



**HAL**  
open science

# Etude des effets combinés de l'azote et de la température sur la synthèse des arômes en fermentation œnologique

Joséphine Godillot

## ► To cite this version:

Joséphine Godillot. Etude des effets combinés de l'azote et de la température sur la synthèse des arômes en fermentation œnologique. Biotechnologie. Montpellier SupAgro, 2022. Français. NNT : 2022NSAM0040 . tel-04260817

**HAL Id: tel-04260817**

**<https://theses.hal.science/tel-04260817v1>**

Submitted on 26 Oct 2023

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

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

**THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR  
DE L'INSTITUT AGRO MONTPELLIER  
ET DE L'UNIVERSITE DE MONTPELLIER**

**En Biotechnologie et Microbiologie**

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

**Portée par  
Unité de recherche UMR Sciences Pour l'œnologie INRAE**

**Etude des effets combinés de l'azote et de la  
température sur la synthèse des arômes en  
fermentation œnologique**

**Présentée par Joséphine GODILLOT  
Le 12 Décembre 2022**

**Sous la direction de Jean-Roch MOURET et Vincent FARINES**

**Devant le jury composé de**

**Sophie LANDAUD-LIAUTAUD, Professeure, AgroParisTech**

**Patrick LUCAS, Professeur, Université de Bordeaux**

**Maeva SUBILEAU, Maîtresse de Conférences, Institut Agro de Montpellier**

**Tiphaine Clément, Ingénieure de recherche, Toulouse White Biotechnology**

**Jean-Roch MOURET, Directeur de recherche, Université de Montpellier**

**Vincent FARINES, Maître de conférences, Université de Montpellier**

**Jean-Marie SABLAYROLLES, Directeur de recherche, Université de Montpellier**

**Présidente**

**Rapporteur**

**Examineur**

**Examineur**

**Directeur de thèse**

**Directeur de thèse**

**Invité**



**UNIVERSITÉ  
DE MONTPELLIER**



**L'INSTITUT  
agro Montpellier**



## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mes encadrants de thèse Jean-Roch Mouret et Vincent Farines. Merci d'avoir été présents pour moi et de m'avoir guidé dans mon travail tout au long de cette thèse. J'ai beaucoup appris grâce à vous. Merci également à Jean-Marie Sablayrolles qui a accompagné le début de la thèse et qui est resté disponible jusqu'à la fin. Merci pour tes précieux conseils.

Je remercie les membres du jury Maeva Subileau, Sophie Landaud-Liautaud et Patrick Lucas d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Cette thèse a été réalisée à l'UMR Sciences Pour l'œnologie de Montpellier dans le cadre du projet STARWINE. Je remercie toutes les personnes de ce projet d'avoir apporté un regard critique à mon travail et qui ont permis d'orienter les différents travaux effectués dans cette thèse.

Mes remerciements s'adressent aussi à toutes les personnes de l'UMR SPO. Les membres de l'équipe FLAM, ADEL et BIO ont tous apporté quelque chose à ce travail que ce soit scientifique ou pour de simples conseils et discussions. Marc et Christian, les frères lumières, merci de m'avoir aidé à aller au bout de toutes ces fermentations et de ces litres de moût (640L quand même). Faïza et Valérie pour votre aide sur les analyses HPLC et GC-MS et votre gentillesse. Virginie et Martine pour toute la réflexion et la conception de l'analyse transcriptomique. J'ai adoré travailler avec vous.

Je remercie aussi Marta, Irene, Carmen, les Rafa, Cécile L, Thibault, Lauriane, Giovana, Angèle, Cécile G et Hugo pour les bons moments passés ensemble. Je remercie Charlie, avec qui j'ai partagé mon bureau depuis le début de nos stages jusqu'à la fin de nos thèses. Merci d'avoir été présente dans les bons comme dans les mauvais moments.

Merci également à Isabelle et Meili, de l'UMR MISTEA, pour m'avoir épaulé dans toutes mes analyses de résultats et m'avoir appris à manipuler R avec plaisir. Je suis très heureuse d'avoir pu travailler avec vous.

Un immense merci à tous les membres de l'unité expérimentale de Pech Rouge. Mes nombreux séjours dans la Clape n'aurait pas été si joyeux sans vous. Je tiens à remercier tout particulièrement Evelyne, Philippe, Yannick et Centina qui ont participé à plus de la moitié des résultats générés pendant ces trois ans. Vous avez été d'une aide précieuse. Merci Mélanie de m'avoir fait sourire tous les jours (sauf le mercredi).

Merci à mes copains d'aventures : Léa, Gabriel, Rémi, Alice et Ludo (Guten Morgen kleine Blume). Oliv et Ted, merci de m'avoir apporté de la bonne humeur tous les matins, vous avez été de vrais piliers pour moi. Trois années passées ensemble, sans vous elles n'auraient pas eu la même saveur. Pour finir, je tiens à remercier ma famille, mes amis et mon amoureux qui m'ont soutenu jusqu'à la fin de cette belle et longue aventure.



# Valorisation des travaux de recherche

## Publications

**Godillot, J., Sanchez, I., Perez, M., Picou, C., Galeote, V., Sablayrolles, J. M., Farines, V., Mouret, J. R. (2022).** The Timing of Nitrogen Addition Impacts Yeast Genes Expression and the Production of Aroma Compounds During Wine Fermentation. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.829786>

**Godillot J., Baconin C., Sanchez I., Baragatti M., Perez M., Sire Y., Sablayrolles J-M., Farines V., Mouret J-R.** Analysis of the production kinetics of volatile compounds: study of the impact of nitrogen addition and temperature during alcoholic fermentation. (Article soumis dans le journal *Frontiers in Microbiology*).

## Posters

**Godillot, J., Sanchez, I., Perez, M., Picou, C., Galeote, V., Sablayrolles, J. M., Farines, V., Mouret, J. R. (2021).** Macrowine 2021, Montpellier, France; Topic: Novel tools and strategies for precision and sustainable varietal and regional enology; Title: Impact of nitrogen addition timing on the synthesis of fermentative aromas in alcoholic fermentation.

**Godillot, J., Aguera, E., Sanchez, I., Baragatti, M., Perez, M., Sire, Y., Sablayrolles, J. M., Farines, V., Mouret, J. R (2022).** IVAS 2022, Neustadt, Germany; Topic: Biotechnology and microbiology; Title: Study of the impact of nitrogen additions and isothermal temperature on aroma production in oenological fermentation.

## Abréviations

AA : Acides aminés

AAP : Perméases d'acides aminés

AC : Ammonium chloride

ARN : Acide ribo-nucléique

AS : Ammonium sulfate

ATP : Adénosine triphosphate

DAP : Di-ammonium phosphate

FID : Détecteur à ionisation de flamme

GAM : Generalized additive model

GC : Chromatographie en phase gazeuse

G6P : Glucose-6-phosphate

HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance

IAA : Isoamyl acétate

ISBA : Isobutyl acétate

ISOH : Isoamyl alcool

ISB : Isobutanol

MCC : Métabolisme carboné central

MS : Spectrométrie de masse

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide, forme réduite

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

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme réduite

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

NCR : Nitrogen catabolite repression

NO : Azote initial

Nad : Azote ajouté

PR : Propanol

Redox : Oxydo réduction

SPS : Ssy1p-Ptr3p-Ssy5, sensor des acides aminés extracellulaires

T : Température

TCA : Cycle des acides tricarboxyliques

Tm : Timing d'ajout d'azote

Vmax : Vitesse maximale de fermentation

VPP : Voie des pentoses phosphate

# Table des matières

<b>INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>9</b>
-----------------------------------	----------

<b>INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>13</b>
--	-----------

1. FERMENTATION EN CENOLOGIE.....	14
1.1. Caractéristiques de la fermentation .....	14
1.2. Déroulement de la fermentation .....	14
1.2.1. Phase de latence .....	15
1.2.2. Phase de croissance .....	15
1.2.3. Phase stationnaire .....	16
1.3. Métabolisme de la levure en conditions œnologiques.....	16
1.4. Métabolisme de l'azote en conditions œnologiques.....	19
1.4.1. Transport de l'azote .....	19
1.4.2. Assimilation de l'azote .....	20
1.4.3. Utilisation des différentes sources azotées .....	22
2. EFFETS DES PRINCIPAUX PARAMETRES FERMENTAIRES SUR LA CINETIQUE FERMENTAIRE .....	24
2.1. Azote assimilable .....	24
2.2. Température .....	25
3. EFFETS DES PRINCIPAUX PARAMETRES SUR LE METABOLISME CARBONE CENTRAL.....	26
3.1. L'azote.....	26
3.2. La température .....	27
4. LES AROMES .....	27
4.1. Les différents types d'arômes .....	27
4.1.1. Les arômes variétaux .....	27
4.1.2. Les arômes fermentaires.....	28
4.1.3. Les arômes de vieillissement .....	29
4.2. Voies de synthèse des arômes fermentaires .....	29
4.2.1. Alcools supérieurs .....	29
4.2.2. Esters d'acétate.....	31
4.2.3. Acides gras .....	34
4.2.4. Esters d'éthyle.....	35
4.3. Chronologie de production des arômes fermentaires .....	36
5. EFFETS DE L'AZOTE ASSIMILABLE ET DE LA TEMPERATURE SUR LA PRODUCTION DES AROMES .....	38
5.1. Effet de l'azote initial .....	38
5.2. Effet de l'azote ajouté en cours de fermentation .....	39
5.2.1. Nature de l'azote ajouté .....	39
5.2.2. Timing de l'ajout d'azote.....	40
5.2.3. Effet des différentes sources azotées sur l'activité transcriptionnelle de <i>S. cerevisiae</i> .....	44
5.3. Effet de la température.....	44
5.3.1. Température isotherme .....	47
5.3.2. Température anisotherme.....	48
5.3.3. Effet combiné de l'azote et de la température .....	49



<b>MATERIELS ET METHODES</b> .....	<b>51</b>
1. SOUCHE DE LEVURE.....	52
2. MILIEUX SYNTHETIQUES.....	52
3. FERMENTATIONS ET SUIVI CINETIQUE .....	54
3.1. Fermentations 1L .....	54
3.2. Fermentations 10L .....	56
4. METHODES DE DOSAGE .....	57
4.1. Dosage de la population cellulaire.....	57
4.2. Dosage des métabolites carbonés extracellulaires .....	58
4.3. Dosage de l'azote assimilable .....	58
4.3.1. Dosage de l'azote ammoniacal .....	58
4.3.2. Dosage des acides aminés libres.....	59
4.4. Dosage des composés volatils.....	60
4.4.1. Dosage des composés volatils hors ligne dans la phase liquide.....	60
4.4.2. Suivi en ligne des composés volatils dans la phase gazeuse.....	63
4.4.3. Bilans gaz-liquide des composés volatils.....	65
5. ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE .....	66
6. ANALYSE STATISTIQUE ET TRAITEMENT DES DONNEES.....	69
6.1. Plan d'expérience de Box-Behnken.....	70
6.2. Modélisation GAM .....	71
<b>RESULTATS</b> .....	<b>74</b>
<b>CHAPITRE 1 : ETUDE DE L'IMPACT DU TIMING D'AJOUT D'AZOTE SUR LA PRODUCTION D'AROMES FERMENTAIRES ...</b>	<b>75</b>
RESULTATS COMPLEMENTAIRES SUR L'ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE .....	91
1. Le gène <i>MAE1</i> .....	91
2. Les gènes <i>EEB1</i> et <i>EHT1</i> .....	92
<b>CHAPITRE 2 : ETUDE DE L'IMPACT DES AJOUTS D'AZOTE ET DE LA TEMPERATURE SUR LES CINETIQUES FERMENTAIRES ET AROMATIQUES .....</b>	<b>93</b>
RESULTATS COMPLEMENTAIRES.....	126
1. Effet combiné de l'azote et de la température sur les métabolites du MCC.....	126
2. Données transcriptomique complémentaires sur le propanol .....	128
<b>CHAPITRE 3 : ETUDE DE L'IMPACT DES AJOUTS D'AZOTE ET DE LA TEMPERATURE ANISOTHERME SUR LES CINETIQUES FERMENTAIRES ET AROMATIQUES.....</b>	<b>130</b>
<b>DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>161</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>170</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>173</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>175</b>
<b>RÉSUMÉ .....</b>	<b>185</b>

---

# Introduction générale

---

Le vin est un produit mondial, consommé sur tous les continents. Le marché du vin est de plus en plus compétitif et la demande des consommateurs toujours plus exigeante. Le profil organoleptique du vin est, depuis toujours, l'une des caractéristiques les plus importantes pour les consommateurs. Aujourd'hui, la demande est ainsi orientée vers des vins disposant de profils sensoriels fruités et floraux (Swiegers et al., 2005).

Afin d'être en adéquation avec les attentes des consommateurs, il est nécessaire de développer des stratégies de contrôle du procédé de vinification pour obtenir les propriétés organoleptiques souhaitées. Qui plus est, ces stratégies doivent intégrer le contexte de changement climatique qui induit progressivement des modifications de la composition des baies de raisins (Darriet et al., 2016). Il est donc d'autant plus important de pouvoir adapter les méthodes d'élaboration du vin, de les rendre suffisamment flexibles et habiles pour assurer de façon constante la qualité finale du produit.

Pour atteindre cet objectif, il est donc important de maîtriser l'une des étapes clé du processus de vinification, la fermentation alcoolique. En effet, c'est au cours de ce procédé microbien que sont produits les arômes fermentaires. Ces composés volatils représentent une part importante des arômes responsables du profil organoleptique des vins avec en particulier les esters impliqués dans l'arôme fruité. La composition du moût de raisin est déterminante pour le bon déroulement de la fermentation. En conditions optimales, il contient tous les nutriments dont les levures ont besoin pour réaliser correctement la fermentation alcoolique. Cependant, selon les facteurs environnementaux, il arrive que certains nutriments ne soient pas présents en quantité suffisante dans le moût. Ces carences peuvent alors impacter le bon déroulement de la fermentation mais aussi altérer la production des arômes par la levure et donc la qualité finale du vin.

Un des éléments majeurs de la composition du moût de raisin est la teneur en azote assimilable. Ce nutriment est primordial pour la croissance des levures et joue un rôle important dans la synthèse des arômes fermentaires. Pour répondre aux problématiques liées aux carences en azote, la mise en place d'ajouts d'azote dans le moût initial ou au cours de la fermentation alcoolique a été développée. Ce sont des pratiques couramment utilisées en œnologie pour « sécuriser » le processus fermentaire et éviter les fermentations lentes ou incomplètes (caractérisées par la présence de sucres résiduels, rendant le vin non marchand) (Bely et al., 1990b). Les conséquences de tels ajouts sur la réaction principale (conversion du sucre en éthanol et CO<sub>2</sub>) sont bien connues (Bely et al., 1990b). En revanche, leur impact sur la synthèse des arômes fermentaires a été peu étudié même si de récents travaux indiquent qu'un ajout d'azote réalisé au cours de la fermentation augmente la production de certains arômes et en particulier des esters (principalement celle des esters d'acétate) qui sont impliqués dans le caractère fruité des vins (Seguinot et al., 2018). Par contre, les effets du timing d'ajout d'azote et de la dose ajoutée n'ont jamais été évalués. Il est donc important de se focaliser plus en détails sur l'impact de ce nutriment concernant la production des arômes, en particulier en étudiant les régulations métaboliques et génétiques associées.

La température de fermentation est également un levier important pour la gestion et le contrôle du processus fermentaire. Si les fortes températures permettent d'accélérer la vitesse de fermentation, elles ne sont pas favorables pour le maintien des composés volatils dans la phase liquide. En effet, depuis quelques années, de nombreux travaux ont étudié l'effet de la température sur l'évaporation des composés d'arôme.

Certaines familles d'arômes, comme les esters d'acétate et les esters d'éthyle, sont des molécules volatiles et s'évaporent facilement dans la phase gazeuse. Différents travaux ont permis de réaliser des bilans gaz/liquide de production de ces molécules (Morakul et al., 2013; Mouret, Camarasa, et al., 2014). La mise au point d'un modèle mathématique associé à un suivi en ligne des cinétiques de production des arômes fermentaires a permis de déterminer tout au long du procédé fermentaire : 1/ la concentration des arômes dans le liquide, 2/ celle perdue par évaporation et 3/ la production totale par la levure (d'intérêt métabolique, égale à la somme des deux concentrations précédentes). Pour certains esters, la perte par évaporation peut représenter jusqu'à 50% de la production totale par la levure à 30°C (Mouret, Camarasa, et al., 2014). L'effet de la température a également été étudié sur la régulation de certains gènes impliqués dans les voies de synthèse des composés d'arômes (Beltran et al., 2006; Molina et al., 2007). Il a été montré que les fortes températures induisent une expression plus importante des gènes responsables de la synthèse des alcools supérieurs tandis que les faibles températures modifient l'expression des gènes impliqués dans la voie de synthèse des esters d'éthyles (Beltran et al., 2006).

Même si les profils de température sont souvent isothermes au cours du procédé œnologique, la gestion de la température peut également se faire en régime anisotherme au cours de la fermentation. Par exemple et dans la pratique, les vinificateurs laissent sensiblement monter la température en fin de fermentation pour en assurer l'achèvement. Utiliser des profils de température anisotherme permet de se rapprocher des conditions réelles de vinifications observées dans les cuves de taille industrielle (Colombie et al., 2005; Malherbe et al., 2004; Mouret et al., 2012). Mais l'impact d'une gestion anisotherme de la température sur la production des arômes fermentaires n'a, à notre connaissance, pas encore été évalué.

Il apparaît donc qu'une gestion combinée de la température et de la nutrition azotée est une solution intéressante pour pouvoir gérer et contrôler au mieux la synthèse des arômes au cours de la fermentation alcoolique et donc la qualité finale du vin. C'est dans ce contexte d'étude que s'inscrit ce travail de thèse. L'objectif de ce projet est de mieux comprendre l'effet des ajouts d'azote en cours de fermentation et de la gestion de la température sur le métabolisme de la levure et la synthèse des arômes associés. Dans un premier temps, ces deux principaux facteurs ont été étudiés seuls puis dans un second temps nous avons évalué leurs effets combinés.

La première partie de ce travail de thèse a été consacrée à l'étude de l'impact du timing d'ajout d'azote en cours de fermentation sur la synthèse des arômes fermentaires mais également sur le métabolisme carboné central de la levure. En plus du timing d'ajout, nous avons

également fait varier la concentration en azote initial dans le moût ainsi que la dose ajoutée. Afin de mieux appréhender les effets directs et d'interaction de ces trois paramètres sur la production des arômes, un plan d'expérience de Box-Behnken a été utilisé. Ce modèle prédictif, couplé à une analyse statistique, a été appliqué à la production finale d'une dizaine de composés volatils appartenant aux principales familles d'arômes fermentaires. Enfin, pour aller plus loin dans la compréhension des résultats statistiques du plan d'expérience, nous avons réalisé une analyse transcriptomique. Ce travail a fait l'objet d'une publication intitulée « The timing of nitrogen addition impacts yeast genes expression and the production of aroma compounds during wine fermentation », parue dans la Revue *Frontiers in Microbiology* en 2022.

Dans une seconde partie, nous avons évalué les effets combinés de la température et de l'azote. Au cours de cette étude, différents profils isothermes de température ont été testés avec un timing unique d'ajout d'azote, déterminé comme étant le timing d'ajout le plus efficace lors du travail précédent. Un plan d'expérience de Box-Behnken a également été utilisé pour ce travail en faisant varier les trois paramètres suivants : azote initial, azote ajouté et température. La production d'arômes a été suivie en fonction du temps grâce à un outil de suivi en ligne des composés volatils par GC-MS. L'analyse des cinétiques de production des arômes a été réalisée avec un outil de modélisation et d'évaluation de la significativité des paramètres (GAM).

Enfin, la dernière partie de ce travail est centrée sur l'effet de l'interaction entre l'azote ajouté et la température anisotherme. Pour cela, des profils de gestion de la température anisothermes ont été mis en place afin d'explorer au mieux l'impact de la température sur la production des arômes. Les fermentations avec les profils anisothermes ont d'abord été réalisées sans ajout d'azote puis ces fermentations ont été répétées en incluant un ajout d'azote en cours de fermentation.

Ce projet de thèse fait partie du projet ANR StarWine (2019-2023). L'objectif principal de ce projet est de maîtriser l'arôme fruité des vins en développant des stratégies innovantes de contrôle en temps réel de la fermentation alcoolique, en utilisant un modèle mathématique prédictif. Par conséquent, les données générées pendant ce travail de thèse ont non seulement permis d'approfondir nos connaissances sur l'impact de l'azote et de la température sur le métabolisme levurien en fermentation œnologique mais elles ont également été utilisées pour construire le modèle mathématique utilisé dans le cadre du projet StarWine. Ce modèle mathématique prédictif permettra d'établir une stratégie de maîtrise en temps réel et de rétrocontrôle du profil aromatique du vin en agissant sur les paramètres azote et température. Le but final de Starwine est d'adapter ce modèle à l'échelle industrielle pour un suivi en ligne et une gestion optimale des arômes en cave.

---

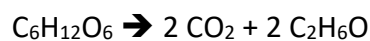
# Introduction bibliographique

---

## 1. Fermentation en œnologie

### 1.1. Caractéristiques de la fermentation

La fermentation alcoolique est une étape clé du processus de vinification. Ce procédé microbien anaérobie permet la conversion des sucres du moût de raisin en éthanol et dioxyde de carbone mais également en autres composés qui vont participer aux propriétés organoleptiques finales du vin. Cette conversion est réalisée par des levures, principalement *Saccharomyces cerevisiae*, suivant l'équation :



Le moût de raisin est un milieu acide (pH compris entre 2,9 et 3,8) possédant une forte concentration en sucre (entre 150 et 260 g/L de glucose et fructose en mélange équimolaire). Il contient également des nutriments essentiels à la croissance des levures tels que les vitamines, les minéraux, les lipides et l'azote. La composition du moût dépend du cépage, de sa maturité lors de la récolte ou encore de la composition du sol.

Même si la fermentation peut se faire naturellement sous l'action des levures indigènes, le levurage est une pratique courante aujourd'hui. La technique consiste àensemencer le moût de raisin avec une souche de levure sélectionnée, sous forme de levures sèches actives, à une concentration comprise entre 1 et  $5 \cdot 10^6$  cellules/mL. Grâce à l'utilisation de ces souches de levures sélectionnées, il est possible de mieux contrôler la fermentation du point de vue cinétique en sécurisant le cycle fermentaire mais aussi aromatique en orientant les propriétés organoleptiques du vin. Dans ces conditions, le déroulement de la fermentation alcoolique va dépendre des paramètres suivants : conditions de fermentation (gestion de la température, ajout d'oxygène), souche de levure utilisée et composition du moût incluant les aspects nutritionnels.

### 1.2. Déroulement de la fermentation

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

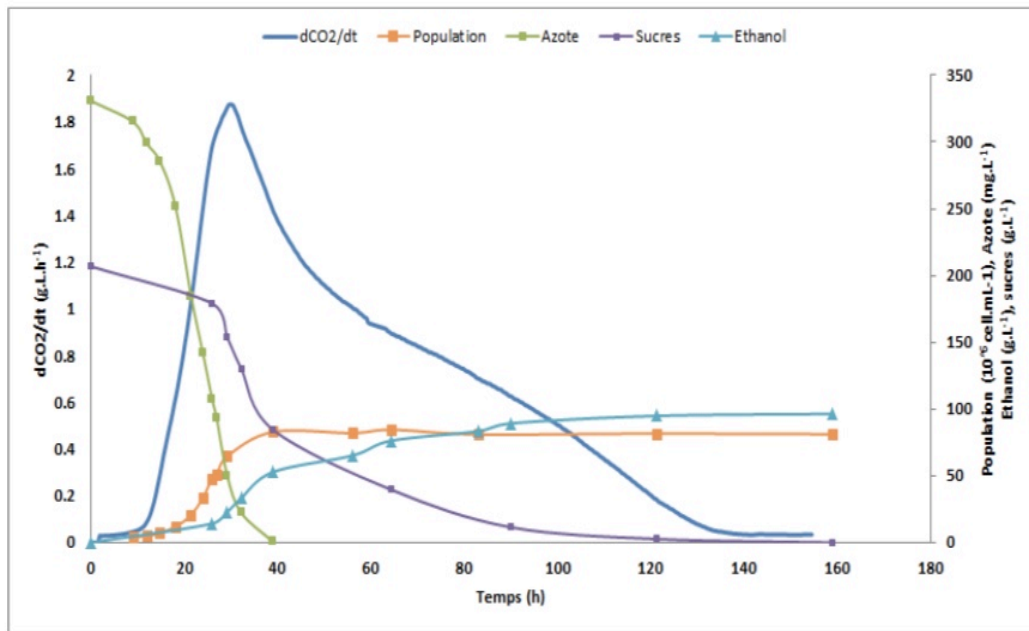


Figure 1. **Evolution des paramètres de fermentation au cours du temps lors d'une fermentation à 24°C.** La souche utilisée est EC1118 et le milieu est un moût synthétique à 200 g/L de sucres et 330 mg/L d'azote assimilable.

### 1.2.1. Phase de latence

La phase de latence correspond au temps durant lequel les levures s'adaptent au milieu (Pérez-Torrado et al., 2002). Cette phase dépend des nutriments qui composent le moût, de la température et de la souche utilisée.

Au cours de cette phase, l'activité des levures est faible c'est-à-dire qu'elles dégagent une quantité minimale de CO<sub>2</sub>. Cette première phase correspond à la saturation (1,5 g/L de CO<sub>2</sub>) progressive du milieu de culture en CO<sub>2</sub> (Bely et al., 1990b).

### 1.2.2. Phase de croissance

La phase de croissance correspond à l'étape d'augmentation de la population de levure dans le moût et dure jusqu'à l'obtention de la population maximale comprise entre 50 et 205.10<sup>6</sup> cellules/mL (Bely et al., 1990b). La croissance cellulaire est généralement interrompue lorsque l'azote assimilable dans le moût est épuisé. Enfin, c'est également à la fin de cette phase que la vitesse maximale de dégagement de CO<sub>2</sub> (V<sub>max</sub>) est atteinte. La durée de cette phase est inversement corrélée avec la température et la concentration en azote dans le moût (Bely et al., 1990b). En effet, lorsque les valeurs de ces deux paramètres fermentaires augmentent, la V<sub>max</sub> est importante et la durée de la phase de croissance est réduite (Bely et al., 1990b; Torrea et al., 2003).



### 1.2.3. Phase stationnaire

Une des particularités de la fermentation alcoolique en conditions œnologiques est que l'essentiel de la consommation des sucres (50-80%) a lieu durant la phase stationnaire au cours de laquelle les levures ne se multiplient plus mais conservent une activité fermentaire. Au cours de cette phase, la viabilité des cellules reste élevée (80-90%) dans la plupart des cas. La population cellulaire est stable alors que l'activité fermentaire diminue progressivement. Cette diminution est due à l'accumulation importante de l'éthanol qui inhibe l'activité des transporteurs de sucres mais également des transporteurs de l'azote et des acides aminés (Torrea et al., 2003). La fermentation se termine lorsque tout le sucre présent dans le moût est consommé.

### 1.3. Métabolisme de la levure en conditions œnologiques

*Saccharomyces cerevisiae* est une levure aérobie facultative et Crabtree positive. Dans un milieu riche en glucose et en anaérobiose, comme le moût de raisin, la levure utilise le sucre comme source d'énergie et possède donc un métabolisme fermentaire (Clement et al., 2011).

La première étape de la glycolyse est la phosphorylation du glucose en glucose-6-phosphate via les enzymes Hxk1/2p (hexokinases) et Glk1p (glucokinase). Ensuite, le G6P est transformé en fructose-6-phosphate par l'isomérase Pgi1p (G6P isomérase) puis en fructose-1,6-diphosphate par les enzymes Pfk1/2p. Cette étape nécessite de l'énergie sous forme d'ATP. Le fructose-1,6-diphosphate est soit converti en dihydroxyacétone phosphate soit en glyceraldéhyde-3-phosphate par l'enzyme Fbp1p. Il est également possible que le dihydroxyacétone phosphate soit converti en glyceraldéhyde-3-phosphate et inversement via Tpi1p. Enfin, par une suite de réaction enzymatique, le glyceraldéhyde-3-phosphate est transformé en pyruvate (**Figure 2**).

Le pyruvate est un intermédiaire métabolique important puisqu'il est au carrefour de plusieurs nœuds métaboliques. Il est le précurseur du cycle des acides tricarboxyliques. La pyruvate carboxylase Pyc1/2p permet la carboxylation du pyruvate en oxaloacétate. Le pyruvate peut aussi être converti en acétyl-CoA via les enzymes Pda1p et Pdb1p. L'oxaloacétate et l'acétyl-CoA sont ensuite convertis en citrate via Cit1/3p. Puis, le citrate est converti en isocitrate et en  $\alpha$ -cétoglutarate respectivement par les enzymes Aco1/2p et Idh1/2p. Il sera ensuite converti en succinyl-CoA puis en succinate par les enzymes Lpd1p, Kgd1/2p et Lsc1/2p. En conditions fermentaires, le cycle de Krebs présente une particularité puisqu'il n'est pas cyclique. La partie allant du succinate à l'oxaloacétate fonctionne comme une branche réductrice et non oxydative. Le flux va donc vers le succinate en passant par le malate et le fumarate *via* les enzymes déshydrogénases Mdh1p, Fum1p, Sdh1/2p, Frds2p et Oms1p (Camarasa et al., 2003) (**Figure 2**).

Le pyruvate donne également, par décarboxylation (Pdc1/5/6p), l'acétaldéhyde puis l'acétate *via* les aldolases Ald4/5/6p. L'acétaldéhyde peut aussi être réduit en éthanol par Adh1p (**Figure 2**).

Le glucose ne va pas entièrement vers la synthèse du pyruvate : une partie est convertie en glycérol en passant par la glycérol-3-phosphate déshydrogénase. Cette synthèse permet l'oxydation du NADH présent en excès lors de la croissance (Michnick et al., 1997; van Dijken & Scheffers, 1986). Le glycérol est également un intermédiaire de la synthèse des phospholipides et permet de réduire le stress osmotique dû aux concentrations élevées en sucre en début de fermentation (Blomberg & Adler, 1989) (**Figure 2**).

Une partie des sucres assimilés est dégradée par la voie des pentoses phosphate (VPP). Cette voie permet de régénérer la majorité du NADPH qui est un intermédiaire primordial dans les processus anaboliques (Blank et al., 2005). La VPP permet également la synthèse d'intermédiaires du métabolisme des acides aminés aromatiques et des nucléotides (ribose-5-phosphate et érythrose-4-phosphate) (**Figure 2**).



## 1.4. Métabolisme de l'azote en conditions œnologiques

L'azote est un nutriment limitant pour la levure puisqu'il est primordial pour la croissance et le bon déroulement de la fermentation. Il est présent sous forme d'azote organique (acides aminés, peptides) et minéral (ammonium). La levure dispose de tous les systèmes enzymatiques nécessaires à l'assimilation et l'utilisation de ces différentes sources azotées.

### 1.4.1. Transport de l'azote

Les acides aminés sont acheminés dans la cellule par des perméases appelées AAP (Amino Acid Permeases). Il en existe 24 qui se différencient par la nature de l'acide aminé transporté. Elles partagent cependant une structure commune composée de 12 domaines transmembranaires, un N-terminal et un C-terminal cytoplasmique (Ljungdahl & Daignan-Fornier, 2012b). L'entrée des acides aminés dans la cellule est accompagnée par l'entrée d'un proton  $H^+$  grâce à un symport (**Figure 3**).

Une des 24 perméases identifiées, appelée Gap1p, est commune à tous les acides aminés. Gap1p est importante car, en plus de transporter les AA de manière générale, elle joue un rôle de « sensor ». En effet, elle détecte la teneur des AA dans le milieu extracellulaire et celle des transporteurs et permet donc de réguler leur activité. Elle va provoquer l'activation des gènes qui codent pour les AAPs. Une fois formées, les AAPs vont transiter par le réticulum endoplasmique puis par l'appareil de Golgi pour devenir fonctionnelles et enfin rejoindre la membrane plasmique pour prendre leurs fonctions (Zhang et al., 2018).

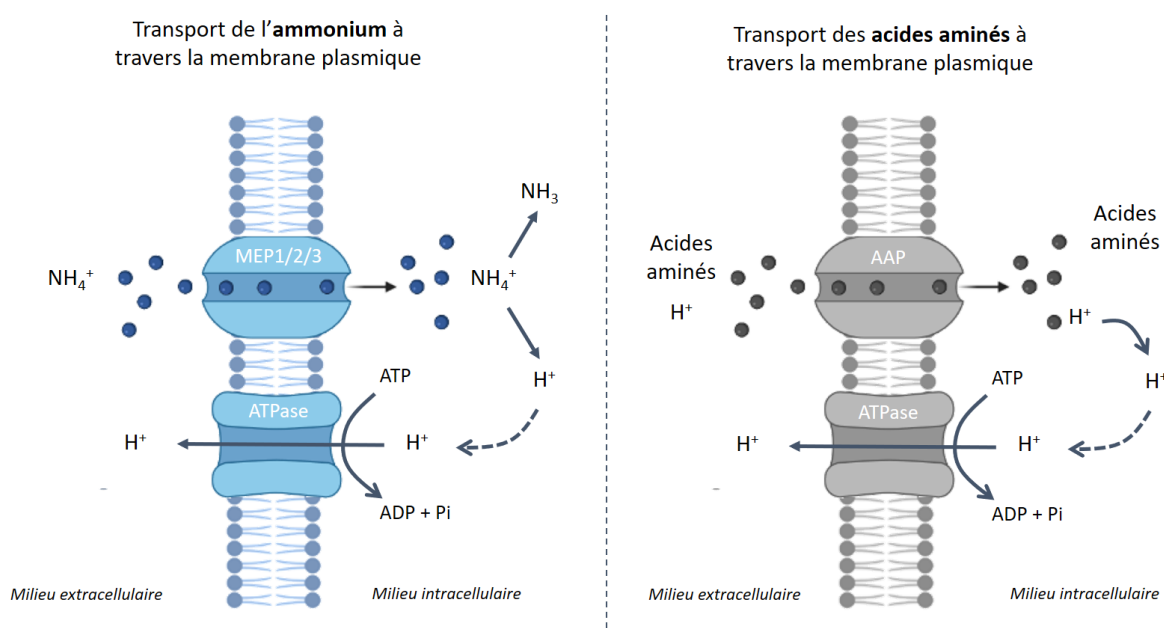


Figure 3. Mécanismes de transport des ions ammonium (uniport) et des acides aminés (symport) (Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012)

L'ammonium, lui, est transporté grâce aux perméases Mep1p, Mep2p et Mep3p. Ces perméases sont constituées de 11 domaines transmembranaires, un N-terminal et un C-terminal cytoplasmique. Elles sont régulées par la protéine kinase Npr1p qui permet une activité optimale des perméases pour l'absorption de l'ammonium dans le milieu intracellulaire.

L'ammonium est assimilé principalement par la perméase Mep2p (Boeckstaens et al., 2007) *via* un uniport (**Figure 3**). Les mécanismes de symport des acides aminés et d'uniport de l'ammonium sont tous deux accompagnés par la sortie d'un proton H<sup>+</sup> via une ATPase afin d'éviter l'acidification du cytoplasme (**Figure 3**).

Le transport des différentes sources azotées va dépendre de « l'affinité » de la levure pour chaque source d'azote. En effet, Crépin et al., 2012 ont mis en évidence un ordre d'assimilation des sources azotées scindé en 3 grands groupes : les sources consommées prématurément (Lys), celles consommées dans la première moitié de la phase de croissance (Asp, Thr, Glu, Leu, His, Met, Ile, Ser, Gln, et Phe) et celles consommées à la fin de la phase de croissance (Ammonium, Val, Arg, Ala, Trp, and Tyr). L'ordre d'assimilation des sources d'azote par la levure dépend de deux systèmes de régulation importants : le système SPS et le système NCR explicités ci-après.

#### 1.4.2. Assimilation de l'azote

Le système SPS est composé de 3 unités situées sur la membrane plasmique : Ssy1p-Ptr3p-Ssy5p (SPS). Suivant la disponibilité en acides aminés extracellulaires, le complexe va changer de conformation et induire une activation de la transcription des gènes codant pour les perméases AAPs. En absence d'acides aminés dans le milieu, le complexe reste composé de ces 3 sous-unités. Les facteurs de transcription Stp1/2p sont inactivés par la présence de l'ancre N-terminal et les gènes codant pour les AAPs sont réprimés. Lorsque les acides aminés sont présents dans le milieu, la sous-unité Ptr3p se détache du complexe SPS et permet l'activation de Stp1/2p par clivage de l'ancre N-terminal. Ce dernier se dirige ensuite dans le noyau pour se fixer à Dal81p. Le complexe Stp1/2p-Dal80p se fixe sur les promoteurs des gènes codant les AAPs et permet donc leur synthèse. Une fois synthétisées, les perméases retrouvent leurs fonctions à la membrane (Gobert et al., 2019; Ljungdahl & Daignan-Fornier, 2012b; W. Zhang et al., 2018) (**Figure 4**).

Le système NCR est plus complexe et montre des régulations plus fines que le système SPS. *S. cerevisiae* a développé ce mécanisme afin de sélectionner les meilleures sources d'azote pour sa croissance parmi un large choix de composés azotés. Ljungdahl & Daignan-Fornier, 2012 ont montré que la régulation de 8 perméases est contrôlée par ce mécanisme : Gap1p, Can1p, Put4p, Dip5p, Uga4p (perméases des acides aminés) et Mep1p, Mep2p et Mep3p (perméases de l'ammonium) (**Tableau 1**). Lorsque les sources d'azotes « préférées » de la levure sont

disponibles dans le milieu, le système NCR va bloquer l'utilisation des sources « pauvres » d'azote en inhibant la transcription des gènes contrôlés par ce système. Tandis que lorsque les sources d'azotes présentes dans le milieu extérieur ne sont pas préférentielles, les gènes qui étaient réprimés précédemment ne le sont plus. La levure est donc amenée à utiliser les sources azotées de manière non spécifique.

Une étude plus détaillée de la régulation du système NCR a permis de démontrer que plusieurs facteurs de transcription interviennent dans la régulation des gènes sensibles au NCR. Lorsqu'une source d'azote préférentielle est présente, les protéines Gat1p et Gln3p sont bloquées par Ure2p dans le cytoplasme. De plus, Dal80p bloque le site de liaison des facteurs de transcription. A l'inverse, lorsqu'aucune source d'azote préférentielle n'est présente dans le milieu, Ure2p se détache de Gat1p et Gln3p, le couple Gat1p/Gln3p migre dans le noyau et se fixe sur le site de liaison libéré par Dal80p (**Figure 4**). Aucune répression par le NCR n'est alors fonctionnelle et la transcription des gènes est activée (Gobert et al., 2019; Ljungdahl & Daignan-Fornier, 2012b).

De manière générale, le système NCR permet à la levure de « classer » les sources d'azote par préférence. Ces préférences vont dépendre de plusieurs paramètres : la composition azotée du milieu (Mendes-Ferreira et al., 2007), la souche de levure (Brice et al., 2018; Crépin et al., 2012; Lleixà et al., 2019) ou encore les conditions de culture (Rollero et al., 2017).

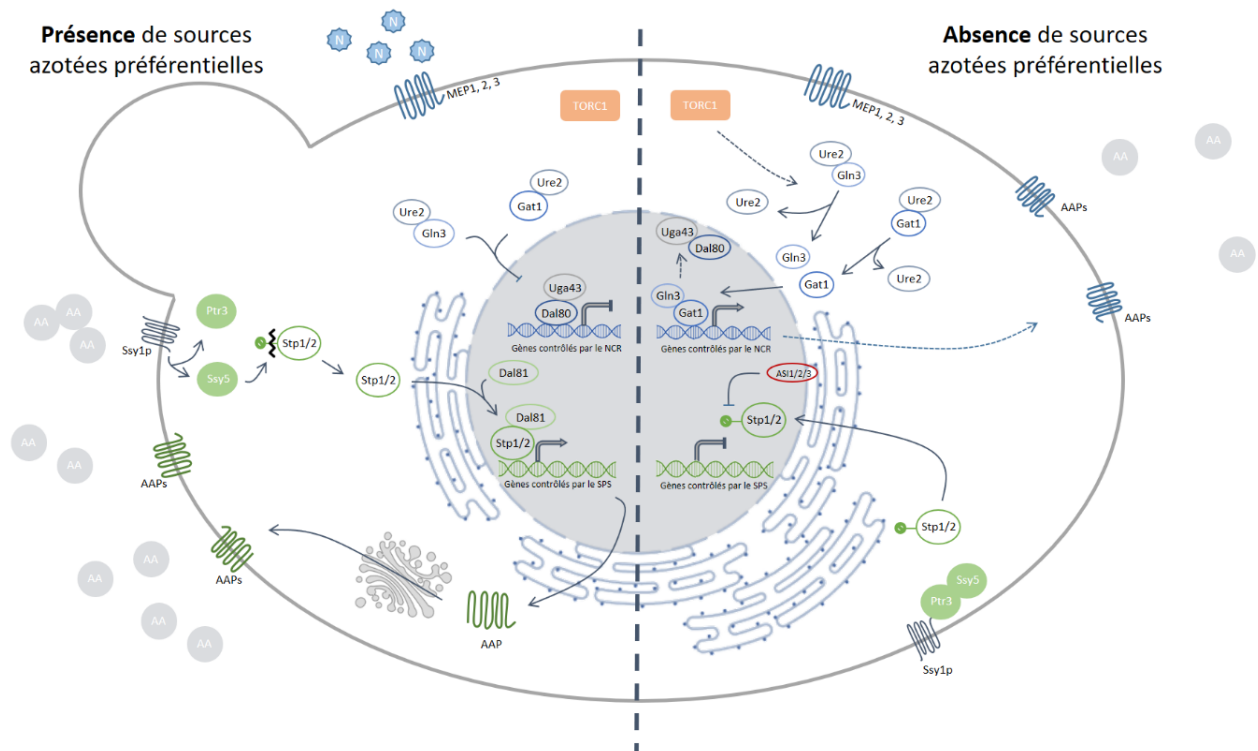


Figure 4. **Systèmes d'assimilation des différentes sources d'azote du milieu en présence ou en absence des sources azotées préférentielles** (Gobert et al., 2019, Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012, Zhang et al., 2018). Les perméases, enzymes et facteurs de transcriptions sous le contrôle du système SPS sont colorés en vert, ceux sous le contrôle du système NCR sont colorés en bleu. En présence de source azotée préférentielle, le système SPS est actif et le NCR inactif (gauche). En absence de source azotée préférentielle le SPS est inactif et NCR actif (droite).



Les acides aminés assimilés vont être : soit directement utilisés dans les protéines, soit catabolisés puis convertis en un autre acide aminé ou encore stockés dans la vacuole ou le cytoplasme (Crépin et al., 2014, 2017).

L'ammonium va être directement utilisé dans le nœud  $\alpha$ -cétoglutarate/glutamate/glutamine. En effet, l'ammonium est un intermédiaire métabolique primordial dans la synthèse *de novo* des acides aminés. La synthèse de la glutamine est effectuée à partir du glutamate et de l'ammonium, lui-même synthétisé à partir de l' $\alpha$ -cétoglutarate *via* les enzymes *GDH1* et *GLN3* (Figure 5).

Cette réaction enzymatique est le point de départ de la biosynthèse de tous les acides aminés nécessaires pour la levure qui est résumée dans la Figure 6 (Ljungdahl & Daignan-Fornier, 2012b).

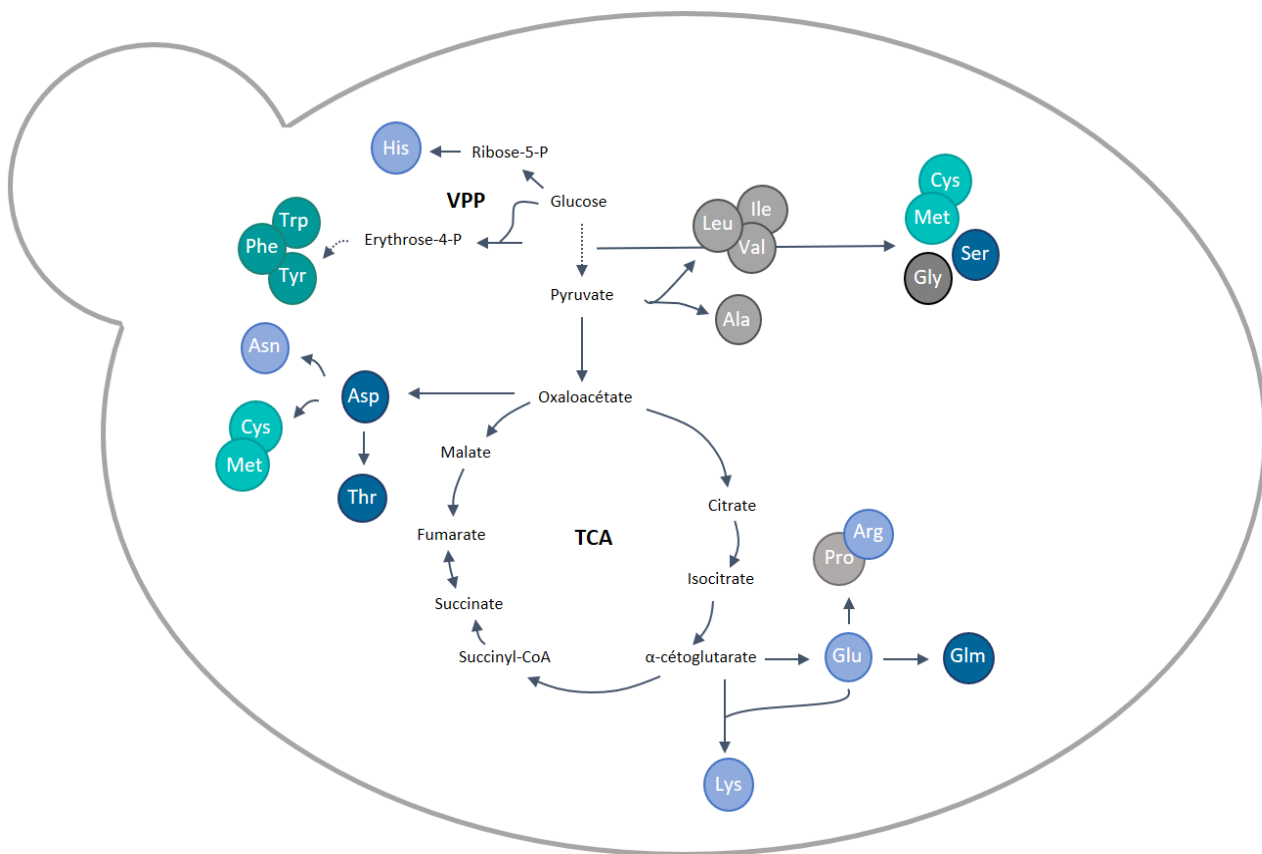


Figure 6. Schématisation de la biosynthèse des acides aminés à partir du MCC (d'après Ljungdahl & Daignan-Fornier, 2012)



## 2. Effets des principaux paramètres fermentaires sur la cinétique fermentaire

### 2.1. Azote assimilable

La concentration en azote assimilable (azote minéral et organique) dans le moût varie selon les cépages, la composition du sol ou encore la maturité du raisin.

Les teneurs varient entre 53 et 444 mgN/L (Bell & Henschke, 2005). C'est un nutriment limitant dans les moûts et il joue un rôle essentiel pour le bon déroulement de la cinétique fermentaire. Il existe ainsi une relation directe entre la concentration en azote assimilable, la vitesse maximale de production de CO<sub>2</sub> et la durée de la fermentation. Cette dernière diminue lorsque la concentration en azote dans le moût augmente (Bely et al., 1990a). A l'inverse, les moûts présentant une carence en azote assimilable peuvent donc être à l'origine de fermentations plus longues.

Un ajout d'azote initial dans le moût permet d'augmenter la population de levures (Bell & Henschke, 2005; Bely et al., 1990a). D'autres études ont montré que des ajouts d'azote réalisés au cours de la phase stationnaire n'ont aucun effet sur la population cellulaire mais augmentent la vitesse spécifique de fermentation, réduisant ainsi la durée de fermentation (Beltran et al., 2005; Malherbe et al., 2004; Seguinot et al., 2018) (Figure 8). Enfin, en cas d'ajout tardif, les effets d'une source d'azote minéral ou organique sur la cinétique fermentaire sont similaires (Barbosa et al., 2012; Seguinot et al., 2018) (Figure 7).

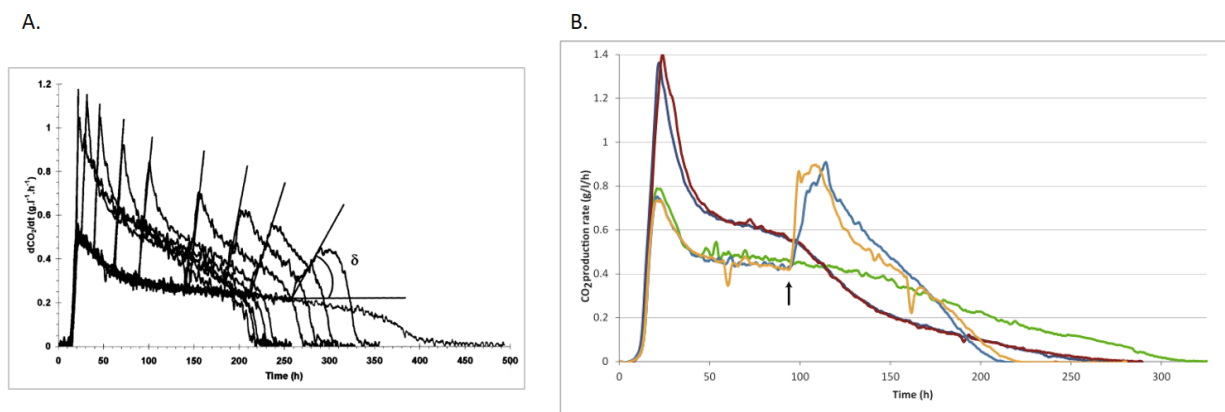


Figure 7. Effet d'un ajout d'azote initial ou en cours de fermentation sur la cinétique fermentaire. (A) Effet du timing d'ajout de DAP à une concentration de 63 mg/L (Malherbe et al., 2004) ; (B) Effet du timing et de la nature de l'azote ajouté sur la cinétique fermentaire : ajout initial (courbes rouge et bleu foncée), ajout en cours de fermentation (courbes jaune et bleu claire), DAP ajouté (courbes bleu foncée et bleu clair), AA ajoutés (courbes rouge et jaune). La courbe verte est une fermentation témoin sans ajout (Seguinot et al., 2018).

## 2.2. Température

Dans la pratique, les vinifications en blanc sont réalisées à des températures inférieures à 20°C tandis que les vinifications en rouges atteignent parfois 30°C (Williams & Boulton, 1983).

La température est un paramètre qu'il est nécessaire de contrôler car la fermentation alcoolique est un processus exothermique. Une augmentation trop importante peut d'une part altérer la qualité aromatique finale des vins et d'autre part engendrer une mortalité importante de la population de levures (Torija et al., 2003).

La température initiale de fermentation impacte les principaux paramètres fermentaires : l'augmentation de température induit une augmentation de la vitesse maximale de dégagement de CO<sub>2</sub> et une diminution de la durée de fermentation (Blateyron & Sablayrolles, 2001; Sablayrolles, 2009).

En conditions réelles de vinifications, il est courant que la température augmente au cours du processus fermentaire. Le profil de température a un effet majeur sur l'allure de la cinétique fermentaire et une augmentation de plusieurs degrés modifie de manière importante celle-ci (**Figure 8**) (Sablayrolles & Barre, 1993). Un écart important est observé pour la durée et la vitesse maximale de dégagement de CO<sub>2</sub> entre une fermentation effectuée à 15°C et à 22°C. On retrouve des valeurs similaires de ces paramètres pour une fermentation anisotherme débutant à 15°C avec une augmentation de température. Lorsque l'augmentation de température est réalisée en début de fermentation, sa durée est plus courte que pour une augmentation effectuée en cours de phase stationnaire (Sablayrolles & Barre, 1993). De plus, entre 15 et 25°C, la vitesse de fermentation est doublée lorsque la température augmente d'environ 8°C (Bely et al., 1990b).

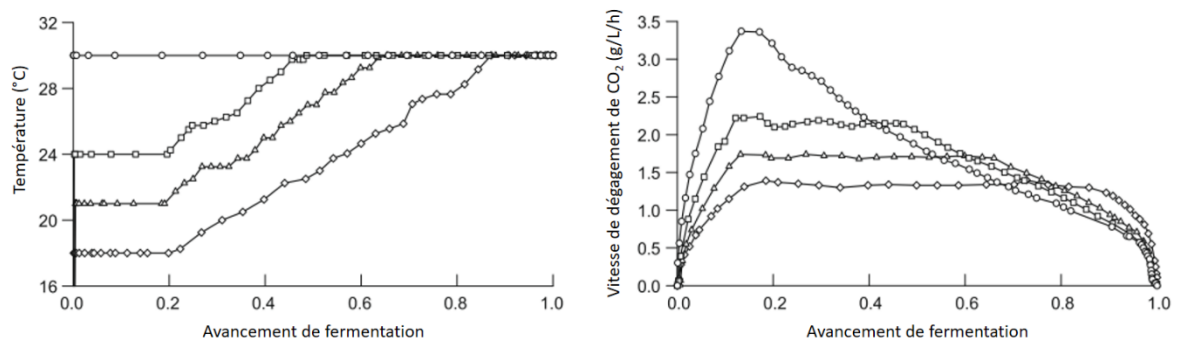


Figure 8. **Effet de l'augmentation de température au cours de la phase stationnaire de fermentation.** (Gauche) Augmentation de la température en fonction de l'avancement de réaction. (Droite) Vitesse de dégagement de CO<sub>2</sub> en fonction de l'avant de réaction (d'après Sablayrolles, 2009)

### 3. Effets des principaux paramètres sur le métabolisme carboné central

Les principaux composés suivis pour étudier l'impact des paramètres environnementaux sur le MCC sont le succinate, l'acétate et le glycérol. Ces intermédiaires métaboliques donnent des informations clés pour comprendre l'effet des paramètres environnementaux sur le métabolisme de la levure.

#### 3.1. L'azote

Il a été montré que le succinate est négativement impacté par l'augmentation de la concentration en azote initial dans le moût (Beltran et al., 2005; Guittin et al., 2021; Rollero et al., 2015; Torrea et al., 2011).

Ce résultat s'explique par le fait qu'en présence d'une forte concentration d'azote assimilable, notamment d'ammonium, l' $\alpha$ -cétoglutarate est principalement utilisé pour former du glutamate, ce qui entraîne une baisse de la production de succinate. En revanche, à des concentrations plus faibles en azote assimilable, le pool d' $\alpha$ -cétoglutarate est en partie pris en charge par la branche oxydative du cycle de Krebs pour former du succinate et donc sa concentration augmente (Camarasa et al., 2003; Rollero et al., 2015).

La production de glycérol est également diminuée lorsque la concentration en azote dans le milieu augmente (Remize et al., 2000; Rollero et al., 2015). En effet, cet intermédiaire métabolique joue un rôle important dans la réoxydation du NADH alors que, la synthèse de succinate permet la production de ce co-facteur redox. Par conséquent, pour maintenir l'équilibre redox de la cellule, lorsque la synthèse d'un des deux composés diminue, la production du second métabolite diminue également.

Tout comme le succinate et le glycérol, une diminution de la production d'acétate est observée dans des conditions où la concentration en azote initial est importante (Guittin et al., 2021; Rollero et al., 2015). L'acétate est synthétisé à partir de l'acétyl-CoA qui est un intermédiaire métabolique important du cycle de Krebs et de la biosynthèse des acides gras. Une forte concentration en azote initial va induire une augmentation de la biomasse et le pool d'acétyl-CoA disponible sera alors mobilisé pour la croissance plutôt que pour la synthèse d'acétate (Saint-Prix et al., 2004). De plus, une importante concentration en azote peut entraîner une augmentation de l'activité de la voie des pentoses phosphate (VPP), permettant la régénération du NADPH (Cadière et al., 2011). La voie des pentoses phosphate et la synthèse de l'acétate sont les principales voies métaboliques impliquées dans la régénération du NADPH. L'augmentation du flux de la VPP pour la régénération du NADPH va donc impliquer une diminution de la voie de synthèse de l'acétate (Cadière et al., 2011).

L'effet d'un ajout d'azote en cours de fermentation sur la production de ces intermédiaires du MCC n'a pas été beaucoup étudié. Les quelques études disponibles montrent que ce type

d'ajout n'a pas d'impact significatif sur la synthèse du glycérol et de l'acétate (Beltran et al., 2005; Liu et al., 2017; Seguinot et al., 2018; Torrea et al., 2011).

### 3.2. La température

L'effet de la température sur la production de succinate et de glycérol est similaire : une hausse de la température entraîne une augmentation de la production de ces deux composés (Deroite et al., 2018; Guittin et al., 2021; Rollero et al., 2015; Scanes et al., 1998). L'augmentation de la concentration en glycérol peut être expliquée par une activité plus importante de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (GPDH) à environ 25 °C (Gao et al., 2019). Pour le succinate, l'augmentation de l'activité du cycle de Krebs en lien avec l'augmentation de la température pourrait être à l'origine de ce résultat.

En ce qui concerne la concentration en acétate, aucun effet significatif de la température n'a été montré (Guittin et al., 2021; Rollero et al., 2015).

## 4. Les arômes

### 4.1. Les différents types d'arômes

Le profil organoleptique d'un vin est défini par trois grandes classes d'arômes qui dépendent principalement du cépage, du processus de fermentation et de l'élevage.

#### 4.1.1. *Les arômes variétaux*

Les arômes primaires/variétaux sont présents dans le moût de raisin sous forme de précurseurs non-volatils. La nature et la quantité de ces composés vont dépendre du cépage, du climat ou encore de la composition du sol. Au cours de la fermentation, ces précurseurs vont être libérés par les levures en composés d'arôme. Les thiols et les terpènes sont, par exemple, des composés d'arôme d'origine variétale.

Les thiols sont généralement retrouvés dans les vins blancs et sont typiques de certains cépages comme le Sauvignon blanc, le Gros-Manseng ou encore le Colombard. Ils sont responsables des odeurs de buis, de bourgeon de cassis, de fruit de la passion et de pamplemousse. Les terpènes sont retrouvés dans les cépages comme le Muscat et apportent des arômes de rose.

#### 4.1.2. Les arômes fermentaires

Au cours de la fermentation, la levure va synthétiser un grand nombre de composés volatils qui ont un impact important sur le profil aromatique du vin ; ce sont les arômes fermentaires. On retrouve dans cette classe de composés : les alcools supérieurs, les acides, les esters d'acétate et les esters d'éthyle (**Tableau 2**).

Les alcools supérieurs sont synthétisés à partir du métabolisme secondaire de la levure et peuvent avoir des effets positifs ou négatifs sur la qualité aromatique du vin final. Dans cette famille, on retrouve par exemple le propanol, l'alcool isoamylique, l'isobutanol ou encore le 2-phényléthanol. Des concentrations excessives en alcools supérieurs peuvent entraîner une odeur et un goût fort et piquant, alors que des niveaux optimaux confèrent un caractère fruité (Lambrechts & Pretorius, 2000; Swiegers et al., 2005). Une précédente étude a montré que des concentrations inférieures à 300 mg/L sont souhaitables tandis que des concentrations supérieures à 400 mg/L peuvent avoir un effet néfaste (Rapp & Versini, 1995).

A partir des alcools supérieurs, la levure synthétise les esters d'acétate. Ces derniers vont donner des arômes fruités et floraux au vin. On retrouve par exemple l'acétate d'isoamyle et l'acétate d'isobutyle qui apportent des arômes de banane ou encore l'acétate de phényléthyle qui va plutôt apporter des connotations de rose (**Tableau 2**).

Les acides gras sont synthétisés à partir du métabolisme des lipides et apportent généralement des notes désagréables au vin avec des descripteurs de savon ou encore d'huile (Lambrechts & Pretorius, 2000). En revanche les esters d'éthyle qui découlent des acides vont apporter des notes fruités et douces au vin. Par exemple l'hexanoate d'éthyle va apporter des arômes de pomme verte et l'octanoate d'éthyle des notes de savon doux (**Tableau 2**).

Les voies de synthèse de ces différents arômes sont décrites dans la partie suivante.

Tableau 2. Principaux composés d'arôme retrouvés dans le vin (d'après Swiegers et al., 2005)

Famille	Composé	Concentration dans le vin (mg/L)	Seuil de perception (mg/L)	Descripteur
Esters d'acétate	Acétate d'éthyle	22.5 - 63.5	7.5*	Solvant, fruité
	Acétate d'isoamyle	0.1 - 3.4	0.03*	Banane, poire
	Acétate de phényléthyle	0 - 18.5	0.25*	Floral, rose, fruité
	Acétate d'isobutyle	0.01 - 1.6	1.6****	Banane, fruité
	Acétate d'hexyle	0 - 4.8	0.7**	Bonbon, parfum
Esters d'éthyle	Butanoate d'éthyle	0.01 - 1.8	0.02*	Floral, fruité
	Hexanoate d'éthyle	0.03 - 3.4	0.05*	Pomme verte
	Octanoate d'éthyle	0.05 - 3.8	0.02*	Savon doux
	Décanoate d'éthyle	0 - 2.1	0.2*****	Floral, savon
Alcools supérieurs	Propanol	9.0 - 68	500**	Piquant, âpre
	Butanol	0.5 - 8.5	150*	Spiritueux
	Isobutanol	9.0 - 174	40*	Spiritueux
	Alcool isoamylique	6.0 - 490	30*	Âpre, vernis à ongles
	Hexanol	0.3 - 12	4**	Vert, herbacé
	2-phényléthanol	4.0 - 197	10*	Floral, rose
Autres	Acide acétique	100 - 1150	280*	Vinaigre
	Acétaldéhyde	10 - 75	100**	Xérès, pomme abimée
	Diacétyl	<5	0.2** / 2.8****	Beurré
	Glycérol	5 - 14 g/L	5.2 g/L **	Sans odeur, goût doux

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

#### 4.1.3. Les arômes de vieillissement

Au cours de la maturation du vin, les arômes de vieillissement vont se développer. Les composés d'arômes fermentaires vont subir des réactions chimiques pour donner de nouvelles molécules volatiles. Les esters peuvent être hydrolysés et changer la composition aromatique du vin en modifiant les notes fruitées qu'apportent ces composés. L'élevage en fût de bois va également modifier le profil aromatique en diffusant ses arômes dans le vin. La composition finale en arômes tertiaires va dépendre de l'origine du bois et du temps passé en barrique.

#### 4.2. Voies de synthèse des arômes fermentaires

Les arômes fermentaires sont synthétisés par la levure suivant différentes voies métaboliques. Les alcools supérieurs et les esters d'acétate vont dépendre de la voie glycolytique, du cycle de Krebs et de la dégradation des acides aminés (voie d'Ehrlich) tandis que les acides gras et les esters d'éthyles vont dépendre de la voie de biosynthèse des lipides (**Figure 9**).

##### 4.2.1. Alcools supérieurs

Les alcools supérieurs peuvent être synthétisés *via* des  $\alpha$ -cétoacides issus soit de la dégradation des acides aminés (voie d'Ehrlich) soit du métabolisme carboné central (TCA)

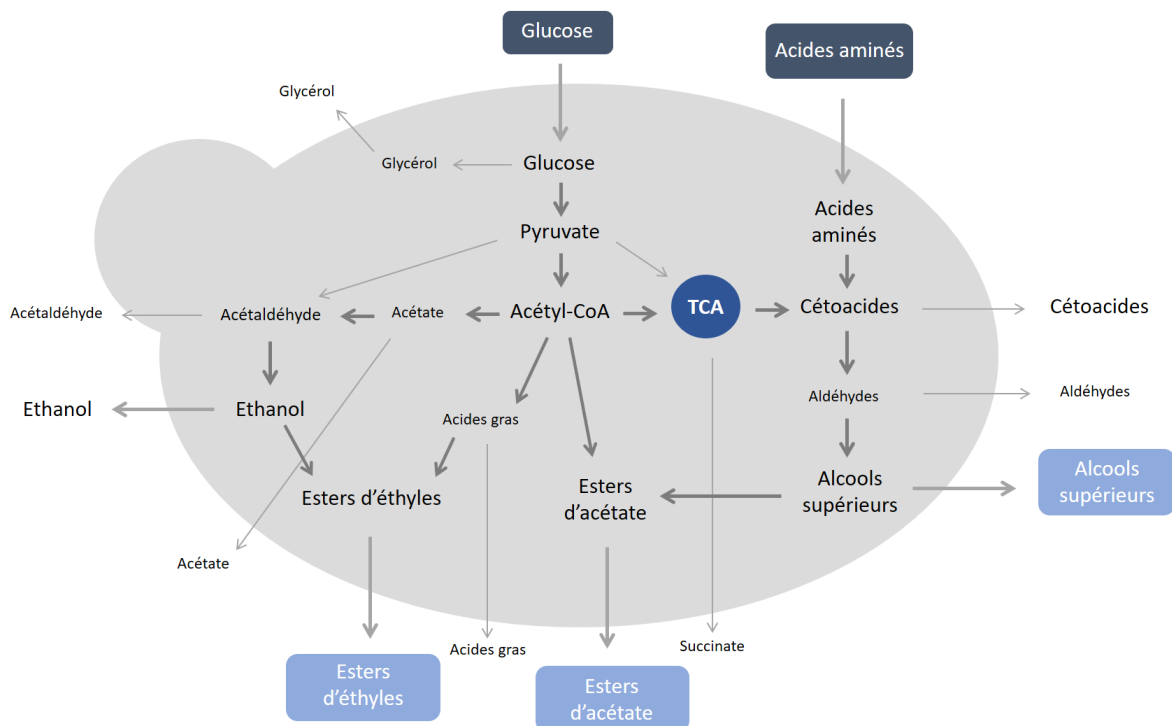


Figure 9. Rôle des métabolismes carboné et azoté dans la synthèse des arômes fermentaires (Swiegers et al., 2005)

(**Figure 9**). Les acides aminés concernés sont la leucine, l'isoleucine, la valine, la thréonine, la phénylalanine, le tryptophane, la méthionine et la tyrosine (Lambrechts & Pretorius, 2000).

Une fois dégradés en  $\alpha$ -cétoacides par transamination grâce aux enzymes Bat1p, Bat2p, Aro8p et Aro9p, ils sont transformés en aldéhydes (**Figure 10**).

Bat1p (Twt1p ou Eca39p) et Bat2p (Twt2p ou Eca40p) sont respectivement des aminotransférases mitochondriales et cytosoliques. L'expression du gène qui code pour Bat1p est plus importante au cours de la phase exponentielle de croissance que pendant la phase stationnaire. L'inverse est observé pour l'expression du gène codant pour Bat2p. De nombreuses études ont étudié plus en détails le rôle de ces deux enzymes et il a été montré qu'une mutation de Bat2p réduit considérablement la production d'isobutanol. Une diminution de la production des alcools amylique et isoamylique est également observée, même si leur synthèse ne serait pas uniquement dépendante de Bat2p mais surtout de Bat1p (Eden et al., 2001; Hazelwood et al., 2008; Lilly, Bauer, Styger, et al., 2006). Les enzymes Aro8p et Aro9p sont également des aminotransférases des acides aminés. Initialement considérées comme spécifiques des acides aminés aromatiques, Urrestarazu et al., 1998 ont montré qu'elles agissent sur un plus large spectre d'acides aminés. L'expression du gène *ARO9* serait dépendante du métabolisme des acides aminés aromatiques tandis que l'expression de *ARO8* serait dépendante du contrôle général de la biosynthèse des acides aminés (Hazelwood et al., 2008; Iraqui et al., 1998). Au cours de cette étape, un transfert du groupement amine de l'acide aminé vers l' $\alpha$ -cétoglutarate permet de former du glutamate, ce qui en fait un métabolite clé de la redistribution de la source azotée.

Les  $\alpha$ -cétoacides sont ensuite convertis en aldéhydes par décarboxylation (**Figure 10**). Cette étape est réalisée par des enzymes décarboxylases codées par cinq gènes. *PDC1*, *PDC5* et *PDC6* codent pour des pyruvates décarboxylases (Hohmann, 1991), *ARO10* code pour une phénylpyruvate décarboxylase (Dickinson et al., 2003) et enfin *THI3* code pour l' $\alpha$ -cétoisocaproate décarboxylase. L'expression de ces cinq gènes va dépendre de l'acide aminé dégradé. Ainsi, *THI3* est impliqué dans le catabolisme de la leucine mais ne joue aucun rôle dans le catabolisme des acides aminés aromatiques (Hazelwood et al., 2008). Dans le catabolisme de la valine, chacune des trois isoenzymes Pdc1p, Pdc5p et Pdc6p décarboxyle l' $\alpha$ -cétisovalérate. En ce qui concerne le catabolisme de l'isoleucine, n'importe quelle décarboxylase codée par *PDC1*, *PDC5*, *PDC6*, *ARO10* ou *THI3* est suffisante pour la conversion de cet acide aminé en alcool amylique. Les enzymes Pdc1p, Pdc5p, Pdc6p et Aro10p seraient localisées dans le cytoplasme tandis que l'enzyme Thi3p serait localisée dans le cytoplasme mais également dans le noyau, ce qui suggère un rôle de régulateur métabolique (Mojzita & Hohmann, 2006; Nosaka et al., 2005).

La dernière étape de la voie d'Ehrlich est soit une réduction de l'aldéhyde en acide soit une oxydation en alcool supérieur. Les gènes intervenant dans cette étape codent principalement pour des alcools déshydrogénases et des aldolases listées dans la **Figure 10**. En complément de leur synthèse par la voie d'Ehrlich, la plupart des alcools supérieurs peuvent être formés

directement via le métabolisme carboné central (Bell & Henschke, 2005; Hazelwood et al., 2008) (**Figure 10**). Ainsi la majorité des cétoacides impliqués dans la synthèse des alcools supérieurs sont des intermédiaires du TCA ou de la glycolyse. Par exemple, les précurseurs de l'isobutanol et de l'alcool isoamylique peuvent être formés à partir du métabolisme du pyruvate (**Figure 11**).

Différents travaux de recherche se sont intéressés à la contribution relative des métabolismes azoté et carboné à la synthèse des alcools supérieurs. Seulement une faible partie des alcools supérieurs est synthétisée à partir du squelette carboné des acides aminés correspondants (*via* la voie d'Ehrlich), la majorité provenant de composés produits par le MCC (Crépin et al., 2017; Rollero et al., 2017) (**Figure 12**). La synthèse des alcools supérieurs peut donc se faire tout au long de la fermentation bien que l'intégralité l'azote soit consommé au cours du premier tiers de la fermentation (Molina et al., 2007). Une hypothèse concernant le rôle de la synthèse des alcools supérieurs est qu'ils seraient un moyen de dégrader les aldéhydes et les cétoacides qui sont des composés toxiques pour la levure.

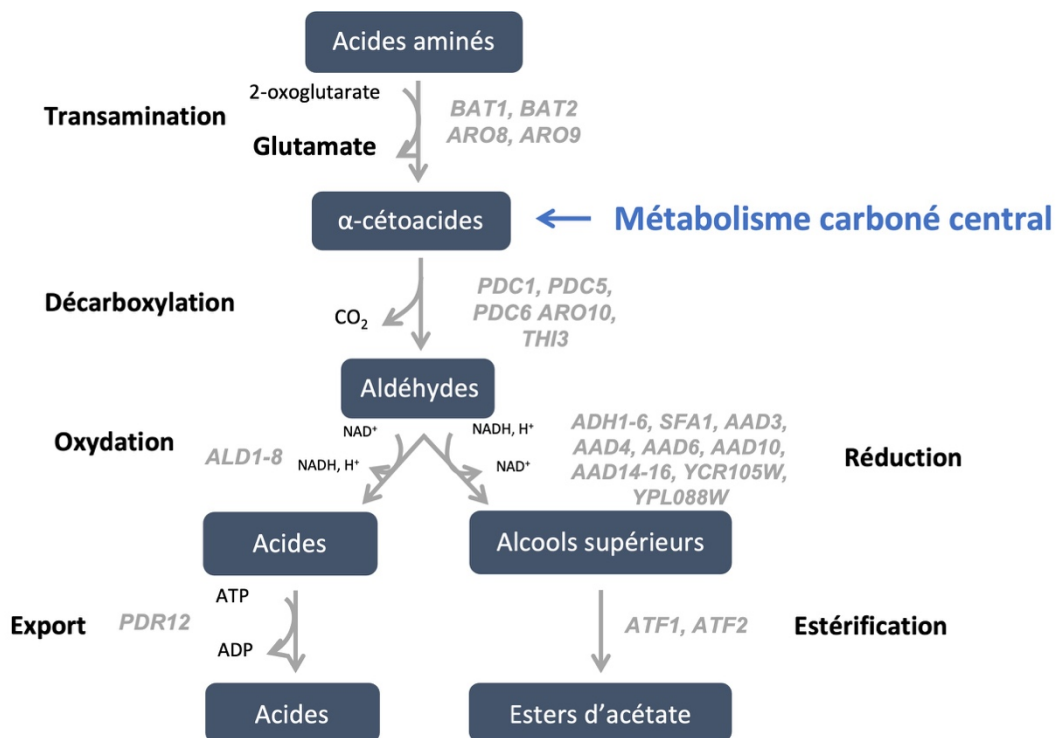


Figure 10. Voie d'Ehrlich (Hazelwood et al., 2008)

#### 4.2.2. Esters d'acétate

La synthèse des esters d'acétate est réalisée à partir d'un alcool et de l'acétyl-CoA grâce à deux acétyltransférases codées par les gènes *ATF1* et *ATF2* (Fujii et al., 1994; Nagasawa et al., 1998) (**Figure 11**). L'expression de ces gènes est corrélée avec la concentration finale en esters d'acétate (Saerens, Delvaux, et al., 2008).



Atf1p est l'enzyme majoritaire dans la formation des esters d'acétate. En effet, la délétion du gène *ATF1* implique une diminution de 80% de la concentration en acétate d'isoamyle, 75% de l'acétate de phényléthyle et environ 40% de l'acétate d'éthyle (Verstrepen, Van Laere, et al., 2003). De plus, lorsque le gène *ATF1* est surexprimé, la production d'acétate d'isoamyle est multipliée par plus de 100 ; les synthèses d'acétate d'éthyle et d'acétate de phényléthyle sont entre 10 et 200 fois supérieures (Lilly et al., 2000; Verstrepen, Van Laere, et al., 2003).

Le rôle de Atf2p n'est pas pour autant négligeable. Récemment, une étude a montré que l'expression de ce gène était plus importante que celle de *ATF1* suite à un ajout d'azote en cours de fermentation (Seguinot et al., 2018). Son action serait alors plus importante en phase stationnaire.

En revanche, la délétion des deux gènes *ATF1* et *ATF2* implique une diminution de seulement 50% de la concentration de l'acétate d'isobutyle et de l'acétate de propyle, suggérant l'existence d'une troisième enzyme (Lilly et al., 2000; Verstrepen, Van Laere, et al., 2003).

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

En conclusion, la production des esters d'acétate dépend à la fois de la disponibilité des deux co-substrats (acétyl-CoA et alcools supérieurs) et surtout des activités enzymatiques de synthèse (alcools acétyltransférases) (Seguinot et al., 2018; Verstrepen, Van Laere, et al., 2003; Yoshimoto et al., 2002) et d'hydrolyse (estérases) (Zhang et al., 2012).

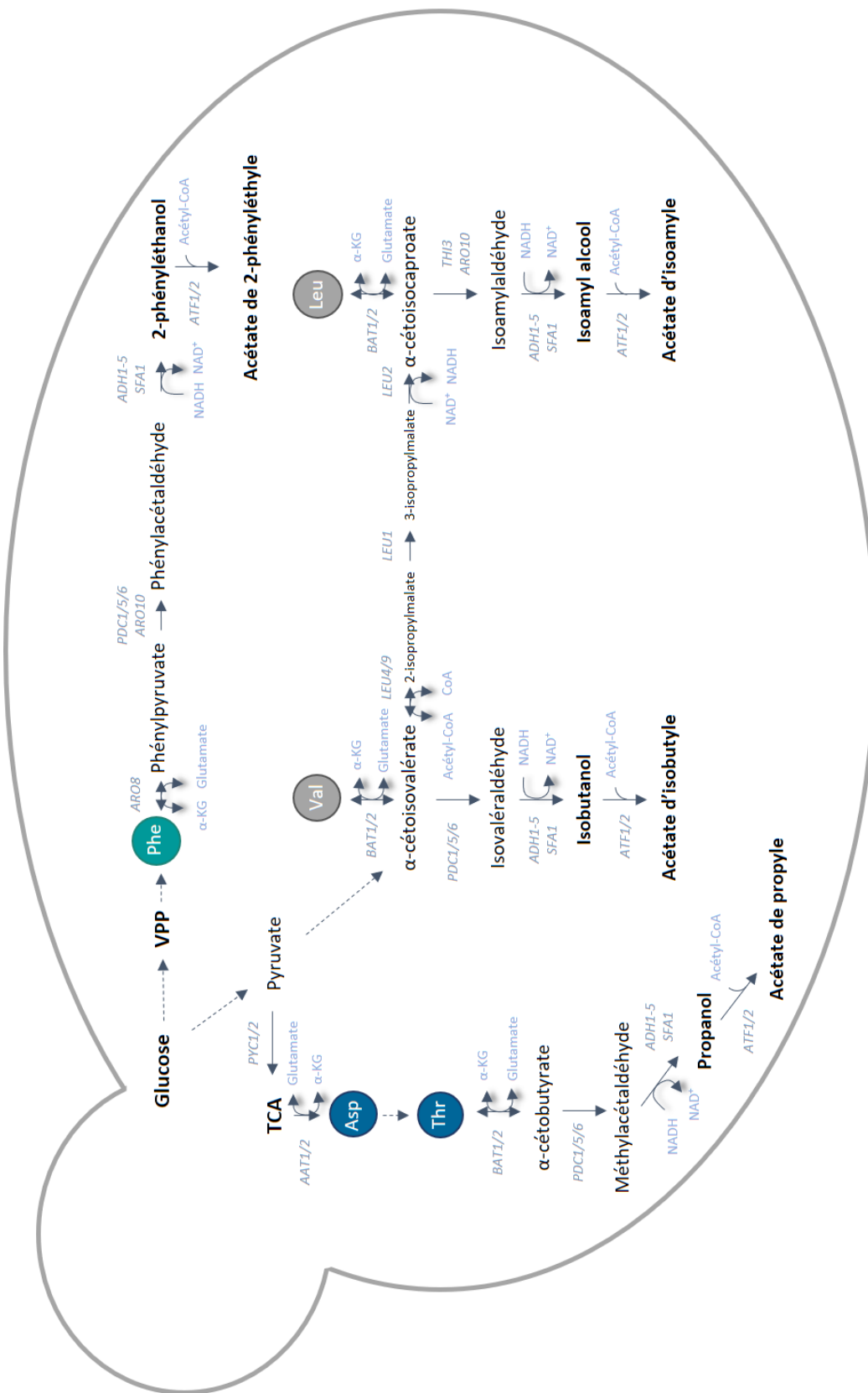


Figure 11. **Synthèse des esters d'acétate à partir du métabolisme carboné central.** L'acétate de phényléthyle, l'acétate d'isoamyle, l'acétate d'isobutyle et l'acétate de propyle sont synthétisés respectivement à partir de la phénylalanine, la leucine, la valine et la thréonine (d'après *Bell and Henschke, 2005*)

#### 4.2.3. Acides gras

Les acides gras sont des composés qui dérivent du métabolisme des lipides. Ils proviennent soit d'une synthèse *de novo* soit de l'hydrolyse des complexes lipidiques ( $\beta$ -oxydation) et du catabolisme protéique ou encore de sources externes par absorption dans le milieu extracellulaire (Klug & Daum, 2014) (**Figure 12**). La voie anabolique est la voie prépondérante alors que la  $\beta$ -oxydation qui nécessite la présence d'oxygène est active uniquement en début de fermentation (Schreier & Walter, 2009).

La levure utilise ensuite les acides gras dans les complexes lipidiques membranaires afin de garantir une bonne fluidité (Jacquier & Schneider, 2010). Les acides gras sont toxiques pour la levure lorsqu'ils sont sous forme libre (Klug & Daum, 2014). Ces derniers sont alors stockés dans des gouttelettes lipidiques sous forme neutre pour ensuite être utilisés en fonction des besoins de la levure. Ils peuvent également être transformés en esters comme moyen de détoxification (**Figure 12**).

La composition en acides gras de *S. cerevisiae* est plutôt simple. Les principaux acides gras insaturés sont le C16 : 1 (acide palmitoléique) et le C18 : 1 (acide oléique). Pour les acides gras saturés, le C16 : 0 (acide palmitique) et le C18 : 0 (acide stéarique) sont les plus représentés. Les acides gras mineurs sont le C14 : 0 (acide myristique) et le C26 : 0 (acide cérotique) (Tuller et al., 1999; Viljoen et al., 1986).

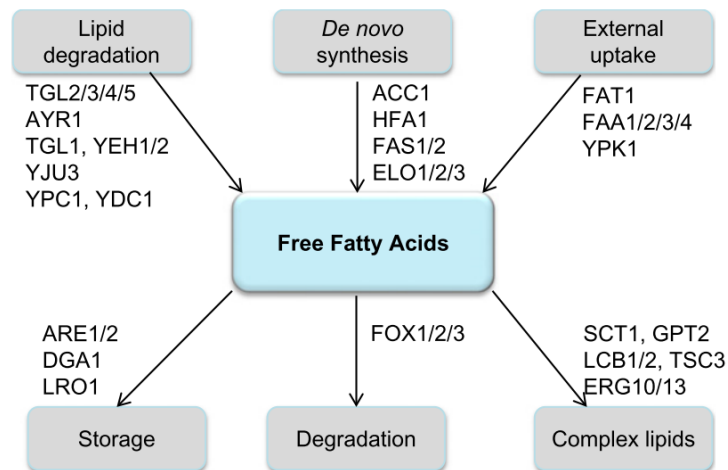


Figure 12. **Métabolisme des acides gras chez *S. cerevisiae*** (Klug & Daum, 2014). Les acides gras viennent du milieu extracellulaire, de la dégradation de complexes lipidiques, de la synthèse *de novo*. Ils sont ensuite stockés, dégradés ou intégrés à des complexes lipidiques membranaires.

La synthèse *de novo* des acides gras a lieu dans le cytosol et dans les mitochondries. Elle est suivie d'une élongation et d'une désaturation dans le réticulum endoplasmique. L'étape initiale de la synthèse des acides gras est catalysée par l'acétyl-CoA-carboxylase et permet l'ajout de deux atomes de carbone (qui proviennent du malonyl-CoA) sur un acyl-CoA, l'acétyl-CoA étant le premier des acyl-CoA de cette chaîne d'élongation des acides gras.

L'acétyl-CoA est principalement formé par décarboxylation oxydative du pyruvate mais peut également venir de la  $\beta$ -oxydation (libération d'un acétyl-CoA et d'un acide gras à chaîne plus courte de deux carbones).

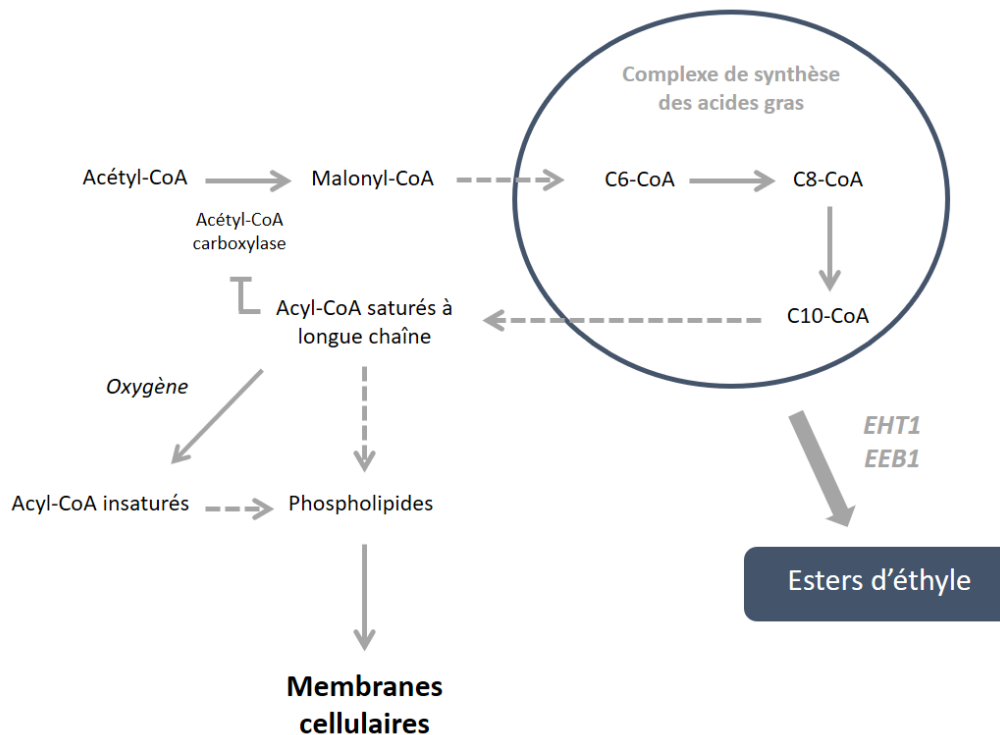


Figure 13. **Biosynthèse des acides gras à chaîne moyenne et longue et synthèse des esters d'éthyles** (D'après Saerens et al., 2010)

#### 4.2.4. Esters d'éthyle

Les esters d'éthyles sont synthétisés à partir des acides gras transformés en acyl-CoA *via* le complexe d'élongation des acides gras (**Figure 13**). A la différence des esters d'acétate, les esters d'éthyle ne sont pas synthétisés par Atf1p et Atf2p mais par deux autres enzymes Eht1p et Eeb1p. Ces enzymes sont des acyl-CoA:éthanol-O-acyltransférases et permettent de condenser l'acyl-CoA et l'éthanol en ester d'éthyle (Mason & Dufour, 2000; Saerens et al., 2006).

Saerens et al., 2006 ont montré que les concentrations finales de butanoate d'éthyle, d'hexanoate d'éthyle, d'octanoate d'éthyle et de décanoate d'éthyle produits pendant la fermentation avec une souche délétée pour le gène *EEB1* ( $\Delta eeb1$ ) sont réduites de respectivement 36%, 88%, 45% et 40% par rapport à la souche témoin. En revanche, la souche délétée pour *EHT1* ( $\Delta eht1$ ) n'affecte pas la production du butanoate d'éthyle et du décanoate d'éthyle, et n'entraîne que des diminutions mineures de la formation de l'hexanoate d'éthyle (36 %) et de l'octanoate d'éthyle (20 %). La double délétion des gènes *EHT1* et *EEB1* produit

des niveaux de butanoate d'éthyle, d'hexanoate d'éthyle et de décanoate d'éthyle similaires à ceux de la souche  $\Delta eeb1$ , et un niveau plus faible d'octanoate d'éthyle.

Ces résultats indiquent que Eht1p ne joue qu'un rôle mineur dans la synthèse des esters d'éthyle à la différence de Eeb1p qui semble tenir un rôle majeur. D'autre part, seule la production d'hexanoate d'éthyle est fortement altérée avec la souche doublement délétée ce qui montre que la levure doit disposer d'une ou plusieurs enzymes supplémentaires responsables de la synthèse de ces esters.

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

De plus, les esters d'éthyle en C8 ainsi que leurs acides gras précurseurs ne sont pas entièrement excrétés dans le milieu ; un certain pourcentage produit est retenu à l'intérieur de la cellule : environ 60% pour les C8, 20% pour les C10 et presque 100% pour les C12 (Verstrepen, Derdelinckx, Dufour, Winderickx, Thevelein, et al., 2003).

#### 4.3. Chronologie de production des arômes fermentaires

Pour étudier la chronologie de production des arômes au cours de la fermentation, une technologie de suivi en ligne en GC-MS a été mise au point (Morakul et al., 2011; Mouret et al., 2012). La précision et la fréquence élevée d'acquisition des mesures ont permis de calculer les paramètres cinétiques, en particulier les vitesses de production et les vitesses spécifiques à savoir, les vitesses de production ramenées à la biomasse.

Mouret et al., 2013 ont montré que la vitesse spécifique de production des alcools supérieurs atteint sa valeur maximale avant l'épuisement des acides aminés précurseurs correspondants. En fonction de l'alcool supérieur considéré, les cinétiques de synthèse sont très différentes. L'isobutanol et l'alcool isoamylique sont formés à partir de métabolites carbonés et de métabolites azotés ; ils sont donc produits en continu tout au long de la fermentation (**Figure 14A**). En revanche, la synthèse du propanol est fortement corrélée à la présence en azote assimilable, tant pendant la phase de croissance que pendant la phase stationnaire. Ainsi, cet alcool est produit exclusivement lors de la phase de croissance, tant que la concentration résiduelle en azote assimilable n'est pas nulle. A l'inverse, en phase stationnaire, la production de propanol s'arrête car il n'y a plus d'azote dans le milieu extracellulaire. Par conséquent, le propanol peut être considéré comme un marqueur très pertinent du métabolisme de l'azote (Mouret, Perez, et al., 2014a). Ce résultat a été confirmé par les travaux de Seguinot et al., 2018 qui montre qu'un ajout d'azote en cours de fermentation permet notamment une reprise de la production du propanol (**Figure 14B**).

Les concentrations en esters d'acétate sont corrélées linéairement avec les concentrations en alcools supérieurs correspondants, indiquant que la disponibilité des précurseurs est un élément fondamental pour la production de ces esters (Mouret, Perez, et al., 2014a) (**Figure**

**14C).** Enfin, les cinétiques de production d'esters d'éthyles sont similaires à celles des alcools supérieurs : ceci montre que leur production est fonctionnelle tout au long de la fermentation (Seguinot et al., 2018).

La majorité des molécules volatiles étant produite au cours de la phase stationnaire, un lien évident s'impose avec le métabolisme carboné central en plus du métabolisme azoté (Mouret, Camarasa, et al., 2014). Une relation a été mise en évidence entre la production d'arômes fermentaires et la consommation de sucre, pour tous les composés étudiés sauf le propanol (Mouret, Camarasa, et al., 2014).

Pour ces composés volatils, deux phases de production linéaires consécutives sont généralement identifiées. Les durées de ces deux phases sont différentes suivant les molécules et les rendements varient en fonction de la teneur en azote initial et de la température (Mouret, Camarasa, et al., 2014). En revanche, le rendement de la seconde phase de production est systématiquement supérieur à celui de la première indiquant que la synthèse des arômes fermentaires a principalement lieu au cours de la phase stationnaire.

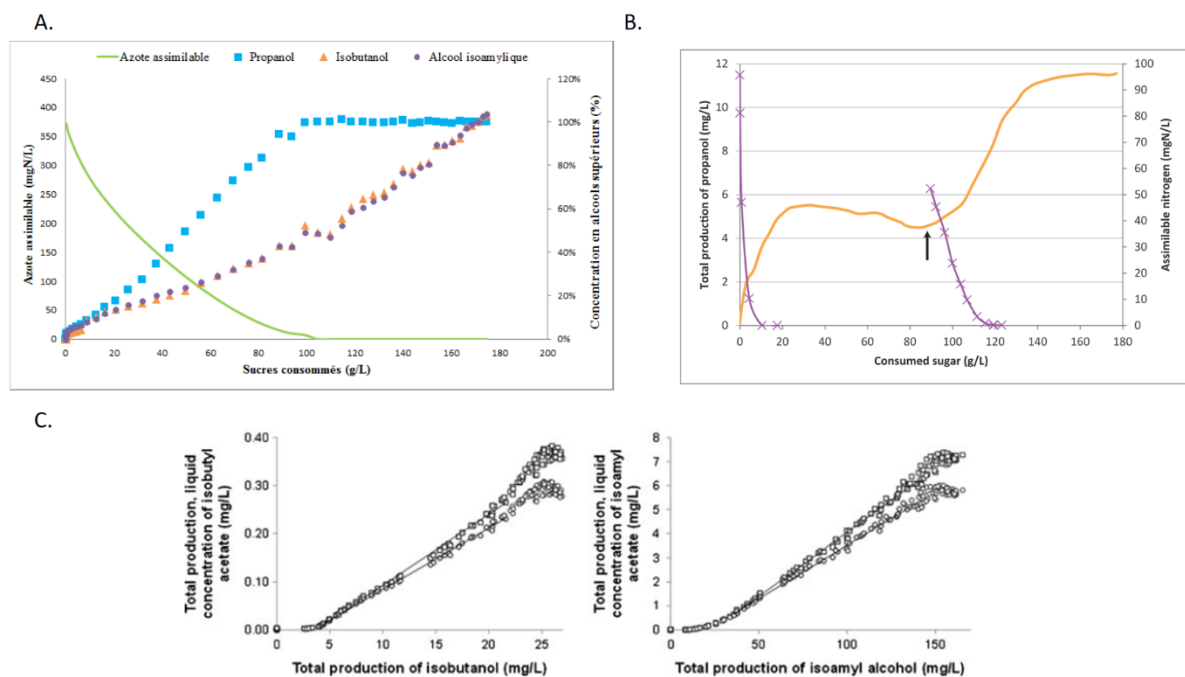


Figure 14. **Chronologie de production des arômes fermentaires.** (A) Consommation d'azote et production des alcools supérieurs. (B) Consommation d'azote initial et ajouté et cinétique de production du propanol. (C) Ratio de production entre l'isobutyl acétate et l'isobutanol (gauche) ; entre l'isoamyl acétate et l'isoamyle alcool (droite).

## 5. Effets de l'azote assimilable et de la température sur la production des arômes

### 5.1. Effet de l'azote initial

L'ajout d'azote initial à un moût carencé en azote entraîne une augmentation de la production des alcools supérieurs notamment de l'alcool isoamylique, de l'isobutanol et du phénylethanol (Mouret, Camarasa, et al., 2014). Néanmoins, lorsque la quantité en azote assimilable dans le moût dépasse une valeur située entre 200 et 300 mg/L, l'ajout d'azote entraîne une diminution de la production d'alcools supérieurs : ces derniers ne sont ainsi pas directement liés à la quantité d'azote présent dans le moût (Mouret, Camarasa, et al., 2014; Swiegers et al., 2005; Vilanova et al., 2007). Cette diminution pourrait s'expliquer par le fait que la gestion du pool de cétoacides, qui sont les précurseurs des alcools supérieurs, ne dépend pas uniquement de l'assimilation des acides aminés mais également du MCC (Mouret, Camarasa, et al., 2014).

De plus, l'expression des gènes *LEU1*, *LEU2*, *BAT1* et *BAT2* intervenant dans les voies de synthèse des alcools supérieurs serait induite lors d'une faible augmentation de la concentration en azote, mais réprimée pour des ajouts plus importants (Torrea et al., 2011; Yoshimoto et al., 2002). Rollero et al., 2017 ont également montré que le flux métabolique partagé entre la synthèse des acides aminés et des alcools supérieurs *via* les cétoacides dépend de la concentration en azote initial. Lorsque la ressource en azote est limitée (**Figure 15A**), une partie importante des acides aminés consommés est catabolisée pour fournir de l'azote intracellulaire ; la libération ultérieure d' $\alpha$ -cétoacides, combinée aux faibles besoins anaboliques en leucine et en valine, entraîne une formation limitée des intermédiaires  $\alpha$ -cétoisovalérate et  $\alpha$ -cétoisocaproate et une production modérée d'alcools supérieurs, ce qui élimine l'excédent de précurseurs d' $\alpha$ -cétoacides. Lorsque la teneur en azote est intermédiaire (250 mg/L) (**Figure 15B**), la synthèse des  $\alpha$ -cétoacides par le MCC augmente pour répondre aux besoins plus importants de ces précurseurs pour l'anabolisme (trois fois plus). Cette réponse entraîne un excès d' $\alpha$ -cétoacides et permet une augmentation marquée du flux vers la formation d'alcools supérieurs. Enfin, lorsque la disponibilité en azote augmente au-delà de 250 mg/L (**Figure 15C**), une augmentation importante de la demande anabolique est observée. Les  $\alpha$ -cétoacides intracellulaires sont dans une large mesure dirigés vers la synthèse d'acides aminés au détriment de la formation d'alcools supérieurs, ce qui entraîne une diminution du flux de production de ces derniers.

L'effet de l'azote sur la production de propanol est complètement différent de celui observé pour les alcools supérieurs. En effet, la production de propanol est directement proportionnelle à la quantité initiale d'azote assimilable dans le moût (Mouret, Camarasa, et al., 2014; Seguinot et al., 2018). Cette observation indique que le propanol est un marqueur métabolique de la teneur en azote assimilable dans les moûts (Mouret, Camarasa, et al., 2014).

La production des esters d'acétate augmente avec la quantité d'azote assimilable initialement disponible (Rollero et al., 2015; Torrea et al., 2011) en lien avec une plus forte expression des gènes codant pour les alcools acyltransférases (Atf1p et Atf2p) en présence d'azote (Verstrepen, Van Laere, et al., 2003). Ainsi, même si la quantité d'alcools supérieurs disponibles diminue pour des teneurs élevées en azote, l'activation de ces gènes entraîne une hausse de la production des esters d'acétate (Torrea et al., 2011). Ce dernier résultat semble indiquer que le facteur limitant dans la synthèse des esters d'acétate est l'activité des alcools acyltransférases et non la disponibilité en précurseurs alcools.

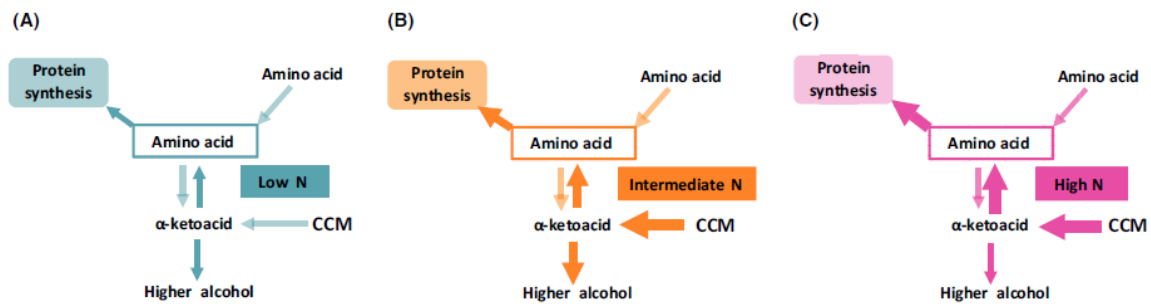


Figure 15. **Redistributión du flux métabolique entre la synthèse des acides aminés et celle des alcools supérieurs en fonction de la concentration en azote initial.** (A) NO = 70 mg/L ; (B) NO = 250 mg/L ; (C) NO = 425 mg/L. (Rollero et al., 2018)

Enfin, plusieurs auteurs observent une hausse de la production des esters d'éthyle suite à un ajout initial d'azote (Hernandez-Orte et al., 2006; Mouret, Camarasa, et al., 2014). Ce résultat est surprenant car ces composés volatils ne sont pas directement liés au métabolisme azoté. Cette observation peut s'expliquer par l'augmentation du pool d'acyl-CoA, synthétisé à partir d' $\alpha$ -cétoacides, et transformé en esters d'éthyles (Rollero et al., 2015).

## 5.2. Effet de l'azote ajouté en cours de fermentation

Les ajouts d'azote en cours de fermentation sont devenus une pratique intéressante pour non seulement sécuriser le cycle fermentaire et/ou réduire la durée de la fermentation mais aussi pour améliorer le bouquet aromatique du vin. Les ajouts d'azote peuvent être de nature différentes et effectués à différents moments au cours de la fermentation.

### 5.2.1. Nature de l'azote ajouté

L'azote peut être ajouté sous forme minérale (di-ammonium phosphate, chlorure d'ammonium ou sulfate d'ammonium) ou sous forme organique (ajouts d'acides aminés). A l'échelle laboratoire ou pour la recherche, l'ajout d'acides aminés seuls est possible pour la compréhension du métabolisme alors qu'il est interdit à l'échelle industrielle ; seul l'ajout d'un pool d'acides aminés est autorisé dans la filière œnologique.



Les différents effets de la nature de la source azotée ajoutée sont résumés dans le **tableau 3**.

De manière générale, l'effet de l'ammonium est proche de celui des acides aminés. En effet, une étude récente a montré qu'un ajout d'acides aminés était légèrement plus efficace pour augmenter la concentration d'esters d'acétate mais apparaît moins efficace pour la production de propanol (Seguinot et al., 2018). Une fois les acides aminés assimilés, le flux catabolique va plus facilement vers la formation des intermédiaires  $\alpha$ -cétoisovalérate et  $\alpha$ -cétoisocaproate puis des alcools supérieurs correspondants. De plus, du fait de la plus grande disponibilité en alcools supérieurs et de l'activation des enzymes Atf1p et Atf2p, la synthèse des esters d'acétate est plus importante.

A l'inverse, la production de propanol est plus importante pour un ajout d'azote minéral. L'ammonium va agir directement dans le nœud glutamate pour la synthèse d'acides aminés. De plus, suite à un ajout initial d'ammonium, l'acide aminé le plus synthétisés après le glutamate est l'aspartate, précurseur de la thréonine. La propanol étant synthétisé à partir de la thréonine, sa relation directe avec la consommation de l'ammonium semble cohérente (Crépin et al., 2017).

Si les sources azotées minérales et organiques ont des effets similaires sur la production des alcools supérieurs et des esters d'éthyles, il semblerait que seul le timing d'ajout ait un impact positif sur leur production (Su et al., 2021).

### *5.2.2. Timing de l'ajout d'azote*

Le timing d'ajout d'azote est un levier important pour la production des arômes et impacte différemment les familles de composés observées. Peu de travaux ont été effectués sur ce sujet et les résultats obtenus sont très divergents.

L'ajout d'azote, qu'il soit minéral ou organique, impacte la production des alcools supérieurs mais il est difficile de trouver un consensus clair sur les effets de ces ajouts. Si l'azote est ajouté à partir de la mi-fermentation, certains travaux montrent une augmentation de la production des alcools supérieurs (Barbosa et al., 2009a; Beltran et al., 2005). De récents travaux contradictoires montrent en revanche que cette augmentation de production après un ajout à mi-fermentation n'est pas systématique (Pérez et al., 2018; Seguinot et al., 2018). L'utilisation de matrices différentes (moût naturel ou milieu synthétique) et des différences dans les timings d'ajouts peuvent expliquer cette divergence de résultats. Dans les travaux de Seguinot et al., 2018, la source utilisée est du DAP et un mélange d'AA et de DAP tandis que Su et al., 2021 utilisent du chlorure d'ammonium : on peut donc penser que l'utilisation de ces divers nutriments azotés par la levure est différente. De la même façon d'autres études réalisées avec soit du chlorure d'ammonium soit du sulfate d'ammonium confirment l'absence d'effet d'un ajout d'azote sur la production des alcools supérieurs (Hernandez-Orte et al., 2006; Jiménez-Martí et al., 2007; Martínez-Moreno et al., 2014). En ce qui concerne le timing d'ajout, Su et al., 2021 montrent qu'un ajout réalisé au premier tiers de la fermentation

diminue fortement la production des alcools supérieurs par rapport à un ajout réalisé au 2/3 de la fermentation (**Tableau 3**). Il est ainsi difficile de croiser les données bibliographiques existantes pour distinguer les effets de la nature et du timing sur la production des alcools supérieurs.

L'effet d'un ajout d'azote sur la production des esters d'acétate est plus consensuel : de manière générale, il augmente fortement la production de ces composés (**Tableau 3**). Seules deux études montrent des résultats contradictoires (Jiménez-Martí et al., 2007; Martínez-Moreno et al., 2014). De plus, les différents travaux semblent s'accorder sur le fait qu'un ajout en phase stationnaire est plus efficace qu'un ajout initial (Barbosa et al., 2009a; Beltran et al., 2005; Hernandez-Orte et al., 2006; Pérez et al., 2018; Seguinot et al., 2018; Su et al., 2021). En effet, l'ajout d'azote va permettre l'activation des enzymes Atf1p et Atf2p et donc la conversion des alcools supérieurs en esters d'acétate (Seguinot et al., 2018). Cependant, peu de données sont disponibles concernant la production d'esters d'acétate à la suite d'ajout d'azote réalisés à différents moments, au cours de la phase stationnaire. Seuls Beltran et al., 2005 montrent que la production est plus importante pour un ajout à mi-fermentation plutôt qu'en fin de phase stationnaire.

Les données disponibles concernant l'effet d'un ajout d'azote sur la production des acides gras sont peu nombreuses. Les rares études montrent cependant que l'ajout d'azote tend à diminuer leur production (Barbosa et al., 2009a; Beltran et al., 2005; Pérez et al., 2018).

Enfin, pour les esters d'éthyle, les données disponibles dans la littérature sont contradictoires (**Tableau 3**). Alors que les travaux de Beltran et al., 2005 montrent que l'ajout d'azote augmente leur production quel que soit le timing de l'apport, d'autres études trouvent l'inverse (Barbosa et al., 2009a; Martínez-Moreno et al., 2014). L'impact du timing de la nutrition azotée dans la synthèse des esters d'éthyle a notamment été étudiée par Seguinot et al., 2018 : la production de ces composés volatils est plus importante quand l'ajout est réalisé initialement plutôt qu'à la moitié de la fermentation.

De façon plus détaillée, une seconde étude récente montre un changement dans le comportement de ces composés en fonction du timing d'ajout. Alors que leur production est réduite pour un ajout effectué au 1/3 de la fermentation, elle est augmentée quand l'ajout est réalisé au 2/3 du processus (Su et al., 2021). Les voies métaboliques de synthèse des esters d'éthyle et le métabolisme de l'azote sont indépendants ; observer un impact de l'ajout d'azote sur ces esters particuliers est donc surprenant. La « connexion » entre ces 2 voies métaboliques pourrait être liée à la gestion du potentiel redox et à la disponibilité du précurseur acétyl-coA. En effet, il est probable que l'assimilation de l'azote ajouté induise des changements dans l'équilibre redox de la cellule et entraîne des modifications de concentration intracellulaire des précurseurs, notamment l'acétyl-coA (Bloem et al., 2016). Lorsque l'ajout d'azote est effectué tôt pendant la fermentation, l'acétyl-CoA est principalement dirigé vers la synthèse de la biomasse. A l'inverse, lorsque les sources d'azote

sont ajoutées plus tard, l'augmentation de la biomasse est limitée et, par conséquent, une plus grande quantité d'acétyl-CoA est alors disponible pour la synthèse des composés volatils.

Les résultats de ces différents travaux de recherche montrent qu'il est primordial de prendre en compte le timing d'ajout d'azote et donc l'état physiologique de la levure pour favoriser la production des esters d'éthyle. Les régulations concernant leur production sont encore mal connues et méritent d'être approfondies.

Il reste tout de même difficile de comparer les résultats de ces nombreux travaux. Chaque étude utilise des milieux de culture et de maîtrise du suivi fermentaire différents. Ainsi, le timing d'ajout n'est pas exactement similaire et peut donc ne pas engendrer les mêmes changements physiologiques chez la levure.

Tableau 3. **Impact du timing d'ajout de différentes sources azotées sur la production des arômes au cours de la fermentation.** AA : acides aminés ; AC : ammonium chlorure ; DAP : di-ammonium phosphate ; AS : sulfate d'ammonium

Nature de l'azote ajouté	Timing d'ajout	Alcools supérieurs	Propanol	Esters d'acétate	Acides gras	Esters d'éthyles	Références
AA+DAP	Fin de phase de croissance	↘=	=	↗	↘	=	
	Début de phase stationnaire	=	↘	↗	↘	↗	Beltran et al., 2005
	Mi-phase stationnaire	↗	↘	↗	↘	↗	
	Fin de phase stationnaire	↗	↘	↗=	=	↗	
AS	Initial	↘=		↗	↗	=	Hernandez-Orte et al., 2006
	Mi-fermentation	↘	nd	↗	↗	=	
AC+AA	Fin de phase de croissance	↘		↘	nd	nd	Jimenez-Marti et al., 2007
		↘	nd	↘			
DAP	Mi-fermentation	↗	nd	↗	↘	↘	Barbosa et al., 2009
AC	Fin de phase de croissance	↘	↗	↘	nd	↘	Martinez-Moreno et al., 2014
AA	Initial	↘=	↗	↗		↗	
DAP		=	↗↗	↗		↗	Seguinot et al., 2018
AA	Mi-phase stationnaire	=	↗	↗	nd	=	
DAP		=	↗↗	↗		=	
DAP	Mi-fermentation	↘	nd	↗	↘	↘=	Perez et al., 2018
AC	1/3 sucre consommé	↘↘				↘	
	2/3 sucre consommé	↘				↗	
	1/3 sucre consommé	↘↘				↘	Su et al., 2021
AC+AA	2/3 sucre consommé	↘				↗	

### 5.2.3. Effet des différentes sources azotées sur l'activité transcriptionnelle de *S. cerevisiae*

L'impact des apports d'azote sur l'expression génique de la levure a été étudié mais seulement pour deux timings d'ajout (initial et à la fin de la phase de croissance). L'un des points importants de ces études concerne l'ajout d'ammonium qui non seulement active l'expression des gènes qui codent pour la biosynthèse des acides aminés mais également celles de la glycolyse et des voies énergétiques (Jiménez-Martí & Olmo, 2008; Mendes-Ferreira et al., 2007). Il apparaît également qu'un ajout d'acides aminés réalisé initialement sur un milieu riche en azote va directement activer les gènes responsables de la synthèse des protéines tandis que l'ajout réalisé sur un milieu pauvre et après la phase de croissance va activer le transport des acides aminés mais aussi réactiver la croissance et la prolifération cellulaire (Jiménez-Martí & Olmo, 2008; Liu et al., 2017) (**Tableau 4**).

Tableau 4. **Impact de l'ajout de sources azotées sur l'expression des gènes de *S.cerevisiae***. AA : acides aminés ; AC : ammonium chlorure ; DAP : di-ammonium phosphate.

Conditions	Souche	Timing d'ajout	Famille de gènes induite	Références
AA (240 mg/L) MS60 – 200g/L G/F	EC1118	Fin de phase de croissance	Synthèse protéique	Jimenez-Marti et al., 2008
AC (240 mg/L) MS60 – 200g/L G/F			Biosynthèse des acides aminés	
			Croissance	
AA (Val, Ile, Leu) MS300-200g/L G/F	EC1118	Initial	Prolifération	Liu et al., 2017
			Transport d'acides aminés	
DAP (200 mg/L) MS66-200 g/L G	PYCC4072	Fin de phase de croissance	Glycolyse	Mendes-Ferreira et al., 2007
			Voies énergétiques	

### 5.3. Effet de la température

La gamme des températures utilisées pour les fermentations vinicoles est assez large, de 15 °C pour les vins blancs à plus de 30 °C pour les vins rouges. De plus, une grande majorité des fermentations n'est pas conduite en mode isotherme. La température est un paramètre important à prendre en compte pour le bon déroulement de la fermentation au sens cinétique mais aussi plus globalement pour la qualité aromatique finale du vin. L'effet de ce paramètre

sur la production des arômes est double puisqu'il va avoir un impact biologique (expression des gènes codant pour la synthèse des arômes) mais aussi physique (évaporation des arômes).

Pour différencier ces deux effets, la mise au point d'un modèle mathématique a permis de réaliser des bilans de production gaz/liquide et de différencier (pour chaque arôme modélisé) : 1/ les pertes par évaporation, 2/ l'accumulation dans la phase liquide et 3/ la production totale d'arôme synthétisée par la levure (somme des pertes et de la concentration dans le liquide) (Morakul et al., 2011, 2013; Mouret et al., 2012). Le **tableau 5** récapitule le pourcentage de pertes des arômes modélisés en fonction des températures de fermentation appliquées.

Tableau 5. **Pourcentages de pertes par évaporation** de différents arômes en fonction des températures de fermentation appliquées (d'après *Mouret et al., 2014*)

Température	Propanol	Isobutanol	Isoamyl alcool	Isoamyl acétate	Ethyl hexanoate	Ethyl octanoate
18°C	0.4%	0.4%	0.5%	14%	29%	26%
24°C	0.6%	0.6%	0.7%	21%	42%	37%
28°C	0.9%	1,0%	1.4%	33%	50%	49%

Tableau 6. Tableau regroupant l'effet de la température isotherme sur la production d'arômes.

Températures	Conditions	Alcools supérieurs	Propanol	Esters d'acétate	Acides gras	Esters d'éthyles	Références
13°C	Modt naturel QA23	↘	nd	↗	↗	↗	Beltran et al., 2006
	MS300 EC1118	↗	nd	→	↗	↗	Molina et al., 2007
15°C	Levures de bières	↘	↘	↘	nd	↘	Saerens et al., 2008
	MS70 à MS410 EC1118	→	→	→	nd	↗	Mouret et al., 2014
18°C	Modt naturel 170 à 270 mg/L Nass + Bourbes FC9	→	→	→	nd	→	Guittin et al., 2021
	MS70 à MS330 + Phytostérols EC1118	→	→	→	nd	↗	Rollero et al., 2014
20°C	Levures de bières	↗	↗	↗	nd	↘	Saerens et al., 2008
	MS70 à MS410 EC1118	↗	→	↗	nd	↘	Mouret et al., 2014
24°C	MS70 à MS330 + Phytostérols EC1118	↗	→	↗	nd	↘	Rollero et al., 2014
	Modt naturel 170 à 270 mg/L Nass + Bourbes FC9	↗	↗	↗	nd	↗	Guittin et al., 2021
25°C	Modt naturel QA23	↗	nd	↘	↘	↘	Beltran et al., 2006
	MS300 EC1118	↘	nd	→	↘	↘	Molina et al., 2007
28°C	MS70 à MS330 + Phytostérols EC1118	↗	→	→	nd	↘	Rollero et al., 2014
	Modt naturel 170 à 270 mg/L Nass + Bourbes FC9	↗	↗	↗	nd	→	Guittin et al., 2021
30°C	MS70 à MS410 EC1118	↗	→	→	nd	↘	Mouret et al., 2014

### 5.3.1. Température isotherme

La plupart des études portant sur la production des arômes en lien avec l'effet de la température sont réalisées avec une régulation isotherme. De manière générale, la production des alcools supérieurs est favorisée par des températures supérieures à 20°C et ce quel que soit le milieu de culture et la souche de levure utilisée (Beltran et al., 2006; Guittin et al., 2021; Mouret, Camarasa, et al., 2014; Rollero et al., 2015; Saerens, Verbelen, et al., 2008). Seule une étude montre une diminution de la somme des alcools supérieurs à 28°C. On note cependant que, dans ce travail, la concentration de 2-phényl éthanol est, elle, augmentée à 28°C (Molina et al., 2007). Ces résultats coïncident avec ceux obtenus pour l'expression des gènes codant pour la synthèse des alcools supérieurs (**Tableau 6**). En effet, les gènes *BAT1*, *PDC1/5*, *ARO10*, *THI3*, *ADH2/3/5* intervenant dans la voie d'Ehrlich et donc dans la synthèse des alcools supérieurs sont induits à 25°C par rapport à 13°C (Beltran et al., 2006) (**Tableau 7**). En dessous de 20°C, la production d'alcools supérieurs est inchangée voir diminuée. Le propanol a un comportement différents des autres alcools supérieurs et ne semble pas sensible à l'augmentation des températures (Mouret, Camarasa, et al., 2014; Rollero et al., 2015).

Concernant les esters d'acétate, en dessous de 20°C et en moût synthétique, leur production n'est pas affectée par le facteur température (Molina et al., 2007; Mouret, Camarasa, et al., 2014; Rollero et al., 2015) (**Tableau 6**). Il semblerait qu'entre 20 et 25°C leur synthèse soit optimale. En revanche, on observe une diminution de leur production pour des températures supérieures à 25°C. Les esters d'acétate étant des molécules volatiles, les pertes par évaporation dans le gaz fermentaire sont plus importantes au-dessus de 24°C puisqu'elles atteignent 40% à 30°C (Mouret, Camarasa, et al., 2014).

L'effet de la température sur les acides gras est peu référencé ; cependant il semblerait que les faibles températures soient plus favorables à leur synthèse (Beltran et al., 2004; Molina et al., 2007) (**Tableau 6**).

Enfin, le comportement des esters d'éthyle est encore différent de celui des esters d'acétate et des alcools supérieurs mais semblable à celui des acides gras (**Tableau 6**). Entre 13°C et 20°C, la production des esters d'éthyle semble favorisée ; cependant au-dessus de 20°C on remarque une forte diminution. Les esters d'éthyle sont des composés encore plus volatiles que les esters d'acétate. En effet, Mouret et al., 2014 montrent un pourcentage d'évaporation allant jusqu'à 60% pour des fermentations réalisées à 30°C. De plus, il a été montré que l'expression des gènes *EEB1* et *EHT1* reste élevée pour des fermentations réalisées à faibles températures (13°C-15°C) probablement en réponse aux niveaux élevés de précurseurs d'acides gras (Molina et al., 2007; Saerens et al., 2006) (**Tableau 7**). Au-delà des effets d'évaporation, la synthèse des esters d'éthyles par la levure serait donc favorisée à faible température.



Enfin, Guittin et al., 2021 observent une augmentation de la production des deux familles d'esters même à 28°C. Ce résultat surprenant est certainement lié aux conditions particulières de cette étude, notamment à la présence de concentrations fortes en phytostérols (liées à l'utilisation d'un taux très élevé de bourbes) qui modifient le métabolisme levurien.

Tableau 7. Effet de la température sur l'expression des gènes codant pour la synthèse des composés volatils.

Conditions	Moment du prélèvement	Souche	Gènes induits	Gènes réprimés	Références
13°C vs 25°C	Mi-fermentation	QA23	<i>BAT2, ADH6, PDC6, ILV2/6, MCT1, ETR1, OAR1, ACH1, IAH1</i>	<i>BAT1, PDC1/5, ARO10, THI3, ADH2/3/5, PDA1, PDB1</i>	Beltran et al., 2006
15°C-28°C	Suivi d'expression sur toute la fermentation	EC1118	<i>BAT1, BAT2, ADH1, PDC1, IAH1</i>	<i>LEU2, ATF1/2, EHT1</i>	Molina et al., 2007

### 5.3.2. Température anisotherme

A l'échelle industrielle, la gestion de la température se fait rarement de façon isotherme. Dans la plupart des cas, le professionnel fixe une température de consigne finale à ne pas dépasser

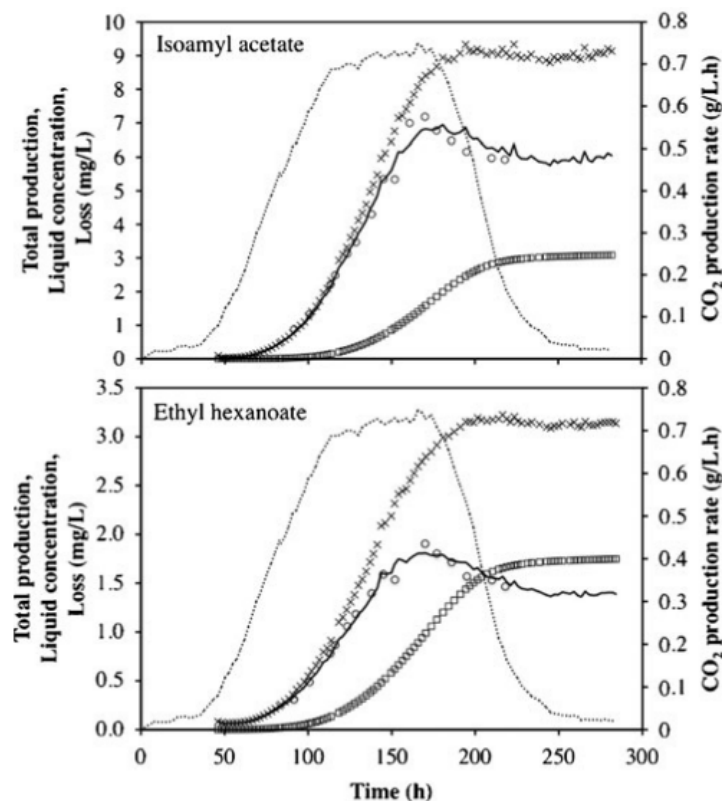


Figure 16. Suivi en ligne de la production d'esters en fonction du temps au cours d'une fermentation anisotherme (15°C-30°C). (Trait vide) Cinétique fermentaire ; (Croix) Production totale ; (Trait plein) Concentration dans le liquide ; (Losange) Pertes. Ces trois concentrations sont exprimées en mg/L (Morakul et al., 2011)

mais, la fermentation étant très exothermique (23,5 kcal par mole de sucre), il y a en général une augmentation de la température tout au long du procédé. Dans certains cas, la différence entre la température initiale et la température finale peut dépasser 10 °C.

Quelques études ont étudié ce phénomène afin d'appréhender la perte par évaporation des arômes produits due à cette augmentation de température (Morakul et al., 2011).

Morakul et al., 2011 ont mis en évidence que la perte engendrée par une augmentation de température de 15°C (de 15°C à 30°C) est de 33,7% pour l'acétate d'isoamyle et 54,3% pour l'hexanoate d'éthyle (**Figure 16**). Un second profil, de 20°C à 30°C (qui se rapproche plus des conditions réelles), a été étudié : il engendre une perte de 46,7% et 64,7% pour l'acétate isoamyle et l'hexanoate d'éthyle respectivement. Enfin, il est intéressant de noter que, pour une fermentation isotherme à 30°C, les pertes par évaporation s'élèvent à 42,2% pour l'acétate d'isoamyle et 71% pour l'hexanoate d'éthyle. Ces pertes sont donc aussi élevées voir plus importantes que pour les profils anisothermes.

### *5.3.3. Effet combiné de l'azote et de la température*

Les effets de l'azote assimilable, initial ou ajouté en cours de procédé, et de la température sur la production des composés volatils ont souvent été étudiés de manière indépendante. L'interaction entre la concentration en azote initial et la température a tout de même fait l'objet de quelques travaux. Par exemple qu'une forte concentration en azote initial (410 mg/L) associée à une faible température de fermentation (18°C) favorise la production de l'acétate d'isoamyle, de l'hexanoate d'éthyle et de l'octanoate d'éthyle. A l'inverse, la production de l'alcool isoamylique et de l'isobutanol est favorisée par une concentration en azote initial faible et une température importante. Cependant, cet effet d'interaction n'est pas retrouvé pour tous les alcools supérieurs notamment pour le propanol qui semble dépendre uniquement de l'azote initial (Mouret, Camarasa, et al., 2014; Rollero et al., 2015). Ces données confirment le comportement atypique du propanol par rapport aux autres alcools supérieurs et son rôle de marqueur métabolique de l'azote assimilable (Mouret, Camarasa, et al., 2014).

Récemment, l'impact d'un ajout d'azote en cours de phase stationnaire a été étudié en interaction avec la température sur un moût naturel rouge (Pérez et al., 2018). Deux températures (14°C et 22°C) de fermentation ont été testées avec ou sans ajout d'azote. Les résultats montrent que, pour une fermentation menée à 22°C avec un ajout d'azote, une augmentation des esters d'acétate est observée. La production des alcools supérieurs et des acides gras est quant à elle diminuée par l'ajout d'azote. Pour les esters d'éthyles, on remarque globalement une diminution de leur production suite à l'ajout sauf pour un composé de cette famille, l'éthyle octanoate. En effet, pour une température de 22°C, l'ajout d'azote semble compenser les pertes par évaporation de ce dernier (Pérez et al., 2018).

Ces différentes études préliminaires indiquent que l'azote assimilable et la température sont des leviers importants pour l'optimisation de la production des arômes mais l'étude de leurs interactions mérite d'être approfondie.

---

# Matériels et méthodes

---

## 1. Souche de levure

Une seule souche de levure a été utilisée tout au long de ce travail : *Saccharomyces cerevisiae* Lalvin EC1118® produite par la société Lallemand. Les levures sont sous forme de levures sèche actives (LSA) et sont stockées à 4°C. Avant inoculation, ces dernières sont réhydratées dans de l'eau glucosée (50 g/L de glucose) pendant 20 minutes avant d'être ajoutées dans le fermenteur. Toutes les fermentations ont été inoculées à 10 g/hL.

## 2. Milieux synthétiques

Le milieu permettant de réaliser l'ensemble des fermentations de ce travail est un milieu synthétique mimant les caractéristiques moyennes d'un moût naturel et mis au point par Bely et al., 1990. Ce milieu est composé de tous les nutriments nécessaires à la croissance des levures et au bon déroulement de la fermentation. L'élément majoritaire est le sucre présent en quantités équivalentes de glucose et de fructose. On retrouve ensuite des sels minéraux, des vitamines, des acides aminés, des oligoéléments et des facteurs anaérobies. Enfin, le moût de raisin étant naturellement acide, le pH du milieu est fixé à 3.3. Les quantités pour 1L de moût synthétique à 200 g/L de sucres sont indiquées dans le tableau ci-dessous (**Tableau 8**).

Tableau 8. **Composition pour 1L de moût synthétique à 200 g/L de sucre.**

Sucre	Glucose (g)	100
	Fructose (g)	100
Sels minéraux	Acide malique (g)	6
	Acide citrique (g)	6
	Phosphate de potassium (g)	0.75
	Sulfate de potassium (g)	0.5
	Sulfate de magnésium (g)	0.25
	Chlorure de calcium (g)	0.155
	Chlorure de sodium (g)	0.2
Solutions mères	Solution mère d'oligo-éléments (mL)	1
	Solution mère de vitamines (mL)	10
	Solution mère d'ergostérols (mL)	1

La composition globale du moût qui a été utilisé dans ce travail est identique pour toutes les fermentations, à l'exception de l'azote assimilable (NH<sub>4</sub>Cl et solution d'acides aminés) dont la concentration varie entre 70, 140 et 210 mg/L. Les quantités d'azote minéral et aminé pour

les 3 moûts (MS70, MS140 et MS210) sont mentionnées dans le tableau ci-dessous (**Tableau 9**).

Tableau 9. Variations de la concentration en azote assimilable dans le moût synthétique.

	MS70	MS140	MS210
Chlorure d'ammonium (g)	0.076	0.152	0.227
Solution mère d'acides aminés (mL)	2.16	4.31	6.47

Après préparation, les valeurs précises de sucre sont contrôlées par HPLC et les moûts synthétiques sont stockés à -20°C. Une fermentation de contrôle est également réalisée pour vérifier les paramètres de la cinétique (latence, vitesse maximale et temps de fermentation) ce qui indique indirectement que tous les composants sont présents aux valeurs cibles en qualité et en quantité.

Le détail des différentes solutions mères employées est présenté dans les **Tableaux 10 et 11**.

Tableau 10. Composition des différentes solutions mères en g/L.

Solution mère d'oligo-éléments	Sulfate de manganèse monohydraté	4 g
	Sulfate de zinc heptahydraté	4 g
	Sulfate de cuivre pentahydraté	1 g
	Iodure de potassium	1g
	Chlorure de cobalt hexahydraté	0.4 g
	Acide borique	1 g
	Ammonium heptamolybdate	1 g
Solution mère de vitamines	Myo-inositol	2 g
	Pantothénate de calcium	0.15 g
	Thiamine, hydrochloride	0.025 g
	Acide nicotinique	0.2 g
	Pyridoxine	0.025 g
Solution mère de facteurs anaérobies	Biotine	3 mL
	Ergostérols	15 g
	Tween 80	500 mL
	Ethanol pur	Qsp 1L

Tableau 11. **Composition de la solution mère d'acides aminés en g/L**

Solution mère d'acides aminés	Acide aspartique	3.4 g
	Acide glutamique	9.4 g
	Alanine	11.1 g
	Arginine	28.6 g
	Cystéine	1 g
	Glutamine	38.6 g
	Glycine	1.4 g
	Histidine	2.5 g
	Isoleucine	2.5 g
	Leucine	3.7 g
	Lysine	1.3 g
	Méthionine	2.4 g
	Phénylalanine	2.9 g
	Proline	46.8 g
	Sérine	6 g
	Thréonine	5.8 g
Tryptophane	13.7 g	
Tyrosine	1.4 g	
Valine	3.4 g	

### 3. Fermentations et suivi cinétique

#### 3.1. Fermentations 1L

Les fermenteurs en verre (1.2 L) disposent d'un volume réactionnel de 1 L, et sont surmontés d'une cloche remplie d'eau afin de permettre le dégagement de CO<sub>2</sub> tout en maintenant l'anaérobiose. Un septum permet de réaliser des prélèvements par seringue sans oxygénation du milieu. Un barreau aimanté dans le fermenteur et un agitateur magnétique (150 rpm) permet de garder le milieu homogène. **(Figure 17)**.

Les fermenteurs sont placés sur des balances individuelles pour effectuer le suivi cinétique. Les fermenteurs sont placés dans une pièce climatisée (14 à 18°C) et sont individuellement équipés d'une sonde mesurant la température dans la phase liquide au moyen d'un doigt de gant. Une lampe chauffante, placée sous le contrôle de la sonde thermique, s'allume ou s'éteint pour assurer le régime de température souhaité pour chaque poste de fermentation. Il est ainsi possible de réaliser des fermentations isothermes ou anisothermes dans la gamme de 18 à 28 °C. Les milieux sont systématiquement mis à température avant inoculation.

Une mesure automatique de la perte de poids se fait toutes les 20 minutes. Cette mesure permet de suivre le dégagement de CO<sub>2</sub> et est réalisée à l'aide d'un système contrôlé par une interface IN/OUT (National Instruments) reliée à un ordinateur équipé d'un logiciel d'acquisition développé sous LabVIEW (développé en interne à l'UMR SPO). Ce logiciel calcule la vitesse de dégagement de CO<sub>2</sub>, le cumul de CO<sub>2</sub> dégagé et stocke ces informations dans une base de données consultable sur internet à partir de l'interface Alfis.

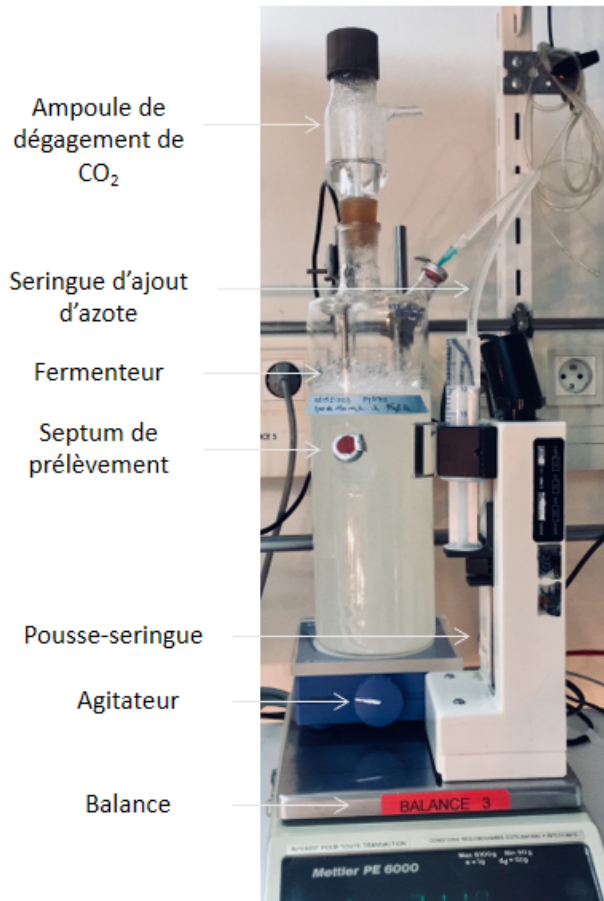


Figure 17. Photo d'un fermenteur de 1L équipé d'un pousse seringue pour l'ajout d'azote automatique en cours de fermentation.

Les ajouts d'azote sont faits de manière automatique grâce à une pompe ou « pousse seringue » et à un débit constant (10 mL/min) pendant 5 minutes. La seringue contient la solution concentrée d'azote et est reliée au fermenteur par un tuyau (**Figure 17**). L'ajout est déclenché lorsqu'un certain seuil de dégagement de CO<sub>2</sub> est atteint, grâce à un fichier « phase » lu par le logiciel d'acquisition. L'azote ajouté est une solution de di-ammonium phosphate (DAP) avec des concentrations comprises entre 24 et 70.5 g/L, en fonction de la quantité d'azote à ajouter (entre 50 et 150 mg/L dans le fermenteur).



### 3.2. Fermentations 10L

Les fermentations sont réalisées dans des cuves de 10L en acier inoxydable à l'unité expérimentale de Pech Rouge (Gruissan). Le système de suivi de la fermentation est différent de celui des fermenteurs en 1L. Chaque fermenteur est équipé de deux bouchons latéraux permettant de faire les ajouts d'azote directement dans le moût à l'aide d'une pompe (ajouts automatisés). L'ajout d'azote se fait grâce à une pompe péristaltique avec un débit constant de 10 mL/min et un temps d'ouverture de pompe de 500 secondes.

Les fermenteurs possèdent une platine amovible aux multiples fonctionnalités. On retrouve deux épingles immergées pour la régulation de température ainsi qu'un doigt de gant contenant une sonde (PT100) pour la mesure de ce paramètre dans la cuve (**Figure 18**). Ainsi, chaque épingle est reliée à des électrovannes qui contrôlent respectivement un circuit d'eau chaude à 40 °C et un circuit d'eau froide entre 10 et 15 °C ce qui permet une régulation de température précise à 0,1°C tout au long du cycle fermentaire.

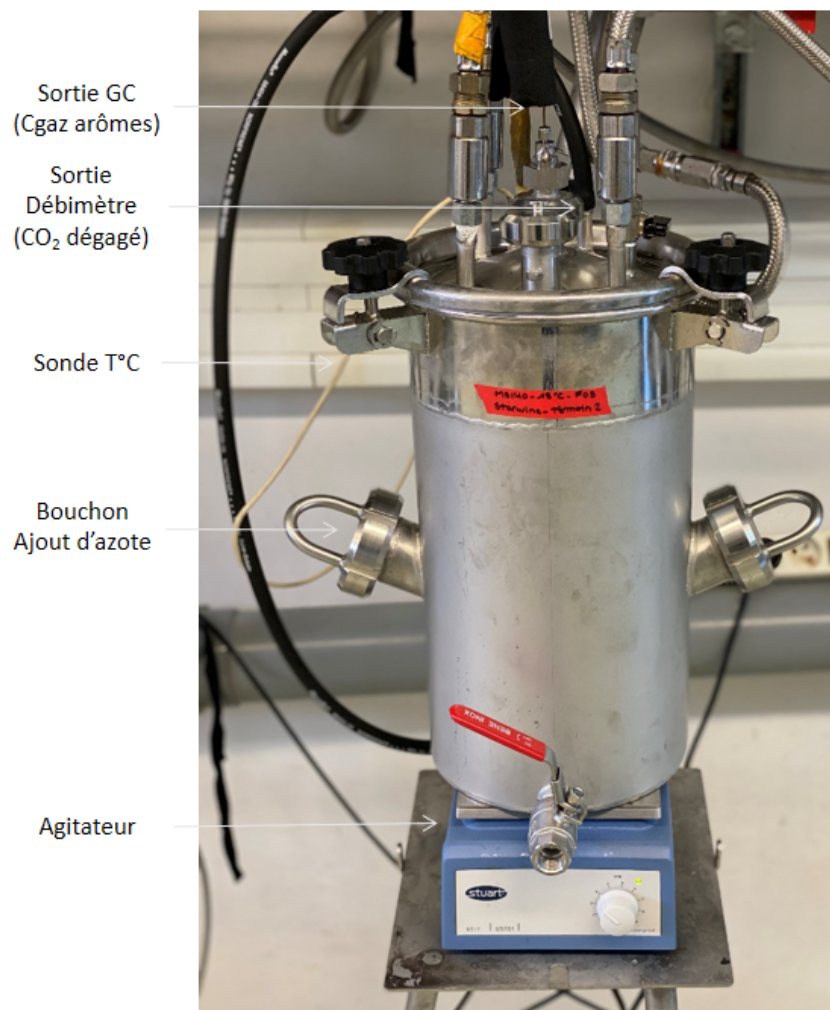


Figure 18. Photo d'un fermenteur de 10L sur lequel on retrouve les différentes sorties pour le suivi de la cinétique fermentaire et aromatique.

Sur la platine on retrouve également différentes sorties dont la sortie centrale utilisée pour le suivi en ligne des composés volatils. La deuxième sortie (à l'avant du fermenteur) est utilisée pour effectuer des prélèvements dans le liquide tout au long de la fermentation. Enfin, une troisième sortie est utilisée pour l'évacuation du CO<sub>2</sub> produit au cours de la fermentation. Le suivi de la fermentation se fait grâce à la mesure automatique du dégagement de CO<sub>2</sub> par un débitmètre massique (Brooks TR). Ce suivi en ligne permet de calculer la vitesse de production de CO<sub>2</sub> ( $dCO_2/dt$ ) et l'intégration de ce signal permet de calculer la quantité de CO<sub>2</sub> dégagé : il est donc indirectement possible d'estimer la teneur résiduelle en sucres et la concentration en alcool, le rendement de la conversion des sucres en alcool étant constant.

Tout comme le suivi de la cinétique fermentaire pour les fermenteurs de 1L, les cuves de 10L sont pilotées par un logiciel Labview (développé par l'UMR SPO et adapté par l'UE Pech Rouge). Ce logiciel dispose de nombreuses fonctionnalités : suivi du débit de dégagement de CO<sub>2</sub> grâce à une mesure de ce débit effectuée toute les 5 secondes et moyennée sur 20 minutes ; contrôle de la régulation de température grâce à une mesure effectuée toutes les 5 secondes ; stockage des données acquises au cours de la fermentation : CO<sub>2</sub> cumulé (g/L), vitesse de dégagement de CO<sub>2</sub> (g/L/h), temps (h), températures de consigne et mesurées et cumul du temps d'ouverture des électrovannes chaud et froid. Une autre fonction de ce logiciel concerne le pilotage des pompes d'ajout d'azote qui peut être rendu actif à partir d'une certaine valeur de CO<sub>2</sub> dégagé (comme pour les fermenteurs de 1L). Enfin, le logiciel permet également de piloter des changements de température au cours de la fermentation. Ce pilotage est possible grâce à la lecture de fichiers « phase » qui permet en retour le déclenchement ou non de la pompe d'ajout ou du changement de température.

## 4. Méthodes de dosage

### 4.1. Dosage de la population cellulaire

Le nombre et la taille des cellules sont déterminés grâce à un compteur électronique de particules (Counter ZB-2, Beckman Coulter). Les échantillons sont préparés au préalable dans un électrolyte (Isoton, Beckman Coulter) à la dilution choisie pour avoir une concentration de cellules adaptée à la gamme de mesure de l'appareil (entre 20000 et 80000 cellules/mL). Les agrégats de cellules sont ensuite détruits par sonication grâce à un générateur d'ultra-sons (Branson Sonifier, modèle 250).

L'appareil est équipé d'une sonde de détection avec un orifice de 100 µm par lequel passent les particules. Le passage des particules non-conductrices par cette sonde va provoquer un changement de résistance électrique mesuré par l'appareil.

Le volume d'électrolyte déplacé par chaque particule est mesuré sous forme d'une impulsion de tension et la hauteur de cette impulsion est proportionnelle au volume de la particule. Cette mesure nous permet d'obtenir un nombre de cellules par mL et de connaître le volume moyen des levures ( $\mu\text{m}^3$ ).

#### 4.2. Dosage des métabolites carbonés extracellulaires

Les métabolites extracellulaires du métabolisme carboné central sont dosés par chromatographie liquide haute performance (HPLC). Ces métabolites sont le glucose, le fructose, l'acétate, le pyruvate, l' $\alpha$ -cétoglutarate et le succinate. Dans ce travail, les échantillons sont prélevés en fin de fermentation puis centrifugés à 3000 rpm pendant 5 minutes. Ils sont ensuite dilués au  $1/6^{\text{ème}}$  avec une solution d'acide sulfurique à 0,005 N dégazée. Cette solution servira de phase mobile pour le passage dans la colonne.

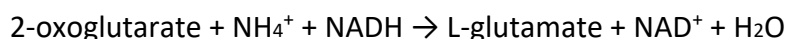
Le chromatographe de l'appareil est muni d'une pompe (HPLC 1290 Infinity, Agilent Technologies, Santa Clara, California) délivrant un débit de 0,6 mL/min et d'un injecteur automatique. L'échantillon est tout d'abord injecté (25  $\mu\text{L}$ ) dans la pré-colonne puis passe dans une colonne de séparation échangeuse d'anions (Phenomenex Rezex ROA) thermostatées à 60°C.

Les différents composés séparés par la colonne sont détectés grâce à un réfractomètre ou à un spectromètre UV mesurant l'absorbance à 210 nm. Enfin, les chromatogrammes sont traités à l'aide du logiciel Agilent EZChrom et les concentrations sont calculées grâce à un étalonnage externe.

#### 4.3. Dosage de l'azote assimilable

##### 4.3.1. Dosage de l'azote ammoniacal

Les échantillons à doser sont centrifugés à 3000 rpm pendant 5 minutes et l'ammonium présent dans le surnageant est quantifié par kit enzymatique ENZYTEC™ *fluid* Ammoniaque (DiaSys Diagnostic Systems GmbH, 5390). La réaction enzymatique repose sur la synthèse de glutamate à partir de l'ammonium et du 2-oxoglutarate par la glutamate déshydrogénase :



La quantité d'azote présente dans le surnageant est dosée par la différence d'absorbance entre le mélange initial et le mélange après ajout du 2-oxoglutarate. Le NADH étant dosable par spectrophotométrie à 340 nm, le suivi de la diminution d'absorbance se fait par la consommation du NADH pour former le glutamate et le  $\text{NAD}^+$ . La réaction enzymatique dure entre 20 et 30 minutes à température ambiante.

La gamme de concentration suivie par ce kit est comprise entre 10 et 70 mg/L d'ammonium. En fonction du moment du prélèvement au cours de la fermentation, l'échantillon peut être dilué au ½ ou au ¼ pour rester dans la gamme du kit.

#### 4.3.2. Dosage des acides aminés libres

Le dosage des acides aminés libres se fait également dans le surnageant après centrifugation des échantillons. La première étape de préparation des échantillons consiste à éliminer les macromolécules par précipitation des protéines grâce à l'acide sulfo-salicylique (SSA).

Pour cela, 4 volumes d'échantillons sont mélangés à 1 volume de SSA 25% (p/v) contenant un étalon interne, la norleucine à 2500 nmol/mL. Après une heure d'incubation à 4°C, les échantillons sont centrifugés 10 minutes à 4°C et filtrés à 0,22 µm. Les échantillons peuvent être conservés à -20°C avant analyse.

Le dosage se fait par chromatographie liquide sur colonne d'échangeuse de cations (résine anionique Ultracac-8 Lithium-form, Serlabo, France), grâce à un Biochrom 30 type HPLC (Serlabo, France). Plusieurs tampons (**Tableau 12**, Serlabo, France) comprenant un gradient de température (de 32 °C à 75 °C), de pH (de 2,8 à 3,55) et de concentration en contre ions (citrate de lithium de 200 à 1650 mM) sont appliqués afin de séparer les acides aminés. La colonne est ensuite régénérée à 75°C avec un tampon d'hydroxyde de lithium à 300 mM. Une fois séparés, les acides aminés sont dérivés avec de la ninyhydrine et les composés ainsi formés vont absorber à 570 nm et être détectés par spectrométrie ultraviolet-visible. La quantité formée est proportionnelle à la concentration en acide aminé. La proline et l'hydroxyproline ne possèdent pas de fonction amine mais une fonction imine, ils sont donc détectés à 440 nm. Les spectres obtenus sont analysés avec le logiciel Biochrom 30.

Tableau 12. **Composition des différents tampons de charge utilisés pour la séparation des acides aminés.**

Ions	Tampons	Molarité	pH
	Charge	200 mM	2,2
	A	200 mM	2,8
Citrate de lithium	B	300 mM	3
	C	500 mM	3,15
	D	900 mM	3.5
	E	1650 mM	3.55
Hydroxyde de lithium	F	300 mM	

#### 4.4. Dosage des composés volatils

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

Le dosage des composés volatils dans la phase liquide se fait dans le surnageant. Dans ce travail, les prélèvements de moûts pour le dosage des arômes ont été fait à 80% d'avancement de la fermentation. 10 µL d'une solution d'étalons deutérés (contenant le butanoate d'éthyle-d5, l'hexanoate d'éthyle-d5, l'octanoate d'éthyle-d5, l'acide butyrique-d7, le décanoate d'éthyle-d5, le phényléthanol-d4) à 100 pg/mL chacun sont ajoutés à 5 mL d'échantillon dans un tube en pyrex de 15 mL avec un bouchon en téflon (Supelco, Bellefonte, Pennsylvanie, États-Unis).

L'échantillon est extrait deux fois avec 1 mL de dichlorométhane pendant 20 minutes sous agitation. Il est ensuite centrifugé pendant 5 minutes à 3000 rpm. La phase organique est récupérée dans un vial de 4 mL et séchée avec du Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre pour éliminer toute trace de phase aqueuse. La phase organique est ensuite concentrée sous flux d'azote jusqu'à obtenir un volume de 0,5 mL. Enfin l'échantillon est transféré dans un insert (Supelco, Bellefonte, Pennsylvanie, États-Unis) placé dans un vial de 2 mL bouché.

L'analyse des échantillons se fait par chromatographie en phase gazeuse Agilent 8860 (Agilent technologies, Santa Clara, Californie, USA) équipé d'un passeur automatique 7693A (Agilent technologies, Santa Clara, Californie, USA) et couplé à un spectromètre de masse HP 5977B (Agilent technologies, Santa Clara, Californie, USA). Le contrôle de l'appareil et l'analyse des données se font par le logiciel OpenLab CDS version 2.6. Le chromatographe est équipé d'une colonne capillaire en silice fondue ZB-XAX (30 m \* 0.25 mm \* 0.25 µm, Phenomenex). Le gaz vecteur utilisé pour cette analyse est de l'hélium à un débit constant de 1 mL/min (Air Products, Allentown, PA, USA).

La température du four est tout d'abord maintenue à 40°C pendant 3 minutes. Ensuite, la température est augmentée à 160°C avec une pente de 4°C/min puis à 220°C avec une pente de 15°C/min et maintenue à 220°C pendant 10 minutes. L'injecteur et la ligne de transfert sont chauffés à 240°C. Le volume d'injection est de 2 µL. L'échantillon est injecté en mode « split », avec une division de 10 : 1 mL/min. La température du spectromètre de masse est fixée à 150°C, celle de la source à 230°C et la ligne de transfert est maintenue à 240°C. Pour la quantification, les spectres de masse ont été enregistrés en mode SIM (Selected Ion Monitoring) avec une énergie d'impact électronique d'ions positifs de 70 eV. Les différents ions qualifiants et quantifiants sont énumérés dans le **Tableau 14**. Les droites de calibration obtenues sont linéaires dans la gamme de concentration utilisée.

La gamme de calibration est préparée le même jour que les échantillons avec le même mélange d'étalons deutérés.

Pour préparer la gamme, 4 solutions indépendantes à 10 g/L de chaque composé sont préparées dans une fiole jaugée de 10 mL dans de l'éthanol absolu : une solution contenant les esters éthyliques **S1**, une solution contenant les acides **S2**, une solution contenant les alcools **S3** et une solution contenant les esters acétiques **S4**. Les solutions stocks sont conservées au congélateur à -20 °C et sont stables plusieurs mois.

A partir des solutions S1 à S4, 7 points de gamme sont préparés dans une solution de vin modèle (VM) : 13 % éthanol, 5 g/L d'acide tartrique, pH ajusté à 3,6 (les dilutions des différentes solutions filles sont détaillées dans le **tableau 13**).

Tableau 13. Composition des 7 points de gamme.

	Solutions stock (mL)				EtOH (mL)	VM 13° (qsp mL)
	S1	S2	S3	S4		
C7	0,25	0,25	0,25	0,25	-	10
C6	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	10
C5	0,1	0,1	0,1	0,1	0,6	10
C4	0,05	0,05	0,05	0,05	0,8	10

	C7 (mL)	EtOH (mL)	VM 13° (qsp mL)
C3	1	0,8	10

	C5 (mL)	EtOH (mL)	VM 13° (qsp mL)
C2	1	0,8	10

	C4 (mL)	EtOH (mL)	VM 13° (qsp mL)
C1	1	0,8	10

		EtOH (mL)	VM 13° (qsp mL)
C0	-	1	10

Tableau 14. Paramètres pour la détermination des arômes fermentaires du vin par SIM.

Catégories	Nom des composés	N° CAS	Formule brute	Temps de rétention	Ion de quantification	Ions de confirmation	
Alcools	1-propanol	71-23-8	C3H8O	5,23	59	42	
	2-méthylpropanol	78-83-1	C4H10O	5,98	88	60,70	
	2-méthylbutanol	137-32-6	C5H12O	10,15	70	56, 57	
	3-méthylbutanol	123-51-3	C5H12O	10,15	70	55	
	1-hexanol	111-27-3	C6H14O	14,84	56	69, 84	
	methionol	505-10-2	C4H10OS	25,76	106	61, 73	
	2-phenylethanol	60-12-8	C8H10	30,9	91	92, 122	
	ethyl acetate	141-78-6	C4H8O2	3,95	61	73	
	propyl acetate	109-60-4	C5H10O2	4,72	56	73	
	isobutyl acetate (2-méthylpropyl acetate)	110-19-0	C6H12O2	4,72	56	73	
Esters d'acétate	2-méthylbutyl acetate	624-41-9	C7H14O2	7,42	57	72	
	isoamyl acetate (3-méthylbutyl acetate)	123-92-2	C7H14O2	7,46	87	55, 61	
	hexyl acetate	142-92-7	C8H16O2	12,21	56	69, 84	
	2-phenylethyl acetate	103-45-7	C10H12O2	28,41	104	91	
	acide propanoïque	79-09-4	C3H6O2	21,08	74	45, 57	
	acide 2-méthylpropanoïque	79-31-2	C4H8O2	21,92	43	73, 88	
	acide butanoïque	107-92-6	C4H8O2	23,68	60	73	
	acide 2-méthylbutanoïque	116-53-0	C5H10O2	24,80	74	57, 87	
	Acides	acide-3-méthylbutanoïque	503-74-2	C5H10O2	24,80	60	61, 87
		acide pentanoïque	109-52-4	C5H10O2	26,73	60	73
acide hexanoïque		142-62-1	C6H12O2	29,59	60	73, 87	
acide octanoïque		124-07-2	C8H16O2	34,46	60	73, 101	
acide decanoïque		334-48-5	C10H20O2	36,9	73	60, 129	
acide dodécanoïque		143-07-7	C12H24O2	38,9	73	60, 129	
ethyl propanoate		105-37-3	C5H10O2	3,69	57	102	
ethyl isobutanoate		97-62-1	C6H12O2	3,79	71	88, 116	
ethyl butanoate		105-54-4	C6H12O2	5,18	71	88, 101	
ethyl-2-méthylbutanoate		7452-79-1	C7H14O2	5,54	102	74	
Esters diéthyles	ethyl isovalerate (ethyl-3-methyl butanoate)	108-64-5	C7H14O2	5,98	88	60, 70	
	ethyl pentanoate	539-82-2	C7H14O2	7,83	88	85, 101	
	ethyl hexanoate	123-66-0	C8H16O2	10,94	88	99, 115	
	ethyl lactate	687-47-8	C5H10O3	14,53	45	75	
	ethyl octanoate	106-32-1	C10H20O2	17,46	88	101, 127	
	ethyl-3-méthylthiopropionate	13327-56-5	C6H12O2S	21,46	148	74, 103	
	ethyl decanoate	110-38-3	C12H24O2	23,61	88	101, 155	
	diethyl succinate	123-25-1	C8H14O4	24,74	101	129	
	ethyl dodecanoate	106-33-2	C14H28O2	29,25	88	101	

#### 4.4.2. Suivi en ligne des composés volatils dans la phase gazeuse

Au domaine expérimental de Pech Rouge, la chromatographie en phase gazeuse a été adaptée au système de fermentation en 10L pour suivre, en ligne, la production des arômes pendant la fermentation.

Le système d'analyse est équipé d'un CompactGC (*Global Analyser Solution - InterScience*) permettant la récupération des prélèvements directs de gaz fermentaires dans l'espace de tête des cuves de fermentation. L'appareil possède deux boucles d'injection. La première permet d'envoyer l'échantillon gazeux vers une colonne et un détecteur FPD, pour l'analyse des composés soufrés. La seconde permet de charger l'échantillon sur un piège Tenax en concentrant l'échantillon à 2°C. La désorption des composés se fait ensuite par chauffage du piège à 310 °C. Les composés carbonés sont ensuite séparés dans la colonne DB-WAX-UI (60m \*0.320mm\*0.5µm; Agilent J&W) du chromatographe en phase gazeuse (*Thermo TRACE 1300*) (**Figure 19**).

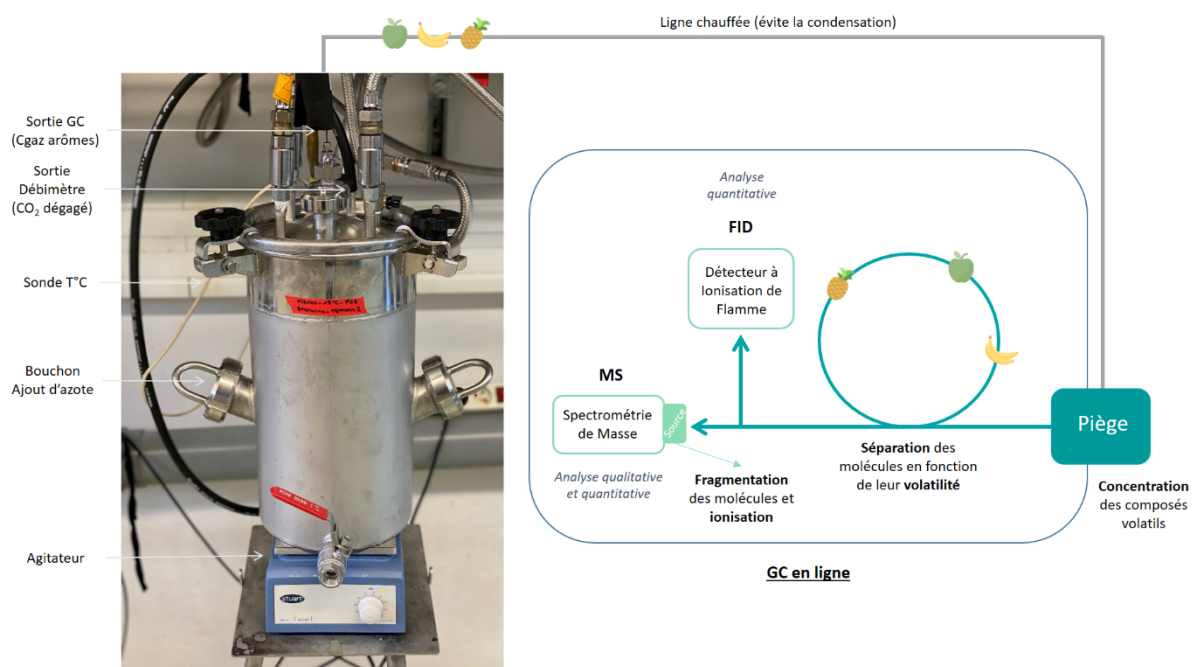


Figure 19. Schéma représentant l'installation du suivi en ligne des arômes au cours de la fermentation (de la sortie du fermenteur par la ligne chauffée au dosage grâce au GC-FID/MS).

Le programme du four qui contient la colonne est le suivant : 38 °C pendant 7 min, une montée de 3 °C/min à 65 °C puis une montée à 160 °C avec une vitesse de 6 °C/min et enfin une montée à 210 °C avec une vitesse de 8 °C/min et maintien à cette température pendant 4 min. En sortie de colonne, on trouve deux analyseurs placés en parallèle : un détecteur FID et un spectromètre de masse (*Thermo ISQ7000*).



En entrée du Compact GC, une vanne 8 voies pilotée et programmable, permet le branchement des 6 lignes de 12 m chauffées et reliées aux fermenteurs et permettant les suivis en ligne des arômes (**Figure 19**). Une 7<sup>ème</sup> entrée est disponible pour réaliser des blancs sur l'air du laboratoire ou la calibration.

Les ions détectés sont transcrits sous forme de pics dont les aires ont été acquises avec le logiciel Chroméléon. Chaque analyse durant une heure : il est possible, sur la base d'un suivi simultané de six fermentations, de réaliser une analyse par fermenteur toutes les six heures.

La calibration de l'appareil se fait grâce à un système ATIS (Adsorbent Tube Injector System ; Supelco, Bellefonte, PA, USA) qui permet de produire des gaz étalons en vaporisant un échantillon liquide de référence dans un flux continu de gaz inerte. Il faut tout d'abord préparer une gamme d'étalonnage que l'on injecte (5 µL) dans le septum au centre de l'ampoule d'injection. Cette dernière est balayée sans discontinuer par un flux d'air chaud à 30 mL/min (**Figure 20**).

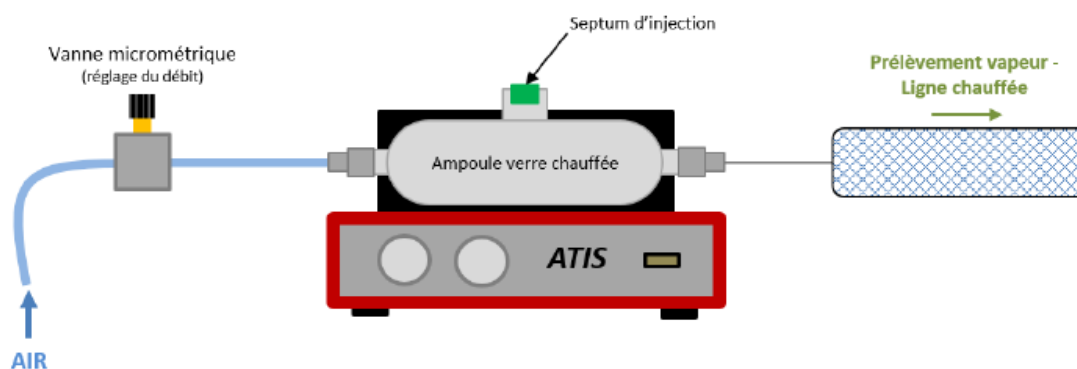


Figure 20. Schéma représentant le système ATIS utilisé pour la calibration du GC-FID/MS

Cette calibration est effectuée sur les principaux arômes fermentaires connus dans chacune des trois familles de molécules :

- Acétate d'éthyle
- Esters d'éthyle : butanoate d'éthyle, hexanoate d'éthyle, octanoate d'éthyle et décanoate d'éthyle.
- Esters d'acétate : acétate d'isobutyle, acétate d'isoamyle, acétate d'hexyle et acétate de phényléthyle.
- Alcools supérieurs : propanol, isobutanol, alcool isoamylique et phényléthanol.

Chaque mesure est réalisée en triplicat et la calibration est réalisée à 4 niveaux de concentrations (**Tableaux 15 et 16**).

Tableau 16. Concentration dans le gaz ( $\mu\text{g/L}$ ) des différentes solutions mères dans les 4 niveaux de solutions filles.

Concentrations dans le gaz ( $\mu\text{g/l}$ )	Volume de solution mère (ml)												
	Acétate d'éthyle	Butyrate d'éthyle	Hexanoate d'éthyle	Octanoate d'éthyle	Decanoate d'éthyle	Acétate d'isobutyle	Acétate d'isoamyle	Acétate d'hexyle	Acétate de Phenylethyle	Propanol	Isobutanol	Alcool isoamylique	Phenyl Ethanol
SF1	1357.10	4.06	10.19	12.43	16.97	1.88	43.43	5.31	12.59	9.87	16.58	36.48	4.19
SF2	813.13	2.44	6.11	7.46	10.18	1.13	26.16	3.20	7.58	6.02	10.12	22.27	2.56
SF3	191.98	0.57	1.43	1.74	2.38	0.27	6.33	0.77	1.83	1.40	2.36	5.19	0.60
SF4	31.36	0.09	0.24	0.29	0.40	0.04	1.02	0.13	0.30	0.24	0.40	0.88	0.10
SF4				50		0.1		0.1		0.1		0.1	

#### 4.4.3. Bilans gaz-liquide des composés volatils

Grâce au système de suivi en ligne des composés d'arômes en phase gazeuse, nous pouvons calculer, pour chaque composé volatil : la concentration en phase liquide, les pertes par évaporation dans le gaz fermentaire et la production totale, qui est la somme des deux paramètres précédents. La production totale est un paramètre d'intérêt métabolique car elle correspond à la quantité d'arôme effectivement produite par la levure indépendamment des pertes éventuelles dans le gaz et/ou de l'accumulation dans le liquide.

#### Concentration liquide

La concentration d'un composé volatil dans le liquide ( $C^{liq}(t)$ ) a été calculée à partir de la concentration mesurée en ligne dans la phase gazeuse, exprimée par  $C^{gas}(t)$  en mg/L de  $\text{CO}_2$ , en utilisant la valeur du coefficient de partage ( $k_i$ ) (Eq. (1)).

$$\text{Équation 1 : } C^{liq}(t) = \frac{C^{gas}(t)}{k_i}$$

La valeur de  $k_i$  (Eq. (2)) a été calculée avec le modèle développé par Morakul et al., 2011, en fonction de la composition du moût et des caractéristiques de la fermentation : concentration en éthanol et température.

$$\text{Équation 2 : } \ln k_i = F1 + F2 * E - \frac{F3+F4*E}{R} \left( \frac{1000}{T} - \frac{1000}{T_{ref}} \right)$$

Où  $E$  est la concentration d'éthanol (g/L) dans la phase liquide, calculée à partir des mesures de la quantité de  $\text{CO}_2$  dégagée ;  $T$  est la température absolue actuelle,  $T_{ref}$  correspond à la température de référence absolue (c'est-à-dire 293,15 K, 20 °C, dans cette étude).  $F1$ ,  $F2$ ,  $F3$  et  $F4$  sont des constantes, identifiées pour chaque composé volatil. Les valeurs de ces paramètres pour les différentes molécules ont été déterminées par Mouret et al., 2013, 2014.

#### Pertes par évaporation dans le gaz

Les pertes dans le gaz ont été calculées à l'aide de l'équation (3).

$$\text{Équation 3 : } L(t) = \int_0^t C^{gas}(t) * Q(t) * dt$$

Où  $Q(t)$  est le débit de  $CO_2$  au temps  $t$ , exprimé en litres de  $CO_2$  par litre de moût et par heure. Les pertes relatives ( $RL$ ), exprimées en pourcentage de la production ( $P(t)$ ), ont été déterminées comme suit (Eq. (4)) :

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

Où  $t_{end}$  correspond à la fin de la fermentation (h).

### **Production totale**

La production totale d'un composé volatil au temps  $t$ , exprimée par  $P(t)$  en mg/L de moût, a été calculée en ajoutant la concentration dans la phase liquide, exprimée par  $C^{liq}(t)$  en mg/L de moût, à la quantité de composé volatil perdue dans la phase gazeuse, exprimée par  $L(t)$  en mg/L de moût (Eq. (5)).

$$\text{Équation 5 : } P(t) = C^{liq}(t) + L(t)$$

## 5. Analyse transcriptomique

L'analyse transcriptomique permet de connaître le niveau d'expression des gènes à un temps donné en dosant les ARN correspondants. Deux types de fermentations ont été réalisées pour étudier l'expression des gènes de la levure suite à un ajout d'azote (150 mgN/L). La première fermentation a été réalisée avec un ajout à 20 g/L de  $CO_2$  produit et la seconde avec un ajout à 50 g/L de  $CO_2$  dégagé. Ces fermentations ont été réalisées avec 140 mgN/L d'azote assimilable initial à 24 °C et ont été effectuées en triplicat. Les cellules ont été récoltées 2 heures après les ajouts d'azote. Nous avons également mis en place un contrôle sans ajout d'azote afin de mieux comprendre son impact sur l'expression des gènes. Pour pouvoir comparer les conditions avec/sans ajouts de la manière la plus précise possible, nous avons prélevé des échantillons du contrôle en fonction de l'avancement de la fermentation et non en fonction du temps après les ajouts.

### **Prélèvement des échantillons**

Au moment du prélèvement, la population de levure dans le fermenteur est mesurée et  $1.10^9$  cellules sont prélevées. L'échantillon est immédiatement centrifugé à 3500 rpm à 4 °C (GR412, Jouan).

Le culot est ensuite lavé dans 750 µL d'eau DEPC froide puis instantanément congelé dans un bain de méthanol à -80 °C et stocké à cette température.

### **Extraction des ARN au Trizol®**

L'extraction des ARN a été réalisée d'après la méthode d'extraction des ARN totaux au Trizol décrite par Chomczynski & Sacchi, 1987. Les échantillons congelés sont repris dans du Trizol (4 °C) (Ambion réf. 15596018) auquel on ajoute des billes de verre (traitées à 180 °C, pour être dépourvues d'ARNase). Les tubes sont vortexés 15 minutes à 2500 rpm. Le Trizol® bloque l'activité des protéines et protège les ARN des RNases. La phase liquide est transférée dans un tube capé (13 ml). Afin de récupérer la totalité de l'échantillon, les billes de verre sont rincées avec 500 µL de Trizol et le Trizol de rinçage est également transféré dans le tube. Le volume est ajusté à 4 mL à l'aide de Trizol et laissé à incuber 5 min à température ambiante. On ajoute 800 µL de chloroforme pour faire précipiter les débris et les protéines. L'échantillon est vortexé pendant 15 s afin de former une émulsion et laissé à incuber 3 min à température ambiante, puis centrifugé 15 min à 4 °C à 10000 rpm (centrifugeuse Beckman rotor JA20). La phase aqueuse contenant les acides nucléiques est récupérée en prenant garde de ne pas toucher le ménisque, celui-ci contenant les protéines et les débris.

### **Purification des ARN**

Les acides nucléiques sont ensuite purifiés par précipitation grâce à l'ajout dans la phase aqueuse d'isopropanol glacé (-20 °C, 50%). Après centrifugation, le culot est lavé avec de l'éthanol à 75% et centrifugé une nouvelle fois. L'ARN est ensuite séché par centrifugation sous vide (SpeedVac) et repris dans 150 µL d'eau RNase-free pendant 1 h à 4 °C, puis il peut être stocké à -80 °C. Après dosage et vérification de la qualité par spectrophotométrie (NanoDrop 1000, ThermoScientific), 100 µg d'acides nucléiques sont purifiés sur colonne par le kit Qiagen RNeasy mini-kit (réf. 74104). Cela permet l'élimination des traces de phénol et de protéines et d'une majorité des ADN. L'ARN total purifié est dosé au NanoDrop et stocké à -80 °C. Sa qualité est aussi vérifiée sur puce d'électrophorèse capillaire Agilent RNA 6000 Nano Kit avec l'appareil Agilent 2100 Bioanalyzer.

### **Marquage des ARN pour les microarray Agilent**

100 ng d'ARN purifié sont marqués à l'aide du kit Low input Quick Amp Labelling one-color (réf 5190-2305, Agilent Technologie). L'ARN est dénaturé en présence d'amorces promoteur T7 et d'ARN contrôle (One-Color RNA SpikeIn kit, 5188-5282, Agilent Technologie) pendant 10 min à 65 °C. Le mélange est refroidi sur la glace. Une étape de transcription inverse est réalisée afin d'obtenir les brins d'ADN complémentaire.

Le mélange est alors incubé à 40 °C pendant 2 heures pour l'étape de polymérisation reverse, puis à 70 °C pendant 15 min pour inactiver les enzymes. Une transcription *in vitro* est réalisée pour permettre l'incorporation des marqueurs. Les réactifs de transcription, dont le marqueur Cy3, sont ajoutés et l'ensemble est incubé à 40 °C pendant 2 heures. L'ARN marqué est alors purifié sur colonne par le kit Qiagen RNeasy mini-kit (réf 74104) et élué dans 30 µL d'eau pure. Après marquage, l'ARN doit être manipulé à l'abri de la lumière et conservé à -80 °C. Le contrôle de la transcription inverse et de l'incorporation est réalisé au NanoDrop 1000 (ThermoScientific). Cette étape permet d'estimer la quantité de Cy3 incorporée à la longueur d'onde 550 nm. Le rendement d'amplification doit alors être supérieur à 660 ng et l'efficacité de marquage FOI (nombre de molécules de dye pour 1000 nucléotides) doit être supérieure à 4.

### **Puce transcriptomique**

Les puces Agilent sont utilisées en monocouleur. Une lame comporte 8 zones d'hybridation (8×15k) dont la composition des spots correspond aux 6200 gènes de *S. cerevisiae* (Design ID 016322), complétée par les 39 nouveaux gènes découverts chez *Lalvin EC1118\** (Novo et al., 2009), (Puce : Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

### **Hybridation des puces**

L'ARNc marqué est hybridé en utilisant le kit Gene Expression Hybridization kit (Réf. 5188-5242, Agilent Technologie). L'ARN est mélangé au tampon de fragmentation 25X (1 µL) en présence d'agent bloquant 10X (5 µL) et complété à l'eau nucléase free pour un volume final de 25 µL. L'ARN est fragmenté à 60°C pendant 30 min exactement. La réaction est arrêtée par refroidissement dans la glace pendant 1 min. Le tampon d'hybridation (Gex 2X) est ajouté pour un volume final de 50 µL. L'échantillon est centrifugé pendant 1 min et refroidi dans la glace pour faciliter le dépôt. Le support d'hybridation « Gasket » (réf. G2534-60014, Agilent Technologie) à 8 compartiments est alors placé dans une chambre d'hybridation en aluminium (G2534A, Agilent Technologie). Chacun des 8 échantillons (40 µL) est déposé au centre des compartiments en évitant la formation de bulles et le contact avec les joints de la « Gasket ». La lame est incubée dans un four rotatif à 65 °C pendant 17 h. Les échantillons et leurs réplicats sont répartis sur la lame de manière aléatoire afin d'éviter un éventuel effet de la qualité des puits (défaut de construction par exemple) sur le résultat.

### **Numérisation et analyse statistique des lames**

La lame est scannée avec un scanner Genepix 4000B (Axon Instrument) et l'acquisition et la quantification des images des puces ont été réalisées avec le logiciel GenePix PRO7.

Le logiciel R4.0.2 a été utilisé pour les analyses statistiques. Le package limma a été utilisé pour importer et normaliser l'ensemble des données des puces à ARN (méthode du quantile pour la normalisation inter-puces) ainsi que pour modéliser l'analyse différentielle. L'ensemble des données est disponible dans la base de données Gene Expression Omnibus (GSE189010). Pour déterminer l'expression différentielle des gènes entre les conditions expérimentales, un t test modifié a été réalisé en filtrant sur la confiance à  $p < 0,05$ , en utilisant le taux de fausse découverte de Benjamini et Hochberg comme corrections de tests multiples des valeurs p du test t. Les gènes présentant différents niveaux d'expression ont été regroupés selon les termes de processus de l'ontologie des gènes (GO) à l'aide du programme Genecodis (<https://genecodis.genyo.es/> ; García-Moreno et al., 2021).

## 6. Analyse statistique et traitement des données

Afin d'analyser l'impact des facteurs étudiés dans ce travail sur la production de composés volatils et de répondre à diverses questions biologiques, un travail approfondi sur les données a été réalisé. Tout d'abord, un lissage a été effectué sur les cinétiques afin de travailler sur un jeu de données « normalisé ». Ensuite, nous avons mis en place une méthode fiable permettant de calculer les différentes concentrations (concentration de liquide, pertes et production totale) de la même manière pour toutes les fermentations. Enfin, plusieurs analyses statistiques ont été utilisées pour répondre aux différentes questions biologiques. Un modèle linéaire permettant d'analyser un plan d'expériences de Box-Behnken a été utilisé pour étudier l'impact des facteurs sur des points clés de la cinétique fermentaire et sur la production finale de composés volatils. La modélisation Generalized Additive Model (GAM) a ensuite été utilisée pour étudier l'impact des facteurs sur la forme des cinétiques (fermentaire et aromatique) en tirant ainsi partie de la nature fonctionnelle des données mesurées.

## 6.1. Plan d'expérience de Box-Behnken

Le plan expérimental de Box-Behnken a été utilisé deux fois dans ce travail pour tester les effets simples, quadratiques et d'interaction de trois facteurs sur la cinétique fermentaire et la production d'arômes fermentaires (**Tableau 17** et **18**).

### **Box-Behnken n°1 :**

Tableau 17. Détails des modalités du Box-Behnken n°1.

Expérimentations	Azote initial (N0), mg/L	Timing d'ajout (CO <sub>2</sub> ), g/L	Azote ajouté (Naj), mg/L
1	210	35	150
2	210	50	100
3	210	20	100
4	140	20	150
5	140	50	150
6 <sup>1</sup>	140	35	100
7 <sup>2</sup>	140	35	100
8 <sup>3</sup>	140	35	100
9 <sup>4</sup>	140	35	100
10	210	35	50
11	140	20	50
12	140	50	50
13	70	35	150
14	70	20	100
15	70	50	100
16	70	35	50

Les facteurs de cette étude sont l'azote initial, le « timing » d'ajout et la concentration en azote ajouté.

### **Box-Behnken n°2 :**

Tableau 18. Détails des modalités du Box-Behnken n°2.

Expérimentations	Azote initial (N0), mg/L	Azote ajouté (Nad), mg/L	Température (Temp), °C
1	70	50	23
2	210	50	23
3	70	150	23
4	210	150	23
5	70	100	18
6	210	100	18
7	70	100	28
8	210	100	28
9	140	50	18
10	140	150	18
11	140	50	28
12	140	150	28
13 <sup>1</sup>	140	100	23
14 <sup>2</sup>	140	100	23
15 <sup>3</sup>	140	100	23

Pour le deuxième plan d'expérience, les trois facteurs sont l'azote initial, la concentration en azote ajouté et la température de fermentation.

Entre 15 et 16 fermentations ont été réalisées pour chaque plan dont 3 à 4 qui constituent le point central du plan expérimental. L'analyse des résultats est faite grâce au package « rsm » (Lenth, 2009) avec le logiciel R v4.0.2.

Chaque facteur présente 3 niveaux différents qui sont codés par -1 (niveau bas), 0 (niveau intermédiaire) et +1 (niveau haut). L'effet des trois variables sur chaque composé d'arôme (Y) a été modélisé avec l'équation polynomiale suivante :

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 \\ + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 \\ + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{33} x_3^2 + \varepsilon$$

Avec  $x_1$ ,  $x_2$  et  $x_3$  les valeurs représentant l'azote initial, le timing d'ajout et la concentration d'azote ajouté respectivement,  $Y$  la réponse prédite,  $\beta_0$  la moyenne générale,  $\beta_i$  les coefficients linéaires,  $\beta_{i,i}$  les coefficients quadratiques et  $\beta_{i,j}$  les coefficients d'interaction. L'erreur  $\varepsilon$  est indépendante et suit une loi normale  $N(0, \sigma^2)$ . Les hypothèses du modèle linéaire (normalité et homoscédasticité des variances) ont été vérifiées avec les graphiques diagnostiques adaptés. La précision et l'adéquation de chaque modèle polynomial décrit ci-dessus ont été évaluées par un test de « lack of fit », un test de Fisher et le coefficient de détermination ajusté  $\text{adj}R^2$ . Suivant les significativités des facteurs et les indicateurs précédents, des modèles simplifiés ont pu être mis en œuvre. De plus, les résultats obtenus de la modélisation ont été représentés sous forme de surfaces de réponse.

## 6.2. Modélisation GAM

La cinétique fermentaire et la cinétique de production des composés volatils ont été modélisées par des modèles additifs généralisés (GAMs ; Wood, 2017). En effet, chaque fermentation produit des courbes non linéaires complexes et les GAMs sont plus flexibles que les modèles linéaires classiques ou les modèles linéaires généralisés.

Nous avons utilisé des GAMs hiérarchiques (Pedersen et al., 2019) : ces modèles permettent aux relations fonctionnelles lisses entre un prédicteur et une réponse de varier entre les groupes, de telle sorte que les différentes fonctions sont en quelque sorte regroupées vers une forme commune. En effet, nous voulons savoir comment les relations fonctionnelles varient entre les groupes, et si une relation se maintient entre les groupes.



Plusieurs modèles peuvent être utilisés pour répondre à ces questions, et nous avons décidé d'utiliser ce qui est appelé un " modèle GS " par Pedersen et al., 2019. Dans un modèle GS, la relation entre un prédicteur X et une réponse Y par la somme d'un lisseur global et de lisseurs au niveau du groupe a été modélisée. Chaque lisseur au niveau du groupe est associé à un niveau d'un facteur de regroupement dans le modèle.

Dans ce travail, plusieurs réponses ont été étudiées. Tout d'abord, pour étudier la cinétique fermentaire, nous avons modélisé le débit de CO<sub>2</sub> en fonction du sucre consommé : la réponse Y est le débit de CO<sub>2</sub> et le prédicteur X est le sucre consommé. Ensuite, pour étudier la cinétique de production des arômes, nous avons modélisé la concentration dans le liquide ( $C^{liq}$ ), les pertes ( $L$ ) et la production totale ( $P$ ) (mg/L) de composés volatils en fonction du CO<sub>2</sub> dégagé (g/L) : Y est  $C^{liq}$ ,  $L$  ou  $P$ , et X est le CO<sub>2</sub> dégagé.

Deux types de modèle GS ont été utilisés. Pour le premier type de modèle, nous avons un seul facteur de regroupement dans le modèle qui correspond à la combinaison observée de T°C, NO et Nad. Le tableau x montre que 15 fermentations ont été réalisées, correspondant à 13 combinaisons des trois facteurs (une combinaison est répétée 3 fois). Si l'on désigne par  $i$  la combinaison des trois facteurs et  $j$  la répétition, la formule de ce modèle est donnée par :

**Modèle GS1 :**

$$Y_{ij} = f(x_{ij}) + f_i(x_{ij}) + \epsilon_{ij}$$

Avec  $i = 1, \dots, 13 ; j = 1, 2, 3$

Où  $f$  est le lisseur global et  $f_i$  le lisseur spécifique à la  $i^{\text{ème}}$  combinaison des trois facteurs. La fonction globale doit être considérée comme un résumé utile de la tendance moyenne à travers les groupes, c'est-à-dire comme une tendance moyenne. La  $i^{\text{ème}}$  fonction spécifique au groupe représente la déviation spécifique au groupe par rapport à la fonction globale.

Pour le deuxième type de modèle, nous avons trois facteurs de regroupement avec trois niveaux chacun (T°C, NO, Nad) et leurs interactions avec 9 niveaux chacune (T°C\*NO, T°C\*Nad et Nad\*NO). Si l'on désigne par  $i$  le niveau de T°C,  $j$  le niveau de NO,  $k$  le niveau de Nad et  $l$  la répétition, la formule de ce modèle est donnée par :

**Modèle GS2 :**

$$Y_{ijkl} = f(x_{ijkl}) + f_i(x_{ijkl}) + f_j(x_{ijkl}) + f_k(x_{ijkl}) \\ + f_{ij}(x_{ijkl}) + f_{ik}(x_{ijkl}) + f_{jk}(x_{ijkl}) \\ + \epsilon_{ijkl}$$

Avec  $i = 18, 23, 28 ; j = 70, 140, 210 ; k = 50, 100, 150 ; l = 1, 2, 3$

Où  $f$  est le lisseur global,  $f_i$  un lisseur spécifique pour le  $i^{\text{ème}}$  niveau de T°C,  $f_j$  un lisseur spécifique pour le  $j^{\text{ème}}$  niveau de NO,  $f_k$  un lisseur spécifique pour le  $k^{\text{ème}}$  niveau de Nad,  $f_{ij}$

un lisseur spécifique pour le niveau d'interaction  $i*j$  entre T°C et NO,  $f_{ik}$  un lisseur spécifique pour le niveau d'interaction  $i*k$  entre T°C et Nad et  $f_{jk}$  un lisseur spécifique pour le niveau d'interaction  $j*k$  entre NO et Nad.

Dans les deux types de modèles GS1 et GS2, nous avons un lisseur global représentant la tendance moyenne à travers les groupes. La principale différence entre eux est que dans GS1 nous n'avons qu'un seul facteur de regroupement qui est la combinaison de T°C, NO et Nad, alors que dans GS2 ce facteur de regroupement est décomposé en trois facteurs de regroupement (T°C, NO, Nad) et leurs interactions.

Par conséquent, nous n'avons qu'une seule fonction spécifique au groupe dans GS1, alors que nous avons 6 fonctions spécifiques au groupe dans GS2. Cela permet de décomposer la fonction spécifique au groupe, afin de comprendre quels facteurs et/ou interactions sont pertinents pour expliquer les déviations de la tendance moyenne.

Pour chaque réponse (la cinétique fermentaire et les suivis en lignes des composés volatils), les modèles GS1 et GS2 sont cohérents entre eux et complémentaires. En effet, nous avons vérifié que les prédictions obtenues avec les deux modèles sont quasi similaires, et les AIC (Akaike information criterion) des deux modèles sont également très proches. Les 2 modèles étant très cohérents nous avons pu raisonner en utilisant les spécificités de chacun pour répondre à notre question.

Le modèle GS2 a été utilisé une seconde fois pour analyser les cinétiques fermentaires et les courbes de production d'arômes d'une troisième expérience combinant les 2 facteurs anisothermie et ajout d'azote. Pour cela, nous avons deux facteurs de regroupement avec huit niveaux pour les profils de température (T) et deux niveaux pour l'ajout d'azote (Nad) mais sans interaction.

Si l'on désigne par  $i$  le niveau de T,  $j$  le niveau de Nad, la formule de ce modèle est donnée par :

$$Y_{ijl} = f(x_{ijl}) + f_i(x_{ijl}) + f_j(x_{ijl}) + \epsilon_{ijl}$$

$$\text{Avec } i = 1, \dots, 8; j = 1, 2$$

Où  $f$  est le lisseur global,  $f_i$  un lisseur spécifique pour le  $i^{\text{ème}}$  niveau de T,  $f_j$  un lisseur spécifique pour le  $j^{\text{ème}}$  niveau de Nad.

Ces analyses ont été exécutées dans R (versions 4.0.2 et 4.2.1) avec le package mgcv (Wood, 2017).

---

# Résultats

---

# Chapitre 1 :

## Étude de l'impact du timing d'ajout d'azote sur la production d'arômes fermentaires

Ce premier chapitre de thèse s'intéresse à l'effet de l'azote assimilable en fermentation alcoolique. Dans ce travail, les effets directs et d'interaction de trois facteurs ont été évalués : (1) teneur en azote initial (70, 140 et 210 mg/L) ; (2) timing d'ajout d'azote (réalisé à 20, 35 et 50 g/L de CO<sub>2</sub> dégagé) et (3) concentration en azote ajouté (50, 100 et 150 mg/L). Les trois timings d'ajouts choisis correspondent respectivement au 1/3, 1/2 et 3/4 de la phase stationnaire de fermentation.

Dans cette étude, un plan d'expérience de type Box-Behnken a été utilisé afin d'optimiser le nombre d'expériences réalisées et construire un modèle statistique. De plus, une analyse transcriptomique a été effectuée afin d'aller plus loin dans la compréhension des effets de l'ajout d'azote sur le métabolisme de la levure.

Nos résultats montrent que le métabolisme de l'azote, le métabolisme carboné central (MCC), la cinétique de fermentation et la production d'arômes sont significativement influencés par l'ajout d'azote. De façon notable, ce travail met en évidence une régulation différente de la bioconversion des alcools supérieurs en esters d'acétate, d'une part, et des acides gras en esters d'éthyles d'autre part. La conversion des alcools supérieurs en esters est maximale lorsque l'azote est ajouté en début de phase stationnaire. A l'inverse, la conversion des acides gras en esters est plus importante pour un ajout au ¾ de la phase stationnaire.

Ce travail a fait l'objet d'une publication intitulée « Godillot, J., Sanchez, I., Perez, M., Picou, C., Galeote, V., Sablayrolles, J. M., ... Mouret, J. R. (2022). **The Timing of Nitrogen Addition Impacts Yeast Genes Expression and the Production of Aroma Compounds During Wine Fermentation.** *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.829786> ».



# The Timing of Nitrogen Addition Impacts Yeast Genes Expression and the Production of Aroma Compounds During Wine Fermentation

Joséphine Godillot<sup>1</sup>, Isabelle Sanchez<sup>2</sup>, Marc Perez<sup>1</sup>, Christian Picou<sup>1</sup>, Virginie Galeote<sup>1</sup>, Jean-Marie Sablayrolles<sup>1</sup>, Vincent Farines<sup>1</sup> and Jean-Roch Mouret<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> SPO, INRAE, L'Institut Agro Montpellier, Université de Montpellier, Montpellier, France, <sup>2</sup> MISTEA, INRAE, L'Institut Agro Montpellier, Montpellier, France

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Lisa Solieri,  
University of Modena and Reggio  
Emilia, Italy

### Reviewed by:

Marilena Budroni,  
University of Sassari, Italy  
Vicente Ferreira,  
University of Zaragoza, Spain

### \*Correspondence:

Jean-Roch Mouret  
jean-roch.mouret@inrae.fr

### Specialty section:

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

**Received:** 06 December 2021

**Accepted:** 31 January 2022

**Published:** 22 February 2022

### Citation:

Godillot J, Sanchez I, Perez M, Picou C, Galeote V, Sablayrolles J-M, Farines V and Mouret J-R (2022) The Timing of Nitrogen Addition Impacts Yeast Genes Expression and the Production of Aroma Compounds During Wine Fermentation. *Front. Microbiol.* 13:829786. doi: 10.3389/fmicb.2022.829786

Among the different compounds present in the must, nitrogen is an essential nutrient for the management of fermentation kinetics but also plays an important role in the synthesis of fermentative aromas. To address the problems related to nitrogen deficiencies, nitrogen additions during alcoholic fermentation have been implemented. The consequences of such additions on the main reaction are well known. However, their impact on aromas synthesis is still poorly understood. So, the main objective of this study was to determine the impact of nitrogen addition during the stationary phase on both the fermentation kinetics and aroma synthesis. To reach this goal, we used a transdisciplinary approach combining statistical modeling (Box-Behnken design and response surface modeling) and gene expression study (transcriptomic analysis). Our results indicated that nitrogen metabolism, central carbon metabolism (CCM), fermentation kinetics and aroma production were significantly impacted by nitrogen addition. The most remarkable point was the different regulation of the bioconversion of higher alcohols into acetate esters on one hand and of fatty acids into ethyl esters on the other hand. We highlighted that the conversion of higher alcohols into acetate esters was maximum when nitrogen was added at the beginning of the stationary phase. Conversely, the highest conversion of acids into ethyl esters was reached when nitrogen was added close to the end of the stationary phase. Moreover, even if the key element in the production of these two ester families appeared to be the enzymatic activity responsible for their production, rather than the availability of the corresponding precursors, these enzymatic activities were differently regulated. For acetate esters, the regulation occurred at gene level: the *ATF2* gene was overexpressed following nitrogen addition during the stationary phase. On the opposite, no induction of gene expression was noted for ethyl esters; it seemed that there was an allosteric regulation.

**Keywords:** wine, alcoholic fermentation, nitrogen, fermentative aromas, Box-Behnken design, transcriptomic analysis

## INTRODUCTION

In recent years, consumer interest in fruity wines has been growing steadily. The main actors of the fruity organoleptic properties are the aromas produced during the fermentation process. Among the different volatile compounds produced by the yeast, esters (acetate and ethyl esters) are the compounds mostly responsible for fruity aromas of young wines (Swiegers et al., 2005; Ugliano et al., 2010). The synthesis of these different aromas depends in part on the yeast strain (Massoutier et al., 1998; Lambrechts and Pretorius, 2000), the composition of the must (Rollero et al., 2015), the fermentation temperature (Molina et al., 2007; Morakul et al., 2011; Mouret et al., 2014a), but is also highly impacted by nitrogen, which is the limiting nutrient for yeast growth in enological conditions (Bely et al., 1990b; Mouret et al., 2014a; Gobert et al., 2019).

Nitrogen in organic (amino acids) or mineral (ammonium) forms is already naturally present in the grape must, but extra nitrogen is sometimes added to overcome the problem of slow fermentations (Salmon, 1989; Bely et al., 1990b; Varela et al., 2004). Moreover, many studies have shown that an addition of nitrogen at the start of the fermentation has important effects on the synthesis of fermentative aromas (Rollero et al., 2015; Gobert et al., 2019). Production of higher alcohols as a function of nitrogen content is not linear: below a threshold value (from 200 to 300 mgN/L), alcohol synthesis increases with nitrogen content, but above this value, alcohol production decreases (Vilanova et al., 2007, 2012; Rollero et al., 2015). The behavior of propanol is very different from that of the other higher alcohols; it can be considered as a marker of assimilable nitrogen availability (Mouret et al., 2014b) as its synthesis is related to the quantity and quality of available nitrogen. Its maximum concentration is reached when all nitrogen has been consumed by the yeast at the end of the growth phase corresponding to around 30% sugar consumption (Mouret et al., 2014b; Seguinot et al., 2018) whereas the other higher alcohols are continuously synthesized throughout the fermentation process (Mouret et al., 2014b). Conversely, ester production is directly correlated to and increases with the initial nitrogen content (Hernandez-Orte et al., 2006; Torrea et al., 2011; Rollero et al., 2015).

Research works have also been carried out to evaluate the impact of nitrogen additions performed during the stationary phase. These additions have been shown to be extremely effective for fermentation kinetics on one hand, since nitrogen will reduce the fermentation time (Bely et al., 1990a; Malherbe et al., 2004), but on the other hand, these additions also impact aroma production (Hernandez-Orte et al., 2006; Jiménez-Martí et al., 2007; Seguinot et al., 2018). Indeed, the effect of such an addition on acetate esters is very significant and consistently increases their concentration. Seguinot et al. (2018) showed that the concentration of isoamyl acetate increased from 1.5 mg/L to 4 mg/L after ammonium addition during the stationary phase. Propanol synthesis is also highly stimulated following an inorganic nitrogen addition whereas the concentration of the other higher alcohols remains unchanged (Seguinot et al., 2018).

While the effect of the initial nitrogen addition has been well explored, little has been done regarding the impacts of the timing and of the quantity of nitrogen added during the

stationary phase. So, to get a deeper understanding of the effect of these nitrogen additions, we implemented a multidisciplinary approach combining bioprocess management, aroma analysis and study of gene expression. A Box-Behnken experimental design was used to evaluate the direct and interaction effects of three parameters: initial nitrogen concentration, added nitrogen concentration and timing of nitrogen addition during the stationary phase. The effect of these three parameters on fermentation kinetics and aroma production was analyzed. A complementary transcriptomic analysis was also performed to understand in more details nitrogen effect on yeast metabolism.

## MATERIALS AND METHODS

### Yeast Strain

The *Saccharomyces cerevisiae* strain used in this study is the commercial strain Lalvin EC-1118 (Lallemand SA, Montreal, Canada). Fermentation tanks were inoculated with 10 g/hL active dry yeast previously rehydrated for 30 min at 37°C in a 50 g/L glucose solution.

### Fermentation Media

All fermentations were carried out in synthetic musts simulating a standard grape juice (Bely et al., 1990a). The detailed compositions of the different stock solutions used for the preparation of this synthetic medium are identical to the ones presented in Mouret et al. (2014b). All musts contained 180 g/L of sugars (90 g/L glucose and 90 g/L fructose) and their pH was 3.3. Three initial assimilable nitrogen (composed of ammonium chloride and mixture of amino acids) concentrations were tested: 70, 140, and 210 mgN/L, respectively, corresponding to media SM70, SM140, and SM210. The proportions of the different sources were identical in all three media.

### Fermentation Conditions

The fermentations were performed in 1.2 L glass fermenters with 1 L of medium at 24°C. CO<sub>2</sub> release was accurately measured from an automatic online monitoring of weight loss (Sablayrolles et al., 1987).

Different concentrations – 50, 100, and 150 mgN/L – of mineral nitrogen (di-ammonium phosphate) were added at different timings of the stationary phase: 20, 35, and 50 g/L of produced CO<sub>2</sub> (corresponding, respectively, to 24, 42, and 60% of fermentation progress). Nitrogen additions were performed automatically by means of a pump on which a syringe containing the nitrogen solution was placed.

The data summarizing the fermentation kinetics are stored in the ALFIS database<sup>1</sup>. Thanks to this database and the use of a custom R program, we retrieved the key points of the fermentation kinetics (V<sub>max1</sub>, dV<sub>max</sub>, and Fermentation time).

### Cell Population

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

<sup>1</sup><http://alfis.supagro.inra.fr/fermentation/>

## Measurement of Assimilable Nitrogen

Ammonium concentration was determined enzymatically (R-Biopharm, Darmstadt, Germany). The free amino acid content was determined by cation exchange chromatography, with post-column ninhydrin derivatization (Biochrom 30, Biochrom, Cambridge, United Kingdom) as described by Crépin et al. (2012).

## Determination of Metabolite Compounds

Ethanol, glycerol, succinate, and acetate concentrations were determined by HPLC (HPLC 1290 Infinity, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, United States) in a Phenomenex Rezex ROA column (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, United States) 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. The acetate concentration was determined with a UV meter at 210 nm; the concentrations of the other compounds were determined with a refractive index detector. Analysis was carried out with the Agilent EZChrom software package.

## Analysis of Volatile Compounds

The analysis of fermentative aromas was performed following the method described by Rollero et al. (2015). First, the volatile compounds were extracted with dichloromethane. Then, the concentrations of fermentative aromas were measured via GC/MS in SIM mode using a DB-WAX GC column. Thirty-five compounds were quantified using internal deuterated standards.

## Experimental Design

Statistical analysis was performed with R software, version 4.0.2 (R Development Core Team, 2012) and the rsm library (Lenth, 2009).

A Box-Behnken experimental design was applied to investigate the effects of three independent variables (initial

nitrogen, timing and concentration of nitrogen addition) and calculate the optimal combination of treatment conditions for fermentation kinetics, the production of central carbon metabolism (CCM) metabolites and volatile compounds, with a limited number of experimental runs. A total of 16 experiments were performed, including four at the center of the experimental domain. In this experimental design, there were three coded factor levels: -1, 0, +1 in which -1 corresponded to the low level of each factor, +1 to the high level, and 0 to the mid-level. The actual level of each factor was calculated with the following equation (Eq. 1) (Box and Behnken, 1960):

$$\text{Actual level} = \text{Coded value} \times \frac{\text{High value} - \text{low value}}{2} + \frac{\text{High level} - \text{low level}}{2}$$

The effect of the three independent variables on each measured parameter (Y) was modeled with a polynomial response surface (Eq. 2):

$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{23}x_2x_3 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{33}x_3^2 + \varepsilon$$

Where  $x_1$ ,  $x_2$ , and  $x_3$  represent the coded values of initial nitrogen content, timing of nitrogen added and concentration of nitrogen added, respectively, Y is the predicted response,  $\beta_0$  the intercept term,  $\beta_i$  the linear coefficient,  $\beta_{ii}$  the quadratic coefficient, and  $\beta_{ij}$  the interaction coefficient ( $i = 1, 2, \text{ and } 3$ ) and  $\varepsilon$  are independent N (0,  $\sigma^2$ ) distributed error terms. When necessary, a simplified model was fitted for some compounds by suppressing the interactive terms of the equation according to validity criteria. In addition, the normality of residual distributions and homogeneity of variance were studied with standard diagnostic graphs; no violation of the assumptions was detected. The accuracy and general ability of each polynomial model described above was evaluated by a lack of fit test, the Fisher test and the adjusted coefficient of determination  $\text{adj}R^2$ . The reliability of the fitted models was overall very good: each polynomial model gave a non-significant lack of fit test at a 0.05 threshold, a significant Fisher test at a 0.05 threshold and a range of  $\text{adj}R^2$  between 57 and 99%. For graphical representations of the surface responses, a custom version of the persp() function was used.

## RNA Extraction and Microarray Assay

Two types of fermentations were performed to study the expression of yeast genes following nitrogen addition (150 mgN/L of added nitrogen). The first was conducted with an addition at 20 g/L of produced CO<sub>2</sub> and the second with an addition at 50 g/L of produced CO<sub>2</sub>. These fermentations were carried out with 140 mgN/L initial assimilable nitrogen and were performed in triplicate. Cells were harvested 2 h after nitrogen additions. We also implemented a control without nitrogen addition to better understand its impact on gene expression. To be able to compare the conditions with/without additions in the

**TABLE 1** | Experimental conditions for the 16 fermentations.

Experiments	Initial nitrogen (NO), mg/L	Timing of addition (Tm), CO <sub>2</sub> g/L	Nitrogen added (Nad), mg/L
1	210	35	150
2	210	50	100
3	210	20	100
4	140	20	150
5	140	50	150
6 <sup>1</sup>	140	35	100
7 <sup>2</sup>	140	35	100
8 <sup>3</sup>	140	35	100
9 <sup>4</sup>	140	35	100
10	210	35	50
11	140	20	50
12	140	50	50
13	70	35	150
14	70	20	100
15	70	50	100
16	70	35	50

1–4 Four replicates included at the center of the experimental domain.

most accurate way, we took samples from the control according to the fermentation progress and not according to the time after additions.

The total RNA extraction and microarray assay protocols were performed with the method used by Rollero et al. (2016) and Duc et al. (2017).

## Statistical Analysis of Microarray Data

The R4.0.2 software was used for statistical analyses.

The limma package was used to import and normalize the overall microarray data (quantile method for interarray normalization). The dataset is available in the Gene Expression Omnibus Database (GSE189010). To determine the differential gene expression between experimental conditions, a modified *t*-test was performed by filtering on confidence at  $p < 0.05$ , using the Benjamini and Hochberg false discovery rate as multiple testing corrections of the *t*-test *p*-values. The genes with different levels of expression were grouped according to gene ontology (GO) process terms using the GeneCodis program (García-Moreno et al., 2021)<sup>2</sup>.

## RESULTS

We investigated the cross-impacts of the initial nitrogen concentration (N0), the timing of nitrogen addition (Tm) and the concentration of added nitrogen (Nad) during the stationary phase on fermentation kinetics, central carbon metabolism, aromas production and yeast gene expression.

Nitrogen and sugars were exhausted at the end of all fermentations. Final concentrations of ethanol were identical in all the conditions.

### Effects of Nitrogen Addition on Fermentation Kinetics, Cell Count, and Metabolites of the Central Carbon Metabolism

A response surface model was used on the three factors with a Box-Behnken design (Table 1). The repetition of the four experiments corresponding to the central point of the design makes it possible to estimate the repeatability of the experiments. The fermentation kinetics obtained for these experiments were reproducible (Figure 1A) as were also cell counts ( $8.88 \cdot 10^7 \pm 0.80 \cdot 10^7$  cells/mL). The analysis showed a good reproducibility and non-significant lack-of-fit tests at a 5% threshold as well as great adjusted  $R^2$  thus allowing us to interpret the various models fitted.

To evaluate the impact of the three studied parameters, we calculated different kinetic parameters: the first maximum CO<sub>2</sub> production rate (Vmax1), the recovery rate after addition (Vmax2) and the total fermentation time (Figure 1B). Nevertheless, to evaluate the efficiency of nitrogen additions during the stationary phase, we calculated additional parameters. The first parameter was “dVmax,” i.e., the difference between

the values of Vmax1 and Vmax2 (Figure 1B). The second parameter was “dPop,” the difference in population before and after obtaining the second maximum rate of CO<sub>2</sub> production.

At first, we observed that Vmax1 increased with the initial nitrogen concentration (Table 2), as already shown in previous studies (Bely et al., 1990a; Mendes-Ferreira et al., 2004). Vmax1 was 0.5 g/L.h for an initial nitrogen concentration of 70 mg/L, while it reached 1.5 g/L.h for a 210 mg/L concentration (Figure 1B). Obviously, Tm and Nad had no effect on Vmax1 as nitrogen additions were systematically made during the stationary phase, i.e., after the first maximum CO<sub>2</sub> production rate.

On the opposite, the two other kinetic parameters calculated were statistically impacted by the three factors studied in this work. For the fermentation time and dVmax (Table 2), the model predicted a negative effect of N0 and Tm but a positive effect of Nad. For example, a high nitrogen concentration at the beginning of the fermentation resulted in a very high Vmax1, so that Vmax2 was low leading to a low dVmax (Table 2 and Figure 1B). Moreover, a late addition of nitrogen resulted in a low Vmax2 and so in a low dVmax (Table 2). Finally, Nad also had a very significant and positive influence on dVmax. Indeed, when the quantity of added nitrogen was high, the difference in velocity was high (Table 2 and Figure 1C). These comments also applied to fermentation time.

The concentration of initial nitrogen, added nitrogen and the timing of addition had important effects on fermentation kinetics and thus on the activation of yeast metabolism. This activation included effects on yeast growth and therefore on dPop. The effects of N0 and Tm on dPop were identical to the ones observed for dVmax (Table 2). On the contrary, the effect of Nad on dPop was very different; dPop was not impacted by this parameter in the range tested in this work. Finally, an addition carried out at the beginning of the stationary phase (24% of fermentation progress) resulted in cell growth, whereas no growth resumption was observed for additions carried out close to the end of the fermentation.

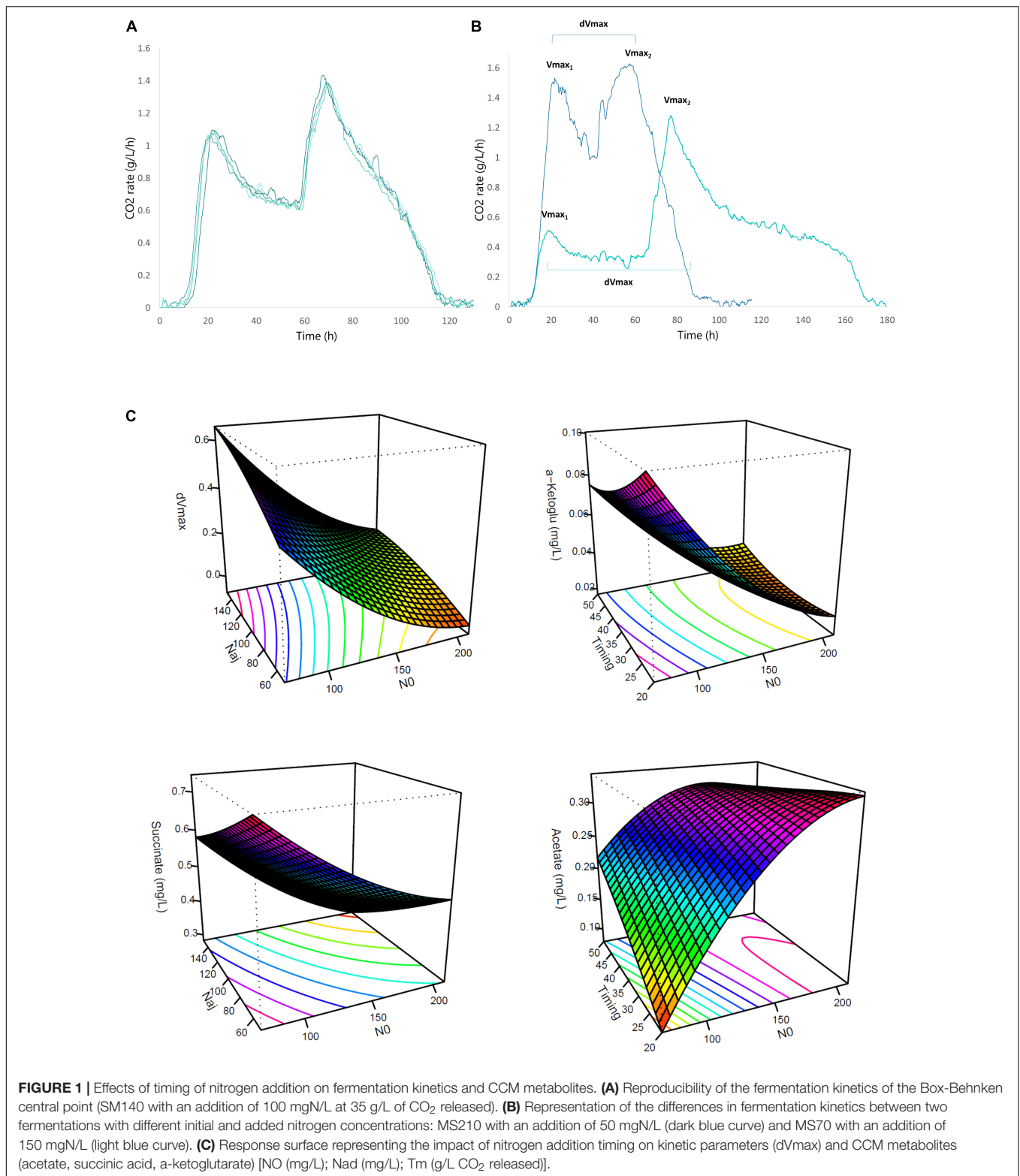
Glycerol production was similar under all conditions. However, there were production differences for  $\alpha$ -ketoglutarate, succinic acid and acetic acid. For  $\alpha$ -ketoglutarate, the model described a very significant and negative linear effect of N0 (Table 2 and Figure 1C). For succinic acid, negative effects were noted for both N0 and Nad. Finally, for acetic acid, the model described a very significant and positive effect of N0 (Table 2 and Figure 1C).

### Impact of Nitrogen Addition on Volatile Compound Production

The data presented for aroma compounds were those for which we had the most interpretable results. In addition, we had chosen these compounds because they are representative of different aroma families. So, we analyzed the production of four alcohols, two acetate esters, one acid and its corresponding ethyl ester (Table 3). Among these compounds, the three esters are involved in fruity flavor of young wines; so their study is interesting for a possible

<sup>2</sup><https://genecodis.genyo.es/>





management of aroma production wines. Despite the lack of interest from an aromatic point of view, the study of the four alcohols is important for a better understanding of yeast metabolism.

### Propanol

At first, it should be noted that the impact of nitrogen additions on propanol production was very different from the one observed for the other alcohols, as already mentioned in the literature

**TABLE 2** | Effects of three factors described by the model on fermentation kinetics and CCM metabolites.

	Simple effects			Interactions			Quadratics effects		
	N0	Tm	Nad	N0:Tm	N0:Nad	Tm:Nad	N0 <sup>2</sup>	Tm <sup>2</sup>	Nad <sup>2</sup>
Fermentation time	-	-	+	+		-		-	
Vmax1	+								
dVmax	-	-	+	-	-	-	+		-
dPop	-	-					+		
Acetate	+			-			-		
α-ketoglutarate	-						+		
Succinate	-		-						

■ p.v < 0.001, ■ p.v < 0.01, ■ p.v < 0.05.

**TABLE 3** | Effects of three factors described by the model on aroma production.

	Simple effects			Interactions			Quadratics effects		
	N0	Tm	Nad	N0:Tm	N0:Nad	Tm:Nad	N0 <sup>2</sup>	Tm <sup>2</sup>	Nad <sup>2</sup>
Propanol		+	+			+		-	-
Isoamyl alcohol	-			+		+			
Isobutanol		-		+			-		
Phenyl ethanol	+					+	-		
Isoamyl acetate		-	+						
Isobutyl acetate	+	-	+						
Hexanoic acid	+	-		-		-			
Ethyl hexanoate				+					
Isoamyl ratio	+	-	+			-		-	
Hexanoic ratio	-	+	+	+		+		+	

$Isoamyl\ ratio = \frac{Isoamyl\ acetate}{Isoamyl\ alcohol}$      $Hexanoic\ ratio = \frac{Ethyl\ hexanoate}{Hexanoic\ acid}$   
 ■ p.v < 0.001, ■ p.v < 0.01, ■ p.v < 0.05.

(Mouret et al., 2014b; Rollero et al., 2016; Seguinot et al., 2018). The production of propanol was only influenced by the factors Nad and Tm that both had a positive and very significant effect (Table 3). For example, for N0 = 70 mg/L and Nad = 100 mg/L, we observed a 26% increase for an addition at 50 g/L of CO<sub>2</sub> released (56 mg/L) compared to an addition at 20 g/L (41 mg/L). In parallel, for N0 = 140 mg/L and Tm = 20 g/L, a 50% increase was noted for an addition of 150 mg/L (55 mg/L) compared to an addition of 50 mg/L (27 mg/L) (Table 4). This result indicated that a late nitrogen addition in high concentration favored the production of this compound (Figure 2A). Furthermore, we observed an interaction effect between Nad and Tm.

### Higher Alcohols

For the three higher alcohols analyzed (isoamyl alcohol, isobutanol, and phenylethanol), the influence of nitrogen additions was different (Table 3). No effect of Nad was noted for isoamyl alcohol and isobutanol. For isoamyl alcohol, a negative linear effect of N0 was observed. There was also a positive interaction effect between N0:Tm and Tm:Nad. Indeed, for N0 = 210 mg/L and Nad = 100 mg/L, a 20% increase was observed for an addition at 50 g/L of CO<sub>2</sub> released (162 mg/L) compared to an addition at 20 g/L (129 mg/L) (Table 4). With regard to isobutanol production, a negative linear effect of timing was observed. For N0 = 70 mg/L and Nad = 100 mg/L, we noted

a 37% decrease for a late addition (45 mg/L) compared to an early addition (72 mg/L) (Table 4). Moreover, we observed an interaction effect between N0 and Tm and a negative quadratic effect of N0 (Table 3 and Figure 2A).

Finally, for phenylethanol, at a threshold of 5%, we noted a significant and positive interaction between the timing of addition and nitrogen added as well as a positive effect of the initial nitrogen. This data indicated that the maximum content of this compound was reached for a high and late addition of nitrogen. We observed a 32% increase for a late addition compared to an early addition for the same concentrations of initial (N0 = 140 mg/L) and added nitrogen (Nad = 150 mg/L) (Table 4).

### Acetate Esters

The production of the two acetate esters studied was impacted by the three fermentation parameters in nearly the same way. We note that the model described only linear effects. Isoamyl acetate was negatively influenced by Tm but positively by Nad; isobutyl acetate showed the same effects with an additional positive effect of N0 (Table 3). This data indicated that the production of acetate esters was favored with an early addition of nitrogen in high concentration (Figure 2A). For N0 = 140 mg/L, we observed an increase of 27 and 34%, respectively, for an early addition of 150 mg/L compared to an early addition of 50 mg/L (Table 4).

**TABLE 4** | Final concentration of volatile compounds (mg/L).

N0	Tm	Nad	Propanol (mg/L)	Phenyl ethanol (mg/L)	Isobutanol (mg/L)	Isobutyl acetate (mg/L)	Isobutyl ratio (mg/L)	Isoamyl alcohol (mg/L)	Isoamyl acetate (mg/L)	Isoamyl ratio (mg/L)	Hexanoic acid (mg/L)	Ethyl hexanoate (mg/L)	Hexanoic ratio (mg/L)
210	35	150	67.6	99.6	53.4	0.152	0.00284	103.4	1.66	0.0160	1.651	0.818	0.496
210	50	100	53.5	106.7	68.2	0.160	0.00234	162.9	1.88	0.0116	1.023	0.908	0.887
210	20	100	45.8	82.2	62.1	0.164	0.00264	129.1	1.82	0.0141	2.472	0.726	0.294
140	20	150	55.5	85.0	70.7	0.192	0.00271	141.6	2.00	0.0141	1.708	0.743	0.435
140	50	150	70.8	125.0	59.3	0.101	0.00170	150.0	1.29	0.0086	0.502	0.687	1.367
140	35	100	51.9	109.6	73.1	0.181	0.00248	179.9	1.87	0.0104	0.932	0.695	0.746
140	35	100	49.7	119.5	73.4	0.142	0.00193	169.6	1.73	0.0102	1.054	0.709	0.673
140	35	100	52.8	117.4	68.0	0.145	0.00213	161.4	1.62	0.0100	1.225	0.741	0.605
140	35	100	49.6	98.4	64.6	0.142	0.00220	152.3	1.51	0.0099	1.345	0.687	0.511
210	35	50	32.2	101.0	59.3	0.134	0.00227	132.3	1.44	0.0109	1.915	0.675	0.353
140	20	50	27.7	122.7	84.5	0.126	0.00150	206.1	1.45	0.0070	1.029	0.778	0.756
140	50	50	29.7	97.7	52.7	0.095	0.00179	132.4	1.10	0.0083	1.177	0.692	0.588
70	35	150	68.6	79.6	60.8	0.147	0.00241	171.5	2.04	0.0119	1.035	0.769	0.743
70	20	100	41.2	83.5	72.6	0.103	0.00142	195.8	1.49	0.0076	1.034	0.834	0.807
70	50	100	56.5	80.4	45.3	0.068	0.00150	140.7	0.75	0.0053	0.597	0.568	0.952
70	35	50	26.9	73.9	53.3	0.074	0.00139	155.5	0.90	0.0058	1.133	0.677	0.598
<b>Central point of the model</b>													
Average			51.0	111.2	69.8	0.153	0.00219	165.8	1.68	0.0101	1.139	0.708	0.634
Standard error			1.6	9.6	4.2	0.019	0.00023	11.7	0.153	0.0002	0.182	0.024	0.100
Coefficient of variation (%)			3.14	8.6	6.08	12.6	10.4	7.08	9.08	2.01	16	3.37	15.8

### Fatty Acid and Ethyl Ester

For hexanoic acid, the model described both linear and interaction effects. The production of this acid was positively impacted by N0 and negatively by Tm. For N0 = 210 mg/L and Nad = 100 mg/L, we observed a 58% increase for an early addition (2.47 mg/L) compared to a late addition (1.02 mg/L) (Table 4). There was also an interaction effect between these two factors and between Tm and Nad. By contrast, the production of the corresponding ester, ethyl hexanoate, did not present the same profile at all, as there was only a positive interaction effect between N0 and Tm (Table 3), indicating that the effect of the timing depended on the initial nitrogen concentration.

### Ratio Between Esters and Their Precursors

To better understand the effect of nitrogen additions on the production of acetate esters and ethyl esters, we studied the ratios between the production of these esters (acetate ester and ethyl ester) divided by the production of their precursors (i.e., the corresponding higher alcohol or acid, respectively).

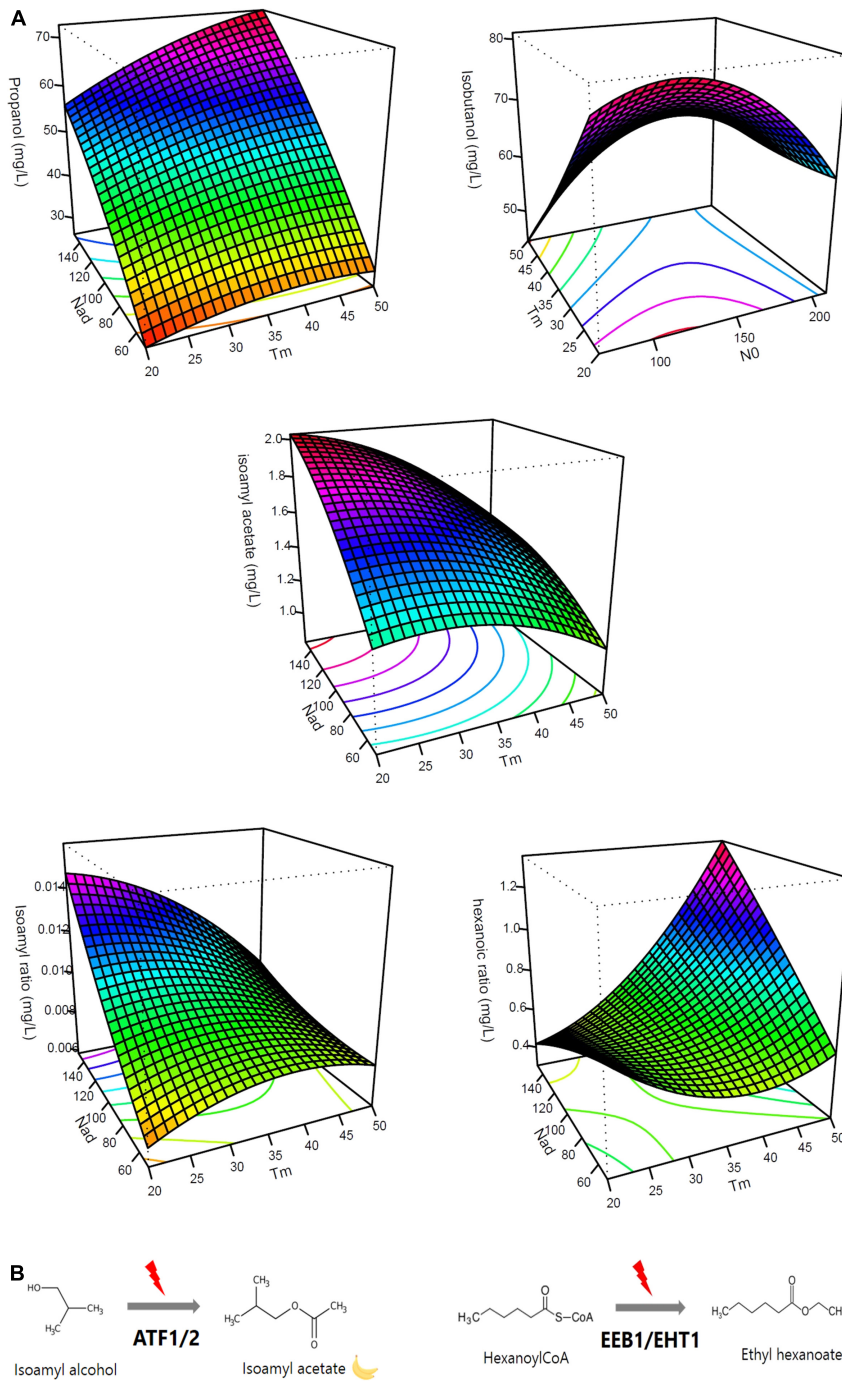
For the ratio isoamyl acetate/isoamyl alcohol (Table 3), we noted that N0 and Nad factors had significant and positive linear effects while the Tm factor had a negative one (Table 3). These results indicated that a greater conversion of higher alcohols into esters (Figure 2B) was observed for a high initial nitrogen concentration and a high amount of added nitrogen (Figure 2A). For N0 = 210 mg/L and Tm = 35 g/L, we observed a 32% increase for a nitrogen addition of 150 mg/L compared to an addition of 50 mg/L (Table 4). Furthermore, an early addition seems to maximize this ester/alcohol ratio (increase of 30% for an early addition compared to a late addition of 100 mg/L of nitrogen and N0 = 70 mg/L) (Figure 2A).

Looking at the ratio between ethyl hexanoate and hexanoic acid, it can be seen that all three factors had significant linear effects but that these effects were very different from those of the ratio between an acetate ester and a higher alcohol. For the ratio between ethyl hexanoate and hexanoic acid, N0 had a negative effect. Conversely, the Tm and Nad factors had a significant and positive linear effect (Table 3). In addition, there were very significant interaction effects between the Nad and Tm factors as well as a quadratic effect of the Tm factor (Figure 2A). We observed a 66% increase for a late addition (0.88) compared to an early addition (0.29) for N0 = 210 mg/L and Nad = 100 mg/L (Table 4). This result indicated that the conversion (Figure 2B) increased for a late nitrogen addition at a high level (Figure 2A).

### Effects of Nitrogen Additions on Gene Expression

To better understand the results obtained thanks to the Box-Behnken model, we compared the overall expression patterns by microarray analyses using three biological replicates. The impact of the timing of nitrogen addition on the expression of all yeast genes was studied. It can be observed that 17% of total genes were differentially expressed.

Venn diagrams were created to see which cellular functions were induced or repressed by nitrogen addition and to evaluate the impact of the addition timing. The first diagram represents induced genes and the second repressed genes (Figure 3A). In the first diagram, 51% of induced genes were common to both addition timings and represented amino acid biosynthetic functions and metabolic pathways. 25% of genes were induced after an addition at the beginning of the stationary phase and 24% exclusively after an addition at the end of the stationary

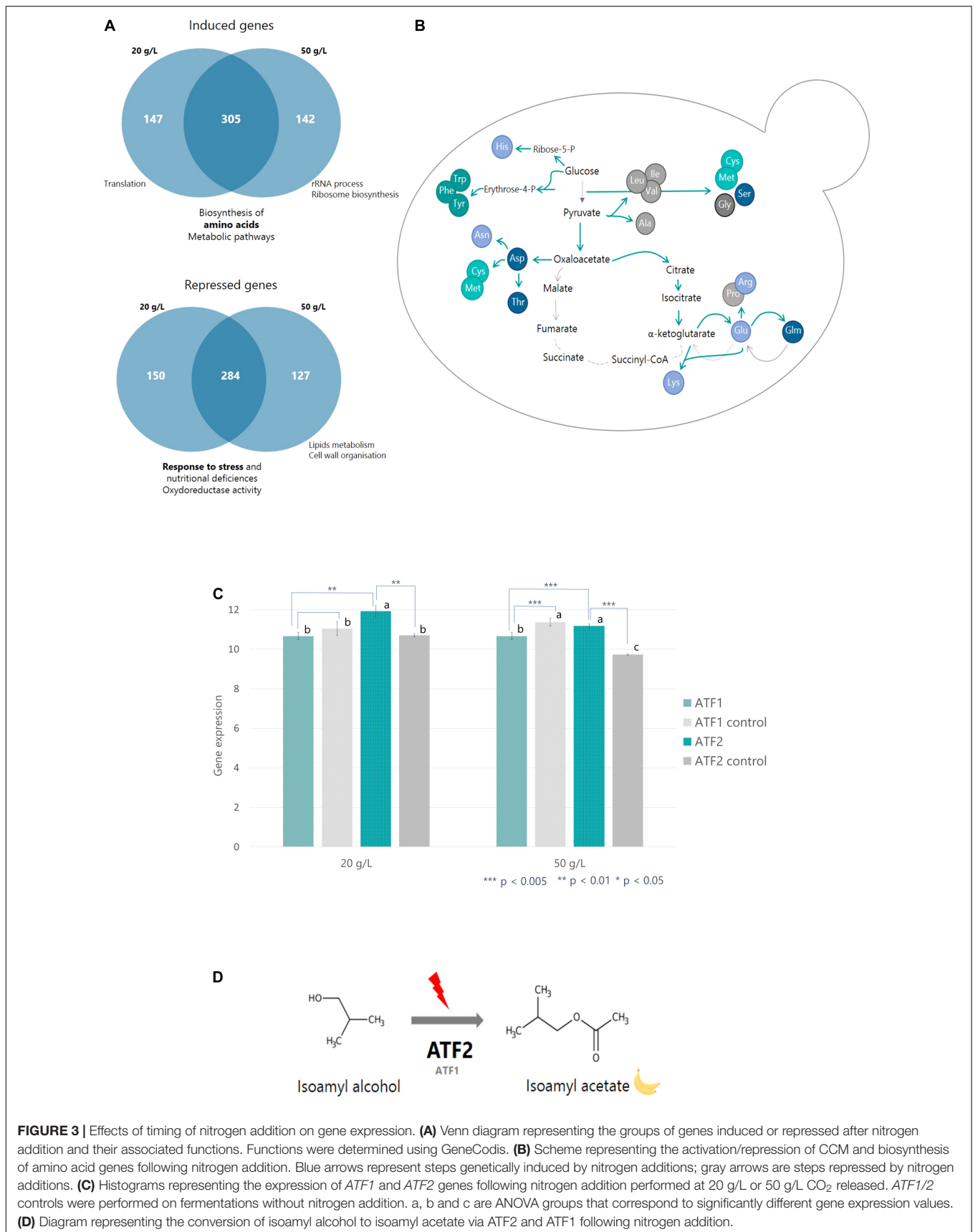


**FIGURE 2 |** Effects of timing of nitrogen addition on aroma production. **(A)** Response surface representing the impact of nitrogen addition timing on aroma productions (propanol, isoamyl alcohol, isoamyl acetate, isoamyl ratio, and hexanoic ratio) [NO (mg/L); Nad (mg/L); Tm (g/L CO<sub>2</sub> released)]. **(B)** Diagram representing the conversion of isoamyl alcohol to isoamyl acetate via the ATF1 and ATF2 enzymes and the conversion of hexanoyl-CoA to ethyl hexanoate via EEB1 and EHT1 enzymes.

phase. These genes corresponded to translation and ribosomal RNA synthesis functions, respectively.

In the second diagram, 28% of genes involved in stress response and nutritional deficiencies as well as oxidoreductase activity were repressed after an addition at the beginning of

the stationary phase. The genes common to both timings (50%) are involved in the same functions. Finally, 22% of genes repressed after an addition close to the end of the fermentation were genes involved in lipid metabolism and cell wall organization (**Figure 3A**).



## Impact of Nitrogen Addition Timing on Gene Expression Coding for Proteins Involved in the Pathway of Central Carbon Metabolism and Biosynthesis of Amino Acids

To understand in more detail the effect of nitrogen addition on yeast metabolic fluxes, the expression of genes coding for the enzymes involved in glycolysis, the Krebs cycle and amino acid synthesis was examined.

After nitrogen addition and whatever its timing, the expression of the genes encoding glycolysis enzymes did not change, suggesting that the glycolytic flux was permanently activated. On the other hand, regarding the Krebs cycle enzymes, the genes encoding pyruvate synthesis up to  $\alpha$ -ketoglutarate (*PYC1*, *PYC2*, *CIT2*, and *ACO2*) were overexpressed (**Figure 3B**). Expression of *GDH1* and *GDH3* genes, encoding the enzymes responsible for glutamate synthesis, also increased significantly. Conversely, expression of genes involved in succinate, fumarate, and malate biosynthesis (*GDH2*, *KGD1-2*, *LSC1-2*, *SDH1-4*, and *MDH1-2*) was repressed (**Figure 3B**).

## Impact of Nitrogen Additions on Expression of Genes Encoding Proteins Involved in the Pathway of Volatile Compounds

In this work, we observed that the addition of nitrogen enabled the activation of metabolic flux toward amino acid synthesis. The resulting amino acids can also be converted to aldehydes and then to higher alcohols via ketoacids (Bloem et al., 2016). The formation of aldehydes from ketoacids is catalyzed by the family of aminotransferases (ARO enzymes). The *ARO8* gene, coding for the enzyme responsible for the conversion of phenylalanine into phenylpyruvate, was induced by nitrogen addition regardless of the timing of addition. The formation of aldehydes can also be catalyzed by the enzymes encoded by the *PDC1* and *PDC5* genes. The expression of these two genes as well as that of the genes coding for the ADH family of enzymes (formation of higher alcohols from aldehydes) was not impacted by the addition of nitrogen. However, one gene of this ADH family, the *ADH5* gene, was induced by the addition of nitrogen regardless of the time of addition (20 or 50 g/L of released CO<sub>2</sub>).

Then, we looked at the *ATF1* and *ATF2* genes, coding for the enzymes responsible for the formation of acetate esters from higher alcohols (**Figure 3C**). While *ATF1* expression was not modified by nitrogen addition, *ATF2* gene was overexpressed in the two conditions, with a higher increase in addition realized at the beginning of the stationary phase (**Figure 3C**).

Finally, the expression of the *EEB1* and *EHT1* genes coding for the enzymes responsible for the conversion of acids to ethyl esters was also examined but no effect of nitrogen addition was observed.

## DISCUSSION

The aim of our study was to better understand the impact of nitrogen addition during stationary phase on yeast metabolism and especially on fermentative aromas synthesis. To reach

this goal, we combined the use of statistical modeling and transcriptomic analysis.

## Cell Population and Central Carbon Metabolism

We first looked at the effects of nitrogen addition during the stationary phase on growth and the main fermentation kinetics. Following any nitrogen addition, this nutrient was quickly and entirely consumed to produce amino acids, as indicated by transcriptomic analyses showing that the genes coding for enzymes involved in amino acids biosynthesis were systematically overexpressed whatever the timing of nitrogen addition. Nevertheless, our results indicated that an early nitrogen addition induced an increase in the cell population whereas this phenomenon was not observed for a late addition, as already observed by Malherbe et al. (2004). This result suggested that added nitrogen was then either used for the resumption of cell growth or for the production of proteins, such as sugar transporters as shown in the literature (Salmon, 1989; Bely et al., 1994). These two effects led to an increase in fermentation rate that was observed under both addition conditions. However, the efficiency of these additions was different: an early nitrogen addition was more effective because it was associated with growth. This suggested that the resumption of growth allows for an increase in  $V_{max}$  in addition to a mere stimulation of cell activity. In relation to this effect on growth, the timing of nitrogen addition also affected the effectiveness of the increase in fermentation rate. This rise in CO<sub>2</sub> production rate was higher for an earlier nitrogen addition but also for higher concentrations of added and initial nitrogen (**Table 2**). This directly impacted the fermentation time that was significantly reduced following nitrogen addition during the stationary phase. This last result confirms the fact that the efficiency on fermentation time is equivalent for additions made during the first half of the stationary phase (Malherbe et al., 2004).

This consumption of nitrogen during the stationary phase also impacted the central carbon metabolism and in particular the production of metabolites originating from the Krebs cycle, as already observed by Barbosa et al. (2015). In the present work, gene expression analysis showed that all genes responsible for pyruvate synthesis up to  $\alpha$ -ketoglutarate synthesis were overexpressed following nitrogen addition. By contrast, this analysis showed that the genes responsible for succinate, fumarate and malate synthesis were repressed. Thus, consequently to a nitrogen addition during the stationary phase, the flux of the oxidative branch of the Krebs cycle is higher than the one of the reductive way, as previously observed during the growth phase (Camarasa et al., 2003). These genetic regulations can explain the results obtained for the production of succinate and  $\alpha$ -ketoglutarate (**Table 2** and **Figure 1C**). On one hand, succinate production was negatively impacted by added nitrogen concentrations. On the other hand, the production of  $\alpha$ -ketoglutarate did not depend on the timing of nitrogen addition or the concentration of added nitrogen. These observations show that, following nitrogen addition during the stationary phase, the pool of  $\alpha$ -ketoglutarate is mainly redirected

to amino acid synthesis at the expense of succinate synthesis. These findings are supported by the results of the transcriptomic analysis. Indeed, following nitrogen addition (regardless of the addition timing) the genes responsible for amino acid synthesis were all overexpressed. Finally, the surplus of amino acids produced is used either for the resumption of cell growth (Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012) or for protein turnover depending of the timing of nitrogen addition (as presented in the previous paragraph related to biomass synthesis).

For glycerol production, we found no significant effect of the three factors tested in this study. Furthermore, gene expression analysis showed that the genes responsible for glycerol synthesis are repressed following nitrogen addition, regardless of the timing of the addition. Several studies have shown that initial nitrogen concentration either does not impact glycerol concentration or induces a decrease in this compound (Beltran et al., 2005; Martínez-Moreno et al., 2014; Rollero et al., 2015; Gobert et al., 2019; Guittin et al., 2021). However, in these previous works, high nitrogen contents were used and nitrogen addition consisted in a mixture of ammonium and amino acids. In the present work, we only added ammonia nitrogen during the stationary phase and in lower concentrations. These two factors appear to be the reason for the differences between our results and data found in the literature.

Finally, acetate production was only impacted by initial nitrogen content and not by nitrogen added during the stationary phase. Acetate is involved in (NADPH) redox balance especially during growth. This compound is mainly synthesized from acetaldehyde by the enzyme Ald6p but the mitochondrial isoform Ald5p can also contribute to its production (Saint-Prix et al., 2004). *ALD5* gene is overexpressed following nitrogen addition during the stationary phase. So, it could be hypothesized that, after this nutrient supplementation, the acetate pool is mainly mobilized toward acetyl-CoA synthesis (Swiegers et al., 2005) for its incorporation into the oxidative branch of the Krebs cycle (Saint-Prix et al., 2004) to meet yeast requirements in terms of precursors or redox balance. Its consumption for yeast metabolism was very high and did not result in any extracellular excretion.

## Volatile Compound Synthesis

The effect of nitrogen addition differs depending on the volatile compounds.

Propanol production appeared dependent on added nitrogen and timing in a positive way but was independent of the initial nitrogen level (Table 3). Such an observation was surprising because a linear correlation between initial nitrogen content and final propanol concentration had previously been noted in different research works (Carrau et al., 2008; Moreira et al., 2011; Mouret et al., 2014b; Rollero et al., 2015; Seguinot et al., 2018). This observation was probably due to the fact that nitrogen addition during the stationary phase had a much higher efficiency than a high initial nitrogen content. This last hypothesis was in agreement with the results obtained by Seguinot et al. (2018), which indicate that, for a given quantity of added ammonium, the final propanol concentration is 2.5 times higher when the nitrogen supplementation is done during

the stationary phase compared to an addition at the start of the fermentation process. So, the data presented in this research work confirm that propanol is a marker of amount and timing of assimilable nitrogen addition in the must (Mouret et al., 2014a; Seguinot et al., 2018).

We have shown that a late addition of nitrogen induced an increase in propanol production. We have also shown that a late addition of nitrogen allows the reactivation of cell activity but is not associated to yeast regrowth.  $\alpha$ -ketobutyrate is the common precursor of propanol and isoleucine. It has been suggested that an addition of nitrogen during the stationary phase would redirect the  $\alpha$ -ketobutyrate pool toward propanol synthesis but not isoleucine synthesis (Seguinot et al., 2018). This hypothesis is consistent with our results since, in our case, propanol synthesis is maximized after late nitrogen addition. Indeed, it can be hypothesized that, since amino acids are no longer used for growth, part of the flux could be redirected toward  $\alpha$ -ketobutyrate synthesis via transamination and then to propanol synthesis.

The production of phenylethanol is impacted differently from isoamyl alcohol and isobutanol. Its production is favored by a late addition of nitrogen and by a high concentration of initial nitrogen. The synthesis of this compound depends on the pentose phosphate pathway and in particular on phenylalanine via the enzyme ARO8 (Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012). This enzyme is an aminotransferase and allows either the synthesis of phenylalanine or the synthesis of phenylpyruvate (Natarajan et al., 2001). In our study, the *ARO8* gene is overexpressed after nitrogen addition. In the same way as propanol, for a late addition of nitrogen, since amino acids are not used by the yeast regrowth, it is possible that part of the phenylalanine synthesis flux is directed to the synthesis of phenylpyruvate via ARO8 and thus of phenylethanol.

As already observed in previous studies (Mouret et al., 2014b; Rollero et al., 2015), isobutanol and isoamyl alcohol behaviors were very different compared to propanol. The synthesis of these two higher alcohols was only weakly impacted by nitrogen addition during the stationary phase, as previously noted by Beltran et al. (2005) and Seguinot et al. (2018). This very limited effect could be explained by the fact that  $\alpha$ -ketoacids that are isobutanol and isoamyl alcohol precursors are mainly produced from the central carbon metabolism and that the contribution to their synthesis of the amino acids catabolism (by the Ehrlich pathway) is minor (Crépin et al., 2017; Rollero et al., 2017). Therefore, it could be suggested that following nitrogen addition, the supplementary flux of  $\alpha$ -ketoacids related to the Ehrlich pathway remained negligible compared to the flux from CCM and that the overall isobutanol and isoamyl alcohol production did not change. Moreover, *ADH5* gene expression was increased following nitrogen addition. *ADH5* is responsible for the synthesis of higher alcohols from  $\alpha$ -ketoacids (Dickinson et al., 2003). However, it has been shown that the enzyme Adh5p can perform the reverse reaction, i.e.,  $\alpha$ -ketoacids synthesis from higher alcohol (de Smidt et al., 2008). This could explain that isobutanol production was not impacted by nitrogen addition while isoamyl alcohol production was negatively impacted. The flux would go to

$\alpha$ -ketoacids and then to amino acids and would support the previous results.

Concerning acetate esters, our data confirmed the positive influence of nitrogen addition on their production (Mouret et al., 2014a; Seguinot et al., 2018; Su et al., 2021; **Figure 2B**). Nevertheless, results obtained in the present work also provided additional knowledge: acetate ester production was mainly controlled by the timing and level of nitrogen addition during the stationary phase. For isoamyl acetate, the weight of these two factors was so considerable that it masked the positive effect of a high initial nitrogen content usually observed in previous studies (Mouret et al., 2014a; Rollero et al., 2015). Finally, the fact that higher alcohols and acetate esters were very differently impacted by nitrogen additions indicated that the key element in the production of these esters was enzymatic activity and not precursors availability.

Unlike acetate esters, no direct effect of the three parameters studied in the present work was observed for ethyl esters. This observation confirmed that nitrogen was not the most efficient nutrient to drive ethyl ester production, which is not very surprising as ethyl esters are related to lipid- and not nitrogen-metabolism (Bloem et al., 2016; Liu et al., 2018). Moreover, it should be noted that acid production was impacted by the initial nitrogen content and the timing of addition. Observing differences in the impact of the parameters on the synthesis of ethyl esters and their corresponding precursors suggested that acid availability is not the key element in the synthesis of ethyl esters, contrary to what was shown in previous studies (Saerens et al., 2008; Rollero et al., 2015). These differences can be attributed to the fact that, in these earlier works, nitrogen addition was made at the beginning of the fermentation and not during the stationary phase. Therefore, our results seem to indicate that regulation of this enzymatic activity is different during the growth and stationary phases.

In conclusion, our observations indicate that precursors availability is not the main factor in the synthesis of both acetate and ethyl esters. So, it can be thought that the enzymatic activity of precursors conversion into final products is the key element, especially consequently to an addition of nitrogen during the stationary phase. Therefore, the ratios between esters and their corresponding precursors was carefully studied.

The ratios between acetate esters and higher alcohols were positively impacted by initial and added nitrogen content but negatively by timing (**Table 3** and **Figure 3A**). This result indicates that the synthesis of acetate esters mainly depends on the enzymatic activity responsible for the bioconversion of higher alcohols and not on their availability (Saerens et al., 2010; Seguinot et al., 2018). This hypothesis is supported by the transcriptomic analysis. It was shown that the *ATF2* gene was overexpressed following any nitrogen addition during the stationary phase; nevertheless, its expression level was higher for an addition at 20 g/L than for an addition at 50 g/L of released CO<sub>2</sub>. This supports the fact that an addition at the beginning of the stationary phase is more effective in increasing acetate ester synthesis. On the contrary, the expression of the *ATF1* gene (the other gene coding for the enzymatic conversion of higher alcohols into acetate esters) was not affected by nitrogen

additions (**Figure 3D**). Such a result is surprising because it was previously established, through mutant construction, that the gene *ATF1* plays a major role in the synthesis of acetate esters while gene *ATF2* plays only a minor one (Verstrepen et al., 2003). Therefore, our data provide new information concerning the regulation of these two genes. This suggests that the expression of the *ATF1* gene is constitutive and not sensitive to nitrogen additions while that of the *ATF2* gene is inducible and responsive to environmental stimuli (**Figure 3D**).

The effects of the factors on ratios between ethyl esters and acids are very different from the acetate ratios. This indicates that the regulation of the two enzyme activities responsible for the synthesis of the two types of esters are very different: this is the first time that this information is shown. Conversely to acetate ratios, the ethyl ester/acids ratio was positively impacted by the timing and level of nitrogen addition. Thus, the conversion of acids to ethyl esters would be greater when nitrogen is added in high concentration in the second part of the stationary phase. In addition, it should be noted that the transcriptomic analysis showed that the expression of genes responsible for bioconversion of fatty acids into ethyl esters, i.e., *EEB1* and *EHT1*, was not impacted by the addition of nitrogen, regardless of the timing. All these results seem to indicate that the production of ethyl esters is regulated allosterically and not through gene expression.

## CONCLUSION

This study led us to better understand the effect of added nitrogen during the stationary phase in its entirety. To access a maximum of information on these phenomena, we developed a mathematical modeling approach to describe the effects of the studied factors and a complementary transcriptomic approach to explain some of our mathematical results. In the present work, it was demonstrated that an addition of nitrogen activated the central carbon metabolism and the biosynthesis of amino acids. It was also shown that the conversion of higher alcohols into acetate esters was maximized when nitrogen was added at the beginning of the stationary phase. New insight into the regulation of genes *ATF1/2* was given: *ATF1* gene expression would be constitutive and not sensitive to nitrogen additions while that of the *ATF2* gene would be inducible. Finally, it appears that the key element in the synthesis of both acetate and ethyl esters is the enzymatic activity responsible for their production, rather than the availability of their corresponding precursors. Nevertheless, consequently to nitrogen addition during the stationary phase, the regulation of ester production is different: for acetate esters, it is related to the expression level of the gene *ATF2* whereas for ethyl esters, it seems to be allosterically regulated.

For the wine industry, this work confirms the value of nitrogen addition during the fermentation process to better manage wine aroma production. Further work will be necessary but our data already demonstrate that the timing of addition and the quantity of added nitrogen strongly impact the final aroma composition of the wine.



Moreover, in the future, the data generated in this work will be helpful for the development of a more complex predictive model based on dynamic data in order to better manage the production of volatile compounds in wines.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found below: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>, GSE189010.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

MP and CP designed the experimental strategy to perform all fermentations of this study and developed the associated tools including automatic nitrogen addition. VG developed the transcriptomic analysis strategy. IS designed the Box-Behnken experimental design, participated in the development of the transcriptomic analysis with VG, and performed the statistical analysis of the Box-Behnken part and transcriptomic analysis.

## REFERENCES

- Barbosa, C., García-Martínez, J., Pérez-Ortín, J. E., and Mendes-Ferreira, A. (2015). Comparative transcriptomic analysis reveals similarities and dissimilarities in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains response to nitrogen availability. *PLoS One* 10:e0122709. doi: 10.1371/journal.pone.0122709
- Beltran, G., Esteve-Zarzoso, B., Rozès, N., Mas, A., and Guillamón, J. M. (2005). Influence of the timing of nitrogen additions during synthetic grape must fermentations on fermentation kinetics and nitrogen consumption. *J. Agr. Food Chem.* 53, 996–1002. doi: 10.1021/jf0487001
- Bely, M., Sablayrolles, J. M., and Barre, P. (1990a). Description of alcoholic fermentation kinetics—its variability and significance. *Am. J. Enol. Viticult.* 41, 319–324.
- Bely, M., Sablayrolles, J. M., and Barre, P. (1990b). Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions. *J. Ferment. Bioeng.* 70, 246–252. doi: 10.1016/0922-338X(90)90057-4
- Bely, M., Salmon, J. M., and Barre, P. (1994). Assimilable nitrogen addition and hexose transport system activity during enological fermentation. *J. Inst. Brew.* 100, 279–282. doi: 10.1002/j.2050-0416.1994.tb00824.x
- Bloem, A., Sanchez, I., Dequin, S., and Camarasa, C. (2016). Metabolic impact of redox cofactor perturbations on the formation of aroma compounds in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microb.* 82, 174–183. doi: 10.1128/AEM.02429-15
- Box, G. E. P., and Behnken, D. W. (1960). Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics* 2, 455–475. doi: 10.1080/00401706.1960.10489912
- Camarasa, C., Grivet, J. P., and Dequin, S. (2003). Investigation by <sup>13</sup>C-NMR and tricarboxylic acid (TCA) deletion mutant analysis of pathways for succinate formation in *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic fermentation. *Microbiology* 149, 2669–2678. doi: 10.1099/mic.0.26007-0
- Carrau, F. M., Medina, K., Farina, L., Boido, E., Henschke, P. A., and Dellacassa, E. (2008). Production of fermentation aroma compounds by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts: effects of yeast assimilable nitrogen on two model strains. *FEMS Yeast Res.* 8, 1196–1207. doi: 10.1111/j.1567-1364.2008.00412.x
- Crépin, L., Nidelet, T., Sanchez, I., Dequin, S., and Camarasa, C. (2012). Sequential use of nitrogen compounds by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation: a model based on kinetic and regulation characteristics of nitrogen permeases. *Appl. Environ. Microb.* 78, 8102–8111.
- JG implemented all the experiment and drafted the manuscript. J-RM, VF, and JG performed the interpretation of all the data conceived and designed the overall study. J-RM and J-MS revised the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

## FUNDING

This research project was funded by the French National Research Agency (ANR) under grant agreement STARWINE (ANR-18-CE10-0013).

## ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the volatile compounds analysis platform (Valérie Nolleau and Teddy Godet) for the training and reprocessing of the aroma analysis data, and Faïza Maçna and Martine Pradal for technical support on HPLC and transcriptomic analysis. Finally, we would also like to thank all the members of the STARWINE project.

- Crépin, L., Truong, N. M., Bloem, A., Sanchez, I., Dequin, S., and Camarasa, C. (2017). Management of multiple nitrogen sources during wine fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microb.* 83, e02617–16. doi: 10.1128/AEM.02617-16
- de Smidt, O., du Preez, J. C., and Albertyn, J. (2008). The alcohol dehydrogenases of *Saccharomyces cerevisiae*: a comprehensive review. *FEMS Yeast Res.* 8, 967–978. doi: 10.1111/j.1567-1364.2008.00387.x
- Dickinson, J. R., Salgado, L. E. J., and Hewlins, M. J. E. (2003). The catabolism of amino acids to long chain and complex alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 278, 8028–8034. doi: 10.1074/jbc.M211914200
- Duc, C., Pradal, M., Sanchez, I., Noble, J., Tesnière, C., and Blondin, B. (2017). A set of nutrient limitations trigger yeast cell death in a nitrogen-dependent manner during wine alcoholic fermentation. *PLoS One* 12:e0184838. doi: 10.1371/journal.pone.0184838
- García-Moreno, A., López-Domínguez, R., Ramirez-Mena, A., Pascual-Montano, A., Aparicio-Puerta, E., Hackenberg, M., et al. (2021). GeneCodis 4: expanding the modular enrichment analysis to regulatory elements. *bioRxiv* [Preprint]. doi: 10.1101/2021.04.15.439962
- Gobert, A., Tourdot-Maréchal, R., Sparrow, C., Morge, C., and Alexandre, H. (2019). Influence of nitrogen status in wine alcoholic fermentation. *Food Microbiol.* 83, 71–85. doi: 10.1016/j.fm.2019.04.008
- Guittin, C., Maçna, F., Sanchez, I., Poitou, X., Sablayrolles, J. M., Mouret, J. R., et al. (2021). Impact of high lipid contents on the production of fermentative aromas during white wine fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 105, 6435–6449. doi: 10.1007/s00253-021-11479-5
- Hernandez-Orte, P., Bely, M., Cacho, J., and Ferreira, V. (2006). Impact of ammonium additions on volatile acidity, ethanol, and aromatic compound production by different *Saccharomyces cerevisiae* strains during fermentation in controlled synthetic media. *Aust. J. Grape Wine R* 12, 150–160. doi: 10.1111/j.1755-0238.2006.tb00055.x
- Jiménez-Martí, E., Aranda, A., Mendes-Ferreira, A., Mendes-Faia, A., and Í del Olmo, M. (2007). The nature of the nitrogen source added to nitrogen depleted vinifications conducted by a *Saccharomyces cerevisiae* strain in synthetic must affects gene expression and the levels of several volatile compounds. *Antonie Van Leeuwenhoek* 92, 61–75. doi: 10.1007/s10482-006-9135-1
- Lambrechts, M. G., and Pretorius, I. S. (2000). Yeast and its importance to wine aroma—a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21, 97–129. doi: 10.21548/21-1-3560
- Lenth, R. V. (2009). Response-surface methods in R, using RSM. *J. Stat. Softw.* 32, 1–17. doi: 10.18637/jss.v032.i07

- Liu, P., Wang, Y., Ye, D., Duan, L., Duan, C., and Yan, G. (2018). Effect of the addition of branched-chain amino acids to non-limited nitrogen synthetic grape must on volatile compounds and global gene expression during alcoholic fermentation: branched-chain amino acids to synthetic must. *Aust. J. Grape Wine R* 24, 197–205. doi: 10.1111/ajgw.12313
- Ljungdahl, P. O., and Daignan-Fornier, B. (2012). Regulation of amino acid, nucleotide, and phosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 190, 885–929. doi: 10.1534/genetics.111.133306
- Malherbe, S., Fromion, V., Hilgert, N., and Sablayrolles, J. M. (2004). Modeling the effects of assimilable nitrogen and temperature on fermentation kinetics in enological conditions. *Biotechnol. Bioeng.* 86, 261–272. doi: 10.1002/bit.20075
- Martínez-Moreno, R., Quirós, M., Morales, P., and Gonzalez, R. (2014). New insights into the advantages of ammonium as a winemaking nutrient. *Int. J. Food Microbiol.* 177, 128–135. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.020
- Massoutier, C., Alexandre, H., Feuillat, M., and Charpentier, C. (1998). Isolation and characterization of cryotolerant *Saccharomyces* strains. *Vitis* 37, 55–59.
- Mendes-Ferreira, A., Mendes-Faia, A., and Leao, C. (2004). Growth and fermentation patterns of *Saccharomyces cerevisiae* under different ammonium concentrations and its implications in winemaking industry. *J. Appl. Microbiol.* 97, 540–545. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02331.x
- Molina, A. M., Swiegers, J. H., Varela, C., Pretorius, I. S., and Agosin, E. (2007). Influence of wine fermentation temperature on the synthesis of yeast-derived volatile aroma compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77, 675–687. doi: 10.1007/s00253-007-1194-3
- Morakul, S., Mouret, J. R., Nicolle, P., Trelea, I. C., Sablayrolles, J. M., and Athes, V. (2011). Modelling of the gas–liquid partitioning of aroma compounds during wine alcoholic fermentation and prediction of aroma losses. *Process Biochem.* 46, 1125–1131. doi: 10.1016/j.procbio.2011.01.034
- Moreira, N., de Pinho, P. G., Santos, C., and Vasconcelos, I. (2011). Relationship between nitrogen content in grapes and volatiles, namely heavy sulphur compounds, in wines. *Food Chem.* 126, 1599–1607. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.12.030
- Mouret, J. R., Camarasa, C., Angenieux, M., Aguera, E., Perez, M., Farines, V., et al. (2014b). Kinetic analysis and gas–liquid balances of the production of fermentative aromas during winemaking fermentations: effect of assimilable nitrogen and temperature. *Food Res. Int.* 62, 1–10. doi: 10.1016/j.foodres.2014.02.044
- Mouret, J. R., Perez, M., Angenieux, M., Nicolle, P., Farines, V., and Sablayrolles, J. M. (2014a). Online-based kinetic analysis of higher alcohol and ester synthesis during winemaking fermentations. *Food Bioprocess Technol.* 7, 1235–1245. doi: 10.1007/s11947-013-1089-5
- Natarajan, K., Meyer, M. R., Jackson, B. M., Slade, D., Roberts, C., Hinnebusch, A. G., et al. (2001). Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast. *Mol. Cell Biol.* 21, 4347–4368. doi: 10.1128/MCB.21.13.4347-4368.2001
- R Development Core Team (2012) *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing.
- Rollero, S., Bloem, A., Camarasa, C., Sanchez, I., Ortiz-Julien, A., Sablayrolles, J. M., et al. (2015). Combined effects of nutrients and temperature on the production of fermentative aromas by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 2291–2304. doi: 10.1007/s00253-014-6210-9
- Rollero, S., Mouret, J. R., Bloem, A., Sanchez, I., Ortiz-Julien, A., Sablayrolles, J. M., et al. (2017). Quantitative <sup>13</sup>C-isotope labelling-based analysis to elucidate the influence of environmental parameters on the production of fermentative aromas during wine fermentation. *Microb. Biotechnol.* 10, 1649–1662. doi: 10.1111/1751-7915.12749
- Rollero, S., Mouret, J. R., Sanchez, I., Camarasa, C., Ortiz-Julien, A., Sablayrolles, J. M., et al. (2016). Key role of lipid management in nitrogen and aroma metabolism in an evolved wine yeast strain. *Microb. Cell Fact.* 15:32. doi: 10.1186/s12934-016-0434-6
- Sablayrolles, J. M., Barre, P., and Grenier, P. (1987). Design of a laboratory automatic system for studying alcoholic fermentations in anisothermal enological conditions. *Biotechnol. Tech.* 1, 181–184. doi: 10.1007/BF00227557
- Saerens, S. M. G., Delvaux, F. R., Verstrepen, K. J., and Thevelein, J. M. (2010). Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*: production and biological function of volatile esters in yeast. *Microb. Biotechnol.* 3, 165–177. doi: 10.1111/j.1751-7915.2009.00106.x
- Saerens, S. M. G., Verbelen, P. J., Vanbeneden, N., Thevelein, J. M., and Delvaux, F. R. (2008). Monitoring the influence of high-gravity brewing and fermentation temperature on flavour formation by analysis of gene expression levels in brewing yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80, 1039–1051. doi: 10.1007/s00253-008-1645-5
- Saint-Prix, F., Bönquist, L., and Dequin, S. (2004). Functional analysis of the ALD gene family of *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic growth on glucose: the NADP<sup>+</sup>-dependent Ald6p and Ald5p isoforms play a major role in acetate formation. *Microbiology* 150, 2209–2220. doi: 10.1099/mic.0.26999-0
- Salmon, J. M. (1989). Effect of sugar transport inactivation in *Saccharomyces cerevisiae* on sluggish and stuck enological fermentations. *Appl. Environ. Microb.* 55, 953–958. doi: 10.1128/aem.55.4.953-958.1989
- Seguino, P., Rollero, S., Sanchez, I., Sablayrolles, J. M., Ortiz-Julien, A., Camarasa, C., et al. (2018). Impact of the timing and the nature of nitrogen additions on the production kinetics of fermentative aromas by *Saccharomyces cerevisiae* during winemaking fermentation in synthetic media. *Food Microbiol.* 76, 29–39. doi: 10.1016/j.fm.2018.04.005
- Su, Y., Heras, J. M., Gamero, A., Querol, A., and Guillamón, J. M. (2021). Impact of nitrogen addition on wine fermentation by *S. cerevisiae* strains with different nitrogen requirements. *J. Agr. Food Chem.* 69, 6022–6031. doi: 10.1021/acs.jafc.1c01266
- Swiegers, J. H., Bartowsky, E. J., Henschke, P. A., and Pretorius, I. S. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Aust. J. Grape Wine R* 11, 139–173. doi: 10.1111/j.1755-0238.2005.tb00285.x
- Torrea, D., Varela, C., Ugliano, M., Ancin-Azpilicueta, C., Francis, I. L., and Henschke, P. A. (2011). Comparison of inorganic and organic nitrogen supplementation of grape juice—effect on volatile composition and aroma profile of a chardonnay wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *Food Chem.* 127, 1072–1083. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.01.092
- Ugliano, M., Travis, B., Francis, I. L., and Henschke, P. A. (2010). Volatile composition and sensory properties of shiraz wines as affected by nitrogen supplementation and yeast species: rationalizing nitrogen modulation of wine aroma. *J. Agr. Food Chem.* 58, 12417–12425. doi: 10.1021/jf1027137
- Varela, C., Pizarro, F., and Agosin, E. (2004). Biomass content governs fermentation rate in nitrogen-deficient wine musts. *Appl. Environ. Microb.* 70, 3392–3400. doi: 10.1128/AEM.70.6.3392-3400.2004
- Verstrepen, K. J., Van Laere, S. D. M., Vanderhaegen, B. M. P., Derdelinckx, G., Dufour, J. P., Pretorius, I. S., et al. (2003). Expression levels of the yeast alcohol acetyltransferase genes ATF1, Lg-ATF1, and ATF2 control the formation of a broad range of volatile esters. *Appl. Environ. Microb.* 69, 5228–5237. doi: 10.1128/AEM.69.9.5228-5237.2003
- Vilanova, M., Siebert, T. E., Varela, C., Pretorius, I. S., and Henschke, P. A. (2012). Effect of ammonium nitrogen supplementation of grape juice on wine volatiles and non-volatiles composition of the aromatic grape variety albariño. *Food Chem.* 133, 124–131. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.12.082
- Vilanova, M., Ugliano, M., Varela, C., Siebert, T., Pretorius, I. S., and Henschke, P. A. (2007). Assimilable nitrogen utilisation and production of volatile and non-volatile compounds in chemically defined medium by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77, 145–157. doi: 10.1007/s00253-007-1145-z

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

**Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Godillot, Sanchez, Perez, Picou, Galeote, Sablayrolles, Farines and Mouret. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## Résultats complémentaires sur l'analyse transcriptomique

### 1. Le gène *MAE1*

Le gène *MAE1* code pour une enzyme responsable de la décarboxylation oxydative du malate pour former du pyruvate. L'enzyme codée par ce gène interagit avec l'acétyl-CoA carboxylase *Acc1p* qui joue un rôle dans la régulation intracellulaire de l'acétyl-CoA (Eder et al., 2018).

Comme indiqué dans la **figure 21** ci-dessous, le gène *MAE1* est surexprimé suite à un ajout d'azote en fermentation, quel que soit le timing d'ajout. Nous pouvons donc supposer que, suite à un ajout d'azote, *Mae1p* va interagir avec *Acc1p* pour former plus d'acétyl-CoA. Ce dernier joue un rôle dans beaucoup de voies métaboliques, notamment le cycle de Krebs, la boucle de synthèse de l'acétate et la synthèse des esters d'acétate *via* les alcools supérieurs. Cette plus grande disponibilité de l'acétyl-CoA pourrait donc avoir un effet positif sur la synthèse des esters d'acétate.

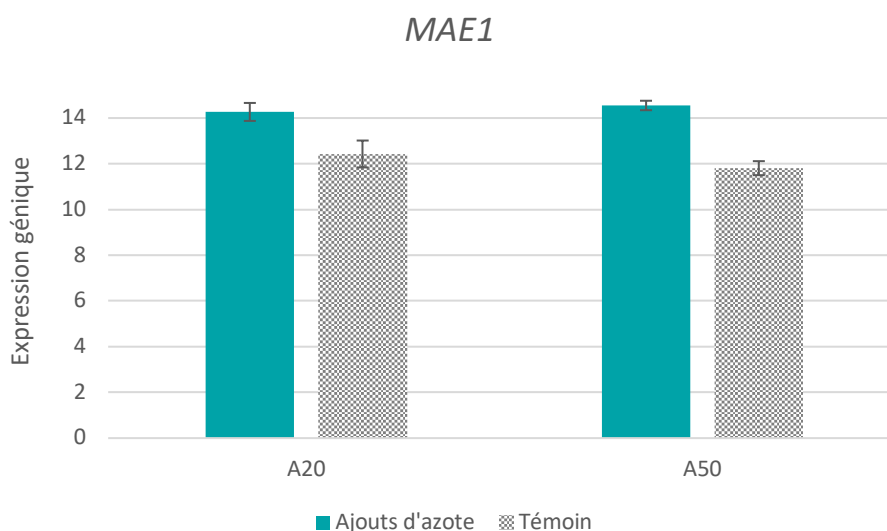


Figure 21. **Expression génique du gène *MAE1*** suite à un ajout à 20 g/L de CO<sub>2</sub> (A20) et à 50 g/L de CO<sub>2</sub> (A50) par rapport au témoin (fermentation sans ajout d'azote).

Il est donc envisageable que l'augmentation de la synthèse d'esters d'acétate suite à un ajout d'azote en cours de phase stationnaire soit due à la fois à une activité accrue de l'enzyme responsable de la conversion des alcools en esters d'acétate (via l'activation directe du gène *ATF2*) mais aussi à une plus grande disponibilité d'un des 2 précurseurs, l'acétyl-CoA. Cependant, il semble que l'effet majoritaire soit lié à la surexpression d'*ATF2*. En effet, la production d'ester et l'expression du gène *ATF2* varient en fonction du timing d'ajout alors que l'expression du gène *MAE1* apparaît identique pour les deux timings d'ajout.

## 2. Les gènes *EHT1* et *EEB1*

Dans la publication, il a été montré que (i) les gènes *EEB1* et *EHT1* ne sont pas impactés de manière significative par l'ajout d'azote et que (ii) le gène *EEB1* est plus exprimé que le gène *EHT1* (**Figure 22**). Ce dernier coderait donc pour l'enzyme principale de conversion des acides gras en esters d'éthyles. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus dans de précédents travaux (Saerens, Delvaux, et al., 2008).

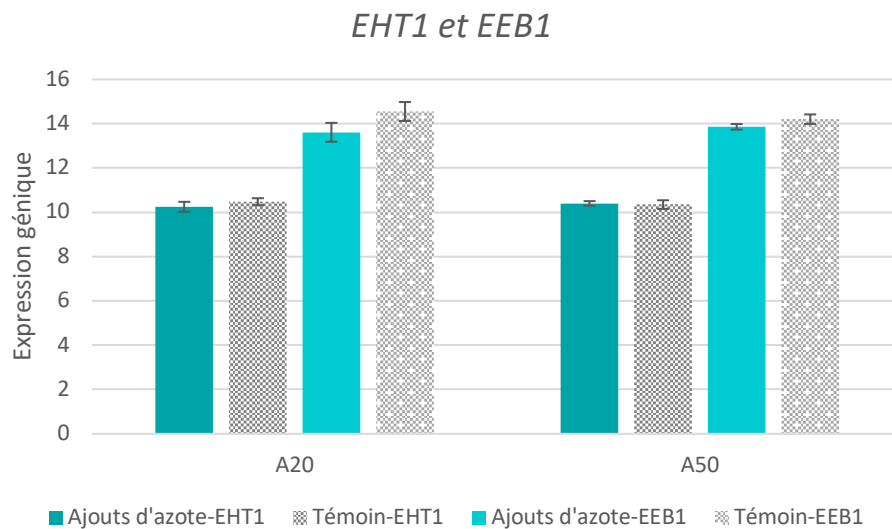


Figure 22. **Expression génique du gène *EEB1* et *EHT1*** suite à un ajout à 20 g/L de CO<sub>2</sub> (A20) et à 50 g/L de CO<sub>2</sub> (A50) par rapport au témoin (fermentation sans ajout d'azote).

## Chapitre 2 :

# Etude de l'impact des ajouts d'azote et de la température sur les cinétiques fermentaires et aromatiques

Le premier chapitre de ce travail nous a permis de positionner un optimum pour le timing d'ajout d'azote à 20 g/L de CO<sub>2</sub> dégagé. En effet, ce timing d'ajout permet de maximiser la production des esters d'acétate, sans affecter négativement les esters d'éthyle, impliqués dans le caractère fruité des vins. Par conséquent, dans la suite de ce travail de thèse, les ajouts d'azote seront exclusivement réalisés à 20 g/L de CO<sub>2</sub> dégagé.

Dans ce deuxième chapitre, les effets combinés des ajouts d'azote et de la température ont été évalués lors de fermentations réalisées à l'échelle pilote (10L) à l'unité expérimentale de Pech Rouge, avec un outil de suivi en ligne des arômes fermentaires (*cf* Matériels et Méthodes). Pour cela, un deuxième plan d'expérience de Box-Behnken a été mis en œuvre pour étudier les effets simples et d'interaction des trois facteurs suivants : (1) concentration en azote initial (70, 140 et 210 mg/L), (2) quantité d'azote ajouté (50, 100 et 150 mg/L) et (3) température (18, 23 et 28°C).

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une démarche pluridisciplinaire innovante combinant (1) le suivi en ligne des arômes fermentaires, (2) la réalisation de bilans gaz/liquide de production de ces arômes et (3) la modélisation statistique (GAM) des cinétiques de synthèse de ces molécules cibles. L'utilisation de la modélisation GAM a permis d'étudier l'effet des facteurs sur l'ensemble des cinétiques (réaction principale et arômes) pas uniquement sur le point final. Ce travail met en évidence certains événements métaboliques spécifiques : (1) le propanol peut être considéré comme une molécule marqueur de l'activité cellulaire et (2) la température a effet biologique et physique sur les cinétiques d'accumulation des esters en phase liquide. Enfin, il apparaît que chaque famille d'arôme étudiée a un comportement différent en fonction des facteurs appliqués. Les alcools supérieurs vont principalement dépendre de l'azote initial et de la température. Pour les esters d'acétate, le facteur le plus significatif est l'azote ajouté au cours de la phase stationnaire, même si les deux autres facteurs jouent un rôle important ; en particulier, la température optimale de synthèse se situe aux environs de 23°C. Enfin, pour les esters d'éthyles, le paramètre le plus influant est la température.

Les résultats de ce travail font l'objet d'une publication qui a été soumise dans le journal *Frontiers in microbiology* en octobre 2022, « Godillot J., Baconin C., Sanchez I., Baragatti M., Perez M., Sire Y., Sablayrolles J-M., Farines V., Mouret J-R. **Analysis of the production kinetics of volatile compounds: study of the impact of nitrogen addition and temperature during alcoholic fermentation.** »

# **Analysis of volatile compounds production kinetics: a study of the impact of nitrogen addition and temperature during alcoholic fermentation**

**Godillot Joséphine<sup>1</sup>, Baconin Clara<sup>3</sup>, Sanchez Isabelle<sup>2</sup>, Baragatti Meili<sup>2</sup>, Perez Marc<sup>1</sup>, Sire Yannick<sup>3</sup>, Aguera Evelyne<sup>3</sup>, Sablayrolles Jean-Marie<sup>1</sup>, Farines Vincent<sup>1</sup>, Mouret Jean-Roch<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>SPO, Univ Montpellier, INRAE, Institut Agro, Montpellier, France

<sup>2</sup>MISTEA, INRAE, Institut Agro, Montpellier, France

<sup>3</sup>UE Pech Rouge, INRAE, Gruissan, France

## **\* Correspondence:**

Mouret Jean-Roch

jean-roch.mouret@inrae.fr

**Keywords: Alcoholic fermentation - Wine - Nitrogen additions - Temperature - Fermentative aromas - Statistical modeling**

## **Abstract**

Among the different compounds present in the must, nitrogen is an essential nutrient for the management of fermentation kinetics, also playing a major role in the synthesis of fermentative aromas. Fermentation temperature is yet another variable that affects fermentation duration and the production of fermentative aromas in wine. The main objective of this study was thus to evaluate the combined effects of nitrogen addition – at the start of the fermentation process or during the stationary phase – at different fermentation temperatures on both fermentation kinetics and aroma synthesis kinetics. To study the impact of these 3 parameters simultaneously, we used an innovative transdisciplinary approach associating an online GC MS system with an original modeling approach: a Box-Behnken experimental design combined with response surface modeling and GAM modeling.

Our results indicated that all three factors studied had significant effects on fermentation and aroma production kinetics. These parameters did not impact in the same way the different families of volatile compounds. At first, obtained data showed that reduction of ester accumulation in the liquid phase was mainly due to important losses by evaporation but also to modifications of yeast metabolic capabilities to synthesise these compounds. Moreover, the study of these three factors simultaneously allowed us to show that propanol is not only a marker of the presence of assimilable nitrogen in the medium but above all a marker of cellular activity.

Finally, this work enabled us to gain a deeper understanding of yeast metabolism regulation. It also underlines the possibility to refine the organoleptic profile of a wine by targeting the ideal combination of fermentation temperature with initial and added nitrogen concentrations.

## 1. Introduction

The presence of fruity and floral aromas in the wine's aromatic profile is increasingly sought after. This profile is composed of a set of volatile compounds belonging to different families of aromas, the main ones being higher alcohols, acetate esters and ethyl esters (Swiegers *et al.*, 2005). For many years, numerous studies have been carried out to better understand the metabolism associated with the synthesis of these volatile compounds and to better manage their concentration during fermentation. Several environmental factors are known to influence this synthesis, in particular nitrogen and temperature (Mouret, Perez, *et al.*, 2014a; Rollero *et al.*, 2015).

Nitrogen is an essential nutrient for yeast growth and fermentation. A high nitrogen concentration in the must resulted in a high maximum fermentation rate along with a short fermentation time (Bely *et al.*, 1990b). Nitrogen also played an important role in the synthesis of aromas. Indeed, a high initial nitrogen concentration was associated with a high concentration of acetate esters (Rollero *et al.*, 2015; Seguinot *et al.*, 2018). Conversely, beyond a certain concentration, it had a negative impact on the synthesis of higher alcohols such as isobutanol or isoamyl alcohol but not on propanol. Indeed, it has been shown that propanol is a marker of assimilable nitrogen in the must as its concentration increased proportionally with initial nitrogen concentration (Mouret, Camarasa, *et al.*, 2014).

To overcome nitrogen deficiencies in musts, nitrogen addition during fermentation has become a regular method. In addition to reducing fermentation duration, it promotes the synthesis of acetate esters and propanol (Godillot *et al.*, 2022; Seguinot *et al.*, 2018). Indeed, it was recently shown that nitrogen addition at the beginning of the stationary phase of fermentation activated the *ATF2* gene that codes for one of the isoenzymes responsible for the synthesis of acetate esters (Godillot *et al.*, 2022). This overexpression resulted in maximizing the synthesis of this aromatic family. Regarding propanol, it was confirmed as a marker of must assimilable nitrogen since its concentration increased with the addition of nitrogen, regardless of the addition timing (Godillot *et al.*, 2022).

Temperature is as important a parameter as nitrogen since it has a physical and biological impact on the fermentation process. First, temperature impacted the length of the latency phase, the fermentation rate and thus the duration of fermentation (Bely *et al.*, 1990b). This parameter also affected the concentration of volatile compounds in the final wines (Morakul *et al.*, 2011, 2013; Mouret, Camarasa, *et al.*, 2014). A temperature increase induced the

evaporation of certain compounds because of their volatility and hydrophobicity, in particular acetate esters and ethyl esters (Morakul et al., 2013). A previous study showed that, during a fermentation carried out at 30°C, the loss by evaporation was respectively 30% and 50% for acetate esters and ethyl esters (Mouret, Camarasa, et al., 2014). It was also noted that high temperatures induced the synthesis of higher alcohols while low temperatures induced the synthesis of ethyl esters (Beltran et al., 2006; Molina et al., 2007).

The objective of this work was therefore to study the cross-impact of 3 key parameters of the fermentation process: initial nitrogen, added nitrogen and temperature. We looked at their impact on fermentation kinetics and aroma production kinetics thanks to an innovative online GC-MS system. Using this new device and a model predicting the evolution of the gas-liquid partitioning of aromas (Morakul et al., 2011; Mouret, Perez, et al., 2014), it was possible to perform mass balances of aroma production and to differentiate physical and biological impacts of fermentations parameters on aromas accumulation in the liquid phase. To evaluate the impact of these 3 parameters simultaneously, a Box-Behnken design together with response surface modeling and GAM modeling were used.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Fermentation conditions**

#### **2.1.1. Yeast strain**

The *Saccharomyces cerevisiae* strain used in this study was the commercial strain Lalvin EC1118® (Lallemand SA, Montreal, Canada). Fermentation tanks were inoculated with 10 g/hL active dry yeast previously rehydrated for 30 min at 37°C in a 50 g/L glucose solution.

#### **2.1.2. Fermentation media**

All fermentations were carried out in synthetic musts simulating a standard grape juice (Bely et al., 1990b). The detailed compositions of the different stock solutions used for the preparation of this synthetic medium are identical to those presented in Mouret et al., 2014. All musts contained 200 g/L of sugars (100 g/L glucose and 100 g/L fructose) and their pH was 3.3. Three initial assimilable nitrogen (composed of ammonium chloride and a mixture of amino acids) concentrations were tested: 70, 140 and 210 mg N/L, respectively corresponding to media SM70, SM140 and SM210. The proportions of the different sources were identical in all three media.



### **2.1.3. Tanks and fermentation control**

Fermentations in MS70, MS140 and MS210 were run in 10-liter stainless steel tanks, at 18, 23 and 28 °C. The amount of CO<sub>2</sub> released was accurately and automatically measured with a gas mass flowmeter, for calculation of the rate of CO<sub>2</sub> production (dCO<sub>2</sub>/dt).

Different concentrations – 50, 100 and 150 mg N/L – of mineral nitrogen (di-ammonium phosphate) were added at 20 g/L of produced CO<sub>2</sub> (corresponding to 24% of fermentation progress). Nitrogen additions were performed automatically using a peristaltic pump fed with the nitrogen solution.

### **2.1.4. Cell population**

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

## **2.2. Online-based kinetic analysis of volatile compounds during the fermentation process**

The concentrations of volatile compounds in the headspace of the fermentor were measured with an online GC MS device.

We analyzed up to two aromas from each major family of volatile compounds: isoamyl alcohol and isobutanol (higher alcohols), isoamyl acetate (acetate esters), ethyl hexanoate and ethyl octanoate (ethyl esters). The concentrations in the liquid phase were calculated as described by Morakul et al., 2011, 2013.

### **2.2.1. Online measurements of concentrations in the gas phase**

Headspace gas was pumped from the tank at a flow rate of 10 mL/min through a heated transfer line. Carbon compounds were concentrated in a cold trap (Tenax™) for 3 min, desorbed at 310 °C for 1 min, and analyzed with a GC Thermo TRACE 1300 (Thermo Fisher Scientific™, Toulouse, France) dedicated to the separation of carbon compounds. The column output was then led to two analyzers: an FID detector and an MS Thermo ISQ7000 (Thermo Fisher Scientific™, Toulouse, France).

The GC oven program was as follows: 38 °C for 7 min, increase to 65 °C at a rate of 3 °C/min followed by an increase to 160 °C at a rate of 6 °C/min followed by an increase to 210 °C at a rate of 8 °C/min and a final hold at 210 °C for 4 min. The peaks areas were acquired with Chromeleon™ Chromatography Data System (CDS) Software (Thermo Fisher Scientific™, Toulouse, France).

The calibration of the instrument was done using an ATIS system (Adsorbent Tube Injector System; Supelco, Bellefonte, PA, USA) which allowed to produce standard gases by vaporizing a liquid reference sample in a continuous flow of inert gas. First, a calibration range must be prepared and injected (5  $\mu$ L) into the ampoule. The latter was continuously swept by a hot air flow at 30 mL/min.

Concentrations in the liquid, losses and total production were calculated using a custom R version 3.6.2 (R Development Core Team 2016) program from the concentration measured online in the gas phase. Details of these calculations are presented in the following parts.

### 2.2.2. Calculation of the concentration in the liquid

The concentration of a volatile compound in the liquid ( $C^{liq}(t)$ ) was calculated from the concentration measured online in the gas phase, expressed as  $C^{gas}(t)$  in mg/L of CO<sub>2</sub>, using the partition coefficient ( $k_i$ ) value (Eq. (1)).

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

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

$$\text{Equation 2: } \ln k_i = F1 + F2 * E - \frac{F3+F4*E}{R} \left( \frac{1000}{T} - \frac{1000}{T_{ref}} \right)$$

where  $E$  is the ethanol concentration (g/L) in the liquid phase, calculated from measurements of the amount of CO<sub>2</sub> released;  $T$  is the current absolute temperature,  $T_{ref}$  corresponds to the absolute reference temperature (i.e. 293.15 K, 20 °C, in this study).  $F1$ ,  $F2$ ,  $F3$  and  $F4$  are constants, identified for each volatile compound. The values of these parameters (Table 1) for the different molecules were determined by (Mouret, Camarasa, et al., 2014; Mouret, Perez, et al., 2014a).

### 2.2.3. Calculation of the losses in the exhaust gas

The losses in the gas were calculated with Eq. (3).

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

where  $Q(t)$  is the CO<sub>2</sub> flow rate at time  $t$ , expressed in liters of CO<sub>2</sub> per liter of must and per hour.

The relative losses ( $RL$ ), expressed as a percentage of production ( $P(t)$ ), were determined as follows (Eq. (4)):

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

where  $t_{end}$  corresponds to the end of fermentation (h).

#### 2.2.4. Calculation of the total production

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

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

This total production reflects yeast ability to produce a volatile compound, regardless of its subsequent fate: accumulation in the liquid phase or evaporation.

#### 2.2.5. Calculation of total production rates

The calculation of total production rates was performed using a local regression (locfit() R function) derived from the total production (mg/L). These rates were calculated only on propanol to further understand the effects of the 3 factors studied in this work on its production kinetics.

### 2.3. Statistical analyses

The data set generated in this study is substantial. To analyze the impact of the three factors studied in the present work on the production of volatile compounds and to answer various biological questions, extensive work on the data was performed. First, a smoothing was realized on production kinetics in order to work on a clean data set. Then, a reliable method to calculate the three following concentrations – liquid concentration, losses and total production – was implemented in the same way for all fermentations. Finally, different statistical analyses were used to answer the different biological questions: (i) a GAM modeling to investigate the impact of factors on the whole shape of the production kinetics and (ii) a Box-Behnken analysis to study the impact of factors on the final production of volatile compounds. Finally, the total propanol production rate was calculated.

Statistical analysis was performed with R software, version 4.0.2 (R Development Core Team 2012) and the rsm library (Lenth, 2009) for the Box-Behnken design, the mgcv library (Wood, 2017) for GAM modeling and the tidyverse library (Wickham et al., 2019) for data management and plot purposes.

### **2.3.1. Experimental design**

A Box-Behnken experimental design was applied to investigate the effects of three independent variables (initial nitrogen, concentration of nitrogen addition and temperature) and to calculate the optimal combination for fermentation kinetics and the different final concentrations of volatile compounds, with a limited number of experimental runs. A total of 15 fermentations were performed, including triplicates at the center of the experimental domain (**Table 1**).

### **2.3.2. GAM modeling**

The curves of fermentation kinetics and production kinetics of volatile compounds have been modeled by Generalized Additive Models (GAMs; Wood, 2017). Indeed, each fermentation produces complex non-linear curves, and GAMs are much more flexible than either classical linear models or generalized linear models. Hierarchical GAMs (Pedersen et al., 2019) were used: these models allow smooth functional relationships between a predictor and a response to vary between groups, in such a way that the different functions are in some sense pooled toward a common shape. Indeed, we want to know how the functional relationships vary between groups, and whether a relationship holds across groups. Several models can be used to answer these questions, and we decided to use a « GS model » by Pedersen et al., 2019. In such a model, the relationship between a predictor  $x$  and a response  $Y$  is modeled by the sum of a global smoother and group-level smoothers. Each group-level smoother is associated to a level of one grouping factor in the model.

In this work, several responses were studied. First, to study fermentation kinetics, the  $\text{CO}_2$  flow rate was modeled as a function of consumed sugar: response  $Y$  is the  $\text{CO}_2$  flow rate and predictor  $x$  is consumed sugar. Then, to study the production kinetics of aromas, the concentration in the liquid, the losses and the total production of volatile compounds were modeled as functions of released  $\text{CO}_2$ :  $Y$  is  $C^{liq}$ ,  $L$  or  $P$ , and  $x$  is released  $\text{CO}_2$ . The volatile compounds studied were propanol, ethyl hexanoate, ethyl octanoate, isoamyl acetate, isoamyl alcohol, isobutanol, and also the ratio isoamyl acetate to isoamyl alcohol.

Two types of GS model were used:

For the first type of model (**GS1**), only one grouping factor in the model that corresponds to the observed combination of  $T^\circ\text{C}$ ,  $\text{N0}$  and  $\text{Nadd}$  is used.

Table 2 shows that 15 fermentations were performed, corresponding to 13 combinations of the three factors (one combination is repeated 3 times). If we denote by  $i$  the combination of the three factors and  $j$  the repetition, the formula of this model is given by:

Model GS1(Equation 6):

$$Y_{ij} = f(x_{ij}) + f_i(x_{ij}) + \epsilon_{ij}$$

With  $i = 1, \dots, 13 ; j = 1, 2, 3$

Where  $f$  is the global smoother and  $f_i$  the smoother specific to the  $i^{\text{th}}$  combination of the three factors. The global function should be viewed as a useful summary of the average trend across the groups, that is as a mean trend. The  $i^{\text{th}}$  group-specific function represents group specific deviation from the global function.

For the second type of model (GS2), we have three grouping factors with three levels each ( $T^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{N0}$ ,  $\text{Nadd}$ ) and their interactions with 9 levels each ( $\text{Temp}*\text{N0}$ ,  $\text{Temp}*\text{Nadd}$  and  $\text{Nadd}*\text{N0}$ ). If we denote by  $i$  the level of  $\text{Temp}$ ,  $j$  the level of  $\text{N0}$ ,  $k$  the level of  $\text{Nadd}$  and  $l$  the repetition, the formula of this model is given by:

Model GS2 (Equation 7):

$$Y_{ijkl} = f(x_{ijkl}) + f_i(x_{ijkl}) + f_j(x_{ijkl}) + f_k(x_{ijkl}) \\ + f_{ij}(x_{ijkl}) + f_{ik}(x_{ijkl}) + f_{jk}(x_{ijkl}) \\ + \epsilon_{ijkl}$$

$$\text{With } i = 18, 23, 28 ; j = 70, 140, 210 ; k = 50, 100, 150 ; l = 1, 2, 3$$

Where  $f$  is the global smoother,  $f_i$  a smoother specific for the  $i^{\text{th}}$  level of  $\text{Temp}$ ,  $f_j$  a smoother specific for the  $j^{\text{th}}$  level of  $\text{N0}$ ,  $f_k$  a smoother specific for the  $k^{\text{th}}$  level of  $\text{Nadd}$ ,  $f_{ij}$  a smoother specific for the interaction level  $i * j$  between  $\text{Temp}$  and  $\text{N0}$ ,  $f_{ik}$  a smoother specific for the interaction level  $i * k$  between  $\text{Temp}$  and  $\text{Nadd}$  and  $f_{jk}$  a smoother specific for the interaction level  $j * k$  between  $\text{N0}$  and  $\text{Nadd}$ .

In both models GS1 and GS2, a global smoother represents the average trend across the groups. The main difference between them is that in GS1, only one grouping factor which is the combination of  $\text{Temp}$ ,  $\text{N0}$  and  $\text{Nadd}$  is considered whereas in GS2, this grouping factor is decomposed into three grouping factors ( $\text{Temp}$ ,  $\text{N0}$ ,  $\text{Nadd}$ ) and their interactions. Hence, if only one group-specific function is considered in GS1, 6 group-specific functions are considered for GS2. Compared to GS2, the GS1 model is simpler and the figures obtained are easier to understand.

However, model GS2 enables us to decompose the group-specific function, to understand which ones of the factors and/or interactions are relevant to explain the deviations from the average trend.

For each response (the CO<sub>2</sub> flow rate and the responses for the volatile compounds), models GS1 and GS2 are consistent with each other and complementary. Indeed, the predictions obtained with either models are remarkably close, and the AIC (Akaike information criterion) of both were also very close. Model GS1 was used to present the figures and model GS2 to obtain p-values for determining the significance of the smoothers specific to Temp, NO, Nadd and their interactions.

### 2.3.3. Response surface

In this experimental design, there were three coded factor levels: -1, 0, +1 in which -1 corresponded to the low level of each factor, +1 to the high level, and 0 to the mid-level. The actual level of each factor was calculated with the following equation (Eq.8) (Box & Behnken, 1960) :

Equation 8:

$$Actual\ level = Coded\ value \times \frac{High\ value - Low\ value}{2} + \frac{High\ level + Low\ level}{2}$$

The effect of the three independent variables on each measured parameter (Y) was modeled using a polynomial response surface (Eq. 9):

Equation 9:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 \\ + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 \\ + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{33} x_3^2 + \varepsilon$$

where  $x_1$ ,  $x_2$  and  $x_3$  represent the coded values of initial nitrogen content, concentration of nitrogen added and fermentation temperature, respectively,  $Y$  is the predicted response (fermentative parameters or final concentration of volatile compounds),  $\beta_0$  the intercept term,  $\beta_i$  the coefficients associated to the linear terms,  $\beta_{ii}$  the coefficients associated to the quadratic terms, and  $\beta_{ij}$  the coefficients associated to the interaction terms ( $i=1, 2$  and  $3$ ;  $j=1, 2$  and  $3$ ) and  $\varepsilon$  are independent  $N(0, \sigma^2)$  distributed error terms. When necessary, a simplified model was fitted for some compounds by suppressing the interactive terms of the equation according to validity criteria (ESM **Table 1**).

The equations of the models (Eq.9) obtained for each parameter are provided in ESM **Table 1**. In addition, the normality of residual distributions and homogeneity of variance were studied with standard diagnostic graphs; no violation of the assumptions was detected. The accuracy and general ability of each polynomial model described above were evaluated by a lack-of-fit test, the Fisher test and the adjusted coefficient of determination  $\text{adj}R^2$ .

The reliability of the fitted models was overall very good: each polynomial model gave a non-significant lack-of-fit test at a 0.05 threshold, a significant Fisher test at a 0.05 threshold and an  $\text{adj}R^2$  range between 70 and 93%. For graphical representations of the surface responses, a custom version of the `persp()` function was used.

**Table 1. Experimental conditions for the 15 fermentations.** <sup>1-3</sup> Three replicates included at the center of the experimental domain.

Experiments	Initial nitrogen (NO), mg/L	Nitrogen added (Nad), mg/L	Temperature (Temp), °C
1	70	50	23
2	210	50	23
3	70	150	23
4	210	150	23
5	70	100	18
6	210	100	18
7	70	100	28
8	210	100	28
9	140	50	18
10	140	150	18
11	140	50	28
12	140	150	28
13 <sup>a</sup>	140	100	23
14 <sup>a</sup>	140	100	23
15 <sup>a</sup>	140	100	23

### 3. Results

#### 3.1. GAM models

GAM modeling with GS1 and GS2 was applied to evaluate the cross-impact of the 3 factors on kinetics shape (main fermentation reaction and aroma compounds). The 2 models provided remarkably close results in terms of predictions and AIC, so both of them were used to interpret our results. The first model (GS1) analyzed the effect of the modalities (combination of the different levels of the factors) in relation to the average curve while the second model (GS2) analyzed the impact of each factor (with its different levels) and the potential interactions existing between the studied factors. The latter allowed us to determine which factor most influenced (positively or negatively) kinetics shape.

##### 3.1.1. Fermentation kinetics

As it is well known, kinetics of CO<sub>2</sub> release during fermentation are impacted by the concentration of initial nitrogen, added nitrogen and also by temperature. However, the cross-impact of these parameters has never been studied.

In the GS1 model (**Figure 1A**), the left graph represents the average fermentation rate and the right graph the deviations from the average. The average curve is defined by a first maximal fermentation rate (V<sub>max</sub>), a function of the initial nitrogen, followed by a second V<sub>max</sub>, a function of the nitrogen added at 20 g/L of released CO<sub>2</sub>. The deviations from the mean are thus visible before and after the addition of nitrogen.

The heatmap (**Figure 1B**) summarizes the different effects of the GS2 model and shows the magnitude of the deviations from the mean of each factor and their interactions. This graph allows the factors to be ranked against each other and to identify the factor with the greatest influence on the kinetic pattern. The interaction effects N0:Temp (210-28) and Nadd:Temp (150-28) show significant and positive divergence from the mean. In addition, the N0 and Temp factors show significant simple effects. For N0 and temperature, the largest positive divergences are for N0 = 210 mg/L and Temp = 28°C. Conversely, the largest negative divergences are for N0 = 70 mg/L and Temp = 18°C. N0 and Temp are the factors with the greatest influence on the shape of the fermentation kinetics (**Figure 1C** and **1D**). It can be noticed that the simple effect of Nad does not show any divergence from the mean. Its effect is dependent on the other two factors: N0 and Temp. The effect of nitrogen addition depends on the initial nitrogen concentration and the fermentation temperature (**Figure 1E**). It is higher if the initial nitrogen concentration and temperature are low. On the other hand, its effect will be moderate if the values of the two other factors are important.



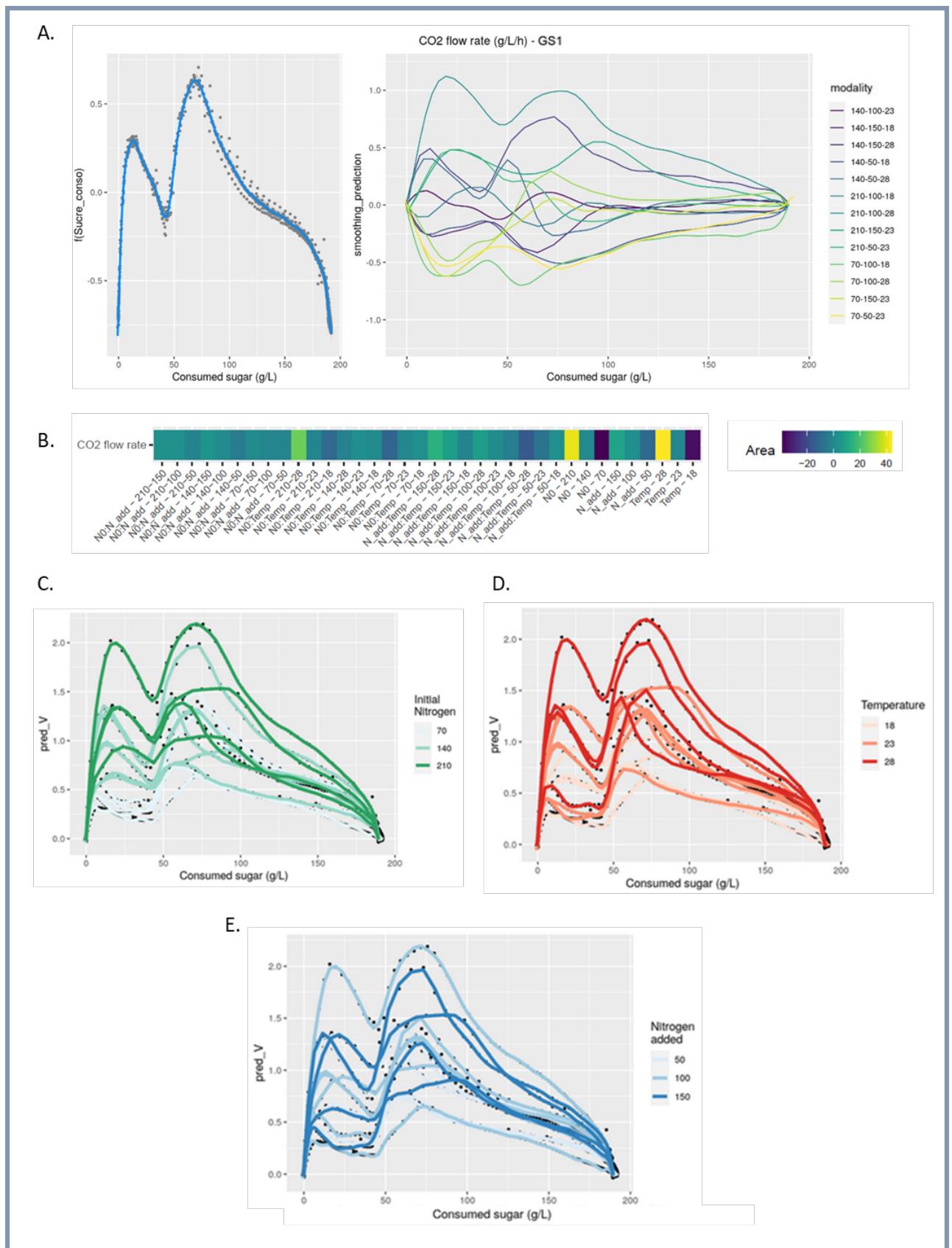


Figure 1. **GAM modelling of fermentation kinetics.** (A) Averages kinetics of all modalities and the divergence with the average curve. (B) Heatmap corresponding to the areas under the curve of divergences from the mean given by the GS2 model. (C) Fermentation kinetics colored by NO in green gradient. (D) Fermentation kinetics colored by Temp in red gradient. (E) Fermentation kinetics colored by Nad in blue gradient.

### 3.1.2. Volatile compounds

As for fermentation kinetics, GAM modeling was applied to investigate the effects of factors on fermentative aroma production kinetics. All kinetics of the different volatile compounds studied were significantly impacted by the three factors NO, Nad and Temp. However, it was necessary to determine the importance of each factor on the course of aromatic kinetics in order to better understand their impact. The modeling was applied to both liquid phase concentration and total production for isoamyl acetate and ethyl esters. Only liquid phase concentration was analyzed for higher alcohols as these compounds being weakly volatile, their losses by evaporation are negligible.

#### 3.1.2.1. Isoamyl alcohol

For isoamyl alcohol production, the average curve of the modalities shows two distinct phases (**Figure 2A**): a first phase is observed before nitrogen addition; then, after addition, a change of slope seems to tend towards a decrease in isoamyl alcohol production. Furthermore, the divergence graph indicates that the largest differences from the mean are observed both before and after nitrogen addition.

In **Figure 2G**, the interaction effects NO:Nadd (210-150) and Nadd:Temp (50-18) have the most impact on kinetics shape and these modalities show negative divergences from the mean. On the other hand, a significant positive divergence from the mean is found for the interaction effect Nadd:Temp (50-28). Regarding the simple effects, the kinetics of isoamyl alcohol was mostly impacted by initial and added nitrogen amounts. When the value of these factors increased, the sign of divergence tends to turn negative.

The effect of initial nitrogen can also be seen in **Figure 2B**. Before 20 g/L CO<sub>2</sub> released, there is a decreasing effect of initial nitrogen concentration, with the highest production obtained for MS70. Nevertheless, the highest final liquid phase content is reached when NO is at 140 mg/L (**Table 2**). This observation is in agreement with previous studies (Mouret, Camarasa, et al., 2014; Rollero et al., 2018; Seguinot et al., 2018), which noted that the optimal concentration for isoamyl alcohol production appears to be around 140 mg/L of initial assimilable nitrogen.

Finally, temperature seems to favor the production of this higher alcohol. Indeed, the group averages show that the ideal temperatures for its production are equal or greater than 23°C. This result can also be seen on the temperature graph (**Figure 2C**) and in **Table 2**.

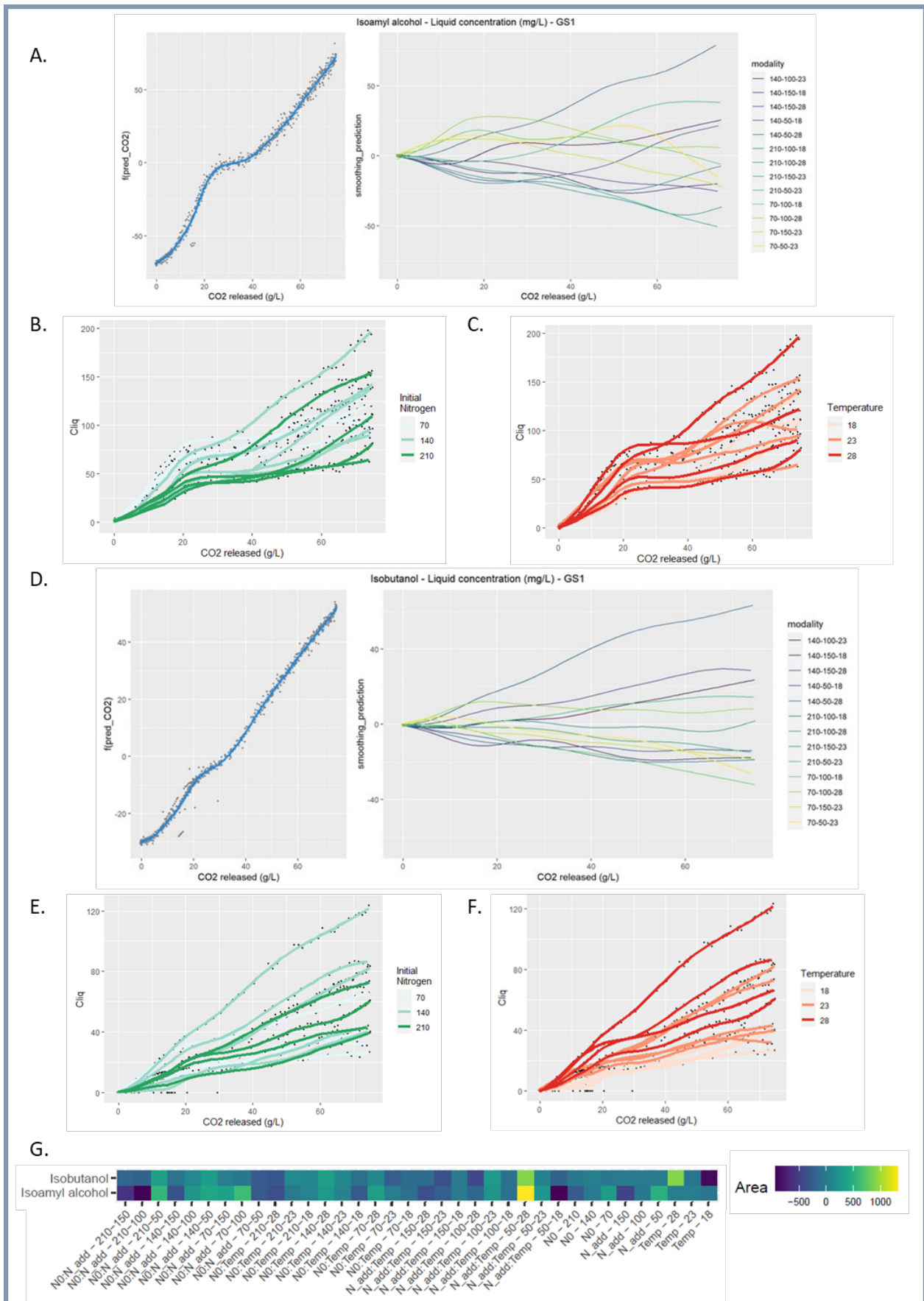


Figure 2. **GAM modelling of ISOH and ISB production kinetics.** (A) Averages kinetics of all modalities and the divergence with the average curve. (B, E) Kinetics colored by NO in green gradient. (C, F) Kinetics colored by Temp in red gradient. (A, B, C) GAM modelling on ISOH production kinetic. (D, E, F) GAM modelling on ISB production kinetic. (G) Heatmap corresponding to the areas under the curve of divergences from the mean given by the GS2 model.

### 3.1.2.2. Isobutanol

As for the kinetics of isobutanol production, the GS model led to an aromatic signature almost similar to that of isoamyl alcohol (**Figure 2D**) and nitrogen addition induced a modification of the production slope. Nevertheless, divergences from the mean were visible both before and after nitrogen addition.

In contrast to isoamyl alcohol, the presence of interaction effects on the heatmap was less important (**Figure 2G**). Simple Temp effect (28) and interaction Nadd:Temp effect (50-28) showed a significant positive divergence from the mean curve. It also appears that temperature had the highest influence on the kinetics of this compound. Finally, a concentration of 140 mg/L can be considered as optimal for isobutanol production (**Figure 2E**; **Table 2**).

### 3.1.2.3. Isoamyl acetate

For the production of isoamyl acetate, the average curve of the modalities is mainly impacted by the addition of nitrogen (GS1 model). Indeed, a change in slope is observed following addition that accelerates the production of this compound (**Figure 3A**). All divergences from the mean are observed after nitrogen addition.

The heatmap (GS2 model) highlights numerous interaction effects influencing the shape of the curve. Indeed, N0:Nadd, N0:Temp and Nadd:Temp effects all had a significant impact. The largest positive divergences from the mean curve were observed for the N0:Nadd-210-50 and N0:Nadd-70-150 combinations. Conversely, the largest negative divergences were observed for the combinations N0:Nadd-70-50, N0:Temp-210-28 or Nadd:Temp-50-18. No single factor effect influenced kinetics shape. The kinetics of isoamyl acetate production depends on the interaction of the three factors studied with one another (**Figure 3B**).

Initial nitrogen seemed to promote the production of isoamyl acetate in the liquid phase (**Figure 3C**). Thus, average concentrations of 1.53 mg/L and 0.98 mg/L were obtained for an initial nitrogen of 210 mg/L and 70 mg/L respectively. Similarly, a high concentration of added nitrogen increased the liquid phase concentration in isoamyl acetate: an average of 1.46 mg/L was obtained for an addition of 150 mg/L versus 1.02 mg/L for an addition of 50 mg/L (**Table 2**). Conversely, the temperature effect on the concentration of isoamyl acetate was not linear but seemed to reach an optimum at 23°C (**Figure 3D**). The highest final concentration in the liquid phase was obtained at 23°C (1.42 mg/L) compared to 18°C (1.15 mg/L) or 28°C (1.03 mg/L) (**Table 2**).

As for the concentration in the liquid phase, the total production of this compound underwent the same effects for the 3 factors studied in this work.

A significant major negative effect of temperature on total production of isoamyl acetate must be underlined: high temperatures decrease its synthesis by yeast. Under our conditions, the optimal temperature for isoamyl acetate synthesis would be 23°C.

**Table 2. Group averages (N0, Nadd and Temp) of final aroma concentrations in the liquid (top table) and for total production (bottom table).**

	[IsoA] mg/L	(+/-)	[IsoOH] mg/L	(+/-)	[IsbOH] mg/L	(+/-)	[EtH] mg/L	(+/-)	[EtO] mg/L	(+/-)	[Prop] mg/L	(+/-)	Ratio IsoA (mol)	(+/-)
MS210	1.53	0.40	97.14	36.7	50.74	15.1	0.341	0.11	0.336	0.13	49.55	8.9	0.0113	0.004
MS140	1.23	0.28	124.53	31.9	72.72	26.6	0.301	0.07	0.290	0.13	50.35	12.7	0.0071	0.003
MS70	0.98	0.40	107.99	11.2	40.93	15.7	0.314	0.10	0.247	0.14	40.28	14.3	0.0064	0.003
18°C	1.15	0.45	105.58	17.3	35.22	6.52	0.420	0.03	0.429	0.033	43.71	13.7	0.0078	0.004
23°C	1.42	0.39	116.88	27.0	59.73	19.7	0.316	0.04	0.267	0.114	45.24	12.7	0.0088	0.004
28°C	1.03	0.15	112.93	48.3	79.18	27.1	0.209	0.02	0.195	0.099	55.06	9.5	0.0070	0.003
50N	1.02	0.52	142.77	28.2	65.78	36.3	0.331	0.07	0.388	0.108	33.64	10.5	0.0048	0.002
100N	1.25	0.33	112.30	22.2	58.64	20.9	0.307	0.11	0.244	0.134	49.66	6.1	0.0077	0.002
150N	1.46	0.22	83.75	9.2	50.52	22.5	0.313	0.09	0.275	0.102	57.40	11.0	0.0120	0.003

	[IsoA] mg/L	(+/-)	[IsoOH] mg/L	(+/-)	[IsbOH] mg/L	(+/-)	[EtH] mg/L	(+/-)	[EtO] mg/L	(+/-)	[Prop] mg/L	(+/-)	Ratio IsoA (mol)	(+/-)
MS210	1.94	0.42	97.96	36.91	51.07	15.2	0.568	0.12	0.562	0.18	49.8	8.963	0.0143	0.005
MS140	1.57	0.35	125.63	32.32	73.19	26.9	0.482	0.06	0.472	0.16	50.6	12.8	0.0090	0.003
MS70	1.22	0.47	109.20	11.41	41.26	15.9	0.494	0.1	0.393	0.18	40.5	14.41	0.0079	0.004
18°C	1.32	0.51	106.16	17.31	35.36	6.5	0.578	0.05	0.595	0.028	43.84	13.68	0.0089	0.004
23°C	1.78	0.49	117.93	27.10	60.09	19.8	0.520	0.08	0.456	0.189	45.44	12.7	0.0110	0.005
28°C	1.47	0.23	114.47	48.83	79.89	27.4	0.417	0.05	0.389	0.187	55.36	9.545	0.0098	0.004
50N	1.36	0.71	144.05	28.74	66.25	36.7	0.546	0.09	0.632	0.144	33.8	10.59	0.0062	0.003
100N	1.56	0.36	113.35	22.4	59.02	21	0.488	0.1	0.397	0.172	49.87	6.169	0.0096	0.003
150N	1.84	0.28	84.60	9.26	50.87	22.7	0.505	0.07	0.456	0.097	57.63	11.1	0.0150	0.004

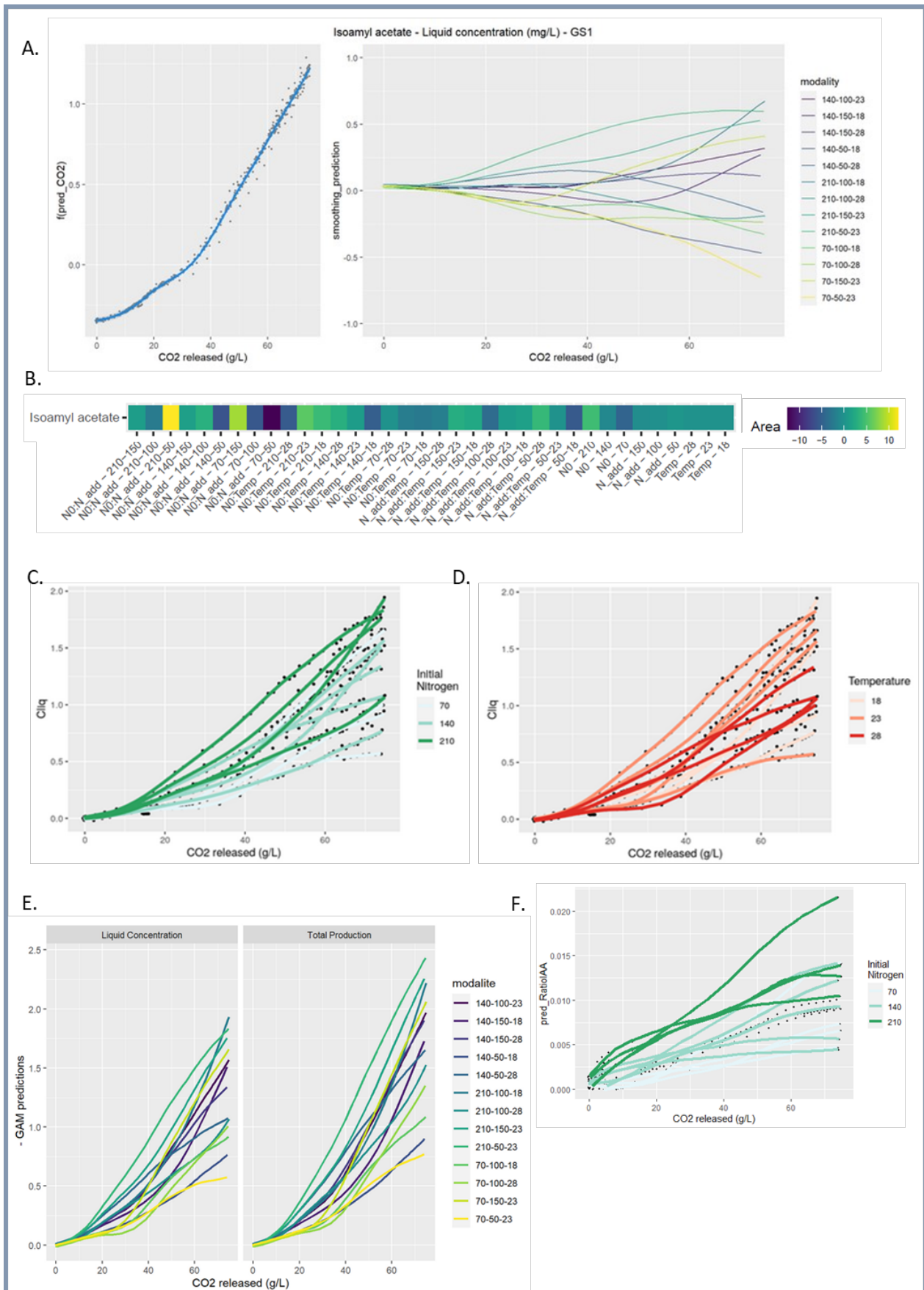


Figure 3. **GAM modelling of IAA production kinetics.** (A) Averages kinetics of all modalities and the divergence with the average curve. (B) Heatmap corresponding to the areas under the curve of divergences from the mean given by the GS2 model. (C) Kinetics colored by N0 in green gradient. (D) Kinetics colored by Temp in red gradient. (E) Comparison between liquid concentration and total production. (F) Graph representing the ratio of IAA to ISOH as a function of CO<sub>2</sub> released. The graph is represented as a function of N0.

The comparison between the concentration in the liquid phase and total production shows that the evaporation of the compound at high temperatures is significant (**Figure 3E**): evaporation losses for the 28°C modalities were about 30% versus 14% for the 18°C modalities (**Table 2**).

#### 3.1.2.4. Ratio IAA/ISOH

In order to evidence the impact of the 3 different factors on the conversion of isoamyl alcohol into isoamyl acetate, the ratio between the total production of these two compounds was calculated and then modeled by GAM. The shape of this ratio was significantly impacted by initial added nitrogen amounts. As already observed by Godillot et al., 2022, a high concentration of initial and added nitrogen will increase the ratio and thus the conversion of isoamyl alcohol to isoamyl acetate (**Figure 3F**). For an initial nitrogen concentration of 210 mg/L, a ratio of 0.0143 was obtained compared to 0.0079 with 70 mg/L of nitrogen. A high concentration of added nitrogen doubled the ratio value compared to a low concentration addition (**Table 2**). Moreover, the ideal temperature for the conversion of alcohol to isoamyl acetate seems to be 23°C, in agreement with the results previously shown for isoamyl acetate.

#### 3.1.2.5. Ethyl hexanoate

Ethyl hexanoate production appeared to be only weakly affected by nitrogen addition (**Figure 4A**). The deviations from the average curve were grouped towards the end of fermentation.

As for isoamyl acetate, the production kinetics of ethyl hexanoate in the liquid phase was impacted by interaction effects between the three factors (**Figure 4G**). The largest positive divergences from the mean curve are for N0:Nadd-210-50, N0:Temp-70-18, or N0:Temp-210-18. Whatever the initial nitrogen concentration, low temperatures positively influence the production kinetics of this compound. This result is supported by the simple effect of temperature on the kinetics. Indeed, low temperature results in positive value of the divergences.

The initial nitrogen content had an effect on the kinetics and in particular on the slope of the latter. Steepest slopes are associated with the modalities containing an initial nitrogen content of 210 mg/L (**Figure 4B**). Furthermore, whatever the dose of nitrogen added, an 18°C temperature led systematically to the highest final liquid concentration (**Figure 4C**). This result can be related to an important evaporation of this compounds linked to its high hydrophobicity. Consequently, up to 60% of the produced ethyl hexanoate were lost for the fermentation modalities at 28°C, as reported in a previous study (Mouret, Camarasa, et al., 2014).

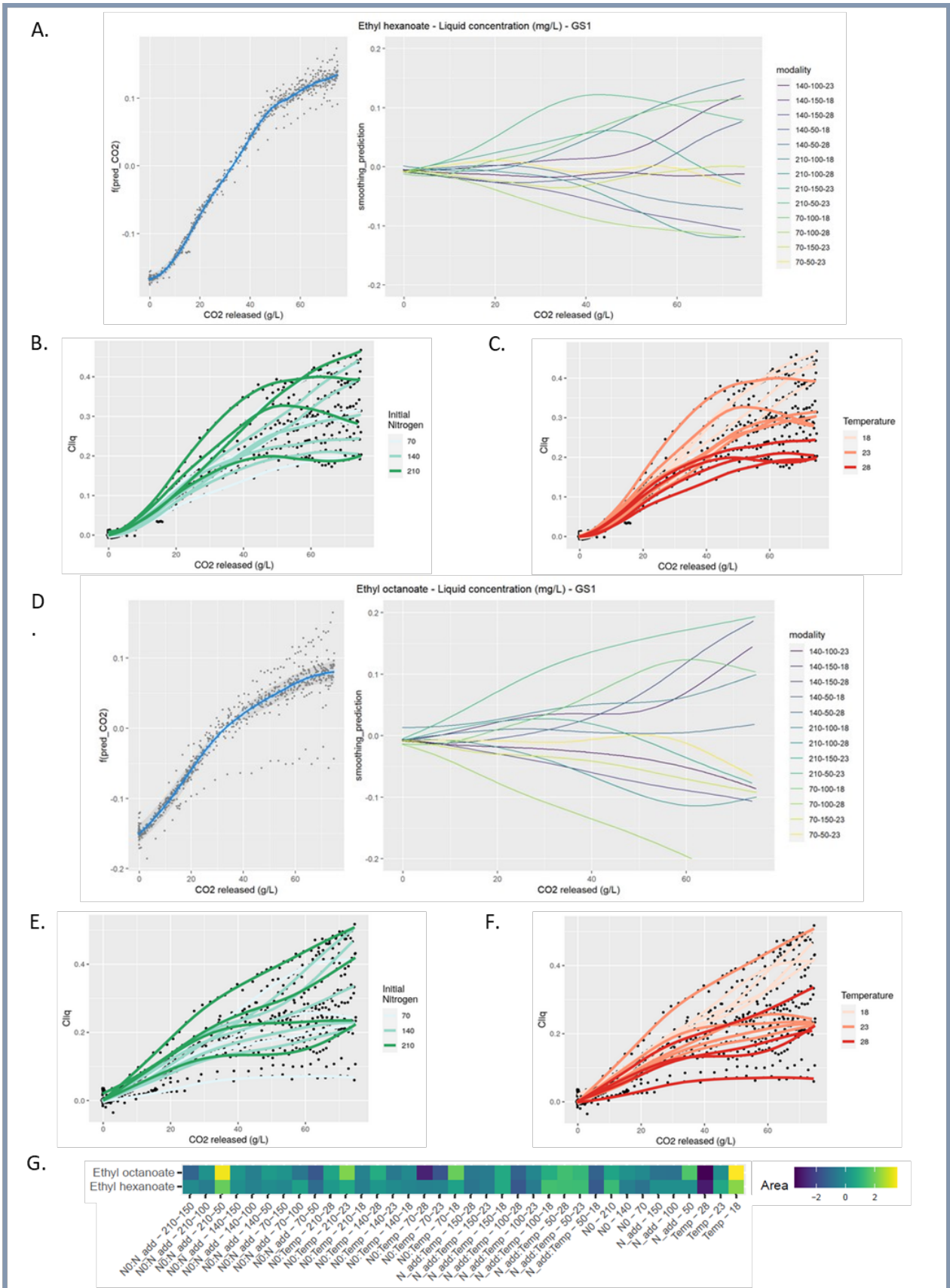


Figure 4. **GAM modelling of EHE and EOC production kinetics.** (A) Averages kinetics of all modalities and the divergence with the average curve. (B, E) Kinetics colored by N0 in green gradient. (C, F) Kinetics colored by Temp in red gradient. (A, B, C) GAM modelling on EHE production kinetic. (D, E, F) GAM modelling on EOC production kinetic. (G) Heatmap corresponding to the areas under the curve of divergences from the mean given by the GS2 model.



Ethyl hexanoate total production as well as the concentration in the liquid were impacted by the same effects. The effect of the initial nitrogen content on the kinetics will depend on the extent of added nitrogen. The simple effect of the temperature is again found, indicating that temperature is the main factor that influences the kinetics. Synthesis of ethyl hexanoate by yeast was enhanced at temperatures lower than or equal to 23°C. The temperature not only affects the evaporation of this compound but also its synthesis by yeast.

### 3.1.2.6. Ethyl octanoate

The signature of ethyl octanoate in the liquid differed from that of ethyl hexanoate. A change in slope was observed on the mean curve starting halfway through fermentation (**Figure 4D**). Divergences from the mean were visible after nitrogen addition and they all occurred towards the end of fermentation.

On the heatmap, the production kinetics of ethyl octanoate displayed the same interaction effects as for ethyl hexanoate and the factor with the largest divergence from the mean was the temperature (**Figure 4G**).

The liquid concentration of ethyl octanoate was impacted, like ethyl hexanoate, by added nitrogen interacting with initial nitrogen and temperature. The initial nitrogen concentration clearly promoted ethyl octanoate production (**Figure 4E**): average concentration increased from 0.24 mg/L to 0.34 mg/L between low and high concentration of initial nitrogen (**Table 2**). The negative effect of temperature was as pronounced as for ethyl hexanoate (**Figure 4F**). On average, the concentration of ethyl octanoate was divided by two when the temperature varied from 18 to 28°C. As for ethyl octanoate, evaporation losses reached 60% for some modalities at 28°C (**Table 2**). Finally, added nitrogen did not seem to increase the final concentration of the compound (**Table 2**).

The effects of the factors on total ethyl octanoate production were the same as for the liquid concentration of this compound. This last result indicates that the impact of temperature on ethyl esters accumulation in the liquid is both biological and physical.

### 3.1.2.7. Propanol

The concentration of propanol in the liquid depends on the three factors studied. The aromatic signature of propanol is particularly sensitive to the addition of nitrogen, since an acceleration of its production is observed after nitrogen addition (**Figure 5A**).

Moreover, divergences from the mean curve were visible before nitrogen addition, depending on the initial nitrogen, and then after addition. There are larger divergences after nitrogen addition suggesting that the effect of added nitrogen is greater than that of initial nitrogen.

The GS2 model (**Figure 5B**) indicates that propanol production kinetics are positively impacted by N0:Temp-210-23 and N0:Temp-140-28. Conversely, the modalities N0:Temp-140-18 and N0:Temp-70-23 exhibit negative divergences from the mean curve. The interaction between initial nitrogen and temperature strongly influences the course of the production kinetics of this compound. The simple effect of added nitrogen shows significant positive divergences when the factor concentration is high.

The effect of the initial nitrogen concentration was clearly noticeable before 20 g/L of released CO<sub>2</sub> since propanol concentration increased with the initial nitrogen content (**Figure 5C**). This result is consistent with those found in previous studies (Mouret, Perez, et al., 2014a; Rollero et al., 2015; Seguinot et al., 2018). Similarly, for added nitrogen, propanol concentration increases both with the added nitrogen dosis (**Figure 5E**) and with fermentation temperature (**Figure 5D**).

Total propanol production rates were also calculated in an attempt to understand the production dynamics of this specific compound. The production rates were superimposed on those of the CO<sub>2</sub> release rate: total propanol production rate was found directly related to fermentation kinetics (**Figure 5F**).

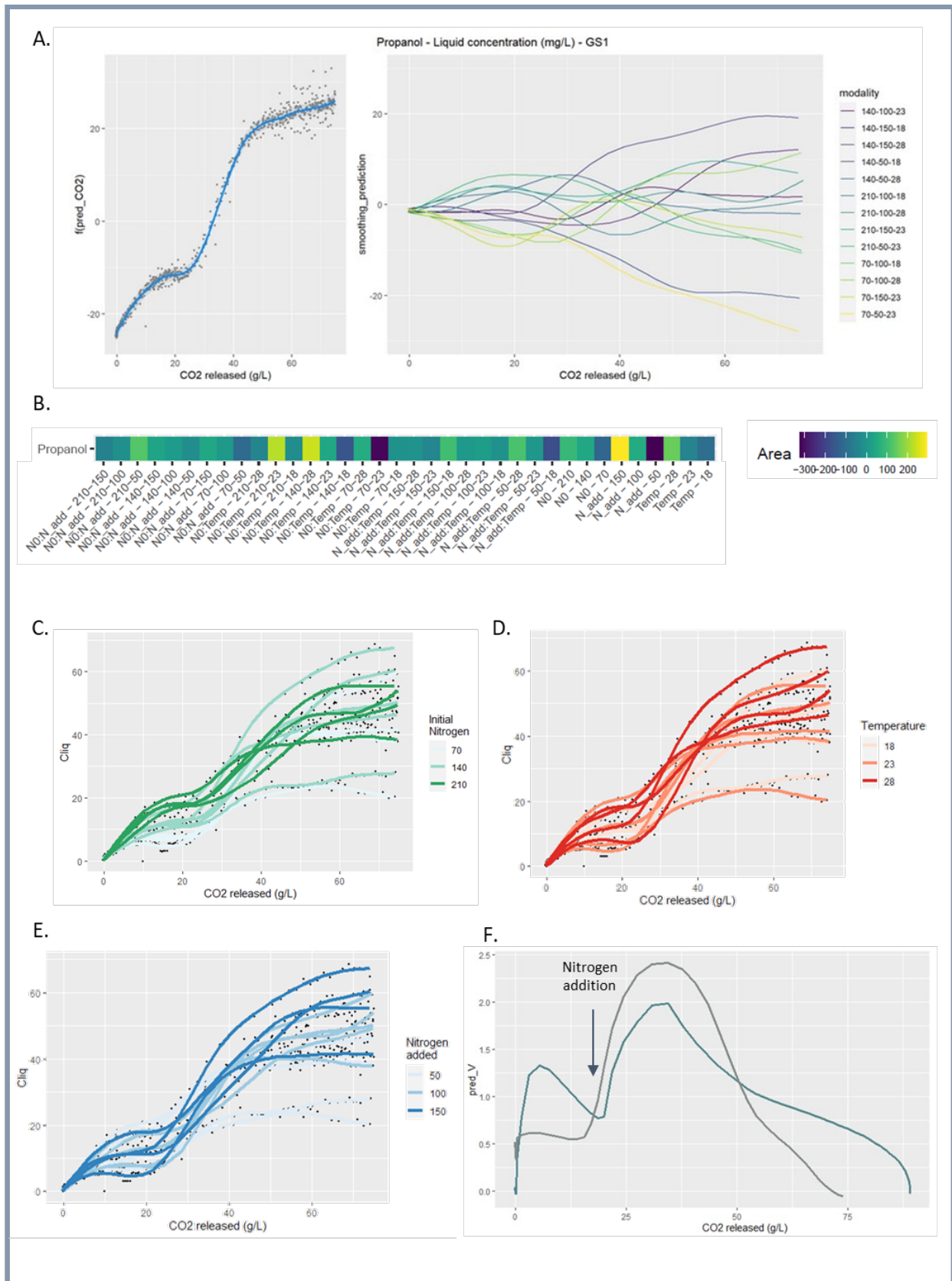


Figure 5. **GAM modelling of propanol production kinetics.** (A) Averages kinetics of all modalities and the divergence with the average curve. (B) Heatmap corresponding to the areas under the curve of divergences from the mean given by the GS2 model. (C) Kinetics colored by NO in green gradient. (D) Kinetics colored by Temp in red gradient. (E) Kinetics colored by Nad in blue gradient. (F) Graph showing the rate of CO<sub>2</sub> release (dark green) and the rate of propanol production (total production) (grey) as a function of fermentation progress.

### 3.2. Box-Behnken analysis

A Box-Behnken design was used to study the sign and weight of the 3 factors on some key parameters of the fermentation kinetics and on the final aroma contents. This statistical analysis is complementary to the GAM modeling done previously. The results of the simple, interaction and quadratic effects are summarized in **Table 3**.

#### 3.2.1. Parameters of fermentation kinetics

Three parameters were studied to summarize the fermentation kinetics: fermentation time (Tf), lag phase (Lagphase) and the difference between the first and second Vmax (dVmax). Fermentation time was significantly impacted by all three factors. In agreement with a previous study (Godillot et al., 2022), initial and added nitrogen contents had a negative effect as they reduced fermentation time. Moreover, increasing temperature also reduced fermentation time (J. M. Sablayrolles, 2009; Torija et al., 2003). The lag phase depends on the temperature (Colombie et al., 2005; Rollero et al., 2015): a high temperature shortens the lag time. Finally, the difference in Vmax was significantly impacted by all three factors. Initial nitrogen and temperature increased the difference in Vmax while the opposite was observed for added nitrogen in agreement with previous studies (Godillot et al., 2022; Malherbe et al., 2004).

Table 3. **Box-Behnken effects on final volatile compounds production.**

Parameters	Simple effects			Interactions			Quadratic effects		
	N0	Nad	T	N0:Nad	Nad:T	N0:T	N0	Nad	T
Tf	-	-	-			+	+		
Lagphase			-	-		+			+
dVmax	-	+	+	-	+	-		-	
Isoamyl alcohol		-						-	
Isobutanol			+						
Propanol		+	+						
Isoamyl acetate	+	+		-					-
Ethyl hexanoate			-						
Ethyl octanoate			-					-	

p.v < 0.001
  p.v < 0.01
  p.v < 0.05

### **3.2.2. Isoamyl alcohol, isobutanol and propanol**

The final production of higher alcohols was differently impacted by the three factors studied in the present work. For isobutanol and propanol, a positive effect of the temperature was noticed. This result matches with the results found after GAM analysis. Furthermore, a negative effect of added nitrogen for isoamyl alcohol supports previous results (Godillot et al., 2022; Seguinot et al., 2018). Finally, a positive effect of added nitrogen on propanol confirms the results of GAM and previous studies (Godillot et al., 2022; Mouret, Camarasa, et al., 2014; Seguinot et al., 2018). These results imply that the management of the synthesis of these three higher alcohols is different.

### **3.2.3. Isoamyl acetate**

For isoamyl acetate, the effects of initial nitrogen, added nitrogen and temperature on the final concentration were the same for liquid phase concentration and total production. Initial and added nitrogen had a significant positive effect on this ester. These results confirm those found in previous studies (Beltran et al., 2005; Seguinot et al., 2018). The effect of temperature on this ester is in agreement with the results found in the GAM analysis and the quadratic effect of temperature shows an optimum at 23°C.

### **3.2.4. Ratio IAA/IAOH**

For the ratio of higher alcohols conversion to acetate esters, the effects of the factors were identical between the concentration in the liquid and the total production. There was no significant effect of temperature. On the opposite, significant and positive effects of both initial and added nitrogen were observed, supporting the results found in a previous study (Godillot et al., 2022). High initial or added quantities of nitrogen both results in a greater conversion of isoamyl alcohol to isoamyl acetate. This result is also in line with those found by GAM analysis.

### **3.2.5. Ethyl hexanoate and octanoate**

Added nitrogen had a significant negative effect on the concentration of ethyl octanoate in the liquid. Temperature also had a significant negative effect on both esters for both liquid concentration and total production. This result is in keeping with the GAM analysis but also with Mouret et al., 2014 that brought out a strong evaporation of esters (50-60%) but also a decrease in their synthesis by the yeast when the fermentation temperature increases.

#### 4. Discussion

The main originality of the present work was to implement a multidisciplinary approach combining the online monitoring of the fermentation process and two original and complementary approaches of statistical modelling (Box Behnken and GAM). This innovative strategy made it possible to (i) acquire a detailed understanding of the overall kinetics of volatile compound production and (ii) take into account both the direct and interaction effects of the parameters on the dynamics of aroma synthesis. This global view allows to go deeper in the understanding of the impact of the studied factors and to differentiate the metabolic and physicochemical effects.

Based on this original approach, the first objective of the present work was to investigate the impact of initial nitrogen, added nitrogen and temperature on the whole aroma production kinetics. The second objective was to “quantify” (weight and sign of variation) these effects on the volatile concentrations at the end of fermentation.

First, the analysis of the fermentation kinetics was studied and showed a significant impact of the three factors on its shape. All the results found are consistent with previous studies and confirm the robustness of the statistical analyses related to this study.

In a second step, we focused on the results of the aromas online monitoring. The analysis of the production kinetics of propanol was more thorough because of its strong reactivity to the studied factors and of its atypical chronology of synthesis compared to the other aromas.

The parameter that had the highest impact on both propanol production kinetics and final content is added nitrogen (**Figure 5** and **Table 3**). Indeed, as already noted in previous works (Godillot et al., 2022; Seguinot et al., 2018), an addition of nitrogen during the stationary phase is more “efficient” to increase propanol production compared to an initial addition. This specific relationship between propanol production and nitrogen addition can be explained by the following metabolic mechanisms: at first, the addition of nitrogen during fermentation will activate the genes responsible for amino acid synthesis (Godillot et al., 2022). Based on this stimulation of nitrogen metabolism, it is conceivable that the addition of ammonium during the stationary phase would directly activate the synthesis of aspartate via the glutamate node, notably because the most produced amino acids by central carbon metabolism are glutamate and aspartate (Crépin et al., 2017). Aspartate being the precursor of threonine, the concentration of this last amino acid would increase and finally result in a significantly increased synthesis of propanol (**Figure 6**). Possibly, the direct relation between propanol production and nitrogen consumption, in contrast to other higher alcohols, may be linked to a lower demand for threonine in proteins compared to other amino acids (such as leucine or valine for example) (Crépin et al., 2017). Propanol would thus act as a “safety valve”, preventing the accumulation of  $\alpha$ -ketobutyrate and threonine in the intracellular medium (Mouret, Camarasa, et al., 2014).

In the present study, the increase in temperature coupled with an addition of nitrogen in stationary phase induced an increase in propanol production. Indeed, when the temperature is increased, so is cell activity (J. M. Sablayrolles, 2009). The genes responsible for the synthesis of  $\alpha$ -ketoacids (*BAT1*) to higher alcohols (*THI3*, *ARO10*, *ADH2/3/5*) are overexpressed (Molina et al., 2007). This would explain that high fermentation temperatures promote the synthesis of higher alcohols (**Figure 6**).

Conversely, no impact of temperature has been reported in the literature. In these works, nitrogen additions were done at the start of the process and not during the stationary phase. It could be thought that the temperature effect in the present study originated from a combined positive stimulation of synthesis of  $\alpha$ -ketoacids (*BAT1*) to higher alcohols by both high temperature and nitrogen addition during the stationary phase.

To our knowledge, this is the first time that that propanol is shown sensitive to both nitrogen assimilation and temperature increase and to the interaction of these two factors. The effect of added nitrogen on propanol concentration is greater at higher temperatures than at lower temperatures, as is the effect on fermentation rate. The dynamics of the propanol production rate are very close to those of the CO<sub>2</sub> release rate. Thus, propanol can be considered not only as a marker of nitrogen availability in the medium but also as a marker of cellular activity.

In contrast to propanol, isoamyl alcohol and isobutanol had a relatively different behavior with respect to the different factors studied in this study. The production kinetics of isoamyl alcohol and isobutanol are influenced by the initial nitrogen content: a high initial nitrogen concentration results in lower production for these two alcohols. Moreover, for isoamyl alcohol, we found a significant and negative quadratic effect of initial nitrogen showing an optimum at 140 mg/L of initial nitrogen (**Figure 1**).

Leucine and valine are amino acids (precursors of isoamyl alcohol and isobutanol, respectively), which in the growth phase, will be directly used for protein synthesis. Unlike threonine, the share of catabolism of these amino acids is low. Crépin et al., 2017 showed that the synthesis of isobutanol depends mainly on valine produced by CCM (Central Carbon Metabolism) and not on its assimilation in the medium. For isoamyl alcohol, synthesis depends mainly on the assimilation of leucine from the extracellular medium and its transformation into  $\alpha$ -ketoisocaproate. During the exponential phase, the part of assimilated leucine and synthesized valine will go towards protein synthesis to meet cell demands. The flow towards the synthesis of higher alcohols is then weak compared to the demand in amino acids. A high concentration of initial nitrogen in the must implies a high demand for proteins, which reduces the synthesis of these two higher alcohols. Similar to the initial nitrogen content, added nitrogen also has a significant impact on the production of these two alcohols (**Figure 1; Table 3**) and does not stimulate their production. As mentioned above, the demand for amino acids is once again stimulated and the flow goes towards the synthesis of proteins and not higher alcohols (Crépin et al., 2017).

The production kinetics of isoamyl alcohol and isobutanol are positively impacted by temperatures above or equal to 23°C. Moreover, the predictions of the Box-Behnken design are in line with the GAM modelling with a positive effect of temperature on their final productions. However, the two alcohols do not display the same behavior towards temperature. For isoamyl alcohol, an optimum appears at 23°C while the ideal temperature for isobutanol production is 28°C. This can be explained by a different regulation of the expression of the genes responsible for their synthesis and thus by a different management of the  $\alpha$ -ketoisocaproate and  $\alpha$ -ketoisovalerate pool between 18 and 28°C. The synthesis of these two higher alcohols therefore depends on CCM activation by temperature (**Figure 6**).

The production kinetics of isoamyl acetate, whether in liquid or in terms of total production, are impacted by the interaction of the three factors studied.

These interactions are particularly important and mask some effects previously reported in the literature, such as the simple effect of initial nitrogen concentration (Hernandez-Orte et al., 2006; Godillot et al., 2022; Rollero et al., 2015; Seguinot et al., 2018). Indeed, depending on the concentration of added nitrogen or fermentation temperature, a high concentration of initial nitrogen is not necessarily associated to a significant isoamyl acetate production. The impact of one of the factors on the synthesis of this compound is therefore dependent on the value of the others. This clearly demonstrates that the management of the synthesis of this ester is multi-parametric.

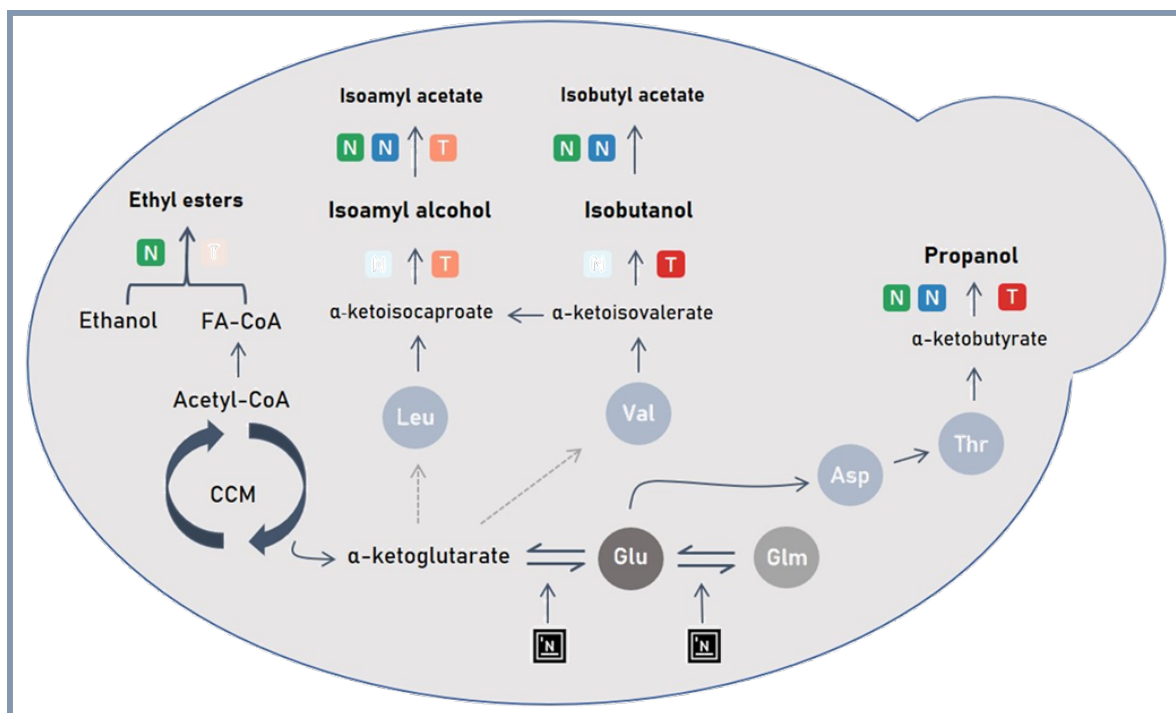


Figure 6. Scheme representing the impact of nitrogen and temperature management on yeast metabolism. NO is represented by a green gradient; Nadd by a blue gradient; Temp by a red gradient. The added nitrogen will act at the  $\alpha$ -ketoglutarate node and induce a change in the flow of amino acid synthesis that affects aromas synthesis.



The aromatic signature of isoamyl acetate is characterized by a change in slope following the addition of nitrogen reflecting an acceleration of its production. As shown in previous studies, high concentrations of added nitrogen promote the synthesis of acetate esters (Godillot et al., 2022; Seguinot et al., 2018). Nitrogen addition during fermentation allows the activation of the *ATF2* gene responsible for the synthesis of acetate esters from higher alcohols (Godillot et al., 2022; Seguinot et al., 2018). This overexpression provokes an increase in the conversion of isoamyl alcohol into its ester and eventually a higher isoamyl acetate production (**Figure 6**).

Temperature has a negative impact on the production kinetics of isoamyl acetate on two aspects: physical and biological. Indeed, excess temperatures have a negative impact on the accumulation of this compound in the liquid phase since they will induce losses by evaporation (**Figure 3E**). Remarkably, this negative effect of temperature is also found for total production, indicating that isoamyl acetate synthesis by yeast is not optimal at 28°C (**Figure 3E**). All statistical analyses performed in the present work pointed out that, under our conditions, the ideal temperature for isoamyl acetate synthesis was 23°C (**Figure 3D**).

An interesting observation is that it is also at this temperature that the synthesis of isoamyl alcohol is highest. A possible explanation to this situation is that, at 23°C, yeast is in an ideal physiological state for the synthesis of higher alcohols and for the bioconversion of higher alcohols into esters, resulting therefore in a high acetate esters production (**Figure 3F**).

Concerning ethyl esters, we observed that their production kinetics were enhanced by high initial concentrations of nitrogen; nevertheless, the “intensity” of this effect is rather low as no significant effect of initial nitrogen on the final concentration of these esters could be evidenced (**Table 3**). Moreover, the synthesis of the two ethyl esters was not impacted by a nitrogen addition during the stationary phase, as already shown in previous studies (Godillot et al., 2022; Seguinot et al., 2018). The lack of effects of added nitrogen on ethyl ester production is not surprising since their synthesis depends on fatty acids and thus on the lipid pathway (Barbosa et al., 2009a; Seguinot et al., 2018).

This work clearly demonstrates that ethyl esters are highly impacted by temperature. We find a significant negative effect of temperature on production kinetics in the liquid. Indeed, as ethyl esters are particularly volatile and hydrophobic compounds, high temperatures induce a strong evaporation from the liquid to the gas for temperatures above 18°C. These results are in agreement with many previous studies (Morakul et al., 2013; Mouret, Camarasa, et al., 2014; Rollero et al., 2015). Most strikingly, the same negative effect is found for the total production of ethyl hexanoate and ethyl octanoate. Their synthesis by yeast would only be optimal at temperatures ranging from 18 to 23°C. A previous study showed that the genes responsible for the activation of fatty acids by acetyl-CoA (*MCT1*, *ETR1*, *OAR1*) are overexpressed at low temperature (Beltran et al., 2006), in which case the quantity of available acyl-CoA precursors would be higher, resulting in an increased synthesis of the corresponding ethyl esters (**Figure 6**).

## **5. Conclusion**

The objective of this study was to understand the simultaneous impact of three factors on fermentation kinetics and aroma synthesis kinetics during fermentation. To do so, we combined precise determination of production dynamics, mass balances and the use of two complementary statistical analysis methods: GAM and Box-Behnken.

This innovative approach allowed us to study the weight of each of the factors on the shape of the kinetics on the one hand, and on specific kinetics parameters (difference between  $V_{max}$ ; final concentration in the liquid), on the other hand. It was found that the production of the different families of aromas through yeast metabolism was regulated differently. But this global and combined approach also allowed identifying original results of primary metabolic interest: (i) propanol can be considered as a marker of cellular activity; (ii) temperature has both biological and physical impacts on esters production dynamics.

In future works, it would be interesting, using this combination of analyses, to study the dual effect of temperature in greater depth and to integrate a transcriptomic approach to further understand the related biological phenomena.

## **6. Conflict of Interest**

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

## **7. Author Contributions**

MP and EA designed the experimental strategy to perform all fermentations of this study and developed the associated tools including automatic nitrogen addition. YS developed the analytical method and calibration procedure for the online GC equipment for volatile compound monitoring. IS and MB designed the Box-Behnken experimental design, built the two GAM models and performed the associated statistical analysis. JG and CB implemented all the experiment. JG drafted the manuscript. J-RM, VF, and JG performed the interpretation of all the data conceived and designed the overall study. J-RM, VF and J-MS revised the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

## **8. Funding**

This research project was funded by the French National Research Agency (ANR) under grant agreement STARWINE (ANR-18-CE10-0013).

## 9. Acknowledgments

We would also like to thank all the members of the STARWINE project.

## 10. Data availability statement

Data are available at the following address:

## 11. References

- Barbosa, C., Falco, V., Mendes-Faia, A., & Mendes-Ferreira, A. (2009). Nitrogen addition influences formation of aroma compounds, volatile acidity and ethanol in nitrogen deficient media fermented by *Saccharomyces cerevisiae* wine strains. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *108*(2), 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.02.017>
- Beltran, G., Esteve-Zarzoso, B., Rozès, N., Mas, A., & Guillamón, J. M. (2005). Influence of the timing of nitrogen additions during synthetic grape must fermentations on fermentation kinetics and nitrogen consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(4), 996–1002. <https://doi.org/10.1021/jf0487001>
- Beltran, G., Novo, M., Leberre, V., Sokol, S., Labourdette, D., Guillamon, J. M., Mas, A., François, J., & Rozes, N. (2006). Integration of transcriptomic and metabolic analyses for understanding the global responses of low-temperature winemaking fermentations. *FEMS Yeast Research*, *6*(8), 1167–1183. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00106.x>
- Bely, M., Sablayrolles, J. M., & Barre, P. (1990). Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, *70*(4), 246–252. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(90\)90057-4](https://doi.org/10.1016/0922-338X(90)90057-4)
- Box, G. E. P., & Behnken, D. W. (1960). *American Society for Quality Some New Three Level Designs for the Study of Quantitative Variables* (Vol. 2, Issue 4).
- Colombie, S., Malherbe, S., & Sablayrolles, J. M. (2005). Modeling alcoholic fermentation in enological conditions: feasibility and interest. In *American journal of enology and viticulture: Vol. v. 56*.
- 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*. *Applied and Environmental Microbiology*, *83*(5). <https://doi.org/10.1128/AEM.02617-16>
- Godillot, J., Sanchez, I., Perez, M., Picou, C., Galeote, V., Sablayrolles, J.-M., Farines, V., & Mouret, J.-R. (2022). The Timing of Nitrogen Addition Impacts Yeast Genes Expression and the Production of Aroma Compounds During Wine Fermentation. *Frontiers in Microbiology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.829786>

- Hernandez-Orte, P., Bely, M., Cacho, J., & Ferreira, V. (2006). Impact of ammonium additions on volatile acidity, ethanol, and aromatic compound production by different *Saccharomyces cerevisiae* strains during fermentation in controlled synthetic media. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 12(2), 150–160. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2006.tb00055.x>
- Lenth, R. V. (2009). Response-Surface Methods in R, Using rsm. In *JSS Journal of Statistical Software* (Vol. 32, Issue 7). <http://www.jstatsoft.org/>
- Malherbe, S., Fromion, V., Hilgert, N., & Sablayrolles, J. M. (2004). Modeling the Effects of Assimilable Nitrogen and Temperature on Fermentation Kinetics in Enological Conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 86(3), 261–272. <https://doi.org/10.1002/bit.20075>
- 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. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(3), 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 and Bioprocess Technology*, 6(3), 818–827. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0827-4>
- Morakul, S., Mouret, J. R., Nicolle, P., Trelea, I. C., Sablayrolles, J. M., & Athes, V. (2011). Modelling of the gas-liquid partitioning of aroma compounds during wine alcoholic fermentation and prediction of aroma losses. *Process Biochemistry*, 46(5), 1125–1131. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.01.034>
- Mouret, J. R., Camarasa, C., Angenieux, M., Aguera, E., Perez, M., Farines, V., & Sablayrolles, J. M. (2014). Kinetic analysis and gas-liquid balances of the production of fermentative aromas during winemaking fermentations: Effect of assimilable nitrogen and temperature. *Food Research International*, 62, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.02.044>
- Mouret, J. R., Perez, M., Angenieux, M., Nicolle, P., Farines, V., & Sablayrolles, J. M. (2014a). Online-Based Kinetic Analysis of Higher Alcohol and Ester Synthesis During Winemaking Fermentations. *Food and Bioprocess Technology*, 7(5), 1235–1245. <https://doi.org/10.1007/s11947-013-1089-5>
- Pedersen, E. J., Miller, D. L., Simpson, G. L., & Ross, N. (2019). Hierarchical generalized additive models in ecology: An introduction with mgcv. *PeerJ*, 2019(5), e6876. <https://doi.org/10.7717/PEERJ.6876/SUPP-1>
- 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(5), 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. *Frontiers in Microbiology*, 9(FEB). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00196>
- Sablayrolles, J. M. (2009). Control of alcoholic fermentation in winemaking: Current situation and prospect. *Food Research International*, 42(4), 418–424. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.12.016>
- 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>
- Swiegers, J. H., Bartowsky, E. J., Henschke, P. A., & Pretorius, I. S. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(2), 139–173. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00285.x>
- Torija, M. J., Rozès, N., Poblet, M., Guillamón, J. M., & Mas, A. (2003). Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, 80(1), 47–53. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00144-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00144-7)
- Wickham, H., Averick, M., Bryan, J., Chang, W., McGowan, L., François, R., Grolemund, G., Hayes, A., Henry, L., Hester, J., Kuhn, M., Pedersen, T., Miller, E., Bache, S., Müller, K., Ooms, J., Robinson, D., Seidel, D., Spinu, V., ... Yutani, H. (2019). Welcome to the Tidyverse. *Journal of Open Source Software*, 4(43), 1686. <https://doi.org/10.21105/JOSS.01686>
- Wood, S. N. (2017). Generalized additive models: An introduction with R, second edition. *Generalized Additive Models: An Introduction with R, Second Edition*, 1–476. <https://doi.org/10.1201/9781315370279/GENERALIZED-ADDITIVE-MODELS-SIMON-WOOD>

## Résultats complémentaires

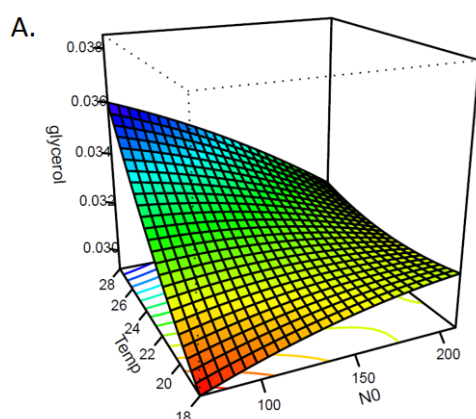
### 1. Effet combiné de l'azote et de la température sur les métabolites du MCC

L'effet de l'impact des ajouts d'azote combiné à celui de la température est également observé sur la concentration finale des métabolites du MCC. Le plan de Box-Behnken montre que les trois facteurs étudiés dans ce chapitre ont un impact sur les métabolites du MCC avec des effets simples, d'interactions et quadratiques (**Tableau 19**).

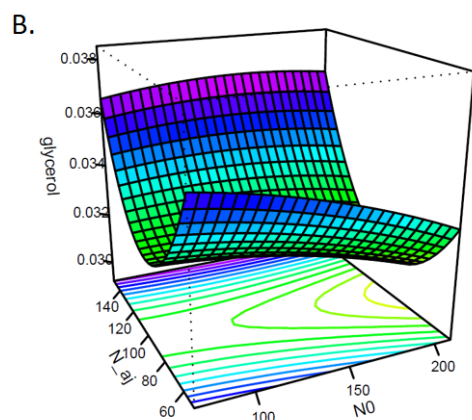
Tableau 19. Effets simples, d'interactions et quadratiques des trois facteurs étudiés sur les métabolites du MCC.

	Simple effects			Interactions			Quadratic effects			R <sup>2</sup>	p.V	LOF
	NO	Nad	T	NO : Nad	NO : T	Nad : T	NO	Nad	T			
Glycerol			+					+		0.8017	0.0207	0.8998
Acetate	+			+						0.7249	0.0438	0.1859
Pyruvate							+			0.6266	0.086	0.9684
Succinate	-	-	+		-			+		0.9209	0.0023	0.227

■ p.v < 0.001    ■ p.v < 0.01    ■ p.v < 0.05



Pour le glycérol, le modèle montre un effet simple et positif de la température (**Tableau 19 ; Figure 23A**), en accord avec des données publiées précédemment (Guittin et al., 2021; Rollero et al., 2015). Cette augmentation peut être expliquée par une activité plus importante de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (GPDH) aux environs de 25 °C (Gao et al. 2019). De plus, l'activité cellulaire augmente avec la température et le flux en direction du glycérol peut donc être plus important.



Ce métabolite est également impacté par un ajout d'azote en cours de fermentation. Un effet quadratique est observé, avec la mise en évidence d'un minimum à 100 mg/L d'azote ajouté (**Tableau 19 ; Figure 23B**). L'existence de ce minimum semble être lié au métabolisme redox car le même effet quadratique est observé sur le succinate (**Tableau 19 ; Figure 24A**).

Figure 23. Surface de réponse de la concentration finale en glycérol (mg/L). (A) En fonction de la température et de l'azote initial. (B) En fonction de l'azote ajouté et de l'azote initial.

En effet, le glycérol et le succinate sont les deux composés majoritaires impliqués dans le maintien de la balance redox intracellulaire : le glycérol permet la réoxydation du NADH tandis que le succinate est impliqué dans sa synthèse (Celton et al., 2012; Michnick et al., 1997; Rollero et al., 2015).

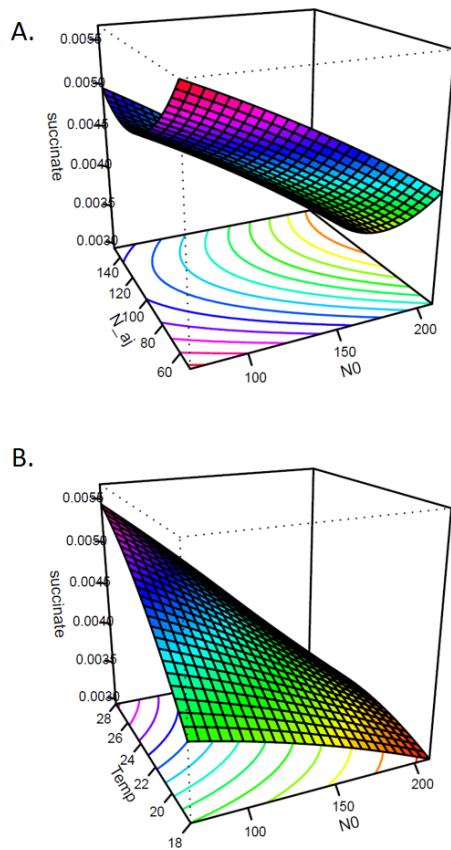


Figure 24. **Surface de réponse de la concentration finale en succinate (mg/L).** (A) En fonction de l'azote ajouté et de l'azote initial. (B) En fonction de la température et de l'azote initial.

La production d'acétate est influencée positivement par l'azote initial et confirme les résultats trouvés dans le chapitre 1 (Godillot et al., 2022). Le modèle montre également un effet d'interaction positif entre l'azote initial et l'azote ajouté (Tableau 19 ; Figure 25). En fonction de la concentration en azote initial, l'azote ajouté a un effet différent. Cependant, ce résultat n'apparaît pas dans les résultats du chapitre précédent.

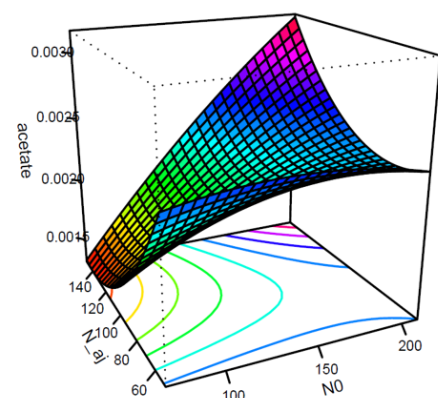


Figure 25. **Surface de réponse de la concentration finale en acétate (mg/L)** en fonction de l'azote ajouté et de l'azote initial.

Ainsi, la concentration en succinate est également impactée négativement par l'azote initial comme montré dans le premier chapitre (Godillot et al., 2022) (Tableau 19 ; Figure 24B). Obtenir des effets différents de l'azote initial et ajouté sur la production de succinate démontre qu'un ajout d'azote en phase de croissance ou en phase stationnaire a un effet différent sur l'intensité des flux métaboliques impliqués dans les voies réductrices et oxydatives du cycle TCA.

Enfin, pour le succinate, le modèle met en évidence un effet positif de la température (Tableau 19 ; Figure 24B), en accord avec des travaux de recherche précédents (Guittin et al., 2021; Rollero et al., 2015). Ce comportement semble, encore une fois, lié au métabolisme redox de la cellule et donc au lien entre glycérol et succinate. De plus, à haute température, la formation de succinate peut éviter l'accumulation d' $\alpha$ -cétoglutarate dans le milieu (Camarasa et al., 2003; Rollero et al., 2015).

L'acétate est impliqué dans l'équilibre redox (NADPH) surtout pendant la croissance (Saint-Prix et al., 2004). Lorsque la concentration en azote initial est faible (70 mg/L), un ajout d'azote en forte concentration va favoriser la synthèse d'acétyl-CoA plutôt que celle de l'acétate pour répondre aux besoins de la cellule.

A l'inverse, une forte concentration en azote initial couplée à une forte concentration en azote ajouté favorise la production d'acétate (**Figure 25**).

Les besoins cellulaires en acétyl-CoA étant moins importants du fait de la plus grande disponibilité en nutriments, le flux est majoritairement redirigé vers la synthèse d'acétate pour maintenir l'équilibre redox (régénération du NADPH). De plus, il a été montré que le gène *ALD5*, responsable de la synthèse d'acétate à partir de l'acétaldéhyde, est surexprimé suite à un ajout d'azote (Godillot et al., 2022).

## 2. Données transcriptomique complémentaires sur le propanol

Afin de compléter les résultats concernant le rôle du propanol en tant que marqueur métabolique, certaines données de l'étude transcriptomique réalisée au chapitre 1 sont présentées ci-dessous (**Figure 26**).

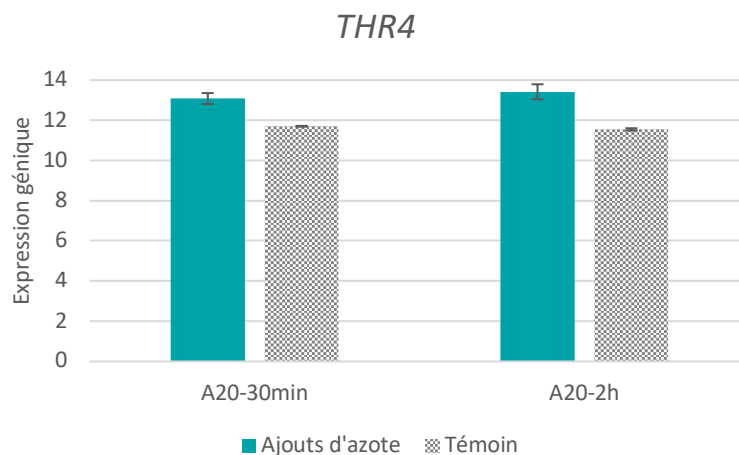


Figure 26. **Expression génique du gène *THR4*** suite à un ajout réalisé à 20 g/L de CO<sub>2</sub> (A20) par rapport au témoin. L'expression génique a été dosée 30 min et 2 h après l'ajout.

Le gène *THR4*, responsable de la synthèse de la thréonine, est induit par un ajout d'azote réalisé en début de phase stationnaire de fermentation et ce dès 30 minutes après l'ajout. On obtient une différence d'expression de 1.38 entre la fermentation avec ajout et la fermentation témoin (sans ajout) 30 minutes après l'ajout. Une différence de 1.87 est observée 2 heures après l'ajout. Une fois l'azote ajouté dans le milieu, la synthèse de la thréonine est directement activée par le gène *THR4*.



De plus, deux autres gènes sont particulièrement sensibles à l'ajout d'azote, *HOM3* et *HOM2* (**Figure 27**). Ces gènes codent pour des enzymes responsables de la première et de la deuxième étape de biosynthèse de la thréonine à partir de l'aspartate. Le gène *HOM3* est surexprimé par rapport au témoin dès 30 minutes après l'ajout d'azote puis on observe une augmentation de la différence d'expression de 1.5 fois 2 heures après l'ajout. La différence d'expression *HOM3* 2 heures après l'ajout atteint 3.2, ce qui est très important. Concernant *HOM2*, son expression n'est pas significativement différente du témoin 30 minutes après l'ajout. En revanche, 2 heures après l'ajout on obtient une différence de 2.5.

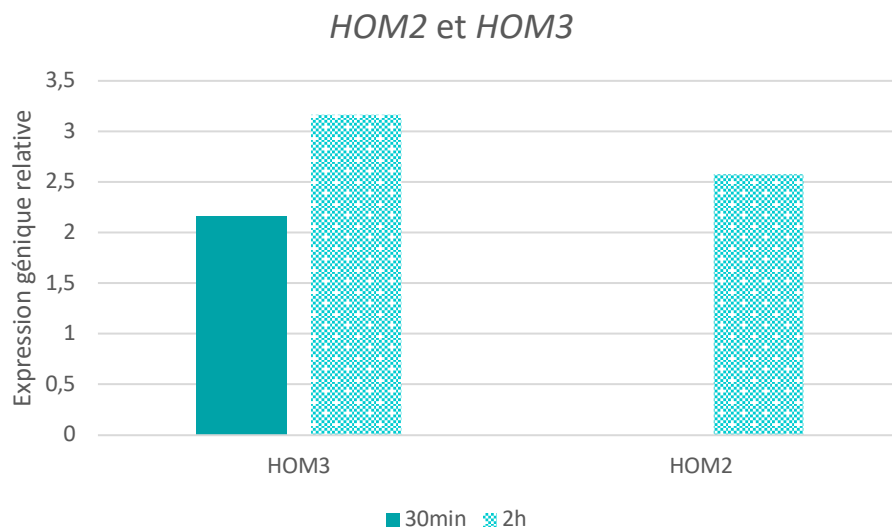


Figure 27. **Expression génique des gènes *HOM2* et *HOM3*** relative au témoin suite à un ajout réalisé à 20 g/L de CO<sub>2</sub>. L'expression génique a été dosée 30 min et 2 h après l'ajout.

Ces résultats montrent une nouvelle fois que l'ajout d'azote en cours de fermentation va agir directement sur le nœud  $\alpha$ -cétoglutarate pour initier la synthèse *de novo* des acides aminés. De plus, on remarque que, dès 30 minutes après l'ajout d'azote, une forte activation de la synthèse de thréonine à partir de l'aspartate est observée. Cette stimulation de la synthèse de thréonine va entraîner un flux plus important dans la voie métabolique correspondante et une « fuite » au niveau du propanol qui conduit donc à une hausse de la concentration extracellulaire de cet alcool.

## Chapitre 3 :

# Étude de l'impact des ajouts d'azote et de la température anisotherme sur les cinétiques fermentaires et aromatiques

Dans ce dernier chapitre, la gestion de température anisotherme de la fermentation a été étudiée en combinaison avec un ajout d'azote en cours de processus. Pour cela, 8 profils anisothermes ont été mis en œuvre : 3 avec une augmentation de la température au cours de la phase stationnaire ; 3 avec une diminution de la température ; et 2 avec une augmentation et une diminution de la température pendant la fermentation. Ces profils évoluent en fonction du CO<sub>2</sub> dégagé. Seize fermentations ont été effectuées pour ce dernier chapitre : huit fermentations anisothermes seules et huit anisothermes avec un ajout d'azote fixé à 20 g/L. Elles ont été réalisées à l'unité expérimentale de Pech Rouge à Gruissan dans des fermenteurs de 10L. Une nouvelle fois, la production des arômes fermentaires a été suivie tout au long de la fermentation.

Nous avons analysé la concentration finale en métabolites du MCC et en arômes pour mieux appréhender l'effet de l'ajout d'azote combiné à l'anisothermie. L'analyse des cinétiques (fermentaires et aromatiques) a été faite avec la modélisation GAM pour voir l'impact des profils de température et de l'ajout sur l'ensemble de la cinétique de production des arômes.

Les profils anisothermes combinés à un ajout d'azote ont un impact important sur la cinétique fermentaire, les métabolites du MCC et la production des arômes. Un effet important d'interaction est observé entre les profils anisothermes et l'ajout d'azote sur la production des arômes notamment pour les alcools supérieurs et l'isoamyle acétate. Ensuite, une diminution de la température pendant la phase stationnaire permet une meilleure synthèse des esters et surtout une meilleure conservation de ces derniers dans le liquide. De plus, différentes combinaisons de paramètres (profils de température et ajout d'azote) permettent d'obtenir la même concentration finale en arômes.

Ce chapitre est une première version d'un article qui sera soumis dans le journal Food microbiology.

# Kinetic Analysis of the Volatile Compounds Production: Study of the Impact of Nitrogen Addition and Anisothermal Temperature During Alcoholic Fermentation

Godillot Joséphine<sup>1</sup>, Sanchez Isabelle<sup>2</sup>, Baragatti Meili<sup>2</sup>, Perez Marc<sup>1</sup>, Pinier Centina<sup>3</sup>, Aguera Evelyne<sup>3</sup>, Sablayrolles Jean-Marie<sup>1</sup>, Farines Vincent<sup>1</sup>, Mouret Jean-Roch<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>SPO, Univ Montpellier, INRAE, Institut Agro, Montpellier, France

<sup>2</sup>MISTEA, INRAE, Institut Agro, Montpellier, France

<sup>3</sup>UE Pech Rouge, INRAE, Gruissan, France

## \*Correspondence:

Mouret Jean-Roch

jean-roch.mouret@inrae.fr

**Keywords: Alcoholic fermentation - Wine - Nitrogen additions - Anisothermal Temperature - Fermentative aromas - Statistical modeling**

## Abstract

Temperature management and nitrogen addition during fermentation are two key drivers to optimize the production of fermentative aromas. Temperature has both physical and biological impacts on liquid accumulation of volatile compounds whereas nitrogen addition directly activates the synthesis of certain aromas, especially acetate esters.

The objective of this work was to study the cross impact of anisothermal temperature profiles and nitrogen additions on the fermentative aromas production. For this purpose, eight anisothermal profiles were designed and tested in combination with nitrogen addition during the stationary phase. The concentration of fermentative aromas of different chemical families was measured at the end of fermentation while the kinetics of esters production were monitored throughout the fermentation. The results were compiled and analyzed using GAM modeling. The main results of this study showed an important cross impact between the two factors on fermentation and aroma kinetics. Moreover, the precise monitoring of the ester production gave a more precise vision of the impact of temperature management on their synthesis. For example, GAM modeling showed that profiles including a temperature decrease during the stationary phase allowed both a higher synthesis of esters and a better preservation in the liquid phase. Another interesting point was the possibility to develop fermentation managements making it possible the de-correlation between the production of ethyl hexanoate and octanoate whereas these two compounds were generally correlated in previous works.

## 1. Introduction

Today, optimizing the control of oenological fermentation is a key element to improve the wine aroma quality. Indeed, among the different aromas produced by yeasts during the alcoholic fermentation, esters can be cited as the main contributors to the fruity flavor of wine (Swiegers et al., 2005).

Many studies have been conducted to better understand the metabolism associated with the synthesis of esters and other aroma compounds during fermentation (Beltran et al., 2004; Saerens et al., 2006; Swiegers et al., 2005; Verstrepen, Derdelinckx, Dufour, Winderickx, Pretorius, et al., 2003). Considering the environmental parameters known to influence the production of fermentative aromas, fermentation temperature and nitrogen are considered as the most important ones (Beltran et al., 2005, 2006; Molina et al., 2007; Mouret, Camarasa, et al., 2014; Rollero et al., 2015; Seguinot et al., 2018).

Temperature is a key parameter that must be controlled because it has a significant impact on fermentation kinetics and aroma production (Bely et al., 1990c; Mouret et al., 2012; Saerens, Delvaux, et al., 2008). The effect of temperature on the different families of aromas synthesized by yeast is very diverse: production of higher alcohols (with the exception of propanol) increased with temperature whereas liquid accumulation of esters decreased with temperature, mainly because of higher losses by evaporation related to the high hydrophobicity of esters (Guittin et al., 2021; Mouret, Camarasa, et al., 2014). Focusing on esters, it appears that their conversion yield from sugars is not linear during the process and their losses by evaporation increase throughout the fermentation (Morakul et al., 2013; Mouret, Camarasa, et al., 2014; Mouret, Perez, et al., 2014a). Therefore, an anisothermal management of the fermentation temperature – which is already a common practice in the wine industry to optimize the fermentation time – appears to be an interesting opportunity for the management of aroma productions by yeast.

Nitrogen is an essential nutrient for yeast growth and fermentation but also for synthesis of aroma compounds. It has been shown that both initial nitrogen concentration and addition of nitrogen during the stationary phase result in a significant increase of acetate esters concentrations (Rollero et al., 2015; Seguinot et al., 2018). The timing of nitrogen addition during fermentation is also very important and a late addition of nitrogen is more efficient than an initial one for the production of this type of esters (Godillot et al., 2022; Seguinot et al., 2018).

Therefore, studying fermentation strategies that combine anisothermal fermentations and nitrogen addition would be a helpful opportunity for the control and optimization of aroma production during fermentation. The cross impact of these two factors has never been studied before and this study is therefore a first exploratory approach of the future design of innovative fermentation strategies. For this purpose, eight anisothermal profiles were designed and tested in combination with nitrogen addition.

The concentration of fermentative aromas from different chemical families was measured at the end of fermentation whereas the kinetics of ester production were monitored throughout the fermentation. The results were compiled and analyzed using GAM modeling.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Fermentation conditions

#### 2.1.1. Yeast strain

The *Saccharomyces cerevisiae* strain used in this study is the commercial strain Lalvin EC1118® (Lallemand SA, Montreal, Canada). Fermentation tanks were inoculated with 10 g/hL active dry yeast previously rehydrated for 30 min at 37°C in a 50 g/L glucose solution.









#### 2.1.2. Fermentation media

All fermentations were carried out in synthetic musts simulating a standard grape juice (Bely et al., 1990b). The detailed compositions of the different stock solutions used for the preparation of this synthetic medium are identical to the ones presented in Mouret et al., 2014. All musts contained 200 g/L of sugars (100 g/L glucose and 100 g/L fructose) and their pH was 3.3. From an initial assimilable nitrogen (composed of ammonium chloride and mixture of amino acids) concentration of 140 mg/L in the synthetic, only one concentration fixed to 100 mg/L of nitrogen added (di-ammonium phosphate) was tested (20 g/L of CO<sub>2</sub> released).

#### 2.1.3. Tanks and fermentation control

Fermentations were run in 10-liter stainless steel tanks. The amount of CO<sub>2</sub> released was measured accurately and automatically with a gas mass flowmeter, for calculation of the rate of CO<sub>2</sub> production ( $dCO_2/dt$ ). Different temperature profiles were tested (table 1).

Table 1. Anisothermal profile tested in the experiment.

Anisothermal profile	Temperature range (°C)
1 	18 → 28 → 18
2 	18 → 28
3 	28 → 18 → 28
4 	28 → 18
5 	23 → 28
7 	18 → 28
6 	28 → 18
8 	23 → 18

## 2.2. Determination of CCM metabolites

Ethanol, glycerol, succinate and acetate concentrations were determined by HPLC (HPLC 1290 Infinity, Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) in a Phenomenex Rezex ROA column (Agilent Technologies, Santa Clara, California, 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. The acetic acid concentration was determined with a UV meter at 210 nm; the concentrations of the other compounds were determined with a refractive index detector. Analysis was carried out with the Agilent EZChrom software package.

## 2.3. Offline analysis of volatile compounds in the liquid phase

The determination of volatile compounds in the liquid phase is done in the supernatant. In this work, the must samples for aroma determination were taken at 80% fermentation progress. 10 µL of a solution of deuterated standards (containing ethyl butanoate-d<sub>5</sub>, ethyl hexanoate-d<sub>5</sub>, ethyl octanoate-d<sub>5</sub>, butyric acid-d<sub>7</sub>, ethyl decanoate-d<sub>5</sub>, phenylethanol-d<sub>4</sub>) at 100 pg/mL each is added to 5 mL of sample in a 15-mL Pyrex tube with a Teflon cap (Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA). The sample is extracted twice with 1 mL of dichloromethane for 20 min with shaking. It is then centrifuged for 5 minutes at 3000 rpm. The organic phase is collected in a 4 mL vial and dried with anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> to remove any trace of aqueous phase. The organic phase is then concentrated under nitrogen flow to a volume of 0.5 mL. Finally the sample is transferred to an insert (Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA) placed in a capped 2 mL vial.

The analysis of the samples is done by gas chromatography Agilent 8860 (Agilent technologies, Santa Clara, California, USA) equipped with an autosampler 7693A (Agilent technologies, Santa Clara, California, USA) and coupled to a mass spectrometer HP 5977B (Agilent technologies, Santa Clara, California, USA). The control of the instrument and the data analysis are done by the OpenLab CDS version 2.6 software. The chromatograph is equipped with a ZB-XAX fused silica capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm, Phenomenex).

The carrier gas used for this analysis is helium at a constant flow rate of 1 mL/min (Air Products, Allentown, PA, USA).

The oven temperature is first maintained at 40°C for 3 minutes. Then the temperature is increased to 160°C with a slope of 4°C/min and then to 220°C with a slope of 15°C/min and maintained at 220°C for 10 minutes. The injector and the transfer line are heated to 240°C. The injection volume is 2 µL. The sample is injected in split mode, with a 10: 1 mL/min split. The mass spectrometer temperature is set at 150°C, the source temperature is set at 230°C, and the transfer line is maintained at 240°C. For quantification, mass spectra were recorded in SIM (Selected Ion Monitoring) mode with a positive ion electron impact energy of 70 eV.

The calibration range is prepared on the same day as the samples with the same mixture of deuterated standards. The range is linear in the analytical range.

#### **2.4. Online based kinetic analysis of volatile compounds during fermentation process**

The concentrations of volatile compounds in the headspace of the fermentor were measured with an online GC device. We analyzed three major volatile compounds in esters family: isoamyl acetate (acetate esters), ethyl hexanoate and ethyl octanoate (ethyl esters). The concentrations in the liquid phase were calculated as described by Morakul et al., 2011, 2013.

##### **2.4.1. Online measurements of concentrations in the gas phase**

Headspace gas was pumped from the tank at a flow rate of 10 mL/min, through a heated transfer line. Carbon compounds were concentrated in a cold trap (Tenax™) for 3 min, desorbed at 310 °C for 1 min, and analyzed with a GC Thermo TRACE 1300 (Thermo Fisher Scientific™, Toulouse, France) dedicated to the separation of carbon compounds (DB-WAX-UI; 60m \*0.320mm\*0.5µm; Agilent J&W). The output of the column then led to a FID detector (Thermo Fisher Scientific™, Toulouse, France).

The GC oven program was as follows: 38 °C for 7 min, increase to 65 °C at a rate of 3 °C/min followed by increase to 160 °C at a rate of 6 °C/min followed by an increase to 210 °C at a rate of 8 °C/min and final hold at 210 °C for 4 min. The areas of the peaks were acquired with Chromeleon™ Chromatography Data System (CDS) Software (Thermo Fisher Scientific™, Toulouse, France).

The calibration of the instrument was done using an ATIS system (Adsorbent Tube Injector System; Supelco, Bellefonte, PA, USA) which allowed to produce standard gases by vaporizing a liquid reference sample in a continuous flow of inert gas. First, a calibration range must be prepared and injected (5 µL) into the ampoule. The latter was continuously swept by a hot air flow at 30 mL/min.

##### **2.4.2. Concentration in the liquid**

The concentration of a volatile compound in the liquid ( $C^{liq}(t)$ ) was calculated from the concentration measured online in the gas phase, expressed as  $C^{gas}(t)$  in mg/L of CO<sub>2</sub>, using the partition coefficient ( $k_i$ ) value (Eq. (1)).

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

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

$$\text{Equation 2: } \ln k_i = F1 + F2 * E - \frac{F3+F4*E}{R} \left( \frac{1000}{T} - \frac{1000}{T_{ref}} \right)$$

where  $E$  is the ethanol concentration (g/L) in the liquid phase, calculated from measurements of the amount of CO<sub>2</sub> released, which is proportional to sugar consumption;  $T$  is the current absolute temperature,  $T_{ref}$  corresponds to the absolute reference temperature (i.e. 293.15 K, 20 °C, in this study).  $F1$ ,  $F2$ ,  $F3$  and  $F4$  are constants, identified for each volatile compound. The values of these parameters for the different molecules were determined by (Mouret, Camarasa, et al., 2014; Mouret, Perez, et al., 2014a).

### 2.4.3. Losses in the exhaust gas

The losses in the gas were calculated with Eq. (3).

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

where  $Q(t)$  is the CO<sub>2</sub> flow rate at time  $t$ , expressed in liters of CO<sub>2</sub> per liter of must and per hour. The relative losses ( $RL$ ), expressed as a percentage of production ( $P(t)$ ), were determined as follows (Eq. (4)):

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

where  $t_{end}$  corresponds to the end of fermentation (h).

### 2.4.4. Total production

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

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

This total production reflects the ability of the yeast to produce a volatile compound, regardless of its subsequent fate: accumulation in the liquid phase or evaporation.



#### **2.4.5. Calculation of total production rates**

The calculation of total production rates was performed using a local regression (locfit() R function) derived from the total production (mg/L). These rates were calculated only on three esters to go further in understanding the effects of the 2 factors studied in this work on its production kinetics.

Concentration in the liquid, losses and total production were calculated using a custom R program version 4.2.1 (R Development Core Team 2016) from the concentration measured online in the gas phase.

#### **2.5. Statistical analysis**

Statistical analysis was performed with R software, version 4.2.1 (R Development Core Team 2016), the mgcv library (Wood 2017) for GAM modeling and the tidyverse library (Wickham 2019) for data-management and plot purposes.

The data set generated in this study is complex. In order to analyze the effects of the 2 factors (Addition of Nitrogen and Profile of temperature) studied in the present work on the production of volatile compounds, we performed the analysis in successive steps. First, a smoothing was performed on the production kinetics in order to work on a clean data set, on three aroma compounds (Ethyl hexanoate, ethyl octanoate and isoamyl acetate).

We developed a way to calculate the different concentrations (liquid concentration, losses and total production). Finally, the curves of fermentation kinetics and production kinetics of volatile compounds have been modeled by Generalized Additive Models (GAMs; Wood, 2017) taking into account the two factors (Nadd and profileT) as qualitative explicative variable.

Indeed, each fermentation produces complex nonlinear curves, and GAMs are much more flexible than classical linear models or generalized linear models. Hierarchical GAMs (Pedersen et al., 2019) were used: these models allow smooth functional relationships between a predictor and a response to vary between groups, in such a way that the different functions are in some sense pooled toward a common shape. Indeed, we want to know how the functional relationships vary between groups, and if a relationship holds across groups. Several models can be used to answer these questions, and we decided to use a « GS model » by Pedersen et al., 2019. In a GS model, the relationship between a predictor  $x$  and a response  $Y$  is modeled by the sum of a global smoother and group-level smoothers. Each group-level smoother is associated to a level of one grouping factor in the model.

In this work, several responses have been studied. First, to study the fermentation kinetics, the CO<sub>2</sub> flow rate was modeled as a function of the consumed sugar: the response  $Y$  is the CO<sub>2</sub> flow rate and the predictor  $x$  is the consumed sugar. Then to study the production kinetics of aromas, the concentration in the liquid, the losses and the total production of volatile compounds were modeled as functions of released CO<sub>2</sub>:  $Y$  is  $C^{liq}$  or  $P$ , and  $x$  is the released CO<sub>2</sub>. The volatile compounds studied are ethyl hexanoate, ethyl octanoate and isoamyl acetate.

The formula of this model is given by (Eq. (6)):

Equation 6:  $Y_{ijl} = f(x_{ijl}) + f_i(x_{ijl}) + f_j(x_{ijl}) + \epsilon_{ijl}$

Where  $f$  is the global smoother,  $f_i$  a smoother specific for the  $i^{\text{th}}$  level of temperature profile,  $f_j$   $i=1 \dots 8$  a smoother specific for the  $j^{\text{th}}$  level of Nadd (nitrogen added),  $j=1, 2$ .

### 3. Results and discussion

In the present work, the objective was to evaluate the cross impact effect of anisothermal management of temperature and nitrogen addition during the stationary phase on (1) the fermentation kinetics, (2) the synthesis of the CCM metabolites and (3) the production of fermentative aromas. In this perspective, eight anisothermal fermentation profiles were tested, with and without nitrogen addition.

#### 3.1. Cross impact effect between nitrogen addition and anisothermal temperature on fermentation kinetics

In the GAM modeling (**Figure 2**), the left graph represented the average fermentation rate and the right graph the divergences from the average. The average curve was defined by a first maximum fermentation rate ( $V_{max}$ ), then by the stationary phase of fermentation. On the graph of divergences, fermentations with nitrogen additions displayed positive divergences (modality 100-1 to 100-8) compared to fermentations without additions (modalities 0-1 to 0-8). The effect of the anisothermal profiles was visible before and after the addition of nitrogen depending on the initial fermentation temperature. These two graphs gave an overall overview of the impact of the two factors studied on the fermentation kinetics.

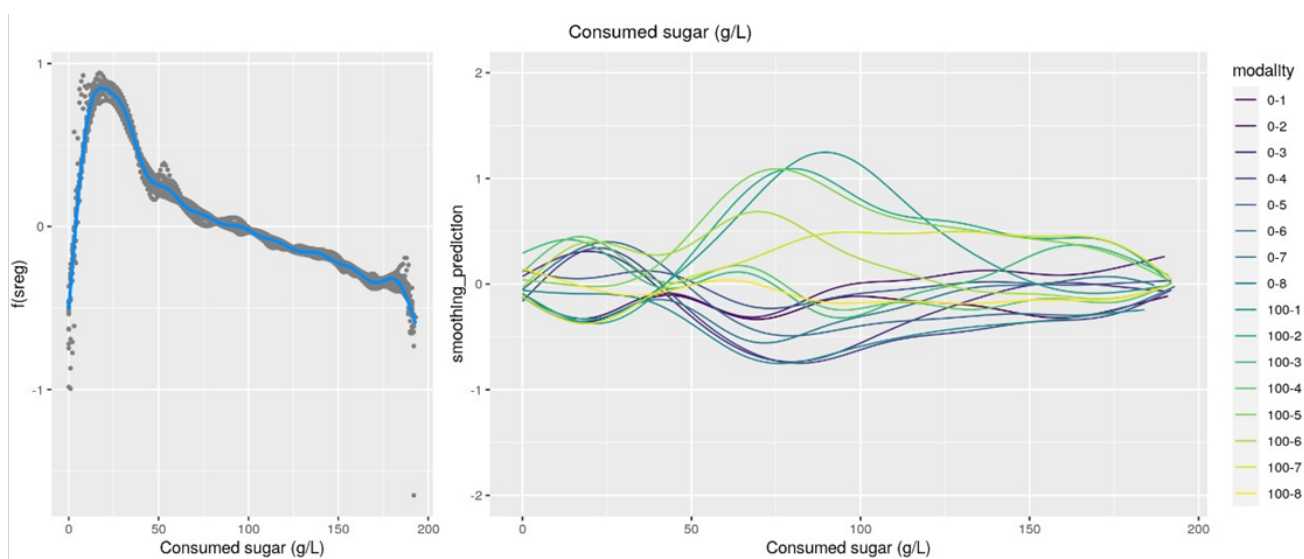
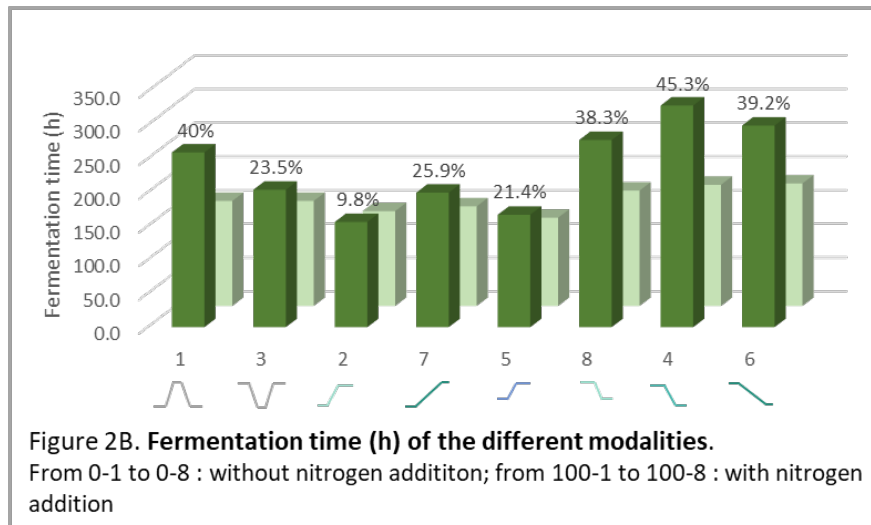


Figure 2. **GAM modelling of fermentation kinetics.** Averages kinetics of all modalities (left) and the divergence with the average curve (right).

Fermentation times were also recorded to evaluate the impact of different combinations (Figure 2B).



The anisothermal profiles had an important impact on the fermentation time. Indeed, the profiles that presented a rapid increase in temperature in the second phase of fermentation showed a decrease of the process duration (profiles 2, 5 and 7). Conversely, descending temperature profiles exhibited longer fermentation times, up to 328.9 h (profile 4). These results indicated that fermentation efficiency depended mainly on the temperature applied during the stationary phase, as already shown in the literature (Malherbe et al., 2004).

The addition of nitrogen systematically reduced the fermentation time (Figure 2B). In agreement with literature, a nitrogen addition at the beginning of the stationary phase allowed for a re-growth of the yeast population and thus a resumption of fermentation activity (accompanied by a second Vmax) (Bely et al., 1990a; Seguinot et al., 2018).

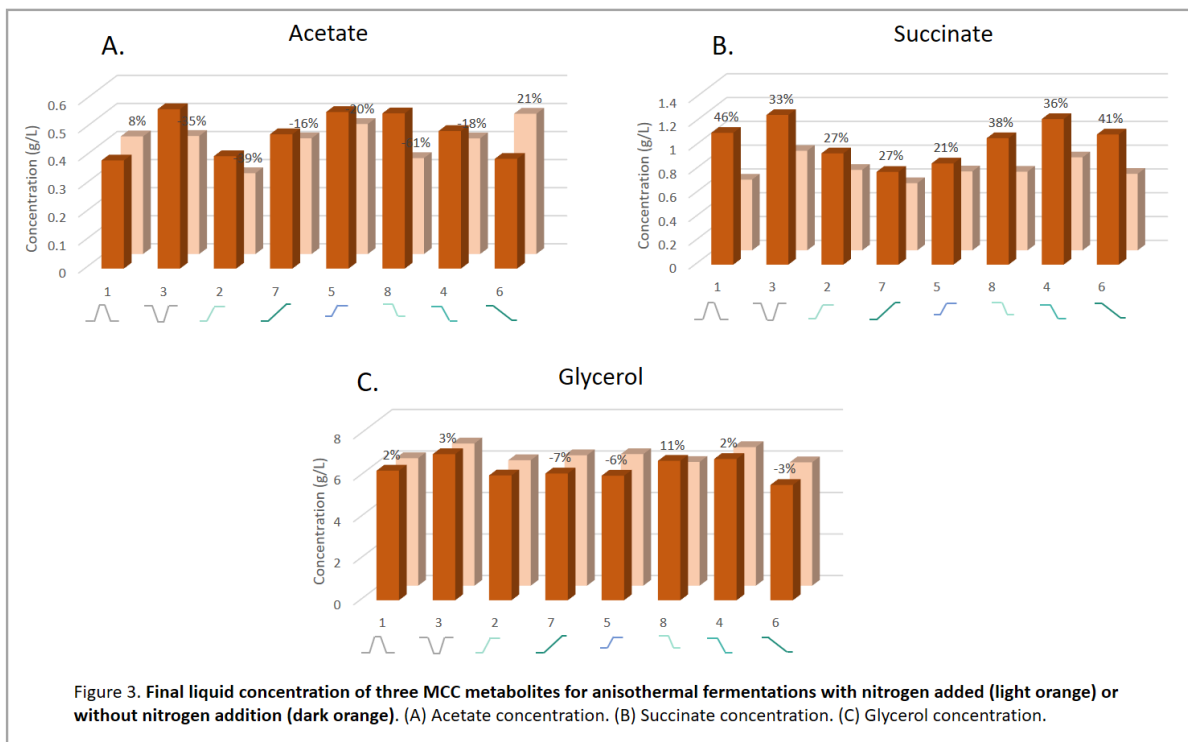
Finally, it was important to note that the percentage gain from nitrogen addition was not similar for all temperature profiles (it varied from 9.8 to 45.3%). This last result showed an important cross impact between temperature and nitrogen addition.

### 3.2. Cross impact effect between nitrogen addition and anisothermal temperature on CCM

To study the effects of anisothermal temperature profiles combined with nitrogen addition on yeast metabolism, the concentration of acetate, succinate and glycerol were measured at the end of fermentation and compared between fermentations with and without nitrogen addition.

The succinate concentration was systematically reduced by the addition of nitrogen (**Figure 3B**): decrease of 21% to 46% was observed compared to fermentations without additions.

The added nitrogen would impact the  $\alpha$ -ketoglutarate node, enabling amino acid biosynthesis to meet cellular demands related to regrowth (Godillot et al., 2022; Ljungdahl & Daignan-Fornier, 2012a). So, the metabolic flux going to the oxidative branch of TCA was reduced and explained the observed decrease in succinate concentration.



In this work, glycerol concentration was not impacted by nitrogen addition, the difference between fermentations with and without addition was minimal (**Figure 3C**). This result was very surprising because succinate and glycerol syntheses are usually correlated, in relationship with the maintenance of the redox balance of the cell (Cadière et al., 2011). Moreover, it was previously shown that the concentration of glycerol increased with the concentration of ammonium in the medium (Michnick et al., 1997). This atypical behavior of glycerol seemed to indicate a compensation of the effect of nitrogen addition by the anisothermal management of temperature. Indeed, the temperature variation associated with nitrogen addition probably caused a reshuffling of the metabolic fluxes involved in glycerol synthesis.

The acetate concentration was globally decreased by the addition of nitrogen except for profile 1 and 6 which showed an increase of 8 and 21% respectively (**Figure 3A**). This reduction appeared to be related to the fact that nitrogen addition during the stationary phase would favor Acetyl-CoA synthesis compared to acetate synthesis to meet the cellular needs, associated especially to cell growth.

However, some interactions between nitrogen addition and temperature probably modified the NADPH management within the cell and therefore resulted in a higher excretion of acetate in specific cases (profile 1 and 6).

### **3.3. Cross impact effect between nitrogen addition and anisothermal temperature on volatile compounds production**

#### **3.3.1. Final liquid concentration**

Final liquid concentration of a large number of volatile compounds was determined by off-line GC-MS.

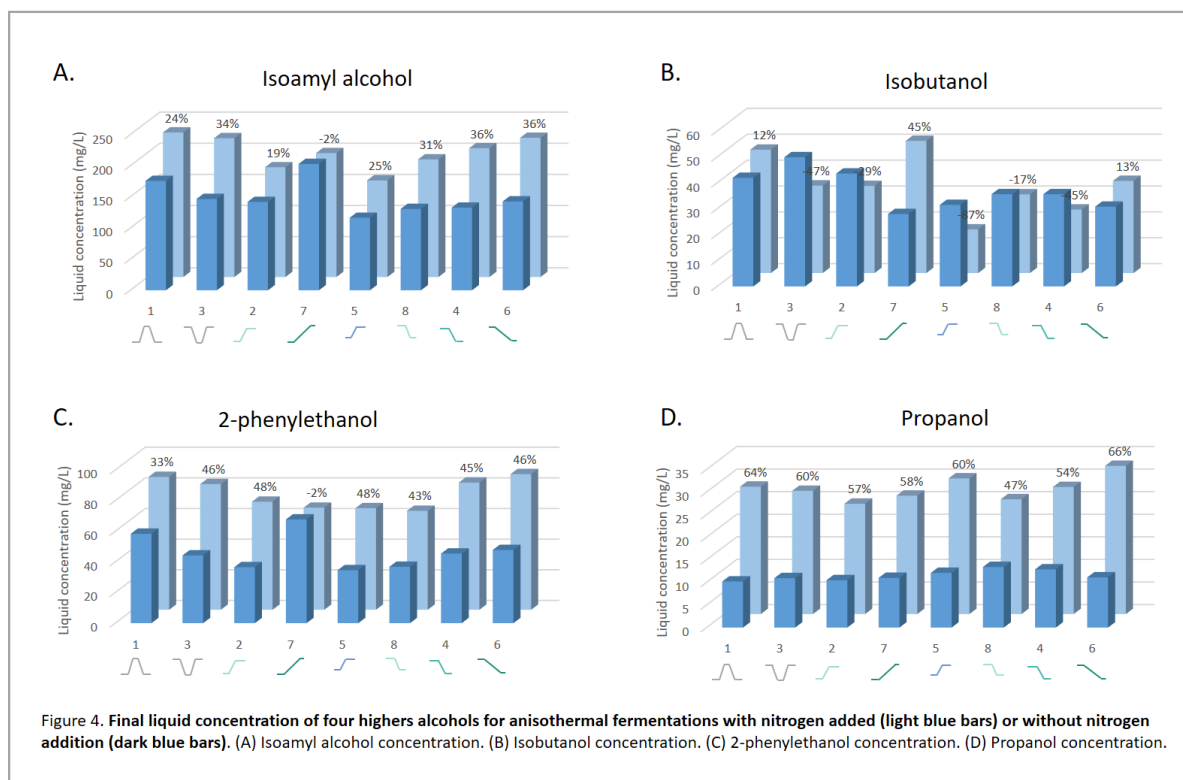
##### Higher alcohols

The final concentration of the four analyzed higher alcohols was not impacted in the same way by the studied parameters. Isoamyl alcohol and 2-phenylethanol displayed similar results (**Figure 4A, 4B**): without nitrogen addition, the anisotherm profiles only marginally impacted on their final concentration, with the exception of profile 7. Indeed, for these two alcohols, the maximal content was reached for this specific ascending temperature profile; moreover, in this specific condition, the same final concentration was obtained with or without nitrogen addition. This observation showed that for a fermentation that started at 18°C and rised to 28°C with a small slope, the addition of nitrogen had no influence on the final concentration.

Surprisingly, for the others anisothermal profiles, the final concentration of isoamyl alcohol and 2-phenylethanol were enhanced by nitrogen addition. In most of the previous works, the concentration of higher alcohols was decreased by a nitrogen addition performed during stationary phase (Godillot et al., 2022; Pérez et al., 2018; Seguinot et al., 2018; Su et al., 2021).

Therefore, this work highlighted the fact that modification of the fermentation temperature simultaneously to nitrogen addition changed drastically the production of these two alcohols. Temperature profiles could modify the physiological state of the yeast, inducing a reshuffling of metabolic fluxes (as already hypothesized for glycerol) and possibly modifying the intracellular management of keto-acids and corresponding higher alcohols. It can be thought that, to avoid a too important accumulation of  $\alpha$ -ketoisocaproate and phenylpyruvate (keto acids precursors of isoamyl alcohol and phenylethanol, respectively), these two acids were converted rather into higher alcohols than in amino acids. Another hypothesis to explain phenylethanol increase following a nitrogen addition during the stationary phase was related to the redox status of the cell. Phenylethanol is synthesized from the pentose phosphate pathway (PPP) via phenylalanine and the PPP is a very important metabolic pathway for the regeneration of NADPH (Cadière et al., 2011).

The main other pathway for NADPH regeneration is acetate synthesis, for which the concentration was decreased by adding nitrogen. Therefore, the production of 2-phenylethanol following a nitrogen addition would be an indirect consequence of a higher flux within the pentose phosphate pathway.

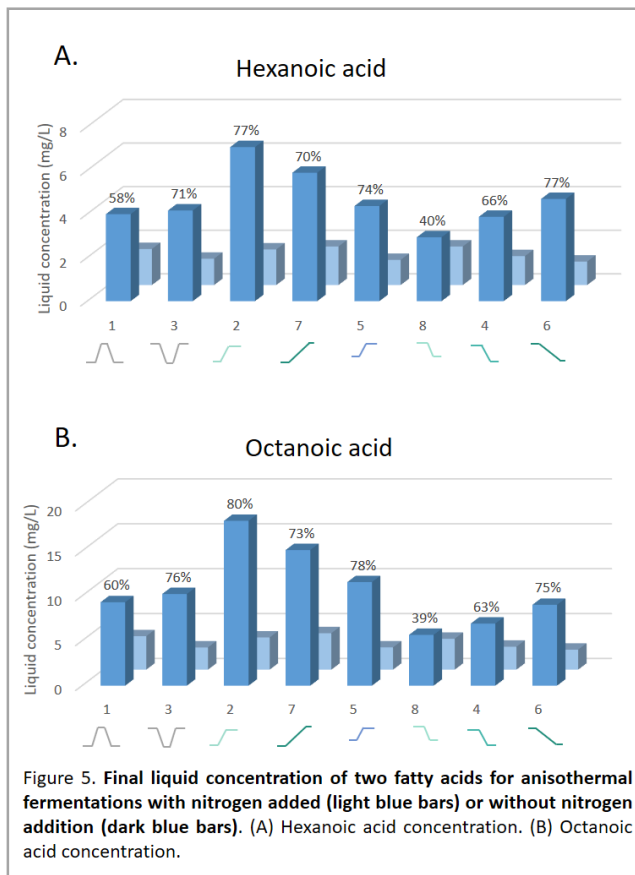


The final isobutanol concentration was very differently impacted by the temperature profiles and nitrogen addition, compared to isoamyl alcohol and phenylethanol (**Figure 4B**). Especially, Profile 7 was the one for which the difference between fermentations with and without nitrogen addition was the most important. This result differed, once again, from results previously found in the literature since isoamyl alcohol and isobutanol had generally similar behaviors (Bloem et al., 2016; Mouret, Camarasa, et al., 2014; Rollero et al., 2015; Seguinot et al., 2018) because the production pathways of these two higher alcohols are partly shared. Therefore, the present work seemed to indicate that interactions between temperature modifications and nitrogen addition during stationary phase induced important changes into keto-acids utilization by yeast and subsequent higher alcohols production, even if their metabolic routes of synthesis are close.

Finally, for propanol, the final concentration was strongly influenced by the nitrogen addition: whatever the temperature profile, an average 3-fold increase was systematically obtained (**Figure 4D**). On the opposite and for fixed nitrogen condition, the temperature profiles applied during the fermentation did not seem to impact the final concentration of this alcohol whereas it was previously shown that a constant temperature combined with a nitrogen addition during the stationary phase impacted on the production of this alcohol (*Chapter 2*).

This difference can be attributed to the fact that, in the present work, temperature changes were performed during the stationary phase whereas it was not the case in the work detailed in *Chapter 2*. These results clearly showed that nitrogen addition during the stationary phase was the factor with the highest weight on the concentration of propanol, in agreement with previous studies (Godillot et al., 2022; Mouret, Camarasa, et al., 2014; Seguinot et al., 2018). Propanol can effectively be considered as a metabolic marker of nitrogen availability during alcoholic fermentation.

### Fatty acids



The hexanoic and octanoic fatty acids, acids, were negatively impacted by the addition of nitrogen (**Figure 5A and 5B**), whatever the temperature profile implemented. These results were consistent with a previous work (Godillot et al., 2022) and appeared to be related to the expression of the genes responsible for the synthesis of fatty acids *FAS1* and *FAS2*; indeed, these two genes were repressed following a nitrogen addition.

Acetyl-CoA is the common precursor of fatty acids synthesis. Based on this result, the Acetyl-CoA necessary for their synthesis would be mobilized by TCA for the synthesis of amino acids, resulting in a reduction of the flux to lipid synthesis, following a nitrogen addition.

Furthermore, it has been shown that the

*ALD5* gene, responsible for the synthesis of acetyl-CoA from acetate, was induced by nitrogen addition (Godillot et al., 2022). All these results seemed to indicate that, in the present work, the reason of the decrease of fatty acids production was related to a modification of the management of the intracellular pool of Acetyl-CoA consequently to a nitrogen addition.

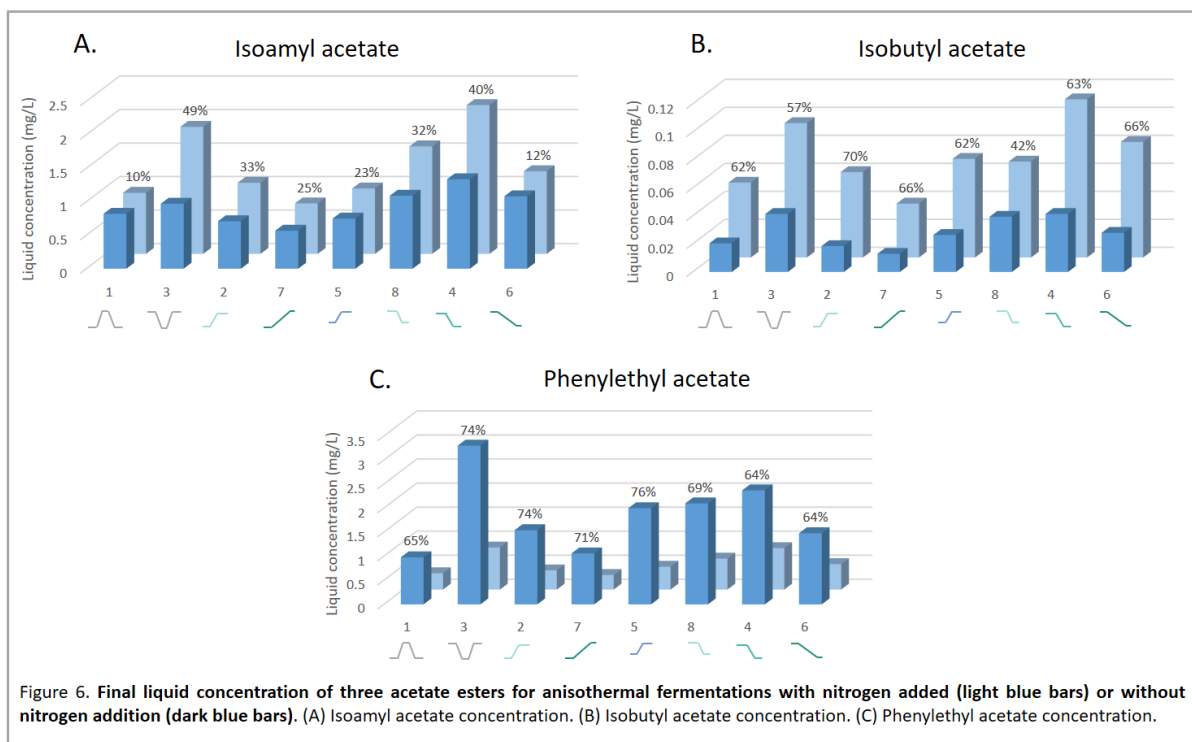
Furthermore, it was also important to note that the concentration of acetate, synthesized from Acetyl-CoA, was also decreased by the nitrogen addition (for the majority of profiles). This result was in line with those found for fatty acids concentration.



## Esters

The final concentration of three acetate esters and two ethyl esters were analyzed.

The three acetate esters were differently impacted by the fermentation conditions. First, the concentrations of isoamyl acetate and isobutyl acetate were increased by the nitrogen addition (**Figure 6A** and **6B**). This result was in agreement with previous studies: nitrogen addition during stationary phase allowed the activation of the *ATF2* gene, responsible for the synthesis of these esters from their corresponding higher alcohols (Godillot et al., 2022; Seguinot et al., 2018). Moreover, the higher production of these two acetate esters also seemed to be related to the overexpression of the *MAE1* and *LEU9* genes, (responsible for pyruvate synthesis from malate and leucine synthesis, respectively). These two genes had an important influence on acetate ester synthesis (Eder et al., 2018), by increasing the availability of acetyl-CoA in the cell which appeared to be mobilized for the synthesis of the specific amino acids.

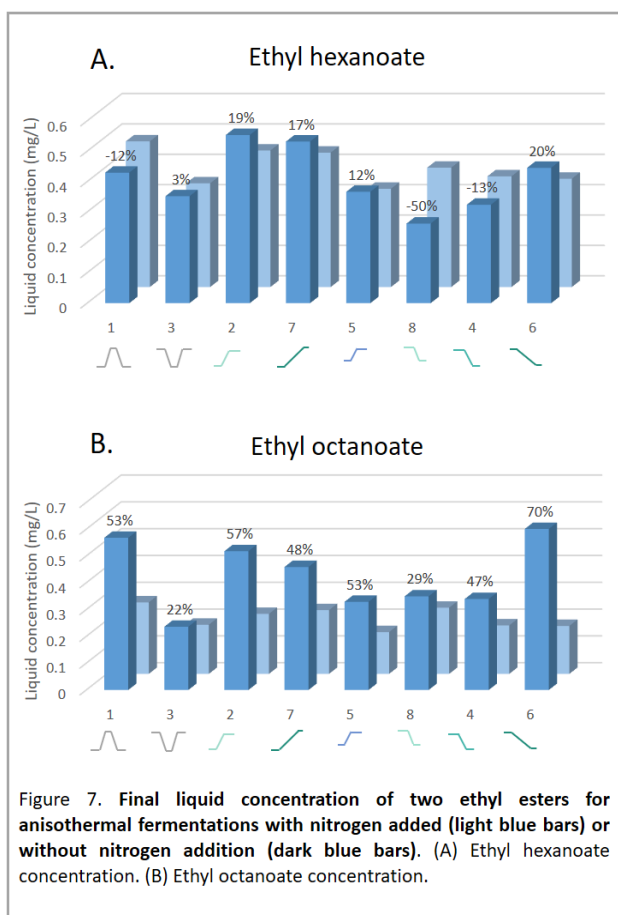


Associated to nitrogen addition, the temperature profiles that led to maximal liquid accumulations for these two esters were profiles 4 and 3. A striking result was that profile 3 (28 → 18 → 28 °C) differed drastically from profile 4 (28 → 18 °C). Surprisingly, even if the final temperature of profile 3 was equal to 28 °C, important losses by evaporation did not prevent from getting high final aroma content. Interestingly, isobutyl acetate and isoamyl acetate differed if we considered the temperature profile which led to the third maximum content: profile 6 (28 → 18 °C) for isobutyl acetate and profile 8 (23 → 18 °C) for isoamyl acetate (**Figure 6A** and **6B**).

Even if these 2 temperature profiles were decreasing profiles, this difference could be related to modifications in the regulation of the metabolic pathways of the two esters production (Crépin et al., 2017) and/or to the difference in the losses by evaporation for these two molecules linked to their own volatility and hydrophobicity (Mouret, Perez, et al., 2014b). Moreover, the percentage increase between fermentations without and with nitrogen addition was systematically higher for isobutyl acetate than for isoamyl acetate, indicating a stronger cross-impact between temperature and nitrogen for isobutyl acetate. This observation showed once again that temperature changes seemed to induce some variations in the management of ketoacids by the yeast. These modifications probably induced a de-correlation between the syntheses of isoamyl acetate and isobutyl acetate, while their metabolic pathways are quite similar.

The impact of both nitrogen addition and temperature profiles on phenylethyl acetate concentration was very opposite from the effects observed for isoamyl and isobutyl acetate (**Figure 6C**). Very surprisingly, the addition of nitrogen decreased the synthesis of this compound. This result was unexpected because, in general, acetate esters reacted in the same way to variations in fermentation parameters (Barbosa et al., 2009b; Hernandez-Orte et al., 2006; Rollero et al., 2015).

We can hypothesize that, in our specific experimental conditions, the main enzyme responsible for the production of phenylethyl acetate was not Atf1p or Atf2p but a third enzyme whose gene expression was repressed by nitrogen addition. Alternatively, the important decrease of phenylethyl acetate could be explained by its degradation. This ester having an aromatic ring in its composition, it could be recovered for cellular needs via the esterase lah1p activity (J. W. Zhang et al., 2012). This hypothesis was supported by the de-correlation between the production of phenylethyl acetate and its corresponding alcohol: the synthesis of phenylethanol increased following a nitrogen addition. Finally, the maximum accumulation in the liquid phase for phenylethyl acetate was obtained for profile 3 (28 → 18 → 28 °C) (**Figure 6C**), indicating once again a different regulation of this specific compound by temperature.



The liquid accumulations of the two ethyl esters were differently influenced by nitrogen and temperature (**Figure 7A** and **7B**). While the concentration of ethyl octanoate was systematically decreased by the addition of nitrogen (**Figure 7B**), this decrease was not always observed for ethyl hexanoate (**Figure 7A**). Indeed, for profiles 1, 4 and 8, the ethyl hexanoate concentration was higher for fermentations with addition than without. These three temperature profiles shared a decrease in temperature at the end of the process and the synthesis of ethyl esters was activated at low temperature (Beltran et al., 2006). Nevertheless, the fact that the same phenomenon was not observed for profile 6 whereas its final temperature was also low tended to indicate that the underlying mechanism was more complex.

The results for ethyl octanoate highlighted important interactions between the effects of temperature and nitrogen. Indeed, even if the liquid accumulation of this ester was higher without nitrogen addition; the percentage of variation changed from 22 to 70%, depending of the temperature profile. This molecule being highly volatile – percentage of loss equal to 60% for an isothermal fermentation at 30°C (Mouret, Camarasa, et al., 2014) – the lowest liquid contents should be correlated to the fermentation profiles having the highest values of temperature at the end of the process.

However, this observation was not systematic: the liquid accumulation of this ethyl ester depended both on losses by evaporation (due to temperature) and on production by yeast (regulated by nitrogen and temperature).

### 3.3.2. On-line monitoring of esters kinetics production: liquid concentration, total production and losses in the gas

To further understand the effects of the fermentation parameters on ester synthesis, their total production was monitored throughout the fermentation. The results of the on-line monitoring were analyzed by GAM modeling. **Figure 8** showed the average curves of each of the three esters and the divergences from this average.

First, the combination of the anisothermal profile and the addition of nitrogen seemed to influence the average curve, making the detailed interpretation of this mean curve very difficult. Therefore, in the next paragraphs, attention will be focused only on the divergences graphs. Regarding divergences, the effects were different for the three esters.

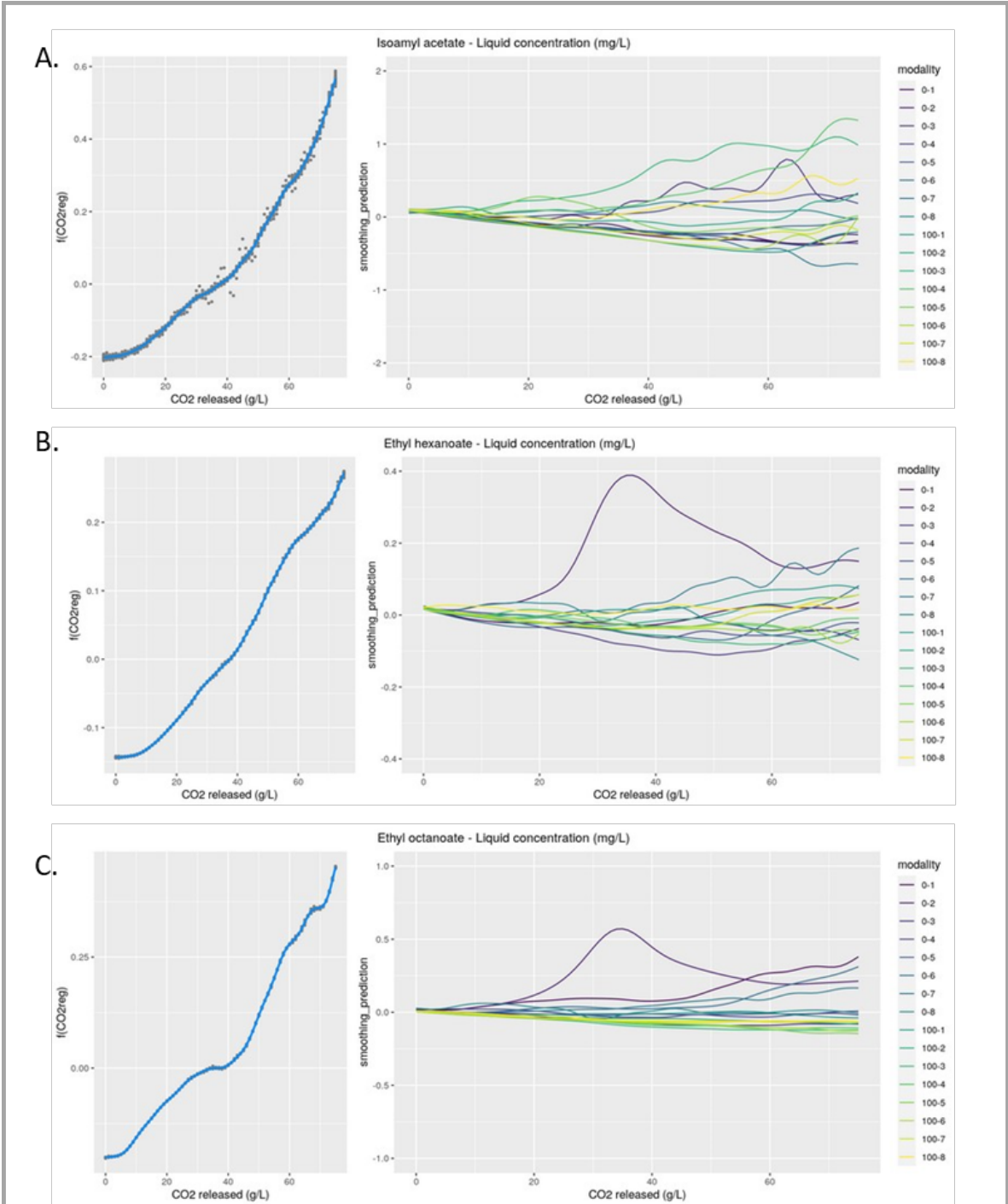
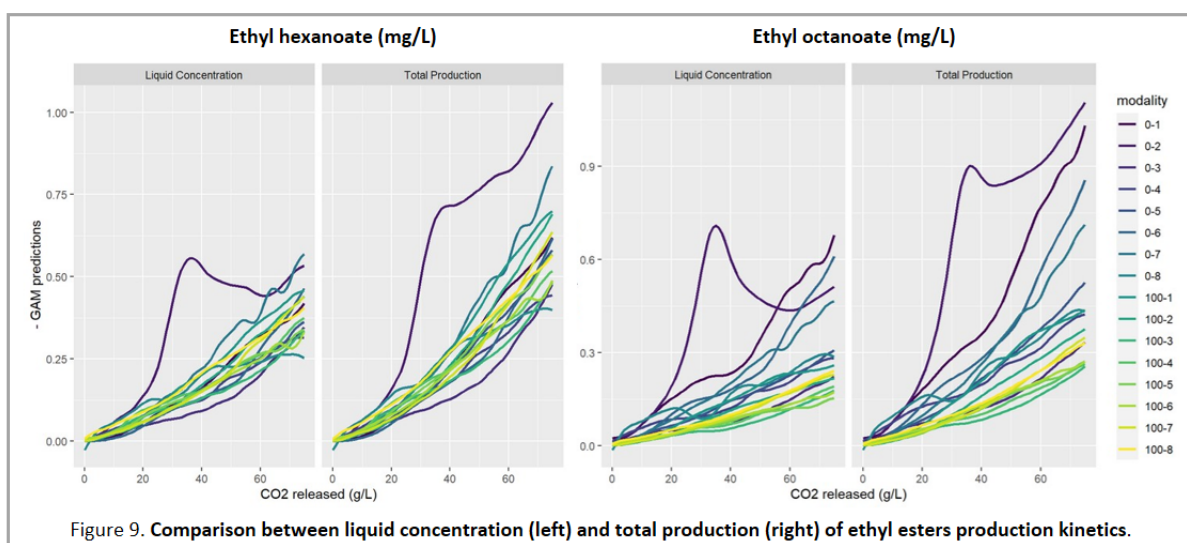


Figure 8. **GAM modelling of esters production kinetics.** Averages kinetics of all modalities (left) and the divergence with the average curve (right). (A) Isoamyle acetate; (B) Ethyl hexanoate; (C) Ethyl octanoate

For isoamyl acetate, the positive divergences were found for the fermentations with nitrogen addition whereas negative divergences were related to the fermentations without additions (**Figure 8A**). It should also be mentioned that the dispersion of the positive divergences was higher than that noted for the negative ones. These different observations clearly showed that differences in the kinetics of production of isoamyl acetate were mainly related to nitrogen addition rather to temperature modification, in agreement with the results obtained in the previous section concerning the final liquid content. Nevertheless, there was a cross effect between nitrogen and temperature. This result indicated that, even if isoamyl acetate production by yeast was systematically stimulated by nitrogen addition, this increase was modulated by the temperature profile.

For the two ethyl esters, the divergences from the mean were specific to each compound (**Figures 8B and 8C**). This result indicated that, despite being generally considered as having similar behaviors in the literature (Beltran et al., 2006; Guittin et al., 2021; Mouret, Camarasa, et al., 2014; Rollero et al., 2015), our work revealed that the kinetics of synthesis of ethyl hexanoate and octanoate were differently impacted by nitrogen addition and anisothermal management of temperature. This difference was particularly visible on the effect of nitrogen: for ethyl hexanoate, the curves corresponding to fermentations with and without addition merged (**Figure 8B**) while for ethyl octanoate the separation was clear (**Figure 8C**). Once again, these results were in agreement with the results presented in the previous section, concerning final liquid accumulation.

Ethyl esters being highly volatile molecules (Morakul et al., 2011; Mouret, Camarasa, et al., 2014), their concentration in the liquid and total production were compared. Interestingly, the temperature profiles allowing the accumulation of these compounds in the liquid were different from those favoring their overall synthesis by the yeast.



The greatest accumulation of ethyl hexanoate in the liquid was obtained for profiles 2 (18 → 28 °C) and 6 (28 → 18 °C) while profiles 1 (18 → 28 → 18 °C) favored the accumulation of ethyl octanoate (**Figure 9**). However, the highest total production was reached with profile 2 for the two esters (**Figure 9**). These results demonstrated that, for ethyl esters, temperature affected both evaporation and production by yeast and that these two phenomena were non superimposed. So, reasoning only on the liquid accumulation of ethyl esters will both overestimate the impact of the temperature and lead to an incorrect understanding of its effect on production pathways of ethyl esters.

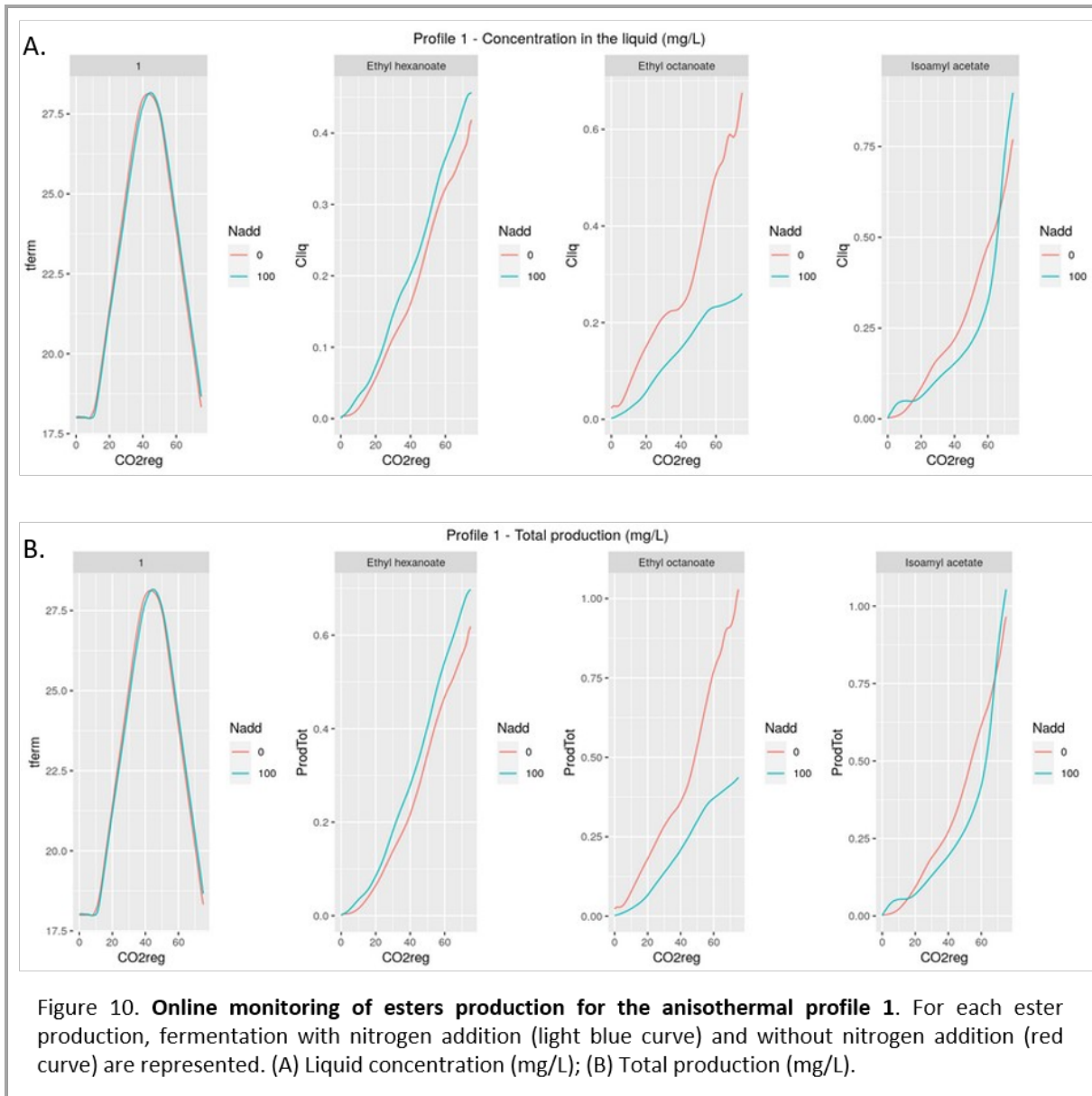
Then, to get a more detailed description of the production kinetics of the isoamyl acetate, ethyl hexanoate and ethyl octanoate, a focus was done on profiles 1, 2 and 6. Indeed, they appeared to have the greatest impact on the production kinetics of these esters but also seemed to favor their synthesis.

Profile 1 is an atypical profile because it was composed of an increase in temperature (from 18 to 28°C) and then a decrease in temperature (from 28°C to 18°C) (**Figure 10**).

For this specific temperature profile, it clearly appeared that the kinetics of liquid accumulation of ethyl hexanoate and octanoate were very divergent and differently impacted by temperature and nitrogen addition. This result differed from the literature data where these two ethyl esters usually showed similar responses to applied stimuli (Molina et al., 2007; Mouret, Camarasa, et al., 2014; Rollero et al., 2015). So, our work indicated that the liquid accumulation of these two ethyl esters can be de-correlated under certain fermentation conditions. At first, an addition of nitrogen resulted in a 3-fold decrease in liquid accumulation of ethyl octanoate whereas a negligible effect was observed for ethyl octanoate (**Figure 10A and 10B**). Secondly, the impact of temperature was also very different for these two aromas. The kinetics of liquid concentration of ethyl hexanoate was poorly impacted by the change in temperature; indeed, no change in slope was observed for this aroma.

On the opposite, for ethyl octanoate, this temperature profile revealed two phases on the liquid concentration monitoring: a first production phase corresponding to the temperature increase followed by a resumption phase of the liquid accumulation corresponding to the temperature decrease. Between the 2 phases, the change in slope corresponded to the temperature plateau at 28°C in the applied profile (**Figure 10A**). More precisely, the slope break occurred around 25°C and the recovery of production started when the temperature decreased. However, this “plateau” was less visible in total production, indicating that the origin of this phenomenon is rather physical than biological (**Figure 10B**).

Finally, a different behavior was observed for isoamyl acetate. The production kinetics of this aroma for fermentations with and without addition showed a globally exponential form (**Figure 10A and 10B**). It would appear that this temperature profile partly masked the very positive effect of an addition during fermentation.



However, kinetics observations can be performed. It can be seen that the decrease in temperature (at 50 g/L of released CO<sub>2</sub>) accompanied by the addition of nitrogen (achieved at 20 g/L of released CO<sub>2</sub>) allowed a slight resumption of production: the resulting acceleration of production led to a slightly higher concentration at the end of fermentation (**Figure 10A**). Indeed, in addition to the activation of isoamyl acetate synthesis genes (Godillot et al., 2022; Seguinot et al., 2018), it appeared that the production of this aroma was favored for temperatures between 25 and 18°C.

This was in agreement with the results shown in a previous study where the synthesis temperature of isoamyl acetate would be optimal around 23°C (*Chapter 2*). An evaporation of only 12% was observed for this profile.

For profile 6, the behavior of the two ethyl esters was close while they were very different for profile 1 (**Figure 11**). Such a result (in agreement with previous observations in the present work) confirmed a strong cross-impact between temperature profile and nitrogen addition. With profile 6, the addition of nitrogen induced a 3-fold decrease of the final concentration of ethyl octanoate and a 2-fold decrease for ethyl hexanoate (**Figure 11**). Several phases were visible on the production of these two esters but the most important observation was the resumption of the production around 50 g/L of released CO<sub>2</sub>. This acceleration corresponded to a temperature of 25°C. This result reinforced the hypothesis mentioned earlier: in addition to reducing the evaporation of esters, temperatures between 25 and 18°C activate the synthesis of these compounds (**Figure 11A and 11B**).

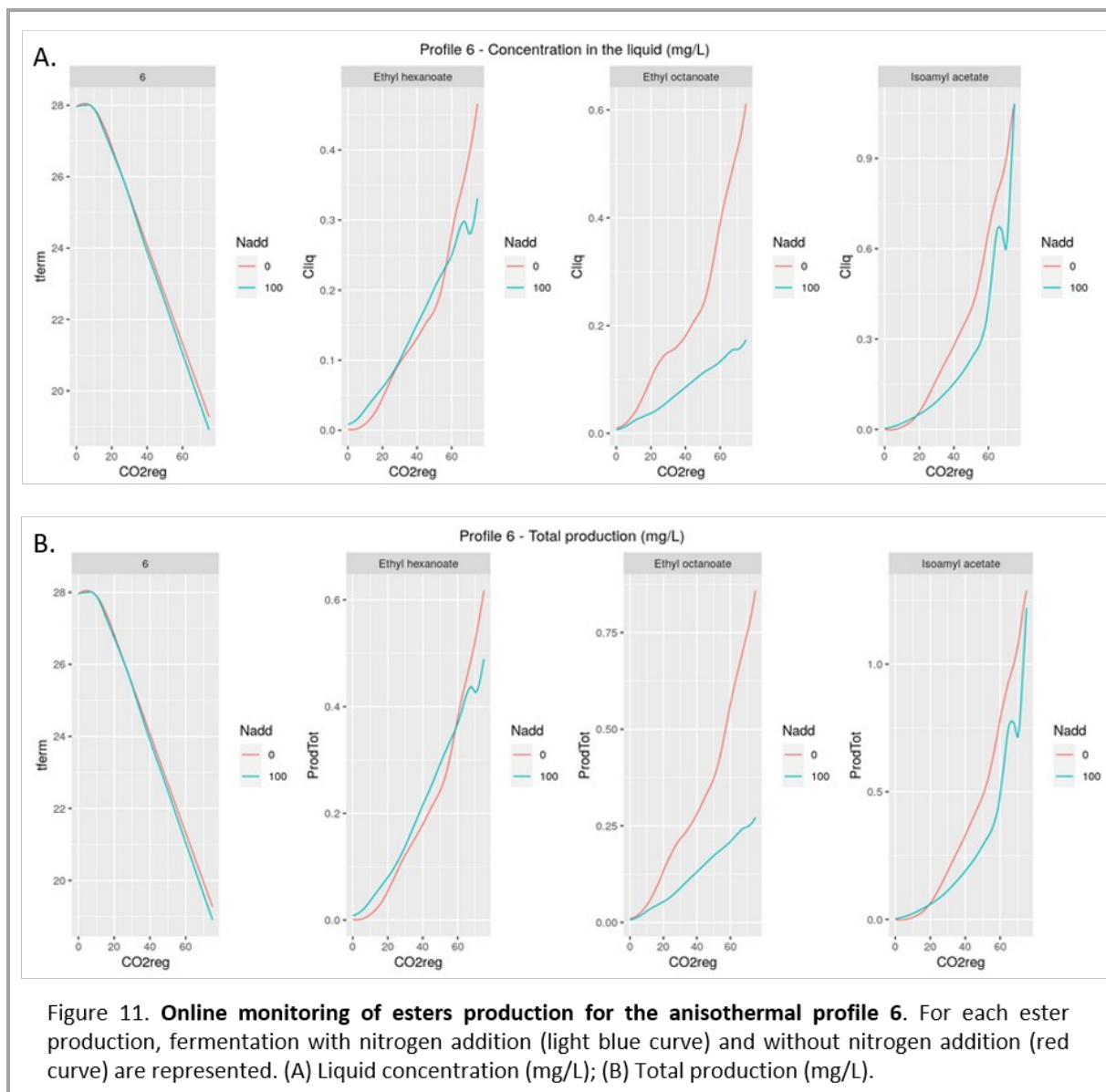
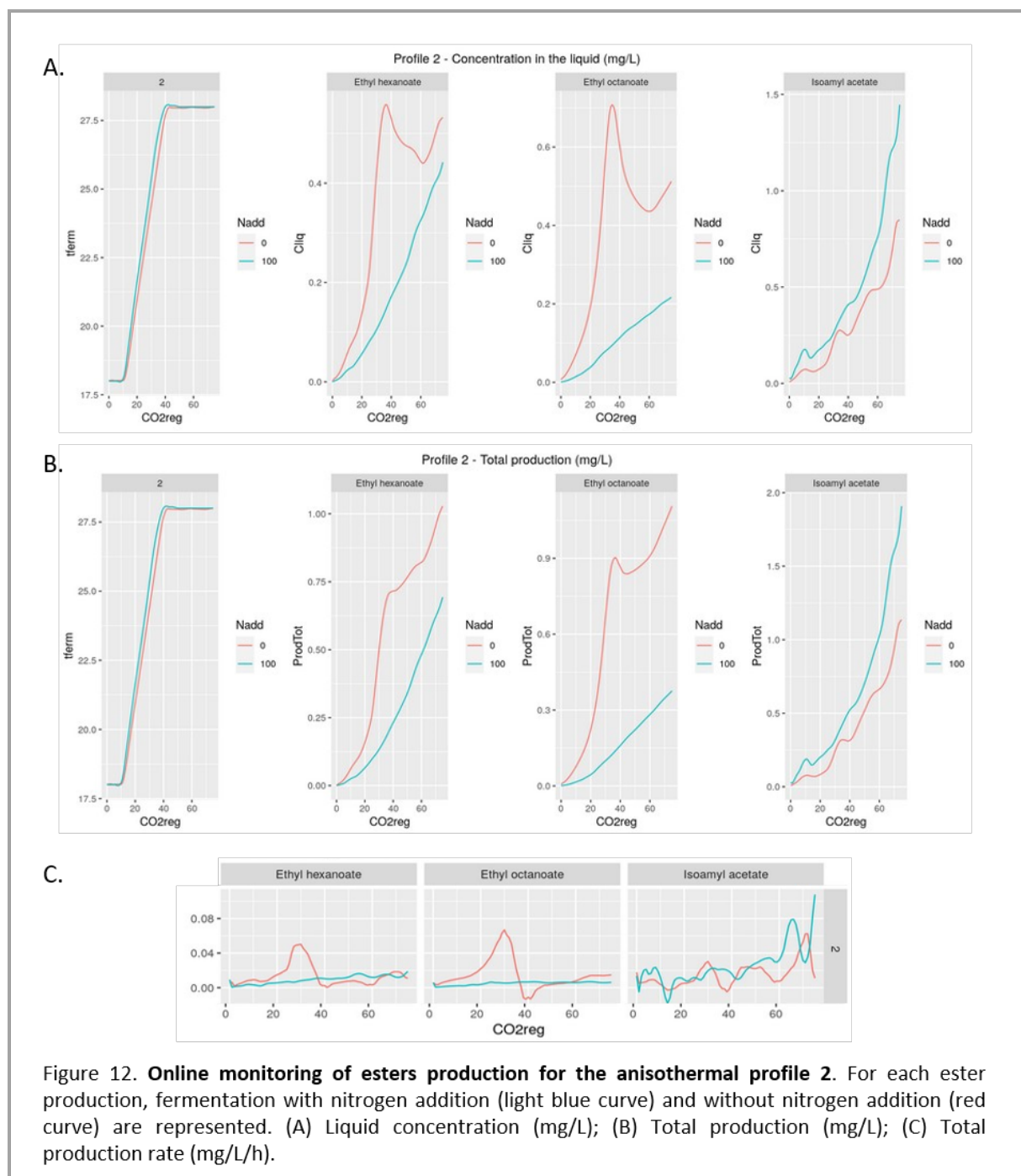


Figure 11. **Online monitoring of esters production for the anisothermal profile 6.** For each ester production, fermentation with nitrogen addition (light blue curve) and without nitrogen addition (red curve) are represented. (A) Liquid concentration (mg/L); (B) Total production (mg/L).



For the production of isoamyl acetate, the same behavior as profile 1 was observed. The nitrogen addition effect on the kinetic was masked by the temperature profile. Indeed, the kinetics with and without additions remained very close unlike the two other esters studied. An acceleration of the production was again visible around 23°C (**Figure 11A**). This highlighted the importance of a medium temperature (25-23°C) during the stationary phase to favor the synthesis of this aroma. Unlike profile 1, an evaporation of about 20% was observed.

Finally, the impact of profile 2 was studied on the production kinetics of the three esters. The behaviors of ethyl esters for this profile were rather similar; but these two curves were very different from those obtained with profiles 1 and 6.



Indeed, two phases were visible on the kinetics: (1) an important liquid accumulation between 18 and 25°C followed by (2) a decrease of this liquid content (**Figure 12A**). As observed for profile 1, above 25°C, the concentration of the aroma was no longer accumulated but evaporated into the fermentative gas.

Moreover, in this phase, the metabolic production of ethyl esters was slowed down (as reflected by a slowdown in total production) (**Figure 12B**). Finally, as for profile 6, the addition of nitrogen induces a strong decrease in the production of these two ethyl esters.

Profile 2 did not seem to impact the kinetics of isoamyl acetate production since no specific phase is visible (**Figure 12**). It was important to note that the addition of nitrogen increases the final production by almost 50%. Contrary to the first two profiles, the impact of the addition of nitrogen was very strong. This positive effect of nitrogen addition can be attributed to the strong increase of *ATF2* gene expression (Godillot 2022). Moreover, the increase in the amino acid pool induced by nitrogen addition (Crépin et al., 2017; Godillot et al., 2022) could cause a redistribution of fluxes towards the synthesis of higher alcohols and then acetate esters and not towards protein synthesis. This impact can also be linked to positive cross-impact with temperature that simulated the synthesis of this ester because a large part of the fermentation was done between 18 and 25°C which was considered at the optimal range for the production of this volatile compound.

In order to go further in the analysis of this profile on ester production kinetics, the total production rate was calculated. For ethyl esters, it was clear that a first phase of production was visible; then, due to high temperatures, this rate decrease. For isoamyl acetate, the result was less obvious and highlighted an important interaction between the change of temperature and the addition of nitrogen on the synthesis of this compound.

#### **4. Conclusion**

In this work, an exploratory study was conducted regarding the cross effect of anisothermal profile and nitrogen addition on fermentation kinetics, MCC metabolites, final aroma concentration and on-line monitoring of ester production. This study mixes different multidisciplinary approaches such as understanding the combined effects of nitrogen addition and temperature control on aroma production but also statistical modeling of the obtained results.

This approach allowed to underline some important results. First of all, a very important cross-impact between the addition of nitrogen and the anisothermal profile was highlighted on each analysis performed. Nevertheless, the propanol content was weakly impacted by temperature, confirming its key role as a metabolic marker of nitrogen availability. Then, GAM modeling coupled with online monitoring showed that profiles including a decrease in temperature during the stationary phase allowed a better synthesis of esters and especially a better preservation in the liquid. It was important to highlight the production de-correlation between the two studied ethyl esters.

Finally, the study of the anisothermal profiles on the on-line monitoring of the esters gives a more precise vision of the temperature management for the synthesis of the aromas.

#### **5. Conflict of Interest**

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

#### **6. Author Contributions**

MP and EA designed the experimental strategy to perform all fermentations of this study and developed the associated tools including automatic nitrogen addition. CP developed the analytical method and calibration procedure for the online GC equipment for volatile compound monitoring. IS and MB built the GAM models and performed the associated statistical analysis. JG implemented all the experiment and drafted the manuscript. J-RM, VF, J-MS and JG performed the interpretation of all the data conceived and designed the overall study. J-RM and VF revised the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

#### **7. Funding**

This research project was funded by the French National Research Agency (ANR) under grant agreement STARWINE (ANR-18-CE10-0013).

## 8. Acknowledgments

We would like to thank the volatile compounds analysis platform (Valérie Nollet and Teddy Godet) for the training and reprocessing of the aroma analysis data, and Faïza Maçna for technical support on HPLC. Finally, we would also like to thank all the members of the STARWINE project.

## 9. Data availability statement

Data are available at the following address:

## 10. References

- Barbosa, Catarina, Virgilio Falco, Arlete Mendes-Faia, and Ana Mendes-Ferreira. 2009. "Nitrogen Addition Influences Formation of Aroma Compounds, Volatile Acidity and Ethanol in Nitrogen Deficient Media Fermented by *Saccharomyces Cerevisiae* Wine Strains." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 108 (2): 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.JBIOSEC.2009.02.017>.
- Beltran, Gemma, Braulio Esteve-Zarzoso, Nicolas Rozès, Albert Mas, and José M. Guillamón. 2005. "Influence of the Timing of Nitrogen Additions during Synthetic Grape Must Fermentations on Fermentation Kinetics and Nitrogen Consumption." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (4): 996–1002. <https://doi.org/10.1021/jf0487001>.
- Beltran, Gemma, Maite Novo, Véronique Leberre, Serguei Sokol, Delphine Labourdette, José Manuel Guillamon, Alberto Mas, Jean François, and Nicolas Rozes. 2006. "Integration of Transcriptomic and Metabolic Analyses for Understanding the Global Responses of Low-Temperature Winemaking Fermentations." *FEMS Yeast Research* 6 (8): 1167–83. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00106.x>.
- Beltran, Gemma, Maite Novo, Nicolas Rozès, Albert Mas, and José M. Guillamón. 2004. "Nitrogen Catabolite Repression in *Saccharomyces Cerevisiae* during Wine Fermentations." *FEMS Yeast Research* 4 (6): 625–32. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2003.12.004>.
- Bely, M., J. M. Sablayrolles, and P. Barre. 1990. "Description of Alcoholic Fermentation Kinetics: Its Variability and Significance." *American Journal of Enology and Viticulture* 41 (4).
- Bely, M, J-M Sablayrolles, and P Barre. 1990. "Automatic Detection of Assimilable Nitrogen Deficiencies during Alcoholic Fermentation in Oenological Conditions." *JOURNAL OF FERMENTATION AND BIOENGINEERING* 70 (4): 246–52.
- Bloem, Audrey, Isabelle Sanchez, Sylvie Dequin, and Carole Camarasa. 2016. "Metabolic Impact of Redox Cofactor Perturbations on the Formation of Aroma Compounds in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Applied and Environmental Microbiology* 82 (1): 174–83. <https://doi.org/10.1128/AEM.02429-15>.

- Cadière, Axelle, Anne Ortiz-Julien, Carole Camarasa, and Sylvie Dequin. 2011. "Evolutionary Engineered *Saccharomyces Cerevisiae* Wine Yeast Strains with Increased in Vivo Flux through the Pentose Phosphate Pathway." *Metabolic Engineering* 13 (3): 263–71. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2011.01.008>.
- Crépin, Lucie, Nhat My Truong, Audrey Bloem, Isabelle Sanchez, Sylvie Dequin, and Carole Camarasa. 2017. "Management of Multiple Nitrogen Sources during Wine Fermentation by *Saccharomyces Cerevisiae*." *Applied and Environmental Microbiology* 83 (5). <https://doi.org/10.1128/AEM.02617-16>.
- Eder, Matthias, Isabelle Sanchez, Claire Brice, Carole Camarasa, Jean-Luc Legras, and Sylvie Dequin. 2018. "QTL Mapping of Volatile Compound Production in *Saccharomyces Cerevisiae* during Alcoholic Fermentation." <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4562-8>.
- Godillot, Joséphine, Isabelle Sanchez, Marc Perez, Christian Picou, Virginie Galeote, Jean-Marie Sablayrolles, Vincent Farines, and Jean-Roch Mouret. 2022. "The Timing of Nitrogen Addition Impacts Yeast Genes Expression and the Production of Aroma Compounds During Wine Fermentation." *Frontiers in Microbiology* 13 (February). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.829786>.
- Guittin, Charlie, Faïza Maçna, Isabelle Sanchez, Xavier Poitou, Jean Marie Sablayrolles, Jean Roch Mouret, and Vincent Farines. 2021. "Impact of High Lipid Contents on the Production of Fermentative Aromas during White Wine Fermentation." *Applied Microbiology and Biotechnology* 105 (16–17): 6435–49. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11479-5>.
- Hernandez-Orte, P., M. Bely, J. Cacho, and V. Ferreira. 2006. "Impact of Ammonium Additions on Volatile Acidity, Ethanol, and Aromatic Compound Production by Different *Saccharomyces Cerevisiae* Strains during Fermentation in Controlled Synthetic Media." *Australian Journal of Grape and Wine Research* 12 (2): 150–60. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2006.tb00055.x>.
- Ljungdahl, Per O., and Bertrand Daignan-Fornier. 2012. "Regulation of Amino Acid, Nucleotide, and Phosphate Metabolism in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Genetics* 190 (3): 885–929. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.133306>.
- Malherbe, S., V. Fromion, N. Hilgert, and J. M. Sablayrolles. 2004. "Modeling the Effects of Assimilable Nitrogen and Temperature on Fermentation Kinetics in Enological Conditions." *Biotechnology and Bioengineering* 86 (3): 261–72. <https://doi.org/10.1002/bit.20075>.
- Michnick, Sumio, Jean Louis Roustan, Fabienne Remize, Pierre Barre, and Sylvie Dequin. 1997. "Modulation of Glycerol and Ethanol Yields during Alcoholic Fermentation in *Saccharomyces Cerevisiae* Strains Overexpressed or Disrupted for GPD1 Encoding Glycerol 3-Phosphate Dehydrogenase." *Yeast* 13 (9): 783–93. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199707\)13:9<783::AID-YEA128>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199707)13:9<783::AID-YEA128>3.0.CO;2-W).
- Molina, Ana M., Jan H. Swiegers, Cristian Varela, Isak S. Pretorius, and Eduardo Agosin. 2007. "Influence of Wine Fermentation Temperature on the Synthesis of Yeast-Derived Volatile Aroma Compounds." *Applied Microbiology and Biotechnology* 77 (3): 675–87. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1194-3>.

- Morakul, Sumallika, Jean Roch Mouret, Paméla Nicolle, Evelyne Aguera, Jean Marie Sablayrolles, and Violaine Athès. 2013. "A Dynamic Analysis of Higher Alcohol and Ester Release During Winemaking Fermentations." *Food and Bioprocess Technology* 6 (3): 818–27. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0827-4>.
- Morakul, Sumallika, Jean Roch Mouret, Pamela Nicolle, Ioan Cristian Trelea, Jean Marie Sablayrolles, and Violaine Athes. 2011. "Modelling of the Gas-Liquid Partitioning of Aroma Compounds during Wine Alcoholic Fermentation and Prediction of Aroma Losses." *Process Biochemistry* 46 (5): 1125–31. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.01.034>.
- Mouret, J. R., C. Camarasa, M. Angenieux, E. Aguera, M. Perez, V. Farines, and J. M. Sablayrolles. 2014. "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., S. Morakul, P. Nicolle, V. Athes, and J. M. Sablayrolles. 2012. "Gas-Liquid Transfer of Aroma Compounds during Winemaking Fermentations." *LWT - Food Science and Technology* 49 (2): 238–44. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.04.031>.
- Mouret, J. R., M. Perez, M. Angenieux, P. Nicolle, V. Farines, and J. M. Sablayrolles. 2014a. "Online-Based Kinetic Analysis of Higher Alcohol and Ester Synthesis During Winemaking Fermentations." *Food and Bioprocess Technology* 7 (5): 1235–45. <https://doi.org/10.1007/s11947-013-1089-5>.
- Pedersen, Eric J., David L. Miller, Gavin L. Simpson, and Noam Ross. 2019. "Hierarchical Generalized Additive Models in Ecology: An Introduction with Mgcv." *PeerJ* 2019 (5): e6876. <https://doi.org/10.7717/PEERJ.6876/SUPP-1>.
- Pérez, Dolores, Mariela Assof, Esteban Bolcato, Santiago Sari, and Martín Fanzone. 2018. "Combined Effect of Temperature and Ammonium Addition on Fermentation Profile and Volatile Aroma Composition of Torrontés Riojano Wines." *LWT - Food Science and Technology* 87 (January): 488–97. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.09.020>.
- Rollero, Stéphanie, Audrey Bloem, Carole Camarasa, Isabelle Sanchez, Anne Ortiz-Julien, Jean Marie Sablayrolles, Sylvie Dequin, and Jean Roch Mouret. 2015. "Combined Effects of Nutrients and Temperature on the Production of Fermentative Aromas by *Saccharomyces Cerevisiae* during Wine Fermentation." *Applied Microbiology and Biotechnology* 99 (5): 2291–2304. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6210-9>.
- Saerens, S. M.G., F. Delvaux, K. J. Verstrepen, P. Van Dijck, J. M. Thevelein, and F. R. Delvaux. 2008. "Parameters Affecting Ethyl Ester Production by *Saccharomyces Cerevisiae* during Fermentation." *Applied and Environmental Microbiology* 74 (2): 454–61. <https://doi.org/10.1128/AEM.01616-07>.
- Saerens, Sofie M.G., Kevin J. Verstrepen, Stijn D.M. Van Laere, Arnout R.D. Voet, Patrick Van Dijck, Freddy R. Delvaux, and Johan M. Thevelein. 2006. "The *Saccharomyces Cerevisiae* EHT1 and EEB1 Genes Encode Novel Enzymes with Medium-Chain Fatty Acid Ethyl Ester Synthesis and Hydrolysis Capacity." *Journal of Biological Chemistry* 281 (7): 4446–56. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512028200>.

- Seguinot, Pauline, Stéphanie Rollero, Isabelle Sanchez, Jean Marie Sablayrolles, Anne Ortiz-Julien, Carole Camarasa, and Jean Roch Mouret. 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 (December): 29–39. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.04.005>.
- Su, Ying, José Mariá Heras, Amparo Gamero, Amparo Querol, and José Manuel Guillamón. 2021. "Impact of Nitrogen Addition on Wine Fermentation by *S. Cerevisiae* Strains with Different Nitrogen Requirements." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 69 (21): 6022–31. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c01266>.
- Swiegers, J. H., E. J. Bartowsky, P. A. Henschke, and I. S. Pretorius. 2005. "Yeast and Bacterial Modulation of Wine Aroma and Flavour." *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11 (2): 139–73. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00285.x>.
- Verstrepen, Kevin J., Guy Derdelinckx, Jean Pierre Dufour, Joris Winderickx, Isak S. Pretorius, Johan M. Thevelein, and Freddy R. Delvaux. 2003. "The *Saccharomyces Cerevisiae* Alcohol Acetyl Transferase Gene ATF1 Is a Target of the CAMP/PKA and FGM Nutrient-Signalling Pathways." *FEMS Yeast Research* 4 (3): 285–96. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(03\)00166-1](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(03)00166-1).
- Wood, Simon N. 2017. "Generalized Additive Models: An Introduction with R, Second Edition." *Generalized Additive Models: An Introduction with R, Second Edition*, January, 1–476. <https://doi.org/10.1201/9781315370279/GENERALIZED-ADDITIVE-MODELS-SIMON-WOOD>.
- Zhang, Jian Wei, Cui Ying Zhang, Long Hai Dai, Jian Dong, Yu Lan Liu, Xue Wu Guo, and Dong Guang Xiao. 2012. "Effects of Overexpression of the Alcohol Acetyltransferase-Encoding Gene ATF1 and Disruption of the Esterase-Encoding Gene IAH1 on the Flavour Profiles of Chinese Yellow Rice Wine." *International Journal of Food Science and Technology* 47 (12): 2590–96. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2621.2012.03140.X>.





---

# Discussion générale et perspectives

---

L'objectif général de ce travail était d'étudier les effets individuels et combinés de deux paramètres clés de la fermentation – l'azote et la température – sur le métabolisme de la levure et la synthèse des arômes fermentaires.

Ce projet de recherche a été réalisé en plusieurs étapes. Dans un premier temps, le timing d'ajout d'azote en cours de fermentation, permettant de maximiser la teneur en arômes positifs (principalement les esters d'acétate) a été déterminé. Cette étude a été réalisée en lien avec une évaluation des effets combinés de l'azote et de la température sur le métabolisme levurien jusqu'à l'expression des gènes notamment ceux impliqués dans les productions d'arômes fermentaires. L'examen de l'impact des ajouts d'azote sur les cinétiques fermentaires et aromatiques pour un pilotage de la fermentation en mode isotherme a été ensuite étendue à l'étude de profils anisothermes de la température, toujours en lien avec l'ajout d'azote dans la dernière partie de ce travail. Cette partie plus exploratoire a été moins étudiée du point de vue métabolique et s'est focalisée principalement sur la description détaillée des effets observés.

Ce travail repose ainsi sur une approche pluridisciplinaire et innovante regroupant les compétences suivantes : 1/ la compréhension du métabolisme de la levure, 2/ la génomique, 3/ les bioprocédés, 4/ l'analyse statistique et 5/ la modélisation des données. Ces approches complémentaires ont permis de répondre à différentes questions biologiques en combinant par exemple un plan d'expérience de Box-Behnken et l'analyse transcriptomique (chapitre 1) ou encore le suivi en ligne de la production des arômes et la modélisation GAM (chapitre 2 et 3).

Cette pluridisciplinarité a permis d'obtenir des résultats importants et novateurs qui soutiennent l'originalité de ce travail de thèse.

Dans un premier temps, notre étude s'est focalisée sur l'effet du timing d'ajout d'azote sur la production des arômes fermentaires. Afin d'étudier l'effet de l'azote dans son intégralité, trois timings d'ajout d'azote ont été testés à différentes phases d'avancement de la fermentation. En complément, nous avons fait varier les concentrations d'azote initial et ajouté à température constante. La combinaison des données issues de l'analyse transcriptomique aux données phénotypiques générées dans le cadre du plan d'expérience de Box-Behnken a permis :

- **de démontrer que la régulation de la synthèse des esters d'acétate est différente de celle des esters d'éthyle par rapport à l'ajout d'azote en cours de phase stationnaire**
- **d'identifier le rôle clé du gène *ATF2* dans la synthèse des esters d'acétate**
- **de confirmer que le propanol est un marqueur pertinent de l'azote assimilable présent dans le moût**
- **et de mettre en évidence l'impact de l'ajout d'azote sur les gènes responsables de la synthèse des acides aminés**

En effet, les données obtenues ont montré qu'un ajout d'azote en début de phase stationnaire permet une meilleure synthèse des esters d'acétate par rapport à un ajout tardif.

Ce résultat est lié à l'activation spécifique du gène *ATF2*, responsable de la conversion d'un alcool supérieur en ester (**Figure 28**). Jusqu'à présent, *ATF1* était considéré comme étant le gène principal impliqué dans cette conversion (Seguinot et al., 2018; Verstrepen, Derdelinckx, Dufour, Winderickx, Pretorius, et al., 2003; J. W. Zhang et al., 2012).

Nos résultats ont permis de démontrer que si le gène *ATF1* est bien exprimé de manière constitutive au cours de la fermentation, c'est le gène *ATF2* qui est induit suite à un ajout d'azote réalisée au cours de la deuxième partie de la fermentation. L'analyse transcriptomique, couplée à un plan expérimental optimisé, a permis l'obtention de ce résultat important, complétant les résultats de la littérature.

L'analyse de l'expression des gènes n'a pas montré de différences significatives pour les gènes *EEB1* et *EHT1*, responsables de la conversion d'un acide gras en ester. Toutefois, les surfaces de réponses obtenues à partir du plan de Box Behnken indiquent un timing optimal d'ajout d'azote pour cette bioconversion. Il semblerait donc que la régulation de la synthèse des esters d'éthyle soit allostérique et non génétique.

Dans ce chapitre, nous avons également confirmé le rôle du propanol en tant que marqueur de la teneur en azote (Mouret, Camarasa, et al., 2014; Seguinot et al., 2018), tout en approfondissant la compréhension du métabolisme de cet alcool. Une nouvelle fois, l'approche croisée entre le modèle statistique et l'expression des gènes apporte des résultats originaux. Même si le propanol est un marqueur de l'azote assimilable, sa concentration augmente de manière plus significative lorsque l'ajout d'azote est réalisé en phase stationnaire, en comparaison d'un ajout initial (**Figure 28**). Ce résultat s'explique par les données obtenues lors de l'analyse transcriptomique : suite à l'ajout d'azote (après 30 minutes), les gènes responsables de la synthèse de la thréonine, précurseur du propanol, sont instantanément activés.

L'analyse des résultats obtenus dans cette première partie nous a permis de fixer le timing d'ajout d'azote à 20 g/L de CO<sub>2</sub> dégagé (correspondant au début de la phase stationnaire de fermentation) pour la suite des travaux car ce timing permet de maximiser la synthèse des esters d'acétate. Dans ce travail, l'objectif est d'optimiser les concentrations des 2 classes d'esters. Cependant, l'azote ayant un impact plus important sur la synthèse des esters d'acétate que sur celle des esters d'éthyle, nous avons privilégié les esters d'acétate dans un premier temps. D'autres leviers, comme la gestion fine de la température, seront évalués plus tard pour moduler la production des esters d'éthyle.

En poursuivant cet objectif, l'effet du facteur température a été étudié en interaction avec l'impact d'un ajout d'azote. Dans cette deuxième partie, un plan d'expérience de Box-Behnken a été une nouvelle fois utilisé. L'approche pluridisciplinaire mise en place est basée sur le suivi en ligne de la production des arômes couplée à une modélisation des résultats associés.

Cette stratégie permet d'identifier les effets simples et d'interactions des différents facteurs sur la production des arômes en dissociant les effets physiques (pertes par évaporation) et biologiques (production totale par la levure). Cette partie du travail de thèse a permis de :

- **mettre en évidence les effets significatifs de l'azote initial, de l'azote ajouté et de la température sur les cinétiques de synthèse des arômes**
- **d'identifier une température optimale de synthèse spécifique à chaque arôme étudié**
- **de préciser le rôle de la température sur l'accumulation des esters en phase liquide, ce paramètre ayant à la fois un effet physique et biologique**
- **d'identifier un nouveau « rôle » clé pour le propanol : cet alcool est un marqueur de l'azote mais aussi de l'activité cellulaire**

Les cinétiques de production des différents arômes sont impactées par les trois facteurs étudiés dans cette partie. La modélisation a tout d'abord révélé un effet d'interaction fort entre la température et l'ajout d'azote, en particulier pour l'acétate d'isoamyle. La production de cet ester n'est pas nécessairement plus importante avec une forte concentration en azote ajouté et une température faible, comme le suggère la littérature. Nos résultats confirment l'effet positif et très significatif de l'ajout d'azote mais révèlent que la concentration finale maximale en acétate d'isoamyle est observée pour une température d'environ 23°C.

Ensuite, il apparaît que la température produit un effet différent sur les synthèses de l'alcool isoamylique et de l'isobutanol : la production de l'alcool isoamylique est activée à une température de 23 °C tandis que celle de l'isobutanol est favorisée à 28 °C (**Tableau 20, Figure 28**). Ces deux composés étaient jusqu'à présent associés dans leur comportement similaire mais ce résultat montre que la régulation de leur synthèse est dissociée. Ce phénomène est certainement dû aux changements de flux de synthèse des acides aminés précurseurs (leucine et valine) induits par les différentes températures appliquées. Pour les esters, on observe également une température idéale de synthèse différente entre les esters d'acétate et d'éthyle. L'acétate d'isoamyle a une température idéale de synthèse à 23°C tandis qu'elle se situe à 18°C pour l'hexanoate d'éthyle et l'octanoate d'éthyle (**Tableau 20, Figure 28**).

Tableau 20. **Températures idéales de synthèse observées à partir des résultats du chapitre 2.**

Arômes	Température idéale de synthèse
Alcool isoamylique	23°C
Isobutanol	28°C
Propanol	28°C
Acétate d'isoamyle	23°C
Hexanoate d'éthyle	18°C
Octanoate d'éthyle	18°C

Il est important de souligner le double effet de la température – biologique et physique – sur la production des esters. En effet, au-delà de l'évaporation des esters en lien avec les fortes températures, ce paramètre joue un rôle fondamental dans l'activation de la synthèse de ces composés. Ainsi, la synthèse des esters d'éthyle est activée à 18°C et cette température est favorable à leur conservation dans le liquide (**Figure 28**).

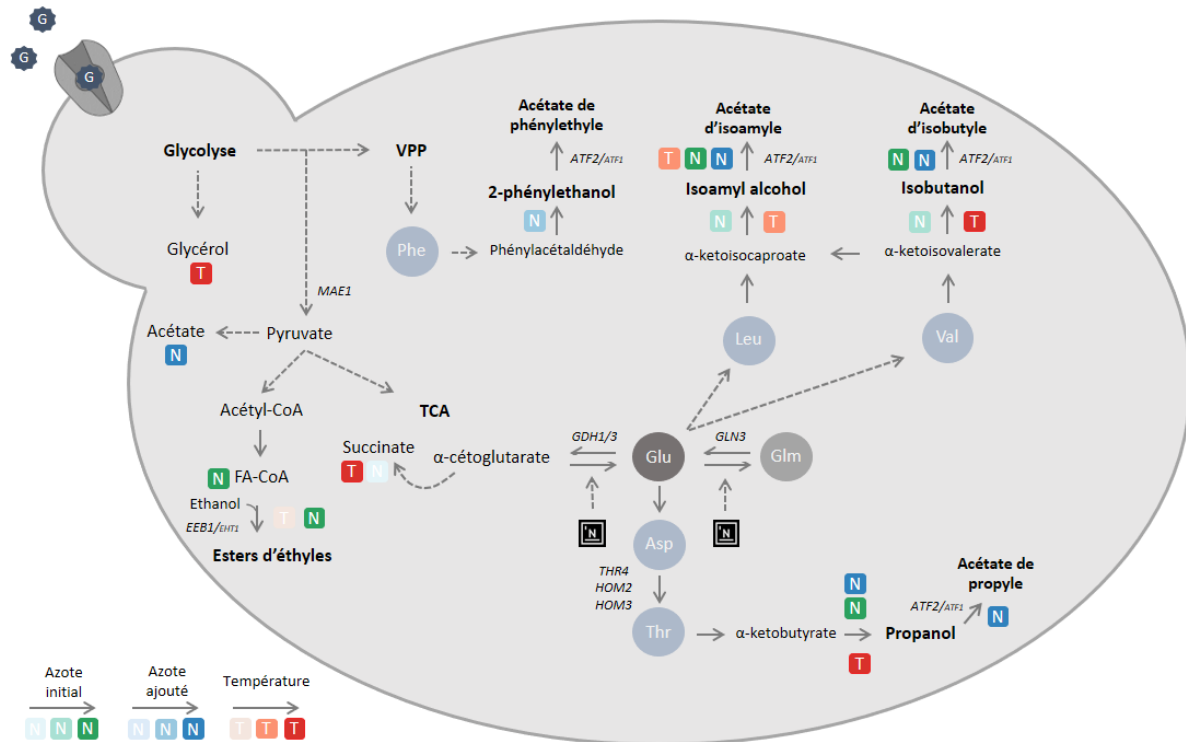


Figure 28. **Schéma récapitulatif des effets de l'azote et de la température** (isotherme) sur la synthèse des métabolites du MCC et des arômes fermentaires.  $70 \leq [\text{azote initial}] \leq 210 \text{ mg/L}$ ,  $50 \leq [\text{azote ajouté}] \leq 150 \text{ mg/L}$  et  $18 \leq \text{température} \leq 28 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Enfin, le suivi en ligne de la production du propanol nous a montré que ce dernier était sensible à l'ajout d'azote mais également à l'augmentation de la température. De plus, l'évolution de sa vitesse de production au cours du temps est fortement similaire à la vitesse de dégagement de  $\text{CO}_2$ . Ce dernier résultat a permis de préciser plus encore le rôle du propanol : ce composé est un marqueur de l'activité cellulaire en plus d'être un marqueur de l'azote assimilable du moût (**Figure 28**).

La troisième et dernière partie de ce travail correspond à un travail plus exploratoire. En effet, à notre connaissance, il s'agit de la première étude évaluant l'impact d'une gestion anisotherme de la température sur les cinétiques de synthèse des arômes. De plus, l'ambition était de coupler cette gestion originale de la température à l'ajout d'azote.

Pour ce travail, huit profils anisothermes différents ont été testés avec et sans ajout d'azote en début de phase stationnaire. La plupart des arômes ont été dosés en point final mais nous avons également suivi la production des esters en ligne car ce sont les marqueurs principaux de l'arôme fruité des vins. Pour ces molécules marqueurs, une modélisation statistique a été réalisée pour permettre une compréhension détaillée des cinétiques de synthèse et comprendre le poids relatif de chaque facteur. Les principaux résultats de cette étude mettent en évidence :

- **la forte interaction entre les profils anisothermes de température et l'ajout d'azote sur la production des arômes**
- **les profils qui favorisent la synthèse des esters d'éthyles**
- **la possibilité d'obtenir une même concentration finale en arômes pour différentes combinaisons de paramètres (profils de température, ajout d'azote)**

Le principal résultat de cette dernière partie est la mise en évidence d'une forte interaction entre les deux paramètres étudiés : la gestion anisotherme de la température et l'ajout d'azote. La meilleure illustration de cette interaction se situe au niveau de l'acétate d'isoamyle.

En effet, en accord avec la littérature et les résultats des chapitres 1 et 2, sa production augmente systématiquement lors d'un ajout d'azote mais le pourcentage d'augmentation varie fortement (de 10 à 49%) en fonction du profil de température utilisé. Même s'il est difficile d'observer des différences significatives au niveau de la gestion de la température, il semble, tout de même, que certains profils anisothermes favorisent la production de l'acétate d'isoamyle. En effet, en accord avec les résultats du chapitre 2 qui indiquent une température de synthèse idéale aux alentours de 23°C, il apparaît que les profils anisothermes qui présentent une rampe de température comprise entre 23 et 25°C sont les plus favorables à la synthèse de ce composé. Au-delà de cette température, la synthèse du composé n'est plus favorisée et le phénomène d'évaporation augmente.

Pour les esters d'éthyle, les profils comprenant une phase de baisse de la température semblent favoriser leur synthèse, en adéquation avec les résultats obtenus dans le chapitre 2.

Il est également important de noter qu'il existe plusieurs stratégies – combinant la gestion anisotherme de la température et l'ajout d'azote – permettant d'atteindre une même concentration finale en arôme. L'ajout d'azote favorisant la production totale des esters d'acétate par la levure, il est possible de s'affranchir partiellement des températures basses nécessaires au maintien de ces molécules volatiles en phase liquide.

Ce travail multidisciplinaire a permis d'avancer de manière importante dans la connaissance des effets directs et d'interaction de l'azote et de la température sur la production des arômes au cours de la fermentation. Cependant, la mise en œuvre d'une approche encore plus intégrée (couplant la génomique, le suivi en ligne des arômes et la modélisation statistique) pourrait à l'avenir permettre d'apporter des connaissances plus détaillées de certains phénotypes observés. En effet, les techniques d'analyses statistiques utilisées permettent de mettre en lumière des points clés dans les cinétiques de synthèse des arômes. Il serait donc intéressant de « zoomer » sur ces points particuliers. L'approche pluridisciplinaire proposée précédemment devrait permettre d'apporter une meilleure compréhension du métabolisme avec les pistes d'études complémentaires suivantes :

- **une analyse transcriptomique englobant l'aspect température (isotherme et anisotherme) et l'ajout d'azote**
- **une analyse précise de la synthèse *de novo* des acides aminés suite à l'ajout d'azote**
- **une analyse précise du devenir du DAP par marquage isotopique**

Dans un premier temps, il serait intéressant de se focaliser sur la synthèse des esters d'acétate, notamment l'acétate d'isoamyle. En effet, la production de cet ester est impactée à la fois par la température et par l'azote. Pour optimiser sa synthèse, une gestion coordonnée de ces deux paramètres fermentaires paraît donc nécessaire. Toutefois, pour élaborer des stratégies de gestion de la fermentation ciblées sur cette arôme, une compréhension fine de la régulation de la production de cet arôme est nécessaire. L'effet de l'azote ayant été étudié en détails dans cette thèse, il faudrait désormais approfondir l'effet de la température. Ce projet de recherche a démontré que la synthèse de l'acétate d'isoamyle est optimale aux alentours de 23°C mais une analyse transcriptomique permettrait de savoir si l'expression du gène *ATF2* est également maximale à cette température. Enfin, la réalisation de cinétiques d'expression de ce gène en fonction des profils anisothermes de température offrirait une vision globale de l'effet de la température.

Dans ce travail de thèse, l'effet de l'ajout d'azote a été étudié en détails sur le génome de la levure en conditions de fermentations isothermes mais pas en conditions anisothermes. Une étude en ce sens serait intéressante pour voir si l'effet de la baisse de température couplée à un ajout d'azote permet le maintien de l'expression et/ou l'activation des gènes comme *EEB1/EHT1* ou encore le couple *ATF1/ATF2*. Au-delà, approfondir la compréhension de l'activation de ces gènes par l'azote pourrait ouvrir des perspectives d'innovation. En effet, identifier des gènes clés jouant un rôle dans des cascades de signalisation activant les gènes liés à la synthèse des arômes pourrait trouver une application dans l'amélioration des souches de levures pour gérer le profil organoleptique des vins.

Ce travail pourrait également être poursuivi par une analyse poussée de la synthèse des acides aminés, notamment de la thréonine, dans le cadre d'un ajout d'azote pendant des fermentations à différentes températures.

Ainsi, la combinaison entre l'analyse transcriptomique (chapitre 1), le suivi en ligne de la production de propanol (chapitre 2), le dosage des acides aminés synthétisés *de novo* par la levure (à la suite de l'ajout d'azote) et l'analyse du devenir de l'azote ajouté (DAP) dans la cellule (par marquage isotopique de l'atome d'azote) nous permettrait de faire un état des lieux complet du rôle du propanol en tant que marqueur métabolique.

Les perspectives techniques envisageables à la suite de ce travail de thèse concernent :

- **l'augmentation du nombre d'arômes fermentaires modélisés afin de suivre en ligne plus de composés d'arôme**
- **l'élargissement du suivi en ligne à d'autres familles d'arômes comme les composés soufrés**

A la suite de ce travail, il serait intéressant d'élargir le suivi en ligne des arômes à d'autres composés comme le 2-phénylethanol pour les alcools supérieurs ; l'acétate de 2-phénylethyle, l'acétate d'isobutyle et l'acétate de propyle pour les esters d'acétate ; le decanoate d'éthyle et le dodécanoate d'éthyle pour les esters d'éthyles. Actuellement, le suivi de la concentration de ces composés volatils carbonés dans la phase gaz est possible grâce l'équipement de GC-MS en ligne. Mais, le coefficient de partage de ces molécules n'a pas été étudié ; il n'est donc pas possible de réaliser des bilans de production gaz/liquide pour ces arômes. Enfin, il serait aussi intéressant d'avoir accès aux acides gras pour suivre les couples esters/précurseurs et optimiser mieux encore la synthèse des esters.

Le suivi en ligne des composés d'arôme permet d'accéder à plusieurs types d'informations et permet également de répondre à des questions métaboliques importantes. Dans ce sens, il serait donc intéressant de réaliser ce suivi sur des molécules volatiles appartenant à d'autres familles comme les composés soufrés. En effet, jusqu'à présent, le suivi en ligne des arômes ne s'est concentré que sur les arômes positifs carbonés. Il serait donc intéressant de se pencher sur la famille des composés soufrés afin d'optimiser le profil organoleptique d'un vin en évitant l'apparition de défauts.

Afin de se rapprocher des conditions réelles de vinifications, nous proposons les perspectives suivantes :

- **tester les combinaisons azote/température sur du moût naturel (blanc et rouge)**
- **étudier le comportement d'autres souches de levures en conditions d'ajout d'azote et de changements de température**

L'ensemble des résultats de ce travail ont été obtenus en milieu synthétique. Par conséquent, il serait pertinent de vérifier si les effets des différentes combinaisons azote/température observés sur la production des arômes fermentaires sont conservés en moûts de raisin naturels. Il faudrait, par exemple, confirmer qu'un ajout d'azote couplé à une baisse de la température permet effectivement d'augmenter l'accumulation des esters d'acétate dans le vin final en matrice naturelle.



De plus, ce travail a montré qu'il est possible d'atteindre la même concentration finale pour un ester d'acétate avec des profils de températures drastiquement différents. Pour les vinificateurs, cet aspect est très important car les profils de température sont plus ou moins énergivores en termes de frigories. Il est donc important de pouvoir tester et optimiser ces profils de température combinés à un ajout d'azote en prenant en compte les bilans énergétiques.

De plus, éprouver la généralité des effets de l'anisothermie et des ajouts d'azote sur une ou plusieurs autres souches de levure serait très intéressant. En effet, étudier le comportement d'autres souches de levures *Saccharomyces* ou de couples de levures *Saccharomyces*/non *Saccharomyces* utilisées en co-inoculation serait intéressant. Le changement de température pourrait permettre à une espèce de s'installer dans le milieu pour ensuite laisser l'autre espèce se développer. Dans ce sens, l'ajout d'azote pourrait également profiter aux deux souches de levures co-inoculées et faciliter leur insertion dans le milieu.

Les résultats de ce travail de thèse ont été utilisés dans un premier temps pour mieux comprendre l'impact croisé de l'azote et de la température sur la physiologie de la levure. Dans un second temps, dans le cadre du projet ANR StarWine, ces résultats seront utilisés pour construire un modèle mécanistique (représentatif des principales réactions du métabolisme levurien) capable de prédire les cinétiques fermentaire et aromatique en fonction de l'azote et de la température. Sur la base de ce modèle mathématique, une stratégie de contrôle en temps réel du procédé fermentaire sera mise en œuvre à l'échelle laboratoire. En utilisant l'outil de suivi en ligne de la cinétique fermentaire et des arômes présenté dans ce travail de thèse, l'objectif de cette stratégie de contrôle sera de piloter l'ajout d'azote et la gestion de la température pour atteindre une concentration cible en arômes dans le vin final.

---

# Liste des figures

---

FIGURE 1. EVOLUTION DES PARAMETRES DE FERMENTATION AU COURS DU TEMPS LORS D'UNE FERMENTATION A 24°C. LA SOUCHE UTILISEE EST EC1118 ET LE MILIEU EST UN MOUT SYNTHETIQUE A 200 G/L DE SUCRES ET 330 MG/L D'AZOTE ASSIMILABLE.....	15
FIGURE 2. METABOLISME CARBONE CENTRAL INCLUANT LA GLYCOLYSE, LE TCA ET LA VOIE DES PENTOSE PHOSPHATE EN FERMENTATION CENOLOGIQUE.....	18
FIGURE 3. MECANISMES DE TRANSPORT DES IONS AMMONIUM (UNIORT) ET DES ACIDES AMINES (SYMPORT) (LJUNGDAHL AND DAIGNAN-FORNIER, 2012).....	19
FIGURE 4. SYSTEMES D'ASSIMILATION DES DIFFERENTES SOURCES D'AZOTE DU MILIEU EN PRESENCE OU EN ABSENCE DES SOURCES AZOTEES PREFERENTIELLES (GOBERT ET AL., 2019, LJUNGDAHL AND DAIGNAN-FORNIER, 2012, ZHANG ET AL., 2018). LES PERMEASES, ENZYMES ET FACTEURS DE TRANSCRIPTIONS SOUS LE CONTROLE DU SYSTEME SPS SONT COLORES EN VERT, CEUX SOUS LE CONTROLE DU SYSTEME NCR SONT COLORES EN BLEU. EN PRESENCE DE SOURCE AZOTEE PREFERENTIELLE, LE SYSTEME SPS EST ACTIF ET LE NCR INACTIF (GAUCHE). EN ABSENCE DE SOURCE AZOTEE PREFERENTIELLE LE SPS EST INACTIF ET NCR ACTIF (DROITE).....	21
FIGURE 5. SCHEMATISATION DU NŒUD A-CETOGLUTARATE/GLUTAMATE/GLUTAMINE (D'APRES LJUNGDAHL AND DAIGNAN-FORNIER, 2012).....	22
FIGURE 6. SCHEMATISATION DE LA BIOSYNTHESE DES ACIDES AMINES A PARTIR DU MCC (D'APRES LJUNGDAHL & DAIGNAN-FORNIER, 2012).....	23
FIGURE 7. EFFET D'UN AJOUT D'AZOTE INITIAL OU EN COURS DE FERMENTATION SUR LA CINETIQUE FERMENTAIRE. (A) EFFET DU TIMING D'AJOUT DE DAP A UNE CONCENTRATION DE 63 MG/L (MALHERBE ET AL., 2004) ; (B) EFFET DU TIMING ET DE LA NATURE DE L'AZOTE AJOUTE SUR LA CINETIQUE FERMENTAIRE : AJOUT INITIAL (COURBES ROUGE ET BLEU FONCEE), AJOUT EN COURS DE FERMENTATION (COURBES JAUNE ET BLEU CLAIR), DAP AJOUTE (COURBES BLEU FONCEE ET BLEU CLAIR), AA AJOUTES (COURBES ROUGE ET JAUNE). LA COURBE VERTE EST UNE FERMENTATION TEMOIN SANS AJOUT (SEGUINOT ET AL., 2018).....	24
FIGURE 8. EFFET DE L'AUGMENTATION DE TEMPERATURE AU COURS DE LA PHASE STATIONNAIRE DE FERMENTATION. (GAUCHE) AUGMENTATION DE LA TEMPERATURE EN FONCTION DE L'AVANCEMENT DE REACTION. (DROITE) VITESSE DE DEGAGEMENT DE CO <sub>2</sub> EN FONCTION DE L'AVANT DE REACTION (D'APRES SABLAYROLLES, 2009).....	25
FIGURE 9. ROLE DES METABOLISMES CARBONE ET AZOTE DANS LA SYNTHÈSE DES AROMES FERMENTAIRES (SWIEGERS ET AL., 2005).....	29
FIGURE 10. VOIE D'EHRlich (HAZELWOOD ET AL., 2008).....	31
FIGURE 11. SYNTHÈSE DES ESTERS D'ACETATE A PARTIR DU METABOLISME CARBONE CENTRAL. L'ACETATE DE PHENYLETHYLE, L'ACETATE D'ISOAMYLE, L'ACETATE D'ISOBUTYLE ET L'ACETATE DE PROPYLE SONT SYNTHETISES RESPECTIVEMENT A PARTIR DE LA PHENYLALANINE, LA LEUCINE, LA VALINE ET LA THREONINE (D'APRES BELL AND HENSCHKE, 2005).....	33
FIGURE 12. METABOLISME DES ACIDES GRAS CHEZ S. CEREVISIAE (KLUG & DAUM, 2014). LES ACIDES GRAS VIENNENT DU MILIEU EXTRACELLULAIRE, DE LA DEGRADATION DE COMPLEXES LIPIDIQUES, DE LA SYNTHÈSE DE NOVO. ILS SONT ENSUITE STOCKES, DEGRADEES OU INTEGRES A DES COMPLEXES LIPIDIQUES MEMBRANAIRES.....	34
FIGURE 13. BIOSYNTHESE DES ACIDES GRAS A CHAINE MOYENNE ET LONGUE ET SYNTHÈSE DES ESTERS D'ETHYLES (D'APRES SAERENS ET AL., 2010).....	35
FIGURE 14. CHRONOLOGIE DE PRODUCTION DES AROMES FERMENTAIRES. (A) CONSOMMATION D'AZOTE ET PRODUCTION DES ALCOOLS SUPERIEURS. (B) CONSOMMATION D'AZOTE INITIAL ET AJOUTE ET CINETIQUE DE PRODUCTION DU PROPANOL. (C) RATIO DE PRODUCTION ENTRE L'ISOBUTYL ACETATE ET L'ISOBUTANOL (GAUCHE) ; ENTRE L'ISOAMYL ACETATE ET L'ISOAMYLE ALCOOL (DROITE).....	37
FIGURE 15. REDISTRIBUTION DU FLUX METABOLIQUE ENTRE LA SYNTHÈSE DES ACIDES AMINES ET CELLE DES ALCOOLS SUPERIEURS EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN AZOTE INITIAL. (A) N0 = 70 MG/L ; (B) N0 = 250 MG/L ; (C) N0 = 425 MG/L. (ROLLERO ET AL., 2018).....	39
FIGURE 16. SUIVI EN LIGNE DE LA PRODUCTION D'ESTERS EN FONCTION DU TEMPS AU COURS D'UNE FERMENTATION ANISOTHERME (15°C-30°C). (TRAIT VIDE) CINETIQUE FERMENTAIRE ; (CROIX) PRODUCTION TOTALE ; (TRAIT PLEIN) CONCENTRATION DANS LE LIQUIDE ; (LOSANGE) PERTES. CES TROIS CONCENTRATIONS SONT EXPRIMEES EN MG/L (MORAKUL ET AL.,2011).....	48
FIGURE 17. PHOTO D'UN FERMENTEUR DE 1L EQUIPE D'UN POUSSE SERINGUE POUR L'AJOUT D'AZOTE AUTOMATIQUE EN COURS DE FERMENTATION. ....	55
FIGURE 18. PHOTO D'UN FERMENTEUR DE 10L SUR LEQUEL ON RETROUVE LES DIFFERENTES SORTIES POUR LE SUIVI DE LA CINETIQUE FERMENTAIRE ET AROMATIQUE.....	56

FIGURE 19. SCHEMA REPRESENTANT L'INSTALLATION DU SUIVI EN LIGNE DES AROMES AU COURS DE LA FERMENTATION (DE LA SORTIE DU FERMENTEUR PAR LA LIGNE CHAUFFEE AU DOSAGE GRACE AU GC-FID/MS).....	63
FIGURE 20. SCHEMA REPRESENTANT LE SYSTEME ATIS UTILISE POUR LA CALIBRATION DU GC-FID/MS.....	64
FIGURE 21. EXPRESSION GENIQUE DU GENE MAE1 SUITE A UN AJOUT A 20 G/L DE CO <sub>2</sub> (A20) ET A 50 G/L DE CO <sub>2</sub> (A50) PAR RAPPORT AU TEMOIN (FERMENTATION SANS AJOUT D'AZOTE). .....	91
FIGURE 22. EXPRESSION GENIQUE DU GENE EEB1 ET EHT1 SUITE A UN AJOUT A 20 G/L DE CO <sub>2</sub> (A20) ET A 50 G/L DE CO <sub>2</sub> (A50) PAR RAPPORT AU TEMOIN (FERMENTATION SANS AJOUT D'AZOTE). .....	92
FIGURE 23. SURFACE DE REPONSE DE LA CONCENTRATION FINALE EN GLYCEROL (MG/L). (A) EN FONCTION DE LA TEMPERATURE ET DE L'AZOTE INITIAL. (B) EN FONCTION DE L'AZOTE AJOUTE ET DE L'AZOTE INITIAL. ....	126
FIGURE 24. SURFACE DE REPONSE DE LA CONCENTRATION FINALE EN SUCCINATE (MG/L). (A) EN FONCTION DE L'AZOTE AJOUTE ET DE L'AZOTE INITIAL. (B) EN FONCTION DE LA TEMPERATURE ET DE L'AZOTE INITIAL. ....	127
FIGURE 25. SURFACE DE REPONSE DE LA CONCENTRATION FINALE EN ACETATE (MG/L) EN FONCTION DE L'AZOTE AJOUTE ET DE L'AZOTE INITIAL. ....	127
FIGURE 26. EXPRESSION GENIQUE DU GENE THR4 SUITE A UN AJOUT REALISE A 20 G/L DE CO <sub>2</sub> (A20) PAR RAPPORT AU TEMOIN. L'EXPRESSION GENIQUE A ETE DOSEE 30 MIN ET 2 H APRES L'AJOUT. ....	128
FIGURE 27. EXPRESSION GENIQUE DES GENES HOM2 ET HOM3 RELATIVE AU TEMOIN SUITE A UN AJOUT REALISE A 20 G/L DE CO <sub>2</sub> . L'EXPRESSION GENIQUE A ETE DOSEE 30 MIN ET 2 H APRES L'AJOUT. ....	129
FIGURE 28. SCHEMA RECAPITULATIF DES EFFETS DE L'AZOTE ET DE LA TEMPERATURE (ISOTHERME) SUR LA SYNTHESE DES METABOLITES DU MCC ET DES AROMES FERMENTAIRES. $70 \leq [AZOTE\ INITIAL] \leq 210$ MG/L, $50 \leq [AZOTE\ AJOUTE] \leq 150$ MG/L ET $18 \leq TEMPERATURE \leq 28$ °C. ....	165

---

# Liste des tableaux

---

<b>TABLEAU 1. TABLEAU RECAPITULATIF DES DIFFERENTES SOURCES AZOTEES ASSIMILEES. (A) PERMEASES D'ACIDES AMINES SOUS LE CONTROLE DU SYSTEME SPS OU NCR. (B) GROUPEMENT DES ACIDES AMINES PAR ORDRE D'UTILISATION (D'APRES GOBERT ET AL., 2019 ET CREPIN ET AL., 2012).....</b>	<b>22</b>
<b>TABLEAU 2. PRINCIPAUX COMPOSES D'AROME RETROUVES DANS LE VIN (D'APRES SWIEGERS ET AL., 2005)</b>	<b>28</b>
<b>TABLEAU 3. IMPACT DU TIMING D'AJOUT DE DIFFERENTES SOURCES AZOTEES SUR LA PRODUCTION DES AROMES AU COURS DE LA FERMENTATION. AA : ACIDES AMINES ; AC : AMMONIUM CHLORURE ; DAP : DI-AMMONIUM PHOSPHATE ; AS : SULFATE D'AMMONIUM .....</b>	<b>43</b>
<b>TABLEAU 4. IMPACT DE L'AJOUT DE SOURCES AZOTEES SUR L'EXPRESSION DES GENES DE S.CEREVISIAE. AA : ACIDES AMINES ; AC : AMMONIUM CHLORURE ; DAP : DI-AMMONIUM PHOSPHATE.....</b>	<b>44</b>
<b>TABLEAU 5. POURCENTAGES DE PERTES PAR EVAPORATION DE DIFFERENTS AROMES EN FONCTION DES TEMPERATURES DE FERMENTATION APPLIQUEES (D'APRES MOURET ET AL., 2014).....</b>	<b>45</b>
<b>TABLEAU 6. TABLEAU REGROUPANT L'EFFET DE LA TEMPERATURE ISOTHERME SUR LA PRODUCTION D'AROMES.....</b>	<b>46</b>
<b>TABLEAU 7. EFFET DE LA TEMPERATURE SUR L'EXPRESSION DES GENES CODANT POUR LA SYNTHESE DES COMPOSES VOLATILS. ....</b>	<b>48</b>
<b>TABLEAU 8. COMPOSITION POUR 1L DE MOUT SYNTHETIQUE A 200 G/L DE SUCRE. ....</b>	<b>52</b>
<b>TABLEAU 9. VARIATIONS DE LA CONCENTRATION EN AZOTE ASSIMILABLE DANS LE MOUT SYNTHETIQUE....</b>	<b>53</b>
<b>TABLEAU 10. COMPOSITION DES DIFFERENTES SOLUTIONS MERES EN G/L. ....</b>	<b>53</b>
<b>TABLEAU 11. COMPOSITION DE LA SOLUTION MERE D'ACIDES AMINES EN G/L.....</b>	<b>54</b>
<b>TABLEAU 12. COMPOSITION DES DIFFERENTS TAMPONS DE CHARGE UTILISES POUR LA SEPARATION DES ACIDES AMINES.....</b>	<b>59</b>
<b>TABLEAU 13. COMPOSITION DES 7 POINTS DE GAMME. ....</b>	<b>61</b>
<b>TABLEAU 14. PARAMETRES POUR LA DETERMINATION DES AROMES FERMENTAIRES DU VIN PAR SIM. ....</b>	<b>62</b>
<b>TABLEAU 15. DISTRIBUTION DES NIVEAUX DE CALIBRATION PAR COMPOSITION DES SOLUTIONS FILLES. ....</b>	<b>65</b>
<b>TABLEAU 16. CONCENTRATION DANS LE GAZ (<math>\mu\text{G/L}</math>) DES DIFFERENTES SOLUTIONS MERES DANS LES 4 NIVEAUX DE SOLUTIONS FILLES. ....</b>	<b>65</b>
<b>TABLEAU 17. DETAILS DES MODALITES DU BOX-BEHNKEN N°1.....</b>	<b>70</b>
<b>TABLEAU 18. DETAILS DES MODALITES DU BOX-BEHNKEN N°2.....</b>	<b>70</b>
<b>TABLEAU 19. EFFETS SIMPLES, D'INTERACTIONS ET QUADRATIQUES DES TROIS FACTEURS ETUDIES SUR LES METABOLITES DU MCC. ....</b>	<b>126</b>
<b>TABLEAU 20. TEMPERATURES IDEALES DE SYNTHESE OBSERVEES A PARTIR DES RESULTATS DU CHAPITRE 2. ....</b>	<b>164</b>

---

# Références bibliographiques

---

- Barbosa, C., Falco, V., Mendes-Faia, A., & Mendes-Ferreira, A. (2009a). Nitrogen addition influences formation of aroma compounds, volatile acidity and ethanol in nitrogen deficient media fermented by *Saccharomyces cerevisiae* wine strains. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *108*(2), 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.02.017>
- 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*(2), 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.10.003>
- Bell, S. J., & Henschke, P. A. (2005). Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. In *Australian Journal of Grape and Wine Research* (Vol. 11, Issue 3, pp. 242–295). Australian Society of Viticulture and Oenology. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00028.x>
- Beltran, G., Esteve-Zarzoso, B., Rozès, N., Mas, A., & Guillamón, J. M. (2005). Influence of the timing of nitrogen additions during synthetic grape must fermentations on fermentation kinetics and nitrogen consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(4), 996–1002. <https://doi.org/10.1021/jf0487001>
- Beltran, G., Novo, M., Leberre, V., Sokol, S., Labourdette, D., Guillamon, J. M., Mas, A., François, J., & Rozes, N. (2006). Integration of transcriptomic and metabolic analyses for understanding the global responses of low-temperature winemaking fermentations. *FEMS Yeast Research*, *6*(8), 1167–1183. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00106.x>
- Beltran, G., Novo, M., Rozès, N., Mas, A., & Guillamón, J. M. (2004). Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentations. *FEMS Yeast Research*, *4*(6), 625–632. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2003.12.004>
- 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*(4), 246–252.
- Bely, M., Sablayrolles, J. M., & Barre, P. (1990b). Description of Alcoholic Fermentation Kinetics: Its Variability and Significance. *American Journal of Enology and Viticulture*, *41*(4).
- Blank, L. M., Lehmbeck, F., & Sauer, U. (2005). Metabolic-flux and network analysis in fourteen hemiascomycetous yeasts. *FEMS Yeast Research*, *5*(6–7), 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.
- Bloem, A., Sanchez, I., Dequin, S., & Camarasa, C. (2016). Metabolic impact of redox cofactor perturbations on the formation of aroma compounds in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, *82*(1), 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*(2), 1087–1092. <https://doi.org/10.1128/jb.171.2.1087-1092.1989>
- Boeckstaens, M., André, B., & Marini, A. M. (2007). The yeast ammonium transport protein Mep2 and its positive regulator, the Npr1 kinase, play an important role in normal and pseudohyphal growth on various nitrogen media through retrieval of excreted ammonium. *Molecular Microbiology*, *64*(2), 534–546. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05681.x>
- Box, G. E. P., & Behnken, D. W. (1960). *American Society for Quality Some New Three Level Designs for the Study of Quantitative Variables* (Vol. 2, Issue 4).
- Brice, C., Cubillos, F. A., Dequin, S., Camarasa, C., & Martínez, C. (2018). Adaptability of the *Saccharomyces cerevisiae* yeasts to wine fermentation conditions relies on their strong ability to consume nitrogen. *PLoS ONE*, *13*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192383>
- 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*(3), 263–271. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2011.01.008>
- Camarasa, C., Grivet, J. P., & Dequin, S. (2003). Investigation by <sup>13</sup>C-NMR and tricarboxylic acid (TCA) deletion mutant analysis of pathways of succinate formation in *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic fermentation. *Microbiology*, *149*(9), 2669–2678. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26007-0>
- Celton, M., Sanchez, I., Goelzer, A., Fromion, V., Camarasa, C., & Dequin, S. (2012). A comparative transcriptomic, fluxomic and metabolomic analysis of the response of *Saccharomyces cerevisiae* to increases in NADPH oxidation. *BMC Genomics*, *13*(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-317>
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, *162*(1), 156–159. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90021-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90021-2)
- Clement, T., Perez, M., Mouret, J. R., Sablayrolles, J. M., & Camarasa, C. (2011). Use of a continuous multistage bioreactor to mimic winemaking fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, *150*(1), 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.016>
- Colombie, S., Malherbe, S., & Sablayrolles, J. M. (2005). Modeling alcoholic fermentation in enological conditions: feasibility and interest. In *American journal of enology and viticulture: Vol. v. 56*.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*(22), 8102–8111. <https://doi.org/10.1128/AEM.02294-12>
- Crépin, L., Sanchez, I., Nidelet, T., Dequin, S., & Camarasa, C. (2014). *Efficient ammonium*

- uptake and mobilization of vacuolar arginine by Saccharomyces cerevisiae wine strains during wine fermentation.* <https://doi.org/10.1186/2046-1682-4-13>
- 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*. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(5). <https://doi.org/10.1128/AEM.02617-16>
- Darriet, P., Pons, A., Allamy, L., Schüttler, A., van Leeuwen, C., Thibon, C., & leeuwen, van C. (2016). *Quels impacts attendus du changement climatique sur les composés aromatiques et leurs précurseurs ?* <https://hal.inrae.fr/hal-02744085>
- Deroite, A., Legras, J. L., Rigou, P., Ortiz-Julien, A., & Dequin, S. (2018). Lipids modulate acetic acid and thiol final concentrations in wine during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* × *Saccharomyces kudriavzevii* hybrids. *AMB Express*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0657-5>
- Dickinson, J. R., Salgado, L. E. J., & Hewlins, M. J. E. (2003). The catabolism of amino acids to long chain and complex alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(10), 8028–8034. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211914200>
- Eden, A., Van Nederveelde, L., Drukker, M., Benvenisty, N., & Debourg, A. (2001). Involvement of branched-chain amino acid aminotransferases in the production of fusel alcohols during fermentation in yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55(3), 296–300. <https://doi.org/10.1007/s002530000506>
- Eder, M., Sanchez, I., Brice, C., Camarasa, C., Legras, J.-L., & Dequin, S. (2018). *QTL mapping of volatile compound production in Saccharomyces cerevisiae during alcoholic fermentation.* <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4562-8>
- 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(8), 2786–2792. <https://doi.org/10.1128/AEM.60.8.2786-2792.1994>
- García-Moreno, A., López-Domínguez, R., Ramirez-Mena, A., Pascual-Montano, A., Aparicio-Puerta, E., Hackenberg, M., & Carmona-Saez, P. (2021). *GeneCodis 4: Expanding the modular enrichment analysis to regulatory elements.* <https://doi.org/10.1101/2021.04.15.439962>
- Gobert, A., Tourdot-Maréchal, R., Sparrow, C., Morge, C., & Alexandre, H. (2019). Influence of nitrogen status in wine alcoholic fermentation. In *Food Microbiology* (Vol. 83, pp. 71–85). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.04.008>
- Godillot, J., Sanchez, I., Perez, M., Picou, C., Galeote, V., Sablayrolles, J.-M., Farines, V., & Mouret, J.-R. (2022). The Timing of Nitrogen Addition Impacts Yeast Genes Expression and the Production of Aroma Compounds During Wine Fermentation. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.829786>
- Guittin, C., Maçna, F., Sanchez, I., Poitou, X., Sablayrolles, J. M., Mouret, J. R., & Farines, V. (2021). Impact of high lipid contents on the production of fermentative aromas during white wine fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(16–17), 6435–

6449. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11479-5>

- 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. In *Applied and Environmental Microbiology* (Vol. 74, Issue 8, pp. 2259–2266). <https://doi.org/10.1128/AEM.02625-07>
- Hernandez-Orte, P., Bely, M., Cacho, J., & Ferreira, V. (2006). Impact of ammonium additions on volatile acidity, ethanol, and aromatic compound production by different *Saccharomyces cerevisiae* strains during fermentation in controlled synthetic media. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 12(2), 150–160. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2006.tb00055.x>
- Hohmann, S. (1991). Characterization of PDC6, a third structural gene for pyruvate decarboxylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 173(24), 7963–7969. <https://doi.org/10.1128/jb.173.24.7963-7969.1991>
- Iraqi, I., Vissers, S., Cartiaux, M., & Urrestarazu, A. (1998). Characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* ARO8 and ARO9 genes encoding aromatic aminotransferases I and II reveals a new aminotransferase subfamily. *Molecular and General Genetics*, 257(2), 238–248. <https://doi.org/10.1007/s004380050644>
- Jacquier, N., & Schneiter, R. (2010). Ypk1, the yeast orthologue of the human serum- and glucocorticoid-induced kinase, is required for efficient uptake of fatty acids. *Journal of Cell Science*, 123(13), 2218–2227. <https://doi.org/10.1242/jcs.063073>
- Jiménez-Martí, E., Aranda, A., Mendes-Ferreira, A., Mendes-Faia, A., & del Olmo, M. L. (2007). The nature of the nitrogen source added to nitrogen depleted vinifications conducted by a *Saccharomyces cerevisiae* strain in synthetic must affects gene expression and the levels of several volatile compounds. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 92(1), 61–75. <https://doi.org/10.1007/s10482-006-9135-1>
- Jiménez-Martí, E., & Olmo, M. (2008). Addition of ammonia or amino acids to a nitrogen-depleted medium affects gene expression patterns in yeast cells during alcoholic fermentation. *FEMS Yeast Research*, 8, 245–256. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2007.00325.x>
- Klug, L., & Daum, G. (2014). Yeast lipid metabolism at a glance. *FEMS Yeast Research*, 14(3), 369–388. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12141>
- Lambrechts, M. G., & Pretorius, I. S. (2000). Yeast and its Importance to Wine Aroma - A Review. *South African Journal of Enology & Viticulture*, 21(1). <https://doi.org/10.21548/21-1-3560>
- Lenth, R. V. (2009). Response-Surface Methods in R, Using rsm. In *JSS Journal of Statistical Software* (Vol. 32, Issue 7). <http://www.jstatsoft.org/>
- Lilly, M., Bauer, F. F., Styger, G., Lambrechts, M. G., & Pretorius, I. S. (2006). The effect of increased branched-chain amino acid transaminase activity in yeast on the production of higher alcohols and on the flavour profiles of wine and distillates. *FEMS Yeast Research*, 6(5), 726–743. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00057.x>

- Lilly, M., Lambrechts, M. G., & Pretorius, I. S. (2000). Effect of Increased Yeast Alcohol Acetyltransferase Activity on Flavor Profiles of Wine and Distillates. In *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* (Vol. 66, Issue 2).
- Liu, P., Wang, Y., Ye, D., Duan, L., Duan, C., & Yan, G. (2017). Effect of the addition of branched-chain amino acids to non-limited nitrogen synthetic grape must on volatile compounds and global gene expression during alcoholic fermentation. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *24*(2), 197–205. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12313>
- Ljungdahl, P. O., & Daignan-Fornier, B. (2012a). Regulation of amino acid, nucleotide, and phosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *190*(3), 885–929. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.133306>
- Lleixà, J., Martín, V., Giorello, F., Portillo, M. C., Carrau, F., Beltran, G., & Mas, A. (2019). Analysis of the NCR mechanisms in *Hanseniaspora vineae* and *Saccharomyces cerevisiae* during winemaking. *Frontiers in Genetics*, *10*(JAN). <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00747>
- Malherbe, S., Fromion, V., Hilgert, N., & Sablayrolles, J. M. (2004). Modeling the Effects of Assimilable Nitrogen and Temperature on Fermentation Kinetics in Enological Conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, *86*(3), 261–272. <https://doi.org/10.1002/bit.20075>
- Martínez-Moreno, R., Quirós, M., Morales, P., & Gonzalez, R. (2014). New insights into the advantages of ammonium as a winemaking nutrient. *International Journal of Food Microbiology*, *177*, 128–135. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.020>
- Mason, A. B., & Dufour, J. P. (2000). Alcohol acetyltransferases and the significance of ester synthesis in yeast. *Yeast*, *16*(14), 1287–1298. [https://doi.org/10.1002/1097-0061\(200010\)16:14<1287::AID-YEA613>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/1097-0061(200010)16:14<1287::AID-YEA613>3.0.CO;2-I)
- Mendes-Ferreira, A., Del Olmo, M., García-Martínez, J., Jiménez-Martí, E., Mendes-Faia, A., Pérez-Ortín, J. E., & Leão, C. (2007). Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to different nitrogen concentrations during alcoholic fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(9), 3049–3060. <https://doi.org/10.1128/AEM.02754-06>
- Michnick, S., Roustan, J. L., Remize, F., Barre, P., & Dequin, S. (1997). Modulation of glycerol and ethanol yields during alcoholic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressed or disrupted for GPD1 encoding glycerol 3-phosphate dehydrogenase. *Yeast*, *13*(9), 783–793. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199707\)13:9<783::AID-YEA128>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199707)13:9<783::AID-YEA128>3.0.CO;2-W)
- Mojzita, D., & Hohmann, S. (2006). Pdc2 coordinates expression of the THI regulon in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Genetics and Genomics*, *276*(2), 147–161. <https://doi.org/10.1007/S00438-006-0130-Z>
- 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. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *77*(3), 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 and Bioprocess Technology*, 6(3), 818–827. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0827-4>
- Morakul, S., Mouret, J. R., Nicolle, P., Trelea, I. C., Sablayrolles, J. M., & Athes, V. (2011). Modelling of the gas-liquid partitioning of aroma compounds during wine alcoholic fermentation and prediction of aroma losses. *Process Biochemistry*, 46(5), 1125–1131. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.01.034>
- Mouret, J. R., Camarasa, C., Angenieux, M., Aguera, E., Perez, M., Farines, V., & Sablayrolles, J. M. (2014). Kinetic analysis and gas-liquid balances of the production of fermentative aromas during winemaking fermentations: Effect of assimilable nitrogen and temperature. *Food Research International*, 62, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.02.044>
- Mouret, J. R., Morakul, S., Nicolle, P., Athes, V., & Sablayrolles, J. M. (2012). Gas-liquid transfer of aroma compounds during winemaking fermentations. *LWT - Food Science and Technology*, 49(2), 238–244. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.04.031>
- Mouret, J. R., Perez, M., Angenieux, M., Nicolle, P., Farines, V., & Sablayrolles, J. M. (2014a). Online-Based Kinetic Analysis of Higher Alcohol and Ester Synthesis During Winemaking Fermentations. *Food and Bioprocess Technology*, 7(5), 1235–1245. <https://doi.org/10.1007/s11947-013-1089-5>
- Nagasawa, N., Bogaki, T., Iwamatsu, A., Hamachi, M., & Kumagai, C. (1998). Cloning and nucleotide sequence of the alcohol acetyltransferase ii gene (ATF2) from *Saccharomyces cerevisiae* kyokai no. 7. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 62(10), 1852–1857. <https://doi.org/10.1271/BBB.62.1852>
- Nosaka, K., Onozuka, M., Konno, H., Kawasaki, Y., Nishimura, H., Sano, M., & Akaji, K. (2005). Genetic regulation mediated by thiamin pyrophosphate-binding motif in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 58(2), 467–479. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2005.04835.X>
- Novo, M., Bigey, F., Beyne, E., Galeote, V., Gavory, F., Mallet, S., Cambon, B., Legras, J. L., Wincker, P., Casaregola, S., & Dequin, S. (2009). Eukaryote-to-eukaryote gene transfer events revealed by the genome sequence of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* EC1118. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(38), 16333–16338. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0904673106>
- Pedersen, E. J., Miller, D. L., Simpson, G. L., & Ross, N. (2019). Hierarchical generalized additive models in ecology: An introduction with mgcv. *PeerJ*, 2019(5), e6876. <https://doi.org/10.7717/PEERJ.6876/SUPP-1>
- Pérez-Torrado, R., Gimeno-Alcañiz, J. V., & Matallana, E. (2002). Wine yeast strains engineered for glycogen overproduction display enhanced viability under glucose deprivation conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(7), 3339–3344. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.7.3339-3344.2002/FORMAT/EPUB>
- Pérez, D., Assof, M., Bolcato, E., Sari, S., & Fanzone, M. (2018). Combined effect of temperature and ammonium addition on fermentation profile and volatile aroma composition of Torrontés Riojano wines. *LWT - Food Science and Technology*, 87, 488–

497. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.09.020>

- Rapp, A., & Versini, G. (1995). Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wines. *Developments in Food Science*, 37(C), 1659–1694. [https://doi.org/10.1016/S0167-4501\(06\)80257-8](https://doi.org/10.1016/S0167-4501(06)80257-8)
- Remize, F., Sablayrolles, J. M., & Dequin, S. (2000). Re-assessment of the influence of yeast strain and environmental factors on glycerol production in wine. In *Journal of Applied Microbiology* (Vol. 88).
- 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(5), 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. *Frontiers in Microbiology*, 9(FEB). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00196>
- Rollero, S., Mouret, J. R., Bloem, A., Sanchez, I., Ortiz-Julien, A., Sablayrolles, J. M., Dequin, S., & Camarasa, C. (2017). Quantitative <sup>13</sup>C-isotope labelling-based analysis to elucidate the influence of environmental parameters on the production of fermentative aromas during wine fermentation. *Microbial Biotechnology*, 10(6), 1649–1662. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12749>
- Sablayrolles, J.-M., & Barre, P. (1993). Kinetics of Alcoholic Fermentation Under Anisothermal Enological Conditions. I. Influence of Temperature Evolution on the Instantaneous Rate of Fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 44(2).
- Sablayrolles, J. M. (2009). Control of alcoholic fermentation in winemaking: Current situation and prospect. *Food Research International*, 42(4), 418–424. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.12.016>
- 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(2), 454–461. <https://doi.org/10.1128/AEM.01616-07>
- Saerens, S. M. G., Verbelen, P. J., Vanbeneden, N., Thevelein, J. M., & Delvaux, F. R. (2008). Monitoring the influence of high-gravity brewing and fermentation temperature on flavour formation by analysis of gene expression levels in brewing yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80(6), 1039–1051. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1645-5>
- Saerens, S. M. G., Verstrepen, K. J., Van Laere, S. D. M., Voet, A. R. D., Van Dijck, P., Delvaux, F. R., & Thevelein, J. M. (2006). The *Saccharomyces cerevisiae* EHT1 and EEB1 genes encode novel enzymes with medium-chain fatty acid ethyl ester synthesis and hydrolysis capacity. *Journal of Biological Chemistry*, 281(7), 4446–4456. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512028200>

- Saint-Prix, F., Bönquist, L., & Dequin, S. (2004). Functional analysis of the ALD gene family of *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic growth on glucose: The NADP<sup>+</sup>-dependent Ald6p and Ald5p isoforms play a major role in acetate formation. *Microbiology*, *150*(7), 2209–2220. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26999-0>
- Scanes, K. T., Hohmann, S., & Prior, B. A. (1998). 2239-Article Text-6879-1-10-20170504.pdf.
- Schreier, P., & Walter, G. J. (2009). Flavor composition of wines: A review. [Http://Dx.Doi.Org/10.1080/10408397909527273](http://Dx.Doi.Org/10.1080/10408397909527273), *12*(1), 59–111. <https://doi.org/10.1080/10408397909527273>
- 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>
- Su, Y., Heras, J. M., Gamero, A., Querol, A., & Guillamón, J. M. (2021). Impact of Nitrogen Addition on Wine Fermentation by *S. cerevisiae* Strains with Different Nitrogen Requirements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *69*(21), 6022–6031. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c01266>
- Swiegers, J. H., Bartowsky, E. J., Henschke, P. A., & Pretorius, I. S. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *11*(2), 139–173. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00285.x>
- Torija, M. J., Rozès, N., Poblet, M., Guillamón, J. M., & Mas, A. (2003). Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, *80*(1), 47–53. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00144-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00144-7)
- Torrea, D., Fraile, P., Garde, T., & Ancín, C. (2003). Production of volatile compounds in the fermentation of chardonnay musts inoculated with two strains of *Saccharomyces cerevisiae* with different nitrogen demands. *Food Control*, *14*(8), 565–571. [https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(02\)00146-9](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(02)00146-9)
- Torrea, D., Varela, C., Ugliano, M., Ancin-Azpilicueta, C., Leigh Francis, I., & Henschke, P. A. (2011). Comparison of inorganic and organic nitrogen supplementation of grape juice - Effect on volatile composition and aroma profile of a Chardonnay wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *Food Chemistry*, *127*(3), 1072–1083. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.092>
- Tuller, G., Nemeč, T., Hraštnik, C., & Gu } Nther Daum, A. (1999). Lipid Composition of Subcellular Membranes of an FY1679-derived Haploid Yeast Wild-type Strain Grown on Different Carbon Sources. In *Yeast* (Vol. 15).
- Urrestarazu, A., Vissers, S., Iraqui, I., & Grenson, M. (1998). Phenylalanine- and tyrosine-auxotrophic mutants of *Saccharomyces cerevisiae* impaired in transamination. *Molecular and General Genetics*, *257*(2), 230–237. <https://doi.org/10.1007/s004380050643>
- van Dijken, J. P., & Scheffers, W. A. (1986). Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, *32*(3–4), 199–224. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(86\)90291-0](https://doi.org/10.1016/0378-1097(86)90291-0)

- Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G., Dufour, J.-P., Winderickx, J., Thevelein, J. M., Pretorius, I. S., & Delvaux, F. R. (2003). *Flavor-Active Esters: Adding Fruitiness to Beer* (Vol. 96, Issue 2).
- 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 Research*, 4(3), 285–296. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(03\)00166-1](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(03)00166-1)
- Verstrepen, K. J., Van Laere, S. D. M., Vanderhaegen, B. M. P., Derdelinckx, G., Dufour, J. P., Pretorius, I. S., Winderickx, J., Thevelein, J. M., & Delvaux, F. R. (2003). Expression levels of the yeast alcohol acetyltransferase genes ATF1, Lg-ATF1, and ATF2 control the formation of a broad range of volatile esters. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(9), 5228–5237. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.9.5228-5237.2003>
- Vilanova, M., Ugliano, M., Varela, C., Siebert, T., Pretorius, I. S., & Henschke, P. A. (2007). Assimilable nitrogen utilisation and production of volatile and non-volatile compounds in chemically defined medium by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(1), 145–157. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1145-z>
- Viljoen, B. C., Kock, J. L. F., & Lategan, P. M. (1986). *Long-chain fatty acid composition of selected genera of yeasts belonging to the Endomycetales*.
- Wickham, H., Averick, M., Bryan, J., Chang, W., McGowan, L., François, R., Grolemund, G., Hayes, A., Henry, L., Hester, J., Kuhn, M., Pedersen, T., Miller, E., Bache, S., Müller, K., Ooms, J., Robinson, D., Seidel, D., Spinu, V., ... Yutani, H. (2019). Welcome to the Tidyverse. *Journal of Open Source Software*, 4(43), 1686. <https://doi.org/10.21105/JOSS.01686>
- Williams, L. A., & Boulton, R. (1983). *Modeling and Prediction of Evaporative Ethanol Loss During Wine Fermentations*.
- Wood, S. N. (2017). Generalized additive models: An introduction with R, second edition. *Generalized Additive Models: An Introduction with R, Second Edition*, 1–476. <https://doi.org/10.1201/9781315370279/GENERALIZED-ADDITIVE-MODELS-SIMON-WOOD>
- Yoshimoto, H., Fukushige, T., Yonezawa, T., & Sone, H. (2002). Genetic and physiological analysis of branched-chain alcohols and isoamyl acetate production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(4–5), 501–508. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1041-5>
- Zhang, J. W., Zhang, C. Y., Dai, L. H., Dong, J., Liu, Y. L., Guo, X. W., & Xiao, D. G. (2012). Effects of overexpression of the alcohol acetyltransferase-encoding gene ATF1 and disruption of the esterase-encoding gene IAH1 on the flavour profiles of Chinese yellow rice wine. *International Journal of Food Science and Technology*, 47(12), 2590–2596. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2621.2012.03140.X>
- Zhang, W., Du, G., Zhou, J., & Chen, J. (2018). Regulation of Sensing, Transportation, and Catabolism of Nitrogen Sources in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 82(1). <https://doi.org/10.1128/membr.00040-17>



## Résumé

Aujourd'hui, la demande est orientée vers des vins disposant de profils sensoriels fruités et floraux. Afin d'être en adéquation avec les attentes des consommateurs, il est nécessaire de développer des stratégies de contrôle du procédé de vinification pour obtenir les propriétés organoleptiques souhaitées. L'objectif général de ce travail est donc d'étudier les effets individuels et combinés de deux paramètres clés de la fermentation sur le métabolisme de la levure et la synthèse des arômes fermentaires : l'azote et la température. La première partie de ce travail de thèse a été consacrée à l'étude de l'impact du timing d'ajout d'azote en cours de fermentation sur la synthèse des composés d'arôme par la levure. En ce sens, une étude mélangeant modélisation statistique et analyse de l'expression des gènes notamment impliqués dans la synthèse des arômes par la levure a permis de déterminer le timing optimal de l'ajout d'azote en cours de fermentation pour maximiser la teneur en arômes positifs (principalement les esters d'acétate). Ensuite, une évaluation des effets combinés de l'azote et de la température sur le métabolisme levurien a été effectuée grâce à un outil de suivi en ligne des arômes fermentaires. Une température idéale de synthèse a été identifiée pour chaque composé suivi. Enfin, l'examen de l'impact des ajouts d'azote et de la température sur les cinétiques fermentaires et aromatiques pour un pilotage de la fermentation a été étendue à l'étude de profils anisothermes de température. Des profils comprenant une baisse de température ont été identifiés comme les plus favorables à la synthèse et l'accumulation des esters d'éthyles dans le liquide.

Mots clés : Fermentation œnologique – Arômes – Azote – Température – Modélisation statistique

## Abstract

Today, the demand is oriented towards wines with fruity and floral sensory profiles. In order to meet consumer expectations, it is necessary to develop strategies to control the winemaking process to obtain the desired organoleptic properties. The general objective of this work is therefore to study the individual and combined effects of two key fermentation parameters on yeast metabolism and fermentation aroma synthesis: nitrogen and temperature. The first part of this thesis was devoted to studying the impact of the nitrogen addition timing during fermentation on the synthesis of aroma compounds by the yeast. In this sense, a study combining statistical modeling and analysis of the expression of genes involved in the aroma synthesis by yeast allowed us to determine the optimal timing of the nitrogen addition during fermentation in order to maximize the content of positive aromas (mainly acetate esters). Then, an evaluation of the combined effects of nitrogen and temperature on yeast metabolism was carried out thanks to an online monitoring tool for fermentative aromas. An ideal synthesis temperature was identified for each compound monitored. Finally, the examination of the impact of nitrogen addition and temperature on fermentation and aroma kinetics for fermentation control was extended to the study of anisothermal temperature profiles. Profiles including a decrease in temperature were identified as the most favorable for the synthesis and accumulation of ethyl esters in the liquid.

Key words: Oenology fermentation – Aromas – Nitrogen – Temperature – Statistical modelling