ces précurseurs non volatils constituent une réserve aromatique potentielle qui peut être révélée lors de la vinification grâce à l'action des enzymes de type glycosidases ou par hydrolyse acide au pH du vin lors du vieillissement, mais il est compliqué de déterminer la concentration précise des différents précurseurs glycosylés (Loscos *et al.*, 2010). La vanilline est un des arômes le plus utilisé au monde dans la nourriture, les boissons, les parfums et la production naturelle est largement inférieure à la consommation annuelle. La différence est produite par synthèse chimique mais depuis plusieurs années, la demande des consommateurs pour des produits plus naturels s'est intensifiée. C'est pourquoi de nombreux travaux ont été initiés pour produire par voie biotechnologique de la vanilline. Un large éventail de microorganismes (bactéries, champignons et levures) a été utilisé à l'échelle du laboratoire et à l'échelle industrielle pour produire de la vanilline à partir de précurseurs phénylpropanoïdes variés : polymère de lignine, acide férulique, eugénol, isoéugénol...

La vanilline existe également dans le raisin sous forme de précurseurs glycosylés ainsi que le 4-VG, mais c'est surtout lors de l'élevage que l'enrichissement du vin en vanilline et en 4-VG peut être le plus important. Lors de la conservation des vins en barriques, des composés volatils du bois de chêne sont libérés dans les vins comme par exemple la vanilline, la whiskylactone ou encore l'eugénol avec respectivement des odeurs de vanille, noix de coco et clou de girofle. Le brûlage nécessaire à la fabrication d'un fût provoque la dégradation des polysaccharides, des composés phénoliques et de la lignine, dont la vanilline est issue (Chatonnet *et al.*, 1989). Il a été noté que les vins dont la FML s'effectue en barriques neuves s'enrichit plus rapidement en vanilline, suggérant l'existence d'un précurseur modifié biochimiquement par les bactéries lactiques (Bloem *et al.*, 2008). Des études ont mis en évidence la présence de vanilline comme intermédiaire de la dégradation microbiologique de l'acide férulique (Zhang *et al.*, 2015). L'acide férulique est également le précurseur du 4-vinylgaiacol, phénol volatil rappelant une odeur épicée de clou de girofle. Cependant, dans les vins blancs, ce composé est toujours associé à la synthèse de 4-vinyl phénol à l'odeur de gouache. Il faut ainsi toujours considérer l'impact organoleptique des deux composés (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

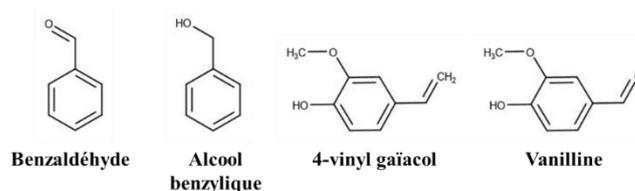
Plusieurs facteurs peuvent influencer l'accumulation de ces composés volatils du bois de chêne comme l'origine géographique du bois, la chauffe et son intensité lors de la fabrication de la barrique, l'âge de la barrique, la durée de contact avec le vin (Cadahía *et al.*, 2001; Jun, Hong-Young *et al.*, 2010; Sanz *et al.*, 2011).

Le métabolisme intrinsèque des levures œnologiques pour produire ces molécules a été peu étudié.

### 2.2.2. Voies de production des dérivés benzéniques

#### 2.2.2.1. Production de benzaldéhyde et d'alcool benzylique

De manière identique aux dérivés terpéniques, les dérivés benzéniques peuvent être variétaux, liés à des précurseurs glycosylés, et hydrolysés par voie enzymatique (**Figures 12 et 16**). Ce mécanisme permet notamment la libération d'alcool benzylique ou de benzaldéhyde (Ferreira and Lopez, 2019).



**Figure 16 : Structure des composés benzéniques étudiés**

Peu d'études ont porté sur la production de ces molécules *via* le métabolisme des levures œnologiques. Néanmoins, Delfini *et al.*, (1991) ont observé la production d'alcool benzylique et de benzaldéhyde après fermentation sur milieu synthétique, sans ajout préalable de précurseurs glycosylés. De grandes disparités de productions, entre les diverses espèces étudiées ainsi qu'une diversité intra-spécifique ont été mises en évidence (**Tableau 9**). Les auteurs ont également vérifié que les levures pouvaient oxyder l'alcool benzylique en benzaldéhyde. Cette conversion dépend des souches et des espèces de levures utilisées. Les levures de la sous-division des *Saccharomycotina* ont montré les meilleures capacités de production à savoir *Hanseniaspora uvarum* (ex *K. apiculata*), *Starmerella bacillaris*, *Schizosaccharomyces*, et *Zygosaccharomyces bailii* (Delfini *et al.*, 1991). De plus, l'alcool benzylique est généralement converti en acide benzoïque en absence de glucose, suggérant une répression catabolique de ce sucre (Delfini *et al.*, 1991).

Chez les plantes, l'alcool benzylique est formé lors de la synthèse des phénylpropanoïdes, par l'enzyme phénylalanine-ammonia lyase (PAL) (Widhalm & Dudareva, 2015). Celle-ci catalyse la conversion de la phénylalanine (Phe) en acide trans-cinnamique (Orlova *et al.*, 2006). A l'heure actuelle, aucune étude n'a montré l'existence de cette enzyme chez les *Saccharomycotina*, bien qu'elle ait pu être identifiée chez la levure basidiomycète *Rhodotorula graminis* (Uchiyama *et al.*, 1969). Malgré cela, Martin *et al.* (2016 a ; 2016b) ont noté une production de benzaldéhyde et d'alcool benzylique après fermentation sur moût synthétique par *S. cerevisiae* et *Hanseniaspora vineae*.

**Tableau 9 : Production d'alcool benzylique et de benzaldéhyde par certaines souches œnologiques (d'après Delfini *et al.*, 1991).**

Productions observées après fermentation sur milieu synthétique sans ajout de précurseurs glycosylés.

Espèces	Nombre de souches	Benzaldéhyde (µg/L)	Alcool benzylique (µg/L)
<i>C. guilliermondii</i>	7	0,0 - 2,6	0,0 - 21,9
<i>C. melinii</i>	1	0,0	27,9
<i>C. valida</i>	1	2,3	1,8
<i>C. vini</i>	1	1,2	0,0
<i>Cr. abidus</i>	1	0,0	10,5
<i>Kl. apiculata</i>	19	6,2 - 232	18,0 - 351,2
<i>Kl. corticis</i>	1	0,0	47,3
<i>Tr. cutaneum</i>	1	0,0	0,0
<i>M. pulcherrima</i>	1	83,5	84,4
<i>S. cerevisiae</i>	28	0 - 155,0	0 - 304,1
<i>Schiz. japonicus</i>	8	71,8 - 120,7	133,3 - 523,4
<i>Schiz. pombe</i>	2	497,1 - 1200,5	303,8 - 464,5
<i>Starm. bacillaris</i>	1	86,7	45,9
<i>T. delbrueckii</i>	8	21,8 - 158,1	0,0 - 4,8
<i>Zygo. bailii</i>	6	45,4 - 839,9	0 - 136,1

Chez les ascomycètes (*Bjerkandera adjusta*), les études de marquage suggèrent que la phénylalanine peut être impliquée dans la production des dérivés benzéniques et peut être catabolisée selon 2 voies métaboliques distinctes : la voie PAL (Phénylalanine-Ammonia Lyase, similaire aux plantes) et la voie mettant en jeu le phénylpyruvate (Lapadatescu *et al.*, 2000).

Les enzymes de la voie PAL n'existant pas chez les levures étudiées, une nouvelle voie de production des composés benzéniques a été proposée : la voie du mandélate (**Figure 17**). Dans cette voie, le précurseur des dérivés benzéniques est la phénylalanine. Le tryptophane aurait un rôle de stimulateur de la voie. La tyrosine, un autre acide aminé aromatique semble intervenir dans la synthèse de *para*-hydroxybenzaldéhyde, et non du benzaldéhyde.

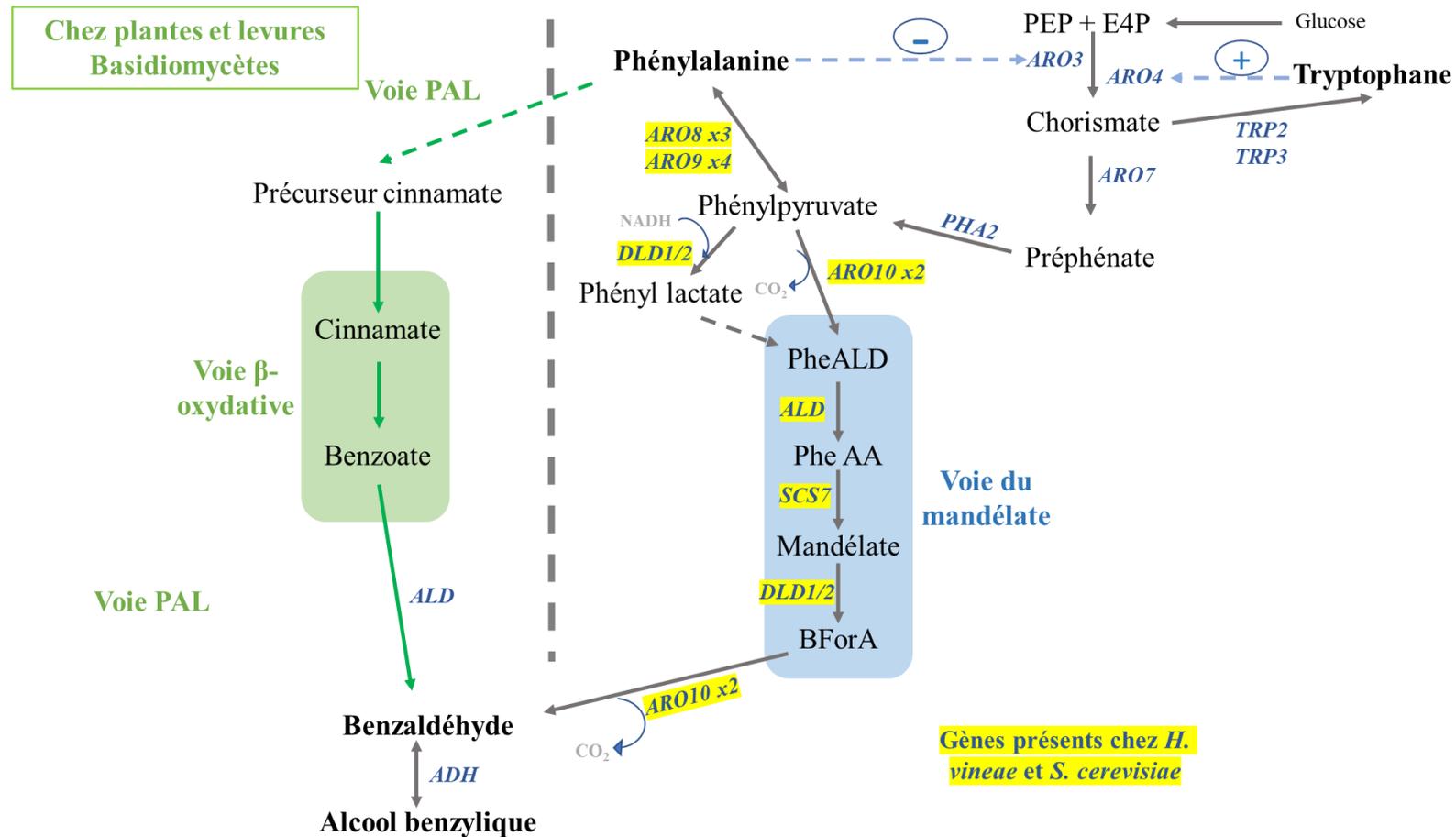
Récemment, Martin *et al.*, (2016b) ont étudié la production intrinsèque de benzaldéhyde et d'alcool benzylique chez *S. cerevisiae* et *Hanseniaspora vineae*. Ils ont montré une capacité de

production bien plus importante chez une souche de *H. vineae*, jusqu'à plus de 1 mg/L contre moins de 200 µg/L pour les souches de *S. cerevisiae*. Cette espèce produit également en plus grande quantité de l'acétate de benzyle ainsi que de l'acétate de 2-phényléthyle, montrant ses spécificités vis-à-vis de la production des composés benzéniques (Martin *et al.*, 2016a).

La voie du mandélate semble être mise en jeu pour la synthèse de benzaldéhyde à partir de Phe, et implique l'action des mêmes enzymes : la phénylpyruvate décarboxylase Aro10p, la sphingolipide alpha-hydroxylase Scs7p, et la lactate déshydrogénase Dld1/2p.

Suite à cette voie du mandélate, l'alcool benzylique peut être formé par des aryl alcool déshydrogénases (Aad) ou par des alcool déshydrogénases (Adh) à partir du benzaldéhyde. Chez *S. cerevisiae*, les enzymes mises en jeu sont des Aadp et Adhp tandis que ce sont uniquement des Adhp chez *H. vineae*. Celles-ci ont une réelle divergence concernant leur séquence d'acides aminés, si elles sont comparées à *S. cerevisiae*, suggérant une spécificité pour la production d'alcool benzylique (Martin *et al.*, 2016b).

La formation des composés benzéniques peut être modulée par la teneur en azote assimilable dans le milieu ainsi que par la proportion en acides aminés aromatiques (Phe, Trp et Tyr). Chez *H. vineae*, le tryptophane serait un stimulateur de la voie de production (voie du chorismate), mais pas un précurseur catabolique de l'alcool benzylique, au contraire de la phénylalanine. En effet, l'ajout de Phe affecte positivement la production d'alcool benzylique chez *H. vineae*, en augmentant la production de phénylpyruvate *via* la voie du mandélate. Enfin, des études génomiques ont montré que *H. vineae* possédaient les gènes codant pour les enzymes de cette voie.



**Figure 17 :** Voies de production du benzaldéhyde et de l'alcool benzylique chez les levures et les plantes (d'après Martin *et al.*, 2016b). ADH : Alcool déshydrogénase ; ALD : aldéhyde déshydrogénase E4P : Erythrose-4-Phosphate ; PAL : Phenylalanine-Ammonia Lyase ; PheAA : Acide phénylacétique ; PheALD : Phénylacétaldéhyde ; PEP : Phosphoénolpyruvate. Sont surlignés les gènes présents chez *H. vineae*, par comparaison du génome avec *S. cerevisiae* EC1118.

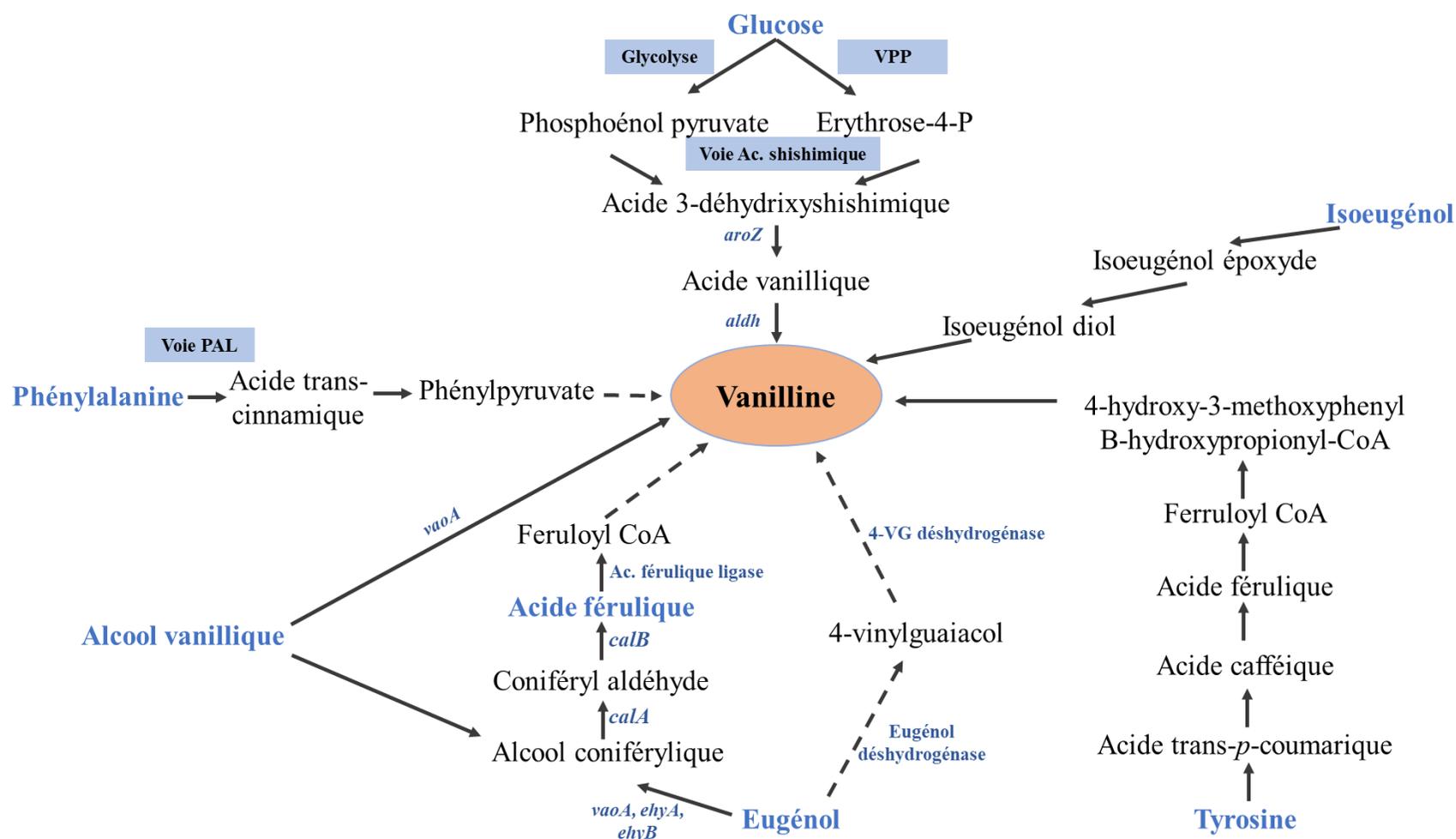
#### 2.2.2.2. Bioproduction de la vanilline

Les concentrations en vanilline observées dans le vin peuvent avoir plusieurs origines : une origine variétale, une origine métabolique ou un transfert à partir du contenant dans lequel le vin est conservé (cf 2.2.1). Seule une faible part de la vanilline retrouvée dans les vins directement liée à un sucre, mais certains de ses dérivés peuvent être glycosylés. En effet, un de ses précurseurs, l'acide férulique, est généralement lié à l'acide tartrique (Ribéreau-Gayon & Peynaud, 1960; Singleton *et al.*, 1978). Les dérivés de la vanilline sont des composés dont la présence à des concentrations importantes dans les vins sont surtout dues à l'extraction du bois au cours de l'élevage plutôt qu'à l'hydrolyse de précurseurs.

De nombreuses voies de biosynthèse ont été mises en évidence (Kaur & Chakraborty, 2013) (**Figure 18**). Les différents précurseurs présentés sont la phénylalanine, l'isoeugénol, l'eugénol, l'alcool vanillique, le glucose et la tyrosine. Aucune de ces voies n'a été mise en évidence chez les levures œnologiques, et peu d'informations sont disponibles quant à leur capacité à produire intrinsèquement de la vanilline.

Chez *Pseudomonas fluorescens*, la voie métabolique débute par la dégradation d'eugénol pour former de l'acide férulique. Elle a été caractérisée aux niveaux enzymatique et moléculaire (Walton *et al.*, 2000) (**Figure 19**). La conversion de l'acide férulique en vanilline via le 4-vinylguaiacol par *Debaryomyces hansenii* a été mise en évidence (Mathew *et al.*, 2007). La diminution de la concentration en acide férulique présent dans le milieu de culture au cours du temps est corrélée à une augmentation des concentrations en 4-vinylguaiacol, vanilline et alcool vanillique. Max *et al.* (2012) ont proposé une voie de biotransformation de l'acide férulique (**Figure 20**). Il peut être converti en : 4-vinyl guaiacol, donnant ensuite de la vanilline ou de l'acétovanillone ; en acide dihydroférulique pouvant être converti en alcool dihydroconiférylique ou en vanilline par l'intermédiaire d'acide vanillique ; en alcool coniférylique, puis en alcool dihydroconiférylique.

L'isoeugénol peut aussi permettre la production de 0,6 g/L de vanilline chez *Bacillus subtilis*, avec un rendement molaire de 12,4% (Shimoni *et al.*, 2000).



**Figure 18** : Récapitulatif des voies majeures de bioproduction de la vanilline (d'après Kaur & Chakraborty, 2013)

Figure non exhaustive, il existe d'autres précurseurs possibles. Flèches en pointillés : seulement étapes majoritaires, les étapes intermédiaires ne sont pas représentées.



## 2.3. Les lactones

Les lactones sont des esters cycliques carboxyliques, comprenant un atome d'oxygène dans le cycle. Le nombre d'atomes de carbone composant le cycle détermine la classe de ces lactones ( $\alpha$ -lactones pour 2C,  $\beta$ -lactones pour 3C,  $\gamma$ -lactones pour 4C, ...), qui comportent en général entre 4 (butyrolactone) et 12 (dodécalactone) atomes de carbone. La chaîne latérale ou le cycle peuvent porter des substitutions (ex : solerone ; whiskylactone : 3-méthyl- $\delta$ -octalactone) ou des insaturations (ex : massoia lactone : 2-décéno- $\delta$ -lactone). Les  $\alpha$ -lactones et  $\beta$ -lactones sont généralement moins courantes, car elles sont très réactives (Carey & Giuliano, 2016). Les lactones existent souvent sous 2 formes, une forme cis et trans, ou une forme R et S, et selon l'énantiomère, la perception olfactive est un peu différente. Les formes R sont généralement plus odorantes que les formes S. Peu d'informations sont disponibles sur la capacité des levures du consortium œnologique à pouvoir intrinsèquement produire ces composés.

### 2.3.1. Les lactones dans le vin

Ces composés aromatiques au caractère fruité prononcé (noix de coco, pêche, ...) sont présents dans de nombreux aliments ou boissons tels que le beurre, le thé, le café ou le vin (Maga, 1976). Dans ces diverses boissons *et* aliments, ce sont les  $\gamma$ -lactones et les  $\delta$ -lactones qui sont retrouvées en majorité (Dufosse, 1994).

Les concentrations en lactones varient en fonction des vins, des cépages et du pilotage de la vinification (Pérez-Olivero *et al.*, 2014) (**Tableau 10**). La lactone présente en plus grande quantité est la  $\gamma$ -butyrolactone (plus de 25 mg/L), caractérisée par une faible odeur de beurre et un seuil de perception élevé (35 mg/L) (Pérez-Olivero *et al.*, 2014). Concernant les lactones de type octalactones, nonalactones et décalactones, leurs concentrations sont plus faibles (moins de 250  $\mu$ g/L en cumulé au maximum), mais leurs seuils de perception sont également bien inférieurs (**Tableau 6**).

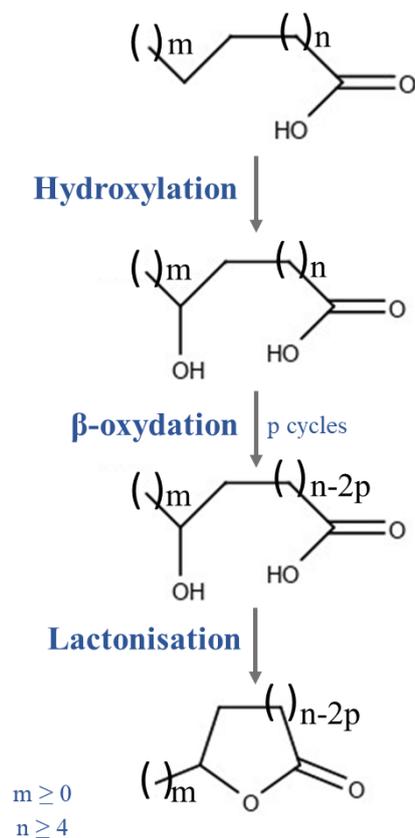
**Tableau 10 :** Concentrations moyennes en lactones ( $\mu\text{g/L}$ ) dans 72 vins différents (d'après Pérez-Oliveiro *et al.*, 2014).

Composés	Vins blancs (n = 35)		Vins rosés (n = 8)		Vins rouges (n = 29)	
	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type
$\gamma$ -butyrolactone	26287	8478	25940	6553	32652	6403
$\gamma$ -hexalactone	200	89	202	72	211	67
Whiskey-lactone I	10,6	14,4	5,4	2,2	45,7	34,4
$\gamma$ -octalactone	5,4	2,6	5,6	2,2	6,9	3,1
Whiskey-lactone II	20,3	50,5	d-nq	/	138,4	111,1
$\gamma$ -nonalactone	14,8	7,4	20,0	5,6	42,1	27,5
$\gamma$ -décalactone	d-nq	/	4,2	2,9	3,9	2,7
$\delta$ -décalactone	157	72	149	37	228	96

Certaines lactones ont été décrites comme étant uniquement formées lors du vieillissement en barriques, notamment la 5-butyl-4-méthyl-4,5-dihydro-2(3H)-furanone, la whiskylactone, apportant des notes caractéristiques de noix de coco dans les vins élevés en fûts (Pollnitz *et al.*, 1999). Les travaux de Pons *et al.* (2017) ont permis ensuite d'identifier la massoia lactone dans les moûts et les vins rouges. L'impact organoleptique de la massoia lactone a été établi particulièrement dans les moûts marqués par des nuances de figue ou de pruneau.

### 2.3.2. Voies de bioproduction des lactones

De manière générale, toutes les lactones sont produites selon la même voie de bioproduction que l'on peut décomposer en 3 parties : l'hydroxylation de l'acide gras précurseur, la  $\beta$ -oxydation, et la lactonisation (ou cyclisation) (Romero-Guido *et al.*, 2011) (**Figure 21**). Chaque lactone étudiée possède comme précurseur un acide gras, qui est apporté par le jus de raisin, notamment l'acide  $\gamma$ -linoléique, linoléique et ricinoléique, a des teneurs de l'ordre de 1 à 10 mg/L (Tumanov *et al.*, 2018) (**Tableau 11**). Il existe une grande diversité de lactones, mais seules certaines se retrouvent à des concentrations pouvant avoir un impact organoleptique dans le vin, notamment les octa-, nona- et décalactones.



**Figure 21** : Schéma général de la production biotechnologique des lactones (d'après Romero-Guido *et al.*, 2011)

**Tableau 11** : Précurseurs des lactones étudiées

Précurseurs	Lactones obtenues	Références
acide caprylique	$\gamma$ -octalactone	Farbood, 1991
acide linoléique	$\gamma$ -nonalactone	Feron & Waché, 2005
acide ricinoléique	$\gamma$ -décalactone	Waché <i>et al.</i> , 2003, 2001
acides linoléique, ricinoléique ou lactones insaturées	$\delta$ -décalactone	Cardillo <i>et al.</i> , 1993; Farbood <i>et al.</i> , 1999

L'incorporation de ces substrats hydrophobes par les levures est facilitée par la modification de leurs propriétés pariétales. Ce transport se fait en trois étapes : contact et adsorption de la molécule au niveau de la paroi ; passage de la molécule entre la paroi et la membrane ; désorption pour entrer dans le cytoplasme (Romero-Guido *et al.*, 2011). Chez *S. cerevisiae*, il a été montré que la co-expression des gènes *DANI* et *AUS1*, codant respectivement pour la mannoprotéine Dan1p et le transporteur ABC Aus1p, permettaient une meilleure incorporation des stérols du milieu (Alimardani *et al.*, 2004).

La première étape est l'hydroxylation de l'acide gras, réalisée par des lipoxygénases ou des peroxydases qui ont été mises en évidence chez certains champignons (*Aspergillus*, *Mortierella sp* notamment) (Romero-Guido *et al.*, 2011). L'inconvénient de ces enzymes est qu'elles peuvent catalyser des réactions non spécifiques. A ce jour, de telles enzymes n'ont pas été trouvées chez les levures du consortium œnologique. En effet, à partir des mêmes précurseurs que les lactones étudiées, certaines lipoxygénases (chez *Aspergillus* et *Agaricus spp* par exemple) permettent la formation de 1-octen-3-ol ou de 1,5-octadien-3-ol, à l'arôme de champignon (Hall *et al.*, 2004; Husson *et al.*, 2001). Ainsi, l'enjeu actuel est de comprendre le fonctionnement de ces hydroxylases, et de découvrir d'autres hydroxylases microbiennes, potentiellement plus spécifiques. Des études ont porté sur l'utilisation de champignons de l'espèce *Mortierella sp* pour la production de  $\delta$ - et  $\gamma$ -octalactones à partir d'acide octanoïque (ou caprylique). Cette utilisation a abouti à la production d'un nombre important de lactones (Farbood, 1991). Les rendements obtenus avec ces enzymes sont néanmoins plutôt bas. Le moyen utilisé pour obtenir des hydroxylases performantes est l'évolution dirigée, en se basant sur l'exemple naturel de l'hydroxylation de l'huile de castor (ou huile de ricin). En effet, chez l'espèce *Ricinus comunis* (arbrisseau connu comme source importante d'huile de ricin), des changements mineurs dans la structure du site actif et dans la composition en acides aminés impliquent des changements importants dans l'activité enzymatique (Broun *et al.*, 1998).

La deuxième étape est la  $\beta$ -oxydation. Dans le cas de la production de lactones, c'est la  $\beta$ -oxydation péroxysomale qui est mise en jeu (Pagot & Belin, 1996). Cette voie, décrite pour la première fois chez la levure *Pichia guilliermondii*, permet d'oxyder un acide gras en une lactone plus courte (Endrizzi *et al.*, 1993). La  $\beta$ -oxydation est un ensemble de 4 réactions catalysées par 3 enzymes (Romero-Guido *et al.*, 2011). La première enzyme est une enzyme spécifique, l'acyl-CoA oxydase, qui catalyse la réaction suivante :

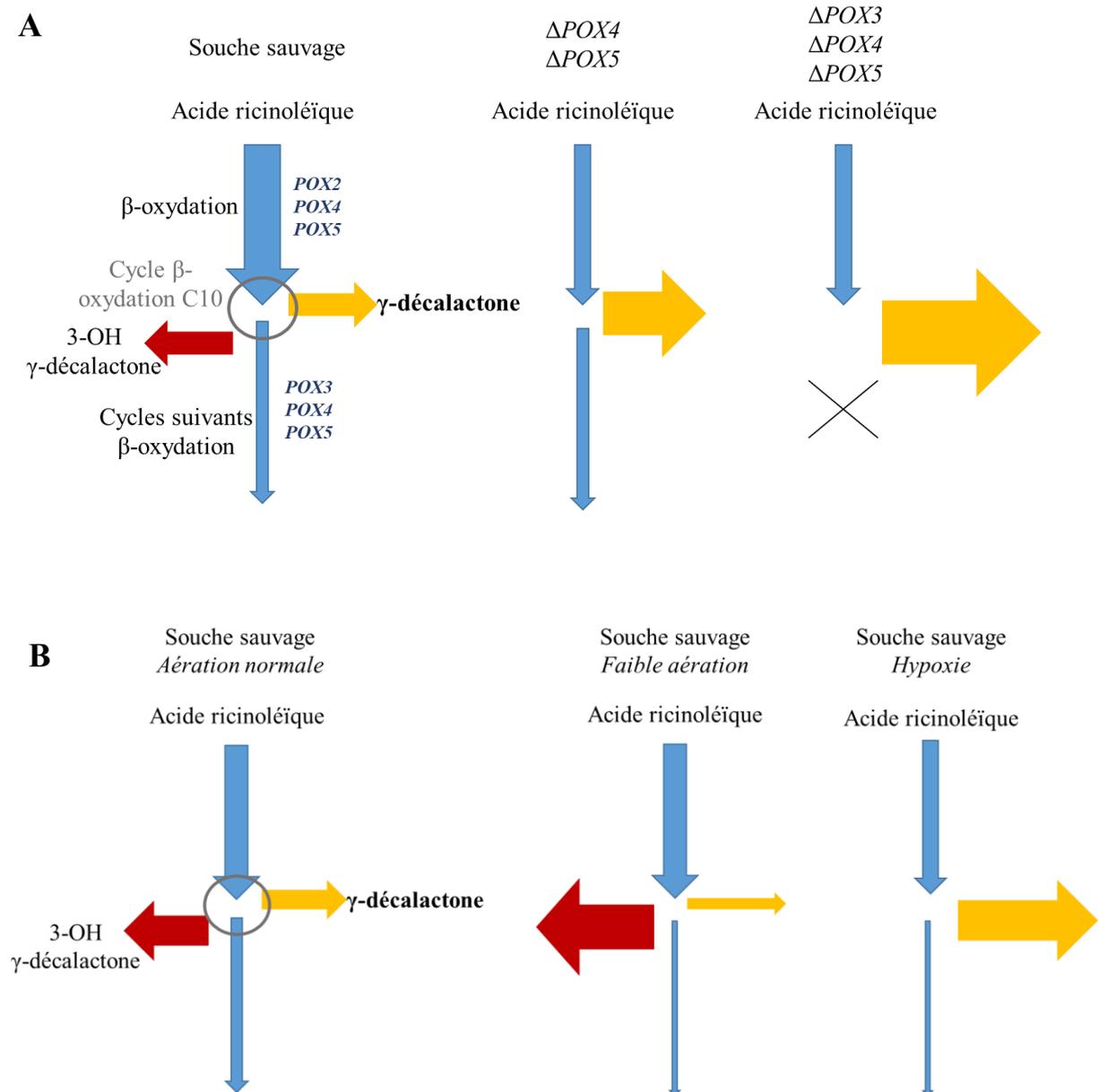


Puis, l'énoyl-CoA hydratase et la 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase forment un complexe enzymatique multifonctionnel, permettant *in fine* l'oxydation de la 3-hydroxyacyl-CoA par le NAD<sup>+</sup>.

Lors de chaque cycle, le composé donne naissance à un métabolite plus court de 2 molécules de carbone, ainsi qu'à 1 molécule d'acétyl. Théoriquement, le cycle est répété jusqu'à la dégradation complète du substrat. Cette voie dépend des pools d'acyl-CoA et de CoA libres, de la présence d'oxygène moléculaire et de la présence de NAD<sup>+</sup>.

De manière générale, la  $\beta$ -oxydation péroxysomale est un mécanisme compliqué à contrôler, car elle dépend de l'équilibre entre les différentes réactions. L'hydrolyse est favorisée lorsque les besoins cellulaires en CoA sont importants alors que des besoins en NAD<sup>+</sup> ou la saturation de l'enzyme suivante promeuvent la réaction inverse et l'élongation des acides gras.

L'espèce *Yarrowia lipolytica* est connue pour posséder un grand nombre de gènes codant pour des acyl-CoA oxydases, impliquées dans la première étape de la  $\beta$ -oxydation, et participent à la régulation de cette voie (Pagot *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1999b, 1999a, 1998). La délétion des gènes *POX3*, *POX4* et *POX5*, codant pour des acyl-CoA oxydases, résulte en une augmentation de la production de  $\gamma$ -décylactone et arrête sa dégradation, ainsi que la formation du co-produit possible de la  $\gamma$ -décylactone : la 3-hydroxy-  $\gamma$ -décylactone (Groguenin *et al.*, 2004; Waché *et al.*, 2001, 2000b, 2000a, 1998) (**Figure 22**). Cette dernière lactone s'accumule en cas de régénération insuffisante de NAD<sup>+</sup> (Gatfield *et al.*, 1993; Waché *et al.*, 2001). En cas de manque d'oxygène, il n'y a plus d'étape d'oxydation, le flux de la  $\beta$ -oxydation diminue, le NAD<sup>+</sup> devient suffisant et la 3-hydroxylactone ne s'accumule plus (E. Escamilla García *et al.*, 2007; García *et al.*, 2009a).



**Figure 22** : Facteurs influençant la production de  $\gamma$ -décalactone chez *Yarrowia lipolytica* à partir d'acide ricinoléique (d'après Romero-Guido *et al.*, 2011)

**A** : facteurs génétiques ; **B** : présence d'oxygène. Plus les flèches sont épaisses, plus le flux est important.

La troisième étape, faisant suite à la  $\beta$ -oxydation, est l'étape de lactonisation (ou cyclisation). Elle n'est pas considérée comme étant limitante, puisqu'elle se déroule par voie chimique à pH acide (Romero-Guido *et al.*, 2011). Néanmoins, il existe une diversité de réactions, en fonction des microorganismes et des conditions environnementales, de par la diversité des intermédiaires mis en évidence (Waché *et al.*, 2003). La structure de la lactone obtenue dépend de la

localisation du groupement OH sur l'acide gras initial. S'il est en position paire, une  $\gamma$ -lactone est obtenue. S'il est en position impaire, une  $\delta$ -lactone est obtenue (Romero-Guido *et al.*, 2011).

Il est également possible que les levures soient capables de produire les lactones étudiées à partir de lactones existantes. En effet, il a été montré que certaines souches de levures du consortium œnologique, pouvaient produire des lactones (à 10, 12 ou 14 atomes de carbone) à partir d'autres lactones contenues dans du bois de Massoia (présent en Nouvelle-Guinée) (Cardillo *et al.*, 1993). Cette réaction est réalisée à haut rendement, seulement limitée à la disponibilité en lactones insaturées, et ainsi surtout utilisée pour la production de  $\delta$ -décylactone.

### *2.3.3. Toxicité des lactones*

La toxicité des lactones vis-à-vis du microorganisme les ayant produites a été établie, notamment pour le cas de la  $\gamma$ -décylactone envers *Sporidiobolus salmonicolor* (Feron *et al.*, 1996). De façon générale, il a été montré que les lactones produites entraînaient une inhibition de la croissance cellulaire, et que le déclin de la viabilité était proportionnel à la quantité de lactones dans le milieu durant la biotransformation de l'acide gras précurseur (Alchihab *et al.*, 2010, 2009; Dufosse *et al.*, 1999; Endrizzi *et al.*, 1996; Feron *et al.*, 1996; Waché *et al.*, 2003).

Cette toxicité est dépendante de la lactone étudiée, puisque pour une concentration de 300 mg/L, la  $\gamma$ -butyrolactone n'a aucun effet, au contraire de la  $\gamma$ -décylactone, qui inhibe totalement la croissance des cellules (Aguedo *et al.*, 2002). La toxicité de cette lactone chez *Y. lipolytica* est liée à une diminution du pH intracellulaire, corrélée à une inhibition d'une H<sup>+</sup>-ATPase et à l'altération de la fluidité membranaire. Cette fluidisation ayant lieu même à de faibles concentrations, cela suggère une forte interaction entre cette lactone et les lipides constituant la membrane (Aguedo *et al.*, 2003a, 2003b). Néanmoins, les concentrations retrouvées dans le vin n'atteignent jamais des concentrations inhibitrices, quelle que soit la lactone étudiée.

## **3. Stratégies d'optimisation de la production d'arômes**

De nombreux paramètres peuvent influencer la production d'arômes par les levures pendant la fermentation. Les différentes stratégies d'optimisation peuvent impliquer la modulation du métabolisme par la modification des paramètres environnementaux et leur contrôle, mais aussi

la souche de levure utilisée. Une autre stratégie, pouvant mener à des modifications plus importantes du métabolisme, est le recours à l'évolution dirigée par pression environnementale.

### **3.1. Modulation du métabolisme des levures par les paramètres environnementaux et technologiques**

Au cours de la fermentation alcoolique, plusieurs paramètres peuvent influencer la production des arômes. Certains effets sont liés à la souche utilisée et d'autres sont liés aux facteurs environnementaux physiques (température, oxygène, ...), biotiques (azote, lipides, ...) ou technologiques. Il est important de connaître les effets des modifications des paramètres afin d'optimiser les stratégies de contrôle de la fermentation.

#### *3.1.1. Effet de l'azote*

L'azote est disponible à des concentrations extrêmement variables dans les différents moûts, en fonction des cépages, des conditions climatiques et de la conduite de la vigne. Les teneurs peuvent varier entre 60 et 400 mg/L (Bell & Henschke, 2005; Bely *et al.*, 1990b).

Les effets de l'azote varient quantitativement en fonction des souches et des conditions fermentaires, mais les tendances observées restent les mêmes (Rollero *et al.*, 2015). Ainsi, la production des alcools supérieurs est maximale pour une concentration d'azote comprise entre 200 et 300 mg/L de YAN (Rollero *et al.*, 2015). La production de propanol fait exception car elle est positivement corrélée à la quantité d'azote dans le moût, cette molécule est donc un marqueur de la quantité d'azote disponible (Mouret *et al.*, 2014a).

La teneur en esters acétiques est généralement augmentée par un ajout d'azote, induisant une plus forte expression des gènes *ATF1* et *ATF2* codant pour les acétyltransférases responsables de la conversion des alcools supérieurs en esters d'acétate (Fujiwara *et al.*, 1999; Seguinot *et al.*, 2018; Verstrepén *et al.*, 2003). La production des esters éthyliques est impactée par les ajouts d'azote, même si leur métabolisme n'est pas directement lié à celui de l'azote. Cette production augmente lorsqu'un ajout d'azote est réalisé (Mouret *et al.*, 2014a; Rollero *et al.*, 2015). Cet effet pourrait être la conséquence de l'utilisation des  $\alpha$ -cétoacides pour la synthèse des dérivés d'acyl-CoA. La synthèse de ces molécules pourrait être induite à cause de besoins en lipides pour la production de biomasse.

L'azote a également un effet sur la production de composés soufrés volatils. En cas de quantité d'azote assimilable suffisant, l'H<sub>2</sub>S produit est converti en cystéine et méthionine (Bell & Henschke, 2005; Park *et al.*, 1994; Swiegers & Pretorius, 2007; Ugliano & Henschke, 2009). La production d'H<sub>2</sub>S pendant la fermentation a lieu lors de faibles quantités d'azote assimilable et augmente en présence de sulfites (Jiranek *et al.*, 1995; Stratford & Rose, 1985).

L'azote peut avoir un impact sur la production des arômes, mais aussi sur le déroulement de la fermentation. En effet, c'est un élément limitant pour la croissance levurienne. Une carence azotée peut entraîner une fermentation languissante ou un arrêt fermentaire. Il est considéré qu'une concentration minimale de 120 à 130 mg/L d'azote assimilable initial est nécessaire pour une fermentation complète par *S. cerevisiae* (Agenbach, 1977; Bely *et al.*, 1990b). Afin de corriger ces carences, des ajouts d'azote peuvent être réalisés sous forme de di-ammonium phosphate (DAP), ou de produits commerciaux composés d'autolysats de levures contenant des acides aminés et des peptides (azote organique).

Pour *S. cerevisiae*, l'impact sur la cinétique fermentaire dépend du moment d'ajout. En phase de croissance, l'ajout permet d'augmenter la population et la vitesse maximale de fermentation. Dans tous les cas, l'ajout d'azote implique une diminution de la durée de fermentation (Bely *et al.*, 1990b).

### *3.1.2. Effet de la température*

La température est un levier important pour piloter l'activité métabolique de la levure. Il est nécessaire de réguler la température fermentaire, de par la composante exothermique de ce procédé. Une température trop élevée peut être délétère pour les levures, et provoquer une évaporation de certains composés volatils (Jolly *et al.*, 2006; Mouret *et al.*, 2014b). La perte des composés volatils par évaporation est liée à la volatilité et l'hydrophobicité des molécules concernées (Morakul *et al.*, 2011). Ainsi, une température élevée est toujours néfaste pour la concentration finale en esters éthyliques ou d'acétate, de par leur évaporation importante (Beltran *et al.*, 2008; Molina *et al.*, 2007; Mouret *et al.*, 2014b).

Certaines souches de non-*Saccharomyces* sont plus performantes pour l'activité fermentaire et la production de métabolites à 10 °C qu'à 25 °C, tandis que *S. cerevisiae* n'est pas performante à basse température (Bilbao *et al.*, 1997; Charoenchai *et al.*, 1998; Heard & Fleet, 1988; Torija *et al.*, 2003). A basse température, la tolérance à l'éthanol est augmentée pour certains souches

non-*Saccharomyces* (Charoenchai *et al.*, 1998; Gao & Fleet, 1988; Torija *et al.*, 2003). La température module également l'activité métabolique de production des composés volatils. la production d'isobutanol (sans prendre en compte l'évaporation) est positivement corrélée à la température, tandis que la production d'alcool isoamylique admet un maximum à 24 °C (Mouret *et al.*, 2014a).

### *3.1.3. Effet des lipides et de l'oxygène*

Les lipides sont cruciaux durant la fermentation car ils assurent le maintien de la viabilité, en préservant l'intégrité des membranes ainsi que la résistance à l'éthanol (Alexandre *et al.*, 1994; Lafon-Lafourcade *et al.*, 1979). En anaérobiose, les levures sont incapables de synthétiser les stérols ou les acides gras (Andreasen & Stier, 1954, 1953). Les levures peuvent trouver ces molécules dans les bourbes du moût de raisin, des particules solides provenant des pellicules, des pépins ou encore des rafles après pressurage. Dans le moût, les stérols se trouvent à 80 % sous forme de  $\beta$ -sitostérol, et les acides gras se trouvent en proportions égales sous formes saturée ou insaturée (Casalta *et al.*, 2016). Les quantités de bourbes présentes dans le moût de raisin avant fermentation sont dépendantes des pratiques œnologiques et du débourbage. Ainsi, il n'est pas rare que certains moûts d'Ugni Blanc, destinés à la production de Cognac, très peu débourbés, atteignent des valeurs de 1500 à 2000 NTU, contre 150 à 300 NTU pour d'autres itinéraires de vinification. Le débourbage est une étape importante de clarification des vins qui impacte la fermentation. En effet, un débourbage insuffisant aura pour potentielle conséquence la production d'arômes herbacés, tandis qu'un débourbage excessif entrainera une carence lipidique, menant à des fermentations languissantes, voire incomplètes, de par la faible viabilité cellulaire chez *S. cerevisiae* (Bertrand *et al.*, 1978; Julien *et al.*, 2000; Sablayrolles *et al.*, 1996).

La concentration en lipides impacte également la production d'arômes. En effet, si la disponibilité en acides gras insaturés est importante dans le milieu, leur synthèse *de novo* est moindre, réduisant dans le même temps la production d'esters éthyliques chez *S. cerevisiae* (Yunoki *et al.*, 2005). Enfin, les acides gras répriment l'expression de *ATF1*, impliqué dans la synthèse d'esters acétiques (Fujii *et al.*, 1994; Fujiwara *et al.*, 1999).

Dans le moût initial, la quantité d'O<sub>2</sub> présente est faible. Lors de la vinification, il est nécessaire d'apporter de l'oxygène au moût afin de permettre aux levures de synthétiser de l'ergostérol ainsi que des phospholipides insaturés, augmentant leur résistance à l'éthanol et donc leur viabilité. Chez les levures non-*Saccharomyces*, cet effet est d'autant plus important. (Mauricio

*et al.*, 1998, 1991; Morales *et al.*, 2015; Pina *et al.*, 2004). Plusieurs études ont montré des tendances différentes sur la production des composés volatils. En effet, Valero *et al.*, (2002) ont montré que l'ajout d'O<sub>2</sub> entraînait une augmentation de la production d'alcools supérieurs et d'esters, tandis que Bertrand & Torres-Alegre (1984) ont noté qu'un tel ajout impliquait une augmentation de la production des esters acétiques et une diminution de la production d'alcools supérieurs. Enfin, Varela *et al.* (2012) ont montré que l'ajout d'O<sub>2</sub> entraînait principalement une production plus importante en alcools supérieurs et acétate d'éthyle. Ces observations parfois contradictoires sont sûrement dues à l'utilisation de souches différentes de *S. cerevisiae* pour les fermentations. Ces études montrent l'importance du contrôle de l'O<sub>2</sub> dans la volonté de moduler les arômes du vin.

Le contrôle de la teneur en lipides et en O<sub>2</sub> peut être relativement facilement réalisé, et représente une technologie intéressante pour la modulation des arômes des vins. En effet, d'un point de vue technologique, l'O<sub>2</sub> peut être ajouté lors des remontages, ou par des apports contrôlés, tandis que la teneur en lipides peut être contrôlée lors du débouillage.

#### *3.1.4. Effets des vitamines et des oligo-éléments*

Généralement, les vitamines, qui sont des cofacteurs impliqués dans de nombreuses réactions enzymatiques, sont présentes en quantités suffisantes dans les moûts de raisin, mais leur addition permet une meilleure croissance cellulaire, et peut jouer un rôle dans la production d'arômes (Duc *et al.*, 2020; Hagen *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2003).

La biotine peut influencer la production de nombreux arômes tels que les alcools supérieurs, les esters ou les acides gras (Lynen *et al.*, 1980). Une carence en biotine implique une synthèse insuffisante d' $\alpha$ -cétoglutarate, et donc d'acides aminés, et par la suite, d'alcools supérieurs (Bohlscheid *et al.*, 2007). Une telle carence entraîne également une diminution de la production d'acides gras à moyenne chaîne et leurs esters associés, car elle est nécessaire pour l'activation de l'acétyl-CoA carboxylase durant la synthèse *de novo* des acides gras.

L'acide pantothénique a un rôle de composant structurel du coenzyme A. Ainsi, une carence en pantothénate entraîne une diminution de la concentration en acétyl-CoA, et donc en acides gras et en esters éthyliques (Bohlscheid *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2003). L'acide pantothénique est aussi important car il est impliqué dans la synthèse de composés soufrés, notamment l'H<sub>2</sub>S, une

carence en acide pantothénique conduisant à une production importante d'H<sub>2</sub>S (Edwards & Bohlscheid, 2007).

La thiamine est impliquée sous forme de thiamine pyrophosphate dans de nombreuses voies métaboliques en conditions fermentaires, notamment la VPP, la voie d'Ehrlich et dans la réaction principale de production d'éthanol (Li *et al.*, 2010). Elle est rapidement consommée dans les premières heures de la fermentation, que ce soit par des levures non-*Saccharomyces*, ou par *S. cerevisiae*. Une carence en thiamine, notamment lors de l'inoculation de *S. cerevisiae* en fermentation séquentielle, peut entraîner un risque de fermentation languissante (Bataillon *et al.*, 1996).

Enfin, les ions métalliques et les minéraux sont essentiels, jouant des rôles physiologiques majeurs pendant la croissance et la fermentation alcoolique. Ils interviennent également dans la production d'arômes (Ibanez *et al.*, 2008; Nicola *et al.*, 2009; Pereira, 1988). L'ajout de CuSO<sub>4</sub> permet notamment de diminuer ou de supprimer certains caractères réduits post-fermentaires (Smith *et al.*, 2015). Néanmoins, certaines études ont montré que la présence de Cu résiduel dans des vins embouteillés impliquaient une concentration plus importante en composés soufrés volatils (Ugliano *et al.*, 2011; Viviers *et al.*, 2013).

D'autres paramètres peuvent influencer la fermentation alcoolique, tels que l'ajout de SO<sub>2</sub>, le pH ou encore le statut redox, mais ne seront pas détaillés dans ce travail.

### **3.2. Approches d'évolution dirigée**

Les microorganismes sont capables de survivre et de s'adapter dans divers types d'environnement. Lorsque la pression environnementale est forte, l'adaptation peut se faire par l'acquisition de phénotypes bénéfiques par des mutations génomiques aléatoires et une sélection positive. Par conséquent, les microorganismes peuvent s'adapter en modifiant les réseaux métaboliques afin d'avoir croissance optimale, appelée "l'évolution adaptative" (Jeong *et al.*, 2016). Dans des conditions de laboratoire contrôlées, les mécanismes de l'évolution moléculaire peuvent être étudiés et contrôlés pour différentes applications. L'évolution adaptative en laboratoire (ALE) peut être appliquée aux levures car elles se régénèrent rapidement, elles maintiennent de grandes populations et il est facile de créer et de maintenir des environnements homogènes.

Les stratégies d'évolution dirigée, ou évolution adaptative, sont basées sur la théorie de la sélection naturelle de Darwin (Rosenberg, 2003). Ce procédé implique l'adaptation à un environnement stressant par des mutations spontanées. La propagation du clone ancestral doit avoir lieu pendant de nombreuses générations dans des conditions de culture contrôlées et reproductibles. Les organismes ayant ainsi intégré ces mutations avantageuses prospèrent et dominant lorsqu'elles sont soumises à ce stress spécifique (Foster, 1999).

La première expérience d'évolution dirigée en laboratoire a été effectuée par William Dallinger, à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle. Il a cultivé des microorganismes pendant sept ans en augmentant progressivement la température de 15,5°C à 70°C. Les souches, au départ sensibles à une température de 23°C, ont acquis la capacité de croître à 70°C. Malheureusement, elles sont devenues sensibles aux faibles températures (Haas, 2000). Il est donc crucial de trouver une stratégie permettant l'acquisition d'un nouveau trait phénotypique, tout en conservant les avantages initiaux pour le procédé souhaité.

Concernant des stratégies d'évolution dirigée, l'étape commune est de réaliser un criblage préliminaire afin de sélectionner une ou plusieurs souches possédant les meilleures capacités concernant le caractère souhaité (résistance à l'éthanol, production de composés aromatiques, ...). Ensuite, la souche sélectionnée est améliorée, généralement par pression de sélection. Dans cette approche, le microorganisme est soumis à un stress environnemental qui le fera muter - évoluer – au cours des générations.

A l'issue de ces divers repiquages, ou diverses générations, il est possible d'obtenir une souche améliorée quant au trait souhaité. Le point crucial de cette stratégie est donc de trouver une pression de sélection adéquate, adaptée.

Dans le secteur œnologique, des approches d'évolution dirigée ont été réalisées, que ce soit concernant la fermentation malolactique ou alcoolique. La fermentation malolactique implique la conversion bactérienne de l'acide L-malique en acide L-lactique. Elle est réalisée dans la grande majorité des vins rouges et dans certains vins blancs pour désacidifier des vins et stabiliser les vins microbiologiquement (Davis *et al.*, 1985). De nombreux travaux se sont focalisés sur l'amélioration de souches de l'espèce *Lactobacillus plantarum*. En effet, la croissance de cette espèce en présence de glycérol en anaérobiose est trop faible pour être mesurée. En revanche, après 500 générations en chemostat, en utilisant le glycérol comme facteur limitant, le taux de croissance a été multiplié par 10 (Teusink *et al.*, 2009).

Plus récemment, des travaux portant sur *Oenococcus oeni* ont été réalisés. En effet, certaines souches sont sensibles à des concentrations élevées en éthanol, à un pH acide ou encore à la présence de SO<sub>2</sub>, affectant négativement le bon déroulement de la fermentation malolactique (Da Silveira & Abee, 2009; Takahashi *et al.*, 2014; Tourdot-Maréchal *et al.*, 1999). Afin de développer des souches résistantes à des fortes teneurs en éthanol, certaines souches ont été préalablement sélectionnées, puis évoluées dans un milieu contenant des concentrations croissantes en éthanol, afin d'exercer une pression environnementale forte, mais qui n'inhibait pas totalement la croissance bactérienne (Betteridge *et al.*, 2018; Jiang *et al.*, 2018). Ces évolutions ont abouti à l'apparition de mutations permettant d'obtenir des souches plus résistantes à l'éthanol, en n'augmentant pas la quantité d'acide acétique produit (Jiang *et al.*, 2018). Cette approche permet également d'obtenir une meilleure connaissance sur les bases génétiques du caractère étudié (Betteridge *et al.*, 2018).

Les levures du consortium œnologique, que ce soit des souches de *S. cerevisiae* ou des non-*Saccharomyces* ont été également améliorées par des stratégies d'évolution dirigée, notamment pour la vitesse de fermentation (McBryde *et al.*, 2006).

La stratégie développée par Cadière *et al.* (2011) pour orienter le flux carboné vers la VPP est basée sur l'utilisation d'un substrat carboné faiblement assimilé par la levure et intermédiaire de la VPP, le gluconate, comme pression de sélection (**Figure 3**). Cela a permis l'obtention d'une souche présentant une faible production d'acide acétique, une augmentation significative du flux de carbone à travers la VPP, et une production importante d'acétate d'isoamyle et d'acétate de 2-phényléthyle.

Des études ont également porté sur la diminution de la production d'éthanol, en redirigeant le flux carboné vers le glycérol en appliquant un stress osmotique par l'utilisation de KCl (Tilloy *et al.*, 2014). Enfin, des études ont porté sur des évolutions en modifiant les concentrations en lipides dans le milieu, afin de diminuer la concentration finale en acide acétique (Deroite *et al.*, 2018).

Les approches d'évolution dirigée présentent de nombreux avantages, comme en attestent les réussites précédemment citées. De plus, le fait de jouer sur la souche de levure utilisée ou les paramètres fermentaires peut ne pas être suffisant pour le phénotype désiré, et l'évolution dirigée peut être une alternative intéressante. Néanmoins, il est nécessaire d'avoir une certaine connaissance des voies métaboliques étudiées afin de choisir au mieux la pression de sélection et de favoriser les mutations pour améliorer le phénotype désiré. Il est également difficile de

faire évoluer la souche vers le phénotype désiré tout en conservant les autres phénotypes qui sont intéressants, tels que les capacités fermentaires.

Il existe d'autres méthodes pour améliorer les souches : les approches d'ingénierie génétique (aboutissant au développement d'OGM), mais également l'hybridation entre souches, qui ne seront pas développées dans ce travail de thèse. L'utilisation d'OGM est interdite dans ce secteur d'activité.





---

# **MATERIELS & METHODES**

---



## 1. Levures

De nombreuses souches de levures ont été utilisées au cours de ce travail de thèse. Les 52 souches non-*Saccharomyces* étudiées sont répertoriées dans le **Tableau 12**. Ces souches ont été fournies par l'INRAE de Montpellier et le CIRM Levures, précédemment isolées sur des baies de raisin. De plus, 29 souches de *Saccharomyces cerevisiae* fournies par Lallemand SAS, sous forme de gélose inclinée, ont été étudiées (notées L1 à L26, EC1118®, 100\*145 et D214). L'ensemble des 81 souches ont été transférées dans du milieu YEPD (glucose 20 g/L, peptone 20 g/L et extrait de levures 10 g/L) contenant 15 % de glycérol, afin d'être stockées et conservées à -80 °C.

**Tableau 12 :** Souches non-*Saccharomyces* étudiées au cours de la thèse

Souches (code utilisé)		
<i>Candida apicola</i> PYV8-49 (1A)	<i>Lachancea thermotolerans</i> 3775 (4B)	<i>Pichia manshurica</i> 3788 (7F)
<i>Candida californica</i> PYV8-3 (1B)	<i>Metschnikowia andauensis</i> 3795 (5A)	<i>Pichia occidentalis</i> 3776 (7G)
<i>Candida diversa</i> 3771 (1C)	<i>Metschnikowia andauensis</i> 3801 (5B)	<i>Pichia occidentalis</i> 3803 (7H)
<i>Candida diversa</i> 3778 (1D)	<i>Metschnikowia chrysoperlae</i> 3784 (5C)	<i>Pichia sporocuriosa</i> PYV8-69 (7I)
<i>Candida glabrata</i> 3773 (1E)	<i>Metschnikowia chrysoperlae</i> 3796 (5D)	<i>Pichia terricola</i> 3766 (7J)
<i>Candida glabrata</i> 3790 (1F)	<i>Metschnikowia fructicola</i> NZ 298 (5E)	<i>Pichia terricola</i> 3789 (7K)
<i>Candida liquefaciens</i> 3791 (1G)	<i>Metschnikowia fructicola</i> NZ 392 (5F)	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 3767 (8A)
<i>Candida orthopilopsis</i> 3764 (1H)	<i>Metschnikowia guilliermondii</i> 3794 (5G)	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 3804 (8B)
<i>Candida railenensis</i> PYV8-93 (1I)	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> 3798 (5H)	<i>Starmerella bacillaris</i> 3768 (10A)
<i>Cryptococcus heveanensis</i> PYV7-4 (2A)	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> 3802(5I)	<i>Starmerella bacillaris</i> 3800 (10B)
<i>Cryptococcus laurentii</i> 3781 (2B)	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> NZ 58 (5J)	<i>Torulasporea delbrueckii</i> 3786 (11A)
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i> 3792 (3A)	<i>Meyerozyma caribbica</i> 3769 (6A)	<i>Torulasporea delbrueckii</i> 3799 (11B)
<i>Hanseniaspora opuntiae</i> 3774 (3B)	<i>Meyerozyma caribbica</i> 3783 (6B)	<i>Trigonopsis cantarelli</i> PYdV7-41 (12A)
<i>Hanseniaspora opuntiae</i> 3779 (3C)	<i>Pichia guilliermondii</i> 3785 (7A)	<i>Trigonopsis vinaria</i> 3782 (12B)
<i>Hanseniaspora osmophila</i> PYV7-30 (3D)	<i>Pichia kluyveri</i> 3777 (7B)	<i>Wickerhamomyces anomalus</i> 3763 (13A)
<i>Hanseniaspora uvarum</i> 3787 (3E)	<i>Pichia kluyveri</i> 3780 (7C)	<i>Zygotulasporea florentina</i> PYV7-16 (14A)
<i>Hanseniaspora uvarum</i> 3793 (3F)	<i>Pichia kudriavzevii</i> 3770 (7D)	
<i>Lachancea thermotolerans</i> 3765 (4A)	<i>Pichia kudriavzevii</i> 3772 (7E)	

Pour chaque utilisation, les souches sont prélevées du stock glycérol, avant d'être étalées sur une boîte de PetriPetri contenant du milieu YEPD gélosé et incubées 48 h à 28 °C. Une colonie est prélevée à partir de la boîte, et inoculée dans un tube de 50 mL stérile contenant 20 mL de milieu YEPD. En fonction des taux d'inoculation ainsi que des volumes de moûts à inoculer, une autre préculture est réalisée, dans un erlenmeyer de 500 mL contenant 150 mL de milieu YEPD. Les précultures sont incubées 24 h à 28 °C, sous agitation.

Avant l'inoculation des fermenteurs, la préculture est centrifugée (4500 rpm, 5 min), puis le culot resuspendu dans de l'eau physiologique stérile (9 g/L de NaCl). Puis, le volume nécessaire à l'inoculation est calculé en dénombrant la population de la préculture resuspendue (voir 4.1.1.). Si le volume d'inoculation est supérieur à 1 % du volume du fermenteur à ensemercer, le volume nécessaire est prélevé, puis centrifugé à nouveau avant d'être totalement repris dans un volume inférieur d'eau physiologique stérile.

## **2. Milieux de fermentation**

### **2.1. Moûts synthétiques**

Un moût synthétique (MS) a été utilisé et vise à mimer les caractéristiques moyennes du moût de raisin naturel (Bely *et al.*, 1990b) (**Tableaux 13 à 18**). Les différents MS préparés sont toujours composés de 200 g/L de sucres (glucose et fructose, à un ratio 50/50) et leur pH est ajusté à 3,3. Les MS utilisés contiennent 200 mg/L d'azote assimilable (YAN) sous forme d'azote minéral (ammonium) et sous forme d'azote organique provenant des acides aminés (**Tableaux 13 et 18**). En fonction des expériences menées, les sources d'azote peuvent être modifiées, en conservant un total de 200 mg/L de YAN. Des lipides sont également ajoutés au moût sous forme de phytostérols (4 mg/L de  $\beta$ -sitostérol) ou d'acides gras (20  $\mu$ g/L à 10 mg/L d'acide ricinoléique) selon les expériences.

Les **tableaux 13 à 18** montrent la composition d'un MS contenant 200 g/L de sucres, 200 mg/L de YAN, et 4 mg/L de phytostérols (MS couramment utilisé).

Avant utilisation, les MS sont pasteurisés durant 15 min, puis aérés pendant 20 à 45 min, en fonction du volume du fermenteur.

**Tableau 13 :** Composition d'un moût synthétique contenant 200 g/L de sucres, 200 mg/L d'azote assimilable et 5 mg/L de phytostérols

Le pH est ajusté à 3,4 avec une solution de NaOH à 10 M. L'acide citrique est utilisé en remplacement de l'acide tartrique communément retrouvé dans les moûts, car il ne précipite pas lors de la congélation des moûts synthétiques.

Composés	Quantité (pour 1 L)
Glucose	100 g
Fructose	100 g
Acide malique	6 g
Acide citrique	6 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,75 g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,25 g
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0,155 g
NaCl	0,2 g
NH <sub>4</sub> Cl	0,216 g
Solution mère d'oligo-éléments (Tableau 14)	1 mL
Solution mère de vitamines (Tableau 15)	10 mL
Solution mère de phytostérols (Tableau 16)	0,20 mL
Solution mère d'acides aminés (Tableau 18)	6,16 mL
Solution mère de chlorure de fer (Tableau 17)	1 mL

**Tableau 14 :** Composition de la solution mère d'oligo-éléments

La solution est stérilisée par filtration à 0,22 µm et conservée à 4°C.

Composés	Quantité (pour 1 L)
MnSO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	4 g
ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	4 g
CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	1 g
KI	1 g
CoCl <sub>2</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,4 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1 g
Ammonium heptamolybdate (H <sub>32</sub> Mo <sub>7</sub> N <sub>6</sub> O <sub>28</sub> )	1 g

**Tableau 15 : Composition de la solution mère de vitamines**

Cette solution est conservée à -20 °C.

Composés	Quantité (pour 1 L)
Myo-inositol	2 g
Pantothénate de calcium	0,15 g
Thiamine, hydrochloride	0,025 g
Acide nicotinique	0,2 g
Pyridoxine	0,025 g
Biotine	3 mL

**Tableau 16 : Composition de la solution mère de phytostérols**

Cette solution est conservée à 4 °C et chauffée à 50°C avant utilisation.

Composés	Quantité (pour 1 L)
Phytostérols	2 g
Tween 80	50 mL
Ethanol pur	Qsp 100 mL

**Tableau 17 : Composition de la solution mère de chlorure de fer**

Cette solution est conservée à 4 °C.

Composés	Quantité (pour 1 L)
Chlorure de fer (III) hexahydraté	20 g

**Tableau 18 : Composition de la solution mère d'acides aminés**

Cette solution est conservée à -20 °C.

Composés	Quantité (pour 1 L)
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

## 2.2. Moûts naturels

Quatre moûts naturels ont été utilisés : deux moûts d'Ugni blanc (2016 et 2018) provenant de Cognac (fournis par l'entreprise Martell), un Chardonnay (2016), et un mélange Viognier/Maccabeu. Ces deux derniers moûts proviennent de l'Unité expérimentale de Pech Rouge, près de Narbonne (UE PR). En fonction des expériences, le YAN a été ajusté (par ajout de di-ammonium phosphate (DAP)), et des phytostérols ont été ajoutés. Les caractéristiques des moûts naturels utilisés sont recensées dans le **Tableau 19**. Tous les moûts sont stockés à -20 °C avant utilisation. Les moûts provenant de l'UE PR sont préalablement flash-pasteurisés avant d'être congelés.

**Tableau 19** : Analyses classiques des moûts naturels

	Ugni blanc 2016	Ugni blanc 2018	Chardonnay 2016	Viognier/ Maccabeu 2019
Glucose (g/L)	81,6	87,2	116,1	110,2
Fructose (g/L)	78,9	84,3	111,4	108,2
Sucre total (g/L)	160,5	171,5	227,5	218,4
Azote assimilable (mg N/L)	92	74	192	87
Azote assimilable ajouté (mg N/L)	0	110	0	120
Turbidité (NTU)	1150	1400	20	230
Phytostérols ajoutés (mg/L)	0	0	4	0
SO <sub>2</sub> libre (mg/L)	0	0	14	0
SO <sub>2</sub> total (mg/L)	0	0	36	0
Provenance	Cognac	Cognac	UE PR	UE PR

### 3. Fermentations et cinétiques

Les fermentations ont été réalisées à des échelles différentes, allant de 15 mL à 80 L. Les méthodes de suivi de la cinétique de fermentation diffèrent en fonction de l'échelle.

#### 3.1. Fermentations en tubes de 15 mL

Les fermentations en 15 mL sont réalisées dans des tubes en verre, équipés d'un bouchon percé bouché avec une pointe à filtre stérile pour permettre la libération du CO<sub>2</sub> produit lors de la fermentation. Un barreau aimanté permet l'homogénéisation du milieu (**Figure 23**). Les tubes sont placés dans des racks, eux-mêmes disposés sur des plaques agitantes. Le système est situé dans une pièce à température régulée. Un robot (PhenOFerm), contrôlé par un logiciel (PlateButler®), se saisit des tubes les uns après les autres pour les placer sur une balance, les peser, et enfin les repositionne sur le rack. Dans cette configuration, jusqu'à 360 fermentations

peuvent être réalisées simultanément. Les poids des tubes sont enregistrés au cours du temps et les données brutes sont envoyées à un logiciel développé en interne (RobView), afin que les paramètres de suivi de fermentation soient calculés, tels que le CO<sub>2</sub> cumulé ou la vitesse de production de CO<sub>2</sub>. Ces différentes données sont transmises, stockées et consultables sur une base de données (ALFIS), *via* une interface web.



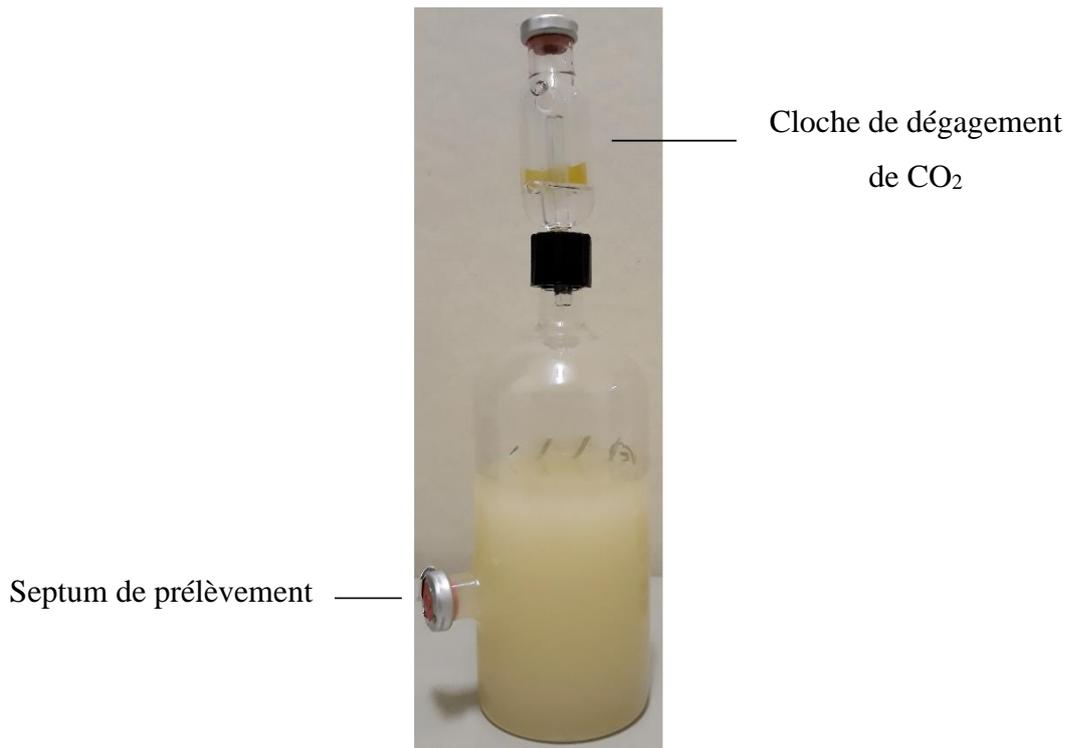
**Figure 23** : Photo du robot PhenOFerm en configuration « tubes »

### 3.2. Fermentations en fermenteurs de 300 mL

Les fermenteurs sont en verre, équipés d'une cloche remplie d'eau permettant le dégagement de CO<sub>2</sub>, en conservant l'anaérobiose durant la fermentation, ainsi que d'un septum permettant de prélever sans entrée d'oxygène (**Figure 24**). Un barreau aimanté est placé dans le fermenteur afin d'homogénéiser le milieu pendant la fermentation. Afin de contrôler la température, les fermenteurs sont placés dans une étuve ou une pièce climatisée dédiées, au sein desquelles se trouvent des plaques agitantes.

La pasteurisation du moût entraînant sa désoxygénation, de l'air comprimé est injecté stérilement dans chaque fermenteur pour une durée de 20 min, permettant d'atteindre une concentration en oxygène dissous en équilibre avec l'espace de tête.

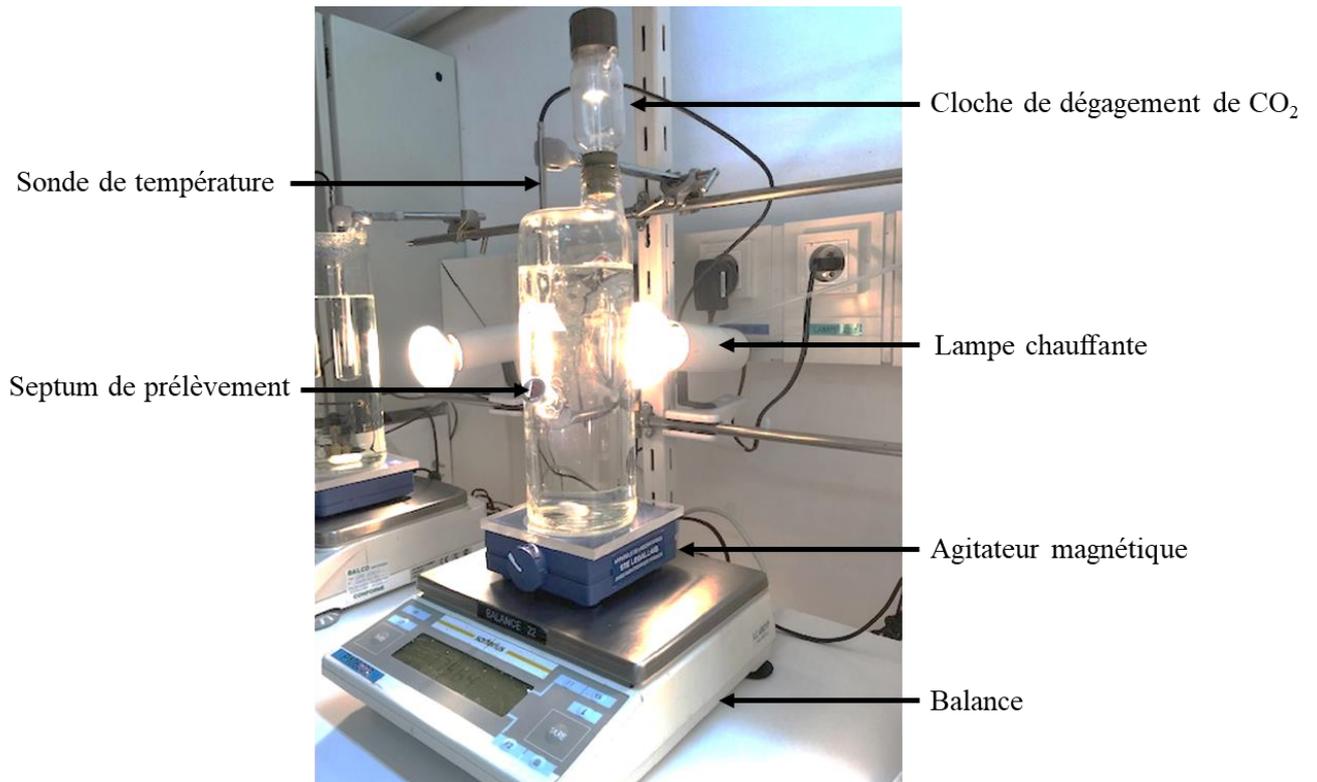
Le suivi de la cinétique fermentaire peut se faire de 2 façons : en utilisant le robot PhenOFerm (présenté ci-dessus) ; par pesée manuelle des fermenteurs, entre 1 et 4 fois par jour, selon l'avancement de la fermentation.



**Figure 24** : Photo d'un fermenteur de 300 mL

### **3.3. Fermentations en fermenteur de 1 L**

Comme les fermenteurs de 250 mL, ces fermenteurs en verre sont équipés d'une cloche de dégagement de CO<sub>2</sub> remplie d'eau, d'un barreau aimanté et d'un septum (**Figure 25**). Afin que la fermentation se déroule à température constante (24 °C), le fermenteur, placé dans une pièce à température régulée (entre 12 et 18 °C), est équipé d'une sonde de température, qui mesure la température au sein de la phase liquide, ainsi que d'une lampe chauffante. Lorsque la température est inférieure à la température de consigne, un système déclenche l'allumage de la lampe, ainsi que son arrêt lorsque la température atteint la valeur de consigne. Avant inoculation, le milieu est mis à température. Chaque fermenteur est placé sur une balance individuelle afin de suivre la cinétique fermentaire (voir partie 3.5.).

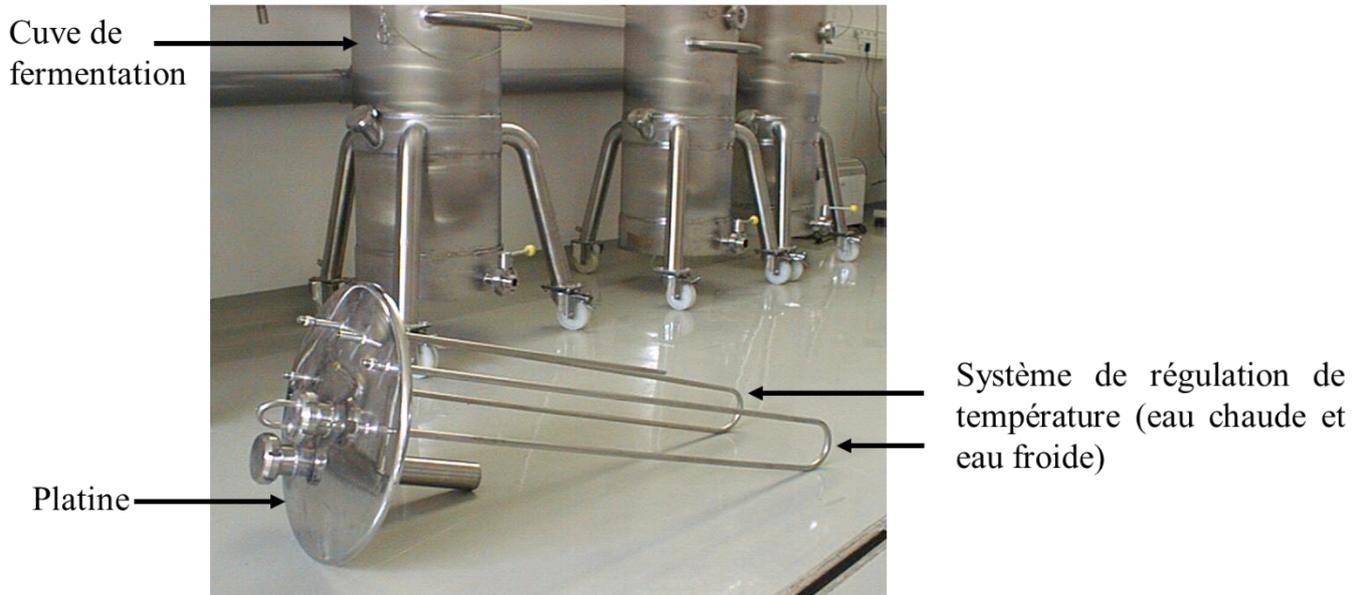


**Figure 25** : Photo d'un fermenteur de 1 L

### 3.4. Fermentations en fermenteurs de 100 L

Les fermentations en fermenteurs de 100 L sont réalisées dans la halle de fermentation différée, au sein de l'unité expérimentale de Pech Rouge. Chaque cuve en inox est hermétiquement fermée par une platine composée d'une sonde de température, de raccords pour des vannes assurant la régulation de température (par eau chaude ou eau froide), d'une sortie pour le CO<sub>2</sub> produit reliée à un débitmètre pour le suivi de la cinétique fermentaire, d'un bouchon pouvant être ouvert pour l'ajout de certains éléments lors de la fermentation, et enfin de raccords aux lignes chauffées permettant le suivi en ligne des arômes fermentaires majoritaires (voir 4.4.2.). Les moûts naturels utilisés pour les fermentations sont préalablement pasteurisés et stockés dans des cuves à 2 °C. Les moûts sont ensuite mis à température dans la cuve de fermentation grâce à la circulation d'eau chaude dans des manches en inox immergées dans le moût (**Figure 26**). Pour des raisons pratiques (production de mousse, notamment), 80 à 90 L de moût sont utilisés

par cuve. Au cours de la fermentation, l'homogénéisation du milieu est uniquement assurée par les mouvements de convection liés à la production de gaz.



**Figure 26 : Photo de cuves de fermentation de 100 L**

### **3.5. Suivi de la cinétique fermentaire**

Concernant tous les fermenteurs (exceptés ceux de 100 L), les suivis de la cinétique fermentaire et de l'avancement de la fermentation sont réalisés en mesurant la perte de poids, due au dégagement de CO<sub>2</sub> produit suite à la consommation du sucre présent dans le moût.

Cette mesure est réalisée automatiquement à différents intervalles de temps, en fonction des volumes des fermenteurs : toutes les 20 min pour les fermenteurs de 1 L, toutes les heures pour les fermenteurs de 300 mL (par le robot PhenOFerm) et toutes les 4 h pour les tubes de fermentation (par le robot PhenOFerm, également). Suite à l'acquisition de la mesure du poids, cette dernière est transmise à un logiciel développé en interne (sous LabVIEW), qui calcule la vitesse de production de CO<sub>2</sub>, le cumul de CO<sub>2</sub> produit, et stocke toutes ces informations dans la base de données ALFIS.

Concernant les fermenteurs de 100 L, l'avancement de la fermentation est suivi par mesure du dégagement de CO<sub>2</sub>, par l'utilisation d'un débitmètre. Cette donnée est ensuite transmise au même logiciel que celui cité ci-dessus, permettant le calcul des mêmes paramètres, et stocke ces données dans ALFIS.

Enfin, pour les fermenteurs de 300 mL (hors robot PhenOFerm), la mesure du poids est réalisée manuellement. Puis, le CO<sub>2</sub> produit et la vitesse de production de CO<sub>2</sub> ( $v_{\text{CO}_2,t}$ ) sont calculés de la manière suivante :

$$\text{CO}_{2,t} = \text{CO}_{2,t-1} + \frac{\text{Poids}_{t-1} - \text{Poids}_t}{\text{Volume}_t}$$

$$v_{\text{CO}_2,t} = \frac{d\text{CO}_{2,t}}{dt}$$

## 4. Dosages

### 4.1. Biomasse

#### 4.1.1. Compteur de cellules

Les souches de *S. cerevisiae* sont comptées à l'aide d'un compteur électronique de particules (Counter ZB-2, Beckman Coulter). L'appareil fonctionne en se basant sur les changements de résistance électrique liés au passage de particules non-conductrices en suspension dans un électrolyte (Isoton, Beckman Coulter). Les échantillons sont d'abord dilués dans de l'électrolyte afin de rester dans la gamme linéaire se situant entre 20000 et 80000 cellules/mL.

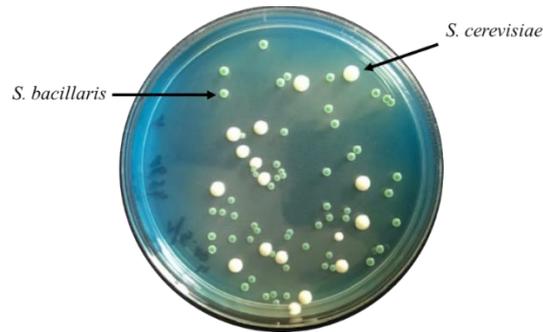
#### 4.1.2. Cytométrie en flux

Le milieu de culture est prélevé au cours de la fermentation, puis repris dans du tampon PBS 1X (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM, pH 7,4) afin de se situer dans la gamme de linéarité du cytomètre (entre 500 et 4000 événements par seconde). 20 µL du mélange « échantillon/PBS » sont utilisés pour chaque comptage, à un débit de 14 µL/min. Les conditions de comptage sont décrites par Delobel *et al.*, (2012).

#### 4.1.3. Dénombrement sur boîtes de Petri

Lors des cultures mixtes, les levures *S. cerevisiae* et non-*Saccharomyces* sont différenciées par étalement sur milieu Wallerstein Laboratory (WL nutrient agar, Merck, Darmstadt, Allemagne). Les colonies de *S. cerevisiae* apparaissent blanches sur ce milieu, celles de *Hanseniaspora osmophila* sont vertes foncées, tandis que les colonies de *S. bacillaris* sont vertes, et blanches sur la périphérie (**Figure 27**). Ce milieu contient du vert de bromocrésol (bleu à pH 5,5), différemment métabolisé par les espèces de levures (Pallmann *et al.*, 2001). Pour le comptage, l'échantillon est dilué entre 5 000 et 100 000 fois dans de l'eau physiologique stérile, afin d'obtenir 30 à 200 colonies par boîte de Petri. 100 µL sont étalés sur boîte.

Les colonies de *S. cerevisiae* sont visibles après 48 h à 28 °C, tandis que celles de *S. bacillaris* sont visibles après 4 jours à 28 °C. Les concentrations obtenues sont en CFU/mL.



**Figure 27 :** Différenciation des espèces de *Starm. bacillaris* et *S. cerevisiae* sur milieu WL.

#### 4.1.4. Matière sèche

La masse sèche est déterminée par la filtration de 10 mL de culture sur un filtre nitrocellulose (0,22 µm). Puis, le filtre est rincé avec 50 mL d'eau osmosée, avant d'être placé dans une étuve à 110 °C pendant 3 jours. La masse sèche est déterminée par la formule suivante et est exprimée en :

$$m_{\text{sèche}}(\text{g}) = m_{\text{filtre après séchage}}(\text{g}) - m_{\text{filtre initial}}(\text{g})$$

## 4.2. Dosage de l'azote

### 4.2.1. Ammonium

La concentration en ammonium contenu dans les surnageants de culture est déterminée par kit enzymatique (Ammonia, Boehringer Mannheim/R-Biopharm, Darmstadt, Allemagne). Celui-ci est basé sur la réaction suivante :



Le NADH étant dosable par spectrophotométrie à 340 nm, la quantité d'ammonium est calculée par la perte d'absorbance entre le mélange initial et après l'ajout du 2-oxoglutarate et de l'enzyme (incubation 20 minutes à température ambiante). La concentration en ammonium peut être déterminée lorsqu'elle est comprise entre 8 et 80 mg/L.

#### 4.2.2. Acides aminés libres

##### 4.2.2.1. Dosage des acides aminés libres

Quatre volumes de surnageant de culture sont mélangés à 1 volume d'acide sulfo-salicylique (SSA) 25% contenant de la norleucine à 2500 nmol/mL (étalon interne). Cela permet de précipiter les protéines. Après 1h d'incubation à 4 °C, les échantillons sont centrifugés 10 min à 4 °C et filtrés à 0,22 µm.

Les échantillons sont ensuite analysés par chromatographie liquide sur colonne échangeuse de cations (résine anionique Ultrapac-8 Lithium-form, Serlabo, France), par un appareil HPLC de type Biochrom 30 (Serlabo, France). La séparation des acides aminés est réalisée à l'aide d'un gradient de température (32 °C à 75 °C), de pH (2,8 à 3,55) et de concentration en contre ions (citrate de lithium de 200 mM à 1650 mM), de par l'utilisation successive de plusieurs tampons (**Tableau 20**). La colonne est régénérée à 75 °C avec un tampon d'hydroxyde de sodium 300 mM. Les acides aminés sont détectés par spectrométrie UV-visible grâce à la dérivation de ceux-ci avec de la ninhydrine (absorbant à 570 nm), dont la quantité de composé absorbant est proportionnelle à la concentration en acide aminé. La proline et l'hydroxyproline ne possèdent pas de fonction amine mais une fonction imine, ils sont donc détectés à 440 nm. Les spectres obtenus sont analysés avec le logiciel Biochrom 30.

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

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

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

#### 4.2.2.2. Méthode NOPA

La méthode « Nitrogen by OPA » (NOPA) permet de déterminer la concentration en  $\alpha$ -aminoacides dans le milieu (Dukes & Butzke, 1998). Ainsi, cette méthode permet de doser uniquement l'azote assimilable sous forme d'acides  $\alpha$ -aminés. Le principe de cette méthode repose sur la dérivation des acides  $\alpha$ -aminés par l'o-phthaldialdéhyde (OPA) en présence de N-acétyl cystéine. Des isoindoles sont ainsi formés, et leur concentration est mesurée par lecture de l'absorbance à 335 nm.

0,671 g sont dissous dans 100 mL d'éthanol 96 %. Cette solution est transvasée dans une fiole de 1 L contenant 0,816 g de N-acétyl cystéine, 8,468 g d'acide borique et 3,837 g de NaOH. Le volume est complété à 1 L avec de l'eau osmosée. Parallèlement, une solution sans OPA est préparée afin de servir de blanc. Concernant le dosage, 50  $\mu$ L d'échantillon sont mélangés à 3 mL de réactif. La concentration en acides  $\alpha$ -aminés est enfin calculée par mesure de l'absorbance à 335 nm, après avoir réalisé une courbe de calibration avec des concentrations croissantes en isoleucine (de 0 à 10 mM).

### **4.3. Métabolites carbonés**

Les composés extracellulaires impliqués dans le métabolisme carboné central (MCC) sont dosés par HPLC : glucose, fructose, éthanol, glycérol, acide pyruvique, acide succinique, acide acétique. Pour certaines expériences, les acides lactique, fumarique et malique sont également dosés. Le milieu de culture prélevé est centrifugé 5 minutes à 4000 rpm. Puis, le surnageant est dilué au 1/6<sup>ème</sup> dans la phase mobile ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,005 N dégazé)). L'appareillage utilisé est un chromatographe équipé d'une pompe couplée à un dégazeur intégré (HPLC 1290 Infinity, Agilent Technologies, Santa Clara, California) permettant de délivrer un débit constant de 0,6 mL/min, d'un injecteur automatique (25 $\mu$ L de volume d'injection), d'une pré-colonne ainsi que d'une colonne de séparation échangeuse d'anions (Phenomenex Rezex ROA) thermostatée à 60°C. La détection des composés est réalisée par un réfractomètre (pour les sucres, l'éthanol et le glycérol) et un spectromètre UV mesurant l'absorbance à 210 nm (pour les acides organiques). Les concentrations sont calculées grâce à un étalonnage externe.

## 4.4. Analyses chimiques des arômes

### 4.4.1. Dosage hors-ligne des arômes

#### 4.4.1.1. Validation de la méthode de dosage des arômes non-conventionnels

##### 4.4.1.1.1. Composés standards

Les standards sont achetés chez Sigma-Aldrich et sont les suivants: linalol [78-70-6], géraniol [106-24-1], citronellol [106-22-9],  $\alpha$ -terpinéol [985-55-5], nérol [106-25-2], géranyl acétate [105-87-3], nootkatone [4674-50-4], benzaldéhyde [100-52-7], alcool benzylique [100-51-6], 4-hydroxybenzaldéhyde [123-08-0], phenylacétaldéhyde [122-78-1], acide phénylacétique [103-82-2], 2-phenyléthanol [60-12-8], acétate de 2-phényléthyle [103-45-7], 4-vinylguaiacol [7786-61-0], vanilline [121-33-5],  $\gamma$ -octalactone [104-50-7],  $\delta$ -octalactone [698-76-0],  $\gamma$ -nonalactone [104-61-0],  $\delta$ -nonalactone [3301-94-8],  $\gamma$ -décaldactone [706-14-9],  $\delta$ -décaldactone [705-86-2],  $\beta$ -ionone [14901-07-6].

##### 4.4.1.1.2. Solutions mères

Une solution stock regroupant l'ensemble des composés étudiés est réalisée à une concentration de 10 g/L dans de l'éthanol absolu. La stabilité de cette solution est régulièrement vérifiée par GC-MS. Deux solutions stock de benzaldéhyde-*d6* à 10 g/L et de 4-nonanol à 10 g/L sont préparées et sont utilisées pour la réalisation de la solution de standards internes.

##### 4.4.1.1.3. Extraction des composés volatils non-conventionnels

Les composés sont extraits par Dispersive Liquid-Liquid MicroExtraction (DLLME). Cinq mL de milieu de culture sont prélevés, et placés dans la glace, puis centrifugés 5 min à 4000 rpm (4 °C). Les échantillons sont stockés à -20 °C jusqu'à l'analyse (décongelés sur glace).

Une solution de standards internes est préparée pour chaque série d'analyses : elle contient du benzaldéhyde-*d6* et du 4-nonanol à 30 mg/L. Puis, 20  $\mu$ L d'une solution de standards internes sont ajoutés à 5 mL de surnageant. 870  $\mu$ L d'acétone sont ensuite ajoutés (agent dispersant), suivis par 500  $\mu$ L de dichlorométhane (solvant d'extraction). Le mélange est ensuite passé au vortex pendant 20 secondes, avant d'être centrifugé 20 min à 2000 rpm (4°C). La phase organique est ensuite transférée dans un réducteur (Supelco, Bellefonte, PA, USA) placé dans un vial de 2 mL.

4.4.1.1.4. Analyses chromatographiques

Les échantillons sont analysés par un chromatographe en phase gazeuse (GC TRACE 1300, ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA) équipé d'un passeur Triplus RSH, et couplé à un spectromètre de masse (ISQ 7000 Single Quadrupole GC-MS, Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA). Le chromatographe est équipé d'une colonne capillaire polaire DB-FFAP (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, Agilent). L'instrument est contrôlé et les données sont stockées par le logiciel Chroméléon 7 (Dionex, ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA). L'hélium est utilisé comme gaz vecteur à un débit constant de 1,2 mL/min. Le volume d'injection est de 1 µL. L'injecteur est à une température de 240 °C, et l'injection se déroule en mode « splitless » (splitless pendant 0,80 min). Le débit de split est de 16 mL/min, et le débit de purge est de 5 mL/min. Le programme de température du four est le suivant : 50 °C pendant 1 min, augmentation de 50 à 100°C à 10 °C/min, de 100 à 113°C à 2 °C/min, de 113 à 210 °C à 4 °C/min, de 210 à 240 °C/min à 20°C/min. Le four est maintenu à 240 °C pendant 10 min. La température de la source d'ions du spectromètre est fixée à 250 °C, et celle de la ligne de transfert à 240 °C. Afin de procéder à la quantification, les spectres de masse ont été acquis en Selected Ion Monitoring (SIM) avec ionisation par impact électronique (EI) de 70 eV. Les ions (qualificateurs et quantificateurs) sont présentés dans le **Tableau 21**.

**Tableau 21** : Paramètres pour la quantification des arômes non-conventionnels par GC-MS

Le benzaldéhyde-*d*6 est utilisé comme standard interne pour chaque composé.

Composés	Temps de rétention (min)	Ions qualificateurs m/z
Benzaldéhyde	17.91	<b>77</b> , 105, 106
Linalool	18.06	<b>71</b> , 93, 106, 121
$\beta$ -citral	25.99	<b>69</b> , 81, 94, 109, 121
$\alpha$ -terpinéol	26.57	81, <b>93</b> , 94, 121, 136
$\alpha$ -citral	28.33	<b>69</b> , 94, 109, 122
Acétate de géranyle	29.28	<b>69</b> , 93, 121, 136
Citronellol	29.66	<b>69</b> , 81, 109, 121, 123
Nérol	31.03	<b>69</b> , 93, 121, 137
Géraniol	32.79	<b>93</b> , 121, 123, 136
Alcool benzylique	33.59	79, <b>107</b> , 108
$\gamma$ -octalactone	38.6	<b>85</b> , 100
$\beta$ -ionone	39.2	<b>85</b> , 177, 178
$\delta$ -octalactone	42.1	70, 71, <b>99</b> , 114
$\gamma$ -nonalactone	42.7	<b>45-69-87</b>
$\delta$ -nonalactone	44.35	<b>88-99-115</b>
$\gamma$ -décalactone	45.47	<b>85</b> , 100, 128
$\delta$ -décalactone	46.32	70, 71, <b>99</b>
4-vinylguaicaol	46.42	135, <b>150</b>
Nootkatone	50	133, <b>147</b> , 161, 204, 218
Vanilline	52.3	<b>123</b> , 151, 152

#### 4.4.1.1.5. Paramètres de validation de la méthode

Pour chaque étape, l'homoscédasticité de chaque série de données a été vérifiée avec un test de Fisher.

Pour déterminer la présence d'un effet matrice, 5 réplicats d'un niveau de concentration ont été extraits et injectés. Le vin modèle a été utilisé comme matrice standard pour le calcul des effets matrice. Pour chaque composé, l'écart-type réduit a été calculé ( $SD_{red}$ ). Statistiquement, si le  $SD_{red}$  est inférieur à 2, il n'y a pas d'effet matrice.

Pour la linéarité, des courbes de calibration ont été réalisées dans du vin modèle, vin blanc (Sauvignon) et du moût synthétique fermenté. La linéarité a été étudiée entre 10 et 200  $\mu\text{g/L}$ .

Statistiquement, des tests lack-of-fit ont été utilisés pour déterminer la linéarité, en réalisant 3 calibrations indépendantes.

Pour le recouvrement, 50 µg/L de chaque analyte ont été ajoutés à la matrice, et les concentrations ont été calculées avec l'équation de calibration

$$\%Recovery = \frac{C_{calibration}}{C_{actual}} \times 100$$

$C_{actual}$  : concentration réellement ajoutée (50 µg/L) et  $C_{calibration}$  est la concentration calculée avec l'équation de calibration.

Les limites de détection et de quantification ont été déterminées en utilisant 2 niveaux de concentration (25 et 50 µg/L). Puis, le ration signal/bruit a été calculé.

$$LOD = \frac{3 * Concentration_{mean}}{S/N_{mean}}$$

$$LOQ = \frac{10 * Concentration_{mean}}{S/N_{mean}}$$

Pour la répétabilité, 10 répliqués d'un niveau de concentration (50 µg/L) ont été indépendamment extraits et injectés le même jour. Les aires réduites ont été déterminées (aire de l'analyte divisée par l'aire du standard interne). Le calcul de la répétabilité se fait par le calcul des écart-types (RSD) et la réalisation de tests de Fisher pour montrer la significativité des résultats. Pour la reproductibilité intermédiaire, 5 répliqués de 2 niveaux de concentration ont été indépendamment préparés et extraits tous les jours pendant 3 jours. Le RSD est ensuite calculé. Il ne doit pas excéder 15 % pour la répétabilité et 20 % pour la reproductibilité intermédiaire.

#### 4.4.1.2. Alcools supérieurs, esters et acides

##### 4.4.1.2.1. Extraction des composés volatils

Le milieu de culture est prélevé, placé dans la glace, puis centrifugé 5 min à 4000 rpm (4 °C). Les échantillons sont stockés à -20 °C jusqu'à l'analyse (décongelés sur glace).

Une solution d'étalons internes deutérés est préparée avec 100 pg/mL des composés suivants : butanoate d'éthyle-*d*5, hexanoate d'éthyle-*d*5, octanoate d'éthyle-*d*5, acide butyrique-*d*7, décanoate d'éthyle-*d*5 et phényléthanol-*d*4 (Rollero *et al.*, 2015). 5 mL d'échantillon et 10 µL de la solution de standards internes deutérés sont mélangés dans un tube en Pyrex de 15 mL, muni d'un bouchon en téflon et d'un joint (Supelco, Bellefonte, PA, USA). L'échantillon subit

ensuite une double extraction avec 1 mL de dichlorométhane, puis est agité sur plaque agitante. Le mélange est ensuite centrifugé 5 min à 2000 rpm, à 4 °C. La phase organique est récupérée dans un vial de 4 mL, puis séché avec du Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre pour éliminer les traces de phase aqueuse potentiellement récupérées lors du transfert de la phase organique. Cette dernière est concentrée par évaporation sous flux d'azote jusqu'à l'obtention d'un volume de 500 µL. L'échantillon est enfin transféré dans un réducteur placé dans un vial bouché de 2 mL (Supelco, Bellefonte, PA, USA).

#### 4.4.1.2.2. Analyses chromatographiques (appareillage)

Les échantillons sont analysés sur un chromatographe en phase gazeuse Hewlett Packard 6890 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) équipé d'un passeur CTC Combi PAL AOC-5000 (Shimadzu, Columbia, Etats-Unis), couplé à un spectromètre de masse HP 5973 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Le contrôle de l'appareil, le retraitement et l'analyse des données se font par le logiciel HP G1701DA ChemStation (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Le chromatographe est équipé d'une colonne DB-WAX (30 m × 0.250 mm × 0.25 µm, Agilent). Le gaz vecteur utilisé est l'hélium à un débit constant de 1,0 mL/min. Le programme du four est le suivant : la température est maintenue à 40 °C pendant 3 min, augmentée jusqu'à 160 °C à une vitesse de 4 °C/min, augmentée jusqu'à 220 °C à une vitesse de 15°C/min, puis maintenue à 220 °C pendant 10 min. L'injecteur et la ligne de transfert sont chauffés à 250 °C. Le volume d'injection est de 2 µL. L'échantillon est injecté en mode split avec un ratio de 10:1 et une division de 10 mL/min. La température du spectromètre de masse est de 150 °C, celle de la source de 230 °C et celle de la ligne de transfert de 250 °C. Pour la quantification, les spectres de masse sont enregistrés en mode Selected Ion Monitoring (SIM) avec un impact électronique de 70 eV. Les ions utilisés sont présentés dans le **Tableau 22** . Pour chaque composé, l'ion en gras est utilisé pour la quantification. Les autres ions sont utilisés comme ions qualificateurs.

Pour la quantification, des courbes de calibration sont réalisées, et sont linéaires dans la gamme étudiée. Pour chacun des composés, une solution mère à une concentration de 10 g/L est préparée dans de l'éthanol absolu. Pour chaque famille chimique de composés (esters d'éthyle, esters d'acétate, alcools supérieurs et acides) une solution standard est préparée à partir des solutions mères. Les solutions standards sont ensuite diluées dans du vin modèle (12% d'éthanol, 5 g/L d'acide malique, pH 3,3). Les différents points de gamme sont enfin extraits en suivant la même procédure que pour les échantillons.

**Tableau 22 : Paramètres pour la semi-quantification des arômes fermentaires majoritaires du vin**

En gras : ions de quantification.

Composés	Temps de rétention (min)	Ions qualificateurs m/z	Etalons internes	Seuil (mg/L) <sup>1</sup>
Propanoate d'éthyle	4,36	73,75, <b>102</b>	Butanoate d'éthyle- <i>d5</i>	1,84
Isobutyrate d'éthyle	4,53	71,88, <b>116</b>	Butanoate d'éthyle- <i>d5</i>	0,015
Acétate de propyle	4,67	43, <b>61</b> ,73	Butanoate d'éthyle- <i>d5</i>	
Acétate d'isobutyle	5,51	<b>56</b> ,73	Butanoate d'éthyle- <i>d5</i>	1,6
Butanoate d'éthyle	6,12	71, <b>88</b> ,101	Butanoate d'éthyle- <i>d5</i>	0,02
Propanol	6,19	31,42, <b>59</b>	Butanoate d'éthyle- <i>d5</i>	
2-méthylbutanoate d'éthyle	6,56	85, <b>102</b>	Butanoate d'éthyle- <i>d5</i>	0,001
Isovalérate d'éthyle	7,01	85, <b>88</b>	Butanoate d'éthyle- <i>d5</i>	0,003
Isobutanol	7,66	43, <b>74</b>	Butanoate d'éthyle- <i>d5</i>	40
Acétate d'amyle	8,56	57,72, <b>74</b>	Butanoate d'éthyle- <i>d5</i>	0,16
Acétate d'isoamyle	8,59	55, <b>70</b> ,87	Butanoate d'éthyle- <i>d5</i>	0,03
Valérate d'éthyle	9,01	<b>85</b> ,88,101	Butanoate d'éthyle- <i>d5</i>	
Alcool isoamylique	11,45	<b>55</b> ,57,70	Hexanoate d'éthyle- <i>d5</i>	30
Hexanol	11,96	<b>45</b> ,69,87	Hexanoate d'éthyle- <i>d5</i>	4
Hexanoate d'éthyle	12,28	<b>88</b> ,99,115	Hexanoate d'éthyle- <i>d5</i>	0,005
Alcool amylique	12,85	<b>55</b> ,57,70	Hexanoate d'éthyle- <i>d5</i>	65
Acétate d'héxyle	13,57	56,69, <b>84</b>	Hexanoate d'éthyle- <i>d5</i>	0,67
Lactate d'éthyle	15,8	45, <b>75</b>	Octanoate d'éthyle- <i>d5</i>	14
Octanoate d'éthyle	18,96	<b>88</b> ,101	Octanoate d'éthyle- <i>d5</i>	0,002
Acide propanoïque	21,92	57,73, <b>74</b>	Octanoate d'éthyle- <i>d5</i>	8,1
Acide isobutyrique	23,95	43, <b>73</b> ,88	Octanoate d'éthyle- <i>d5</i>	200
Acide butanoïque	24,86	45, <b>60</b> ,73	Octanoate d'éthyle- <i>d5</i>	0,22
Décanoate d'éthyle	25,39	<b>88</b> ,101,157	Décanoate d'éthyle- <i>d5</i>	0,2
Acide isovalérique	25,86	<b>60</b> ,61,87	Décanoate d'éthyle- <i>d5</i>	3
Acide 2-méthylbutanoïque	25,9	73, <b>74</b> ,87	Décanoate d'éthyle- <i>d5</i>	3
Succinate de diéthyle	26,14	101, <b>129</b>	Décanoate d'éthyle- <i>d5</i>	
Méthionol	27,21	61,73, <b>106</b>	Décanoate d'éthyle- <i>d5</i>	
Acide pentanoïque	27,75	60, <b>73</b>	Décanoate d'éthyle- <i>d5</i>	
Acétate de 2-phényléthyle	29,88	91, <b>104</b>	Décanoate d'éthyle- <i>d5</i>	0,25
Acide hexanoïque	30,77	<b>60</b> ,73,87	Décanoate d'éthyle- <i>d5</i>	8
Dodécanoate d'éthyle	30,92	<b>88</b> ,101	Décanoate d'éthyle- <i>d5</i>	
2-phényléthanol	32,36	<b>91</b> ,92,122	Phényléthanol- <i>d4</i>	10
Acide octanoïque	35,32	<b>60</b> ,73,101	Phényléthanol- <i>d4</i>	8,8
Acide décanoïque	37,52	60, <b>73</b> ,129	Phényléthanol- <i>d4</i>	6
Acide dodecanoïque	39,87	<b>60</b> ,73,129	Phényléthanol- <i>d4</i>	

<sup>1</sup>Siebert *et al.*, 2005

#### 4.4.2. Suivi en ligne de la production d'arômes

Le suivi en ligne de la production d'arômes fermentaires majoritaires est réalisé au sein de l'UE Pech rouge. Toutes les 7 h, l'espace de tête de chaque cuve est récolté par une pompe (active pendant 6 min) à un débit de 10 mL/min, et transféré au GC-MS *via* des lignes de prélèvement chauffées à 90 °C (12 m, diam 1/16, inox traitées Sulfinert). L'espace de tête est ensuite concentré par un concentrateur Compact GC (InterScience, St Nom la Bretèche, France) avant d'être analysé par un chromatographe en phase gazeuse GC Trace 1300 couplé à un spectromètre de masse ISQ 7000 (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA). Un détecteur FID est également utilisé, à une température de 260 °C avec un débit d'hydrogène, d'air et d'azote (comme « makeup » gaz) de 35 mL/min, 350 mL/min et 40 mL/min respectivement. L'échantillon est injecté en mode « split » (débit de purge fixé à 5 mL/min et débit de split à 25 mL/min) dans une colonne DB-WAX (30 m × 0.250 mm × 0.25 µm, Agilent). La ligne de transfert est à 250 °C, celle de la source d'ions est à 300 °C. La détection des ions est réalisée en mode Full Scan (m/z entre 29 et 400).

La production totale des composés volatiles, leur concentration dans la phase liquide, ainsi que les pertes dans le gaz ont été déterminées par une méthode décrite par Morakul *et al.*, (2013). Les productions totales au cours de la fermentation ont été déterminées pour 3 alcools supérieurs (propanol, alcool isoamylique, isobutanol) et 2 esters acétiques (acétate d'isoamyle et acétate d'isobutyle). Les aires des pics des autres composés (acide octanoïque, octanoate d'éthyle, hexanoate d'éthyle, butanoate d'éthyle, benzaldéhyde et acétaldéhyde) présents en phase gazeuse ont été comparées, de par l'absence de calibration au moment de l'analyse.

Le logiciel Chroméléon est utilisé pour gérer le GC-MS ainsi que pour retraiter les chromatogrammes obtenus.

## 5. Evaluation de la viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire peut être étudiée en utilisant un cytomètre en flux (C6 Cytometer, Accuri, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) et repose sur l'utilisation d'un marqueur fluorescent (iodure de propidium) qui ne peut rentrer que dans des cellules mortes ou fragiles.

Un volume d'1 mL d'échantillon est centrifugé 3 min à 10000 rpm. Le culot est ensuite resuspendu dans le même volume de tampon PBS 1X. Puis, cet échantillon est mélangé à du PBS 1X dans un volume final de 500 µL (afin de se situer entre 1000 et 10000 évènements par

μL). 5 μl d'iodure de propidium (IP) à une concentration de 100 μg/mL sont ensuite ajoutés au mélange avant que ce dernier ne soit vortexé. Les paramètres d'appareillage sont décrits par Delobel *et al.*, (2012).

## 6. Analyse sensorielle

Les différents vins dégustés sont issus des vinifications réalisées à l'unité expérimentale de Pech Rouge. Un moût d'assemblage Viognier-Maccabeu a été vinifié selon trois modalités différentes : un moût vinifié par *Saccharomyces cerevisiae* EC1118 (**Modalité SC**), un moût vinifié par inoculation séquentielle *Starmerella bacillaris* / *Saccharomyces cerevisiae* EC1118<sup>®</sup> avec une inoculation de *S. cerevisiae* 24 h après la Vmax de *S. bacillaris* (**Modalité SB/SC72**) et un moût vinifié par inoculation séquentielle *Starmerella bacillaris* / *Saccharomyces cerevisiae* EC1118 avec une inoculation de *S. cerevisiae* 48h après le Vmax de *S. bacillaris* (**Modalité SB/SC96**). Les différentes modalités ont été répétées en double (**SC A/SC B, SB/SC72 A / SB/SC72 B, SB/SC96 A / SB/SC96 B**).

### 6.1. Conditions générales

Le panel était composé de 29 personnes, membres des laboratoires de recherche de l'UMR Sciences Pour l'Œnologie, recrutés sur la base du volontariat pour leur intérêt pour l'œnologie, leur motivation et leur disponibilité. Parmi le panel, des spécialistes de la filière (œnologues, jury de concours, cavistes) ont constitué le jury pour l'analyse descriptive des vins.

L'évaluation sensorielle a été réalisée dans des cabines individuelles dans une salle réservée à l'analyse sensorielle (selon norme V09-105 de février 1987), exempte d'odeur, dans des conditions de température et d'éclairage contrôlées. Chaque cabine est équipée de poste informatique sur lequel le juge pourra donner ses réponses. Ces postes sont reliés en réseau à un serveur pour l'acquisition des données sensorielles, avec le logiciel FIZZ (société Biosystèmes, Couternon, France).

Les dégustations ont été réalisées en verres noirs opaques (norme V09-110) pour s'affranchir de différences de couleur qui peuvent influencer les réponses des juges. La température de présentation des vins était de 18°C.

### 6.2. Tests triangulaires

Le test sensoriel a été expliqué au jury en début de séances. Les échantillons sont codés grâce à un nombre à trois chiffres générés par le logiciel FIZZ pour conserver l'anonymat des

échantillons. L'ordre de présentation des échantillons a été randomisé sur l'ensemble du jury. Le **Tableau 23** présente les différents tests triangulaires réalisés.

**Tableau 23 : Tests triangulaires réalisés lors de l'analyse sensorielle.**

Les trois premiers tests visent à comparer les répétitions entre elles, tandis que les trois derniers comparent les différentes modalités de fermentation.

	Vins comparés
Test triangulaire 1	SC A (rép 1) / SC B (rép 2)
Test triangulaire 2	SB/SC72 A (rép 1) / SB/SC72 B (rép 2)
Test triangulaire 3	SB/SC96 A (rép 1) / SB/SC96 B (rép 2)
Test triangulaire 4	SC A (rép 1) / SB/SC72 A (rép 1)
Test triangulaire 5	SC A (rép 1) / SB/SC96 A (rép 1)
Test triangulaire 6	SB/SC72 A (rép 1) / SB/SC96 A (rép 1)

Pour l'interprétation statistique, le nombre de réponses correct est comptabilisé par test sur l'ensemble du jury. Puis la probabilité du risque  $\alpha$  de donner une réponse au hasard, est calculée par une loi binomiale de paramètres  $(n,p)$ ,  $n$  étant le nombre total de réponses et  $p$ , le risque de donner une bonne réponse en répondant au hasard. Ici,  $n = 29$  et  $p = 1/3$ .

La probabilité du risque  $\beta$  est également calculée à partir de la loi binomiale, en tenant compte de la performance du jury ainsi que le pouvoir discriminant du jury.

### 6.3. Epreuves descriptives

Les trois vins des trois modalités (répétition 1) ont été présentés aux dégustateurs experts dans des verres blancs pour réaliser une analyse descriptive des vins. Cette phase consiste à donner des descripteurs olfactifs et gustatifs qui caractérisent au mieux les traits dominants des vins.

La procédure Chek All That Apply (CATA) a été réalisée avec les descripteurs générés dans l'épreuve d'analyse descriptive. Dans ce test du CATA, le panel dispose de la liste de descripteurs et il lui est demandé de cocher les options qu'il juge approprié pour décrire olfactivement et gustativement les trois vins vinifiés selon les 3 modalités (Sc, Sc\_Sb 24 h, Sc\_Sb 48 h). Au préalable à l'évaluation, le jury a été entraîné à la reconnaissance des descripteurs afin d'accroître ses performances. Pour cela, des standards sensoriels ont été préparés (**Tableau 24**).

Les 3 modalités répétées sont présentées dans des verres noirs aux dégustateurs, en monadique et selon un plan en carré latin équilibré sur les effets arrière (Macfie *et al.*, 1989). Pour le traitement des données, un test de Cochran est réalisé sur chacun des descripteurs pour regarder les différences entre les modalités. Puis, l'analyse factorielle des correspondances est utilisée pour établir une typologie des vins et leur description à l'aide des termes générés.

Les données sont recueillies avec un système d'acquisition de données informatisé (FIZZ software, Biosystemes, Couternon France). Le traitement statistique est réalisé avec le logiciel XLstat (Addinsoft, France), par des analyses de variances. Au préalable, les performances du jury (discrimination, répétabilité et consensus) sont vérifiées. Lorsque des différences significatives sont observées ( $p < 0,05$ ), les intensités moyennes sont comparées en utilisant le test de comparaison multiple Tukey (HSD).

**Tableau 24 : Préparation des standards sensoriels**

Descripteur	Produit	Quantité produit	Quantité de milieu (ici vin)	Préparation
Vinaigre	Vinaigre d'alcool	10 ml	250 ml	Légère agitation
Alcool	Alcool absolu	0,04 ml	250 ml	Légère agitation
Amande fraîche	Benzaldéhyde	1,5 mL	250 ml	
Fruité (pêche)	Pêche (fraîche)	130 g	250 ml	Hacher ou couper en morceaux. A préparer le matin
Fruité (abricot)	Poire (fraîche)	250 g		Hacher ou couper en morceaux. A préparer le matin
Agrumes	Zestes citron + pamplemousse	7 g de chaque	250 ml	Couper en morceaux et mettre congelé dans le vin.
Confiture abricot	Confiture d'abricot	100 g	250 ml	Avec agitation
Miel	Miel	30 g	250 ml	Avec agitation (faire la veille)
Floral	Linalool	3 ml	250 ml	Légère agitation





---

# RESULTATS

---



# CHAPITRE 1

---

## POTENTIALITES DES LEVURES DU CONSORTIUM ŒNOLOGIQUE A PRODUIRE DES COMPOSES NON-CONVENTIONNELS LORS DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE

Les capacités d'une collection de souches de levures œnologiques à produire des composés d'arômes non-conventionnels ont été étudiées, lors de fermentations sur moûts naturels (Chardonnay et Ugni Blanc) et synthétiques. Les composés étudiés appartiennent aux familles chimiques suivantes : terpènes, dérivés benzéniques, et lactones.

Dans un premier temps, un « pré-criblage » a été réalisé sur moût synthétique, et a porté sur l'étude des capacités fermentaires d'une cinquantaine de souches de levures non-*Saccharomyces*. Ces souches sont issues du consortium œnologique, et ont été isolées sur des moûts de raisin. Les composés du métabolisme carboné central (MCC) ont été dosés pour chacune des souches, ainsi que les composés d'arômes fermentaires majoritaires, uniquement pour les souches ayant consommé plus de 70 % des sucres initialement présents. Le but de cette étude est, d'une part, de sélectionner des souches non-*Saccharomyces* ayant un avancement de fermentation suffisant pour envisager une utilisation œnologique et d'autre part d'étudier la production d'arômes non-conventionnels. Cette étude a également pour objectif d'écarter les souches produisant de manière trop importante certains composés nuisibles aux qualités organoleptiques des vins, tel que l'acétate.

Dans un second temps, 40 souches œnologiques (29 *S. cerevisiae* et 11 non-*Saccharomyces*) ont été mises à fermenter dans deux moûts naturels (Chardonnay et Ugni blanc) et un moût synthétique. La composition en sucres et en azote assimilable (ammonium et acides aminés) du

moût synthétique est identique à celle du Chardonnay utilisé. Ce moût permet d'étudier la production *de novo* des composés non-conventionnels, et de pouvoir comparer avec les productions après fermentation sur le Chardonnay, pour déterminer la part variétale de la production des composés étudiés. Au préalable, une méthode de dosage par Direct Liquid Liquid Micro Extraction (DLLME) couplée à la GC-MS a été développée puis validée afin de doser les différents composés d'arômes d'intérêts non-conventionnels produits lors de la fermentation alcoolique des différentes souches. Le but de ce travail est d'étudier la capacité intrinsèque des souches à produire ces composés d'arômes, mais aussi de discriminer les productions *de novo* des productions liées à la présence de précurseurs dans les moûts de raisins, afin de sélectionner une souche présentant de bonne capacité de production pour une cible aromatique.

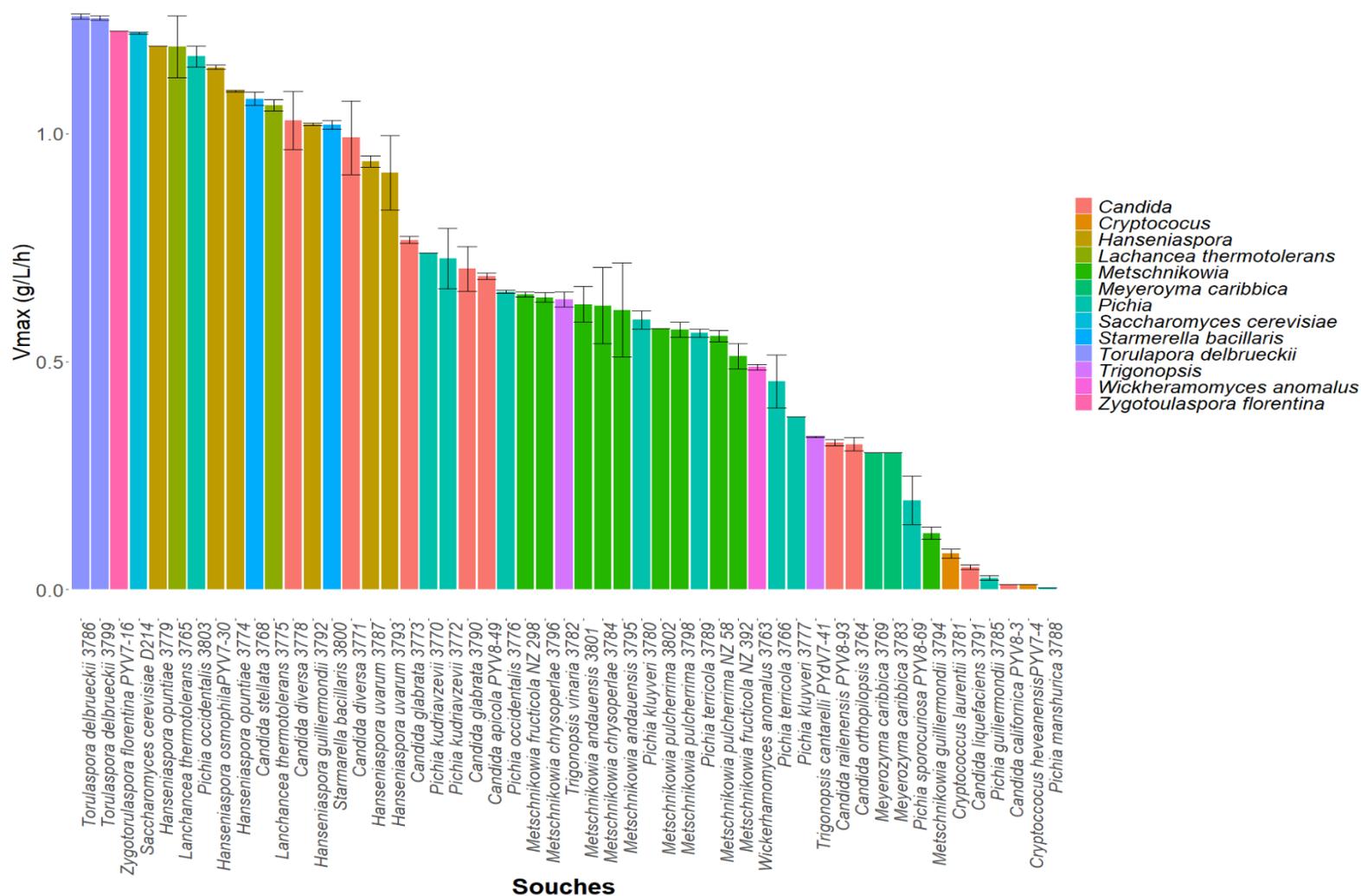
Ce travail a fait l'objet d'une publication (Bergler *et al.*, 2020), de deux présentations orales en congrès international scientifique (OENO-IVAS 2019, Bordeaux, France & ICGWS 2018, Logroño, Espagne), ainsi que d'un poster (Macrowine 2018, Zaragoza, Espagne).

## **1. Pré-criblage de souches non-Saccharomyces pour leurs capacités fermentaires**

L'objectif de ce pré-screening est de déterminer les souches avec les meilleures capacités fermentaires, afin d'étudier ensuite plus en détails leur capacité à produire des arômes non-conventionnels au cours de la fermentation alcoolique.

Un dosage des sucres et des métabolites du MCC a été réalisé pour l'ensemble des fermentations. La vitesse maximale de production de CO<sub>2</sub> ( $V_{\max}$ ) a également été mesurée grâce au logiciel RobView pour l'ensemble des souches. La moyenne des  $V_{\max}$  des différentes souches est recensée sur la **Figure 28**. Une grande diversité a été observée entre les diverses souches étudiées concernant les  $V_{\max}$ . Seules 8 souches sont incapables de fermenter dans les conditions de l'étude ( $V_{\max} < 0.02$  g/L/h). Trois souches de non-*Saccharomyces* présentent des  $V_{\max}$  supérieures à *S. cerevisiae* D214, utilisée comme témoin : les deux souches de *Torulaspora delbrueckii* et *Zygorulaspora florentina*. Les deux souches de *T. delbrueckii* présentent les  $V_{\max}$  les plus élevées, 1,25 g/L/h en moyenne contre 1,22 g/L/h pour le témoin *S. cerevisiae*. Les souches du genre *Hanseniaspora* étudiées possèdent des  $V_{\max}$  variables, mais ils sont plus

élevés que la moyenne des souches étudiées (entre 0,91 et 1,14 g/L/h). La souche de *H. osmophila* est celle présentant la  $V_{\max}$  la plus importante au sein de ce genre dans les souches étudiées. Contrairement au genre *Hanseniaspora*, les souches du genre *Pichia* présentent beaucoup de diversité, avec des  $V_{\max}$  allant de 0,01 g/L/h pour *P. manshurica* à 1,17 g/L/h pour *P. occidentalis*. Enfin, les souches du genre *Metschnikowia* étudiées forment un groupe plus homogène, peu diversifié concernant les  $V_{\max}$  des souches, avec des valeurs comprises entre 0,51 et 0,65 g/L/h. Seule la souche de *M. guilliermondii* se différencie au sein de ce genre avec une  $V_{\max}$  plus faible (0,12 g/L/h).

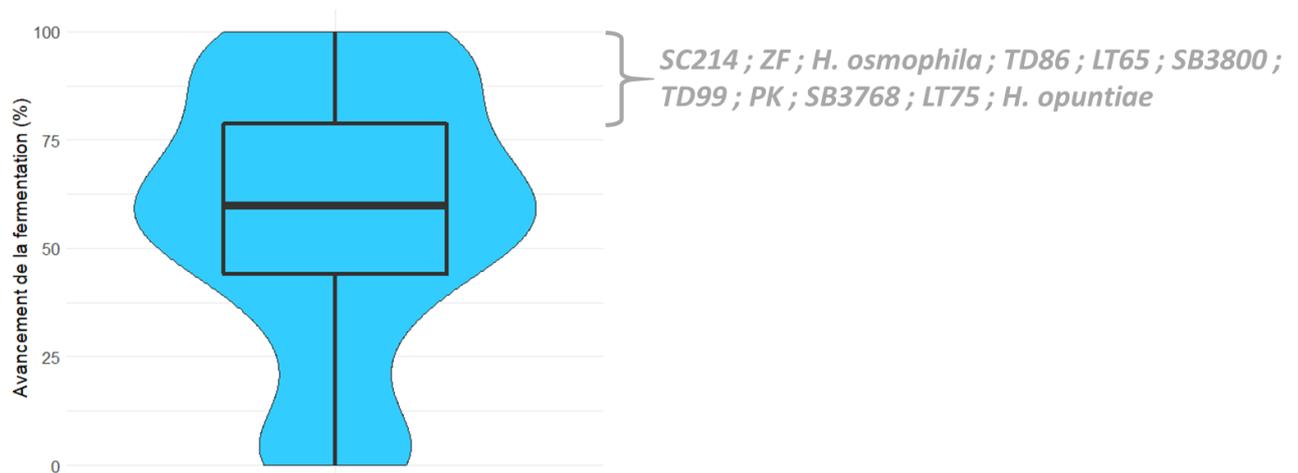


**Figure 28 : Vitesses maximales de production de CO<sub>2</sub> des différentes souches non-Saccharomyces étudiées.**

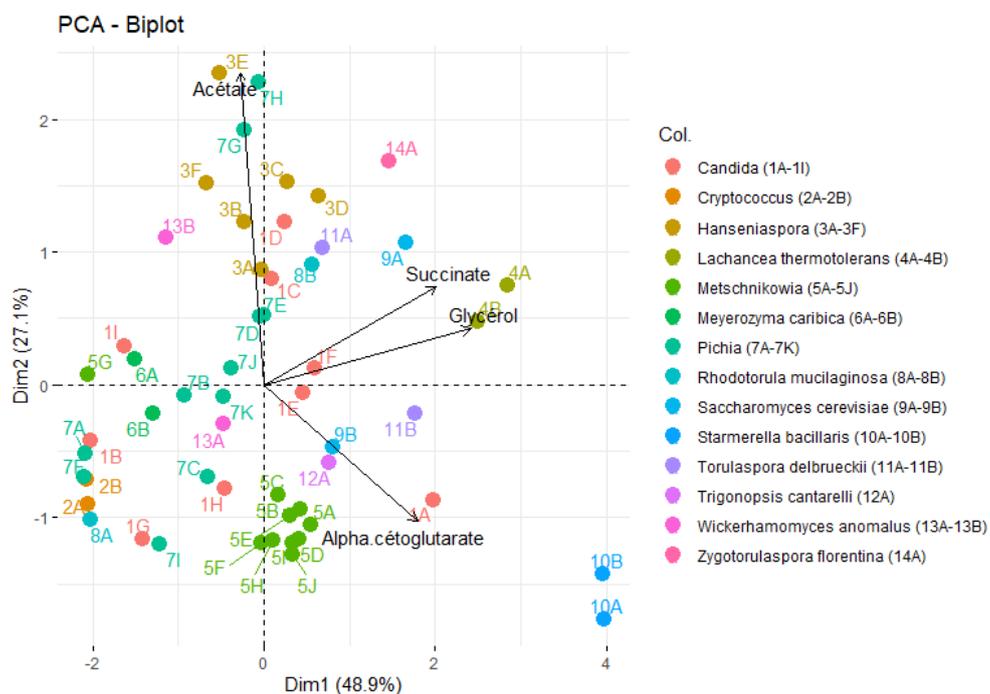
Les valeurs sont obtenues pour des fermentations sur du MS200, contenant 200 g/L de sucres et 200 mg/L d'azote assimilable, à 24 °C, en tubes de 15mL, grâce au robot de fermentation PhenOFerm.

La concentration en sucres résiduels et la production de métabolites issues du MCC ont été déterminées par HPLC (**Figure 29**). Les données de production de ces métabolites sont analysées de façon intégrée sous forme d'Analyse en Composantes Principales (ACP).

**A**



**B**

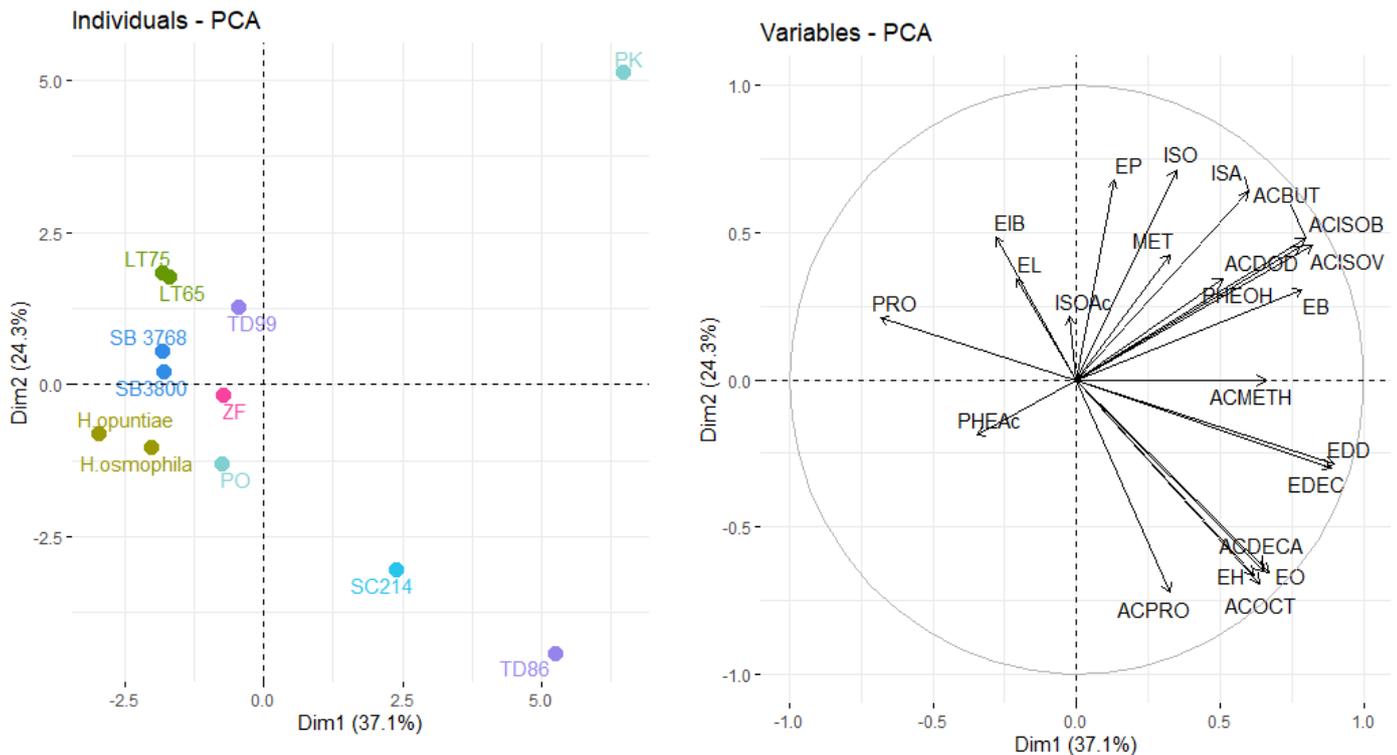


**Figure 29 :** Avancement de la fermentation des souches non-*Saccharomyces* étudiées (A) et profil de production du MCC (B). A : Diagramme en violon couplé à un box-plot, comprenant les données pour l'ensemble des souches étudiées. B : Analyse en Composantes Principales à la fin des fermentations.

Un total de 14 souches (13 non-*Saccharomyces* et le témoin *S. cerevisiae*) a consommé plus de 80 % des sucres lors de la fermentation alcoolique dans les conditions de l'étude. Parmi ces 13 souches, 3 ont un avancement de fermentation supérieur à 98 % : *Zygotorulaspora florentina*, *Hanseniaspora osmophila* et *Torulaspora delbrueckii* 3786. De manière générale, les souches ayant une  $V_{\max}$  élevée sont également celles qui consomment le plus de sucres lors de la fermentation. Les remarques portant sur la diversité intra-genre sont également les mêmes. A titre d'exemple, les souches du genre *Metschnikowia* ont toutes un avancement compris entre 48 % (*M. fructicola* NZ392) et 64,2 % (*M. andauensis* 3801), et des profils de production des MCC similaires, expliquant le cluster qu'elles forment sur la **Figure 29B**. Elles se caractérisent notamment par une faible production d'acide acétique (0,10 g/L au maximum pour *M. pulcherrima* NZ92). Au contraire, de nombreuses souches du genre *Hanseniaspora* sont parmi les plus fortes productrices d'acide acétique, notamment les souches de *H. uvarum* 3787, *H. uvarum* 3793, et *H. osmophila* (respectivement 1,13 g/L, 0,86 g/L et 0,74 g/L à la fin de la fermentation, contre 0,57 g/L pour *S. cerevisiae* D214). Les deux souches de *Pichia occidentalis* sont également fortes productrices de ce métabolite carboné (respectivement 1,20 et 1,08 g/L). D'autres souches étudiées se démarquent par leur production de glycérol, notamment les 2 souches de *L. thermotolerans* et de *Starm. bacillaris*. Ces souches produisent entre 10,2 et 11,5 g/L de glycérol, contre 7,9 g/L pour le témoin. Les 2 souches de *Starm. bacillaris* sont également les seules surproductrices d'alpha-cétoglutarate (0,54 et 0,56 g/L contre 0,10 g/L pour le témoin). Ces observations sont en accord avec les travaux d'Englezos *et al.*, (2018) qui montrent une orientation des flux métaboliques différents chez *Starm. bacillaris* par rapport à *S. cerevisiae*.

Les valeurs d'avancement de la fermentation sont globalement élevées pour des levures non-*Saccharomyces*. Par exemple, les deux souches de *Starm. bacillaris* de l'étude consomment plus de 70 % des sucres, alors que d'autres ont été décrites comme consommant – au mieux – la moitié des sucres (Englezos *et al.*, 2018). Ces résultats seraient liés à la confection des tubes de fermentation, recouverts d'un bouchon et d'un cône permettant au CO<sub>2</sub> d'être relâché. L'anaérobiose ne serait pas stricte dans ces conditions et un peu d'oxygène pourrait pénétrer au sein du tube, facilitant la fermentation des souches non-*Saccharomyces*, ainsi qu'un meilleur maintien de leur viabilité.

Pour les souches présentant un avancement de fermentation supérieur à 80 %, la production des alcools supérieurs, acides gras et esters (acétiques et éthyliques) a été quantifiée. (**Figure 30**). Ainsi, 13 souches ont été étudiées, avec *S. cerevisiae* D214 comme témoin.



**Figure 30 :** Analyse en Composantes Principales de la production des alcools supérieurs, esters éthyliques, esters acétiques et acides par les souches non-*Saccharomyces*.

PRO : propanol, ISO : isobutanol, PheOH : phényléthanol, MET : méthionol ; ISA : Alcool isoamylique ; EIB : isobutyrate d'éthyle ; EP : propanoate d'éthyle ; EH : hexanoate d'éthyle ; EB : butyrate d'éthyle ; EO : octanoate d'éthyle ; EDEC : décanoate d'éthyle ; EL : lactate d'éthyle ; PHEAc : acétate de 2-phényléthyle ; ISOAc : acétate d'isoamyle ; ACOCT : acide octanoïque ; ACDEC : acide décanoïque ; ACDOD : acide dodécanoïque ; ACISOV : acide isovalérique ; ACISOB : acide isobutyrique ; ACBUT : acide butyrique ; ACMETH : acide 2-méthyl butanoïque. LT65/75 : *L. thermotolerans* 3765/3775 ; SB 3768/3800 : *Starm. bacillaris* 3768/3800 ; TD86/99 : *T. delbrueckii* 3786/3799 ; ZF : *Zygorulaspora florentina* ; PO : *P. occidentalis* ; PK : *P. kluyverii* ; SC214 : *S. cerevisiae* D214.

Dans ce travail, les différentes souches d'une espèce possèdent les mêmes traits caractéristiques concernant la production des composés volatils. Ainsi, les deux souches de *Starm. bacillaris* et les deux souches de *L. thermotolerans* se démarquent par une production importante de propanol (entre 55,7 et 62,4 mg/L contre 24,4 mg/L pour *S. cerevisiae*). De plus, les deux

souches de *Starm. bacillaris* (SB3768 et SB3800) sont fortes productrices d'isobutanol (461 et 518 mg/L contre 186 mg/L pour le témoin). Elles produisent également deux fois plus d'isobutyrate d'éthyle que *S. cerevisiae* (120, 160, et 80 µg/L respectivement), molécule responsable des notes de fraise et de kiwi dans les vins. Enfin, concernant cette molécule, 7 des 12 souches non-*Saccharomyces* étudiées produisent plus que le témoin, avec un maximum de 704 mg/L pour *Pichia kluyveri*.

Les deux souches du genre *Hanseniaspora* qui ont été conservées, *H. osmophila* et *H. opuntiae*, se démarquent des autres souches, notamment par une forte production d'acétate de 2-phényléthyle (respectivement 23,5 et 15 mg/L contre 0,49 mg/L pour le témoin). Inversement, ce sont les plus faibles productrices de 2-phényléthanol (respectivement 14,5 et 14,9 mg/L contre 25,5 mg/L pour *S. cerevisiae*). Ces observations sont en accord avec les études de Hu *et al.*, (2018) et de Moreira *et al.*, (2008), qui ont montré une plus forte production de ces composés par d'autres souches du genre *Hanseniaspora*, *H. uvarum* et *H. guilliermondii*, que ce soit en cultures pures ou en fermentations mixtes. De manière similaire aux travaux de Moreira *et al.*, (2008), *H. osmophila* est forte productrice de méthionol (13,7 mg/L contre 3,5 mg/L pour le témoin). En revanche, contrairement à ces travaux, l'acétate de 2-phényléthyle est le seul ester acétique produit en plus grande quantité. En effet, *H. osmophila* et *H. opuntiae* sont faibles productrices d'acétate d'isoamyle et d'acétate d'isobutyle (**Annexe 2**). Cela peut s'expliquer par un métabolisme spécifique au couple 2-phényléthanol/acétate de 2-phényléthyle, avec l'implication d'une autre enzyme de type acétyl transférase, différente de Atf1p et Atf2p, ou des spécificités différentes de ces 2 enzymes.

Les deux souches de *L. thermotolerans* produisent une plus grande quantité de lactate d'éthyle (7,8 et 9 mg/L contre 1,9 mg/L pour le témoin). Cette surproduction peut être liée aux propriétés métaboliques de cette espèce, décrite comme productrice d'acide lactique (Banilas *et al.*, 2016; Jolly *et al.*, 2014; Kapsopoulou *et al.*, 2005).

Les deux souches de *T. delbrueckii* étudiées, TD86 et TD99, ont des profils de production des composés volatils fermentaires assez différents. Les caractéristiques communes à ces deux souches (TD86 et TD99) sont la production plus importante d'alcools supérieurs par rapport à *S. cerevisiae*, notamment l'isobutanol (210,8, 259,8 et 185,8 mg/L respectivement), le propanol (32,7, 46,5 et 24,4 mg/L respectivement) et l'alcool isoamylique (279,8, 305,2 et 233,5 mg/L respectivement). La souche TD99 a de meilleures capacités de production d'alcools supérieurs que TD86. D'autres études ont montré une plus forte production d'alcools supérieurs comprise

entre 19 et 38 % en fonction de la souche, après des fermentations mixtes avec *T. delbrueckii* comparées à des cultures pures de *S. cerevisiae* (Azzolini *et al.*, 2015). Les données de la littérature sont un peu contradictoires concernant la production d'alcools supérieurs, qui semble liée à la souche étudiée, ainsi qu'à la composition du milieu (Arslan *et al.*, 2018; Loira *et al.*, 2014; Tondini *et al.*, 2019).

Les esters éthyliques sont produits en plus grande quantité par la souche TD86 que TD99 et *S. cerevisiae*, notamment le dodécanoate d'éthyle (4,4, 1,6 et 2,8 mg/L respectivement). La production d'acides à moyennes chaînes est également plus importante chez TD86, notamment l'acide octanoïque, l'acide décanoïque et l'acide dodécanoïque, substrats essentiels à la formation des esters éthyliques (**Annexe 2**).

Enfin, la souche de *P. kluyveri* étudiée est la plus forte productrice d'acide isovalérique (5,5 mg/L), d'acide butyrique (2,8 mg/L), d'acide isobutyrique (2,8 mg/L), d'acide 2-méthylbutanoïque (1,7 mg/L) et d'acide dodécanoïque (2,1 mg/L), pouvant conférer aux vins des défauts à de telles concentrations. A ces fortes productions sont corrélées des productions légèrement supérieures en propanoate d'éthyle (0,5 mg/L), butyrate d'éthyle (160 µg/L) et en dodécanoate d'éthyle (3,4 mg/L). La production trop importante des différents acides nous a contraint à ne pas inclure cette souche pour l'étude de la production des composés non-conventionnels.

A l'issue de ce pré-criblage, 40 souches ont été conservées afin d'étudier leur production de composés non-conventionnels durant la fermentation alcoolique. Pour cela, trois moûts ont été utilisés : deux moûts naturels (Chardonnay et Ugni Blanc) et un moût synthétique MS basé sur la composition du Chardonnay pour les teneurs en azote assimilable et en sucres. De plus, afin de pouvoir doser ces composés en fin de fermentation, une méthode d'analyse basée sur une Dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) couplée à de la GC-MS a été développée, puis validée. Puis, la production des diverses molécules a été quantifiée en fin de fermentation. Les résultats concernant la production de terpènes ont fait l'objet d'une publication (JAFC). La production des autres molécules étudiées, de par une volonté de confidentialité, est présentée en complément de chapitre.

**2. Dispersive Liquid-Liquid Microextraction for the Quantification of Terpenes in Wines**

## Dispersive Liquid–Liquid Microextraction for the Quantitation of Terpenes in Wine

G. Bergler,\* V. Nolleau, C. Picou, M. Perez, A. Ortiz-Julien, M. Brulfert, C. Camarasa, and A. Bloem



Cite This: <https://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.9b08222>



Read Online

ACCESS |



Metrics & More



Article Recommendations



Supporting Information

**ABSTRACT:** To study the contribution of yeasts to the formation of terpene derivatives during winemaking, a dispersive liquid–liquid microextraction gas chromatography mass spectrometry method was developed for the quantitation of terpenes in white wines, synthetic wine, and a fermented synthetic medium. A mixture of acetone (disperser solvent) and dichloromethane (extraction solvent) was added to 5 mL of sample. The proposed method showed no matrix effect, good linearity in the enological range (from 10 to 200  $\mu\text{g/L}$ ), good recovery, and satisfactory inter- and intraday reproducibilities (below 20 and 15% of the relative standard deviation). This sample preparation technique is very interesting for high-throughput studies and economic and environmental reasons because it is fast and easy to operate with high enrichment and consumes a low volume of organic solvents. This method was applied to explore the capacities of 40 yeast strains to produce terpene compounds during fermentation of Chardonnay and Ugni Blanc musts as well as in a synthetic medium. Interestingly, most of the studied compounds were detected and quantified in the resulting wines. This study shows that yeast strains can intrinsically produce terpene derivatives under enological conditions and also highlights the differences between the *de novo* biosynthesis of terpenes and their precursor-linked production.

**KEYWORDS:** wine yeast diversity, terpene production, DLLME–GC–MS

### INTRODUCTION

In a highly competitive worldwide market, a current challenge for the beverage sector is to diversify the range of products and to offer wines and spirits with typicity and character. The aroma of a wine is comprised of several thousand molecules, which are classified into varietal aromas, present in berries and typical of grape variety, and fermentation aromas, originating from yeast metabolism, and post-fermentative aromas, produced by chemical reactions during aging. The metabolic pathways involved in the formation of the most abundant fermentative volatile compounds, including acetate esters, ethyl fatty acid esters, higher alcohols, and volatile fatty acids, are now well-identified.<sup>1,2</sup> Therefore, other compounds, including terpenoids, although produced by yeast in smaller quantities, have a great sensory impact on the quality of wines. To date, little is known about the biosynthesis pathways involved in their formation as well as on the ability of yeasts from the wine microbial consortium to produce these molecules.

Isoprenoids play a key role in microbial physiology and are involved in cell wall biosynthesis, membrane function, and electron transport.<sup>3,4</sup> In the winemaking sector, these molecules are of interest as a result of their floral fragrances.<sup>5</sup> In wines, the major terpenoids are monoterpenols, linalool, nerol,  $\alpha$ -terpineol, geraniol, and citronellol,<sup>6</sup> which can be chemically interchanged or biologically interconverted,<sup>7</sup> depending upon the yeast species used for fermentation.<sup>8</sup> These compounds first originated from cultivars that naturally contain high amounts of free terpenes, such as Muscat or Gewürztraminer cultivars (up to 1.5 mg/L of free terpenes).<sup>9,10</sup> Terpenes may also be present in must as glycosylated precursors, for which terpene is combined with  $\beta$ -D-

glucopyranose, itself bound to another carbohydrate (usually rhamnopyranose or arabinofuranose).<sup>6,11,12</sup> The free terpene/bound terpene ratio and their individual concentrations can greatly differ depending upon the grape variety.<sup>9</sup> The release of terpenes is a two-step process, first involving cleavage between the terminal sugar and rhamnose or arabinose by  $\alpha$ -L-rhamnosidase or  $\alpha$ -L-arabinosidase and the further hydrolysis of the intermediate by  $\beta$ -D-glucosidase.<sup>13,14</sup> Some yeast species, such as *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora* sp., are able to produce  $\beta$ -D-glucosidases.<sup>15,16</sup> Finally, terpene derivatives found in wines can be derived from the metabolism of yeast, as the ability of *S. cerevisiae* to produce monoterpenes has been reported.<sup>5</sup> Overall, three potential routes have been described for the formation of isoprenoids, including the involvement of the mevalonate pathway (MVA) reported in eukaryotes and bacteria,<sup>17</sup> the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) pathway described in plants and bacteria, and the methyl crotonyl CoA (MCC) pathway identified in *S. cerevisiae* mitochondria and related to leucine catabolism.<sup>5</sup> However, the effective contribution of these metabolic pathways to terpenol formation during wine fermentation remains poorly elucidated. In addition, these molecules are produced at low levels (4  $\mu\text{g/L}$  linalool and 3  $\mu\text{g/L}$  geraniol), underlining the importance of

Special Issue: Highlights of the Oeno - In Vino Analytica Scientia Conference 2019

Received: December 26, 2019

Revised: March 14, 2020

Accepted: March 14, 2020

Published: March 14, 2020



ACS Publications

© XXXX American Chemical Society

A

<https://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.9b08222>  
 J. Agric. Food Chem. XXXX, XXX, XXX–XXX

having a dedicated accurate analytical method for the quantitation of these molecules during fermentation.

During analytical procedures, sample pretreatments, such as liquid–liquid or solid-phase extraction (LLE or SPE, respectively), allow for the extraction of the targeted analytes from complex matrices as well as pre-concentration of the compounds, which makes them easier to detect and quantitate. These commonly used sample pretreatments require extensive development work and are time-consuming.<sup>18</sup> Furthermore, for trace analysis using LLE, the use of large volumes of solvents has negative economic, environmental, and health impacts. Concerning SPE, the major issue relies on the use of single use of cartridges, generating large amounts of waste.

To address these drawbacks, microextraction techniques have emerged as alternative methodologies. In this context, solid-phase microextraction (SPME) is a solvent-free process enabling the extraction and pre-concentration of analytes.<sup>19,20</sup> Nonetheless, it is an expensive method that uses a fragile fiber with a limited lifetime.<sup>21</sup> This approach has been improved by the development of dispersive liquid–liquid microextraction (DLLME) based on the addition of a disperser solvent to the organic phase to reduce the interfacial tension between the aqueous phase and the extraction solvent.<sup>22,23</sup> The feasibility of the method depends upon the choice of solvents, which first have to be chemically compatible with the compounds to be measured. Therefore, the dispersing solvent has to be soluble in aqueous solutions and miscible with the extraction solvent.<sup>24</sup> The extraction solvent is required to be insoluble in water and to have a different density than water for the phase separation.

DLLME has already been applied to quantitate a wide cluster of trace compounds as a result of the concentration factor of the technique. As an example, it has been used to detect and quantitate pesticides in water samples, with limits of detection (LODs) between 3 and 10 pg/mL.<sup>22,25,26</sup> Interestingly, this extraction technique was previously used in a wine matrix to analyze volatile phenols in a linear range between 50 and 1500 µg/L 4-ethylguaiaacol and 4-ethylphenol.<sup>27</sup>

The main aim of this study was to provide a comprehensive view of the potential of wine yeasts to contribute to the perception of terpenols in wines and to discriminate *de novo* production from precursor-related production. To do this, because terpene derivatives are present in low concentrations in wines, an analytical method relying on DLLME coupled to gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) was implemented for accurate detection and quantitation of these molecules at the end of fermentation, and its use was validated under enological conditions.

## MATERIALS AND METHODS

**Chemicals and Standards.** Linalool (CAS Registry Number 78-70-6), geraniol (CAS Registry Number 106-24-1), citronellol (CAS Registry Number 106-22-9),  $\alpha$ -terpineol (CAS Registry Number 985-55-5), nerol (CAS Registry Number 106-25-2), geranyl acetate (CAS Registry Number 105-87-3), and nootkatone (CAS Registry Number 4674-50-4) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). 4-Nonanol (CAS Registry Number 143-08-8, Sigma-Aldrich) and benzaldehyde-*d*<sub>6</sub> purchased from CDN Isotopes (Quebec, Canada) were used as internal standards. All solvents were of high-performance liquid chromatography (HPLC) grade. Absolute ethanol (CAS Registry Number 64-17-5, purity of  $\geq 99.9\%$ ) was obtained from Carlo Erba (Val de Reuil, France). Acetone (CAS Registry Number 67-64-1, purity of  $\geq 99.5\%$ ) and dichloromethane (CAS Registry Number 75-09-2, purity of  $\geq 99.9\%$ ) were purchased from Honeywell (Seelze, Germany).

**Analytical Standard Solution.** A mixed standard stock solution including all of the terpene derivatives was prepared in 100% absolute ethanol at a concentration of 10 g/L. The solution was stored in dark glass tubes at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The stability of the solution was checked regularly by GC–MS. An internal standard solution of benzaldehyde-*d*<sub>6</sub> was prepared at 30 mg/L in absolute ethanol.

**Sample Preparation.** A total of 5 mL of samples supplemented with 20 µL of internal standard was extracted using DLLME with 870 µL of acetone (the disperser solvent) and 500 µL of dichloromethane (extracting solvent). The mixture was shaken by vortexing for 20 s. The samples were centrifuged at 2000 rpm for 20 min at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The organic phase was transferred to a 2 mL vial before analysis.

**GC–MS.** Analysis was performed using a GC Trace Ultra gas chromatograph (Thermo Fisher, Waltham, MA, U.S.A.) equipped with a CTC Combi PAL (Shimadzu, Columbia, MD, U.S.A.) and coupled to a TSQ8000 Series mass spectrometer (Thermo Fisher, Waltham, MA, U.S.A.). A volume of 1 µL was injected into GC–MS (injector set at  $240\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) in splitless mode.

The gas chromatograph was equipped with a DB-FFAP column (30 m  $\times$  0.25 mm  $\times$  0.25 µm film thickness, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, U.S.A.). The gas carrier was helium (BIP quality, Air Liquide) at a flow rate of 1.2 mL/min. The column oven temperature program used was as follows: initial temperature of  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 1 min, then increased to  $210\text{ }^{\circ}\text{C}$  at a rate of  $4\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , and finally increased to  $240\text{ }^{\circ}\text{C}$  at  $20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  for 10 min. For quantitation, mass spectra were recorded in selected ion monitoring (SIM) mode with positive ion electronic ionization of 70 eV. The transfer line temperature was set at  $240\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

The identification of terpenes in wine was performed by comparing retention times and mass spectra to the pure analytical standard injected using GC–MS and the National Institute of Standards and Technology (NIST) mass spectra database. A mass spectral database regrouping each compound was created to develop a GC–MS/SIM acquisition method. The retention times, retention indexes, and qualifying and quantifying ions are summarized in Table S1 of the Supporting Information.<sup>34</sup>

**Validation Procedure of the Method.** For each validation step, the homoscedasticity of each data series was verified using a Fisher test.

To determine the presence of a matrix effect, 5 replicates of one concentration (50 µg/L) were extracted and injected. The wine model (water, 12% ethanol, and 5 g/L tartaric acid at pH 3.5) was used as the standard matrix for the calculations in this study. For each compound, the reduced standard deviation ( $SD_{red}$ ) of the reduced areas was calculated and compared to the wine model. Statistically, if the  $SD_{red}$  values are below 2, there is no matrix effect.

For linearity, calibration curves were constructed in model wine, white wine (Sauvignon), and fermented synthetic must (SM). Linearity was studied between 10 and 200 µg/L. Statistically, a lack-of-fit test was used to determine the linearity of the data series by performing three independent calibrations.

For recovery, 50 µg/L of each analyte (geraniol, nerol, linalool, citronellol,  $\alpha$ -terpineol, geranyl acetate, and nootkatone) was added to the studied matrix and the concentrations were calculated using the calibration equation. The recovery was calculated using the formula

$$\text{recovery (\%)} = \frac{C_{\text{calibration}}}{C_{\text{actual}}} \times 100$$

where  $C_{\text{actual}}$  is the real concentration added to the matrix (50 µg/L) and  $C_{\text{calibration}}$  is the calculated concentration using the calibration equation.

The limit of quantitation (LOQ) and LOD were evaluated using two concentrations (25 and 50 µg/L). Then, the signal-to-noise ratio (S/N) was calculated. The next step was the calculation of the mean S/N ( $S/N_{\text{mean}}$ ) and the mean of the concentrations ( $C_{\text{mean}} = 39.5\text{ }\mu\text{g/L}$  in this experiment).

$$\text{LOD} = \frac{3C_{\text{mean}}}{S/N_{\text{mean}}}$$

B

<https://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.9b08222>  
J. Agric. Food Chem. XXXX, XXX, XXX–XXX

$$\text{LOQ} = \frac{10C_{\text{mean}}}{S/N_{\text{mean}}}$$

To determine intraday variability, 10 replicates of one concentration level (50  $\mu\text{g/L}$ ) were independently extracted and injected on the same day. The reduced areas were determined (area of the analytes divided by the area of the internal standard), and the intraday variability was determined by calculating the relative standard deviation (RSD) and performing Fisher tests to show the significance of the results. To determine interday variability, 5 replicates of two concentration levels were independently prepared and extracted every day for 3 days.

The RSD should not exceed 15% for intraday variability and 20% for interday variability.

**Yeast Strains and Precultures.** A total of 41 yeast strains were used: 29 *S. cerevisiae* strains (referred to as L1–L26, all produced and provided by Lallemand SA, Montreal, Canada) and 12 non-*Saccharomyces* strains: *Torulaspota delbrueckii* strains (TD86 and TD99), *Lachancea thermotolerans* strains (LT65 and LT75), *Starmerella bacillaris* strains (SB1 and SB2), *Hanseniaspora osmophila* strain (HO), *Zygotulaspota florentina* strain (ZF), and strains provided by Lallemand SA (referred to as L27, L28, and L29). Strains are stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  in a mix of YEPD medium (10 g/L yeast extract, 20 g/L peptone, and 20 g/L dextrose) and glycerol (15%). For precultures, one colony of each strain was used to inoculate a sterile 50 mL tube containing 25 mL of YEPD medium. The strains were grown for 24 h at  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  (190 rpm). Then, the tubes were centrifuged (5 min, 4500 rpm, and  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), and the pellet was resuspended in 15 mL of water containing 9 g/L NaCl. The inoculation rate for each strain was  $1 \times 10^6$  colony-forming units (CFU)/mL.

**Fermentation Media and Fermentation Conditions.** Natural musts (Chardonnay 2016 and Ugni Blanc 2016) and a SM were used in this study. The composition of the natural musts [sugars, acids, yeast assimilable nitrogen (YAN), and pH] is shown in Table S2 of the Supporting Information. The composition of the SM was based on the Chardonnay must concerning the sugar content, pH, and YAN (ammonium chloride and amino acids). Concerning the other nutrients, the SM was prepared as described by Rollero et al.<sup>28</sup>

The nitrogen source of the SM was composed of ammonium chloride and amino acids. The stock solution of amino acids was composed of proline (54.4 g/L), alanine (12.8 g/L), arginine (15.4 g/L), aspartic acid (3.4 g/L),  $\gamma$ -aminobutyric acid (7.7 g/L), glutamine (7.0 g/L), glutamic acid (8.3 g/L), glycine (0.44 g/L), histidine (2.0 g/L), isoleucine (0.94 g/L), leucine (1.4 g/L), lysine (0.3 g/L), methionine (0.3 g/L), phenylalanine (1.8 g/L), serine (7.6 g/L), threonine (5.6 g/L), tryptophan (1.3 g/L), tyrosine (1.3 g/L), and valine (3.2 g/L). To reach 192 mg/L YAN, 11.7 mL of amino acid solution and 200 mg/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$  were added. A concentration of 4 mg/L  $\beta$ -sitosterol was added to the Chardonnay must and SM to satisfy the yeast requirements during anaerobic growth. The stock solution was composed of 20 g/L phytosterols in a mix of Tween 80 and absolute ethanol (1:1, v/v).

Fermentations were carried out in 300 mL bioreactors containing 270 mL of must equipped with fermentation locks to maintain anaerobiosis at  $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Fermentation was monitored by a fermentation robot (PhenOFerm) that determines  $\text{CO}_2$  release by measuring the weight of each bioreactor every hour.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Validation of the Method.** To study the volatile production of wine yeasts, high-throughput fermentations were carried out. These studies require the fast extraction of volatile compounds at low concentrations (between 10 and 200  $\mu\text{g/L}$ ). The studied method for the quantitation of terpenes in wines relies on the use of DLLME. Usually, very low volumes of extracting solvents are used for DLLME, between 10 and 500  $\mu\text{L}$  depending upon the sample volume.<sup>29,30</sup> In our research group, previous studies have

resulted in the use of 870  $\mu\text{L}$  of acetone as the disperser solvent. This volume lies between the values found in the literature to obtain a proper dispersion (between 500  $\mu\text{L}$  and 2 mL for 5 mL of aqueous sample). In addition, 500  $\mu\text{L}$  of dichloromethane was used as the extraction solvent. This value represents a good compromise between the theoretical 10-fold enrichment factor and the problems of handling the extract. This enrichment factor was convenient for the recoveries of the target compounds in wine.

In addition, the analytical method has to enable us to compare low concentrations of the targeted compounds (linalool,  $\beta$ -citral,  $\alpha$ -terpineol,  $\alpha$ -citral, geranyl acetate, citronellol, nerol, geraniol, and nootkatone) in a complex matrix. Therefore, the dedicated method was validated for nine terpenoids that can be found in wines in this concentration range (between 10 and 200  $\mu\text{g/L}$ ). The results of the method validation are summarized in Tables 1 and 2.

**Table 1. Determination of Matrix Effects between the Model Wine, White Wine, and Fermented SM for the Quantitation of Terpenes**

compound	$\text{SD}_{\text{red}}^a$	
	model wine versus SM	model wine versus white wine
linalool	1.42	1.94
$\beta$ -citral	1.48	1.54
$\alpha$ -terpineol	1.53	1.99
$\alpha$ -citral	1.10	1.06
geranyl acetate	1.55	1.18
citronellol	1.97	1.62
nerol	1.26	1.83
geraniol	0.82	0.85
nootkatone	0.74	1.34

<sup>a</sup>The reduced standard deviation ( $\text{SD}_{\text{red}}$ ) has to be lower than 2 to confirm that there is no matrix effect.

One problem in quantitative analysis is matrix effects, in which the compounds of the matrix co-extracted with the target compounds can affect the signal response, resulting in poor analytical performance. In this study, we assessed the matrix effects of three different matrices: model wine, white wine, and fermented SM to evaluate the specificity of the method. These effects were studied because different matrices were used in the applicative part below, and the response of each analyte in each the matrix had to be known. In addition, it can allow for the determination of whether linearity can be performed under standard conditions or using a real matrix. Thus, 50  $\mu\text{g/L}$  of each analyte was added to each matrix, extracted by DLLME and analyzed by GC–MS (five independent replicates). The reduced areas were calculated, and statistical tests were performed. As explained by Roland and Schneider,<sup>31</sup> the matrix effect calculations are performed in three steps,  $S_{\text{pooled}}^2$ ,  $S_{\text{diff}}$ , and then  $\text{SD}_{\text{red}}$  according to the following formulas:

$$S_{\text{pooled}}^2 = \frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1)}$$

$$S_{\text{diff}} = S_{\text{pooled}} \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}$$

C

Table 2. Validation Parameters for the Developed Method Using Fermented SM as the Matrix

compound	interday RSD (%)		intraday RSD (%)	linearity <sup>a</sup>		recovery (%)		limits <sup>b</sup> (μg/L)		response factor
	25 μg/L	50 μg/L	50 μg/L	calibration curve	R <sup>2</sup>	25 μg/L	50 μg/L	LOD	LOQ	50 μg/L
linalool	10.4	6.0	5.1	4.85x - 0.009	0.991	103.0	101.2	5.6	18.7	0.57
β-citral	10.0	8.3	4.7	3.94x + 0.002	0.997	102.9	101.1	9.9	32.9	0.49
α-terpineol	9.3	11.5	4.3	21.07x + 0.009	0.994	97.9	104.3	9.3	30.8	2.86
α-citral	12.0	9.4	5.5	5.58x - 0.001	0.991	99.7	100.8	11.3	37.6	0.68
geranyl acetate	9.5	6.3	3.5	9.24x - 0.032	0.991	103.7	100.3	5.7	19.0	1.03
citronellol	9.5	6.0	3.3	5.92x - 0.002	0.992	101.9	100.5	8.8	29.4	0.71
nerol	9.5	6.7	4.6	7.19x - 0.025	0.993	98.4	94.6	8.8	29.2	0.75
geraniol	19.4	6.2	8.2	1.45x - 0.000	0.994	98.5	104.0	5.9	19.7	0.19
nootkatone	11.3	9.6	4.7	1.84x - 0.002	0.996	105.3	102.4	10.5	35.1	0.21

<sup>a</sup>Linearity was statistically verified using lack-of-fit tests. <sup>b</sup>LOD and LOQ were determined when S/N was higher than 3 and 10, respectively.

$$SD_{\text{red}} = \frac{|\overline{M}_{\text{diff}}|}{S_{\text{diff}}}$$

where  $n_1$  and  $n_2$  are the number of replicates,  $S_1$  and  $S_2$  are the standard deviations of series 1 and 2, and  $|\overline{M}_{\text{diff}}|$  is the average of the response differences.

If the  $SD_{\text{red}}$  is less than 2, there is no matrix effect.<sup>31</sup>

Second, the  $SD_{\text{red}}$  values were calculated and compared to those obtained on model wine. Whether for the comparison of the  $SD_{\text{red}}$  between model wine and SM or between model wine and white wine, the values were always below 2 (between 0.74 and 1.998) (Table 1). This statistically proves the absence of a matrix effect. Therefore, under our conditions, there is no interference by the matrix on the quantitation of these analytes using this method. However, all steps of the validation procedure were performed on the different matrices. Only the results from the fermented SM are represented. The results obtained for white wine and model wine are summarized in Tables S3 and S4 of the Supporting Information.

Then, three independent calibration curves were constructed by adding known amounts of terpenes between 10 and 200 μg/L, which is the representative range of terpenes in wines. To check the linearity model statistically, lack-of-fit tests were performed. For each analyte, the  $R^2$  values were higher than 0.991 and the statistical tests were positive (Table 2). For every condition, the Fisher tests performed in the lack-of-fit procedure revealed that the terpene calibrations were linear over the range of 10–200 μg/L for SM, model solution, and white wine. These calibration curves were used to evaluate the accuracy of the method.

The accuracy of the method was assessed by adding 25 and 50 μg/L of each compound to the SM (Table 2). By comparison of the added concentrations and the calculated concentrations, we evaluated the recovery of the method. The relative recovery ranges obtained for each molecule for the two amounts (25 and 50 μg/L) were between 94.6 and 104%, indicating satisfactory method accuracy.

The repeatability and intermediate reproducibility were evaluated by calculating the intra- and interday variabilities. The repeatability was performed at one concentration level (the addition of 50 μg/L, 10 replicates of one sample on the same day), and the intermediate reproducibility was performed at two concentration levels (addition of 25 or 50 μg/L, independent triplicates on five different days). The intraday RSD (%) was between 3.3 and 8.2% (Table 2). For each analyte, the interday RSD (%) was below 20%, regardless of the concentration added (between 9.3 and 19.4% for 25 μg/L and between 6.0 and 11.5% for 50 μg/L). For repeatability, the

RSD values for the intermediate reproducibility were acceptable and satisfactory in the validation procedure.

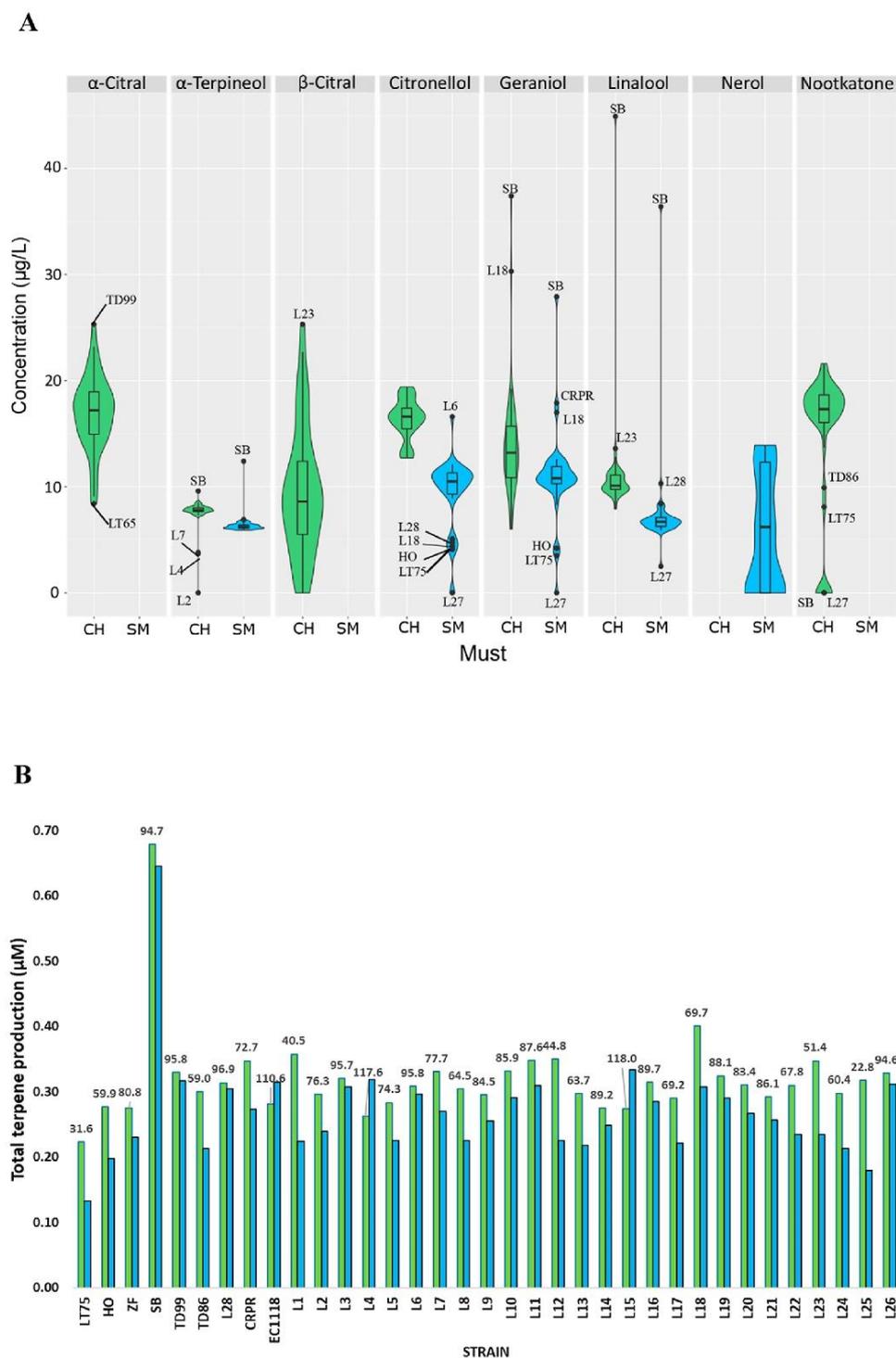
In addition, blank samples were included in the run sequence, and no signal that could interfere with the desired analytes was observed, even after the highest point of the linear range. This result bears witness to the absence of memory effects after run analysis.

The LODs and LOQs were measured. They were determined by considering S/N (>3 and >10, respectively). The results are shown in Table 2. The limits were lower for linalool, geraniol, and geranyl acetate, with LODs of 5.6, 5.9, and 5.7 μg/L, respectively. In contrast, the method seems to be less sensitive for nootkatone and α-citral (LODs of 10.5 and 11.3, respectively). Despite these higher values, the method is sensitive enough for the studied compounds. Indeed, in wines, terpenoid concentrations can exceed 5 mg/L for some cultivars, such as Muscat.<sup>32</sup> For other grape varieties, the concentration can greatly differ depending upon the cultivar. For instance, the content of geraniol can be 13 μg/L for Cinsault or 26 μg/L for Riesling.<sup>9</sup> In addition, only a few studies have focused on the ability of yeasts to produce terpenoids as a result of their metabolism.<sup>5</sup> This study highlighted that *S. cerevisiae* could intrinsically produce between 5 and 10 μg/L monoterpenols. This is why a sensitive and accurate method had to be developed and validated.

**Diversity of Terpene Production by Wine Yeasts during Fermentation.** To draw up a global picture of the contribution of yeasts to terpenol formation during wine-making, the production of terpenoids was quantitated at the end of the carried out fermentations using a collection of 40 wine yeasts and 2 natural musts (Chardonnay and Ugni Blanc) with different characteristics (sugar, nitrogen, and lipid contents). This experimental design allowed us first to assess the diversity within wine yeasts (28 *S. cerevisiae* strains and 12 non-*Saccharomyces* yeasts widely isolated from the wine environment) regarding their capacity to synthesize or liberate terpenoids from precursors depending upon grape juice composition. Furthermore, to assess the relative importance of *de novo* synthesis by yeasts versus release from varietal precursors in the terpene profile of wine, we also used a SM with characteristics similar to those of Chardonnay in terms of sugars, YAN content, pH, and added phytosterols but without terpene precursors. Finally, a control was carried out by incubating the SM in the absence of cells for 10 days at 24 °C. Under these conditions, no terpene production was observed, indicating that no chemical reaction took place. Consequently, the terpene production discussed hereafter is only due to yeast activity (metabolism and/or enzymatic activity).

D

<https://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.9b08222>  
 J. Agric. Food Chem. XXXX, XXX, XXX–XXX



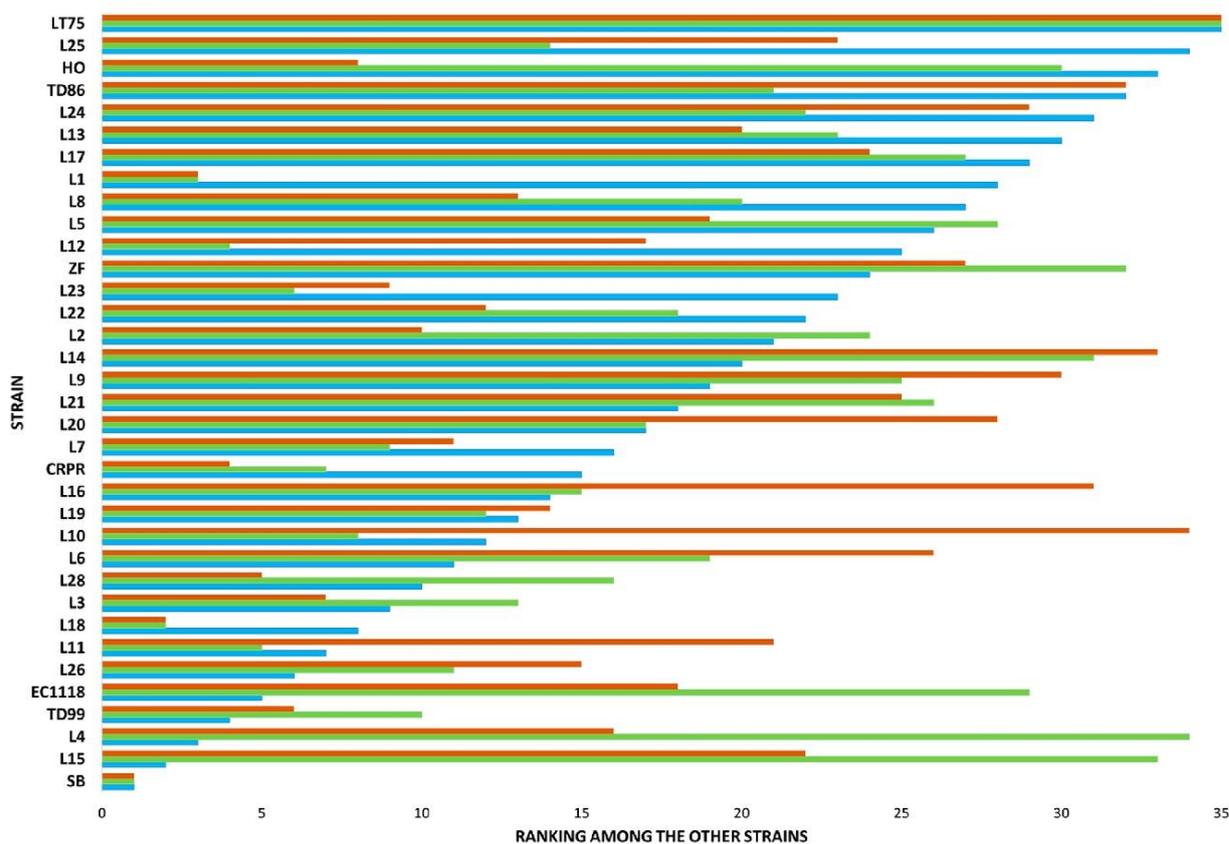
**Figure 1.** Production of terpenoids by 40 wine yeasts after fermentations in synthetic must (SM, blue) and Chardonnay (CH, green). Fermentations were carried out in duplicate. (A) Concentration of each produced studied terpene. (B) Sum of terpene production by yeast. Only the terpenes produced in SM are summed. The numbers on the barplots represent the percent terpenes produced by yeast metabolism.

Regardless of the culture conditions, the non-*Saccharomyces* strains consumed at least 60% of the initial sugars (except for L27 and L29), while all of the *S. cerevisiae* strains completed fermentation (Figure S1 of the Supporting Information).

To investigate the intrinsic ability of wine yeasts to produce terpene derivatives, the production profiles obtained during Chardonnay and SM fermentation were compared (Figure 1). First, during the fermentations on SM, only five of the nine

E

<https://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.9b08222>  
 J. Agric. Food Chem. XXXX, XXX, XXX–XXX



**Figure 2.** Terpene production ranking of each yeast after fermentation of three different musts: (green) fermentations of Chardonnay, (blue) fermentations of SM, and (red) fermentations of Ugni Blanc. The strains were first classified according to their production ranking in SM. Strains are ranked between the 1st and 35th most productive (five fermentations were contaminated).

terpene compounds analyzed were produced between 5 and 10  $\mu\text{g}/\text{L}$  on average by all of the strains, with a few exceptions:  $\alpha$ -terpineol, citronellol, geraniol, linalool, and nerol (Figure 1A). This observation shows the capacity of these wine yeasts to produce terpenes, without the presence of any precursor, likely through leucine catabolism or the MVA pathway.<sup>5</sup> Conversely,  $\alpha$ -citral,  $\beta$ -citral, and nootkatone were produced only during Chardonnay fermentation, showing an exclusive production of these compounds by hydrolysis of varietal precursors or, in the case of nootkatone, by further metabolism of valencene, a sesquiterpene plant precursor provided by grapes.<sup>33</sup> Furthermore, in the case of  $\alpha$ -terpineol, citronellol, geraniol, and linalool, the production in Chardonnay was only slightly higher than that measured in the SM (Figure 1A), indicating that *de novo* synthesis may account for a large part of the production of these molecules (up to 96.9%) during wine fermentation.

Then, to further analyze the relative contribution of the two main origins of terpenols in wines (*de novo* synthesis versus release from varietal precursors), we compared the variations in total terpene production between Chardonnay and the SM for each strain (Figure 1B). Overall, the formation of terpenes was only slightly increased by the use of Chardonnay fermentation compared to SM, underlying the substantial contribution of *de novo* synthesis to terpene formation during wine fermentation (between 22.8 and 96.9% of total production). Nevertheless, we found that some terpenes originating from varietal precursors depended upon the strain.

A large increase in the total terpene production by L25, LT75, and L12 was observed during Chardonnay fermentation (77.2, 68.4, and 55.2%, respectively), pointing out the capacity of these strains to produce hydrolytic enzymes involved in the release of terpenes from their glycosylated precursors present in the must. In contrast, terpene production by *S. bacillaris* (0.7  $\mu\text{M}$  total terpenes) was mainly due to yeast metabolism (94.7%), and a decrease in the total terpene concentration was observed in Chardonnay wines produced by L15, EC1118, and L4 in comparison to synthetic wines. This last observation may be related to the absence of nerol production after Chardonnay fermentation (Figure 1A). However, our conclusions must be considered, taking into account the fact that the total terpene production measured in our experiment is low compared to the terpene content usually measured in wines (between 83 and 4040  $\mu\text{g}/\text{L}$ ),<sup>9</sup> which may reflect the oxidation of the varietal precursors in Chardonnay that must be used in this study.

The incidence of the genetic background of the yeast used during fermentation was also observed at the level of each compound. The production of geraniol varied from 6  $\mu\text{g}/\text{L}$  (for LT75) to 37  $\mu\text{g}/\text{L}$  (for *S. bacillaris*). The same observation can be made for  $\alpha$ -citral (between 8 and 25  $\mu\text{g}/\text{L}$ ),  $\beta$ -citral (between 0 and 25  $\mu\text{g}/\text{L}$ ), linalool (between 9 and 44  $\mu\text{g}/\text{L}$  in Chardonnay), and nootkatone (from 0 to 21  $\mu\text{g}/\text{L}$ ). These results show the importance of the yeast strain used for fermentation for the production of aromatic compounds.

F

<https://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.9b08222>  
*J. Agric. Food Chem.* XXXX, XXX, XXX–XXX

Furthermore, geraniol, linalool, and citronellol are produced at higher concentrations than nerol or  $\alpha$ -terpineol, which is in agreement with literature data. This can be explained by the fact that geraniol is the first intermediate of the monoterpene biosynthesis pathway from GPP, which is further converted to citronellol or linalool.<sup>8</sup> Then, linalool can be converted to  $\alpha$ -terpineol. The mechanisms involved in monoterpene interconversions have not yet been fully elucidated. First, chemical conversions have been demonstrated, as after 5 days at 25 °C in a model wine, a solution initially containing 96% geraniol and 2% nerol evolved into a solution containing 72% geraniol, 22% linalool, 0.5%  $\alpha$ -terpineol, and 2% nerol.<sup>7</sup> Furthermore, there was no modification in a solution containing only  $\alpha$ -terpineol, which confirms what King et al. showed,<sup>8</sup> suggesting that this compound was the end product of the pathway. However, the contribution of yeasts to these interconversions should not be ruled out but should be demonstrated experimentally.

Finally, we compared the production of the total terpenes by each strain after fermentation of Ugni Blanc, SM, and Chardonnay to study whether the composition of must has an influence on the production of terpenes by yeasts (Figure 2). Regardless of the must, *S. bacillaris* was the highest producer of terpenes. However, important variations in the terpene production rank of each strain depending upon the must were observed, indicating substantial interactions between the strains and the must for terpene production. This observation is applicable to both non-*Saccharomyces* strains and *S. cerevisiae* strains. Thus, L15 was the 2nd highest producer from the SM but only the 22nd from Ugni Blanc and the 33rd from Chardonnay. We can make the same observations for L4 (3rd, 16th, and 34th, respectively) or EC1118 (5th, 18th, and 29th, respectively). We can hypothesize that this observation can be linked to the higher nerol production in the SM (a different balance of nerol and geraniol leading to nerol production) but also to a poor ability of these yeasts to hydrolyze glycosylated precursors in natural musts. In contrast, *S. cerevisiae* strains L18 and L1 were ranked 2nd and 3rd for Chardonnay and Ugni Blanc but 8th and 27th for the SM, which was likely due to the efficiency of these strains to execute  $\beta$ -glucosidase activities.<sup>15</sup> All of these elements led us to assume that there is strain variability among the *S. cerevisiae* studied species. Finally, for some strains, there is a substantial difference between the two natural musts: L6, L11, and L16 (19th, 5th, and 15th for Chardonnay, respectively, and 26th, 21st, and 31st for Ugni Blanc, respectively). This highlights the complexity of terpene production, probably as a result of its multifactorial regulation.

To conclude, in this study, an analytical method based on the use of DLLME has been developed and validated to quantitate terpenoids in wines. This method is in line with a high-throughput approach as a result of its simplicity and ease of implementation. In addition, DLLME is economically and environmentally friendly as a result of the lower volumes of organic solvents compared to commonly used extraction techniques. We applied this method to screen 40 yeast strains and confirmed that the yeasts were intrinsically able to produce terpenoids during fermentation, probably through sterol metabolism or leucine catabolism. Generally, the production was higher in the natural musts than in the SM, probably as a result of the presence of glycosylated terpene precursors. We have shown a strain effect of the production of terpenes but also an effect of the must. In addition, the *S. bacillaris* strains

are the highest producers of geraniol, linalool, and  $\alpha$ -terpineol, regardless of the must. This is another example showing the potential of using non-*Saccharomyces* yeast species to bring new organoleptic properties and to diversify wine.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.9b08222>.

Retention times and qualifying and quantifying ions for the studied compounds (Table S1), composition of the natural musts used in the study (Table S2), comparison of the linearities studied on the three studied matrixes (Table S3), (A) interday and (B) intraday coefficient of variation (CV, %) on the three studied matrixes (Table S4), concentrations of terpenoids produced by yeasts after fermentation on (A) Chardonnay, (B) Ugni Blanc, and (C) SM (Table S5), and fermentation progress of the studied wine yeasts in the three different musts (Figure S1) (PDF)

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

**G. Bergler** – Martell Mumm Perrier-Jouët, Pernod Ricard, 16000 Cognac, France; SPO, University Montpellier, INRAE, Montpellier SupAgro, 34060 Montpellier, France; [orcid.org/0000-0002-5540-0269](https://orcid.org/0000-0002-5540-0269); Phone: +33650298882; Email: [guillaume.bergler@supagro.fr](mailto:guillaume.bergler@supagro.fr)

### Authors

**V. Nollean** – SPO, University Montpellier, INRAE, Montpellier SupAgro, 34060 Montpellier, France

**C. Picou** – SPO, University Montpellier, INRAE, Montpellier SupAgro, 34060 Montpellier, France

**M. Perez** – SPO, University Montpellier, INRAE, Montpellier SupAgro, 34060 Montpellier, France

**A. Ortiz-Julien** – Lallemand SAS, 31702 Blagnac, France

**M. Brulfert** – Martell Mumm Perrier-Jouët, Pernod Ricard, 16000 Cognac, France

**C. Camarasa** – SPO, University Montpellier, INRAE, Montpellier SupAgro, 34060 Montpellier, France

**A. Bloem** – SPO, University Montpellier, INRAE, Montpellier SupAgro, 34060 Montpellier, France

Complete contact information is available at:

<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.9b08222>

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Aurélie Roland for help concerning the validation of the method and her useful advice and discussions.

## ■ REFERENCES

- (1) Pretorius, I. S.; Høj, P. B. Grape and Wine Biotechnology: Challenges, Opportunities and Potential Benefits. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2005**, *11* (2), 83–108.
- (2) Swiegers, J. H.; Bartowsky, E. J.; Henschke, P. A.; Pretorius, I. S. Yeast and Bacterial Modulation of Wine Aroma and Flavour. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2005**, *11* (2), 139–173.
- (3) Pérez-Gil, J.; Rodríguez-Concepción, M.; Vickers, C. E. Formation of Isoprenoids. In *Biogenesis of Fatty Acids, Lipids and*

Membranes; Geiger, O., Ed.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2017; pp 1–29, DOI: 10.1007/978-3-319-43676-0\_6-1.

(4) Touze, T.; Mengin-Lecreulx, D. Undecaprenyl Phosphate Synthesis. *EcoSal Plus* **2008**, DOI: 10.1128/ecosalplus.4.7.1.7.

(5) Carrau, F. M.; Medina, K.; Boido, E.; Farina, L.; Gaggero, C.; Dellacassa, E.; Versini, G.; Henschke, P. A. Novo Synthesis of Monoterpenes by *Saccharomyces cerevisiae* Wine Yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* **2005**, *243* (1), 107–115.

(6) Park, S. K.; Noble, A. C. Monoterpenes and Monoterpene Glycosides in Wine Aromas. In *Beer and Wine Production*; Gump, B. H., Pruetz, D. J., Eds.; American Chemical Society (ACS): Washington, D.C., 1993; Vol. 536, Chapter 6, pp 98–109, DOI: 10.1021/bk-1993-0536.ch006.

(7) Pedersen, D. S.; Capone, D. L.; Skouroumounis, G. K.; Pollnitz, A. P.; Sefton, M. A. Quantitative Analysis of Geraniol, Nerol, Linalool, and  $\alpha$ -Terpineol in Wine. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *375* (4), 517–522.

(8) King, A.; Richard Dickinson, J. Biotransformation of Monoterpene Alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspota delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* **2000**, *16* (6), 499–506.

(9) Gunata, Y. Z.; Bayonove, C. L.; Baumes, R. L.; Cordonnier, R. E. The Aroma of Grapes I. Extraction and Determination of Free and Glycosidically Bound Fractions of Some Grape Aroma Components. *J. Chromatogr. A* **1985**, *331*, 83–90.

(10) Marais, J. Terpenes in the Aroma of Grapes and Wines: A Review. *South Afr. J. Enol. Vitic.* **2017**, *4* (2), 49–58.

(11) Lambrechts, M. G.; Pretorius, I. S. Yeast and Its Importance to Wine Aroma—A Review. *South Afr. J. Enol. Vitic.* **2000**, *21* (1), 97–129.

(12) Vasserot, Y.; Arnaud, A.; Galzy, P. Monoterpenol glycosides in plants and their biotechnological transformation. *Acta Biotechnol.* **1995**, *15* (1), 77–95.

(13) Gunata, Z.; Bitteur, S.; Brillouet, J.-M.; Bayonove, C.; Cordonnier, R. Sequential Enzymic Hydrolysis of Potentially Aromatic Glycosides from Grape. *Carbohydr. Res.* **1988**, *184*, 139–149.

(14) Maicas, S.; Mateo, J. J. Hydrolysis of Terpenyl Glycosides in Grape Juice and Other Fruit Juices: A Review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *67* (3), 322–335.

(15) Hernandez, L.  $\beta$ -Glucosidase Activity in a *Saccharomyces cerevisiae* Wine Strain. *Int. J. Food Microbiol.* **2003**, *80* (2), 171–176.

(16) Swangkeaw, J.; Vichitphan, S.; Butzke, C. E.; Vichitphan, K. Characterization of  $\beta$ -Glucosidases from *Hanseniaspora* sp. and *Pichia anomala* with Potentially Aroma-Enhancing Capabilities in Juice and Wine. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *27* (2), 423–430.

(17) Lynen, F. Biosynthetic Pathways from Acetate to Natural Products. *Pure Appl. Chem.* **1967**, *14* (1), 137–167.

(18) Zgola-Grzeskowiak, A.; Grzeskowiak, T. Dispersive Liquid-Liquid Microextraction. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2011**, *30* (9), 1382–1399.

(19) Arthur, C. L.; Pawliszyn, J. Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. *Anal. Chem.* **1990**, *62* (19), 2145–2148.

(20) Zhao, X.; Fu, L.; Hu, J.; Li, J.; Wang, H.; Huang, C.; Wang, X. Analysis of PAHs in Water and Fruit Juice Samples by DLLME Combined with LC-Fluorescence Detection. *Chromatographia* **2009**, *69* (11–12), 1385–1389.

(21) Prosen, H.; Zupančič-Kralj, L. Solid-Phase Microextraction. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **1999**, *18* (4), 272–282.

(22) Berijani, S.; Assadi, Y.; Anbia, M.; Milani Hosseini, M.-R.; Aghaee, E. Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Combined with Gas Chromatography-Flame Photometric Detection. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1123* (1), 1–9.

(23) Rezaee, M.; Assadi, Y.; Milani Hosseini, M.-R.; Aghaee, E.; Ahmadi, F.; Berijani, S. Determination of Organic Compounds in Water Using Dispersive Liquid-Liquid Microextraction. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1116* (1–2), 1–9.

(24) Al-Saidi, H. M.; Emar, A. A. A. The Recent Developments in Dispersive Liquid-Liquid Microextraction for Preconcentration and

Determination of Inorganic Analytes. *J. Saudi Chem. Soc.* **2014**, *18* (6), 745–761.

(25) Farhadi, K.; Farajzadeh, M. A.; Matin, A. A. Liquid Chromatographic Determination of Benomyl in Water Samples after Dispersive Liquid-Liquid Microextraction. *J. Sep. Sci.* **2009**, *32* (14), 2442–2447.

(26) Nagaraju, D.; Huang, S.-D. Determination of Triazine Herbicides in Aqueous Samples by Dispersive Liquid-Liquid Microextraction with Gas Chromatography-Ion Trap Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1161* (1–2), 89–97.

(27) Fariña, L.; Boido, E.; Carrau, F.; Dellacassa, E. Determination of Volatile Phenols in Red Wines by Dispersive Liquid-Liquid Microextraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry Detection. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1157* (1–2), 46–50.

(28) Rollero, S.; Bloem, A.; Camarasa, C.; Sanchez, I.; Ortiz-Julien, A.; Sablayrolles, J.-M.; Dequin, S.; Mouret, J.-R. Combined Effects of Nutrients and Temperature on the Production of Fermentative Aromas by *Saccharomyces cerevisiae* during Wine Fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99* (5), 2291–2304.

(29) Leong, M.-I.; Huang, S.-D. Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Method Based on Solidification of Floating Organic Drop for Extraction of Organochlorine Pesticides in Water Samples. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216* (45), 7645–7650.

(30) Mao, T.; Hao, B.; He, J.; Li, W.; Li, S.; Yu, Z. Ultrasound Assisted Ionic Liquid Dispersive Liquid Phase Extraction of Lovastatin and Simvastatin: A New Pretreatment Procedure. *J. Sep. Sci.* **2009**, *32* (17), 3029–3033.

(31) Roland, A.; Schneider, R. Development and Validation of a High-Throughput Analysis of Glutathione in Grapes, Musts and Wines by Stable Isotope Dilution Assay and LC-MS/MS. *Food Chem.* **2015**, *177*, 152–157.

(32) Rapp, A.; Mandery, H.; Ullmeyer, H. Neue Monoterpendiole in Traubenmosten Und Weinen Und Ihre Bedeutung Für Die Genese Cyclischer Monoterpenäther. *Vitis* **1984**, *23*, 84–92.

(33) Fraatz, M. A.; Berger, R. G.; Zorn, H. Nootkatone—A Biotechnological Challenge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *83* (1), 35–41.

(34) Babushok, V. I.; Linstrom, P. J.; Zenkevich, I. G. Retention Indices for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **2011**, *40* (4), No. 043101.

### **3. Validation et application de la méthode de dosage pour la production de lactones et de dérivés benzéniques en fermentation alcoolique**

#### **3.1. Validation de la méthode**

La méthode précédemment décrite dans la publication (extraction et paramètres analytiques) a été utilisée pour la quantification des lactones et des dérivés benzéniques. La validation de cette méthode a été effectuée en suivant la même procédure de validation, en étudiant l'effet matrice, en déterminant la reproductibilité intermédiaire, la répétabilité, les limites (LOD et LOQ) et le recouvrement de la méthode pour les composés étudiés.

Dans un premier temps, l'effet matrice a été évalué, en comparant 2 à 2 les réponses observées sur vin modèle, sur moût synthétique MS fermenté, et sur vin blanc, après l'ajout de 50 µg/L de chaque analyte dans chacune des matrices. Puis le  $SD_{red}$  a été calculé de la même manière que dans la partie précédente. Il doit être inférieur à 2 pour attester statistiquement de l'absence d'effet matrice (Roland & Schneider, 2015). Le **Tableau 25** recense les valeurs de  $SD_{red}$  obtenues pour les différentes molécules étudiées.

**Tableau 25 : Etude de l'effet matrice pour les dérivés benzéniques et les lactones étudiés**

Composés	$SD_{red}$	
	Vin modèle vs MS	Vin modèle vs Vin blanc
Benzaldéhyde	1.60	1.77
Alcool benzylique	1.59	1.66
Vanilline	1.80	1.80
4-Vinylguaiacol	1.33	1.66
$\gamma$ -octalactone	1.25	0.97
$\delta$ -octalactone	0.93	1.57
$\gamma$ -nonalactone	0.60	1.78
$\delta$ -nonalactone	1.19	1.80
$\gamma$ -décalactone	0.54	1.57
$\delta$ -décalactone	1.33	1.48

Au préalable, pour chaque série d'analyses, l'homoscédasticité a été évaluée puis confirmée par la réalisation de tests de Fisher. De manière identique aux terpènes, il n'y a pas d'effet matrice dans les conditions de l'étude, que ce soit en comparant les résultats obtenus sur matrice témoin (vin modèle) à ceux obtenus sur MS fermenté ou sur vin blanc. Cette observation permet de réaliser des courbes d'étalonnage dans des vins modèles au lieu de la matrice réelle pour la quantification sur les vins blancs et les moûts synthétiques fermentés.

Les différents paramètres évalués pour la validation de la méthode sont recensés dans le **Tableau 26**.

**Tableau 26 : Paramètres de validation de la méthode développée, appliquée aux dérivés benzéniques et aux lactones étudiés**

Les résultats sont obtenus en utilisant le MS fermenté comme matrice. <sup>a</sup> La linéarité a été statistiquement vérifiée en réalisant des tests « Lack-of-fit ». <sup>b</sup> Les LOD et LOQ sont déterminées lorsque les ratios signal/bruit sont respectivement de 3 et 10.

Composé	RSD Reproductibilité (%)		RSD Répétabilité (%)	Linéarité <sup>a</sup>		Recouvrement (%)		Limites <sup>b</sup> (µg/L)		Facteur de réponse
	25 µg/L	50 µg/L	50 µg/L	Courbe de calibration	R <sup>2</sup>	25 µg/L	50 µg/L	LOD	LOQ	50 µg/L
<b>Benzaldéhyde</b>	8.6	6.1	5.8	8.22 x - 0.011	0.997	106.0	100.8	5.9	19.7	0.96
<b>Alcool benzylique</b>	9.9	7.5	6.7	4.59 x - 0.002	0.998	102.4	102.1	7.1	23.5	0.54
<b>Vanilline</b>	10.3	8.1	5.2	2.96 x - 0.005	0.996	103.7	100.9	8.1	26.9	0.76
<b>4-Vinylguaiacol</b>	12.7	10.3	9.9	6.86 x - 0.161	0.990	104.1	97.4	8.9	29.5	0.33
<b>γ-octalactone</b>	7.8	6.5	5.9	18.69 x - 0.082	0.998	95.0	106.0	5.6	18.5	2.52
<b>δ-octalactone</b>	11.8	9.1	7.0	5.24 x + 0.003	0.996	104.3	100.9	7.2	24.0	0.63
<b>γ-nonolactone</b>	10.7	8.2	6.9	18.02 x - 0.054	0.996	104.2	99.5	5.9	19.6	2.01
<b>δ-nonolactone</b>	12.5	10.6	10.2	6.87 x - 0.018	0.995	103.6	101.0	7.3	24.2	0.78
<b>γ-décalactone</b>	10.4	8.2	6.1	17.63 x + 0.107	0.995	103.2	100.7	5.4	18.1	2.33
<b>δ-décalactone</b>	10.5	8.6	8.2	5.94 x - 0.025	0.996	102.1	102.1	6.8	22.7	0.66

Néanmoins, la totalité de la procédure de validation a été effectuée sur l'ensemble des matrices (**Annexe 3**).

Trois courbes de calibration indépendantes ont été réalisées, en ajoutant des concentrations connues des composés étudiés, entre 10 et 200 µg/L. Des tests « lack-of-fit » ont été faits afin de vérifier statistiquement la linéarité des calibrations. Pour chaque composé, les valeurs de  $R^2$  sont supérieures à 0,990 et les tests statistiques confirment la linéarité des calibrations entre 10 et 200 µg/L (**Tableau 26**).

La précision de la méthode a ensuite été évaluée, par l'ajout de 25 et 50 µg/L au moût synthétique. Le recouvrement de la méthode est mesuré en comparant les concentrations calculées par les équations des droites de calibration, aux concentrations réellement ajoutées. Pour les 2 concentrations étudiées, le recouvrement relatif varie de 6,1 à 12,7 %, attestant de résultats satisfaisants.

La répétabilité et la reproductibilité intermédiaire ont été évaluées en calculant divers pourcentages de variabilité (**Tableau 26**). La répétabilité a été réalisée à un niveau de concentration (50 µg/L) en réalisant 10 extractions et analyses indépendantes, tandis que la reproductibilité intermédiaire a été réalisée sur 5 jours, à deux niveaux de concentration (25 et 50 µg/L), avec trois réplicats indépendants. Le RSD (écart-type relatif) de la répétabilité varie entre 5,2 et 10,2 %. Les RSD de la reproductibilité intermédiaire pour chaque composé sont inférieurs à 13%, que ce soit pour 25 ou 50 µg/L d'analyte ajouté à la matrice. De manière identique aux terpènes, les valeurs obtenues pour la répétabilité et la reproductibilité intermédiaire sont satisfaisantes pour les dérivés benzéniques et les lactones étudiés. Des échantillons de blanc de matrice ont été inclus après chaque séquence analytique, et aucun signal pouvant interférer avec les analytes étudiés n'a été observé, attestant de l'absence d'effet mémoire, même après l'injection du plus haut point de la gamme de calibration.

Les LODs et LOQs ont été déterminées (Tableau 2), en considérant le ratio « signal/bruit » (S/N, > 3 et > 10, respectivement). Concernant les lactones, les limites de détection (LOD) sont inférieures pour les trois  $\gamma$ -lactones étudiées (5,9, 6,9 et 6,1 µg/L) par rapport aux  $\delta$ -lactones correspondantes (7,0, 10,2 et 8,2 µg/L), traduisant une meilleure sensibilité de la méthode pour les  $\gamma$ -lactones dans ces conditions.

Pour les dérivés benzéniques étudiés, les LODs obtenues sont plus faibles (entre 5,9 et 8,9 µg/L) et la méthode est assez sensible pour quantifier ces composés dans les vins, dont la

concentration peut varier en fonction des moûts et des souches utilisées pour la fermentation (Delfini *et al.*, 1991)

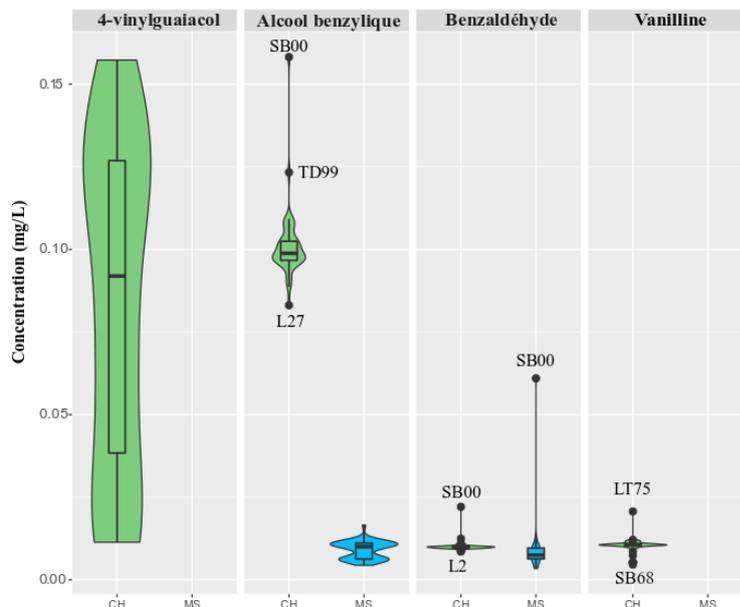
### 3.2. Diversité de production des dérivés benzéniques par les levures œnologiques pendant la fermentation

Les capacités de production des dérivés benzéniques durant la fermentation alcoolique des 40 souches de levures sélectionnées précédemment ont été étudiées. Les fermentations ont été réalisées sur deux moûts naturels différents, un moût de Chardonnay et un moût Ugni Blanc avec des caractéristiques différentes concernant les teneurs en sucres, en azote assimilable et en lipides (**Annexe 4**). L'utilisation des moûts naturels permet d'évaluer la capacité des différentes souches à produire ou à libérer des dérivés benzéniques à partir de précurseurs variétaux. De plus, la capacité des levures à produire *de novo* ces molécules a été appréhendée en réalisant des fermentation en moût synthétique dont la composition principale est basée sur celle du Chardonnay pour les sucres, le pH et l'azote assimilable. Aucune production de composés benzéniques n'a été observée en condition contrôle (MS conservé à 24 °C pendant 10 jours). Par conséquent, la production des dérivés benzéniques est uniquement liée à l'activité des levures, que ce soit *via* leur métabolisme ou leurs activités enzymatiques.

Afin d'observer la capacité intrinsèque des levures à produire ces composés, les profils de production obtenus après fermentation sur moût de Chardonnay et sur moût synthétique ont été comparés (**Figure 31**). Sur MS, seuls le benzaldéhyde et l'alcool benzylique ont été produits. L'ensemble des souches étudiées sont capables de produire intrinsèquement ces deux dérivés benzéniques, dans des concentrations allant de 4,4 à 16,7 µg/L d'alcool benzylique, et de 3,4 à 61 µg/L de benzaldéhyde. Les trois souches produisant le plus de benzaldéhyde sont trois souches non-*Saccharomyces* : *Starm. bacillaris* 3800 (61 µg/L), *Z. florentina* (13,3 µg/L) et L28 (*T. delbrueckii*) (12 µg/L). Néanmoins, ces 3 souches sont faibles productrices d'alcool benzylique (respectivement 6, 9,7 et 6,4 µg/L). Ces observations sont en accord avec les travaux de Delfini *et al.*, (1991), au cours desquels les souches de *Starm. bacillaris* et *T. delbrueckii* produisaient plus de benzaldéhyde que d'alcool benzylique. Concernant l'alcool benzylique, c'est la souche L15 (*S. cerevisiae*) qui en produit le plus (16,7 µg/L). Ces observations suggèrent l'existence d'une voie métabolique de production de ces composés, éventuellement *via* la dégradation de la phénylalanine, comme suggéré par Martin *et al.*, (2016). Après

fermentations sur Ugni Blanc, les concentrations obtenues sont plus faibles que sur Chardonnay. Par exemple, SB3800 produit moins de 25 µg/L de benzaldéhyde, soit deux fois moins que sur Chardonnay. Cela peut être lié à une présence moins importante du précurseur hypothétique, la phénylalanine. En effet, le moût d’Ugni Blanc utilisé ne contient que 92 mg/L d’azote assimilable (non ajusté) contre 192 mg/L pour le Chardonnay. Cette faible teneur en azote dans l’Ugni Blanc peut expliquer une disponibilité moindre en phénylalanine, et par conséquent une production plus faible de benzaldéhyde et d’alcool benzylique. L’alcool benzylique et le benzaldéhyde peuvent aussi être des composés variétaux, présents sous forme glycosylée dans le moût. L’Ugni Blanc étant connu pour être un cépage peu aromatique, une faible présence de ces précurseurs peut également être une explication pour ces plus faibles concentrations.

La production d’alcool benzylique est bien supérieure sur moût naturel que sur MS, avec des concentrations allant de 83,1 µg/L (L18) à 158 µg/L (*Starm. bacillaris* 3800). Ces concentrations sont ainsi jusqu’à 25 fois supérieures sur Chardonnay que sur MS, suggérant la présence de précurseurs variétaux présents dans le moût. L’importance des précurseurs variétaux semble être moindre pour le benzaldéhyde. En effet, les concentrations obtenues sur Chardonnay sont au maximum 2 fois supérieures que celles sur MS. Certaines souches produisent moins sur Chardonnay que sur MS, notamment *Starm. bacillaris* 3800, qui, malgré le fait qu’elle soit meilleure productrice, ne produit que 22 µg/L contre 61 µg/L sur MS.



**Figure 31 : Comparaison des productions de dérivés benzéniques après fermentation sur Chardonnay (vert) et sur MS mimant la composition du Chardonnay (bleu)**

SB00 : *Starm. bacillaris* 3800 ; TD99 : *T. delbrueckii* 3799 ; LT75 : *L. thermotolerans* 3775

Le 4-vinylguaiacol (4-VG) et la vanilline ont seulement été produits au cours de la fermentation alcoolique sur Chardonnay, montrant une production exclusive de ces composés par la conversion de précurseurs variétaux initialement présents dans le moût.

Il existe une grande diversité de production de 4-VG, avec des concentrations allant de 11,4 µg/L pour *Starm. bacillaris* 3768 à 157 µg/L pour L11 (**Annexe 5**). La production de 4-VG est à surveiller car elle s'accompagne de la production de 4-vinylphénol, précurseurs des phénols volatils (4-éthylguaiacol et 4-éthylphénol), impliqués dans le caractère phénolé des vins. La production de vanilline est également variable, avec des productions comprises entre 4,6 µg/L pour *Starm. bacillaris* 3768 et 20,7 µg/L pour *L. thermotolerans* 3775. Cette variabilité montre l'importance de la souche ou de l'espèce de levure utilisée pour la production des composés aromatiques.

### 3.3. Diversité de production des lactones par les levures du consortium œnologique pendant la fermentation alcoolique

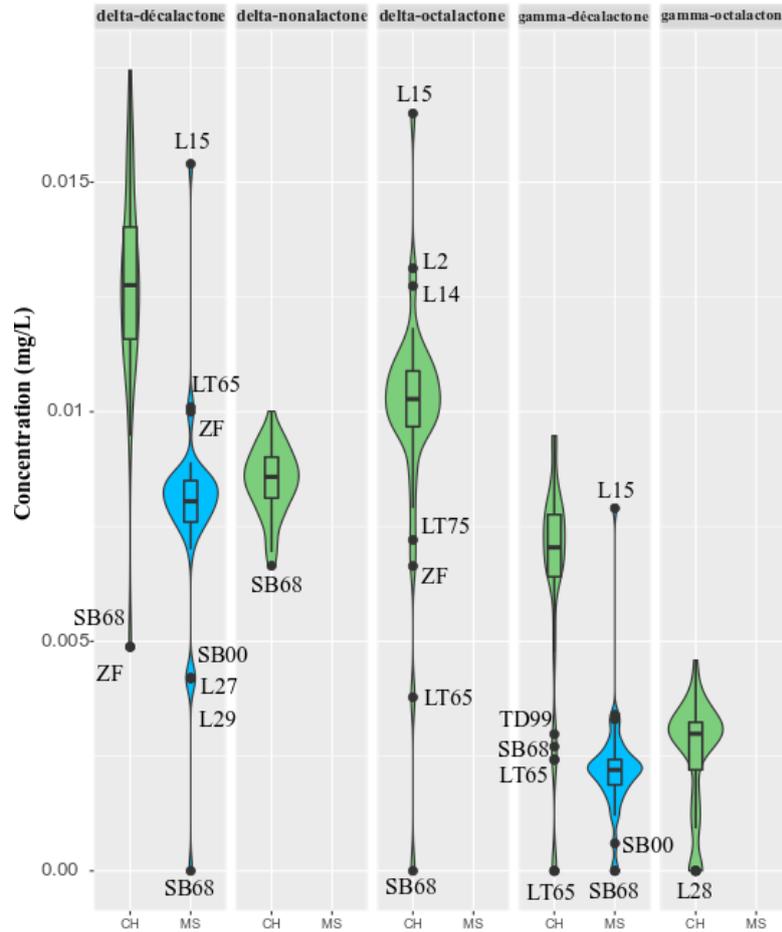
Parmi les lactones étudiées, la  $\gamma$ -nonalactone n'est jamais produite, que ce soit sur MS, Chardonnay, ou Ugni Blanc, confirmant les données de la littérature attestant du fait que certaines lactones seraient des arômes de vieillissement (Pollnitz *et al.*, 1999). Concernant les autres lactones, seulement 2 sont produites par certaines souches – surtout *S. cerevisiae* – après fermentations sur MS : la  $\delta$ - et la  $\gamma$ -déalactone. La souche L15 est la meilleure productrice pour ces composés (respectivement 15,4 et 7,9 µg/L) (**Figure 32A**). L15 est globalement la seule souche de *S. cerevisiae* étudiée qui se démarque des autres sur l'ensemble des moûts et également L2 et L14 sur Chardonnay. Sur MS, la totalité des souches de *S. cerevisiae* ont une production de décalactones, tandis que certaines non-*Saccharomyces* n'en produisent pas (*Starm. bacillaris* 3768, par exemple). Ces résultats obtenus sur MS prouvent la capacité de certaines levures, dont les souches étudiées de *S. cerevisiae*, à produire ces molécules grâce à leur métabolisme.

Il semble exister une réelle incidence du background génétique des souches, puisque certaines souches sont très faibles productrices, quelques soient les conditions de fermentation. Les souches concernées sont notamment les deux souches de *Starm. bacillaris* (SB 3800 et SB 3768), incapable de produire intrinsèquement les lactones étudiées.

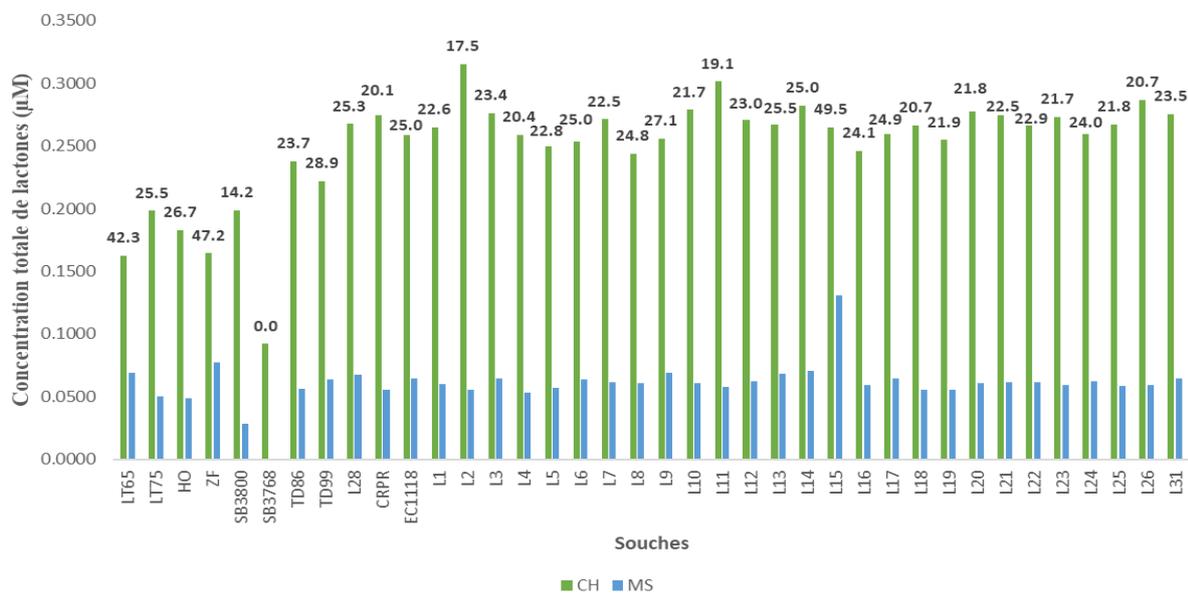
Les productions totales de lactones montrent une certaine homogénéité concernant les souches de *S. cerevisiae* (entre 0,05 et 0,07  $\mu\text{M}$  sur MS), excepté L15, meilleure productrice (0.13  $\mu\text{M}$  sur MS) (**Figure 32B**). Pour l'ensemble des souches et des lactones étudiées, la part provenant du métabolisme de la levure est minoritaire, comme le montre la comparaison des productions entre MS et Chardonnay (**Figure 32B**). A partir de ces données, on peut estimer qu'entre 20,1 % et 49,5 % des lactones proviennent d'une synthèse *de novo* par les levures. La proportion maximale produite par les levures par rapport à la teneur totale est de 49,5 % pour la L15, 47,2 % pour la souche de *Z. florentina* et de 42,3 % pour la souche de *L. thermotolerans* 3765. L2 est la meilleure productrice sur Chardonnay, mais seulement 17,5 % de la production sont liés au métabolisme intrinsèque de la levure. Exceptés les exemples précédemment cités, les parts liées au métabolisme des souches varient entre 20,1 % (CRPR) et 27,1 % (L9).

Cela confirme les données de la littérature montrant l'importance des précurseurs (acides gras) dans la production de ces composés (Romero-Guido *et al.*, 2011). La production observée sur MS par certaines souches peut être liée aux conditions environnementales, notamment l'ajout de phytostérols dans les moûts de départ, pouvant contenir une proportion d'acides gras. Après fermentations sur Ugni Blanc, les concentrations obtenues sont plus faibles que sur Chardonnay, malgré une turbidité bien plus importante (1150 NTU, **Annexes 4 et 5**) et ainsi une probabilité importante de contenir les acides gras précurseurs des lactones étudiées (acides linoléique et ricinoléique notamment). Néanmoins, le procédé de vendange à Cognac, sans  $\text{SO}_2$  ajouté, entraîne une grande oxydation des moûts de raisin, et potentiellement des précurseurs intéressants, expliquant les plus faibles concentrations des lactones étudiées. Les différentes observations mettent en lumière la complexité de la compréhension de la production de ces composés, ainsi que la diversité des souches, même au sein de l'espèce *S. cerevisiae*.

A



B



**Figure 32 : Production des lactones par 40 souches œnologiques après fermentation sur moût synthétique (MS , bleu) et Chardonnay (CH, vert)**

(A) Concentration des lactones étudiées. (B) Somme de la production des lactones. Les nombres sur les histogrammes représentent la proportion en % de lactones produites liées au métabolisme de la souche. LT : *L. thermotolerans* ; HO : *H. osmophila* ; ZF : *Z. florentina* ; SB : *Starm. Bacillaris* ; TD : *T. delbrueckii*. Les autres souches sont des *S. cerevisiae*.

## 4. Conclusion

Au cours de cette étude, une méthode d'analyse des composés non-conventionnels, basée sur une DLLME suivie d'une analyse par GC-MS, a été développée et validée, en étudiant divers paramètres tels que l'absence d'effet matrice, la reproductibilité intermédiaire, la répétabilité, le recouvrement, ou encore la linéarité dans une gamme de concentrations œnologiques.

Cette méthode a ensuite été appliquée à un screening de 40 souches de levures du consortium œnologique, dont 8 souches non-*Saccharomyces* préalablement sélectionnées pour leurs capacités fermentaires. Ce travail a permis d'obtenir une image globale de la capacité de production de lactones, de dérivés benzéniques et de terpènes, par les levures œnologiques. Certaines molécules n'ont jamais été détectées au cours des diverses fermentations (acétate de géranyle pour les terpènes, et  $\gamma$ -nonalactone, par exemple). D'autres composés étudiés ont une origine variétale prépondérante voire exclusive, de par une plus grande production pendant la fermentation sur moûts naturels. Dans cette optique, la production de 4-VG, ou encore de citral, n'est détectée qu'après fermentation sur Chardonnay. La production des lactones s'inscrit également dans cette logique, avec des parts liées à la présence de précurseurs variant entre 20 et 49,5 %. La production d'alcool benzylique est également supérieure sur Chardonnay, pour l'ensemble des souches étudiées.

Certains composés ont pour origine le métabolisme des levures, malgré leur qualification d'arômes variétaux. En effet, certains composés sont produits durant la fermentation sur MS, et la production de ces divers composés dépend du background génétique des souches. Ainsi, certaines souches se sont démarquées par la surproduction de certains composés d'intérêt, contrairement à d'autres, faibles productrices de certains composés. En effet, la souche *Starm. bacillaris* s'est révélée être la meilleure productrice de benzaldéhyde, mais également de certains monoterpénols tels que le géraniol, le linalool et l'alpha-terpinéol. De par ces caractéristiques, cette souche a été conservée pour étudier les voies métaboliques menant à la production des terpènes et des dérivés benzéniques. Néanmoins, cette souche a été incapable de consommer l'intégralité des sucres au cours de la fermentation, il est donc nécessaire de l'étudier en fermentations mixtes avec *S. cerevisiae* et d'étudier son impact sur la production des composés étudiés. Ces observations confirment l'intérêt des souches non-*Saccharomyces* pour diversifier le profil aromatique des vins.

D'autre part, la souche *S. cerevisiae* L15 est la meilleure productrice de lactones, avec une part importante provenant de son métabolisme (49,5 %). L'ensemble des souches *S. cerevisiae* étudiées est intrinsèquement capable de produire ces composés. La production de ces composés est connue dans le monde vivant, mais n'a jamais été montré chez *S. cerevisiae*. Cette souche a donc été sélectionnée afin de mieux comprendre les voies de production des lactones, et l'effet de certains paramètres sur cette production.

# Annexes Chapitre 1

**Annexe 1 :** Données brutes d'avancement de fermentation et de concentration de métabolites issus du MCC après fermentation des souches du screening de non-*Saccharomyces*. Les concentrations en glycérol, acétate, alpha-cétoglutarate, pyruvate et succinate sont exprimées en g/L.

Souche	Code ACP	Avancement	Glycérol	Alpha-cétoglutarate	Pyruvate	Succinate	Acétate
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> D214	9A	100.0	7.98	0.10	0.09	1.04	0.57
<i>Zygorulasporea florentina</i> PYV7-16	14A	99.6	7.09	0.04	0.15	1.25	0.06
<i>Hanseniaspora osmophila</i> PYV7-30	3D	98.9	6.76	0.05	0.14	0.73	0.74
<i>Torulasporea delbrueckii</i> 3786	11A	98.7	6.57	0.05	0.07	0.77	0.59
<i>Lachancea thermotolerans</i> 3765	4A	94.9	10.39	0.02	0.02	1.63	0.14
<i>Starmerella bacillaris</i> 3800	10A	94.5	11.49	0.56	0.20	0.51	0.21
<i>Torulasporea delbrueckii</i> 3799	11B	92.3	7.93	0.05	0.05	1.18	0.13
<i>Pichia kudriavzevii</i> 3770	7E	92.0	6.92	0.05	0.11	0.24	0.54
<i>Starmerella bacillaris</i> 3768	1J	91.4	10.99	0.54	0.17	0.66	0.28
<i>Lachancea thermotolerans</i> 3775	4B	88.1	10.17	0.02	0.03	1.42	0.10
<i>Hanseniaspora opuntiae</i> 3779	3C	80.8	4.98	0.01	0.05	0.89	0.72
<i>Candida apicola</i> PYV8-49	1A	80.7	10.60	0.15	0.26	0.57	0.15
<i>Pichia kudriavzevii</i> 3772	7D	80.1	6.58	0.06	0.11	0.23	0.56
<i>Pichia occidentalis</i> 3803	7H	77.8	6.65	0.07	0.04	0.28	1.20
<i>Candida diversa</i> 3771	1C	77.6	7.42	0.04	0.04	0.26	0.61
<i>Candida diversa</i> 3778	1D	76.5	7.72	0.06	0.03	0.28	0.78
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i> 3792	3A	70.1	5.05	0.01	0.07	0.65	0.54
<i>Hanseniaspora opuntiae</i> 3774	3B	69.6	5.92	0.01	0.07	0.40	0.72
<i>Pichia occidentalis</i> 3776	7G	69.5	5.54	0.07	0.09	0.33	1.08
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	13B	67.4	3.29	0.02	0.08	0.19	0.80
<i>Candida glabrata</i> 3773	1E	66.2	6.14	0.03	0.12	0.68	0.20
<i>Metschnikowia andauensis</i> 3801	5B	64.2	5.63	0.10	0.06	0.49	0.03
<i>Candida glabrata</i> 3790	1F	62.5	5.76	0.03	0.14	0.84	0.23
<i>Hanseniaspora uvarum</i> 3787	3E	61.5	5.40	0.00	0.04	0.39	1.13
<i>Trigonopsis vinaria</i> 3763	13A	60.0	5.86	0.04	0.11	0.08	0.29
<i>Metschnikowia andauensis</i> 3795	5A	59.7	6.12	0.12	0.07	0.43	0.02
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> 3802	5I	58.5	5.56	0.12	0.07	0.37	0.04
<i>Metschnikowia fructicola</i> NZ 298	5E	57.8	6.28	0.08	0.06	0.36	0.01
<i>Metschnikowia chrysoperlae</i> 3784	5C	57.6	5.62	0.07	0.05	0.42	0.05
<i>Metschnikowia chrysoperlae</i> 3796	5D	54.9	5.83	0.12	0.08	0.38	0.06
<i>Pichia kluyveri</i> 3777	7B	54.2	4.27	0.04	0.18	0.05	0.41
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> NZ 58	5J	53.9	5.20	0.14	0.06	0.37	0.10
<i>Hanseniaspora uvarum</i> 3793	3F	53.3	4.94	0.00	0.04	0.31	0.86
<i>Pichia kluyveri</i> 3780	7C	51.3	5.22	0.04	0.10	0.04	0.17
<i>Trigonopsis cantarelli</i> PYdV7-41	12A	49.4	3.72	0.16	0.12	0.86	0.18
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> 3798	5H	49.1	5.41	0.10	0.07	0.30	0.05
<i>Metschnikowia fructicola</i> NZ 392	5F	47.9	4.70	0.10	0.05	0.33	0.07
<i>Candida orthopilopsis</i> 3764	1H	45.1	4.55	0.03	0.03	0.30	0.07

<i>Meyerozyma caribbica</i> 3783	<b>6B</b>	43.6	2.59	0.01	0.03	0.15	0.33
<i>Meyerozyma caribbica</i> 3769	<b>6A</b>	38.8	2.33	0.00	0.03	0.11	0.48
<i>Candida railenensis</i> PYV8-93	<b>1I</b>	38.5	2.39	0.01	0.03	0.00	0.56
<i>Pichia terricola</i> 3789	<b>7K</b>	36.3	3.79	0.04	0.05	0.42	0.32
<i>Pichia terricola</i> 3766	<b>7J</b>	28.3	3.37	0.05	0.03	0.53	0.39
<i>Pichia sporocuriosa</i> PYV8-69	<b>7I</b>	23.0	1.47	0.05	0.05	0.21	0.03
<i>Metschnikowia guilliermondii</i> 3794	<b>5G</b>	18.7	0.71	0.00	0.02	0.00	0.50
<i>Candida californica</i> PYV8-3	<b>1B</b>	6.2	0.69	0.00	0.01	0.00	0.32
<i>Cryptococcus laurentii</i> 3781	<b>2B</b>	5.7	0.38	0.00	0.01	0.00	0.22
<i>Candida liquefaciens</i> 3791	<b>1G</b>	2.4	2.73	0.01	0.00	0.00	0.02
<i>Cryptococcus heveanensis</i> PYV7-4	<b>2A</b>	1.5	0.19	0.01	0.00	0.00	0.07
<i>Pichia manshurica</i> 3788	<b>7F</b>	0.5	0.26	0.00	0.00	0.00	0.23
<i>Pichia guilliermondii</i> 3785	<b>7A</b>	0.0	0.37	0.00	0.00	0.00	0.29

**Annexe 2 : Données brutes du dosage des alcools supérieurs, esters et acides des souches non-*Saccharomyces* ayant 80 % d'avancement**

Code Souche	Alcools supérieurs (mg/L)					Esters acétiques (mg/L)		Esters éthyliques (mg/L)							
	PRO	MET	ISO	ISA	PHEOH	PHEAc	ISOAc	EP	EO	EDEC	EH	EL	EIB	EB	EDD
<i>H. opuntiae</i>	47.08	5.01	171.42	109.27	14.87	15.04	0.3	0.35	0.09	0.21	0.12	1.59	0.08	0.06	1.92
<i>H. osmophila</i>	35.97	13.71	76.65	204	14.54	23.49	0.31	0.18	0.08	0.21	0.12	1.19	0.07	0.07	1.95
LT65	55.73	5.56	326.87	362.3	20.84	0.07	0.37	0.35	0.09	0.17	0.19	7.78	0.15	0.09	1.54
LT75	57.11	5.98	332.8	377.72	21.13	0.07	0.34	0.48	0.09	0.17	0.21	9.01	0.13	0.08	1.54
PK	20.89	14.09	703.57	541.55	34.77	0.15	0.28	0.49	0.11	0.36	0.14	2.31	0.1	0.16	3.4
PO	23.43	2.11	106.4	137.51	27.24	0.06	0.19	0.05	0.09	0.16	0.11	0.58	0.07	0.07	1.5
SB 3768	55.94	2.11	518.55	163.08	25.58	0.09	0.13	0.07	0.08	0.17	0.11	2.01	0.16	0.12	1.58
SB 3800	62.43	1.55	461.72	146.73	29.46	0.09	0.13	0.06	0.08	0.17	0.1	1.76	0.12	0.11	1.56
SC214	24.4	3.46	185.83	233.52	25.49	0.49	0.21	0.13	0.27	0.3	0.65	1.89	0.08	0.1	2.76
TD99	46.49	11.83	259.77	305.15	36.63	0.2	0.12	0.34	0.09	0.18	0.17	0.59	0.09	0.1	1.66
TD86	32.68	5.84	210.78	279.75	25.62	0.47	0.22	0.12	0.32	0.47	1.3	1.71	0.08	0.13	4.37
ZF	41.49	7.46	149.75	246.2	27.03	1.03	0.13	0.11	0.08	0.17	0.19	6	0.1	0.08	1.63

Code Souche	Acides (mg/L)								
	ACPRO	ACBUT	ACISOV	ACDECA	ACISOB	ACMETH	ACOCT	ACDOD	
<i>H. opuntiae</i>	1.28	0.3	0.08	0.07	0.3	0.18	0.02	0.28	
<i>H. osmophila</i>	2.8	0.61	0.2	0.07	0.61	0.29	0.07	0.31	
LT65	1.6	0.99	0.24	0.11	0.99	0.62	0.04	0.14	
LT75	1.59	0.78	0.22	0.1	0.78	0.6	0.04	0.25	
PK	1.63	2.81	5.49	0.15	2.81	1.72	0.11	2.05	
PO	4.86	1.44	0.5	0.07	1.44	0.24	0.03	0.44	
SB 3768	2.03	0.68	0.05	0.13	0.68	0.44	0.05	0.3	
SB 3800	2.00	0.65	0.05	0.16	0.65	0.32	0.08	0.54	
SC214	4.05	1.04	1.27	0.57	1.04	1.5	1.09	0.38	
TD99	1.26	1.12	0.26	0.1	1.12	0.52	0.03	0.22	
TD86	4.43	1.18	1.25	1.13	1.18	1.43	1.5	0.7	
ZF	3.47	0.88	1.24	0.07	0.88	2.28	0.01	0.12	

PRO : propanol, ISO : isobutanol, PheOH : phényléthanol, MET : méthionol ; ISA : Alcool isoamylique ; EIB : isobutyrate d'éthyle ; EP : propanoate d'éthyle ; EH : hexanoate d'éthyle ; EB : butyrate d'éthyle ; EO : octanoate d'éthyle ; EDEC : décanoate d'éthyle ; EL : lactate d'éthyle ; PHEAc : acétate de 2-phényléthyle ; ISOAc : acétate d'isoamyle ; ACOCT : acide octanoïque ; ACDEC : acide décanoïque ; ACDOD : acide dodécanoïque ; ACISOV : acide isovalérique ; ACISOB : acide isobutyrique ; ACBUT : acide butyrique ; ACMETH : acide 2-méthylbutanoïque

**Annexe 3 : Paramètres de la validation de méthode dans les différentes matrices**

Composé	RSD Reproductibilité					
	25 µg/L			50 µg/L		
	MS fermenté	Vin blanc	Vin modèle	MS fermenté	Vin blanc	Vin modèle
<b>Benzaldéhyde</b>	8.6	9.2	8.1	6.1	8.2	5.6
<b>Alcool benzylique</b>	9.9	9.0	9.5	7.5	8.0	7.0
<b>Vanilline</b>	10.3	10.8	10.0	9.1	10.3	9.6
<b>4-Vinylguaiacol</b>	12.7	14.5	12.1	10.3	5.7	8.2
<b>γ-octalactone</b>	7.8	6.6	7.1	6.5	5.5	6.7
<b>δ-octalactone</b>	11.8	10.2	11.2	9.1	9.2	9.8
<b>γ-nonolactone</b>	10.7	8.3	8.5	8.2	4.6	5.1
<b>δ-nonolactone</b>	12.5	10.5	9.4	10.6	7.3	8.4
<b>γ-décalactone</b>	10.4	10.7	10.1	8.2	8.9	10.1
<b>δ-decalactone</b>	10.5	10.1	9.6	7.6	6.3	7.1

Composé	RSD répétabilité			Linéarité		
	50 µg/L			Matrices		
	MS fermenté	Vin blanc	Vin modèle	MS fermenté	Vin blanc	Vin modèle
<b>Benzaldéhyde</b>	5.8	7.1	5.3	8.22 x - 0.011	7.53 x - 0.000	9.67 x - 0.020
<b>Alcool benzylique</b>	6.7	8.6	8.3	4.59 x - 0.002	5.37 x + 0.011	4.75x + 0.009
<b>Vanilline</b>	5.2	9.3	7.3	2.96x - 0.005	3.07 x + 0.016	3.24 x - 0.009
<b>4-Vinylguaiacol</b>	9.9	6.2	7.1	6.86 x - 0.161	6.53 x - 0.143	6.77 x - 0.223
<b>γ-octalactone</b>	5.9	5.3	5.8	18.69 x - 0.082	17.65 x + 0.069	17.88 x - 0.008
<b>δ-octalactone</b>	7.0	4.7	6.3	5.24 x + 0.003	5.56 x + 0.082	5.85 x - 0.023
<b>γ-nonolactone</b>	6.9	6.0	6.2	18.02 x - 0.054	17.65 x - 0.038	17.88 x - 0.091
<b>δ-nonolactone</b>	10.2	8.0	9.5	6.87 x - 0.018	7.16 x + 0.019	6.97 x - 0.040
<b>γ-décalactone</b>	6.1	8.7	7.6	17.63 x + 0.107	18.24 x + 0.034	16.86 x - 0.065
<b>δ-decalactone</b>	8.2	7.4	3.7	5.94 x - 0.025	6.46 x - 0.014	5.22 x - 0.048

**Annexe 4 : Composition des moûts naturels utilisés**

<b>Musts</b>	<b>Sugars (g/L)</b>	<b>Total acidity (g/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)</b>	<b>pH</b>	<b>Malic acid (g/L)</b>	<b>Tartaric acid (g/L)</b>	<b>YAN (mgN/L)</b>	<b>NTU</b>	<b>Free SO<sub>2</sub> (mg/L)</b>	<b>Total SO<sub>2</sub> (mg/L)</b>
Ugni Blanc 2016	160.5	4.8	2.95	3.54	4.76	92	1150	0	0
Chardonnay 2016 <sup>a</sup>	227.5	2.8	3.42	2.16	2.15	192	20 <sup>a</sup>	14	36

<sup>a</sup> 4 mg/L de phytostérols ont été ajoutés pour éviter les carences lipidiques

**Annexe 5 : Données brutes des concentrations de dérivés benzéniques et lactones obtenues (mg/L) après fermentations sur MS (A), Chardonnay (B) et Ugni Blanc (C).**

A

Genre	Souches	Benzaldéhyde	Alcool benzylique	$\gamma$ -décalactone	$\delta$ -decalactone
<i>Non-Saccharomyces</i>	LT65	7.6	10.6	1.6	10.1
	LT75	5.7	10.4	1.6	7.0
	HO	8.2	12.1	0.0	8.3
	ZF	13.3	11.6	3.2	10.0
	CS	10.0	12.8	0.0	0.0
	SB	61.0	16.9	0.6	4.2
	TD99	8.8	11.1	2.6	8.3
	TD86	5.0	10.5	1.9	7.7
	L1	9.4	10.1	1.9	8.3
	L2	4.9	11.0	1.8	7.6
	L3	9.8	10.1	2.4	8.6
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	L4	3.4	9.5	1.5	7.5
	L5	3.8	10.5	2.2	7.5
	L6	9.4	10.2	2.3	8.5
	L7	7.1	10.0	2.3	8.1
	L8	7.0	9.9	2.3	8.0
	L9	7.0	11.1	3.3	8.5
	L10	9.1	9.5	1.8	8.5
	L11	4.0	11.1	2.2	7.6
	L12	9.6	9.8	2.2	8.4
	L13	9.7	10.0	2.7	8.9
	L14	11.2	11.0	3.4	8.6
	L15	11.0	10.4	6.9	9.8
	L16	6.6	10.0	2.1	8.0
	L17	10.5	10.1	2.4	8.6
	L18	7.8	9.9	1.2	8.2
	L19	3.6	9.7	1.9	7.6
	L20	7.3	10.3	2.3	8.0
	L21	9.5	10.5	2.1	8.4
	L22	5.3	9.9	2.4	8.0
	L23	7.4	10.1	2.2	7.9
	L24	7.0	10.7	2.6	8.0
	L25	6.6	9.7	2.0	7.9
	L26	5.6	10.7	2.2	7.9
	CRPR	5.8	12.2	2.1	7.3
	EC1118	10.5	10.4	2.5	8.5

B

Genre	Souches	Benzaldéhyde	Alcool benzylique	4-VG	Vanilline	$\gamma$ -octalactone	$\delta$ -octalactone	$\delta$ -nonalactone	$\gamma$ -décalactone	$\delta$ -decalactone
<i>Non-Sacharomyces</i>	LT65	6.5	6.1	5.1	0	8.3	7.9	7.1	0	9.7
	LT75	6.1	6.1	4.1	0	4.2	3.8	7.7	0	11.2
	HO	8.2	6.5	5.4	0	10.4	7.2	7.8	2.4	11
	ZF	8.2	6.8	11.5	0	9.2	10.6	7.9	2.7	12.8
	SB1	36.4	12.4	9.3	13.6	27.9	10.1	8.8	0	12.9
	SB2	26.9	9.7	8.9	13.8	30.8	11	8.6	7.1	15.8
	TD99	8.2	6.4	9.3	13	12	8.6	9	3	9.5
	TD86	7	6.7	8.9	0	10.3	0	6.6	2.4	4.9
	L27	2.5	5.9	0	0	0	6.6	6.9	4.8	4.9
	L28	10.3	6.9	4.7	12.7	12.4	10.5	8.8	6.7	11.7
	L29	5.9	6.1	0	0	3.5	13.1	9.3	7.9	15
L31	7.1	6.6	12.1	6.4	11.5	10.8	8.8	7.4	12.7	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CRPR	7.8	6	10.5	0	17.9	10.7	8.5	6.5	15.5
	EC1118	6.8	6.2	11.3	12.6	11.8	9.6	8.3	7	10.9
	L1	7.4	6.1	9.8	0	11.4	10.4	8.3	6.6	11.6
	L2	6.8	6.4	11.2	0	12.6	10.1	9.1	8.6	11.5
	L3	6.7	6.4	10.9	12.4	11.1	9.7	9	7.2	12.9
	L4	6.8	6.1	11.3	12.6	12.5	10.4	8.4	6.7	11.7
	L5	6.4	6.2	11.3	0	11	8.9	9.5	9.4	13.3
	L6	6.1	6.2	16.6	6.2	10.8	11.1	9.5	9.5	14.3
	L7	7.1	6.7	10.7	6.3	11	10.6	9.1	7.8	12.3
	L8	6.6	6.4	11.3	0	10.5	9.6	8.2	6.4	16.8
	L9	6.3	6.4	10.3	6.2	10.3	12.7	8.6	7.7	15.6
L10	6.1	5.9	10	12.4	10.6	10.5	8	5.5	14.4	

L11	6.5	6.6	11.3	12.3	11.2	10.2	7.8	7.2	11.9
L12	6.8	6.3	10.5	0	11.3	11.8	8.1	7.5	13.8
L13	6.2	6.1	11.5	0	10	11.5	7.3	6.9	13.6
L14	5.9	6	10	6.6	9.9	6.7	8.8	6.7	11.8
L15	7.3	6.4	11.8	13.9	12.2	7.8	8.7	7.8	12.7
L16	7.4	6.2	11.7	6.4	12.4	6.9	8.1	6.9	14.1
L17	6.8	6	10.9	0	10.6	5.4	8.4	5.4	14.2
L18	7	6.1	4.4	13	17	6.4	9.4	6.4	14
L19	6.1	6.4	9.7	12.3	10.3	6.7	8.6	6.7	13
L20	6.7	6.7	10.8	6.3	10.7	7.5	8.3	7.5	13.5
L21	6.5	6.4	10.1	6.3	10.4	8.2	8.6	8.2	15.7
L22	6.8	6.3	10.6	0	12.6	8	9.5	8	11.3
L23	8.4	6.4	11.1	0	10.3	7.5	9.1	7.5	12.7
L24	6.1	6.2	9.9	0	10.8	7.6	7.7	7.6	12.5
L25	6.7	6	5	0	10	8.1	7.7	7.6	12.4
L26	6.7	6.1	11.6	12.4	11.4	0	0	0	0

C

Genre	Souches	Benzaldéhyde	Alcool benzylique	4-VG	Vanilline	$\gamma$ -octalactone	$\delta$ -octalactone	$\gamma$ -décalactone	$\delta$ -decalactone
<i>Non-Saccharomyces</i>	LT75	9.3	42.0	16.3	8.9	6.5	5.0	3.8	0.0
	HO	13.2	15.4	10.7	4.3	13.7	12.5	0.0	4.9
	SB1	35.6	38.4	10.5	8.9	13.0	30.2	1.9	9.6
	SB2	21.1	35.3	10.2	0.0	13.3	24.6	0.0	9.4
	TD86	8.7	34.2	11.9	9.1	13.6	7.0	0.0	11.8
	TD99	16.2	33.0	11.9	8.4	13.5	10.3	3.7	11.7
	ZF	11.5	34.6	11.7	9.0	13.6	5.6	2.0	11.1
	L28	16.4	32.7	15.4	9.3	14.8	9.7	0.0	4.8
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CRPR	18.4	33.5	20.2	10.3	17.8	7.1	0.0	13.7
	EC1118	12.3	30.4	14.5	8.7	14.6	7.5	0.0	10.3
	L1	16.6	31.8	20.6	9.7	17.0	13.4	2.4	11.2
	L2	13.7	30.2	11.5	9.3	15.9	7.8	3.8	10.4
	L3	14.9	33.2	26.4	9.1	15.3	9.1	2.0	10.0
	L4	12.3	33.3	24.6	10.2	13.3	8.6	2.1	10.1
	L5	12.8	32.2	19.1	9.3	14.9	6.6	0.0	11.0
	L6	11.6	32.4	16.5	9.4	14.0	6.5	4.2	10.7
	L7	12.4	32.9	19.0	9.4	15.3	9.5	0.0	9.9
	L8	13.3	36.1	13.5	11.6	15.0	7.5	2.0	4.9
	L9	9.8	35.2	21.4	9.6	13.6	6.6	4.5	10.9
	L10	12.3	32.2	22.2	11.4	6.5	3.6	2.0	10.3
	L11	12.8	34.9	12.3	10.1	14.5	6.1	0.0	11.5
	L12	12.7	35.1	13.9	8.9	14.5	7.0	0.0	10.7
	L13	11.0	32.4	16.6	9.1	17.6	5.8	0.0	10.1
L14	7.9	33.6	26.1	9.2	13.8	4.6	1.9	10.4	

L15	13.5	33.9	14.5	11.9	14.6	4.8	0.0	12.4
L16	11.8	31.0	12.4	9.9	15.3	6.2	2.5	11.3
L17	11.5	36.2	21.7	11.7	16.1	5.1	2.9	11.9
L18	24.0	35.6	21.6	8.7	14.0	20.9	1.9	10.3
L19	12.9	32.2	12.3	9.1	14.6	7.5	0.0	10.7
L20	10.6	32.8	18.7	10.9	14.4	6.0	2.1	11.0
L21	11.3	42.9	34.9	10.3	16.1	5.5	0.0	9.6
L22	14.7	30.7	10.8	8.7	14.4	7.1	0.0	10.6
L23	14.1	32.6	11.8	9.2	15.6	9.1	0.0	10.4
L24	9.9	34.4	12.0	9.2	14.3	6.4	1.8	11.1
L25	12.4	46.6	13.4	9.2	14.6	5.8	1.9	10.8
L26	13.5	30.2	15.0	8.9	15.8	5.6	0.0	9.8







# CHAPITRE 2

---

## ORIGINALITES METABOLIQUES DE *STARMERELLA BACILLARIS* PENDANT LA FERMENTATION ALCOOLIQUE ET PRODUCTION DE DERIVES BENZENIQUES ET TERPENIQUES

Nos travaux sur la caractérisation des levures œnologiques vis-à-vis de la production d'arômes non-conventionnels ont révélé les capacités de production de terpènes et de dérivés benzéniques de la souche de *Starm. bacillaris* 3800. Notre premier objectif a alors été de connaître l'origine métabolique de ces composés. Pour cela, une étude bibliographique a été menée, et a conduit à envisager le rôle de la phénylalanine et du tryptophane dans la production de composés benzéniques. D'autre part, pour la production de terpènes, il existerait une voie additionnelle à la voie classique de synthèse des dérivés terpéniques, *via* la voie du mévalonate, par la dégradation de la leucine. L'étude de l'incidence de ces 3 acides aminés sur la production des composés volatils non-conventionnels a permis de valider ou d'infirmer ces différentes hypothèses quant aux voies de production de ces molécules. Ce travail fera l'objet d'une publication.

La souche de *Starm. bacillaris* est incapable de réaliser la fermentation œnologique jusqu'à l'épuisement complet des sucres. D'un point de vue technologique, il est donc nécessaire de l'utiliser en association avec *S. cerevisiae*. Le second objectif de notre étude a été d'évaluer les apports de cette levure dans un contexte d'élaboration des vins, nous avons tout d'abord étudié la compatibilité des souches *Starm. bacillaris* et *S. cerevisiae* EC1118® en fermenteurs de 1 L, critère crucial dans la mise en place de fermentations séquentielles. Dans un second temps, des

fermentations mixtes ont été réalisées au sein de l'UE Pech Rouche, en fermenteurs de 100 L en duplicats, pour lesquelles le timing d'inoculation de *S. cerevisiae* et ses effets sur la cinétique fermentaire et sur la production d'arômes ont été étudiés. Un suivi en ligne de 13 composés volatils majoritaires a été effectué, ainsi qu'une analyse hors ligne de composés volatils conventionnels et non-conventionnels. Une analyse sensorielle (29 juges) a ensuite été menée sur les vins obtenus, en effectuant 6 tests triangulaires et une analyse descriptive des vins, par profil CATA. Cette étude à l'échelle pilote, suivie de l'analyse sensorielle, fera l'objet d'une publication.

## **1. Unravelling the metabolic specificities of *Starmerella bacillaris*, in particular the production of benzene and terpene derivatives**

### **1. Abstract**

Diversifying the aromatic profile of wines is a major challenge for today's wine industry. To address this issue, the use of non-*Saccharomyces* strains appears as a relevant solution. Among the wine yeast species, *Starmerella bacillaris* displays phenotypic traits of technological interest, including the production of terpenes and benzene derivatives which give the wines floral and almond notes. The aim of this study was to elucidate the metabolic origin of these molecules during *Starm. bacillaris* wine fermentation. To this end, we first compared the dynamic of formation of terpene and benzene derivatives by *S. cerevisiae* and *Starm. bacillaris*. Benzaldehyde and benzyl alcohol were transiently accumulated throughout fermentation. Terpene production displayed a sequential production of geraniol first, bioconverted in other monoterpenols. The levels of production of these compounds are greatly influenced by the strain used for fermentation, confirming the role of yeasts in the sensory profile of the wines.

The impact of three amino acids identified as potential precursors for terpenes and benzaldehyde derivatives (leucine - phenylalanine and tryptophan, respectively) on the formation of these compounds was then investigated. Phenylalanine was shown to be a precursor of benzaldehyde through the mandelate pathway while tryptophan was a regulator, via the modulation of the flux distribution around the chorismate nod. On the other hand, leucine did not have any effect of monoterpenols production, suggesting the role of the sterol pathway in the production of these compounds.

## 2. Introduction

In a very competitive market, a current challenge for the winemaking sector is to diversify its offer, conferring typicity to the final product. Yeasts play a key role in the winemaking process, transforming highly sugar-rich grape musts into wines, during alcoholic fermentation, which is the conversion of grape sugars, glucose and fructose, in ethanol, carbon dioxide, but also in less abundant metabolites such as glycerol, organic acids, and aromatic compounds. This process depends on many factors such as grape quality, environmental parameters (temperature, nitrogen content, lipids, ...) and the yeast strain used to perform fermentation (Bell & Henschke, 2005; Jolly *et al.*, 2006; Mouret *et al.*, 2014a; Sablayrolles, 2009).

Most of industrial wine fermentations are currently carried out using *S. cerevisiae* starter strains to ensure the complete consumption of sugars and to secure the process (Sablayrolles, 2009).

Nonetheless, in the last few years, a particular attention was paid to the use of non-*Saccharomyces* species, since it has been shown that indigenous yeasts, mostly non-*Saccharomyces* species present in the winemaking environment, can provide complexity to the wines (Bokulich *et al.*, 2014; Padilla *et al.*, 2016; Pretorius, 2016). For a long time, indigenous yeasts were considered as spoilage yeasts, leading to the production of undesirable off-flavor compounds. Nevertheless, over the past 20 years, various non-*Saccharomyces* yeasts have been proved to positively contribute to the wines aroma (Belda *et al.*, 2017; Medina *et al.*, 2013). However, during spontaneous fermentations, despite a high diversity and an important presence at the berries surface, indigenous yeasts are outcompeted by *S. cerevisiae* during fermentation, mainly due to the highest ethanol tolerance of this species (Combina *et al.*, 2005).

Among these non-*Saccharomyces* yeast species, *Starmerella bacillaris*, previously known as *Candida zemplinina* or *Candida stellata*, is now considered as a very promising species to meet the consumers expectations, in particular lowering the ethanol content in the wines (Englezos *et al.*, 2015). Masneuf-Pomarede *et al.*, (2015) studied the diversity of this species in winemaking, performing the genotyping of 163 different strains originating from 28 regions (7 countries) by microsatellites approaches, showing a high diversity within the species related to the geographical origin of the strains.

Regardless of this diversity, *Starm. bacillaris* strains share important characteristic features, as an acidogenic, psychrotolerant and osmotolerant species, particularly well adapted to sweet wine fermentations (Pfliegler *et al.*, 2014; Rantsiou *et al.*, 2012; Sipiczki, 2004). Regarding phenotypic traits of technological interest, *Starm. bacillaris* strains display a strong fructophilic character, contrary to *S. cerevisiae* that displays a preference for glucose (Englezos *et al.*, 2018, 2017). These strains have also a lower ethanol yield than *S. cerevisiae*, due to the relatively high

production of central carbon metabolites as glycerol, and organic acids resulting in the acidification of the medium (Giovanna *et al.*, 2012; Magyar *et al.*, 2014; Zara *et al.*, 2014). Finally, the use of *Starm. bacillaris* results in a higher production of terpenes after fermentation on natural matrixes, thanks to its ability to produce a wide range of hydrolytic enzymes (Englezos *et al.*, 2015; Mestre Furlani *et al.*, 2017).

Terpenes are widely known as varietal aromas, conferring floral notes to the wines, present in the must in free form or bound form. Monoterpenols can be present in the grapes in the form of odorless glycolytic precursors that can be hydrolyzed with the action of hydrolytic enzymes (Swiegers *et al.*, 2005). The precursors are composed of an aglycone linked to a  $\beta$ -D-glucopyranoside, that can be bound, in the 6-O position, to a  $\alpha$ -L-rhamnopyranose, a  $\alpha$ -L-arabinofuranose or a  $\beta$ -D-apiofuranose (Gunata *et al.*, 1985; Spagna *et al.*, 2002; Villena *et al.*, 2007; Williams *et al.*, 1982). Recently, a production of 60  $\mu\text{g/L}$  of monoterpenols was observed during *Starm. bacillaris* 3800 fermentation on synthetic medium without glycosylated precursors, showing the ability of this strain to produce these molecules compared to the low production of *S. cerevisiae* (5  $\mu\text{g/L}$ ) (Bergler *et al.*, 2020; Carrau *et al.*, 2005).

However, little is known about the metabolic pathway responsible for terpenes synthesis in yeasts. In plants, *Archae* and bacteria, terpene and sterol biosynthesis were connected (Lynen, 1964). Their common precursor, isopentyl diphosphate (IPP), is produced from acetyl-CoA through the mevalonate pathway (Schwender *et al.*, 1996; Wright, 1961). IPP is converted in geranyl pyrophosphate (GPP) by prenyl transferases, further converted into geraniol (Pérez-Gil *et al.*, 2017). This monoterpenol is then chemically or enzymatically isomerised, resulting in the formation of other monoterpenols as linalool, nerol or citronellol (King & Dickinson, 2000; Pedersen *et al.*, 2003). In addition, a formation of IPP from leucine catabolism has also been proposed (Carrau *et al.*, 2005). Through this pathway, isovaleryl-CoA is formed from leucine, and then converted in 3-methylcrotonyl-CoA (3-MCC-CoA). 3-MCC-CoA is then transformed in 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA), precursor of mevalonate, further converted in IPP.

Another characteristic of *Starm. bacillaris* strains is the production of some benzene derivatives, such as benzaldehyde and benzyl alcohol (Bergler *et al.*, 2020; Delfini *et al.*, 1991). First, a varietal origin of these molecules has been reported (Ferreira & Lopez, 2019). These compounds are present in grape juice as glycosylated precursors, that need to be enzymatically hydrolyzed to free the odorous molecules.

The formation of these benzene derivatives through the yeast metabolism has been studied for *S. cerevisiae* and *H. vineae* (Martin *et al.*, 2016b). *H. vineae* displayed a much higher ability to

produce benzyl alcohol and benzaldehyde (1 mg/L and 40 µg/L, respectively) than *S. cerevisiae* (40 µg/L and 17 µg/L, respectively). The mandelate pathway has been proposed as responsible for the formation of benzaldehyde from the phenylpyruvate intermediate coming from the chorismate pathway or the degradation of phenylalanine (Martin *et al.*, 2016b). The genes involved in this pathway have been identified: *ARO10* coding for the phenylpyruvate decarboxylase, *SCS7* coding for a sphingolipid- $\alpha$ -hydroxylase, and *DLD1/2* coding for a lactate dehydrogenase. These three genes are known to have a wide functional importance, including reactions with mandelate and phenylpyruvate (Gondry *et al.*, 2001; Smékal *et al.*, 1993). Benzyl alcohol can be then formed by aryl alcohol dehydrogenases (Aad) and alcohol dehydrogenases (Adh) from benzaldehyde in *S. cerevisiae*.

The aim of this study was to further explore the metabolic specificities of a *Starm. bacillaris* strain, and in particular to elucidate the metabolic origin of benzaldehyde and terpenes produced by this strain during wine fermentation. Furthermore, the dynamics of production of these compounds throughout oenological fermentation were unravelled. The incidence of three amino acids, Phe, Trp and Leu, potential precursors for the *de novo* formation of terpenes and benzaldehyde in the synthesis of these molecules was investigated.

### 3. Materials and methods

#### *Yeast strains and precultures*

The strain of *Starmerella bacillaris* (SB3800), previously isolated from grape berries, was used. The strain is stored at -80 °C in a mix of YEPD medium (10 g/L yeast extract, 20 g/L peptone and 20 g/L dextrose) and glycerol (15 %). For preculture, one colony was used to inoculate a sterile 50-mL tube containing 25 mL of YEPD medium. Then, 1 mL of this preculture was used to inoculate a sterile 500-mL flask containing 100 mL of YEPD medium. For each step of this upscaling, the strain was grown for 24 h at 28 °C (190 rpm). Then, the final preculture was centrifuged (5 min, 4500 rpm, 4 °C), and the pellet was resuspended in 15 mL of water containing 9 g/L NaCl. The inoculation rate was  $1 \times 10^7$  CFU/mL.

*Saccharomyces cerevisiae* EC1118 ®, provided by Lallemand SA (Montreal, Canada), was used as a control. The inoculation of this dried yeast was 20 g/hL, previously rehydrated for 30 min at 37 °C in a 50 g/L solution (1 g of dry yeasts diluted in 10 mL of this solution).

### *Fermentation media and fermentation conditions*

Seven synthetic musts (SM) were used in this study. The regular SM was prepared as described by Rollero *et al.* (2015). Depending on the experiments, the other media differentiate from each other by their Yeast Assimilable Nitrogen (YAN) content (200 mg/L) (**Table S1**). A concentration of 4 mg/L  $\beta$ -sitosterol was added to the SM to satisfy the yeast requirements during anaerobic growth. The stock solution was composed of 20 g/L phytosterols in a mix of Tween 80 and absolute ethanol (1:1, v/v). Fermentations were carried out in 1.2-L bioreactors containing 1 L of must equipped with fermentation locks to maintain anaerobiosis at 24 °C. Bioreactors are placed on individual scales for fermentation kinetics monitoring. Fermentation was monitored by measuring the weight of each bioreactor every 20 min.

### *Determination of central carbon metabolite concentrations*

Ethanol, glycerol, acetate, succinate, pyruvate and alphaketoglutarate concentrations were determined by HPLC (HPLC 1290 Infinity, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) on a Phenomenex Rezex ROA column (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) at 60 °C, as described by Rollero *et al.* (2015). The column was eluted with 0.005 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at a flow rate of 0.6 mL/min. Acetate, pyruvate and alphaketoglutarate concentrations were determined with a UV meter at 210 nm. The concentrations of the other compounds were determined with a refractive index detector.

### *Quantification of assimilable nitrogen*

Ammonium concentration was determined by an enzymatic kit (Boeringer-Mannheim, Darmstadt, Germany).

Primary amino acid content in the must was determined using NOPA method, as described by Dukes & Butzke (1998).

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).

### *Assessment of cell viability*

Cell viability was assessed using a C6 flow cytometer (Accuri, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). 1 mL of sample is centrifugated (10 000 rpm, 3 min). Then, the pellet is resuspended in 1 mL of PBS 1X buffer (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.76 mM, pH 7.4). 500 µL of this suspension are used for cell viability assessment. 5 µL of propidium iodide (100 µg/mL) are added to the mix, and then vortexed. After a 10-min dark incubation at 4 °C, the sample is analyzed with the flow cytometer. 20 000 events were counted, and the device calculated the percentage of dead cells presenting a propidium iodide signal, by comparing their number to the number of total events.

### *Data treatment / Statistical analysis*

Alfis software was used to calculate produced CO<sub>2</sub> and fermentation rates.

Each sample of separate fermentation triplicate was analyzed once. ANalysis Of VAriance (ANOVA) was carried out with the software Microsoft® Excel® 2019. Single factor ANOVA was performed to evaluate the effect of the different amino acid compositions of volatile compounds production. effect of SO<sub>2</sub> on each parameter measured. Difference among mean final concentrations of metabolites was determined using Tukey's test, significant results were considered at  $p < 0.01$  (\*\*\*) or  $p < 0.05$  (\*\*).

### *Chemicals and standards*

Linalool [CAS number 78-70-6], geraniol [106-24-1], citronellol [106-22-9],  $\alpha$ -terpineol [985-55-5], nerol [106-25-2], geranyl acetate [105-87-3], nootkatone [4674-50-4], citral [5392-40-5], benzaldehyde [100-52-7], benzyl alcohol [100-51-6], 4-hydroxybenzaldehyde [123-08-0], phenylacetaldehyde [122-78-1], phenylacetic acid [103-82-2], 2-phenylethanol [60-12-8] and 2-phenethyl acetate [103-45-7] were purchased from Sigma-Aldrich. The benzaldehyde-*d*6 purchased from CDN Isotopes (Quebec, Canada) was used as internal standard. All solvents were of HPLC grade. Absolute ethanol [64-17-5] (purity  $\geq 99.9$  %) was obtained from Carlo Erba (Val de Reuil, France). Acetone [67-64-1] (purity  $\geq 99.5$  %) and dichloromethane [75-09-2] (purity  $\geq 99.9$  %) were purchased from Honeywell (Seelze, Germany).

### *Standard preparation*

A mixed standard stock solution including all the terpene and benzene derivatives was prepared in 100 % absolute ethanol at a concentration of 10 g/L. The solution was stored in dark glass tubes at -20 °C. The stability of the solution was checked regularly by GC-MS. An internal standard solution of benzaldehyde-*d*<sub>6</sub> was prepared at 30 mg/L in absolute ethanol.

### *Sample preparation*

Five mL of samples supplemented with 20 µL of internal standard were extracted using dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) with 870 µL of acetone (the disperser solvent) and 500 µL of dichloromethane (extracting solvent). The mixture was shaken by vortexing for 20 seconds. The samples were centrifuged at 2000 rpm for 20 min at 4 °C. The organic phase was transferred into a 2-mL vial before analysis (Bergler *et al.*, 2020). 2-phenylethanol and 2-phenylethyl acetate were extracted with the method described by Rollero *et al.* (2015).

### *Gas chromatography/mass spectrometry*

Analysis was performed using a GC Trace 1300 gas chromatograph (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA) equipped with a Triplus RSH (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA) and coupled to a TSQ8000 Series mass spectrometer (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA). The GC-MS parameters are described by Bergler *et al.* (2020). 2-phenylethanol and 2-phenylethyl acetate were analyzed with the method described by Rollero *et al.* (2015).

## **4. Results**

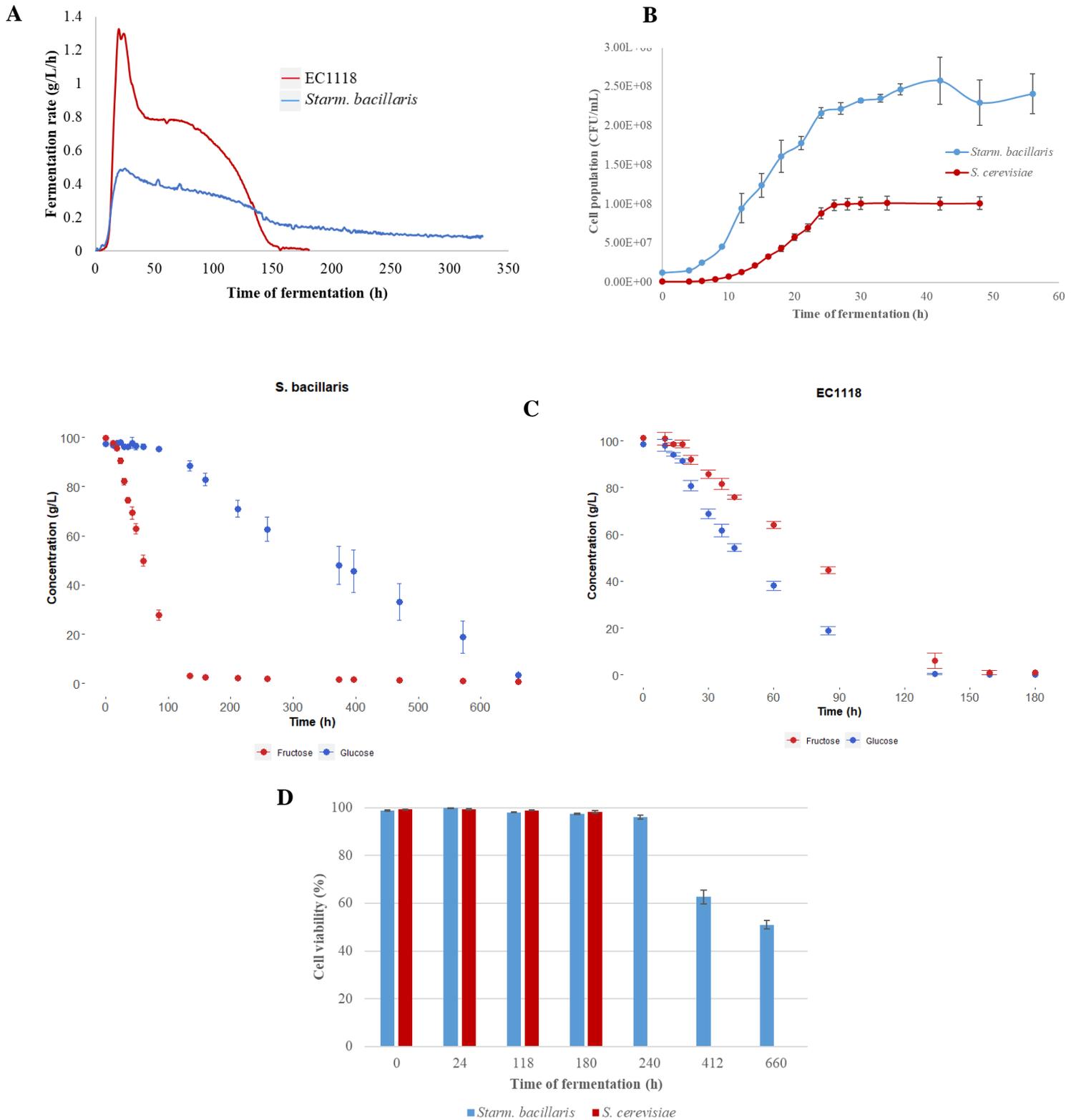
### *Metabolic characterization of *Starm. bacillaris* during fermentation on synthetic medium*

To better characterize the ability of *Starm. bacillaris* to produce benzene derivatives and terpenes, we investigated the dynamics of production of these molecules during fermentation. *Starm. bacillaris* and *S. cerevisiae* (control) fermentations were carried out on synthetic medium SM200, at 24 °C. The kinetics of fermentation, nitrogen consumption and terpenes and benzene derivatives productions were compared, as well as the final concentration of these aroma compounds. Fermentations were performed in triplicates and the absence of contamination was confirmed by plating a fermentation sample in WL agar medium.

Substantial differences can be observed in the fermentation profiles between *S. cerevisiae* and *Starm. bacillaris* (**Figure 33**). *S. cerevisiae* displayed a typical fermentation dynamics, with a rapid increase in the fermentation rate up to 1.3 g CO<sub>2</sub>/L/h during the growth phase, followed by a progressive decrease in the fermentative activity. The fermentation reached dryness in 180 h. Glucose and fructose are simultaneously consumed, even if glucose content (130 h) is depleted before fructose content (180h) (**Figure 33C**). Glucose and fructose were consumed by *S. cerevisiae* with an average rate of 0.8 g/L/h and 0.6 g/L/h, respectively. *Starm. bacillaris* displayed a maximal fermentative activity of 0.5 g CO<sub>2</sub>/L/h at the end of the growth phase. Evolution of fermentation rate displayed specific features in relation with the sugar consumption. Indeed, *Starm. bacillaris* consumed only fructose during the first 100 h of fermentation at a higher rate than *S. cerevisiae* (0.72 g/L/h). Glucose consumption began once fructose was completely consumed, with a less efficient rate (0.16 g/L/h). This resulted in a lower fermentation rate (decrease down to 0.1 g CO<sub>2</sub>/L/h) and a longer fermentation time (660 h). At the end of fermentation, only glucose remained in the medium (less than 5 g/L).

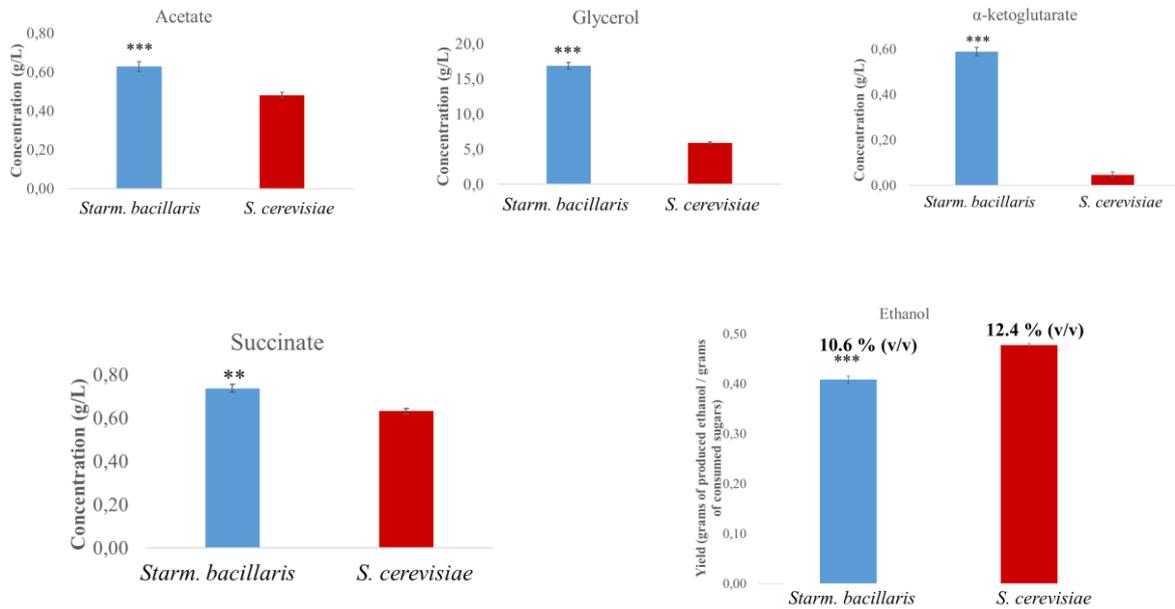
Viability of the two strains was assessed during fermentation (**Figure 33D**). *S. cerevisiae* was 98 % viable during the fermentation without decrease at the end of the fermentation. Interestingly, the viability of *Starm. bacillaris* began to decrease after 240 hours of fermentation (8.4 % ethanol (v/v)), but at the end of fermentation (more than 10.5 % ethanol (v/v)), *Starm. bacillaris* was highly viable (more than 50 % of cell viability).

Then, the central carbon metabolites were quantified for the two strains at the end of the fermentation (**Figure 34**). *Starm. bacillaris* 3800 (SB) produced more organic acids related to the CCM than EC1118, with final concentrations of acetic acid, succinic acid and  $\alpha$ -ketoglutaric of 0.63 g/L, 0.74 g/L and 0.59 g/L for SB ; 0.48 g/L, 0.63 g/L and 0.046 g/L for EC1118, respectively (**Figure 34**). SB produced 3 times more glycerol than *S. cerevisiae* (16.9 g/L and 5.9 g/L, respectively). In line with these reorientations of metabolic fluxes, the ethanol production of SB (0.41 g of ethanol per gram of sugars) was significantly lower than that measured for *S. cerevisiae* (0.48 g of ethanol per gram of sugars).



**Figure 33: Fermentation profiles of *Starm. bacillaris* 3800 and *S. cerevisiae* EC1118.**

A: Fermentation kinetics of the two strains. B: Growth curves of *S. cerevisiae* and *Starm. bacillaris*. C: Sugars consumption by the two studied strains. Fermentations were stopped when fermentation rate was below 0.05 g/L/h. D: Viability of the two strains during fermentation. For *S. cerevisiae*, fermentations ended after 180 h of fermentation.



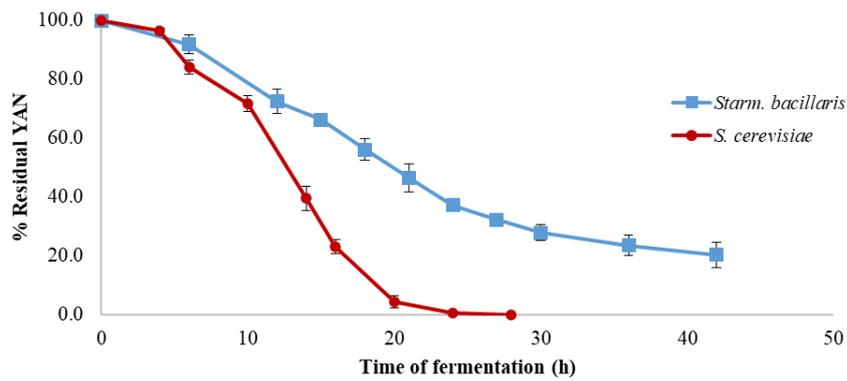
**Figure 34:** Central carbon metabolites produced by *Starm. bacillaris* (blue) and *S. cerevisiae* EC1118 (red) at the end of fermentation.

Fermentations were performed at 24 °C, using 3 replicates. ANOVA analysis were performed for each compound. \*\*\*: p-value < 0.01 ; \*\*: p-value < 0.05.

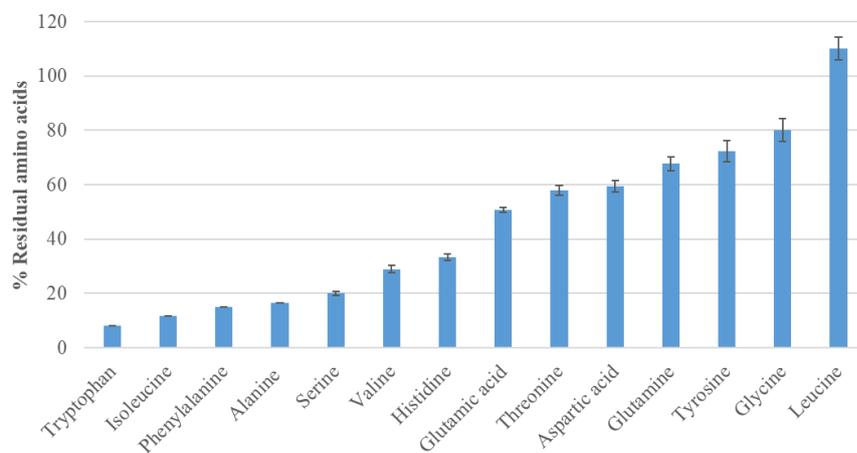
Nitrogen consumptions by *Starm. bacillaris* and *S. cerevisiae* were investigated during fermentation. While *S. cerevisiae* consumed all the available assimilable nitrogen (YAN) during the growth phase, SB consumed only 80 % of initial YAN (**Figure 35**).

Only 4 nitrogen sources were entirely consumed: Ammonium, Lys, Met and Arg, and 5 other amino acids were assimilated at more than 80 % during SB fermentation, i.e. Ile, Phe, Ala, Trp and Ser. Furthermore, SB had a particular behavior regarding leucine. After a consumption phase (40 %) during the first hours of growth, a production of leucine (from 17.5 mg/L to 31 mg/L of leucine) was observed during the last stage of growth. This behaviour was specific to leucine, and was not observed for the other amino acids, even those poorly consumed by SB (Asp, Gln or Tyr for instance) . Finally, less than 40 % of Gly, Tyr and Gln were consumed during the growth phase.

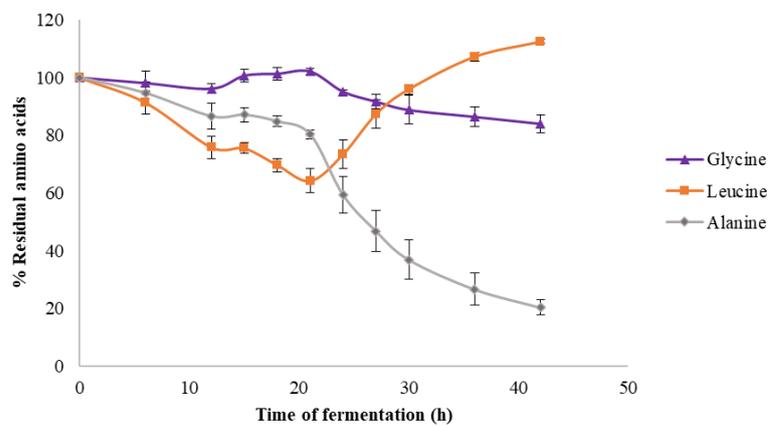
A



B



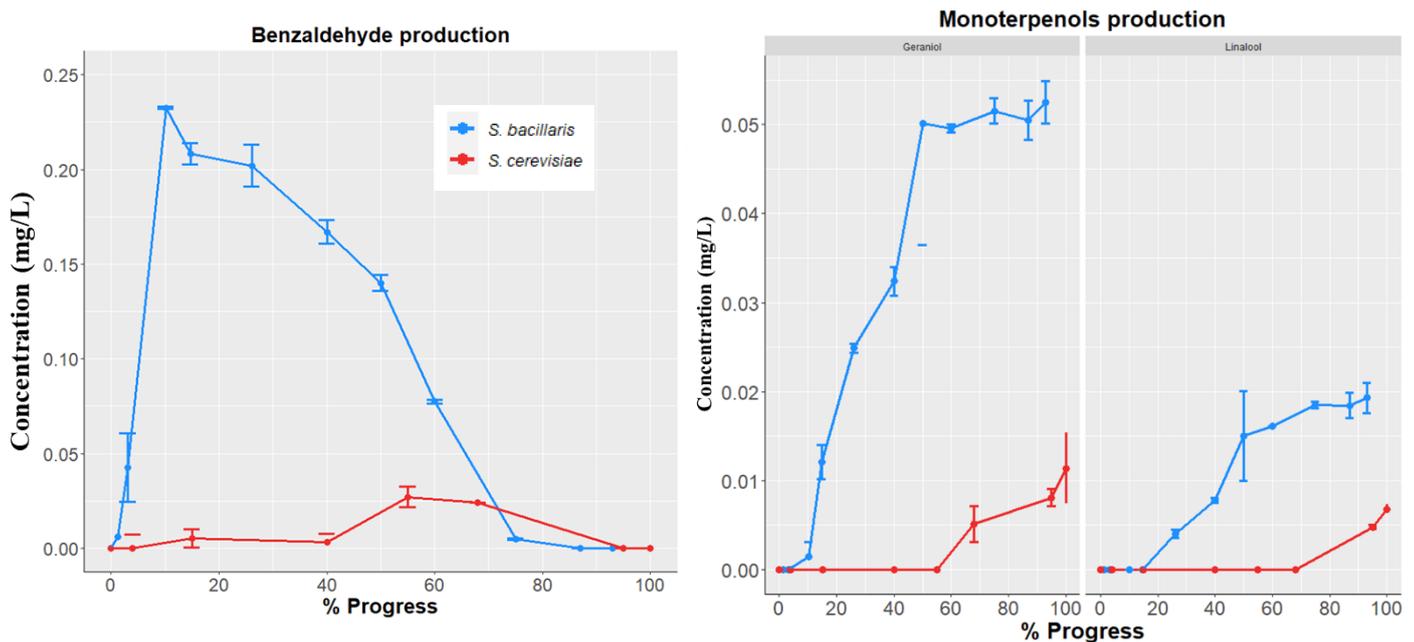
C



**Figure 35: Nitrogen consumption of *Starm. bacillaris* during fermentation**

**A:** Residual YAN during fermentation. **B:** % Residual amino acids at the end of fermentation. Ammonium, lysine, methionine and arginine were completely consumed during the fermentation. **C:** Residual leucine, glycine and alanine during fermentation with *Starm. bacillaris*. The other residual amino acids are shown in **Figure S1**.

Then, the dynamics of benzaldehyde and terpenes production by SB and *S. cerevisiae* were investigated during fermentation (**Figure 36**). The two strains displayed the same pattern of production of benzaldehyde throughout fermentation, with a production phase followed by a decrease in benzaldehyde content in the medium (**Figure 36A**). However, the formation of benzaldehyde by SB started early during fermentation and reached the maximal value when only 10% sugars were consumed. Conversely, a production of benzaldehyde by *S. cerevisiae* was observed after consumption of 40 % sugars, and the maximal production was drastically lower (26  $\mu\text{g/L}$ ) than the maximal formation by SB (226  $\mu\text{g/L}$ ).



**Figure 36:** Production of benzene derivatives (A) and monoterpenols (B) after fermentation on synthetic must with *Starm. bacillaris* (blue) and *S. cerevisiae* (red). Fermentations were performed in triplicates. Alpha-terpineol was detected for *Starm. bacillaris* only.

At the end of fermentation, for the two strains, no residual concentration of benzaldehyde was detected in the medium. Potential degradation products of this compound were sought, but the bioconversion of benzaldehyde was not related to an increase of benzyl alcohol or benzoic acid concentrations (data not shown),

Concerning the monoterpenols production, an accumulation all along fermentation was observed, for the two strains. Nonetheless, production of geraniol and linalool started earlier during fermentation for SB (after 10 % and 28 % sugar consumption, respectively) than *S. cerevisiae* (68 % fermentation progress and 88 % fermentation progress, respectively) (**Figure**

**36B**). Linalool and citronellol were produced at the same time as linalool for SB and *S. cerevisiae*. For the two strains, geraniol was the first monoterpene detected in the medium, suggesting a further conversion of this molecule to other monoterpenes. As expected, the final production of geraniol and linalool were significantly higher for SB (51 µg/L and 19 µg/L, respectively) compared with *S. cerevisiae* (11 µg/L and 9.5 µg/L, respectively). SB also produces α-terpineol (4.5 µg/L), which is undetected after fermentation with *S. cerevisiae*. On the other hand, *S. cerevisiae* produces significantly more citronellol than SB (5.8 µg/L and 3.8 µg/L, respectively) (**Table 27**).

**Tableau 27: Monoterpenes concentration at the end of fermentation**

Compounds (µg/L)	<i>S. bacillaris</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Geraniol	51 ± 2.3***	11 ± 0.4
Linalool	19 ± 1.7***	9.5 ± 0.5
Citronellol	3.8 ± 0.1***	5.8 ± 0.3
α-terpineol	4.5 ± 0.3	n.d.

Fermentations were performed at 24 °C, using 3 replicates. ANOVA analysis were performed for each compound. \*\*\*: p-value < 0.01 ; \*\*: p-value < 0.05.

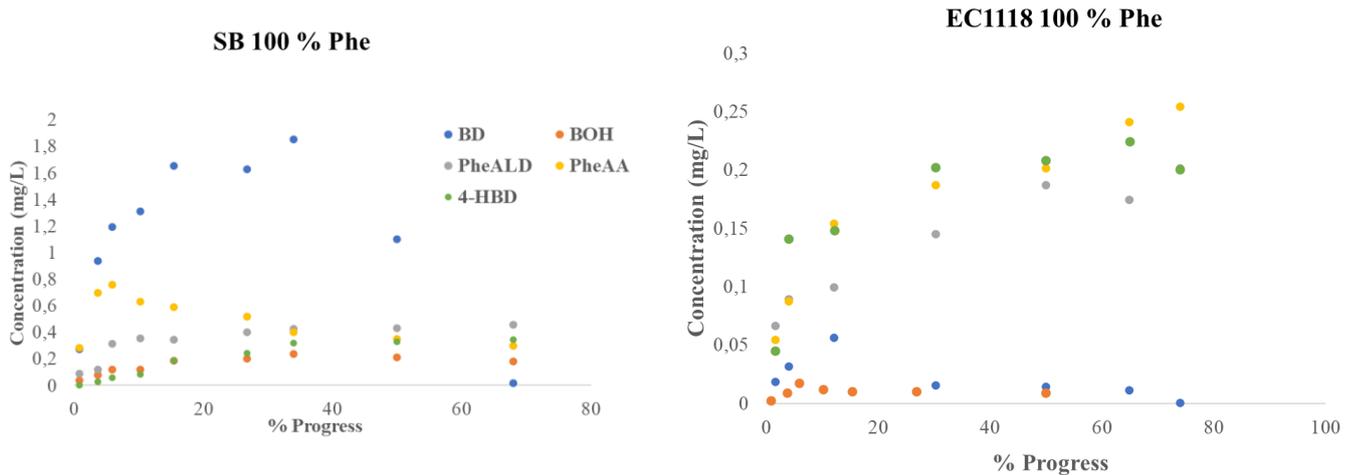
#### *Impact of the absence/presence of aromatic amino acids on the production of benzene derivatives by *Starm. bacillaris**

To further analyze the metabolic origin of benzene derivatives, we investigated the impact of aromatic amino acids (Phe and Trp) on the production of these compounds using two types of synthetic media either containing Phe and Trp as sole nitrogen source or without Phe or Trp. YAN was adjusted to 200 mg/L for all the conditions. Seven molecules potentially involved in the pathway responsible for benzaldehyde production were quantified (**Figure 40**): benzaldehyde (BD), benzyl alcohol (BOH), phenylacetaldehyde (PheALD), 4-hydroxy benzaldehyde (4-HBD), phenylacetic acid (PheAA), 2-phenylethanol (PheOH) and 2-phenylethyl acetate (PheAc). 4-HBD is equivalent to BOH *via* tyrosine degradation through the mandelate pathway.

Regardless the nitrogen source composition, *S. cerevisiae* consumed all the available YAN, and completed fermentation to dryness. *Starm. bacillaris* consumed between 71 % (medium without Phe) and 76 % (Phe medium) of YAN. At the end of fermentation, between 52 and 62 g/L of

residual glucose was measured in the medium. No significant impact of the composition of the nitrogen source on CCM metabolites production was found (**Table S3**).

The dynamics of production of the benzene derivatives during fermentation using medium 100 % Phe were presented in **Figure 37**. Similar patterns were found for the other medium (**Figure S2**). The concentrations at the end of the fermentation are presented in the **Table 28**.



**Figure 37: Production kinetics of the studied benzene derivatives during fermentation in a medium with Phe as sole nitrogen source.**

BD: benzaldehyde ; BOH: Benzyl alcohol ; PheALD: Phenylacetaldehyde ; PheAA: Phenylacetic acid ; 4-HBD: 4-hydroxybenzaldehyde. YAN was adjusted to 200 mg/L with only Phe as sole nitrogen source.

Benzaldehyde was the compound produced at the highest concentration by *Starm. bacillaris*, but this accumulation was transient. The maximal production (1.85 mg/L) was observed after consumption of 34 % sugars. Then, the further conversion of this molecule resulted in a very low concentration of benzaldehyde at the end of the fermentation (16 µg/L). The intermediates of the Ehrlich-mandelate pathway (Figure 40) were also detected in the medium. PheALD was produced mostly during the first stage of fermentation (0.4 mg/L after consumption of 10 % of the sugars) and remained almost constant thereafter. PheAA displayed a maximum production very early in the fermentation process (0.8 mg/L after consumption of 5 % of the sugars); then, the PheAA concentration decreased simultaneously to the high increase in benzaldehyde concentration and the final content of PheAA during *Starm. bacillaris* 3800 fermentation was 0.35 mg/L. BOH was produced concomitantly to benzaldehyde, but at lower concentration

(0.24 mg/L after consumption of 34 % sugars). Furthermore, after this production phase, BOH concentration did not significantly vary until the end of fermentation, indicating that the decrease in BD concentration during the second part of the fermentation cannot be explained by a conversion of BD in BOH.

Tyrosine is an amino acid that can be degraded through the Ehrlich/mandelate pathway, similarly to Phe, leading to the production of 4-HBD. Interestingly, although we could have expected the same dynamics as BD, the production of 4-HBD was continuous throughout the fermentation (0.4 mg/L at the end of fermentation for SB), without any decrease during the second part of the fermentation.

The pattern of production of intermediates of the Ehrlich-mandelate pathway by *S. cerevisiae* was very different in comparison with *Starm. bacillaris*. First, a substantial accumulation of intermediates of Phe degradation through the Ehrlich pathway was observed throughout the fermentation, with final concentrations of 187 µg/L and 45 µg/L for PheALD and PheAA, respectively (**Figure 37**, **Table 28**). Conversely, the formation of the derivatives of the mandelate route, BD and BOH were significantly lower (56 µg/L and 17 µg/L in 100 % Phe medium, respectively) compared to *Starm. bacillaris* productions. It is possible that enzymes involved in the mandelate pathway are absent, or less efficient in *S. cerevisiae*.

Finally, it is noteworthy that regardless of the strains and the conditions, the main products of the degradation were 2-phenylethanol and 2-phenylethyl acetate, with higher concentrations for *S. cerevisiae*. For SB, the production of these two compounds were 1.1 g/L and 0.93 mg/L (only Phe in the medium), respectively. On the other hand, for *S. cerevisiae*, the productions were 1,5 mg/L and 112 mg/L.

Then, we compared the potential effects of the media and the strains on the production of benzene derivatives at their maximal production (**Figure 38**), i.e. at the end of fermentation for PheALD and 4-HBD and after consumption of 40 % and 15 % sugars for BD and BOH production and after 5 % and 100 % of sugar consumption for PheAA production by *Starm. bacillaris* and *S. cerevisiae*, respectively.

Phe has a significant effect ( $p < 0.01$ ) on the production of all the intermediates of the Ehrlich/mandelate pathway by SB. This strain produced 18.5 times more benzaldehyde and 60 times more benzyl alcohol in the medium with only Phe than without Phe. Regarding the intermediates of the Ehrlich part of the pathway, large increase in the formation of PheALD and PheAA were observed (30 times higher, and 80 times higher, respectively) as a consequence of

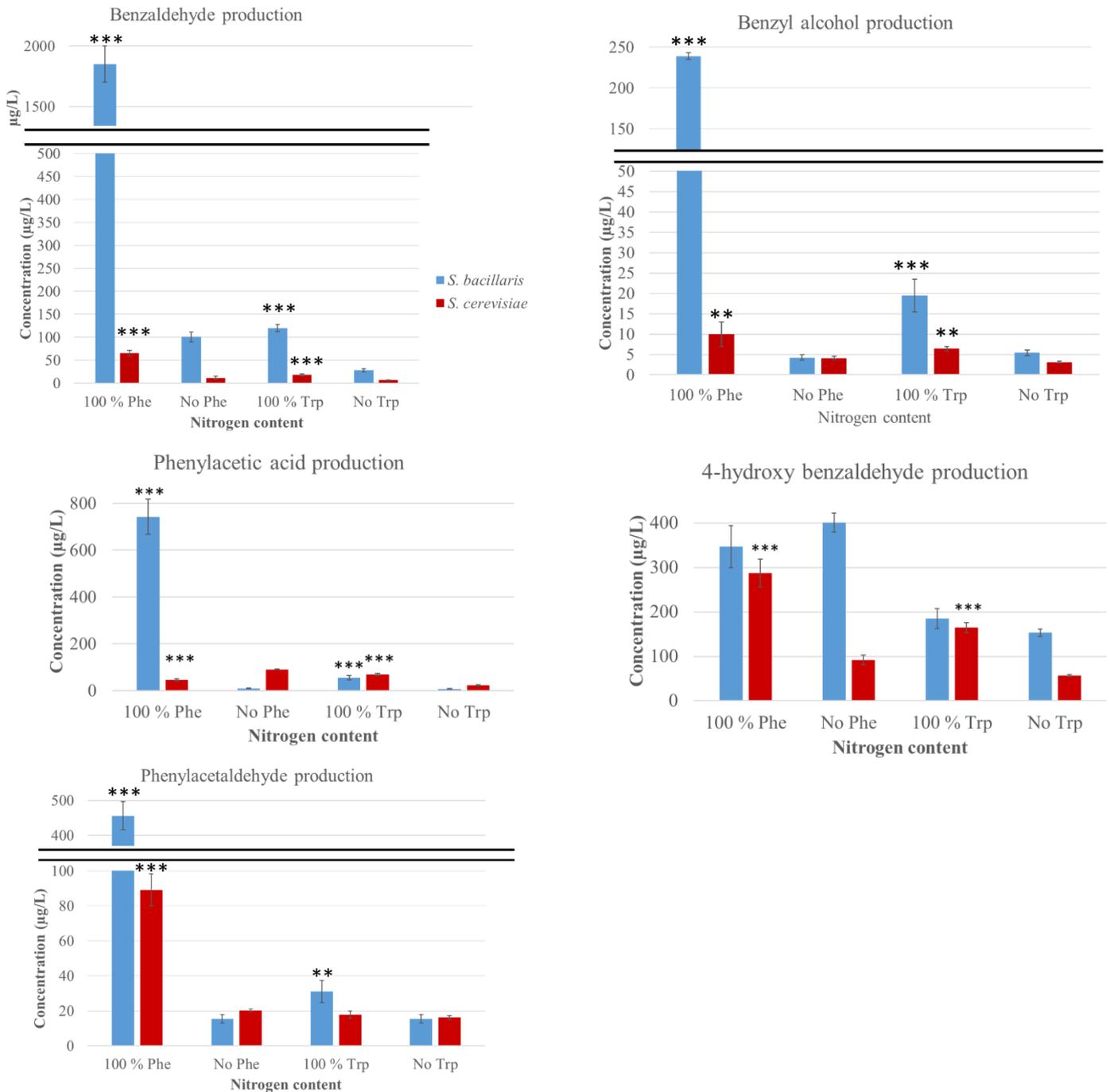
the use of Phe as sole nitrogen source. The effect of Trp is similar to Phe, even if the increase is less important (4 times higher for benzaldehyde and 3 times higher for benzyl alcohol in the medium with only Trp). Phe and Trp had no impact on the production of 4-HBD by SB.

For *S. cerevisiae*, the pattern was generally the same, even if the concentration levels of benzyl alcohol (10 µg/L with 100 % Phe and 4.6 µg/L without Phe) and benzaldehyde (56 µg/L with 100 % Phe and 11.3 µg/L without Phe) were much lower than those observed with SB (1.85 mg/L with 100 % Phe and 101 µg/L without Phe, regarding benzaldehyde production). There were some exceptions to this general pattern. *S. cerevisiae* produced two times more PheAA in absence of Phe (90 µg/L) than in presence of Phe excess (45.3 µg/L). Furthermore, the production of 4-HBD was significantly increased when Phe and Trp were used as sole nitrogen sources there is only Phe (537.9 µg/L compared to 264 µg/L without Phe) or Trp in the medium (185 µg/L compared to 125 µg/L without Trp).

**Tableau 28: Benzene derivative concentrations at the end of fermentation (µg/L).**

Media	Compounds	<i>Starm. bacillaris</i>	<i>S. cerevisiae</i>
100 % Phe	BD (µg/L)	17.3 ± 0.4	N.D.
	BOH (µg/L)	199.4 ± 0.4	N.D.
	PheALD (µg/L)	456.2 ± 40.1	189.1 ± 9.1
	PheAA (µg/L)	342.1 ± 75	45.3 ± 4.7
	4-HBD (µg/L)	537.9 ± 47	187.4 ± 31.2
	PheOH (mg/L)	1105 ± 164	1506 ± 139
	PheAc (mg/L)	0.93 ± 0.08	112.3 ± 5.4
No Phe	BD (µg/L)	9.1 ± 1.4	N.D.
	BOH (µg/L)	3.5 ± 0.2	N.D.
	PheALD (µg/L)	15.3 ± 2.4	13.1 ± 0.7
	PheAA (µg/L)	9.2 ± 1.4	90 ± 1.1
	4-HBD (µg/L)	264 ± 17	12.6 ± 0.4
	PheOH (mg/L)	94 ± 8.1	122.6 ± 6.7
	PheAc (mg/L)	0.43 ± 0.08	8.4 ± 0.5
100 % Trp	BD (µg/L)	16.4 ± 1.8	N.D.
	BOH (µg/L)	5.4 ± 0.4	N.D.
	PheALD (µg/L)	31.1 ± 6.4	15.9 ± 0.8
	PheAA (µg/L)	54.3 ± 9.4	68.1 ± 4.1
	4-HBD (µg/L)	185 ± 22	165 ± 11.1
	PheOH (mg/L)	63 ± 2.4	187 ± 14
	PheAc (mg/L)	0.33 ± 0.02	3.8 ± 139
No Trp	BD (µg/L)	7 ± 0.2	N.D.
	BOH (µg/L)	3.1 ± 0.4	N.D.
	PheALD (µg/L)	15.5 ± 2.4	16.1 ± 1.1
	PheAA (µg/L)	6.6 ± 0.9	22 ± 2.1
	4-HBD (µg/L)	125.1 ± 8.1	57.1 ± 2.4
	PheOH (mg/L)	52.3 ± 3.6	36.7 ± 2.1
	PheAc (mg/L)	0.13 ± 0.02	1.1 ± 0.06

BD: Benzaldehyde ; BOH: Benzyl alcohol ; PheALD: Phenylacetaldehyde ; PheAA: Phenylacetic acid ; 4-HBD: 4-hydroxybenzaldehyde ; PheOH: 2-phenylethanol ; PheAc: 2-phenylethylacetate.



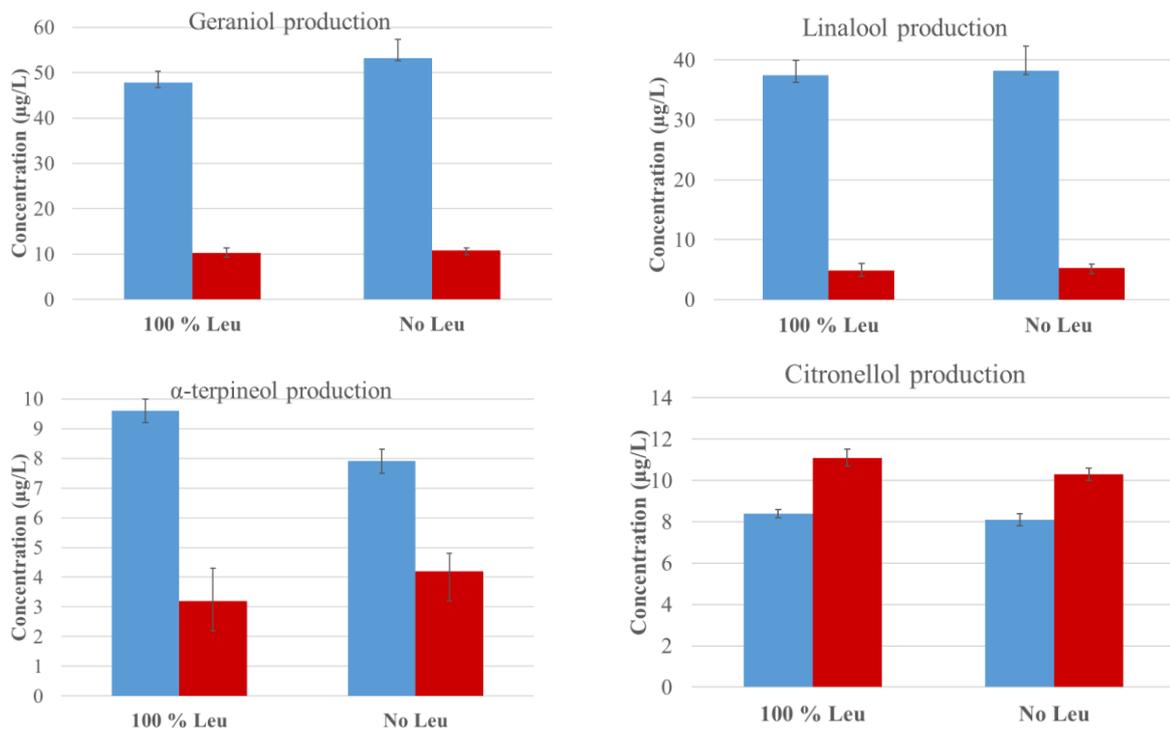
**Figure 38:** Maximal production of benzene derivatives by *Starm. bacillaris* (blue) and *S. cerevisiae* (red) after fermentation in different media.

Fermentations were carried out in media containing 200 mg/L YAN, only with Phe or Trp, or without them. For *SB*: maximal productions of BOH and BD were reached after 10 % progress ; 5 % progress for PheAA ; end of fermentation for PheALD and 4-BDOH. For *S. cerevisiae*: maximal productions of BOH and BD were reached after 15 % progress ; end of fermentation for PheALD, PheAA and 4-BDOH. ANOVAs were performed between the media with or without the amino acid (Phe or Trp). \*\*\*: p-value < 0.01 ; \*\*: p-value < 0.05.

*Impact of leucine on the production of terpenes by Starm. bacillaris*

Finally, the metabolic origin of terpenes in SB and *S. cerevisiae* was addressed by assessing the impact of Leu on the production of these molecules. Two media, containing Leu as sole nitrogen source or without Leu but with a mixture of ammonium and amino acids, were compared (**Figure 39**).

For both strains, presence of leucine had no impact on the production of monoterpenols. However, differences between strains in the profile of monoterpenols production were noteworthy. The major terpene produced by *S. cerevisiae* was citronellol (11.1 µg/L), followed by geraniol and linalool. The formation of these latter two compounds by this strain was below 10 µg/L. Conversely, SB synthesized high amounts of linalool (38 µg/L) and geraniol (48 µg/L), but lower amount of citronellol than *S. cerevisiae* (8.1 µg/L). SB also produced more α-terpineol (9 µg/L) than *S. cerevisiae* (4µg/L). The total amount of monoterpenols was higher for *Starm. bacillaris* (more than 100 µg/L) than *S. cerevisiae* (less than 30 µg/L) at the end of fermentation.



**Figure 39:** Terpenes production by *Starm. bacillaris* (blue) and *S. cerevisiae* (red) at the end of fermentation.

Fermentations were performed in triplicates on one SM containing only Leu as YAN source, and one containing every amino acid but Leu. ANOVA were performed between the two strains. \*\*\*: p-value < 0.01 ; \*\*: p-value < 0.05. There was no detection of α-citral and β-citral.

## 5. Discussion

*Starmerella bacillaris* is a frequently isolated yeast species in the microbial communities of the wine environment. This strain is of technological interest due to its metabolic specificities, different from those of *S. cerevisiae*.

### *Metabolic specificities of Starm. bacillaris*

*Starm. bacillaris* has been described as genetically distant from *S. cerevisiae* and belonging to the *Wickerhamiella* / *Starmerella* clade (Gonçalves *et al.*, 2020; Masneuf-Pomarede *et al.*, 2016). The yeasts of this clade have the distinctive feature of being fructophilic, due to the presence of the *FFZI* gene (Gonçalves *et al.*, 2016). This particularity explains the different consumption profiles of sugars observed in this study between SB and *S. cerevisiae*. Contrary to *S. cerevisiae*, able to simultaneously consume glucose and fructose with a slight preference for glucose, SB consumed exclusively fructose during the first part of the fermentation. A slow consumption of glucose took place only when fructose was completely depleted, resulting in a decrease in the fermentation rate. The fructophilic character of *Starm. bacillaris* has been previously reported for the FC54<sup>®</sup> and MUT5705 strains (Englezos *et al.*, 2018). In this study, MUT5705 strain consumed almost the entirety of fructose (112 g/L consumed, only 3.4 g/L of residual fructose), but only 7 g/L of glucose (115 g/L initial glucose content). On the other hand, FC54 consumed 103 g/L of fructose and only 7 g/L of glucose. The important delayed consumption of glucose observed in our study has never been reported before.

Another genetic characteristic of this species is the loss of the orthologous genes *ADHI* and *PDC1* during evolution. This species recovered fermentative abilities with the acquisition of homologous *ADHI* and *PDC1* genes of bacterial origin by horizontal transfer (Gonçalves *et al.*, 2018). These differences can explain the different production profiles of Central Carbon Metabolites (CCM) between SB and *S. cerevisiae* observed in this study, in agreement with previous work (Englezos *et al.*, 2018). In SB, due to the presence of a less efficient Pdc1p-like and Adh1p-like proteins, the flux from pyruvate toward acetaldehyde and then ethanol was decreased (ethanol yield was 0.41 g/g for SB, 0.48 g/g for *S. cerevisiae*). This resulted in a reorientation of the fluxes to the production of other metabolites: an overflow of acetaldehyde to acetate production combined with, upstream of the pyruvate node, an increased formation of glycerol to maintain the redox balance and, downstream of the pyruvate node, an increase in the production of TCA organic acids. Similar behaviours have been previously observed, apart from the very low acetate production by the FC54<sup>®</sup> strain (Englezos *et al.*, 2018). These

differences could be related to the important genetic diversity within this species, with likely divergence in the coding sequences of the genes involved in acetate production (*PDC1*, *PDC5*, *PDC6*, *ALD4*, *ALD5* and *ALD6*). A comparative analysis of the genomic sequences would allow to confirm this assumption.

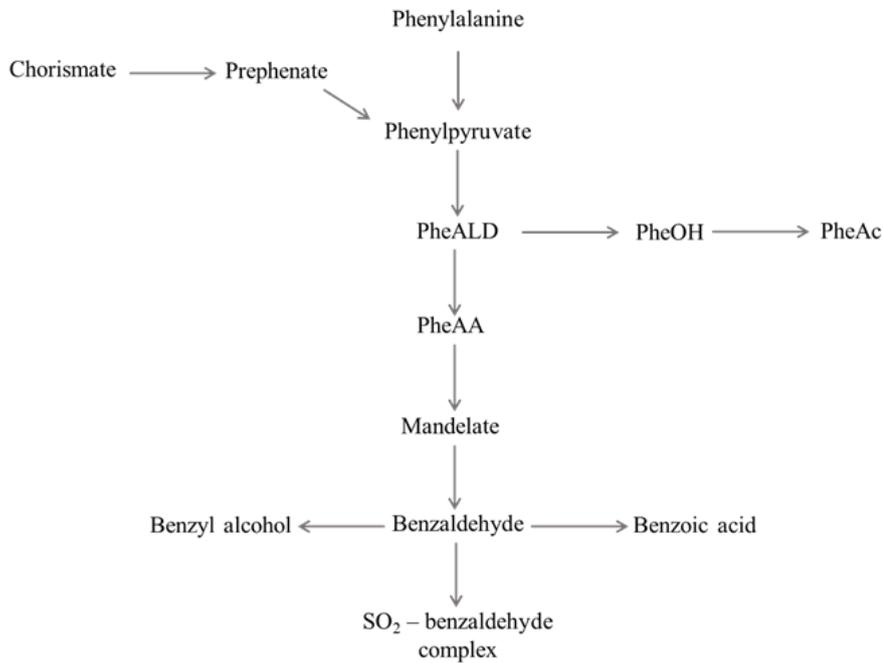
#### *Metabolic pathway leading to benzene derivative production by *Starm. bacillaris**

Regarding the production of volatile compounds, the ability of *Starm. bacillaris* strain to produce benzene derivatives has been reported, with benzaldehyde concentrations of 86 µg/L and 61 µg/L measured at the end of the fermentation in synthetic media without varietal precursors (Bergler *et al.*, 2020; Delfini *et al.*, 1991). These studies showed that benzaldehyde in wine can be synthesized by yeast metabolism, in addition to its varietal origin (Ferreira & Lopez, 2019).

Surprisingly, while PheAA and PheALD concentrations increased throughout the fermentation process, benzaldehyde and benzyl alcohol transiently accumulated in the medium, with a progressive decrease of their concentration after 20 % sugars consumption. Such a profile of transient accumulation during fermentation has been reported for acetaldehyde, explained by a complexation of acetaldehyde with the high chemical active molecule SO<sub>2</sub> (Ochando *et al.*, 2020). A similar mechanism of complexation of benzaldehyde with SO<sub>2</sub> could be envisaged to explain the decrease in benzaldehyde content. Another possibility to be considered was the chemical or biological conversion of benzaldehyde. Nonetheless, the decrease in benzaldehyde content did not involve an increase in the two major compounds, from the oxidation (benzoic acid) or the reduction (benzyl alcohol) of benzaldehyde. The conversion products of benzaldehyde have to be identified and further studied.

The copy number variations of genes of the Ehrlich-mandelate pathway between *Starm. bacillaris* and *S. cerevisiae* as well as comparative analysis of the genomic sequences have to be further investigated to elucidate the molecular basis of *Starm. bacillaris* to produce benzene derivatives.

However, it is important to keep in mind that the production of benzene derivatives remained minor in comparison with the massive conversion of Phe into 2-phenylethanol and 2-phenylethyl acetate through the Ehrlich pathway.

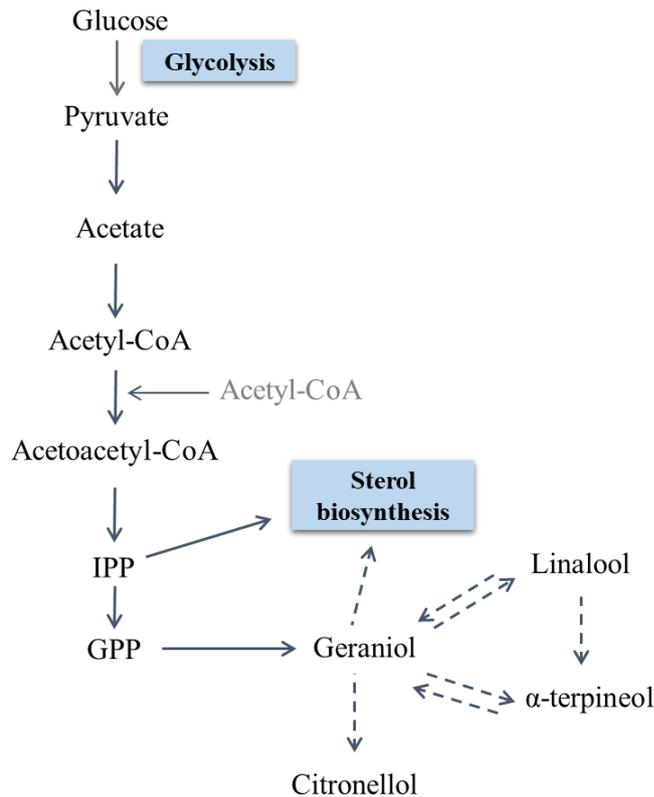


**Figure 40:** Proposed pathway for the formation of benzene derivatives by *Starm. bacillaris*. Benzaldehyde is produced through the mandelate pathway by *S. cerevisiae*. The different intermediates are: PheALD (phenylacetaldehyde), PheAA (phenylacetic acid), and mandelate. Benzyl alcohol and benzoic acid could be the conversion products of benzaldehyde. PheOH: 2-phenylethanol ; PheAc: 2-phenylethyl acetate.

#### *Metabolic pathway leading to terpene production by Starm. bacillaris*

The other volatile compounds overproduced by SB are the terpenes. IPP and DMAPP have been identified as precursors for the biosynthesis of this family of compounds (Pérez-Gil *et al.*, 2017). Two metabolic origins have been proposed for these intermediates, *i.e.* sterol and acetyl-CoA metabolism (Lynen, 1964) and leucine catabolism (Carrau *et al.*, 2005). The absence of effect of Leu on the production of terpenes enabled to rule out the formation of terpenes from leucine. Furthermore, the higher production of acetate and terpenes by SB compared to *S. cerevisiae* was in agreement with the production of monoterpenols from acetyl-CoA (**Figure 41**).

It has been demonstrated that the balance between the different isomers of monoterpenol in wine is governed by both chemical and enzymatic reactions. As an example, the chemical conversion of geraniol to nerol (22 % after a 5-day incubation at 25 °C) has been reported (Pedersen *et al.*, 2003). In parallel, the important contribution of yeast metabolism, depending on the strain) in the bioconversion of geraniol has been highlighted (King & Dickinson, 2000). Geraniol can be reduced in citronellol, involving the *OYE2* gene in *S. cerevisiae* (Steyer *et al.*, 2013). The presence of this gene can explain the higher production by *S. cerevisiae*, with or without Leu in the medium. Besides, geraniol can be isomerized to linalool, further converted to  $\alpha$ -terpineol, but the involvement of specific enzymes was not unravelled. The analysis of the dynamic of monoterpenols formation during SB and *S. cerevisiae* fermentation revealed that geraniol is the first monoterpenol produced by both strains. Geraniol was further converted to linalool, citronellol and  $\alpha$ -terpineol by SB and to citronellol and linalool by *S. cerevisiae*. This production sequence showed the central role of geraniol in the yeast synthesis of monoterpenols. On the other hand, contrary to King & Dickinson (2000), no nerol production was detected throughout fermentation. The differences in the monoterpenols equilibrium are obtained are strain-dependent, and confirm the important contribution of the yeasts in the conversion of monoterpenols, compared to the chemical conversion.



**Figure 41:** Proposed pathway for the formation of monoterpenols by *Starm. bacillaris* from acetyl-CoA. The dashed line are hypothetical. Monoterpenols production is related to acetyl-CoA and sterols metabolism.

To conclude, this work expands our knowledge on the metabolic specificities of *Starm. bacillaris*, a species already identified as interesting for oenological use. The generated data allowed us to establish the link between phenotypic and genotypic specificities. In particular, *Starm. bacillaris* displayed a higher ability to produce terpenes, that can bring floral notes to the wines, and benzene derivatives, conferring almond notes and participating to the aromatic complexity of the wines. The present work provides a better understanding of the metabolism of these compounds (by the study of the production dynamics), and enables to define strategies in order to modulate their production. The mechanisms related to benzaldehyde decrease throughout fermentation are still to be elucidated.

## Supplementary data

**Table S1: Amino acid composition of every medium used in the study.** For each condition, there is a total YAN of 200 mgN/L. Ammonium is added with NH<sub>4</sub>Cl.

Amino acids	Molar mass (g/mol)	number of assimilable N atoms	SM 200		No Leu		100 % Leu	
			Concentration (mg/L)	Assimilable nitrogen (mg N/L)	Concentration (mg/L)	Assimilable nitrogen (mg N/L)	Concentration (mg/L)	Assimilable nitrogen (mg N/L)
Ala	89.09	1	68.38	10.74	71.90	11.30	/	/
Arg	174.2	3	176.18	42.48	185.26	44.67	/	/
Asp	133.1	1	20.94	2.20	22.02	2.32	/	/
Gln	146.14	2	237.78	45.56	250.03	47.91	/	/
Glu	147.13	1	56.67	5.39	59.59	5.67	/	/
Gly	75.07	1	8.62	1.61	9.07	1.69	/	/
His	155.15	1	15.40	1.39	16.19	1.46	/	/
Ile	131.17	1	15.40	1.64	16.19	1.73	/	/
L-Cys	121.16	1	6.16	0.71	6.48	0.75	/	/
Leu	131.17	1	22.79	2.43	/	/	1,873	200.00
Lys	146.19	2	8.01	1.53	8.42	1.61	/	/
Met	149.21	1	14.78	1.39	15.55	1.46	/	/
Phe	165.19	1	17.86	1.51	18.78	1.59	/	/
Pro	115.13	0	288.29	0.00	288.29	0.00	/	/
Ser	105.09	1	36.96	4.92	38.87	5.18	/	/
Thr	119.12	1	35.73	4.20	37.57	4.42	/	/
Trp	204.23	1	84.39	5.79	88.74	6.08	/	/
Tyr	181.19	1	8.62	0.67	9.07	0.70	/	/
Val	117.15	1	20.94	2.50	22.02	2.63	/	/

Amino acids	No Phe		100 % Phe		No Trp		100 % Trp	
	Concentration (mg/L)	Assimilable nitrogen (mg N/L)						
Ala	71.27	11.20	/	/	74.19	11.66	/	/
Arg	183.64	44.28	/	/	191.16	46.09	/	/
Asp	21.83	2.30	/	/	22.73	2.39	/	/
Gln	247.85	47.49	/	/	258.00	49.43	/	/
Glu	59.07	5.62	/	/	61.49	5.85	/	/
Gly	8.99	1.68	/	/	9.36	1.75	/	/
His	16.05	1.45	/	/	16.71	1.51	/	/
Ile	16.05	1.71	/	/	16.71	1.78	/	/
L-Cys	6.42	0.74	/	/	6.68	0.77	/	/
Leu	23.76	2.54	/	/	24.73	2.64	/	/
Lys	8.35	1.60	/	/	8.69	1.66	/	/
Met	15.41	1.45	/	/	16.04	1.51	/	/
Phe	/	/	2,359	200.00	19.38	1.64	/	/
Pro	288.29	0.00	/	/	288.29	0.00	/	/
Ser	38.53	5.13	/	/	40.10	5.34	/	/
Thr	37.24	4.38	/	/	38.77	4.56	/	/
Trp	87.97	6.03	/	/	/	/	2,918	200.00
Tyr	8.99	0.69	/	/	9.36	0.72	/	/
Val	21.83	2.61	/	/	22.73	2.72	/	/

**Table S2:** Consumption of nitrogen by *Starm. bacillaris* during the first 42 hours of fermentation. The results are expressed in % of initially present nitrogen source (amino acid or ammonium)

	0	6	12	15	18	21	24	27	30	36	42
<b>Ammonium</b>	100	88.1	54.6	36.4	18.0	1.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<b>Lysine</b>	100	90.1	43.1	27.1	15.8	6.6	4.0	3.6	2.0	1.2	0.7
<b>Méthionine</b>	100	91.1	67.7	60.5	50.7	41.3	24.8	15.7	10.6	6.1	2.8
<b>Arginine</b>	100	92.9	81.1	78.6	70.8	63.5	42.6	29.3	19.3	9.3	3.0
<b>Isoleucine</b>	100	91.7	74.8	71.7	62.8	55.7	40.3	32.1	25.6	18.3	13.9
<b>Phénylalanine</b>	100	91.7	78.4	78.2	73.0	64.3	50.1	36.8	30.6	23.2	16.2
<b>Alanine</b>	100	94.6	86.6	87.1	84.9	80.4	59.4	46.8	36.9	26.6	20.3
<b>Tryptophane</b>	100	89.4	69.7	78.8	69.5	59.6	46.9	43.6	35.5	27.3	20.8
<b>Sérine</b>	100	95.8	86.1	84.9	80.9	75.6	61.3	51.2	43.8	35.3	29.5
<b>Valine</b>	100	94.0	82.3	83.3	79.4	75.0	59.6	51.3	44.6	38.2	34.2
<b>Histidine</b>	100	98.0	98.3	105.4	103.6	109.2	91.7	87.5	71.8	62.7	52.2
<b>Glutamique</b>	100	98.0	94.3	93.9	93.1	90.2	82.3	76.4	71.5	64.7	59.4
<b>Thréonine</b>	100	96.8	91.2	93.3	92.3	90.0	81.3	76.1	70.9	65.4	60.5
<b>Aspartique</b>	100	98.4	95.1	97.7	96.8	94.8	87.4	83.3	78.4	73.5	69.4
<b>Glutamine</b>	100	96.9	91.7	101.3	99.8	99.5	89.6	85.8	80.2	76.5	71.4
<b>Tyrosine</b>	100	97.2	94.7	99.1	98.3	97.7	89.1	85.3	81.8	77.2	74.9
<b>Glycine</b>	100	98.1	96.2	100.7	101.3	102.1	95.2	91.8	88.9	86.5	84.1
<b>Leucine</b>	100	91.3	75.8	75.5	69.7	64.2	73.4	87.4	96.0	107.3	112.6

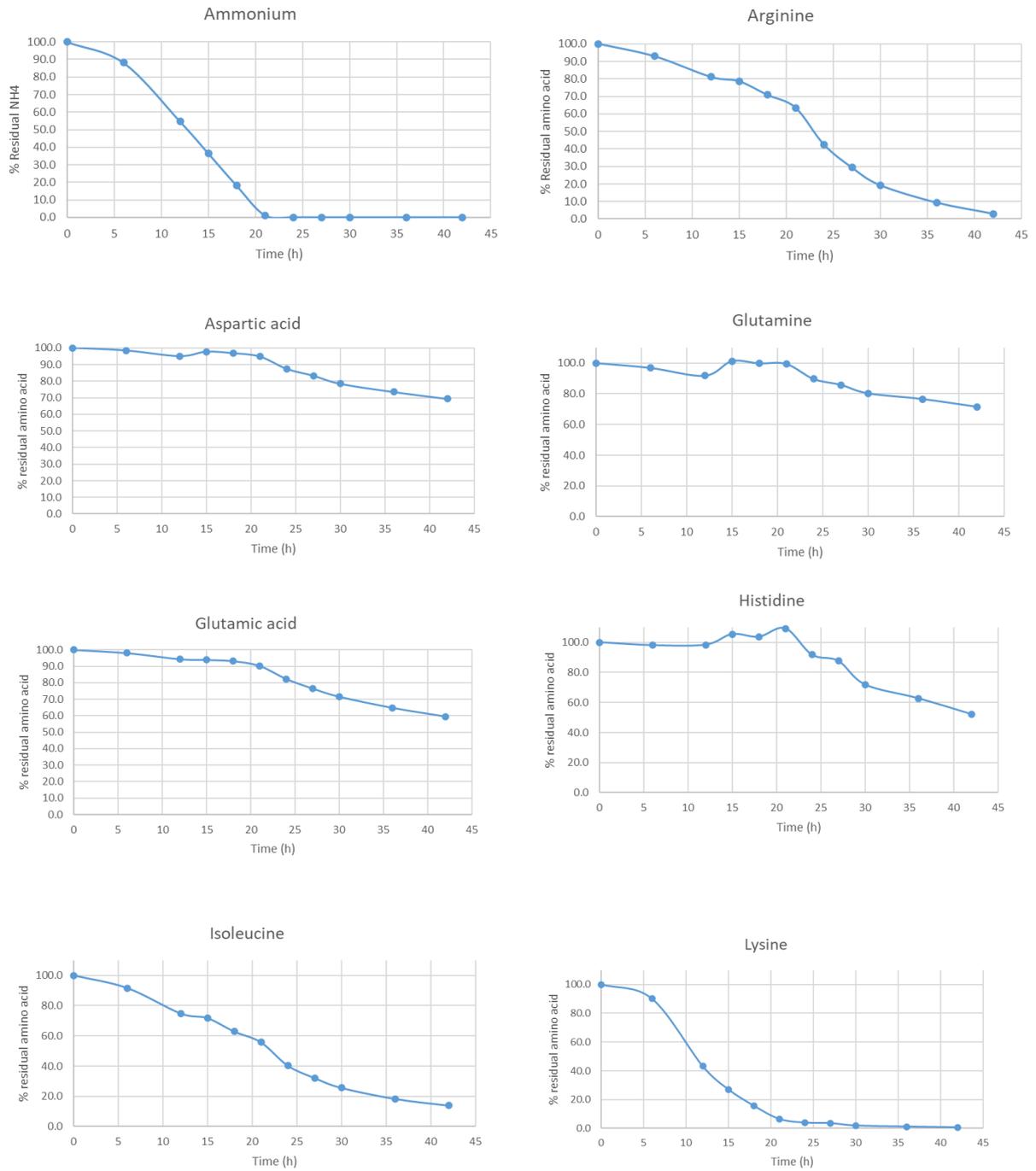
**Table S3: Summary of central carbon metabolites produced after fermentation of different media by *Starm. bacillaris* and *S. cerevisiae*.**

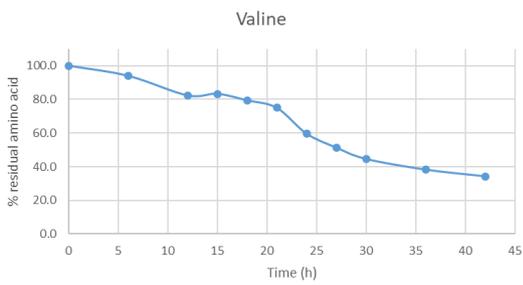
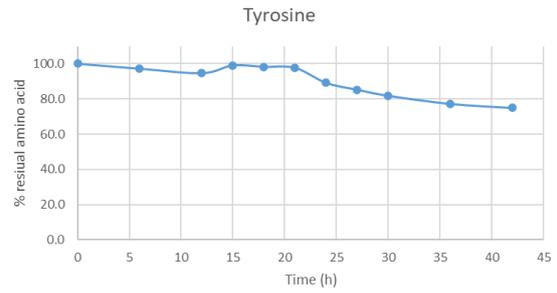
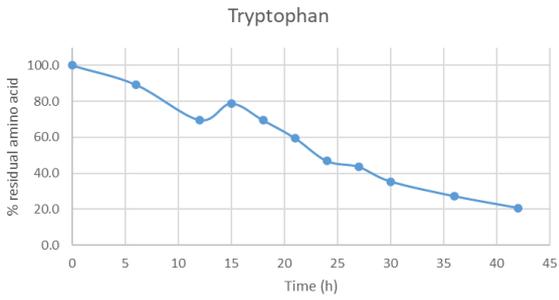
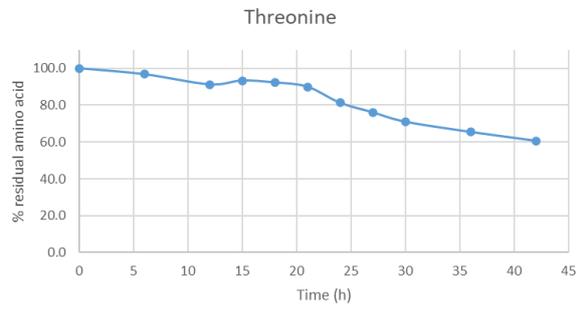
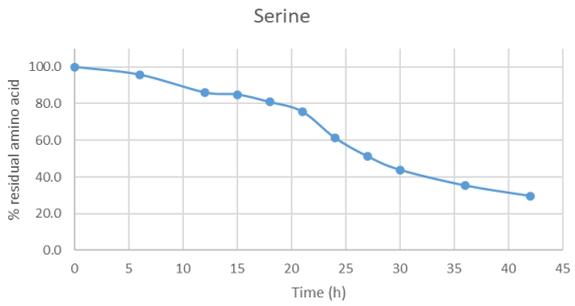
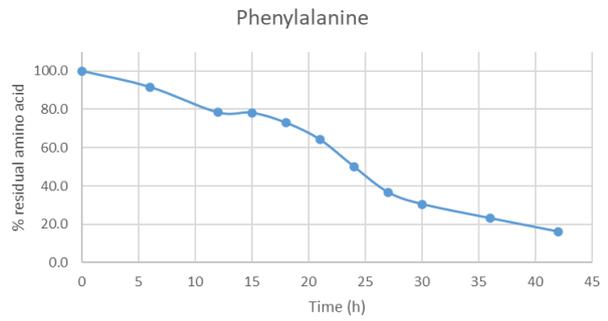
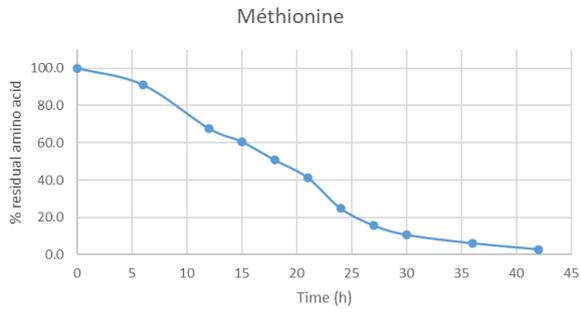
Fermentations were performed in triplicates.

Compounds	<i>Starm. bacillaris</i>					
	100 % Phe	No Phe	100 % Trp	No Trp	100 % Leu	No Leu
Glucose	55.81 ± 3.31	54.24 ± 3.53	57.83 ± 2.54	54.42 ± 2.23	58.81 ± 4.11	61.43 ± 2.53
Fructose	/	/	/	/	/	/
Ethanol	60.12 ± 1.43	61.14 ± 2.12	59.3 ± 1.71	60.31 ± 0.88	57.83 ± 0.8	58.32 ± 1.01
Glycerol	12.85 ± 0.54	13.05 ± 0.81	12.48 ± 0.50	12.99 ± 0.14	13.01 ± 0.44	12.88 ± 0.77
Acetate	0.58 ± 0.06	0.55 ± 0.02	0.60 ± 0.08	0.55 ± 0.04	0.58 ± 0.05	0.59 ± 0.06
Succinate	0.78 ± 0.09	0.74 ± 0.04	0.77 ± 0.09	0.75 ± 0.07	0.74 ± 0.07	0.79 ± 0.08
Alphaketoglutarate	0.62 ± 0.10	0.65 ± 0.11	0.69 ± 0.08	0.65 ± 0.06	0.70 ± 0.10	0.71 ± 0.11
Pyruvate	0.23 ± 0.03	0.21 ± 0.05	0.24 ± 0.05	0.22 ± 0.01	0.24 ± 0.00	0.24 ± 0.02

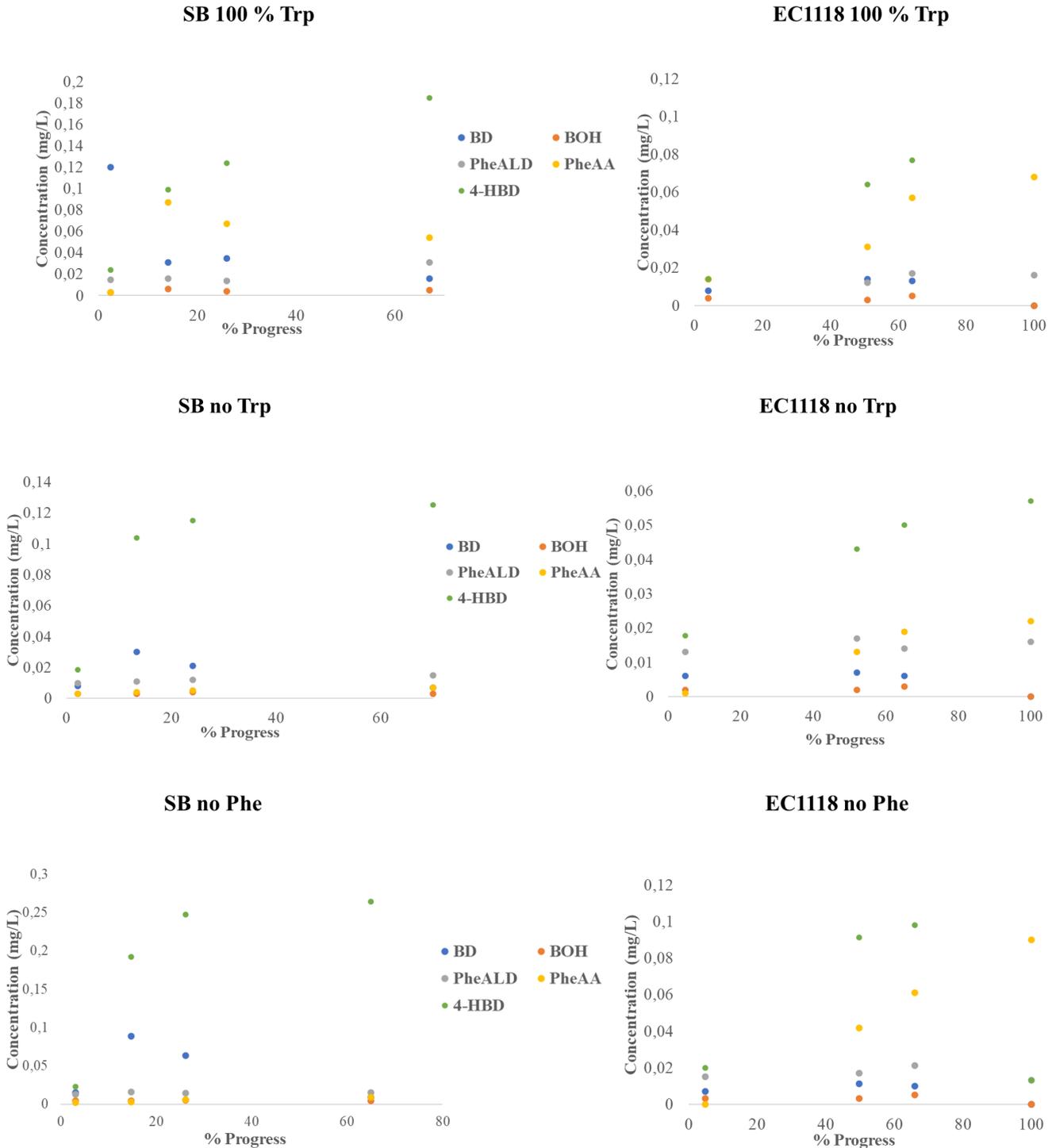
Compounds	<i>S. cerevisiae</i>					
	100 % Phe	No Phe	100 % Trp	No Trp	100 % Leu	No Leu
Glucose	/	/	/	/	/	/
Fructose	/	/	/	/	/	/
Ethanol	92.84 ± 2.42	92.64 ± 1.33	93.01 ± 2.01	93.14 ± 2.77	93.44 ± 2.12	92.88 ± 1.81
Glycerol	5.33 ± 0.24	5.38 ± 0.11	5.49 ± 0.54	5.58 ± 0.48	5.61 ± 0.34	5.29 ± 0.18
Acetate	0.17 ± 0.02	0.20 ± 0.01	0.23 ± 0.05	0.18 ± 0.01	0.21 ± 0.05	0.20 ± 0.03
Succinate	0.60 ± 0.07	0.52 ± 0.03	0.54 ± 0.04	0.58 ± 0.08	0.54 ± 0.03	0.51 ± 0.02
Alphaketoglutarate	0.08 ± 0.00	0.11 ± 0.02	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.00	0.11 ± 0.01
Pyruvate	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.04 ± 0.00

**Figure S1: Consumption kinetics of ammonium and amino acids by *Starm. bacillaris* during fermentation**





**Figure S2: Production dynamics of benzene derivatives by *Starm. bacillaris* and *S. cerevisiae* during fermentation.** BD: benzaldehyde ; BOH: Benzyl alcohol ; PheALD: Phenylacetaldehyde ; PheAA: Phenylacetic acid ; 4-HBD: 4-hydroxybenzaldehyde. YAN was adjusted to 200 mg/L with only Phe as sole nitrogen source.



## **2. Impacts de *Starm. bacillaris* en fermentations séquentielles avec *S. cerevisiae* sur la production des arômes non-conventionnels**

Précédemment nous avons sélectionné une souche de *Starmerella bacillaris* pour son aptitude à produire des dérivés benzéniques, et notamment le benzaldéhyde. Nous avons montré que la production de benzaldéhyde était transitoire et que cette levure fructophile n'était pas capable de fermenter complètement les sucres présents dans le milieu. Dans la pratique pour bénéficier à la fois des particularités métaboliques des non-*Saccharomyces* et des capacités fermentaires de *Saccharomyces cerevisiae*, les praticiens ont recours à l'inoculation séquentielle. Ce procédé implique tout d'abord l'ensemencement d'une souche de non-*Saccharomyces*, puis après 24h ou 48h, l'inoculation de *Saccharomyces cerevisiae*. Il est clairement admis que la réussite de l'inoculation séquentielle est « couple dépendante » c'est-à-dire qu'elle dépend de la compatibilité des deux microorganismes utilisés. Un travail préliminaire sera consacré à l'étude de la compatibilité entre la souche de *Starmerella bacillaris* et la souche commerciale EC1118®. Des fermentations par inoculation séquentielle à l'échelle pilote (80 L) ont ensuite été menées au sein de la cave expérimentale de Pech Rouge au niveau de la halle de fermentation avec un dispositif original de suivi en ligne des composés volatils (acétaldéhyde, alcools amylique et isoamylique et leurs esters acétiques correspondants, isobutanol, acide octanoïque et esters éthyliques, ainsi que le benzaldéhyde), afin de mieux comprendre les cinétiques de production du benzaldéhyde, et des terpènes liées aux métabolismes des différents microorganismes. L'analyse sensorielle des vins a été réalisée grâce à un jury de 29 personnes au travers de tests triangulaires et de profils sensoriels de type Check All That Apply (CATA) pour évaluer les différences entre les vins ainsi que les marqueurs sensoriels expliquant ces différences.

## **Travail préliminaire :**

### **2.1. Etude de la compatibilité entre les souches de *Starm. bacillaris* et *S. cerevisiae* pour la réalisation de la fermentation séquentielle**

#### *2.1.1. Introduction bibliographique*

De par l'incapacité de nombreuses espèces non-*Saccharomyces* à fermenter la totalité des sucres présents dans le moût de raisin, notamment du fait de leur sensibilité à l'éthanol, ces dernières sont utilisées lors de fermentations mixtes avec *S. cerevisiae*, en co-inoculations (inoculations simultanées des différentes souches) ou d'inoculations séquentielles (inoculation de *S. cerevisiae* 24 h ou 48 h après la souche non-*Saccharomyces*). En fermentations mixtes, certains paramètres doivent être considérés afin de permettre à *Starm. bacillaris* d'exprimer son potentiel phénotypique sans limiter l'activité fermentaire de *S. cerevisiae* en fin de procédé. Différents types d'interactions entre les microorganismes peuvent exister, telles que les interactions de contact cellule-cellule, la compétition pour la consommation de nutriments, ou encore la production de certains composés toxiques (Holm Hansen *et al.*, 2001; Medina *et al.*, 2012; Nissen *et al.*, 2003; Yap *et al.*, 2000). Ces différentes interactions peuvent avoir des conséquences positives ou négatives à la fois sur le déroulement de la fermentation et sur la qualité des vins. En effet, certaines espèces de non-*Saccharomyces* consomment des quantités importantes d'azote (Medina *et al.*, 2012; Prior *et al.*, 2019; Rollero *et al.*, 2018; Taillandier *et al.*, 2014), ce qui peut être préjudiciable à l'implantation de *S. cerevisiae*. Il est donc nécessaire de réaliser un ajout d'azote, sous forme de DAP, afin que *S. cerevisiae* ne soit pas en carence lors de son inoculation. Au contraire, certaines études ont montré une activité protéolytique de certaines souches de non-*Saccharomyces* au cours de la fermentation, permettant une meilleure fermentation de *S. cerevisiae* (Dizy & Bisson, 2000; Ganga & Martinez, 2004). Concernant les fermentations mixtes avec *Starm. bacillaris* et *S. cerevisiae*, les auteurs ont montré que les timings d'inoculation de *S. cerevisiae* variaient entre 24 h et 72 h après l'inoculation de *Starm. bacillaris*. Néanmoins, dans certaines conditions, l'ajout d'azote n'est pas suffisant pour obtenir une vitesse de fermentation satisfaisante. Cela peut être dû à la consommation de certaines vitamines importantes telles que la thiamine ou l'acide pantothénique, provoquant une carence pour *S. cerevisiae* (Bataillon *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2003). Au-delà des compétitions pour les nutriments, d'autres paramètres doivent être vérifiés pour la faisabilité de fermentations mixtes.

En effet, certains composés toxiques peuvent être produits au cours de la fermentation, et présenter un effet toxique pour les différentes souches de levures.

Le principal composé toxique pour les levures non-*Saccharomyces* est généralement décrit comme étant l'éthanol (Pretorius, 2000). De plus, certains acides gras ont un impact négatif sur la croissance de *S. cerevisiae*, notamment les acides octanoïque et décanoïque (Viegas *et al.*, 1989). Certaines levures peuvent également produire ou être sensibles à des toxines ayant un effet killer. Ces levures killer peuvent produire, sécréter et résister à une toxine pouvant entraîner la mort cellulaire pour les levures sensibles (Yap *et al.*, 2000).

Enfin, les phénomènes de contact cellule-cellule peuvent également avoir une incidence sur le bon déroulement des fermentations mixtes. Chez les cellules animales, le contact entre cellules permet de stopper la croissance cellulaire après avoir atteint une certaine densité (Fiore & Degrassi, 1999; Hirano *et al.*, 2001). En fermentation alcoolique, ce phénomène a déjà été décrit (Nissen *et al.*, 2003). Les auteurs ont mis en lumière un arrêt de croissance précoce et une diminution de la biomasse finale de plusieurs espèces non-*Saccharomyces* en co-inoculation comparé à des cultures pures. Les hypothèses de limitation en nutriments ainsi que de production de toxines ont été écartées, et les interactions cellule-cellule ont été suspectées. L'utilisation d'un tube de dialyse pour séparer physiquement les deux espèces étudiées a conduit à une croissance identique à celle obtenue en culture pure pour les deux espèces. De façon similaire, l'utilisation d'un fermenteur à deux compartiments séparés par une membrane permettant une séparation des cellules mais l'homogénéité du milieu a montré que la viabilité de *T. delbrueckii* diminue lorsqu'elle est mise en contact avec *S. cerevisiae*, dont la viabilité ne change pas (Renault *et al.*, 2013). Le mécanisme n'est pas encore connu, mais *S. cerevisiae* entrainerait la mort de *T. delbrueckii* par contact cellule-cellule.

De plus, certaines interactions métaboliques entre différentes souches de levures œnologiques peuvent conduire à des modifications notables des profils des vins. Ainsi, il a été montré qu'il existait des interactions positives entre *Metschnikowia pulcherrima* et *S. cerevisiae*, à l'origine d'une augmentation de la production de thiols variétaux au cours des fermentations séquentielles (Seguinot *et al.*, 2020b). Ces observations ont également été faites en cultures mixtes avec *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae* (Renault *et al.*, 2013).

Plusieurs études ont porté sur l'utilisation de souches de *Starm. bacillaris* en fermentations mixtes avec *S. cerevisiae*, lors de co-inoculations ou d'inoculations séquentielles (Andorrà *et al.*, 2012; Englezos *et al.*, 2016b; Giovanna *et al.*, 2012; Romboli *et al.*, 2015; Soden *et al.*,

2000; Zara *et al.*, 2014). Concernant les co-inoculations, il est nécessaire d'étudier le ratio d'inoculation des 2 souches, variant pour chaque couple de souches utilisé. Comitini *et al.* (2011) ont ainsi montré qu'un ratio *Starm. bacillaris* / *S. cerevisiae* de 10000:1 permettait la croissance des deux souches, avec un réel impact de *Starm. bacillaris* sur les vins obtenus, incluant une diminution du titre alcoolique et une acidification du vin. Concernant l'inoculation séquentielle, il est important de trouver le meilleur délai favorisant l'implantation de *Starm. bacillaris*, tout en permettant à *S. cerevisiae* de consommer les sucres résiduels. Pour cela, une étude fine de la consommation en nutriments par *Starm. bacillaris* doit être menée afin de compléter le milieu en azote lors de l'inoculation de *S. cerevisiae* (Englezos *et al.*, 2017). Dans le cadre de co-fermentations entre *Starm. bacillaris* et *S. cerevisiae*, les co-inoculations aboutissent souvent à des fermentations languissantes ou à des arrêts de fermentation, probablement par la compétition pour les nutriments, et par des mécanismes de contact cellule-cellule (Ciani & Comitini, 2015; Kemsawasd *et al.*, 2015; Mateo & Maicas, 2016). Ces problèmes ont été moins observés lors de fermentations séquentielles.

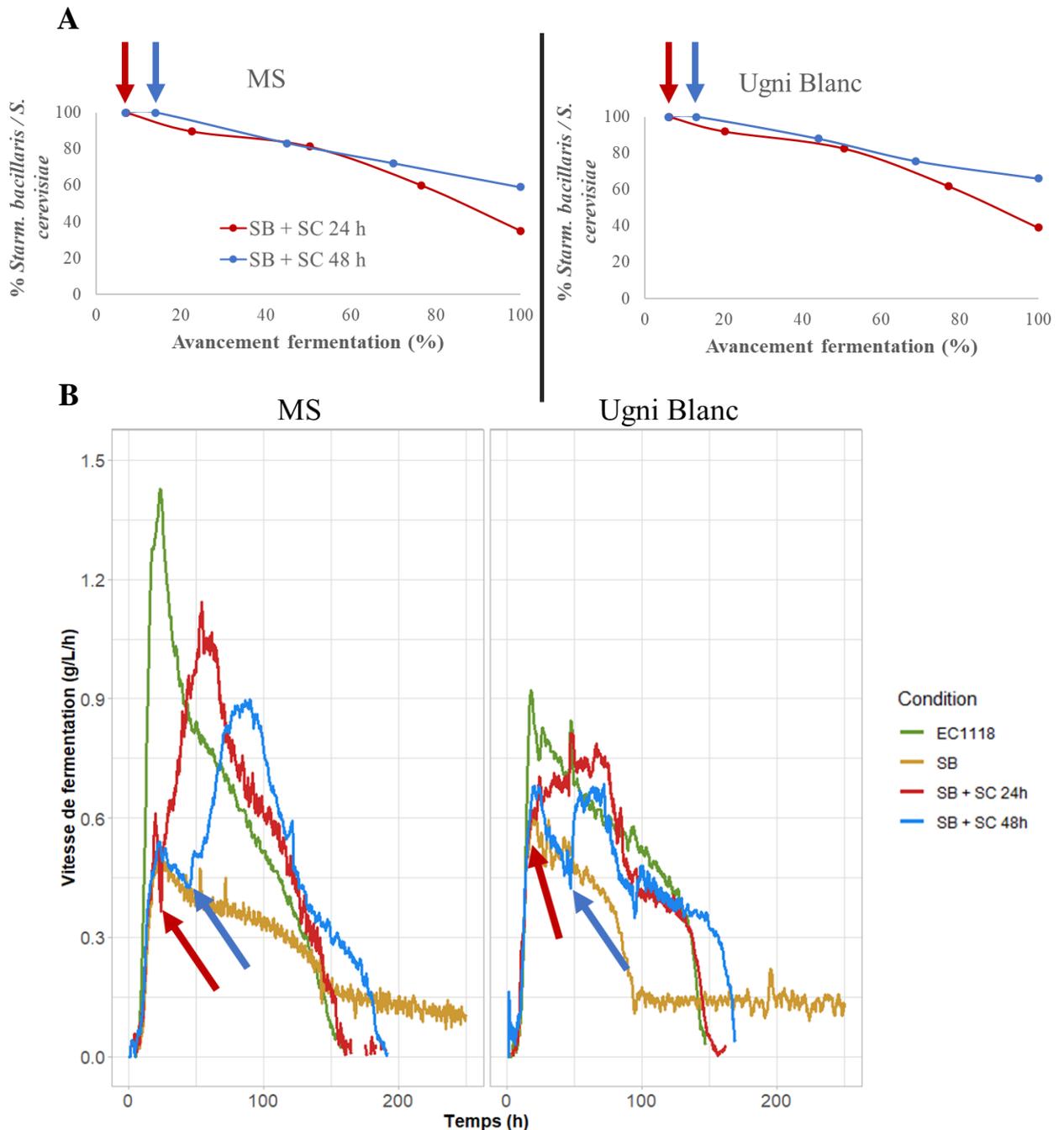
Notre précédent travail nous a permis d'établir le profil de consommation des sources d'azote de *Starm. bacillaris* en début de fermentation (consommation de plus de 70 % du YAN après 42 h à 24 °C), et la consommation incomplète des sucres, même après plus de 600 h de fermentation à 24 °C. Pour s'assurer de la consommation complète des sucres, il est ainsi nécessaire d'avoir recours à une inoculation séquentielle avec *S. cerevisiae*, ainsi qu'un ajout en azote assimilable lors de l'inoculation de *S. cerevisiae*. Pour cela, la première étape est de s'assurer de la compatibilité entre les 2 souches utilisées, et d'étudier l'impact des timings d'inoculation sur le déroulement de la fermentation et sur les vins obtenus.

### 2.1.2. Résultats : fermentations mixtes en fermenteurs de 1L

Pour évaluer la compatibilité du couple de souches choisi, le plan expérimental mis en place consistait à réaliser des fermentations en fermenteurs de 1 L, à 24 °C, en utilisant deux moûts différents : un moût synthétique MS200 classique (200 g/L glucose/fructose, 200 mg/L YAN et 4 mg/L de phytostérols) et un moût naturel Ugni Blanc 2018, cépage caractéristique dans l'élaboration de Cognac. Les caractéristiques de ce moût naturel sont dans le **Tableau 19**. De par la faible teneur en azote assimilable dans le moût d'Ugni Blanc, un ajout de DAP a été effectué avant inoculation des souches, pour atteindre 170 mg/L d'azote assimilable, concentration visée dans les vinifications réalisées par Martell au cours de cette année.

*Starm. bacillaris* a été inoculée à un taux de  $1.10^7$  UFC/mL, tandis que *S. cerevisiae* EC1118® a été inoculée à un taux de 20 g/hL. Ces taux d'inoculation ont été choisis car ils correspondent à ce qui est couramment effectué lors des pratiques industrielles.

Deux timings d'inoculation de *S. cerevisiae* ont été étudiés : 24 h après le début de la fermentation (correspondant au  $V_{max}$  de la souche de *Starm. bacillaris* dans ces conditions) ou 48 h après le début de la fermentation. Les cultures pures de *Starm. bacillaris* et EC1118 dans ces moûts constituent les témoins expérimentaux. Avant chaque inoculation de *S. cerevisiae*, un ajout d'azote équivalent à la consommation de *Starm. bacillaris* a été réalisé sous forme de DAP, afin d'atteindre la concentration initiale en azote assimilable. Des contrôles d'implantation de souches sont effectués sur boîtes de Petri contenant du milieu WL, ce qui permet de distinguer les colonies de *Starm. bacillaris* (vertes avec une périphérie blanche) et *S. cerevisiae* (couleur crème) (**Figures 27, 42 A**). Le but est de vérifier la bonne implantation de *S. cerevisiae* après son inoculation, tout en étudiant le maintien de *Starm. bacillaris* inoculée en début de fermentation. Le ratio de la population entre *Starm. bacillaris* et *S. cerevisiae* a été mesuré au cours de la fermentation, et a montré une part importante de *Starm. bacillaris* dans le milieu, que ce soit sur MS ou Ugni Blanc, jusqu'à la fin de la fermentation. Ainsi, après la consommation totale des sucres, il y a toujours plus de 35 % de *Starm. bacillaris* pour la condition SB + SC 24 h et plus de 55 % pour la condition SB + SC 48 h sur MS. Malgré cette importante proportion de *Starm. bacillaris*, la proportion de *S. cerevisiae* dans le milieu semble suffisante, puisque pour chacune des conditions de fermentation séquentielle, les fermentations ont été complètes et les vins obtenus sont secs. Cette étude d'implantation des deux souches montre une bonne compatibilité des deux souches pour la consommation totale des sucres. Les cinétiques fermentaires des diverses fermentations sur les 2 moûts sont sur la **Figure 42B**.

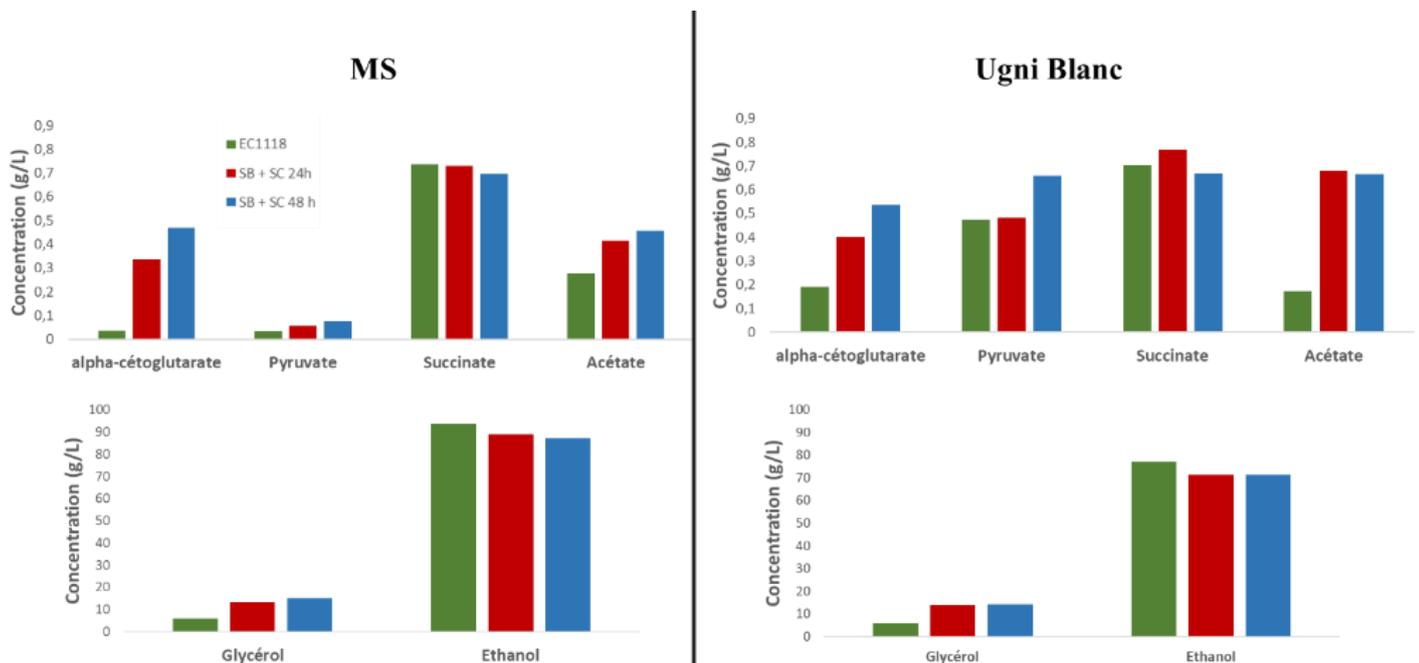


**Figure 42** : Dynamiques des populations (A) et cinétiques fermentaires (B) et des fermentations séquentielles et des cultures pures de *Starm. bacillaris* et *S. cerevisiae*.

Les flèches représentent le moment d'inoculation de la souche EC1118. Ajout de DAP au moment de l'inoculation de *S. cerevisiae*. SB + SC 24 h, SB + SC 48 h : Inoculation de *S. cerevisiae* après 24 h ou 48 h de fermentation par *Starm. bacillaris*. MS : Moût synthétique contenant 200 mgN/L de YAN. Les fermentations se sont déroulées à 24 °C, et les vitesses de fermentation ont été déterminées par mesure du poids des fermenteurs (toutes les 20 min), puis retraitées par le logiciel LabView.

Lors des fermentations sur Ugni Blanc ou sur MS, l'inoculation de *S. cerevisiae* résulte en une augmentation de la vitesse de fermentation. Cette augmentation est toutefois plus prononcée sur milieu synthétique que sur Ugni Blanc : sur MS, de 0,6 g/L/h à 1,1 g/L/h pour SB + SC 24h, et de 0,45 g/L/h à 0,9 g/L/h pour SB + SC 48 h ; sur Ugni Blanc, de 0,55 g/L/h à 0,75 g/L/h pour SB + SC 24 h, et de 0,45 g/L/h à 0,64 g/L/h pour SB + SC 48 h. De manière générale, pour une condition donnée, les vitesses de fermentation maximales ( $V_{max}$ ) sont plus faibles sur Ugni Blanc que sur MS. A titre d'exemple, les  $V_{max}$  sont respectivement de 0,9 g/L/h et de 1,4 g/L/h sur Ugni Blanc et sur MS. Cette différence peut être expliquée par un YAN plus faible (170 mgN/L) sur Ugni Blanc que sur MS (200 mgN/L).

Puis, les sucres et les métabolites issus du MCC ont été dosés en fin de fermentation (**Figure 43**).



**Figure 43** : Production des métabolites issus du MCC à l'issue des fermentations séquentielles.

Pour chacune des conditions montrées, la consommation des sucres est totale. Ces données sont obtenues à la fin des fermentations. MS : Moût synthétique contenant 200 mgN/L de YAN. SB + SC 24 h, SB + SC 48 h : Inoculation de *S. cerevisiae* après 24 h ou 48 h de fermentation par *Starm. bacillaris*.

Les tendances observées sont les mêmes après fermentations sur MS ou Ugni Blanc. Les fermentations séquentielles permettent une augmentation de la production d' $\alpha$ -cétoglutarate (sur MS : 0,04 g/L pour EC1118, 0,33 g/L pour SB + SC 24 h, 0,45 g/L pour SB + SC 48 h), d'acétate (0,27 g/L, 0,41 g/L et 0,44 g/L, respectivement) et de glycérol (5,9 g/L, 13,4 g/L et 15,1 g/L, respectivement). En parallèle, une diminution de la production d'éthanol est observée sur MS et sur Ugni Blanc. Sur MS, la production d'éthanol diminue de 94 g/L pour le contrôle à 88 g/L pour SB + SC 24 h et 87.2 g/L pour SB + SC 48 h. De manière générale, plus *S. cerevisiae* a été inoculée tardivement, plus *Starm. bacillaris* a eu le temps d'imposer son phénotype, à savoir une diminution du titre alcoolique liée à une réorientation des flux métaboliques vers les acides organiques issus du TCA et le glycérol.

Pour conclure, la consommation totale des sucres lors des fermentations mixtes confirme la compatibilité entre la souche de *Starm. bacillaris* et EC1118®, et le temps d'inoculation étudié n'a eu que peu d'impact sur la production des métabolites du MCC ou sur la durée de fermentation. Le procédé d'inoculation séquentielle avec ces deux souches a donc pu être étudié à plus grande échelle, pour évaluer l'incidence de *Starm. bacillaris* sur le déroulement de la fermentation par *S. cerevisiae* et sur la qualité des vins.

## 2.2. Impacts of *Starmerella bacillaris* on the production dynamics of volatile compounds during fermentation and on the sensory properties of the wines.

### 1. Abstract

In recent years, non-*Saccharomyces* yeasts have received a great interest to promote the production of high interest metabolites that can bring typicity to wines. In this study, sequential fermentations with *Starm. bacillaris* and *S. cerevisiae* were performed on a Maccabeu/Viognier mix grape varieties, and two inoculation timings of *S. cerevisiae* were studied (72 h and 96 h after *Starm. bacillaris* inoculation). To evaluate the impact of *Starm. bacillaris* in sequential fermentations with *S. cerevisiae* on the volatile profile of wine, an online monitoring system of the majority of volatile compounds (higher alcohols, acetate esters, acids, ethyl esters) was performed at pilot scale. The sequential fermentations resulted in low ethanol wines, displaying high titratable and volatile acidities, but also in general in a lower production of volatile compounds. Only propanol, isobutanol, ethyl isobutyrate, isobutyric acid and terpenes were more produced during sequential fermentations. Benzaldehyde production increased during sequential fermentations, but this difference was transitory and became negligible at the end of fermentation. Moreover, the inoculation timing did not have a significant impact. A sensory analysis was performed, and the wines produced using sequential or pure fermentations were discriminated by sensory analyses, regarding the fruity character of the wines. This study confirms the interest of the use of non-*Saccharomyces* species to diversify wine chemical aroma profile, and also corroborates the need to correlate the chemical analysis of the wines with the sensory analysis.

### 2. Introduction

In a very competitive market, a current challenge for the winemaking sector is to diversify its offer, while conferring typicity to the final product. Yeasts play a key role in the winemaking process, transforming grape musts into wines and producing a diversity of volatile metabolites. Yeasts can produce fermentative aromas, via their carbon and nitrogen metabolisms (Swiegers *et al.*, 2005). Yeasts can also participate to wine bouquet by the revelation of glycosylated precursors, for some compounds such as terpenes and some benzene derivatives, with the

activity of enzymes produced by yeasts (Ferreira & Lopez, 2019; Gunata *et al.*, 1985a; Villena *et al.*, 2007). Benzene derivatives, as benzaldehyde and vanillin can greatly influence the sensory profile of the wines, bringing almond and vanilla notes to the wines. On the other hand, terpenes can confer floral notes to the wines, and bring typicity to the final product. Although benzene derivatives and terpenes are known to be varietal aromas, some studies highlighted the ability of yeasts to intrinsically produce these compounds. Thus, benzaldehyde can be formed via the Ehrlich-mandelate pathway, through phenylalanine degradation, while terpenes can be formed via leucine catabolism and sterols biosynthesis pathway (Bergler *et al.*, 2020; Carrau *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2016b, Bergler *et al.*, in preparation).

Fermentation can be influenced by various environmental parameters, such as nitrogen, temperature or lipid content. Nitrogen content can greatly influence the fermentation progress, leading to stuck or sluggish fermentations in case of nitrogen deficiency. Besides, nitrogen can influence production of volatile aroma compounds, such as higher alcohols, with a higher production when assimilable nitrogen content is between 200 and 300 mg/L (Rollero *et al.*, 2015). Temperature is an important leverage to control fermentation and yeast fermentative activity. A high temperature can be detrimental for the yeasts, but also can induce the loss of some volatile compounds by evaporation, such as ethyl esters and acetate esters (Beltran *et al.*, 2008; Jolly *et al.*, 2006; Molina *et al.*, 2007; Mouret *et al.*, 2014b). Lipids are very important during fermentation, because they ensure cell viability, by maintaining the cell membrane integrity, and ethanol resistance (Alexandre *et al.*, 1994; Lafon-Lafourcade *et al.*, 1979). Finally, the strain used to perform fermentation is a fundamental parameter to consider.

For a long time, non-*Saccharomyces* yeasts species, often isolated from stuck fermentations or in wines presenting some off-flavors, were considered as detrimental for the quality of the wines (du Toit & Pretorius, 2000; Escott *et al.*, 2017; Jolly *et al.*, 2006; Padilla *et al.*, 2016; Ribéreau-Gayon & Peynaud, 1960). For about ten years, it has been clearly recognized that non-*Saccharomyces* wine yeasts could positively contribute to wine profiles and meet the consumers expectations. Indeed, *Starmerella bacillaris* strains can be used to reduce ethanol content in wines (Englezos *et al.*, 2016a). Some strains of *Lachancea thermotolerans* and *Schizosaccharomyces pombe* can also have a positive effect on wine color (Benito *et al.*, 2017). For the past few years, non-*Saccharomyces* yeasts, such as *Metschnikowia pulcherrima* or *Wickerhamomyces anomalus* have been used as biocontrol agents, enabling to decrease the doses of SO<sub>2</sub> before fermentation (Kuchen *et al.*, 2019). Finally, some non-*Saccharomyces* strains can confer a certain freshness to the wines, by the production of some aroma compounds.

For instance, some strains of *W. anomalus* or *Torulaspora delbrueckii* can significantly increase the esters and thiols content in wines (Padilla *et al.*, 2018; Ramírez & Velázquez, 2018; Seguinot *et al.*, 2020b). However, non-*Saccharomyces* yeasts are unable to complete fermentation, mostly due to the toxicity of ethanol and the unavailability of O<sub>2</sub> (Combina *et al.*, 2005; Holm Hansen *et al.*, 2001). In order to benefit from both the original metabolic properties of non-*Saccharomyces* yeasts and the fermentative properties of *Saccharomyces cerevisiae*, mixed fermentations – co-fermentations or sequential fermentations – can be implemented.

*Starmerella bacillaris* is a wine yeasts displaying some original metabolic properties. In mixed fermentations, this strain can enable the reduction of ethanol content, by the production of glycerol and organic acids mostly (Englezos *et al.*, 2017). Furthermore, it has been shown that a strain of *Starm. bacillaris* could intrinsically produce benzene derivatives and terpenes, compounds that can have a great sensory impact on the wines (Bergler *et al.*, 2020 ; Bergler *et al.*, in preparation).

The aim of this study was to evaluate the impact of a *Starm. bacillaris* strain in sequential fermentations with *S. cerevisiae* Lalvin EC1118<sup>®</sup>, regarding the fermentation kinetics, but also the production of major volatile compounds (higher alcohols, acetate esters, acids and ethyl esters) and other unconventional aromas such as benzene derivatives and terpenes. To perform this step, an online monitoring of the fermentative aromas was carried out at the experimental unit of Pech Rouge, France. The final step of this work was to correlate the differences in the chemical compositions of the resulting wines with a sensory analysis. The sensory analysis was based on triangular tests, and Check-all-that-apply (CATA) profile, a, ease-to-be-applied tool to describe and differentiate samples in relation to their specific characteristics, and helping the identification of consumers' perceptions and preferences (Ares *et al.*, 2010; Ares & Jaeger, 2013).

### 3. Materials and methods

#### *Yeast strains and precultures*

The strain of *Starmerella bacillaris* is stored at -80 °C in a mix of YEPD medium (10 g/L yeast extract, 20 g/L peptone and 20 g/L dextrose) and glycerol (15 %). For preculture, one colony was used to inoculate a sterile 50-mL tube containing 25 mL of YEPD medium. Then, 1 mL of this preculture was used to inoculate four sterile 250-mL flasks containing 50 mL of YEPD medium. After 24 h at 28 °C, 30 mL are used to inoculate a 3-L flask containing 800 mL of YEPD medium. Finally, two 15-L containers were inoculated with 400 mL of preculture for 48

h at 28 °C. Before inoculation of the grape must, the total preculture is centrifugated (15 min, 3000 rpm), and resuspended in physiological water (H<sub>2</sub>O + 0.9 % NaCl). The inoculation rate for the fermentation is 1.10<sup>7</sup> CFU/mL.

*Saccharomyces cerevisiae* EC1118 ®, provided by Lallemand SA (Montreal, Canada), was used as a control. The inoculation of this dried yeasts was 20 g/hL (4.10<sup>6</sup> CFU/mL, approximatively), previously rehydrated for 30 min at 37 °C in a 50 g/L glucose solution.

### *Fermentation media and fermentation conditions*

Fermentations were run at pilot scale, in 100-L stainless steel tanks, at 18 °C. The released CO<sub>2</sub> was automatically and accurately measured using a gas mass flow meter, which allowed the rate of CO<sub>2</sub> production (dCO<sub>2</sub>/dt) to be calculated.

The must used for the study is a Viognier/Maccabeu mix. The characteristics of the must are shown in **Table S1**. The grapemust was previously flash-pasteurized and stored under sterile conditions.

Three conditions were studied in duplicate: inoculation of *S. cerevisiae* after 72 h of fermentation of *Starm. bacillaris* (SB/SC72); inoculation of *S. cerevisiae* after 96 h of fermentation of *Starm. bacillaris* (SB/SC96); fermentation with *S. cerevisiae* only (Control). Before inoculation of *S. cerevisiae*, an addition of di-ammonium phosphate, equivalent to the consumption of *Starm. bacillaris*, is performed.

### *Strain implementation assays and population dynamics*

Petri dishes containing WL medium (WL nutrient agar, Merck, Darmstadt, Germany) were used to check the implantation and calculate the population dynamics of both *S. cerevisiae* and *Starm. bacillaris* strains during fermentation. The fermentation sample is diluted in physiological water (9 g/L NaCl) and 100 µL are displayed on the Petri dish. After 4 days at 28 °C, *Starm. bacillaris* colonies appear green while those of *S. cerevisiae* appear white, enabling to calculate the ratios between the two populations.

## Online monitoring of major fermentative aromas

### *Online measurement of volatile compounds in the gas present in the headspace*

Every seven hours, the gas present in the headspace above the fermenting juice was pumped at a flow rate of 10 mL/min from the tank headspace through a heated transfer line (90 °C, 12 m, diam 1/16, Sulfinert). It was then concentrated with a Compact GC (InterScience, St Nom la Bretèche, France) in a cold trap (Tenax TM) for 6 min (desorption at 160 °C for 1 min) and injected into a ZBWax (60 m × 0.32 mm × 0.5 µm, Phenomenex Inc., Torrance, California, USA) column. The injection is in “split” mode, with a purge flow of 5 mL/min, and a split flow of 21 mL/min. The sample is analysed by a GC Trace 1300 coupled to an ISQ7000 Series mass spectrometer (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA). The oven temperature program was: 38 °C for 9 min, increase to 65 °C at a rate of 3 °C/min, hold for 2 min, increase to 160 °C at a rate of 6 °C/min, hold at 160 °C for 2 min, increase to 210 °C at a rate of 4 °C/min, and hold at 210 °C for 4 min. The detector temperature was set at 260 °C. The areas of the peaks were acquired with Chromeleon software. Concerning MS parameters, the transfer line was set at 300 °C, and the ion source was set at 250°C. The spectra were acquired in a “Full Scan” mode (m/z between 29 and 400). A FID detector was also used, at a temperature of 260 °C, for the quantitation of higher alcohols.

### *Online calculation of volatile compound balances during fermentation*

The total production of the volatile compounds, their concentrations in the liquid phase, and the losses in the exhausted gas were determined by a method described by Morakul *et al.*, (2013). The total productions were calculated for propanol, isoamyl alcohol, isobutanol, isoamyl acetate and isobutyl acetate. The GC-MS peak areas of the other compounds present in the gas phase (octanoic acid, ethyl octanoate, ethyl hexanoate, ethyl butyrate) were compared.

## Offline analysis of central carbon metabolites and volatile compounds

### *Offline determination of central carbon metabolite concentrations*

Ethanol, glycerol, acetate, succinate, pyruvate and  $\alpha$ -ketoglutarate concentrations were determined by HPLC (HPLC 1290 Infinity, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) on a Phenomenex Rezex ROA column (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) at 60 °C. The column was eluted with 0.005 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at a flow rate of 0.6 mL/min. Acetate, pyruvate

and alphaketoglutarate concentrations were determined with a UV meter at 210 nm. The concentrations of the other compounds were determined with a refractive index detector.

#### *Offline quantitation of higher alcohols, acetate esters and ethyl esters*

Fermentative aromas were measured by GC-MS following the method described by Rollero *et al.* (2015). Ten microliters of a solution of the deuterated standard at 100 mg/L was added to 5 mL of sample. Volatile compounds were extracted using 1 mL of dichloromethane. After shaking for 20 minutes and 5 min of centrifugation at 5 000 rpm at 4 °C, the organic phase was collected. This step was repeated for the aqueous phase. The total organic phase was dried with Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated under nitrogen flux to obtain a final volume of 0.5 mL.

Samples were analysed in a Hewlett Packard 6890 (Agilent Technologies) gas chromatograph equipped with a CTC Combi PAL AOC-5000 (Shimadzu, Colombia, Etats-Unis) autosampler and an HP 5973 (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) mass spectrometry detector. The gas chromatograph was equipped with a DB-WAX (30 m \* 0.250 mm \* 0.25 µm, Agilent J&W) column. The carrier gas was helium applied at a flow rate of 1.0 mL/min and a linear velocity of 36 cm/s in constant flow mode. The initial oven temperature was 40 °C for 3 min, which was then increased to 160 °C at a rate of 4 °C/min and finally to 220 °C at 15 °C/min, then kept at 220 °C for 10 min. The mass spectrometry detection parameters were previously described by Rollero *et al.* (2015).

#### *Offline quantitation of benzene derivatives and terpenes*

Benzene derivatives and terpenes were quantitated using the method described by Bergler *et al.* (2020). Five milliliters of samples supplemented with 20 µL of internal standard (3 mg/L benzaldehyde-*d*6) were extracted using dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) with 870 µL of acetone (the disperser solvent) and 500 µL of dichloromethane (extracting solvent). The mixture was shaken by vortexing for 20 seconds. The samples were centrifuged at 2000 rpm for 20 min at 4 °C. The organic phase was transferred into a 2-mL vial before analysis.

Analysis was performed using a GC Trace 1300 gas chromatograph (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA) equipped with a Triplus RSH (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA) and coupled to a ISQ7000 Series mass spectrometer (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA). The GC-MS parameters are described in Bergler *et al.* (2020).

## **Sensory analysis**

### *General conditions of the sensory analysis*

The sensory panel was composed of 29 judges, members of the UMR SPO, INRAE Montpellier. Among them, experts were selected to perform the quantitative descriptive analysis of the wines. Sensory evaluation was performed in individual boxes, in a dedicated room (V09-105 norm, February 1985). Tastings were performed using dark opaque glasses (V09-110 norme). Wine temperature was 18 °C for the tasting.

### *Triangular tests*

The samples are coded using the FIZZ software (Biosystemes, Couternon France). The presentation order of the samples was randomized. The **Table S2** shows the six different triangular tests performed in the study.

Statistically, the amount of correct answers was recorded for the entire sensory panel. Then, the probability, due to the  $\alpha$  risk, is calculated by a binomial distribution ( $n,p$ ), where  $n$  is the total amount of answers (29), and  $p$  the probability to randomly give a good answer (1/3). The probability, due to  $\beta$  risk, is also calculated, by taking account of the judges performances and the discriminating power of the jury.

### *Descriptive tests*

The three wines (corresponding to the three conditions) were presented to the expert judges, using white glasses, who were asked to specify the aroma descriptors (sensory and olfactory) of the wines.

Then, the Check All That Apply procedure (CATA) was performed with the generated descriptors. During this procedure, the judges have the list of descriptors, and they check the descriptors they can sense (olfactory and sensory) for the three wines. Previously, judges were trained to the recognition of the descriptors, to enhance their performances. The three conditions were presented in dark glasses, according to a plan described by Macfie *et al.*, (1989). For data treatment, a Cochran test was performed for each descriptor to check the differences between the conditions. Data are gathered with the FIZZ software (Biosystemes, Couternon France). Statistical retreatment was performed by XLStat (Addinsoft, France), by variances analysis. If significant differences are observed ( $p < 0.05$ ), the mean intensities are compared using Tukey tests.

## 4. Results & discussion

### *Fermentation kinetics, population dynamics and sugars consumption during sequential fermentations*

Sequential fermentations were started by inoculating *Starm. bacillaris* ( $1.10^7$  CFU/mL). Because the CO<sub>2</sub> production rate after 48 h was low, 8 mg/L O<sub>2</sub> were added to promote *Starm. bacillaris* growth, resulting in a 2-fold increase in CO<sub>2</sub> production rate. *S. cerevisiae* was added after 72 h of fermentation with *Starm. bacillaris* (SB/SC72, corresponding to 5% fermentation progress) or 96 h of fermentation with *Starm. bacillaris* (SB/SC96, corresponding to 10 % fermentation progress). Fermentations with pure culture of *Saccharomyces cerevisiae* EC1118® (SC) were also achieved as control. Fermentation kinetics were obtained with an online monitoring system of the CO<sub>2</sub> production.

As shown in the **Figure 44A**, in terms of fermentation kinetics, each replica showed satisfactory reproducibility, and the duplicates were overlapped. The analysis of the fermentation kinetic profiles revealed some important differences between the different conditions. The maximum fermentation rate (V<sub>max</sub>) of CO<sub>2</sub> production for the control was 0.89 g/L/h after 72 hours. For sequential conditions (SB/SC72 and SB/SC96), the V<sub>max</sub> before *S. cerevisiae* inoculation was 0.2 g/L/h. There was an increase of the fermentation rate, from 0.2 g/L/h to 0.45 g/L/h, as a result of *S. cerevisiae* inoculation, regardless the timing of addition. This value is lower than the control V<sub>max</sub> (SC), and may be explained by the depletion of some nutrients by *Starm. bacillaris*, such as vitamins.

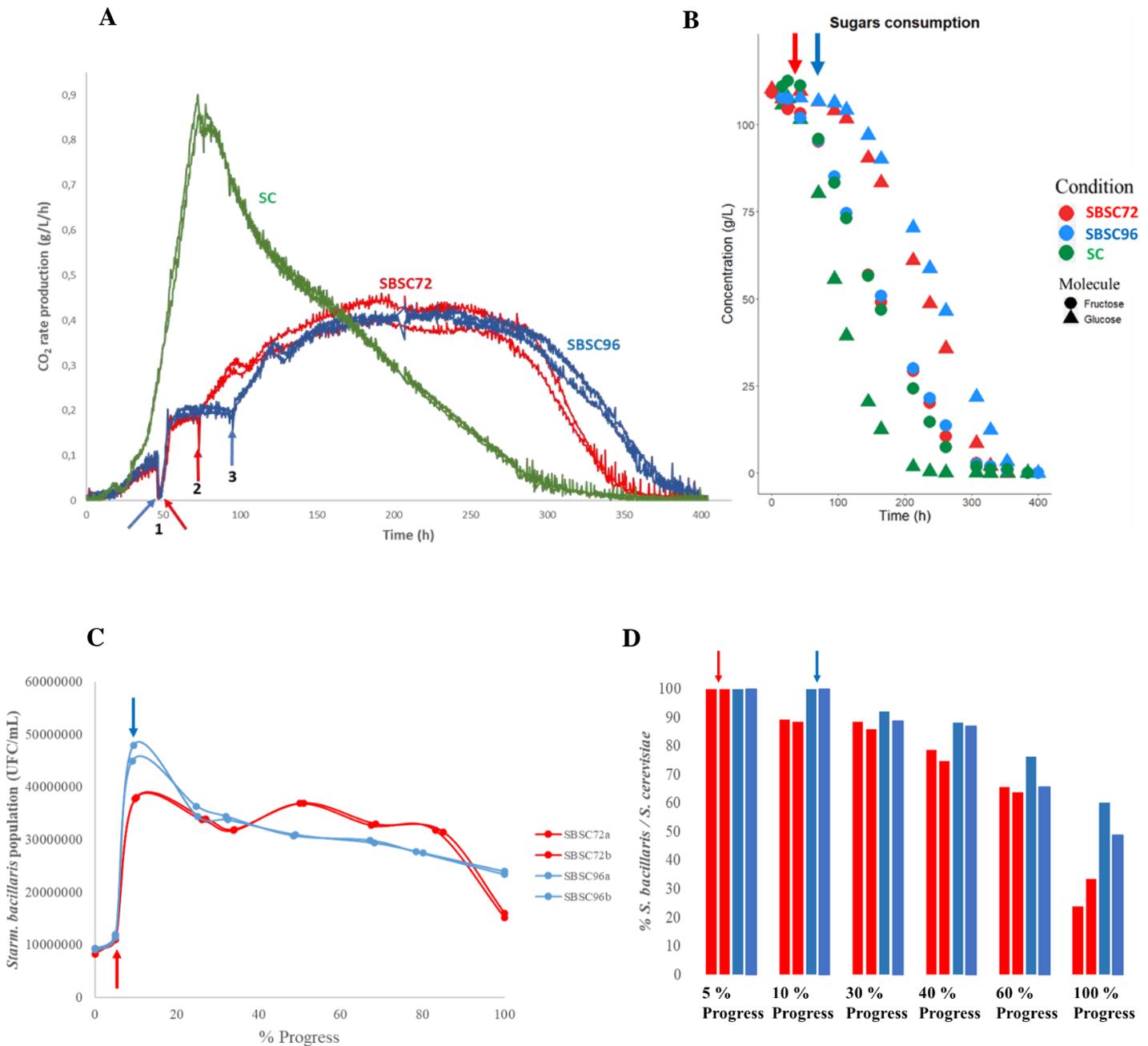
The sequential fermentation time was 72 h or 96 h longer compared to fermentation in pure culture *S. cerevisiae*, corresponding to the delay of inoculation with *Saccharomyces cerevisiae* for conditions SB/SC72 and SB/SC96, respectively.

For sequential fermentations, before *S. cerevisiae* addition, only fructose was consumed by *Starm. bacillaris*, at the same rate as the control (**Figure 44B**). On the contrary, glucose was preferentially consumed by *S. cerevisiae* in pure culture. The inoculation of *S. cerevisiae* resulted in the beginning of glucose consumption in the sequential fermentations. Interestingly, the complete consumption of fructose occurred before the complete consumption of glucose in the mixed fermentations (384 h for SB/SC72 and SB/SC96, while fermentations were finished after more than 400 hours of fermentation). *S. cerevisiae* consumed the entirety of glucose after 235 h, while fructose was depleted after more than 360 h. The fructophilic trait of *Starm. bacillaris* have already been reported, and explained by the presence of the *FFZI* gene, coding

for a fructose transporter, for strains belonging to the *Wickerhamiella* / *Starmerella* clade (Englezos *et al.*, 2017; Gonçalves *et al.*, 2016, 2020).

The growth of the yeasts in sequential and control fermentations was monitored by plate counting and the results are shown in the **Figures 44C and 44D**. The inoculation of *S. cerevisiae* for SB/SC72 resulted in a lower maximal *Starm. bacillaris* population than SB/SC96 ( $3.8 \cdot 10^7$  CFU/mL and  $4.7 \cdot 10^7$  CFU/mL, respectively). The proportion of *Starm. bacillaris* populations in the bioreactor was assessed during fermentation. At 30 % of fermentation progress, regardless the condition of sequential inoculation, there are more than 85 % of *Starm. bacillaris* population in the must, despite the inoculation of *S. cerevisiae*. Nonetheless, beside an important consumption of fructose, the degradation of glucose already started, showing the action of *S. cerevisiae*. Between 30 % and 60 % progress, the percentage of *Starm. bacillaris* populations in the medium decreased, mostly for the SB/SC72, from 85 % to 65 %, probably because *S. cerevisiae* was inoculated 24 h before SB/SC96. Moreover, at the moment of *S. cerevisiae* inoculation, *Starm. bacillaris* populations were higher for SB/SC96 (around  $5.1 \cdot 10^7$  CFU/mL), and could explain a more difficult implantation for *S. cerevisiae* than for SB/SC72 ( $1.3 \cdot 10^7$  CFU/mL at the moment of *S. cerevisiae* inoculation).

Despite this change of the populations ratio, there is no impact on the fermentation rate, since glucose and fructose keep being consumed at the same rate in the two conditions of sequential fermentation. At the end of fermentation, there are still more than 30 % (SB/SC72) and 50 % (SB/SC96) of *Starm. bacillaris* present in the medium, while ethanol content is high (more than 13 % (v/v)). This observation confirms the ethanol tolerance of some studied strains of *Starm. bacillaris* (Englezos *et al.*, 2017). The higher proportion of *Starm. bacillaris* at the end of fermentation for SB/SC96 is likely due to a longer time to colonize the medium before *S. cerevisiae* inoculation, compared to SB/SC72.



**Figure 44:** Comparison of the fermentation kinetics (A), the sugar consumption (B), the *Starm. bacillaris* population in sequential fermentations (C) and the population ratios of *Starm. bacillaris* and *S. cerevisiae* during sequential fermentations (D).

In red: SB/SC72 ; In blue: SB/SC96 ; In green: SC. (A) 1: O<sub>2</sub> addition (8 mg/L) ; 2: Inoculation of *S. cerevisiae* for SB/SC72 ; 3: Inoculation of *S. cerevisiae* for SB/SC96. (B),(C), (D): The red arrow represents the inoculation of *S. cerevisiae* for SB/SC72 ; the blue arrow represents the inoculation of *S. cerevisiae* for SB/SC96.

*Main enological and chemical parameters of wine*

Enological parameters and central carbon metabolites (ethanol, pyruvate, acetate, glycerol and  $\alpha$ -ketoglutarate) in wines obtained from pure culture of *Saccharomyces cerevisiae* or from mixed cultures with *Starm. bacillaris* and *S. cerevisiae* are presented in the **Table 29**. The impact of the use of *Starm. bacillaris* in mixed culture and the inoculation timing of *S. cerevisiae* were investigated.

Regarding enological parameters, all wines contained less than 2 g/L of residual sugar at the end of fermentation. Sequential fermentations resulted in the decrease of the TAV compared to the control (13 % (v/v) for SB/SC72, 12.9 % (v/v) for SB/SC96 and 13.65 % (v/v) for the control). This observation confirms the interest of using *Starm. bacillaris* in order to reduce ethanol content in wines, one of the major actual challenges in a context of climate change (Englezos *et al.*, 2016a).

Then, sequential fermentations resulted in a higher titrable acidity than the control (4.82 g/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for SB/SC72, 4.95 g/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for SB/SC96, and 3.95 g/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for the control), and consequently a lower pH (3.42, 3.37 and 3.62, respectively). This acidogenic trait is specific to *Starm. bacillaris* species and can be beneficial, because it can lead to a better microbiological stabilization of the final wines. This increase of titrable acidity in this work is not correlated to a higher production of lactic acid or malic acid during mixed fermentations.

Finally, the production of SO<sub>2</sub> was higher in the control (22 mg/L of total SO<sub>2</sub> compared to 6-9 mg/L). The observed productions of SO<sub>2</sub> are only due to yeasts metabolism, since no SO<sub>2</sub> addition was performed before the fermentations. This is interesting car SO<sub>2</sub> can be a precursor of H<sub>2</sub>S, a compound involved in the reduced character of the wines. In literature, H<sub>2</sub>S can also be involved in the formation of other sulfur compounds (Smith *et al.*, 2015; Ugliano & Henschke, 2009 ; Jiménez-Lorenzo *et al.*, in preparation).

The must fermentations performed by the mixed cultures contained higher levels of glycerol and organic acids (acetic acid,  $\alpha$ -ketoglutarate and pyruvate) than fermentations performed by only *Saccharomyces cerevisiae*. The production of glycerol is 2-fold increased (12 g/L) in sequential fermentation compared to less than 6 g/L for the control. This overproduction can be explained by the originalities of *Starm. bacillaris*, displaying a different regulation of the glycerol pathway, particularly with the absence of some transcriptional factors like YpK1p and YpK2p, involved in the regulation of the glycerol-3-phosphate deshydrogenase (Lemos Junior *et al.*, 2018).

Finally, the production of acetate is higher after sequential fermentations, with more than 0.7 g/L compared to less than 0.2 g/L for the control. This overproduction, which explains the increase of volatile acidity (0.68 g/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.75 g/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 0.19 g/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> respectively for SB/SC72, SB/SC96 and SC), can be considered as spoilage in wine, associated with notes of vinegar (**Table 29**). The SB/SC72 and SB/SC96 resulted in higher productions of pyruvic acid compared to the control (0.31 g/L, 0.35 g/L and 0.22 g/L, respectively). Interestingly, the concentration of  $\alpha$ -ketoglutarate is higher for the control (0.75 g/L) than for the sequential fermentations (less than 0.69 mg/L), which is not consistent with previous studies that showed higher productions of this organic acid by *Starm. bacillaris* (Englezos *et al.*, 2018, Bergler *et al.*, in preparation). This overproduction of organic acids (except for  $\alpha$ -ketoglutarate) during sequential fermentations can also explain the increase of titrable acidity for SB/SC72 and SB/SC96, and the decrease of the ethanol content in the resulting wines.

Generally, the *S. cerevisiae* inoculation time has very little impact on the oenological parameters.

**Tableau 29: Wines analysis after fermentations in the studied conditions.**

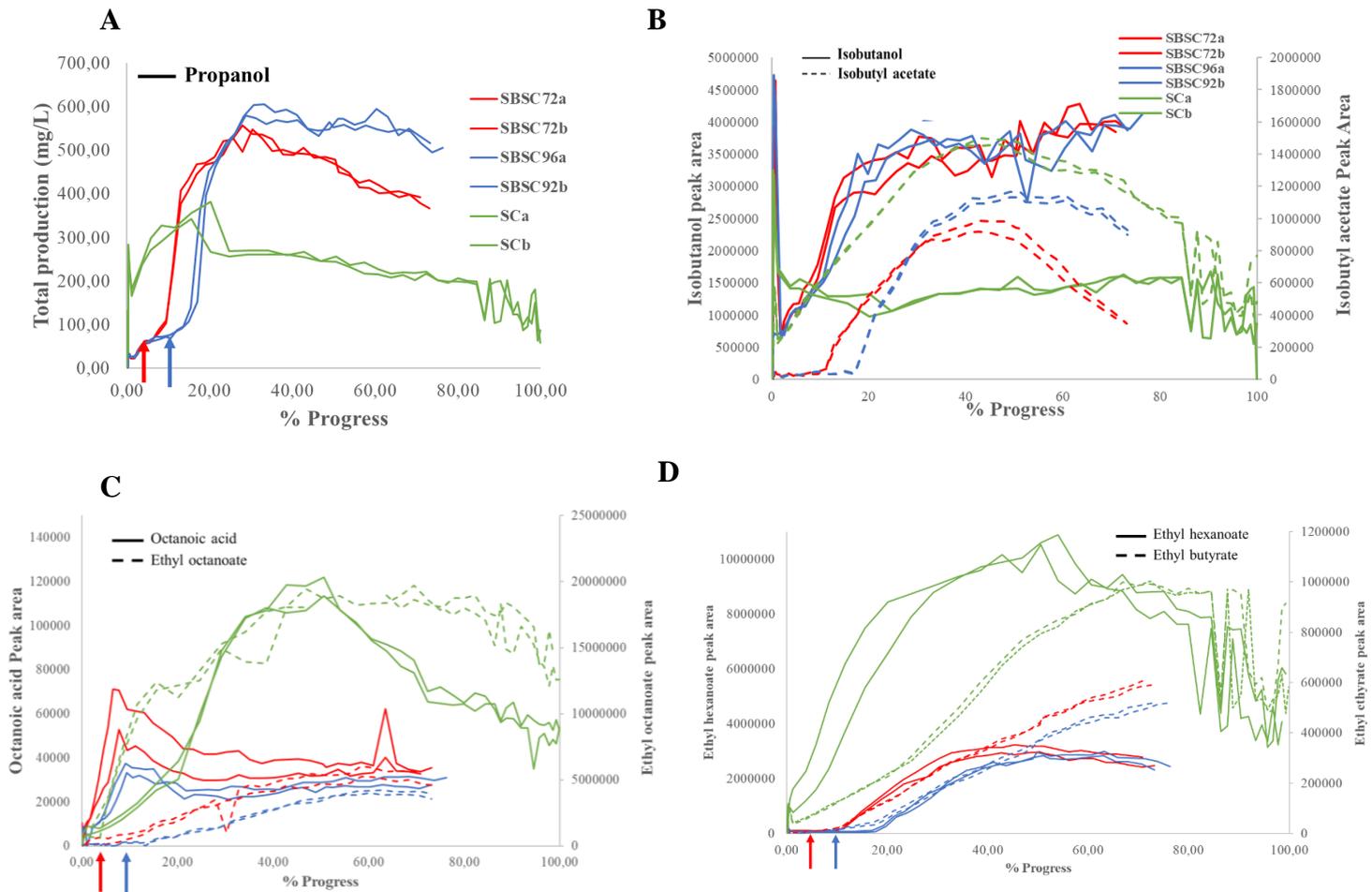
SB/SC72 and SB/SC96: inoculation of *S. cerevisiae* after 72h or 96 h of *Starm. bacilliaris* fermentation. Control: Pure fermentation of *S. cerevisiae*. 2 replicates of each conditions (A and B) were performed.

	SB/SC72		SB/SC96		Control/SC	
	A	B	A	B	A	B
TAV (% (v/v))	13	13.05	12.9	12.9	13.65	13.65
Residual sugars (g/L)	0.03	0.03	0.05	0.04	0.19	0.19
Titrable acidity (g/L H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	4.85	4.8	4.95	4.95	3.9	4
Volatile acidity (g/L H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	0.7	0.67	0.75	0.76	0.18	0.19
pH	3.42	3.42	3.37	3.37	3.62	3.61
Malic acid (g/L)	1.99	1.97	1.9	1.99	1.94	1.94
Lactic acid (g/L)	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Total SO <sub>2</sub> (mg/L)	15	15	18	18	27	22
Glycerol (g/L)	13.07	12.79	13.43	13.45	6.42	6.25
Acetate (g/L)	0.78	0.75	0.83	0.83	0.14	0.15
Pyruvate (g/L)	0.31	0.31	0.35	0.38	0.2	0.24
$\alpha$ -ketoglutarate (g/L)	0.69	0.67	0.6	0.6	0.77	0.74

### *Kinetic profiles of the production of major volatile metabolites during fermentation*

The production of volatile compounds were quantified both with an online GC/MS throughout the fermentation process and with an offline GC/MS at the end of the fermentation to determine the effect of the sequential inoculation on wine aromas. The interest of online GC/MS device includes allowing the calculation of the total production of the volatile compounds due to the yeast metabolism, whereas offline GC/MS the concentration of remaining in wine, which is important from a practical point of view. As shown in the **Figure 45**, a total of 9 volatile molecules were quantified by online GC/MS including 3 higher alcohols (isobutanol, isoamyl alcohol, propanol), 4 esters (acetate esters and ethyl esters), octanoic acid and one aldehyde (acetaldehyde). 38 volatile compounds were measured with the offline GC/MS from different chemical families: higher alcohols, esters, fatty acids, terpenes, benzene derivatives (**Tables 30 and 31**).

The online monitoring of the major volatile compounds exhibited some important differences between pure and sequential culture fermentations. In particular, lower productions of volatile compounds were observed for fermentations in mixed cultures compared to pure cultures, except for higher alcohols (propanol and isobutanol) (**Figure 45, Tables 30 and 31**). Higher alcohols represent the most important group of fermentative compounds synthesized by yeasts during the alcoholic fermentation and they have a positive impact on the complexity of wine below 300 mg/L (Bell & Henschke, 2005; Cameleyre *et al.*, 2015; de-la-Fuente-Blanco *et al.*, 2016). The monitoring of propanol production showed that before *S. cerevisiae* inoculation in sequential fermentations, the propanol production by *Starm. bacillaris* was 6 times lower than the control. As expected, propanol production by *S. cerevisiae* occurred during the growth phase and stopped when the yeast assimilable nitrogen was exhausted in the medium. The inoculation of *S. cerevisiae* resulted in a significant increase in the propanol production, exceeding the production by pure culture of *S. cerevisiae* (2-times higher for SB/SC96 and 1.5 times higher for SB/SC72). As a result, the final concentrations in the wine are much higher after sequential fermentations (52 mg/L for SB/SC72, 53 mg/L for SB/SC96 and 28.5 mg/L for the control) (**Table 30**).



**Figure 45:** Online monitoring of the major fermentative aromas by GC-MS after sequential fermentations (red and blue) and pure fermentation by *S. cerevisiae* (green). Peak areas of propanol (A), isobutanol and isobutyl acetate (B), octanoic acid and ethyl octanoate (C), ethyl butyrate and ethyl hexanoate (D). Areas of compounds were measured in the gas phase of the bioreactor. SB/SC72 and SB/SC96: inoculation of *S. cerevisiae* after 72h or 96 h. Control: Pure fermentation of *S. cerevisiae*.

**Tableau 30: Production of major volatile compounds at the end of fermentation**

Concentrations in the liquid were offline measured at the end of the fermentation. For each compound, concentrations range from yellow (low concentrations) to red (high concentrations). SB/SC72 and SB/SC96: inoculation of *S. cerevisiae* after 72 h or 96 h. SC/Control: Pure fermentation of *S. cerevisiae*. . 2 replicates of each conditions (A and B) were performed.

		Condition 1		Condition 2		Condition 3	
		1a	1b	2a	2b	3a	3b
<b>Higher alcohols (mg/L)</b>							
	Propanol	53.22	51.05	51.81	54.37	29.96	27.43
	2-methylpropanol	50.52	47.32	49.49	49.95	23.73	22.28
	2- and 3-methylbutanol	79.11	80.48	74.22	70.35	118.66	120.66
	Hexanol	1.12	1.14	1.07	1.08	0.86	0.91
	Methionol	0.77	0.67	0.46	0.47	1.28	1.45
	2-phenylethanol	21.08	20.06	16.60	16.75	25.43	24.64
<b>Ethyl esters (mg/L)</b>							
	Ethyl isobutyrate	0.15	0.15	0.16	0.16	0.10	0.10
	Ethyl butyrate	0.12	0.14	0.14	0.13	0.21	0.18
	Ethyl hexanoate	0.17	0.19	0.12	0.11	0.34	0.31
	Ethyl octanoate	0.48	0.51	0.34	0.31	0.65	0.61
	Ethyl decanoate	0.19	0.22	0.14	0.17	0.31	0.34
	Ethyl lactate	1.81	1.74	2.44	2.05	0.79	0.84
<b>Acetate esters (mg/L)</b>							
	Propyl acetate	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.21	0.21
	2-methylpropyl acetate	0.15	0.16	0.19	0.20	0.20	0.20
	2-methylbutyl acetate	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.16	0.16
	3-methylbutyl acetate	0.28	0.31	0.24	0.21	1.31	1.24
	Hexyl acetate	0.11	0.10	0.11	0.12	0.45	0.45
	2-phenylethyl acetate	0.15	0.15	0.15	0.17	0.29	0.27
<b>Acids (mg/L)</b>							
	Butyric acid	0.71	0.77	0.51	0.54	1.27	1.34
	3-methylbutyric acid	0.25	0.27	0.22	0.22	0.64	0.60
	2-methylbutyric acid	0.17	0.18	0.14	0.15	0.38	0.36
	Pentanoic acid	0.14	0.15	0.15	0.15	0.29	0.27
	Hexanoic acid	0.74	0.77	0.57	0.61	1.67	1.54
	Octanoic acid	1.11	1.09	0.97	0.94	1.87	1.77
	Decanoic acid	0.67	0.65	0.50	0.47	0.81	0.84
	Dodecanoic acid	0.16	0.15	0.14	0.15	0.29	0.24
<b>Terpenes (µg/L)</b>							
	Geraniol	23.8	21.7	22.6	23.4	11.5	11.4
	Linalool	14.8	15.8	16.6	16.3	12.2	11.5
	Citronellol	27.4	26.1	26.4	27	12	11.7
	Nerol	10.4	10.6	10.2	10.1	10	10.5
	α-terpineol	7.1	7.4	7.4	7.3	5.4	5.3
	α-citral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	β-citral	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	Geranyl acetate	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Propanol production is proportional to the amount of consumed nitrogen during fermentation (Beltran *et al.*, 2008; Carrau *et al.*, 2008; Mouret *et al.*, 2014a). Thus, the addition of DAP for the inoculation of *S. cerevisiae* in the sequential fermentations can explain the higher production of propanol for the conditions SB/SC72 and SB/SC96. Despite these higher concentrations, the perception threshold was not reached (500 mg/L in wine), and the amounts should not bring bitter notes to the wines.

Then, the production of isobutanol and its corresponding acetate ester, isobutyl acetate, was monitored during fermentation (**Figure 45B**). Isobutanol is synthesized in the yeast cell via the catabolism of valine and via the central carbon metabolism. Before *S. cerevisiae* inoculation in sequential fermentations, *Starm. bacillaris* produced around 20 % of the final total production of isobutanol. The production rate of this compound is higher after *S. cerevisiae* inoculation (5 % fermentation progress after its inoculation). This high production rate of this compound persisted up to 13 % fermentation progress for SB/SC72 and 20 % fermentation progress for SB/SC96, before slowing down. A delay was observed depending on the inoculation timing. On the contrary, the production of isobutanol is continuous for *S. cerevisiae*, but did not reach the same level of production obtained during sequential fermentations. At the end of the fermentation, the concentrations were 2 times higher for the sequential fermentations, reaching up to more than 50 mg/L, exceeding the perception threshold of isobutanol (40 mg/L in wines), and could allegedly bring alcoholic and spirit notes to the wines, which is contrary to the study of Englezos *et al.*, (2018). Isobutyl acetate production began only when *S. cerevisiae* was inoculated in sequential fermentations. The acetate ester synthesis started only once the concentration of the higher alcohol corresponding reached a threshold level in *Saccharomyces cerevisiae* (15% of the total production), which could be explained the isobutyl acetate non-production by *Starm. bacillaris* (Mouret *et al.*, 2014b). There was a slight delay between the beginning of isobutanol high-rate production and isobutyl acetate production, in particular for the sequential fermentations (1-2 % fermentation progress). At the end of the fermentation, despite higher concentrations of isobutanol after sequential fermentations, the amounts of isobutyl acetate were not higher in these conditions, compared to the control (0.15 mg/L, 0.2 mg/L and 0.2 mg/L, respectively) (**Table 30**). None of these concentrations exceeded the perception threshold of isobutyl acetate (1.6 mg/L), that can bring banana and fruity notes to the wines. The inoculation timing did not have an impact on the final concentration of isobutanol, but a later inoculation of *S. cerevisiae* slightly increased the final concentrations of isobutyl acetate. The acetate ester synthesis depends on the activity of two enzymes, Atf1p and

Atf2p. The availability of precursors cannot explain the differences in the isobutyl acetate production between SB/SC72 and SB/SC96, since isobutanol production was similar between these two conditions (around 49 mg/L). Another hypothesis could be the different expression levels of the *ATF1* and *ATF2* genes throughout fermentation.

The production kinetics of isoamyl alcohol and isoamyl acetate were quite similar isobutyl alcohol and isobutyl acetate regarding the sequential fermentations (**Figure 45C**). Isoamyl alcohol is produced in the yeast cell via the catabolism of leucine and via the central carbon metabolism. *Starm. bacillaris* produced a small amount of isoamyl alcohol (less than 15 % of the final concentration), and the production drastically increased after *S. cerevisiae* inoculation (during 10 % sugars consumption after inoculation), without reaching the amounts produced by *S. cerevisiae* only (around 40 % less). These observations concurred with the analysis at the end of fermentation, with higher concentration for the control (120 mg/L) than the sequential fermentations (80 mg/L for SB/SC72 and 72 mg/L for SB/SC96) (**Table 30**). Interestingly, the study of phenotypic traits of *Starm. bacillaris* showed a leucine consumption, followed by a leucine production during fermentation, exceeding the initial concentration of leucine (Englezos *et al.*, 2018 Bergler *et al.*, in preparation). Surprisingly, the isoamyl alcohol content after sequential fermentations is lower than for the control. For the three conditions, higher alcohols production was below 300 mg/L, and allegedly should not bring fusel notes to the final product, but rather positive notes to the global sensory profile of the wines.

Isoamyl acetate monitoring displayed the same pattern as isobutyl acetate, with a production beginning after the inoculation of *S. cerevisiae* for the sequential fermentations, but remaining much lower than for *S. cerevisiae* only. At the end of fermentation, concentrations of isoamyl acetate are 8 to 10 times higher for the control (5.9 mg/L compared to 0.6 and 0.7 mg/L for the mixed fermentations), exceeding the perception threshold of this compound (0.03 mg/L) that can bring some banana, fruity notes to the wine.

Furthermore, at the end of the fermentation, methionol production was lower for the sequential fermentations than *S. cerevisiae* (5.5 mg/L for SB/SC72, 3.4 mg/L for SB/SC96 and 12.9 mg/L for the control). This reduction of methionol content can be positive for the wine because this compound can bring onion and meaty notes to the wines, with an odor threshold of 1 mg/L (Petronilho *et al.*, 2020).

Then, the production of octanoic acid and its corresponding ethyl ester, ethyl octanoate, was monitored (**Figure 45D**). The production dynamics of the octanoic acid are different between

mixed fermentations and pure culture of *S. cerevisiae*. For the sequential fermentations, *Starm. bacillaris* began producing this compound. After the inoculation of *S. cerevisiae*, a decrease of this compound occurred for SB/SC72 (around 50-% loss in 10 % progress after *S. cerevisiae* inoculation). For SB/SC96, the decrease occurred at the same fermentation progress as SB/SC72. Thus, *S. cerevisiae* inoculation did not seem to induce the decrease of this compound, but more likely the higher production of octanoic acid. This decrease is correlated with an increase of ethyl octanoate production, which was not produced before *S. cerevisiae* inoculation. It is likely that the activity of *S. cerevisiae*, higher producer of these two compounds in pure cultures, enabled a better conversion of the acid into the ethyl ester. The decrease of octanoic acid concentration after 55 % progress for *S. cerevisiae* was not correlated with an increase of ethyl octanoate production. At the end of fermentation, significant lower levels of medium chain fatty acids and ethyl esters deriving were found in sequential fermentations, which could impact the fruity profile of wine. The concentrations of octanoic acid did not exceed 5 mg/L after sequential fermentations (12.1 mg/L), while the ethyl ester concentrations after mixed fermentations were below 7 mg/L (more than 15 mg/L for the control), exceeding its perception threshold, could bring pear and pineapple notes to the wine. We finally studied the production sequence of ethyl butyrate and ethyl hexanoate during fermentation (**Figure 45E**). Before inoculation of *S. cerevisiae*, no production of these compounds was observed. Interestingly, ethyl butyrate was continuously produced during fermentation, while ethyl hexanoate production stopped after 40 % progress. These compounds derive from two-carbon linear acids, via a metabolic cascade, which could explain why the first acid was continuously produced, as well as its corresponding ethyl ester.

The concentrations of these compounds are always lower than *S. cerevisiae* (2 to 3 times lower). For *S. cerevisiae* only, the production of ethyl butyrate began early in fermentation (less than 5 % progress), and lasted up to 80 % progress.

The impact of the presence of *Starm. bacillaris* on the production of branched acids, and their ethyl esters derivatives, as well as terpenes production, was investigated. Except for the isobutanol derivatives (isobutyric acid and ethyl isobutyrate), lower concentrations of branched acids and ethyl esters were observed after sequential fermentations. Indeed, the production of 2- and 3-methylbutyric acids are 3 times lower. The overproduction of isobutanol derivatives, from valine can be explained by a lower pool of acetyl-CoA, leading to a poor conversion of  $\alpha$ -ketoisovalerate into of  $\alpha$ -ketoisocaproate, resulting in a lower production of isoamyl alcohol

and isoamyl acetate, and an accumulation of isobutanol, isobutyric acid and ethyl isobutyrate that we observed in this study (Bell & Henschke, 2005; Bloem *et al.*, 2016).

Finally, terpenes production was assessed at the end of fermentation. Concentrations of geraniol and citronellol were 2 times higher after sequential fermentations (25 µg/L of geraniol and 25 µg/L of citronellol), while linalool content was 1.3 times higher after sequential fermentations (16 µg/L for SB/SC96). This observation was already made by previous studies (Whitener *et al.*, 2017). But other studies showed a decrease in the terpenes content after the use of *Starm. bacillaris* in sequential fermentations, mostly depending on the cultivar (Sadoudi *et al.*, 2012). Interestingly, Bergler *et al.* (2020) showed that pure cultures of *Starm. bacillaris* produced more geraniol, linalool and  $\alpha$ -terpineol, but less citronellol than *S. cerevisiae*. Nonetheless, in the present study, citronellol production was higher, as well as geraniol and linalool. In acidic environment, Pedersen *et al.* (2003) showed that monoterpenols could be chemically converted from geraniol to the other monoterpenols, and that an equilibrium existed between these compounds. Nonetheless, King & Dickinson (2000) showed that some of the conversions were enzymatic, such as the reduction of geraniol into citronellol. The present study seems to confirm the action of an enzyme for the reduction of geraniol, and that enzyme could be produced by *S. cerevisiae* during fermentation. The production of terpenes was higher during mixed fermentations, but did not exceed their perception threshold. Nerol production was not affected by sequential fermentations.

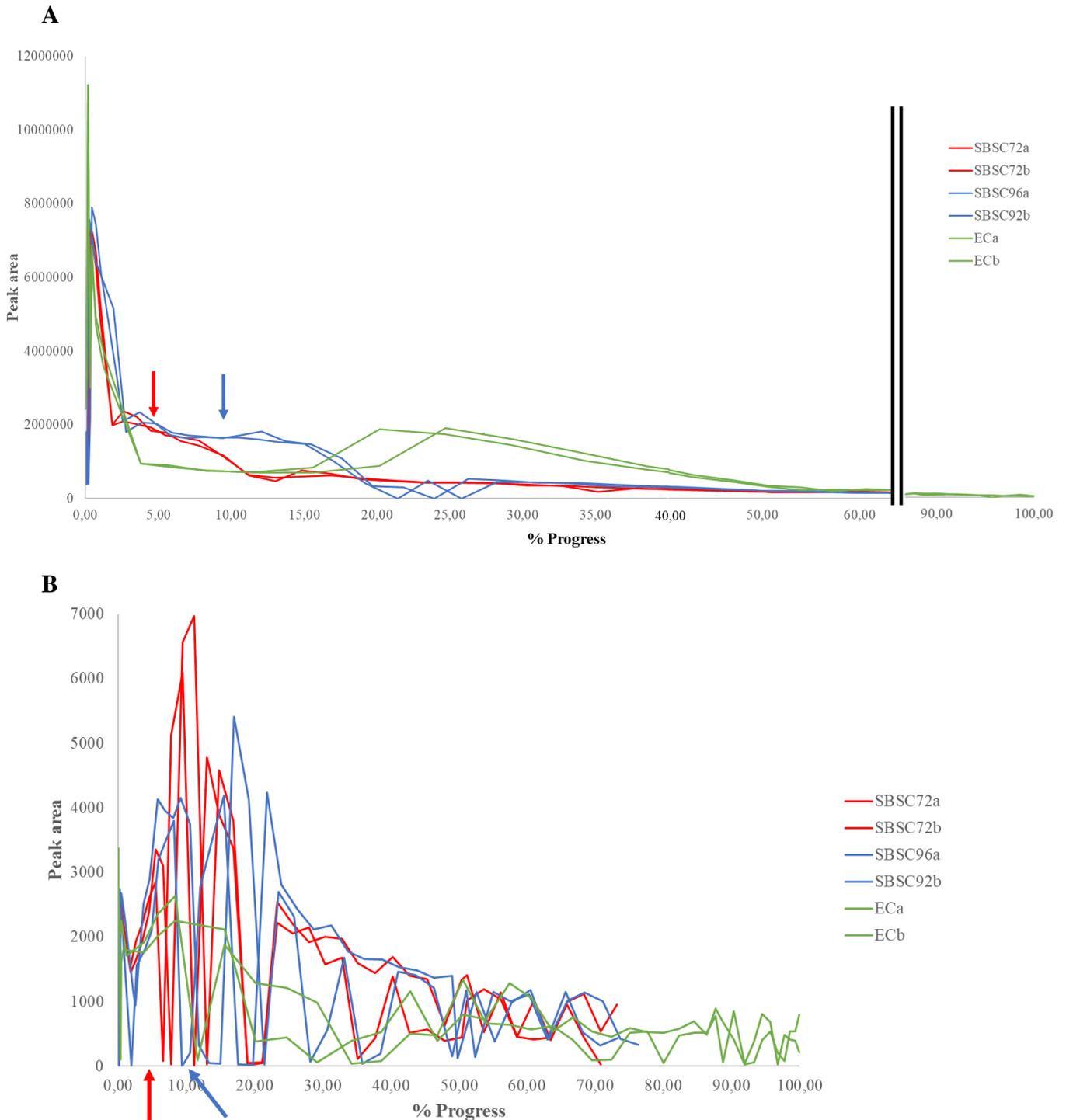
Overall, the wines produced in this study using mixed fermentations seem to be less aromatic than the wines obtained with *S. cerevisiae* only (**Table 30**). Indeed, except for the examples shown before (propanol, isobutanol derivatives, terpenes), the aroma compounds productions were lower for the sequential fermentations.

### *Production kinetics of acetaldehyde and benzaldehyde during fermentation*

In a previous work, we highlighted the original production kinetics of benzaldehyde by *Starm. bacillaris* during fermentation, with a production phase during the early stages of fermentation, followed by a decrease until the end of fermentation, reaching undetected concentrations (Bergler *et al.*, in preparation). Benzaldehyde is a molecule produced via the Ehrlich-mandelate pathway, conferring almond notes to the wines, and contributing to the sensory complexity of the wines (Sánchez-Palomo *et al.*, 2017, Bergler *et al.*, in preparation). This kinetics profile was similar to acetaldehyde production during fermentation (Ochando *et al.*, 2020). We aimed to study the impact of *Starm. bacillaris* during sequential fermentations on the production of

benzaldehyde, and compare it to that of acetaldehyde (**Figure 46**). Acetaldehyde is a key component of wine, with a green grass, apple-like aroma, and a sensory threshold of approximately 100 mg/L in wines (Berg *et al.*, 1955; Zoecklein *et al.*, 1999). This compound was monitored during fermentation because it plays a key role in yeast metabolism, enabling to maintain the redox balance, and precursor of different important molecules such as acetate, acetoin and  $\alpha$ -acetolactic acid, later converted in acetoin and 2,3-butanediol (Pronk *et al.*, 1996; Romano & Suzzi, 1996).

The kinetics of acetaldehyde showed different phases (**Figure 46A**). The first stage was a production phase, reaching a maximal production in the early stages of the fermentation, regardless of the conditions (between 0.5 % and 1.5 % fermentation progress). The maximal production was reached by the control, with a 50 % higher production than the sequential fermentations. After this step, the concentration decreased for the three conditions. For all the sequential fermentations, this decrease led to a plateau. After the inoculation of *S. cerevisiae*, this plateau lasted for 3 to 5 % progress (for SB/SC72 and SB/SC96, respectively), before another decrease. Then, for the control only, there was another production phase, after 15 to 20 % fermentation progress, but in lower concentrations compared to the first phase. Then, there was a decrease. This second production phase was not observed in the sequential fermentations, during which the concentrations stayed minimal after 15 % progress (SB/SC72) and 20 % progress (SB/SC96). The kinetics of acetaldehyde production by the control concur with Ochando *et al.*, (2020), who showed a production phase in the early stages of the yeast growth, followed by a decrease, and another production phase in the stationary phase, also followed by a decrease. There is a relationship between the concentration of acetaldehyde and the fermentation kinetics (Roustan & Sablayrolles, 2002). The kinetics of production of this compound seems to be related to the redox status of the cell (Liu & Pilone, 2000; Wang *et al.*, 2001) In the second part of the fermentation process, acetaldehyde catabolism enables the reoxidation of NADH into NAD<sup>+</sup> by ethanol synthesis.



**Figure 46: Online monitoring of the production of acetaldehyde (A) and benzaldehyde (B) during fermentations.**

The red and blue arrows show the timing of *S. cerevisiae* inoculation for SB/SC72 and SB/SC96, respectively. Acetaldehyde was studied by GC-MS using a “Full-Scan” mode, while benzaldehyde was monitored by GC-MS using “SIM” mode, following its two major ions ((m/z) 77 and 106). Areas of compounds was measured in the gas phase of the bioreactor. SB/SC72 and SB/SC96: inoculation of *S. cerevisiae* after 72h or 96 h. Control: Pure fermentation of *S. cerevisiae*.

Benzaldehyde production during fermentation displayed a different pattern compared to acetaldehyde production (**Figure 46B**). Indeed, only one production phase was observed for the three conditions, after 10, 18 and 10 % progress, for SB/SC72, SB/SC96, and the SC control, respectively. Nonetheless, despite a similar pattern for the three conditions, the maximal production reached during sequential fermentations was 2 to 2.5 higher than for the control. After reaching this maximal production, the decrease lasted for the rest of the fermentation, resulting in low concentrations at the end of the fermentation (1.8 µg/L for SB/SC72 and 2 µg/L for SB/SC96), much lower than the perception threshold of this compound in wines (350 µg/L) (**Table 31**) (Etievant, 1991). This kinetics was already observed by Bergler *et al.* (in preparation). The production phase of this compound seems to be related to phenylalanine degradation. The decrease of benzaldehyde concentrations is not elucidated yet, but it can be explained by a conversion of this compound to other benzene derivatives, such as 2-phenylethanol. This other hypothesis can be a complexation to SO<sub>2</sub>, also produced during sequential fermentations, similar to acetaldehyde. Nonetheless, no data is available concerning the complexation of benzaldehyde with SO<sub>2</sub>.

Overall, the production kinetics of acetaldehyde and benzaldehyde are very different, and the mechanisms causing these different patterns are distinct, with different metabolic origins.

**Tableau 31: Offline analysis of benzene derivatives and terpenes at the end of fermentation.**

SB/SC72 and SB/SC96: inoculation of *S. cerevisiae* after 72h or 96 h. SC/Control: Pure fermentation of *S. cerevisiae*. Two replicates of each condition were performed (A and B).

	SB/SC72		SB/SC96		SC/Control	
	A	B	A	B	A	B
<b>Benzene derivatives (µg/L)</b>						
Benzaldehyde	1.7	1.7	1.8	2.3	1.6	1.6
Benzyl alcohol	42	43.1	44.6	44.2	42.7	41.7
Phenylacetaldehyde	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Vanillin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4-vinylguaiacol	153.8	165.3	101.1	103.1	1101.5	1102.6
Phenylacetic acid	13.9	12.4	11	11.3	27.4	33.8
4-hydroxybenzaldehyde	24.9	27.6	41.6	52.1	3.3	3.1

Other benzene derivatives were quantified at the end of the fermentation (**Table 31**). Benzyl alcohol (BOH), phenylacetaldehyde (PheALD) and phenylacetic acid (PheAA) are intermediates of the Ehrlich-mandelate pathway, leading to the production of benzaldehyde from Phe degradation, by *Starm. bacillaris* (Bergler *et al.*, in preparation). 4-hydroxybenzaldehyde (4-HBD) is the equivalent of benzaldehyde, but through Tyr degradation via the Ehrlich-mandelate pathway (Martin *et al.*, 2016b).

At the end of fermentation, there is no differences in the concentrations of benzyl alcohol (from 41.7 µg/L to 44.6 µg/L) between the sequential fermentations and the control. On the contrary, the production of 4-HBD is higher after sequential fermentations than the control (25.4 µg/L, 46.2 µg/L and 3.2 µg/L), with a higher production for SB/SC96, showing that the final concentration of this compound depended on the inoculation timing of *S. cerevisiae*. This compound can be interesting for the wine bouquet, with woody notes of almond, but no information is available concerning its perception threshold in the wine. Besides, production of PheAA was reduced by a factor 2 adding *Starm. bacillaris* at the beginning of the process (13.9 µg/L for SB/SC72, 11.1 µg/L for SB/SC96 and 30.1 µg/L for the control). This compound, as well as ethyl phenylacetate, its corresponding ester can be found in some wines made from infected berries (up to 1668 and 304 µg/L, respectively), and being responsible for the ‘sweet-like’ off-odor of Italian Aglianico del Vulture wines (Barata *et al.*, 2011; Tat *et al.*, 2007). Nonetheless, a study showed that the rejection threshold of PheAA was much higher than the concentrations in our present study, around 800 µg/L (Campo *et al.*, 2012).

Then, production of 4-vinylguaicaol was studied at the end of fermentation. This compound has a descriptor of clove, and can be detrimental to the wine. Indeed, the production of this compound can lead to the production of other unwanted volatile phenol such as 4-vinylphenol, that can bring aromas described as barnyard and medicinal (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

Interestingly, in this study, the production of 4-vinylguaicaol is 10 times higher after fermentation by *S. cerevisiae* than in the sequential fermentations. This observation shows that the use of non-*Saccharomyces* in this type of fermentations can reduce the production of off-flavors. In our conditions, no production of vanillin or phenylacetaldehyde was observed.

*Sensory analysis of the wines*

The chemical analysis described above suggests high differences in the volatile profile of the wines produced after sequential fermentations. A sensory analysis was performed to assess whether any perceptible differences exist between two wines (two replicates or two modalities), *i.e.* if judges were able to discriminate the different wines presented during triangular tests.

The first session of three triangular tests was carried out to find out whether wines resulting from repetitions A and B of each fermentation condition (SB/SC72, SB/SC96, SC) were perceived as different by panelists. To perform this step, three triangular tests were performed (one for each condition). The wines were tasted, and the sensory panel was asked to point out which wine was different. The results are presented in **Table 32**. Firstly, the discrimination ability of jury was assessed. Results showed that 15 judges (out of 29) were selective, removing the uncertainty of the results of the triangular tests, and confirming a judges consensus. Concerning the first three triangular tests, judges were unable to perceive differences between the two repetitions of one condition, with a maximum of 13 good answers for the comparison of replicates of the control (SC). This is congruent with the chemical analysis and the whole data presented before, that showed a good reproducibility of each condition. Due to these results, only one repetition of each condition was selected to perform the second session of three triangular tests, that aimed to confront each condition, to assess if the jury was able to differentiate wines from sequential fermentations (SB/SC72 and SB/SC96) and from pure culture (Control).

**Tableau 32: Triangular tests performed on produced wines by sequential fermentations or pure fermentation of *S. cerevisiae*.**

A: triangular tests between the two replicates of one condition ; B: triangular tests between the different conditions.  $\alpha$  risk: probability of a wrong answer when a judge says there was a difference.  $\beta$  risk: in case of no differences, risk taken when judges says the products are identical. SB/SC72 and SB/SC96: inoculation of *S. cerevisiae* after 72h or 96 h. SC: Pure fermentation of *S. cerevisiae*.

**A**

Conditions	Total answers	Correct answers	Proba $\alpha$ risk	Proba $\beta$ risk (50%)	Conclusion
SB/SC72a / SB/SC72b	29	12	0,2321	0,0014	No significant differences
SB/SC96a / SB/SC96b	29	7	0,8968	< 0,0001	No significant differences
SCa / SCb	29	13	0,1330	0,0045	No significant differences

**B**

Conditions	Total answers	Correct answers	Proba $\alpha$ risk	Proba $\beta$ risk (50%)	Conclusion
SB/SC72a / SB/SC72b	29	13	0,1330	0,0045	No significant differences
SB/SC96a / SB/SC96b	29	22	< 0,0001	0,8014	Significant differences
SCa / SCb	29	21	< 0,0001	0,6703	Significant differences

These results show that it is not possible for the judges to significantly discriminate the two conditions of sequential inoculation (SB/SC72 and SB/SC96), with only 13 judges who could differentiate them. On the contrary, 22 and 21 judges were able to distinguish a wine produced by sequential fermentation (SB/SC72 and SB/SC96, respectively) from a wine made by a pure culture of *S. cerevisiae*.

These results are also consistent with the previous chemical analysis, showing differences in the production of volatile compounds and carbon metabolites after sequential fermentations compared to the control. Nonetheless, the chemical analyses of the wines SB/SC72 and SB/SC96 were very close, explaining the difficulty of the judges to discriminate these two conditions.

Following on from this, trained judges were selected for the olfactory and sensory qualifications of the different wines. The descriptors selected were then used to perform a CATA profile. The judges were asked to select the descriptors for each tasted wine. Then, Cochran tests were used to determine which descriptors statistically stood out from the others (**Table 33**).

**Tableau 33: Results of the CATA profile for olfactory descriptors (A) and mouthfeel descriptors (B).**

The results were calculated by performing Cochran tests.

<b>A</b>		<b>B</b>	
<b>Descriptors</b>	<b><i>p</i>-values</b>	<b>Descriptors</b>	<b><i>p</i>-values</b>
Vinegar	0.646	Acid	0.867
Apricot jelly	0.360	Short	0.700
Alcohol	0.475	Greasy	0.637
Honey	0.714	Long-lasting	0.657
Almond	0.593	Alcoholic	0.552
Flowery	0.938	Bitter	0.751
<b>Fruity</b>	<b>0.063</b>	Aqueous	0.870
Strong intensity	0.605	Astringent	0.481
White fruits	0.690	Aromatic	0.954
Medium intensity	0.192	Fruity	0.566
Citrus	0.736		
Low intensity	0.202		

Only one olfactory descriptor was statistically highlighted, the fruity character, in favor of the control conditions. This result can be related to the chemical analysis of the wine produced by pure culture of *S. cerevisiae*. Indeed, higher concentrations of acetate esters (amyl acetate, isoamyl acetate, hexyl acetate, propyl acetate and 2-phenylethyl acetate) were found in the control wine, reaching a total of 7.4 mg/L (1.2 mg/L for the sequential conditions). Moreover, the concentrations of ethyl esters (ethyl butyrate, ethyl hexanoate, ethyl octanoate, ethyl decanoate, and ethyl dodecanoate) were higher for the control, reaching a total of 21.5 mg/L (9.5 mg/L for the sequential fermentations). These compounds are known to bring fruity notes to the wines, and can explain the differentiation of the control concerning the fruity character.

Surprisingly, despite the large chemical differences between the sequential fermentations and the control, no specific descriptor emerged. For instance, despite higher concentrations of acetic acid for SB/SC72 and SB/SC96, compared to the control (0.75 g/L, 0.8 g/L and 0.15 g/L, respectively), the vinegar descriptor was not highlighted for the sequential fermentations. In addition, the production of terpenes is supposed to confer flowery notes to the wines. But the *p*-value is the highest for this descriptor (0.938), showing that the production of these compounds was too low, under their odor threshold. The same observation can be made for the almond descriptor, typical for benzaldehyde. This absence of significant differences during the sensory analysis, regarding olfactory and sensory descriptors could be related to chemical interactions between some compounds. The high amount of glycerol after sequential fermentations (12.9 g/L and 13.4 g/L for the sequential fermentations) can also explain the absence of sensory differences. At this concentration, glycerol may participate to roundness in wines, but can also hide the differences, and the potential off-flavors (acetic acid, for instance).

During this study, we have shown that sequential fermentations using *Starm. bacillaris* and *S. cerevisiae* had an impact on the chemical compositions of the wines, compared to pure fermentations performed by *S. cerevisiae*. Firstly, regarding the main oenological parameters, higher productions of glycerol and organic acids, resulting in a decrease in ethanol content and an increase in the total and volatile acidity in the wines obtained after sequential fermentations. Overall, the aroma compounds were less produced during sequential fermentations, except for isobutanol derivatives and propanol. The online monitoring of the aroma compounds showed that the production of some major volatile compounds only began after *S. cerevisiae* inoculation, such as ethyl esters or acetate esters, while some compounds were already produced by *Starm. bacillaris* (isobutanol, propanol and octanoic acid). Terpene content of the wine was higher after sequential fermentations, but in concentrations lower than their perception

threshold. Online monitoring of acetaldehyde displayed different patterns between sequential fermentations and pure culture. This could highlight another impact of *Starm. bacillaris* on this aroma, by a decrease of the first peak of production, and the absence of the second peak. Benzaldehyde was also monitored to study the production kinetics of this compound, and compared it to acetaldehyde. The two compounds displayed completely different patterns. The benzaldehyde decrease should be investigated, in particular its complexation with SO<sub>2</sub>.

Sensory analysis was then performed in order to correlate the chemical differences with the sensory properties of the wines. Triangular tests showed that there was no significant differences between the repetitions of each condition, confirming the good reproducibility of the results. Then, they showed that judges were able to significantly differentiate the wines obtained after sequential fermentations and the control, even if they were not able to significantly describe the different wines.

This study is consistent with the studies showing that sequential fermentations are a matter of compromises, between the will to complete fermentation with the activity of *S. cerevisiae*, and the need to diversify the wines thanks to the use of non-*Saccharomyces* strains.

**Supplementary data**

**Table S1: Characteristics of the must used in this study.** Di-ammonium phosphate was used to adjust nitrogen content.

	<b>Viognier/ Maccabeu 2019</b>
Glucose (g/L)	110,2
Fructose (g/L)	108,2
Total sugars (g/L)	218,4
Yeast Assimilable Nitrogen (mgN/L)	87
Added YAN* (mgN/L)	120
Turbidité (NTU)	230

**Table S2: Triangular tests performed in this study.** SC: *S. cerevisiae* (Control) ; SB/SC72: inoculation of *S. cerevisiae* after 72 h of fermentation ; SB/SC96: inoculation of *S. cerevisiae* after 96 h of fermentation. Fermentations were performed in duplicates (A and B).

	<b>Compared wines</b>
Triangular test 1	SC A / SC B
Triangular test 2	SB/SC72 A / SB/SC72 B
Triangular test 3	SB/SC96 A / SB/SC96 B
Triangular test 4	SC A / SB/SC72 A
Triangular test 5	SC A / SB/SC96 A
Triangular test 6	SB/SC72 A / SB/SC96 A







---

# **DISCUSSION GENERALE**

---



Ce travail a été dédié à l'étude de la production de composés d'arômes non-conventionnels pendant la fermentation alcoolique par des levures issues du consortium œnologique. Ces molécules, bien que peu abondantes dans les vins, peuvent avoir un réel impact organoleptique par l'apport de notes florales, fruitées, ou encore amandées, permettant d'élargir la palette aromatique des vins et de se différencier dans un marché mondial concurrentiel particulièrement intense.

L'étude avait pour but d'apporter de nouvelles connaissances sur la production de ces arômes et de les exploiter pour favoriser la production de ces composés dans un contexte œnologique. Ce travail s'est focalisé sur 3 familles chimiques de composés volatils : les terpènes (notes florales), les dérivés benzéniques (notes amandées ou vanillées), et les lactones (notes fruitées). Ces cibles ont été définies en début de thèse par le groupe Pernod Ricard et la société Lallemand, partenaires industriels de la thèse. Ces molécules ont été choisies pour leur intérêt dans les vins et surtout dans les spiritueux de type Cognac, avec pour premier objectif de diversifier les profils organoleptiques des produits du groupe Pernod Ricard. D'autre part, ce groupe affiche la volonté de démarquer leurs produits par l'apport de caractéristiques sensorielles spécifiques à chaque marque, pouvant être apportées par les cibles aromatiques étudiées.

Le travail de thèse s'est tout d'abord axé sur l'obtention d'une image globale des levures à produire ces composés au cours de la fermentation, puis sur l'identification des voies métaboliques impliquées dans la formation d'un ou deux arômes non-conventionnels cibles ainsi que leurs régulations. L'utilisation de ces connaissances doit permettre d'élaborer des stratégies d'optimisation de la production des composés choisis, par évolution dirigée, par exemple. La mise en œuvre de cette étude a nécessité d'utiliser des outils de fermentation innovants (robot de fermentation PhenOFerm, suivi en ligne des composés volatils fermentaires majoritaires), ainsi que le développement et la validation d'une méthode de dosage spécifique aux molécules étudiées.

En accord avec nos partenaires industriels, nous avons focalisé notre étude sur trois familles de molécules. Le premier groupe chimique étudié a été les dérivés benzéniques, avec une attention particulière portée sur le benzaldéhyde. Cette molécule peut conférer des notes amandées aux vins, et participe à la complexité aromatique des vins même à des concentrations inférieures à son seuil de perception élevé (350 µg/L dans l'eau). Nous nous sommes également intéressés à la production de vanilline et de 4-vinylguaiacol (notes de clou de girofle), potentiel précurseur de vanilline, et surtout considéré comme précurseur des phénols volatils, négatifs pour les vins.

Le deuxième groupe chimique est celui des terpènes, qui apportent des notes florales (lilas, rose, muguet) aux vins lorsque le seuil de perception est dépassé (seuils variant entre 25 µg/L pour le linalool et 300 µg/L pour le nérol dans le vin modèle) (Pardo *et al.*, 2015). Les composés étudiés sont majoritairement des monoterpénols : linalool, géraniol, nérol, citronellol et  $\alpha$ -terpinéol, mais aussi l' $\alpha$ -citral et le  $\beta$ -citral, caractérisés par des notes citronnées puissantes et des seuils de perception plus faibles (30 µg/L) (Buttery *et al.*, 1989). Un sesquiterpène, la nootkatone, avec des notes de pamplemousse et un seuil de perception plus bas que les autres terpènes étudiés (1 µg/L dans l'eau), a également été intégrée à notre étude. Le troisième groupe de molécules d'intérêt est celui des lactones, aux notes fruitées aux vins (pêche, noix de coco), et en particulier, les  $\delta$ -lactones et les  $\gamma$ -lactones. Les  $\delta$ -lactones possèdent des seuils de perception plus élevés que les  $\gamma$ -lactones (350-400 µg/L contre 7-90 µg/L, dans l'eau). De manière générale, les lactones dérivent d'acides gras potentiellement présents dans les moûts de raisin (Tumanov *et al.*, 2018). Dans la littérature, les dérivés benzéniques et les terpènes ont surtout été étudiés en tant qu'arômes variétaux, présents sous la forme de précurseurs glycosylés dans les moûts de raisin (Ferreira & Lopez, 2019; Gunata *et al.*, 1985; Villena *et al.*, 2007). Nos objectifs sont d'évaluer quelles peuvent être les contributions des levures dans la production de ces composés, que ce soit par révélation des précurseurs (activités enzymatiques) ou par la synthèse *de novo* via leur métabolisme.

La première étape de la thèse portait sur la réalisation d'une cartographie des capacités des levures à produire des terpènes, des dérivés benzéniques, ou des lactones au cours de la fermentation œnologique. Au préalable, il a été nécessaire de développer et de valider une méthode d'extraction et d'analyse de ces composés, répondant au cahier des charges suivant : méthode rapide, fiable, juste, précise, et plus respectueuse de l'environnement que la plupart des autres méthodes par une utilisation moindre de solvants. Nous avons développé une méthode de type Direct Liquid Liquid Micro-Extraction (DLLME) reposant sur une microextraction utilisant un agent dispersif (acétone) et un agent extractant (dichlorométhane) couplée à une analyse par GC-MS. Cette méthode permet à la fois un gain de temps car une seule extraction est réalisée et de limiter fortement la quantité de solvants nécessaires à l'extraction (500 µL de dichlorométhane par extraction pour une DLLME, contre 2 mL pour une double extraction décrite par Rollero *et al.* (2015)). La méthode a ensuite été validée, en suivant la procédure décrite par Roland *et al.* (2010). La validation de la méthode a permis de montrer que la méthode est répétable (moins de 9 % de variation), reproductible (entre 6 % et 12 % de variation pour la majorité des composés), fidèle (entre 94 % et 105 % de recouvrement

pour l'ensemble des composés) et linéaire dans la gamme de concentrations rencontrées en œnologie (entre 10 et 200 µg/L). Ont été incluses dans l'étude 28 souches de *S. cerevisiae*, fournies par l'entreprise Lallemand, car c'est l'espèce la plus fréquemment utilisée en œnologie de par sa capacité à mener la fermentation jusqu'à l'épuisement complet des sucres (Sablayrolles, 2009), mais aussi 12 souches non-*Saccharomyces*, dont le contenu génétique peut conduire à des traits phénotypiques particuliers. Deux milieux naturels (Chardonnay 2016 et Ugni Blanc 2016) de composition très différente en terme de concentrations en sucres, en azote assimilable, en pH et en turbidité et un milieu synthétique dont la composition en azote et en sucres était identique à celle du Chardonnay 2016 ont été utilisés. Les productions d'arômes fermentaires (alcools supérieurs et leurs esters acétiques, acides à moyenne chaîne et leurs dérivés esters éthyliques) des levures non-*Saccharomyces* ont également été évaluées. Ce plan expérimental a permis d'évaluer les interactions souche-milieu sur la production des arômes étudiés et de différencier les capacités de synthèse *de novo* d'arômes non-conventionnels des levures de leur potentiel à les libérer à partir leurs précurseurs variétaux.

De façon générale, ce travail a montré la capacité des levures à produire *via* leur métabolisme, un grand nombre de composés volatils non-conventionnels : terpènes (géraniol, linalool, nérol, citronellol et  $\alpha$ -terpinéol), dérivés benzéniques (benzaldéhyde et alcool benzylique) et lactones ( $\gamma$ - et  $\delta$ -décalactones), complétant de façon exhaustive les données de la littérature sur cette thématique, jusqu'alors très parcellaires (Carrau *et al.*, 2005; Delfini *et al.*, 1991; Martin *et al.*, 2016b). Ce travail a permis de mettre en lumière l'impact du background génétique des souches dans la production des composés non-conventionnels. En effet, certaines souches se sont révélées être les meilleures productrices d'un composé ou d'une famille de composés, peu importe le moût utilisé pour la fermentation. C'est notamment le cas des deux souches de *Starm. bacillaris*, ayant produit *de novo* les plus grandes quantités de monoterpénols. De même, la souche *S. cerevisiae* L15 s'est révélée être la meilleure productrice de décalactones, dans les différentes conditions étudiées. Certains composés (linalool, géraniol, citronellol, alcool benzylique et benzaldéhyde) sont produits à la fois par le métabolisme intrinsèque des levures, mais également par la révélation de précurseurs. La part provenant de ces deux origines est variable selon les souches étudiées et les composés. Certains composés : la nootkatone, l' $\alpha$ -citral, le  $\beta$ -citral, la vanilline ou encore les deux octalactones ( $\gamma$ - et  $\delta$ -) sont uniquement produits en présence de précurseurs variétaux. Dans ce cas également, le niveau de révélation des arômes à partir de précurseurs variétaux dépend fortement de la souche de levure, et donc de leur capacité de production d'enzymes efficaces. La part des productions provenant des précurseurs

a été différente en fonction des souches, pouvant traduire des meilleures activités enzymatiques de la part de certaines souches. En effet, dans nos conditions, les souches *L. thermotolerans* 3775, *S. cerevisiae* L12 et *S. cerevisiae* L25 sont celles dont l'augmentation de la production des terpènes était la plus grande lors de l'utilisation du Chardonnay, comparé au MS (respectivement 77,2 %, 68,4 % et 55,2 %).

De manière générale, seule la production de géraniol et de linalool par *Starm. bacillaris* permettait d'obtenir des concentrations supérieures aux seuils de perception de ces composés. Bien que les concentrations de certains composés soient en-dessous des seuils de perception, il est possible que la somme de la quantité des divers composés ait un effet de synergie positif sur la qualité organoleptique des vins. Il peut néanmoins être opportun de trouver des stratégies pour augmenter la production de ces composés, que ce soit par amélioration génétique, ou par amélioration de la conduite de la fermentation. En effet, il serait intéressant d'étudier l'impact de certains paramètres environnementaux sur la production des composés non-conventionnels, de la même manière que certains auteurs ont étudié l'effet des paramètres environnementaux sur la production des métabolites du MCC ou des arômes fermentaires (Mouret *et al.*, 2015; Ochando *et al.*, 2017; Rollero *et al.*, 2015; Seguinot *et al.*, 2020a).

Les résultats produits au cours de cette étude constituent une base de données recensant les spécificités phénotypiques des levures vis-à-vis de la formation des arômes fermentaires majoritaires et non-conventionnels, afin d'améliorer les connaissances concernant la compréhension des mécanismes métaboliques et moléculaires sous-jacents à ces propriétés, et les exploiter dans un contexte œnologique. Dans cette optique, ce travail a souligné la particularité de la souche *Hanseniaspora osmophila* 4075, qui se caractérise par une production plus importante d'acétate de 2-phényléthyle que de 2-phényléthanol (23,5 mg/L et 14,5 mg/L, respectivement). Généralement, le rapport entre les niveaux de formation de ces deux molécules par les levures au cours de la fermentation est largement en faveur de l'alcool supérieur. L'acétate de 2-phényléthyle ne faisant pas partie des arômes d'intérêt pour nos partenaires, un projet parallèle effectué dans le cadre au cours d'un stage de fin d'études de 6 mois encadré durant la thèse (**Annexe 1**) a été initié afin d'élucider l'origine des fortes productions d'acétate de 2-phényléthyle de la souche de *H. osmophila* par des approches d'analyse fonctionnelle de gènes homologues à *ATF1*, impliqué dans la conversion de l'alcool supérieur en ester acétique, et de traçage isotopique.

Dans le cadre du projet de thèse, nous avons sélectionné deux souches de levure présentant des potentialités métaboliques intéressantes vis-à-vis de la production de composés volatils non-

conventionnels : *Starmerella bacillaris* 3800 pour ses capacités de production de dérivés benzéniques et de terpènes, pouvant apporter des notes respectives d'amande ou de fleurs aux vins et *S. cerevisiae* L15 pour étudier le métabolisme de formation des lactones qui peuvent conférer des notes de noix de coco et de pêche aux vins. Il s'est alors agi, pour chaque souche, d'élucider l'origine métabolique et d'identifier les facteurs qui modulent la formation des arômes conventionnels cibles.

Le deuxième volet de ce travail de thèse a donc porté sur la caractérisation des originalités métaboliques de *Starm. bacillaris* 3800, notamment pour la production de dérivés benzéniques et de terpènes et sur leur exploitation dans un contexte œnologique. Cette étude a tout d'abord permis d'aller plus loin dans la compréhension des spécificités phénotypiques de cette souche rapportées dans la littérature : caractère fructophile, capacité importante de production de glycérol aux dépens de celle d'éthanol (Englezos *et al.*, 2016a; Giaramida *et al.*, 2016; Rolle *et al.*, 2018), et de les analyser au regard des données de génomiques récemment acquises sur cette espèce (Gonçalves *et al.*, 2018 ; Gonçalves *et al.*, 2020). Ainsi, la réorientation des flux carbonés de la formation d'éthanol vers la formation de glycérol et acides du cycle TCA chez *Starm bacillaris* a pu être expliquée par la perte au cours de l'évolution des gènes homologues à *PDC1* et *ADH1*, suivie de l'acquisition de gènes équivalents d'origine bactérienne, conduisant à des protéines avec des caractéristiques cinétiques différentes (Gonçalves *et al.*, 2018). D'autre part, ce travail a montré des spécificités phénotypiques propres à la souche *Starm. bacillaris* 3800, notamment sa capacité à consommer une part importante du glucose du milieu ou sa forte production d'acétate. Ainsi, la souche *Starm. bacillaris* 3800 consomme plus de 60 % de glucose apporté dans le milieu alors que les souches décrites dans la littérature montrent des capacités très limitées dans la consommation du glucose (entre 5 et 10 g/L de glucose consommé au cours de la fermentation) (Englezos *et al.*, 2018). De plus, une variabilité entre souches de *Starm. bacillaris* dans leur niveau de production d'acide acétique semble se dégager à partir des données de la littérature. De nombreuses souches de *Starm. bacillaris* ont été décrites comme faibles productrices d'acide acétique (Di Maio *et al.*, 2016; Rantsiou *et al.*, 2012). Au contraire, les souches *Starm. bacillaris* 3800 (cette étude) et AR06 (Giaramida *et al.*, 2016) conduisent à des productions accrues d'acide acétique en fermentation mixte avec *S. cerevisiae*. Ces écarts pourraient être expliqués par la grande diversité génétique qui a été démontrée au sein l'espèce *Starm. bacillaris* (Masneuf-Pomarede *et al.*, 2015). Ces observations montrent qu'il est nécessaire d'avoir recours à une sélection appropriée des souches pour les diverses applications industrielles, en fonction des caractéristiques recherchées

dans le produit final, en prenant en compte l'ensemble du phénotype de la souche, que ce soit les avantages (diminution du titre alcoolique), ou les inconvénients (forte production d'acide acétique), dans le but de mettre en place des stratégies limitant l'apparition de potentiels défauts.

Un accent particulier a été mis sur l'étude des mécanismes mis en jeu dans la production d'arômes non-conventionnels par la souche *Starm. bacillaris 3800*, notamment les terpènes (notes florales aux vins) et les dérivés benzéniques (notes amandées). Le travail effectué s'est appuyé sur une caractérisation des dynamiques de production (en cultures pures et en fermentations séquentielles), et l'identification de l'origine métabolique de ces composés, ainsi que l'étude de l'impact des potentiels précurseurs sur leur production.

Notre étude a établi que la souche de *Starm. bacillaris 3800* était capable de synthétiser du benzaldéhyde et de l'alcool benzylique à des niveaux élevés, avec des concentrations maximales de 226 µg/L de benzaldéhyde (40 % des sucres consommés) et des teneurs finales dans les vins allant jusqu'à 60 µg/L. Les productions observées sont supérieures à celles de *S. cerevisiae* obtenues dans notre étude. Chez les levures non-*Saccharomyces*, une grande variabilité dans les capacités de production de benzaldéhyde a été mise en évidence, avec des concentrations allant de 244 µg/l (*Zygosaccharomyces bailii*) à 1,2 mg/L (*Schizosaccharomyces pombe*). Ces valeurs sont supérieures à celles mesurées dans ce travail mais toutefois, il est difficile d'établir une comparaison car les données ne correspondent pas à des concentrations dans les vins mais à des teneurs au moment de l'arrêt de fermentation par les NS (entre 3,5 et 8,8 % de titre alcoolique (v/v)). Les concentrations obtenues dans notre étude restent cependant bien souvent en deçà du seuil de perception du benzaldéhyde de (350 µg/L dans l'eau).

Peu d'informations sont disponibles concernant les concentrations de benzaldéhyde dans les vins. Dans les eaux-de-vie de Cognac, les concentrations en benzaldéhyde sont relativement faibles par rapport aux produits présentant un descripteur amandé plus marqué, comme les eaux-de-vie de Mirabelle (concentrations 15 à fois 20 supérieures) (Ledauphin *et al.*, 2010). Il serait donc intéressant d'obtenir des eaux-de-vie de Cognac plus concentrées en benzaldéhyde, permettant une meilleure diversification vis-à-vis des autres cognacs, et d'obtenir une réelle typicité apportée par ce composé, que ce soit par des notes amandées, ou - par le jeu des assemblages - par la complexité aromatique apportée par ce composé. Cela peut notamment être facilité par l'étape de distillation, permettant une concentration des composés volatils. Nous avons ainsi vérifié que le benzaldéhyde était bien transféré lors de la distillation, puisqu'il est retrouvé à plus de 25 % dans le distillat (**Annexe 2**). Une autre stratégie envisageable pour

augmenter la teneur en benzaldéhyde serait de modifier les paramètres fermentaires, en jouant sur le mode de conduite, ou en changeant les souches de levures utilisées. Une autre possibilité pour l'augmentation de la teneur en benzaldéhyde dans le produit final serait de récolter la vendange plus tardivement, puisque ce composé est souvent associé aux vins produits avec des raisins sur-mûris (Goetghebeur *et al.*, 1992). Néanmoins, la mise en place de ce type de vendange semble compliqué à mettre en place dans le contexte du Cognac.

En ce qui concerne l'origine métabolique des dérivés benzéniques, nous avons établi qu'une fraction mineure du PheAA issue de la dégradation de la Phe par la voie d'Ehrlich était convertie en benzaldéhyde par la voie du mandélate. Cela a donc mis en lumière le rôle de la voie d'Ehrlich-mandélate dans la production du benzaldéhyde chez *Starm. bacillaris* (cette voie est confirmée pour *S. cerevisiae* également). Au cours de cette étude, le rôle de régulateur du Trp a été mis en évidence, *via* la modulation de la distribution des flux autour du nœud du chorismate. Ce rôle de stimulateur de la synthèse de chorismate a précédemment été proposé, et semble confirmé (Martin *et al.*, 2016b). Ces connaissances ont servi de base pour définir une stratégie d'évolution dirigée afin d'améliorer le rendement de production de benzaldéhyde par *Starm. bacillaris*. Nous avons, en particulier, identifié que le verrou de production du benzaldéhyde se situait en aval du PheAA (flux principalement dirigé vers le 2-phényléthanol) et le rôle inhibiteur de la croissance de *Starm. bacillaris* au-delà de 250 mg/L. Ces caractéristiques font du PheAA une pression de sélection intéressante pour des approches d'évolution dirigée de la souche étudiée (expériences actuellement en cours), afin de déverrouiller la voie de conversion de cette molécule vers le benzaldéhyde. La difficulté de cette approche est d'améliorer la production de benzaldéhyde, sans altérer les avantages de l'utilisation de cette souche, tels que la réduction du rendement éthanol, ou encore la grande tolérance de cette souche vis-à-vis de l'éthanol.

Le suivi cinétique de la production des dérivés benzéniques a permis de mettre en évidence une accumulation continue des intermédiaires de dégradation de Phe par la voie Ehrlich-mandélate (PheALD et PheAA), surtout produits lors de la première partie de la fermentation par *Starm. bacillaris*. En revanche, nous avons montré une accumulation transitoire de benzaldéhyde, avec des productions maximales de 226 µg/L après la consommation de 34 % des sucres. Il est primordial d'identifier l'origine de la diminution importante de la concentration en benzaldéhyde au cours de la seconde partie de la fermentation alcoolique, qui est à l'origine directe des faibles concentrations en fin de fermentation (de 7 µg/L à 61 µg/L). Le point d'ébullition de ce composé étant de 178,1 °C, nous pouvons exclure les pertes par évaporation

au cours de la fermentation. La première hypothèse serait une conversion ultérieure de l'intermédiaire métabolique benzaldéhyde. Les pistes les plus probables sont la réduction de *cet* aldéhyde en alcool benzylique ou son oxydation en acide benzoïque. Néanmoins, ces deux hypothèses sont infirmées, puisque les concentrations en alcool benzylique et acide benzoïque n'augmentent pas lors de la diminution de la teneur en benzaldéhyde. Une autre hypothèse serait une conversion chimique directement liée à la structure de la molécule. Le fait que le 4-HBD (molécule équivalente au benzaldéhyde, *via* la dégradation de la Tyr par la voie Ehrlich-mandélate) ne suive pas le même profil est en accord avec cette hypothèse. Les aldéhydes sont en effet des espèces chimiques très réactives et on peut envisager une complexation du benzaldéhyde avec d'autres molécules du milieu. De tels phénomènes ont été décrits pour l'acétaldéhyde, qui se combine avec le SO<sub>2</sub> libre du milieu (Ochando *et al.*, 2020). Il serait intéressant d'étudier la réactivité du benzaldéhyde vis-à-vis du SO<sub>2</sub>, par l'ajout de benzaldéhyde dans un milieu (moût naturel et moût synthétique) préalablement sulfité, et d'étudier l'évolution de la concentration de benzaldéhyde libre au cours du temps.

Concernant l'origine métabolique de la synthèse *de novo* des terpènes, nos travaux ont montré que la leucine n'était pas un précurseur direct de la synthèse de ces composés chez *S. cerevisiae*, contrairement aux propositions de la littérature (Carrau *et al.*, 2005). La synthèse de ces molécules est probablement liée à la formation de l'intermédiaire IPP à partir d'acétyl-CoA. Cette hypothèse est également en accord avec la production plus importante d'acétate par *Starm. bacillaris*. Cela reste néanmoins à confirmer et à approfondir, par une analyse plus fine du devenir de l'acétyl-CoA. Des approches de marquage isotopique pourraient être envisagées, mais il est compliqué d'avoir recours à ce type d'étude concernant l'acétyl-CoA, de par son rôle de carrefour métabolique. Une autre possibilité serait d'augmenter le flux de synthèse d'acétyl-CoA de la souche de *Starm. bacillaris*, potentiellement en forçant la production d'acétate, ou en modifiant l'équilibre rédox. Pour cela, il serait intéressant de surexprimer ou déléter les gènes autour de l'acétyl-CoA, ou de jouer sur les conditions du milieu. Une fois la synthèse d'acétyl-CoA améliorée, il est nécessaire de favoriser la synthèse de terpènes aromatiques (monoterpénols), en limitant, par exemple, la synthèse de stérols (tout en maintenant la viabilité cellulaire) et en redirigeant le flux vers la synthèse des terpènes. Pour cela, une identification précise des voies de production des terpènes par la voie des stérols doit être menée chez *Starm. bacillaris*, afin de pouvoir ensuite moduler l'expression des gènes impliqués, par modification des paramètres environnementaux, ou par manipulation génétique.

La souche de *Starm. bacillaris* 3800 présente de fortes capacités de synthèse des monoterpénols (plus de 75 µg/L contre moins de 20 µg/L pour *S. cerevisiae*, dans les mêmes conditions) et une autre spécificité de cette souche est un équilibre entre les isomères de monoterpénols différent de celui de *S. cerevisiae*. En effet, le profil de production de terpènes de *Starm. bacillaris* se compose majoritairement de géraniol, linalool et  $\alpha$ -terpinéol, alors que *S. cerevisiae* synthétise essentiellement du géraniol, du linalool et du citronellol, en concentrations moindres que *Starm. bacillaris*. Il serait intéressant d'étudier les bases moléculaires à l'origine de ces équilibres différents de monoterpénols, qui semble être souche-dépendant, par exemple en élargissant la gamme de souches étudiées pour les deux espèces et en réalisant des ajouts de géraniol, linalool ou citronellol en début de fermentation pour suivre leur devenir. En parallèle, un milieu identique, mais non inoculé peut servir de témoin, et nous permettre de quantifier les transformations chimiques et les bioconversions enzymatiques liées à la souche utilisée.

La partie suivante du travail de thèse s'est focalisée sur l'étude de l'incidence d'une pré-inoculation de *Starm. bacillaris* sur le déroulement de la fermentation alcoolique par *S. cerevisiae*, et sur la qualité finale du produit, évaluée par analyses chimiques et sensorielle. L'analyse sensorielle permet notamment d'établir si les différences chimiques des vins peuvent se retrouver au niveau de la perception des consommateurs, et nous donner une vision « bout de chaîne ». Nous avons tout d'abord vérifié que le protocole d'inoculation suivi (ajout de *S. cerevisiae* EC1118 combiné à un ajout d'ammonium) n'avait aucune incidence sur les performances fermentaires de *S. cerevisiae* EC1118, indiquant que les deux souches mises en jeu sont compatibles, et n'affichent pas une compétition trop importante vis-à-vis des nutriments disponibles. A l'inverse, d'importants effets de la présence de *Starm. bacillaris* sur le profil chimique des vins ont été mis en évidence, qui peuvent être bénéfiques ou non vis-à-vis de la qualité en fonction du type de produit : vin ou spiritueux. L'utilisation de cette souche se traduit tout d'abord par une diminution de la concentration finale en éthanol (0,7 % (v/v) de moins). Cette diminution du titre alcoolique est un avantage non négligeable pour la production des vins dans un contexte de réchauffement climatique, mais en revanche, n'est pas nécessairement recherchée dans un contexte de Cognac et de distillation. L'augmentation de la concentration de glycérol (plus de 12,8 g/L pour les fermentations séquentielles) qui accompagne la diminution du titre alcoolique, permet d'apporter une certaine rondeur des vins, mais son impact à la distillation n'est pas connu, de même que son incidence sur le profil organoleptique des eaux-de-vie de Cognac. L'un des désavantages de l'utilisation de la souche SB3800 est la production plus importante d'acide acétique lors des fermentations séquentielles

à l'origine notamment d'une acidité volatile élevée (plus de 0,7 g/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> contre 0,2 g/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pour le témoin). Toutefois, cette concentration élevée en acide acétique n'est que peu perçue en dégustation, puisque le descripteur vinaigré n'a pas été mis en évidence lors de l'analyse sensorielle par profil CATA, bien que généré par certains dégustateurs avertis. Les vins obtenus en fermentation séquentielle étaient généralement moins concentrés en arômes fermentaires (alcools supérieurs, esters et acides), à l'exception de l'isobutanol et de l'acide isobutyrique, ainsi que de leurs dérivés esters, l'acétate d'isobutyle et l'isobutyrate d'éthyle. Ces vins se caractérisent également par une teneur plus élevée en monoterpènes, notamment géraniol, linalool et citronellol. Ces modifications sont en lien direct avec les spécificités de la souche *Starm. bacillaris* vis-à-vis de la gestion du pool d'acétyl-CoA. De manière surprenante, les concentrations obtenues en benzaldéhyde *et* alcool benzylique en fin de fermentations séquentielles sont inférieures à celles obtenues sur Chardonnay lors du screening. Cela peut s'expliquer par un niveau différent de complexation des dérivés benzéniques avec d'autres espèces chimiquement active du milieu, notamment lié à une procédure d'échantillonnage différente entre les deux séries d'expériences (avant consommation de la totalité des sucres sur Chardonnay et en fin de fermentation séquentielle). Il reste néanmoins crucial de trouver des solutions pour obtenir une concentration finale importante en benzaldéhyde. Cela nécessite des travaux complémentaires pour mieux comprendre l'origine de la diminution de la teneur en benzaldéhyde sur la seconde partie de la fermentation. En parallèle, il serait envisageable d'avoir recours à une fermentation séquentielle « inversée », en ajoutant la souche *Starm. bacillaris* en fin de fermentation de *S. cerevisiae*. En effet, nous avons montré que *Starm. bacillaris* était résistante à des hautes teneurs en éthanol, pouvant rendre possible son implantation au cours de la fermentation par *S. cerevisiae*, en procédant à l'ajout de certains nutriments lors de son inoculation (azote principalement, sous forme organique ou minérale, ainsi que la thiamine). Pour faciliter son implantation dans un milieu riche en éthanol, il serait envisageable de procéder à une adaptation à l'éthanol lors des étapes de préculture en milieu liquide, afin de limiter la perte de viabilité lors de l'inoculation. Un tel type de fermentation n'a encore jamais été mis en œuvre, mais mériterait d'être étudié dans le cadre de la production des dérivés benzéniques.

Malgré les différences de concentrations des divers composés entre les fermentations séquentielles et le témoin, l'analyse sensorielle n'a révélé aucune différence significative ( $p < 0,05$ ) pour les différents descripteurs. Le côté floral, conféré par les terpènes, n'a pas été significativement discriminant, de même que le descripteur amandé. Un seul descripteur olfactif

a été discriminant, le descripteur fruité, pour la condition témoin, mais à un seuil de significativité faible (p-value de 0,06). L'absence de différences sensorielles malgré de grandes différences chimiques peut en partie être expliquée par la forte production de glycérol lors des fermentations séquentielles (plus de 12,8 g/L), masquant les différences organoleptiques. Il est également possible que la matrice initiale soit peu aromatique, et il serait intéressant de tester un panel de moûts de cépages et de compositions différentes, et étudier si des effets sont observables ou pas.

La dernière famille de composés sélectionnée pour ce projet suite au screening de la collection de levures est les lactones, pouvant conférer des notes fruitées de pêche et de noix de coco aux vins. Les données bibliographiques s'accordent pour montrer que les lactones dérivent d'un acide gras précurseur (Romero-Guido *et al.*, 2011; Waché *et al.*, 2001). Dans le cas des décalactones, cet acide gras est l'acide ricinoléique. Notre objectif a alors été de montrer que la souche *S. cerevisiae* L15, sélectionnée pour sa capacité à produire *de novo* les  $\delta$ - et  $\gamma$ -décalactones, était capable de convertir l'acide ricinoléique en lactones, en conditions œnologiques. Toutefois, nous avons dû faire face à quelques problèmes méthodologiques, liés à la solubilisation de l'acide ricinoléique dans une matrice aqueuse de type vin ou moût (notamment pour des hautes concentrations, telles que 5 et 10 mg/L). Des essais d'ajout d'acide ricinoléique, que ce soit en seule source de lipides ou en présence de phytostérols, n'a eu aucune incidence sur la production des lactones. L'hypothèse privilégiée pour expliquer cette absence d'effet est une assimilation relativement faible de cet acide gras au cours de la fermentation, pouvant être liée à l'accessibilité de ce substrat pour les cellules. Il est nécessaire de s'assurer de la dissolution de l'acide ricinoléique dans le milieu, et d'évaluer la consommation de cet acide gras par la souche L15. Plusieurs études ont montré l'importance des facteurs environnementaux et génétiques sur la production des lactones. Chez *Yarrowia lipolytica*, il a notamment été montré que la production de  $\gamma$ -décalactone était meilleure en conditions d'hypoxie, car cela implique une diminution du flux dans la voie d'oxydation, menant à une quantité suffisante de NAD, empêchant la production de 3-hydroxydécalactone (peu aromatique) au profit de la  $\gamma$ -décalactone (Erandi Escamilla García *et al.*, 2007; García *et al.*, 2009b; Romero-Guido *et al.*, 2011). De plus, chez *Y. lipolytica*, les délétions des gènes *POX3*, *POX4* et *POX5*, impliqués dans la  $\beta$ -oxydation de l'acide ricinoléique ont eu pour conséquence une augmentation importante de la  $\gamma$ -décalactone, au détriment de la 3-hydroxydécalactone. Le gène *POX3* existe chez *S. cerevisiae* (sous le nom de *POT1*), mais l'existence de *POX4* ou *POX5* n'a pas encore été démontrée, bien que le gène *POX1* de *S. cerevisiae* présente des

homologies de séquence avec les gènes *POX4* et *POX5* de *Candida tropicalis* (Dmochowska *et al.*, 1990; Erdmann, 1994; Igual *et al.*, 1991; Mathieu *et al.*, 1997). Il serait ainsi intéressant d'étudier l'effet des délétions des gènes *POT1* et *POX1* chez *S. cerevisiae* sur la production des lactones.

Ce projet a permis de mettre en lumière les capacités intrinsèques de certaines levures œnologiques à produire *de novo* des composés originaux, pouvant avoir un réel impact organoleptique sur les vins, et dont les descripteurs répondent aux attentes des consommateurs. Les diverses particularités des levures sélectionnées pour la production des composés non-conventionnels ont été étudiées, et ont montré la spécificité de *Starm. bacillaris* 3800 dans la production de dérivés benzéniques et de terpènes, ainsi que de *S. cerevisiae* L15 dans la production de lactones. En revanche, certaines questions restent à élucider, à savoir l'identification et l'approfondissement des bases moléculaires de la régulation de la production de dérivés benzéniques, ainsi que la réponse de la production de ces composés à des facteurs environnementaux différents. Il reste également à élucider le mécanisme à l'origine de la diminution du benzaldéhyde au cours de la fermentation, notamment étudier sa combinaison bisulfite. Il serait également important de confirmer expérimentalement la relation entre le métabolisme des lipides et la production des terpènes, notamment chez *Starm. bacillaris*. De plus, que ce soit pour la formation des terpènes ou des lactones, nous avons pu montrer un lien entre la synthèse de ces composés et le métabolisme autour de l'acétyl-CoA, véritable carrefour métabolique. Il est donc envisageable de suivre son devenir, ou bien de trouver des solutions permettant de stimuler la synthèse de cette molécule, que ce soit par la modification de paramètres environnementaux, ou par manipulations génétiques afin d'élucider plus précisément son rôle dans la synthèse de certains arômes non-conventionnels. De surcroît, au-delà des diverses analyses chimiques réalisées au cours de ce projet de thèse, il reste néanmoins primordial d'avoir recours à l'analyse sensorielle afin de s'assurer que les concentrations obtenues ont un réel impact organoleptique sur le produit fini. Enfin, malgré le nombre important de souches non-*Saccharomyces* étudié au cours de ce travail, la diversité de ces espèces est extrêmement importante, et il serait intéressant d'utiliser les outils haut-débit afin de pouvoir étudier la production d'autres souches non-*Saccharomyces*, puisque certaines ont été décrites comme capables de produire certains composés non-conventionnels, tels que *Schizosaccharomyces pombe*, capable de produire du benzaldéhyde au cours de la fermentation, tout en étant capable de fermenter de manière satisfaisante (jusqu'à 8-9 % éthanol (v/v)) (Delfini *et al.*, 1991).





**Références bibliographiques**

- Agenbach, W.A., 1977. A study of must nitrogen content in relation to incomplete fermentations, yeast production and fermentation activity. *Proc. South Afr. Soc. Enol. Vitic* 66–87.
- Aguedo, M., Beney, L., Waché, Y., Belin, J.-M., 2003a. Interaction of an odorant lactone with model phospholipid bilayers and its strong fluidizing action in yeast membrane. *Int. J. Food Microbiol.* 80, 211–215.
- Aguedo, M., Beney, L., Waché, Y., Belin, J.-M., 2003b. Mechanisms underlying the toxicity of lactone aroma compounds towards the producing yeast cells. *J. Appl. Microbiol.* 94, 258–265.
- Aguedo, M., Beney, L., Waché, Y., Belin, J.-M., Gervais, P., 2002. Interaction of odorous lactones with phospholipids: implications in toxicity towards producing yeast cells. *Biotechnology Letters* 24, 1975–1979. <https://doi.org/10.1023/A:1021129800080>
- Albergaria, H., Arneborg, N., 2016. Dominance of *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation processes: role of physiological fitness and microbial interactions. *Appl Microbiol Biotechnol* 100, 2035–2046. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7255-0>
- Albertin, W., Marullo, P., Aigle, M., Dillmann, C., de Vienne, D., Bely, M., Sicard, D., 2011. Population Size Drives Industrial *Saccharomyces cerevisiae* Alcoholic Fermentation and Is under Genetic Control. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 2772–2784. <https://doi.org/10.1128/AEM.02547-10>
- Alchihab, M., Destain, J., Aguedo, M., Majad, L., Ghalfi, H., Wathelet, J.-P., Thonart, P., 2009. Production of gamma-decalactone by a psychrophilic and a mesophilic strain of the yeast *Rhodotorula aurantiaca*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 158, 41–50. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8297-x>
- Alchihab, M., Destain, J., Aguedo, M., Wathelet, J.-P., Thonart, P., 2010. The Utilization of Gum Tragacanth to Improve the Growth of *Rhodotorula aurantiaca* and the Production of  $\gamma$ -Decalactone in Large Scale. *Appl Biochem Biotechnol* 162, 233–241. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8739-0>
- Alexandre, H., Rousseaux, I., Charpentier, C., 1994. Relationship between ethanol tolerance, lipid composition and plasma membrane fluidity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. *FEMS Microbiology Letters* 124, 17–22. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb07255.x>
- Alimardani, P., Régnacq, M., Moreau-Vauzelle, C., Ferreira, T., Rossignol, T., Blondin, B., Bergès, T., 2004. SUT1-promoted sterol uptake involves the ABC transporter Aus1 and the mannoprotein Dan1 whose synergistic action is sufficient for this process. *Biochemical Journal* 381, 195–202. <https://doi.org/10.1042/BJ20040297>
- Andorrà, I., Berradre, M., Mas, A., Esteve-Zarzoso, B., Guillamón, J.M., 2012. Effect of mixed culture fermentations on yeast populations and aroma profile. *LWT* 49, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.04.008>
- Andreasen, A.A., Stier, T.J.B., 1954. Anaerobic nutrition of *saccharomyces cerevisiae*. II. Unsaturated fatty and requirement for growth in a defined medium. *J. Cell. Comp. Physiol.* 43, 271–281. <https://doi.org/10.1002/jcp.1030430303>
- Andreasen, A.A., Stier, T.J.B., 1953. Anaerobic nutrition of *Saccharomyces cerevisiae*. I. Ergosterol requirement for growth in a defined medium. *J. Cell. Comp. Physiol.* 41, 23–36. <https://doi.org/10.1002/jcp.1030410103>
- Ares, G., Deliza, R., Barreiro, C., Giménez, A., Gámbaro, A., 2010. Comparison of two sensory profiling techniques based on consumer perception. *Food Quality and Preference* 21, 417–426. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2009.10.006>

- Ares, G., Jaeger, S.R., 2013. Check-all-that-apply questions: Influence of attribute order on sensory product characterization. *Food Quality and Preference* 28, 141–153. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2012.08.016>
- Arslan, E., Çelik, Z., Cabaroğlu, T., 2018. Effects of Pure and Mixed Autochthonous *Torulaspota delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* on Fermentation and Volatile Compounds of Narince Wines. *Foods* 7, 147. <https://doi.org/10.3390/foods7090147>
- Awad, P., Athès, V., Decloux, M.E., Ferrari, G., Snackers, G., Raguenaud, P., Giampaoli, P., 2017. Evolution of Volatile Compounds during the Distillation of Cognac Spirit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65, 7736–7748. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02406>
- Azzolini, M., Tosi, E., Lorenzini, M., Finato, F., Zapparoli, G., 2015. Contribution to the aroma of white wines by controlled *Torulaspota delbrueckii* cultures in association with *Saccharomyces cerevisiae*. *World J Microbiol Biotechnol* 31, 277–293. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1774-1>
- Bailly, S., Jerkovic, V., Meurée, A., Timmermans, A., Collin, S., 2009. Fate of Key Odorants in Sauternes Wines through Aging. *J. Agric. Food Chem.* 57, 8557–8563. <https://doi.org/10.1021/jf901429d>
- Banilas, G., Sgouros, G., Nisiotou, A., 2016. Development of microsatellite markers for *Lachancea thermotolerans* typing and population structure of wine-associated isolates. *Microbiological Research* 193, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.08.010>
- Banthorpe, D.V., Long, D.R.S., Pink, C.R., 1983. Biosynthesis of geraniol and related monoterpenes in *Pelargonium graveolens*. *Phytochemistry* 22, 2459–2463. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(83\)80140-X](https://doi.org/10.1016/0031-9422(83)80140-X)
- Barata, A., Campo, E., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., Cacho, J., Ferreira, V., 2011. Analytical and sensorial characterization of the aroma of wines produced with sour rotten grapes using GC-O and GC-MS: identification of key aroma compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 2543–2553.
- Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., 2012. The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology* 153, 243–259. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.025>
- Barbosa, C., Mendes-Faia, A., Mendes-Ferreira, A., 2012. The nitrogen source impacts major volatile compounds released by *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 160, 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.10.003>
- Bataillon, M., Rico, A., Sablayrolles, J.-M., Salmon, J.-M., Barre, P., 1996. Early thiamin assimilation by yeasts under enological conditions: Impact on alcoholic fermentation kinetics. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 82, 145–150. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(96\)85037-9](https://doi.org/10.1016/0922-338X(96)85037-9)
- Belda, I., Ruiz, J., Esteban-Fernández, A., Navascués, E., Marquina, D., Santos, A., Moreno-Arribas, M., 2017. Microbial Contribution to Wine Aroma and Its Intended Use for Wine Quality Improvement. *Molecules* 22, 189. <https://doi.org/10.3390/molecules22020189>
- Bell, S.-J., Henschke, P.A., 2005. Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11, 242–295. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00028.x>
- 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. *International Journal of Food Microbiology* 121, 169–177. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.030>

- Bely, M., Sablayrolles, J.-M., Barre, P., 1990a. Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 70, 246–252. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(90\)90057-4](https://doi.org/10.1016/0922-338X(90)90057-4)
- Bely, M., Sablayrolles, J.M., Barre, P., 1990b. Description of alcoholic fermentation kinetics: its variability and significance. *American Journal of Enology and Viticulture* 319–324.
- Benito, A., Calderon, F., Benito, S., 2017. The Combined Use of *Schizosaccharomyces pombe* and *Lachancea thermotolerans*—Effect on the Anthocyanin Wine Composition. *Molecules* 22, 739. <https://doi.org/10.3390/molecules22050739>
- Berg, H.W., Filipello, F., Hinreiner, E., Webb, A.D., 1955. Evaluation of thresholds and minimum difference concentrations for various constituents of wines. I. Water solutions of pure substances. *Food Technology* 9, 23–262.
- Bergler, G., Nollet, V., Picou, C., Perez, M., Ortiz-Julien, A., Brulfert, M., Camarasa, C., Bloem, A., 2020. Dispersive Liquid-Liquid Microextraction for the Quantitation of Terpenes in Wine. *J. Agric. Food Chem.* [acs.jafc.9b08222](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b08222). <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b08222>
- Bertrand, A., Marly-Brugerolle, C., Sarre, Ch., 1978. Influence du débourage des moûts et du sulfitage sur les teneurs en substances volatiles des vins et des eaux-de-vie. 1. Etude des vins. *OENO One* 12, 35. <https://doi.org/10.20870/oenone.1978.12.1.1412>
- Bertrand, A., Torres-Alegre, V., 1984. Incidence de l'action de l'oxygène sur la formation des produits secondaires de la fermentation alcoolique du moût de raisin. *Science des Aliments* 4, 45–64.
- Betteridge, A.L., Sumby, K.M., Sundstrom, J.F., Grbin, P.R., Jiranek, V., 2018. Application of directed evolution to develop ethanol tolerant *Oenococcus oeni* for more efficient malolactic fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 102, 921–932. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8593-x>
- Bick, J.A., Lange, B.M., 2003. Metabolic cross talk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis: unidirectional transport of intermediates across the chloroplast envelope membrane. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 415, 146–154. [https://doi.org/10.1016/S0003-9861\(03\)00233-9](https://doi.org/10.1016/S0003-9861(03)00233-9)
- Bilbao, A., Irastorza, A., Dueñas, M., Fernandez, K., 1997. The effect of temperature on the growth of strains of *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* in apple juice fermentation. *Letters in Applied Microbiology* 24, 37–39. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.1997.00340.x>
- Bisson, L.F., 1991. Influence of nitrogen on yeast and fermentation of grapes.
- Blanco, P., Mirás-Avalos, J.M., Pereira, E., Orriols, I., 2013. Fermentative aroma compounds and sensory profiles of Godello and Albariño wines as influenced by *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains: Influence of yeast strains on wine chemical and sensory properties. *J. Sci. Food Agric.* 93, 2849–2857. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6122>
- Blank, L., Lehmbeck, F., Sauer, U., 2005. Metabolic-flux and network analysis in fourteen hemiascomycetous yeasts. *FEMS Yeast Research* 5, 545–558. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.09.008>
- Blateyron, L., Sablayrolles, J.M., 2001. Stuck and slow fermentations in enology: statistical study of causes and effectiveness of combined additions of oxygen and diammonium phosphate. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 91, 184–189. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(01\)80063-3](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(01)80063-3)
- Bloem, A., Bertrand, A., Lonvaud-Funel, A., De Revel, G., 2006. Vanillin production from simple phenols by wine-associated lactic acid bacteria: Vanillin production by lactic acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology* 44, 62–67. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02037.x>

- Bloem, A., Lonvaud-Funel, A., de Revel, G., 2008. Hydrolysis of glycosidically bound flavour compounds from oak wood by *Oenococcus oeni*. *Food Microbiology* 25, 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.07.009>
- Bloem, A., Sanchez, I., Dequin, S., Camarasa, C., 2016. Metabolic Impact of Redox Cofactor Perturbations on the Formation of Aroma Compounds in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 174–183. <https://doi.org/10.1128/AEM.02429-15>
- Blomberg, A., Adler, L., 1989. Roles of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD<sup>+</sup>) in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* 171, 1087–1092. <https://doi.org/10.1128/JB.171.2.1087-1092.1989>
- Blouin, J., Peynaud, E., 2012. *Connaissance et travail du vin*, 5e édition. ed. Dunod.
- Bohlmann, J., Meyer-Gauen, G., Croteau, R., 1998. Plant terpenoid synthases: Molecular biology and phylogenetic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 4126–4133. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.8.4126>
- Bohlscheid, J.C., Fellman, J.K., Wang, X.D., Ansen, D., Edwards, C.G., 2007. The influence of nitrogen and biotin interactions on the performance of *Saccharomyces* in alcoholic fermentations. *J Appl Microbiol* 102. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03180.x>
- Boidron, J.-N., Chatonnet, P., Pons, M., 1988. INFLUENCE DU BOIS SUR CERTAINES SUBSTANCES ODORANTES DES VINS. *Connaissance Vigne Vin* 22, 275–294.
- Bokulich, N.A., Thorngate, J.H., Richardson, P.M., Mills, D.A., 2014. PNAS Plus: From the Cover: Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, E139–E148. <https://doi.org/10.1073/pnas.1317377110>
- Bonnaïffoux, H., Delpech, S., Rémond, E., Schneider, R., Roland, A., Cavelier, F., 2018. Revisiting the evaluation strategy of varietal thiol biogenesis. *Food Chemistry* 268, 126–133. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.061>
- Botstein, D., Fink, G.R., 2011. Yeast: An Experimental Organism for 21st Century Biology. *Genetics* 189, 695–704. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.130765>
- Bouchilloux, P., Darriet, P., Henry, R., Lavigne-Cruège, V., Dubourdiou, D., 1998. Identification of Volatile and Powerful Odorous Thiols in Bordeaux Red Wine Varieties. *J. Agric. Food Chem.* 46, 3095–3099. <https://doi.org/10.1021/jf971027d>
- Bouvier, F., Rahier, A., Camara, B., 2005. Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. *Progress in Lipid Research* 44, 357–429.
- Bradbury, J.E., Richards, K.D., Niederer, H.A., Lee, S.A., Rod Dunbar, P., Gardner, R.C., 2006. A homozygous diploid subset of commercial wine yeast strains. *Antonie Van Leeuwenhoek* 89, 27–37. <https://doi.org/10.1007/s10482-005-9006-1>
- Broun, P., Shanklin, J., Whittle, E., Somerville, C., 1998. Catalytic plasticity of fatty acid modification enzymes underlying chemical diversity of plant lipids. *Science* 282, 1315–1317.
- Buttery, R.G., Teranishi, R., Flath, R.A., Ling, L.C., 1989. Fresh Tomato Volatiles: Composition and Sensory Studies, in: Teranishi, R., Buttery, R.G., Shahidi, F. (Eds.), *Flavor Chemistry*, ACS Symposium Series. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 213–222. <https://doi.org/10.1021/bk-1989-0388.ch017>
- Cabrita, M.J., Freitas, A.M.C., Laureano, O., di Stefano, R., 2006. Glycosidic aroma compounds of some Portuguese grape cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86, 922–931.
- Cadahía, E., Varea, S., Muñoz, L., Fernández de Simón, B., García-Vallejo, M.C., 2001. Evolution of Ellagitannins in Spanish, French, and American Oak Woods during Natural Seasoning and Toasting. *J. Agric. Food Chem.* 49, 3677–3684. <https://doi.org/10.1021/jf010288r>

- 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. *Metabolic Engineering* 13, 263–271. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2011.01.008>
- Cai, H., Hauser, M., Naider, F., Becker, J.M., 2007. Differential Regulation and Substrate Preferences in Two Peptide Transporters of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* 6, 1805–1813. <https://doi.org/10.1128/EC.00257-06>
- Camarasa, C., Grivet, J.-P., Dequin, S., 2003. Investigation by <sup>13</sup>C-NMR and tricarboxylic acid (TCA) deletion mutant analysis of pathways for succinate formation in *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic fermentation. *Microbiology* 149, 2669–2678. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26007-0>
- Camarasa, C., Sanchez, I., Brial, P., Bigey, F., Dequin, S., 2011. Phenotypic Landscape of *Saccharomyces cerevisiae* during Wine Fermentation: Evidence for Origin-Dependent Metabolic Traits. *PLoS ONE* 6, e25147. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025147>
- Cameleyre, M., Lytra, G., Tempere, S., Barbe, J.-C., 2015. Olfactory Impact of Higher Alcohols on Red Wine Fruity Ester Aroma Expression in Model Solution. *J. Agric. Food Chem.* 63, 9777–9788. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03489>
- Campo, E., Saenz-Navajas, M.P., Cacho, J., Ferreira, V., 2012. Consumer rejection threshold of ethyl phenylacetate and phenylacetic acid, compounds responsible for the sweet-like off odour in wines made from sour rotten grapes. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 18, 280–286. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2012.00198.x>
- Cardillo, R., Fuganti, C., Barbeni, M., Allegrone, G., 1993. Procédé pour la préparation de delta lactones saturées par biohydrogénation des composés insaturés naturels correspondants à l'aide de microorganismes. EP0577463A2.
- Carey, F.A., Giuliano, R.M., 2016. *Organic chemistry*, Tenth edition. ed. McGraw-Hill Education, New York, NY.
- Carrau, F.M., Medina, K., Boido, E., Farina, L., Gaggero, C., Dellacassa, E., Versini, G., Henschke, P.A., 2005. De novo synthesis of monoterpenes by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* 243, 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.11.050>
- Carrau, F.M., Medina, K., Farina, L., Boido, E., Henschke, P.A., Dellacassa, E., 2008. Production of fermentation aroma compounds by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts: effects of yeast assimilable nitrogen on two model strains. *FEMS Yeast Research* 8, 1196–1207. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00412.x>
- Casalta, E., Vernhet, A., Sablayrolles, J.-M., Tesniere, C., Salmon, J.-M., 2016. Review: Characterization and Role of Grape Solids during Alcoholic Fermentation under Enological Conditions. *American Journal of Enology and Viticulture* 67, 133–138. <https://doi.org/10.5344/ajev.2015.15060>
- Cavaliere, D., McGovern, P.E., Hartl, D.L., Mortimer, R., Polsinelli, M., 2003. Evidence for *S. cerevisiae* Fermentation in Ancient Wine. *Journal of Molecular Evolution* 57, S226–S232. <https://doi.org/10.1007/s00239-003-0031-2>
- Cerdán, T.G., Ancín-Azpilicueta, C., 2006. Effect of oak barrel type on the volatile composition of wine: Storage time optimization. *LWT - Food Science and Technology* 39, 199–205. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.01.009>
- Charoenchai, C., Fleet, G.H., Henschke, P.A., 1998. Effects of Temperature, pH, and Sugar Concentration on the Growth Rates and Cell Biomass of Wine Yeasts. *American Journal of Enology and Viticulture* 49, 283–288.
- Chatonnet, P., Boidron, J.-N., Pons, M., 1989. Incidence du traitement thermique du bois de chêne sur sa composition chimique. 2e partie : évolution de certains composés en

- fonction de l'intensité de brûlage. *OENO One* 23, 223. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.1989.23.4.1722>
- Chen, F., Tholl, D., Bohlmann, J., Pichersky, E., 2011. The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom: Terpene synthase family. *The Plant Journal* 66, 212–229. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04520.x>
- Ciani, M., Capece, A., Comitini, F., Canonico, L., Siesto, G., Romano, P., 2016a. Yeast Interactions in Inoculated Wine Fermentation. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00555>
- Ciani, M., Comitini, F., 2015. Yeast interactions in multi-starter wine fermentation. *Current Opinion in Food Science* 1, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2014.07.001>
- Ciani, M., Morales, P., Comitini, F., Tronchoni, J., Canonico, L., Curiel, J.A., Oro, L., Rodrigues, A.J., Gonzalez, R., 2016b. Non-conventional Yeast Species for Lowering Ethanol Content of Wines. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00642>
- Clark, G.S., 1990. Vanillin. *Perfumer & Flavorist* 15, 45–54.
- Combina, M., Elía, A., Mercado, L., Catania, C., Ganga, A., Martinez, C., 2005. Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. *International Journal of Food Microbiology* 99, 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.08.017>
- Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., Ciani, M., 2011. Selected non-Saccharomyces wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology* 28, 873–882. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.12.001>
- Cordero-Bueso, G., Esteve-Zarzoso, B., Cabellos, J.M., Gil-Díaz, M., Arroyo, T., 2013. Biotechnological potential of non-Saccharomyces yeasts isolated during spontaneous fermentations of Malvar (*Vitis vinifera* cv. L.). *Eur Food Res Technol* 236, 193–207. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1874-9>
- Crépin, L., Nidelet, T., Sanchez, I., Dequin, S., Camarasa, C., 2012. Sequential Use of Nitrogen Compounds by *Saccharomyces cerevisiae* during Wine Fermentation: a Model Based on Kinetic and Regulation Characteristics of Nitrogen Permeases. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 8102–8111. <https://doi.org/10.1128/AEM.02294-12>
- Crépin, L., Truong, N.M., Bloem, A., Sanchez, I., Dequin, S., Camarasa, C., 2017. Management of Multiple Nitrogen Sources during Wine Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 83, e02617-16, /aem/83/5/e02617-16.atom. <https://doi.org/10.1128/AEM.02617-16>
- Csoma, H., Sipiczki, M., 2008. Taxonomic reclassification of *Candida stellata* strains reveals frequent occurrence of *Candida zemplinina* in wine fermentation. *FEMS Yeast Research* 8, 328–336. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2007.00339.x>
- Da Silveira, M.G., Abee, T., 2009. Activity of ethanol-stressed *Oenococcus oeni* cells: a flow cytometric approach. *Journal of Applied Microbiology* 106, 1690–1696. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04136.x>
- 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. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.67>
- Darriet, P., Tominaga, T., Lavigne, V., Boidron, J.-N., Dubourdieu, D., 1995. Identification of a powerful aromatic component of *Vitis vinifera* L. var. sauvignon wines: 4-mercapto-4-methylpentan-2-one. *Flavour Fragr. J.* 10, 385–392. <https://doi.org/10.1002/ffj.2730100610>

- Davis, C.R., Wibowo, D., Lee, T.H., Fleet, G.H., 1985. Practical Implications of Malolactic Fermentation: A Review. *American Journal of Enology and Viticulture* 36, 290–301.
- de-la-Fuente-Blanco, A., Sáenz-Navajas, M.-P., Ferreira, V., 2016. On the effects of higher alcohols on red wine aroma. *Food Chemistry* 210, 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.021>
- Delcroix, A., Gunata, Z., Sapis, J.-C., Salmon, J.-M., Bayonove, C., 1994. Glycosidase Activities of Three Enological Yeast Strains During Winemaking: Effect on the Terpenol Content of Muscat Wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 45, 291–296.
- Delfini, C., Gaia, P., Bardi, L., Mariscolo, G., Contiero, M., Pagliara, A., 1991. Production of benzaldehyde, benzyl alcohol and benzoic acid by yeasts and *Botrytis cinerea* isolated from grape musts and wines. *Vitis* 30, 253–263.
- Delobel, P., Pradal, M., Blondin, B., Tesniere, C., 2012. A ‘fragile cell’ sub-population revealed during cytometric assessment of *Saccharomyces cerevisiae* viability in lipid-limited alcoholic fermentation: Yeast viability in lipid-limited media. *Letters in Applied Microbiology* 55, 338–344. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03301.x>
- Dequin, S., Casaregola, S., 2011. The genomes of fermentative *Saccharomyces*. *Comptes Rendus Biologies* 334, 687–693. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2011.05.019>
- Deroite, A., Legras, J.-L., Rigou, P., Ortiz-Julien, A., Dequin, S., 2018. Lipids modulate acetic acid and thiol final concentrations in wine during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* × *Saccharomyces kudriavzevii* hybrids. *AMB Expr* 8, 130. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0657-5>
- Di Maio, S., Genna, G., Gandolfo, V., Amore, G., Ciaccio, M., Oliva, D., 2016. Presence of *Candida zemplinina* in Sicilian Musts and Selection of a Strain for Wine Mixed Fermentations. *SAJEV* 33. <https://doi.org/10.21548/33-1-1309>
- Díaz-Maroto, M.C., Schneider, R., Baumes, R., 2005. Formation Pathways of Ethyl Esters of Branched Short-Chain Fatty Acids during Wine Aging. *J. Agric. Food Chem.* 53, 3503–3509. <https://doi.org/10.1021/jf048157o>
- Dickinson, J.R., Salgado, L.E.J., Hewlins, M.J.E., 2003. The Catabolism of Amino Acids to Long Chain and Complex Alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 278, 8028–8034. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211914200>
- Dizy, M., Bisson, L.F., 2000. Proteolytic Activity of Yeast Strains During Grape Juice Fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture* 51, 155–167.
- Dmochowska, A., Dignard, D., Maleszka, R., Thomas, D.Y., 1990. Structure and transcriptional control of the *Saccharomyces cerevisiae* POX1 gene encoding acyl-coenzyme A oxidase. *Gene* 88, 247–252. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(90\)90038-s](https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90038-s)
- du Toit, M., Pretorius, I.S., 2000. Microbial Spoilage and Preservation of Wine: Using Weapons from Nature’s Own Arsenal -A Review. *SAJEV* 21. <https://doi.org/10.21548/21-1-3559>
- Duarte, F.L., Pimentel, N.H., Teixeira, A., Fonseca, Á., 2012. *Saccharomyces bacillaris* is not a synonym of *Candida stellata*: reinstatement as *Starmerella bacillaris* comb. nov. *Antonie van Leeuwenhoek* 102, 653–658. <https://doi.org/10.1007/s10482-012-9762-7>
- Duc, C., Pradal, M., Sanchez, I., Noble, J., Blondin, B., Tesnière, C., 2020. Specific gene regulations of non-usual micronutrient starvations leading to cell death during wine fermentation. *OENO One* 54, 359–371. <https://doi.org/10.20870/oenone.2020.54.2.2970>
- Dufosse, L., 1994. Importance des lactones dans les arômes alimentaires: structure, distribution, propriétés sensorielles. *Science des Aliments* 14, 17–50.
- Dufosse, L., Souchon, I., Feron, G., Latrasse, A., Spinnler, H.E., 1999. In Situ Detoxification of the Fermentation Medium during  $\gamma$ -Decalactone Production with the Yeast

- Sporidiobolus salmonicolor. Biotechnol. Prog. 15, 135–139. <https://doi.org/10.1021/bp980113a>
- Dukes, B.C., Butzke, C.E., 1998. Rapid determination of primary amino acids in grape juice using an o-phthaldialdehyde/N-acetyl-L-cysteine spectrophotometric assay. American Journal of Enology and Viticulture 125–134.
- Edwards, C.G., Bohlscheid, J.C., 2007. Impact of pantothenic acid addition on H<sub>2</sub>S production by Saccharomyces under fermentative conditions. Enzyme and Microbial Technology 41, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.03.002>
- Egli, C.M., Edinger, W.D., Mittrakul, C.M., Henick-Kling, T., 1998. Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effect on the sensory character of Riesling and Chardonnay wines. Journal of Applied Microbiology 85, 779–789. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00521.x>
- Elskens, M.T., Jaspers, C.J., Penninckx, M.J., 1991. Glutathione as an endogenous sulphur source in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Journal of General Microbiology 137, 637–644. <https://doi.org/10.1099/00221287-137-3-637>
- Endrizzi, A., Awadé, A.C., Belin, J.-M., 1993. Presumptive involvement of methyl ricinoleate  $\beta$ -oxydation in the production of  $\gamma$ -decalactone by the yeast Pichia guilliermondii. FEMS Microbiology Letters 114, 153–160.
- Endrizzi, A., Pagot, Y., Le Clainche, A., Nicaud, J.M., Belin, J.M., 1996. Production of lactones and peroxisomal beta-oxidation in yeasts. Crit. Rev. Biotechnol. 16, 301–329. <https://doi.org/10.3109/07388559609147424>
- Engel, K.H., Flath, R.A., Buttery, R.G., Mon, T.R., Ramming, D.W., Teranishi, R., 1988. Investigation of volatile constituents in nectarines. 1. Analytical and sensory characterization of aroma components in some nectarine cultivars. J. Agric. Food Chem. 36, 549–553. <https://doi.org/10.1021/jf00081a036>
- Englezos, V., Cocolin, L., Rantsiou, K., Ortiz-Julien, A., Bloem, A., Dequin, S., Camarasa, C., 2018. Specific Phenotypic Traits of Starmerella bacillaris Related to Nitrogen Source Consumption and Central Carbon Metabolite Production during Wine Fermentation. Applied and Environmental Microbiology 84. <https://doi.org/10.1128/AEM.00797-18>
- Englezos, V., Giacosa, S., Rantsiou, K., Rolle, L., Cocolin, L., 2017. Starmerella bacillaris in winemaking: opportunities and risks. Current Opinion in Food Science 17, 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.08.007>
- Englezos, V., Rantsiou, K., Cravero, F., Torchio, F., Ortiz-Julien, A., Gerbi, V., Rolle, L., Cocolin, L., 2016a. Starmerella bacillaris and Saccharomyces cerevisiae mixed fermentations to reduce ethanol content in wine. Appl Microbiol Biotechnol 100, 5515–5526. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7413-z>
- Englezos, V., Rantsiou, K., Torchio, F., Rolle, L., Gerbi, V., Cocolin, L., 2015. Exploitation of the non-Saccharomyces yeast Starmerella bacillaris (synonym Candida zemplinina) in wine fermentation: Physiological and molecular characterizations. International Journal of Food Microbiology 199, 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.01.009>
- Englezos, V., Torchio, F., Cravero, F., Marengo, F., Giacosa, S., Gerbi, V., Rantsiou, K., Rolle, L., Cocolin, L., 2016b. Aroma profile and composition of Barbera wines obtained by mixed fermentations of Starmerella bacillaris (synonym Candida zemplinina ) and Saccharomyces cerevisiae. LWT 73, 567–575. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.063>
- Erdmann, R., 1994. The peroxisomal targeting signal of 3-oxoacyl-CoA thiolase from Saccharomyces cerevisiae. Yeast 10, 935–944. <https://doi.org/10.1002/yea.320100708>
- Eschenbruch, R., 1974. Hydrogen sulphide production from sulphite by Saccharomyces cerevisiae. American Journal of Enology and Viticulture 25, 157–161.

- Escott, C., Loira, I., Morata, A., Bañuelos, M.A., Suárez-Lepe, J.A., 2017. Wine Spoilage Yeasts: Control Strategy, in: Morata, A., Loira, I. (Eds.), *Yeast - Industrial Applications*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.69942>
- Escribano, R., González-Arenzana, L., Garijo, P., Berlanas, C., López-Alfaro, I., López, R., Gutiérrez, A.R., Santamaría, P., 2017. Screening of enzymatic activities within different enological non-Saccharomyces yeasts. *J Food Sci Technol* 54, 1555–1564. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2587-7>
- 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 Fruitness of Wines. *J. Agric. Food Chem.* 55, 4501–4510. <https://doi.org/10.1021/jf0636418>
- Etievant, P.X., 1991. *Volatile Compounds in Foods and Beverages*, Food Science and Technology. ed. Henk Maarse.
- Fairbairn, S., McKinnon, A., Musarurwa, H.T., Ferreira, A.C., Bauer, F.F., 2017. The Impact of Single Amino Acids on Growth and Volatile Aroma Production by *Saccharomyces cerevisiae* Strains. *Front. Microbiol.* 8, 2554. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02554>
- Farbood, M., 1991. Octalactone-containing composition, fermentation process for producing same and organoleptic uses thereof. Patent US719154. 719154.
- Farbood, M., Kizer, L.E., Morris, J.A., Harris, G., McLean, L.B., 1999. Process for preparing saturated lactones, products produced therefrom and organoleptic uses of said products. EP0952226A1.
- Fedrizzi, B., Magno, F., Badocco, D., Nicolini, G., Versini, G., 2007. Aging Effects and Grape Variety Dependence on the Content of Sulfur Volatiles in Wine. *J. Agric. Food Chem.* 55, 10880–10887. <https://doi.org/10.1021/jf072145w>
- Fenoll, J., Manso, A., Hellin, P., Ruiz, L., Flores, P., 2009. Changes in the aromatic composition of the *Vitis vinifera* grape Muscat Hamburg during ripening. *Food Chemistry* 114, 420–428. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.060>
- Feron, G., Dufosse, L., Pierard, E., Bonnarme, P., Quere, J.L., Spinnler, H., 1996. Production, Identification, and Toxicity of (gamma)-Decalactone and 4-Hydroxydecanoic Acid from *Sporidiobolus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2826–2831.
- Feron, G., Waché, Y., 2005. Microbial Biotechnology of Food Flavor Production, in: Shetty, K., Paliyath, G., Pometto, A., Levin, R. (Eds.), *Food Biotechnology*, Second Edition, Food Science and Technology. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420027976.ch1.16>
- Ferreira, V., Lopez, R., 2019. The Actual and Potential Aroma of Winemaking Grapes. *Biomolecules* 9, 818. <https://doi.org/10.3390/biom9120818>
- Ferreira, V., López, R., Cacho, J., 2000. Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 1659–1667.
- Fiore, M., Degrassi, F., 1999. Dimethyl Sulfoxide Restores Contact Inhibition-Induced Growth Arrest and Inhibits Cell Density-Dependent Apoptosis in Hamster Cells. *Experimental Cell Research* 251, 102–110. <https://doi.org/10.1006/excr.1999.4542>
- Fleet, G.H. (Ed.), 1993. *Wine: microbiology and biotechnology*. Taylor & Francis, London.
- Foster, P.L., 1999. Mechanisms of Stationary Phase Mutation: A Decade of Adaptive Mutation. *Annu. Rev. Genet.* 33, 57–88. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.33.1.57>
- Fraatz, M.A., Berger, R.G., Zorn, H., 2009. Nootkatone—a biotechnological challenge. *Applied Microbiology and Biotechnology* 83, 35–41. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1968-x>
- Francis, I.L., Kassara, S., Noble, A.C., Williams, P.J., 1998. The Contribution of Glycoside Precursors to Cabernet Sauvignon and Merlot Aroma: Sensory and Compositional

- Studies, in: Waterhouse, A.L., Ebeler, S.E. (Eds.), *Chemistry of Wine Flavor*. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 13–30. <https://doi.org/10.1021/bk-1998-0714.ch002>
- Frick, O., Wittmann, C., 2005. Characterization of the metabolic shift between oxidative and fermentative growth in *Saccharomyces cerevisiae* by comparative <sup>13</sup>C flux analysis. *Microb Cell Fact* 4, 30. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-4-30>
- Fujii, T., Kobayashi, O., Yoshimoto, H., Furukawa, S., Tamai, Y., 1997. Effect of aeration and unsaturated fatty acids on expression of the *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyltransferase gene. *Applied and environmental microbiology* 63, 910–915. <https://doi.org/10.1128/AEM.63.3.910-915.1997>
- Fujii, T., Nagasawa, N., Iwamatsu, A., Bogaki, T., Tamai, Y., Hamachi, M., 1994. Molecular cloning, sequence analysis, and expression of the yeast alcohol acetyltransferase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2786–2792.
- Fujiwara, D., Kobayashi, O., Yoshimoto, H., Harashima, S., Tamai, Y., 1999. Molecular mechanism of the multiple regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* ATF1 gene encoding alcohol acetyltransferase. *Yeast* 15, 1183–1197. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(19990915\)15:12<1183::AID-YEA444>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(19990915)15:12<1183::AID-YEA444>3.0.CO;2-J)
- 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017872>
- Galeote, V., Novo, M., Salema-Oom, M., Brion, C., Valério, E., Gonçalves, P., Dequin, S., 2010. FSY1, a horizontally transferred gene in the *Saccharomyces cerevisiae* EC1118 wine yeast strain, encodes a high-affinity fructose/H<sup>+</sup> symporter. *Microbiology* 156, 3754–3761. <https://doi.org/10.1099/mic.0.041673-0>
- Gancedo, J.M., 2008. The early steps of glucose signalling in yeast. *FEMS Microbiol Rev* 32, 673–704. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00117.x>
- Ganga, M.A., Martinez, C., 2004. Effect of wine yeast monoculture practice on the biodiversity of non-*Saccharomyces* yeasts. *J Appl Microbiol* 96, 76–83. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02080.x>
- Gao, C., Fleet, G.H., 1988. The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of the wine yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* and *Kloeckera apiculata*. *Journal of Applied Bacteriology* 65, 405–409. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1988.tb01909.x>
- García, E.E., Aguedo, M., Gomes, N., Choquet, A., Belo, I., Teixeira, J.A., Belin, J.-M., Waché, Y., 2009a. Production of 3-hydroxy- $\gamma$ -decalactone, the precursor of two decenolides with flavouring properties, by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 57, 22–26. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2008.06.010>
- García, E.E., Aguedo, M., Gomes, N., Choquet, A., Belo, I., Teixeira, J.A., Belin, J.-M., Waché, Y., 2009b. Production of 3-hydroxy- $\gamma$ -decalactone, the precursor of two decenolides with flavouring properties, by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 57, 22–26. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2008.06.010>
- García, E., Escamilla, Belin, J.-M., Waché, Y., 2007. Use of a Doehlert factorial design to investigate the effects of pH and aeration on the accumulation of lactones by *Yarrowia lipolytica*. *J. Appl. Microbiol.* 103, 1508–1515. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03379.x>
- García, Erandi Escamilla, Nicaud, J.-M., Belin, J.-M., Waché, Y., 2007. Effect of acyl-CoA oxidase activity on the accumulation of  $\gamma$ -decalactone by the yeast *Yarrowia lipolytica*:

- A factorial approach. *Biotechnol. J.* 2, 1280–1285. <https://doi.org/10.1002/biot.200700085>
- García, M., Esteve-Zarzoso, B., Arroyo, T., 2016. Non-Saccharomyces Yeasts: Biotechnological Role for Wine Production, in: Morata, A., Loira, I. (Eds.), *Grape and Wine Biotechnology*. InTech. <https://doi.org/10.5772/64957>
- García-Muñoz, S., Asproudi, A., Cabello, F., Borsa, D., 2011. Aromatic characterization and enological potential of 21 minor varieties (*Vitis vinifera* L.). *Eur Food Res Technol* 233, 473–481. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1538-1>
- Gatfield, I.L., Güntert, M., Werkhoff, P., 1993. Some aspects of the microbiological production of flavor: active lactones with particular reference to  $\gamma$ -decalactone. *Chem Mikrobiol Technol Lebensm* 15, 165–170.
- Genovese, A., Gambuti, A., Piombino, P., Moio, L., 2007. Sensory properties and aroma compounds of sweet Fiano wine. *Food Chemistry* 103, 1228–1236. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.10.027>
- Gershenson, J., Dudareva, N., 2007. The function of terpene natural products in the natural world. *Nat Chem Biol* 3, 408–414. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2007.5>
- Giaramida, P., Ponticello, G., Di Maio, S., Squadrito, M., Genna, G., Barone, E., Scacco, A., Corona, O., Amore, G., di Stefano, R., Oliva, D., 2016. *Candida zemplinina* for Production of Wines with Less Alcohol and More Glycerol. *SAJEV* 34. <https://doi.org/10.21548/34-2-1095>
- Giovanna, S., Maria, S., Manuel, S., Rosa Maria, M., Giuseppe, F., Irene, A., Rosanna, T., 2012. Multistarter from Organic Viticulture for Red Wine Montepulciano d’Abruzzo Production. *Front. Microbio.* 3. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00135>
- Gobert, A., Tourdot-Maréchal, R., Morge, C., Sparrow, C., Liu, Y., Quintanilla-Casas, B., Vichi, S., Alexandre, H., 2017. Non-Saccharomyces Yeasts Nitrogen Source Preferences: Impact on Sequential Fermentation and Wine Volatile Compounds Profile. *Front. Microbiol.* 8, 2175. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02175>
- Godard, P., Urrestarazu, A., Vissers, S., Kontos, K., Bontempi, G., van Helden, J., Andre, B., 2007. Effect of 21 Different Nitrogen Sources on Global Gene Expression in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 27, 3065–3086. <https://doi.org/10.1128/MCB.01084-06>
- Goetghebeur, M., Nicolas, M., Brun, S., Galzy, P., 1992. Purification and Properties of Benzyl Alcohol Oxidase from *Botrytis cinerea*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 56, 298–303. <https://doi.org/10.1271/bbb.56.298>
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S.G., 1996. Life with 6000 Genes. *Science* 274, 546–567. <https://doi.org/10.1126/science.274.5287.546>
- Gombert, A.K., Moreira dos Santos, M., Christensen, B., Nielsen, J., 2001. Network Identification and Flux Quantification in the Central Metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* under Different Conditions of Glucose Repression. *Journal of Bacteriology* 183, 1441–1451. <https://doi.org/10.1128/JB.183.4.1441-1451.2001>
- Gómez García-Carpintero, E., Sánchez-Palomo, E., Gómez Gallego, M.A., González-Viñas, M.A., 2012. Free and bound volatile compounds as markers of aromatic typicalness of Moravia Dulce, Rojal and Tortosí red wines. *Food Chemistry* 131, 90–98. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.08.035>
- Gomez-Cordoves, M.C., Khayyat, N., 1983. Effect of yeasts on aldehydes and phenolic acids present in Spanish grape musts [1982].

- Gonçalves, C., Coelho, M.A., Salema-Oom, M., Gonçalves, P., 2016. Stepwise Functional Evolution in a Fungal Sugar Transporter Family. *Mol Biol Evol* 33, 352–366. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv220>
- Gonçalves, C., Wisecaver, J.H., Kominek, J., Oom, M.S., Leandro, M.J., Shen, X.-X., Opulente, D.A., Zhou, X., Peris, D., Kurtzman, C.P., Hittinger, C.T., Rokas, A., Gonçalves, P., 2018. Evidence for loss and reacquisition of alcoholic fermentation in a fructophilic yeast lineage. *eLife* 7, e33034. <https://doi.org/10.7554/eLife.33034>
- Gonçalves, P., Gonçalves, C., Brito, P.H., Sampaio, J.P., 2020. The *Wickerhamiella/Starmerella* clade—A treasure trove for the study of the evolution of yeast metabolism. *Yeast* 37, 313–320. <https://doi.org/10.1002/yea.3463>
- Gondry, M., Dubois, J., Terrier, M., Lederer, F., 2001. The catalytic role of tyrosine 254 in flavocytochrome *b<sub>2</sub>* (L-lactate dehydrogenase from baker's yeast): Comparison between the Y254F and Y254L mutant proteins. *European Journal of Biochemistry* 268, 4918–4927. <https://doi.org/10.1046/j.0014-2956.2001.02424.x>
- Goniak, O.J., Noble, A.C., 1987. Sensory study of selected volatile sulfur compounds in white wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 38, 223–227.
- Grenson, M., 1966. Multiplicity of the amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 127, 339–346. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(66\)90388-6](https://doi.org/10.1016/0304-4165(66)90388-6)
- Groguenin, A., Waché, Y., Garcia, E.E., Aguedo, M., Husson, F., Le Dall, M.-T., Nicaud, J.-M., Belin, J.-M., 2004. Genetic engineering of the  $\beta$ -oxidation pathway in the yeast *Yarrowia lipolytica* to increase the production of aroma compounds. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 28, 75–79. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2004.01.006>
- Gunata, Y.Z., Bayonove, C.L., Baumes, R.L., Cordonnier, R.E., 1985. The aroma of grapes I. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components. *Journal of Chromatography A* 331, 83–90. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(85\)80009-1](https://doi.org/10.1016/0021-9673(85)80009-1)
- Gunata, Z., Bitteur, S., Brillouet, J.-M., Bayonove, C., Cordonnier, R., 1988. Sequential enzymic hydrolysis of potentially aromatic glycosides from grape. *Carbohydrate Research* 184, 139–149. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(88\)80012-0](https://doi.org/10.1016/0008-6215(88)80012-0)
- Haas, J.W., 2000. The Reverend Dr William Henry Dallinger, F.R.S. (1839-1909). *Notes and records of the Royal Society of London* 54, 53–65.
- Hagen, K.M., Keller, M., Edwards, C.G., 2008. Survey of Biotin, Pantothenic Acid, and Assimilable Nitrogen in Winegrapes from the Pacific Northwest. *American Journal of Enology and Viticulture* 59, 432.
- Hall, C.E., Husson, F., Kermasha, S., 2004. Characterization of an enriched lipoxigenase extract from *Aspergillus niger* in terms of specificity and nature of flavor precursors production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 29, 201–209. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2003.11.013>
- Hallinan, C.P., Saul, D.J., Jiranek, V., 1999. Differential utilisation of sulfur compounds for H<sub>2</sub>S liberation by nitrogen-starved wine yeasts. *Aust J Grape Wine Res* 5, 82–90. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.1999.tb00291.x>
- 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. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 2259–2266. <https://doi.org/10.1128/AEM.02625-07>
- Heard, G.M., Fleet, G.H., 1988. The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. *Journal of Applied Bacteriology* 65, 23–28. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1988.tb04312.x>

- Hinnebusch, A.G., 2005. Translational Regulation of *GCN4* and the General Amino Acid Control of Yeast OF. *Annu. Rev. Microbiol.* 59, 407–450. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.59.031805.133833>
- Hirano, M., Hirano, K., Nishimura, J., Kanaide, H., 2001. Transcriptional Up-regulation of p27Kip1 during Contact-Induced Growth Arrest in Vascular Endothelial Cells. *Experimental Cell Research* 271, 356–367. <https://doi.org/10.1006/excr.2001.5384>
- Hohmann, S., Huse, K., Valentin, E., Mbonyi, K., Thevelein, J.M., Zimmermann, F.K., 1992. Glucose-induced regulatory defects in the *Saccharomyces cerevisiae* *byp1* growth initiation mutant and identification of *MIG1* as a partial suppressor. *Journal of Bacteriology* 174, 4183–4188. <https://doi.org/10.1128/JB.174.12.4183-4188.1992>
- Holm Hansen, E., Nissen, P., Sommer, P., Nielsen, J.C., Arneborg, N., 2001. The effect of oxygen on the survival of non-*Saccharomyces* yeasts during mixed culture fermentations of grape juice with *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl Microbiol* 91, 541–547. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01426.x>
- Holzer, H., Goedde, H.W., 1957. Two ways from pyruvate to acetyl-coenzyme A in yeast. *Biochem Z* 329, 175–191.
- Hu, K., Jin, G.-J., Xu, Y.-H., Tao, Y.-S., 2018. Wine aroma response to different participation of selected *Hanseniaspora uvarum* in mixed fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Research International* 108, 119–127. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.037>
- Husson, F., Bompas, D., Kermasha, S., Belin, J.M., 2001. Biogenesis of 1-octen-3-ol by lipoxygenase and hydroperoxide lyase activities of *Agaricus bisporus*. *Process Biochemistry* 37, 177–182. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(01\)00201-1](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00201-1)
- 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. *Journal of Food Composition and Analysis* 21, 672–683. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.06.005>
- Igual, J.C., Matallaná, E., Gonzalez-Bosch, C., Franco, L., Pérez-Ortín, J.E., 1991. A new glucose-repressible gene identified from the analysis of chromatin structure in deletion mutants of yeast *SUC2* locus. *Yeast* 7, 379–389. <https://doi.org/10.1002/yea.320070408>
- Jackson, R.S., 2008. Chemical Constituents of Grapes and Wine, in: *Wine Science*. Elsevier, pp. 270–331. <https://doi.org/10.1016/B978-012373646-8.50009-3>
- Jagtap, U.B., Bapat, V.A., 2015. Wines from fruits other than grapes: Current status and future prospectus. *Food Bioscience* 9, 80–96. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2014.12.002>
- Jeong, H., Lee, S.J., Kim, P., 2016. Procedure for Adaptive Laboratory Evolution of Microorganisms Using a Chemostat. *JoVE* 54446. <https://doi.org/10.3791/54446>
- Jiang, B., Xi, Z., Luo, M., Zhang, Z., 2013. Comparison on aroma compounds in Cabernet Sauvignon and Merlot wines from four wine grape-growing regions in China. *Food Research International* 51, 482–489. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.01.001>
- Jiang, J., Sumby, K.M., Sundstrom, J.F., Grbin, P.R., Jiranek, V., 2018. Directed evolution of *Oenococcus oeni* strains for more efficient malolactic fermentation in a multi-stressor wine environment. *Food Microbiology* 73, 150–159. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.01.005>
- Jiranek, V., Langridge, P., Henschke, P.A., 1995. Regulation of hydrogen sulfide liberation in wine-producing *Saccharomyces cerevisiae* strains by assimilable nitrogen. *Applied and environmental microbiology* 61, 461–467. <https://doi.org/10.1128/AEM.61.2.461-467.1995>
- Jolly, N.P., Augustyn, O.P.H., Pretorius, I.S., 2006. The Role and Use of Non-*Saccharomyces* Yeasts in Wine Production. *SAJEV* 27. <https://doi.org/10.21548/27-1-1475>

- Jolly, N.P., Varela, C., Pretorius, I.S., 2014. Not your ordinary yeast: non- *Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Res* 14, 215–237. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12111>
- Jones, R.P., Greenfield, P.F., 1987. Ethanol and the fluidity of the yeast plasma membrane. *Yeast* 3, 223–232. <https://doi.org/10.1002/yea.320030403>
- Julien, A., Roustan, J.-L., Dulau, L., Sablayrolles, J.-M., 2000. Comparison of Nitrogen and Oxygen Demands of Enological Yeasts: Technological Consequences. *American Journal of Enology and Viticulture* 215–222.
- Jun, Hong-Young, 최성호, Kim, Young-Man, Jung, Eun-Joo, Oh, Gi-Su, Joo, Sung-Jin, Kim, Sunghyun, Kim, Il Kwang, 2010. Evaluation of Antioxidant Activities and Active Compounds Separated from Water Soluble Extracts of Korean Black Pine Barks. *Bulletin of the Korean Chemical Society* 31, 3567–3572. <https://doi.org/10.5012/BKCS.2010.31.12.3567>
- Kapsopoulou, K., Kapaklis, A., Spyropoulos, H., 2005. Growth and Fermentation Characteristics of a Strain of the Wine Yeast *Kluyveromyces thermotolerans* Isolated in Greece. *World J Microbiol Biotechnol* 21, 1599–1602. <https://doi.org/10.1007/s11274-005-8220-3>
- Kaur, B., Chakraborty, D., 2013. Biotechnological and Molecular Approaches for Vanillin Production: a Review. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 169, 1353–1372. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-0066-1>
- Kemsawasd, V., Viana, T., Ardö, Y., Arneborg, N., 2015. Influence of nitrogen sources on growth and fermentation performance of different wine yeast species during alcoholic fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 99, 10191–10207. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6835-3>
- King, A., Dickinson, J., 2003. Biotransformation of hop aroma terpenoids by ale and lager yeasts. *FEMS Yeast Research* 3, 53–62. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(02\)00141-1](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(02)00141-1)
- King, A., Dickinson, J., 2000. Biotransformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulasporea delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* 16, 499–506. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(200004\)16:6<499::AID-YEA548>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(200004)16:6<499::AID-YEA548>3.0.CO;2-E)
- Kuchen, B., Maturano, Y.P., Mestre, M.V., Combina, M., Toro, M.E., Vazquez, F., 2019. Selection of Native Non-Saccharomyces Yeasts with Biocontrol Activity against Spoilage Yeasts in Order to Produce Healthy Regional Wines. *Fermentation* 5, 60. <https://doi.org/10.3390/fermentation5030060>
- Kurtzman, C.P. (Ed.), 2011. *The yeasts: a taxonomic study*, 5. ed. ed. Elsevier, Amsterdam.
- 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 - A Review. *SAJEV* 21. <https://doi.org/10.21548/21-1-3560>
- Lapadatescu, C., Giniès, C., Le Quééré, J.L., Bonnarne, P., 2000. Novel scheme for biosynthesis of aryl metabolites from L-phenylalanine in the fungus *Bjerkandera adusta*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1517–1522. <https://doi.org/10.1128/aem.66.4.1517-1522.2000>
- Ledauphin, J., Le Milbeau, C., Barillier, D., Hennequin, D., 2010. Differences in the Volatile Compositions of French Labeled Brandies (Armagnac, Calvados, Cognac, and Mirabelle) Using GC-MS and PLS-DA. *J. Agric. Food Chem.* 58, 7782–7793. <https://doi.org/10.1021/jf9045667>
- Legras, J.-L., Galeote, V., Bigey, F., Camarasa, C., Marsit, S., Nidelet, T., Sanchez, I., Couloux, A., Guy, J., Franco-Duarte, R., Marcet-Houben, M., Gabaldon, T., Schuller, D.,

- Sampaio, J.P., Dequin, S., 2018. Adaptation of *S. cerevisiae* to Fermented Food Environments Reveals Remarkable Genome Plasticity and the Footprints of Domestication. *Molecular Biology and Evolution* 35, 1712–1727. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy066>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03266.x>
- Lemos Junior, W.J.F., Binati, R.L., Felis, G.E., Slaghenaufi, D., Ugliano, M., Torriani, S., 2020. Volatile organic compounds from *Starmerella bacillaris* to control gray mold on apples and modulate cider aroma profile. *Food Microbiology* 89, 103446. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103446>
- Lemos Junior, W.J.F., da Silva Duarte, V., Treu, L., Campanaro, S., Nadai, C., Giacomini, A., Corich, V., 2018. Whole genome comparison of two *Starmerella bacillaris* strains with other wine yeasts uncovers genes involved in modulating important winemaking traits. *FEMS Yeast Research* 18. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foy069>
- Leppanen, O.A., Denslow, J., Ronkainen, P.P., 1980. Determination of thiolacetates and some other volatile sulfur compounds in alcoholic beverages. *J. Agric. Food Chem.* 28, 359–362. <https://doi.org/10.1021/jf60228a028>
- Li, M., Petteys, B.J., McClure, J.M., Valsakumar, V., Bekiranov, S., Frank, E.L., Smith, J.S., 2010. Thiamine Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* Is Regulated by the NAD<sup>+</sup>-Dependent Histone Deacetylase Hst1. *Molecular and Cellular Biology* 30, 3329–3341. <https://doi.org/10.1128/MCB.01590-09>
- 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.
- 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., Nguyen, A.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. <https://doi.org/10.1038/nature07743>
- Liu, S.-Q., Pilone, G.J., 2000. An overview of formation and roles of acetaldehyde in winemaking with emphasis on microbiological implications. *International Journal of Food Science & Technology* 35, 49–61. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2000.00341.x>
- Ljungdahl, P.O., Daignan-Fornier, B., 2012. Regulation of Amino Acid, Nucleotide, and Phosphate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 190, 885–929. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.133306>
- Loira, I., Vejarano, R., Bañuelos, M.A., Morata, A., Tesfaye, W., Uthurry, C., Villa, A., Cintora, I., Suárez-Lepe, J.A., 2014. Influence of sequential fermentation with *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* on wine quality. *LWT - Food Science and Technology* 59, 915–922. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.06.019>
- Lomascolo, A., Asther, M., Navarro, D., Antona, C., Delattre, M., Lesage-Meessen, L., 2001. Shifting the biotransformation pathways of L-phenylalanine into benzaldehyde by *Trametes suaveolens* CBS 334.85 using HP20 resin. *Lett. Appl. Microbiol.* 32, 262–267.
- López, M.C., Mateo, J.J., Maicas, S., 2015. Screening of  $\beta$ -Glucosidase and  $\beta$ -Xylosidase Activities in Four Non- *Saccharomyces* Yeast Isolates: Glycosidasic activities from wine yeasts.... *Journal of Food Science* 80, C1696–C1704. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12954>

- Loscos, N., Hernández-Orte, P., Cacho, J., Ferreira, V., 2010. Evolution of the aroma composition of wines supplemented with grape flavour precursors from different varieties during accelerated wine ageing. *Food Chemistry* 120, 205–216. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.10.008>
- Loureiro, V., 2003. Spoilage yeasts in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology* 86, 23–50. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00246-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00246-0)
- Lynen, F., 1964. The pathway from activated acetic acid to the terpenes and fatty acids.
- 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. *European Journal of Biochemistry* 112, 431–442. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1980.tb06105.x>
- Lytra, G., Franc, C., Cameleyre, M., Barbe, J.-C., 2017. Study of Substituted Ester Formation in Red Wine by the Development of a New Method for Quantitative Determination and Enantiomeric Separation of Their Corresponding Acids. *J. Agric. Food Chem.* 65, 5018–5025. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00979>
- Macfie, H.J., Bratchell, Nicholas., Greenhoff, Keith., Vallis, L.V., 1989. DESIGNS TO BALANCE THE EFFECT OF ORDER OF PRESENTATION AND FIRST-ORDER CARRY-OVER EFFECTS IN HALL TESTS. *J Sensory Studies* 4, 129–148. <https://doi.org/10.1111/j.1745-459X.1989.tb00463.x>
- Maga, J.A., 1976. Lactones in foods. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr* 8, 1–56.
- Magasanik, B., Kaiser, C.A., 2002. Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 290, 1–18. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(02\)00558-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(02)00558-9)
- Magyar, I., Nyitrai-Sárdy, D., Leskó, A., Pomázi, A., Kállay, M., 2014. Anaerobic organic acid metabolism of *Candida zemplinina* in comparison with *Saccharomyces* wine yeasts. *International Journal of Food Microbiology* 178, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.03.002>
- Malcorps, P., Cheval, J.M., Jamil, S., Dufour, J.P., 1991. A New Model for the Regulation of Ester Synthesis by Alcohol Acetyltransferase in *Saccharomyces Cerevisiae* during Fermentation. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 49, 47–53. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-49-0047>
- Marais, J., 1983. Terpenes in the Aroma of Grapes and Wines: A Review. *SAJEV* 4. <https://doi.org/10.21548/4-2-2370>
- Marini, A.M., Soussi-Boudekou, S., Vissers, S., Andre, B., 1997. A family of ammonium transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 17, 4282–4293. <https://doi.org/10.1128/MCB.17.8.4282>
- Marsit, S., 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* 32, 1695–1707. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv057>
- Marsit, S., Sanchez, I., Galeote, V., Dequin, S., 2016. Horizontally acquired oligopeptide transporters favour adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast to oenological environment: Impact of HGT genes on yeast metabolic pathways. *Environ Microbiol* 18, 1148–1161. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13117>
- Martin, V., Boido, E., Giorello, F., Mas, A., Dellacassa, E., Carrau, F., 2016a. Effect of yeast assimilable nitrogen on the synthesis of phenolic aroma compounds by *Hanseniaspora vineae* strains: Role of *Hanseniaspora vineae* phenylpropanoids in wine flavour. *Yeast* 33, 323–328. <https://doi.org/10.1002/yea.3159>
- Martin, V., Giorello, F., Fariña, L., Minteguiga, M., Salzman, V., Boido, E., Aguilar, P.S., Gaggero, C., Dellacassa, E., Mas, A., Carrau, F., 2016b. *De Novo* Synthesis of Benzenoid Compounds by the Yeast *Hanseniaspora vineae* Increases the Flavor

- Diversity of Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64, 4574–4583. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05442>
- Masneuf-Pomarede, I., Bely, M., Marullo, P., Albertin, W., 2016. The Genetics of Non-conventional Wine Yeasts: Current Knowledge and Future Challenges. *Front. Microbiol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01563>
- Masneuf-Pomarede, I., Juquin, E., Miot-Sertier, C., Renault, P., Laizet, Y., Salin, F., Alexandre, H., Capozzi, V., Cocolin, L., Colonna-Ceccaldi, B., Englezos, V., Girard, P., Gonzalez, B., Lucas, P., Mas, A., Nisiotou, A., Sipiczki, M., Spano, G., Tassou, C., Bely, M., Albertin, W., 2015. The yeast *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) shows high genetic diversity in winemaking environments. *FEMS Yeast Research* 15, fov045. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov045>
- Mateo, J., Maicas, S., 2016. Application of Non-Saccharomyces Yeasts to Wine-Making Process. *Fermentation* 2, 14. <https://doi.org/10.3390/fermentation2030014>
- Mathew, S., Abraham, T.E., Sudheesh, S., 2007. Rapid conversion of ferulic acid to 4-vinyl guaiacol and vanillin metabolites by *Debaryomyces hansenii*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 44, 48–52. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2006.09.001>
- Mathieu, M., Modis, Y., Zeelen, J.P., Engel, C.K., Abagyan, R.A., Ahlberg, A., Rasmussen, B., Lamzin, V.S., Kunau, W.H., Wierenga, R.K., 1997. The 1.8 Å crystal structure of the dimeric peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase of *Saccharomyces cerevisiae*: implications for substrate binding and reaction mechanism. *J Mol Biol* 273, 714–728. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1331>
- Mauricio, J.C., Guijo, S., Ortega, J.M., 1991. Relationship Between Phospholipid and Sterol Contents in *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii* and their Fermentation Activity in Grape Musts. *American Journal of Enology and Viticulture* 42, 301.
- Mauricio, J.C., Millán, C., Ortega, J.M., 1998. Influence of oxygen on the biosynthesis of cellular fatty acids, sterols and phospholipids during alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 14, 405–410. <https://doi.org/10.1023/A:1008873430077>
- Max, B., Tugores, F., Cortés-Diéguez, S., Domínguez, J.M., 2012. Bioprocess Design for the Microbial Production of Natural Phenolic Compounds by *Debaryomyces hansenii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 168, 2268–2284. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9935-x>
- McBryde, C., Gardner, J.M., de Barros Lopes, M., Jiranek, V., 2006. Generation of novel yeast strains by adaptive evolution. *American Journal of Enology and Viticulture* 57, 423–430.
- McGovern, P.E., Zhang, J., Tang, J., Zhang, Z., Hall, G.R., Moreau, R.A., Nunez, A., Butrym, E.D., Richards, M.P., Wang, C. -s., Cheng, G., Zhao, Z., Wang, C., 2004. Fermented beverages of pre- and proto-historic China. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 17593–17598. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407921102>
- McKay, A.M., 1990. Degradation of polygalacturonic acid by *Saccharomyces cerevisiae*. *Lett Appl Microbiol* 11, 41–44. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1990.tb00132.x>
- Medina, K., Boido, E., Dellacassa, E., Carrau, F., 2012. Growth of non-Saccharomyces yeasts affects nutrient availability for *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 157, 245–250. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.012>
- Medina, K., Boido, E., Fariña, L., Gioia, O., Gomez, M.E., Barquet, M., Gaggero, C., Dellacassa, E., Carrau, F., 2013. Increased flavour diversity of Chardonnay wines by spontaneous fermentation and co-fermentation with *Hanseniaspora vineae*. *Food Chemistry* 141, 2513–2521. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.056>

- Mestre Furlani, M.V., Maturano, Y.P., Combina, M., Mercado, L.A., Toro, M.E., Vazquez, F., 2017. Selection of non-Saccharomyces yeasts to be used in grape musts with high alcoholic potential: a strategy to obtain wines with reduced ethanol content. *FEMS Yeast Research* 17. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox010>
- Mestres, M., Busto, O., Guasch, J., 2000. Analysis of organic sulfur compounds in wine aroma. *Journal of Chromatography A* 881, 569–581. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00220-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00220-X)
- Michlmayr, H., Nauer, S., Brandes, W., Schumann, C., Kulbe, K.D., del Hierro, A.M., Eder, R., 2012. Release of wine monoterpenes from natural precursors by glycosidases from *Oenococcus oeni*. *Food Chemistry* 135, 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.099>
- 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. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 57, 2094–2098. <https://doi.org/10.1271/bbb.57.2094>
- Molina, A.M., Swiegers, J.H., Varela, C., Pretorius, I.S., Agosin, E., 2007. Influence of wine fermentation temperature on the synthesis of yeast-derived volatile aroma compounds. *Appl Microbiol Biotechnol* 77, 675–687. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1194-3>
- Morakul, S., Mouret, J.-R., Nicolle, P., 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. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0827-4>
- Morakul, S., Mouret, J.-R., Nicolle, P., Trelea, I.C., Sablayrolles, J.-M., Athès, V., 2011. Modelling of the gas–liquid partitioning of aroma compounds during wine alcoholic fermentation and prediction of aroma losses. *Process Biochemistry* 46, 1125–1131. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.01.034>
- Morales, P., Rojas, V., Quirós, M., Gonzalez, R., 2015. The impact of oxygen on the final alcohol content of wine fermented by a mixed starter culture. *Appl Microbiol Biotechnol* 99, 3993–4003. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6321-3>
- Moreira, N., Mendes, F., Guedes de Pinho, P., Hogg, T., Vasconcelos, I., 2008. Heavy sulphur compounds, higher alcohols and esters production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as pure and mixed cultures in grape must. *International Journal of Food Microbiology* 124, 231–238. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.025>
- Mortimer, R.K., 2000. Evolution and Variation of the Yeast (*Saccharomyces*) Genome. *Genome Research* 10, 403–409. <https://doi.org/10.1101/gr.10.4.403>
- 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 Research International* 62, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.02.044>
- Mouret, J.R., Farines, V., Sablayrolles, J.M., Trelea, I.C., 2015. Prediction of the production kinetics of the main fermentative aromas in winemaking fermentations. *Biochemical Engineering Journal* 103, 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.07.017>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s11947-013-1089-5>

- Nadai, C., Treu, L., Campanaro, S., Giacomini, A., Corich, V., 2016. Different mechanisms of resistance modulate sulfite tolerance in wine yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol* 100, 797–813. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7169-x>
- 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. *Journal of the Institute of Brewing* 115, 265–271. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2009.tb00379.x>
- Nisiotou, A.A., Spiropoulos, A.E., Nychas, G.-J.E., 2007. Yeast Community Structures and Dynamics in Healthy and Botrytis-Affected Grape Must Fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 6705–6713. <https://doi.org/10.1128/AEM.01279-07>
- Nissen, M.E., 1997. Reengineering Support through Measurement-driven Inference. *Intelligent Systems in Accounting, Finance and Management* 6, 109–120.
- Nissen, P., Nielsen, D., Arneborg, N., 2003. Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell-cell contact-mediated mechanism. *Yeast* 20, 331–341. <https://doi.org/10.1002/yea.965>
- Ochando, T., Mouret, J.-R., Humbert-Goffard, A., Aguera, E., Sablayrolles, J.-M., Farines, V., 2020. Comprehensive study of the dynamic interaction between SO<sub>2</sub> and acetaldehyde during alcoholic fermentation. *Food Research International* 136, 109607. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109607>
- Ochando, T., Mouret, J.-R., Humbert-Goffard, A., Sablayrolles, J.-M., Farines, V., 2017. Impact of initial lipid content and oxygen supply on alcoholic fermentation in champagne-like musts. *Food Research International* 98, 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.11.010>
- Ocón, E., Gutiérrez, A.R., Garijo, P., López, R., Santamaría, P., 2010. Presence of non-*Saccharomyces* yeasts in cellar equipment and grape juice during harvest time. *Food Microbiology* 27, 1023–1027. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.06.012>
- Oelofse, A., Pretorius, I.S., du Toit, M., 2016. Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during Winemaking: A Synoptic Review. *SAJEV* 29. <https://doi.org/10.21548/29-2-1445>
- Oldfield, E., Lin, F.-Y., 2012. Terpene Biosynthesis: Modularity Rules. *Angew. Chem. Int. Ed.* 51, 1124–1137. <https://doi.org/10.1002/anie.201103110>
- Oliveira, I., Ferreira, V., 2019. Modulating Fermentative, Varietal and Aging Aromas of Wine Using non-*Saccharomyces* Yeasts in a Sequential Inoculation Approach. *Microorganisms* 7, 164. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7060164>
- Orlova, I., Marshall-Colon, A., Schnepf, J., Wood, B., Varbanova, M., Fridman, E., Blakeslee, J.J., Peer, W.A., Murphy, A.S., Rhodes, D., Pichersky, E., Dudareva, N., 2006. Reduction of Benzenoid Synthesis in *Petunia* Flowers Reveals Multiple Pathways to Benzoic Acid and Enhancement in Auxin Transport. *THE PLANT CELL ONLINE* 18, 3458–3475. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.046227>
- Ough, C.S., Crowell, E.A., 1987. Use of Sulfur Dioxide in Winemaking. *J Food Science* 52, 386–388. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1987.tb06620.x>
- Padilla, B., Gil, J., Manzanares, P., 2018. Challenges of the Non-Conventional Yeast *Wickerhamomyces anomalus* in Winemaking. *Fermentation* 4, 68. <https://doi.org/10.3390/fermentation4030068>
- Padilla, B., Gil, J.V., Manzanares, P., 2016. Past and Future of Non-*Saccharomyces* Yeasts: From Spoilage Microorganisms to Biotechnological Tools for Improving Wine Aroma Complexity. *Frontiers in Microbiology* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00411>
- Pagot, Y., Belin, J.-M., 1996. Fatty acid cellular metabolism and lactone production by the yeast *Pichia guilliermondii*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 45, 349–354. <https://doi.org/10.1007/s002530050695>

- Pagot, Y., Le Clainche, A., Nicaud, J.-M., Wache, Y., Belin, J.-M., 1998. Peroxisomal  $\beta$ -oxidation activities and  $\gamma$ -decalactone production by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 49, 295–300. <https://doi.org/10.1007/s002530051172>
- Pallmann, C.L., Brown, J.A., Olineka, T.L., Cocolin, L., Mills, D.A., Bisson, L.F., 2001. Use of WL Medium to Profile Native Flora Fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture* 52, 198–203.
- Pardo, E., Rico, J., Gil, J.V., Orejas, M., 2015. De novo production of six key grape aroma monoterpenes by a geraniol synthase-engineered *S. cerevisiae* wine strain. *Microb Cell Fact* 14, 136. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0306-5>
- Park, S.K., Boulton, R.B., Bartra, E., Noble, A.C., 1994. Incidence of Volatile Sulfur Compounds in California Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*.
- Pedersen, D.S., Capone, D.L., Skouroumounis, G.K., Pollnitz, A.P., Sefton, M.A., 2003. Quantitative analysis of geraniol, nerol, linalool, and  $\alpha$ -terpineol in wine. *Anal Bioanal Chem* 375, 517–522. <https://doi.org/10.1007/s00216-002-1716-x>
- Pereira, C.F., 1988. The importance of metallic elements in wine. A literature survey. *Z Lebensm Unters Forch* 186, 295–300. <https://doi.org/10.1007/BF01027030>
- Pérez-Gil, J., Rodríguez-Concepción, M., Vickers, C.E., 2017. Formation of Isoprenoids, in: Geiger, O. (Ed.), *Biogenesis of Fatty Acids, Lipids and Membranes*. Springer International Publishing, Cham, pp. 1–29. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-43676-0\\_6-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-43676-0_6-1)
- Pérez-Olivero, S.J., Pérez-Pont, M.L., Conde, J.E., Pérez-Trujillo, J.P., 2014. Determination of Lactones in Wines by Headspace Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography Coupled with Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Methods in Chemistry* 2014, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2014/863019>
- 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. *Systematic and Applied Microbiology* 25, 153–161. <https://doi.org/10.1078/0723-2020-00087>
- Perpète, P., Duthoit, O., De Maeyer, S., Imray, L., Lawton, A.I., Stavropoulos, K.E., Gitonga, V.W., Hewlins, M.J.E., Richard Dickinson, J., 2006. Methionine catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research* 6, 48–56. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1356.2005.00005.x>
- Peter, J., De Chiara, M., Friedrich, A., Yue, J.-X., Pflieger, D., Bergström, A., Sigwalt, A., Barre, B., Freel, K., Llored, A., Cruaud, C., Labadie, K., Aury, J.-M., Istace, B., Lebrigand, K., Barbry, P., Engelen, S., Lemainque, A., Wincker, P., Liti, G., Schacherer, J., 2018. Genome evolution across 1,011 *Saccharomyces cerevisiae* isolates. *Nature* 556, 339–344. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0030-5>
- Petronilho, S., Lopez, R., Ferreira, V., Coimbra, M.A., Rocha, S.M., 2020. Revealing the Usefulness of Aroma Networks to Explain Wine Aroma Properties: A Case Study of Portuguese Wines. *Molecules* 25, 272. <https://doi.org/10.3390/molecules25020272>
- Peynaud, E., Lafourcade, S., 1977. Sur les teneurs en thiamine des vins et jus de raisin. *Ind. Agric. Alim.* 8, 897–904.
- Pfliegler, W.P., Horváth, E., Kállai, Z., Sipiczki, M., 2014. Diversity of *Candida zemplinina* isolates inferred from RAPD, micro/minisatellite and physiological analysis. *Microbiological Research* 169, 402–410. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.006>
- Pina, C., Santos, C., Couto, J.A., Hogg, T., 2004. Ethanol tolerance of five non-*Saccharomyces* wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae*—influence of different culture conditions. *Food Microbiology* 21, 439–447. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2003.10.009>

- Pineau, B., Barbe, J.-C., Van Leeuwen, C., Dubourdieu, D., 2009. Examples of Perceptive Interactions Involved in Specific “Red-” and “Black-berry” Aromas in Red Wines. *J. Agric. Food Chem.* 57, 3702–3708. <https://doi.org/10.1021/jf803325v>
- Pollnitz, A.P., Jones, G.P., Sefton, M.A., 1999. Determination of oak lactones in barrel-aged wines and in oak extracts by stable isotope dilution analysis. *Journal of Chromatography A* 857, 239–246. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00785-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00785-2)
- Pons, A., Allamy, L., Lavigne, V., Dubourdieu, D., Darriet, P., 2017. Study of the contribution of massoia lactone to the aroma of Merlot and Cabernet Sauvignon musts and wines. *Food Chemistry* 232, 229–236. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.151>
- Pretorius, I., 2016. Conducting Wine Symphonics with the Aid of Yeast Genomics. *Beverages* 2, 36. <https://doi.org/10.3390/beverages2040036>
- Pretorius, I.S., 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16, 675–729.
- Pretorius, I.S., van der Westhuizen, T.J., Augustyn, O.P.H., 1999. Yeast Biodiversity in Vineyards and Wineries and Its Importance to the South African Wine Industry. A Review. *SAJEV* 20. <https://doi.org/10.21548/20-2-2234>
- Prior, K.J., Bauer, F.F., Divol, B., 2019. The utilisation of nitrogenous compounds by commercial non-Saccharomyces yeasts associated with wine. *Food Microbiology* 79, 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.12.002>
- Pronk, J.T., Wenzel, T.J., Luttk, M.A.H., Klaassen, C.C.M., Scheffers, W.A., Steensma, H.Y., van Dijken, J.P., 1994. Energetic aspects of glucose metabolism in a pyruvate-dehydrogenase-negative mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 140, 601–610. <https://doi.org/10.1099/00221287-140-3-601>
- Pronk, J.T., Yde Steensma, H., van Dijken, J.P., 1996. Pyruvate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 12, 1607–1633.
- Ramírez, M., Velázquez, R., 2018. The Yeast *Torulaspora delbrueckii*: An Interesting But Difficult-To-Use Tool for Winemaking. *Fermentation* 4, 94. <https://doi.org/10.3390/fermentation4040094>
- Rankine, B.C., 1963. Nature, origin and prevention of hydrogen sulphide aroma in wines. *J. Sci. Food Agric.* 14, 79–91. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740140204>
- Rantsiou, K., Dolci, P., Giacosa, S., Torchio, F., Tofalo, R., Torriani, S., Suzzi, G., Rolle, L., Cocolin, L., 2012. *Candida zemplinina* Can Reduce Acetic Acid Produced by *Saccharomyces cerevisiae* in Sweet Wine Fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 1987–1994. <https://doi.org/10.1128/AEM.06768-11>
- Rapp, A., Mandery, H., 1986. Wine aroma. *Experientia* 42, 873–884. <https://doi.org/10.1007/BF01941764>
- Rauhut, D., 2009. Usage and Formation of Sulphur Compounds, in: König, H., Uden, G., Fröhlich, J. (Eds.), *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 181–207. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-85463-0\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-540-85463-0_10)
- Remize, F., Andrieu, E., Dequin, S., 2000. Engineering of the Pyruvate Dehydrogenase Bypass in *Saccharomyces cerevisiae*: Role of the Cytosolic Mg<sup>2+</sup> and Mitochondrial K<sup>+</sup> Acetaldehyde Dehydrogenases Ald6p and Ald4p in Acetate Formation during Alcoholic Fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3151–3159. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.8.3151-3159.2000>
- Renault, P.E., Albertin, W., Bely, M., 2013. An innovative tool reveals interaction mechanisms among yeast populations under oenological conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* 97, 4105–4119. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4660-5>
- Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, E., 1960. *Traité d’Oenologie*, Beranger. Paris.

- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D., 2006. Handbook of Enology: The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. <https://doi.org/10.1002/0470010398>
- Roland, A., Schneider, R., 2015. Development and validation of a high-throughput analysis of glutathione in grapes, musts and wines by Stable Isotope Dilution Assay and LC–MS/MS. *Food Chemistry* 177, 152–157. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.027>
- Roland, A., Schneider, R., Razungles, A., Cavelier, F., 2011. Varietal Thiols in Wine: Discovery, Analysis and Applications. *Chem. Rev.* 111, 7355–7376. <https://doi.org/10.1021/cr100205b>
- Roland, A., Vialaret, J., Moniatte, M., Rigou, P., Razungles, A., Schneider, R., 2010a. Validation of a nanoliquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the identification and the accurate quantification by isotopic dilution of glutathionylated and cysteinylated precursors of 3-mercaptohexan-1-ol and 4-mercapto-4-methylpentan-2-one in white grape juices. *Journal of Chromatography A* 1217, 1626–1635. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.01.031>
- Roland, A., Vialaret, J., Razungles, A., Rigou, P., Schneider, R., 2010b. Evolution of *S*-Cysteinylated and *S*-Glutathionylated Thiol Precursors during Oxidation of Melon B. and Sauvignon blanc Musts. *J. Agric. Food Chem.* 58, 4406–4413. <https://doi.org/10.1021/jf904164t>
- Rolle, L., Englezos, V., Torchio, F., Cravero, F., Río Segade, S., Rantsiou, K., Giacosa, S., Gambuti, A., Gerbi, V., Cocolin, L., 2018. Alcohol reduction in red wines by technological and microbiological approaches: a comparative study: Ethanol reduction in red wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 24, 62–74. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12301>
- 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. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99, 2291–2304. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6210-9>
- Rollero, S., Bloem, A., Ortiz-Julien, A., Camarasa, C., Divol, B., 2018. Altered Fermentation Performances, Growth, and Metabolic Footprints Reveal Competition for Nutrients between Yeast Species Inoculated in Synthetic Grape Juice-Like Medium. *Front. Microbiol.* 9, 196. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00196>
- Rollero, S., Mouret, J., Bloem, A., Sanchez, I., Ortiz-Julien, A., Sablayrolles, J., Dequin, S., Camarasa, C., 2017. Quantitative <sup>13</sup>C-isotope labelling-based analysis to elucidate the influence of environmental parameters on the production of fermentative aromas during wine fermentation. *Microb. Biotechnol.* 10, 1649–1662. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12749>
- Romano, P., Suzzi, G., 1996. Origin and Production of Acetoin during Wine Yeast Fermentation. *Appl Environ Microbiol* 62, 309–315. <https://doi.org/10.1128/AEM.62.2.309-315.1996>
- Romboli, Y., Mangani, S., Buscioni, G., Granchi, L., Vincenzini, M., 2015. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida zemplinina* on quercetin, vitisin A and hydroxytyrosol contents in Sangiovese wines. *World J Microbiol Biotechnol* 31, 1137–1145. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1863-9>
- Romero-Guido, C., Belo, I., Ta, T.M.N., Cao-Hoang, L., Alchihab, M., Gomes, N., Thonart, P., Teixeira, J.A., Destain, J., Waché, Y., 2011. Biochemistry of lactone formation in yeast and fungi and its utilisation for the production of flavour and fragrance

- compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89, 535–547. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2945-0>
- Rosenberg, S.M., 2003. MICROBIOLOGY AND EVOLUTION: Modulating Mutation Rates in the Wild. *Science* 300, 1382–1383. <https://doi.org/10.1126/science.1085691>
- Roustan, J.L., Sablayrolles, J.-M., 2002. Modification of the acetaldehyde concentration during alcoholic fermentation and effects on fermentation kinetics. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 93, 367–375. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(02\)80069-X](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(02)80069-X)
- Sablayrolles, J.M., 2009. Control of alcoholic fermentation in winemaking: Current situation and prospect. *Food Research International* 42, 418–424. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.12.016>
- 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. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 82, 377–381. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(96\)89154-9](https://doi.org/10.1016/0922-338X(96)89154-9)
- Sadoudi, M., Tourdot-Maréchal, R., Rousseaux, S., Steyer, D., Gallardo-Chacón, J.-J., Ballester, J., Vichi, S., Guérin-Schneider, R., Caixach, J., Alexandre, H., 2012. Yeast–yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-Saccharomyces and Saccharomyces yeasts. *Food Microbiology* 32, 243–253. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.06.006>
- Saerens, S.M.G., Delvaux, F., Verstrepen, K.J., Van Dijck, P., Thevelein, J.M., Delvaux, F.R., 2008. Parameters Affecting Ethyl Ester Production by *Saccharomyces cerevisiae* during Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 454–461. <https://doi.org/10.1128/AEM.01616-07>
- Salmon, J.M., 1989. Effect of Sugar Transport Inactivation in *Saccharomyces cerevisiae* on Sluggish and Stuck Enological Fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 953–958.
- Sánchez-Palomo, E., Trujillo, M., García Ruiz, A., González Viñas, M.A., 2017. Aroma profile of malbec red wines from La Mancha region: Chemical and sensory characterization. *Food Research International* 100, 201–208. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.06.036>
- 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. <https://doi.org/10.1021/jf1048657>
- Sanz, M., Fernández de Simón, B., Esteruelas, E., Muñoz, Á.M., Cadahía, E., Hernández, T., Estrella, I., Pinto, E., 2011. Effect of Toasting Intensity at Cooperage on Phenolic Compounds in Acacia (*Robinia pseudoacacia*) Heartwood. *J. Agric. Food Chem.* 59, 3135–3145. <https://doi.org/10.1021/jf1042932>
- Schacherer, J., Shapiro, J.A., Ruderfer, D.M., Kruglyak, L., 2009. Comprehensive polymorphism survey elucidates population structure of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 458, 342–345. <https://doi.org/10.1038/nature07670>
- Schreier, P., Jennings, W.G., 1979. Flavor composition of wines: A review. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 12, 59–111. <https://doi.org/10.1080/10408397909527273>
- Schwender, J., Seemann, M., Lichtenthaler, H.K., Rohmer, M., 1996. Biosynthesis of isoprenoids (carotenoids, sterols, prenyl side-chains of chlorophylls and plastoquinone) via a novel pyruvate/glyceraldehyde 3-phosphate non-mevalonate pathway in the green alga *Scenedesmus obliquus*\*. *Biochemical Journal* 316, 73–80. <https://doi.org/10.1042/bj3160073>
- Seguinot, P., Bloem, A., Brial, P., Meudec, E., Ortiz-Julien, A., Camarasa, C., 2020a. Analysing the impact of the nature of the nitrogen source on the formation of volatile compounds

- to unravel the aroma metabolism of two non-Saccharomyces strains. *International Journal of Food Microbiology* 316, 108441. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108441>
- Seguinot, P., Ortiz-Julien, A., Camarasa, C., 2020b. Impact of Nutrient Availability on the Fermentation and Production of Aroma Compounds Under Sequential Inoculation With *M. pulcherrima* and *S. cerevisiae*. *Front. Microbiol.* 11, 305. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00305>
- Seguinot, P., Rollero, S., Sanchez, I., Sablayrolles, J.-M., Ortiz-Julien, A., Camarasa, C., Mouret, J.-R., 2018. Impact of the timing and the nature of nitrogen additions on the production kinetics of fermentative aromas by *Saccharomyces cerevisiae* during winemaking fermentation in synthetic media. *Food Microbiology* 76, 29–39. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.04.005>
- Shimoni, E., Ravid, U., Shoham, Y., 2000. Isolation of a *Bacillus* sp. capable of transforming isoeugenol to vanillin. *Journal of Biotechnology* 78, 1–9. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00199-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00199-6)
- Shinohara, T., 1985. Gas Chromatographic Analysis of Volatile Fatty Acids in Wines. *Agricultural and Biological Chemistry* 49, 2211–2212. <https://doi.org/10.1080/00021369.1985.10867054>
- Siebert, T.E., Bramley, B., Solomon, M.R., 2009. Hydrogen sulfide : aroma detection threshold study in red and white wine. *AWRI Technical Review* 183, 14–16.
- Siebert, T.E., Smyth, H.E., Capone, D.L., Neuwöhner, C., Pardon, K.H., Skouroumounis, G.K., Herderich, M.J., Sefton, M.A., Pollnitz, A.P., 2005. Stable isotope dilution analysis of wine fermentation products by HS-SPME-GC-MS. *Anal Bioanal Chem* 381, 937–947. <https://doi.org/10.1007/s00216-004-2992-4>
- Singleton, V.L., Timberlake, C.F., Lea, A.G.H., 1978. The phenolic cinnamates of white grapes and wine. *J. Sci. Food Agric.* 29, 403–410. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740290416>
- Šipiczki, M., 2004. Species identification and comparative molecular and physiological analysis of *Candida zemplinina* and *Candida stellata*. *J. Basic Microbiol.* 44, 471–479. <https://doi.org/10.1002/jobm.200410449>
- Sipiczki, M., 2004. Species identification and comparative molecular and physiological analysis of *Candida zemplinina* and *Candida stellata*. *Journal of Basic Microbiology* 44, 471–479. <https://doi.org/10.1002/jobm.200410449>
- Šipiczki, M., 2003. *Candida zemplinina* sp. nov., an osmotolerant and psychrotolerant yeast that ferments sweet botrytized wines. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY* 53, 2079–2083. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.02649-0>
- Šipiczki, M., Ciani, M., Csoma, H., 2005. Taxonomic reclassification of *Candida stellata* DBVPG 3827. *Folia Microbiol* 50, 494–498. <https://doi.org/10.1007/BF02931436>
- Slaghenaufi, D., Ugliano, M., 2018. Norisoprenoids, Sesquiterpenes and Terpenoids Content of Valpolicella Wines During Aging: Investigating Aroma Potential in Relationship to Evolution of Tobacco and Balsamic Aroma in Aged Wine. *Front. Chem.* 6, 66. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00066>
- Smékal, O., Yasin, M., Fewson, C.A., Reid, G.A., Chapman, S.K., 1993. l-mandelate dehydrogenase from *Rhodotorula graminis*: comparisons with the l-lactate dehydrogenase (flavocytochrome b2) from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal* 290, 103–107. <https://doi.org/10.1042/bj2900103>
- Smith, M.E., Bekker, M.Z., Smith, P.A., Wilkes, E.N., 2015. Sources of volatile sulfur compounds in wine: Sources of volatile sulfur compounds in wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 21, 705–712. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12193>

- Soden, A., Francis, I.L., Oakey, H., Henschke, P.A., 2000. Effects of co-fermentation with *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and composition of Chardonnay wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 6, 21–30. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2000.tb00158.x>
- Spagna, G., Barbagallo, R.N., Palmeri, R., Restuccia, C., Giudici, P., 2002. Properties of endogenous  $\beta$ -glucosidase of a *Saccharomyces cerevisiae* strain isolated from Sicilian musts and wines. *Enzyme and Microbial Technology* 31, 1030–1035. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00233-8](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00233-8)
- Spor, A., Nidelet, T., Simon, J., Bourgeois, A., de Vienne, D., Sicard, D., 2009. Niche-driven evolution of metabolic and life-history strategies in natural and domesticated populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Evol Biol* 9, 296. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-296>
- Stentelaire, C., Lesage-Meessen, L., Delattre, M., Haon, M., Sigoillot, J.C., Colonna-Ceccaldi, B., Asther, M., 1998. By-passing of unwanted vanillyl alcohol formation using selective adsorbents to improve vanillin production from *Phanerochaete chrysosporium*. *World J Microbiol Biotechnol* 14, 285–287. <https://doi.org/10.1023/A:1008811019693>
- Steyer, D., Erny, C., Claudel, P., Riveill, G., Karst, F., Legras, J.-L., 2013. Genetic analysis of geraniol metabolism during fermentation. *Food Microbiology* 33, 228–234. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.09.021>
- Stratford, M., Rose, A.H., 1985. Hydrogen sulphide production from sulphite by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology* 131, 1417–1424.
- Sun, Y., Guo, J., Liu, F., Liu, Y., 2014. Identification of indigenous yeast flora isolated from the five winegrape varieties harvested in Xiangning, China. *Antonie van Leeuwenhoek* 105, 533–540. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-0105-0>
- Swangkeaw, J., Vichitphan, S., Butzke, C.E., Vichitphan, K., 2011. Characterization of  $\beta$ -glucosidases from *Hanseniaspora* sp. and *Pichia anomala* with potentially aroma-enhancing capabilities in juice and wine. *World J Microbiol Biotechnol* 27, 423–430. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0474-8>
- Swiegers, J.H., Bartowsky, E.J., Henschke, P.A., Pretorius, I.S., 2005. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Aust J Grape Wine Res* 11, 139–173. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00285.x>
- Swiegers, J.H., Pretorius, I.S., 2007. Modulation of volatile sulfur compounds by wine yeast. *Appl Microbiol Biotechnol* 74, 954–960. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0828-1>
- Taillandier, P., Lai, Q.P., Julien-Ortiz, A., Brandam, C., 2014. Interactions between *Torulasporea delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* in wine fermentation: influence of inoculation and nitrogen content. *World J Microbiol Biotechnol* 30, 1959–1967. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1618-z>
- Takahashi, M., Ohta, T., Masaki, K., Mizuno, A., Goto-Yamamoto, N., 2014. Evaluation of microbial diversity in sulfite-added and sulfite-free wine by culture-dependent and -independent methods. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 117, 569–575. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.10.012>
- Tat, L., Comuzzo, P., Battistutta, F., Zironi, R., 2007. Sweet-like off-flavor in Aglianico del Vulture wine: ethyl phenylacetate as the mainly involved compound. *J Agric Food Chem* 55, 5205–5212. <https://doi.org/10.1021/jf0637067>
- Terrier, A., Boidron, J.A., 1972. Identification des dérivés terpéniques dans les raisins de certains variétés de *Vitis Vinifera*. *Connaissance Vigne Vin* 1, 69–85.
- Tesnière, C., 2019. Importance and role of lipids in wine yeast fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 103, 8293–8300. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10029-4>

- Teusink, B., Wiersma, A., Jacobs, L., Notebaart, R.A., Smid, E.J., 2009. Understanding the Adaptive Growth Strategy of *Lactobacillus plantarum* by In Silico Optimisation. *PLoS Comput Biol* 5, e1000410. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000410>
- 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. <https://doi.org/10.1128/AEM.03710-13>
- Tokuyama, T., Kuraishi, H., Aida, K., Uemura, T., 1973. HYDROGEN SULFIDE EVOLUTION DUE TO PANTOTHENIC ACID DEFICIENCY IN THE YEAST REQUIRING THIS VITAMIN, WITH SPECIAL REFERENCE TO THE EFFECT OF ADENOSINE TRIPHOSPHATE ON YEAST CYSTEINE DESULFHYDRASE. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 19, 439–466. <https://doi.org/10.2323/jgam.19.439>
- Tominaga, T., Baltenweck-Guyot, R., Peyrot des Gachons, C., Dubourdieu, D., 2000. Contribution of Volatile Thiols to the Aromas of White Wines Made From Several *Vitis vinifera* Grape Varieties. *American Journal of Enology and Viticulture* 51, 178–181.
- Tominaga, T., Furrer, A., Henry, R., Dubourdieu, D., 1998. Identification of new volatile thiols in the aroma of *Vitis vinifera* L. var. Sauvignon blanc wines. *Flavour and Fragrance Journal* 13, 159–162. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1026\(199805/06\)13:3<159::AID-FFJ709>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1026(199805/06)13:3<159::AID-FFJ709>3.0.CO;2-7)
- Tominaga, T., Masneuf-Pomarède, I., Dubourdieu, D., 1995. A S-cysteine conjugate, precursor of aroma of White Sauvignon. *OENO One* 29, 227. <https://doi.org/10.20870/oenone.1995.29.4.1123>
- Tondini, F., Lang, T., Chen, L., Herderich, M., Jiranek, V., 2019. Linking gene expression and oenological traits: Comparison between *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* strains. *International Journal of Food Microbiology* 294, 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.01.014>
- Toriya, 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. *International Journal of Food Microbiology* 85, 127–136. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00506-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00506-8)
- Tourdot-Maréchal, R., Fortier, L.-C., Guzzo, J., Lee, B., Diviès, C., 1999. Acid sensitivity of neomycin-resistant mutants of *Oenococcus oeni*: a relationship between reduction of ATPase activity and lack of malolactic activity. *FEMS Microbiology Letters* 178, 319–326. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb08694.x>
- Tristezza, M., Vetrano, C., Bleve, G., Spano, G., Capozzi, V., Logrieco, A., Mita, G., Grieco, F., 2013. Biodiversity and safety aspects of yeast strains characterized from vineyards and spontaneous fermentations in the Apulia Region, Italy. *Food Microbiology* 36, 335–342. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.07.001>
- Tumanov, S., Pinu, F.R., Greenwood, D.R., Villas-Bôas, S.G., 2018. Effect of free fatty acids and lipolysis on Sauvignon Blanc fermentation: Effect of fatty acids on Sauvignon Blanc. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 24, 398–405. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12352>
- Uchiyama, K., Kawaguchi, K., Tochikura, T., Ogata, K., 1969. Metabolism of Aromatic Amino Acids in Microorganisms: Part III. Metabolism of Cinnamic Acid in *Rhodotorula*. *Agricultural and Biological Chemistry* 33, 755–763. <https://doi.org/10.1080/00021369.1969.10859378>
- Ugliano, M., Henschke, P.A., 2009. Yeasts and Wine Flavour, in: Moreno-Arribas, M.V., Polo, M.C. (Eds.), *Wine Chemistry and Biochemistry*. Springer New York, New York, NY, pp. 313–392. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-74118-5\\_17](https://doi.org/10.1007/978-0-387-74118-5_17)

- Ugliano, M., Kwiatkowski, M., Vidal, S., Capone, D., Siebert, T., Dieval, J.-B., Aagaard, O., Waters, E.J., 2011. Evolution of 3-Mercaptohexanol, Hydrogen Sulfide, and Methyl Mercaptan during Bottle Storage of Sauvignon blanc Wines. Effect of Glutathione, Copper, Oxygen Exposure, and Closure-Derived Oxygen. *J. Agric. Food Chem.* 59, 2564–2572. <https://doi.org/10.1021/jf1043585>
- 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 Chemistry* 78, 57–61. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00361-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00361-2)
- van Dijken, J.P., Scheffers, W.A., 1986. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. *FEMS Microbiology Letters* 32, 199–224. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1986.tb01194.x>
- 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 Chemistry* 135, 2863–2871. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.127>
- Vaudano, E., Moruno, E.G., Stefano, R., 2004. Modulation of Geraniol Metabolism During Alcohol Fermentation. *Journal of the Institute of Brewing* 110, 213–219. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2004.tb00205.x>
- Verstrepen, K.J., Derdelinckx, G., Dufour, J.P., Winderickx, J., Pretorius, I.S., Thevelein, J.M., Delvaux, F.R., 2003. The *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyl transferase gene ATF1 is a target of the cAMP/PKA and FGM nutrient-signalling pathways. *FEMS Yeast Res.* 4, 285–296.
- Vickers, C.E., Behrendorff, J.B.Y.H., Bongers, M., Brennan, T.C.R., Bruschi, M., Nielsen, L.K., 2015. Production of Industrially Relevant Isoprenoid Compounds in Engineered Microbes, in: Kamm, B. (Ed.), *Microorganisms in Biorefineries*, Microbiology Monographs. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 303–334. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-45209-7\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-662-45209-7_11)
- Viegas, C.A., Rosa, M.F., Sá-Correia, I., Novais, J.M., 1989. Inhibition of Yeast Growth by Octanoic and Decanoic Acids Produced during Ethanolic Fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 21–28. <https://doi.org/10.1128/AEM.55.1.21-28.1989>
- Villena, M.A., Iranzo, J.F.Ú., Pérez, A.I.B., 2007.  $\beta$ -Glucosidase activity in wine yeasts: Application in enology. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 420–425. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.07.013>
- Viviers, M.Z., Smith, M.E., Wilkes, E., Smith, P., 2013. Effects of Five Metals on the Evolution of Hydrogen Sulfide, Methanethiol, and Dimethyl Sulfide during Anaerobic Storage of Chardonnay and Shiraz Wines. *J. Agric. Food Chem.* 61, 12385–12396. <https://doi.org/10.1021/jf403422x>
- Vos, P.J.A., Gray, R.S., 1979. The Origin and Control of Hydrogen Sulfide during Fermentation of Grape Must. *American Journal of Enology and Viticulture* 30, 187–197.
- 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*. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 4534–4541. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.4534-4541.2003>
- Waché, Y., Aguedo, M., Choquet, A., Gatfield, I.L., Nicaud, J.M., Belin, J.M., 2001. Role of beta-oxidation enzymes in gamma-decalactone production by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5700–5704. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.12.5700-5704.2001>

- Waché, Y., Aguedo, M., Nicaud, J.-M., Belin, J.-M., 2003. Catabolism of hydroxyacids and biotechnological production of lactones by *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, 393–404. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1207-1>
- Waché, Y., Bergmark, K., Courthaudon, J.L., Aguedo, M., Nicaud, J.M., Belin, J.M., 2000a. Medium-size droplets of methyl ricinoleate are reduced by cell-surface activity in the gamma-decalactone production by *Yarrowia lipolytica*. *Lett. Appl. Microbiol.* 30, 183–187.
- Waché, Y., Laroche, C., Bergmark, K., Møller-Andersen, C., Aguedo, M., Le Dall, M.T., Wang, H., Nicaud, J.M., Belin, J.M., 2000b. Involvement of acyl coenzyme A oxidase isozymes in biotransformation of methyl ricinoleate into gamma-decalactone by *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1233–1236. <https://doi.org/10.1128/aem.66.3.1233-1236.2000>
- Waché, Y., Pagot, Y., Nicaud, J.-M., Belin, J.-M., 1998. Acyl-CoA oxidase, a key step for lactone production by *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 5, 165–169. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(98\)00027-7](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(98)00027-7)
- Walton, N.J., Narbad, A., Faulds, C., Williamson, G., 2000. Novel approaches to the biosynthesis of vanillin. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11, 490–496.
- Wang, C., García-Fernández, D., Mas, A., Esteve-Zarzoso, B., 2015. Fungal diversity in grape must and wine fermentation assessed by massive sequencing, quantitative PCR and DGGE. *Front. Microbiol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01156>
- Wang, H.J., Dall, M.-T., Waché, Y., Laroche, C., Belin, J.-M., Nicaud, J.-M., 1999a. Cloning, sequencing, and characterization of five genes coding for Acyl-CoA oxidase isozymes in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Cell Biochem Biophys* 31, 165–174. <https://doi.org/10.1007/BF02738170>
- Wang, H.J., Le Clainche, A., Le Dall, M.T., Wache, Y., Pagot, Y., Belin, J.M., Gaillardin, C., Nicaud, J.M., 1998. Cloning and characterization of the peroxisomal acyl CoA oxidase ACO3 gene from the alkane-utilizing yeast *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* 14, 1373–1386. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199811\)14:15<1373::AID-YEA332>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199811)14:15<1373::AID-YEA332>3.0.CO;2-1)
- Wang, H.J., Le Dall, M.T., Wach, Y., Laroche, C., Belin, J.M., Gaillardin, C., Nicaud, J.M., 1999b. Evaluation of acyl coenzyme A oxidase (Aox) isozyme function in the n-alkane-assimilating yeast *Yarrowia lipolytica*. *J. Bacteriol.* 181, 5140–5148.
- Wang, X.D., Bohlscheid, J.C., Edwards, C.G., 2003. Fermentative activity and production of volatile compounds by *Saccharomyces* grown in synthetic grape juice media deficient in assimilable nitrogen and/or pantothenic acid. *J Appl Microbiol* 94, 349–359. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01827.x>
- Wang, Z., Zhuge, J., Fang, H., Prior, B.A., 2001. Glycerol production by microbial fermentation. *Biotechnology Advances* 19, 201–223. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(01\)00060-X](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(01)00060-X)
- Whitener, M.E.B., Stanstrup, J., Carlin, S., Divol, B., Du Toit, M., Vrhovsek, U., 2017. Effect of non- *Saccharomyces* yeasts on the volatile chemical profile of Shiraz wine: Shiraz wines fermented by non- *Saccharomyces* yeasts. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 23, 179–192. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12269>
- Widhalm, J.R., Dudareva, N., 2015. A Familiar Ring to It: Biosynthesis of Plant Benzoic Acids. *Molecular Plant* 8, 83–97. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.12.001>
- Wildenradt, H.L., Singleton, V.L., 1974. The Production of Aldehydes as a Result of Oxidation of Polyphenolic Compounds and its Relation to Wine Aging. *American Journal of Enology and Viticulture* 119–126.

- Williams, P.J., Strauss, C.R., Wilson, B., Massy-Westropp, R.A., 1982. Novel monoterpene disaccharide glycosides of *Vitis vinifera* grapes and wines. *Phytochemistry* 21, 2013–2020. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(82\)83034-3](https://doi.org/10.1016/0031-9422(82)83034-3)
- Winter, G., Henschke, P.A., Higgins, V.J., Ugliano, M., Curtin, C.D., 2011. Effects of rehydration nutrients on H<sub>2</sub>S metabolism and formation of volatile sulfur compounds by the wine yeast VL3. *AMB Express* 1, 36. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-1-36>
- Wright, L.D., 1961. Biosynthesis of Isoprenoid Compounds. *Annu. Rev. Biochem.* 30, 525–548. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.30.070161.002521>
- Yap, N.A., de Barros Lopes, M., Langridge, P., Henschke, P.A., 2000. The incidence of killer activity of non-*Saccharomyces* yeasts towards indigenous yeast species of grape must: potential application in wine fermentation: killer yeast activity in winemaking. *Journal of Applied Microbiology* 89, 381–389. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01124.x>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s11745-006-1395-z>
- Zamuz, S., Sestelo, A.B.F., Poza, M., Villa, T.G., 2004. Enzymes as Potential Markers of Wine Aging. *Journal of the Institute of Brewing* 110, 220–226. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2004.tb00206.x>
- Zara, G., Mannazzu, I., Del Caro, A., Budroni, M., Pinna, M.B., Murru, M., Farris, G.A., Zara, S., 2014. Wine quality improvement through the combined utilisation of yeast hulls and *Candida zemplinina* / *Saccharomyces cerevisiae* mixed starter cultures: Effect of yeast hulls on mixed wine fermentations. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 20, 199–207. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12078>
- Zhang, B., Cai, J., Duan, C.-Q., Reeves, M., He, F., 2015. A Review of Polyphenolics in Oak Woods. *IJMS* 16, 6978–7014. <https://doi.org/10.3390/ijms16046978>
- Zhang, P., Fuentes, S., Siebert, T., Krstic, M., Herderich, M., Barlow, E.W.R., Howell, K., 2016. Terpene evolution during the development of *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz grapes. *Food Chemistry* 204, 463–474. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.125>
- Zhao, Wu, Meng, Shi, Fang, Zhang, Sun, 2019. Harvesting at the Right Time: Maturity and Its Effects on the Aromatic Characteristics of Cabernet Sauvignon Wine. *Molecules* 24, 2777. <https://doi.org/10.3390/molecules24152777>
- Zoecklein, B.W., Fugelsang, K.C., Gump, B.H., Nury, F.S., 1999. *Wine analysis and production*, Springer. ed.
- Zohre, D.E., Erten, H., 2002. The influence of *Kloeckera apiculata* and *Candida pulcherrima* yeasts on wine fermentation. *Process Biochemistry* 38, 319–324. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00086-9](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00086-9)
- Zott, K., Miot-Sertier, C., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., Masneuf-Pomarede, I., 2008. Dynamics and diversity of non-*Saccharomyces* yeasts during the early stages in winemaking. *International Journal of Food Microbiology* 125, 197–203. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.001>
- Zott, K., Thibon, C., Bely, M., Lonvaud-Funel, A., Dubourdieu, D., Masneuf-Pomarede, I., 2011. The grape must non-*Saccharomyces* microbial community: Impact on volatile thiol release. *International Journal of Food Microbiology* 151, 210–215. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.026>







---

# **Annexes**

---



## ANNEXE 1 : EFFET DE LA COMPOSITION EN ACIDE GRAS DU MOUT DANS LA PRODUCTION DE LACTONES PAR *S. CEREVISIAE* AU COURS DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE

Le troisième groupe de composés chimiques auquel nous nous sommes intéressés pendant ce projet est les lactones.

Les lactones sont des composés aromatiques dont les descripteurs, tels que la noix de coco ou la pêche, sont recherchés pour diversifier le profil organoleptique des vins. Il a été montré, dans le monde du vivant, que les lactones dérivent d'un acide gras initial, dont le nombre de carbones détermine la lactone produite. Les résultats précédents ont montré que les souches étudiées de *S. cerevisiae* étaient capables de produire certaines lactones, notamment les  $\delta$ - et  $\gamma$ -décalactones. Il existe également une diversité de production entre souches concernant ces deux composés, et la souche L15 s'est révélée être la meilleure productrice, que ce soit en fermentation sur moûts naturels ou moût synthétique.

Le précurseur de la  $\delta$ -décalactone n'est pas encore identifié. Par contre, il a été montré que l'acide ricinoléique, présent dans certains moûts de raisin, était le précurseur de la  $\gamma$ -décalactone (Romero-Guido *et al.*, 2011).

Afin d'identifier l'origine métabolique des lactones en fermentation œnologique, nous avons évalué si l'acide ricinoléique pouvait être un précurseur pour la formation de cette famille de molécules en étudiant l'impact de cet acide gras sur la production des lactones en conditions œnologiques. Ce travail est une étude préliminaire ayant pour objectif de comprendre le mode de production des lactones *via* le métabolisme des levures, afin de mieux identifier les voies métaboliques, dans une optique d'amélioration des souches, ou avec la volonté de contrôler de cette production de lactones.

Une série de fermentations a été réalisée en utilisant un MS200 désoxygéné à l'argon, en faisant varier la teneur en acides gras ou phytostérols. Ainsi, deux séries de fermentations ont été réalisées (**Tableau 34**). Ces expériences se déroulant en anaérobiose, il est nécessaire d'apporter des acides gras et des stérols aux levures, permettant le maintien de l'intégrité des membranes et la résistance à l'éthanol, puisque dans ces conditions, les levures ne peuvent pas synthétiser les stérols et les acides gras insaturés, dont la formation nécessite la présence d'oxygène

(Alexandre *et al.*, 1994; Andreasen & Stier, 1954, 1953; Lafon-Lafourcade *et al.*, 1979). La première série, PAR, vise à confirmer le rôle de cet acide gras comme précurseur des lactones et les composés lipidiques sont apportés sous forme d'un mélange de 4 mg/L de phytostérols et de concentrations croissantes d'acide ricinoléique (20 µg/L à 1 mg/L). La condition PAR\_0 (4 mg/L de phytostérols, et aucun ajout d'acide ricinoléique) est le contrôle. La seconde série AR, ne contient que de l'acide ricinoléique, dans des concentrations allant de 1 mg/L à 10 mg/L. L'absence d'ajout de phytostérols dans cette série a pour but de contraindre les levures à utiliser l'acide ricinoléique.

A l'exception de la condition AR-2000, l'ensemble des fermentations est allé à son terme ou à des avancements de fermentation supérieurs à 95 %. Seulement 92 % des sucres initiaux ont été consommés au cours de la modalité AR-2000. A la fin de la fermentation, les productions des arômes fermentaires majeurs, des métabolites du MCC et des lactones, ont été étudiées.

**Tableau 34: Concentrations en acide ricinoléique des séries PAR et AR.**

Dans la série A, 4 mg/L de phytostérols (P) sont ajoutés dans le milieu, avec des concentrations croissantes d'acide ricinoléique (AR, de 20 à 1000 µg/L). Dans la série B, seul l'acide ricinoléique est ajouté (AR entre 1000 et 10000 µg/L).

Série	Phytostérols (mg/L)	Concentration acide ricinoléique (µg/L)	Code
A	4	0	PAR-0
		20	PAR-20
		100	PAR-100
		500	PAR-500
		1000	PAR-1000
B	/	1000	AR-1000
		2000	AR-2000
		5000	AR-5000
		10000	AR-10000

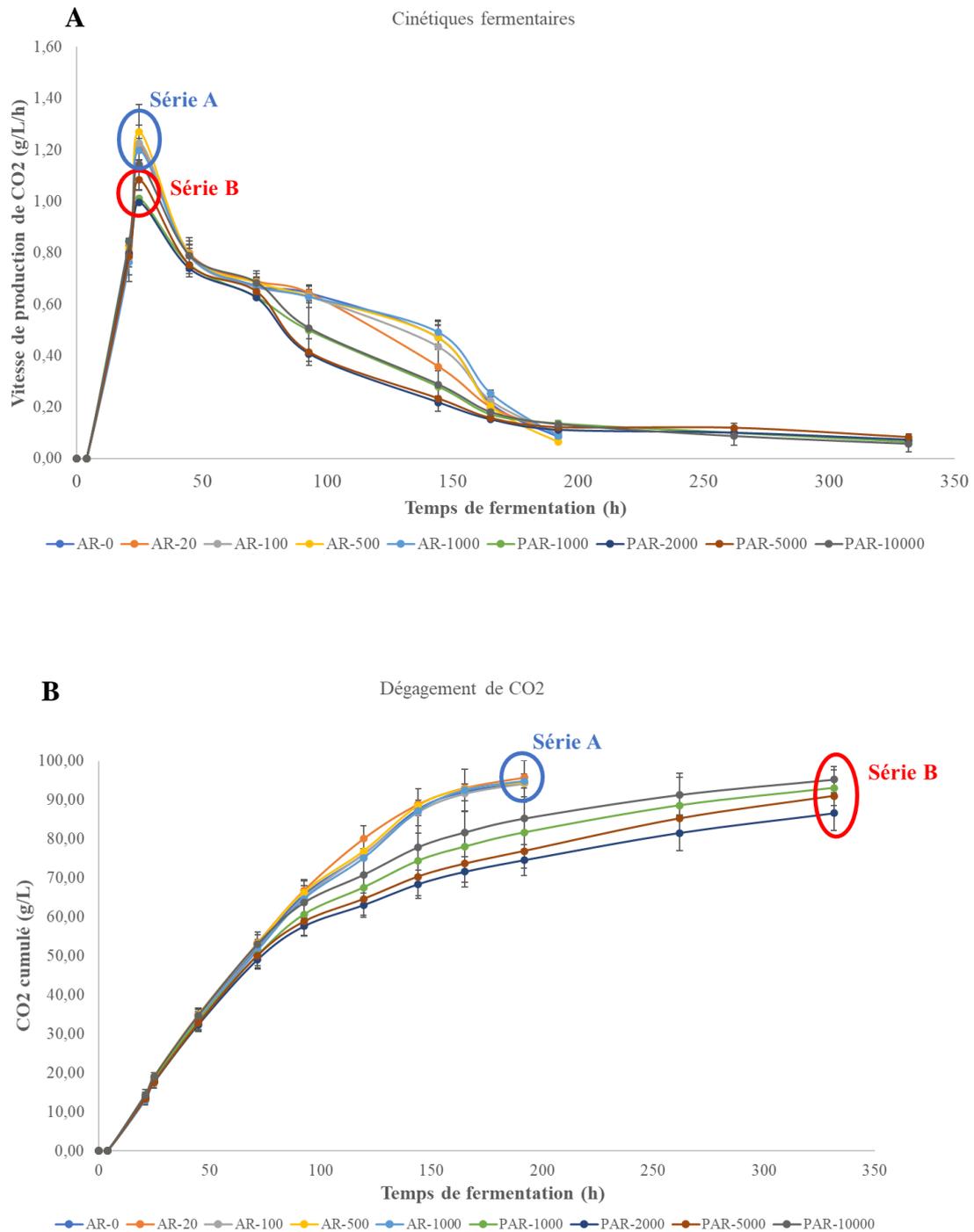
1. Effets de l'ajout d'acide ricinoléique en présence de phytostérols

Nous avons tout d'abord évalué l'incidence d'un ajout d'acide ricinoléique (en absence de tout autre acide gras et en présence de 4 mg/L de phytostérols) sur la cinétique fermentaire (**Figure 47**). Dans les conditions de l'étude, il n'y a pas d'incidence majeure de l'ajout de cet acide sur la cinétique, avec une fin de fermentation de cette série PAR atteinte après 192 h de fermentation (moins de 2 g/L de sucres résiduels).

L'analyse de la production des métabolites du MCC n'a pas montré d'incidence de l'ajout d'acide ricinoléique (**Figure 48**). Ainsi, les productions de glycérol, d'acétate, de pyruvate, d' $\alpha$ -cétoglutarate et de succinate sont de 0.3 g/L, 5 g/L, 0.8 g/L et 0.04 g/L, respectivement, en présence de 20, 100, 500 et 1000 mg/L d'acide ricinoléique, similaires à celles du témoin. Aucune différence significative n'a été observée concernant la production de ces métabolites au sein de la série PAR.

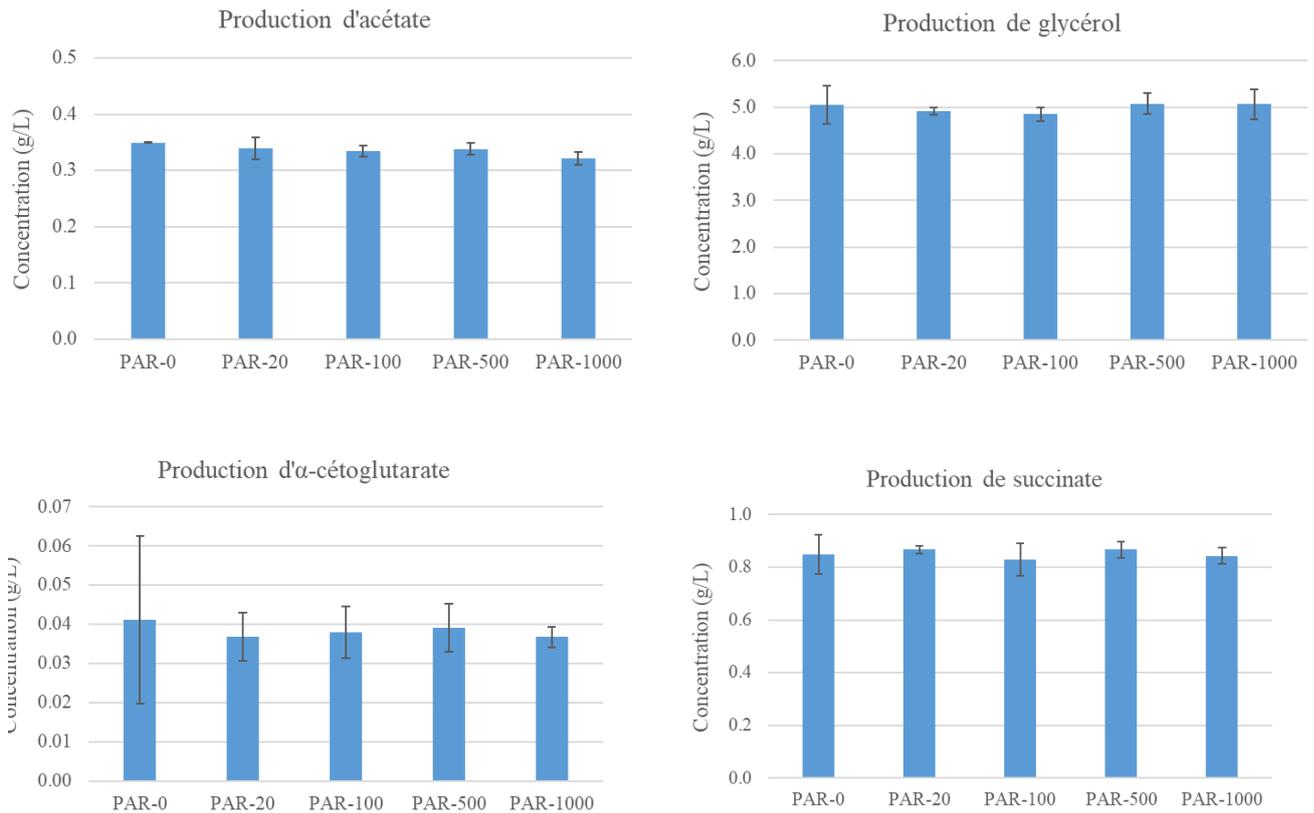
L'effet de l'ajout d'acide ricinoléique sur la production des alcools supérieurs, esters acétiques, acides et esters éthyliques, a été étudié. Les résultats sont compilés sur le **Tableau S1**. Pour l'ensemble des composés étudiés, des ANOVA ont été réalisées afin de vérifier la significativité des différences observées.

L'ajout d'acide ricinoléique dans cette première série de fermentations n'a pas eu d'effet sur la production de la majorité des composés volatils, comparé au témoin PAR-0. On peut néanmoins observer une augmentation de la production d'alcools supérieurs corrélée avec l'augmentation de la concentration en acide ricinoléique. C'est notamment le cas pour les alcools amylique et isoamylique : 271 mg/L pour PAR-0, 306 mg/L pour PAR-100 et 311 mg/L pour PAR-1000. Cette tendance est en accord avec les données de la littérature, montrant une augmentation de la production d'alcools supérieurs après l'ajout de lipides en cours de fermentation (Tesnière, 2019).



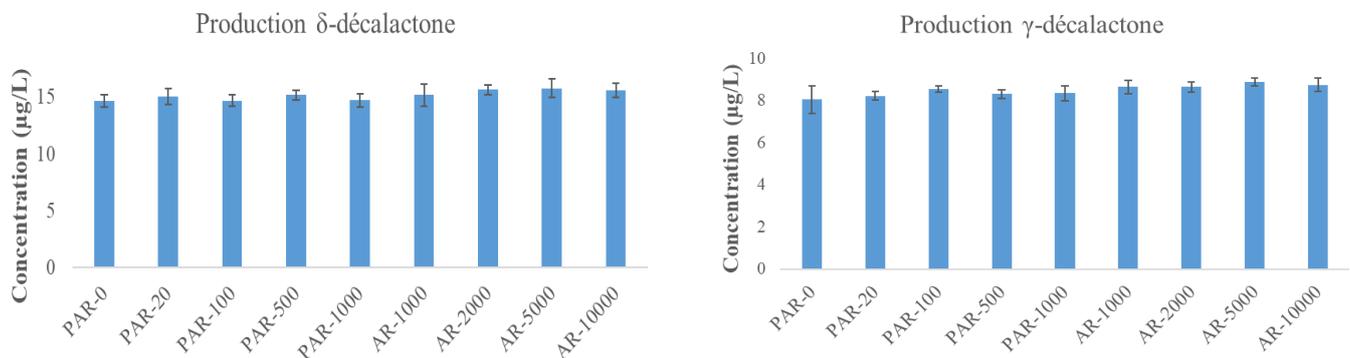
**Figure 47 :** Cinétiques fermentaires (A) et CO<sub>2</sub> cumulé (B) au cours de la fermentation des séries PAR et AR.

Les fermentations ont été réalisées par la souche *S. cerevisiae* L15 en triplicats.



**Figure 48 : Dosage des métabolites issus du MCC a l'arrêt des fermentations PAR.** Des ANOVA ont été réalisées entre les différentes conditions pour étudier la significativité des différences entre les séries. Pas de différences significatives observées dans cette étude.

Enfin, l'effet de l'ajout d'acide ricinoléique sur la production des lactones a été étudié (**Figure 49**).



**Figure 49 : Production des décalactones à l'arrêt des fermentations.** Des tests ANOVA ont été réalisés, et aucune différence significative n'a été trouvée.

Identiquement aux résultats précédents, l'ajout d'acide ricinoléique n'a eu aucune incidence sur la production des décalactones, avec des productions autour de 14 µg/L de δ-décalactone et 8 µg/L de γ-décalactone. La concentration supérieure en δ-décalactone par rapport à celle en γ-décalactone est en accord avec la tendance retrouvée dans les vins (Pérez-Olivero *et al.*, 2014).

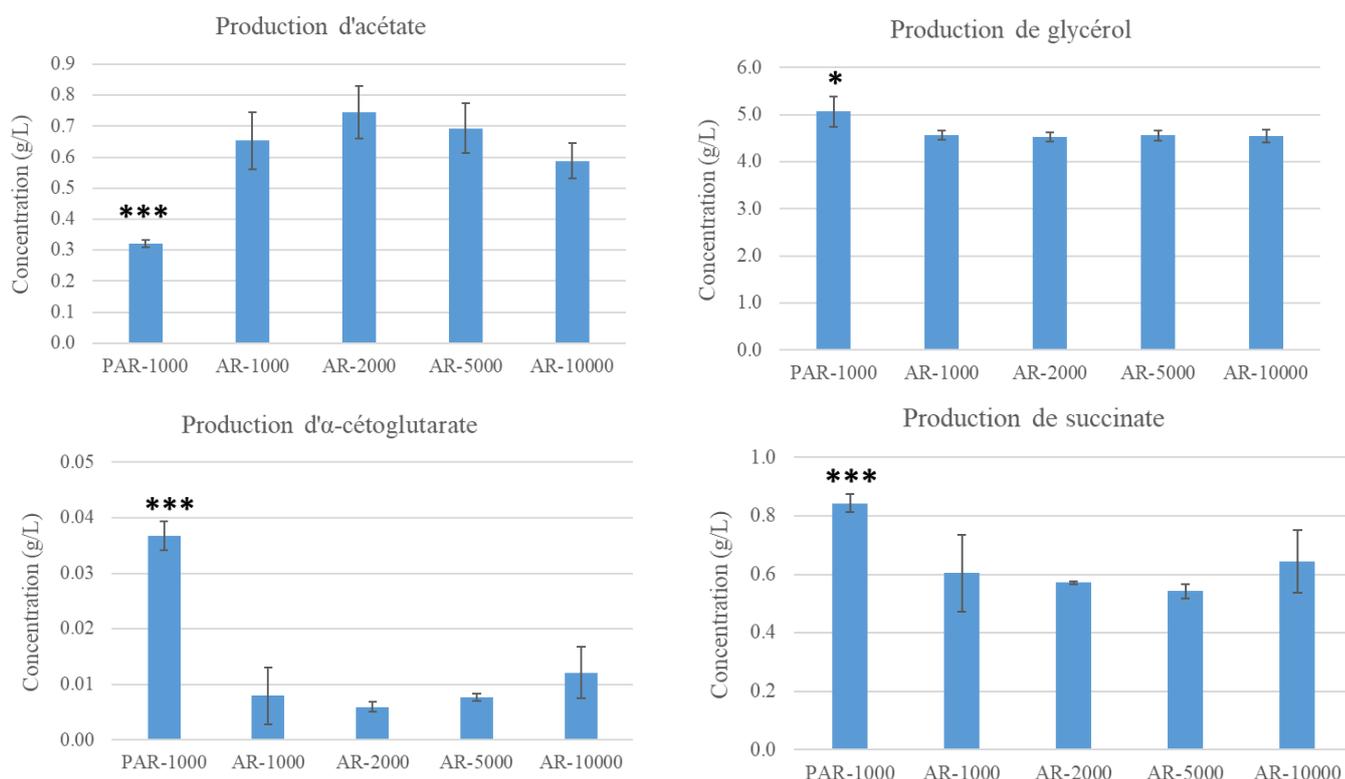
Ces différents résultats ont montré que les ajouts d'acide ricinoléique effectués au cours de cette étude n'ont eu aucun effet, tant sur le déroulement de la fermentation que sur le métabolisme de la souche *S. cerevisiae* L15.

## 2. Effets de l'ajout d'acide ricinoléique en l'absence de phytostérols

L'absence d'effet marqué d'ajouts croissants d'acide ricinoléique sur le déroulement de la FA et la production de métabolites pose la question de la capacité des levures à assimiler cet acide au cours de la fermentation. Pour répondre à cela, des fermentations uniquement en présence d'acide ricinoléique (sans phytostérols) ont été réalisées (série AR). La condition PAR1000 (1000 µg/L avec phytostérols) constitue le témoin lors de cette étude.

La suppression des phytostérols, corrélée à l'ajout d'acide ricinoléique, ont un effet sur la cinétique fermentaire. En effet, les fermentations sont plus languissantes, et ont été arrêtées au bout de 336 h (**Figure 47**). A leur arrêt, seule la condition AR-2000 n'a pas consommé plus de 95 % des sucres. Ce type de fermentations est caractéristique notamment de carences lipidiques à cause de débordages excessifs, pouvant entraîner une baisse de la viabilité cellulaire (Bertrand *et al.*, 1978; Julien *et al.*, 2000; Sablayrolles *et al.*, 1996). Lorsque les phytostérols sont absents du milieu, et remplacés uniquement par l'acide ricinoléique, les fermentations sont languissantes, traduisant une potentielle plus mauvaise incorporation et assimilation de cet acide gras par la souche L15. L'ajout de la plus grande concentration étudiée en acide gras (10 mg/L) ne semble pas résoudre ce problème.

L'impact de la suppression des phytostérols et de l'ajout d'acide ricinoléique sur le MCC a ensuite été étudié (**Figure 50**).



**Figure 50 : Dosage des métabolites issus du MCC a l'arrêt des fermentations AR.**

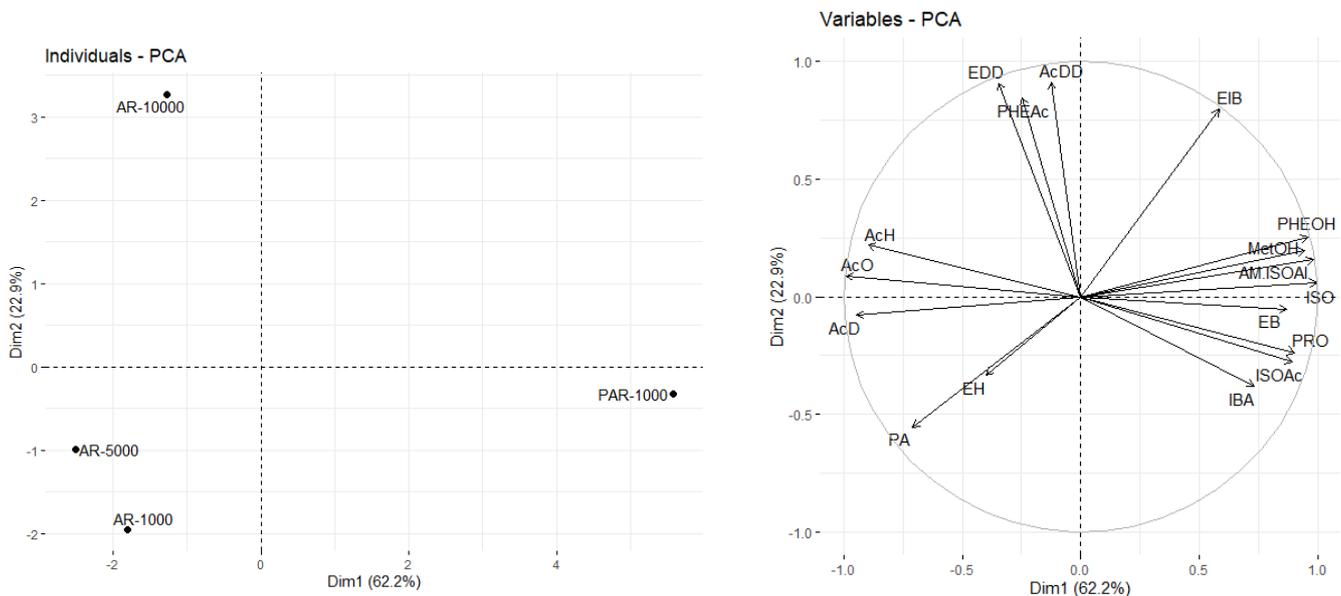
Des ANOVA ont été réalisées entre les conditions AR-1000 et PAR-1000 pour étudier la significativité des différences entre les séries. Pour les ANOVA : \*\*\* : p-value < 0.01 ; \* : p-value < 0.1.

Au sein de la série AR, il n'y a pas d'effet significatif des concentrations croissantes d'acide ricinoléique sur la production des métabolites issus du MCC.

Nous avons ensuite comparé l'effet de la présence de phytostérol par des ANOVA entre les conditions PAR-1000 et AR-1000, contenant la même concentration d'acide ricinoléique (1 mg/L), mais en présence ou en absence de phytostérols. Pour l'ensemble des composés étudiés, les différences sont significatives entre les conditions PAR-1000 et celles de la série AR1000 (p < 0,01 pour les acides organiques, p < 0.1 pour le glycérol)). La production d'acétate est doublée en l'absence de phytostérols qu'en leur présence, malgré l'ajout d'acide ricinoléique. En effet, les concentrations retrouvées dans la série PAR sont entre 0,32 et 0,35 g/L tandis qu'elles sont entre 0,65 et 0,75 g/L pour la série AR. Parallèlement à cela, les concentrations en glycérol, succinate et  $\alpha$ -cétoglutarate sont moindres pour la série PAR, traduisant un flux carboné orienté principalement vers la production d'acide acétique. Ces résultats traduisent une dérégulation du métabolisme des lipides. En effet, dans les conditions de la série B, il y a une

plus grande demande en acétyl-CoA pour la synthèse *de novo* d'acides gras, induisant l'activation du bypass de la pyruvate déshydrogénase, qui convertit le pyruvate en acétyl-CoA via trois réactions enzymatiques catalysées par une pyruvate décarboxylase, une acétaldéhyde déshydrogénase, et une acétyl-CoA synthase (Holzer & Goedde, 1957; Pronk *et al.*, 1994; Remize *et al.*, 2000). Cela implique un reflux d'acétate, et l'augmentation en besoin d'acétyl-CoA entraîne un flux plus limité vers le TCA, expliquant la diminution de la production de succinate et d' $\alpha$ -cétoglutarate.

A l'issue des fermentations de la série AR, les productions de composés aromatiques fermentaires majoritaires ont été quantifiées, puis compilées sous forme d'analyse en composantes principales (**Figure 51**).



**Figure 51 :** ACP de la production d'arômes fermentaires majoritaires dans les différentes conditions AR.

La condition AR-2000 n'a pas été représentée, car son avancement de fermentation était plus faible que les autres conditions. EP : propanoate d'éthyle ; EIB : isobutyrate d'éthyle ; PA : acétate de propyle ; IBA : acétate d'isobutyle ; EB : butanoate d'éthyle ; PRO : propanol ; ISO : isobutanol ; ISOAc : acétate d'isoamyle ; AM+ISOAl : alcool amylique + isoamylique ; EH : hexanoate d'éthyle ; PHEOH : 2-phényléthanol ; EDD : dodécanoate d'éthyle ; AcH : acide hexanoïque ; AcO : acide octanoïque ; AcD : acide décanoïque ; AcDD : acide dodécanoïque ; PHEAc : acétate de 2-phényléthyle ; MetOH : méthionol. Les valeurs utilisées pour réaliser cette ACP sont recensées dans le **Tableau S1**.

Les concentrations obtenues en méthionol, en alcools supérieurs branchés ainsi que leurs esters acétiques correspondants étaient plus faibles qu'en présence de phytostérols (1,13 mg/L de méthionol pour AR-1000 contre 2,6 mg/L pour PAR-1000). Les concentrations plus faibles en esters acétiques pour la série AR peuvent aussi être expliquées par le fait que les acides gras insaturés, dont l'acide ricinoléique, ont été décrits comme répresseurs du gène *ATF1*, majoritairement responsable de la conversion des alcools supérieurs en esters acétiques (Fujii *et al.*, 1997; Fujiwara *et al.*, 1999; Malcorps *et al.*, 1991; Verstrepen *et al.*, 2003). Néanmoins, peu d'informations sont disponibles pour expliquer la grande différence dans la production de certains alcools supérieurs entre les séries PAR et AR, étant donné que les avancements de fermentation sont similaires (excepté AR-2000).

Contrairement aux alcools supérieurs et aux esters acétiques, en absence de phytostérols, la production d'acides gras est bien supérieure, notamment les acides butyrique, hexanoïque, octanoïque, et décanoïque (respectivement, pour PAR-1000 et AR-1000 : 2.9 mg/L et 3.6 mg/L ; 47.2 mg/L et 80.6 mg/L ; 8.7 mg/L et 12.1 mg/L ; 5.2 mg/L et 6.4 mg/L). Cette augmentation de la production des acides gras précédemment cités est en accord avec l'hypothèse d'une redirection des flux d'acétyl-CoA vers la synthèse *de novo* de lipides.

Malgré ces plus grandes quantités d'acides gras produits, la concentration en esters éthyliques associés n'est pas supérieure à la série AR, contenant des phytostérols, excepté pour la condition contenant le plus d'acide ricinoléique (AR-10000), qui produit les plus grandes quantités de dodécanoate d'éthyle (1.1 mg/L contre moins de 0.5 mg/L pour la série PAR) et de décanoate d'éthyle (2.3 mg/L contre moins de 2 mg/L pour la série PAR). Ces observations ne sont pas en accord avec les données de la littérature, suggérant que la formation des esters éthyliques dépend surtout de la disponibilité en acides gras, et moins de l'expression des gènes codant pour les acyl-CoA/éthanol O transférase (Rollero *et al.*, 2015).

Enfin, la production de lactones a été étudiée en l'absence de phytostérols. Les observations sont les mêmes qu'en présence de phytostérols, *i.e.* aucun effet des différentes concentrations d'acide ricinoléique, avec des concentrations similaires entre les fermentations de la série PAR et celles de la série AR. L'absence de différences entre les séries et les conditions étudiées peut être expliquée par la voie de bioproduction des lactones. En effet, la première étape de la voie est une étape d'hydrolyse de l'acide gras précurseur. Or, cette étape est catalysée par des hydroxylases telles que des lipoxygénases ou des peroxydases, qui n'ont pas été identifiées chez *S. cerevisiae*. Cette réaction est également hautement non-spécifique, aboutissant à des rendements de production très bas (Hall *et al.*, 2004; Husson *et al.*, 2001). Si une telle enzyme

existe chez *S. cerevisiae*, il est possible que son activité soit également non spécifique, aboutissant à de très faibles concentrations en lactones. Une autre hypothèse peut être une mauvaise incorporation de cet acide gras.

### 3. Conclusion

Au cours de cette étude, l'impact de l'acide ricinoléique sur la fermentation de L15 a été étudié. Tout d'abord, son impact sur les cinétiques fermentaires a été observé. En l'absence de phytostérols, même en complétant avec de hautes concentrations d'acide ricinoléique, les fermentations ont toutes été languissantes, bien qu'elles aient été à leur terme ou atteint des avancements de fermentation importants (plus de 92 % pour la série B). De par cette importante consommation des sucres dans toutes les conditions, les différentes concentrations peuvent être comparées à l'arrêt des fermentations.

Les profils MCC des séries PAR et AR sont radicalement différents. En effet, la série AR induit une production importante d'acide acétique (jusqu'à 0.75 g/L), pouvant être corrélée à un besoin important en acétyl-CoA en anaérobiose. Cette forte augmentation d'acétate pour la série AR entraîne ainsi une diminution de la production d'autres métabolites carbonés tels que le glycérol ou le succinate.

L'impact de l'acide ricinoléique, précurseur des décalactones, a été également étudié sur la production de ces composés. Malgré des fortes concentrations en acides gras, aucune différence significative n'a été montrée entre les séries PAR et AR. La première hypothèse pouvant expliquer cet absence d'effet peut être le fait que cet acide gras n'est pas le précurseur des lactones étudiées. Les autres pistes de réflexion peuvent être la présence d'une enzyme encore non identifiée chez *S. cerevisiae*, potentiellement très peu spécifique de cet acide gras. Il serait intéressant d'étudier la présence d'une telle hydrolase chez *S. cerevisiae*. Une augmentation significative de la production d'acides gras a été observée pour la série AR, en accord avec une redistribution des flux d'acétyl-CoA. Au sein d'une même série, les effets sont ceux décrits dans la littérature, à savoir une concentration en alcools supérieurs (alcool isoamylique, amylique et isobutanol notamment) positivement corrélée à la concentration en lipides.

Afin de savoir si cette absence d'effet de l'acide gras sur la production des lactones est liée à une mauvaise incorporation de l'acide ou à un faible rendement enzymatique, il serait intéressant de doser l'acide ricinoléique au cours de la fermentation. L'autre hypothèse serait

une autre voie métabolique impliquée dans la production des lactones, mais cette voie hypothétique n'est pas documentée. Il serait également intéressant de tester les concentrations élevées en acides gras (de 2 à 10 mg/L) en présence de phytostérols.

Cette étude confirme l'importance des paramètres environnementaux – ici, les lipides – dans la modulation des profils volatils des vins, et dans la conduite de la fermentation.

**Annexes****Tableau S1 : Concentrations en composés d'arômes majoritaires (mg/L).** La série AR-2000 n'a pas été représentée, de par plus son faible avancement de fermentation.

		PAR-0	PAR-20	PAR-100	PAR-500	PAR-1000	AR-1000	AR-5000	AR-10000
<b>Esters d'acétate</b>	acétate de propyle	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0	0.07 ± 0.04	0.08 ± 0.01	0.06 ± 0
	acétate d'isobutyle	0.13 ± 0.02	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.03	0.12 ± 0.03	0.12 ± 0.01	0.1 ± 0.04	0.11 ± 0.01	0.1 ± 0.01
	acétate d'isoamyle	4.2 ± 0.78	4.07 ± 0.3	4.39 ± 0.56	4.2 ± 1.12	4.39 ± 0.36	3.02 ± 1.04	3.4 ± 0.45	2.88 ± 0.13
	acétate de 2-phényléthyle	17.23 ± 4.51	19.69 ± 1.28	21 ± 5.86	18.07 ± 5.4	16.54 ± 5.12	14.62 ± 4.47	18.72 ± 2.57	20.77 ± 1.51
<b>Alcools supérieurs</b>	propanol	23.83 ± 2.76	22.99 ± 0.44	23.08 ± 4.5	26.51 ± 4.64	27.66 ± 1	22.61 ± 5.25	24.07 ± 2	22.35 ± 5.59
	isobutanol	55.29 ± 3.97	49.69 ± 0.2	54.07 ± 15.81	56.51 ± 12.74	58.74 ± 4.28	35.5 ± 5.44	35 ± 3	39.09 ± 13.01
	alcool amylique + isoamylique	271.28 ± 49.04	272.29 ± 1.22	305.65 ± 49.16	302.51 ± 52.47	311.28 ± 11.52	160.38 ± 23.99	165.03 ± 11.13	199.96 ± 76.14
	2-phényléthanol	100.69 ± 7.7	103.5 ± 7.61	134.29 ± 44.3	111.5 ± 12.97	113.25 ± 16.56	66.22 ± 16.69	57.74 ± 16.57	81.34 ± 25.24
<b>Acides</b>	acide butyrique	2.63 ± 0.57	3.06 ± 0.2	2.39 ± 0.78	3.11 ± 0.74	2.87 ± 0.83	3.63 ± 1.21	5.33 ± 0.56	4.32 ± 0.25
	acide pentanoïque	1.21 ± 0.22	1.31 ± 0.07	1.27 ± 0.13	1.41 ± 0.32	1.34 ± 0.4	1.3 ± 0.43	1.9 ± 0.21	1.55 ± 0.07
	acide hexanoïque	46.62 ± 15.91	54.54 ± 2.18	44.41 ± 10.35	52.43 ± 14.49	47.22 ± 15.14	80.58 ± 27.04	116.34 ± 4.43	101.71 ± 2.29
	acide octanoïque	8.28 ± 1.74	9.41 ± 0.13	7.4 ± 1.71	9.25 ± 1.42	8.71 ± 1.09	12.08 ± 1.72	12.96 ± 0.88	12.36 ± 0.99
	acide décanoïque	4.92 ± 1.13	5.61 ± 0.08	3.79 ± 2.11	5.56 ± 0.98	5.18 ± 0.44	6.43 ± 1.45	7.18 ± 0.75	6.4 ± 0.31

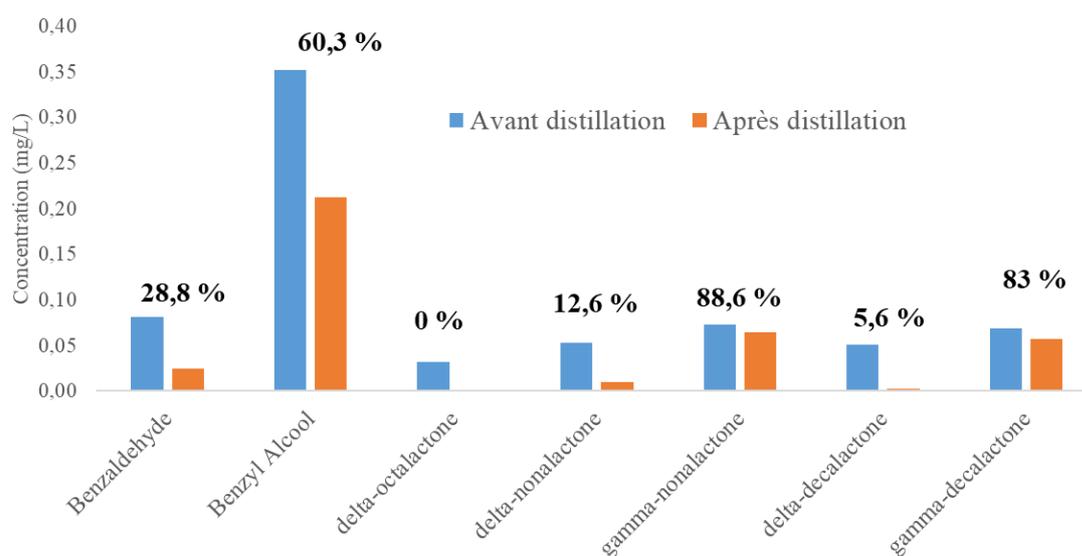
	acide dodécanoïque	0.42 ± 0.01	0.45 ± 0.03	0.41 ± 0.1	0.5 ± 0.04	0.46 ± 0.05	0.39 ± 0.02	0.5 ± 0.06	0.58 ± 0.05
	acide-2-methylpropanoïque	0.47 ± 0.07	0.5 ± 0.05	0.44 ± 0.14	0.55 ± 0.09	0.47 ± 0.02	0.39 ± 0.08	0.52 ± 0.03	0.54 ± 0.15
	acide 2 methylbutyrique	6.68 ± 0.67	7.1 ± 0.3	6.35 ± 1.42	8.16 ± 1.21	6.6 ± 1.8	5.24 ± 1.88	6.76 ± 0.37	6.91 ± 1.63
	acide 3 methylbutyrique	9.61 ± 0.84	10.23 ± 0.35	9.09 ± 1.93	11.61 ± 1.65	9.4 ± 2.48	7.42 ± 2.4	9.75 ± 0.85	10.15 ± 2.43
<b>Esters éthyliques</b>	propanoate d'éthyle	0.15 ± 0.03	0.13 ± 0.01	0.16 ± 0.03	0.17 ± 0.03	0.15 ± 0.01	0.12 ± 0.02	0.12 ± 0.01	0.13 ± 0.03
	butyrate d'éthyle	0.41 ± 0.09	0.4 ± 0.02	0.41 ± 0.03	0.43 ± 0.08	0.43 ± 0.02	0.37 ± 0.08	0.39 ± 0.02	0.38 ± 0.07
	hexanoate d'éthyle	1.4 ± 0.33	1.65 ± 0.06	1.62 ± 0.09	1.68 ± 0.31	1.72 ± 0.08	1.71 ± 0.4	2.05 ± 0.19	1.7 ± 0.14
	lactate d'éthyle	1.02 ± 0.22	1.11 ± 0.16	1.02 ± 0.28	1.31 ± 0.31	1.09 ± 0.11	1.57 ± 0.53	2.18 ± 0.23	2.4 ± 0.81
	octanoate d'éthyle	1.75 ± 0.35	2.04 ± 0.04	2.08 ± 0.09	2.06 ± 0.4	2.18 ± 0.17	1.72 ± 0.31	2.12 ± 0.07	2.19 ± 0.45
	décanoate d'éthyle	1.62 ± 0.35	1.82 ± 0.09	1.92 ± 0.35	1.97 ± 0.19	2.17 ± 0.05	1.13 ± 0.35	1.79 ± 0.31	2.3 ± 0.54
	dodécanoate d'éthyle	0.36 ± 0.03	0.4 ± 0.02	0.42 ± 0.09	0.46 ± 0.03	0.47 ± 0.15	0.38 ± 0.12	0.7 ± 0.12	1.08 ± 0.29



## ANNEXE 2 : Impact de la distillation sur les dérivés benzéniques et les lactones

Le projet de thèse visant à être appliqué dans le secteur du Cognac, l'impact de la distillation sur les dérivés benzéniques et les lactones. Les informations sur les terpènes ont déjà été obtenues par l'entreprise Martell, et ces molécules ne font pas partie de cette étude.

Un vin blanc a été supplémenté avec du benzaldéhyde, de l'alcool benzylique, ainsi que toutes les lactones étudiées. Ce vin blanc a ensuite été distillé en laboratoire. Les concentrations en ces divers composés ont ensuite été quantifiées dans le vin de départ et dans le distillat, afin de pouvoir calculer les potentielles pertes liées à la distillation. Bien que les conditions de distillation soient différentes de la double distillation charentaise, cela permet d'avoir une première approche de l'effet de ce procédé sur les composés étudiés. Les résultats sont compilés sur la **Figure 1**.



**Figure 1 : Impact de la distillation sur les dérivés benzéniques et les lactones.** Le % noté est le pourcentage de recouvrement suite à la distillation.

Les composés étudiés ont des comportements relativement différents concernant la distillation. En effet, 28,6 % du benzaldéhyde ajouté dans le vin sont retrouvés dans le distillat, contre 60,3 % pour l'alcool benzylique. Pour les lactones, il est intéressant de noter que seules les  $\gamma$ -lactones se retrouvent à plus de 80 % dans le distillat. En revanche, les  $\delta$ -lactones ne supportent pas l'étape de distillation, avec moins de 15 % retrouvés dans le distillat. Ces observations peuvent être dues à des potentielles recombinaisons entre les molécules. Il a été montré que l'étape de double distillation charentaise pouvait être à l'origine de recombinaisons de certains composés, impliquant l'apparition de nouveaux composés, notamment des terpènes et des norisoprénoïdes (Awad *et al.*, 2017). Il est très probable qu'il existe des réarrangements de lactones, notamment les  $\delta$ -lactones, puisque des auteurs ont montré que certaines lactones pouvaient être formées à partir d'autres lactones (Romero-Guido *et al.*, 2011).

ANNEXE 3 : Etude du métabolisme de *Hanseniaspora osmophila*



# Etude du métabolisme d'une espèce de levure non-*Saccharomyces* isolée du consortium œnologique

Présenté par Chloé Pyron

Tutrices INRA : Carole Camarasa et Audrey Bloem

Encadrant : Guillaume Bergler

Tutrice Polytech : Céline Breton

Rapporteur : Alexandre Colas de la noue



## Table des matières

1	L'INRA.....	3
1.1	Présentation générale.....	3
1.1.1	L'INRA au niveau national.....	3
1.1.2	L'unité SPO (Sciences Pour l'Oenologie).....	3
1.1.3	L'équipe FLAM (Fermentation alcoolique : Levures, Arômes, Métabolisme).....	4
1.2	Enjeux et objectifs.....	4
1.3	Des moyens de communication performants.....	5
1.4	Un système qualité opérationnel.....	6
1.5	Des activités de prévention et de sécurité efficaces.....	6
1.6	Une optique de développement durable et responsabilité sociétale.....	7
1.7	Management de projet.....	7
1.7.1	Evaluation des délais.....	7
1.7.2	Estimation des coûts.....	8
1.7.3	Analyse post-mortem.....	8
1.8	Retour d'expérience.....	8
2	Contexte.....	9
3	Introduction bibliographique.....	10
3.1	La fermentation alcoolique en œnologie.....	10
3.1.1	Les caractéristiques de la fermentation alcoolique.....	10
3.1.2	Impact des paramètres fermentaires sur le déroulement de la fermentation alcoolique 11	
3.2	La diversité des levures identifiées en œnologie.....	13
3.2.1	Les levures non- <i>Saccharomyces</i> .....	13
3.2.2	La co-inoculation et l'inoculation séquentielle.....	14
3.3	Le métabolisme des levures.....	15
3.3.1	Le métabolisme central carboné.....	15
3.3.2	Le rôle des levures dans la libération d'arômes.....	16
3.3.3	Synthèse des alcools supérieurs.....	17
3.3.4	Synthèse des esters d'acétate.....	18
3.3.5	Synthèse des esters d'éthyle.....	19
4	Résultats et discussion.....	19
4.1	Etude préliminaire sur <i>H. osmophila</i> .....	19
4.2	Etude sur les transformants.....	21
4.2.1	Etude cinétique.....	21
4.2.2	Etude des métabolites fermentaires issus du métabolisme carboné central (MCC).....	23

4.2.3	Production de composés volatils.....	26
5	Conclusion .....	31
6	Bibliographie.....	33
	Résumé.....	35

## 1 L'INRA

### 1.1 Présentation générale

#### 1.1.1 L'INRA au niveau national

L'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) est le premier institut de recherche agronomique en Europe et se place en deuxième position dans le domaine des sciences agricoles dans le monde. L'institut aborde des domaines variés traitant de l'alimentation, l'agriculture et l'environnement. L'INRA compte ainsi 4 584 publications scientifiques, dont 56% sont co-signées avec un partenaire étranger. En 2017, l'INRA recense 980 contrats actifs, avec une recette perçue de 20,4 M d'euros. Les contrats établis sont principalement signés avec des PME (Petites et Moyennes Entreprises) et ETI (Entreprises de Tailles Intermédiaires) (Figure 1).

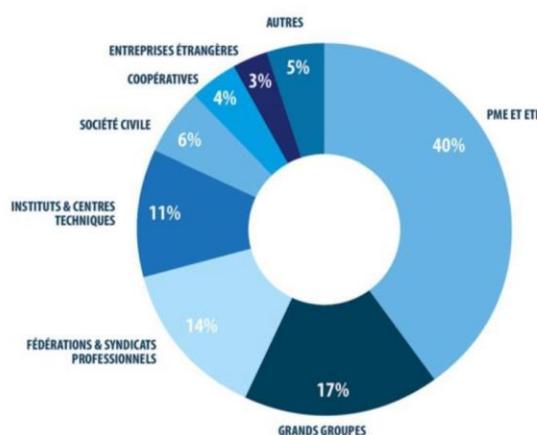


Figure 1 : Cartographie des partenariats de l'INRA en 2017

L'institut est force d'innovation et de découvertes scientifiques avec 340 brevets déposés. Ce sont au total 13000 personnes qui travaillent conjointement sur des projets nationaux et internationaux. L'INRA compte ainsi 250 unités de recherche et 45 unités expérimentales répartis dans 17 centres de recherches.

A l'heure actuelle, l'INRA est en cours de fusion avec l'IRSTEA. Ce dernier est un établissement public à caractère scientifique spécialisé dans les domaines de l'agriculture et de l'environnement. La fusion est prévue pour le 1<sup>er</sup> Janvier 2020. Le nouvel institut aura pour nom développé *Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement*, dont l'acronyme sera INRAE.

#### 1.1.2 L'unité SPO (Sciences Pour l'Oenologie)

Au sein de l'INRA se répartissent plusieurs unités. L'unité SPO (Sciences Pour l'Oenologie) se situe dans le campus de Supagro, place Pierre Viala à Montpellier. L'unité SPO a été créée conjointement par l'INRA, Montpellier SupAgro et l'Université de Montpellier en 2000. L'unité comprend des chercheurs de l'INRA, des enseignants chercheurs de l'UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Montpellier ainsi que de l'école d'ingénieur SupAgro, des techniciens et des non-permanents (doctorants et stagiaires). Au total, c'est une soixantaine de permanents et une cinquantaine de non-permanents qui travaillent dans le domaine de la fermentation. Classé comme l'un des plus gros pôles de la filière œnologie, il s'agit d'un des rares centres à bénéficier de telles technologies de pointe en

matière de suivi fermentaire. Spécialisée dans le domaine de l'œnologie, l'équipe travaille également sur d'autres procédés fermentaires tels que la panification, la fermentation du cacao et la brasserie.

Au sein de l'unité se distinguent trois équipes : l'équipe FLAM (Fermentation alcoolique : Levures, Arômes, Métabolisme), l'équipe ADEL (Adaptation, Diversité, Ecologie des Levures) et l'équipe BIO (Biomolécules d'Intérêt en Œnologie). L'équipe FLAM étudie en profondeur le procédé de fermentation alcoolique afin d'en moduler le profil aromatique. L'équipe ADEL est quant à elle spécialisée dans le domaine de la génétique, en étudiant l'adaptation des levures à leur milieu. Enfin, l'équipe BIO oriente son expertise dans les domaines de la physico-chimie et étudie les relations matière première/produit fini ainsi que les liens entre la composition et la typicité des vins.

La pluridisciplinarité des équipes constitue le point fort l'unité SPO. De nombreux projets sont transversaux ce qui permet de mutualiser à la fois les outils et les connaissances. Ce fonctionnement permet de traiter de sujets vastes de la façon la plus exhaustive afin de répondre aux enjeux environnementaux et sociétaux actuels.

Afin de partager les outils efficacement, quatre plateaux techniques sont quotidiennement gérés par des techniciens référents. La plateforme polyphénol permet d'offrir une expertise et des ressources analytiques dédiées aux polyphénols. Leurs clients sont à la fois issus du secteur public et du secteur privé. La plateforme participe également à des projets de recherche en collaboration, accueille des intervenants extérieurs et pratique des formations. Le plateau technique d'analyse sensorielle est quant à lui rattaché à SPO et à Pech Rouge. Il permet la mise en œuvre de méthodes sensorielles et statistiques en adéquation avec les études menées. Le plateau technique des volatils est lui spécialisé dans le développement de méthodes d'analyses permettant la détection et la quantification des composés volatils. Enfin, le plateau technique de fermentation regroupe des dispositifs permettant un suivi automatique et précis des fermentations en conditions œnologiques. Ces dernières peuvent se faire de l'échelle du laboratoire à l'échelle pilote. Les objectifs premiers de ce plateau sont ainsi de mettre en œuvre des solutions de suivi en ligne et de développer des modes de gestion innovants de la fermentation.

#### 1.1.3 L'équipe FLAM (Fermentation alcoolique : Levures, Arômes, Métabolisme)

L'équipe FLAM se compose de 7 chercheurs et enseignants chercheurs, de 4 techniciens et de 5 doctorants. Les sujets d'étude portent sur la compréhension du métabolisme des levures, à la fois chez les levures *Saccharomyces* et les non-*Saccharomyces*. Cette expertise s'oriente notamment sur la production de composés volatils, afin de déterminer leur origine et les voies métaboliques dans lesquelles elles sont impliquées. Par ailleurs, l'équipe s'intéresse à l'impact des paramètres environnementaux sur la production des composés volatils afin de maîtriser les effets. Pour cela, des fermentations à différentes échelles sont réalisées, allant de 10 mL à 100 L. Les fermentations en volumes de 10 mL, 250 mL et 1 L sont réalisés sur place. En ce qui concerne les plus gros volumes, de nombreux échanges sont réalisés avec l'Unité Expérimentale de Pech Rouge, située à Narbonne. Ces derniers sont dotés de dispositifs à l'échelle pilote ayant des capacités de 10 L et de 100 L comprenant des systèmes de suivi en ligne.

### 1.2 Enjeux et objectifs

La stratégie de l'INRA s'établit à l'échelle européenne et internationale. Elle vise à renforcer les coopérations avec l'enseignement supérieur tout en développant les partenariats et l'innovation. Pour cela, l'INRA valorise les projets interdisciplinaires autour des enjeux environnementaux et sociétaux.

Les enjeux de l'INRA se traduisent à plusieurs niveaux : économique, environnemental, sanitaire, politique, territorial et social. Leurs objectifs globaux sont de nourrir la France et la planète tout en

assurant une alimentation saine et durable, réduire la dépendance aux pesticides et engrais, anticiper et lutter contre le changement climatique, prévenir des zoonoses, sauver les espèces en voie de disparition ainsi que d'innover en termes de sélection animale et végétale tout en conservant la biodiversité génétique.

A l'échelle de l'unité, les enjeux économiques et environnementaux sont fortement marqués. Les défis environnementaux auxquels répond l'unité résident dans la réduction des intrants, comme le SO<sub>2</sub>. La recherche de solutions innovantes pour palier au réchauffement climatique est également un objectif clé de SPO. En effet, le réchauffement climatique entraîne par exemple une hausse du degré alcoolique, produisant des vins hors réglementation.

D'un point de vue économique, la recherche de financements publiques et privés sont au cœur des réflexions de l'unité. A l'heure actuelle, une part égale des financements est attribuée par les deux secteurs. Le renforcement des liens avec les partenaires industriels comme Lallemand sont des enjeux permanents et essentiels au bon fonctionnement de l'unité. La création de nouvelles thèses CIFRE permet notamment de créer de nouveaux partenariats industriels intéressants. Par ailleurs, afin de répondre aux enjeux économiques liés à la concurrence, le développement de nouveaux composés aromatiques constitue un des objectifs premiers de l'unité.

Au niveau de mon stage, des enjeux plus spécifiques coexistent. Cette étude étant réalisée en partenariat avec Lallemand et Pernot Ricard, des résultats sont attendus. Afin de se démarquer vis-à-vis de la concurrence, ces derniers souhaitent développer de nouvelles souches produisant des arômes atypiques. L'étude des levures non-*Saccharomyces* est apparue intéressante, leurs caractéristiques métaboliques et sensorielles étant encore méconnues. La compréhension du métabolisme de la levure que j'étudie permettra aux industriels, à terme, de commercialiser cette levure en tant que starter œnologique. Pernot-Ricard et Lallemand pourront ainsi se démarquer de leurs concurrents par la vente d'un produit œnologique innovant sur le marché des levures, leur permettant d'opérer une stratégie de différenciation.

### 1.3 Des moyens de communication performants

Afin que l'ensemble de l'UMR se tienne informé des recherches scientifiques, des journées annuelles sont tenues avec l'ensemble de l'UMR. Cette année, deux jours ont été consacrés pour exposer les différents travaux réalisés par chaque équipe. Par ailleurs, des échanges avec l'Unité Expérimentale de Pech Rouge sont régulièrement organisés afin d'entretenir les liens qui unissent les deux unités. En effet, les thématiques de recherche sont fortement liées entre-elles et de nombreux travaux sont réalisés conjointement entre les deux instituts. Une journée à l'unité SPO a déjà eu lieu dans le but de réaliser des échanges sur les thématiques de recherche et de participer à des ateliers interactifs liés aux domaines de la viticulture et de l'œnologie.

Parallèlement à cela, des réunions mensuelles avec l'ensemble de l'UMR sont effectuées. Celles-ci permettent de tenir le personnel informé de toute actualité nouvelle liée à l'unité. Egalement, des réunions mensuelles par équipe sont tenues chaque premier jeudi du mois. Un membre de l'équipe présente ses travaux en cours puis ce sont les informations liées fonctionnement qui sont énoncées. De manière plus rapprochée, des réunions avec mes tutrices sont tenues régulièrement pour suivre l'avancement de mon projet. Ces réunions font office de discussion des résultats et de prises de décisions pour les expérimentations suivantes.

Enfin, les informations plus globales sont envoyées par mail à l'ensemble du personnel. Elles sont également disponibles sur l'intranet et sont diffusées sur un écran à l'accueil du bâtiment. Les

documents communs ayant un but de pérennité, comme les modes opératoires par exemple, sont également disponibles sur l'intranet.

#### 1.4 Un système qualité opérationnel

L'unité SPO a créé au sein de l'établissement une équipe qualité qui veille au respect des règles établies. Elle est composée d'un animateur qualité, d'un responsable métrologie, d'un responsable de la documentation qualité et de correspondants de différentes entités constitutives de l'unité. Les démarches qualité de l'INRA s'inscrivent dans un référentiel interne adapté à la recherche. Le référentiel qualité de SPO a été créé en 2000 et ne cesse d'évoluer. Le système qualité mis en place a deux objectifs majeurs : contrôler la traçabilité des activités et assurer la fiabilité des résultats.

Pour cela, des cahiers de laboratoire sont attribués à chaque membre du personnel. Les méthodes utilisées et les résultats obtenus y sont inscrits, chaque page étant validée et signée par le responsable scientifique. Les cahiers de laboratoire sont des éléments essentiels de la traçabilité et sont preuve d'authenticité, d'originalité et de paternité des résultats. Il est souhaité que ces cahiers deviennent numériques dans les années à venir.

Parallèlement à cela, les modes opératoires, les instructions et les procédures suivent des règles de validation strictes. Rédigé selon des codes d'usages, le document est vérifié par un tiers et doit obtenir l'approbation de l'animateur qualité pour être officiellement diffusé. Chaque document est alors référencé selon un code spécifique (Mode opératoire : MO, Instruction : I, Procédure : P ...).

Afin de valider la fiabilité des résultats, une maintenance du matériel est réalisée régulièrement, avec des étalonnages et des vérifications qui s'appuient sur les principes de la métrologie. Par exemple, les balances étant des outils très fréquemment utilisés au laboratoire, leur vérification de conformité est réalisée tous les mois. A partir de Septembre, un poids sera mis à disposition à côté de chaque balance afin de vérifier son exactitude de mesure avant chaque pesé. Une fiche de suivi est également présente à côté de chaque appareil, afin d'y annoter le type d'analyse, la personne en charge de l'analyse, le nombre d'échantillons analysés, les lavages ou maintenances éventuelles ainsi que les anomalies pouvant être rencontrées. Cette traçabilité permet ainsi de contrôler la fréquence des anomalies et de gérer le niveau de maintenance en fonction de la quantité d'analyses réalisées.

#### 1.5 Des activités de prévention et de sécurité efficaces

La sécurité et la prévention des risques est au cœur des activités de l'UMR. Une équipe est notamment dédiée au bon fonctionnement des règles, avec deux assistants de préventions de l'unité. Ces derniers organisent les visites de sécurité qui ont lieu après l'arrivée de chaque nouveau permanent ou non permanent. Les issues de secours nous ont ainsi été indiquées, tout comme les boîtiers d'alarme incendie et les extincteurs présents à côté de chaque escalier. Des boîtiers de premiers soins sont disposés à chaque étage de l'établissement, tout comme des rinces-œil et des douches de sécurité. De l'absorbant végétal est également disponible dans les laboratoires afin d'éliminer rapidement et sans risque les liquides chimiques ou souillés tombés à terre.

Par ailleurs, il existe un registre « santé et sécurité au travail » dans lequel chaque problème lié à l'environnement, aux ambiances de travail, aux risques d'incidents, accidents corporels ou maladies sont consignés. Ce registre est à disposition de tous les membres du personnel. Il est destiné à être évolutif et vivant afin de prévenir au mieux les risques liés au travail.

L'INRA dispose également d'un document unique dans lequel sont renseignés l'ensemble des risques identifiés de chaque unité de travail. Le document, nommé OPPI, est consultable par tout le personnel. Il est modifiable auprès des membres du groupe OPPI.

En ce qui concerne les visites médicales, celles-ci sont assurées par la médecine du travail. Une visite médicale est obligatoire pour tout employé travaillant plus de six mois au sein de l'unité.

La sécurité au travail est un engagement quotidien. L'ensemble du personnel de recherche doit porter des équipements de protection individuelle (EPI) lors de leurs expérimentations en laboratoire. Le port de la blouse est obligatoire et des gants et lunettes sont mis à disposition dans chaque laboratoire. Travaillant sur du matériel vivant, et notamment des souches de levures, le risque pathogène est écarté. Le risque de contamination des échantillons est ici plus important que le risque de santé du manipulateur. En revanche, je réalise des extractions de composés volatils. Pour cela, j'utilise du dichlorométhane, composé cancérigène. Un travail sous hotte avec des gants est indispensable pour éviter tout incident de travail. Que ce soit sur les flacons de produits ou sur les modes opératoires, les consignes de sécurité sont mentionnées.

### 1.6 Une optique de développement durable et responsabilité sociétale

L'unité SPO est soucieuse des enjeux environnementaux et sociaux actuels. Tout d'abord, une gestion des déchets stricte est adoptée. Une salle aérée est réservée au stockage des déchets, rangés selon la toxicité de chaque produit. Les déchets sont évacués par des entreprises extérieures, qu'ils soient des déchets chimiques ou biologiques. Par ailleurs, la réduction de l'utilisation de composés toxiques fait parti des enjeux de l'équipe. Les modes opératoires évoluent dans le temps pour permettre la réduction de l'utilisation de produits chimiques dangereux pour l'Homme et l'environnement.

Parallèlement à cela, des pratiques écoresponsables sont pratiquées par l'ensemble des employés. L'impression papier est par exemple limitée, privilégiant le partage d'informations via le réseau informatique. De plus, des mails groupés sont fréquemment envoyés pour rappeler les bons gestes écocitoyens : éteindre la lumière, limiter l'utilisation de la climatisation et du chauffage etc.

Les sujets de recherche sont également orientés vers des thématiques environnementales et participent donc, à une certaine échelle, à la préservation de l'environnement.

En ce qui concerne le pilier social, l'INRA propose de nombreuses formations, que ce soit pour les permanents ou les non-permanents. Ces formations permettent de valoriser la carrière des employés tout en leur permettant d'accroître leurs connaissances dans des domaines diversifiés. Des formations spécifiques sont également proposées aux employés pour accéder à des postes à plus hautes responsabilités en interne. Enfin, les conditions de travail ont été réfléchies dans le but d'être les plus agréables possible. Un patio commun aménagés et des produits électroménagers (machines à cafés, réfrigérateurs, micro-ondes) sont mis à disposition de tous pour offrir des moments de détente et de partage. De nombreux événements conviviaux sont réalisés, comme des apéritifs entre équipe. L'accès au sport est également facilité avec des tarifs préférentiels permettant de nombreuses activités sportives et culturelles.

### 1.7 Management de projet

#### 1.7.1 Evaluation des délais

Afin de respecter les délais, un GANTT prévisionnel a été réalisé (Annexe 1). Celui-ci a été respecté autant que possible, même si des différences existent naturellement entre le GANTT prévisionnel et le GANTT réel (Annexe 1). En effet, le planning a pris légèrement de retard, pour plusieurs raisons. Tout d'abord, une expérience 1bis a dû être réalisée. Les résultats obtenus lors de la première expérimentation en fermenteurs de 1L ont montré une cinétique plus faible que celle obtenue lors d'études antérieures sur des fermenteurs de 250 mL. Lors de ces études antérieures, le moût utilisé était différent. Il a donc paru intéressant de lancer une expérimentation 1bis afin de tester l'impact du volume du fermenteurs et du moût sur la cinétique fermentaire. Cette étude a alors montré que le

moût n'avait aucune influence sur la cinétique, au contraire du volume du fermenteur. Suite à cela, le volume choisi pour la suite des expérimentations a été de 250 mL. Par ailleurs, il a été difficile de respecter les délais en raison de la disponibilité parfois réduite de certains appareils. Enfin, les études menées en recherche étant à l'état expérimental, les protocoles sont parfois réadaptés et les résultats retravaillés.

### 1.7.2 Estimation des coûts

Les coûts estimés au sein de ce rapport ne comptent que les coûts d'analyse, eux-même basés sur des coûts directs. Ainsi, le prix d'analyse par échantillon et le nombre d'échantillons sont présentés tableau 1.

Tableau 1 : Estimation des coûts directs générés lors du stage

Analyse	Coût/ech ou L	Nombre ech ou L	Coût final
HPLC	1,65	123	202,95
GC-MS	9	71	639
Fermentation	5,5	20	110
Biochrom	15	30	450
Kit enzymatique	127,65	1	127,65
Marquage	500	1	500
<b>TOTAL</b>			<b>2029,6</b>

Le travail réalisé au sein de ce stage a généré un coût s'élevant à 2030 euros. Les salaires n'ont pas été considérés ici, tout comme l'amortissement des machines.

### 1.7.3 Analyse post-mortem

La plus grande difficulté de ce stage a été le respect des délais. En effet, le matériel d'analyse n'est pas toujours disponible et le déroulement des expérimentations n'est pas toujours optimal. Il est également difficile de travailler avec du matériel biologique. Celui-ci étant un matériel vivant, les fermentations fonctionnent en continu et des relevés de nuits sont parfois nécessaires. Egalement, le retraitement des données est parfois lourd puisque le nombre de molécules suivies est conséquent. Il faut ainsi travailler méthodiquement et générer une certaine organisation. De manière globale, le déroulement des missions a été respecté et les réponses clés liées à la thématique du projet ont été répondues. De nouvelles questions se posent désormais et des expériences seront pour cela réalisées aux mois de juillet et août.

## 1.8 Retour d'expérience

Ce stage m'a permis d'être d'autant plus organisée dans mes tâches et de planifier en amont les analyses à effectuer. En effet, il faut prévoir en avance le nombre de prises d'échantillons, le volume et les paramètres de fermentation afin de disposer de tous les échantillons nécessaires à l'interprétation des résultats et la compréhension des mécanismes mis en jeu. Il faut ainsi réfléchir à ce qui est observé, quand et comment. Par ailleurs, ce stage m'a appris à être critique avec les résultats obtenus, mais également de sélectionner les résultats pertinents.

Ce stage a été pour moi une très belle expérience, que ce soit d'un point de vue humain ou scientifique. L'accueil au sein de l'équipe a été très chaleureux et la présence de nombreux stagiaires et doctorants a rendu mon intégration d'autant plus facile. Mes missions ont bien été définies dès le premier jour de

mon stage et un suivi régulier par mes encadrants m'a permis de remplir mes objectifs. Leur disponibilité, leur écoute et leur pédagogie m'ont permis de prendre rapidement en mains les outils et les techniques spécifiques pratiqués dans le laboratoire. Mon travail a ainsi été encadré tout en me laissant des responsabilités et un degré d'autonomie. J'ai également acquis de nombreuses connaissances dans le domaine de l'œnologie, sujet qui me passionne particulièrement.

Ce stage m'as permis d'acquérir des compétences dans les domaines de la fermentation et de l'analytique. Je sais désormais planifier, réaliser et suivre des micro-fermentations. Je suis capable de choisir des points de prélèvement utiles à l'interprétation des résultats. Je sais également suivre l'évolution des nutriments utiles à la croissance des levures ainsi que les métabolites qu'elles produisent. Ce stage m'a apporté de nombreuses connaissances sur le métabolisme levurien et sur la formation des arômes fermentaires. Ces connaissances me seront notamment utiles pour mon projet professionnel.

En effet, cette expérience a confirmé mon envie de travailler dans le domaine du vin, notamment appliqué à la microbiologie. Je souhaite aujourd'hui travailler dans le développement de nouvelles souches starter chez des fournisseurs œnologiques comme Lallemand ou Chr Hansen. Je serais également intéressée à travailler en Recherche & Développement dans des domaines viticoles afin d'optimiser leurs procédés fermentaires, que ce soit dans le développement de nouvelles caractéristiques sensorielles ou dans la réduction des intrants œnologiques avec l'utilisation de souches bioprotectrices.

## 2 Contexte

Les levures non-*Saccharomyces* ont longtemps été considérées comme des flores d'altérations, l'ajout de sulfites étant un moyen de limiter leur croissance en début de fermentation. Cependant, les connaissances actuelles montrent que ces levures peuvent avoir un effet bénéfique sur les qualités sensorielles des vins (Martin et al., 2018). Plusieurs espèces non-*Saccharomyces* sont déjà commercialisées en tant que starters œnologiques, alors que d'autres espèces sont encore à l'état de recherche dans le but d'évaluer leur potentiel d'application (Tristezza et al., 2016).

L'intérêt de ce stage est d'étudier le métabolisme d'une levure non-*Saccharomyces*, *Hanseniaspora osmophila*, dans le but d'une utilisation future en tant que ferment œnologique. Son métabolisme est notamment caractérisé par l'étude du métabolisme central carboné, l'évaluation des capacités fermentaires, la consommation de l'azote et la production de composés volatils. Le métabolisme lié aux arômes est particulièrement étudié afin de développer de nouvelles qualités sensorielles aux vins produits. L'inoculation séquentielle est privilégiée, *Hanseniaspora osmophila* apportant des arômes originaux en début de fermentation et *Saccharomyces cerevisiae* permettant une fermentation alcoolique complète. A l'issue de la caractérisation, une étude complémentaire devra ainsi être réalisée afin de comprendre les mécanismes d'interaction entre ces deux souches et proposer un protocole d'inoculation viable.

Cette étude vise donc à caractériser les bases métaboliques et moléculaires responsables des spécificités phénotypiques d'*Hanseniaspora osmophila*. Elle permettra, *in fine*, d'améliorer la compréhension des mécanismes mis en jeu chez *Hanseniaspora osmophila* et ses potentielles implications sur les qualités sensorielles des vins, pour une utilisation dans l'industrie vinicole.

Le rapport de stage présentera premièrement une introduction bibliographique faisant l'état des lieux des connaissances actuelles sur le métabolisme levurien ainsi que des spécificités liées aux non-

*Saccharomyces* et notamment à *Hanseniaspora osmophila*. Une seconde partie traitera des matériels et des méthodes utilisés dans l'étude menée. Enfin, les résultats seront présentés et commentés lors de la discussion.

### 3 Introduction bibliographique

#### 3.1 La fermentation alcoolique en œnologie

##### 3.1.1 Les caractéristiques de la fermentation alcoolique

Les levures œnologiques ont pour rôle principal de réaliser la fermentation alcoolique lors de la fabrication du vin. Ainsi, en condition anaérobie, les levures dégradent le glucose en éthanol et gaz carbonique selon la réaction :



La fermentation alcoolique est majoritairement réalisée par *Saccharomyces cerevisiae*, avec un rendement théorique de conversion de 0,51 g d'éthanol / g de glucose (Hussenet, 2017). En revanche, les levures non-*Saccharomyces* ont un rendement de conversion du sucre en éthanol plus faible que *Saccharomyces*, nécessitant une concentration supérieure à 19 g/L pour produire 1% (v/v) d'alcool (Mestre Furlani et al., 2017). Cette caractéristique est notamment intéressante dans une optique de réduction du degré alcoolique des vins. En effet, le réchauffement climatique actuel induit une augmentation de la maturité des grappes et ainsi une augmentation de la concentration finale en éthanol des vins produits (Ciani et al., 2014).

Lors de la fermentation, les levures sont soumises à différents stress qui induisent une adaptation de leur métabolisme. Ainsi, la fermentation est structurée selon trois phases distinctes (Figure 1). La première phase observée est la phase de latence, durant laquelle le milieu se sature peu à peu en CO<sub>2</sub>, jusqu'à atteindre des concentrations aux alentours de 1,5 g/L. La durée de cette phase est très variable et dépend de plusieurs facteurs que sont le taux d'inoculation, la température et la présence de SO<sub>2</sub>. La seconde phase est la phase de croissance ou phase exponentielle. Celle-ci dure jusqu'à atteindre une population levurienne maximale, ce qui correspond à une consommation d'1/4 des sucres. C'est également à la fin de cette phase que le dégagement de CO<sub>2</sub> est maximal. Pour la majorité des fermentations œnologiques, le développement cellulaire est arrêté par épuisement de l'azote assimilable présent dans le moût (Morakul, 2011). La troisième phase est la phase stationnaire. Durant cette phase, les levures gardent une activité fermentaire mais ne se multiplient plus. C'est au cours de cette phase que la majorité des sucres est consommée (60-70%). L'activité fermentaire diminue enfin progressivement avec la consommation des sucres et l'augmentation de la concentration en éthanol dans le milieu (Rollero, 2015).

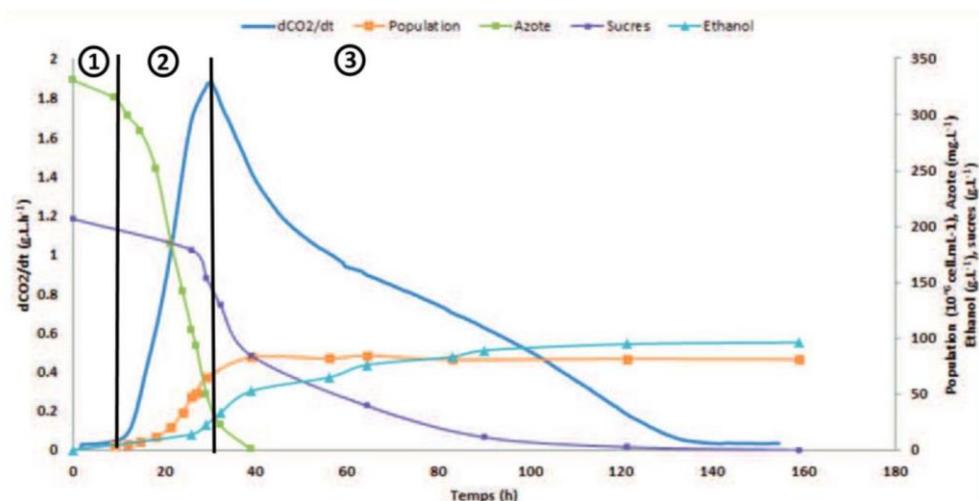


Figure 2 : Evolution des paramètres fermentaires en fonction des phases de la fermentation (1 : phase de latence, 2 : phase exponentielle, 3 : phase stationnaire)

3.1.2 Impact des paramètres fermentaires sur le déroulement de la fermentation alcoolique  
Plusieurs facteurs influencent le déroulement de la fermentation alcoolique. Ces facteurs peuvent être des facteurs chimiques, physiques ou biologiques.

#### 3.1.2.1 Facteurs chimiques

La concentration en sucres est un facteur d'influence de la fermentation. Celle-ci se situe généralement entre 170 g/L et 220 g/L, avec une répartition égale de glucose et de fructose. Les sucres constituent le substrat utilisé par les levures lors de la fermentation alcoolique. Ils exercent toutefois une pression osmotique importante lorsque les concentrations sont élevées. De fortes concentrations en début de fermentation peuvent entraîner une réduction des capacités fermentaires des levures (Lai, 2010).

Par ailleurs, la concentration en azote constitue le paramètre le plus important à considérer. Sa concentration initiale se situe entre 60 et 400 mg/L selon les moûts. L'ammonium et les acides aminés sont directement utilisés par les levures et constituent l'azote dit assimilable. La quantité d'azote impacte directement la cinétique de fermentation. En effet, des concentrations initiales en azote inférieures à 120-140 mg/L peuvent entraîner des fermentations languissantes. L'ajout de DAP (Diammonium phosphate) dans les moûts carencés est une technique utilisée dans le but de compléter le moût en azote. Son ajout en phase de croissance permet d'augmenter la population levurienne et la vitesse maximale de fermentation tandis qu'un ajout lors de la phase stationnaire permet uniquement d'accélérer la vitesse de fermentation (Rollero, 2015).

#### 3.1.2.2 Facteurs physiques

Parmi les facteurs physiques, la température est un paramètre à considérer. La température optimale pour la fermentation alcoolique est de 25°C (Lai, 2010). En pratique, les vinifications en blancs se font aux alentours de 20°C alors que les vins rouges sont produits à des températures plus hautes, de l'ordre de 25-30°C. La température joue un rôle majeur sur la vitesse de fermentation. En effet, lorsque la température descend en-dessous 20°C, la fermentation devient languissante. Il a été observé entre 15°C et 25°C qu'une augmentation de 8°C permettait de doubler la vitesse de fermentation (Rollero, 2015). En revanche, si la température dépasse les 30°C, une surproduction d'acide acétique est

observée ce qui induit un arrêt anticipé de la fermentation. L'oxygénation est un autre facteur physique influençant la fermentation. Celui-ci est notamment consommé par les levures pour assurer leur croissance, mais également utilisé pour la synthèse des acides gras non-saturés nécessaires aux membranes cellulaires (Lai, 2010). Les besoins en oxygène se situent entre 5 et 10 mg/L et varient selon le type de moût ou de levures en présence. La quantité d'oxygène diminuant au cours de la fermentation, des remontages sont communément effectués afin d'oxygéner le moût et d'éviter des arrêts prématurés de fermentation (Rollero, 2015).

### 3.1.2.3 Facteurs biologiques

Les facteurs biologiques influençant la fermentation alcoolique sont les levures elle-même ainsi que les interactions qu'elles peuvent occurrer. En ce qui concerne les interactions, celles-ci peuvent être neutres, bénéfiques ou néfastes pour les populations concernées (Tableau 2) (Chasseriaud, 2015).

Tableau 2 : Interactions levuriennes pouvant survenir au cours de la fermentation alcoolique

Type d'interaction	Définition
Neutralisme	Aucune population n'est affectée par la présence de l'autre
Commensalisme	Une population est favorisée, l'autre n'est pas affectée
Mutualisme	Les deux populations tirent bénéfice de la présence de l'autre
Amensalisme	Une population est inhibée par la présence de l'autre, la seconde n'est pas affectée
Parasitisme	Une population se développe au dépend de l'autre
Compétition	Les deux populations sont affectées

Lors des procédés de vinification, plusieurs mécanismes de défense et de communication entre les microorganismes sont mis en jeu. Il existe notamment la compétition pour les nutriments, pour l'oxygène, la production de composés toxiques, le cell-cell contact et le quorum sensing. Pour ce qui est des composés toxiques, *Saccharomyces cerevisiae* produit de l'éthanol à de telles concentrations qu'une pression de sélection s'exerce à l'encontre des levures non-*Saccharomyces*. En effet, l'éthanol modifie les systèmes de transports actifs de la cellule ce qui limite l'absorption de l'azote par les levures non-*Saccharomyces*. D'autre part, une pression de sélection sur les levures non-*Saccharomyces* est également appliquée via la production d'acides gras. L'acide décanoïque (C10) et dodécanoïque (C12) sont les acides gras les plus toxiques. Par ailleurs, certaines souches de levures sont dites « killer », puisqu'elles sécrètent des toxines extracellulaires létales pour les autres levures. Pour *Saccharomyces cerevisiae*, il s'agit d'une sécrétion de peptides antimicrobiens sous forme de fragments de glyceraldéhyde phosphate déshydrogénase. Ainsi, *Saccharomyces cerevisiae* exerce une pression de sélection sur *Hanseniaspora guilliermondii* via cette toxine. Pour les levures non-*Saccharomyces*, les processus sont moins connus mais les spectres d'action semblent plus larges que ceux des *Saccharomyces*. Le cell-cell contact est un type d'interaction généré par contact physique entre deux cellules. Les molécules impliquées et les mécanismes mis en jeu sont peu connus. Enfin, le quorum-sensing est un procédé de communication cellulaire impliquant des molécules signales de faible poids moléculaire. Ces molécules sont produites durant la phase de croissance des levures et peuvent être du bicarbonate, de l'acétaldéhyde ou de l'ammonium. Les molécules produites comprennent des

valeurs seuil qui, une fois dépassées, activent ou inhibent certains gènes de la levure (Chasseriaud, 2015).

Les interactions levuriennes dépendent également du mode de conduite de la fermentation alcoolique. La fermentation alcoolique peut être spontanée ou dirigée. Si celle-ci est dirigée, des inoculations simples ou mixtes peuvent être envisagées.

Par ailleurs, le type de levure utilisée en fermentation œnologique joue un rôle majeur dans le déroulement de la fermentation.

## 3.2 La diversité des levures identifiées en œnologie

### 3.2.1 Les levures non-*Saccharomyces*

Les levures non-*Saccharomyces* sont présentes naturellement sur les baies et dans le moût de raisin, ainsi que sur le matériel viti-vinicole. Leur population s'élève à  $10^3$  UFC/mL sur les baies non mûres et peuvent atteindre  $10^4$ - $10^6$  UFC/mL sur les baies arrivées à maturité (Jolly et al., 2017). Parmi les nombreuses levures rencontrées, le genre *Hanseniaspora* est le plus abondant du consortium œnologique, notamment l'espèce *uvarum* (Figure 2).

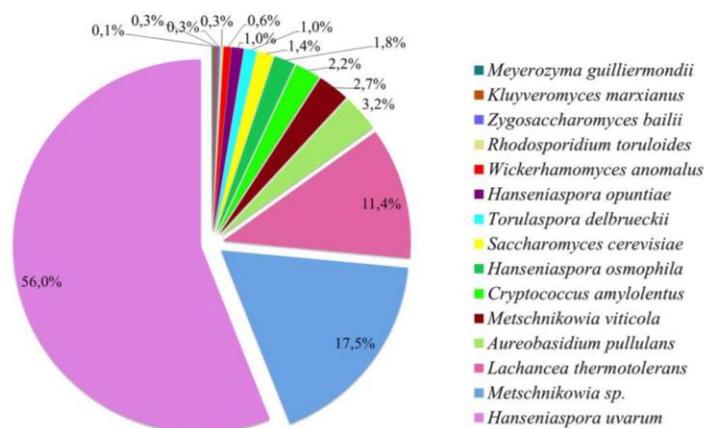


Figure 3 : Principales levures présentes dans les moûts de raisin (Belda et al., 2016)

Les levures non-*Saccharomyces* prédominent durant les 3-4 premiers jours de fermentation, pour ensuite laisser place à *Saccharomyces cerevisiae* (Belda et al., 2016). En effet, plusieurs facteurs présents en fin de fermentation limitent la croissance des non-*Saccharomyces* comme un faible pH, des ajouts de  $SO_2$ , une forte concentration en éthanol ainsi qu'une déficience en oxygène (Jolly et al., 2017).

Certaines sont considérées comme des levures d'altération, comme par exemple *Brettanomyces bruxellensis*, tandis que d'autres sont particulièrement étudiées pour améliorer les qualités des vins. Des études prometteuses mettent en évidence l'intérêt de l'utilisation des non-*Saccharomyces*, notamment dans une optique de réduction du degré alcoolique, de l'amélioration des qualités organoleptiques et sensorielles ainsi que la réduction des flores d'altération.

Les levures non-*Saccharomyces* possèdent une diversité d'enzymes propre à chaque espèce. Il a été observé durant les premières phases de fermentation une production d'enzymes extracellulaires de type pectinase, protéase,  $\beta$ -glucanase, lichenase,  $\beta$ -glucosidase, cellulase, xylanase, amylase et sulfite réductase. Ces enzymes sont grandement impliquées dans les qualités sensorielles des vins,

notamment la  $\beta$ -glucosidase, qui hydrolyse les précurseurs d'arômes glycosylés ou encore les  $\beta$ -liases, impliquées dans la libération des thiols variétaux (Ciani and Comitini, 2019).

Parmi ces levures, le genre *Hanseniaspora* produit des  $\beta$ -glucosidase et  $\beta$ -xylosidase permettant le relargage de terpènes volatils. Ces composés sont très intéressants d'un point de vue aromatique, notamment pour l'élaboration de vins de type muscat (López et al., 2014). En revanche, il est à noter que de fortes concentrations en glucose sont inversement corrélées avec l'activité de la  $\beta$ -glucosidase et de la  $\beta$ -xylosidase, ce qui suggère une plus faible efficacité de ces enzymes dans les moûts de raisin riches en sucres. Certaines espèces du genre *Hanseniaspora* produisent également des protéases, permettant d'accélérer la clarification des vins et d'améliorer les propriétés visuelles des vins en réduisant leur turbidité. Ces protéases pourraient également renforcer la croissance des microorganismes pendant et après la fermentation alcoolique en libérant des acides aminés et peptides présents dans les grappes de raisin (López et al., 2016).

Au sein du genre *Hanseniaspora* se classent plusieurs espèces de levures. Chaque espèce possède des caractéristiques métaboliques propres. *H. osmophila* est notamment intéressante pour sa production aromatique particulière. Cette levure produit de grandes quantités de phényléthanol avec une concentration 3 à 4 fois supérieure à ce que produit *H. guilliermondii* (Viana et al., 2008). Par conséquent, l'ester d'acétate correspondant, l'acétate de phényléthyle, est également produit de façon abondante. Sa concentration se situe entre 10 et 13 mg/L dans les vins (Viana et al., 2009). Selon d'autres publications, la production de cette molécule peut s'élever à des concentrations dix fois supérieures à celles rencontrées chez des souches de *S. cerevisiae* commerciales (Viana et al., 2008). Caractérisée par une odeur agréable de rose, cette molécule est très intéressante d'un point de vue sensoriel. D'autre part, *H. osmophila* possède une activité  $\beta$ -lyase importante comparée aux espèces *H. opuntiae* and *H. uvarum* (Belda et al., 2016). Cette activité permet l'hydrolyse des précurseurs de thiols variétaux ce qui contribue également à la complexité finale du bouquet aromatique.

Les mécanismes mis en jeu par *H. osmophila* sont encore peu connus aujourd'hui. Cette étude vise donc à apporter des renseignements supplémentaires sur le métabolisme de cette levure afin de l'utiliser en culture mixte.

### 3.2.2 La co-inoculation et l'inoculation séquentielle

Afin de terminer la fermentation alcoolique de façon complète, une seconde inoculation avec *Saccharomyces* est souhaitable après l'ensemencement d'une non-*Saccharomyces*. Pour cela, deux types d'inoculations existent : la co-inoculation, lors de laquelle les deux souches sont inoculées en même temps ; et l'inoculation séquentielle, où les deux inoculations sont séparées temporellement. Deux facteurs doivent être considérés afin de réaliser des inoculations séquentielles viables : le taux d'inoculation et l'intervalle de temps entre la première et la deuxième inoculation (Ciani et al., 2014). De manière générale, la seconde inoculation s'effectue après 24h ou 48h de fermentation. L'inoculation séquentielle offre l'avantage de permettre aux levures non-*Saccharomyces* de s'implanter en début de fermentation en évitant des compétitions entre levures vis-à-vis des nutriments. Son métabolisme n'est alors pas influencé par celui de la levure *Saccharomyces* (Ciani et al., 2014). De plus, l'inoculation séquentielle peut favoriser l'activité de *Saccharomyces cerevisiae*. En effet, la consommation des sucres en début de fermentation par les non-*Saccharomyces* induit une diminution de la pression osmotique ce qui facilite l'implantation de *Saccharomyces cerevisiae* (Tristezza et al., 2016). Egalement, le déclin des non-*Saccharomyces* permet un relargage d'azote favorisant la croissance de cette dernière (J. Prior et al., 2018).

En revanche, des compétitions et des interactions peuvent occurrer lors de la cohabitation des deux souches de levures. La compétition vis-à-vis de l'azote est un facteur limitant pour l'implantation de *S.*

*cerevisiae*. Par ailleurs, il a notamment été observé que *Saccharomyces cerevisiae* secrète des peptides antimicrobiens ayant une action fongicide sur *H. guilliermondii*, *L. thermotolerans*, *B. bruxellensis* et *K. marxianus*. Des interactions de type cell-cell contact ont également été constatées entre *S. cerevisiae* et *H. guilliermondii* ainsi que *S. cerevisiae* et *H. uvarum*, avec production de composés toxiques (Chasseriaud, 2015). Ainsi, des études plus approfondies doivent être menées afin d'établir les relations d'interaction entre *S. cerevisiae* et *H. osmophila* dans l'optique d'une inoculation mixte viable.

### 3.3 Le métabolisme des levures

#### 3.3.1 Le métabolisme central carboné

En condition anaérobie, la levure doit générer de l'ATP pour garantir sa croissance. Celui-ci est principalement formé lors de la glycolyse (Figure 3). Le produit final de cette voie métabolique est le pyruvate, lui-même majoritairement converti en acétaldéhyde par la pyruvate décarboxylase (PDC). L'acétaldéhyde est principalement réduit en éthanol mais peut également être converti en acétate ou acétyl-CoA. Parallèlement, une seconde fraction de l'acétaldéhyde est dégradée via le cycle des acides tricarboxylique (TCA). Cette voie comporte deux branches, une branche oxydative et une branche réductrice. Le produit final de ces deux branches est le succinate, la branche réductrice étant la plus sollicitée (Camarasa et al., 2003).

Le glucose n'est pas uniquement converti en pyruvate. Une fraction est notamment utilisée pour la synthèse du glycérol.

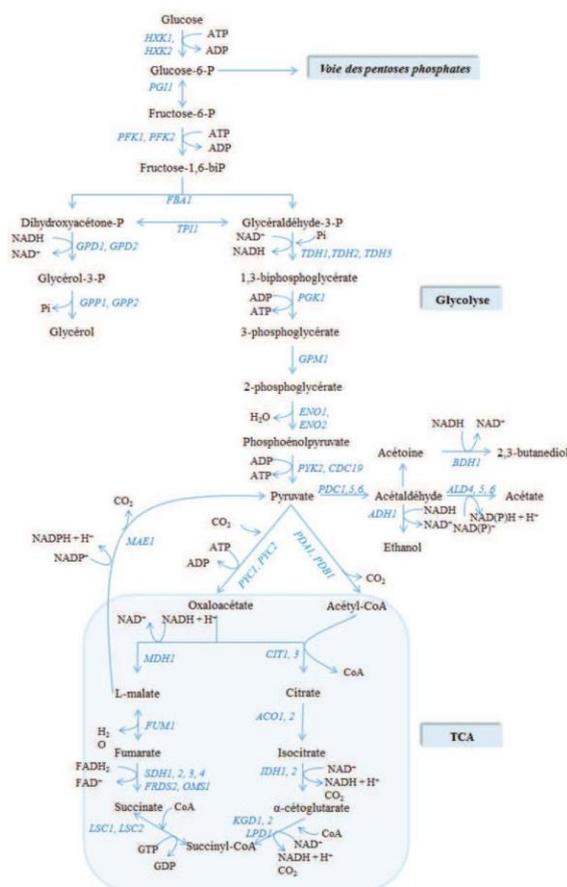


Figure 4 : Métabolisme carboné central (Rollero, 2015)

### 3.3.2 Le rôle des levures dans la libération d'arômes

Il existe quatre catégories d'arômes qui se distinguent par leur origine (Jeromel et al., 2019). Les arômes variétaux sont les arômes qui proviennent de la vigne, notamment du raisin. Ils existent sous forme libre, où ils sont directement perceptibles d'un point de vue sensoriel, et sous forme de précurseurs. Ces derniers peuvent être des précurseurs glycosylés, cystéinylés, glutathionylés ou des précurseurs de sulfure de diméthyle. Lors des procédés de vinification, ces précurseurs peuvent être hydrolysés pour libérer des composés odorants perceptibles. Les arômes secondaires comprennent les arômes pré-fermentaires et fermentaires. Ces derniers sont générés par les levures au cours de la fermentation alcoolique et par les bactéries lactiques au cours de la fermentation malolactique. Ils dépendent notamment de la souche de levure utilisée, du moût et des conditions de vinification (Rollero, 2015). Enfin les arômes de vieillissement sont liés à des réactions chimiques post fermentaires et aux échanges entre le vin et le bois de chêne lors de l'élevage en barrique.

Cette étude traite plus particulièrement des arômes fermentaires, les plus abondants étant les alcools supérieurs et les esters. Les alcools supérieurs représentent les composés les plus abondants en termes de concentration tandis que les esters comptent le plus large nombre de molécules impliquées (Boss et al., 2015). Les voies métaboliques levuriennes de la synthèse des arômes dépendent à la fois de la

glycolyse, du TCA (Acides Tricarboxyliques) et de la dégradation des acides aminés via la voie de Ehrlich (Figure 4), (Clément, 2012).

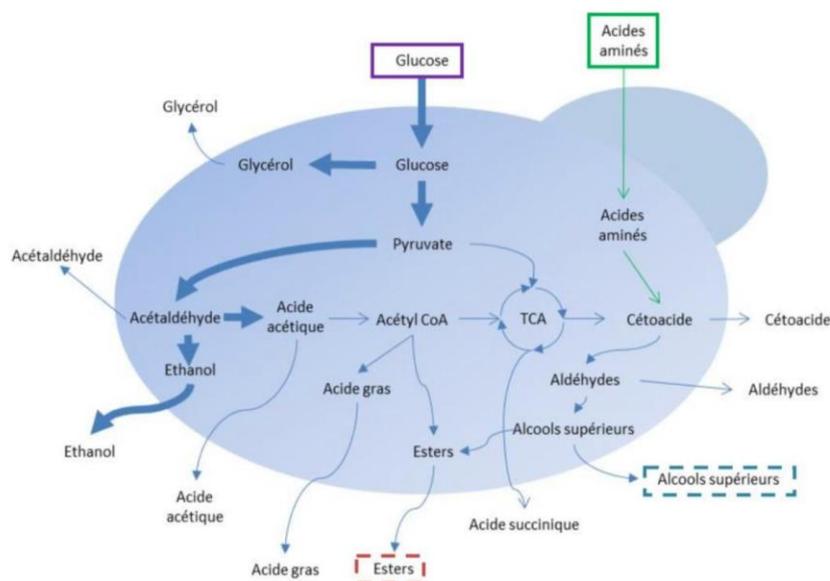


Figure 5 : métabolisme de la production des alcools supérieurs et esters (Clément, 2012 adapté de Sweigers, 2005)

### 3.3.3 Synthèse des alcools supérieurs

Les alcools supérieurs peuvent avoir des effets positifs ou négatifs sur les qualités sensorielles d'un vin. A des concentrations inférieures à 300 mg/L, des notes fruitées et florales se dégagent du bouquet. Par exemple, le 2-phényléthanol donne des odeurs de rose agréables. A contrario, des concentrations trop élevées, supérieures à 400 mg/L, donnent des notes désagréables. La production des alcools supérieurs dépend de plusieurs facteurs que sont la souche de levure, la concentration en acides aminés précurseurs et l'oxygène dissout du moût (Lai, 2010). Il a également été observé qu'une limitation en azote entraîne une augmentation de production d'alcools supérieurs aromatiques. Toutefois, une limitation en glucose inhibe leur production (González et al., 2018). Les alcools supérieurs sont synthétisés selon deux voies : la voie de Ehrlich et la voie du métabolisme carboné central.

Au travers de la voie d'Ehrlich, les acides aminés sont convertis en cétoacides par une réaction de transamination. Ces derniers subissent ensuite une décarboxylation pour former des aldéhydes. Selon le potentiel redox de la cellule, les aldéhydes peuvent être réduits en acides carboxyliques ou oxydés en alcools supérieurs (Hazelwood et al., 2006) (Figure 5).

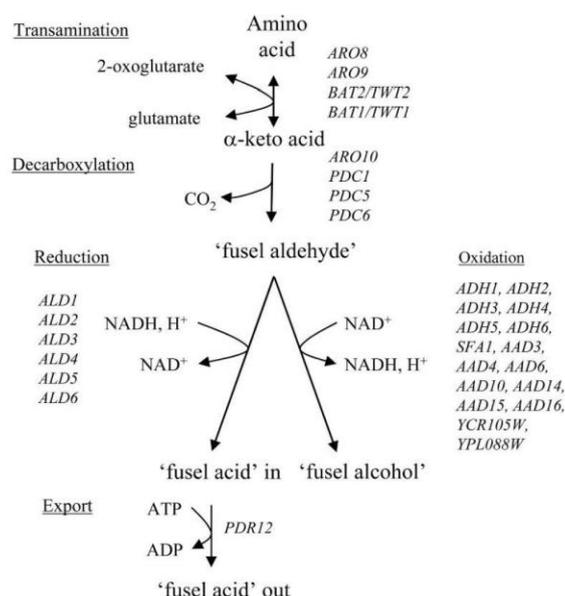


Figure 6 : Voie d'Ehrlich (Hazelwood et al., 2008)

Les acides aminés précurseurs ainsi que les intermédiaires de la voie d'Ehrlich sont présentés tableau 3.

Tableau 3 : Formation des alcools supérieurs et des esters correspondants par la voie d'Erlich (adapté de Rollero, 2015)

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

En ce qui concerne le métabolisme carboné central, la formation d'alcools supérieurs s'effectue par l'intermédiaire des cétoacides, eux-même produits au cours de la glycolyse et du TCA. Cette voie alternative a été confirmée par l'observation d'une production d'alcools supérieurs tout au long de la fermentation tandis que l'azote assimilable avait été consommé au bout du premier tiers de l'avancement de la fermentation. Une filiation isotopique a également appuyé cette hypothèse (Rollero, 2015).

### 3.3.4 Synthèse des esters d'acétate

Les esters d'acétate contribuent fortement au bouquet aromatique des vins. L'acétate d'éthyle, l'acétate d'hexyle, l'acétate d'isoamyle et le l'acétate de phényléthyle sont des esters synthétisés de façon relativement abondante par des levures non-*Saccharomyces* (Viana et al., 2008). Les esters d'acétate se forment lors d'une réaction entre un alcool (éthanol ou alcool supérieur) et un acétyl-

CoA. Chez *S. cerevisiae*, les enzymes impliquées dans cette voie métabolique sont des alcools acétyltransférases nommées Atf1 et Atf2. Parmi ce couple d'enzymes, Atf2 semble jouer un rôle mineur comparé à celui d'Atf1. En effet, cette dernière est responsable de la production de 80% de l'acétate d'isoamyle, 75% de l'acétate de phényléthyle et 20% de l'acétate d'éthyle. Une troisième enzyme semble également impliquée dans la synthèse des esters d'acétate ; puisqu'une double délétion de ces enzymes a été réalisée sur une souche de *S. cerevisiae* et montre un maintien de la production des esters d'acétate (Verstrepen et al., 2003). Par ailleurs, l'activité des estérases présentes chez *S. cerevisiae* peut contrebalancer l'accumulation des esters d'acétate, réduisant ainsi leur concentration. La production finale de ces composés est donc à la fois dépendante des substrats impliqués dans la formation des esters mais également des activités enzymatiques de synthèse et d'hydrolyse (Rollero, 2015).

### 3.3.5 Synthèse des esters d'éthyle

Les esters d'éthyle contribuent significativement au caractère fruité du profil sensoriel des vins (Hu et al., 2018). Ils sont formés lors d'une réaction entre l'éthanol et l'acyl-CoA, par l'intermédiaire d'enzymes spécifiques : éthanol O-acétyltransférase, Eeb1 et Eht1. L'éthanol acyltransférase Eeb1 est la plus impliquée dans la formation des esters d'éthyle tandis que Eht1 n'intervient qu'au niveau de la synthèse de l'hexanoate d'éthyle. D'autre part, il a été observé que les gènes *EEB1* et *EHT1* possèdent à la fois une activité de synthèse et une activité d'hydrolyse, ce qui implique un équilibre dans la production des esters d'éthyle (Saerens et al., 2010). Egalement, au cours du vieillissement, des réactions chimiques plus lentes peuvent être responsable de la production d'esters qui contribuent au bouquet des vins.

## 4 Résultats et discussion

### 4.1 Etude préliminaire sur *H. osmophila*

Une première étude en fermenteurs de 250 mL a permis d'étudier la cinétique de croissance d'*H. osmophila* (Figure 6).

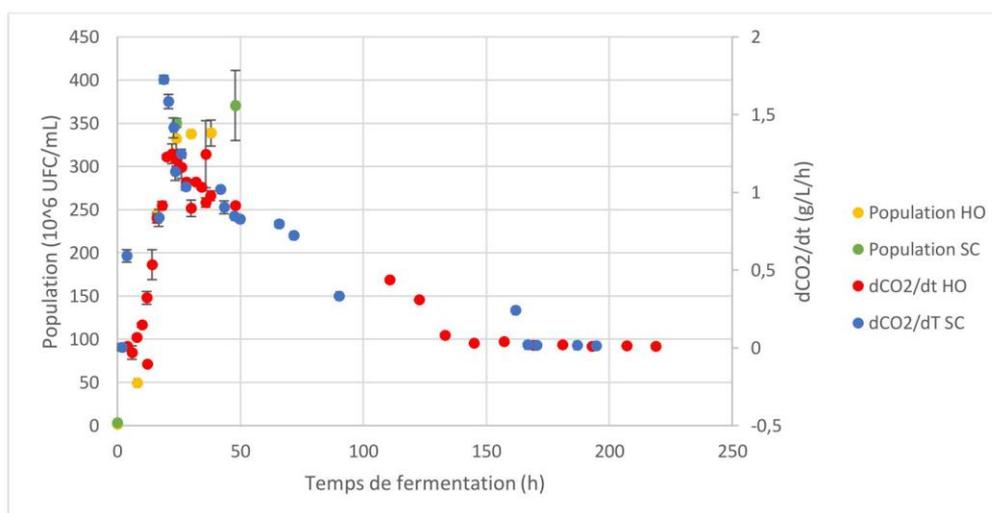


Figure 7 : Comparaison de la cinétique fermentaire et du suivi de la population pour *H. osmophila*

Pour les deux souches étudiées, une augmentation de la population est observée en début de fermentation jusqu'à environ 24h. Il en est de même pour la vitesse de dégagement de CO<sub>2</sub>. Les

courbes sont ainsi superposées jusqu'à 24h de fermentation ; la population étant corrélée à la vitesse de dégagement de CO<sub>2</sub>.

Le suivi de ces paramètres permet d'observer les phases de fermentation. Avant 24h, la phase observée est la phase de croissance. A partir de 24 h, la vitesse maximale de dégagement de CO<sub>2</sub> (V<sub>max</sub>) est atteinte. A la V<sub>max</sub>, la population levurienne maximale est atteinte. Après 24 h, la phase stationnaire débute. Les levures ne se multiplient plus mais continuent de fermenter les sucres résiduels.

Lorsque l'on compare les V<sub>max</sub>, *S. cerevisiae* atteint une valeur de 1,7 g de CO<sub>2</sub>/L/h. Cette valeur est supérieure à celle de *H. osmophila*, dont la V<sub>max</sub> atteint 1,2 g de CO<sub>2</sub>/L/h. Les populations sont quant à elles similaires entre les deux souches.

Par ailleurs, les nutriments ainsi que les métabolites ont été dosés au cours de la fermentation chez *H. osmophila* (Figure 7).

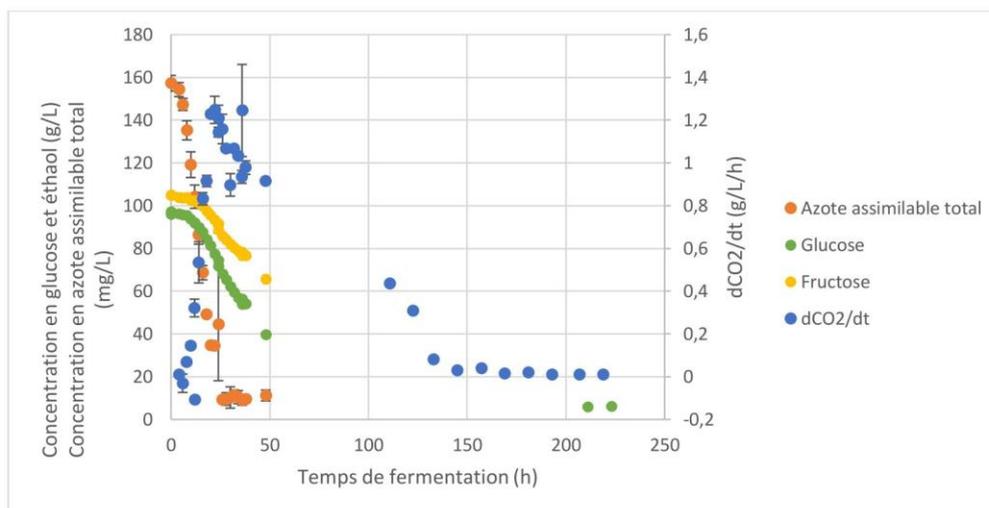


Figure 8 : Cinétique fermentaire et évolution des nutriments au cours du temps pour *H. osmophila*

L'azote assimilable est le nutriment suivi consommé le plus rapidement par levure. 94 % de l'azote assimilable est consommé au bout des 24 premières heures. Celui-ci permet notamment la production de la biomasse levurienne. Sa consommation rapide en fait un des facteurs limitants en fermentation alcoolique. Chez *S. cerevisiae*, la diminution de la vitesse de fermentation suivant le V<sub>max</sub> est corrélée à l'épuisement des ressources azotées. Pour *H. osmophila*, il est probable que ce ralentissement soit lié à une diminution de la concentration en azote assimilable dans le milieu.

Les sucres sont consommés plus lentement, avec une consommation préférentielle du glucose par la levure. *H. osmophila* est donc une levure glucophile. La consommation en sucres décroît plus rapidement après le pic de la V<sub>max</sub>, moment où les levures dégradent les sucres après avoir consommé l'azote assimilable.

Une analyse plus fine de la consommation en acides aminés a été réalisée après 8 h, 16 h et 24 h de fermentation (Figure 8).

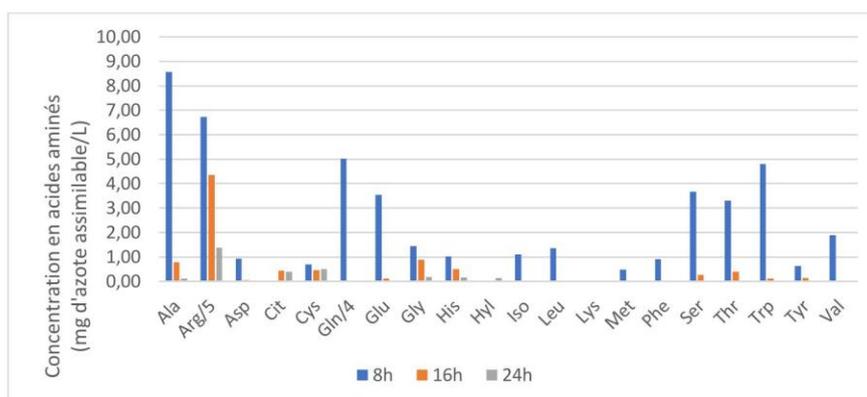


Figure 9 : Evolution des acides aminés après 8h, 16h et 24h de fermentation pour *H. osmophila*

De manière générale, la plupart des acides aminés sont consommés en totalité au bout de 16 h de fermentation. L'arginine, la glutamine et l'alanine sont les acides aminés qui sont consommés le moins rapidement. *A contrario*, les acides aminés aromatiques sont rapidement assimilés par la levure. La concentration en phénylalanine est nulle au bout de 16 h ; le tryptophane et la tyrosine ayant une très faible concentration après le même temps de fermentation. La consommation de la phénylalanine est intéressante puisque cet acide aminé est un précurseur du phényléthanol via la voie d'Ehrlich, lui-même pouvant être estérifié en acétate de phényléthyle. Cet ester d'acétate peut notamment être produit en grande quantité par *H. osmophila* (Viana et al., 2009). Sa consommation rapide peut donc être corrélée avec cette production accrue. Cette hypothèse reste à vérifier puisque les sucres sont également des précurseurs d'arômes importants.

## 4.2 Etude sur les transformants

Une expérimentation a été réalisée sur des souches transformantes afin d'étudier la conversion des alcools supérieurs en ester d'acétate. Le gène *ATF1* de *S. cerevisiae* est notamment impliqué dans cette conversion. Des études antérieures effectuées au laboratoire ont montré que la souche *H. osmophila* possède dans son génome un gène codant pour une protéine ayant un site actif homologue à celui de *ATF1*, nommé par commodité *ATFh*. Par ailleurs, selon la littérature, cette levure produit des quantités importantes d'acétate de phényléthyle. L'intérêt d'insérer le gène *ATFh* chez *S. cerevisiae* est d'étudier l'implication de ce gène dans la formation des esters d'acétate. Une seconde modalité consiste à déléter *ATF1* et à insérer *ATFh* afin d'observer si la délétion et l'insertion ont un impact sur le métabolisme de la levure.

### 4.2.1 Etude cinétique

Une étude cinétique sur les transformants ainsi que les levures *H. osmophila* et *S. cerevisiae* (59A  $\Delta$ amn1) a été menée dans le but d'évaluer l'impact des modifications génétiques sur la cinétique fermentaire (Figure 9).

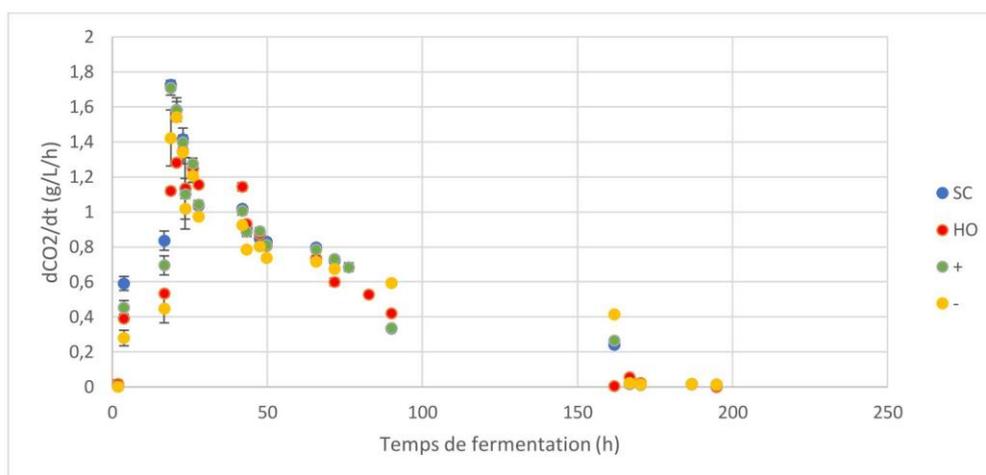


Figure 10 : Cinétique fermentaire des souches transformées. SC : *S. cerevisiae*, HO : *H. osmophila*, + : *S. cerevisiae* ATFh, - : *S. cerevisiae atf1 ATFh*.

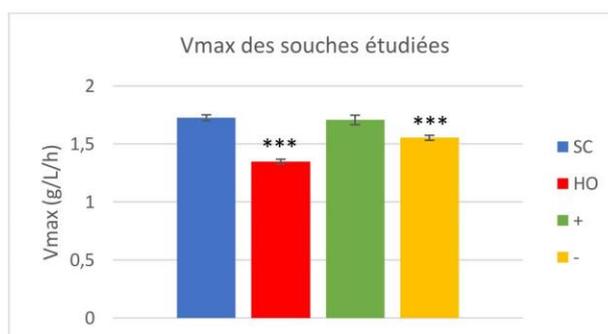


Figure 11 : Comparaison statistique des V<sub>max</sub> des souches étudiées, les comparaisons étant effectuées avec le témoin *S. cerevisiae*. SC : *S. cerevisiae*, HO : *H. osmophila*, + : *S. cerevisiae* ATFh, - : *S. cerevisiae atf1 ATFh*. \*\*\* : risque de 0,1%.

La vitesse de dégagement de CO<sub>2</sub> diffère selon les souches. En effet, les V<sub>max</sub> atteintes par *H. osmophila* et *S. cerevisiae atf1 ATFh* sont significativement différentes (risque d'erreur < 0,1 %) (Figure 10). La V<sub>max</sub> de *H. osmophila* est la plus faible, avec une moyenne de CO<sub>2</sub> dégagé de 1,3 g /L/h. La V<sub>max</sub> la plus haute est atteinte par *S. cerevisiae* et la souche *S. cerevisiae ATFh*, avec une valeur maximale de 1,7 g/L/h de CO<sub>2</sub> dégagé. Enfin, la souche *S. cerevisiae atf1 ATFh* possède une V<sub>max</sub> de 1,5 g de CO<sub>2</sub>/L/h. La délétion du gène *ATF1* et l'insertion du gène *ATFh* a donc eu un impact sur la valeur du V<sub>max</sub>.

Parallèlement à cela, la population a été observée au moment de l'inoculation, après 24 h et 48 h de fermentation (Figure 11).

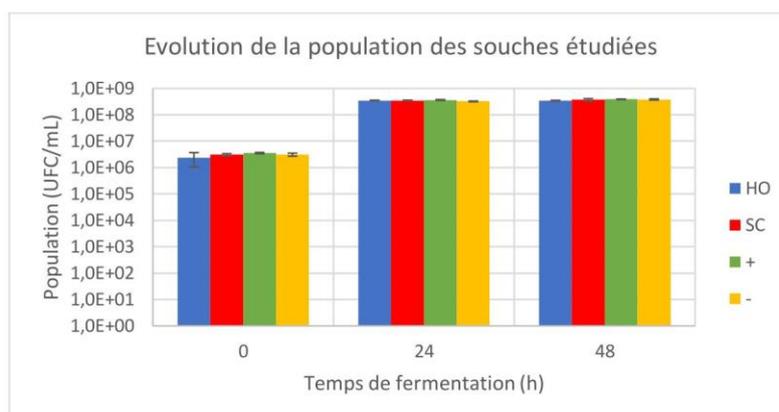


Figure 12 : Evolution de la population des souches étudiées après 24h et 48h de fermentation. SC : *S. cerevisiae*, HO : *H. osmophila*, + : *S. cerevisiae* ATFh, - : *S. cerevisiae* atf1 ATFh.

La population a augmenté de 2 log entre 0 et 24 h puis s'est stabilisée entre 24 et 48 h. Lorsque l'on compare les souches entre-elles, aucune différence n'est observée. Ainsi, les modifications génétiques n'ont pas eu d'impact sur la croissance cellulaire. Par ailleurs, la population de *H. osmophila* est identique à celle de *S. cerevisiae*, malgré les différences de  $V_{max}$  observées précédemment.

#### 4.2.2 Etude des métabolites fermentaires issus du métabolisme carboné central (MCC)

La consommation en sucres a été suivie par HPLC au cours de la fermentation pour les différentes souches étudiées (Figure 12).

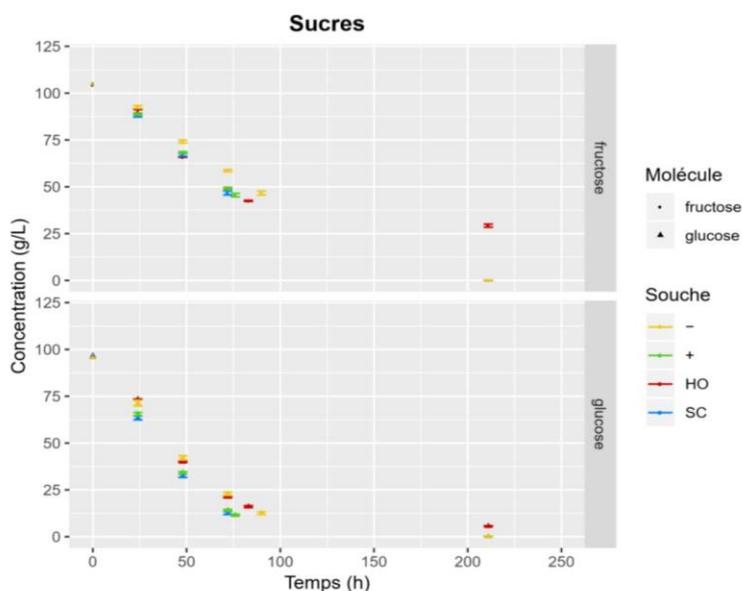


Figure 13 : Consommation en glucose et fructose des souches étudiées. SC : *S. cerevisiae*, HO : *H. osmophila*, + : *S. cerevisiae* ATFh, - : *S. cerevisiae* atf1 ATFh.

De manière globale, le glucose est préférentiellement consommé par l'ensemble des souches étudiées. Ces dernières sont donc glucophiles. Les souches de *S. cerevisiae*, qu'elles soient transformées ou non,

consomment l'intégralité du glucose et du fructose. En revanche, *H. osmophila* ne consomme pas la totalité des sucres, puisque 5 g/L de glucose et 30 g/L de fructose sont présents à l'arrêt de la fermentation. Cette souche ne peut donc pas réaliser une fermentation alcoolique complète. L'incapacité de *H. osmophila* à consommer l'intégralité des sucres peut être liée à un degré alcoolique devenant trop élevé pour la souche, entraînant la perte de sa viabilité. Une étude sur la viabilité a notamment montré un pourcentage de cellules mortes de 50% pour *H. osmophila* contre 4% pour *S. cerevisiae* après 170 h de fermentation (données non présentées ici).

Les métabolites carbonés des souches étudiées ont été analysés par HPLC. Les résultats ont été traités statistiquement à l'aide du logiciel R (Figure 13).

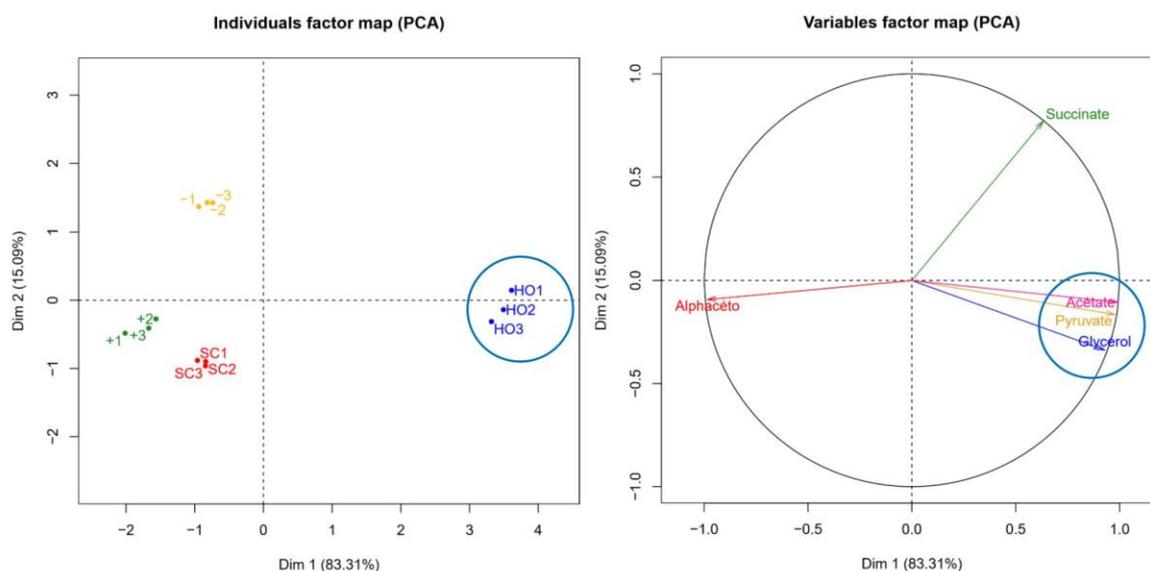


Figure 14 : ACP (Analyse en Composantes Principales) des métabolites carbonés des souches étudiées. ACP des individus à gauche et ACP des variables à droite. SC : *S. cerevisiae*, HO : *H. osmophila*, + : *S. cerevisiae* ATFh, - : *S. cerevisiae* atf1 ATFh.

L'ACP (Analyse en Composantes Principales) sur les individus montre une bonne répétabilité des expériences, avec des clusters définis pour chaque répétition. Par ailleurs, un cluster isolé est visible pour *H. osmophila*. Cette dernière présente donc des différences aux niveaux des métabolites carbonés produits au cours de la fermentation alcoolique. La souche *S. cerevisiae* atf1 ATFh forme également un cluster légèrement éloigné des autres souches de *S. cerevisiae*.

En mettant en relation l'ACP des individus avec l'ACP des variables, une corrélation des métabolites carbonés produits et des souches productrices peut être effectuée. Ainsi, des différences de production d'acétate, de pyruvate et de glycérol sont observables chez la souche *H. osmophila*, comparée aux autres souches étudiées. Les cinétiques de production d'acétate, de pyruvate et de glycérol sont représentées figure 14.

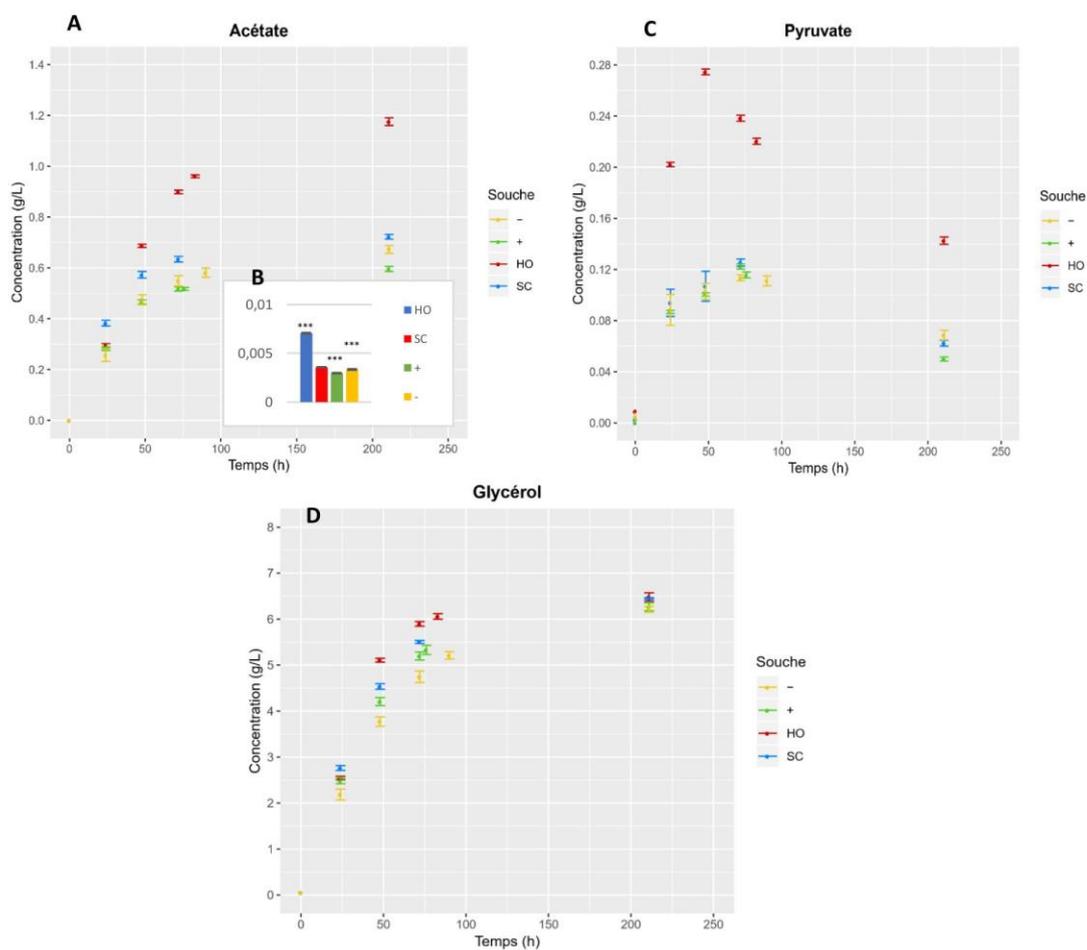


Figure 15 : Cinétique de production d'acétate (A), de pyruvate (C) et de glycérol (D) par les souches étudiées. Les rendements massiques en acétate ont été calculés (B) (g d'acétate produit par g de sucres consommés). SC : *S. cerevisiae*, HO : *H. osmophila*, + : *S. cerevisiae* ATFh, - : *S. cerevisiae* atf1 ATFh.

Tableau 4 : Résultats statistiques de la comparaison des concentrations en acétate et pyruvate des souches étudiées avec le témoin *S. cerevisiae* à 70 % d'avancement de fermentation.

	Acétate	Pyruvate	Glycérol
HO	***	***	***
+	***	**	*
-	***	***	**

HO : *H. osmophila*, + : *S. cerevisiae* ATFh, - : *S. cerevisiae* atf1 ATFh. \*\*\* : risque de 0,1%, \*\* : risque de 1%, \* : risque de 5%

La production d'acétate est significativement plus importante pour *H. osmophila*, avec un rendement massique deux fois supérieur à celui de *S. cerevisiae* (Figure 14, Tableau 7). Une trop forte production engendre une détérioration organoleptique conséquente. La quantité maximale autorisée d'acide

acétique dans les vins s'élève à 1,2 g/L d'acide acétique, seuil limite atteint par *H. osmophila* (OIV, 2015). En revanche, l'optique étant d'effectuer une inoculation séquentielle après 24 h voire 48 h, *H. osmophila* aura produit une quantité d'acétate quasi identique à celle de *S. cerevisiae* et ne pourra en produire davantage suite à son déclin. Par ailleurs, de manière générale, les quantités en acide acétique obtenues en laboratoire sont supérieures à celles obtenues en chais.

Chez *S. cerevisiae*, la production d'acétate est anti-corrélée avec la production de glycérol et d'éthanol, afin d'équilibrer la balance redox. Ce phénomène n'est pas observé chez *H. osmophila*, qui doit avoir un équilibre redox différent (Figure 14). En effet, sa production de glycérol est légèrement supérieure à celle de *S. cerevisiae*. De plus, le rendement en éthanol chez *S. cerevisiae* est proche de celui d'*H. osmophila* (les valeurs respectives étant de 0,48 g / g de sucres consommés contre 0,47 g / g de sucres consommés).

En ce qui concerne le pyruvate, la figure 14 montre une augmentation suivie d'une diminution de la concentration de ce composé. En effet, celui-ci est produit par la levure et converti au cours de la fermentation : il s'agit d'un carrefour métabolique important. Il est à noter que la concentration maximale atteinte est réalisée par *H. osmophila*, sa concentration étant deux fois supérieure à celles des *S. cerevisiae*.

#### 4.2.3 Production de composés volatils

Les composés volatils produits pendant la fermentation alcoolique ont été quantifiés par GC-MS. Une étude statistique de l'ensemble des résultats a été réalisée (Figure 15).

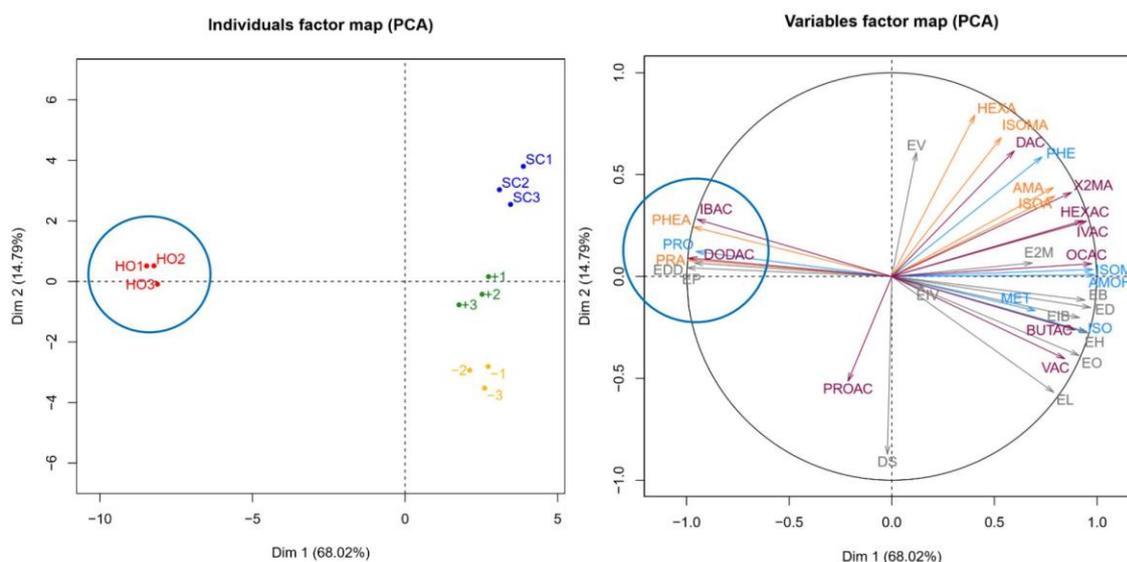


Figure 16 : ACP (Analyse en Composantes Principales) sur la production de composés volatils des souches étudiées (ACP des individus à gauche et ACP des variables à droite). SC : *S. cerevisiae*, HO : *H. osmophila*, + : *S. cerevisiae* ATfH, - : *S. cerevisiae* atf1 ATfH. 2MA : 2-methylbutyric acid, AMA : Amyl acetate, BUTAC : Butyric acid, DAC : Decanoic acid, DODAC : Dodecanoic acid, DS : Diethyl succinate, E2M : Ethyl 2-methylbutyrate, EB : Ethyl butyrate, ED : Ethyl decanoate, EDD : Ethyl dodecanoate, EH : Ethyl hexanoate, EIB : Ethyl isobutyrate, EIV : Ethyl isovalerate, EL : Ethyl lactate, EO : Ethyl octanoate, EP : Ethyl propionate, ETA : Ethyl acetate, EV : Ethyl valerate, HEXA : Hexyl acetate, HEXAC : Hexanoic acid, IBAC : Isobutyric acid, ISOA : Isobutyl acetate, ISOMA : Isoamyl acetate, IVAC : Isovaleric acid, OCAC : Octanoic acid, PHEA : Phenylethyl acetate, PROAC : Propionic acid, VAC : Valeric acid.

L'ACP sur les individus montre tout d'abord une bonne répétabilité dans l'expérimentation, puisque les répétitions se situent chacune dans un cluster restreint. Par ailleurs, un cluster de différenciation important pour la souche d'*H. osmophila* comparée aux autres souches est observé. Cette dernière présente donc des différences au niveau de sa production de composés volatils. Pour ce qui est de l'ACP sur les variables, un groupement de composés volatils se détache du reste des composés dosés (groupement gauche). Ainsi, statistiquement, les différences métaboliques de *H. osmophila* sont liées à la production du phényléthylacétate, de l'acétate de propyle, du propanol, de l'acide isobutyrique, de l'acide dodécanoïque, du dodécanoate d'éthyle et du propanoate d'éthyle.

Certains composés volatils impliquant l'action d'Atf1 ont été étudiés de façon plus exhaustive.

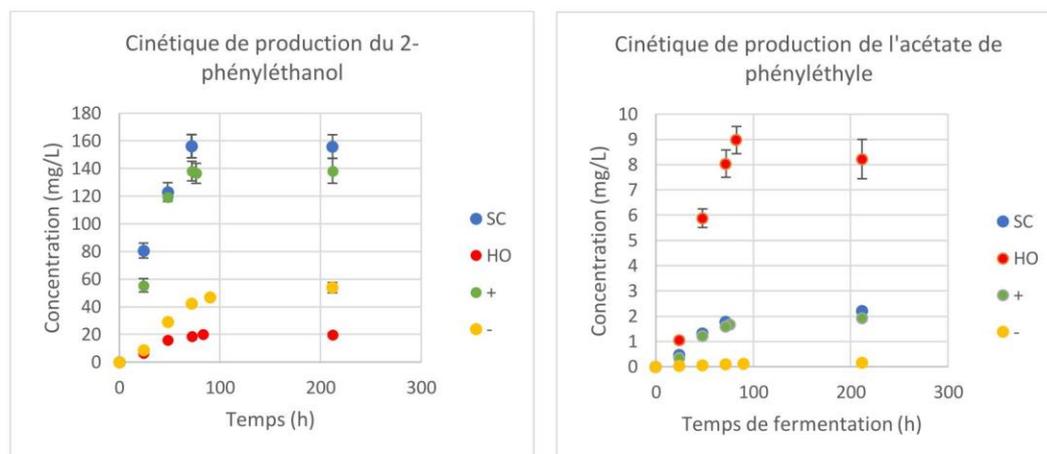


Figure 17 : Cinétique de production du 2-phényléthanol et de l'acétate de phényléthyle. SC : *S. cerevisiae*, HO : *H. osmophila*, + : *S. cerevisiae ATFh*, - : *S. cerevisiae atf1 ATFh*.

Tableau 5 : Résultats statistiques de la comparaison de production du 2-phényléthanol et de l'acétate de phényléthyle des souches étudiées avec le témoin *S. cerevisiae* à 70% d'avancement

	2-phényléthanol	Acétate de phényléthyle
HO	***	***
+	**	
-	***	***

HO : *H. osmophila*, + : *S. cerevisiae ATFh*, - : *S. cerevisiae atf1 ATFh*. \*\*\* : risque de 0,1%, \*\* : risque de 1%.

La figure 16 montrent l'évolution du 2-phényléthanol et de l'acétate de phényléthyle. La concentration du phényléthanol produit par *S. cerevisiae* et *S. cerevisiae ATFh* est plus de sept fois supérieure à celle produite par les deux autres souches. En revanche, *H. osmophila* produit plus de quatre fois plus de l'ester d'acétate correspondant, ce qui n'est pas le cas de la souche *S. cerevisiae atf1 ATFh*.

*S. cerevisiae* et *S. cerevisiae ATFh* produisent du phényléthanol et de l'acétate de phényléthyle de façon semblable. L'insertion du gène *ATFh* ne semble pas avoir eu d'impact sur la production de ces composés. En revanche, la concentration en phényléthanol de la souche *S. cerevisiae atf1 ATFh* est bien inférieure à celle de *S. cerevisiae*. La délétion du gène *ATF1* a pu entraîner une modification au niveau de la voie des pentoses phosphates. Cette voie est notamment impliquée dans la production d'acides aminés aromatiques, comme la phénylalanine. Une réduction de la concentration en phénylalanine induit alors une réduction de la production du phényléthanol.

Par ailleurs, *H. osmophila* semble posséder un métabolisme de conversion plus efficace, avec une production d'acétate de phényléthyle significativement plus importante (Tableau 8). Le gène *ATFh*, homologue au gène *ATF1* de *S. cerevisiae*, hypothétiquement impliqué dans cette conversion, pourrait être le gène responsable de l'abondance de l'acétate de phényléthyle. Toutefois, il est observé que les souches dont le gène *ATFh* a été inséré (souches + et -) ne produisent pas plus de ce composé. Une voie métabolique alternative peut donc être impliquée dans la conversion de l'alcool supérieur en ester d'acétate. *A fortiori*, *S. cerevisiae atf1 ATFh* produit des quantités significativement plus faibles que celles produites par *S. cerevisiae* (Tableau 8). Cette délétion a ainsi pu perturber le métabolisme de la levure.

La quantité d'acétate de phényléthyle produite par *H. osmophila* est donc bien supérieure à celle de *S. cerevisiae* et des transformants, tandis que celle du 2-phényléthanol est bien inférieure. Ainsi, il est intéressant d'étudier les profils de production d'autres couples « alcools supérieurs / esters d'acétate » (Figure 17).

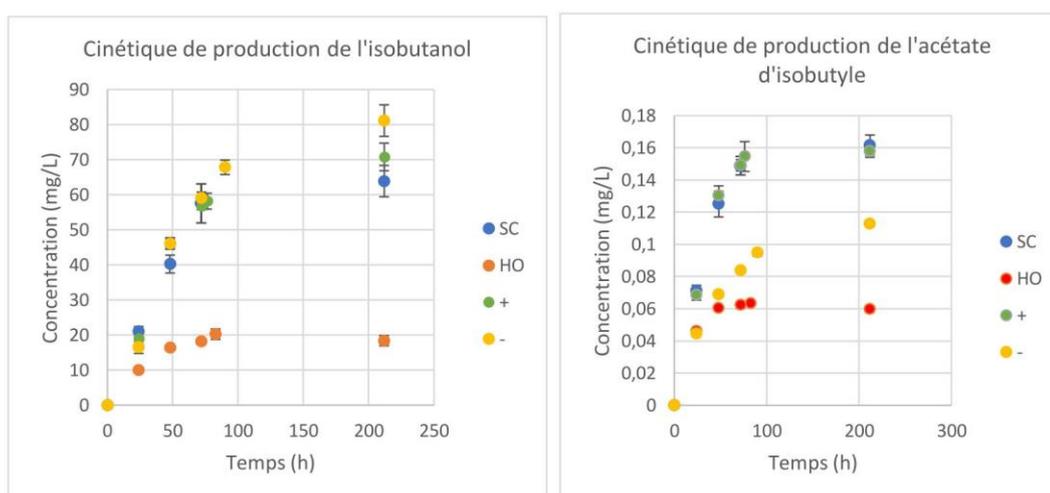


Figure 18 : Cinétique de production de l'isobutanol et de l'acétate d'isobutyle. SC : *S. cerevisiae*, HO : *H. osmophila*, + : *S. cerevisiae ATFh*, - : *S. cerevisiae atf1 ATFh*.

Tableau 6 : Résultats statistiques de la comparaison de production de l'isobutanol et de l'acétate d'isobutyle des souches étudiées avec le témoin *S. cerevisiae* à 70% d'avancement

	Isobutanol	Acétate d'isobutyle
HO	***	***
+		
-	*	***

HO : *H. osmophila*, + : *S. cerevisiae ATFh*, - : *S. cerevisiae atf1 ATFh*. \*\*\* : risque de 0,1%, \* : risque de 5%.

*H. osmophila* produit trois fois moins d'isobutanol que le reste des souches, ce qui la différencie significativement de *S. cerevisiae* (Tableau 9). Les trois autres souches produisent quant à elles des quantités similaires d'isobutanol. La souche *S. cerevisiae atf1 ATF1*, contrairement au comportement étudié avec le phényléthanol, produit cette fois-ci la même quantité d'alcool supérieur que *S. cerevisiae*. Les gènes *ATF1* et *ATFh* ne semblent pas impliqués dans la production de l'isobutanol.

La production d'acétate d'isobutyle d'*H. osmophila* est également significativement moins importante. Celle de la souche *S. cerevisiae* ATFh possède le même comportement que *S. cerevisiae*, alors que la souche *S. cerevisiae atf1 ATFh* produit une quantité d'ester d'acétate située entre les deux souches non transformées. Il est donc envisageable que la délétion ait perturbé le métabolisme de conversion de l'isobutanol en acétate d'isobutyle.

La conversion de ces molécules n'est pas caractéristique comme celle étudiée avec le couple « phényléthanol / acétate de phényléthyle ». La conversion atypique de *H. osmophila* pourrait ainsi être spécifique pour des cycles aromatiques.

Parallèlement, l'alcool amylique et l'acétate de n-amyle ont été étudiés (Figure 18).

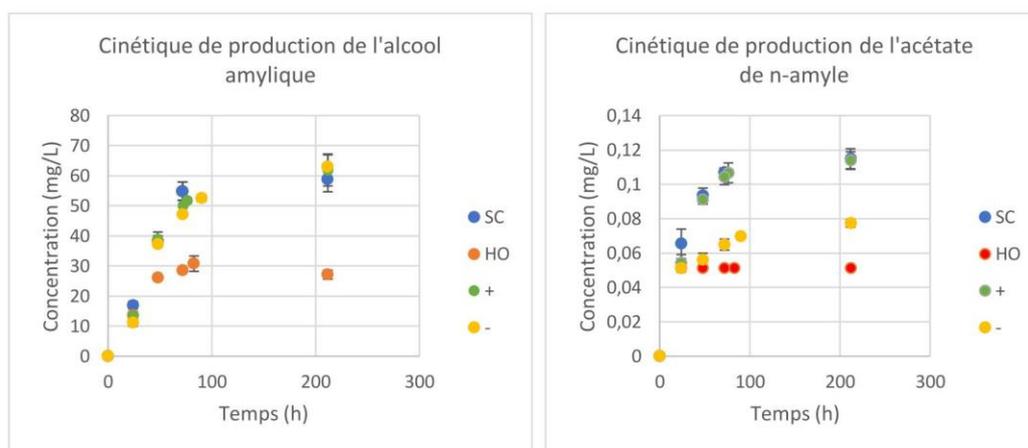


Figure 19 : Cinétique de production de l'alcool amylique et de l'acétate de n-amyle. SC : *S. cerevisiae*, HO : *H. osmophila*, + : *S. cerevisiae* ATFh, - : *S. cerevisiae atf1 ATFh*.

Tableau 7 : Résultats statistiques de la comparaison de production de l'alcool amylique et de l'acétate de n-amyle des souches étudiées avec le témoin *S. cerevisiae* à 70% d'avancement

	Alcool amylique	Acétate de n-amyle
HO	***	***
+		
-		***

HO : *H. osmophila*, + : *S. cerevisiae* ATFh, - : *S. cerevisiae atf1 ATFh*. \*\*\* : risque de 0,1%.

Les cinétiques observées sont assez similaires à celles observées pour l'isobutanol et son ester d'acétate associé. Des conclusions similaires peuvent être proposées.

L'alcool isoamylique et son ester correspondant ont aussi été dosés (Figure 20).

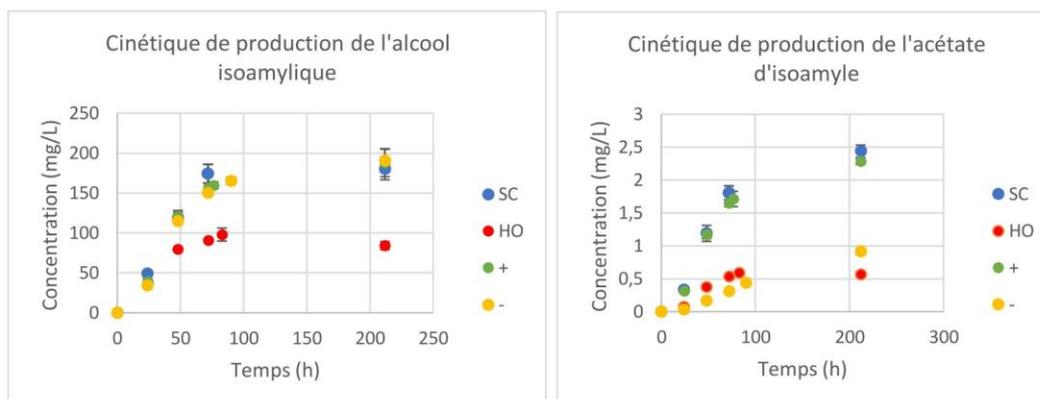


Figure 20 : Cinétique de production de l'alcool isoamylique et de l'acétate d'isoamyle. SC : *S. cerevisiae*, HO : *H. osmophila*, + : *S. cerevisiae* ATFh, - : *S. cerevisiae* atf1 ATFh.

Tableau 8 : Résultats statistiques de la comparaison de production de l'alcool isoamylique et de l'acétate d'isoamyle des souches étudiées avec le témoin *S. cerevisiae* à 70% d'avancement

	Alcool isoamylique	Acétate d'isoamyle
HO	***	***
+		
-		***

HO : *H. osmophila*, + : *S. cerevisiae* ATFh, - : *S. cerevisiae* atf1 ATFh. \*\*\* : risque de 0,1%.

L'alcool isoamylique est produit en plus grande quantité par les souches de *S. cerevisiae*, transformées et non transformées. La conversion en son ester d'acétate correspondant est plus efficace pour les souches de *S. cerevisiae* et *S. cerevisiae* ATFh. En revanche, la souche de *S. cerevisiae* atf1 ATFh présente une homologie de production d'acétate d'isoamyle avec *H. osmophila*, toutes deux étant significativement différentes de *S. cerevisiae* (Tableau 11). Ainsi, le gène *ATF1* est impliqué dans la conversion de l'alcool isoamylique en acétate d'isoamyle, contrairement au gène *ATFh* d'*H. osmophila*.

Sur la figure 15, *H. osmophila* se distinguait des autres souches étudiées par sa production de propanol. C'est pourquoi cette molécule a également été plus finement étudiée (Figure 19).

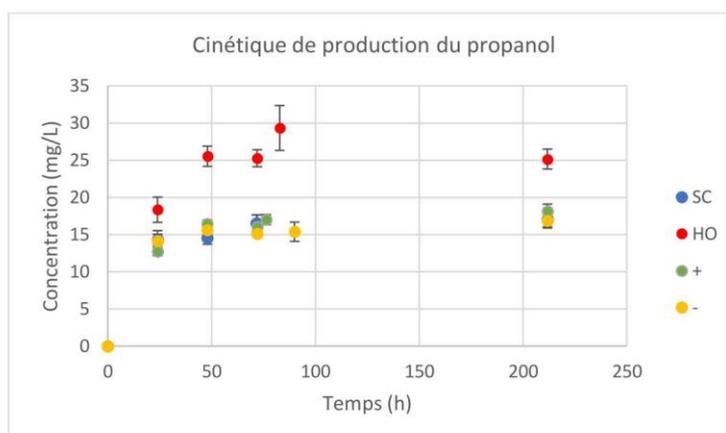


Figure 21 : **Cinétique de production du propanol**. SC : *S. cerevisiae*, HO : *H. osmophila*, + : *S. cerevisiae* ATFh, - : *S. cerevisiae* atf1 ATFh.

Tableau 9 : **Résultats statistiques de la comparaison de production du propanol des souches étudiées avec le témoin *S. cerevisiae* à 70% d'avancement**

	Propanol
HO	***
+	
-	

HO : *H. osmophila*, + : *S. cerevisiae* ATFh, - : *S. cerevisiae* atf1 ATFh. \*\*\* : risque de 0,1%.

La production de propanol est deux fois importante chez *H. osmophila* comparée aux autres souches. Les concentrations produites par cette souche sont significativement différentes du témoin *S. cerevisiae*. Les souches transformées ont quant à elles un comportement identique au témoin. De ce fait, les gènes *ATF1* et *ATFh* ne semblent pas impliqués dans la production du propanol.

## 5 Conclusion

*H. osmophila* possède des capacités fermentaires réduites par rapport à *S. cerevisiae*. Des sucres résiduels ont notamment été constatés dans les moûts fermentés. Par ailleurs, il a été constaté que *H. osmophila* produisait une quantité importante d'acétate. Le métabolisme carboné central de cette levure est donc tourné vers la production d'acétate. Ainsi, pour réaliser une fermentation complète et réduire l'acidité volatile présente dans les vins, une inoculation avec *S. cerevisiae* après 24 voire 48 h de fermentation est obligatoire. Il serait ainsi intéressant d'étudier les interactions entre ces levures pour déterminer si une inoculation mixte entre ces deux souches est viable. En effet, puisque *H. osmophila* consomme une quantité importante d'acides aminés en 24-48h, une compétition vis-à-vis des nutriments est à prévoir ce qui entraînerait des fermentations difficiles voire des arrêts de fermentation.

D'un point de vue de la production de composés volatils, *H. osmophila* possède un fort potentiel au niveau de la conversion du phényléthanol en acétate de phényléthyle. La balance alcool supérieur / ester d'acétate est à l'opposé de celle de *S. cerevisiae*, avec une production d'ester quatre fois supérieure. La production de cette molécule est notamment intéressante pour son caractère floral, dégageant des arômes de rose. L'implication du gène *ATFh* dans la production accrue de cet ester

d'acétate a été étudiée. Ainsi, les résultats ont montré que l'insertion du gène *ATFh* n'avait pas entraîné d'augmentation de la production de l'acétate de phényléthyle. Ce gène n'est donc sûrement pas impliqué dans la conversion mise en jeu.

En ce qui concerne les autres molécules aromatiques, comme l'acétate d'isobutyle ayant des odeurs fruitées, l'acétate n-amyle ayant des odeurs de bonbon et de banane ou l'acétate d'isoamyle donnant des odeurs de poire et de banane, leur concentration est plus faible chez la souche *H. osmophila*. Cette dernière ne pourra donc pas apporter ce type de profil aromatique.

Par ailleurs, la délétion du gène *ATF1* a pu perturber dans certains cas le métabolisme aromatique et fermentaire de *S. cerevisiae*.

Ainsi, les résultats de cette étude ont montré l'absence d'implication du gène *ATFh* dans la conversion des alcools supérieurs en esters d'acétate. Plusieurs hypothèses quant à la production accrue d'acétate de phényléthyle par *H. osmophila* peuvent alors être envisagées. Une première hypothèse se porte sur l'implication d'une voie métabolique plus globale avec des régulations complexes. Une seconde hypothèse se formule quant à elle sur l'action d'une enzyme encore méconnue ayant une forte affinité pour les cycles aromatiques. Il serait alors intéressant d'étudier plus précisément les productions de tryptophol et de tyrosol ainsi que de leurs esters d'acétate correspondants. Pour ce qui est de la phénylalanine, une prochaine expérimentation consistera à effectuer un marquage par filiation isotopique afin d'appréhender ses produits de conversion et d'étudier la répartition des flux métaboliques.

Une fois les voies métaboliques élucidées, des expérimentations devront être réalisées à l'échelle industrielle afin de corréliser les résultats obtenus sur les micro-fermentations. Cette démarche expérimentale, semblable à celle réalisée par les fournisseurs de produits œnologiques, permettra, à terme, de commercialiser une nouvelle levure non-*Saccharomyces* susceptible d'apporter des notes florales aux nouveaux vins produits.

## 6 Bibliographie

Belda, I., Ruiz, J., Alastruey-Izquierdo, A., Navascués, E., Marquina, D., and Santos, A. Unraveling the Enzymatic Basis of Wine “Flavorome”: A Phylo-Functional Study of Wine Related Yeast Species, 2016. *Front Microbiol* vol.7.

Boss, P.K., Pearce, A.D., Zhao, Y., Nicholson, E.L., Dennis, E.G., and Jeffery, D.W. Potential Grape-Derived Contributions to Volatile Ester Concentrations in Wine, 2015.

Camarasa, C., Grivet, J.-P., and Dequin, S. Investigation by <sup>13</sup>C-NMR and tricarboxylic acid (TCA) deletion mutant analysis of pathways for succinate formation in *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic fermentation, 2003. *Microbiology (Reading, Engl.)* vol. 149, p. 2669–2678.

Chasseraud, L. Interactions entre levures *Saccharomyces cerevisiae* et non-*Saccharomyces* en vinification. : Incidence de facteurs de l’environnement, 2015.

Ciani, M., and Comitini, F. *Red Wine Technology*, 2019.

Ciani, M., Canonico, L., Oro, L., and Comitini, F. Sequential fermentation using non- *Saccharomyces* yeasts for the reduction of alcohol content in wine, 2014. *BIO Web of Conferences* vol. 3, p.02015.

Clément, T. Utilisation d’un fermenteur continu multi-étagé pour la compréhension des mécanismes d’adaptation de la levure à des ajouts d’azote en conditions œnologiques, 2012.

Dukes, B.C., and Butzke, C.E. Rapid Determination of Primary Amino Acids in Grape Juice Using an o-Phthaldialdehyde/N-Acetyl-L-Cysteine Spectrophotometric Assay, 1998. *Am J Enol Vitic.* vol 49, p.125–134.

González, B., Vázquez, J., Morcillo-Parra, M.Á., Mas, A., Torija, M.J., and Beltran, G. The production of aromatic alcohols in non-*Saccharomyces* wine yeast is modulated by nutrient availability, 2018. *Food Microbiol.* vol 74, p.64–74.

Hazelwood, L.A., Tai, S.L., Boer, V.M., de Winde, J.H., Pronk, J.T., and Daran, J.M. A new physiological role for Pdr12p in *Saccharomyces cerevisiae*: export of aromatic and branched-chain organic acids produced in amino acid catabolism, 2006. *FEMS Yeast Res* vol 6, p.937–945.

Hu, K., Jin, G.-J., Mei, W.-C., Li, T., and Tao, Y.-S. Increase of medium-chain fatty acid ethyl ester content in mixed *H. uvarum*/*S. cerevisiae* fermentation leads to wine fruity aroma enhancement, 2018. *Food Chemistry* vol 239, p.495–501.

Hussenet, C. Instrumentation, modélisation et automatisation de fermenteurs levuriers à destination œnologique, 2017.

J. Prior, K., Bauer, F., and Divol, B. The utilisation of nitrogenous compounds by commercial non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine, 2018. *Food Microbiology* vol. 79.

Jeromel, A., Korenika, A.-M.J., and Tomaz, I. 6 - An Influence of Different Yeast Species on Wine Aroma Composition, 2019. In *Fermented Beverages*, A.M. Grumezescu, and A.M. Holban, eds. (Woodhead Publishing), pp. 171–285.

Jolly, N.P., Augustyn, O.P.H., and Pretorius, I.S. The Role and Use of Non-*Saccharomyces* Yeasts in Wine Production, 2017. *South African Journal of Enology & Viticulture* vol 27.

Lai, Q.P. Utilisation de levures non *Saccharomyces* en œnologie : études des interactions entre *Torulasporea delbrueckii* et *Saccharomyces cerevisiae* en cultures mixtes, 2010.

López, S., Mateo, J.J., and Maicas, S.M. Characterisation of *Hanseniaspora* Isolates with Potential Aroma-enhancing Properties in Muscat Wines, 2014. South African Journal of Enology and Viticulture vol. 35, p.292–303.

López, S., Mateo, J.J., and Maicas, S. Screening of *Hanseniaspora* Strains for the Production of Enzymes with Potential Interest for Winemaking, 2016. Fermentation vol 2, p.1.

Martin, V., Valera, M.J., Medina, K., Boido, E., and Carrau, F. Oenological Impact of the *Hanseniaspora/Kloeckera* Yeast Genus on Wines—A Review, 2018. Fermentation vol 4, p.76.

Mestre Furlani, M.V., Maturano, Y.P., Combina, M., Mercado, L.A., Toro, M.E., and Vazquez, F. Selection of non-*Saccharomyces* yeasts to be used in grape musts with high alcoholic potential: a strategy to obtain wines with reduced ethanol content, 2017. FEMS Yeast Res. vol. 17.

Morakul, S. Etude et modélisation de la composition du gaz fermentaire en conditions œnologiques : intérêt pour le contrôle de la fermentation, 2011.

OIV. Limites maximales acceptables, 2015.

Rollero, S. Impact des paramètres environnementaux sur la synthèse des arômes fermentaires par *Saccharomyces cerevisiae* en fermentation œnologique, 2015.

Saerens, S.M.G., Delvaux, F.R., Verstrepen, K.J., and Thevelein, J.M. Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*, 2010. Microb Biotechnol vol. 3, p.165–177.

Tristezza, M., Tufariello, M., Capozzi, V., Spano, G., Mita, G., and Grieco, F. The Oenological Potential of *Hanseniaspora uvarum* in Simultaneous and Sequential Co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* for Industrial Wine Production, 2016. Front Microbiol vol.7.

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., and Delvaux, F.R. Expression levels of the yeast alcohol acetyltransferase genes ATF1, Lg-ATF1, and ATF2 control the formation of a broad range of volatile esters, 2003. Appl. Environ. Microbiol. vol 69, p.5228–5237.

Viana, F., Gil, J.V., Genovés, S., Vallés, S., and Manzanares, P. Rational selection of non-*Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits, 2008. Food Microbiol. vol.25, p.778–785.

Viana, F., Gil, J.V., Vallés, S., and Manzanares, P. Increasing the levels of 2-phenylethyl acetate in wine through the use of a mixed culture of *Hanseniaspora osmophila* and *Saccharomyces cerevisiae*, 2009. Int. J. Food Microbiol. vol.135, p.68–74.

## Résumé

Le but de cette étude est d'élucider les voies métaboliques aromatiques d'une levure non-*Saccharomyces*, *H. osmophila*. L'objectif serait, à terme, de l'utiliser en tant que starter œnologique en vue de développer les qualités sensorielles des vins. Une étude plus approfondie sur la production des alcools supérieurs et esters d'acétate a été menée. Le gène *ATFh* de la souche *H. osmophila* étant potentiellement impliqué dans la conversion des alcools supérieurs en esters d'acétate, une étude sur des souches génétiquement modifiées de *S. cerevisiae* a été réalisée. Les résultats obtenus montrent une forte production d'acétate de phényléthyle par la levure *H. osmophila*, donnant des arômes de rose. Toutefois, les transformants étudiés indiquent une absence de corrélation entre la présence du gène *ATFh* et l'augmentation de la production des esters d'acétate. Par ailleurs, la délétion du gène *ATF1* de *S. cerevisiae* semble induire des perturbations métaboliques. Ainsi, il existerait une voie métabolique alternative utilisée par la levure *H. osmophila* permettant une production accrue d'acétate de phényléthyle.

**Mots clés** : métabolisme, levure non-*Saccharomyces*, *Hanseniaspora osmophila*, arômes.

The aim of this study is to elucidate the aromatic pathway of a non-*Saccharomyces* yeast, *H. osmophila*. The objective is to use this strain as an oenological starter to develop the sensorial qualities of wines. The study more insists on the high alcohol and ester acetate production. The *ATFh* gene of *H. osmophila* being potentially involved in the conversion of the higher alcohol in acetate ester, a study with genetically modified yeast of *S. cerevisiae* was conducted. The results show a high production of phenyletylacetate by *H. osmophila*, which is characteristic of rose aromas. However, the study with the modified yeasts suggest a lack of correlation between the presence of the *ATFh* gene and the increase of the acetate ester production. Furthermore, the deletion of the *ATF1* gene of *S. cerevisiae* seems to induce metabolic disruptions. It may exist an alternative pathway that can be used by *H. osmophila* to ensure a high production of phenylethylacetate.

**Key words**: metabolism, non-*Saccharomyces* yeast, *Hanseniaspora osmophila*, aromas.





Durant la fermentation alcoolique, les levures sont capables de synthétiser des arômes fermentaires participant au bouquet des vins. Ces arômes majoritaires, faisant partie des familles des alcools supérieurs, des esters, ou encore des acides à moyennes ou longues chaînes. Néanmoins, d'autres composés d'arômes, bien que présents en moindres quantités dans les vins, peuvent avoir une grande incidence organoleptique sur le produit fini, et s'inscrivent dans la volonté de se démarquer au sein d'un marché de plus en plus concurrentiel. Ces arômes non-conventionnels, terpènes aux notes florales, dérivés benzéniques aux notes vanillées ou amandées, ou encore les lactones, aux arômes fruités, sont retrouvés en concentrations variables dans les vins, et peu d'informations sont disponibles quant aux capacités intrinsèques des levures du consortium œnologique à les synthétiser lors de la fermentation. L'objectif général de la thèse est ainsi d'étudier la production de ces composés d'arômes par les levures lors de la fermentation œnologique. Pour cela, une méthode d'analyse spécifique a été développée et validée, basée sur une extraction par Dispersive Liquid-Liquid Microextraction (DLLME) couplée à une analyse par GC-MS. Cette méthode a été appliquée à un screening de 40 souches œnologiques, dont 8 souches non-*Saccharomyces* capables de consommer plus de 70 % des sucres en fermentation, et a mis en exergue une souche de *Starmerella bacillaris* capable de produire les plus grandes quantités de terpènes et de dérivés benzéniques *via* son métabolisme. Une souche de *Saccharomyces cerevisiae* a également été sélectionnée pour la production de lactones. Dans un deuxième temps, une étude des voies métaboliques menant à la production de ces composés a été menée. Celle-ci a permis de mettre en évidence le rôle de la phénylalanine et du tryptophane dans la synthèse de certains dérivés benzéniques chez *Starm. bacillaris*, dont le benzaldéhyde et l'alcool benzylique. De plus, contrairement à certaines données bibliographiques, la synthèse des terpènes chez cette souche ne met pas en jeu le catabolisme de la leucine, mais la voie des stérols, notamment par une potentielle disponibilité accrue en acétyl-CoA, de par une plus grande production d'acétate durant la fermentation. Cette souche de *Starm. bacillaris*, incapable de réaliser totalement la fermentation, a ensuite été étudiée en fermentations mixtes avec *S. cerevisiae* à l'échelle pilote, afin de réaliser un suivi en ligne des arômes majoritaires, ainsi qu'un dosage hors-ligne des composés non-conventionnels. Les vins obtenus ont ensuite été étudiés par analyse sensorielle, par la réalisation de tests triangulaires et d'épreuves descriptives. Les juges ont été capables de discriminer les vins obtenus par fermentations mixtes et le témoin (*S. cerevisiae*), bien que les critères de différenciation n'aient pas pu être significativement explicités. Afin que la production des dérivés benzéniques puisse être améliorée, des expériences d'évolution dirigée par pression de sélection ont commencé à être menées sur la souche de *Starm. bacillaris*. Ce projet a permis d'apporter de nouvelles connaissances quant aux capacités intrinsèques des levures œnologiques, notamment non-*Saccharomyces*, à produire des composés d'arômes non-conventionnels permettant une meilleure diversification de l'offre et une réelle typicité des vins.

**Mots-clés** : Fermentation alcoolique, dérivés benzéniques, lactones, terpènes, *Starmerella bacillaris*, métabolisme.

During alcoholic fermentation, yeasts are able to synthesize fermentative aromas contributing to the wines bouquet. These quantitatively predominant aromas, belonging to higher alcohols, esters or medium-chain and long-chain acids. Nonetheless, other aromatic compounds, while present in lower quantities, can have a great organoleptic incidence on the final product, and is part of the willingness to diversify the offer within a highly competitive market. These unconventional aromas, terpenes with flowery notes, benzene derivatives with vanilla and almond notes, lactones with fruity notes, are found in the wines in different concentrations, and few information is available concerning the intrinsic abilities of the wine yeasts to produce these compounds during enological fermentation. Thus, the general aim of the thesis is to study the production of these unconventional compounds during fermentation. To achieve this, an analytical method was developed and validated, relying on the use of a Dispersive Liquid Liquid Microextraction (DLLME) coupled to GC-MS analysis. This method has been applied to a 40-wine-yeast-strains screening, including 8 non-*Saccharomyces* strains able to consume at least 70 % of the sugars during fermentation, and highlighted a strain of *Starmerella bacillaris*, able to produce the highest concentrations of terpenes and benzene derivatives through its metabolism. A *Saccharomyces cerevisiae* strain was selected on the basis on its ability to produce lactones. Secondly, the metabolic pathways leading to the production of these compounds were investigated. This study enabled to bring to light the role of phenylalanine and tryptophan regarding the production of some benzene derivatives by *Starm. bacillaris*, including benzaldehyde and benzyl alcohol. Besides, contrarily to some bibliographical data, the biosynthesis of terpenes by this strain did not imply the leucine catabolism, but the sterols pathway, probably due to an increased availability of acetyl-CoA, linked to a higher production of acetate during fermentation. Then, this *Starm. bacillaris* strain, unable to complete fermentation, was studied in mixed fermentations with *S. cerevisiae* at pilot scale, to perform an online monitoring of some major fermentative aroma compounds, and an offline quantitation of the unconventional aroma compounds. A sensory analysis was performed on the resulting wines, by triangular tests and descriptive analysis of the wines. The judges were able to differentiate the wines obtained by mixed fermentations from the wines obtained by fermentation of *S. cerevisiae* only, although the criteria leading to this differentiation were not significantly elucidated. In order to enhance the production of benzene derivatives by *Starm. bacillaris*, experiments of directed evolution by environmental pressure were conducted. This 3-year project brought new knowledge concerning the intrinsic abilities of wine yeasts, including non-*Saccharomyces* strains, for the production of unconventional aromas, allowing the diversification of the offer and a real typicity to the wines.

**Keywords** : Alcoholic fermentation, benzene derivatives, lactones, terpenes, *Starmerella bacillaris*, metabolism.







Durant la fermentation alcoolique, les levures sont capables de synthétiser des arômes fermentaires participant au bouquet des vins. Ces arômes majoritaires, faisant partie des familles des alcools supérieurs, des esters, ou encore des acides à moyennes ou longues chaînes. Néanmoins, d'autres composés d'arômes, bien que présents en moindres quantités dans les vins, peuvent avoir une grande incidence organoleptique sur le produit fini, et s'inscrivent dans la volonté de se démarquer au sein d'un marché de plus en plus concurrentiel. Ces arômes non-conventionnels, terpènes aux notes florales, dérivés benzéniques aux notes vanillées ou amandées, ou encore les lactones, aux arômes fruités, sont retrouvés en concentrations variables dans les vins, et peu d'informations sont disponibles quant aux capacités intrinsèques des levures du consortium œnologique à les synthétiser lors de la fermentation. L'objectif général de la thèse est ainsi d'étudier la production de ces composés d'arômes par les levures lors de la fermentation œnologique. Pour cela, une méthode d'analyse spécifique a été développée et validée, basée sur une extraction par Dispersive Liquid-Liquid Microextraction (DLLME) couplée à une analyse par GC-MS. Cette méthode a été appliquée à un screening de 40 souches œnologiques, dont 8 souches non-*Saccharomyces* capables de consommer plus de 70 % des sucres en fermentation, et a mis en exergue une souche de *Starmerella bacillaris* capable de produire les plus grandes quantités de terpènes et de dérivés benzéniques *via* son métabolisme. Une souche de *Saccharomyces cerevisiae* a également été sélectionnée pour la production de lactones. Dans un deuxième temps, une étude des voies métaboliques menant à la production de ces composés a été menée. Celle-ci a permis de mettre en évidence le rôle de la phénylalanine et du tryptophane dans la synthèse de certains dérivés benzéniques chez *Starm. bacillaris*, dont le benzaldéhyde et l'alcool benzylique. De plus, contrairement à certaines données bibliographiques, la synthèse des terpènes chez cette souche ne met pas en jeu le catabolisme de la leucine, mais la voie des stérols, notamment par une potentielle disponibilité accrue en acétyl-CoA, de par une plus grande production d'acétate durant la fermentation. Cette souche de *Starm. bacillaris*, incapable de réaliser totalement la fermentation, a ensuite été étudiée en fermentations mixtes avec *S. cerevisiae* à l'échelle pilote, afin de réaliser un suivi en ligne des arômes majoritaires, ainsi qu'un dosage hors-ligne des composés non-conventionnels. Les vins obtenus ont ensuite été étudiés par analyse sensorielle, par la réalisation de tests triangulaires et d'épreuves descriptives. Les juges ont été capables de discriminer les vins obtenus par fermentations mixtes et le témoin (*S. cerevisiae*), bien que les critères de différenciation n'aient pas pu être significativement explicités. Afin que la production des dérivés benzéniques puisse être améliorée, des expériences d'évolution dirigée par pression de sélection ont commencé à être menées sur la souche de *Starm. bacillaris*. Ce projet a permis d'apporter de nouvelles connaissances quant aux capacités intrinsèques des levures œnologiques, notamment non-*Saccharomyces*, à produire des composés d'arômes non-conventionnels permettant une meilleure diversification de l'offre et une réelle typicité des vins.

**Mots-clés** : Fermentation alcoolique, dérivés benzéniques, lactones, terpènes, *Starmerella bacillaris*, métabolisme.

During alcoholic fermentation, yeasts are able to synthesize fermentative aromas contributing to the wines bouquet. These quantitatively predominant aromas, belonging to higher alcohols, esters or medium-chain and long-chain acids. Nonetheless, other aromatic compounds, while present in lower quantities, can have a great organoleptic incidence on the final product, and is part of the willingness to diversify the offer within a highly competitive market. These unconventional aromas, terpenes with flowery notes, benzene derivatives with vanilla and almond notes, lactones with fruity notes, are found in the wines in different concentrations, and few information is available concerning the intrinsic abilities of the wine yeasts to produce these compounds during enological fermentation. Thus, the general aim of the thesis is to study the production of these unconventional compounds during fermentation. To achieve this, an analytical method was developed and validated, relying on the use of a Dispersive Liquid Liquid Microextraction (DLLME) coupled to GC-MS analysis. This method has been applied to a 40-wine-yeast-strains screening, including 8 non-*Saccharomyces* strains able to consume at least 70 % of the sugars during fermentation, and highlighted a strain of *Starmerella bacillaris*, able to produce the highest concentrations of terpenes and benzene derivatives through its metabolism. A *Saccharomyces cerevisiae* strain was selected on the basis on its ability to produce lactones. Secondly, the metabolic pathways leading to the production of these compounds were investigated. This study enabled to bring to light the role of phenylalanine and tryptophan regarding the production of some benzene derivatives by *Starm. bacillaris*, including benzaldehyde and benzyl alcohol. Besides, contrarily to some bibliographical data, the biosynthesis of terpenes by this strain did not imply the leucine catabolism, but the sterols pathway, probably due to an increased availability of acetyl-CoA, linked to a higher production of acetate during fermentation. Then, this *Starm. bacillaris* strain, unable to complete fermentation, was studied in mixed fermentations with *S. cerevisiae* at pilot scale, to perform an online monitoring of some major fermentative aroma compounds, and an offline quantitation of the unconventional aroma compounds. A sensory analysis was performed on the resulting wines, by triangular tests and descriptive analysis of the wines. The judges were able to differentiate the wines obtained by mixed fermentations from the wines obtained by fermentation of *S. cerevisiae* only, although the criteria leading to this differentiation were not significantly elucidated. In order to enhance the production of benzene derivatives by *Starm. bacillaris*, experiments of directed evolution by environmental pressure were conducted. This 3-year project brought new knowledge concerning the intrinsic abilities of wine yeasts, including non-*Saccharomyces* strains, for the production of unconventional aromas, allowing the diversification of the offer and a real typicity to the wines.

**Keywords** : Alcoholic fermentation, benzene derivatives, lactones, terpenes, *Starmerella bacillaris*, metabolism.