HAL
open science

Caractérisation et valorisation de la production d'arômes par la levure non-conventionnelle Saprochaete suaveolens : analyse métabolique de souches sauvages et mutantes et application biotechnologique dans le domaine brassicole

Mélissa Tan

To cite this version:

Mélissa Tan. Caractérisation et valorisation de la production d'arômes par la levure non-conventionnelle Saprochaete suaveolens : analyse métabolique de souches sauvages et mutantes et application biotechnologique dans le domaine brassicole. Biochimie [q-bio.BM]. Université de la Réunion, 2020. Français. NNT : 2020LARE0032 . tel-04416377

HAL Id: tel-04416377

https://theses.hal.science/tel-04416377v1

Submitted on 25 Jan 2024

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.

UNIVERSITE DE LA REUNION
UFR SCIENCES ET TECHNOLOGIES
Ecole Doctorale Sciences, Technologies et Santé

THESE
Présentée en vue de l'obtention du grade de
DOCTEUR EN SCIENCES
Spécialité : Agroalimentaire et Biotechnologie
Par : **Mélissa TAN**

Caractérisation et valorisation de la production d'arômes par la levure non-conventionnelle *Saprochaete suaveolens* : analyse métabolique de souches sauvages et mutantes et application biotechnologique dans le domaine brassicole

Soutenance le 7 décembre 2020

Composition du jury :

Mme Elisabeth GIRBAL NEUHAUSER, Professeur, LBAE, Auch	Rapporteur
Mme Gemma BELTRAN CASELLAS, Professeur, Univ. Rovira I Virgili, Espagne	Rapporteur
Mr Thierry REGNIER, Professeur, Tshwane Univ. of Technology, Afrique du Sud	Examinateur
Mr Yanis CARO, MCF-HDR, ChemBioPro, Univ. de la Réunion, France	Examinateur
Mr Laurent ROBERT, Maître brasseur, SOREBRA©, Saint-Louis, La Réunion, France	Invité
Mr Alain SHUM CHEONG SING, MCF-HDR, ChemBioPro, Univ. de la Réunion, France	Co-encadrant de thèse
Mr Jean-Marie FRANCOIS, Professeur, Toulouse Biotechnology Institute, Toulouse, France	Co-directeur de thèse
Mr Thomas PETIT, Professeur, ChemBioPro, Univ. de la Réunion, France	Directeur de thèse

Cette thèse a reçu le soutien financier de l'Université de la Réunion dans le cadre d'un contrat doctoral

POLE RECHERCHE
Ecoles **D**octorales

LETTRE D'ENGAGEMENT DE NON-PLAGIAT

Je, soussigné(e) TAN Mélissa Marie Justine, en ma qualité de doctorant(e) de l'Université de La Réunion, déclare être conscient(e) que le plagiat est un acte délictueux passible de sanctions disciplinaires. Aussi, dans le respect de la propriété intellectuelle et du droit d'auteur, je m'engage à systématiquement citer mes sources, quelle qu'en soit la forme (textes, images, audiovisuel, internet), dans le cadre de la rédaction de ma thèse et de toute autre production scientifique, sachant que l'établissement est susceptible de soumettre le texte de ma thèse à un logiciel anti-plagiat.

Fait à Saint-Pierre le 15 octobre 2020

Extrait du Règlement intérieur de l'Université de La Réunion
(Validé par le Conseil d'Administration en date du 11 décembre 2014)

Article 9. Protection de la propriété intellectuelle – Faux et usage de faux, contrefaçon, plagiat

L'utilisation des ressources informatiques de l'Université implique le respect de ses droits de propriété intellectuelle ainsi que ceux de ses partenaires et plus généralement, de tous tiers titulaires de tels droits.
En conséquence, chaque utilisateur doit :
- utiliser les logiciels dans les conditions de licences souscrites ;
- ne pas reproduire, copier, diffuser, modifier ou utiliser des logiciels, bases de données, pages Web, textes, images, photographies ou autres créations protégées par le droit d'auteur ou un droit privatif, sans avoir obtenu préalablement l'autorisation des titulaires de ces droits.

La contrefaçon et le faux
Conformément aux dispositions du code de la propriété intellectuelle, toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle d'une œuvre de l'esprit faite sans le consentement de son auteur est illicite et constitue un délit pénal.
L'article 444-1 du code pénal dispose : « Constitue un faux toute altération frauduleuse de la vérité, de nature à causer un préjudice et accomplie par quelque moyen que ce soit, dans un écrit ou tout autre support d'expression de la pensée qui a pour objet ou qui peut avoir pour effet d'établir la preuve d'un droit ou d'un fait ayant des conséquences juridiques ».
L'article L335_3 du code de la propriété intellectuelle précise que : « Est également un délit de contrefaçon toute reproduction, représentation ou diffusion, par quelque moyen que ce soit, d'une œuvre de l'esprit en violation des droits de l'auteur, tels qu'ils sont définis et réglementés par la loi. Est également un délit de contrefaçon la violation de l'un des droits de l'auteur d'un logiciel (…) ».

Le plagiat est constitué par la copie, totale ou partielle d'un travail réalisé par autrui, lorsque la source empruntée n'est pas citée, quel que soit le moyen utilisé. Le plagiat constitue une violation du droit d'auteur (au sens des articles L 335-2 et L 335-3 du code de la propriété intellectuelle). Il peut être assimilé à un délit de contrefaçon. C'est aussi une faute disciplinaire, susceptible d'entraîner une sanction.
Les sources et les références utilisées dans le cadre des travaux (préparations, devoirs, mémoires, thèses, rapports de stage…) doivent être clairement citées. Des citations intégrales peuvent figurer dans les documents rendus, si elles sont assorties de leur référence (nom d'auteur, publication, date, éditeur…) et identifiées comme telles par des guillemets ou des italiques.
Les délits de contrefaçon, de plagiat et d'usage de faux peuvent donner lieu à une sanction disciplinaire indépendante de la mise en œuvre de poursuites pénales.

REMERCIEMENTS

Avant de commencer, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé de différentes façons au bon déroulement de ce projet de thèse. C'est pourquoi j'adresse mes premiers remerciements au Pr. Anne Bialecki, directrice du laboratoire de Chimie et Biotechnologies des Produits Naturels (ChemBioPro, Réunion) pour m'avoir permis d'intégrer ce laboratoire pendant mes années de doctorat et à l'école doctorale « Sciences, Technologies et Santé » (ED STS) de l'Université de la Réunion pour m'avoir confié un contrat doctoral afin de mener à bien mon projet. Je souhaite également remercier les rapportrices de ce manuscrit, Mme Elisabeth Girbal Neuhauser, Professeure au Laboratoire de Biotechnologies Agroalimentiaire et Environnementale (LBAE) d'Auch et Mme Gemma Beltran Casellas, Professeure à l'Université « Rovira I Virgili » (Espagne), pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

J'exprime également toute ma gratitude à mes directeurs de thèse, le Pr. Thomas Petit et le Pr. Jean-Marie François et à mon encadrant de thèse, le Dr-HDR Alain Shum Cheong Sing pour m'avoir fait confiance sur ce projet. Je remercie par ailleurs, Thomas de m'avoir fait part de son expertise en microbiologie et en biotechnologie. Je le remercie plus particulièrement de m'avoir proposé d'entreprendre cette thèse et de m'avoir accompagné dans le milieu professionnel depuis mes années de Master. A Jean-Marie, merci de m'avoir accueilli pleinement à deux reprises au sein de son équipe de recherche, l'équipe « *Physiology and Functional Genomics of Eucaryotes* » (PHYGE) du « *Toulouse Biotechnology Institute - Bio & Chemical Engineering* » (TBI, Toulouse). Merci pour toute son expertise en biologie moléculaire ainsi qu'en biochimie et pour la patience et la disponibilité qu'il a eu pour m'y initier. Enfin, à Alain je dis un grand merci pour m'avoir fait profiter de l'ensemble de ses

connaissances théoriques dans les domaines des arômes. Merci également pour tout le temps consacré à me former à ce domaine tant du point de vue technique que fondamental. A vous trois, merci pour votre suivi, vos conseils et votre disponibilité durant toutes ces années.

Je voudrais aussi remercier le Pr. Thierry Regnier ainsi que le Dr-HDR Yanis Caro pour le temps qu'ils ont consacré à mon encadrement pendant la thèse. Merci à Thierry de m'avoir accueilli au sein du « *Department of Biotechnology and Food Technology* » du « *Tswhane University of Technology* » (TUT, Pretoria) et de m'avoir fait profiter de son réseau professionnel et personnel pour réaliser mes campagnes de récolte. A Yanis, je dis merci pour sa participation aux diverses réunions de travail et de m'avoir aidé à résoudre les problèmes techniques rencontrés en chimie. Merci à vous deux d'avoir veillé au bon avancement de la thèse en acceptant d'être les membres de mon comité de thèse durant ces années.

Je tiens particulièrement à remercier Mr Patrick Chan-Ou-Teng, directeur de l'entreprise SOREBRA©, pour nous avoir fait don de moût de brassage industriel tout au long du projet. Merci également à Mr Laurent Robert, maître brasseur à SOREBRA©, pour m'avoir accompagné sur la partie technique et pour avoir partagé avec moi son savoir et savoir-faire sur l'art du brassage et de la production de bière.

Je voudrais également remercier l'ensemble des équipes techniques des divers laboratoires et départements universitaires qui m'ont accueilli dans leurs locaux au cours de ma thèse. Ainsi je remercie Mme Ethel Mogale du « *Department of Biotechnology and Food Technology* » de TUT, Mme Catherine Bostanch, de l'équipe PHYGE de TBI ainsi que Mme Patricia Clerc et Mme Heloïse Reiss, du laboratoire ChemBioPro pour m'avoir fait part de leurs compétences pour la mise en place technique de ce projet. Aussi, je voudrais remercier Mme Gwendoline Hoarau, Mme Ingrid Lebreton et Mr Luc Collin, techniciens de laboratoire au département Génie Biologique et au département Hygiène, Sécurité et Environnement de l'Institut Universitaire et Technologique (IUT) de Saint-Pierre (Réunion) pour leur soutien

technique et moral pendant l'ensemble de ces années. Merci notamment pour m'avoir proposé vos solutions et votre appui à chaque étape de la réalisation de ce projet. Aussi, aux stagiaires, doctorants et post-doctorants rencontrés au cours de ces années, je dis un grand merci pour ces longues heures de discussion sur nos projets et ces moments de fous rires. Je remercie ainsi l'ensemble des équipes de TUT, PHYGE et ChemBioPro pour leur accueil pendant ces années de doctorat.

Enfin mes derniers remerciements vont vers ma famille. A ma mère, mon père et ma sœur qui m'ont épaulé pendant toute la durée de mes études. Pour leurs mots réconfortants et d'encouragement lorsque le doute s'installait. Pour leur amour et leur soutien au quotidien. Merci d'être là, tout simplement.

« Qui maîtrisait les odeurs, maîtrisait le cœur des Hommes. »

Patrick Süskind

AVANT PROPOS

J'ai mené cette thèse à l'Université de La Réunion (Ecole Doctorale Sciences, Technologies et Santé - ED STS) au laboratoire de Chimie et de Biotechnologie des Produits Naturels (ChemBioPro, anciennement Laboratoire de Chimie des Subtances Naturelles et des Sciences des Aliments, LCSNSA). J'ai reçu le soutien financier de l'Université de La Réunion sous la forme d'un contrat doctoral suite à une audition avec les membres de l'ED STS. Pour la dernière année de thèse, j'ai bénéficié d'un contrat d'Attachée Temporaire à l'Enseignement et à la Recherche (ATER) dans le cadre de mes activités d'enseignement au sein du département Hygiène, Sécurité, Environnement (HSE) de l'Institut Universitaire de Technologie (IUT) de La Réunion (Terre Sainte, La Réunion).

Les recherches faisant l'objet de ce manuscrit sont le fruit de travaux réalisés au sein de plusieurs entités et laboratoires de recherche universitaires dont :

- Le Laboratoire de Chimie et Biotechnologie des Produits Naturels (CHEMBIOPRO, ex- LCSNSA) de la Faculté des Sciences et Technologies (FST) de l'Université de La Réunion, qui est mon laboratoire d'accueil principal,
- L'Institut de Biotechnologies de Toulouse (*Toulouse Biotechnology Institute*, TBI), anciennement Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP) de l'Institut National des Sciences Appliquées (INSA) de Toulouse (France),
- Le Département Biotechnologie de la Faculté des Sciences de la *Tshwane University of Technology* (TUT) de Prétoria (Afrique du Sud), où j'ai réalisé une mission de 3 mois en recherche sur le criblage de la biodiversité microbienne notamment.

Mes activités de recherche en lien direct ou non de la thèse, ont donné lieu à 1

publication scientifique (P) publiée dans une revue internationale à comité de lecture, 1 publication scientifique (P) publiée dans une revue nationale à comité de lecture, 6 affiches (A) présentées à l'occasion de congrès internationaux et 1 action de vulgarisation (V). Nous prévoyons également de soumettre 3 autres publications, dont 1 soumise (Food Chemistry) et 2 en cours de rédaction qui seront soumises prochainement.

- **Publications :**

  - **M. Tan**, Y. Caro, T. Regnier et T. Petit (2018). Transformation d'une viande bovine selon un procédé de type Biltong. Etude physico-chimique, microbiologique et sensorielle de la transformation d'une viande bovine selon un procédé de type Biltong, un produit traditionnel Sud-African. (article publié dans *Viandes & Produits Carnés* ; VPC-2018-34-1-7 - www.viandesetproduitscarnes.fr)

  - G. Chuppa-Tostain, **M. Tan**, L. Adelard, A. Shum-Cheong-Sing, J.M. François, Y. Caro and T. Petit (2020). Evaluation of filamenteous fungi and yeasts for the biodegradation of sugarcane distillery wastewater. *Microorganisms*, 8(10), 1588 (https://doi.org/10.3390/microorganisms8101588)

  - **M. Tan,** Y. Caro, A. Shum-Cheong-Sing, L. Robert, J.M. François and T. Petit. Evaluation of mixed-fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* with *Saprochaeete suaveolens* to produce natural fruity beer from industrial wort (*Article soumis pour publication dans* ***Food Chemistry***).

- **Présentations d'affiches à l'occasion de congrès internationaux :**

  - A. Chen Yen Su, E. Bousquet, **M. Tan**, S. Assemat, F. Davrieux, F. Descroix, S. Staub, S. James, E. Vienne, J.C. Meile, T. Petit, and A. Shum Cheong Sing. Contribution des microorganismes à la qualité organoleptique du cacao malgache. Décembre 2016, Journées QUALIREG, IUT de Saint-Pierre, La Réunion, France.

  - **M. Tan**, P. Le Montagner, A. Shum Cheong Sing, Y. Caro, J.M. Francois and T. Petit. Producing natural fruity beers: study of the performance of *Saccharomyces cerevisiae* and *Geotrichum fragrans* in co-culture during beer fermentation. May 2018, VIII International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld2018), Torremolinos, Málaga (Espagne).

  - **M.Tan**, A. Shum Cheong Sing, Y. Caro, J.M. Francois and T. Petit. Evaluation of simultaneous fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* and *Geotrichum fragrans* to produce natural fruity beer. November 2018, 32nd EFFoST Internation Conference, Nantes, France.

  - **M. Tan,** Y. Caro, T. Regnier and T. Petit. Physicochemical, microbological and sensorial studies of meat transformation using Biltong-like process. November 2018, 32nd EFFoST Internation Conference, Nantes, France.

  - **M. Tan**, E. Grondin, A. Shum Cheon Sing, Y. Caro, M. Raherimandimby, T. Regnier, J.M François and T. Petit. Screening for yeast biodiversity from Reunion Island, Madagascar, and South-Africa. Selection for yeast strain with atypical aroma production and application to antural fruity beer production. July 2019, Island Biology, La Reunion, France *(Poster primé).*

- **M. Tan**, Y. Caro, E. Grondin, A. Shum Cheong Sing, T. Regnier, J.M. Francois and T. Petit. Evaluation of a wild *Geotrichum fragrans* strain to enhance natural fruity aromas during beer fermentation. September 2019, SAAFoST Congress, Johannesburg, Afrique du Sud.

- **Autres activités de communications :**

  - **1er Prix du Jury** au concours « Ma thèse en 180s » Mars 2018, Réunion, France https://www.youtube.com/watch?v=8osrkC6OtV8 ; https://www.youtube.com/watch?v=DnTtcbNBs50

  - Participation à la demi-finale nationale du concours « Ma thèse en 180s », Avril 2018, Paris, France.

  - « La Qualité pour le développement en Océan Indien » (QualiREG) https://www.qualireg.org/informations/portraits-d-acteurs/melissa-tan

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS 2

AVANT PROPOS 6

SOMMAIRE 10

LISTE DES ABREVIATIONS 15

LISTE DES TABLEAUX 18

LISTE DES FIGURES 20

LISTE DES DONNEES SUPPLEMENTAIRES 23

INTRODUCTION GENERALE 24

CHAPITRE I 31

Etude bibliographique 33

I. La production d'arôme par les levures 33

1. Les arômes 33

2. Le métabolisme des levures pour la production d'arôme 39

3. Les levures non-*Saccharomyces* en production d'arôme 48

II. Amélioration des souches levurienne par mutagenèse 65

1. Les mutations génétiques 65

2. Les techniques de mutagenèse aléatoire 70

III. La bière, une boisson produite par les levures 81

1. Généralités 81

2. La fermentation, une étape-clé dans la production de la bière 85

3. Rôle des levures dans l'aromatisation de la bière 88

IV. Références bibliographiques 110

CHAPITRE II 118

Criblage de la biodiversité levurienne des fèces d'animaux sauvages d'Afrique du Sud pour la production d'esters α-insaturés volatils 120

Screening for yeast biodiversity from wild animal faeces of South-Africa for production of volatile α-unsaturated esters 123

I. Introduction 126

II. Materials and Methods 129

1. Biological materials 129

2. Isolation and selection of the yeast strains 129

3. Qualitative analysis of volatile organic compound (VOCs) 130

4. Statistical analysis 131

III. Results and discussion 131

1. Strain distribution 131

2. Selection of strains with high VOCs production capacities 135

3. Multivariate analysis of isolates based on their origins and their volatile organic compounds production. 141

IV. Conclusions 146

V. Supplementary data 147

VI. Acknowlegments 151

VII. References 151

CHAPITRE III 154

Sélection par mutagenèse UV et caractérisation physiologiques de souches mutantes

de la levure *Saprochaete suaveolens* (anciennement *Geotrichum fragrans*) hyperproductrices de composés organiques volatils. 156

Selection by UV mutagenesis and physiological characterization of mutant strains of the yeast *Saprochaete suaveolens* (former *Geotrichum fragrans*) with higher capacity to produce flavour compounds 158

I. Introduction 161

II. Materials and method 164

1. Yeast strains and UV mutagenesis performance 164

2. Mutant screening 164

3. Volatile organic compound (VOCs) analysis 165

4. Preparation of crude extracts and assays of enzymatic activities 165

5. Statistical analysis 168

III. Results and discussion 168

1. Condition of UV mutagenesis. 168

2. Screening strategy 169

3. Volatile organic compounds analysis of *S. suaveolens* and its 9 ILV$^-$ mutants 169

4. Reduced activities in the catabolic degradation of amino acids by β-oxidation pathway may account for higher VOCs production in M10 176

IV. Conclusions 179

V. Supplementary data 180

VI. References 182

CHAPITRE IV 184

Evaluation de l'utilisation d'une fermentation mixte de *Saccharomyces cerevisiae* et de *Saprochaete suaveolens* sur un moût industriel pour produire une bière naturellement fruitée. 186

Evaluation of mixed-fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* with *Saprochaete suaveolens* to produce natural fruity beer from industrial wort. 188

I. Introduction 191

II. Materials and Methods 193

1. Yeast strains and preparation of the starter 193

2. Beer fermentation set-up 194

3. Total Cell enumeration and determination of ratio between the two yeast species along the brewing process. 195

4. Physicochemical parameters and non-volatile compounds 195

5. Volatile compounds analysis 196

6. Stastistical analysis 196

III. Results 197

1. Determination of optimal starter of culture under laboratory process condition 197

2. Mixed-fermentation under industrial process condition 199

3. Contribution of *S. suaveolens* in the constitution of a new fruity aroma bouquet in beers after mixed fermentation using industrial wort 207

IV. Discussion 213

V. Conclusions 215

VI. Supplementary data 217

VII. Acknowlegments 220

VIII. References 220

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES 224

MATERIELS ET METHODES 230

I. Matériels biologiques 231

1. Souches de levures 231

2. Fèces d'animaux sauvages 231

3. Souches mutantes de *S. suaveolens* 231

4. Moût de brassage et fabrication des bières 232

II. Isolement et sélection des souches d'intérêts 233

1. Isolement des souches des fécès d'animaux sauvages 233

2. Sélection des souches capables et incapables de se développer sur des milieux contenant uniquement des acides aminés branchés comme source de carbones (ILV^+ et ILV^-) 234

III. Analyses chimiques, physico-chimiques et biochimiques 235

1. Analyses des composés organiques volatiles 235

2. Préparation des extraits bruts et mesure des activités enzymatiques de la souche sauvage *S. suaveolens* et du mutant M10. 236

3. Dénombrement des cellules et détermination des ratios entre les deux espèces de levure au cours de la fermentation des bières 239

4. Détermination des paramètres physicochimiques et des composés non-volatils pendant le procédé de fermentation des bières 239

IV. Analyses statistiques 240

V. Références bibliographiques 240

LISTE DES ABREVIATIONS

0-GEC-D14 beer	Beer obtained by 14 days of simple-fermentation with *Saccharmyces cerevisiae*
0-GEC-D7 beer	Beer obtained by 7 days of simple-fermentation with *Saccharmyces cerevisiae*
100-GEC-D14beer	Beer obtained by 14 days of simple-fermentation with *Saprochaete suaveolens*
100-GEC-D7 beer	Beer obtained by 7 days of simple-fermentation with *Saprochaete suaveolens*
30-GEC-D14 beer	Beer obtained by 14 days of mixed-fermentation with 30% (cell/cell) of *Saprochaete suaveolens* and 70% (cell/cell) of *Saccharomyces cerevisiae* (cell/cell).
30-GEC-D7 beer	Beer obtained by 7 days of mixed-fermentation with 30% (cell/cell) of *Saprochaete suaveolens* and 70% (cell/cell) of *Saccharomyces cerevisiae* (cell/cell).
64PPs	Pyrimidine 6-4 pyrimidone
8-OH-dGTP	8-hydroxydeoxyguanosine-triphosphate
8OH-G	8-hydroxyguanine
90-GEC-D14 beer	Beer obtained by 14 days of mixed-fermentation with 90% (cell/cell) of *Saprochaete suaveolens* and 10% (cell/cell) of *Saccharomyces cerevisiae* (cell/cell).
90-GEC-D7 beer	Beer obtained by 7 days of mixed-fermentation with 90% (cell/cell) of *Saprochaete suaveolens* and 10% (cell/cell) of *Saccharomyces cerevisiae* (cell/cell).
AAT	Alcohol acetyltransferase
ABV	Alcohol by volume
ACP	Analyse en composante principale
ACyD	Acyl-CoA deshydrogenase
ACyDH	Acyl-CoA deshydrogenase
ACyO	Acyl-CoA oxidase
ACyS	Acyl-CoA synthetase
ADH	Alcohol deshydrogenase
ADN	Acide desoxyribonucléique
AFNOR	Association française de normalisation
ALDH	Aldehyde deshydrogenase
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyle phosphate
BCKAD	Branched-chain α-ketoacid deshydrogenase
BER	Base excision repair

BHACyDH	β-acyl-CoA deshydroganase
BKACyT	β-keto-acyl-CoA thiolase
BOP	β-oxidation pathway
CACGR	Compound annual growth rate
CAH	Classification ascendante hierarchique
CG	Chromatographie gazeuse
CHEMBIOPRO	Chimie et Biotechnologie des Produits Naturels
CJUE	Cours de Justice de l'Union Européenne
CLHP	Chromatographie liquid haute performance
CoA	Coenzyme A
COV	Composé organique volatil
CTZ	Chlotrimazole
DC	Decarboxylase
DNA	Desoxyribonucleic acid
ECH	Enoyl-CoA hydratase
ED STS	Ecole doctorale « Sciences, Technologies et Santé »
EEAG	Ester éthylique d'acide gras
EMS	Ethyl methane sulfonate
EP	Ehrlich pathway
ERO	Espèce réactive de l'oxygène
FDA	Food and Drug administration
GC/MS	Gas chromatography / mass spectrum
GMO	Genetically modified organism
GRAS	Generally recognized as safe
HCA	Hierarchical cluster analysis
HPLC	High performance liquid chromatography
HR	Homologous recombitional repair
HS/SPME	Headspace / Solid-phase micro-extraction
ILV	Isoleucine, Leucine, Valine
ILV^-	unable to develop on media containing only isoleucine, leucine and valine as source of carbon
ILV^+	Able to develop on media containing only isoleucine, leucine and valine as source of carbon
IUT	Institut Universitaire et Technologique
MCFA	Medium-chain fatty acid
MMR	Mismatch repair
MPYG	Malt-Peptone-Yeast extract-Glucose
NCY	Non-conventional yeasy
NER	Nucleotide excision repair
NHEJ	Non-homologous end-joining
OGM	Organisme génétiquement modifié
PC	Principal component

PCA	Principal component analysis
PD	Dimère pyrimidique de cyclobutane
PHYGE	Physiology and Functional Genomics of Eucaryotes
PPTA	Plasma à pression et température atmosphérique
SD	Standard deviation
TA	Transaminase
TBI	Toulouse Biotechnology Institute
TSS	Total soluble solids
TUT	Tshwane University of Technology
UV	Ultraviolet
VOC	Volatile organic compound
W.T	Wild type
YNB	Yeast-Nitrogen base
YNB-Glu	Yeast-Nitrogen base supplemented with 2 $g.L^{-1}$ of glucose
YNB-Glu-Ile	Yeast-Nitrogen base supplemented with 2 $g.L^{-1}$ of glucose and 1g/L of isoleucine
YNB-Ile	Yeast-Nitrogen base supplemented with 1 $g.L^{-1}$ of isoleucine
YNB-Leu	Yeast-Nitrogen base supplemented with 1 $g.L^{-1}$ of leucine
YNB-Val	Yeast-Nitrogen base supplemented with 1 $g.L^{-1}$ of valine
YPD	Yeast-Peptone-Dextrose
YPD-chloramphenicol	Yeast-Peptone-Dextrose supplemented with 0.1 $g.L^{-1}$ of chloramphenicol

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Avantages et inconvénients majeurs des principales voies de production d'arôme 35

Tableau II. Intermédiaires métaboliques et principaux esters de la voie d'Erlich 44

Tableau III. Levures non- *Saccharomyces* et composés organiques volatils produits (COVs) lors de la croissance sur milieu de culture synthétique..... 50

Tableau IV. Systèmes de réparation majeurs de l'ADN 66

Tableau V. Agents chimiques et physiques communément utilisés en mutagenèse aléatoire et altérations génétiques majeures associées..... 71

Tableau VI: Quelques exemples récents d'optimisation de souches de levures par mutagenèse UV 79

Tableau VII. Nombre et croissance des microbasseries en Europe entre 2009 et 2018 (adapté de The brewers of Europe, 2019, 2015) 81

Tableau VIII. Composés organiques volatils retrouvés dans les bières et levures impliquées pendant la fermentation 90

Tableau VIII. Composés organiques volatils retrouvés dans les bières et levures impliquées pendant la fermentation 91

Tableau IX. Levures non-*Saccharomyces* étudiées en production de bière aromatisée 107

Tableau X. Sites de collectes des différents fécès d'animaux sauvages..... 231

Table 1. Collection sites of South African wild animal faeces 129

Table 2. Volatile organic compounds produced by the isolated strain during growth on Yeast Peptone Dextrose agar media 137

Table 3. Pearson (n) correlation matrix obtained for principal component analysis. 143

Table 4. Correlation between the parameters and the principal component obtained during the principal component analysis. 146
Table 5. Activities (nmol/min/mg protein) of some enzymes involved in the Ehrlich pathway, the unsaturated compounds from the β-oxidation pathway and the fatty-acids β-oxidation pathway in wild type of *S. suaveolens* and mutant M10. 178
Table 6 : Main characteristics of initial wort and beers obtained after 6 days of fermentation with different ratios of *S. suaveolens* and *S. cerevisiae.* 198
Table 7 : Concentration ($mg.L^{-1}$) of the type of major volatile compounds (GC-MS) identified in wort and beers obtained after 7 days of mono-culture and mixed-fermentation of wort with *S. cerevisiae* and *S. suaveolens.* 211

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Méthodes biotechnologiques de production d'arômes (adaptée de Bhari et Singh, 2019) 36

Figure 2. Types de composés d'arômes majoritairement produits par les levures (adaptée de Carlquist *et al.,* 2015)..... 40

Figure 3. Schéma de la voie métabolique d'Ehrlich et des gènes codants pour les enzymes impliquées chez la levure conventionnelle *S. cerevisiae* (adapté de Hazelwood *et al.,* 2008). 42

Figure 4. Schéma de la voie métabolique et des gènes codant pour les enzymes de la voie de β-oxydation. 47

Figure 5. Nombre de souches levuriennes produisant des acides, des alcools, des carbonyles, des esters, des esters α-insaturés et des terpènes parmi les 82 souches de levures investiguées dans la littérature. 58

Figure 6. Nombre de levures non-conventionelles (triées par genre) issues de la litérature produisant des esters α-insaturés. 60

Figure 7. Observations macroscopique(A) et microscopique (B) (Grossissement *400) de la levure *Saprochaete suaveolens* cultivée sur milieu synthétique (tiré de Grondin, 2014) 61

Figure 8. Métabolisme de l'isoleucine en divers esters chez la levure *S. suaveolens* (Adapté de Grondin *et al.,* 2015b)..... 64

Figure 9. Exemple de suivi de pourcentage de survivant en fonction (a) du temps d'irradiation aux UVs et (b) du temps d'exposition à l'EMS d'une souche diploïde (▪) et d'une souche haploïde (◊) (adapté de Hashimoto *et al.,* 2005). 73

Figure 10. Formation des dimères de pyrimidines après ouvertures de doubles brins 5-6 des pyrimidines sous l'effet d'irradiation UVB ou UVC (adapté de Oak *et al.,*

2018)..... 77
Figure 11. Représentation schématique du procédé général de production de bière (adapté de Kao, 2018)..... 83
Figure 12. Bières de style *Brettanomyces* retrouvées actuellement sur le marché mondial (tiré de Serra Colomer *et al.,* 2019)..... 109
Figure 13. Distribution of the 119 isolated strains among the family of wild animals investigated 133
Figure 14. Percentage of samples displaying microorganisms according to the habitat of the animal..... 134
Figure 15. Growth test of 6 different strains from South African animal's faeces on YNB-Glu, YNB-Ile, YNB-Leu and YNB-Val agar media. 136
Figure 16. Score plot of PC2 versus PC1 according to strains flavor production and their origins. Component analysis was performed using XL Stat Applied Sensory software (2020.1.3)..... 142
Figure 17. Cluster analysis of the isolated strains which produced VOCs..... 143
Figure 18. Cattell's scree diagram (A) based on the eigenvalues and the cumulative variability obtained for principal component analysis (B)..... 145
Figure 19. Simplified scheme of branched-chain amino acids catabolism in wild type of *S. suaveolens*..... 163
Figure 20. *S. suaveolens* survival after UV exposure, according to the number of colony forming units (CFU) observed in each time period of exposition..... 169
Figure 21. Heatmap visualization based on ratio of production of each volatile organic compound (VOC) between UV generated mutants (M2 to M10) and wild type of *S. suaveolens* (W.T.)..... 173
Figure 22. Score plot PC2 versus PC1 for wild type of *S. suaveolens* (WT) and its UV generated mutants M2 to M10 flavours analyzed by HS-SPME-GC/MS..... 175
Figure 23. Cluster analysis of the wild type of *S. suaveolens* (WT) and its UV generated mutants M2 to M10..... 176

Figure 24. Cell growth of *S. suaveolens* and *S. cerevisiae* during wort mixed fermentation (a) 30-GEC (with starter of culture containing 70% of *S. cerevisiae* and 30% of *S. suaveolens* cell/cell) and (b) 90-GEC (with starter of culture containing 10% of *S. cerevisiae* and 90% of *S. suaveolens* cell/cell)..... 200

Figure 25. Kinetics of (a) total yeast content, (b) total soluble solids content, (c) pH and (d) ethanol content during fermentation..... 202

Figure 26. Kinetics of consumption of carbohydrates (in g/L) contained in the wort (a : glucose ; b : fructose; c : sucrose and d : maltose) during fermentation..... 205

Figure 27. : Changes in major organic acids contained in the wort (a: pyruvic acid mg/L; b: α-ketoglutaric acid mg/L; c : acetic acid g/L and d malic acid content g/L) during fermentation..... 207

Figure 28. Score plot of F2 versus F1 for the main organic volatile compounds detected in initial and fermented wort analyzed after 7 days (D7) and 14 days (D14) of fermentation. 0-GEC (single-fermentation with *S. cerevisiae*), 30-GEC (mixed-fermentation inoculated with 70% of *S. cerevisiae* and 30% of *S. suaveolens*, 90-GEC (mixed-fermentation inoculated with 10% of *S. cerevisiae* and 90% of *S. suaveolens*) and 100-GEC (single-fermentation inoculated with *S. suaveolens* alone)..... 209

LISTE DES DONNEES SUPPLEMENTAIRES

Supplementary data A. Number of different strain from diverse South-African animal's faeces isolated on YPD-chloramphenical media 147

Supplementary data B. Classification of the VOCs produced by each isolated strain 150

Supplementary data C. Main volatile organic compounds (mg.L^{-1}) produced by wild type and 9 ILV^{-} mutants strains of *S. suaveolens* after 48h of growth at 30°C on YNB-Glu-Ile agar medium. Main VOCs were classified according to their hypothetical metabolic pathway of production 180

Supplementary data D. Concentration (mg.L^{-1}) of the major volatile compounds (GC-MS) identified in wort and beers obtained after 7 days of mono-culture and mixed-fermentation of wort with *S. cerevisiae* and *S. suaveolens* 217

INTRODUCTION GENERALE

L'arôme des aliments est défini par un ensemble complexe de composés organiques volatils (COVs) se développant naturellement pendant le procédé de production des denrées alimentaires ou introduits de façon volontaire par le producteur. Aujourd'hui, les arômes formulés à partir de molécules de synthèse, représentent encore 80% du marché mondial des arômes mais, du fait de l'augmentation de l'intérêt des consommateurs pour les produits portant le label « naturel », les industries et les recherches scientifiques se tournent progressivement vers l'utilisation de composés d'arômes obtenus par voie naturelle. Les voies de production par extraction à partir de plante ont donc d'abord largement été étudiées. Cependant, elles entraînent de faibles rendements associés à des hauts coûts de production et un besoin élevé en matières premières, aboutissant à des composés d'arômes coûteux. De plus, elles sont soumises aux contraintes de saisonnalité et posent des problèmes environnementaux. Pour y trouver une alternative, les recherches se sont donc orientées vers les voies biotechnologiques de production d'arômes, incluant l'utilisation de culture cellulaire *in vitro* de plantes, de méthodes enzymatiques et d'organismes microbiens tels que les bactéries, les champignons et les levures. D'ailleurs, la production et la diversification des composés d'arômes naturels par les **levures non-*Saccharomyces*** (ou encore appelées **levures non-conventionnelles**) sont aujourd'hui décrites comme une option particulièrement intéressante du fait des métabolismes variés des levures. De plus, nombres d'entre elles sont reconnues comme GRAS (*Generally Recognized as Safe*) et par conséquent utilisables en agro-alimentaire. Cette diversité de métabolisme offre donc la possibilité de produire un large panel de COVs et a entraîné une intensification des recherches de nouvelles souches de levures productrices d'arômes.

Dans ce contexte, notre laboratoire s'intéresse depuis une dizaine d'années aux levures productrices de COVs. Ainsi, en partenariat avec l'Institut de Biotechnologies de Toulouse (*Toulouse Biotechnology Institute,* TBI) et dans le cadre du projet COST

BIOFLAVOUR FA0907, une première thèse portant sur l'exploration du potentiel biotechnologique des levures endémiques et indigènes de la Réunion et de Madagascar à produire des molécules d'arômes a été réalisée (Grondin, 2014) et a conduit à la publication de plusieurs articles sur le sujet (Grondin *et al.*, 2015a ; Grondin *et al.*, 2015b ; Grondin *et al.*, 2017). Ce premier travail a mis en exergue l'existence d'un certain nombre de levures productrices d'arômes sur les fruits de Madagascar et de l'île de la Réunion. De plus il a montré que la levure *Saprochaete suaveolens* est particulièrement intéressante pour sa production en arôme à partir des acides aminés. Cette souche produit notamment de nombreux esters dont des esters α-insaturés très appréciés en aromatisation mais rarement retrouvés dans le bouquet aromatique des levures à partir d'acides aminés branchés (ILV : isoleucine, leucine, valine). Enfin, au cours de ces travaux, l'étude du métabolisme aromatique de *S. suaveolens*, a montré que la production de ces esters α-insaturés dérive du catabolisme des acides aminés branchés *via* la voie de la β-oxydation, voie qui permet également à *S. suaveolens* de se développer sur des milieux ne comportant que des acides aminés branchés comme seule source de carbone (phénotype ILV^+). En accord avec les résultats d'autres équipes de recherche (İşcan *et al.*, 2015; de Oliveira *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2016; Damasceno *et al.*, 2003), les travaux de cette première thèse ont donc montré les qualités exceptionnelles de la levure *S. suaveolens* pour la production de composés d'arômes. Dans la continuité de ces travaux, nous nous sommes donc proposés au cours du présent travail de thèse, de caractériser et de valoriser la production d'arômes par la levure *S. suaveolens* selon trois axes.

Le premier axe consiste au criblage de la biodiversité levurienne de nouvelles souches productrices d'esters α-insaturés. Pour élargir les zones d'investigations déjà exploitées par notre laboratoire (Madagascar, Réunion), nous avons choisi de mener ce criblage en Afrique du Sud. De plus, comme les fèces d'animaux regorgent de souches de levures présentant des potentiels biotechnologiques intéressants (Ganesh

Kumar *et al.,* 2010; Lorliam *et al.,* 2013; Lowe *et al.,* 1987), nous nous sommes demandé si les fèces d'animaux sauvages sud-africains pouvaient contenir des souches productrices d'esters α-insaturés. Pour affiner ce criblage, en se basant sur la voie de production d'esters α-insaturés chez *S. suaveolens*, nous avons émis l'hypothèse que le phénotype ILV^+ pouvait être directement lié à une production d'esters α-insaturés. Nous avons ainsi, en partenariat avec le département de biotechnologie et de technologies alimentaires de l'Université de technologie de Tshwane (*Tshwane University of Technology,* TUT, Pretoria), isolé des souches de levures à partir d'excréments d'animaux sauvages et testé leur croissance sur des milieux ne comportant que des acides aminés branchés comme seule source de carbone. Enfin, la fraction volatile des souches ILV^+ a été analysée en chromatographie gazeuse pour vérifier la présence d'esters α-insaturés et évaluer la capacité d'aromatisation de ces souches par rapport à notre souche modèle de *S. suaveolens*.

Le second axe consiste en l'optimisation de la production d'arôme de la souche *S. suaveolens* par une méthode de mutagenèse aléatoire à l'aide d'UV. La mutagenèse UV, contrairement aux méthodes de mutagenèse dirigée, permet de produire des organismes génétiquement modifiés (OGMs) qui ne sont pas soumis aux réglementations strictes liées aux OGMs. Les mutants ainsi obtenus sont donc plus facilement utilisables en industrie agroalimentaire. De plus, l'efficacité de la mutagenèse UV pour améliorer les capacités biotechnologiques chez des levures conventionnelles (du genre *Saccharomyces spp.*) et non-conventionnelles (non-*Saccharomyces*) a largement été démontrée dans la littérature (Yamada *et al.,* 2017; Bessadok *et al.,* 2019; Kilbey et James, 1977; Resnick, 1969). Néanmoins, à notre connaissance, une optimisation de la production d'arômes n'a encore jamais été réalisée essentiellement à cause de l'absence de méthode de criblage à haut débit des clones potentiellement mutés parmi les dizaines de milliers obtenus après mutagenèse aléatoire. Au cours du présent projet de thèse, en nous basant sur le fait

que *S. suaveolens* utilisait une partie des acides aminés branchés pour son développement au lieu de les métaboliser entièrement dans les voies de production d'arômes, nous avons émis l'hypothèse que la perte du caractère ILV$^+$ pouvait conduire à une augmentation globale de la production d'arômes. Nous avons donc d'abord mis en place une méthode de mutagenèse UV adaptée à la souche de *S. suaveolens,* puis une méthode de criblage rapide des clones ayant perdu la capacité à se développer sur des milieux ne comportant que des acides aminés branchés comme seule source de carbone (ILV$^-$). Ensuite, les bouquets aromatiques des souches ILV$^-$ retenues ont été analysés en chromatographie gazeuse et comparés à celui de la souche mère de *S. suaveolens*. Les activités des enzymes majeurs impliqués dans les voies de métabolisation des acides aminés branchés ont ensuite été mesurées pour un mutant présentant une surproduction d'arômes comparée à la souche mère afin de mieux comprendre l'origine de cette surproduction.

Enfin, le dernier axe de la thèse vise à une valorisation de la production d'arômes de *S. suaveolens* en procédé biotechnologique agro-alimentaire. Considérant d'une part l'intérêt grandissant de l'utilisation des levures non-*Saccharomyces* productrices d'arômes en procédé brassicole (Budroni *et al.*, 2017; Gamero *et al.*,2013; Capece *et al.,* 2018; Steensels et Verstrepen, 2014) pour favoriser la diversification des bières sur le marché, et d'autre part la production exceptionnelle de différents composés d'arômes par la souche de *S. suaveolens,* nous nous sommes proposés d'évaluer la capacité de *S. suaveolens* à aromatiser naturellement des bières par fermentation simple ou mixte (avec *S. suaveolens*) d'un moût de brassage industriel. Ainsi, nous avons dans un premier temps déterminé les proportions adaptées de *S. suaveolens* et de *S. cerevisiae* à introduire dans un starter de culture pour bénéficier à la fois des propriétés aromatiques de *S. suaveolens* et des propriétés fermentaires de *S. cerevisiae.* Dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux variations des propriétés chimiques et physico-chimiques du moût au cours de sa fermentation simple ou mixte et aux comportements des deux souches lors des fermentations

mixtes. Enfin, les bouquets aromatiques des bières obtenues ont été investigués par chromatographie gazeuse afin de comparer les arômes de la bière standard (c'est-à-dire obtenue par fermentation-simple avec *S. cerevisiae*) à celles des bières originales obtenues par introduction de *S. suaveolens* dans le procédé de fermentation.

Ce travail de thèse s'articule donc autour de quatre questions majeures. Quelle est la place des levures non-*Saccharomyces* dans les procédés actuels de production d'arômes, et plus particulièrement, en quoi *S. suaveolens* constitue-t-elle un modèle de souche intéressante ? Les connaissances sur le métabolisme de *S. suaveolens* peuvent-elles permettre de sélectionner des nouvelles souches productrices d'esters α-insaturés dans des habitats naturels ? La production d'arômes par *S. suaveolens* peut-elle être améliorée par perte de la capacité de croissance sur milieu ne comportant que des acides aminés branchés comme source de carbone ? Enfin, la levure *S. suaveolens* est-elle applicable en industrie brassicole pour la production de bières aux notes aromatiques accrues par rapport à une bière standard ?

Pour répondre à ces questions, le présent manuscrit de thèse a été organisé en quatre chapitres. Le **premier chapitre** fait état du travail de recherche bibliographique et vise à situer *S. suaveolens* dans le contexte général de production d'arômes par les levures et à mieux comprendre le choix de cette levure comme modèle d'étude dans notre travail. Le **second chapitre** présente les résultats de criblage de la biodiversité levurienne des fèces d'animaux sauvages d'Afrique du Sud pour la production d'esters α-insaturés volatils alors que le **troisième chapitre** s'applique à restituer le travail de sélection par mutagenèse UV et de caractérisation physiologique de souches mutantes de la levure *S. suaveolens* hyperproductrices de composés organiques volatils. Enfin, le **quatrième et dernier chapitre** présente les résultats de l'évaluation de l'utilisation d'une fermentation mixte de *S. cerevisiae* et de *S. suaveolens* sur un moût industriel pour produire une bière naturellement fruitée.

Références bibliographiques

Bessadok B., Santulli A., Brück T., and Sadok S. 2019. "Species disparity response to mutagenesis of marine yeasts for the potential production of biodiesel." *Biotechnology for Biofuels* 12 (1): 129.

Budroni M., Zara G., Ciani M. and Comitini F. 2017. "*Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* starter yeasts." In *Brewing Technology*, edited by Makoto Kanauchi. InTech.

Capece A., Romaniello R., Siesto G. and Romano P. 2018. "Conventional and non-conventional yeasts in beer production." *Fermentation* 4 (2): 38.

Damasceno S., Cereda M.P., Pastore G.M. and Oliveira J.G. 2003. "Production of volatile compounds by *Geotrichum fragrans* using cassava wastewater as substrate." *Process Biochemistry* 39 (4): 411–414.

Gamero A., Katz M., Gojkovic Z. and de Jong C. 2013. "Yeast biodiversity as a tool for flavour improvement or diversification in beer." *Technology for business*

Ganesh K., Mongolla C.P., Joseph J., Nageswar Y.V.D. and Kamal A. 2010. "Antimicrobial activity from the extracts of fungal isolates of soil and dung samples from Kaziranga National Park, Assam, India." *Journal of Medical Mycology* 20 (4): 283–289.

Grondin E. 2014. "Exploration du potentiel biotechnologique des levures endémiques et indigènes de La Réunion et de Madagascar à produire des molécules d'arômes." Université de la Réunion.

Grondin E., Shum Cheong Sing A., Caro Y., Raherimandimby M., Randrianierenana A.L., James S., Nueno-Palop C., François J.M., and Petit T. 2015a. "A comparative study on the potential of epiphytic yeasts isolated from tropical fruits to produce flavoring compounds." *International Journal of Food Microbiology* 203: 101–108.

Grondin E., Shum Cheong Sing A., Caro Y., Billerbeck G.M., François J.M., and Petit T. 2015b. "Physiological and biochemical characteristics of the ethyl tiglate production pathway in the yeast *Saprochaete suaveolens.*" *Yeast* 32 (1): 57–66.

Grondin E., Shum Cheong Sing A., James S., Nueno-Palop C., François J.M., and Petit T. 2017. "Flavour production by *Saprochaete* and *Geotrichum* yeasts and their close relatives." *Food Chemistry* 237: 677–684.

İşcan G., Demirci B., Demirci B. and Başer K.H.C. 2015. "Headspace solid phase microextraction (HS-SPME) and analysis of *Geotrichum fragrans* volatiles." *Natural Volatiles & Essential Oils* 2 (2): 45–51.

Kilbey B.J. and James A.P. 1977. "The timing of UV mutagenesis in yeast : a pedigree analysis of induced recessive mutation," *Genetics* 87 : 237-248

Lorliam W., Akaracharanya A., Jindamorakot S., Suwannarangsee S., and Tanasupawat S. 2013. "Characterization of xylose-utilizing yeasts isolated from herbivore faeces in Thailand." *ScienceAsia* 39 (1): 26-35.

Lowe S.E., Theodorou M.K., and Trinci A.P.J. 1987. "Isolation of anaerobic fungi from saliva and faeces of sheep." *Microbiology* 133 (7): 1829–1834.

de Oliveira SM.M., Damasceno Gomes S., Sene L., Machado S.R., Coelho A.C.B., Cereda M.P., Christ D. and Piechontcoski J. 2013. "Production of 2-phenylethanol by *Geotrichum fragrans*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus* in cassava wastewater." *Journal of Food Agricultural Environment* 11 (2): 158–163.

Resnick M. 1969. "Induction of mutations in *Saccharomyces cerevisiae* by Ultraviolet light." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 7 (3): 315–332.

Steensels J. and Verstrepen K.J. 2014. "Taming wild yeast : potential of conventional and non-conventional yeasts in industrial fermentations." *Annual Review of Microbiology* 68: 61–80.

Yamada R., Yamauchi R., Kashihara T. and Ogino H. 2017. "Evaluation of lipid production from xylose and glucose/xylose mixed sugar in various oleaginous yeasts and improvement of lipid production by UV mutagenesis." *Biochemical Engineering Journal* 128: 76–82.

Zhu J., Shi JL., Lu Y., Liu LP., and Liu YL. 2016. "Application of strains of *Geotrichum* spp. to decrease higher alcohols and to increase esters." *Journal of the Institute of Brewing* 122 (1): 147–155..

CHAPITRE I

La production de composés d'arômes d'origine naturelle valorisables en agro-alimentaire par l'utilisation de levures non-Saccharomyces est considérée comme une bonne alternative à l'extraction des plantes. L'utilisation de ces souches aromatisantes est particulièrement appréciée dans l'élaboration de boissons fermentées telles que le vin, le kefir ou la bière. Parmi les levures non-Saccharomyces productrices d'arômes, Saprochaete suaveolens a été décrite comme une souche particulièrement prometteuse. Ce chapitre de revue bibliographique, organisé en trois parties, vise à replacer les connaissances actuelles concernant l'exploitation des levures non-Saccharomyces pour leur production d'arômes en s'intéressant tout particulièrement à la levure S. suaveolens.

La première partie s'intéresse à la production d'arômes par les levures non-Saccharomyces en développant plus particulièrement les voies métaboliques impliquées dans cette production, notamment chez la levure S. suaveolens. La seconde partie s'interesse aux techniques de mutagenèse, notamment la mutagenèse UV, utilisée pour l'optimisation des capacités biotechnologiques des levures. Enfin, la troisième partie de ce chapitre présente un état de l'art de l'utilisation des levures non-Saccharomyces en production de bière dans l'optique d'une aromatisation naturelle pendant la fermentation.

Etude bibliographique

I. La production d'arômes par les levures

1. Les arômes

1.1. Rôle des arômes dans la perception de la flaveur des aliments

Depuis 1992, l'association française de normalisation (AFNOR) a défini la flaveur comme étant « l'ensemble complexe des sensations olfactives, gustatives et trigéminales perçues au cours de la dégustation » (AFNOR, 1992). La flaveur résulte ainsi de la perception combinée en bouche de la texture, de la saveur et de l'arôme de l'aliment.

En effet, lors de la mise en bouche d'un aliment, celui-ci entre en contact avec les récepteurs de la surface buccale et transmet des sensations comme l'astringence, la pétillance, l'impression algique, etc. qui lui sont propres. Au même moment, sous l'effet de la mastication, divers composés sont libérés en bouche. Les composés « non-volatils » (de masse moléculaire supérieure à 400 Da) sont entrainés par la salive vers la cavité orale pour y stimuler les récepteurs du goût et permettre de différencier les goûts basiques tels que le sucré, le salé, l'amer, l'acide, l'umami et leur combinaison. A contrario, les composés « volatils » (de masse moléculaire inférieure à 400 Da) sont transportés de la bouche vers les cavités nasales via le nasopharynx (voie rétro-nasale) pour y stimuler les récepteurs olfactifs qui permettent la distinction de l'arôme (floral, fruité, végétal, etc.) de l'aliment (Berger, 2009; Roy et Kumar, 2019).

La perception des arômes est souvent plus complexe que celle du goût car elle résulte généralement d'un mélange de plusieurs molécules volatiles appartenant à des classes variées (esters, lactones, alcools, composés carbonylés) dans des proportions définies. L'arôme permet donc une caractérisation plus marquée de la

flaveur des aliments que leur goût (Bogacz-Radomska *et al.,* 2008). De plus, en fonction de sa nature, l'arôme d'un aliment peut modifier la perception de son goût du fait de l'impact des stimulis olfactifs sur la perception du goût. Ces impacts sont souvent interprétés selon les termes « augmentation » ou « suppression » du goût. Par exemple, les arômes de fraise, caramel ou vanille, souvent associés à des goûts sucrés accroissent la perception de ce goût dans une denrée alimentaire, alors que l'arôme de chocolat communément associé à l'amertume la diminue. Au contraire les arômes tels que l'eucalyptol ou la cacahuète n'exercent aucune influence sur la sensation sucrée (Tournier *et al.,* 2007). Les composés d'arômes jouent donc un rôle primordial dans la perception, et par conséquent l'acceptation, d'un produit alimentaire par le consommateur. De ce fait, ils constituent un intérêt majeur en industrie agro-alimentaire.

1.2. La production des arômes

L'arôme d'un aliment résulte d'un mélange complexe de composés – les composés d'arômes – dont le changement quantitatif ou qualitatif peut changer la perception de l'arôme global du produit par le consommateur (Bogacz-Radomska *et al.,* 2008). Recréer l'arôme d'un aliment dans sa globalité peut ainsi s'avérer extrêmement complexe. Néanmoins, l'utilisation d'agents d'aromatisation constitue aujourd'hui un bon compromis pour reconstituer un arôme dans un produit alimentaire. Selon le Règlement (CE) N°1334/2008 du Parlement Européen et du Conseil du 16 décembre 2008, on peut distinguer six catégories d'agents d'aromatisation (les substances aromatisantes, les substances aromatisantes naturelles, les préparations aromatisantes, les arômes obtenus par traitement thermique, les arômes de fumé et les précurseurs d'arômes) qui peuvent être mélangés entre eux ou utilisés isolément dans la partie aromatisante du produit (Parlement européen et du Conseil, 2008). Ces agents d'aromatisation peuvent être obtenus par synthèse chimique, par extraction à partir de plante ou par voie

microbienne dont les avantages et inconvénients principaux sont présentés dans le Tableau I.

Les arômes obtenus par voie synthétique occupent aujourd'hui plus de 80% du marché des arômes en agroalimentaire puisqu'ils permettent un rendement de production élevé et aboutissent à des produits de moindre coût. Cependant, les méthodes de synthèse peuvent conduire à la production de mélanges racémiques parfois difficiles à séparer. Ces mélanges racémiques peuvent subir des altérations importantes lorsqu'elles intègrent les voies métaboliques et former des composés toxiques à l'origine de maladies chroniques comme des réactions allergiques, des diarrhées, des vomissements, certains types de cancers, etc (Roy et Kumar, 2019). Ceci a généré un désintérêt des consommateurs pour les produits alimentaires comportant des arômes de synthèse et a poussé les chercheurs à se tourner progressivement vers la production d'arômes par voie naturelle dont les effets sont plus positifs pour la santé humaine (anti-allergique, anti-oxydant, anti-diabétique, etc.) (Pessôa *et al.*, 2019; Roy et Kumar, 2019).

Tableau I. Avantages et inconvénients majeurs des principales voies de production d'arôme

Voie de production	Avantages	Inconvénients
Synthèse chimique	Bon rendements Prix bas Maîtrise du procédé Industrialisable	Production parfois non sélective (mélanges racémiques) Demande énergétique élevée Problèmes environnementaux Pas de label naturel
Extraction à partir de plantes issues de l'agriculture	Label naturel Large diversité de produits Procédés maîtrisés	Faibles rendements Prix élevés Contraintes de saisonnalité
Obtention par voie biotechnologique (incluant les micro-organismes)	Label naturel Production sélective Industrialisable Conditions réactionnelles douces	Faibles rendements Utilisation d'organisme génétiquement modifié (OGM) Difficultés liées aux cultures cellulaires

Les chercheurs se sont alors d'abord de nouveau interessés à l'extraction des arômes à partir de plantes, qui, historiquement, constitue la plus ancienne voie de

production d'arômes. Cependant, du fait des fortes contraintes de saisonnalité et des faibles rendements de production, les arômes produits par cette voie se sont avérés coûteux pour les industries agro-alimentaires. De plus, étant donné la grande quantité de matières premières nécessaires, la production d'arômes à partir de plantes a généré de forts impacts environnementaux (Bhari et Singh, 2019; Roy et Kumar, 2019; Sales *et al.,* 2018). C'est pourquoi, dans les années 90, la recherche s'est tournée vers la production d'arômes par les méthodes biotechnologiques incluant les cultures *in vitro* de cellules de plantes, les transformations enzymatiques ou encore les arômes produits par les microorganismes (Figure 1).

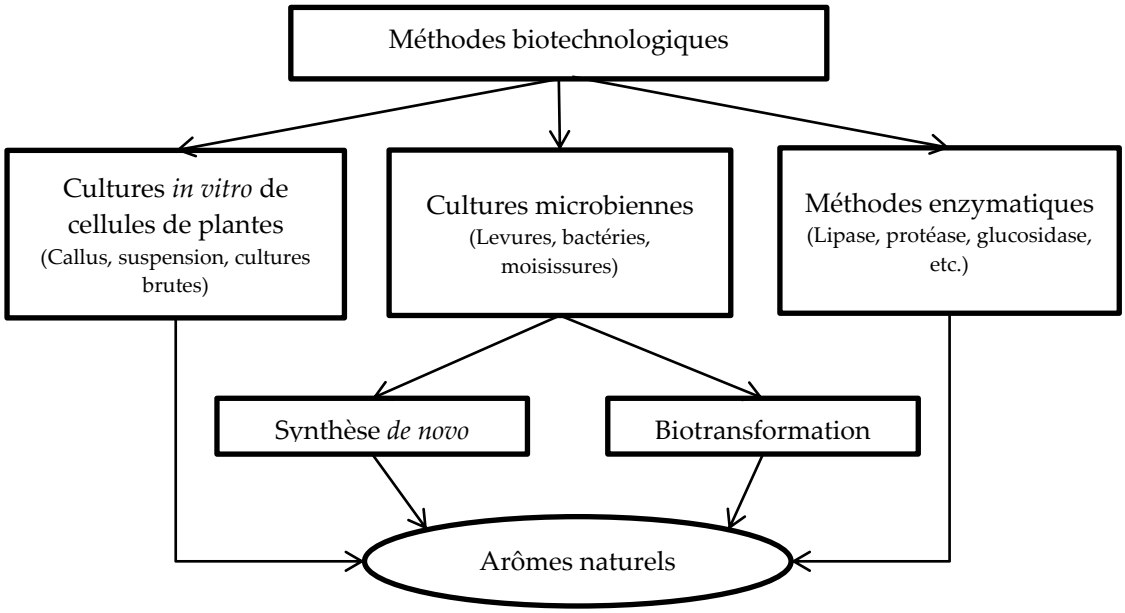


Figure 1. Méthodes biotechnologiques de production d'arômes (adaptée de Bhari et Singh, 2019)

Ces méthodes permettent de produire des molécules hautement régio- et énantio-sélectives sans induire trop d'impacts environnementaux (Roy et Kumar, 2019; Sales *et al.,* 2018; de Oliveira *et al.,* 2017). La production d'arômes par culture *in vitro* de cellules est basée sur le principe que toutes les cellules d'une plante contiennent l'information génétique nécessaire à la production des composés chimiques qui constituent la fraction aromatique de la plante d'origine. Cette méthode, rapide et efficace est indépendante des variations géographiques et des

contraintes de saisonnalités et permet, en outre, de produire des composés non retrouvés dans la fraction aromatique de la plante initiale. Cependant, les temps de croissance cellulaire sont relativement longs et les rendements de production plutôt faibles. De plus, ces rendements continuent à diminuer avec le temps du fait de la perte d'activité progressive des voies biosynthétiques des cellules utilisées (de Oliveria *et al,.* 2019). Les transformations par des enzymes (telles que les lipases, les protéases, les esterases et les nucléases) isolées de sources naturelles offrent les avantages de produire des arômes en une seule étape, d'être hautement efficace et de permettre une récupération facile de l'arôme produit. Cependant, les enzymes nécessaires sont souvent coûteux et la méthode demande l'utilisation de substrat spécifique à l'enzyme dans des milieux réactionnels très contrôlés (pH, température, etc.) pour permettre une activité optimale de l'enzyme ce qui a tendance à conduire à la production de composés d'arômes plutôt coûteux (Bhari et Singh, 2019; Berger, 2015).

Enfin, l'utilisation de la voie microbienne (champignons, bactéries, levures) permet la production d'un large éventail de molécules organiques à caractère aromatique grâce au potentiel et à la diversité métabolique des divers microorganismes reconnus comme « sans danger » (GRAS, *Generally Recognized as Safe*) et utilisables en agro-alimentaire par l'Administration américaine de l'alimentation et des médicaments (FDA, *United States Food and Drug administration*). De plus, les performances de production par voie microbienne peuvent être améliorées par la combinaison d'outils d'ingénierie génetique et métabolique avec celles des procédés fermentaires (Pessôa *et al.,* 2019). Ainsi, malgré les difficultés liées aux cultures cellulaires, notamment en ce qui concerne la stérilité et le contrôle de la croissance cellulaire, la production d'arômes par voie microbienne constitue une voie particulièrement attractive et prometteuse. De ce fait, seules les méthodes basées sur la production d'arômes par les microorganismes seront discutées dans ce chapitre.

1.3. Les voies microbiennes de production d'arômes : la synthèse *de novo* et les biotransformations

Les méthodes de bioproduction d'arômes par voie microbienne comprennent la synthèse *de novo* et les biotransformations. La méthode de synthèse *de novo* repose sur la capacité du microorganisme à produire un grand nombre de composés d'arômes *de novo* considérés comme des métabolites secondaires (ou métabolites spécialisés), lorsqu'ils se développent sur des milieux complexes à l'instar des matrices alimentaires. Des nutriments simples (sucres, acides aminés) sont ainsi présents dans le milieu de fermentation et les microorganismes les assimilent via diverses voies métaboliques en produisant finalement un mélange de composés variés dans le milieu de culture (Pessôa *et al.,* 2019). Ce principe est naturellement utilisé lors de la production de produits agro-alimentaires fermentés comme le fromage, le pain, la bière, le vin, etc. et pour lesquels les arômes caractéristiques sont directement attribués aux microorganismes à l'origine de la fermentation.

Dans le cas des biotransformations, un précurseur spécifique est ajouté au milieu de culture comme co-substrat et les microorganismes sont incités à le métaboliser selon une voie métabolique distincte afin d'obtenir le produit final en une à deux réactions chimiques (Pessôa *et al.,* 2019). Quatre méthodes de biotransformations microbiennes peuvent aujourd'hui être distinguées. La première méthode est la biotransformation qui prend place au cours de la croissance microbienne. Dans ce cas, la production de biomasse et la biotransformation du substrat en arôme se font de manière simultanée et un contrôle important de la croissance cellulaire ainsi que de la bioconversion au cours du temps est nécessaire. Cette méthode est par exemple utilisée dans la production de heptan-2-one à partir de l'acide octanoïque par le champignon *Penicillium roquefortii* (Larroche *et al.,* 1994). Une seconde méthode de bioconversion est la biotransformation à partir de la biomasse produite à l'issue de la culture. Dans ce cas, la production de biomasse est réalisée avant la biotransformation du substrat en composé d'arômes et le contrôle de

la croissance cellulaire et de la biotransformation est simplifié. La troisième méthode de biotransformation est réalisée avec des cellules immobilisées sur un support de réaction. Cette méthode présente l'avantage de permettre une récupération facile du biocatalyseur sur le support ou de la réutiliser directement dans un procédé de biotransformation constant. Enfin, la dernière méthode consiste en une biotransformation en milieu liquide biphasique. Le milieu est alors constitué d'une phase aqueuse dans laquelle se développe préferentiellement le microoganisme et d'une phase organique permettant une solubilisation rapide des composés d'arômes produits.

Tous les types de microorganismes peuvent être impliqués en synthèse *de novo* et en biotransformation. Cependant ces dernières années, la recherche a montré un intérêt tout particulier pour les microorganismes de types lévuriens pour la production d'arômes.

2. Le métabolisme des levures pour la production d'arômes

2.1. Les mécanismes de production d'arômes chez la levure

Les procédés de production agro-alimentaires de mets et de boissons fermentés tels que le pain, le vin ou la bière sont maîtrisés par l'Homme depuis des millénaires sans que l'on ne sache à quoi cela était dû. Il a fallu attendre les travaux de Louis Pasteur dans les années 1860 pour comprendre que ceci était dû à des microorganismes appelés levure. Le rôle de ces levures dans la fermentation de ces produits a ensuite été démontré comme indispensable pour la production de dioxyde de carbone (CO_2) et d'éthanol. Cependant, il contribue aussi fortement à l'originalité organoleptique des produits en permettant de convertir des précurseurs simples du milieu de culture en molécules plus complexes nommées composés d'arômes ou composés organiques volatils (COVs).

Ces COVs sont majoritairement produits pendant la phase de croissance des

levures *via* le métabolisme primaire ou le métabolisme secondaire (İşleten *et al.,* 2018). Dans le premier cas, les COVs sont considérés comme des déchets métaboliques dont le rôle principal est la détoxification alors que dans le second, ils sont impliqués dans les mécanismes de défense ou de communication du microorganisme (Ebert *et al.,* 2017). Les COVs produits dépendent fortement de la souche de levure utilisée et de la composition du milieu de culture, en particulier la nature et la concentration en carbone et en azote du milieu. Cependant, les COVs les plus couramment formés appartiennent aux classes des cétones, des aldéhydes, des alcools, des acides carboxyliques, des esters, des lactones et des terpenoïdes (Figure 2).

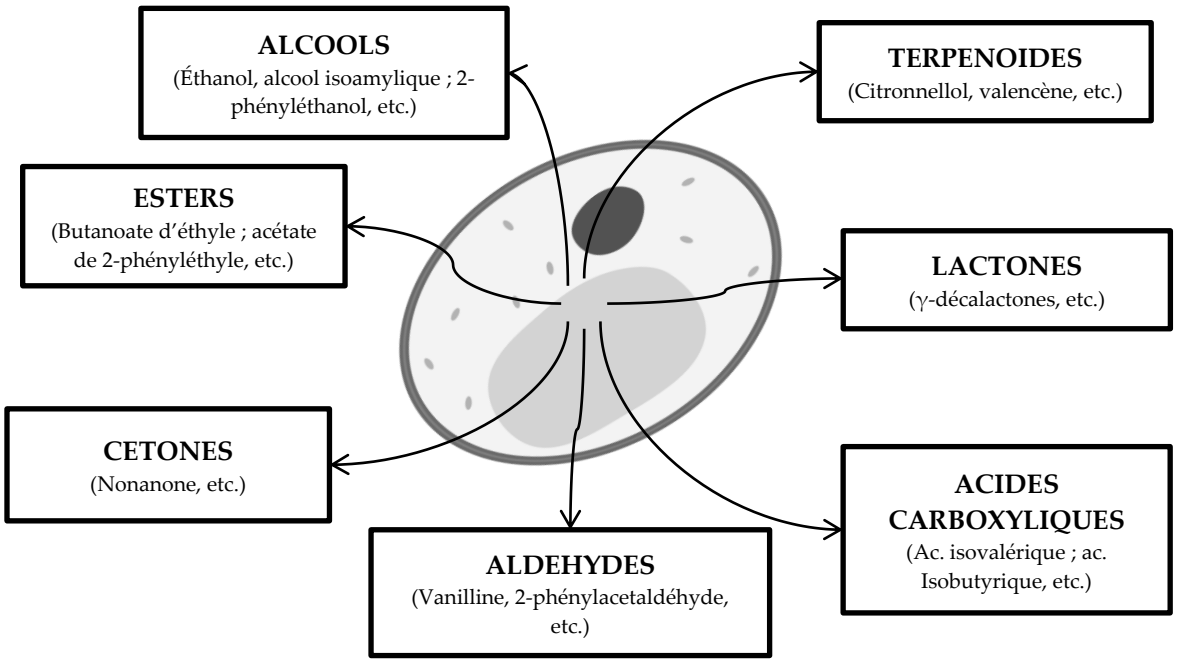


Figure 2. Types de composés d'arômes majoritairement produits par les levures (adaptée de Carlquist *et al.,* 2015)

De nombreuses voies métaboliques impliquées dans la production des COVs ont été élucidées par l'étude de la levure traditionnelle *Saccharomyces cerevisiae*, considérée comme le système-modèle des levures. Par exemple, il a été démontré que l'éthanol, le butan-2,3-diol et l'acétaldéhyde sont des produits de la fermentation alcoolique, alors que les terpenoïdes tels que le géraniol, le citronnellol ou le farnésol

sont issus de la voie du mévalonate (Ebert *et al.,* 2017). Cependant, chez *S. cerevisiae*, la plupart des COVs sont des produits de la dégradation des acides aminés *via* la voie d'Ehrlich. Chez certaines levures non-*Saccharomyces* et champignons filamenteux, ils peuvent être issus de la dégradation d'acide gras *via* la voie de la β-oxydation. Nous verrons que le microorganisme que nous avons étudié dispose de ces deux voies.

2.2. La voie métabolique d'Ehrlich

Mise en évidence suite aux travaux de Felix Ehrlich (1907) et de Neubauer et Fromhers (1910), la voie métabolique d'Ehrlich est la voie biochimique utilisée par les levures pour récupérer l'azote des acides aminés dans le milieu quand l'ammonium n'est pas disponible (Hazelwood *et al.,* 2008). Il s'agit aujourd'hui de la voie la mieux connue dans la production d'arômes chez les levures. Dans cette voie, les acides aminés branchés (leucine, isoleucine, valine), aromatiques (phénylalanine, tyrosine, tryptophane) et soufrés (méthionine) sont catabolisés pour former des alcools aromatiques et aliphatiques ainsi que leurs acides carboxyliques correspondants selon un schéma métabolique comportant trois étapes : une transamination, une décarboxylation, une oxydation ou une réduction (Figure 3).

La transamination est l'étape de conversion de l'acide aminé en l'α-cétoacide correspondant sous l'action catalytique d'une transaminase. Chez la levure *S. cerevisiae*, quatre gènes codent pour cette transaminase : *ARO8, ARO9, BAT1* et *BAT2*. Leur expression dépend essentiellement de l'acide aminé entrant dans la voie d'Ehrlich. Ainsi, les gènes *ARO8* et *ARO9* sont majoritairement exprimés en présence d'acides aminés aromatiques alors que les gènes *BAT1* et *BAT2* le sont en présence d'acides aminés branchés (Dzialo *et al.,* 2017; Hazelwood *et al.,* 2008). Néanmoins, en présence de glucose et d'ammonium, l'expression du gène *BAT1* est supérieure à celle du gène *BAT2* dont l'activité augmente lorsque le glucose constitue une source de carbone et que les acides aminés branchés (isoleucine, leucine et valine)

constituent les sources d'azote dans le milieu de culture (Colón *et al.,* 2011).

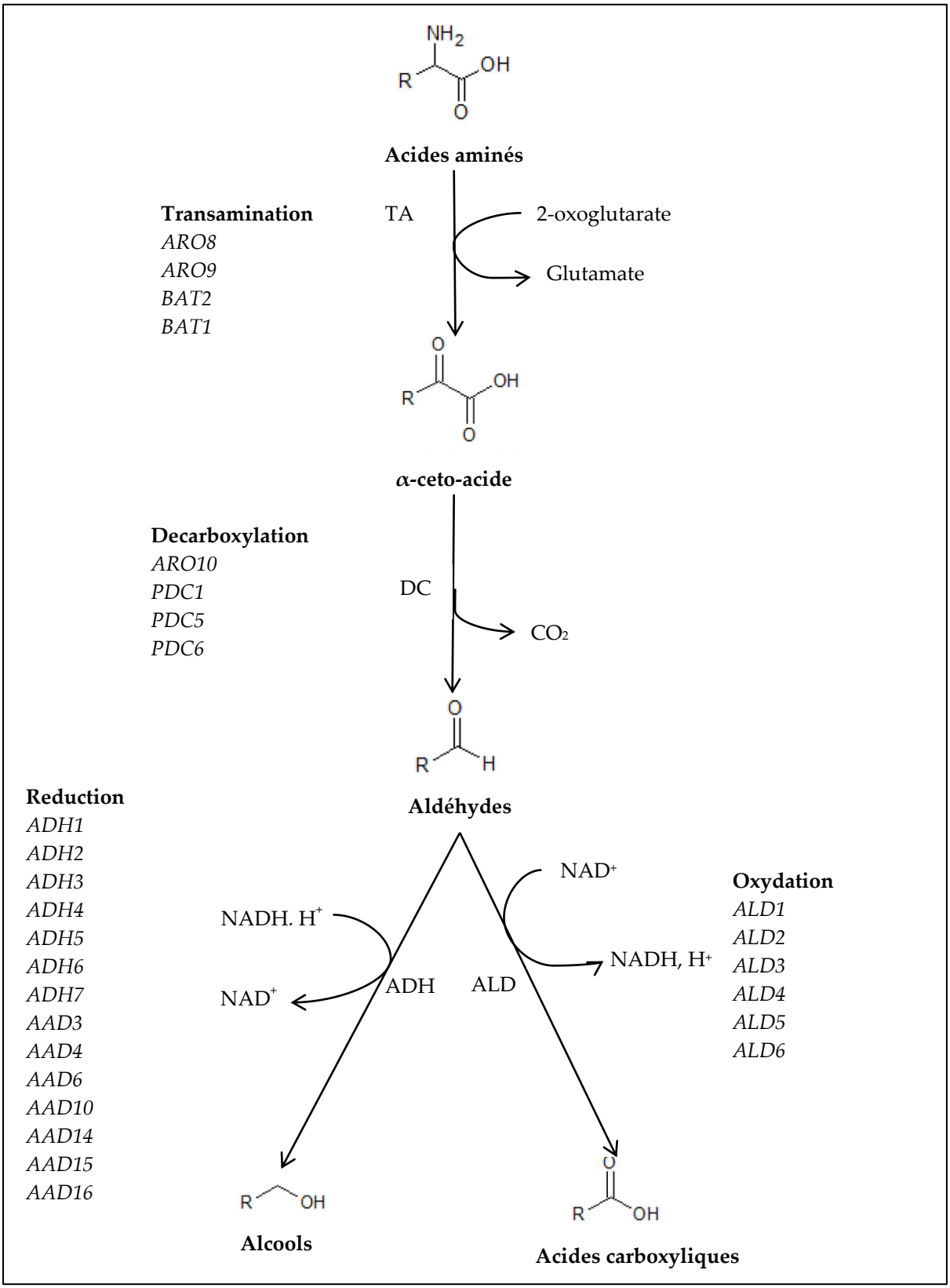


Figure 3. Schéma de la voie métabolique d'Ehrlich et des gènes codants pour les enzymes impliquées chez la levure conventionnelle *S. cerevisiae* (adapté de Hazelwood *et al.,* 2008). TA : Transaminase ; DC : Décarboxylase ; ADH : Alcool déshydrogénase ; ALD : Aldéhyde déhydrogénase

La décarboxylation est la seconde étape de la voie d'Ehrlich au cours de laquelle l'α-cétoacide est converti de façon irréversible en aldéhyde. Cette réaction est catalysée par une décarboxylase. Chez *S. cerevisiae*, les gènes majeurs impliqués dans cette réaction sont ceux impliqués dans la décarboxylation TPP-dépendante du pyruvate en acétaldéhyde : *PDC1, PDC5* et *PDC6*. L'expression de ces trois gènes paralogues est indépendante des substrats mais varie en fonction des conditions de culture dans lesquelles l'organisme se développe. En effet, alors que le gène *PDC1* est fortement exprimé sous toutes les conditions, le niveau d'expression de *PDC5* augmente en l'absence de gène *PDC1* fonctionnel, ou sous des conditions de limitation en thiamine ou en azote. Le gène *PDC6* est quant à lui exprimé lorsque les apports en soufre sont limités. Enfin, chez *S. cerevisiae*, le gène *ARO10* code également pour une enzyme de décarboxylation dans la voie d'Ehrlich, mais il agit uniquement sur la transformation des acides aromatiques ou des α-cétoacides branchés contenant du soufre (Romagnoli *et al.,* 2012).

La dernière étape de la voie d'Ehrlich peut consister soit en une réduction de l'aldéhyde en alcool, soit en son oxydation en acide carboxylique correspondant. Dans le premier cas, la réaction est catalysée par une alcool déshydrogénase qui peut être codée par divers gènes de la famille des *ADHs* (pour les alcools non aryliques) et *AADs (*pour les alcools aryliques) chez la levure *S. cerevisiae (*Figure 3). Parmi ces gènes, le gène *ADH3* semble être le plus important dans la famille des gènes *ADH* puisque les autres gènes de cette famille ne sont pas particulièrement exprimés en conditions normales dans la souche et que leur délétion n'entraîne pas de différence significative de production en alcools supérieurs. De même, parmi les gènes de la famille *AAD*, le gène *AAD6* est le plus impliqué dans la voie d'Ehrlich (Styger *et al.,* 2011; 2013). Dans le cas de l'oxydation, l'aldéhyde est transformé en acide correspondant sous l'effet d'une aldéhyde déshydrogénase encodée par un des gènes de la famille des *ALDs* selon les conditions du milieu. En effet, en condition de croissance normale, les gènes *ALD5 et ALD6* sont majoritairement impliqués dans la

voie d'Ehrlich, avec une surexpression du gène *ALD5* en condition anaérobique. Les autres gènes de la famille *ALD* ne semblent pas avoir d'effet particulier sur la production d'acides en temps normal. Par contre, en l'absence de gènes *ALD5* et *ALD6* fonctionels, ces gènes sont exprimés et assurent l'encodage des enzymes catalysant l'oxydation des aldéhydes en acides carboxyliques (Saint-Prix *et al.,* 2004).

Tableau II. Intermédiaires métaboliques et principaux esters de la voie d'Erlich

Acide aminé	α-cétoacide	Aldéhyde	Alcool et ester correspondant	Acide et ester correspondant
Leucine	Acide 4-méthyl-2-oxo-pentanoïque	3-méthylbutanal	3-méthylbutanol Acétate de 3-méthylbutyle	Acide 3-méthylbutanoïque 3-méthylbutanoate d'éthyle
Valine	Acide 3-méthyl-2-oxo-butanoïque	2-méthylpropanal	2-méthylpropanol Acétate de 2-méthylpropyle *(Fruité)*	Acide 2-méthylpropanoïque 2-méthylpropanoate d'éthyle
Isoleucine	Acide 3-méthyl-2-oxo-pentanoïque	2-méthylbutanal	2-méthylbutanol Acétate de 2-méthylbutyle *(Banane)*	Acide 2-méthylbutanoïque 2-methylbutanaote d'éthyle
Phenylalanine	Acide 3-phényl-2-oxo-propanoïque	2-phényléthanal	2-phényléthanol *(Rose)* Acétate de 2-phényléthyle *(Rose, miel)*	Acide 2-phényléthanoïque 2-phényléthanoate d'éthyle
Tyosine	Acide 3-(4-hydroxyphényl)-2-oxo-propanoïque	2-(4-hydroxyphényl)-éthanal	2-(4-hydroxyphényl)-éthanol Acétate de 2-(4-hydroxyphényl)-éthyle	Acide 2-(4-hydroxyphényl)-éhanoïque 2-(4-hydroxyphényl)-éhanoate d'éthyle
Tryptophane	Acide 3-(indol-3-yl)-2-oxopropanoïque	2-(indol-3-yl)-éthanal	2-(indol-3-yl)-éthanol Acétate de 2-(indol-3-yl)-éthyle	Acide 2-(indol-3-yl)-éthanoïque 2-(indol-3-yl)-éthanoate d'éthyle
Methionine	Acide 4-méthylthio-2-oxobutanoïque	3-(méthylthio)-propanal	3-(méthylthio)-propanol Acétate de 3-(méthylthio)-propanyle	Acide 3-(méthylthio)-propanoïque 3-(méthylthio)-propanoate d'éthyle

Chez la levure *S. cerevisiae*, les enzymes de chaque étape de la voie d'Ehrlich peuvent donc être encodées par plusieurs gènes dont l'expression varie selon les

conditions du milieu de culture et la fonctionalité des gènes assurant l'encodage en temps normal. Ceci assure une activité permanente de cette voie au sein de la souche de *S. cerevisiae* et la rend difficilement inactivable en l'absence de manipulations génétiques.

Le rôle physiologique de la voie d'Ehrlich reste encore à démontrer, mais certaines études tendent à démontrer que les étapes d'oxydation et de réduction impliquées dans cette voie métabolique aideraient à équilibrer le potentiel redox. Comme les alcools et les acides carboxyliques formés sont facilement convertis en acétates (Tableau II) par condensation avec un acétyl-Coenzyme A sous l'action de l'alcool acétyltransférase (AAT), la production d'acide via la voie d'Ehrlich permettrait de recycler le Coenzyme A (CoA, enzyme de tranfert de groupement acyle) en condition anaérobie lorsque la consommation d'acétyl-CoA dans le cycle de Krebs est ralentie. Ceci permettrait alors d'éviter l'accumulation d'acide acétique toxique dans la cellule (Ebert *et al.,* 2017). Cette voie est donc d'un intérêt majeur pour la production d'arômes puisque les esters sont probablement les contributeurs majoritaires des arômes fruités et floraux dans les produits alimentaires. De plus, du fait de leur petite taille et de leur nature lipophile, les acétates diffusent facilement du cytoplasme vers le milieu extracellulaire, ce qui leur permet d'impacter fortement la flaveur des produits fermentés par les levures impliquées. La voie d'Ehrlich des levures permet donc la production d'un certain nombre d'alcools, d'acides carboxyliques et d'esters à haut pouvoir d'aromatisation (Tableau II). C'est pourquoi cette voie est considérée comme l'une des voies les plus importantes pour la production d'arômes chez les levures.

2.3. La voie de la β-oxydation des acides gras

La voie de la β-oxydation des acides gras est la voie métabolique de dégradation des molécules d'acides gras chez les eucaryotes qui résulte en la

production d'acétyl-CoA. Il s'agirait d'un mécanisme de détoxification permettant d'empêcher l'accumulation des acides gras à chaîne moyenne dans la cellule en condition d'anaérobiose. Cette dégradation se fait en cinq étapes présentées en Figure 4.

Brièvement, les acides gras sont initialement activés sous l'action d'une acyl-CoA synthétase (ACyS). Le thioester d'acyl-CoA résultant est ensuite deshydrogéné en enoyl-CoA sous l'action d'une acyl-CoA deshydrogénase (ACyDH) dans les mitochondries ou d'une acyl-CoA oxydase dans le peroxysome. Après quoi, l'enoyl-CoA est transformé en 3-hydroxyacyl-CoA sous l'effet d'une enoyl-CoA hydratase puis en 3-cétoacyl-CoA sous l'effet d'une β-acyl-CoA deshydrogénase. Enfin, lors de la dernière étape, la β-keto-acyl-CoA thiolase entraîne une coupure du 3-cétoacyl-CoA pour former d'une part un acétyl-CoA et de l'autre un thioester d'acyl-CoA pouvant être de nouveau métabolisé *via* la voie de la β-oxydation. Les deux premières enzymes impliquées dans la voie de la β-oxydation (ACyS et ACyD ou ACyO) peuvent être encodées par plus de quatre différents gènes présents chez *S. cerevisiae*, selon les conditions de culture et le niveau d'expression du gène principalement impliqué dans l'encodage de l'enzyme. L'inactivation des deux premières étapes de la voie de la β-oxydation est donc difficilement réalisable en l'absence de manipulations génétiques. Par contre, peu de gènes sont connus pour catalyser les trois enzymes suivants de la voie. Enfin, seulement deux gènes sont connus pour coder pour l'ECH chez *S. cerevisiae* et un seul pour coder pour la BHACyDH et la BKACyT, ce qui rend ces trois étapes potentiellement plus facilement modulables par l'utilisation seule de moyens chimique ou physique sur la souche.

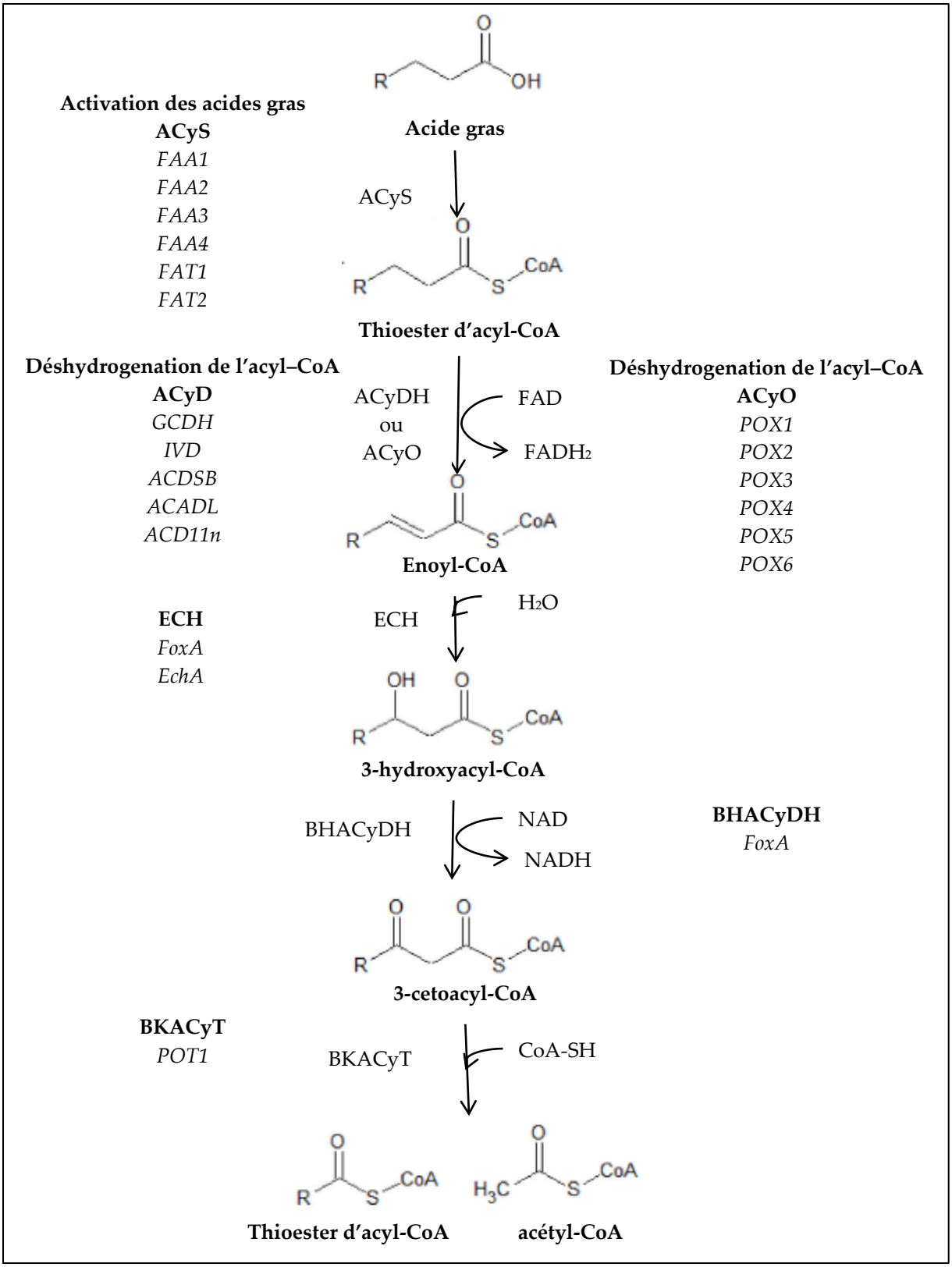


Figure 4. Schéma de la voie métabolique et des gènes codant pour les enzymes de la voie de β-oxydation. ACyS : acyl-CoA synthétase ; ACyD : acyl-CoA déshydrogénase ; ACyO : acyl-CoA oxydase ; ECH : enoyl-CoA hydratase ; BHACyDH : β-acyl-CoA deshydrogénase ; BKACyT : β-keto-acyl-CoA thiolase

Après la dégradation des acides gras à chaine moyenne (acide hexanoïque, octanoïque et décanoïque), les acyl-CoA résultants peuvent également réagir avec l'éthanol produit *via* la voie fermentaire pour produire des esters éthyliques d'acides gras (EEAG) aux arômes floraux et fruités tels que l'hexanoate d'éthyle, l'octanoate d'éthyle ou le décanoate d'éthyle. De plus, ces acyl-CoA peuvent également réagir avec des alcools supérieurs pour former des esters plus complexes. Ainsi, la production d'acyl-CoA fait de la voie de la β-oxydation une voie également particulièrement intéressante pour la production de COVs, notamment sous forme d'esters.

3. Les levures non-*Saccharomyces* en production d'arômes

Bien que les espèces du genre *Saccharomyces* (dont *Saccharomyces cerevisiae*) soient les levures les plus connues et les plus utilisées en industrie, de nombreux autres genres et espèces de levures ont déjà été décrits. Le métabolisme des ces levures non-*Saccharomyces* peut se différencier des levures du genre *Saccharomyces* et leur permettre de produire des composés à hautes valeurs ajoutées pour divers domaines d'applications tels que la pharmaceutique, les bioénergies (les biofuels) ou l'alimentaire comme la production de boissons fermentées (de Souza Varize *et al.* 2019; Flores *et al*. 2000). En étudiant les processus de fermentation des produits de type bière ou vin, les chercheurs ont montré l'impact fort des levures non-*Saccharomyces* sur l'arôme des produits comparés aux levures du genre *Saccharomyces*. C'est ainsi que l'intérêt des levures non-*Saccharomyces* en production d'arômes a été mise en exergue et que la recherche de ces levures à fort potentiel aromatique s'est intensifiée ces dernières années.

3.1. Les composés organiques volatils produits par les levures non-*Saccharomyces*

De nombreuses études font état des composés organiques volatils (COVs) produits par des levures non-*Saccharomyces* dans diverses boissons fermentées

complexes comme le vin, la bière ou le kefir (Budroni *et al.,* 2017; Schifferdecker *et al.,* 2014; Tataridis *et al.,* 2013; Ravasio *et al.,* 2018). Cependant, comme nous l'avons déjà mentionné auparavant (paragraphe I.2), la production de COVs par les levures est fortement dépendante du milieu de culture sur lequel elles se développent. Comparer les capacités des espèces de levures à produire des COVs entre elles lorsqu'elles se développent sur de tels milieux de culture peut donc s'avérer complexe. C'est pourquoi, dans ce chapitre, nous avons choisi de recenser uniquement les données de la littérature portant sur la production des COVs par des levures non-*Saccharomyces* se développant sur des milieux de cultures synthétiques (par opposition aux matrices alimentaires par exemple). 82 souches de levures ont ainsi été répertoriées. Les espèces de levures concernées ainsi que les COVs qui leur sont apparentés, sont présentés dans le Tableau III.

En étudiant ces données, il apparait que les travaux portant sur les COVs ne sont pas homogènes au sein d'un même genre de levures. En effet, certains genres comme *Candida*, *Geotrichum* ou *Pichia* sont particulièrement représentés (ils comptent pour respectivement 16, 12 et 14, soit plus de 50%, des 82 espèces citées dans la littérature) alors que d'autres genres de levures, tels que les *Kluyveromyces* ou les *Kwoniella* sont très peu cités (une seule des 82 espèces citées dans la littérature). Il semblerait de plus que la diversité des COVs produits par ces levures ne soit pas dépendante de leur genre. Par exemple, seuls deux COVs ont été décrits pour la levure *Candida diddensiae* alors que 13 différents COVs ont été détectés pour *Candida oleophila* (Buzzini *et al.,* 2003). De même, alors que la levure *Debaryomyces hansenii* produit 10 COVs différents, *Debaryomyces vanrijiae* n'en produit que trois.

Tableau III. Levures non- *Saccharomyces* et composés organiques volatils produits (COVs) lors de la croissance sur milieu de culture synthétique (1/8)

Levures	COVs associés		Réf.
Aureobasidium leucospermi	ALCOOLS :	2-éthylhexanol ; 2-méthylbutanol ; 2-phényléthanol ; 3-méthylbutanol ; butanol	[1]
Aureobasidium pullulans	ALCOOLS :	2-éthylhexanol ; 2-méthylbutanol ; 2-phényléthanol ; 3-méthylbutanol ; éthanol	[1]
Candida catenulata	ALCOOLS :	Alcool isoamylique; pentanol	[2]
	ESTERS :	Isobutyrate d'éthyle ; acétate d'isobutyle ; acétate d'isoamyle ; acétate de 2-méthylbutyle	
Candida diddensiae	ALCOOLS :	Alcool isoamylique; pentanol	[2]
	ESTERS :	Acétate d'isoamyle	
Candida diversa	ALCOOLS :	Alcool isoamylique; pentanol	[2]
	ESTERS :	Acétate d'isobutyle ; acétate d'isoamyle ; acétate de 2-methylbutyle	
Candida fermentati	ALCOOLS :	2-methylbutanol ; 2-phényléthanol ; 3-méthylbutanol	[1]
	CARBONYLES :	nonan-2-one	
Candida jaroonii	ALCOOLS :	2-éthylhexanol ; 2-phényléthanol ; 3-méthylbutanol ; éthanol	[1]
	ESTERS :	éthanoate d'isoamyle, octanoate d'éthyle, éthanoate d'octyle	
Candida magnioliae	ALCOOLS :	Alcool isoamylique; pentanol	[2]
	ESTERS:	Acétate d'isoamyle	
Candida maltosa	ALCOOLS :	Alcool isoamylique; pentanol	[2]
	ESTERS :	Acétate d'isoamyle	
Candida oleophila	ALCOOLS :	2-éthylhexanol ; 2-méthylbutanol ; 2-phényléthanol ; 3-méthylbutanol ; ethanol ; alcool isoamylique ; pentanol	[1-2]
	ESTERS	Acétate d'isobutyle ; acétate d'isoamyle ; acétate de 2-méthylbutyle ; propanoate d'isoamyle ; acétate de phénylméthyle	
	CARBONYLES :	Nonan-2-one	
Candida pararugosa	ALCOOLS :	2-phényléthanol ; 3-méthylbutanol ; éthanol	[1]
	ESTERS :	Butanoate d'isoamyle, octanote d'éthyle	
Candida quercitrusa	ALCOOLS :	2-éthylhexanol ; 2-méthylbutanol ; 2-phényléthanol ; 3-méthylbutanol	[1]
	CARBONYLES :	2-phényléthanal ; heptan-2-one ; nonan-2-one	
Candida railenensis	ALCOOLS :	2-phényléthanol ; 3-methylbutanol ; éthanol	[1]
	ESTERS :	Ethanoate de 2-éthylhexyle ; éthanoate d'isoamyle	

[1] Grondin *et al.,* 2015 ; [2] Buzzini *et al.,* 2003 ; [3] Ravasio *et al.,* 2018 ; [4] Roy et Kumar, 2019 ; [5]Grondin *et al.,* 2017; [6] Gethins *et al.,* 2014 ; [7] Isleten *et al.,* 2018

Tableau III. Levures non- *Saccharomyces* et composés organiques volatils produits (COVs) lors de la croissance sur milieu de culture synthétique (2/8)

Levures	COVs associés		Réf.
Candida sake	ALCOOLS :	Alcool isoamylique ; pentanol	[2]
	ESTERS :	Acétate d'isoamyle	
	CARBONYLES	2-isopropyl-5-methylhex-2-énal	
Candida shehaae	ALCOOLS :	Alcool isoamylique ; pentanol	[2]
Candida stellate	ALCOOLS :	2-furanméthanol ; 2-méthylpropanol ; 2-phényléthanol ; 3-(méthylthio)-propan-1-ol ; butanol ; furanéol ; alcool isoamylique	[3]
Candida tropicalis	TERPENES :	Limonène	[4]
Candida zeylanoides	ALCOOLS :	Alcool isoamylique ; pentanol	[2]
Cryptococcus flavensvens	ALCOOLS :	2-phénylethanol ; 3-méthylbutanol	[1]
	ESTERS :	éthanoate d'isomyle	
Cryptococcus laurentii	ACIDES :	acide butanoique	[1]
	ALCOOLS :	2-éthylhexanol ; 2-méthylbutanol ; 2-phénylethanol ; 3-méthylbutanol ; éthanol	
	CARBONYLES :	3-hydroxybutanone	
Cyberlindnera rhodanensis	ALCOOLS :	2-phénylethanol ; 3-méthylbutanol	[1]
	ESTERS :	Ethanoate de 2-éthylhexyle ; éthanoate de 2-méthylpropyle ; éthanoate de 2-phényléthyle ; propanoate de 2-phényléthyle ; éthanoate d'isoamyle ; propanoate d'isoamyle ; 3-méthylbutanoate de butyle ; éthanoate de butyle ; éthanoate d'éthyle	
Debaryomyces hansenii	ACIDES :	Acide butanoïque	[1-2]
	ALCOOLS :	2-éthylhexanol ; 2-méthylbutanol ; 2-phényléthanol ; 3-méthylbutanol ; éthanol ; alcool isoamylique ; pentanol	
	ESTERS :	Acétate d'isoamyle	
	CARBONYLES :	3-hydroxybutanone	
Debaryomyces nepalensis	ALCOOLS :	2-éthylhexanol ; 2-méthylbutanol ; 2-phényléthanol ; 3-méthylbutanol ; alcool isoamylique ; pentanol	[1-2]
	ESTERS :	Acétate d'isoamyle	
Debaryomyces polymorphus	ALCOOLS :	Alcool isoamylique ; pentanol	[2]
	ESTERS :	Acétate d'isoamyle	
Debaryomyces vanrijiae	ALCOOLS :	Alcool isoamylique ; pentanol	[2]
	ESTERS :	Acétate d'isoamyle	

[1] Grondin *et al.,* 2015 ; [2] Buzzini *et al.,* 2003 ; [3] Ravasio *et al.,* 2018 ; [4] Roy et Kumar, 2019 ; [5]Grondin *et al.,* 2017; [6] Gethins *et al.,* 2014 ; [7] Isleten *et al.,* 2018

Tableau III. Levures non- *Saccharomyces* et composés organiques volatils produits (COVs) lors de la croissance sur milieu de culture synthétique (3/8)

Levures	COVs associés		Réf.
Dipodascus capitatus	ALCOOLS :	Alcool isoamylique	[2]
Endomycopsis crategensis	ALCOOLS :	Alcool isoamylique ; pentanol	[2]
Galactomyces candidus	ALCOOLS :	2-phényléthanol ; 3-méthylbutanol	[5]
Galactomyces citri-auranti	ALCOOLS :	2-phényléthanol ; 3-méthylbutanol	[5]
	ESTERS :	3-méthylbutanoate d'isoamyle	
Galactomyces geotrichum	ALCOOLS :	3-méthylbutanol	[5]
	ESTERS :	3-méthylbutanoate d'éthyle	
	ESTERS α-INSATURES :	Tiglate d'éthyle	
Galactomyces pseudocandidus	ALCOOLS :	2-méthylbutanol ; 2-méthylpropanol ; 2-phényléthanol	[5]
	ESTERS :	Isovalérate d'isobutyle ; 2-méthylbutanoate d'éthyle ; 2-méthylpropanoate d'éthyle ; 3-méthylbutanoate d'éthyle ; butanoate d'éthyle ; 3-méthylbutanoate de méthyle	
	ESTERS α-INSATURES :	Tiglate d'éthyle	
Geotrichum candidum	ALCOOLS :	2-méthylbutanol ; 2-phényléthanol ; 3-méthylbutanol ; butanol	[5]
	ESTERS :	Ethanoate d'isoamyle ; 2-méthylbutanoate d'éthyle ; 3-méthylbutanoate d'éthyle ; butanoate d'éthyle	
Geotrichum carabidarum	ALCOOLS :	Butanol	[5]
	ESTERS :	Ethanoate d'éthyle ; octanoate d'éthyle ; éthanoate d'octyle	
Geotrichum cucujoidarum	ALCOOLS :	2-méthylbutanol ; 3-méthylbutanol	[5]
Geotrichum eriense	ALCOOLS :	2-phényléthanol	[5]
Geotrichum europeum	ALCOOLS :	2-méthylbutanol ; 2-méthylpropanol ; 3-méthylbutanol	[5]
	ESTERS :	2-méthylbutanoate d'éthyle, 2-méthylpropanoate d'éthyle ; 3-méthylbutanoate d'éthyle ; éthanoate d'éthyle	
	ESTERS α-INSATURES :	Tiglate d'isobutyle ; tiglate d'éthyle	
Geotrichum fermentans	ALCOOLS :	2-phényléthanol ; 3-méthylbutanol	[5]
	ESTERS :	3-méthylbutanoate d'isoamyle ; 3-méthylbutanoate d'éthyle	
Geotrichum histeridarum	ALCOOLS :	2-éthylhexanol ; 2-phényléthanol ; 3-méthylbutanol	[5]
	ESTERS :	Ethanoate d'isoamyle ; 2-méthylbutanoate d'éthyle ; 2-méthylpropanoate d'éthyle ; butanoate d'éthyle	

[1] Grondin *et al.,* 2015 ; [2] Buzzini *et al.,* 2003 ; [3] Ravasio *et al.,* 2018 ; [4] Roy et Kumar, 2019 ; [5]Grondin *et al.,* 2017; [6] Gethins *et al.,* 2014 ; [7] Isleten *et al.,* 2018

Tableau III. Levures non- *Saccharomyces* et composés organiques volatils produits (COVs) lors de la croissance sur milieu de culture synthétique (4/8)

Levures	COVs associés		Réf.
Geotrichum klebahnii	ALCOOLS :	Alcool isoamylique ; pentanol	[2]
Geotrichum marinum	ALCOOLS :	2-phényléthanol ; 3-méthylbutanol	[5]
	ESTERS :	2-méthylbutanoate d'isoamyle ; 3-méthylbutanoate d'isoamyle ; butanoate d'isoamyle ; éthanoate d'isoamyle ; propanoate d'isoamyle ; 2-méthylbutanoate d'éthyle ; 2-méthylpropanoate d'éthyle ; 3-méthylbutanoate d'éthyle ; butanoate d'éthyle ; éthanoate d'éthyle ; hexanoate d'éthyle ; pentanoate d'éthyle ; 2-methylbutanoate de méthyle ; 3-méthylbutanoate de pentyle	
	ESTERS α-INSATURES :	Tiglate d'isoamyle, tiglate d'éthyle ; 3-méthylbut-2-énoate d'éthyle ; but-2-énoate d'éthyle ; hex-2-énoate d'éthyle	
Geotrichum phuruaensis	ALCOOLS :	2-phényléthanol ; 3-méthylbutanol	[5]
Geotrichum restrictum	ALCOOLS :	2-méthylbutanol ; 3-méthylbutanol ; butanol	[5]
	ESTERS :	Butanoate d'éthyle ; éthanoate d'éthyle ; octanoate d'éthyle ; éthanoate d'octyle	
Hanseniaspora guillermondii	ALCOOLS	Alcool isoamylique ; pentanol	[2,6]
	ESTERS :	Acétate d'isoamyle ; éthanoate de 2-phényléthyle ; acétate d'éthyle ; caprylate d'éthyle ; acétate d'isobutyle ; acétate de 2-méthylbutyle	
Hanseniaspora uvarum	ALCOOLS :	2-phényléthanol ; 3-méthylbutanol	[1,6]
	ESTERS :	Ethanote de 2-éthylhexyle ; éthanoate de 2-phényléthyle ; éthanoate d'isoamyle ; propanoate d'isoamyle ; éthanoate de butyle ; propanoate d'éthyle ; acétate d'éthyle ; succinate de diéthyle ; acétate d'isobutyle	
Hanseniaspora valyensis	ALCOOLS :	Alcool isoamylique ; pentanol	[2]
	ESTERS :	Acétate d'isoamyle	
Hanseniaspora vineae	ALCOOLS :	Butanol ; furanéol ; alcool isoamylique ; 2-furanméthanol ; 2-méthylpropanol ; 2-phényléthanol ; 3-(méthylthio)-1-propanol	[3]
Issatchenkia scutulata	ALCOOLS :	Alcool isoamylique ; pentanol	[2]
	ESTERS :	Acétate d'isobutyle ; acétate d'isoamyle ; acétate de 2-méthylbutyle	
Issatchenkia terricola	ALCOOLS :	Alcool isoamylique ; pentanol	[2]
	ESTERS :	Acétate d'isobutyle ; acétate d'isoamyle ; acétate de 2-méthylbutyle ; acétate de benzyle	

[1] Grondin *et al.,* 2015 ; [2] Buzzini *et al.,* 2003 ; [3] Ravasio *et al.,* 2018 ; [4] Roy et Kumar, 2019 ; [5]Grondin *et al.,* 2017; [6] Gethins *et al.,* 2014 ; [7] Isleten *et al.,* 2018

Tableau III. Levures non- *Saccharomyces* et composés organiques volatils produits (COVs) lors de la croissance sur milieu de culture synthétique (5/8)

Levures	COVs associés		Réf.
Kluveromyces marxianus	ALCOOLS :	2-phényléthanol ; éthanol ; alcool isoamylique	[2, 4, 6-7]
	ESTERS :	Acétate d'éthyle, acétate d'isoamyle, éthanoate de 2-phényléthyle ; propanoate de 2-phényléthyle ; isobutyrate de 2-phényléthyle	
Kwoniella mongroviensis	ACIDES :	Acide butanoïque	[1]
	ALCOOLS :	2-éthylhexanol ; 2-méthylbutanol ; 2-phényléthanol ; 3-méthylbutanol ; éthanol	
	CARBONYLES :	3-hydroxybutanone	
	ESTERS :	Ethanoate de 2-éthylhexyle ; éthanoate d'isoamyle	
Lachancea fermentati	ALCOOLS :	2-ethylhexanol ; 2-methylbutanol ; 2-phenylethanol ; 3-methylbutanol ; butanol ; ethanol	[1]
	ESTERS :	Ethanoate d'isoamyle; octanoate d'éthyle	
Magnusiomyces magnusii	ALCOOLS :	2-éthylhexanol ; 2-méthylbutanol ; 2-phényléthanol ; 3-méthylbutanol ; butanol	[5]
	ESTERS α-INSATURES :	Tiglate d'éthyle	
Magnusiomyces ocetensis	ALCOOLS :	2-phényléthanol	[5]
Pichia americana	ALCOOLS ;	Alcool isoamylique ; pentanol	[2]
	ESTERS :	Acétate d'isoamyle	
	CARBONYLES :	2-isopropyl-5-méthyl-2-hexénal	
Pichia angusta	ALCOOLS :	Alcool isoamylique ; pentanol	[2]
	ESTERS :	Acétate d'isoamyle	
Pichia anomala	ALCOOLS :	Alcool isoamylique ; pentanol	[3,6]
	ESTERS :	Acétate d'isoamyle ; éthanoate de 2-phényléthyle ; acétate d'éthyle ; acétate d'isobutyle ; acétate de 2-méthylbutyle ; propanoate d'isoamyle ; caproate d'éthyle ; caprylate d'éthyle ; succinate de diéthyle ; acétate de benzyle	
Pichia barkerii	ALCOOLS :	Alcool isoamylique ; pentanol	[2]
	ESTERS :	Acétate d'isobutyle ; acétate d'isoamyle ; acétate de 2-méthylbutyle ; propanoate d'isobutyle ; acétate de benzyle	
Pichia guillermondii	ACIDES :	Acide 2-méthylpropanoïque ; acide 3-méthylbutanoïque ; acide butanoïque	[1]
	ALCOOLS	2-éthylhexanol ; 2-méthylbutanol ; 2-phényléthanol ; 3-méthylbutanol	

[1] Grondin *et al.,* 2015 ; [2] Buzzini *et al.,* 2003 ; [3] Ravasio *et al.,* 2018 ; [4] Roy et Kumar, 2019 ; [5]Grondin *et al.,* 2017; [6] Gethins *et al.,* 2014 ; [7] Isleten *et al.,* 2018

Tableau III. Levures non- *Saccharomyces* et composés organiques volatils produits (COVs) lors de la croissance sur milieu de culture synthétique (6/8)

Levures	COVs associés		Réf.
Pichia kluyveri	ACIDES :	Acide 2-méthylbutanoïque ; acide 2-méthylpropanoïque ; acide 3-méthylbutanoïque ; acide butanoïque	[1,3]
	ALCOOLS :	2-éthylhexanol ; 2-méthylbutanol ; 2-phényléthanol ; 3-méthylbutanol ; butanol ; acool isoamylique ; propanol ; 2-méthylpropanol	
	CARBONYLES :	2-phényléthanal	
	ESTERS :	Ethanoate de 2-phényléthyle ; propanoate de 2-phényléthyle ; éthanoate d'isoamyle ; octanoate d'éthyle ; propanoate de pentyle ; acétate de butyle ; dec-*4E*-énoate d'éthyle ; 2-méthylbutanoate d'éthyle ; acétate d'éthyle ; butanoate d'éthyle ; décanoate d'éthyle ; dodécanoate d'éthyle ; heptanoate d'éthyle ; hexadécanoate d'éthyle ; hexanoate d'éthyle ; isovalerate d'éthyle ; acétate d'isobutyle ; butanoate d'isobutyle ; 2-méthylpropanoate d'éthyle	
Pichia kudriavzevii	ALCOOLS :	2-phényléthanol ; 3-méthylbutanol ; éthanol	[1]
	ESTERS :	Ethanoate de 2-éthylhexyle ; éthanoate de 2-méthylpropyle ; éthanoate de 2-phényléthyle ; éthanoate d'isoamyle	
Pichia manshurica	ALCOOLS :	2-éthylhexanol ; 2-méthylbutanol ; 2-phényléthanol ; 3-méthylbutanol	[1]
	ESTERS :	Ethanoate de 2-méthylpropyle ; éthanoate de 2-phényléthyle ; butanoate d'isoamyle ; éthanoate d'isoamyle ; éthanoate de butyle ; propanoate de pentyle	
Pichia membranifaciens	ALCOOLS :	Alcool isoamylique; pentanol ; butanol ; furanéol ; 2-furanméthanol ; 2-phényléthanol ; 3-(méthylthio)-1-propanol	[2,3]
	ESTERS :	Acétate d'isobutyle ; acétate d'isoamyle ; acétate de 2-méthylbutyle ; propanoate d'isoamyle ; acétate de benzyle	
Pichia mississipiensis	ALCOOLS :	Alcool isoamylique ; pentanol	[2]
	ESTERS :	Acétate d'isoamyle	
Pichia nakazawae	ALCOOLS :	Alcool isoamylique ; pentanol	[2]
	ESTERS :	Acétate d'isoamyle	
Pichia pastoris	CARBONYLES :	Benzaldéhyde	[4]
Pichia pini	ALCOOLS ;	Alcool isoamylique ; pentanol	[2]
	ESTERS :	Acétate d'isoamyle	

[1] Grondin *et al.,* 2015 ; [2] Buzzini *et al.,* 2003 ; [3] Ravasio *et al.,* 2018 ; [4] Roy et Kumar, 2019 ; [5]Grondin *et al.,* 2017; [6] Gethins *et al.,* 2014 ; [7] Isleten *et al.,* 2018

Tableau III. Levures non- *Saccharomyces* et composés organiques volatils produits (COVs) lors de la croissance sur milieu de culture synthétique (7/8)

Levures	COVs associés		Réf.
Pichia spartinae	ALCOOLS :	Alcool isoamylique ; pentanol	[2]
Rhotorula glutinis	ALCOOLS :	2-éthylhexanol ; 2-méthylbutanol ; 2-phényléthanol	[1]
Rhotorula mucilaginosa	ALCOOLS :	2-éthylhexanol ; 2-méthylbutanol ; 2-phényléthanol ; 3-méthylbutanol	[1]
	ESTERS :	Ethanoate de 2-éthylhexyle ; 2-méthylpropanoate de 2-méthylbutyle	
Saccharomyces cerevisiae	ALCOOLS :	2-éthylhexanol ; 2-méthylpropanol ; 2-phényléthanol ; 3-méthylbutanol ; 3-(méthylthio)-1-propanol ; éthanol ; butanol ; furanéol ; alcool isoamylique ; propanol	[1,3-4,6]
	ESTERS :	Ethanoate de 2-éthylhexyle ; éthanoate de 2-phényléthyle ; butanoate de butyle ; acétate d'isoamyle ; acétate d'éthyle ; caproate d'éthyle ; caprylate d'éthyle	
Saprochaete fungicola	ALCOOLS :	2-éthylhexanol ; 2-méthylbutanol ; 2-méthylpropanol ; 2-phényléthanol ; 3-méthylbutanol	[5]
Saprochaete gigas	ALCOOLS :	2-phényléthanol ; 3-méthylbutanol	[5]
	ESTERS :	2-méthylpropanoate d'éthyle ; 3-méthylbutanoate d'éthyle ; propanoate d'éthyle	
	ESTERS α-INSATURES :	Tiglate d'éthyle ; 3-méthylbut-2-énoate d'éthyle	
Saprochaete quercus	ALCOOLS :	2-éthylhexanol ; 2-méthylbutanol ; 2-phényléthanol ; 3-méthylbutanol	[5]
	ESTERS :	2-méthylbutanoate d'isobutyle ; isobutyrate d'isobutyle ; isovalérate d'isobutyle ; 3-méthylbutanoate d'isoamyle ; 3-méthylbutanoate de butyle ; éthanoate d'éthyle ; octanoate d'éthyle ; 3-méthylbutanoate de pentyle ; propanoate de pentyle	
	ESTERS α-INSATURES :	Tiglate d'isobutyle ; tiglate d'éthyle	
Saprochaete japonica	ALCOOLS :	2-phényléthanol ; 3-méthylbutanol	[5]
Saprochaete suaveolens	ALCOOLS :	2-méthylbutanol ; 2-phényléthanol ; 3-méthylbutanol ; butanol	[1,4-5]
	ESTERS :	2-méthylpropanoate de 2-méthylbutyle ; 2-méthylpropanoate d'éthyle ; butanoate de 2-méthylbutyle ; éthanoate de 2-méthylbutyle ; 2-méthylbutanoate d'isobutyle ; isobutyrate d'isobutyle ; isovalérate d'isobutyle ; butanoate de 2-méthylpropyle ; éthanoate de 2-méthylpropyle ; 2-méthylbutanoate d'isoamyle ; 3-méthylbutanoate d'isoamyle ; butanoate d'isoamyle; éthanoate d'isoamyle ; propanoate d'isoamyle; 2-méthylbutanoate de butyle ; 3-méthylbutanoate de butyle ; 2-méthylbutanoate d'éthyle ; 3-méthylbutanoate d'éthyle; acétate d'éthyle ; butanoate d'éthyle ; éthanoate d'éthyle ; propanoate d'éthyle ; 3-méthylbutanoate de pentyle ; propanoate de pentyle	
	ESTERS α-INSATURES :	Tiglate d'isobutyle ; tiglate d'isoamyle ; tiglate de butyle ; tiglate d'éthyle ; 3-méthylbut-2-énoate d'éthyle ; but-2-énoate d'éthyle	

[1] Grondin *et al.,* 2015 ; [2] Buzzini *et al.,* 2003 ; [3] Ravasio *et al.,* 2018 ; [4] Roy et Kumar, 2019 ; [5]Grondin *et al.,* 2017; [6] Gethins *et al.,* 2014 ; [7] Isleten *et al.,* 2018

Tableau III. Levures non- *Saccharomyces* et composés organiques volatils produits (COVs) lors de la croissance sur milieu de culture synthétique (8/8)

Levures	COVs associés		Réf.
Sporidiobolus pararoseus	ACIDES	Acide 3-méthylbutanoïque	[1]
	ALCOOLS :	2-phényléthanol ; 3-méthylbutanol	
	ESTERS :	Ethanoate de 2-éthylhexyle ; éthanoate de 2-phényléthyle ; éthanoate d'isoamyle ; propanoate d'isoamyle	
Torulaspora delbrueckii	ALCOOLS :	2-phényléthanol ; 3-méthylbutanol ; 3-méthylthiopropanol ; éthanol ; alcool isoamylique ; pentanol	[1-3]
	ESTERS :	3-méthylbutanoate de 2-phényléthyle ; butanoate de 2-phényléthyle ; éthanoate de 2-phényléthyle ; propanoate de 2-phényléthyle ; éthanoate d'isoamyle ; propanoate d'isoamyle ; acétate de butyle ; déc-4*E*-ènoate d'éthyle ; 2-méthylbutanoate d'éthyle ; acétate d'éthyle ; butanoate d'éthyle ; décanoate d'éthyle ; dodécanoate d'éthyle ; heptanoate d'éthyle ; hexadécanoate d'éthyle ; hexanoate d'éthyle ; isovalérate d'éthyle ; octanoate d'éthyle ; butanoate d'isobutyle ; 2-méthylpropanoate d'éthyle	
Trichosporon asteroides	ALCOOLS :	Alcool isoamylique ; pentanol	[2]
Wickerhamomyces anomalus	ALCOOLS :	Butanol ; alcool isoamylique ; propanol ; 2-méthylpropanol ; 2-phényléthanol	[3]
	ESTERS :	Acétate de butyle ; 2-méthylbutanoate d'éthyle ; acétate d'éthyle ; butanoate d'éthyle ; décanoate d'éthyle ; dodécanoate d'éthyle ; heptanoate d'éthyle ; hexadécanoate d'éthyle ; hexanoate d'éthyle ; isovalérate d'éthyle ; octanoate d'éthyle ; acétate d'isoamyle ; butanoate d'isobutyle ; acétate de 2-phényléthyle ; propanoate de 2-méthylbutyle	
Williopsis californica	ALCOOLS :	Alcool isoamylique ; pentanol	[2]
	ESTERS :	Acétate d'isobutyle ; acétate d'isoamyle ; acétate de 2-méthylbutyle	
Zygosaccharomyces bisporus	ALCOOLS :	Butanol ; furanéol ; alcool isoamylique ; propanol ; 2-furanméthanol ; 2-méthylpropanol ; 2-phényléthanol	[3]
	ESTERS :	Acétate de butyle ; déc-4*E*-énoate d'éthyle ; 2-méthylbutanoate d'éthyle ; acétate d'éthyle ; butanoate d'éthyle ; décanoate d'éthyle ; dodécanoate d'éthyle ; heptanoate d'éthyle ; hexadécanoate d'éthyle ; hexanoate d'éthyle ; octanoate d'éthyle ; acétate d'isoamyle ; acétate d'isobutyle ; butanoate d'isobutyle ; acétate de 2-phényléthyle ; thioacétate de méthyle	
Zygosaccharomyces mellis	ALCOOLS :	Butanol ; furanéol ; alcool isoamylique ; propanol ; 2-furanméthanol ; 2-méthylpropanol ; 2-phényléthanol ; 3-(méthylthio)-1-propanol	[3]

[1] Grondin *et al.,* 2015 ; [2] Buzzini *et al.,* 2003 ; [3] Ravasio *et al.,* 2018 ; [4] Roy et Kumar, 2019 ; [5]Grondin *et al.,* 2017; [6] Gethins *et al.,* 2014 ; [7] Isleten *et al.,* 2018

Enfin, comme le montre la Figure 5, les classes de COVs produites par ces levures ne sont également pas homogènes. En effet, seule la production d'alcool (autre que l'éthanol) semble être commune à leur production de COVs puisque 100% des souches citées dans la littérature en produit. Bien que non-universelle, la production d'esters semble également être fréquente chez les levures non-*Saccharomyces* puisqu'on la retrouve chez plus de 66% des souches citées dans la littérature. A contrario, la production d'acides, de carbonyles, de terpènes et d'esters α-insaturés semble bien plus anecdotique chez les levures non-*Saccharomyces*.

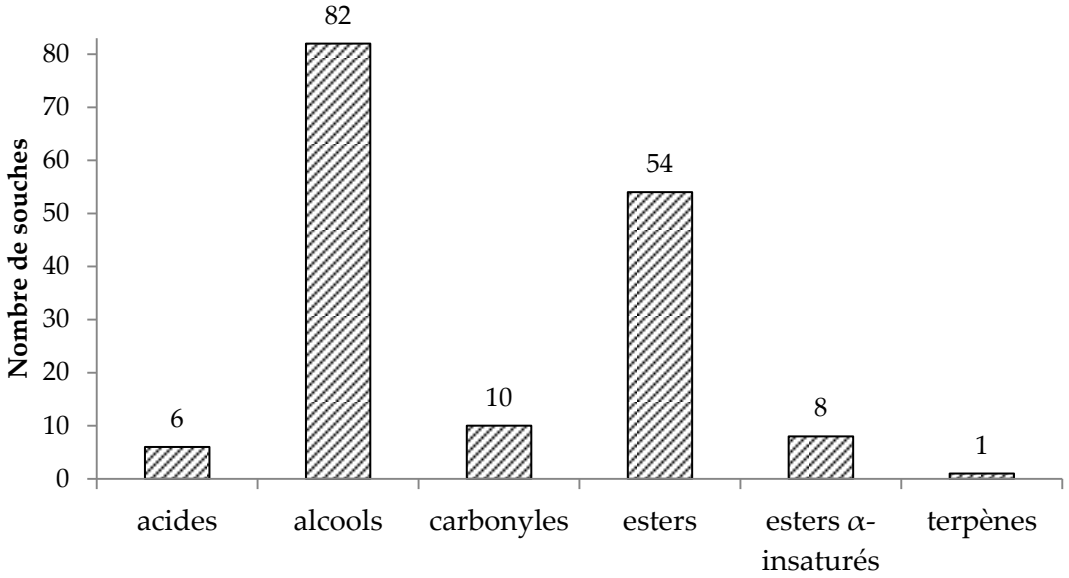


Figure 5. Nombre de souches levuriennes produisant des acides, des alcools, des carbonyles, des esters, des esters α-insaturés et des terpènes parmi les 82 souches de levures investiguées dans la littérature. Le détail des souches ainsi que des COVs produits sont listés en Tableau III.

La production et la diversification des COVs par les levures non-*Saccharomyces* sont donc espèces dépendantes. Certaines espèces sont d'ailleurs étudiées de façon plus approfondies pour leur production d'arômes. C'est notamment le cas des souches *Pichia kluyverii, Torulaspora delbrueckii* et *Saprochaete suaveolens* qui, avec plus d'une trentaine de COVs déjà décrits, sont aujourd'hui au cœur des travaux de recherches sur la production d'arômes par les levures non-*Saccharomyces*.

3.2. Les levures des genres *Saprochaete*, *Geotrichum* et apparentés, sources d'esters α-insaturés

Les genres *Saprochaete* et *Geotrichum* sont des levures très proches qui possèdent des téléomorphes dans les genres *Magnusiomyces* (pour *Saprochaete)* et *Dipodascus* et *Galactomyces* (pour *Geotrichum*). Ce sont des organismes ubiquitaires de l'environnement qui ont été retrouvés dans le sol, le fumier, les produits laitiers, à la surface des fruits et des plantes mais aussi sur la peau et dans le tube digestif des hommes et des animaux. Bien qu'aujourd'hui l'espèce de levure la plus étudiée dans ces genres est *Geotrichum candidum*, de nombreuses études ont fait état de l'intérêt de nombreux autres *Geotrichum* et *Saprochaete* en production d'arômes (Bonnarme *et al.,* 2001; de Oliveira *et al.,* 2013; Mdaini *et al.,* 2006; Zhu *et al.,* 2016).

Récemment, une étude menée au laboratoire par Grondin *et al.,* (2017) a mis en évidence les COVs produits par un grand nombre de levures des genres *Saprochaete et Geotrichum* et d'espèces qui y sont apparentées. Les données de cette étude sont regroupées dans le Tableau III. L'étude a montré que l'ensemble des souches investiguées produit au moins 2 COVs différents sous forme d'alcool et/ou d'esters. Plus surprenant, alors que la production d'esters α-insaturés par des souches de levure avait été observée uniquement chez *G. candidum*, *S. suaveolens* et *G. klebahnii* (Farbood *et al.,* 1992; 1987; Pinotti *et al.,* 2006) avant cette étude, Grondin *et al.* (2017) a permis de mettre en évidence l'existence totale de 8 souches levuriennes (dont 5 *Geotrichum spp.* et 3 *Sapraochete spp.*) productrices d'esters α-insaturés (Figure 5 et Figure 6).

Les esters α-insaturés sont très appréciés en agro-alimentaire en raison de leurs arômes fruités. Par exemple, la présence de tiglate d'éthyle (2-méthylbut-2*E*-énoate d'éthyle) à des teneurs très faibles (inférieurs à 20 ppm) apporte des notes de framboise, de fraise ou d'ananas. A notre connaissance, cette molécule n'est pas produite par voie microbienne en industrie. La production d'esters α-insaturés par certaines espèces des genres *Geotrichum* et *Saprochaete* constitue donc une

particularité très prometteuse pour les industries de production d'arômes, à condition d'optimiser leur production par ces levures.

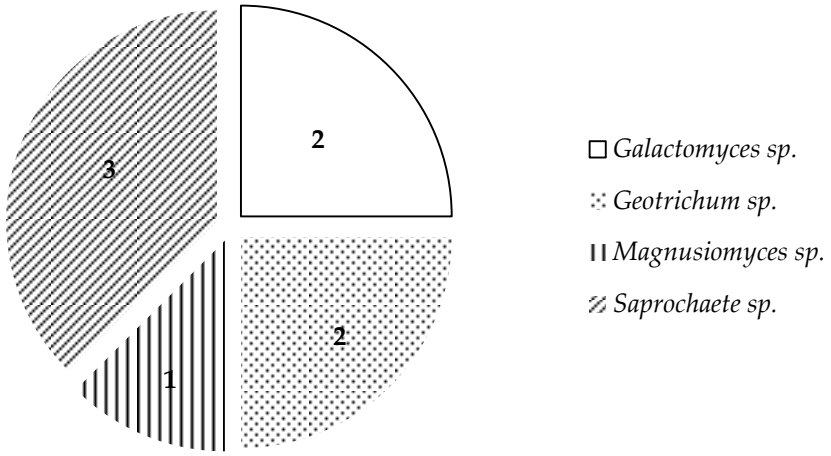


Figure 6. Nombre de levures non-conventionelles (triées par genre) issues de la litérature produisant des esters α-insaturés.

3.3. *Saprochaete suaveolens*, un organisme levurien de choix pour la production d'arômes

3.2.1. La levure *Saprochaete suaveolens*

Saprochaete suavolens est une espèce de levure filamenteuse de la division des Ascomycètes, de la classe des Saccharomycètes et de l'ordre des Saccharomycetales qui forme des colonies membraneuses blanches. Anciennement nommée *Geotrichum fragrans,* cette souche ubiquitaire de l'environement a été isolée à partir de nombreuses sources riches en nutriments telles ques les eaux usées ou les fruits comme le pitaya (Damasceno *et al.,* 2003; Grondin *et al.,* 2015a) et a été largement décrite comme une excellente productrice de COVs. Son bouquet aromatique se caractérise notamment par des composés ayant des arômes fruités intenses comme le 2-méthylbutanoate d'éthyle, l'isovalérate d'éthyle ou l'octanoate d'éthyle produits à partir d'acides aminés et d'acides gras *via* les voies d'Ehrlich et de la β-oxydation des acides gras respectivement. (Damasceno *et al.,* 2003; Grondin *et al.,* 2017; Grondin *et al.,* 2015a; 2015b; İşcan *et al.,* 2015)

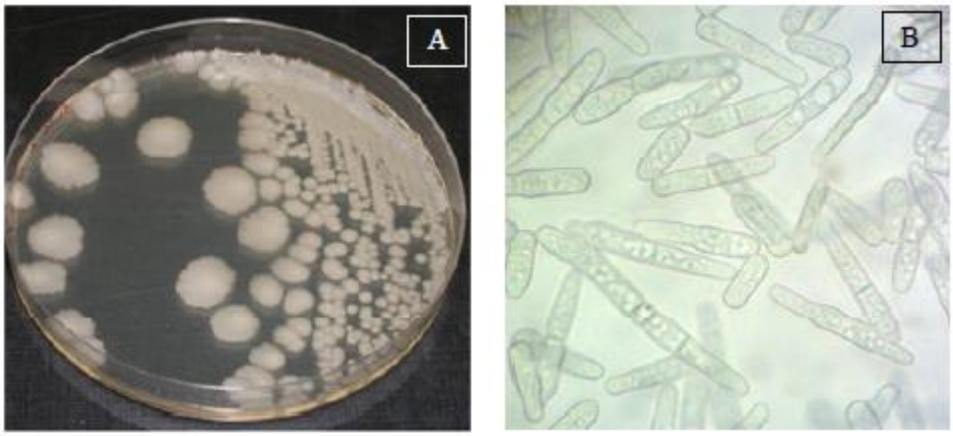


Figure 7. Observations macroscopique(A) et microscopique (B) (Grossissement *400) de la levure *Saprochaete suaveolens* cultivée sur milieu synthétique (tiré de Grondin, 2014)

En effet, avec 36 différentes molécules volatiles produites sur milieu synthétique, *S. suaveolens* est la levure non-*Saccharomyces* ayant la plus grande diversité de COVs décrites dans la littérature. Plus intéressant encore, elle est capable de produire sept composés α-insaturés différents dont la production peut être accrue par supplémentation de l'acide aminé correspondant (Grondin *et al.,* 2017; Grondin *et al.*, 2015b). D'ailleurs, dans une étude menée au laboratoire sur cette souche, il a été montré qu'une supplémentation en isoleucine d'1g.L^{-1} peut générer une production de 100 mg.L^{-1} de tiglate d'éthyle par *S. suaveolens,* alors que cette production ne dépasse pas 1 mg.L^{-1} dans un milieu non supplémenté (Grondin *et al*. 2015b).

Ainsi, de part sa capacité globale de production et sa diversité en COVs, la levure *S. suaveolens* est une souche de choix pour la production d'arômes naturels. De plus, la compréhension de la voie de production des esters α-insaturés chez cette levure est intéressante tant du point de vue fondamental qu'appliqué. De ce fait, au cours de ce travail de thèse, l'un des objectifs était de séquencer une souche de *S. suaveolens*. Néanmoins, le séquencage de cette dernière a été publié récemment par une autre équipe de recherche s'intéressant à cette souche de levure (Lichancová *et al.,* 2019).

3.2.2. Voie de production des esters α-insaturés chez *S. suaveolens*

En 2015, en se basant sur la voie de production du tiglate d'éthyle chez la pomme, Grondin *et al.,* (2015b) ont montré que ces esters α-insaturés sont des co-produits du catabolisme des acides aminés branchés via la voie de la β-oxydation permettant ainsi la production d'acétyl-CoA à partir de ces acides aminés (Grondin *et al*. 2015b). Les acétyl-CoA résultant pouvant ensuite incorporer le cycle de Krebs et le shunt glycoxylique, cette voie, qui a déjà été identifiée chez des champignons filamenteux mais non chez les levures du genre *Saccharomyces* permet donc à *S. suaveolens* de se développer sur des milieux contenant que des acides aminés branchés comme source de carbone selon le schéma présenté en Figure 8.

Brièvement, pendant cette métabolisation, les α-cétoacides branchés subissent une décarboxylation oxydative catalysée par une déshydrogénase d'α-cétoacide branchée (*branched chain α-ketoacid*, BCKAD) suivie d'une déshydrogénation par une déshydrogénase d'Acyl-CoA (*acyl-CoA dehydrogenase,* ACyD) pour former un intermédiaire enoyl-CoA. Cet intermédiaire peut ensuite intégrer la voie classique de la β-oxydation des acides gras (Figure 4) ou être esterifié en esters α-insaturés sous l'action d'une alcool acétyltransférase (AAT).

3.2.3. Vers une optimisation de production globale des COVs par la levure *S. suaveolens*

La Figure 8 montre que chez la levure *S. suaveolens*, le catabolisme des acides aminés branchés abouti également à la production de composés organiques volatils directement par la voie d'Ehrlich ou par une estérification de l'intermédiaire enoyl-CoA de la voie de la β-oxydation. Ainsi, bien que d'un point de vue adaptatif la capacité de développement de *S. suaveolens* sur des milieux comportant uniquement des acides aminés branchés comme source de carbone soit intéressante, d'un point de vue purement biotechnologique, elle entraine une diminution globale du rendement possible en composés organiques volatils de la souche.

En prenant en compte ces considérations, il semblerait donc qu'il soit possible d'optimiser la production de composés d'arômes chez la levure *S. suaveolens* en lui retirant la capacité de métaboliser les acides aminés branchés *via* la voie de la β-oxydation. En effet, au regard de la voie métabolique présenté en Figure 8, une inactivation de l'enoyl-CoA hydratase chez *S. suaveolens* devrait permettre d'induire une accumulation des composés de type enoyl-CoA et par conséquent une augmentation de leur esterification en esters α-insaturés. Ce type d'inactivation peut être obtenu par mutagénèse et fera l'objet du chapitre III de cette thèse.

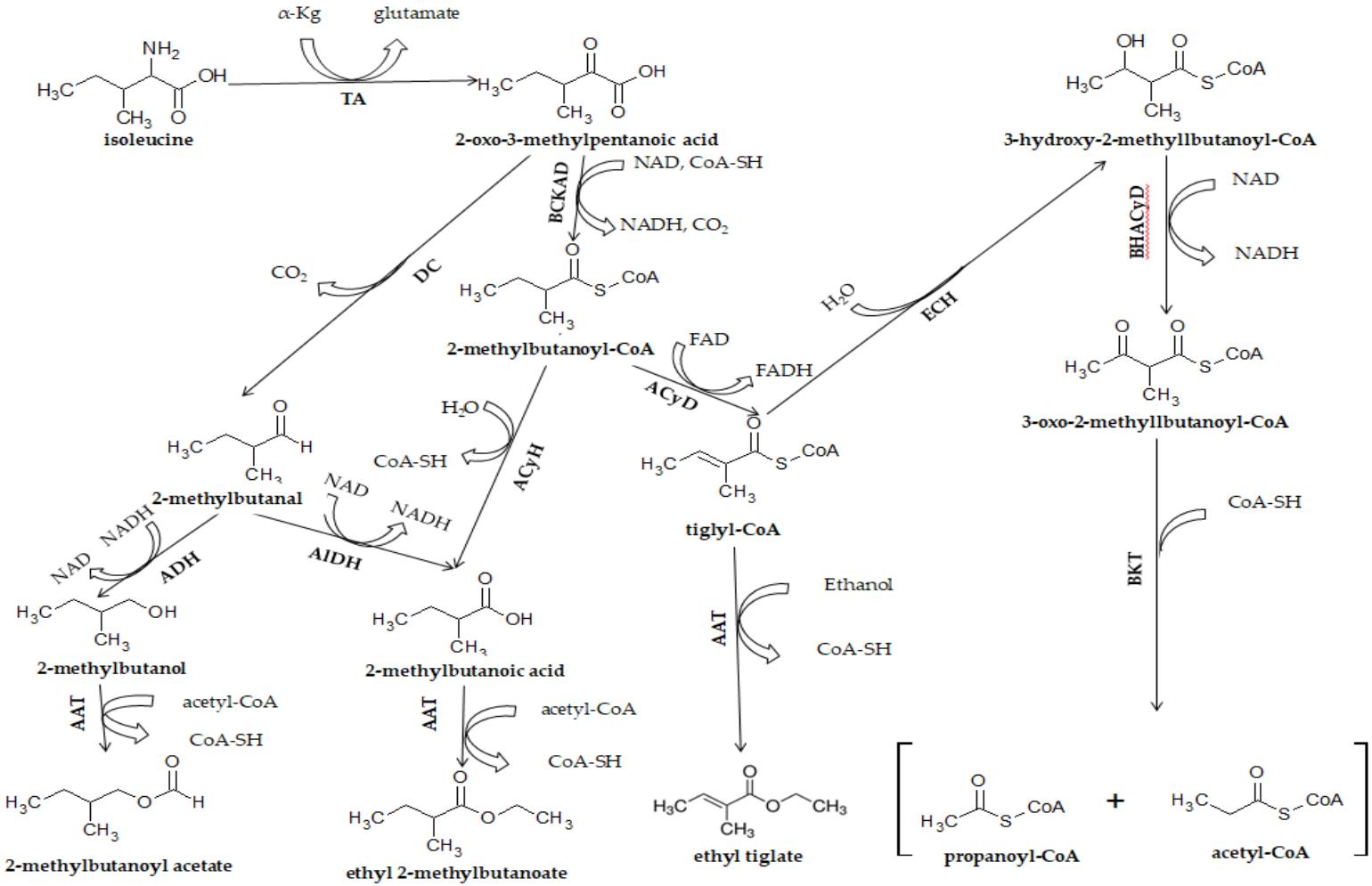


Figure 8. Métabolisme de l'isoleucine en divers esters chez la levure *S. suaveolens* (Adapté de Grondin *et al.*, 2015b). TA : Transaminase ; DC : Decarboxylase ; BCKAD : Branched-chain α-keto acid dehydrogenase ; ACyH : Acyl-CoA hydrolase ; AAT : Alcool Acyltransferase ; ACyD : Acyl-CoA dehydrogenase ; AlDH : Aldehyde dehydrogenase ; ADH : Alcool dehydrogenase ; ECH : Enoyl-CoA hydratase ; BHACyDH : β-acyl-CoA dehydrogenase ; BKT : β-keto-acyl-CoA thiolase.

II. Amélioration des souches levuriennes par mutagenèse

L'immense diversité des levures naturelles offre une multitude de possibilités de production de composés (éthanol, lipides, arômes, etc.) ou de caractéristiques propres (résistance à l'éthanol ou à la température, osmotolérance etc.) particulièrement intéressantes pour des applications biotechnologiques. Cependant, dans la nature, la production de ces composés ou le dévelopement de ces caractéristiques par les levures ne sont régis que par la survie de ces dernières et peuvent, dans certains cas ne pas leur être essentiel. De ce fait, pour des applications industrielles, une optimisation de ces productions ou caractéristiques est souvent nécessaire. C'est pourquoi de nombreuses techniques visant à améliorer ces capacités par introduction de mutations génétiques au sein du génome de l'organisme à améliorer ont été mises en place au cours du temps (Steensels *et al.,* 2014). Parmi elles, la mutagenèse UV tient une place de choix.

1. Les mutations génétiques

1.1. Mécanisme d'apparition des mutations génétiques

Les mutations génétiques sont des modifications rares mais stables de l'information génétique qui peuvent apparaitre spontanément au sein d'un organisme vivant ou y être induits de façon dirigée ou aléatoire (McGregor, 1999).

Ces modifications résultent d'erreurs non corrigées de réplication de l'ADN qui peuvent concerner un seul ou un ensemble de nucléotides et impacter plus ou moins fortement la fonctionalité de la protéine codée (McGregor, 1999; Fleck, 2004). En effet, lorsqu'une erreur apparait pendant la réplication de l'ADN, des nucléases, protéines associées au complexe enzymatique de l'ADN polymérase, peuvent réparer l'erreur à l'aide de cinq systèmes de réparation présentés en Tableau IV. Lorsque la séquence nucléotidique est trop altérée, ou si les cassures sont trop nombreuses, la cellule peut

utiliser un dernier recours pour réparer l'erreur. Le système de réparation rajoute alors aléatoirement des séquences de nucléotides complémentaires pouvant conduire à la mort de la cellule ou à des processus de cancérisation.

Tableau IV. Systèmes de réparation majeurs de l'ADN

Système de réparation	Mécanismes	References
Répararation de mésapariement *(mismatch repair, MMR)*	• Retrait des mésappariements et des petites boucles d'insertions ou de délation introduites pendant la réplication dans le brin synthétisé	Fleck, 2004
Réparation par excision de nucléotide *(nucleotide excision repair, NER)*	• Système de réparation sans-erreur (*« error-free system*) • Utilisé lorsqu'un seul brin est altéré. • Utilisation du brin non altéré pour réparer l'erreur. • Coupure du brin altété de part et d'autre du nucléotide altéré ou d'un petit fragment contenant ce nucléotide et remplacement de la partie coupée par la séquence nucléotidique complémentaire du brin non altéré.	Fleck, 2004 ; Ikehata et Ono 2011; McGregor, 1999
Réparation par excision de base *(base excision repair, BER)*	• Utilisé lors de la correction de lésions non volumineuses résultats d'alkylaton, d'oxydation ou de désaminations de bases	Fleck, 2004
Réparation par recombinaison homologue *(homologous recombitional repair, HR)*	• Système de réparation sans-erreur (*« error-free system*) • Utilisé lorsque l'ADN est cassé ou lorsque les deux brins sont altérés. • Récupération de l'information à partir de la copie non altérée sur un chromosome homologue	Fleck, 2004
Réparation par jonction d'extremité non homologue *(non-homologous end joining, NHEJ)*	• Utilisée lors de la cassure de l'ADN ou de l'altération des deux brins. • Réparation des extrémités cassées sans utilisation de modèle. • Perte courante de nucléotides	Fleck, 2004

Parfois, les systèmes ne permettent pas la mise en place de deux nucléotides complémentaires l'un en face de l'autre et rendant la correction de l'erreur impossible. Lors de la réplication suivante, le nucléotide incorporé par erreur fait alors partie du brun matrice et dirige l'incorporation de son nucléotide complémentaire. Dès lors, il n'existe plus de nucléotides mal appariés, et le changement dans la séquence d'ADN est définitif et stable. Si la modification

engendrée n'empêche par la survie de la cellule, elle sera transmise stablemement à la génération suivante lors de la division de la cellule. Il s'agit alors d'une mutation génétique.

Dans un grand nombre de cas, les mutations reposent sur l'insertion ou la délétion d'un ou d'un groupe de nucléotides à l'intérieur de la séquence codante du gène. Ce type de mutation provoque en général la perte de la fonctionalité de la protéine qui se retrouve amputée et profondémment modifiée dans sa structure. Dans le cas d'une mutation ponctuelle où seul un nucléotide a été substitué (changement d'un nucléotide pour un autre), l'impact de la mutation est généralement moins marqué et la protéine correspondante peut encore être fonctionnelle si c'est une mutation silencieuse ou altérée, ou inactive si c'est une mutation qui provoque un *frameshift* et aboutit à une synthèse d'une protéine tronquée.

1.2. Rôle des mutations dans l'évolution des espèces

Au début du XXème siècle, après avoir mené 13 ans d'étude sur une espèce originale d'onagre « *Oenothera lamarckiana* », Hugo de Vries (1848-1935), un botaniste hollandais a découvert que les descendants de l'espèce mère de *O. lamarckiana* présentaient de nombreuses variantes phénotypiques. De Vries a ainsi montré que les variations phénotypiques pouvaient soit être mineures et former de nouvelles variétés de l'espèce de *O. lamarckiana*, soit être si différentes de l'espèce originale qu'elles formaient de nouvelles espèces du genre *Oenothera*. Pour expliquer l'apparition de ces nouvelles variétés et espèces, De Vries avança le possible rôle des évènements mutationnels simples et fut ainsi le premier à développer la théorie de l'évolution par les mutations (de Vries, 1909; 1910).

Les travaux de Vries ont été contestés pendant des années mais les données génomiques récentes semblent appuyer sa théorie. En effet, de nombreuses études montrent que, bien que le rôle de la sélection naturelle ne soit pas négligeable, les

mutations génétiques sont essentielles dans les phénomènes de spéciation et d'évolution des espèces (Nei et Nozawa, 2011; Safran et Nosil, 2012). Plus intéressant encore, certaines études appuient l'idée que les mutations seraient une réponse directe des pressions environnementales subies par l'organisme. Ce phénomène est aujourd'hui appelé « mutation adaptative » et est défini comme le procédé par lequel des pressions sélectives non léthales entrainent des mutations permettant à l'organisme de s'adapter progressivement aux pressions qui lui sont imposées (Foster, 2000).

Ainsi, même si les mutations génétiques résultent d'une erreur initiale de réplication de l'ADN, ces mutations, lorsqu'elles ne sont pas mortelles peuvent être à l'origine de nouvelles espèces présentant des propriétés et des caractéristiques mieux adaptées à l'environnement dans lequel elles évoluent.

1.3. Les méthodes de mutagenèse : des procédés dirigés ou aléatoires

Les mutations génétiques pouvant être à l'origine d'espèces présentant des caractéristiques biotechnologiques plus intéressantes que l'espèce originale, de nombreuses techniques permettant l'induction volontaire de mutations génétiques au sein des organismes ont été publiées. Ces techniques sont appelées mutagenèse et peuvent être regroupées en deux classes : les mutagenèses dirigées et les mutagenèses aléatoires.

Les mutagenèses dirigées consistent à introduire une mutation génétique d'une nature particulière dans un endroit précis du génome de l'organisme à modifier. Ces techniques, en plus de permettre la diversification des espèces au sein des organismes, sont d'une importance majeure dans le domaine de la biologie moléculaire puisqu'elles permettent d'étudier plus facilement les fonctions des gènes chez les organismes. Par contre, pour pouvoir être appliquées, elles nécessitent une connaissance préalable du génome de l'organisme à modifier. Par opposition, les mutagenèses aléatoires consistent en l'introduction non-dirigée de mutations

ponctuelles dans un organisme. Aujourd'hui, ces techniques sont majoritairement utilisées pour modifier les caractéristiques génétiques et physiologiques de l'organisme à muter.

L'article 2 de la directive 2001/18/CE du parlement européen et du conseil du 12 mars 2001 désigne tout « organisme, à l'exception des êtres humains, dont le matériel génétique a été modifié d'une manière qui ne s'effectue pas naturellement par multiplication et/ou par recombinaison naturelle » comme organisme génétiquement modifié (OGM) soumis à une réglementation stricte. Cependant, cette réglementation ne concerne pas les OGM issus « (1) de la mutagenèse et (2) de la fusion cellulaire (y compris la fusion de protoplastes) de cellules végétales d'organismes qui peuvent échanger du matériel génétique par des méthodes de sélection traditionnelles ». Par conséquent les organismes obtenus par mutagenèse dirigée et alétoire n'étaient pas concernés par cette directive (Le Parlement européen et le Conseil de l'Union européenne, 2001). Néanmoins, suite à un litige opposant la Confédération paysanne et d'autres associations au premier ministre à propos de la culture et de la commercialisation de plantes obtenues par mutagenèse depuis 2016, la Cour de Justice de l'Union européenne (CJUE) a conclu dans son arrêt du 25 juillet 2018 que les OGM obtenus par mutagenèse dirigée ne sont pas exemptés des termes de la directive 2001/18/CE (Brosset et Noiville, 2019).

Ainsi, aujourd'hui la reglementation stricte relative aux OGM s'applique aux organismes obtenus par mutagenèse dirigée mais non à ceux obtenus par mutagenèse aléatoire, permettant d'introduire les organismes obtenus par cette dernière méthode plus facilement dans le process industriel (Arora *et al.,* 2020).

2. Les techniques de mutagenèse aléatoire

2.1. Généralités

2.1.1. Les mutagenèse physiques et chimiques

Les mutagenèses aléatoires sont réalisées par l'action d'agents mutagènes chimiques ou physiques, permettant d'augmenter la fréquence de mutation de 100 fois par gène sans provoquer de mortalité excessive des cellules (Winston, 2008). Ces techniques sont particulièrement intéressantes car elles nécessitent des outils simples et quelques manipulations peu onéreuses. De plus, contrairement aux techniques de mutagenèse dirigée, elles sont applicables aux organismes dont le génome n'est pas entièrement connu. Il existe deux grands types de mutagenèse aléatoire : les mutagenèses chimiques pour lesquelles l'agent mutagène utilisé est un composé chimique et les mutagenèses physiques pour lesquelles on utilise un agent mutagène physique. La liste des agents chimiques et physiques capables de générer des altérations génétiques est présentée dans le Tableau V.

Les agents chimiques réagissent avec l'ADN et peuvent ainsi causer des erreurs d'appariement des bases, la désamination des purines, ainsi que des transitions, des transversions et des mutations de décalage du cadre de lecture (Arora *et al.,* 2020; Bose, 2014; Steensels *et al.,* 2014). Ces composés, peuvent être classés en 4 catégories : les agents intercalants (orange acridine, bromure d'éthidium, proflavine et acriflavine), les agents alkylants (méthanesulfonate d'éthyle, méthanesulfonate de méthyle, sulphate de diéthyle, N-méthyl-N-nitro-N-nitrosoquanidine), les agents non alkylants (formaldéhyde, hydroxylamine, méthoxyamine, acide nitrique, bisulfite et hydrazine) et les agents analogues des bases puriques (5-bromouracile, 5-bromodéoxyrudinine, 2-aminopurine).

Les agents physiques agissent directement avec l'ADN ou entrainent la formation de composés susceptibles d'endommager l'ADN après leur formation. Il

s'agit essentiellement de radiations (UVs, ioniques, X et γ) ou de plasma à pression et température atmosphérique (Arora *et al.*, 2020; Bose, 2014; Steensels *et al.*, 2014).

Tableau V. Agents chimiques et physiques communément utilisés en mutagenèse aléatoire et altérations génétiques majeures associées

Agents mutagènes	Altérations génétiques	Références
Chimiques		
Agents intercalants	Insertion dans l'ADN entrainant un décalage du cadre de lecture	Arora *et al.*, 2020 ; Bose, 2014
Agents alkylants	Depurination et erreur d'appariement de base dans l'ADN	Arora *et al.*, 2020; Bose, 2014; Steensels *et al.*, 2014
Agents non alkylants	Formation de réticulation entre l'ADN et les protéines ; délétions ; déamination	Arora *et al.*, 2020
Agents analogues des bases puriques	Transitions des bases	Arora *et al.*, 2020
Physiques		
Rayons UV (250-290nm)	Formation de dimers de thymine qui cause la transition de guanine et cytosine en adenine et thymine ; deletion de pairs de base A-T dans l'ADN	Arora *et al.*, 2020; Steensels *et al.*, 2014
Rayons ioniques	*Utilisation de* $^{12}C^{6+}$*:* Cassure double brin de l'ADN ; substitutions des bases, petitse delétions et insertions *Utilisation de* N^{+} *:* Formation de radicaux libres qui endommagent l'ADN.	Arora *et al.*, 2020; Steensels *et al.*, 2014
Rayons γ (^{60}Co)	Formation de dérivés réactifs de l'oxygène (O_2^-, OH, H_2O_2 et $^1O_2$) qui endommagent l'ADN.	Arora *et al.*, 2020
Rayons X		Arora *et al.*, 2020
Plasma à pression et température atmosphérique (PPTA)	Dommages subléthaux sur l'ADN, les activités enzymatiques et le métabolisme des cellules microbiennes	Arora *et al.*, 2020

Il est à noter ici que certaines approches de mutagenèse aléatoire peuvent être controversées. Par exemple, les souches mutées obtenues par les méthodes de mutagenèse chimique sont de moins en moins acceptées par les consommateurs car elles peuvent causer des problèmes liés à la sécurité des manipulateurs et au respect de l'environnement. C'est pourquoi les techniques de mutagenèse physique sont généralement privilégiées. Parmi elles, la mutagenèse UV, rapide, efficace et non dangereuse pour l'environnement tient une place privilégiée dans la littérature

(Abirami *et al.,* 2018; Arora *et al.,* 2020; Barsoum *et al.,* 2020; Kilbey et James, 1977; Rasmey *et al.,* 2020; Resnick, 1969; Spagnuolo *et al.,* 2019; Yamada *et al.,* 2017b).

2.1.2. Mise en pratique des techniques de mutagenèses aléatoires

En pratique, les techniques de mutagenèses aléatoires sont réalisées par la mise en contact de l'organisme à muter avec l'agent mutagène. Pour ce faire, la mise en place de ces méthodes nécessite une étude préalable permettant de déterminer les conditions optimales d'expositions de la souche à améliorer à l'agent mutagène. En effet, une dose d'exposition trop faible entrainerait une proportion faible de mutants et rendrait l'identification des souches améliorées difficiles alors qu'une dose trop forte permettrait une réduction considérable du nombre de souche à étudier mais pourrait entraîner des mutations multiples possiblement déletères pour la souche (Steensels *et al.,* 2014). C'est pourquoi, les conditions optimales doivent être choisies de façon à favoriser le nombre de souches irradiées portant potentiellement une mutation tout en s'assurant de la survie de la souche. Ce compromis est généralement obtenu lorsque l'exposition de la souche à l'agent mutagène entraine de 50 à 95% de mortalité de la population, les 5 à 50 % de survivants restants étant susceptibles d'avoir contracté une ou plusieurs mutations sur des gènes non essentiels à la survie de la cellule (Spencer et Spencer, 1996).

Bien que le taux de survivant nécessaire soit compris entre 5 et 50% de la population initiale, pour favoriser l'apparition d'un mutant d'intérêt, les méthodes de mutagenèse aléatoire nécessitent souvent une quantité de cellules initiale élevée. Dès lors, des dizaines de milliers de colonies mutées sont générées. Ceci fait de la sélection des cellules mutantes présentant une amélioration dans la voie de bioconversion d'intérêt, une étape sensible et souvent chronophage. Le développement d'une méthode efficace de criblage à haut débit pour sélectionner les souches d'intérêt constitue donc une étape-clé de la production de souches améliorées par mutagenèse aléatoire (Arora *et al.,* 2020).

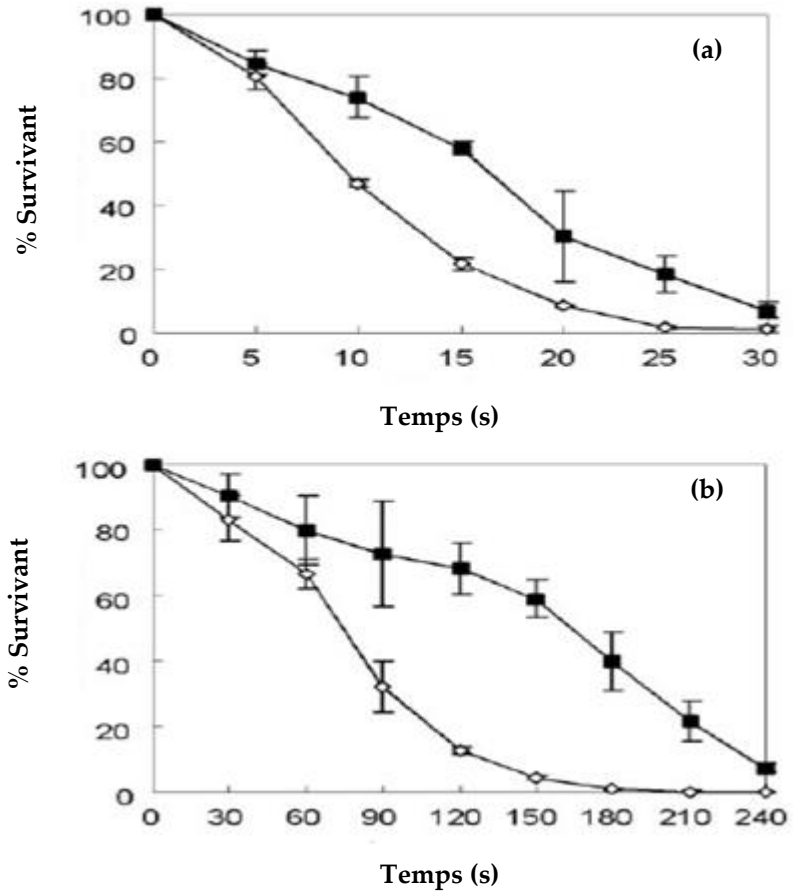


Figure 9. Exemple de suivi de pourcentage de survivant en fonction (a) du temps d'irradiation aux UVs et (b) du temps d'exposition méthylsulfonate d'éthyle d'une souche diploïde (▪) et d'une souche haploïde (◊) (adapté de Hashimoto *et al.*, 2005).

Selon le type d'amélioration recherché, certaines méthodes de criblages spécifiques ont déjà été mises en place et sont couramment employées. Par exemple, l'une des méthodes developées pour la recherche de souches de levures présentant une production accrue de lipides est la méthode de résistance à la cérulénine, un inhibiteur d'acide-gras synthétase (Tableau VI). En effet, la biosynthèse de lipides étant un métabolisme essentiel pour la croissance des cellules, l'inhibition de la cérulénine entraine une réduction marquée de la croissance cellulaire. Ainsi, les souches résistantes à la cérulénine sont reconnues comme susceptibles d'être de bons candidats pour produire des grandes quantités de lipides (Tapia *et al.*, 2012). Cette méthode a notamment été utilisée pour l'optimisation de la production de lipides par

les souches de *Lypomyces starkeyi* et *Rhodosporidium toruloides* (Tapia *et al.,* 2012; Yamada *et al.,* 2017a ; 2017b). De même, en se basant sur les résultats de Mizoguchi *et al.*, (2002) qui a montré que les souches résistantes au chlotrimazole (CTZ) ont une activité fermentaire plus importante dans le saké, une équipe de recherche a pu sélectionner des mutants de *S. cerevisiae* présentant une activité fermentaire accrue pendant la production de saké (Yang *et al.,* 2018).

Plus largement, lorsque la caractéristique à améliorer est une tolérance à un paramètre physico-chimique telles que la concentration à l'éthanol, la pression osmotique ou la température, les méthodes de criblages consistent en la mise en contact des cellules irradiées avec le paramètre à tester et la sélection de cellules capable de se développer dans ce milieu. Par exemple, pour sélectionner des souches mutantes de *S. cerevisiae* plus résistantes à l'éthanol, la capacité de croissance de ses souches irradiées sur un milieu de culture contenant 10% (v/v) d'éthanol a été testée et les souches présentant les vitesses de croissance les plus élevées ont été sélectionnées (Wang *et al.,* 2012).

Aujourd'hui, bien que les méthodes de chromatographie gazeuse (CG) puissent permettre le criblage de souches pour une production d'arômes, ceci serait difficilement réalisable après mutagenèse UV du fait du temps qu'il serait nécessaire pour analyser les dizaines de milliers de souches générées lors de la mutagenèse. Ainsi, à ce jour l'amélioration de la production d'arômes par une souche de levure n'a probablement pas encore été réalisée par mutagenèse aléatoire du fait de l'absence de méthode de criblage à haut débit efficace des souches obtenues. Dans le travail de thèse présenté dans ce document, nous avons pu mettre en place une méthode de criblage rapide mais spécifique à la souche de *S. suaveolens*. Cette méthode sera détaillée dans le chapitre III.

2.2. Mécanisme de la mutagenèse UV

2.2.1. La lumière ultraviolette (UV), un agent mutagène

La source la plus importante de lumière ultraviolette (UV) dans la nature est les radiations solaires, principales causes majeures des cancers de la peau chez l'être humain en raison de leur pouvoir mutagène élevé. En effet, la lumière UV peut entrainer des dommages spécifiques importants dans l'ADN par la formation de lésions à travers des réactions photochimiques dont l'efficacité dépend de la longueur d'onde des rayons. On distingue ainsi trois groupes de rayons selon leur longeur d'ondes et leur niveau énergétique : les UVA (320-400 nm), les UVB (290-320 nm) et les UVC (<290 nm).

Les UVA peuvent être classés en deux sous-groupes : les UVA1 (300-400nm) et les UVA2 (320-340 nm). Ce sont les rayons UV les moins énergétiques qui peuvent quand même induire des modifications de l'ADN de manière indirecte (de Gruijl 1999; Setlow *et al.,* 1993)**.** Les UVB composent le rayonnement UV solaire qui atteint la surface de la Terre. Ces rayonnements pénètrent profondément dans les tissus de la peau et sont directement absorbés par l'ADN. De ce fait, ils sont à l'origine de nombreux cancers de la peau chez l'être humain (Brash *et al.,* 1991; Ikehata et Ono, 2011; Setlow, 1974).

Enfin, les UVC constituent les rayons les plus énergétiques et entrainent des modifications similaires aux UVB sur l'ADN. Cependant, les UVC du rayonnement solaire sont absorbés par la couche d'ozone et n'atteignent pas la surface de la Terre. Du fait de leur forte énergie et de leur grande absorption par l'ADN, les UVC sont les rayons UV les plus adaptés pour induire des mutations au sein d'un organisme. Ce sont ainsi les rayons UV majoritairement utilisés comme agent mutagène en mutagenèse UV.

2.2.2. Les lésions et mutations de l'ADN induites par les UV

Certaines lésions de l'ADN sont propres à l'action des UVs. Par exemple, l'absorption des UVB et UVC par l'ADN peut entrainer une ouverture des doubles brins 5-6 des bases pyrimidiques. Si 2 bases pyrimidiques adjacentes subissent cette ouverture, il peut se former un cycle stable nommé « dimère pyrimidique de cyclobutane » (CPD). De l'autre coté, si le double brin ouvert réagit avec la moitié exocyclique de la base pyrimidique 3' adjacente pour former une liaison covalente 6-4, il se forme une « pyrimidine 6-4 pyrimidone » (64PPs). Après l'absorption d'UVA, les 64PPs peuvent s'isomériser en un produit secondaire nommé « isomère de valence de Dewar ».

Ces trois photolésions altèrent la capacité d'appariement des bases impliquées et peuvent bloquer la transcription et la réplication de l'ADN. Cependant, si le blocage est contourné, la synthèse entraine l'insertion stable d'une base incorrecte en face du site de la lésion sur le nouveau brin d'ADN et résulte en l'incorporation d'une mutation dite UV spécifique telles que les mutations de type « Signature UV » ou « Signature UV-solaire » pour lesquels la substitution des cytosines en thymines (C → T) à des sites dipyrimidiques et, plus rarement, des substitutions de base en tandem CC → TT sont observées (Ikehata et Ono, 2011; McGregor, 1999; Brash *et al.*, 1991).

Les UV peuvent également activer des molécules comme la riboflavine, le tryptophane et la porphyrine et entrainer la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) capables d'attaquer l'ADN en oxydant par exemple la guanine pour former des 8-hydroxyguanine (8OH-G). De plus, ils peuvent oxyder les nucléotides cellulaires pour produire des nucléotides oxydés tels que le 8-hydroxydéoxygunanosine-triphosphate (8-OH-dGTP). Ces nucléotides peuvent ensuite être utilisés comme précurseur pour la synthèse de molécules d'ADN oxydés et entrainer des mutations de « type oxydatif » majoritairement detectées par la

substitution d'une guanine en thymine (G → T) ou de type « empreinte UVA » caractérisé par la substitution de thymine en guanine (T → G).

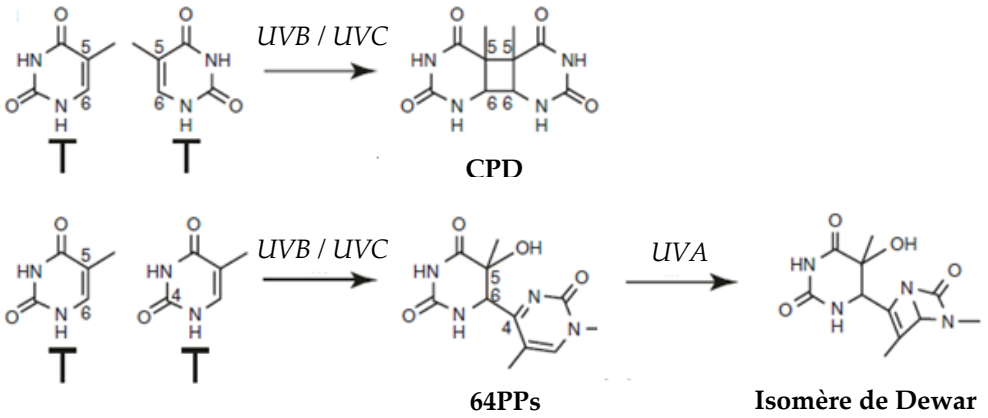


Figure 10. Formation des dimères de pyrimidines après ouvertures de doubles brins 5-6 des pyrimidines sous l'effet d'irradiation UVB ou UVC (adapté de Oak *et al.*, 2018). CPD, dimère pyrimidique de cyclobutane ; 64PPs pyrimidine-6-4-pyrimidone

2.2.3. Application de la mutagenèse UV pour l'optimisation de souches levuriennes

Les rayons UVs étant des agents mutagènes puissants, leur incidence sur la levure modèle *Saccharomyces cerevisiae* a été étudiée et admise dès les années 60 (Resnick, 1969). Aujourd'hui, l'utilisation de la mutagenèse UV pour l'optimisation des souches levuriennes est reconnue comme une méthode de choix. En effet, de nombreux exemples d'optimisation de souche de levure par mutagenèse UV ont été décrits dans la littérature. Certains exemples récents sont présentés en Tableau VI.

Les souches ayant subies des mutagenèses UV les plus citées sont aujourd'hui, sans grande surprise, des souches de *S. cerevisiae*. Ces dernières ont majoritairement été investiguées pour améliorer leur tolérance et/ou leur production d'éthanol afin de les rendre utilisables dans l'élaboration de biofuel ou de boissons alcoolisées. De plus, elles ont servi de souches modèles à l'élaboration de méthodes standardisées de mutagenèse UV, comme celle présentée par Winston en 2008.

Néanmoins la mutagenèse UV a également montré son applicabilité à des

souches de levures non-*Saccharomyces* pour l'amélioration de caractéristiques variées. Par exemple, dès la fin des années 90, Ykema *et al.,* (Ykema *et al.,* 1990) ont montré la possibilité d'augmenter la production d'acide stéarique (C18:0) par la levure *Apiotrichum curvatum* (renommée *Cryptococcus curvatus*) afin d'utiliser les lipides de cette levure comme un équivalent du beurre de cacao. Plus récemment, Qvirist *et al.,* (2017), ont montré qu'une exposition de 18s de la levure *Pichia kudriavzevii* aux rayons UVs (254 nm) suffisait pour générer un mutant dont la capacité de dégradation des phytates, molécules végétales non dégradées par certains animaux, est améliorée.

En prenant en compte ces considérations, il semblerait donc que la mutagenèse UV puisse être applicable pour l'optimisation de la production d'arômes par la levure *S. suaveolens.* Cet aspect a fait l'objet d'une partie du travail de thèse présenté dans ce manuscrit et sera dévelopé dans le chapitre III.

Tableau VI: Quelques exemples récents d'optimisation de souches de levures par mutagenèse UV (1/2)

Souche mère	Conditions expérimentales	Méthode de sélection	Capacité améliorée	App. industrielle	Références
Apiotrichum curvatum	200s ; 2W/m²	-	Production de lipide (C18 :0)	Agroalimentaire	Ykema *et al.*, 1990
Lipomyces starkeyi DSM 70296	40min ; 30W	Croissance en milieu YP contenant des concentrations croissantes de cérulénine et sélection des souches ayant les plus grandes vitesses de croissance	Production de biomasse et de lipide	Biofuel	Tapia *et al.*, 2012
Pichia kudriavzevii TY 1310	18s ; 254 nm	Croissance sur milieu gelosé BCIP et sélection des colonies formant une couleur bleue	Capacité de dégradation des phytates	Alimentation animale	Qvirist *et al.*, 2017
Pichia stipitis	20s	Croissance sur des boites de Pétri contenant un milieu avec un gradient de liqueur de sulfite usé (pH 5.5) et sélection des colonies se developpant aux concentrations les plus élevées de liqueur de sulfite usé	Tolérance et fermentation de la liqueur de sulfite usée	Biofuel	Bajwa *et al.*, 2009
Pichia stipites NBRC1687	30s ; 50 cm de dist.	Croissance sur milieu YNB contenant de l'éthanol et sélection des colonies se développant plus rapidement	Tolérance à l'éthanol et production d'éthanol à partir de xylose	-	Watanabe *et al.*, 2011
Rhodosporidium toruloides 2.1389	8min ; 15W/m²	Croissance sur milieu YPD contenant de l'éthanol et H_2O_2 ou du LiCl (5mol.L^{-1}) et sélection des souches tolérantes à ce milieu	Production de lipides	Biofuel	Guo *et al.*, 2019
Rhodosporidium toruloides NBRC 8766	200s ; 2 W/m²	Croissance en milieu YP contenant des concentrations croissance de cérulénine (entre 10 et 320µmol.L^{-1}) et sélection des souches ayant les plus grandes vitesses de croissance	Production de lipides	Biofuel	Yamada *et al.*, 2017a ; 2017b
Saccharomyces cerevisiae	35s ; 254 nm	Croissance sur milieu YNB (pH 4.5) contenant 0.3% (v/v) d'acide acétique et sélection des souches ayant les plus grandes vitesses de croissance	Tolérance à l'acide citrique	Biofuel	Zheng *et al.*, 2011
Saccharomyces cerevisiae	254nm	Croissance sur des boites de Pétri contenant un milieu avec un gradient de liqueur de sulfite usée (pH 5.5) et sélection des colonies se developpant aux concentrations les plus élevées de liqueur de sulfite usée	Tolérance à la liqueur de sulfite usée	Biofuel	Pinel *et al.*, 2011
Saccharomyces cerevisiae	3min ; 254nm	Croissance sur milieu YNB contenant 10% (v/v) d'éthanol et sélection des souches ayant les plus grandes vitesses de croissance	Tolérance à l'éthanol	-	Wang *et al.*, 2012

Tableau VI. Quelques exemples récents d'optimisation de souches de levure par mutagenèse UV (2/2)

Souche mère	Conditions expérimentales	Méthode de sélection	Capacité améliorée	App. industrielle	Références
Saccharomyces cerevisiae	40s ; 2537A	-	Tolérance à l'éthanol et au sucre et à la température	Boisson fermentée	Unaldi *et al.*, 2002
Saccharomyces cerevisiae	254 nm ; 10mJ/m²	Introduction dans de la pâte à pain et congélation successive et sélection des souches les plus résistantes	Tolérance au froid	Boulangerie	Teunissen *et al.*, 2002
Saccharomyces cerevisiae C-70	254 nm, 200mW/cm²	Croissance sur milieu YPD contenant 10 à 25% d'éthanol et sélection des souches les plus résistantes	Production d'éthanol	Fermentation de moût	Revin *et al.*, 2018
Saccharomyces cerevisiae CGMCC 10378	1.30min ; 30W ; 30 cm de dist.	Croissance sur milieu contenant des doses léthales de CTZ et sélection des souches capables de se développer	Activité fermentaire	Sake	Yang *et al.*, 2018
Saccharomyces cerevisiae n°3786	25min	-	Production d'alcool	Biofuel	Taloria *et al.*, 2012
Saccharomyces cerevisiae VS1	6min ; 30 W ; 30 cm de dist.	Croissance des cellules sur milieu YPD et sélection des colonies les plus grosses capables de se développer à 42°C.	Production de biomasse et d'éthanol et thermotolérance	-	Sridhar *et al.*, 2002
Saccharomyces cervevisiae T12	280nm ; 30W	Croissance des cellules sur milieux YPD contenant 0.2% (v/v) de furfural et sélection des souches résistantes au furfural	Résistance au furfural et production d'éthanol	Biofuel	Bahareh et Mehrdad, 2011
Saccharomyces pastorianus	254nm ; 5, 10 ou 15mJ/ cm²	Inoculation des cellules dans un moût de haute gravité (24.2°P) et mise en fermentation à 20°C puis croissance des cellules sur milieu YPM et sélection des souches selon leur taile	Fermentation sous des conditions de haute gravité	Bière	Blieck *et al.*, 2007
Wickerhamomyces anomalus HH16	5min ; 254 nm ; 200 mW/cm²	Sélection des souches résistance à l'éthanol (10-30% v/v)	Production de glycérol	-	Hawary *et al.*, 2019

BCIP, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate ; CTZ, clotrimazole; YPD, Yeast-Peptone-Dextrose; YP, Yeast-Peptone; YPM, Yeast-Peptone-Maltose ; YNB, Yeast-Nitrogen Base

III. La bière, une boisson produite par les levures

1. Généralités

1.1. Contexte mondial

La bière est l'une des boissons alcoolisées les plus anciennement connues dans l'histoire de l'humanité. En effet, la plus ancienne preuve archéologique d'une activité de brassage remonte à 6000 ans avant Jesus-Christ en ancienne Babylone, où des pièces de poterie représentant des travailleurs remuant et écrémant des cuves de brassage ont été retrouvées (Willaert, 2007). Aujourd'hui, cette boisson constitue, avec le vin, les spirtitueux, le saké et les liqueurs, l'une des boissons alcoolisées les plus consommées dans le monde. Ceci a entrainé une recrudescence des filières de production de bières. En Europe par exemple, entre 2009 et 2018, le nombre de microbrasseries n'a cessé d'augmenter, notamment en Espagne et en Suède pour lesquelles les croissances relatives du nombre de microbrasseries dans le pays ont été estimées à 1362 et 1130% respectivement. En France, cette même croissance relative est bien plus basse (451%) mais le nombre de microbrasseries en 2018 dans le pays est le second plus élevé juste derrière le Royaume-Uni (Tableau VII).

Tableau VII. Nombre et croissance des microbasseries en Europe entre 2009 et 2018 (adapté de The brewers of Europe, 2019, 2015)

Pays	Microbrasseries		Croissance relative (%)
	2009	2018	
Espagne	27	395	1362
Autriche	13	126	869
Suède	30	369	1130
Rep. Tchèque	51	440	763
Slovaquie	9	57	533
Slovénie	20	97	385
Italie	242	692	186
France	263	1450	451
Royaume-Uni	694	1979	185
Suisse	232	933	302

Le terme « bière » regroupe toutes les boissons fermentées par des levures

produites à partir de malt, d'eau et de houblon. De nos jours, on distingue trois grands types de bière nommés « Ale », « Lager » ou « Lambic » selon le type de fermentation réalisé pendant leur production (ces différences seront détaillées en partie III.2 du présent chapitre). Ces trois types sont eux-même divisés en de nombreux styles de bières tels que le Strong-Ale ou l'Old-Ale, l'American-Style-Lager ou le Vienna-Style-Lager ou encore la Specialty Beer et la Rye Beer dont les spécificités aromatiques peuvent être retrouvées dans les Guides de style de bières proposés par l'association des brasseurs (Brewers Association, www.brewersassociation.org). Selon les données de cette même association, le nombre de style de bière connu est passé de 141 à 155 uniquement entre 2014 et 2020 (Brewers Association 2014; 2015; 2016; 2017; 2018; 2019; 2020). L'augmentation du nombre de producteurs et de consommateurs de bières dans le monde serait ainsi le résultat d'une augmentation de la population mondiale mais aussi de la diversification continue des bières proposées sur le marché, qui permet de toucher un plus grand public (Olaniran *et al.*,, 2017).

D'ailleurs, à la fin du XXème siècle, de nombreuses brasseries se sont attachées à produire des bières sans alcool (teneur en alcool < 0.5% v/v) ou à faible teneur en alcool (teneur en alcool comprise entre 0.5 et 1.2% v/v). Le but était essentiellement de s'adaptater aux activités des consommateurs (conduite de véhicule motorisé, mode de vie sportif) et à leurs états médicaux (grossesse, prise de médicament) mais aussi d'introduire le marché de la bière dans des pays dans lesquels la consommation d'alcool est interdite (Brányik *et al.*, 2012). Aujourd'hui, même si les ventes de bières de ce type n'excèdent pas celles des bières traditionnelles, leur demande par les consommateurs, plus alertes sur leur consommation d'alcool est en constante évolution (Brányik *et al.*, 2012; Capece *et al.*, 2018).

Le marché de la bière est donc un marché dynamique régi par les demandes des consommateurs et par les propositions des brasseurs. C'est pourquoi durant ces dernières décennies, de nombreuses recherches se sont attachées à développer des

méthodes de diversification des produits de type bière en adaptant une ou plusieurs parties du procédé général de production.

1.2. Procédé général de production de la bière

De façon générale, quatre étapes sont impliquées dans la production de bière : le maltage, le brassage, la cuisson du moût et la fermentation (Kao, 2018). Ces étapes sont présentées en Figure 11.

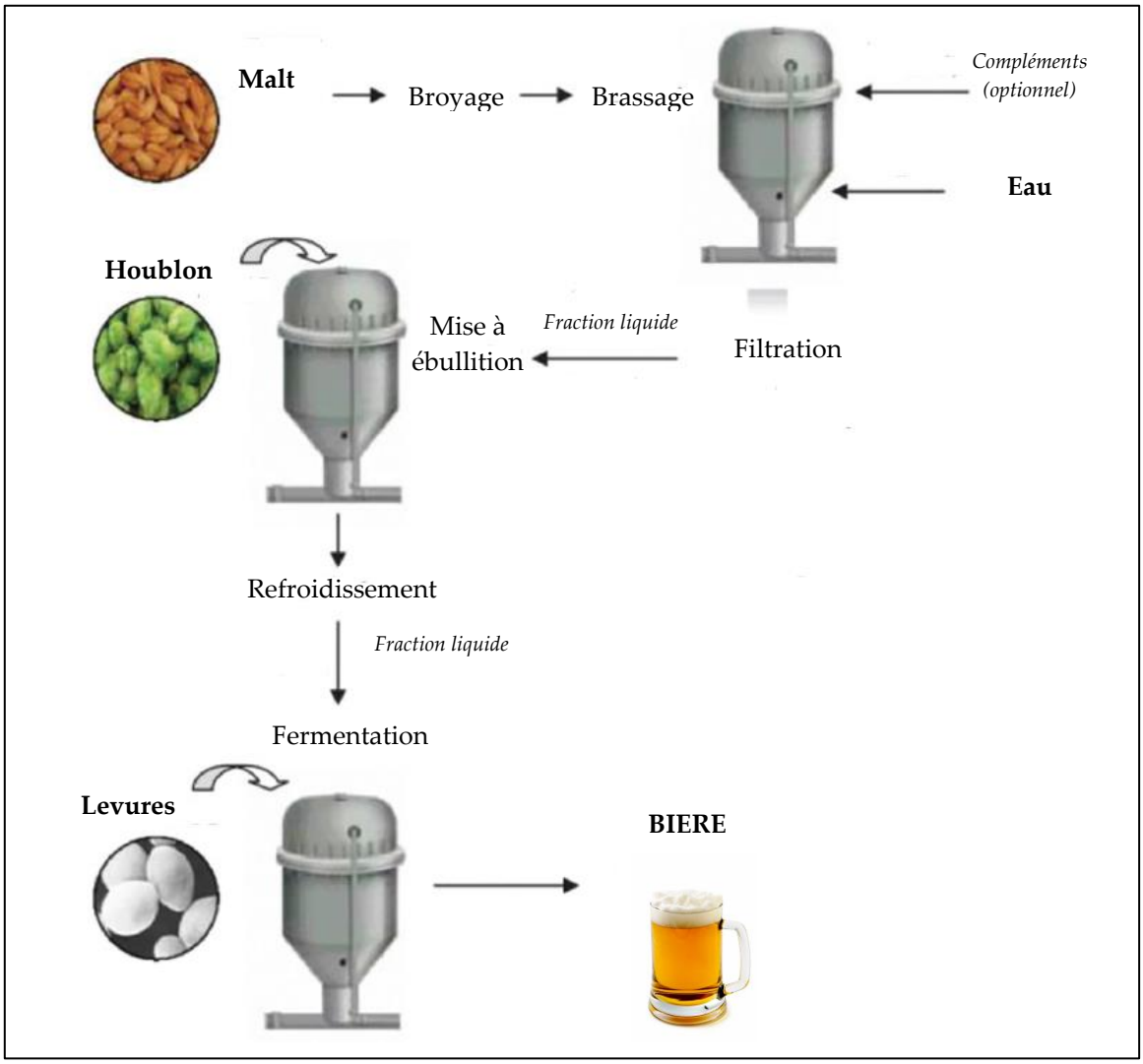


Figure 11. Représentation schématique du procédé général de production de bière (adapté de Kao, 2018)

Pendant le maltage (non représenté sur la Figure 11), de l'orge est transformée en malt sous l'effet d'enzymes qui décomposent la structure du complexe protéine-

carbohydrate en plus petites molécules et expose l'amidon contenu à l'intérieur de l'endosperme. Ceci est effectué via un procédé en trois étapes impliquant une macération de l'orge dans de l'eau pendant 48h à une température comprise entre 12 et 22°C, une germination de l'orge pendant 3 à 5 jours à 22°C et une cuisson du malt vert obtenu pendant 24 à 48h à des températures comprises entre 22 et 110°C. Ceci permet d'arrêter la germination et favoriser la production des composés responsables de l'arôme et de la couleur du malt (Willaert, 2007). Le malt obtenu est ensuite broyé avant d'être envoyé à l'étape de brassage.

Pendant l'étape de brassage, de l'eau est rajoutée avant d'augmenter lentement la température de 37 à 78°C pour activer les α- et les β-amylases. L'amidon est alors converti en sucres fermentescibles (majoritairement maltose et maltotriose) et non-fermentescibles (maltodextrines) pendant que les protéines sont dégradées en peptides et en amino-acides (Kao, 2018). Dans le cadre de la production de certaines bières particulières, comme les bières aux fruits rouges, c'est à cette étape que les compléments, comme les fruits rouges, peuvent être rajoutés.

Après une filtration, la fraction liquide est récupérée et envoyée à l'étape de cuisson durant laquelle le moût est mis à ébullition pendant 0,5 à 1,5h (Willaert, 2007). Ceci permet la stérilisation du moût et la désactivation des enzymes de la glycolyse. A cette étape du procédé, du houblon (*Humulus lupulus*) est rajouté. Il participe alors à la stabilisation des bulles ainsi qu'à la clarification du moût et il y apporte une flaveur amère (Kao, 2018). Le mélange est ensuite clarifié par sédimentation ou centrifugation puis refroidi à des températures comprises entre 12 et 18°C, la fraction liquide est alors récupérée.

Pour démarrer l'étape de fermentation, des levures y sont inoculées. La température du mélange est alors maintenue à des valeurs comprises entre 20 et 25°C pour des durées allant de 7 à 20 jours selon le type de bière produit. Il arrive que du houblon soit ajouté au cours de la fermentation pour apporter une flaveur houblonnée au produit final (Kao, 2018). Après cette étape de fermentation, la

température est abaissée et les bières obtenues sont clarifiées pour retirer les levures et les troubles du produit. La bière est alors obtenue.

2. La fermentation, une étape-clé dans la production de la bière

Lors de l'étape de fermentation des bières, les levures produisent de l'éthanol et du dioxyde de carbone à partir des sucres fermentescibles mais aussi de nombreux composés d'arômes à partir des acides aminés et des acides gras disponibles dans le moût *via* les voies d'Ehrlich et de la β-oxydation détaillées en partie 0.2 de ce chapitre de thèse. L'étape de fermentation est donc une étape très importante en production de bière, car elle permet de définir le degré alcoolique de la bière, sa quantité de bulles et sa flaveur finale.

2.1. La fermentation brassicole classique : la fermentation-simple

2.1.1. Les levures de brasseries courantes

Les levures traditionnellement utilisées appartiennent au genre *Sacharomyces* car elles présentent les avantages d'avoir un taux de conversion des sucres en éthanol particulièrement élevé, une forte tolérance à l'éthanol et d'être capables de réaliser la fermentation en conditions acides, comme celles rencontrées dans les moûts de brassage (Capece *et al.*, 2018). A l'échelle industrielle, même si on retrouve dans certains procédés des souches telles que *S. bayanus, S. cariocanus, S. kudriavzevii, S. mikatae* et *S. paradoxus,* les deux espèces les plus couramment utilisées sont *S. cerevisiae,* et *S. eubayanus* (Kao, 2018). Ces espèces sont choisies selon le type de bière (« Ale » ou « Lager ») à produire. En effet, les bières de type « Ale » sont définies comme des bières obtenues par fermentation haute à des températures comprises entre 12 et 25°C. C'est pourquoi, dans l'élaboration des bières « Ale », la levure *S. cerevisiae* est plutôt utilisée (Gallone *et al.,* 2018; Gibson *et al.,* 2017).

A contrario, les bières de type « Lager » sont définies comme des bières

obtenues par fermentation basse à des températures comprises entre 4 et 12°C (Libkind *et al.*, 2011; Gibson *et al.*, 2017). Pour l'élaboration de ce type de bière, on utilise préférentiellement les souches de *S. eubayanus*, souche sauvage découverte en Argentine en 2010 qui se distingue pour sa capacité d'aromatisation à de faibles températures. D'ailleurs, les premières bières commerciales produites exclusivement avec *S. eubayanus* ont été mises sur le marché par Heineken sous la gamme « Wild lager » et se distinguent notamment par leur note boisée, épicée et fruitée (Heineken, 2018). Une autre souche de levure, hybride entre *S. cerevisiae* et *S. eubayanus* est également relativement souvent utilisée en production de bière de type « Lager », il s'agit de l'espèce *S. pastorianus*.

2.1.2. Mise en place de la fermentation

Traditionnellement, l'étape de fermentation est réalisée par des levures en suspension libre pour fermenter le moût dans un réacteur non agité à des températures dépendantes de la souche de levure choisie. Cette étape entraine un changement des paramètres biologiques et physico-chimiques principaux du moût au cours du temps. Par exemple, la biomasse augmente généralement pendant les 96 premières heures puis diminue à cause de la floculation et de la sédimentation et le pH du milieu diminue continuellement à cause de la formation d'acide carbonique (CO_2) et de la libération de protons pendant le processus (Yin *et al.*, 2017).

Cependant, la technologie de fermentation par des levures en suspension libre peut s'avérer relativement longue : par exemple, la production de bière de type « Lager » nécessite 7 jours de fermentation suivis de plusieurs mois de maturation. Pour accélérer le processus de production, certains brasseurs utilisent des schémas de fermentation accélérée basés sur l'utilisation de température de fermentation plus haute ou l'utilisation de souches fermentaires plus rapides que la souche couramment utilisée. Cela peut par exemple permettre d'abaisser le temps d'obtention d'une bière de type « Lager » à 12-15 jours (Willaert et Nedovic, 2006).

D'autres technologies existent, comme celle utilisant des cellules immobilisées (TCI) qui permet la production de bière de type « Lagers » en des durées allant seulement de 1 à 3 jours. Néanmoins cette forte diminution du temps de fermentation peut entraîner une perte d'arôme drastique dans la bière car le temps disponible pour la production de COVs par la levure est considérablement diminué (Willaert et Nedovic, 2006).

2.3. Fermentation mixte

Les fermentations-simples avec des *Saccharomyces spp.* constituent aujourd'hui les techniques de fermentation les plus répandues au niveau industriel. Cependant, il existe un dernier type de fermentation retrouvé. Il s'agit de la méthode par fermentation spontanée au cours desquelles aucune souche de levure particulière n'est introduite volontairement avant l'étape de fermentation dans le procédé de production. Les moûts de brasserie sont ainsi colonisés par une ou plusieurs souches de levures et/ou de bactéries (notamment des bactéries lactiques) sauvages qui assurent une fermentation-mixte (c'est-à-dire impliquant l'activité d'au moins deux souches différentes) de façon non contrôlée dans les cuves (Petruzzi *et al.*, 2016; Steensels et Verstrepen, 2014). Ce type de fermentation conduit à la production de bières de type « Lambic » qui ne présentent donc aucune caractéristique commune entre elles (Iattici *et al.*, 2019) mais qui abritent souvent des flaveurs complexes et agréables particulièrement appréciées et recherchées par les consommateurs.

Ce procédé ancestral a inspiré le domaine brassicole et a favorisé la recherche et la mise en place de procédés de production de bière impliquant une fermentation mixte qui favorise la diversification naturelle des arômes de bière. Ce type de procédé est toutefois plus complexe à mettre en place comparé au procédé de fermentation simple. En effet, plusieurs paramètres sont à prendre en compte lors des fermentations mixtes. Il s'agit notamment de la disponibilité des nutriments, le taux d'ensemencement en levure, le laps de temps entre les inoculations des

différents microorganismes ainsi que la compétitivité entre les souches concernées qui peuvent largement impacter l'efficacité de la fermentation mixte (Toh *et al.,* 2018).

Dans les procédés de fermentation mixte rencontrés dans l'industrie et dans la littérature, la fermentation fait intervenir deux espèces de levures. La première est souvent une espèce à forte capacité fermentaire rajoutée à faible concentration initiale pour favoriser la production d'éthanol et de dioxyde de carbone. La seconde est une espèce ayant d'autres fonctionnalités telle que la formation d'arômes et est rajoutée à une concentration hautement majoritaire comparée à la levure fermentaire (van Rijswijck *et al.,* 2017). Ce type de fermentation est généralement pratiqué dans la production de bières spéciales comme les Flanders, le Berlin Weisse et les bières blanches acides (Toh *et al.,* 2018).

3. Rôle des levures dans l'aromatisation de la bière

La flaveur de la bière est souvent définie selon six critères, à savoir « sucré », « acide », « amer », « houblonné », « fruité » et « malté ». Cependant, comme il existe aujourd'hui des centaines de styles de bière différents ayant chacun ses propres caractéristiques aromatiques, il est difficile de donner un profil universel de l'arôme des bières et de leur composition en composés organiques volatils (COVs). En effet, cette dernière peut comporter plus de 800 composés différents pour certaines bières. Néanmoins, seulement quelques dizaines de ces composés ont un impact olfactif. Ces derniers peuvent dériver des ingrédients (houblon, orge, etc.) ou des microorganismes contaminants le moût pendant le procédé de production mais le profil aromatique des bières est majoritairement attribué aux activités biochimiques des cellules de levures au cours de la fermentation (Olaniran *et al.,* 2017; Capece *et al.,* 2018). Une liste non exhaustive des composés organiques volatils retrouvés dans les bières en fonction des levures impliquées dans la fermentation est proposée en Tableau VIII.

3.1. Composition de la fraction volatile des bières traditionelles

Les COVs majoritairement retrouvés dans les bières appartiennent aux classes chimiques des terpènes, des alcools supérieurs, des composés carbonylés et des esters.

3.1.1 Les terpènes

Les terpènes proviennent majoritairement de l'ajout du houblon et sont donc très dépendants du type de houblon utilisé pendant l'élaboration du produit. Cependant, le linalool est souvent rencontré dans la composition des composés organiques volatils (COVs) des bières car il s'agit également d'un élément composant la fraction volatile des moûts seuls (Liu et Quek, 2016).

3.1.2. Les alcools supérieurs

Les alcools supérieurs sont produits par les levures pendant la fermentation alcoolique (Stevens, 1960). Ils sont synthétisés via les métabolismes cataboliques des acides aminés (voie d'Ehrlich) et anaboliques des acides aminés à partir du pyruvate. Le choix de la voie dépend de l'alcool supérieur produit et de la quantité d'acides aminés disponible dans le milieu. Ainsi, plus le nombre de carbone dans l'alcool augmente, plus la voie catabolique est favorisée, mais lorsque la teneur en acide aminé est faible dans le milieu, en fin de fermentation par exemple, l'utilisation de la voie anabolique augmente (Stevens, 1960; Olaniran *et al.,* 2017; Willaert et Nedovic, 2006).

Ils peuvent à la fois avoir des impacts positifs et négatifs sur l'arôme et la flaveur de la bière. Des quantités trop élevées (>300 mg/L) peuvent en effet conduire à un goût et une odeur fortement âcre, alors que des niveaux optimum entrainent des caractéristiques désirables (Olaniran *et al.,* 2017).

Tableau VIII. Composés organiques volatils retrouvés dans les bières et levures impliquées pendant la fermentation (1/14)

Composés	Flaveur	Levures impliquées	Teneurs (mg.L^{-1})	Références bibliographiques
ALCOOLS				
2-méthylbutanol	Acre	*Brettanomyces anomalus*	0.27 – 0.81	Hellwig *et al.*, 2018; Michel *et al.*, 2016a
		Brettanomyces bruxellensis	0.95- 5.22	Michel *et al.*, 2016a
		Lachancea thermotolerans	17.8 – 123.6	Callejo *et al.*, 2019
		Saccharomyces cerevisiae	24.1 – 126.7	Callejo *et al.*, 2019 ; Michel *et al.*, 2016a
		Saccharomyces pombe	5.8 – 133.0	Callejo *et al.*, 2019
		Saccharomycodes ludwigii	3.72 – 116.8	Callejo *et al.*, 2019 ; Michel *et al.*, 2016a
		Torulaspora delbrueckii	7.2 – 141.5	Callejo *et al.*, 2019
		Zygosaccharomyces rouxii	6.76 – 20.38	Michel *et al.*, 2016a
2-méthylpropanol	Solvant	*Brettanomyces anomalus*	0.7 – 2.25	Michel *et al.*, 2016a
		Brettanomyces bruxellensis	2 – 18.3	Michel *et al.*, 2016a
		Lachancea thermotolerans	7.6 – 63.3	Callejo *et al.*, 2019
		Saccharomycodes ludwigii	5.27 – 62.8	Callejo *et al.*, 2019 ; Michel *et al.*, 2016a
		Saccharomyces pombe	3.6 – 68.9	Callejo *et al.*, 2019
		Saccharomyces cerevisiae	10.6 – 67.8	Callejo *et al.*, 2019 ; Canonico *et al.*, 2016 ; 2017 ; Liu et Quek, 2016; Michel *et al.*, 2016a; Stevens, 1960
		Torulaspora delbrueckii	1.36 – 67.7	Callejo *et al.*, 2019 ; Canonico *et al.*, 2016 ; 2017 ; Michel *et al.*, 2016a
		Williopsis saturnus	-	Liu et Quek, 2016
		Zygosaccharomyces rouxii	14.58 – 68.89	Michel *et al.*, 2016a

Tableau IX. Composés organiques volatils retrouvés dans les bières et levures impliquées pendant la fermentation (2/14)

Composés	Flaveur	Levures impliquées	Teneurs (mg.L^{-1})	Références bibliographiques
ALCOOLS				
2-phényléthanol	Rose, sucré, floral	*Saccharomyces cerevisiae*	7.29 – 179.9	Canonico *et al.*, 2016 ; 2017 ; 2019 ; Callejo *et al.*, 2019 . Hellwig *et al.*, 2018; Kobayashi *et al.*, 2008; Liu et Quek 2016; Michel *et al.*, 2016a
		Saccharomycodes ludwigii	5.5 – 167.4	Callejo *et al.*, 2019 ; Michel *et al.*, 2016a
		Saccharomyces pombe	7.1 – 101.1	Callejo *et al.*, 2019
		Torulaspora delbrueckii	5.03 – 177.2	Canonico *et al.*, 2016 ; 2017 ; Callejo *et al.*, 2019 ; Michel *et al.*, 2016a
		Lachancea thermotolerans	2.6 – 176.6	Callejo *et al.*, 2019 ; Canonico *et al.*, 2019
		Wickerhamomyces anomalus	-	Capece *et al.*, 2018
		Williopsis saturnus	-	Liu et Quek 2016
		Zygotorulaspora florentina	1.74	Canonico *et al.*, 2019
		Zygosaccharomyces rouxii	9.81 – 34.54	Michel *et al.*, 2016a
3-méthylbutan-2-ol	Fruité	*Saccharomycodes ludwigii*	14.14 – 28.92	Michel *et al.*, 2016a
3-méthylbutanol	Alcool, banane, sucré	*Brettanomyces anomalus*	0.91 – 2.79	Capece *et al.*, 2018; Hellwig *et al.*, 2018; Michel *et al.*, 2016a
		Brettanomyces bruxellensis	2.15 – 57.7	Michel *et al.*, 2016a
		Lachancea thermotolerans	5.6 – 46.6	Callejo *et al.*, 2019 ; Canonico *et al.*, 2019
		Saccharomyces cerevisiae	9.5 – 68.53	Canonico *et al.*, 2016 ; 2017 ; 2019 ; Callejo *et al.*, 2019 ; Kobayashi *et al.*, 2008 ; Liu et Quek, 2016 ; Michel *et al.*, 2016a
		Saccharomyces pombe	2.9 – 51.6	Callejo *et al.*, 2019
		Saccharomycodes ludwigii	5.0 – 44.7	Callejo *et al.*, 2019
		Torulaspora delbrueckii	3.1 - 69	Canonico *et al.*, 2016 ; 2017 ;Callejo *et al.*, 2019 ; Michel *et al.*, 2016a
		Williopsis anomalus	51.6	Canonico *et al.*, 2019
		Williopsis saturnus	-	Liu et Quek, 2016
		Zygotorulaspora florenti	20.4	Canonico *et al.*, 2019
		Zygosaccharomyces rouxii	16.42 – 75.82	Michel *et al.*, 2016a

Tableau VIII. Composés organiques volatils retrouvés dans les bières et levures impliquées pendant la fermentation (3/14)

Composés	Flaveur	Levures impliquées	Teneurs (mg.L^{-1})	Références bibliographiques
Alcool furfurylique	Fermenté, sucre brûlé, caramel	*Saccharomycodes ludwigii*	1.20 - 4.40	Michel *et al.*, 2016a
		Zygosaccharomyces rouxii	2.70 – 4.26	Michel *et al.*, 2016a
Butan-1-ol	Fruité, fromage	*Lachancea thermotolerans*	4.4 – 5.3	Callejo *et al.*, 2019
		Saccharomyces ludwigii	0 – 4.4	Callejo *et al.*, 2019
		Saccharomyces pombe	1.6 – 4.5	Callejo *et al.*, 2019
		Saccharomyces cerevisiae	4.3 – 5.4	Callejo *et al.*, 2019 ; Stevens, 1960
		Torulaspora delbrueckii	1.2 – 4.6	Callejo *et al.*, 2019
Butan-2-ol	Vin, alcool	*Lachancera thermotolerans*	0 – 3.2	Callejo *et al.*, 2019
		Saccharomyces ludwigii	0 – 3.5	Callejo *et al.*, 2019
		Saccharomyces pombe	0 – 3.2	Callejo *et al.*, 2019
		Saccharomyces cerevisiae	0 – 3.4	Callejo *et al.*, 2019
		Torulaspora delbrueckii	0 -3.1	Callejo *et al.*, 2019
Butan-2,3-diol	Fruité, beurre	*Lachancea thermotolerans*	72.1 – 287.2	Callejo *et al.*, 2019
		Saccharomyces cerevisiae	0 – 278.1	Callejo *et al.*, 2019
		Saccharomyces ludwigii	67.8 – 265.5	Callejo *et al.*, 2019
		Saccharomyces pombe	0 – 291.7	Callejo *et al.*, 2019
		Torulaspora delbrueckii	63.0 – 295.5	Callejo *et al.*, 2019
Ethanol	Alcool, ether	*Saccharomyces cerevisiae*	36.6 – 54.4	Canonico *et al.*, 2016 ; 2017 ; 2019 ; Liu et Quek, 2016; van Risjwijck *et al.*, 2017
		Cyberlindnera fabianii	3.87	van Risjwijck *et al.*, 2017
		Torulaspora delbrueckii	20.98	Canonico *et al.*, 2016 ; 2017 ; Michel *et al.*, 2016a ;
		Lachancea thermotolerans	24.6	Canonico *et al.*, 2019
		Pichia kudriavzevii	4.18	van Risjwijck *et al.*, 2017
		Williopsis saturnus	13.4	Liu et Quek, 2016
		Wickerhamomyces anomalus	12.1	Canonico *et al.*, 2019
		Zygotorulaspora florentina	27.4	Canonico *et al.*, 2019
Hexanol	Fruité, âcre	*Saccharomyces cerevisiae*	-	Liu et Quek, 2016
		Williopsis saturnus	-	Liu et Quek, 2016

Tableau VIII. Composés organiques volatils retrouvés dans les bières et levures impliquées pendant la fermentation (4/14)

Composés	Flaveur	Levures impliquées	Teneurs (mg.L^{-1})	Références bibliographiques
Méthanol	Acre	*Lachancea thermotolerans*	4.8 – 8.2	Callejo *et al.*, 2019
		Saccharomyces ludwigii	5.1 - 8.0	Callejo *et al.*, 2019
		Saccharomyces pombe	4.8 – 5.9	Callejo *et al.*, 2019
		Saccharomyces cerevisiae	4.8 – 8.2	Callejo *et al.*, 2019
		Torulaspora delbrueckii	4.6 – 6.7	Callejo *et al.*, 2019
Pentanol	Alcool, banane, médicament, solvant	*Williopsis saturnus*	-	Liu et Quek, 2016
		Lachancea thermotolerans	4.1	Canonico *et al.*, 2019
		Saccharomyces cerevisiae	7.9 - 12.69	Canonico *et al.*, 2016 ; 2017 ; 2019 ; Kobayashi *et al.*, 2008 ; Stevens, 1960
		Zygotorulaspora florenti	3.49	Canonico *et al.*, 2019
		Williopsis anomalus	9.2	Canonico *et al.*, 2019
		Torulaspora delbrueckii	3.82 – 64.83	Canonico *et al.*, 2016 ;2017 ; Michel *et al.*, 2016a
Propan-1-ol	Alcool	*Brettanomyces anomalus*	0.59 – 1.51	Michel *et al.*, 2016a
		Brettanomyces bruxellensis	0.88 – 21.7	Michel *et al.*, 2016a
		Lachancea thermotolerans	7.6 – 31.4	Callejo *et al.*, 2019 ; Canonico *et al.*, 2019
		Saccharomycodes ludwigii	3.13 – 29.9	Callejo *et al.*, 2019 ; Michel *et al.*, 2016a
		Saccharomyces pombe	8.7 – 34.7	Callejo *et al.*, 2019
		Saccharomyces cerevisiae	8.2 – 31.6	Callejo *et al.*, 2019 ; Canonico *et al.*, 2016 ; 2017 ; 2019 ; Kobayashi *et al.*, 2008; Michel *et al.*, 2016a; Stevens, 1960
		Torulaspora delbrueckii	2.33 – 35.0	Callejo *et al.*, 2019 ; Canonico *et al.*, 2016 ; 2017 ; Michel *et al.*, 2016a
		Williopsis anomalus	22.5	Canonico *et al.*, 2019
		Zygotorulaspora florentina	14.0	Canonico *et al.*, 2019
		Zygosacharomyces rouxii	5.64 – 33.5	Michel *et al.*, 2016a
Propan-2-ol	Alcool	*Saccharomyces cerevisiae*	-	Kobayashi *et al.*, 2008
Pyrralinol	-	*Saccharomyces cerevisiae*	Tr – 0.2	Hellwig *et al.*, 2018

Tableau VIII. Composés organiques volatils retrouvés dans les bières et levures impliquées pendant la fermentation (5/14)

Composés	Flaveur	Levures impliquées	Teneurs (mg.L^{-1})	Références bibliographiques
CARBONYLES				
3-hydroxybutanone	Gras, beurre	*Lachancea thermotolerans*	5.5 – 7.0	Callejo *et al.*, 2019
		Saccharomyces ludwigii	5.5 – 8.7	Callejo *et al.*, 2019
		Saccharomyces pombe	5.6 – 8.8	Callejo *et al.*, 2019
		Saccharomyces cerevisiae	5.5 – 8.4	Callejo *et al.*, 2019
		Torulaspora delbrueckii	5.4 – 8.6	Callejo *et al.*, 2019
Butan-2,3-dione	Beurre, scotch	*Brettanomyces anomalus*	0.012 – 0.048	Michel *et al.*, 2016a
		Brettanomyces bruxellensis	0.022 – 0.06	Michel *et al.*, 2016a
		Lachancea thermotolerans	0.8 - 29.3	Callejo *et al.*, 2019 ; Domizio *et al.*, 2016
		Saccharomycodes ludwigii	0.005 – 1.4	Callejo *et al.*, 2019 ; Michel *et al.*, 2016a
		Saccharomyces pombe	0.3 – 1.4	Callejo *et al.*, 2019
		Saccharomyces cerevisiae	0 - 47.3	Callejo *et al.*, 2019 ; Domizio *et al.*, 2016; Michel *et al.*, 2016a
		Torulaspora delbrueckii	0.1 – 1.7	Callejo *et al.*, 2019 ; Michel *et al.*, 2016a
		Zygosaccharomyces rouxii	0.23 – 0.85	Michel *et al.*, 2016a
Pentan-2,3-dione	Caramel au beurre	*Brettanomyces anomalus*	0.003 – 0.007	Michel *et al.*, 2016a
		Brettanomyces bruxellensis	0.003 – 0.018	Michel *et al.*, 2016a
		Lachancea thermotolerans	4.5	Domizio *et al.*, 2016
		Saccharomyces cerevisiae	15.7	Domizio *et al.*, 2016; Michel *et al.*, 2016a
		Saccharomycodes ludwigii	0.001 – 0.002	Michel *et al.*, 2016a
		Zygosaccharomyces rouxii	0.00001 – 0.0667	Michel *et al.*, 2016a
Octan-2-one	Terreux, boisé	*Williopsis saturnus*	-	Liu et Quek, 2016
Nonan-2-one	Fruité, sucré, cireux	*Saccharomyces cerevisiae*	-	Liu et Quek, 2016
6-méthyl-5-hept-én-2-one	Champignons, cassis	*Saccharomyces cerevisiae*	-	Liu et Quek, 2016
		Williopsis saturnus	-	Liu et Quek, 2016

Tableau VIII. Composés organiques volatils retrouvés dans les bières et levures impliquées pendant la fermentation (6/14)

Composés	Flaveur	Levures impliquées	Teneurs (mg.L^{-1})	Références bibliographiques
Acétaldéhyde	Feuilles vertes, Fruité, âcre	*Brettanomyces anomalus*	1.03 – 1.44	Michel *et al.*, 2016a
		Brettanomyces bruxellensis	1.03 – 26.3	Michel *et al.*, 2016a
		Lachancea thermotolerans	4.1 – 8.24	Callejo *et al.*, 2019 ; Canonico *et al.*, 2019
		Saccharomycodes ludwigii	1.85 – 5.5	Callejo *et al.*, 2019 ; Michel *et al.*, 2016a
		Saccharomyces pombe	12.9 – 20.6	Callejo *et al.*, 2019
		Saccharomyces cerevisiae	5.8 – 84.9	Canonico *et al.*, 2016 ; 2017 ; 2019 ; Kobayashi *et al.*, 2008 ; Liu et Quek, 2016 ; Michel *et al.*, 2016b ; Stevens, 1960
		Torulaspora delbrueckii	2.3 - 47.9	Callejo *et al.*, 2019 ; Canonico *et al.*, 2016 ; 2017 ; Michel *et al.*, 2016a
		Williopsis anomalus	49.3	Canonico *et al.*, 2019
		Williopsis subpelliculosus	-	Basso *et al.*, 2016
		Zygotorulaspora florentina	14.2	Canonico *et al.*, 2019
		Zygosaccharomyces rouxii	5.57 – 8.15	Michel *et al.*, 2016a
Acétone	Acétone	*Saccharomyces cerevisiae*	0.44	Stevens, 1960
Benzaldéhyde	Amande, cerise	*Saccharomyces cerevisiae*	-	Liu et Quek, 2016
		Williopsis saturnus	-	Liu et Quek, 2016
Déc-2*E*-énal	Cireux, coriandre	*Saccharomyces cerevisiae*	-	Liu et Quek, 2016
		Williopsis saturnus	-	Liu et Quek, 2016
Nonanal	Gras, peau d'orange	*Saccharomyces cerevisiae*	-	Liu et Quek, 2016
		Williopsis saturnus	-	Liu et Quek, 2016
o-tolualdéhyde	Cerise	*Saccharomyces cerevisiae*	-	Liu et Quek, 2016
		Williopsis saturnus	-	Liu et Quek, 2016
ESTERS				
2-méthylpropanoate de 2-méthylpropyle	Ananas, tropical	*Williopsis saturnus*	-	Liu et Quek, 2016
3-méthylbutanoate d'éthyle	Fruité, anis, pomme	*Brettanomyces bruxellensis*	0.32	Michel *et al.*, 2016a

Tableau VIII. Composés organiques volatils retrouvés dans les bières et levures impliquées pendant la fermentation (7/14)

Composés	Flaveur	Levures impliquées	Teneurs (mg.L^{-1})	Références bibliographiques
4-méthylhex-2-énoate de méthyle	Sucré, fruité	*Saccharomyces cerevisiae*	-	Liu et Quek, 2016
		Williopsis saturnus	-	Liu et Quek, 2016
Déc-9-énoate d'éthyle	Fruité, gras	*Saccharomyces cerevisiae*	-	Liu et Quek, 2016
		Williopsis saturnus	-	Liu et Quek, 2016
Acétate d'éthyle	Fruité, solvant	*Brettanomyces anomalus*	1.26 – 20.99	Michel *et al.*, 2016a
		Brettanomyces bruxellensis	4.04 – 42.63	Michel *et al.*, 2016a
		Lachancea thermotolerans	6.3 – 29.5	Callejo *et al.*, 2019 ; Canonico *et al.*, 2019
		Saccharomycodes ludwigii	1.17 – 29.4	Callejo *et al.*, 2019 ; Michel *et al.*, 2016a
		Saccharomyces pombe	3.3 – 31.7	Callejo *et al.*, 2019
		Saccharomyces cerevisiae	2.60 – 29.0	Callejo *et al.*, 2019 ; Canonico *et al.*, 2016 ; 2017 ; 2019 ; Capece *et al.*, 2018 ; Holt *et al.*, 2018 ; Kobayashi *et al.*, 2008 ; Liu et Quek, 2016 ; Michel *et al.*, 2016a ; Olaniran *et al.*, 2017 ; Stevens, 1960 ; Verstrepen *et al.*, 2003 ; Willaert et Nedovic, 2006
		Torulaspora delbrueckii	2.23 – 34.4	Callejo *et al.*, 2019 ; Canonico *et al.*, 2016 ; 2017 ; Michel *et al.*, 2016a
		Hanseniaspora uvarum	-	Basso *et al.*, 2016
		Wickerhamomyces anomalus	1.7	Capece *et al.*, 2018 ; Canonico *et al.*, 2019
		Williopsis subpelliculosus	-	Basso *et al.*, 2016
		Williopsis saturnus	-	Basso *et al.*, 2016 ; Liu et Quek, 2016
		Zygotorulaspora florentina	1.6	Canonico *et al.*, 2019

Tableau VIII. Composés organiques volatils retrouvés dans les bières et levures impliquées pendant la fermentation (8/14)

Composés	Flaveur	Levures impliquées	Teneurs (mg.L^{-1})	Références bibliographiques
Acétate de 3-méthylbutyle	Banane, poire, pomme	*Saccharomycodes ludwigii*	0– 4.0	Callejo *et al.*, 2019 ; Michel *et al.*, 2016a
		Saccharomyces pombe	0 – 4.1	Callejo *et al.*, 2019
		Saccharomyces cerevisiae	0 – 4.3	Canonico *et al.*, 2016 ; 2017 ; 2019 ; Callejo *et al.*, 2019 ; Kobayashi *et al.*, 2008 ; Liu et Quek, 2016 ; Michel *et al.*, 2016b ; Stevens, 1960 ; Verstrepen *et al.*, 2003 ; Willaert et Nedovic, 2006
		Hanseniaspora uvarum	-	Basso *et al.*, 2016
		Lachancea thermotolerans	0 – 4.3	Callejo *et al.*, 2019 ; Canonico *et al.*, 2019
		Pichia kluyveri		Basso *et al.*, 2016
		Torulaspora delbrueckii	0.13 – 4.4	Canonico *et al.*, 2016 ;2017 ; Callejo *et al.*, 2019 ; Basso *et al.*, 2016 ; Michel *et al.*, 2016a
		Williopsis anomalus	0.051	Canonico *et al.*, 2019
		Williopsis saturnus	-	Basso *et al.*, 2016 ; Liu et Quek, 2016 ; Michel *et al.*, 2016b
		Williopsis subpelliculosus	-	Basso *et al.*, 2016
		Zygotorulaspora florenti	0.30	Canonico *et al.*, 2019
		Zygosaccharomyces rouxii	0.008 – 0.069	Michel *et al.*, 2016a
Acétate de 2-méthylpropyle	Fruit, sucré, étheral	*Saccharomyces cerevisiae*	-	Michel *et al.*, 2016a ; Olaniran *et al.*, 2017
		Pichia kluyveri	-	Basso *et al.*, 2016
		Williopsis saturnus	-	Liu et Quek, 2016 ; Michel *et al.*, 2016

Tableau VIII. Composés organiques volatils retrouvés dans les bières et levures impliquées pendant la fermentation (9/14)

Composés	Flaveur	Levures impliquées	Teneurs (mg.L^{-1})	Références bibliographiques
Acétate de 2-phényléthyle	Rose, miel, pomme, sucré	*Brettanomyces bruxellensis*	0.12	Michel *et al.*, 2016a
		Lachancea thermotolerans	0.01 – 10.4	Callejo *et al.*, 2019 ; Canonico *et al.*, 2019
		Saccharomyces pombe	5.5 – 7.11	Callejo *et al.*, 2019
		Saccharomyces ludwigii	6.6 – 9.1	Callejo *et al.*, 2019
		Saccharomyces cerevisiae	0 - 10.9	Canonico *et al.*, 2016 ; 2017 ; 2019 ; Capece *et al.*, 2018 ; Kobayashi *et al.*, 2008 ; Liu et Quek, 2016 ; Michel *et al.*, 2016a ; Olaniran *et al.*, 2017 ; Verstrepen *et al.*, 2003 ; Willaert et Nedovic, 2006
		Torulaspora delbrueckii	0.004 – 11.5	Callejo *et al.*, 2019 ; Canonico *et al.*, 2017
		Wickerhamomyces anomalus	0.061	Capece *et al.*, 2018. Canonico *et al.*, 2019
		Williopsis saturnus	-	Liu et Quek, 2016
		Zygotorulaspora florentina	0.17	Canonico *et al.*, 2019
Butanoate d'éthyle	Banane, pomme, fraise	*Brettanomyces bruxellensis*	0 – 0.08	Michel *et al.*, 2016a
		Lachancea thermotolerans	0.32	Canonico *et al.*, 2019
		Saccharomyces cerevisiae	0.04 - 0.32	Canonico *et al.*, 2016 ; 2017 ; 2019; Liu et Quek, 2016
		Torulaspora delbrueckii	0 - 0.27	Canonico *et al.*, 2016 ;2017 ; Basso *et al.*, 2016 ; Michel *et al.*, 2016a
		Williopsis anomalus	0.04	Canonico *et al.*, 2019
		Williopsis saturnus	-	Liu et Quek, 2016
		Zygotorulaspora florentina	0.02	Canonico *et al.*, 2019
		Zygosaccharomyces rouxii	2.12 – 70.86	Michel *et al.*, 2016a
Décanoate d'éthyle	Sucré, fruité, pomme, raisin	*Brettanomyces bruxellensis*	0.17	Michel *et al.*, 2016a
		Saccharomyces cerevisiae	-	Olaniran *et al.*, 2017 ; Liu et Quek, 2016
		Williopsis saturnus	-	Liu et Quek, 2016
Décanoate de 3-méthylbutyle	Fruité, sucré	*Saccharomyces cerevisiae*	-	Liu et Quek, 2016
Décanoate de 2-methylpropyle	Cognac, abricot	*Saccharomyces cerevisiae*	-	Liu et Quek, 2016
Décanoate de propyle	Fruité, gras, vert	*Saccharomyces cerevisiae*	-	Liu et Quek, 2016
Dodécanoate d'éthyle	Sucré, cireux, savonneux	*Saccharomyces cerevisiae*	-	Liu et Quek, 2016
		Williopsis saturnus	-	Liu et Quek, 2016

Tableau VIII. Composés organiques volatils retrouvés dans les bières et levures impliquées pendant la fermentation (10/14)

Composés	Flaveur	Levures impliquées	Teneurs (mg.L^{-1})	Références bibliographiques
Formate d'éthyle	Acre	*Saccharomyces cerevisiae*	0.8	Stevens, 1960
Hexanoate d'éthyle	Fruité, sucré, pomme aigre, anis, ananas	*Brettanomyces anomalus*	0.03 – 0.23	Michel *et al.*, 2016a
		Brettanomyces bruxellensis	0 - 0.44	Michel *et al.*, 2016a
		Saccharomyces cerevisiae	0.016 – 0.22	Canonico *et al.*, 2016 ; 2017 ; 2019 ; Kobayashi *et al.*, 2008 ; Verstrepen *et al.*, 2003 ; Willaert et Nedovic, 2006 ; Olaniran *et al.*, 2017 ; Liu et Quek, 2016
		Saccharomycodes ludwigii	0.01 – 0.02	Michel *et al.*, 2016a
		Torulaspora delbrueckii	0.031	Canonico *et al.*, 2016 ; 2017 ; Michel *et al.*, 2016a
		Williopsis anomalus	0.056	Canonico *et al.*, 2019
		Zygosaccharomyces rouxii	0.017 – 0.045	Michel *et al.*, 2016a
Lactate d'éthyle	-	*Brettanomyces anomalus*	0.28 – 35.99	Michel *et al.*, 2016a
		Brettanomyces bruxellensis	0.18 – 70.26	Michel *et al.*, 2016a
		Lachancea thermotolerans	0 – 5.6	Callejo *et al.*, 2019
		Saccharomyces cerevisiae	0 – 5.6	Callejo *et al.*, 2019
		Saccharomyces ludwigii	0 – 5.6	Callejo *et al.*, 2019
		Saccharomyces pombe	0 – 5.6	Callejo *et al.*, 2019
		Torulaspora delbrueckii	0- 5.7	Callejo *et al.*, 2019
Octanoate d'éthyle	Fruité, vin,, sucré, pomme aigre	*Brettanomyces anomalus*	0 – 0.83	Michel *et al.*, 2016a
		Brettanomyces bruxellensis	0.22 – 4.13	Michel *et al.*, 2016a
		Saccharomyces cerevisiae	0.007 -0.057	Canonico *et al.*, 2016 ;2017 ; Kobayashi *et al.*,2008 ; Verstrepen *et al.*, 2003 ; Willaert et Nedovic, 2006 ; Olaniran *et al.*, 2017 ; Liu et Quek, 2016
		Saccharomycodes ludwigii	0.010 – 0.013	Michel *et al.*, 2016a
		Torulaspora delbrueckii	0.006	Canonico *et al.*, 2016 ;Michel *et al.*, 2016a
		Williopsis saturnus		Liu et Quek, 2016
		Zygosaccharomyces rouxii	0.011– 0.020	Michel *et al.*, 2016a
Octanoate de 3-méthylbutyle	Sucré, ananas, noix de coco	*Saccharomyces cerevisiae*	-	Liu et Quek, 2016
Octanoate de 2-méthylbutyle	Pomme, fruité	*Saccharomyces cerevisiae*	-	Liu et Quek, 2016
Octanoate de propyle	Noix de coco, cacao, gin	*Saccharomyces cerevisiae*	-	Liu et Quek, 2016

Tableau VIII. Composés organiques volatils retrouvés dans les bières et levures impliquées pendant la fermentation (11/14)

Composés	Flaveur	Levures impliquées	Teneurs (mg.L^{-1})	Références bibliographiques
Propanoate de 3-méthylbutyle	Sucré, fruité, ananas	*Williopsis saturnus*	-	Liu et Quek, 2016
Propanoate d'éthyle	Fruité, solvant, acétone	*Wickerhamomyces anomalus*	-	Capece *et al.*, 2018
Succinate de diéthyle	Fruité, pasthèque, floral, patate	*Brettanomyces bruxellensis*	0.06	Michel *et al.*, 2016a
		Saccharomyces cerevisiae	0.016 – 0.049	Canonico *et al.*, 2016 ; 2017
		Torulaspora delbrueckii	0.022	Canonico *et al.*, 2017
ACIDES				
Acide 2-méthylpropanoïque	Acide	*Brettanomyces bruxellensis*	0.36	Michel *et al.*, 2016a
		Saccharomyces cerevisiae	-	Liu et Quek, 2016 ; Michel *et al.*, 2016a
		Williopsis saturnus	-	Liu et Quek, 2016
Acide 2-méthylbutanoïque	Fruité, floral	*Saccharomyces cerevisiae*	-	Michel *et al.*, 2016a
Acide 3-méthylbutanoïque	Sucré, fromage, rance	*Brettanomyces bruxellensis*	3.9	Michel *et al.*, 2016a
Acide acétique	Vinaigre, acide	*Saccharomyces cerevisiae*	-	Liu et Quek, 2016 ; Michel *et al.*, 2016a ; Stevens, 1960
		Brettanomyces bruxellensis	55.4 - 198	Basso *et al.*, 2016 ; Michel *et al.*, 2016b
		Brettanomyces anomalus	-	Basso, Alcarde et Portugal, 2016
		Torulaspora delbrueckii	93.4	Michel *et al.*, 2016a
		Williopsis saturnus	-	Liu et Quek, 2016
Acide benzoïque	Vin, balsamique	*Saccharomyces cerevisiae*	-	Liu et Quek, 2016
		Williopsis saturnus	-	Liu et Quek, 2016
Acide butanoïque	Beurre, rance, fromage, sucré	*Brettanomyces bruxellensis*	0.02	Michel *et al.*, 2016a
		Saccharomyces cerevisaie	0.054 - 0.158	Canonico *et al.*, 2016 ;2017 ; Michel *et al.*, 2016a
		Torulaspora delbrueckii	0.048 - 0.074	Canonico *et al.*, 2016 ;2017 ; Michel *et al.*, 2016a
Acide décanoïque	Acide, rance, gras	*Brettanomyces bruxellensis*	4.3	Michel *et al.*, 2016a
		Saccharomyces cerevisiae	-	Liu et Quek, 2016 ; Michel *et al.*, 2016a
		Torulaspora delbrueckii	0.02 – 2.06	Michel *et al.*, 2016a
		Williopsis saturnus	-	Liu et Quek, 2016
Acide dodécanoïque	Métallique, cire	*Brettanomyces bruxellensis*	1.5	Michel *et al.*, 2016a
		Saccharomyces cerevisiae	-	Michel *et al.*, 2016a
Acide formique	Acre, vinaigre	*Saccharomyces cerevisiae*	-	Stevens, 1960

Tableau VIII. Composés organiques volatils retrouvés dans les bières et levures impliquées pendant la fermentation (12/14)

Composés	Flaveur	Levures impliquées	Teneurs (mg.L^{-1})	Références bibliographiques
Acide hexanoïque	Acide, gras, fromage	*Brettanomyces bruxellensis*	1	Michel *et al.*, 2016a
		Saccharomyces cerevisiae	-	Liu et Quek, 2016 ; Michel *et al.*, 2016a
		Torulaspora delbrueckii	0.07 – 0.23	Michel *et al.*, 2016a
		Williopsis saturnus	-	Liu et Quek, 2016
Acide lactique	-	*Lachancea thermotolerans*	240	Domizio *et al.*, 2016
Acide octanoïque	Gras, rance, fromage	*Brettanomyces bruxellensis*	3.1	Michel *et al.*, 2016a
		Saccharomyces cerevisiae	-	Liu et Quek, 2016 ; Michel *et al.*, 2016a
		Torulaspora delbrueckii	0.11 – 0.59	Michel *et al.*, 2016a
		Williopsis saturnus	-	Liu et Quek, 2016
Acide propanoïque	Rance, fruité, fromage	*Brettanomyces bruxellensis*	0.09	Michel *et al.*, 2016a
		Saccharomyces cerevisiae	-	Michel *et al.*, 2016a
COMPOSES PHENOLIQUES				
2,4-di-tert-butylphenol	Phénolique	*Saccharomyces cerevisiae*	-	Liu et Quek, 2016
		Williopsis saturnus	-	Liu et Quek, 2016
4-éthylguaiacol	Epicé, fumé, clou de girofle	*Saccharomyces cerevisiae*	-	Liu et Quek, 2016 ; Michel *et al.*, 2016a
		Williopsis saturnus	-	Liu et Quek, 2016
4-éthylphénol	Phenolique, astringeant	*Saccharomyces cerevisiae*	-	Michel *et al.*, 2016a
4-vinylguaiacol	Phenolique, amer, clou de girofle	*Brettanomyces anomalus*	0 – 0.098	Michel *et al.*, 2016a
		Brettanomyces bruxellensis	0 – 0.11	Michel *et al.*, 2016a
		Saccharomyces cerevisaie	-	Michel *et al.*, 2016a
4-vinylphénol	Phenolique, fumé	*Saccharomyces cerevisiae*	-	Michel *et al.*, 2016a
Tyrosol	Sucré, florale, fruité	*Saccharomyces cerevisiae*	Tr- 34	Hellwig *et al.*, 2018
Vanilline	Vanille	*Saccharomyces cerevisiae*	-	Michel *et al.*, 2016a
COMPOSES SOUFRES				
Dioxyde de soufre	Soufre	*Saccharomyces cerevisiae*	< 10	Michel *et al.*, 2016a
Sulfure d'hydrogène	Œuf pourri	*Saccharomyces cerevisiae*	-	Michel *et al.*, 2016a
TERPENES				
4-terpinéol	Boisé, mentholé, agrume	*Williopsis saturnus*	-	Liu et Quek, 2016
Acétate de géranyle	Floral, rose, vert	*Williopsis saturnus*	-	Liu et Quek, 2016

Tableau VIII. Composés organiques volatils retrouvés dans les bières et levures impliquées pendant la fermentation (13/14)

Composés	Flaveur	Levures impliquées	Teneurs (mg.L^{-1})	Références bibliographiques
Acétate de citronellyle	Floral, vert, rose, agrume	*Saccharomyces cerevisiae*	-	Liu et Quek, 2016
		Williopsis saturnus	-	Liu et Quek, 2016
Limonène	Agrume, frais, sucré	*Saccharomyces cerevisiae*	-	Liu et Quek, 2016
		Williopsis saturnus	-	Liu et Quek, 2016
Linalool	Lavande, agrume, floral, cireux	*Saccharomyces cerevisiae*	0.11	Liu et Quek, 2016 ; Michel *et al.*, 2016a ; Canonico *et al.*, 2019
		Lachancea thermotolerans	0.09	Canonico *et al.*, 2019
		Zygotorulaspora florentina	0.051	Canonico *et al.*, 2019
		Williopsis anomalus	0.11	Canonico *et al.*, 2019
		Williopsis saturnus	-	Liu et Quek, 2016
Oxyde de linalool	Floral, herbal, vert	*Williopsis saturnus*	-	Liu et Quek, 2016
p-cymène	Frais, agrume, boisé	*Saccharomyces cerevisiae*	-	Liu et Quek, 2016
		Williopsis saturnus	-	Liu et Quek, 2016
Sabinène	Boisé, agrume	*Saccharomyces cerevisiae*	-	Liu et Quek, 2016
		Williopsis saturnus	-	Liu et Quek, 2016
Trans-β-damascenone	Pomme, rose, miel	*Saccharomyces cerevisiae*	-	Liu et Quek, 2016
		Williopsis saturnus	-	Liu et Quek, 2016
Trans-β-ocimène	Sucré, herbal	*Saccharomyces cerevisiae*	-	Liu et Quek, 2016
		Williopsis saturnus	-	Liu et Quek, 2016
α-terpinène	Agrume, boisé	*Saccharomyces cerevisiae*	-	Liu et Quek, 2016
		Williopsis saturnus	-	Liu et Quek, 2016
α-terpinéol	Floral, agrume	*Lachancea thermotolerans*	0.045	Canonico *et al.*, 2019
		Saccharomyces cerevisiae	0.058	Liu et Quek, 2016 ; Michel *et al.*, 2016a ; Canonico *et al.*, 2019
		Williopsis anomalus	0.022	Canonico *et al.*, 2019
		Williopsis saturnus	-	Liu et Quek, 2016
		Zygotorulaspora florentina	0.094	Canonico *et al.*, 2019

Tableau VIII. Composés organiques volatils retrouvés dans les bières et levures impliquées pendant la fermentation (14/14)

Composés	Flaveur	Levures impliquées	Teneurs (mg.L^{-1})	Références bibliographiques
α-terpinolène	Frais, agrume, boisé	*Williopsis saturnus*	-	Liu et Quek, 2016
Nérol	Rose, agrume	*Saccharomyces cerevisiae*	-	Michel *et al.*, 2016a
Géraniol	Rose	*Saccharomyces cerevisiae*	-	Michel *et al.*, 2016a
β-citronellol	Citron	*Lachancea thermotolerans*	0.21	Canonico *et al.*, 2019
		Zygotorulaspora florentina	0.40	Canonico *et al.*, 2019
		Saccharomyces cerevisiae	0.78	Michel *et al.*, 2016a ; Canonico *et al.*, 2019

Cependant, c'est la composition même en alcool qui définit majoritairement l'impact des alcools supérieurs sur la flaveur.

Deux groupes d'alcools supérieurs sont retrouvés dans la bière: les alcools aliphatiques et les alcools aromatiques (Willaert et Nedovic, 2006 ; Olaniran *et al.,* 2017). Les alcools aliphatiques, tels que le propanol, le 3-méthylbutanol ou le 2-méthylbutanol participent à l'arôme de solvant et donnent une sensation chaude en bouche. Les alcools aromatiques tels que le 2-phényléthanol ou le tyrosol peuvent avoir une contribution positive ou négative à l'arôme de la bière. Par exemple, le 2-phényléthanol confère des notes positives florales et fruitées à la bière alors que le tyrosol et le tryptophol y apportent des flaveurs indésirables anormales à la bière (Szlavko, 1973).

3.1.3. Les composés carbonylés

Les composés carbonylés sont retrouvés en concentration relativement faible dans les bières mais peuvent tout de même s'avérer indésirables à l'arôme final de la bière. C'est notamment le cas des dicétones vicinales et des aldéhydes.

Deux dicétones vicinales sont particulièrement retrouvées : le butane-2,3-dione (ou diacétyle) et le pentane-2,3-dione. Le diacétyle apporte à la bière finale des flaveurs indésirables de beurre lorsque la concentration est supérieure à 0.1-0.15 $mg.L^{-1}$. Il s'agit d'un co-produit de l'anabolisme de la valine qui est généralement réduit en butane-2,3-diol par les levures pendant la maturation du produit. Le pentane-2,3-dione est connu pour apporter des flaveurs de caramel au beurre lorsque sa concentration est supérieure à 0,9 $mg.L^{-1}$. C'est un co-produit de la synthèse de l'isoleucine chez la levure (Michel *et al.,* 2016b).

Les aldéhydes constituent environ 90% des composés carbonylés retrouvés dans la bière. Ces composés peuvent provenir soit des réactions de Maillard et d'oxydation lipidique lors de la préparation du moût, soit de la fermentation du moût par les levures sous l'effet de l'activité de l'alcool déshydrogénase sur l'éthanol.

Les aldéhydes peuvent apporter des arômes de pomme verte à la bière lorsqu'ils sont en proportions appropriées (Wang *et al.,* 2013). Cependant, à trop haute concentration, ils peuvent y entrainer un goût âcre et indésirable. L'aldéhyde le plus souvent retrouvé dans les bières est l'acétaldéhyde, un intermédiaire de formation de l'éthanol et de l'acétate pendant la fermentation (Olaniran *et al.,* 2017). Ce composé a un seuil de flaveur de 10-20 $mg.L^{-1}$ et sa présence dans la bière au-dessus de ce seuil peut entraîner des flaveurs négatives de gras ou de pomme verte dans la bière (Michel *et al.,* 2016b).

3.1.4. Les esters

Les esters sont les composés d'arômes les plus importants dans la bière car ils y sont perceptibles à de très basse concentration comparée aux autres composés (Willaert et Nedovic, 2006 ; Michel *et al.,* 2016b ; Liu et Quek, 2016). En quantité modérée, ils y ajoutent un caractère plaisant en lui conférant des notes fruitées et florales. Néanmoins quand ils sont présents à des concentrations excessives, ils peuvent y apporter un goût trop fruité considéré comme indésirable aux yeux de la majeure partie des consommateurs (Verstrepen *et al.,* 2003 ; Willaert et Nedovic, 2006 ; Stevens, 1960 ; Olaniran *et al.,* 2017 ; Michel *et al.,* 2016). Deux groupes d'esters peuvent être distingués dans la bière : les acétates et les esters éthyliques d'acides gras à chaîne moyenne.

Les acétates sont synthétisés par esterification d'un alcool supérieur ou d'une molécule d'éthanol avec de l'acide acétique et constituent les esters majoritaires dans la bière (Michel *et al.,* 2016a). Les plus fréquemment retrouvés sont l'acétate d'éthyle, l'acétate d'isoamyle et l'acétate de 2-phényléthyle, tous associés à des arômes fruités et floraux.

Les esters éthyliques d'acides gras à chaine moyenne (C6-C10) sont formés par esterification d'un acide gras à chaîne moyenne et d'une molécule d'éthanol ou par alcoolyse, c'est-à-dire par transestérification entre un acyl-CoA d'acide gras et une

molécule d'éthanol sous l'action d'une enzyme nommée fatty acyl transferases. (Michel *et al.,* 2016a). Ces composés constituent le groupe de composés organiques volatils majoritaires dans les bières. Parmi eux, l'hexanoate d'éthyle (ou caprylate d'éthyle) et l'octanoate d'éthyle (ou caprate d'éthyle) sont les composés les plus fréquents et abondants et y apportent des arômes de pomme ou d'abricot (Peddie, 1990 ; Verstrepen *et al.,* 2003).

3.1.5. Les composés soufrés et les composés phénoliques

Les composés soufrés majoritairement produits par les levures pendant le cycle de maturation cellulaire est le dioxyde de soufre qui joue un rôle important dans la stabilité de la flaveur en agissant comme un antioxydant dans la bière finale, augmentant ainsi sa durée de vie (Michel *et al.,* 2016a). Il est généralement produit en quantité inférieure à 10 $g.L^{-1}$. D'un point de vue aromatique, il s'agit d'un composé indésirable car il masque les flaveurs positives de la bière à de très faibles doses (0,005 $mg.L^{-1}$) (Michel *et al.,* 2016a).

Les deux composés phénoliques les plus couramment retrouvés sont le 4-vinyguaiacol et le 4-vinylphénol. Comme la plupart des composés phénoliques, ces deux composés sont considérés comme indésirables dans la bière. Cependant, dans certains types de bière comme le « Belgian lambic », le « Belgian Abbey-style ales » et le « German wheat beer », ils peuvent apporter des notes particulières et recherchées (Michel *et al.*, 2016a).

3.2. Utilisation des levures non-*Saccharomyces* pour la diversification des bières

Les levures jouent un rôle majeur pour l'élaboration du bouquet aromatique des bières. C'est pourquoi la diversification des souches de levures pendant les procédés de fermentation constitue aujourd'hui une méthode de choix pour l'élaboration de bières aux arômes diversifiés. Etant donné les ressources immenses en levures non-*Saccharomyces* productrices d'arômes, l'utilisation des levures non-

Saccharomyces pendant les procédés de fabrication des bières est une méthode prometteuse. C'est pourquoi, depuis une dizaine d'année la recherche de nouvelles levures utilisables en fermentation simple ou mixte pour la production de bières aromatisées s'est intensifiée (Holt *et al.,* 2018 ; Gibson *et al.,* 2017 ; Michel *et al.,* 2016b ; Capece *et al.,* 2018). Le Tableau X fait état des souches levuriennes utilisées en aromatisation de bière retrouvée dans la littérature.

Tableau X. Levures non-*Saccharomyces* étudiées en production de bière aromatisée

Levures	Applications	Type de fermentation
Brettanomyces anomalus / Dekkera anomala	Aromatisation Faibles teneurs en calories	Simple [1-4, 11]
Brettanomyces/ Dekkera bruxellensis	Aromatisation Faibles teneurs en calories	Simple [1-5, 11]
Candida tropicalis	Accélération de la fermentation du moût	Simple [4, 12] Mixte [12]
Cyberlindnera fabaani	Aromatisation Faibles teneurs en alools	Mixte [6]
Hanseniaspora uvarum	Aromatisation	Simple [1]
Lachancea thermotolerans	Aromatisation	Simple [2, 5, 7, 13, 19]
Pichia kluyveri	Aromatisation Faibles teneurs en alcools	Simple [1, 2, 4, 5]
Pichia kudriavzevii	Aromatisation	Mixte [6, 9, 10]
Saccharomycodes ludwigii	Aromatisation Faibles teneur en alcool	Simple [2, 4, 14]
Scheffersomyces shehatae	Aromatisation	Simple [2, 4, 5]
Torulaspora delbrueckii	Aromatisation Faibles teneurs en alools	Simple [1, 2, 4, 8, 16, 17, 19] Mixte [8]
Wickerhamomyces anomalus	Aromatisation Faibles teneurs en calories	Simple [1, 2, 5, 13]
Wickerhamomyces subpelliculosus	Faibles teneurs en alools	Simple [1]
Williopsis saturnus	Aromatisation Faibles teneurs en alools	Simple [1, 18]
Zygosaccharomyces rouxii	Aromatisation Faibles teneurs en alcool	Simple [2, 4, 5, 14]
Zygotorulsapora florentina	Aromatisation	Simple [13]

[1] Basso *et al.,* 2016; [2] Capece *et al.,* 2018; [3] Holt *et al.,* 2018; [4] Michel *et al.,* 2016b; [5] Gibson *et al.,* 2017 ; [6] van Rijswijck *et al,.* 2017 ; [7] Domizio *et al.,* 2016 ; [8] Canonico *et al.,* 2017 ; [9] Saerens et Swiegers, 2013 ; [10] Saerens et Swiegers, 2014 ; [11]Serra Colomer *et al.,* 2019 ; [12] Alloue-Boraud *et al.,* 2015 ; [13] Canonico *et al.,* 2019 ; [14] De Francesco *et al.,* 2015 ; [15] Canonico *et al.,* 2016 [16] Tataridis *et al.,* 2013 ; [17] Toh *et al.,* 2018 ; [18] Liu et Quek, 2016 ; [19] Callejo *et al.,* 2019

Bien que toutes les espèces présentées dans ce tableau aient montré des

résultats intéressants en termes d'aromatisation, dans ce chapitre, nous ne développerons que les principaux résultats obtenus pour les espèces *Brettanomyces anomalus*, *B. bruxellensis*, *Torulaspora delbrueckii* et *Pichia kluyverii* puisqu'il s'agit de celles ayant fait l'objet du plus grand nombre d'articles dans la littérature.

Les premières souches de levures non-*Saccharomyces* ayant fait l'objet d'études approfondies ont été des souches de levures initialement retrouvées dans les brassins de bière de type « Lambic » (Steensels et Verstrepen, 2014 ; Crauwels *et al.,* 2015). Les souches du genre *Brettanomyces*, notamment *B. bruxellensis* et *B. anomalus*, ont ainsi particulièrement interessées les chercheurs pour leur production élevée en COVs sous forme de composés phénoliques, d'esters éthyliques ou d'acides gras. La possibilité d'utiliser cette levure pour la production de bières ayant des notes boisée, amère, fruitée et phénolique a ainsi largement été démontrée, si bien qu'aujourd'hui ces levures participent à la production de nombreuses bières de style *Brettanomyces* (Figure 12). En plus d'apporter des arômes intenses pendant la fermentation des bières, les *Brettanomyces spp.* ont montré la capacité de métaboliser un grand nombre de mono- di- et tri-saccharides ainsi que des dextrines présentes dans le moût. Ceci entraîne une forte réduction des teneurs en sucres associée à une teneur en éthanol comparable aux bières standards (obtenues par fermentation simple avec *S. cerevisiae*) dans les bières finales. C'est pourquoi, elles sont également appliquées pour produire des bières à faible teneur en calories (Serra *et al.,* 2019).

La souche *Torulaspora delbrueckii* a montré une résistance particulière à de nombreux stress physico-chimiques présents dans la bière, c'est pourquoi ces dernières années, le nombre de recherche sur son utilisation en procédé brassicole n'a cessé d'augmenter (Toh *et al.,* 2018 ; Tataridis *et al.,* 2013 ; Michel *et al.,* 2016b ; Canonico *et al.,* 2016; 2017; 2019). Cette souche est particulièrement appréciée pour apporter des notes de banane, de chewing-gum ou de clou de girofle dans les bières (Pettruzi *et al.,* 2016). Néanmoins, *Torulaspora delbrueckii* a montré des capacités fermentaires moindres qui conduisent à la production de bières à faibles teneurs en

alcools. C'est pourquoi des efforts de recherche ont été réalisés pour proposer des méthodes de fermentation mixte entre *Torulaspora delbrueckii* et *S. cerevisiae* pendant l'étape de fermentation des bières pour tirer à la fois profit du pouvoir d'aromatisation de *T. delbrueckii* et du pouvoir fermentaire de *S. cerevisiae*.

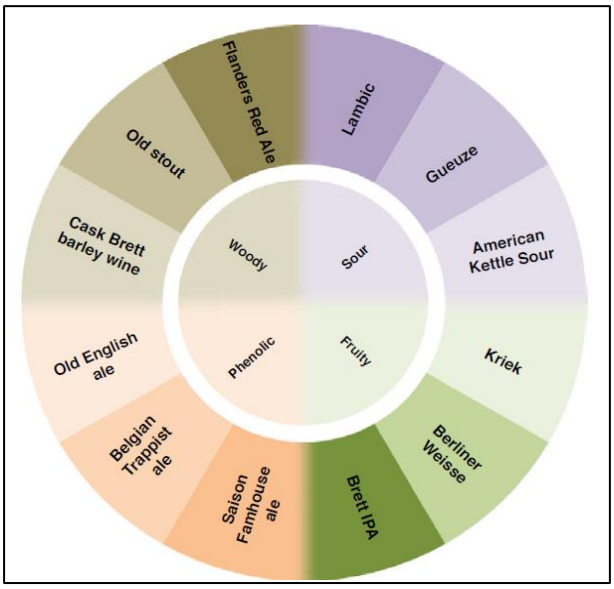


Figure 12. Bières de style *Brettanomyces* retrouvées actuellement sur le marché mondial (tiré de Serra Colomer *et al.*, 2019)

Le même constat a été fait pour la souche de *P. kluyverii*. En effet, les études ont montré un pouvoir aromatisant élevé de cette souche en fermentation de bière. Néanmoins, étant donné le très faible pouvoir fermentaire de la souche de *P. kluyveri*, cela conduit à des bières ayant de faibles teneurs en alcool. Par contre, l'introduction d'une seconde souche de type *Saccharomyces sp.* ou *Brettanomyces sp.* dans le procédé de fermentation peut permettre d'augmenter la teneur en alcool dans les bières fermentées avec une souche de *P. kluyverii*. L'utilisation de cette souche pour la production de bières aromatisées à teneur en alcool modérée par fermentation mixte a fait l'objet d'un premier brevet en 2013 (Saerens et Swiegers, 2013). De plus, son utilisation en fermentation simple pour la production de bière sans ou à faible teneur en alcool a fait l'objet d'un second brevet en 2014 (Saerens et Swiegers, 2014).

Ainsi, de façon générale, la plupart des levures non-*Saccharomyces*, malgré une production de composés d'arômes accrue comparée aux levures conventionnelles,

possèdent une capacité limitée à fermenter les sucres du moût – notamment le maltose et le maltotriose - en éthanol. L'utilisation de levures non-*Saccharomyces* par fermentation simple est ainsi souvent utilisée comme une stratégie d'obtention de bières sans ou à faible teneur en alcool (Saerens et Swiegers, 2014 ; De Francesco *et al*., 2015 ; Budroni *et al.,* 2017 ; Branyik *et al.,* 2012 ; Bellut et Arendt, 2019). Toutefois, afin de produire des bières fortement aromatisées mais avec des teneurs en alcool qui soient comparables aux bières classiques (c'est-à-dire fermentées avec des souches de *Saccharomyces sp.*), les stratégies de fermentation mixtes sont préférables. Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à la capacité d'aromatisation de la levure *S. suaveolens* en production de bières par fermentation simple et fermentation mixte.

IV. Références bibliographiques

Abirami S., Revathi P., Pushpa A.S.R, and Kannan M. 2018. "Random UV mutagenesis stimulated over production of citric acid by *Aspergillus niger*."*International Journal of Recent Research Aspects* : 316-324

AFNOR. 1992. "NF ISO 5492 - Mai 1992." [en ligne]. Disponible sur : https://m.boutique.afnor.org

Alloue-Boraud W.A.M, N'Guessan K.F, Djeni N'D.T., Hiligsmann S., Djè K.M., and Delvigne F. 2015. "Fermentation Profile of *Saccharomyces cerevisia*e and *candida tropicalis* as starter cultures on Barley Malt Medium." *Journal of Food Science and Technology* 52 (8): 5236–42.

Arora N., Yen H.-W., and Philippidis G.P. 2020. "Harnessing the power of mutagenesis and adaptive laboratory evolution for high lipid production by oleaginous microalgae and yeasts." *Sustainability* 12 : 5125-5152

Bahareh, R. Z., and Mehrdad A. 2011. "Increasing the bioethanol yield in the presence of furfural via mutation of a native strain of *Saccharomyces cerevisiae*." *African Journal of Microbiology Research* 5 (6): 651–656.

Bajwa P. K., Shireen T., D'Aoust F., Pinel D., Martin V.J.J, Trevors J.T., and Lee H. 2009. "Mutants of the Pentose-Fermenting Yeast *Pichia Stipitis* with improved tolerance to inhibitors in hardwood spent sulfite liquor." *Biotechnology and Bioengineering* 104 (5): 892–900.

Barsoum, M., Kusch S., Frantzeskakis L., Schaffrath U., and Panstruga R. 2020. "Ultraviolet mutagenesis coupled with next-generation sequencing as a method for functional interrogation of powdery mildew genomes." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 33 : 1008-1021

Basso R.F., Alcarde A.R., and Portugal C. 2016. "Could non-*Saccharomyces* yeasts contribute on innovative brewing fermentations?" *Food Research International* 86: 112–120.

Bellut K., and Arendt E.K. 2019. "Chance and challenge: non- *Saccharomyces* yeasts in nonalcoholic and low alcohol beer brewing – A review." *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 77 (2): 77–91.

Berger R.G. 2009. "Biotechnology of flavours—the next generation." *Biotechnology Letters* 31 (11): 1651–1659.

Berger, R.G. 2015. "Biotechnology as a source of natural volatile flavours." *Current Opinion in Food*

Science 1: 38–43.
Bhari R., and Singh R.S.. 2019. "Microbial production of natural flavours." In *Technology of Handling, Packaging, Processing, Preservation of Fruits and Vegetables : Theory and Practicals*, New India Publising Agency, 767–813. New Dehli, India.
Blieck L.,G., Dumortier T.F., Verstrepen K.J., Delvaux F.R., Thevelein J.M., and Van Dijck P. 2007. "Isolation and characterization of brewer's yeast variants with improved fermentation performance under high-gravity conditions." *Applied and Environmental Microbiology* 73 (3): 815–824.
Bogacz-Radomska L., Pietkiewicz J.J., and Górska K.. 2008. "Aroma Production And Application In Food Products."
Bonnarme Pa., Arfi K., Dury C., Helinck S., Yvon M., and Spinnler H.-E. 2001. "Sulfur compound production by *Geotrichum Candidum* from L-methionine: importance of the transamination step." *FEMS Microbiology Letters* 205 (2): 247–252.
Bose J. L. 2014. "Chemical and UV Mutagenesis." In *The Genetic Manipulation of Staphylococci*, edited by Jeffrey L. Bose, 1373:111–115. New York, NY: Springer New York.
Branyik T., Silva D.P., Braszczynski M., Lehnert R., and Silva J.A. 2012. "A review of methods of low alcohol and alcohol-free beer production." *Journal of Food Engineering* 108: 493–506.
Brash D.E., Jeffrey A.R., Jeffrey A.S, Anthony L., McKenna G., P. Baden H.P., Halperin A.J., and Ponten J.. 1991. "A role for sunlight in skin sancer : UV-induced P53 mutations squamous cell carcinoma." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88: 10124–10128.
Brewers Association. 2014. "2014 Beer Style Guidelines." [en ligne]. Disponible sur https://brewersassoc.s3
———. 2015. "2015 Beer Style Guidelines." [en ligne]. Disponible sur https://brewersassoc.s3
———. 2016. "2016 Beer Style Guidelines." [en ligne]. Disponible sur https://brewersassoc.s3
———. 2017. "2017 Beer Style Guidelines." [en ligne]. Disponible sur https://brewersassoc.s3
———. 2018. "2018 Beer Style Guidelines." [en ligne]. Disponible sur https://brewersassoc.s3
———. 2019. "2019 Beer Style Guidelines." [en ligne]. Disponible sur https://brewersassoc.s3
———. 2020. "2020 Beer Style Guidelines." [en ligne]. Disponible sur https://brewersassoc.s3
Brosset E., and Noiville C. 2019. "Droit Des Biotechnologies." *Cahiers Drois, Sciences & Technologies* 8: 197–212.
Budroni M., Zara G., Ciani M., and Comitini F. 2017. "*Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* starter yeasts." In *Brewing Technology*, edited by Makoto Kanauchi. InTech.
Buzzini P., Martini A., Cappelli F., Pagnoni U.M., and Davoli P. 2003. "A study on volatile organic compounds (VOCs) produced by tropical ascomycetous yeasts." *Antonie van Leeuwenhoek* 84 (4): 301–311.
Callejo M.J., Garcia Navas J.J., Alba R., Escott C., Loira I., Gonzales M.C. and Morata A. 2019. Wort fermentation and beer conditioning with selected non *Saccharomyces* yeasts in craft beers. *European Food Research and Technology* 245 : 1229-1238
Canonico L., Agarbati A., Comitini F. and Ciani M. 2016. "*Torulaspora Delbrueckii* in the brewing process: a new approach to enhance bioflavour and to reduce ethanol content." *Food Microbiology* 56: 45–51.
Canonico L., Comitini F., and Ciani M. 2017. "*Torulaspora Delbrueckii* contribution in mixed brewing fermentations with different *Saccharomyces cerevisiae* strains." *International Journal of Food Microbiology* 259: 7–13.
Canonico L., Galli E., Ciani E., Comitini F., and Ciani M. 2019. "Exploitation of three non-conventional yeast species in the brewing process." *Microorganisms* 7 (1): 11-15.
Capece A., Romaniello R., Siesto G., and Romano R. 2018. "Conventional and non-conventional yeasts in beer production." *Fermentation* 4 (2): 38-49.
Carlquist M., Gibson B., Yuceer Y.K., Paraskevopoulou A., Sandell M., Angelov A.I., Gotcheva V., Angelov A.D., Etschmann M., and de Billerbeck G.M. 2015. "Process engineering for

bioflavour production with metabolically active aeasts– A mini-review." *Yeast* 32 (1): 123–143.

Colón M., Hernández F., López K., Quezada H., González J., López G., Aranda C., and González A. 2011. "*Saccharomyces cerevisiae BAT1* and *BAT2* aminotransferases have functionally diverged from the ancestral-like *Kluyveromyces lactis* orthologous enzyme." Edited by Geraldine Butler. *PLoS ONE* 6 (1): e16099.

Crauwels S., Steensels J., Aerts G., Willems K.A., Verstrepen K.J., and Lievens B.. 2015. "*Brettanomyces Bruxellensis*, essential contributor in spontaneous beer fermentations providing novel opportunities for the brewing industry." *BrewingScience* 68 (9–10): 110–121.

Damasceno S., Cereda M.P., Pastore G.M., and Oliveira J.G.. 2003. "Production of volatile compounds by *Geotrichum fragrans* using cassava wastewater as substrate." *Process Biochemistry* 39 (4): 411–414.

De Francesco G., Turchetti B., Sileoni V., Marconi O.,, and Perretti G.. 2015. "Screening of new strains of *Saccharomycodes ludwigii* and *Zygosaccharomyces rouxii* to produce low-alcohol beer." *Journal of the Institute of Brewing* 121 (1): 113–121.

De Oliveira S.M.M., Damasceno Gomes S., Sene L., Machado S.R., Coelho A.C.B., Cereda M.P., Divair Christ, and Piechontcoski J. 2013. "Production of 2-phenylethanol by *Geotrichum fragrans, Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus* in cassava wastewater." *Journal of Food and Agricultural Environment* 11 (2): 158–163.

De Oliveira F.L., de Oliveira A.M., and Lemos B.J. 2017. "Bioaromas - perspectives for sustainable development." *Trens in Food Science & Technology* 62: 141–153.

De Oliveira F.L., Nicolau P.B., Sales A, Gustavo M., and Bicas J.L.. 2019. "Production of food aroma compounds (microbial and enzymatic methodologies)." In *Food Aroma Evolution*, by Matteo Bordiga and Leo M.L. Nollet, edited by Matteo Bordiga and Leo M.L. Nollet, 1st ed., 293–306. 1st edition. | Boca Raton : CRC Press, 2019. | Series: Food analysis & properties, 2475-7551: CRC Press.

De Vries H., 1909. *The Mutation Theory: Experiments and Observations on the Origin of Species in the Vegetable Kingdom. Vol. I. The Origin of Species by Mutation.* Chicago: Open Court Publishing Company.

Domizio, P., House J. F., Joseph C. M. L., Bisson L. F., and Bamforth C. W.. 2016. "*Lachancea thermotolerans* as an alternative yeast for the production of beer: *Lachancea thermotolerans* in beer fermentation." *Journal of the Institute of Brewing* 122 (4): 599–604.

Dzialo M.C, Park R., Steensels J., Lievens B., and Verstrepen K.J. 2017. "Physiology, ecology and industrial applications of aroma formation in yeast." *FEMS Microbiology Reviews* 41 (1): S95–128.

Ebert E., Halbfeld B.C, and Blank L.M. 2017. "Exploration and exploitation of the yeast volatilome." *Current Metabolomics* 5 (2) : 102-118

Farbood M.I., Morris J.A., and Seitz E.W. 1987. Preparation of naturally-occurring C2–C5 alkyl esters of C4–C5 carboxylic acids bymeans of fermentation of C5–C6 amino acids in the presence of C2–C5 alcohols. US4657862 A, filed 1987, and issued 1987.

———. 1992. Fermentation process for preparation of alkyl esters of carboxylic acids. EP0170243, issued 1992.

Fleck O. 2004. "DNA Repair." *Journal of Cell Science* 117 (4): 515–517.

Flores C.L., Rodriguez C., Petit T., and Gancedo C.. 2000. "Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts." *FEMS Microbiology Reviews* 24 (4): 507–529.

Foster P.L. 2000. "Adaptive mutation: implications for evolution." *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 22 (12): 1067–1074.

Gallone B., Mertens S., Gordon J.L., Maere S., Verstrepen K.J., and Steensels J. 2018. "Origins, evolution, domestication and diversity of *Saccharomyces* beer yeasts." *Current Opinion in Biotechnology* 49: 148–155.

Gethins L., Guneser O., Demirkol A., Rea M.C., Stanton C., Ross R.P., Yuceer Y.K., and Morrissey J.P.

2015. "Influence of carbon and nitrogen source on production of volatile fragrance and flavour metabolites by the yeast *Kluyveromyces marxianus*: nutrient effects on volatiles in *K. marxianus*." *Yeast* 32 (1) : 67-76

Gibson B., Geertman J.-M. A., Hittinger C.T., Krogerus K., Libkind D., Louis E.J., Magalhães F., and Sampaio J.P. 2017. "New yeasts—New brews: modern approaches to brewing yeast design and development." *FEMS Yeast Research* 17 (4): 1–13.

Grondin, E. 2014. "Exploration du potentiel biotechnologique des levures endémiques et indigènes de La Réunion et de Madagascar à produire des molécules d'arômes." Université de la Réunion.

Grondin E., Shum Cheong Sing A., Caro Y., Raherimandimby M., Randrianierenana A.L., James S., Nueno-Palop C., François J.M., and Petit T. 2015a. "A comparative study on the potential of epiphytic yeasts isolated from tropical fruits to produce flavoring compounds." *International Journal of Food Microbiology* 203: 101–108.

Grondin E., Shum Cheong Sing A., Caro Y., Billerbeck G.M., François J.M., and Petit T. 2015b. "Physiological and biochemical characteristics of the ethyl tiglate production pathway in the yeast *Saprochaete suaveolens*." *Yeast* 32 (1): 57–66.

Grondin E., Shum Cheong Sing A., James S., Nueno-Palop C., François J.M., and Petit T. 2017. "Flavour production by *Saprochaete* and *Geotrichum* yeasts and their close relatives." *Food Chemistry* 237: 677–684.

Gruijl, F.R. 1999. "Skin cancer and solar UV radiation." *European Journal of Cancer* 35: 2003–2009.

Guo M., Cheng S., Chen G., and Chen J. 2019. "Improvement of Lipid production in oleaginous yeast *Rhodosporidium toruloides* by Ultraviolet mutagenesis." *Engineering in Life Sciences* 19 (8): 548–556.

Hashimoto S., Ogura M., Aritomi K., Hoshida H., Nishizawa Y., and Akada R. 2005. "Isolation of auxotrophic mutants of diploid industrial yeast strains after UV Mutagenesis." *Applied and Environmental Microbiology* 71 (1): 312–319.

Hawary H., Rasmey A.-H. M., Aboseidah A.A., El-Morsi E.-S, and Hafez M. 2019. "Enhancement of glycerol production by UV-mutagenesis of the marine yeast *Wickerhamomyces anomalus* HH16: kinetics and optimization of the fermentation process." *3 Biotech* 9 (12): 446.

Hazelwood L. A., Daran J.-M., van Maris A. J. A., Pronk J. T., and Dickinson J. R.. 2008. "The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism." *Applied and Environmental Microbiology* 74 (12): 3920–3920.

Heineken. 2018. "Wild Lager." [en ligne]. Disponible sur www.heineken.com

Hellwig M., Beer F., Witte S., and Henle T. 2018. "Yeast metabolites of glycated amino acids in beer." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66 (28): 7451–7460.

Holt S., Mukherjee V., Lievens B., Verstrepen K.J., and Thevelein J.. 2018. "Bioflavoring by non-conventional yeasts in sequential beer fermentations." *Food Microbiology* 72: 55–66.

Iattici F., Catallo M., and Solieri L. 2020. "Designing new yeasts for craft brewing: when natural biodiversity meets biotechnology" *Beverages* 6 (1) :

Ikehata H., and Ono T. 2011. "The mechanisms of UV mutagenesis." *Journal of Radiation Research* 52 (2): 115–125.

İşcan G., Demirci B., Demirci F., and Başer K.H.C. 2015. "Headspace Solid Phase Microextraction (HS-SPME) and analysis of *Geotrichum fragrans* volatiles." *Natural Volatiles & Essential Oils* 2 (2): 45–51.

İşleten H.M. 2018. "Study of increasing the production of volatile flavor compounds by the yeast *Kluyveromyces marxianus* through optimization of carbon and nitrogen sources." *Food and Health*, 4 (2) : 112-123

Kao T.-H. 2018. "Health potential for beer brewing byproducts." In *Current Topics on Superfoods*, edited by Naofumi Shiomi. InTech.

Kilbey B.J., and James A.P. 1977. "The timing of UV mutagenesis in yeast : a pedigree analysis of induced recessive mutation," *Genetics* 87 (2) : 237-248

Kobayashi M., Shimizu H., and Shioya S.. 2008. "Beer volatile compounds and their application to low-malt beer fermentation." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 106 (4): 317–323.

Larroche C., Besson I., and Gros J.B. 1994. "Behavior of spores of *Penicillium roquefortii* during fed-batch bioconversion of octanoic acid into 2-Heptanone." *Biotechnology and Bioengineering* 44 (6): 699–709.

Le Parlement européen et le Conseil de l'Union européenne. 2001. "Directive 2001/18/CE Du Parlement Européen et Du Conseil Du 12 Mars 2001 Relative à La Dissémination Volontaire d'organisme Génétiquement Modifiés Dns l'environnement et Abrogeant La Directive 90/220/CEE Du Conseill." [en ligne]. Disponible sur: eur-lex.europa.eu

Libkind D., Hittinger C.T., Valério E., Gonçalves C., Dover J., Johnston M., Gonçalves P., and Sampaio J.P.. 2011. "Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (35): 14539–14544.

Lichancová H., Hodorová V., Sienkiewicz K., Penir S.M.U, Afanasyev P., Boceck D., Bonnin S., 2019. "Genome sequence of flavor-producing yeast *Saprochaete Suaveolens* NRRL Y-17571." Edited by Christina Cuomo. *Microbiology Resource Announcements* 8 (9).

Liu S.-Q., and Quek A.Y.H. 2016. "Evaluation of beer fermentation with a novel yeast *Williopsis saturnus*." *Food Technology and Biotechnology* 54 (4): 403–412.

McGregor W.G. 1999. "DNA repair, DNA replication, and UV mutagenesis." *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* 4 (1): 1–5.

Mdaini N., Mohamed G., Hammami M., Monser L., and Hamdi M. 2006. "Production of natural fruity aroma by *Geotrichum candidum*." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 128 (3): 227–235.

Michel M., Meier-Dörnberg T., Jacob F., Methner F.-J., R. Wagner S., and Hutzler M.. 2016a. "Review: Pure non- *Saccharomyces* starter cultures for beer fermentation with a focus on secondary metabolites and practical applications: non-conventional yeast for beer Fermentation." *Journal of the Institute of Brewing* 122 (4): 569–587.

Michel M., Kopecká J., Meier-Dörnberg T., Zarnkow M., Jacob F., and Hutzler M. 2016b. "Screening for new brewing yeasts in the non-*Saccharomyces* sector with *Torulaspora delbrueckii* as model." *Yeast* 33 (4): 129–144.

Nei M., and Nozawa M. 2011. "Roles of mutation and selection in speciation: from Hugo de Vries to the modern genomic era." *Genome Biology and Evolution* 3: 812–829.

Oak A. S. W., Athar M., Yusuf N., and A. Elmets C.A.. 2018. "UV and skin: photocarcinogenesis." In *Environment and Skin*, edited by Jean Krutmann and Hans F. Merk, 67–103. Cham: Springer International Publishing.

Olaniran A.O., Hiralal L., Mokoena M.P., and Pillay B.. 2017. "Flavour-active volatile compounds in beer: production, regulation and control." *Journal of the Institute of Brewing* 123 (1): 13–23.

Parlement européen et du Conseil. 2008. "Règlement (CE) N°1334/2008 Du Parlement Européen et Du Conseil Du 16 Décembre 2008 Relatif Aux Arômes et à Certains Ingrédients Alimentaires Possédant Des Propriétés Aromatisantes Qui Sont Destinés à Être Utilisés Dans et Sur Les Denrées Alimentaires et Modifiant Le Règlement (CEE) N°1601/91 Du Conseil, Les Règlements (CE) N°2232/96 et (CE) N°110/2008 et La Directive 2000/13/CE." [en ligne]. Disponible sur : https://eur-lex.europa.eu

Peddie H.A.B., 1990. "Ester Formation in Brewery Fermentations." *Journal of Inst. Brew* 96: 327–31.

Pessôa M.G., Vespermann K.A.C., Paulino B.N., Barcelos M.C.S, Pastore G.M., and Molina G. 2019. "Newly isolated microorganisms with potential application in biotechnology." *Biotechnology Advances* 37 (2): 319–339..

Petruzzi L., Corbo M.R., Sinigaglia M., and Bevilacqua A. 2016. "Brewer's yeast in controlled and uncontrolled fermentations, with a focus on novel, nonconventional, and superior strains." *Food Reviews International* 32 (4): 341–363.

Pinel D., D'Aoust F., del Cardayre S.B., Bajwa P.K., Lee H., and Martin V.J.J. 2011. "*Saccharomyces cerevisiae* genome shuffling through recursive population mating leads to improved tolerance

to spent sulfite liquor." *Applied and Environmental Microbiology* 77 (14): 4736–4743.

Pinotti T., arvhalho P.M.B, and Garcia K.M.G. 2006. "Media components and amino acid supplements influencing the production of fruity aroma by *Geotrichum candidum*." *Brazilian Journal of Microbiology* 37: 494–498.

Qvirist L., Vorontsov E., Vilg J.V., and Andlid T. 2017. "Strain improvement of *Pichia kudriavzevii* TY13 for raised phytase production and reduced phosphate repression." *Microbial Biotechnology* 10 (2): 341–353.

Rasmey A.-H., Hawary H., Abu-seidah A., Ahmed M., and Khalaf E.-S. 2020. "Glycerol production by the UV-mutant marine yeast *Wickerhamomyces anomalus* HH16-MU15 via simultaneous saccharification and fermentation of fruit peels." *Frontiers in Scientific Research and Technology* 1 (1) : 74-80

Ravasio D., Carlin S., Boekhout T., Groenewald M., Vrhovsek U., Walther A., and Wendland J.. 2018. "Adding flavor to beverages with non-conventional yeasts." *Fermentation* 4 (1): 15.

Resnick M.A. 1969. "Induction of mutations in *Saccharomyces cerevisiae* by Ultraviolet light." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 7 (3): 315–332.

Revin V., Atykyan N., Lyovina E., Dragunova Y., and Ushkina V.. 2018. "Effect of Ultraviolet radiation on physiological and biochemical properties of yeast *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation of ultradispersed starch raw material." *Electronic Journal of Biotechnology* 31: 61–66.

Romagnoli G., Luttik M.A.H., Kötter P., Pronk J.T., and Daran J.-M. 2012. "Substrate specificity of thiamine pyrophosphate-dependent 2-oxo-acid decarboxylases in *Saccharomyces cerevisiae*." *Applied and Environmental Microbiology* 78 (21): 7538–7548.

Roy P., and Kumar V. 2019. "Production of bioflavour from microbial sources and its health benefits." *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics* 56: 352–357.

Saerens S., and Swiegers J.H. 2014. Production of low-alcohol or alcohol free beer with Pichia kluyveri yeast strains. World intellectual property organization WO 2014/135673 A2, filed 2013, and issued 2014.

Saerens S., and Swiegers J.H.. 2013. Enhancement of beer flavor by a combination of Pichia yeast and different hop varieties. World intellectual property organization WO 2013/030398 A1, filed 2012, and issued 2013.

Safran R.J., and Nosil P. 2012. "Speciation : the origin of new species." *Nature Education Kknowledge* 3 (10): 17.

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+-dependent Ald6p and Ald5p isoforms play a major role in acetate formation." *Microbiology* 150 (7): 2209–2220.

Sales A., Paulino B.N., Pastore G.M., and Bicas J.L. 2018. "Biogeneration of aroma compounds." *Current Opinion in Food Science* 19: 77–84.

Schifferdecker A.J., Dashko S., Ishchuk O.P., and Piškur J. 2014. "The wine and beer yeast *Dekkera bruxellensis*." *Yeast* 31 (9): 323–332.

Serra Colomer M., Funch B., and Forster J. 2019. "The raise of *Brettanomyces* yeast species for beer production." *Current Opinion in Biotechnology* 56: 30–35.

Setlow R. B., 1974. "The wavelengths in sunlight effective in producing skin cancer: A theoretical analysis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71 (9): 3363–3366.

Setlow R.B.E.G., Thompson K., and Woodhead A.D. 1993. "Wavelengths effective in induction of malignant melanoma." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (14): 6666–6670.

De Souza Varize C., Christofoleti-Furlan R.M., de Souza M.M., de Melo Pereira G.V., Lopes L.D., and Basso L.C. 2019. "Biotechnological applications of nonconventional yeasts." In *Yeasts in Biotechnology*, edited by Thalita Peixoto Basso. IntechOpen.

Spagnuolo M., Yaguchi A., and Blenner M. 2019. "Oleaginous yeast for biofuel and oleochemical production." *Current Opinion in Biotechnology* 57: 73–81.

Spencer J.F.T., and Spencer D.M. 1996. "Mutagenesis in Yeast." *Yeast Protocols*, 17–38.

Sridhar M., Sree N.K., and Rao L.V.. 2002. "Effect of UV radiation on thermotolerance, ethanol tolerance and osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae* VS 1 and VS 3 strains." *Bioresource Technology* 83 (3): 199–202.

Steensels J., Snoek T., Meersman E., Nicolino M.P., Voordeckers K, and Verstrepen K.J. 2014. "Improving industrial yeast strains : exploiting natural and artifical diversity." *FEMS Microbiology Reviews* 38: 947–998.

Steensels J., and Verstrepen K.J. 2014. "Taming wild yeast : potential of conventional and nonconventional yeasts in industrial fermentations." *Annual Review of Microbiology* 68: 61–80.

Stevens R. 1960. "Volatile products of fermentation : a review." *Brewing Industry Research Foundation* 66: 453–471.

Styger G., Jacobson D., and Bauer F.F. 2011. "Identifying genes that impact on aroma profiles produced by *Saccharomyces cerevisiae* and the production of higher alcohols." *Applied Microbiology and Biotechnology* 91 (3): 713–730.

Styger G., Jacobson D., Prior B.A., and Bauer F.F. 2013. "Genetic analysis of the metabolic pathways responsible for aroma metabolite production by *Saccharomyces cerevisiae*." *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (10): 4429–4442.

Szlavko C.M. 1973. "Tryptophol, Tyrosol and Phenylethanol - the Aromatic higher alcohols in beer." *Journal of the Institute of Brewing* 79 (4): 283–288.

Taloria D., Sutanu S., Das S., and ututunda C.. 2012. "Increase in bioethanol production by random UV mutagenesis of *S. cerevisiae* and by addition of zinc ions in the alcohol production media." *APCBEE Procedia* 2: 43–49.

Tapia E., Anschau A., Coradini A.L.V, Franco T.T., and Deckmann A.. 2012. "Optimization of lipid production by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* by random mutagenesis coupled to cerulenin screening." *AMB Express* 2 (1): 64.

Tataridis P., Kanellis A., Logothetis S., and Nerantzis E.. 2013. "Use of non-*Saccharomyces Torulaspora delbrueckii* yeast strains in winemaking and brewing." *Journal of Natural Sciences* 124: 415–426.

Teunissen A., Françoise F., Gorwa M.-F., Bauer J., Tanghe A., Loïez A., Smet P., Van Dijck P., and Thevelein J.M.. 2002. "Isolation and characterization of a freeze-tolerant diploid derivative of an industrial baker's yeast strain and its use in frozen doughs." *Applied and Environmental Microbiology* 68 (10): 4780–4787.

The brewers of Europe. 2015. "Beers Statistics 2015." [en ligne]. Disponible sur : https://brewersofeurope.org

———. 2019. "European Beer Trends." [en ligne]. Disponible sur : https://brewersofeurope.org

Toh D., Kiat D.W., Chua J.Y., and Liu S.Q. 2018. "Impact of simultaneous fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii* on volatile and non-volatile constituents in beer." *LWT* 91: 26–33.

Tournier C., Sulmont-Rossé C., and Guichard E. 2007. "Flavour perception: aroma, taste and texture interactions." In *Globl Science Books*, Food, 1:46–257.

Unaldi M.N., Arikan B., and Coral G. 2002. "Isolation of alcohol tolerant, osmotolerant and thermotolerant yeast strains and improvement of their alcohol tolerance by UV mutagenesis." *Acta Microbiologica Polonica* 51 (2): 115–20.

Van Rijswijck I.M.H., Wolkers - Rooijackers J.C.M, Abee T., and Smid E.J.. 2017. "Performance of non-conventional yeasts in co-culture with brewers' yeast for steering ethanol and aroma production." *Microbial Biotechnology* 10 (6): 1591–1602.

Verstrepen K.J., Derdelinckx G., Dufour J.-P., Winderickx J., Thevelein J.M, Pretorius I.S., and Delvaux F.R. 2003. "Flavor-active esters: adding fruitiness to beer." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 96 (2): 110–118.

———. 1910. *The Mutation Theory : Experiments and Observatons on the Origin of Species in the Vegetable Kingdom; Vol. II. The Origin of Varieties by Mutation*. Chicago: Open Court Publishing Company.

Wang J., Shen N., Yin H., Liu C., Li Y., and Li Q. 2013. "Development of industrial brewing yeast with low acetaldehyde production and improved flavor stability." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 169 (3): 1016–1025.

Wang P.-M., Zheng D.-Q., Liu T.-Z., Tao X.-L., Feng M.-G., Min H., Jiang X.-H., and Xue-Chang Wu X.-C. 2012. "The combination of glycerol metabolic engineering and drug resistance marker-aided genome shuffling to improve very-high-gravity fermentation performances of industrial *Saccharomyces cerevisiae*." *Bioresource Technology* 108: 203–210.

Watanabe T., Watanabe I., Yamamoto M., Ando A., and Nakamura T. 2011. "A UV-induced mutant of *Pichia stipitis* with increased ethanol production from xylose and selection of a spontaneous mutant with increased ethanol tolerance." *Bioresource Technology* 102 (2): 1844–1848.

Willaert R. 2007. "The beer brewing process: wort production and beer." *Handbook of Food Products Manufacturing* 2: 443.

Willaert R. and Viktor A.N. 2006. "Primary beer fermentation by immobilised yeast—a review on flavour formation and control strategies." *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 81 (8): 1353–1367.

Winston F. 2008. "EMS and UV mutagenesis in yeast." In *Current Protocols in Molecular Biology*, edited by Frederick M. Ausubel, Roger Brent, Robert E. Kingston, David D. Moore, J.G. Seidman, John A. Smith, and Kevin Struhl. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.

Yamada R., Kashihara T., and Ogino H. 2017a. "Improvment of lipid production by the oleaginous yeast *Rhodosporidum toruloides* through UV mutagenesis." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 33: 1–9.

Yamada R., Yamauchi R., Kashihara T., and Ogino H. 2017b. "Evaluation of lipid production from xylose and glucose/xylose mixed sugar in various oleaginous yeasts and improvement of lipid production by UV mutagenesis." *Biochemical Engineering Journal* 128: 76–82.

Yang Y., Xia Y., Lin X., Wang G., Zhang H., Xiong Z., Yu H., Yu J., and Ai L. 2018. "Improvement of flavor profiles in chinese rice wine by creating fermenting yeast with superior ethanol tolerance and fermentation activity." *Food Research International* 108: 83–92.

Yin H., Dong J.-J., Yu J.-H., Zhong C., Liu L.-P., Liu M., Yang P.-F., Hao J.-G., and Jia S.-R. 2017. "Intracellular metabolite profiling of industrial yeast and the synthesis of flavour compounds in beer: metabolic analysis of flavor during beer fermentation." *Journal of the Institute of Brewing* 123 (3): 328–336.

Ykema A., Verbree E.C., Verwoert I.I.G.S., van der Linden K.H., Nijkamp H.J.J., and Smit H. 1990. "Lipid production of revertants of Ufa mutants from the oleagineaous yeast *Apiotrichum curvatum*." *Applied Microbiology and Biotechnology* 33: 176–182.

Zheng D.-Q., Wu X.-C., Wang P.-M., Chi X.-Q, Tao X.-L., Ping Li, Jiang X.-H., and Zhao Y.-H. 2011. "Drug resistance marker-aided genome shuffling to improve acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 38 (3): 415–422.

Zhu J., Shi J., Lu Y., Liu L., and Liu Y.. 2016. "Application of strains of *Geotrichum spp*. to decrease higher alcohols and to increase esters" *Journal of the Institute of Brewing* 122 (1): 147–155.

CHAPITRE II

Le chapitre I du présent manuscrit de thèse a montré que la production d'arômes naturels par les levures non-Saccharomyces est une option particulièrement intéressante car elle permet la production d'une large gamme de composés organiques volatils à fort potentiel aromatique. Ceci a entrainé une intensification de la recherche pour découvrir de nouvelles levures non-Saccharomyces dans les milieux naturels et leur utilisation en aromatisation.

Parmi les levures non-Saccharomyces citées dans la littérature, Saprochaete suaveolens s'est distinguée du fait de sa haute productivité en esters α-insaturés à haute valeur ajoutée dont la production industrielle par voie naturelle n'est à ce jour toujours pas réalisée. Cette souche pourrait de surcroît, appartenir à la catégorie des organismes dits GRAS (Generally Recognized As Safe).

La voie métabolique de ces esters α-insaturés chez S. suaveolens a été élucidée au laboratoire et peut donc être utilisée comme base pour la recherche de nouvelles levures à fort potentiel aromatique. Dans ce chapitre de thèse, nous nous sommes donc proposés de mettre à profit nos connaissances sur le métabolisme aromatique de S. suaveolens pour cribler des souches de levures capables de produire des esters α-insaturés et isolées à partir de féces d'animaux sauvages d'Afrique du Sud.

Criblage de la biodiversité levurienne des fèces d'animaux sauvages d'Afrique du Sud pour la production d'esters α-insaturés volatils

Melissa TAN[1,2], Yanis CARO[1,2], Alain SHUM-CHEONG-SING[2], Thierry REGNIER[3], Jean-Marie FRANCOIS[4] and Thomas PETIT [1,2]*

[1] Université de la Réunion, Laboratoire de Chimie et Biotechnologies des Produits Naturels (ChemBioPro), Réunion, France

[2] IUT de la Réunion, Département Hygiène, Sécurité et Environnement (HSE), Réunion, France

[3] TUT of Pretoria, Department of biotechnology and Food technology, Pretoria, Afrique du Sud

[4] INSA de Toulouse, Toulouse Biotechnology Institute (TBI), Toulouse, France

Résumé :

La production d'esters α-insaturés associés à des arômes fruités chez la levure *Saprochaete suaveolens* est probablement fortement liée à sa capacité à se développer sur des milieux de culture contenant uniquement des acides aminés branchés (isoleucine, leucine, valine) comme source de carbone (phénotype ILV^+). Cette étude avait pour objectif d'isoler de nouvelles souches productrices d'esters α-insaturés en sélectionnant les souches ILV^+ parmi les fèces d'animaux sauvages d'Afrique du Sud, dans des zones totalement (ou partiellement) dépourvues d'activités humaines. Pour ce faire, après avoir collecté des fèces de 42 espèces différentes de mammifères carnivores et herbivores, de rapaces, de reptiles et d'oiseaux provenant de divers habitats d'Afrique du Sud incluant des zoos, des fermes et des parcs nationaux, nous avons isolé des souches microbiennes sur un milieu YPD-agar agrémenté de 0.1 $g.L^{-1}$ de chloramphénicol pour favoriser le développement des souches de levures. Après quoi, nous avons réalisé des tests de croissance sur des milieux contenant de l'isoleucine, de la leucine et de la valine comme unique source de carbone afin de sélectionner les souches ILV^+. La composition des composés organiques volatils (COVs) de ces souches après développement sur milieu YPD-agar a ensuite été analysée par HS/SPME-CG/SM. Sur les 119 souches isolées à partir de fèces d'animaux sauvages, 43 souches présentaient un phénotype ILV^+. Parmi elles, 22 produisaient des COVs et 12 produisaient des esters α-insaturés. Les analyses statistiques n'ont pas permis de démontrer l'existence d'une corrélation significative entre le caractère ILV^+ et la production d'esters α-insaturés. Par contre, deux esters α-insaturés retrouvés chez deux nouvelles souches isolées des fèces d'animaux sauvages n'avaient pas encore été détéctés dans le volatilome de la souche de *S. suaveolens* ou des autres levures isolées au laboratoire. Ceci suggère que l'investigation des fèces d'animaux sauvages est une voie prometteuse pour isoler des souches productrices de

nouveaux esters α-insaturés.

Mots-clés : Arômes naturels ; voie métabolique d'Ehrlich ; esters α-insaturés ; acides aminés ; *Saprochaete suaveolens* ; *Geotrichum fragrans* ; levures non-*Saccharomyces* ; féces d'animaux sauvages ; biodiversité microbienne

Screening for yeast biodiversity from wild animal faeces of South-Africa for production of volatile α-unsaturated esters

Mélissa TAN[1,2], Yanis CARO[1,2], Alain SHUM-CHEONG-SING[2], Thierry REGNIER[3], Jean-Marie FRANCOIS[4] and Thomas PETIT [1,2]*

[1] Université de la Réunion, Laboratoire de Chimie et Biotechnologies des Produits Naturels (ChemBioPro), Réunion, France ;

[2] IUT de la Réunion, Département Hygiène, Sécurité et Environnement (HSE), Réunion, France ;

[3] TUT of Pretoria, Department of biotechnology and Food technology, Pretoria, Afrique du Sud

[4] INSA de Toulouse, Toulouse Biotechnology Institute (TBI), Toulouse, France

Abstract:

The production of α-unsaturated esters with natural fruity aromas by the yeast *Saprochaete suaveolens* is thought to be closely linked to its ability to develop on media containing only branched-chain aminoacids (isoleucine, leucine and valine) as a carbon source (ILV^+ phenotype). In this study, we aimed at isolating novel α-unsaturated esters producing strains while selecting only for ILV^+ strains from faeces of wild South African fauna. Therefore, after collecting faeces from 42 different species of carnivorous and herbivorous mammals, raptors, reptiles and birds from different locations of South Africa including zoo, game reserve and national park, we isolated strains on YPD-agar media supplemented with 0.1 $g.L^{-1}$ of chloramphenicol to promote the development of yeast strains. Then we performed a growth test on media containing isoleucine, leucine or valine as the sole carbon source to select ILV^+ strains. The composition of volatile organic compounds (VOCs) of these strains after developemnt on YPD-agar medium was then studied by HS/SPME-GC/MS analysis.On the 119 strains isolated on faeces, 43 were shown as ILV^+. Among them, 22 produced VOCs and 12 produced α-unsaturated esters. Finally no significant correlation between the ILV^+ criteria and the production of α-unsaturated esters were found. Nevertheless, two α-unsaturated esters detected in two novels strains isolated in South-Africa were not detected in the volatilome of *S. suaveolens* or others yeast isolated in our laboratory. This suggests that investigation of wild animals faeces is a promising way to isolate strains producing new α-unsaturated esters.

Keywords: Natural flavors; Ehrlich's metabolic pathway ; α-unsaturated esters ; amino acids ; *Sapraochete suaveolens* ; *Geotrichum fragrans* ; non-*Saccharomyces* yeasts ; faeces of wild animals ; microbial biodiversity.

Highlights:

- Fresh faeces from 42 different species of wild animals were aseptically collected from different locations of South Africa including zoo, game reserve and national park.
- 43 of the 119 yeast strains isolated were shown to be able to grow on media containaing only branched-chain aminoacids (isoleucine, leucine and valine) as the sole carbon source.
- 22 yeast strains produced volatile organic compounds (VOCs) and 12 of them were able to produce α-unsaturated esters.
- No significant correlation between the ability to grow on media containing only branched-chain aminoacids as the sole carbon source and α-unsaturated esters production was found.
- 2 α-unsaturated esters rarely identified in the aromatic bouquet of the yeasts were detected in the headspace of 2 newly isolated strains.

I. Introduction

Food flavorings result from a complex mixture of volatile organic compounds (VOCs) whose quantitative or qualitative changes can influence the general perception of the flavor by consumers (Bogacz-Radomska *et al.,* 2008). Recreating a specific food aroma can therefore be a complex task, but the use of an aromatizing agent could be a good alternative. Nowadays such aromatizing agents are mainly produced through chemical synthesis which lead to "artificial aromas". Alternatively, aromas with « natural labels » can be produced through extraction from plants or microorganisms. Synthetic flavors still count for almost 80% of the global food market as they lead to low cost products due to high production efficiency. However, since synthetic production is neither regio- nor chemoselective, it often produces a racemic mixture wich could form toxic compounds upon entering human metabolism. As a result, consumer interest in artificially flavored food products has steadily declined over the last decades, encouraging the search for new methods to produce natural aromas. Extraction from the plants was the first route explored, but it is highly dependent on seasonality contraints and generally shows low production yields. In addition, the high demand for raw material generates environmental challenges (Bhari and Singh, 2019; Roy and Kumar, 2019; Sales *et al.*, 2018).

As a consequence, the research is moving towards the production of natural flavors *via* biotechnological methods that allow the production of aromatic compounds which are more robust and resistant to industrial processes without inducing too high environmental impacts (Roy and Kumar, 2019; Sales *et al.*, 2018; de Oliveira *et al.*, 2017). Among them, the production of aromas using microorganisms offers a wide range of possibilities due to the great diversity of their metabolism which allows them to form various complex VOCs. Among many microorganisms, the yeasts, and in particular from the *Saccharomyces spp.* genera, have been largely

described as good aroma producers notably in the form of alcohols, esters, ketones, aldehydes, acids, lactones and terpenoïds with high flavoring power (Carlquist *et al.*, 2015). Additionally, many studies have shown that yeasts from other genera, also called non-conventional yeasts (NCY) or non-*Saccharomyces* yeasts, play an important role in flavoring of a number of complex fermented drinks such as wine, beer or kefir (Budroni *et al.*, 2017; Schifferdecker *et al.*, 2014; Tataridis *et al.*, 2013; Ravasio *et al.*, 2018). Likewise, many NCYs have been investigated for their production of VOCs on complex media such as yeast-peptone-dextrose (YPD) agar media (Buzzini *et al.*, 2005; Buzzini *et al.*, 2003; Grondin *et al.*, 2015a; 2017). Among them, with more than 30 different VOCs including esters detected in their headspace, *Pichia kluyverii, Torulaspora delbrueckii* and *Saprochaete suaveolens* (former *Geotrichum fragrans*) have been shown to be promising yeast strains for flavor production.

Saprochaete suaveolens has received particular attention because it has been shown to produce highly aromatic α-unsaturated esters such as ethyl 2-methylbut-2-enoate (also known as ethyl-tiglate which harbour aromas such as strawberry, pineapple and fruit-like) and ethyl but-2-enoate (also knows as ethyl crotonate, which generates caramel, pungnent and fruit-like aromas) which are rarely described in the headspace of the microorganisms. In 2015, based on the ethyl tiglate production route already described in apples, Grondin and coworkers showed that these compounds were produced through the catabolism of branched-chained amino acids via the β-oxidation pathway (Grondin *et al.*, 2015b). This pathway involves an enoyl-CoA intermediate which can be esterified into α-unsaturated esters by an alcohol acetyltransferase or which will continue its catabolism through the fatty-acid β-oxidation pathway. This second possibility results in the formation of acetyl-CoA units which are then incorporated into the TCA cycle and further in the glycoxylic shunt, allowing *S. suaveolens* strain to grow on media containing only branched-chain amino acids as the sole carbon source (Grondin *et al.*, 2015b). Based on this observation, we hypothesized that the ability to grow on media containing only

branched-chain amino acids as the sole carbon source (ILV^+ strain) is closely related to the formation of α-unsaturated esters and could therefore be a rapid way of selection for strains able of producing such esters. Currently, researches are focused on the need to explore novel ecological niches, such as wild animal faeces, to isolate strains of yeasts with particular properties and useful applications. Among them, Lorliam *et al.* (2013) discovered various yeasts of different genera using xylose (including *Geotrichum*, *Candida*, *Sporopachydermia,* etc.), while studying the yeast biodiversity of buffalo dung in Thaïland. In India, Kumar and his colleagues (2010) highlighted the occurrence of various anti-microbial fungi (anti-*Candida albicans,* anti-*Micrococcus luteus,* etc.) in the faeces of elephant, rhinos and tigers (Kumar *et al.*, 2010). This would suggest that to discover new natural flagrant producing yeasts, wild animal faeces might be a suitable source. South Africa is well known for its rich ecosystems and national parks, game reserves or animal rehabilitation centers. Thus, they constitute a very interesting and unexplored area to collect the excrements of wild animals which could provide new particular yeasts.

In this study we carried out a campaign to collect faeces from diverse wild animals in South-Africa in order to isolate microbial yeast strains on yeast-peptone-dextrose media, supplemented with 0.1 $g.L^{-1}$ of chloramphenicol (YPD-cloramphenicol). Then, we performed a screening based on the rapid growth capacity on the strains on media containing branched-chain amino acids (isoleucine, valine, and leucine) as the sole carbon source. Finally, we investigated the capacity of the selected strains to produce α-unsaturated esters and their chemical characteristics during growth on YPD medium using headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) coupled to gas-chromatography and mass spectrometry analysis (GC/MS).

II. Materials and Methods

1. Biological materials

Wild type *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK 112-2N (van Dijken *et al.*, 2000) was used in this study. We also used a *Saprochaete suaveolens* (former *Geotrichum fragrans*) strain that was previously isolated from Pitaya fruits (*Hylecereus polyrhisus*) in Reunion Island, France (Grondin *et al.*, 2015a).

Fresh faeces of wild animals were collected aseptically from different locations in the zoo, game reserve and national parks of South Africa (Table 1). For each location, official authorization have been requested and obtained from the organizations concerned. Collection was performed using pre-labelled sterile swabs or tubes, which were hermetically sealed and transported to the laboratory. Then samples were kept at 4°C until use. Additionally, freeze-dried samples of wild animal's faeces were obtained by an anonymous donator. The 118 samples and their origins are presented in Supplementary data A.

Table 1. Collection sites of South African wild animal faeces

Sites names	Type of site and Adresses
Moreleta Kloof Nature Reserve	Game reserve (Helios Street, Moreletapark, Pretoria, Gauteng)
Kruger National Park	National park (Kruger National Park, Mpumalang)
Lory Park Zoo	Zoo (180/1 Kruger Road, President Park, Midrand, Gauteng)
Mc Crindle Farm	Game reserve (Gauteng)
Emoya big cat sanctuary	Zoo (Farm Milumbe, D1939, Lephalale, Limpopo)
Elephant Sanctuary	Zoo (Hartbeespoortdam, Plettenberg bay)
Moholoholo Animal Rehabilitation center	Zoo (Limpopo)

2. Isolation and selection of the yeast strains

For swab samples, swabs were added directly to 10 mL of sterile Ringer's solution. For tube samples, 1 g of faeces was weighted beforehand and dissolved in Ringer's solution. Serial dilutions were then prepared and 100 µL of each dilution

was spread on the surface of Yeast-Peptone-Dextrose agar media (Biolab diagnostics LTD, South Africa) supplemented with 0.1 $g.L^{-1}$ of chloramphenicol (EMDQ Millipore Corp. Billerica, MA USA) (YPD-chloramphenicol) to promote the growth and selection of yeasts. The Petri dishes were then incubated at 30°C for 48 hours until the cell colonies were completely formed. The colonies were then isolated by repeating the subculture on YPD-chloramphenicol agar medium and stored at 4°C. For lyophylised samples, 1g of faeces was resuspended in 10 mL of sterile nutrient broth (Merck, South Africa) and vortexed before incubation at 25°C for 5 days before plating on YPD-chloramphenicol medium.

The selection of strains able to grow on media containing only branched-chain aminoacids (isoleucine, leucine and valine) as the sole carbon source (ILV^+ strains) was carried out as follow. 5 mL of YPD broth were inoculated with each isolated strain and the culture was incubated overnight at 30°C under shaking. The culture was then centrifuged (13 000 rpm, 5min) and the cell pellet was washed twice with 5 mL of sterile physiological water. The cells were then resuspended in 10 mL of sterile physiological water and cell concentration was determined using Thoma cell. Then, a 10^6 $cell.mL^{-1}$ was prepared in sterile physiological water and 10^5 and 10^4 $cell.mL^{-1}$ cultures were prepared by serial dilution. 5µL of each suspension was dropped twice on Yeast Nitrogen Based medium supplemented with 1$g.L^{-1}$ of isoleucine, leucine, valine or 2 $g.L^{-1}$ of glucose (YNB-Ile, YNB-Leu, YNB-Val, YNB-Glu respectively). The strains *S. suaveolens* and *S. cerevisiae* were prepared using the same protocol and were used as positive and negative controls, respectively. The Petri dishes were then incubated for 48 hours at 30°C before reading.

3. Qualitative analysis of volatile organic compound (VOCs)

The strains were innoculated into a 20 mL screw tube containing 15 mL of YPD-agar slant and incubated at 30°C during 24 hours. Then the vials were sealed and reincubated for 24 hours at 30°C. The headspace of inclined cultures was subjected to

headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) analysis using a 2 cm long fiber coated with 50/30 µm divinylbenzene/Carboxen on polydimethylsiloxane bonded to a flexible fused silica core (Supelco). The fiber was then exposed to the strains headspace for 15 min at 30°C and inserted into the injection port at 250°C for 2 min. Metabolites were separated by gas-chromatography (GC/MS) using a ZB-5MSI columns (30m * 0.32mm * 0.25 µm film thickness), coupled to a mass spectrometer (Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra). The carrier gas (H_2) was set at a flow rate of 1.4 $mL.min^{-1}$. The column temperature was maintained at 45°C for 2 min and was raised to 230°C at 4°$C.min^{-1}$. This temperature was maintained during 5 min before end. Volatile organic compounds were identified by comparing their mass spectra and their experimental Kovats index with the NIST database (www.chemdata.nist.gov).

4. Statistical analysis

Experimental data were subjected to factor analysis (Principal component analysis method) and cluster analysis (Ward's method) using XL Stat Applied Sensory software (2020.1.3).

III. Results and discussion

1. Strain distribution

In 2016, while studying the faeces of wild herbivorous mamals from South-Africa, Ndlela and Schmidt (2016) showed that different animal digestive systems can lead to different populations of microorganisms. In this study, we investigated the faecal microbial population of 42 different wild animals, including 13 carnivorous and 16 herbivorous mammals, 8 raptors, 3 birds and 1 reptile for their microbial population (see also Supplementary data A). From these 42 samples, we selected and isolated 119 different yeast strains. The distribution of the strains isolated was highly variable within the animal families. In fact, 90% of the 119 strains were isolated from

the faeces of mammalian animals (herbivorous and carnivorous), while the remaining 10% being distributed between raptors, birds and reptiles (see Figure 13). This result was somewhat expected because faeces from mammalians and reptiles were respectively the highest and the lowest amount in the collection. However, the whole mammalian species from wild or domestic habitat exhibited at least one strain on YPD-chloramphenicol, unlike raptors and birds. Indeed, among the 7 species of raptors, only 2 (namely White Headed Vulture (*Trigonoceps occipitalis*) and Tawney Eagle (*Aquila rapax*)) exhibited microorganisms in their faeces. In addition, only 2 of the 4 birds investigated displayed microorganisms on YPD. It is admitted that not all animals need a microbiome. Indeed, Hammer *et al.*, (2019) distinguished three groups of animals according to their need of symbiosis with microbial organisms. First group is constituted of species for which the microbiome is abundant and essential. For these species, the microbiome play a key role in development, physiology or the defence system. The second group concerned species which are tolerant to microbiome because they take few advantages of the symbionts but which are not dependant of them. In this species, number of microbial organism is low. Finally, the third group is constituted with species for which there is no benefit to host a microbiome. In this case, the animal mainly adapts its organism to prevent microorganism development (Hammer *et al.,* 2019). With those considerations, the low amount of strains isolated from raptors and birds could be due to their gastric acidity, which is considered to be very low for protecting them against foreign microorganisms (Beasley *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2020; Hammer *et al.*, 2019). According to our results, mammalians seem to better benefit the symbiosis with a microbiome as they displayed the highest amount of different strains, we therefore concluded that mammals faeces provided a greater possibility for discovering new microbial strains, with potential biotechnological capacities.

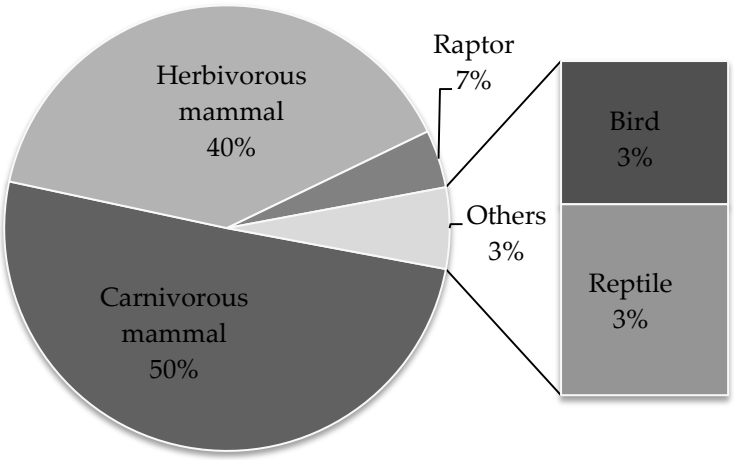


Figure 13. Distribution of the 119 isolated strains among the family of wild animals investigated

Numerous studies have already claimed a possible effect of where and how animal live on their microbiome (Oliveira *et al.*, 2020; Nicholson *et al.*, 2010). For instance, Budd *et al.*, (2020) showed that the α-diversity of microbiome did not differ significantly between elephant species based on their diet or habitat, but that their microbial β-diversity did. Therefore, to enlarge the investigated habitat, in this study we tried to collect faeces from both domestic (zoo and rehab center) and natural (game reserve, natural reseve and national park) habitats. However, because of the difficulties of collecting faeces from animals from wild habitats (especially for carnivorous mammals), the collected faeces from animals living in these habitats were less numereous than those collected in domestic habitats (14 vs 37 respectively). Overall, 72.9% of the total faeces collected in domestic habitats and 71.4% of the total faeces collected in natural habitats displayed at least one microorganism (Figure 14). Our results therefore showed no significant difference in strain distribution between domestic and natural habitats.

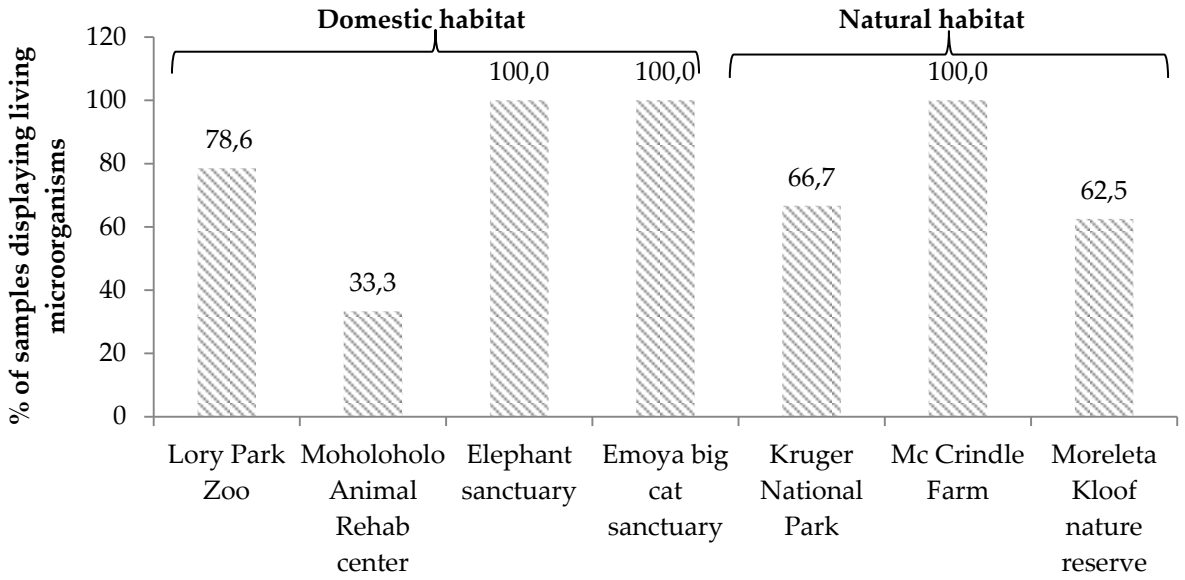


Figure 14. Percentage of samples displaying microorganisms according to the habitat of the animal. 72.9% of the samples of faeces from animals living in domestic habitats (Lory Park Zoo, Moholoholo animal rehabilitation centere, Elephant Sanctuary and Emoya big cat sanctuary) displayed microorganism on YPD-agar supplemented with 0.1g/L of chloramphenicol and 71.4% of the sample of faeces from animals living in natural habitats (Kruger national park, Mc Crindle farm and Moreleta Kloff nature reserve) did.

We observed that within species, the habitat could influence the diversity of microorganisms. For exemple, the elephant *(Loxodonta africana)* faeces from Kruger National Park did not failed to isolate any strain on YPD-chloramphenicol, while those from the Elephant Sanctuary allowed to isolate 3 different strains (Supplementary data A). Similarly, in domestic or natural habitat, the place of life seems to have strong influence on the diversity of microorganisms in animals. When looking at Figure 14, this was particularly true within the domestic habitat. 78.6% of the samples from Lory Park Zoo displayed microorganisms (at least one strain), while only 33.3% of the sample from Moholoholo animal rehabilitation center did. The faeces of White-headed vulture *(Trigonoceps occipitalis)* from Lory Park showed 3 different strains whereas faeces of this animal from Moholoholo animal rehabilitation center displayed no growth on YPD. Moholoholo animal rehabilitation center aims at caring injured wild animals before releasing them back into the wild (www.moholoholo.co.za). This sometimes includes the use of antimicrobial treatment on the animals which in turns could lead to a decrease of their microbiome.

Then, in accordance with other studies, our result confirm the influence of nutrition and habitats on animals microbiome (Oliveira *et al.*, 2020; Nicholson *et al.*, 2010).

2. Selection of strains with high VOCs production capacities

In 2015, Grondin and coworkers showed that α-unsaturated esters by *S. suaveolens* were produced by the esterification of the enoyl-CoA intermediate of the β-oxidation of branched-chain amino acids pathway (Grondin *et al.*, 2015). The catabolism of the enoyl-CoA intermediate *via* the β-oxidation pathway leads to the production of acetyl-CoA which can further be metabolised via the TCA cycle and the glycoxylic shunt. This specific property of *S. suaveolens* metabolism was used as a basis for the development of a screening method using the ability of yeasts to grow on media containing only branched-chain aminoacids (isoleucine, leucine and valine) as the sole carbon source (ILV^+ strains). By hypothesizing that this method would make it possible to select for strain overproducing α-unsaturated esters, we screened for ILV^+ strains within the 119 strains isolated from the wild animal faeces, while using *S. suaveolens* and *S. cerevisiae* as positive and negative controle respectively (Figure 15). Surprisingly, we found that 43 of the 119 strains tested showed the ILV^+ criteria. These strains are marked with a star in the Supplementary data A.

The volatilome, *i.e* the volatile organic compounds produced by all the ILV^+ strains (43 strains isolated from the faeces and the positive control *S. suaveolens* S0) were investigated using headspace-solid-phase micro-extraction, and analysed using gas-chromatography coupled with mass spectrometry detector (HS-SPME-GC/MS) after 48h of growth on YPD media at 30°C. Among the 43 ILV^+ strains, 21 strains namely S4, S17, S22, S28, S33, S40, S44, S58, S60, S62, S63, S65, S72, S78, S92, S97, S117, S121, S123, S124 and S125 did not produce any VOCs. This suggests that these strains harbored an inactive Ehrlich pathway and showed that isoleucine, leucine and valine assimilation in the fatty acid β-oxidation pathway cannot be strictly linked to aroma production. The VOCs produced by the 22 remaing strains and by *S. suaveolens* are

presented in Table 2.

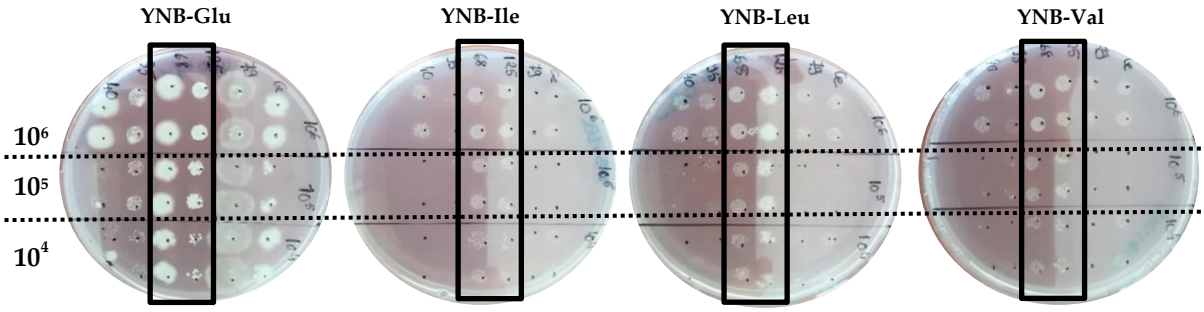


Figure 15. Growth test of 6 different strains from South African animal's faeces on YNB-Glu, YNB-Ile, YNB-Leu and YNB-Val agar media. 5µL of S40, S95, S68, S125, S79 and S2 (from left to right) were dropped twice at concentration of 10^6, 10^5 and 10^4 cell/mL. S68 and S125 (framed below) clearly grow on all the tested media whereas S40, S95, S79 and S2 did not.

A total of 50 different VOCs were detected and classified into four categories, namely acids, alcohols, esters and α-unsaturated esters. The major part of the VOCs derived from the catabolism of aminoacids. For instance, ethyl 2-methylbutanoate and ethyl 3-methylbutanoate were probably produced through the catabolism of isoleucine and leucine respectively *via* the Ehrlich pathway (Hazelwood *et al.*, 2008). Moreover, ethyl 2-methylbut-2-enoate and ethyl 3-methylbut-2-enoate were likely also produced from the catabolism of isoleucine and leucine but through the β-oxidation pathway (Grondin *et al.*, 2015). According to the KEGG pathway database (www.genome.jp) the major metabolic pathways involved in the production of the other VOCs detected in this study were the fatty-acid β-oxidation pathway (ethyl hexanoate, ethyl octanoate, etc.), the butanoate pathway (butyl acetate, butyl butanoate, ethyl butanoate, etc.), the propanoate pathway (butyl propanoate) and the pentanoate pathway (ethyl pentanoate).

Table 2. Volatile organic compounds produced by the isolated strain during growth on Yeast Peptone Dextrose agar media (1/2)

Volatile compounds	Odor type*	IRR_{exp}	IRR_{th}**	Producing strains
ACIDS				
2-methylbutanoic acid	Overripe fruit, cashew, sweet	856	846	S38
3-methylbutanoic acid	Sweet	837	828	S37; S84; S105
Butanoic acid	Rancid	792	780	S37
ALCOHOL				
2-phenylethanol	Flower, honey, rose	1101	1114	S0; S13; S18; S21; S27; S37; S38; S70; S74; S82; S99; S100; S105; S106
ESTERS				
2-methylbutyl 2-methylbutanoate	Fruit, apple, rum, berry	1110	1104	S0
2-methylbutyl 3-methylbutanoate	Apple, cheese, eart	1112	1107	S0
2-methylbutyl butanoate	Fruit, spice, butter	1057	1056	S0
2-methylbutyl propanoate	Sweet, banana, fruit, apple, melon,	975	975	S0
2-methylpropyl 2-methylbutanoate	Sweet, fruit	1002	1004	S0
2-methylpropyl 2-methylpropanoate	Pineapple, grape skin, tropical	955***	909	S0; S91; S106
2-methylpropyl 3-methylbutanoate	Fruit, apple, raspberry	892	904	S0; S12; S13; S18; S68; S75; S99
2-methylpropyl butanoate	Sweet, fruit	959	955	S0
2-methylpropyl propanoate	Fruit, green ether, sweet, banana	869	863	S0; S12
2-phenylethyl 2-methylbutanoate	Sweet, fruit, herb, floral	1494	1493	S0
2-phenylethyl 3-methylbutanoate	Apricot, sweet, bitter	1486	1488	S0; S12; S13; S27; S75
2-phenylethyl acetate	Rose, floral, fruit, sweet	1261	1265	S0
3-methylbutyl 2-methylbutanoate	Fruit	1093	1102	S0; S12; S13; S99
3-methylbutyl 2-methylpropanoate	Mixed fruit	1011	1013	S0; S12; S75
3-methylbutyl 3-methylbutanoate	Sweet, apple, fruit	1099	1103	S12; S13; S18; S75; S99; S105;
3-methylbutyl acetate	Pear, banana	872	871	S0; S3; S12; S18; S21; S64; S68; S70; S75; S88; S91; S106
3-methylbutyl pentanoate	Ripe apple	1097	1090	S0; S3; S64
3-methylbutyl propanoate	Apricot, pineapple	968	964	S0; S12; S68; S75; S91; S106
Butyl 2-methylbutanoate	Fresh, sweet, fruit	1039	1043	S0; S12; S91;
Butyl 2-methylpropanoate	Fruit	951	955	S0; S12; S64; S68; S91; S106
Butyl 3-methylbutanoate	Apple, pear, sweet, pineapple, green	1043	1047	S0; S12; S106
Butyl butanoate	Fresh, sweet, fruit	995	993	S12; S21; S64; S91; S100; S106

Table 2. Volatile organic compounds produced by the isolated strain during growth on Yeast Peptone Dextrose agar media (2/2)

Volatile compounds	Odor type*	IRR_{exp}	IRR_{th}*	Producing strains
Butyl propanoate	Sweet, fruit, rum	907	910	S12; S64; S75; S91; S106
Ethyl 2-methylbutanoate	Fruit, green, apple, flower	842	846	S0; S3; S12; S18; S21; S68; S75; S91; S99; S105; S106
Ethyl 3-methylbutanoate	Fruit, blueberry	847	849	S0; S3; S12; S13; S18; S21; S64; S68; S75; S91; S99; S105; S106
Ethyl butanoate	Fruit, pear, pineapple	799	800	S0; S3; S12; S21; S37; S38; S64; S68; S70; S75; S84; S88; S91; S100; S105; S106
Ethyl hexanoate	Fruit, strawberry, anise	999	996	S12; S64; S68; S84; S91
Ethyl octanoate	Flower, fruit, menthol, anise, sweet	1196	1198	S0; S91
Ethyl pentanoate	Fruit, orange, green	890	898	S12; S13; S64; S68; S75; S84; S91; S106
Octyl 2-methylpropanoate***	Cream, wax, fruit, earth, fat	1349	1394	S0
Octyl 2-methylbutanoate	Green, must, fruit	1432	1438	S0
Octyl 3-methylbutanoate	Rose, honey, apple, pineapple	1436	1440	S0
Octyl acetate	Floral, fruit, sweet	1115	1149	S0
Octyl butanoate	Herb, fruit, green	1391	1434	S0
Pentyl butanoate	Apricot, pineapple	1052	1093	S12; S91
Propyl 3-methylbutanoate	Sweet, fruit	947	943	S0; S12; S91
α-UNSATURATED ESTERS				
2-methylpropyl 2-methylbut-2-enoate	Herb, pungent	1039	1034	S0; S12; S13; S91
3-methylbutyl 2-methylbut-2-enoate	Floral	1190	1168	S0; S12; S91
3-methylbutyl 3-methylbut-2-enoate		1178	1184	S12; S91
Butyl 2-methylbut-2-enoate	Floral, herb, warm, fruit	1091	1068	S0
Ethyl 2-methylbut-2-enoate	Fruit	938	936	S0; S3; S12; S13; S64; S68; S75; S84 S91; S99; S100; S105; S106
Ethyl 3-methylbut-2-enoate	-	922	911	S0; S3; S12; S13; S64; S68; S75; S84; S91; S99; S105; S106
Ethyl but-2-enoate	Fruit, caramel, pungent	835	833	S0; S21; S64; S106
Ethyl hex-2-enoate	Fruit, slight, pungnent	1041	1025	S12
Propyl 2-methylbut-2-enoate	-	1039	1034	S0

*Data from Nagata 2003; Chen *et al.*, 2006; Czerny *et al.*, 2008 and "Odor & flavor detection thresholds in water (in parts per billion)" from Leffingwell & Associates. **Data from "Flavornet and human odor space" (Acree and Arn, 2020) and "Database of pheromones and semiochemicals."(The pherobase, www.pherobase.com). ***Tentative

Finally some esters probably resulted from the esterification of two units generated from two different metabolic pathways. For instance 2-methylbutyl butanoate formation was likely generated from esterification of 2-methylbutanol (synthetized *via* the catabolism of isoleucine through the Ehrlich pathway) and butanoic acid synthetized *via* the butanoate pathway.

Only one molecule of alcohol, namely 2-phenylethanol, was detected in the headspace of *S. suaveolens* (S0) and 13 of the 22 investigated strains (Table 2, Supplementary data B). It could seems surprising because yeasts are well known to produce alcohol compounds (notably ethanol) during growth (Buzzini *et al.*, 2005; 2003; Hazelwood *et al.*, 2008; Suomalainen and Lehtonen, 1979) and production of higher alcohols such as 2-methylbutanol and 3-methylbutanol by *S. suaveolens* has already been observed in other studies (Damasceno *et al.*, 2003; İşcan *et al.*, 2015; Grondin *et al.*, 2017). However, the method of analysis used in our study does not enable to visualize these compounds on the resulting chromatogram.

Acids production was also not widespread among the strain studied. We found that only 3 different acids were produced by only 4 strains of yeasts (Table 2, Supplementary data B). The most frequently detected acid was 3-methylbutanoic acid (sweety taste) which was produced by S37, S87 and S107. This compound is generated from the catabolism of leucine through the Ehrlich pathway and is rarely detected in the volatilome of yeasts because it is usually rapidly esterified into its corresponding ethyl ester (ethyl 3-methylbutanoate). However, 3-methylbutanoic acid has already been detected in some yeast strains such as *Pichia guillermondii*, *Pichia kluyveri* and *Sporidiobolus pararoseus* (Grondin *et al.*, 2015a; Ravasio *et al.*, 2018).

Esters represented 37 of the 50 VOCs detected in this study. They were present in the volatilome of all strains, with the exception of S74 and S82 which both only produced 2-phenylethanol (Table 2 and Supplementary data B). Strains S0 (*S. suaveolens*), S12 and S91 displayed the largest ester diversities in their volatilome. S0's volatilome presented the highest diversity of esters, with 30 different compounds

from this catergory detected. Among those, 13 esters were not identified in the other strains investigated in this study. However pentyl butanoate, which harbor an apricot pineapple-like aroma frequently used in food and perfumerie, was not detected in the volatilome of S0, but was detected in S12 and S91 strains. This result is interesting because this compound is mostly found in fruit (apple and cocoa bean) but rarely detected in microorganisms volatilome.

Finally, 9 different α-unsaturated esters were detected in S0 and 12 of the 22 VOCs producing strains (Table 2 and Supplementary data B). The 10 remaining strains didn't display any α-unsaturated esters in their volatilome, meaning that the ILV^+ criteria can not be strictly linked to the production of α-unsaturated esters.. The most frequently detected α-unsaturated esters were ethyl 3-methylbut-2-enoate (also called ethyl 3-methylcrotonate) and ethyl 2-methylbut-2-enoate (or ethyl tiglate), produced *via* the β-oxidation of leucine and isoleucine respectively. The flavoring esters butyl 2-methylbut-2-enoate and propyl 2-methylbut-2-enoate were only produced by strain S0, while 3-methylbutyl 3-methylbut-2-enoate was produced by S12 and S91 and ethyl hex-2-enoate by strain S12. These compounds being rarely described in the yeast volatilome, it can be conclude that the investigation of faeces from wild animals could be a promising way to isolate strains producing new α-unsaturated esters.

According to the total area of the pics on the chromatogram (data not shown), strain S106 displayed a higher amount of VOCs in terms of quantity far well before strains S12 and S91. However, S0 produced 150 times more total VOCs than S106, in which 11 times and 62 times more of esters and α-unsaturated esters respectively. This showed that none of the isolated strains from South Africa had a higher capacity of VOCs production than our modele strain S0.

3. Multivariate analysis of isolates based on their origins and their volatile organic compounds production.

To better visualize how strains behave with respect to their performance of VOCs production (number of total VOCs, number of acids, number of alcohol, number of esters and number of α-unsaturated esters) and their origin (carnivorous mammal faeces, herbivorous mammal faeces, reptile faeces, domestic habitat animal and natural habitat animal), a principal component analysis (PCA) and a hierarchical cluster analysis (HCA) were carried out on the 22 selected strains which produced VOCs (Figure 16 and Figure 17).

Also, to identify a possible correlation between VOCs and the origin of the strains, a Pearson correlation matrix was constructed (Table 3). Number of acids were correlated to any of the other paramaters probably because they represented only a few part of the VOCs detected compared to the other categories of volatile. However, we detected correlation among the other VOCs parameters. For instance, the number of total VOCs was strongly correlated with the number of esters (Pearson correlation r of 0.990) and the number of α-unsaturated esters (r=0.938) but it was negatively correlated with the number of alcohol (1, corresponding to the 2-phenylethanol, r=-0.514), meaning that the esters and α-unsaturated esters significantly participate to the total number of VOCs. As expected, we also identified a number of esters and α-unsaturated esters which were highly correlated to each others (r= 0.903), but they were both negatively linked to the number of alcohol (r= -0.560 and r=-0.551) respectively, meaning that the strains volatilome which contained a lot of esters (unsaturated or not), didn't displayed any alcohol. We finally concluded that there were no significant correlation between VOCs parameters and the origin of the strains.

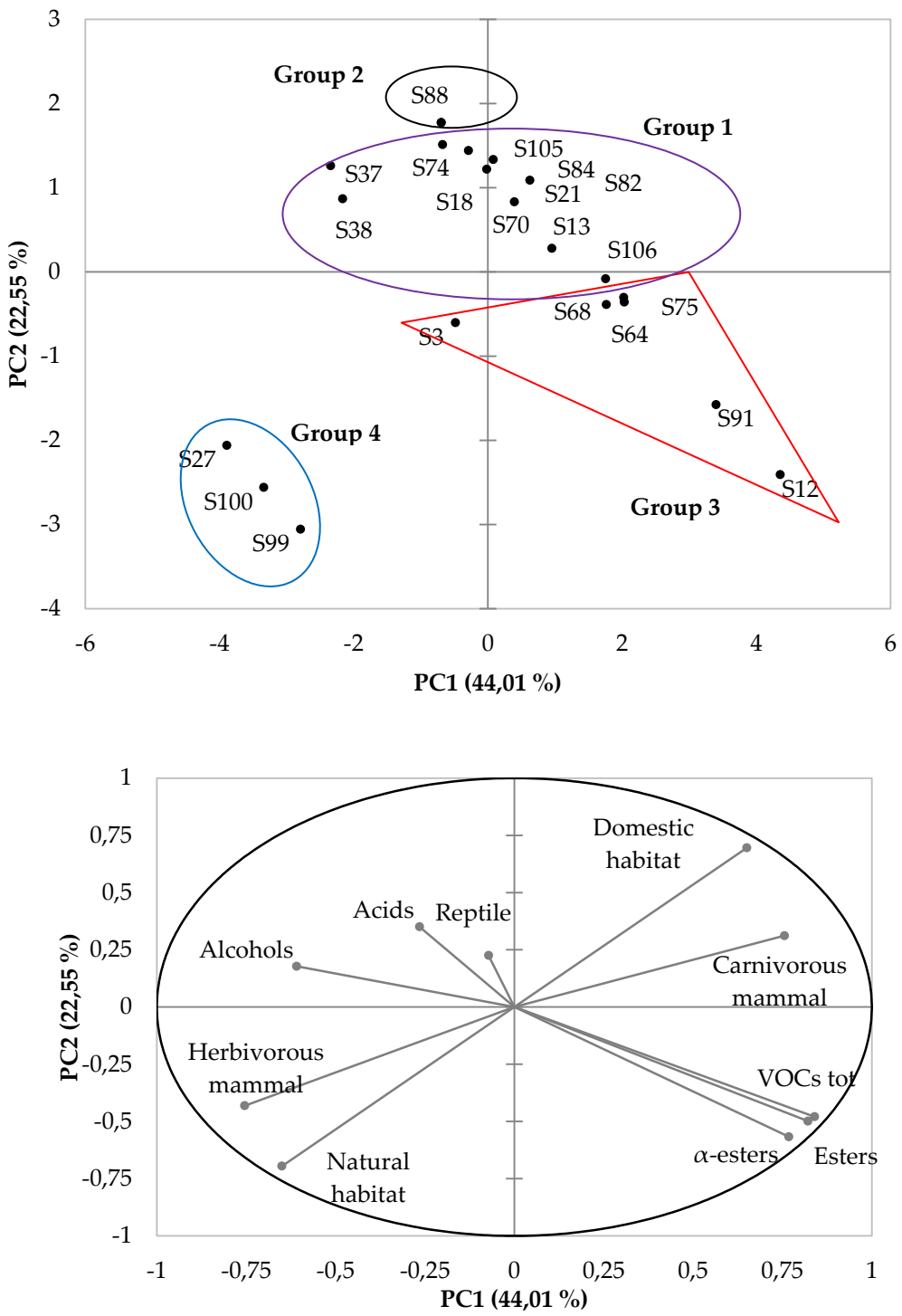


Figure 16. Score plot of PC2 versus PC1 according to strains flavor production and their origins

Component analysis was performed using XL Stat Applied Sensory software (2020.1.3). Group 1 included S13, S18, S21, S37, S38, S70, S74, S82, S84, S105 and S106. Group 2 was only composed of S88. Group 3 included S3, S12, S64, S68, S75 and S91. Group 4 included S27, S99 and S100.

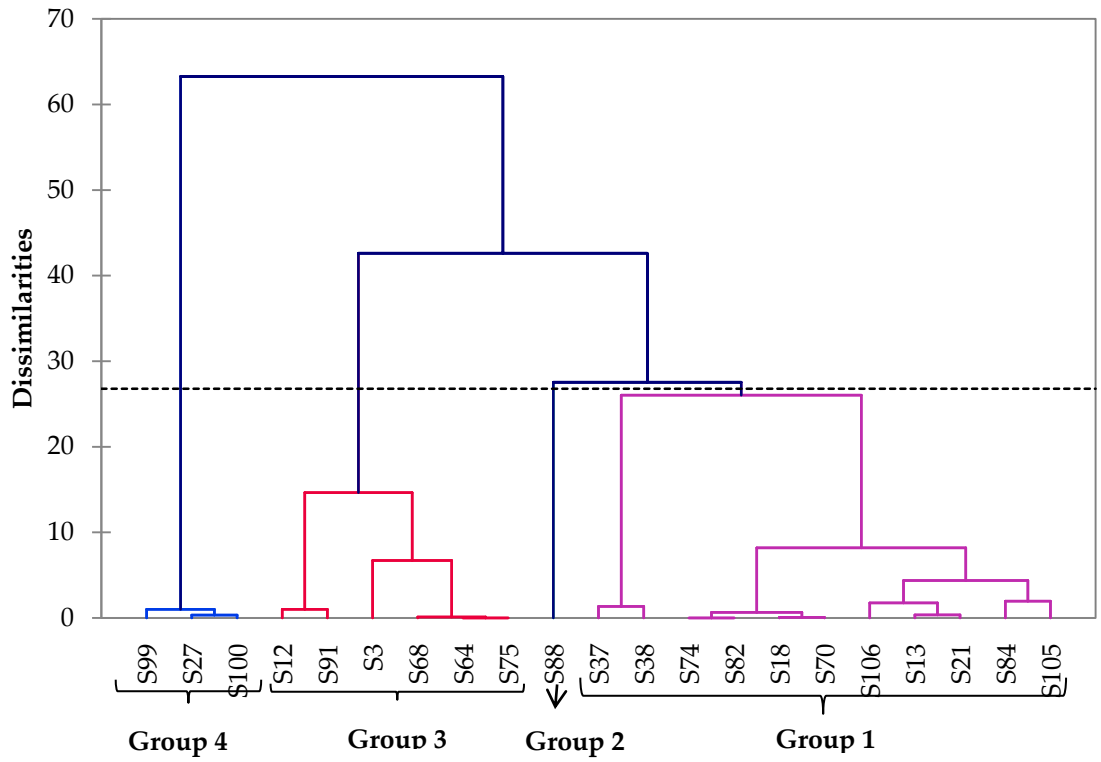


Figure 17. Cluster analysis of the isolated strains which produced VOCs

Strains were grouped on the basis of their flavor production and their origin using Ward's method and performed using XL Stat Applied Sensory software (2020.1.3) Automatic truncation (dotted line) allowed identifying four consistent groups of strains. Most of the strains were classified into group 1 (11 strains) and group 3 (6 strains). Group 4 included three strains. Strain S88 accounted itself for group 2. The dendogram is more flattened for group 4, suggesting that this group of strains is more homogeneous than the two other groups.

Table 3. Pearson (n) correlation matrix obtained for principal component analysis

Variables	VOCs	Ac.	Alc.	Est.	α-est.	Herb.	Carn.	Rept.	Nat.	Dom.
VOCs	**1**									
Ac.	-0,211	**1**								
Alc.	**-0,514**	0,169	**1**							
Est.	**0,990**	-0,288	**-0,560**	**1**						
α-est.	**0,938**	-0,262	**-0,551**	**0,903**	**1**					
Herb.	-0,336	0,315	0,279	-0,378	-0,278	**1**				
Carn.	0,410	-0,256	-0,139	0,423	0,361	**-0,894**	**1**			
Rept.	-0,194	-0,101	-0,285	-0,134	-0,209	-0,141	-0,316	**1**		
Nat.	-0,228	-0,185	0,320	-0,244	-0,139	**0,645**	**-0,577**	-0,091	**1**	
Dom.	0,228	0,185	-0,320	0,244	0,139	**-0,645**	**0,577**	0,091	**-1,000**	**1**

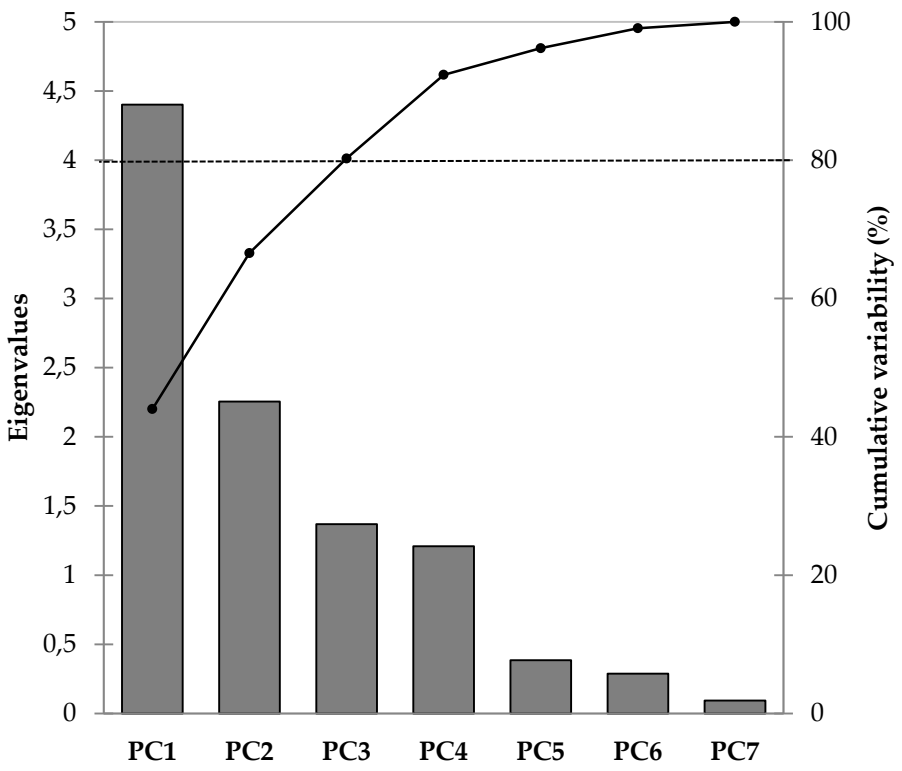
Bold values are significantly different from 0 at a significance level $\alpha = 0.05$. VOCs, number of different VOCs; Ac., number of different acids; Alc., number of different alcohols, Est., number of different esters; α-est., number of different α-unsaturated esters, Herb, herbivorous mammal; Carn., carnivorous mammal; Rept., reptile; Nat., natural habitat and Dom., domestic habitat origin of faeces from which strains have been isolated.

The Cattell's scree diagram (Cattell, 1974) highlighted three significant Principal Components (PC) explaining 80.25 % of the total variance, 44.01% for PC_1, 22.55% for PC_2 and 13.68% for PC_3 (Figure 18). However, the first two principle components chosen for PCA analysis were PC_1 and PC_2 which explained 66.6% of the total variance (Figure 16 and Figure 18). The first axis PC_1 was representative of a global average level of the variables and strongly correlated with five of the ten parameters (number of total VOCs, number of esters, number of α-unsaturated esters, carnivorous mammal origin and domestic habitat). On the contrary, it was negatively correlated with four parameters including number of acids, number of alcohols, herbivorous mammals origin and natural habitats. Finally, the reptile parameter did not significantly participated to the construction of PC_1. Conversely, the second axis PC_2 was mainly positively correlated with the number of acids, the number of alcohols, the carnivorous mammals, the domestic habitat and the reptile, but was negatively correlated with the other parameters (Figure 16 and Table 4).

The score plot obtained by PCA (Figure 16) and the dendogramm obtained by HCA (Figure 17) suggested that the strains could be classified into four significant groups. Group 1 enclosed the strains S13, S18, S21, S37, S38, S70, S74, S82, S84, S105 and S106 and was better described by PC_2. It mainly corresponded to strains for which the diversity of total VOCs was very low. Surprisingly, strain S106 was assigned to this group whereas it produced 2-phenylethanol and variable esters (12 different compounds) and α-unsaturated esters (3 different compounds). Strain S88 slightly diverged from group 2 because it produced only 3 esters (See Supplementary data B). Therefore, this strain alone accounted for a second group (Group 2). Group 3 included strains S3, S12, S64, S68, S75 and S91 and was better described by PC_1. This group mostly contained strains from carnivorous from domestic habitat which produced numereous different VOCs including esters or α-unsaturated esters. Thus, even if the Pearson correlation matrix did not revealed any direct correlation between the VOCs production and the origin of the strains, the result of the PCA

analysis tended to prove that these strains are more likeky to be detected in faeces from carnivorous than in herbivorous animals. Strain S3 was the most divergent strain of this group because it produced low amount of different VOCs. Finally strains S27, S99 and S100 which formed the homogeneous group 4 (as the dendogram is flattened for this group) were the strains isolated from herbivorous from natural habitat (Moreleta Kloof Nature Reserve) which produced low amount of different VOCs.

(A)



(B)

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7
Eigenvalues	4,401	2,255	1,368	1,209	0,385	0,288	0,093
Variability (%)	44,015	22,551	13,684	12,088	3,853	2,879	0,930
Cumulative variability (%)	44,015	66,566	80,250	92,338	96,191	99,070	100,000

Figure 18. Cattell's scree diagram (A) based on the eigenvalues and the cumulative variability obtained for principal component analysis (B)

Table 4. Correlation between the parameters and the principal component obtained during the principal component analysis.

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
VOCs tot	0,821	-0,499	-0,041	0,193	0,178
Acids	-0,265	0,351	-0,111	0,829	0,170
Alcohols	-0,609	0,178	-0,588	-0,168	0,430
Esters	0,840	-0,479	0,022	0,119	0,144
α-esters	0,768	-0,567	-0,021	0,156	0,055
Herbivorous mammal	-0,754	-0,431	0,034	0,425	-0,126
Carnivorous mammal	0,756	0,312	-0,439	-0,319	-0,018
Reptile	-0,072	0,225	0,900	-0,195	0,309
Natural habitat	-0,650	-0,695	-0,050	-0,221	0,047
Domestic habitat	0,650	0,695	0,050	0,221	-0,047

IV. Conclusions

This work aimed at isolating strains producing α-unsaturated esters in the wildlife faeces of South-Africa by a strategy based on the metabolism of *S. suaveolens,* taken as model for its capacity of developing on media containing only branched chain amino acids as source of carbone (ILV^+) coupled to its production of α-unsaturated esters. Even if 12 α-unsaturated esters producing strains have been isolated, no evidence of correlation between the ILV^+ criteria and the α-unsaturated esters production has been observed. However, before refuting the strategy of selection, investigating already known α-unsaturated esters producing yeast for their development on ILV media is necessary.

None of the isolated strain produced more total VOCs and α-unsaturated esters than *S. suaveolens*. Therefore, despite 2 α-unsaturated esters were detected in the selected strains and not in *S. suaveolens* headspace, this strain still appears as one of the best model of aroma producing yeast and keeping investigate this particular strain should be promising for the aroma field.

V. Supplementary data

Supplementary data A. Number of different strain from diverse South-African animal's faeces isolated on YPD-chloramphenical media (1/3)

Animals	Type of animal	Sampling	Origin	Nb of different strain
Aardwolf *(Proteles cristata)*	Carnivorous mammal	Freeze-dried	Not communicated	2 (S1/S2)
Abyssinian hornbill (*Bucorvus abyssinicus*)	Bird	Swab	Lory Park Zoo	0
Bateleur eagle *(Terathopius ecaudatus)*	Raptor	Swab	Moholoholo Animal Rehabilitation Center	0
Black-and-white-casques hornbill *(Bycanistes subcylindricus)*	Bird	Swab	Lory Park Zoo	1 (S31)
Black crested gibbon *(Nomascus concolor*)	Herbivorous mammal	Swab	Lory Park Zoo	2 (S3* / S4*)
Black jaguar *(Panthera pardus)*	Carnivorous mammal	Swab	Lory Park Zoo	3 (S6 / S7 / S8)
Black-footed cat *(Felis nigripes)*	Carnivorous mammal	Tubes	Lory Park Zoo	4 (S12* / S14 / S15 / S16))
		Swab	Lory Park Zoo	3 (S13* / S17* / S18*)
Blesbok *(Damaliscus pygarus*)	Herbivorous mammal	Tube	Moreleta Kloof Nature Reserve	2 (S9/S10)
Brown lemur *(Eulemur fulvus)*	Herbivorous mammal	Swab	Lory Park Zoo	3 (S58* / S59 / S60*)
Brown jaguar *(Panthera onca*)	Carnivorous mammal	Swab	Lory Park Zoo	5 (S20 / S21* / S22* / S23 / S24)
Buffalo *(Syncerus caffer*)	Herbivorous mammal	Swab	Kruger National Park	2 (S28* / S29*)
		Freeze-dried	Not communicated	1 (S30)
Bushbuck (*Tragelaphus sylvaticus*)	Herbivorous mammal	Tube	Moreleta Kloof Nature Reserve	2 (S26 / S27*)
		Swab	Moreleta Kloof Nature Reserve	0
Cape Vulture (*Gyps coprotheres*)	Raptor	Swab	Moholoholo Animal Rehabilitation Center	0
Cheetah *(Acinonyx jubatus*)	Carnivorous mammal	Tube	Lory Park Zoo	2 (S32 / S33*)
		Swab	Lory Park Zoo	2 (S34 / S35)
		Freeze-dried	Not communicated	0
Duiker (*Sylvicapra grimmia)*	Herbivorous mammal	Tube	Moholoholo Animal Rehabilitation Center	2 (S37* / S38*)
Elephant *(Loxodonta africana)*	Herbivorous mammal	Swab	Kruger National Park	0
		Freeze-dried	Not communicated	1 (S42)
		Swab	Elephant sanctuary	3 (S39 / S40* /S41)
Gibbon (*Hylobates lar)*	Herbivorous mammal	Swab	Lory Park Zoo	3 (S43 / S44* / S45)
Giraffe *(Giraffa cameopardalis*)	Herbivorous mammal	Freeze-dried	Not communicated	1 (S46)

Supplementary data A. Number of different strain from diverse South-African animal's faeces isolated on YPD-chloramphenical media (2/3)

Animals	Type of animal	Sampling	Origin	Nb of different strain
Hyena *(Crocuta crocuta)*	Carnivorous mammal	Swab	Lory Park Zoo	1 (S47)
		Freeze-dried	Not communicated	1 (S48)
Impala *(Aepyceros melampus)*	Herbivorous mammal	Tube	Kruger National Park	2 (S49 / S50)
		Tube	Mc Crindle Farm	2 (S51 /S52)
King Vulture *(Sarcoramphus papa)*	Raptor	Swab	Lory Park Zoo	0
Kudu *(Tragelaphus strepsiceros)*	Herbivorous mammal	Tube	Mc Crindle Farm	2 (S53 / S54)
Lapped faced Vulture *(Torgos tracheliotos)*	Raptor	Swab	Moholoholo Animal Rehabilitation Center	0
Lemur *(Varecia variegate)*	Herbivorous mammal	Tube	Lory Park Zoo	3 (S55 / S56 / S57)
		Swab	Lory Park Zoo	0
Leopard *(Panthera pardus)*	Carnivorous mammal	Swab	Lory Park Zoo	7 (S62* / S63* / S64* / S65* / S68* / S69 / S70*)
		Tube	Lory Park Zoo	2 (S66 / S67)
		Freeze-dried	Not communicated	0
Lion *(Panthera leo)*	Carnivorous mammal	Freeze-dried	Not communicated	1 (S80)
		Tube*	Emoya big cat sanctuary	10 (S71 / S72* / S78* / S73 / S74* / S75* / S76 / S77 / S79 / S80)
		Swab**	Emoya big cat sanctuary	1 (S78)
Long Tailed Hornbill *(Tropicranus albocristatus)*	Raptor	Swab	Lory Park Zoo	0
Meerkat *(Suricata suricatta)*	Carnivorous mammal	Tube	Lory Park Zoo	3 (S82* / S83 / S84*)
Nile crocodile *(Crocodylus niloticus)*	Reptile	Swab	Lory Park Zoo	4 (S85 / S86 / S87 / S88*)
Ostrich *(Struthio camelus)*	Bird	Swab	Moreleta Kloof Nature Reserve	2 (S89 / S90)
Palm nut vulture *(Gypohierax angolensis)*	Raptor	Swab	Lory Park Zoo	0
Serval *(Leptailruus serval)*	Carnivorous mammal	Tube	Lory Park Zoo	3 (S91* / S92* /S93)
		Swab	Lory Park Zoo	2 (S94 / S95)
Southern Hornbill *(Bucorvus leadbeateri)*	Raptor	Swab	Lory Park Zoo	0
Springbok *(Antidorcas marsupialis)*	Herbivorous mammal	Tube	Moreleta Kloof Nature Reserve	6 (S96 / S97* / S98 / S99* / S100* / S101)

Supplementary data A. Number of different strain from diverse South-African animal's faeces isolated on YPD-chloramphenical media (3/3)

Animals	Type of animal	Sampling	Origin	Nb of different strain
Tawney Eagle (*Aquila rapax)*	Raptor	Swab	Mohololoholo Animal Rehabilitation Center	2 (S102 / S103)
Tiger *(Panthera tigris*)	Carnivorous mammal	Tube	Lory Park Zoo	4 (S104 / S105* / S106* / S108 / S109)
		Swab	Lory Park Zoo	1 (S107)
White Headed Vulture *(Trigonoceps occipitalis)*	Raptor	Swab	Lory Park Zoo	3 (S114 /S115 / S116)
		Swab	Mohololoholo Animal Rehabilitation Center	0
White Lion *(Panthero leo*)	Carnivorous mammal	Swab	Lory Park Zoo	2 (S117* / S118)
White rhino (*Ceratotherium simum)*	Herbivorous mammal	Freeze-dried	Not communicated	2 (S119 / S120)
Wild dog *(Lycaon pictus*)	Carnivorous mammal	Freeze-dried	Not communicated	1 (S113)
Wildebeest *(Connochaetes gnou*)	Herbivorous mammal	Tube	Moreleta Kloof Nature Reserve	2 (S111 / S112)
		Freeze-dried	Not communicated	1 (S110)
Zebra *(Equus zebra*)	Herbivorous mammal	Swab	Moreleta Kloof Nature Reserve	2 (S121* / S122)
		Tube	Moreleta Kloof Nature Reserve	2 (S123* / S124*)
		Swab	Mc Crindle Frm	1 (S125*)
			TOTAL	**119**

*Strains with the capacity of using branched chain amino acid (Isoleucine, Leucine, Valine) as sole source of carbone (ILV^+)

Supplementary data B. Classification of the VOCs produced by each isolated strain

Strains	VOCs tot	Acids	Alcohols	Esters	α-esters
S0	38	-	1	30	7
S3	7	-	-	5	2
S12	27	-	-	21	6
S13	10	-	1	6	3
S18	6	-	1	5	-
S21	8	-	1	6	1
S27	2	-	1	1	-
S37	5	2	1	2	-
S38	4	1	1	2	-
S64	13	-	-	10	3
S68	12	-	-	10	2
S70	4	-	1	3	-
S74	1	-	1	-	-
S75	14	-	-	12	2
S82	1	-	1	-	-
S84	6	1	-	3	2
S88	3	-	-	3	-
S91	21	-	-	16	5
S99	8	-	1	5	2
S100	5	-	1	3	1
S105	8	1	1	5	1
S106	16	-	1	12	3

[VOCs tot], concentration of total volatile organic compounds; [Acids], concentration of total acids; [Alcohols], concentration of total alcohols; [Esters], concentration of total esters; [α-esters], concentration of total α-unsaturated esters. VOCs tot, number of different VOCs; Acids, number of different acids; alcohols, number of different alcohols, Esters, number of different esters; α-esters, number of different α-unsaturated esters.

VI. Acknowlegments

The authors wish to thank the management of the staff of Lory Park Zoo (www.lorypark.co.za), Emoya big cat sanctuary (www.emoya.org.za), Elephant sanctuary (www.elephantsanctuary.co.za) and Mohololololo animal rehabilitation center (www.moholoholo.co.za) for having kindly welcomed us in their structure and for providing us with the biological materials necessary for this work.

VII. References

Acree, T., and Arn H. 2020. "Flavornet and human odor space." [Online]. Available on : https://www.flavornet.org/.

Beasley DeA E., Koltz A.M., Lambert J.E., Fierer N., and Dunn R.R. 2015. "The evolution of stomach acidity and its relevance to the human microbiome." Edited by Xiangzhen Li. *PLOS ONE* 10 (7): e0134116.

Bhari R., and Singh R.S. 2019. "Microbial production of natural flavours." In *Technology of Handling, Packaging, Processing, Preservation of Fruits and Vegetables : Theory and Practicals*, New India Publishing Agency, 767–813. New Dehli, India.

Bogacz-Radomska L., Pietkiewicz J.J., and Górska K. 2008. "Aroma production and application in food products."

Budd K., Gunn J.C., Finch T., Klymus K., Sitati N., and Eggert L.S. 2020. "Effects of diet, habitat, and phylogeny on the fecal microbiome of wild African savanna (*Loxodonta africana*) and Forest elephants (*L. cyclotis*)." *Ecology and Evolution* 10 (12): 5637–5650.

Budroni M., Zara G., Ciani M., and Comitini F. 2017. "*Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* starter yeasts." In *Brewing Technology*, edited by Makoto Kanauchi. InTech.

Buzzini P., Gasparetti C., Turchetti B., Cramarossa M.R., Vaughan-Martini A., Martini A., Pagnoni U.M., and Forti L. 2005. "Production of volatile organic compounds (VOCs) by yeasts isolated from the ascocarps of Black (*Tuber melanosporum* vitt.) and White (*Tuber magnatum* pico) truffles." *Archives of Microbiology* 184 (3): 187–193.

Buzzini P., Martini A., Cappelli F., Pagnoni U.M., and Davoli P. 2003. "A study on volatile organic compounds (VOCs) produced by tropical ascomycetous yeasts." *Antonie van Leeuwenhoek* 84 (4): 301–311.

Carlquist M., Gibson B., Yuceer Y.K., Paraskevopoulou A., Sandell M., Angelov A.I., Gotcheva V., Angelov A.D., Etschmann M., and de Billerbeck G.M.. 2015. "Process Engineering for Bioflavour Production with Metabolically Active Yeasts–a mini-review." *Yeast* 32 (1): 123–143.

Cattell R.B.. 1974. "The Scree test for the number of factors." In *A History of Psychology in Autobiography, Vol VI.*, edited by Gardner Lindzey, 61–100. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, Inc.

Chen J.L., Wu H., Wang Q., Deng H., and Hu X.S. 2006. "Changes in the volatile compounds and chemical and physical properties of Kuerle Fragrant Pear (*Pyrus Serotina* Reld) during storage." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (23): 8842–8847.

Czerny M., Christlbauer M., Christlbauer M., Fischer A., Granvogl M., Hammer M., Hartl C., Hernandez N.M., and Schieberle P. 2008. "Re-investigation on odour thresholds of key food aroma compounds and development of an aroma language based on odour qualities of

defined aqueous odorant solutions." *European Food Research and Technology* 228 (2): 265–273.

Damasceno S., Cereda M.P., Pastore G.M., and Oliveira J.G.. 2003. "Production of volatile compounds by *Geotrichum fragrans* using cassava wastewater as substrate." *Process Biochemistry* 39 (4): 411–414.

Van Dijken J.P., Bauer, Brambilla, Duboc, Francois, Gancedo and Giuseppin. 2000. "An interlaboratory comparison of physiological and genetic properties of four *Saccharomyces cerevisiae* strains." *Enzyme and Microbial Technology* 26 (9–10): 706–714.

Ganesh Kumar C., Mongolla P., Joseph J., Nageswar Y.V.D., and Kamal A. 2010. "Antimicrobial activity from the extracts of fungal isolates of soil and dung samples from Kaziranga National Park, Assam, India." *Journal of Medical Mycology* 20 (4): 283–289.

Grondin E., Shum Cheong Sing A., Caro Y., Raherimandimby M., Randrianierenana A.L., James S., Nueno-Palop C., François J.M., and Petit T. 2015a. "A comparative study on the potential of epiphytic yeasts isolated from tropical fruits to produce flavoring compounds." *International Journal of Food Microbiology* 203: 101–108.

Grondin E., Shum Cheong Sing A., Caro Y., de Billerbeck G.M., François J.M., and Petit T. 2015b. "Physiological and biochemical characteristics of ethyl tiglate production pathway in the yeast *Saprochaete suaveolens*." *Yeast* 32: 57–66.

Grondin E., Shum Cheong Sing A., James S., Nueno-Palop C., François J.M., and Petit T. 2017. "Flavour production by *Saprochaete* and *Geotrichum* yeasts and their close relatives." *Food Chemistry* 237: 677–684.

Hammer T.J. Sanders J.G., and Fierer N. 2019. "Not all animals need a microbiome." *FEMS Microbiology Letters* 366 (10): 1-11

Hazelwood L. A., Daran J.-M., van Maris A. J. A., Pronk J. T., and Dickinson J. R.. 2008. "The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: A century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism." *Applied and Environmental Microbiology* 74 (12): 3920–3920.

İşcan G., Demirci B., Demirci F., and Başer K.H.C. 2015. "Headspace Solid Phase Microextraction (HS-SPME) and analysis of *Geotrichum fragrans* volatiles." *Natural Volatiles & Essential Oils* 2 (2): 45–51.

Leffingwell & Associates. 2020. "Odor & Flavor Detection Thresholds in Water (in Parts per Billion)." [Online]. Available on: www.leffingwell.com

Lorliam W., Akaracharanya A., Suzuki M., Ohkuma M., and Tanasupawat S.. 2013. "Diversity and fermentation products of xylose-utilizing yeasts isolated from Buffalo feces in Thailand." *Microbes and Environments* 28 (3): 354–360.

Nagata Y. 2003. "Measurement of odor threshold by triangle odor bag method," 10.

Ndlela L.L., and Schmidt S. 2016. "Evaluation of wild herbivore faeces from South Africa as a potential source of hydrolytically active microorganisms." *SpringerPlus* 5 : 118

Nicholson M., Christopher J., McSweeney S., Mackie R.I., Brookman J.L., and Theodorou M.K. 2010. "Diversity of anaerobic gut fungal populations analysed using ribosomal ITS1 sequences in faeces of wild and domesticated herbivores." *Anaerobe* 16 (2): 66–73.

Oliveira B.C.M., Murray M., Tseng F., and Widmer G. 2020. "The fecal microbiota of wild and captive raptors." *Animal Microbiome* 2 (1): 15.

Oliveira F.L., de Oliveira A.M., and Bicas J.L. 2017. "Bioaromas - Perspectives for sustainable development." *Trens in Food Science & Technology* 62: 141–153.

Ravasio D., Carlin S., Boekhout T., Groenewald M., Vrhovsek U., Walther A., and Wendland J. 2018. "Adding flavor to beverages with non-conventional yeasts." *Fermentation* 4 (1): 15.

Roy P. and Kumar V.. 2019. "Production of bioflavour from microbial sources and its health benefits." *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics* 56: 352–57.

Sales A., Paulino B.N., Pastore G.M., and Bicas J.L. 2018. "Biogeneration of aroma compounds." *Current Opinion in Food Science* 19: 77–84.

Schifferdecker A.J., Dashko S., Ishchuk O.P., and Piškur J. 2014. "The wine and beer yeast *Dekkera*

bruxellensis." *Yeast* 31 (9): 323–332.
Suomalainen H., and Lehtonen M. 1979. "The production of aroma compounds by yeast." *Journal of the Institute of Brewing* 85 (3): 149–156.
Tataridis P., Kanellis A., Logothetis S., and Nerantzis E. 2013. "Use of non-*Saccharomyces Torulaspora delbrueckii* yeast strains in winemaking and brewing." *Journal of Natural Sciences* 124: 415–426.
The pherobase. 2020. "Database of pheromones and semiochemicals." [Online]. Available on : www.pherobase.com

CHAPITRE III

Le chapitre II du présent manuscrit de thèse a permis de montrer que le métabolisme de la souche de Saprochaete suaveolens pouvait servir de modèle pour faciliter la recherche de souches productrices d'esters α-insaturés dans les fèces d'animaux sauvages d'Afrique du Sud. Parmi elles, certaines souches semblent être particulièrment prometteuses et mériteraient de faire l'objet de recherches plus approfondies.

Les travaux du chapitre II ont également confirmé la supériorité de la levure S. suaveolens en termes d'aromatisation globale. Dans le cadre des travaux de thèse présentés dans ce manuscrit, le choix a donc été fait de continuer à optimiser et valoriser les potentialités déjà hors nomes de cette souche pour sa production d'arôme. Comme nous l'avons mentionné dans le chapitre I, une des méthodes d'optimisation des caractéristiques biotechnologiques de souches levuriennes particulièrement utile est la mutagenèse à l'aide des UVs. Cette méthode est d'autant plus intéressante pour des applications en agro-alimentaire qu'elle est aujourd'hui l'une des seules techniques de mutagenèse produisant des organismes génétiquement modifiés accéptables du point de vue de la réglementation européenne stricte vis à vis des organismes génétiquement modifiés de manière générale.

Nous nous sommes proposés d'utiliser cette méthode pour produire des souches mutantes dans le but d'optimiser la production globale d'arômes de la levure S. suaveolens. Le criblage des souches a été réalisé en séléctionnant les mutants ayant perdu la capacité à croitre sur un milieu contenant uniquement de l'isoleucine, de la leucine ou de la valine (souches ILV$^-$). Les résultats de ces expérimentations font l'objet de ce chapitre III.

Sélection par mutagenèse UV et caractérisation physiologiques de souches mutantes de la levure *Saprochaete suaveolens* (anciennement *Geotrichum fragrans*) hyperproductrices de composés organiques volatils.

Melissa TAN[1,2], Yanis CARO[1,2], Alain SHUM CHEONG SING[1], Héloïse REISS[1], Jean-Marie FRANCOIS[3] et Thomas PETIT[1,2] *

[1] Université de la Réunion, Laboratoire de Chimie et Biotechnologies des Produits Naturels (ChemBioPro), Réunion, France

[2] IUT de la Réunion, Département Hygiène, Sécurité et Environnement (HSE), Réunion, France

[3] INSA de Toulouse, Toulouse Biotechnology Institute (TBI), Toulouse, France

* Correspondant:

Tel.: +33 262 692 65 11 48

E-mail: thomas.petit@univ-reunion.fr

Adresse : Université de La Réunion, Institut Universitaire de Technologie, 40 Avenue de Soweto, F-97410 Saint-Pierre, France.

Résumé

La production de composés d'arômes ou composés organiques volatils (COVs) par les levures non-*Saccharomyces* telles que *Pichia kluyveri, Torulaspora delbrueckii, Candida stellate* ou *Hanseniaspora delbrueckii* a été démontrée comme une bonne alternative pour la production d'arômes naturels. Parmi les levures non-*Saccharomyces* productrices d'arômes, *Saprochaete suaveolens* (anciennement connue sous le nom de *Geotrichum fragrans*) est particulièrement intéressante car elle produit à partir d'acides aminés branchés (ILV : isoleucine, leucine, valine) certains esters α-insaturés avec des propriétés hautement aromatisantes (tels que le tiglate d'isobutyle, le tiglate d'isoamyle ou le tiglate d'éthyle) et qui ne sont que rarement retrouvés dans les bouquets aromatiques des levures non-*Saccharomyces.* Ces composés sont produits dans les voies de la β-oxydation des acides aminés branchés, par l'estérification de l'intermédiaire enoyl-CoA avec un alcool qui peut être produit par la voie d'Erhlich (alcool isoamylique) ou par la glycolyse (éthanol). Afin d'améliorer la production de ces COVs, nous avons réalisé la mutagenèse UV de notre souche de *S. suaveolens* isolée au laboratoire et nous avons cherché les mutants ayant perdu la capacité de se développer sur ces acides aminés. Sur les 15 393 clones isolés après irradiation UV, neuf clones se sont révélés incapables de se développer sur un milieu ne contenant que de la leucine, de l'isoleucine et de la valine comme seule source de carbone (souches ILV^-). Alors que les COVs étaient globalement moins diversifiés chez les mutants comparés à la souche sauvage, l'un de ces mutants produisait 8 fois plus de COVs que la souche sauvage de *S. suaveolens*. Les mesures des activités des enzymes impliquées dans le catabolisme de ces acides aminés branchés ont montré que la hausse d'accumulation de ces COVs chez ce mutant coïncidait avec une perte relative de l'activité de l'enoyl-CoA hydratase et une nette augmentation de l'activité de l'acyl-CoA hydrolase.

Mots-clés : Production d'arômes ; *Saprochaete suaveolens* ; levure non-*Saccharomyces* ; mutagenèse UV, voie métabolique d'Ehrlich, acides aminés

Selection by UV mutagenesis and physiological characterization of mutant strains of the yeast *Saprochaete suaveolens* (former *Geotrichum fragrans*) with higher capacity to produce flavour compounds

Melissa TAN[1,2], Yanis CARO[1,2], Alain SHUM CHEONG SING[1], Héloïse REISS[1], Jean-Marie FRANCOIS[3] and Thomas PETIT[1,2 *]

[1] Université de la Réunion, Laboratoire de Chimie et Biotechnologies des Produits Naturels (ChemBioPro), Réunion, France

[2] IUT de la Réunion, Département Hygiène, Sécurité et Environnement (HSE), Réunion, France

[3] INSA de Toulouse, Toulouse Biotechnology Institute (TBI), Toulouse, France

* Corresponding author:

Tel.: +33 262 692 65 11 48.

E-mail: thomas.petit@univ-reunion.fr

Permanent address: Université de La Réunion, Institut Universitaire de Technologie, 40 Avenue de Soweto, F-97410 Saint-Pierre, France.

Abstract:

Aroma compounds, also called volatile organic compounds (VOCs), production by non-conventional yeast (NCY) such as *Pichia kluyveri, Torulaspora delbrueckii, Candida stellate* or *Hanseniaspora delbrueckii* has been shown as a good alternative to get natural aromas for food products. Among the aroma producing NCY, *Saprochaete suaveolens* (former *Geotrichum fragrans*) is endowed with very interesting flavouring properties as it can produce several α-unsaturated esters, such as isobutyl tiglate, isoamyl tiglate or ethyl tiglate that are rarely found in other aroma producing NCY. These compounds are produced from branched-chain amino acids (isoleucine, leucine, valine; ILV) in route of their β-oxydation, in which the intermediate α-unsaturated enoyl-CoA can be esterified with an alcohol that can be produced from the Erlich pathway or the glycolysis pathway (ethanol). As this β-oxydation enables growth of *S. suaveolens* on these amino-acids as sole carbon source, we sought to UV mutagenized this yeast and searched for mutants no longer able to grow on these amino acids, as mean to search for mutant strains with higher capacity of producing these aromas. From 15,393 clones isolated after UV irradiation, nine of them were found to be unable to grow on ILV. While the diversity in VOCs were overall lower in these mutants as compared to the wild type strain, one of them produced 8 times more VOCs than the wild type of *S. suaveolens.* Measure of activities of enzymes implied in the catabolism of branched chain amino acids in this mutant showed that this higher accumulation coincidated with an almost lost of enoyl-CoA hydratase activity and a 2-fold increase of acyl-CoA hydrolase.

Keywords: Aroma production; *Saprochaete suaveolens*; non-conventional yeast; UV mutagenesis; Ehrlich metabolic pathway, amino acids

Highlights:

- UV mutagenesis of *S. suaveolens* was performed to search for mutant strain with higher VOCs production from catabolism of branched amino acids *via* a fatty acid oxidation.
- From more than 15 000 clones selected, 9 showed to be unable to grow on branched-chain amino acids (isoleucine, leucine, and valine) as sole source of carbone.
- 1 of the 9 selected mutants produced 8-fold more VOCs compared to the wild type of *S. suaveolens*.
- The higher accumulation coincidated with a lost of enoyl-CoA hydratase activity and a 2-fold increase of acyl-CoA hydrolase

I. Introduction

Aroma perception results from a complex mixture of volatile molecules from various group like esters, acids or alcohols in defined proportion and play an important role in food acceptance by consumers (Bogacz-Radomska *et al.,* 2008). For many years, they have been mainly chemically synthetized because of high yield and low cost production. However, some of these chemically synthetized aromas can strongly be modified when integrating human metabolic pathways (Roy and Kumar, 2019). In some cases, these modifications lead to toxic compounds implied in chronic disease such as allergies, diarrhea or cancer. This has resulted in a growing interest of consumers for aromas of natural origins, more positive on human health (Roy and Kumar, 2019; Pessôa *et al.,* 2019). While direct extraction of the natural aroma from fruit or plant extracts could respond to the consumers' demand, the resulting products were often very expensive, sensitive to storage and food process conditions. Moreover, their method of production often requires specific solvent that may penalize the natural notion of such product and is strongly dependent on season. To overcome these inconvenients, researches considered the aroma production by microbial activity as a promising solution, taking into account that microbial culture are carried out in bioreactors and independent of season (Roy and Kumar, 2019; Sales *et al.,* 2018; Felipe *et al.,* 2019).

Among potential microbial aroma producers, non-conventional yeasts (NCY) have gained an important place in that field. Indeed, numerous of them from various genus, such as *Pichia kluyveri, Torulaspora delbrueckii, Candida stellate* or *Hanseniospora delbrueckii* have been shown as good alternative for aroma production as they produce high amount of several flavoring compounds like 2-phenyl ethanol, ethyl octanoate or butanoic acid (Buzzini *et al.,* 2005; 2003; Grondin *et al.,* 2017; 2015a; Mdaini *et al.,* 2006; Suomalainen and Lehtonen, 1979; Liu *et al.,* 2020; Bhari and Singh, 2019). In this regard, we previously isolated from dragon fruit in Reunion Island, a

filamentous yeast strain with intense fruity flavour deriving from metabolization of amino- and fatty acids (Grondin *et al.,* 2015a; 2015b). We identified this yeast species as *Saprochaete suaveolens* by sequencing of the variable D1/D2 domain of the large subunit ribosomal RNA gene, and showed that it produced high level of aromatic compounds also termed volatile organic compounds (VOCs) among which some α-unsaturated esters (isobutyl tiglate, isoamyl tiglate, butyl tiglate, ethyl tiglate, ethyl 2-methylpropanoate, ethyl-3-methylbut-2-enoate, ethyl but-2-enoate) are rarely found in aroma bouquet of other NCYs (Grondin *et al.,* 2015a; Roy and Kumar, 2019).

The study of Grondin *et al.,* (2015b) indicated that the production of these α-insaturated esters by *S. suaveolens* arised from the catabolism of branched-chain amino-acids through two pathways, namely Ehrlich pathway (EP), and β-oxidation pathway (BOP). A simplified representation of these metabolic routes is presented in Figure 19. Briefly, in EP, the branched-chain amino acid is converted into the corresponding branched α-keto acid by a branched amino acid transferase (TA). This branched α-keto acid is then decarboxylated into an aldehyde which can be either oxidized into an acid or reduced into an alcohol under the action of an aldehyde dehydrogenase (AlDH) or of an alcohol dehydrogenase (ADH) (Hazelwood *et al.,* 2008). The second route that has been identified in filamentous fungi and is absent in *Saccharomyces* species is the β-oxydation of the branched-chain α-ketoacid into acetyl-CoA that is incorporated into the TCA cycle and the shunt glyoxylic pathway, enabling *S. suaveolens* to grow on media containing branched-chain amino acids as sole carbon source (Grondin *et al.,* 2015b). During this metabolisation, the branched α-keto acid is subjected to an oxidative decarboxylation catalyzed by branched-chain α-ketoacid dehydrogenase (BCKAD) into an enoyl-CoA. This intermediate can then enter the classical fatty acid β-oxydation pathway that encompasses the successive reduction by a FAD+-dependent acyl-CoA dehydrogenase into an enoyl-CoA, an enoyl-CoA hydratase, a NAD+-dehydrogenase and finally a thiolase to end up into acetyl-CoA and propionyl-CoA in the case of isoleucine. However, Grondin *et al.,*

(2015b) showed that the enoyl-CoA intermediate can be also esterified by an alcohol acyl transferase (AAT) to give rise to α-unsaturated esters. Also, the previous intermediary, *i.e.* the acyl-CoA can be hydrolysed by an acyl-CoA hydrolase followed by esterification catalyzed by an AAT to generate others esterified compounds. Altogether, the combination of Erlich pathway and these new routes led to a wide variety of VOCs.

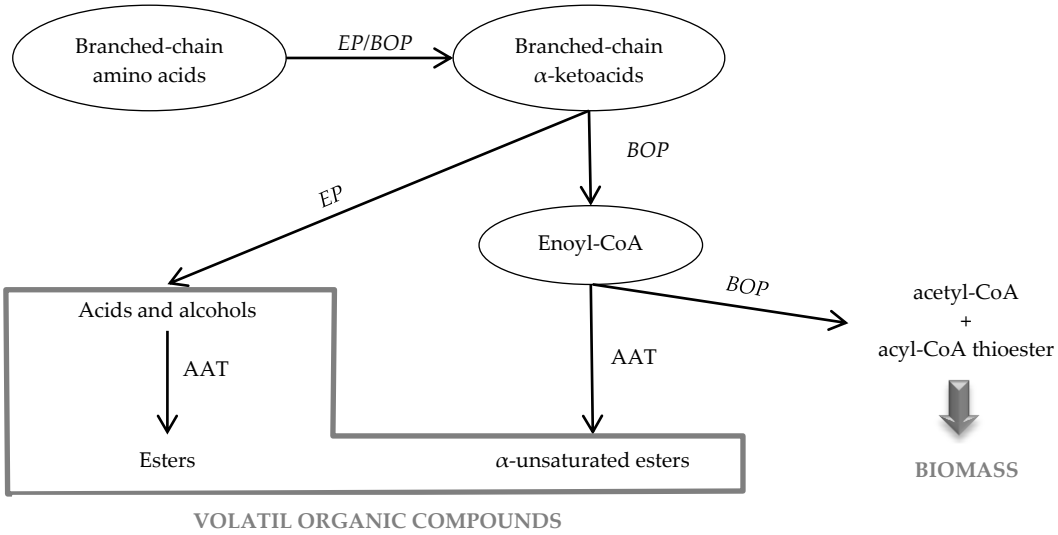


Figure 19. Simplified scheme of branched-chain amino acids catabolism in wild type of *S. suaveolens*. Two metabolic pathways are implied in branched-chain amino acids: Ehrlich pathway (EP) and β-oxidation pathway (BOP). Alcool acyl transferase (AAT) allows producing esters from metabolic intermediates.

Taking these pathways into consideration, one can expect that the loss of the growth on branched-chain amino acids in *S. suaveolens* may be a trick to improve an overall VOCs production. As the genome sequence of this yeast species has just recently been established (Lichancová *et al.*, 2019) and that there was no genetic tools available at the moment, we sought to employ UV mutagenesis to screen for *S. suavelens* mutant unable to grow on branched amino acids (leucine, isoleucine and valine) as sole carbon source. Then, to identify mutants with higher VOCs production than wild type, we carried out headspace solid phase microextraction and gas-chromatography coupled with mass spectrum detector analysis (HS-SPME GC/MS) of their VOCs. Finally, we investigated activities of enzymes implied in branched-chain amino acid catabolism into VOCs and acetyl-CoA to examine

whether increased of VOCs is correlated with change in either one of the enzymes in this pathway.

II. Materials and methods

1. Yeast strains and UV mutagenesis performance

Wild type *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK 112-2N (van Dijken *et al.,* 2000) and a wild strain of *Saprochaete suaveolens* (former *Geotrichum fragrans*) previously isolated from Pitaya fruit (*Hylecereus polyrhisus*) in Reunion Island, France (Grondin *et al.*, 2015a) were used in this study. UV mutagenesis of *S. suaveolens* was performed according the protocol introduced by Winston (2008) for the application of UV mutagenesis in yeast, with some modifications. *S. suaveolens* strain was incubated in 10 mL of yeast extract peptone dextrose (YPD, 20 $g.L^{-1}$ peptone, 20 $g.L^{-1}$ dextrose and 10 $g.L^{-1}$ yeast extract) broth medium at 30°C overnight before twice wash with 10 mL of sterile physiological water. 5.10^4 $cell.mL^{-1}$ of culture were then prepared with sterile physiological water. 100 µL of the suspension were spread on yeast nitrogen based media supplemented of $2g.L^{-1}$ of glucose (YNB-Glu) before exposure to UV irradiation (254 nm, 30 cm high) at times comprise between 0 (control) and 540 sec. To stop photoreactions, plate was kept in the dark and incubated at 30°C for 15h.

2. Mutant screening

Using replica-plating method, irradiated strains were replicated on Yeast Nitrogen Based media supplemented of 1 $g.L^{-1}$ of isoleucine, leucine, valine or 2 $g.L^{-1}$ of glucose (YNB-Ile, YNB-Leu, YNB-Val, YNB-Glu respectively) and incubated during 5 days at 30°C. Colonies growing on YNB-Glu and not on YNB-Ile, YNB-Leu or YNB-Val were then selected and isolated on YPD agar media for confirmation. Confirmation of selected strain was realized by growth test. Thus, strains were suspended in 5 mL of YPD broth media and incubated overnight at 30°C. The culture

was then centrifuged (13 000 rpm, 5min) and the supernatant was replaced by 5 mL of sterile physiological water. Then, 10^6, 10^5 and 10^4 cell.mL^{-1} cultures were prepared in sterile physiological water and 5µL of these suspensions were dropped in duplicate in YNB-agar plate containing glucose, leucine, valine or isoleucine. Wild type *S. suaveolens* and *S. cerevisiae* were used as positive and negative control, respectively. Plates were incubated during 48 hours at 30°C before reading.

3. Volatile organic compound (VOCs) analysis

Strains were seeded in a 20 mL crimping vial containing 15 mL of YNB agar slant media supplemented with 2 g.L^{-1} of glucose and 1 g.L^{-1} of isoleucine (YNB-Glu-Ile) and incubated at 30°C during 24H. Then, vial was sealed and re-incubated during 24 h at 30°C. Prior to analysis, 10 µL of octan-1-ol (at 1 g.L^{-1} in dichloromethane) was added into the sealed vials containing the yeast culture as internal standard. The headspace of inclined cultures was subjected to SPME analysis using a 2 cm long fiber coated with 50/30 µm divinylbenzene/Carboxen on polydimethylsiloxane bonded to a flexible fused silica core (Supelco). The fiber was exposed to headspace for 15 min at 30°C and inserted into the injection port at 250°C for 2 min. Metabolites were separated by GC, on a ZB-5MSI columns (30m * 0.32mm * 0.25µm film thickness), coupled to a mass spectrometer (Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra). The carrier gas (H_2) was set at a flow rate of 2 mL.min^{-1}. The column temperature was maintained at 40°C for 2 min, raised to 150°C at 10°C.min^{-1}, then raised to 240°C at 30°C.min^{-1} before end. Volatile organic compounds were identified by comparing their mass spectra and their experimental Kovats index with the NIST database (www.chemdata.nist.gov).

4. Preparation of crude extracts and assays of enzymatic activities

Yeast cells were cultivated in 250 ml Erlenmeyer flasks containing 50 ml of YNB-Glu or YNB-Glu-Ile broth for 24 h at 30°C. Then, equivalent of 100 UDO at 600

nm of culture were collected in 50 mL falcon tubes by centrifugation (2000 rpm, 4°C, 1 min). Cell pellet was resuspended in 1 ml cold water, transfered into Eppendorf tubes and washed twice with demineralised cold water by centrifugation (2 min at 10.000 rpm) and finally stored at -20°C until use.

For *S. cerevisiae*, glass beads (0.5 mm of diameter) and 500 µL of extraction buffer pH 7.4 (50 mM potassium phosphate buffer, 2 mM EDTA, 100 mM KCl and 1 mM DTT) were added to the cell pellet. Cells were broken in a MP Biomedicals™ Instrument FastPrep-24™ 5G using 6 cycles of 30s at 6.5 $m.s^{-1}$ and 1 min on ice-water between each cycle. As this procedure did not work for *S. suaveolens*, these cells were broken using a Qiagen Retsh Tissue Lyser II (3 min, 30Hz) with a cold tungsten bead introduced in the tube in the presence of 500 µL of extraction buffer. In both cases, tubes were then centrifuged (4°C, 5 min, 1000 g) and the supernatants were purified on Amicon Ultra-05 Centrifugal Filter devices 10K according to the manufacturer protocol. Filtered extracts were then used for enzyme activities measurement and for protein concentration.

All enzymatic activity assays were carried out using an Agilent 8453 UV-Visible spectrophotometer in a final volume of 1 mL with an appropriate amount of crude extract. Specificity of the enzymatic reaction was verified by carry out the reaction in the absence of crude extract. For the branched-chain α-ketoacid dehydrogenase (BCKAD), the reaction measured by oxidation of NAD+ at 340 nm in a reaction mixture containing 50 mM phosphate buffer pH 7.4, 2 mM EDTA, 0.2 mM DTT, 0.5 mM TPP, 5 mM MgSO4 and 0.5 mM CoA-SH and 1.5 mM NAD. The reaction was started by addition of 0.2 mM 2-oxo-4-methylpentanoic acid (Patston P.A. *et al.*, 1988). Enoyl-CoA hydratase (ECH) activity on crotonyl-CoA was determined according to Park and Lee (2003) with some modifications. Briefly, reduction of 0.225 mM crotonyl-CoA into 3-hydroxy-butanoyl-CoA was followed at 263 nm in a reaction mixture containing 45 mM TrisCl pH 8.0. Decarboxylase (DC) activity on 2-oxo-4-methylpentanoic acid was determined in medium containing 50 mM

Na+citrate at pH 6.2, 100 mM KCl, 0.2 mM DTT, 0.5 mM TPP, 5mM MgSO4 0.2 mM NADH and 5 U/mL yeast alcohol dehydrogenase. The reaction was started by addition of 0.2 mM 2-oxo-4-methylpentanoic acid and oxidation of NAD+ was followed at 340 nm. Alcohol dehydrogenase (ADH) was assayed with 2 mM 2-methylpropanal or 100 mM ethanol. In first case, reduction of 0.2 mM NADH to NAD^+ was followed at 340 nm in a mixture containing 50 mM Na+citrate buffer pH 6.2, 100 mM KCl, 0.2 mM DTT, 0.5 mM TPP and 5 mM MgSO4. In the second case, oxidation NAD+ to NADH was followed at 340 nm in 50 mM phosphate buffer pH 8.0, 100 mM KCl, 0.2 mM DTT, 0.5 mM TPP, 5 mM MgSO4 and 0.2 mM NAD. For aldehyde dehydrogenase (AlDH) activity assay, the reaction was carried out in the presence of 50 mM citrate buffer pH 6.2, 100 mM KCl, 0.2 mM DTT, 0.5 mM TPP, 5 mM MgSO4 and 1.5 mM NAD. The reaction was started by addition of 2 mM 2-methylpropanal and followed at 340 nm by oxidation of NAD into NADH. The acyl-CoA dehydrogenase (ACyD) activity was determined following the reduction of DCIP into $DCIPH_2$ at 655 nm. The reaction was carried out in 50 mM KPi buffer pH 7.4, 2 mM EDTA, 100 mM KCl, 0.1 mM FAD+, 0.5 mM DCIP and 0.2 mM DTT and was started by the addition of 0.2 mM 2-methylbutanoyl-CoA. Assay of alcohol acyltransferase (AAT) activity was performed in a reaction mixture containing 50 mM KPi pH 7.4, 2 mM EDTA and 100 mM KCl. The reaction was started by addition 2 mM p-nitrophenylbutyrate with leads to release of p-nitrophenol that was followed at 415 nm. Finally, acyl-CoA hydrolase activity (ACyH) assay was performed in 10 mM KPi buffer (pH 6.5), 50 mM $MgCl_2$ and 0.1 mM DTNB. Reaction was started by addition of 0.1 mM 2-methylbutanoyl-CoA and the release of CoASH was followed at 415 nm which correspond to production of reduced DTNB. Protein concentration was determined at 550 nm by a Bradford method, with bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich) as the standard. All assays were performed in triplicate from independent cultures.

5. Statistical analysis

The means and standard deviations (SD) were determined based on triplicate fermentations and represented as mean ± SD. Experimental data were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) using XL Stat Applied Sensory software (2020.1.3) at the 95% confidence level. Principal analysis component (PCA) and hierarchichal cluster analysis (HCA) were applied to discriminate among the means of the total volatile organic compounds production and the different volatile compounds of the wild type of *S. suaveolens* and the selected mutant. PCA was also carried out using the XL Stat Applied Sensory software (2020.1.3) and the data are presented as a biplot graph. Finally a heatmap was realized based on the ratio of each VOCs produced by the mutant on those produced by the wild type of *S. suaveolens* using NG-CHM Builder: Interactive heatmap online software (www.build.ngchm.net).

III. Results and discussion

1. Condition of UV mutagenesis determination

Suitable time of UV irradiation to accumulate non-lethal permanent mutation in *S. cerevisiae* has been empirically described as time which results in a population survival rate from 40 to 70% (Winston, 2008). Therefore, prior to the mutagenesis experiments, a dose/response assay was performed to determine the optimal UV-exposition duration for *S. suaveolens* strain. As shown in Figure 20, population survival rate immediately dropped by 25 % after the first 10 s of irradiation and then remained at this value even after 110 s of irradiation. Upon longer time of irradiation, we clearly observed a linear decay (R^2 = 0.96) in population survival with complete mortality after 420 s of irradiation. We therefore choose 180 s of UV irradiation which corresponded to a 50 % of population survival. Accordingly, we isolated 15 393 colonies after this time of UV-irradiation of wild *S. suaveolens* on YNB-Glu agar

media plates.

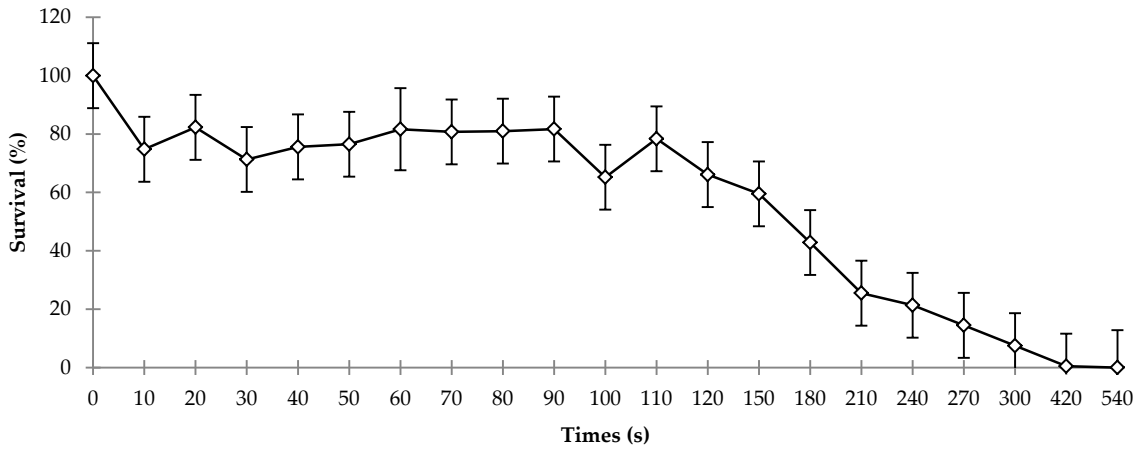


Figure 20. *S. suaveolens* survival after UV exposure, according to the number of colony forming units (CFU) observed in each time period of exposition. The viability of UV-irradiated cells was calculated as fraction (%) of the control values. Standard deviations were calculated from eight-fold measurements.

2. Screening strategy

To screen irradiated clones which loss ability to grow on media containing only isoleucine, leucine or valine as sole source of carbone, the irradiated clones grown on YNB-Glu were replicated on YNB-Ile, YNB-Leu and YNB-Val agar media plate. This analysis led to 34 clones not growing of YNB-Leu, 13 on YNB-Ile and 25 on YNB-Val. Those clones that did not grow on the three aminoacids were then recultivated on YNB-Glu, to isolate single colonies, which were again rechecked for growth / no growth on non-permissive YNB- Leu/ Ile/Val medium to end up with 9 ILV^- mutants termed mutants M2 to M10.

3. Volatile organic compounds analyses of *S. suaveolens* and its 9 ILV^- mutants

Volatile organic compounds (VOCs) produced by wild type *S. suaveolens* and the 9 selected mutants were investigated by headspace-solid-phase micro extraction followed by gas-chromatography coupled with mass spectrum detector (HS-SPME-GC/MS) analysis after 48h of growth on YNB-Glu agar tubes containing 1 $g.L^{-1}$ isoleucine (YNB-Glu-Ile) at 30°C. Results of these analyses are presented in

3.1. Comparative analysis of VOCs production between *S. suaveolens* and its 9 ILV$^-$ mutant strains.

To better visualize the VOC profile of each ILV$^-$ strain and compared to that of the wild type of *S. suaveolens*, we determined the ratios of each VOC found in the mutant strain on the value obtained for the wild type and realized a heatmap (Figure 21). Overall, the number of different VOCs was lower in the mutants as compared to the wild type (*i.e.* mutant M6 produced 24 different VOCs whereas 34 different compounds were identified in the wild type), indicating that UV mutagenesis caused a decrease in the VOCs diversity.

In term of total amount, only two mutants showed significant increase of VOCs production. Indeed, mutants M9 and M10 showed 1.8 and 8.0 times, respectively, more VOCs production (mg.L^{-1}) than the wild type. Only the wild type and two mutants M5 and M7 produced a tiny amount of the rose-tasty alcohol phenylethanol (Supplementary data C). Also, as already noticed in a previous work (Grondin *et al.*, 2015b), the produced VOCs were essentially ester compounds. As esters result from a condensation of an acyl-CoA and an alcohol, these compounds can be generated either *via* the Ehrlich pathway (EP) as alcool or acid (Dickinson *et al.*, 2003; Hazelwood *et al.*, 2008; Saerens *et al.*, 2010), either *via* the β-oxydation of fatty acid or branched-chain α-ketoacid pathways.

Major part of the detected VOCs derived from 2-methylbutanol and 2-methylbutanoic acid, *i.e* alcohol and acid resulting from isoleucine catabolism *via* the EP. This result was expected as strains were cultivated in a glucose medium supplemented with 1 g.L^{-1} of this amino acid. In mutants M3, M5, M6 and M9, part of the total VOCs obtained *via* the EP were lower than the part observed in the wild type of *S. suaveolens* (40.6, 57.5, 56.9 and 61.3% of total VOCs respectively, *vs.* 62.6% in the wild type), suggesting that these mutants while unable to grow on this amino acid had also reduced the capacity to assimilate these amino acids through the EP.

Conversely, for mutants M2, M4, M7, M8 and M10 part of the total VOCs involving EP in their production was higher than the part observed in the wild type of *S. suaveolens* (75.2, 67.4, 72.9, 71.9 and 67.5%, respectively) and hence they may have an increased EP capacity than the wild type *S. suaveolens*. Results of the heatmap (Figure 21) suggested a particularly more effective EP in the mutant M10 than in the wild type of *S. suaveolens*. Indeed, on the 22 VOCs from EP detected, 10 are coloured in orange to bright brown, meaning that these VOCs are produced at least above 5 to 10 times more by the mutant M10 compared to the wild type of *S. suaveolens*. Six of the VOCs from the EP are red-coloured, meaning that these compounds are produced above 50 times more by the mutant M10 than by the wild type of *S. suaveolens.* Finally, the most overproduced compound from the EP by the mutant M10 was 2-methylbutyl butanoate (fruity, spicy like) which was over 900 fold more important for the mutant M10 than for the wild type of *S. suaveolens*.

The classical fatty-acid β-oxidation pathway is the major pathway for fatty-acid degradation in eukaryotes which is mainly located in the peroxisomes for yeast. This pathway allows the production of acetyl-CoA and a thioester of acyl-CoA from a fatty-acid (Maggio-Hall and Keller, 2004). Furthermore, thioester of acyl-CoA can further react with available superior alcohol to synthetize ester or be reduced in flavoring aldehydes or alcohols. For mutants M2 to M9, most of the VOCs deriving from the unsaturated acyl-COA in the fatty-acid β-oxidation pathway were lower than in the wild type of *S. suaveolens*. This suggested a decrease of the activity of one or numerous enzymes involved in this pathway and was in accordance with the absence of growth of these mutants on YNB-Ile media. However, an increased production of ethyl but-2-enoate above 12 fold was observed for mutants M2, M3, M4 and M6 suggesting that this compound may be produced in another metabolic pathway. With 6 of the 8 VOCs deriving from the β-oxidation pathway overproduced, mutant M10 also displayed the most overproduction of compounds from this pathway, with highest increase for ethyl but-2-enoate (over 1000 fold

compared to *S. suaveolens*). For this mutant, this suggested that the lost of growth ability on media containing only branched-chain amino acids as source of carbone favoured, as expected, the production of VOCs from the β-oxidation.

Some esters derived both from Ehrlich and β-oxidation pathways (see Supplementary data C). These compounds may result from extracellular esterification between products of these two pathways. 2-methylbutyl 2-methylbut-2*Z*-enoate and 2-methylpropyl 2-methylbut-2-enoate were not detected in the aromatic fraction of the wild type of *S. suaveolens* but were produced in some cases in the mutants. Therefore, ratios of their production by the mutants and by the wild type of *S. suaveolens* were very high when produced (over 50 fold, Figure 21). Production of 2-methylbut-2*Z*-enoate by mutants did not exceed 0.25mg.L^{-1} (for mutant M8) but 2-methylpropyl 2-methylbut-2*E*-enoate one reached 37.40 mg.L^{-1} in mutant M10 (Supplementary data C).

Finally, one ester derived neither from the EP nor from the β-oxidation pathway. This was the case of ethyl butanoate which propably derived from the butanoate pathway (KEGG pathway database, www.genome.jp), and which was particularly over produced by the mutant M3, M8 and M10 compared to the wild type of *S. suaveolens* (122.5 times more).

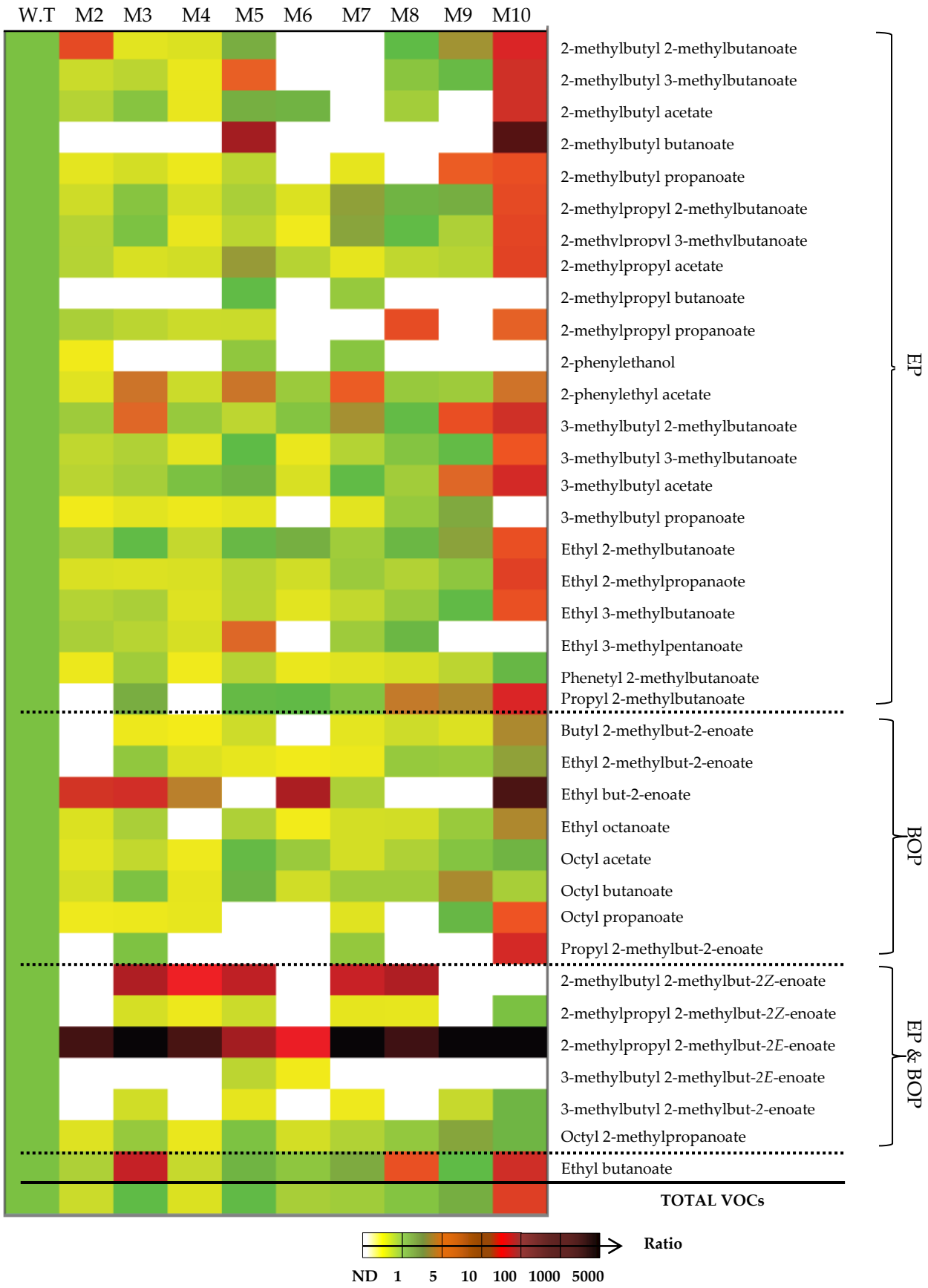


Figure 21. Heatmap visualization based on ratio of production of each volatile organic compound (VOC) between UV generated mutants (M2 to M10) and wild type of *S. suaveolens* (W.T.). VOCs production (mg/L) were analyzed by HS/SPME GC/MS and classified according the metabolic pathway implied in their production: Ehrlich pathway (EP) or β-oxidation pathway (BOP). Ratios were calculated according data obtained for the mutant on data obtained for the wild type of *S. suaveolens*. Therefore, for the wild type, ratios were set at 1 for all metabolites. The heatmap was realized using NG-CHM Builder: Interactive heatmap online software (www.build.ngchm.net). Colour-scale was chosen from white (not detected) and black (VOC production over 5000 fold more important than in the wild type).

3.2. Cluster and multivariate analysis of the wild type of *S. suaveolens* and its 9 ILV$^-$ mutants

In order to vizualise the aggregation and the dissociation of VOCs profiles between the wild type of *S. suaveolens* and its 9 ILV$^-$ mutants, a principal component analysis (PCA) was carried out (data from Supplementary data C) using the Person's method. Two significant Principal Components (PC) explaining 76.59% of the total variance were retained to create the score plot presented in Figure 22. The firt axis PC1 explained 66.64% of the total variance and was strongly correlated (over 0.583) with all the VOCs presented in Figure 21, except 2-phenylethanol (-0.134), 2-methylbutyl 2-methylbut-2*Z*-enoate (-0.278), 2-methylpropyl butanoate (-0.199), 3-methylbutyl propanoate (-0.054), ethyl 3-methylpentanoate (-0.161), ethyl butanoate (-0.025) and octyl butanoate (0.042). The second axis PC2 explained 9.95% of the total variance and was better correlated with 3-methylbutyl propanoate (0.921), octyl 2-methylpropanoate (0.785) and octyl butanoate (0.944) and to a lesser extends with 2-methylbutyl propanoate (0.425) and octyl acetate (0.392). A hierarchical cluster analysis (HCA) was also performed using the Ward's method. Both PCA and HCA analysis led to clustering the wild type and the 9 ILV$^-$ mutants into 4 groups (Figure 22 and Figure 23).

Group 1 was represented by WT and M5, indicated that they exhibited similar VOCs production profile, notably characterized by similar amount of total VOCs produced and also by a higher production of 2-phenylethanol, ethyl 3-methylpentanoate and 2-methylpropyl butanoate, all deriving from the Ehrlich pathway, as compared to all the other mutants. Mutant M2, M3, M4, M6, M7 and M8 were clustered in group 3 and with the exception of M3, they produced 3 to 5 times less overall VOCs content than the wild type, suggesting that isoleucine assimilation was potentially less effective in these mutants than the wild type of *S. suaveolens*. Group 2 and group 4 were represented by a single member, which was the mutant M9 for group 2 and M10 for group 4. Although they both showed a higher

production of VOCs as compared to wild type, M10 was distinct from M9 as it accumulated the highest level of ethyl tiglate and its reduced form of it, namely ethyl 2-methylbutanoate that very likely originated from the degradation of isoleucine through β-oxidation pathway.

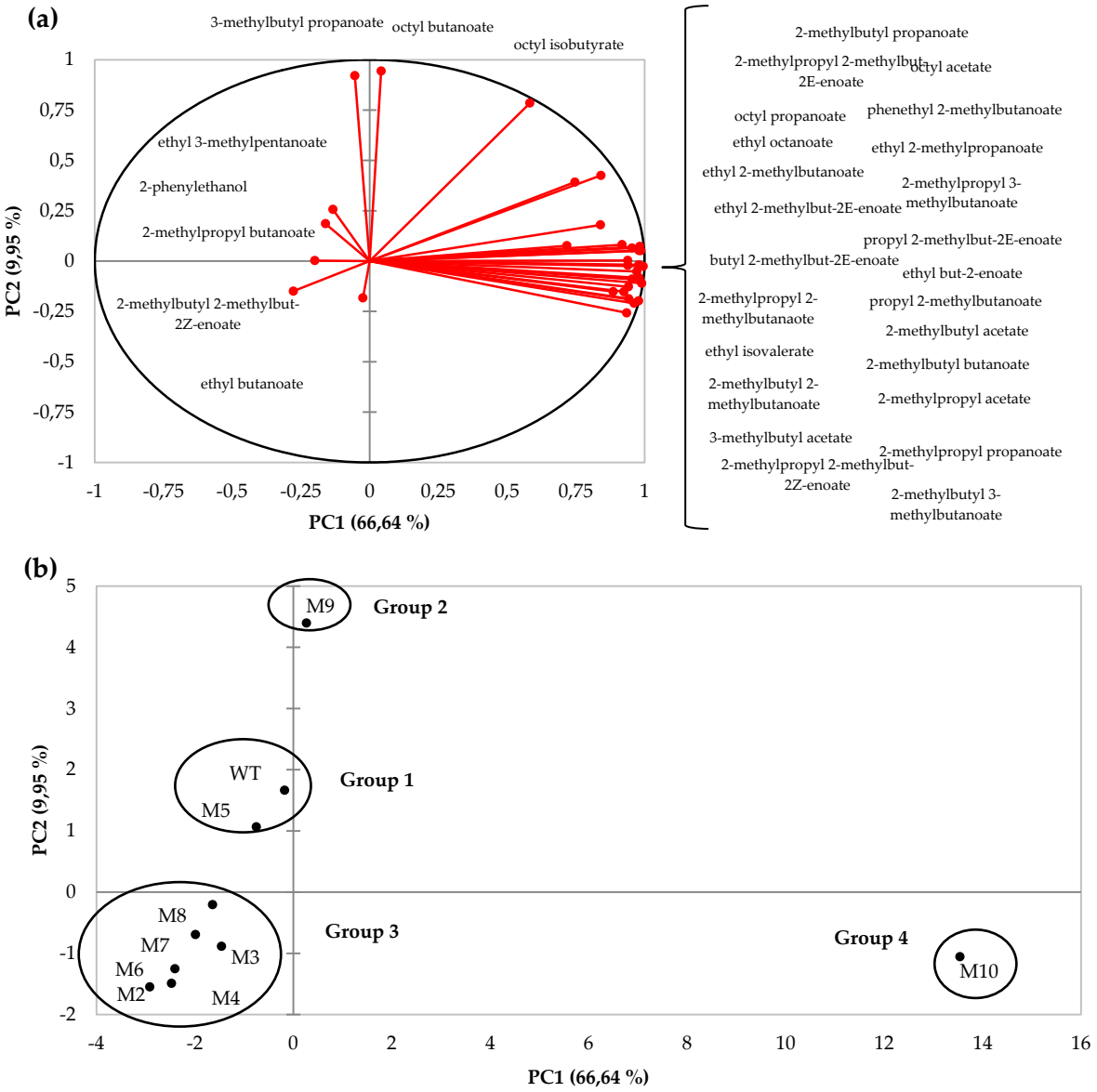


Figure 22. Score plot PC2 versus PC1 for wild type of *S. suaveolens* (WT) and its UV generated mutants M2 to M10 flavours analyzed by HS-SPME-GC/MS. Principal component analysis was performed using the Pearson method on XL Stat Applied Sensory software (2020.1.3).

Thus, except for mutant M5 for which UV mutagenesis seem no to have strongly modify the VOCs profile compared to the wild type, the metabolic routes for VOCs production have been likely altered by UV mutagenesis for the 8 ILV-

remaining mutants. While the overall aminoacids catabolism *via* the Ehrlich of the β-oxidation pathways was lower in the mutants of group 3 than in wild type, it was enhanced in mutants M9 and M10. In addition, mutant M10 displayed 4-fold higher production of total VOCs than mutant M9, suggesting a better assimilation of isoleucine than mutant M9.

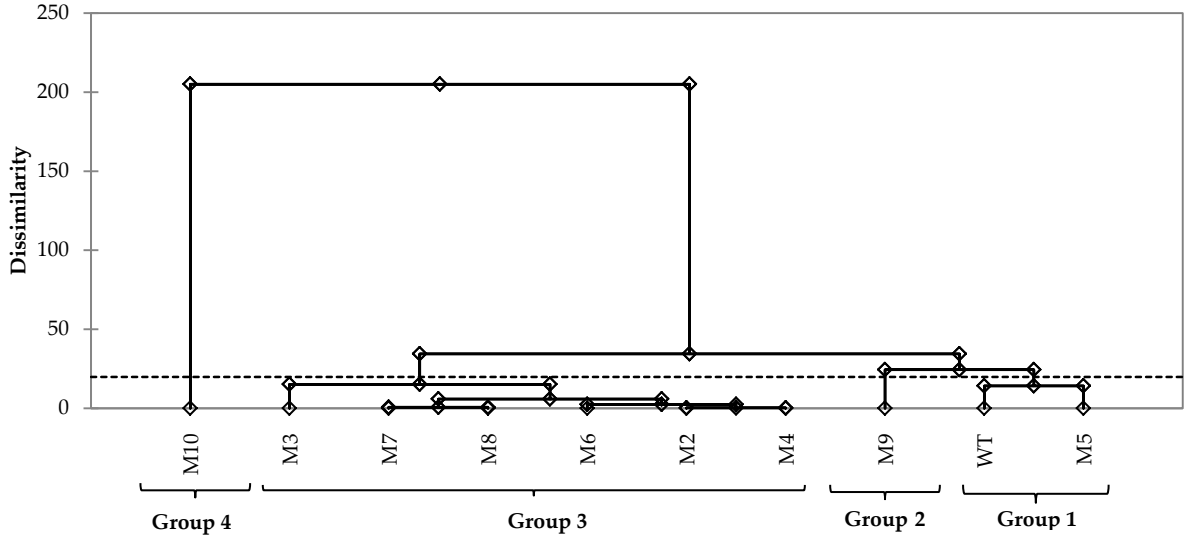


Figure 23. Cluster analysis of the wild type of *S. suaveolens* (WT) and its UV generated mutants M2 to M10. Strains were grouped on the basis of their flavour production using Ward's method and performed using XL Stat Applied Sensory software (2020.1.3). Automatic truncation based on entropy (dotted line) allowed identifying four consistent groups of strain. Most of the strains were classified into group 1 and 3 as indicated by the dotted line (truncation). The dendogram is more flattened for group 3 suggesting that this group of strain is more homogeneous than the group 1. Mutants M9 and M10 were clearly out of group 1 and 3 and were assigned to group 2 and 4, respectively.

4. Reduced activities in the catabolic degradation of amino acids by β-oxidation pathway may account for higher VOCs production in mutant M10

In search for an explanation to the fact that mutant M10 showed an 8-fold increase in the total VOCs, we wished to compare the activities of key enzymes that are implicated in the catabolism of branched-chain amino-acid (namely isoleucine) between the wild type *S. suaveolens* and the mutant M10. From the metabolic routes proposed by Grondin *et al.* (Grondin *et al.,* 2015b), isoleucine can be catabolized by the Erlich pathway and the β-oxidation pathway. The Erlich pathway implicates a decarboxylase (DC) and alcohol dehydrogenase (ADH) for the reductive route or an aldehyde dehydrogenase for the oxidative route. The catabolism by the β-oxydation requires a branched-chain α-keto-dehydrogenase (BCKAD). The acyl-CoA produced

by BCKAD is reduced into an enoyl-CoA by a FAD-dependent acyl-CoA dehydrogenase (ACyD). However, it can be also esterified through the consecutive action of an acyl-coA hydrolase (ACyH) and alcohol acyltransferase (AAT), given rise to specific aroma such ethyl 2-methylbutanoate. The enoyl-CoA intermediate is also at the cross-road of two routes. One is the remaining β-oxydation pathway that implied a hydratation by an enoyl-CoA hydratase (ECH) whereas the other is the esterification into an α-unsaturated ester involving a hydrolase (ACyH) and an alcohol acyltransferase (AAT). We therefore assessed all these enzymes in crude extracts of wild type and mutant M10 of *S. suaveolens*.

Under the condition defined in Material & Methods, we found that the DC of the wild type of *S. suaveolens* and the mutant M10 was roughly comparable whatever the yeasts were cultivated in YNB glucose supplemented or not with 1 $g.L^{-1}$ of isoleucine. Likewise for the activity of ADH measured on 2 methylpropanal showing no significant difference between the two strains. These data suggested that the Erlich pathway has not been altered in the mutant M10. However, we noticed that the aldehyde dehydrogenase (AlDH) activity was 10 times lower than ADH whereas our VOCs data presented in Table 1 showed that esters deriving from 2-methylbutanoic acid (oxidative part of the Erlich pathway) were more abundant than those deriving from 2-methylbutanal (reductive part of the Erlich pathway). This apparent discrepancy can be due to the fact that the enzymatic measurement *in vitro* entailled the bulk activities of ADH and AlDH that are not relevant to those working *in vivo*.

With respect to enzymes of the β-oxidation pathway, we found that the enoyl-CoA hydratase activity in the mutant M10 was extremely weak, near the detection limit of our assay (Table 5). Meanwhile, the activity of acyl-CoA hydrolase (ACyH) catalysing an upstream reaction of enoyl-hydratase was 2 fold higher than in wild type, whereas the activity of acyl-CoA dehydrogenase (ACyD) was not different in both strains but was 5 to 10 fold lower than that of ACyH. Therefore, taken these

data together, the almost lack of ECH in M10 combined with increased activity of ACyH should favour the production of 2-methylbutanoic acid and its associated esters. Accordingly, we found that esters of 2-methylbutanoic acid in M10 were 14 times higher than in the wild type *S. suaveolens* (747.25 mg.L^{-1} *versus* 53.83 mg.L^{-1}). Likewise, the lost of ECH activity shall favour a higher production of ethyl-tiglate which was actually confirmed as this amount of this ester was found 3 times higher in M10 as compared to wild type of *S. suaveolens* (244.33 mg.L^{-1} *versus* 77.39 mg.L^{-1}).

Table 5. Activities (nmol/min/mg protein) of some enzymes involved in the Ehrlich pathways, the unsaturated compounds from the β-oxidation pathways and the fatty-acids β-oxidation pathway in wild type of *S. suaveolens* and mutant M10

Enzyme	Substrate	Wild type of *S. suaveolens*		Mutant M10	
		YNB-Glu	YNB-Glu-Ile	YNB-Glu	YNB-Glu-Ile
AAT	**p-nitrophenylbutyrate**	235,6 ± 124,7^{a}	431,5 ± 96,6^{b}	230,1 ± 118,8^{a}	586,8 ± 92,1^{b}
ADH	**2-methylpropanal**	139,5 ± 31,7^{a}	164,0 ± 28,4^{a}	151,7 ±43,4^{a}	97,5 ± 43,4^{a}
	ethanol	225,4 ± 141,4^{a}	232,8 ± 200,0^{a}	118,8 ± 53,8^{a}	83,7 ± 76,0^{a}
ACyD	**2-methylbutanoyl-CoA**	121,1 ± 60,7^{a}	28,8 ± 33,7^{b}	60,7 ± 12,9^{a}	42,7 ± 12,9^{a,b}
ACyH	**2-methylbutanoyl-CoA**	**356,5 ± 47,7^{a}**	**381,8 ± 55,0^{1}**	**836,1 ± 142,7^{b}**	**780,9 ± 142,7^{2}**
AlDH	**2-methylpropanal**	13,2 ± 5,9^{a}	14,7 ± 5,4^{a}	3,4 ± 2,7^{b}	2,8 ± 2,4^{b}
BCKAD	**2-oxo-4-methylpentanoic acid**	26,1 ± 4,7^{a}	18,9 ± 6,0^{a}	6,5 ± 3,7^{b}	25,7 ± 4,3^{a}
DC	**2-oxo-4-methylpentanoic acid**	107,9 ± 74,1^{a}	138,4 ± 74,1^{a}	219,7 ± 85,8^{a}	118,9 ± 85,8^{a}
ECH	**Crotonyl-CoA**	**143,8 ± 65,7^{a}**	**112,6 ± 75,8^{1}**	**4,7 ± 1,7^{b}**	**0,7 ± 1,7^{2}**

AAT, alcohol acyltransferase; ADH, alcohol dehydrogenase; ACyD, acyl-CoA dehydrogenase; ACyH, acyl-CoA hydrolase; AlDH, aldehyde dehydrogenase; BCKAD, branched-chain α-ketoacid dehydrogenase; DC, decarboxylase; ECH, Enoyl-CoA hydratase. ^{a,,b,c} Enzymes belonging to the significant different group a, b, and c when strains were cultured in YNB-Glu broth media. . ^{1,2,3} Enzymes belonging to the significant different group 1,2 and 3 when strains were cultured in YNB-Glu-Ile broth media.

It is worth to note that the *in vitro* activity of BCKAD was 4 to 10 times lower than activity of enzymes downstream of the pathway, which agrees with previous report arguing that this enzyme is rate limiting in catabolism of branched chain amino acids (Huang and Chuang, 2000). In addition, this enzyme exhibed at least a 4-fold lower activity than enzymes of the Erlich pathway, which may argue that branched amino acids would be preferentially catabolized through the Ehrlich pathway (EP), at least when the yeast is cultivated on glucose as the carbon source. Finally, the AAT activity which is required for esterification of alcohol or acids

derived from Erlich and β-oxidation pathways was similar on wild type and M10 strains and was 2 fold increased upon supplementation of the YNB glucose medium with isoleucine. This data suggests a positive effect of the branched amino acids on expression of the genes encoding AAT.

Altogether, these enzymatic analyses support the notion that the enhanced production of VOCs from isoleucine in *S. suaveolens* mutant M10 may result from the dramatic reduction of ECH activity combined with an increase of ACyH activity. Moreover, the inability of this mutant to grow on branched amino acids may be due to the impairment of the fatty acid β-oxidation caused by the very low activity ECH.

IV. Conclusions

UV mutagenesis was employed to search for mutants of S. *suaveolens* that harbored a higher production of VOCs from branched amino acids. The screen was based on the inability to grow on these amino acids as the sole carbon source. It allowed isolating for 9 mutants, from which one of them (mutant M10) turned out to exhibit 8 times more VOCs as compared to the wild type *S. suaveolens* strain. By determining the specific activities of key enzymes involved in isoleucine catabolism, we demonstrated that the higher production of VOCs observed in this *S. suaveolens* mutant was mainly due to loss of the enoyl-CoA hydratase activity and to an increase of acyl-CoA hydrolase activity. Whether the loss of ECH activity is due to a direct or indirect effect of UV irradiation on gene encoding this enzyme shall await sequencing of the wild type and the mutant strains. Nevertheless, this work showed the feasibility of using for UV mutagenesis strategy and selection on specific media containing branched chain aminoacids as the sole carbon source to significantly enhance the capacity of the yeast *S. suaveolens* to produce valuable VOCs.

V. Supplementary data

Supplementary data C. Main volatile organic compounds (mg.L^{-1}) produced by wild type and 9 ILV^{-} mutants strains of *S. suaveolens* after 48h of growth at 30°C on YNB-Glu-Ile agar medium. Main VOCs were classified according to their hypothetical metabolic pathway of production (1/2)

Compound	W.T	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10
EHRLICH PATHWAY										
2-methylbutyl 2-methylbutanoate	25.79 ± 3.13^{a}	179.87 ± 2.89^{a}	3.43 ± 1.43^{a}	4.58 ±3.57^{a}	48.74 ± 25.46^{a}	0.21 ± 0.37^{a}	1.63 ± 1.25^{a}	27.20 ± 46.03^{a}	74.35 ± 32.45^{a}	533.23 ± 112.90^{a}
2-methylbutyl 3-methylbutanoate	5.02 ± 0.28^{a}	1.46 ± 1.11^{a}	2.05 ± 3.56^{a}	0.43 ± 0.30^{a}	23.69 ± 18.13^{a,b}	n.d^{a}	n.d^{a}	3.99 ± 6.91^{a}	6.99 ± 3.48^{a}	54.95 ± 30.95^{b}
2-methylbutyl acetate	3.97 ± 0.77^{a}	1.75 ± 1.07^{a}	3.34 ± 2.73^{a}	0.38 ± 0.25^{a}	7.19 ± 5.49^{a}	6.55 ± 2.95^{a}	n.d^{a}	2.33 ± 0.88^{a}	n.d^{a}	42.13 ± 34.01^{b}
2-methylbutyl butanoate	n.d^{a}	n.d^{a}	n.d^{a}	n.d^{a}	0.31 ± 0.09^{a}	n.d^{a}	n.d^{a}	n.d^{a}	n.d^{a}	0.92 ± 0.45^{b}
2-methylbutyl propanoate	1.01 ± 0.91^{a}	0.12 ± 0.19^{a}	0.23 ± 0.41^{a}	0.07 ± 0.13^{a}	0.40 ± 0.48^{a}	n.d^{a}	0.11 ± 0.19^{a}	n.d^{a}	4.90 ± 2.78^{a,b}	6.25 ± 3.53^{b}
2-methylpropyl 2-methylbutanoate	20.17 ± 3.99^{a}	5.27 ± 4.89^{a}	16.75 ± 2.71^{a}	4.36 ± 1.32^{a}	10.56± 8.44^{a}	3.58 ± 2.79^{a}	48.82 ± 69.54^{a,b}	32.70 ± 21.52^{a}	37.07 ± 19.61^{a}	140.48 ± 57.53^{c}
2-methylpropyl 3-methylbutanoate	2.30 ± 2.62^{a}	0,99 ± 3,40^{a}	2.23 ± 1.37^{a}	0.22 ± 0.30^{a}	0.98 ± 1.70^{a}	0.08 ± 0.14^{a}	5.19 ± 8.49^{a}	2.59 ± 1.79^{a}	1.16 ± 1.71^{a}	17.07 ± 15.71^{a}
2-methylpropyl acetate	1.57 ± 0.60^{a}	0.69 ± 0.97^{a}	0.32 ± 0.08^{a}	0.38 ±0.41^{a}	4.11 ± 2.22^{a,b}	0.67 ± 0.31^{a}	0.18 ± 0.07^{a}	0.55 ± 0.73 ^{a}	0.68 ± 0.29^{a}	11.88 ± 5.50^{c}
2-methylpropyl butanoate	0.10 ± 0.06^{a}	n.d^{a}	n.d^{a}	n.d^{a}	n.d^{a}	0.12 ± 0.00^{a}	n.d^{a}	0.07 ± 0.00^{a}	n.d^{a}	n.d^{a}
2-methylpropyl propanoate	1.05 ± 0.65^{a,b,c}	0.56 ± 0.39^{a,b,c}	0.42 ± 0.10^{a,b}	0.31 ± 0.22^{a}	0.31 ± 0.03^{a}	n.d^{a}	n.d^{a}	7.07 ± 2.54^{d}	n.d^{a}	4.88 ± 2.55^{c,d}
2-phenylethanol	0.09 ± 0.16^{a,b}	n.d^{a}	n.d^{a}	n.d^{a}	0.07 ± 0.12^{a,b}	n.d^{a}	0.08 ± 0.13^{a,b}	n.d^{a}	n.d^{a}	n.d^{a}
2-phenylethyl acetate	0.15 ± 0.09^{a}	0.02 ± 0.04^{a}	0.61 ± 0.85^{a}	0.04 ± 0.04^{a}	0.60 ± 0.19^{a}	0.10 ± 0.17^{a}	0.74 ± 1.09^{a}	0.11 ± 0.18^{a}	0.10 ± 0.17^{a}	0.62 ± 0.75^{a}
3-methylbutyl 2-methylbutanoate	6.00 ± 3.63^{a}	3.77 ± 2.23^{a}	28.10 ± 25.13^{a}	4.13 ± 3.97^{a}	2.34 ± 1.96^{a}	5.29 ± 5.26^{a}	17.88 ± 3.56^{a}	7.41 ± 9.42^{a}	37.19 ± 40.28^{a,b}	67.38 ± 34.70^{a,b}
3-methylbutyl 2-methylpropanotae	2.36 ± 1.23^{a}	0.84 ± 0.70^{a}	1.14 ± 1.48^{a}	0.33 ± 0.24^{a}	2.41 ± 0.35^{a}	0.19 ± 0.02^{a}	1.01 ± 0.90^{a}	2.04 ± 1.94^{a}	2.96 ± 1.38^{a}	12.53 ± 9.31^{b}
3-methylbutyl acetate	1.20 ± 0.97^{a}	0.49 ± 0.49^{a}	0.67 ± 0.98^{a}	1.21 ± 1.90^{a}	1.96 ± 2.17^{a}	0.24 ± 0.41^{a}	1.41 ± 0.41^{a}	0.72 ± 0.79^{a}	5.34 ± 2.24^{a,b}	17.39 ± 2.51^{b}
3-methylbutyl propanoate	0.37 ± 0.44^{a}	0.01 ± 0.02^{a}	0.05 ± 0.05^{a}	0.02 ± 0.03^{a}	0.05 ± 0.04^{a}	n.d^{a}	0.05 ± 0.04^{a}	0.26 ± 0.24	0.76 ± 0.90^{a}	n.d^{a}
ethyl 2-methylbutanoate	28.84 ± 10.64^{a}	15.60 ± 6.41^{a}	32.60 ± 5.66^{a}	9.22 ± 3.51^{a}	40.90 ± 5.67^{a}	52.27 ± 10.50^{a}	17.67 ± 6.99^{a}	42.84 ± 19.93^{a}	66.86 ± 31.38^{a}	171.72 ± 21.69^{b}
ethyl 2-methylpropanoate	2.24 ± 0.64^{a}	0.43 ± 0.27^{a}	0,39 ± 1,06^{a}	0.42 ± 0.44^{a}	0.94 ± 0.77^{a}	0.55 ± 0.40^{a}	1.45 ± 0.93^{a}	1.02 ± 0.87^{a}	1.71 ± 0.85^{a}	17.62 ± 3.27^{b}
ethyl 3-methylbutanoate	9.52 ± 0.69^{a}	4.26 ± 1.87^{a}	5.08 ± 0.07^{a}	1.49 ± 0.87^{a}	3.90 ± 3.84^{a}	1.24 ± 0.13^{a}	3.27 ± 2.97^{a}	6.34 ± 4.14^{a}	11.54 ± 6.36^{a}	56.71 ± 25.84^{b}
ethyl 3-methylpentanoate	0.06 ± 0.01^{a}	0.03 ± 0.03^{a}	0.03 ± 0.05^{a}	0.01 ± 0.02^{a}	0.28 ± 0.05^{b}	n.d^{a}	0.04 ± 0.05^{a}	0.09 ± 0.16^{a}	n.d^{a}	n.d^{a}
phenethyl 2-methylbutanoate	1.68 ± 2.02	0.13 ± 0.05	1.04 ± 1.30	0.08 ± 0.06	0.74 ± 0.48	0.15 ± 0.03	0.26 ± 0.16	0.37 ± 0.52	0.66 ± 0.33	2.37 ± 2.36
propyl 2-methylbutanoate	0.19 ± 0.13^{a}	n.d^{a}	0.36 ± 0.19^{a}	n.d^{a}	0.25 ± 0.03^{a}	0.23 ± 0.00^{a}	0.17 ± 0.05^{a}	0.71 ± 0.19^{a}	0.61 ± 1.05^{a}	3.79 ± 3.09^{a,b}

Supplementary data C. Main volatile organic compounds (mg.L^{-1}) produced by wild type and 9 ILV^{-} mutants strains of *S. suaveolens* after 48h of growth at 30°C on YNB-Glu-Ile agar medium. Main VOCs were classified according to their hypothetical metabolic pathway of production (2/2)

Compound	W.T	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10
β-OXIDATION PATHWAY										
butyl 2-methylbut-2*E*-enoate	28.53 ± 2.18^{a}	n.d^{b}	1.68 ± 1.38^{b}	0.45 ± 0.75^{b}	7.66 ± 8.46^{a,b}	0.07 ± 0.07^{b}	3.32 ± 4.78^{b}	7.90 ± 8.99^{a,b}	4.89 ± 3.08^{a}	90.62 ± 10.50^{c}
ethyl 2-methylbut-2*E*-enoate	48.43 ± 2.96^{a,b}	n.d^{a}	35.88 ± 6.98^{a,b}	8.26 ± 10.17^{a}	5.15 ± 1.99^{a}	1.53 ± 1.43^{a}	3.48 ± 1.68^{a}	34.06 ± 20.37^{a,b}	32.03 ± 38.45^{a,b}	115.91 ± 30.70^{a,b}
ethyl but-2*E*-enoate	0.14 ± 0.13^{a}	1.28 ± 1.40^{a}	1.67 ± 1.90^{a}	0.48 ± 0.72^{a}	n.d	36.63 ± 0.71^{a,b}	0.07 ± 0.06^{a}	n.d	n.d	155.78 ± 136.15^{b}
ethyl octanoate	16.94 ± 12.64^{a}	3.05 ± 4.19^{a}	8.96 ± 9.45^{a}	n.d^{a}	9.13 ± 9.84^{a}	n.d^{a}	3.92 ± 6.47^{a}	5.65 ± 9.67^{a}	11.40 ± 19.75^{a}	54.53 ± 94.45^{a}
octyl acetate	8.60 ± 8.88^{a}	1.08 ± 0.51^{a}	2.89 ± 2.44^{a}	0.45 ± 0.50^{a}	11.32 ± 6.47^{a}	5.72 ± 5.43^{a}	1.96 ± 1.62^{a}	4.23 ± 4.66^{a}	7.39 ± 2.40^{a}	13.91 ± 10.65^{a}
octyl butanoate	9.92 ± 9.47^{a,b}	2.25 ± 1.96^{a}	9.36 ± 12.10^{a,b}	1.18 ± 1.65^{a}	15.67 ± 10.86^{a,b}	2.50 ± 0.41^{a}	6.21 ± 1.95^{a}	6.19 ± 5.41^{a}	31.02 ± 15.40^{b}	5.37 ± 2.31^{a}
octyl propanoate	0.13 ± 0.13^{a}	n.d^{a}	n.d^{a}	0.01 ± 0.01^{a}	n.d^{a}	n.d^{a}	0.02 ± 0.04^{a}	n.d^{a}	0.19 ± 0.32^{a}	0.71 ± 0.76^{a}
propyl 2-methylbut-2*E*-enoate	0.09 ± 0.04^{a}	n.d^{a}	0.09 ± 0.08^{a}	n.d^{a}	n.d^{a}	n.d^{a}	0.07 ± 0.11^{a}	n.d^{a}	n.d^{a}	1.40 ± 1.24^{b}
EHRLICH AND β-OXIDATION PATHWAYS										
2-methylbutyl 2-methylbut-2*Z*-enoate	n.d^{a}	n.d^{a}	0.24 ± 0.20^{a,b}	0.05 ± 0.06^{a,b}	0.15 ± 0.04^{a,b}	n.d^{a}	0.11 ± 0.19^{a,b}	0.25 ± 0.43^{a,b}	n.d^{a}	n.d^{a}
2-methylpropyl 2-methylbut-2*E*-enoate	n.d^{a}	3.00 ± 4.92^{a}	15.91 ± 2.90^{a,b}	1.86 ± 2.44^{a}	0.32 ± 0.55^{a}	0.07 ± 0.06^{a}	9.43 ± 4.81^{a,b}	4.14 ± 5.10^{a}	8.75 ± 5.40^{a,b}	37.40 ± 20.00^{c}
2-methylpropyl 2-methylbut-2*Z*-enoate	1.06 ± 0.64^{a}	n.d^{a}	0.23 ± 0.23^{a}	0.07 ± 0.06^{a}	0.30 ± 0.10^{a,b}	n.d^{a}	0.12 ± 0.12^{a}	0.11 ± 0.01^{a}	n.d^{a}	1.07 ± 0.75^{a,b}
3-methylbutyl 2-methylbut-2*E*-enoate	0.24 ± 0.21^{a}	n.d^{b}	n.d^{b}	n.d^{b}	0.09 ± 0.16^{a,b}	n.d^{a}	n.d^{a}	n.d^{a}	n.d^{a}	n.d^{a}
3-methylbutyl 2-methylbut-2*Z*-enoate	0.39 ± 0.51^{a}	n.d^{a}	0.10 ± 0.07^{a}	n.d^{a}	0.04 ± 0.04^{a}	n.d^{a}	0.02 ± 0.04^{a}	n.d^{a}	0.12 ± 0.21^{a}	0.63 ± 1.09^{a}
octyl 2-methylpropanoate	0.72 ± 0.69^{a,b}	0.12 ± 0.09^{a,b}	0.51 ± 0.58^{a,b}	0.06 ± 0.09^{a}	0.69 ± 0.31^{a,b}	0.17 ± 0.03^{a,b}	0.34 ± 0.16^{a,b}	0.52 ± 0.61^{a,b}	1.57 ± 0.64^{a,b}	1.15 ± 0.97^{a,b}
OTHER										
ethyl butanoate	0.37 ± 0.08^{a}	0.18 ± 0.11^{a}	44.91 ± 12.10^{b}	0.11 ± 0.12^{a}	0.59 ± 0.40^{a}	0.28 ± 0.18^{a}	0.74 ± 0.74^{a}	2.17 ± 3.17^{a}	0.38 ± 0.00^{a}	4.24 ± 2.80^{a}
TOTAL VOCs (mg/L)	230.91 ± 14.44^{a}	66.14 ± 13.47^{a}	249.99 ± 38.73^{a}	42.11 ± 15.72^{a}	277.83 ± 40.34^{a}	125.94 ± 17.73^{a}	142.6 ± 104.3^{a}	204.54 ± 125.30^{a}	424.12 ± 171.34^{a}	1862.70 ± 247.21^{b}
Number of total VOCs	34	25	32	29	33	24	31	29	26	31

^{a,,b,c} Enzymes belonging to the significant different group a, b, and c

VI. References

Bhari R., and Singh R.S. 2019. "Microbial production of natural flavours." In *Technology of Handling, Packaging, Processing, Preservation of Fruits and Vegetables : Theory and Practicals*, New India Publishing Agency, 767–813. New Dehli, India.

Bogacz-Radomska L., Pietkiewicz J.J., and Górska K. 2008. "Aroma production and application in food products."

Buzzini P., Gasparetti C., Turchetti B., Cramarossa M.R., Vaughan-Martini A., Martini A., Pagnoni U.M., and Forti L. 2005. "Production of volatile organic compounds (VOCs) by yeasts isolated from the ascocarps of Black (*Tuber melanosporum* vitt.) and White (*Tuber magnatum* pico) truffles." *Archives of Microbiology* 184 (3): 187–193.

Buzzini P., Martini A., Cappelli F., Pagnoni U.M., and Davoli P. 2003. "A study on volatile organic compounds (VOCs) produced by tropical ascomycetous yeasts." *Antonie van Leeuwenhoek* 84 (4): 301–311.

Dickinson J. R., L., Salgado L.E.J., and 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.

Dijken JP, Bauer, Brambilla, Duboc, Francois, Gancedo, Giuseppin. 2000. "An interlaboratory comparison of physiological and genetic properties of four *Saccharomyces cerevisiae* strains." *Enzyme and Microbial Technology* 26 (9–10): 706–714.

De Oliveira F.L., Paulino B.N., Sales A., Molina G., and Bicas J.L. 2019. "Production of food aroma compounds (microbial and enzymatic methodologies)." In *Food Aroma Evolution*, by Matteo Bordiga and Leo M.L. Nollet, edited by Matteo Bordiga and Leo M.L. Nollet, 1st ed., 293–306. 1st edition. | Boca Raton : CRC Press, 2019. | Series: Food analysis & properties, 2475-7551: CRC Press.

Grondin E., Shum Cheong Sing A., Caro Y., Raherimandimby M., Randrianierenana A.L., James S., Nueno-Palop C., François J.M., and Petit T. 2015a. "A comparative study on the potential of epiphytic yeasts isolated from tropical fruits to produce flavoring compounds." *International Journal of Food Microbiology* 203: 101–108.

Grondin E., Shum Cheong Sing A., Caro Y., Billerbeck G.M., François J.M., and Petit T.. 2015b. "Physiological and biochemical characteristics of the ethyl tiglate production pathway in the yeast *Saprochaete suaveolens*." *Yeast* 32 (1): 57–66.

Grondin E., Shum Cheong Sing A., James S., Nueno-Palop C., François J.M., and Petit T. 2017. "Flavour production by *Saprochaete* and *Geotrichum* yeasts and their close relatives." *Food Chemistry* 237: 677–684.

Hazelwood L. A., Daran J.-M, van Maris A. J. A., Pronk J. T., and Dickinson J. R. 2008. "The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: A century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism." *Applied and Environmental Microbiology* 74 (12): 3920–3920.

Huang Y.-S., and Chuang D.T. 2000. "Regulation of branched-chain α-keto acid dehydrogenase kinase gene expression by glucocorticoids in hepatoma cells and rat liver." *Methods in Enzymology* 324: 498–511.

Lichancová H., Hodorová V., Sienkiewicz K., Penir S.M.U., Afanasyev P., Boceck D., Bonnin S. 2019. "Genome sequence of flavor-producing Yyeast *Saprochaete suaveolens* NRRL Y-17571." Edited by Christina Cuomo. *Microbiology Resource Announcements* 8 (9).

Liu Q., Liu Y., Chen Y., and Nielsen J. 2020. "Current state of aromatics production using yeast: achievements and challenges." *Current Opinion in Biotechnology* 65: 65–74.

Maggio-Hall L.A., and Keller N.P. 2004. "Mitochondrial β-oxidation in *Aspergillus nidulans*: mitochondrial β-oxidation in *A. nidulans*." *Molecular Microbiology* 54 (5): 1173–1185.

Mdaini N., Gargouri M., Hammami M., Monser L., and Hamdi M. 2006. "Production of natural fruity

aroma by *Geotrichum candidum*." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 128 (3): 227–235.

Park S.J., and Lee Y. 2003. "Identification and characterization of a new Enoyl Coenzyme A Hydratase involved in biosynthesis of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates in recombinant *Escherichia coli*." *Journal of Bacteriology* 185 (18): 5391–5397.

Patston P.A., Espinal J., Beggs M., and Randle P.J. 1988. "Assay of total complex and activity state of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex and of aActivator protein in mitochondria, cells, and tissues." In *Methods in Enzymoloy, Branched-Chain Amino Acids*, 166:175–189.

Pessôa M.G., Vespermann K.A.C., Paulino B.N., Barcelos M.C.S., Pastore G.M., and Molina G.. 2019. "Newly isolated microorganisms with potential Application in Biotechnology." *Biotechnology Advances* 37 (2): 319–339.

Roy P., and Kumar V.. 2019. "Production of bioflavour from microbial sources and its health benefits." *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics* 56: 352–357.

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*." *Microbial Biotechnology* 3 (2): 165–177.

Sales A., Paulino B.N., Pastore C.M., and Bicas J.L. 2018. "Biogeneration of aroma compounds." *Current Opinion in Food Science* 19: 77–84.

Suomalainen H., and Lehtonen M. 1979. "The production of aroma compounds by yeast." *Journal of the Institute of Brewing* 85 (3): 149–156.

Winston F., 2008. "EMS and UV mutagenesis in yeast." In *Current Protocols in Molecular Biology*, edited by Frederick M. Ausubel, Roger Brent, Robert E. Kingston, David D. Moore, J.G. Seidman, John A. Smith, and Kevin Struhl. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.

CHAPITRE IV

Ces travaux de thèse avaient pour but de valoriser la production d'arômes de la levure Saprochaete suaveolens par diverses approches. Le chapitre II de ce manuscrit a présenté une première approche visant à utiliser le métabolisme de la souche de S. suaveolens comme modèle pour la recherche de nouvelles levures productrices d'esters α-insaturés. Le chapitre III avait pour objet de présenter une seconde approche visant cette fois à utiliser la mutagénèse aléatoire pour optimiser la production d'arômes de la levure S. suaveolens. Ce chapitre a notamment permis de mettre en évidence l'importance de certaines enzymes du métabolisme aromatique chez cette levure. Les chapitres II et III ont ainsi permis de confirmer et d'améliorer la forte capacité de production d'arômes chez la levure S. suaveolens, tout en apportant de nouvelles données fondamentales pour la compréhension de son métabolisme aromatique.

L'un des objectifs que nous nous étions fixés était également d'évaluer la capacité réelle de la levure S. suaveolens à produire des arômes dans le cadre d'une application biotechnologique industrielle et à valoriser ses capacités d'aromatisation d'une matrice alimentaire au cours de la fermentation. De telles voies de valorisation ont déjà été réalisées pour des levures non-Saccharomyces, notamment pour la production de boissons naturellement aromatisées par voie fermentaire. Sur la base de ces études, nous avons entrepris d'évaluer la capacité de notre levure S. suaveolens isolée au laboratoire à produire des arômes en condition de fermentation industrielle. Le chapitre IV de ce manuscrit de thèse présente les travaux que nous avons menés en partenariat avec une brasserie industrielle pour étudier l'activité aromatique sur la bière de la levure S. saprochaete seule ou en condition de fermentation mixte en présence de la levure S. cerevisiae.

Evaluation de l'utilisation d'une fermentation mixte de *Saccharomyces cerevisiae* et de *Saprochaete suaveolens* sur un moût industriel pour produire une bière naturellement fruitée

Melissa TAN[1,2], Yanis CARO[1,2], Alain SHUM-CHEONG-SING[2], Laurent ROBERT[3], Jean-Marie FRANCOIS[4] and Thomas PETIT [1,2]*

[1] Université de la Réunion, Laboratoire de Chimie et Biotechnologies des Produits Naturels (ChemBioPro), Réunion, France

[2] IUT de la Réunion, Département Hygiène, Sécurité et Environnement (HSE), Réunion, France

[3] Société Réunionnaise de brasserie (SOREBRA), Saint-Louis, Réunion, France

[4] INSA de Toulouse, Toulouse Biotechnology Institute (TBI), Toulouse, France

Résumé :

Les bières fruitées peuvent être obtenues par la production de composés d'arômes directement pendant la fermentation en remplaçant partiellement la levure de brasserie par une levure non-*Saccharromyces* à haute capacité à produire des composés d'arômes. Dans cette étude, nous avons évalué l'efficacité de l'utilisation d'une souche sauvage de *Saprochaete suaveolens* connue pour sa production de composés d'arômes atypiques, à produire une nouvelle bière naturellement fruitée, tout en gardant les conditions classiques de production utilisées dans une brasserie industrielle. *S.suaveolens* a ainsi été inoculée seule ou avec *S. cerevisiae* comme starter de culture pendant la fermentation de bière et les performances de fermentation ont été évaluées à travers les mesures de plusieurs paramètres physico-chimiques. Les profils aromatiques des bières réalisées ont été investigués par HS-SPME-CG/SM. Les résultats ont montré que des bières à haute teneur en arômes fruitées et à basse teneur en éthanol étaient obtenues lors d'une fermentation simple avec *S. suaveolens*. Nous avons également démontré que pendant les fermentations mixtes, *S. suaveolens* maintenait une haute activité métabolique et permettait la production de bière enrichie en arômes fruités. Enfin, nous avons montré que la production de bière fruitée à teneur en éthanol haute ou basse pouvait être obtenue en faisant varier la composition du starter de culture.

Mots-clés : Arôme naturel ; *Saprochaete suaveolens* ; levure non-*Saccharomyces* ; bière ; co-fermentation

Evaluation of mixed-fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* with *Saprochaete suaveolens* to produce natural fruity beer from industrial wort.

Melissa TAN [1,2], Yanis CARO[1,2] , Alain SHUM-CHEONG-SING[2], Laurent ROBERT[3], Jean-Marie FRANCOIS[4] and Thomas PETIT [1,2]*

[1] Université de la Réunion, Laboratoire de Chimie et Biotechnologies des Produits Naturels (ChemBioPro), Réunion, France

[2] IUT de la Réunion, Département Hygiène, Sécurité et Environnement (HSE), Réunion, France

[3] Société Réunionnaise de brasserie (SOREBRA), Saint-Louis, Réunion, France

[4] INSA de Toulouse, Toulouse Biotechnology Institute (TBI), Toulouse, France

Abstract:

Fruity beers can be promoted through production of flavoring compounds during fermentation by partial replacement of brewing yeast by non-conventional yeasts with high aroma production abilities. We evaluated here the use of a wild *Saprochaete suaveolens* strain, producing atypical aroma compounds, to produce new natural fruity beer, while keeping classical production conditions used in brewing industry. *S. suaveolens* was inoculated as starter of culture during beer fermentation and the fermentation performance was evaluated through measurement of several physicochemical parameters. The aroma profile of the engineered beers was monitored using HS-SPME GC/MS. The results showed that high fruity aroma and low-ethanol content beers were obtained through single-fermentation using *S. suaveolens*. We also demonstrated that during mixed-fermentation, *S. suaveolens* maintained high metabolic activity and allowed production of beer enriched with fruity aroma. Production of high or low ethanol content fruity beer could be achieved by varying the composition of the starter of culture.

Keywords : Natural aroma; *Saprochaete suaveolens*; non-conventional yeast; beer; co-fermentation

Highlights:

- The non-conventional yeast *Saprochaete suaveolens* has been tested in simple fermentation and mixed-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* for natural aromatization of beers.
- During mixed-fermentation, *S. cerevisiae* dominated the fermentation but *S. suaveolens* kept its aroma metabolism active.
- 7 days fermentation led to beers significantly enriched in fruity aroma, enrichment growing with the part of *S. suaveolens* in the starter of culture.
- Starter of culture composed of 30% cell/cell of *S. suaveolens* and 70% cell/cell of *S. cerevisiae* beer with ethanol content comparable to standard beer whereas starter of culture composed of 90% cell/cell of *S. suaveolens* and 10% cell/cell of *S. cerevisiae* led to low-alcohol beer.

I. Introduction

The market of *fruity beers* has increased over the last decade with a compound annual growth rate (CAGR) of over 4 % from 2019 to 2023 (TechNavio, 2019). For a long time, the traditional manner to produce these fruity beers was to directly add fruity flavour additives during brewing process carried out as single-fermentations by yeasts belonging to the *Saccharomyces* gender (mostly *S. cerevisiae, S. eubayanus, S. pastorianus or S. kudriavzevii*). This process which can reach high ethanol content beers (6-7% v/v) also generated a wide spectrum of more than 800 different volatile organic compounds (VOCs) in the form of esters, higher alcohols, organic acids, sulfur compounds, carbonyls or short-chain fatty acids (Bokulich and Bamforth, 2013; Olaniran *et al.,* 2017; Willaert and Nedovic, 2006; Stevens, 1960; Lodolo *et al.,* 2008). Despite this high amount of VOCs, standard beers mostly display poor *aromatic bouquet* as only a few part of them are flavor-active (Capece *et al.,* 2018; Kao, 2018; Gallone *et al.,* 2018; Gibson *et al.,* 2017; Gallone *et al.,* 2016; Libkind *et al.,* 2011; Petruzzi *et al.,* 2016; Stewart, 2016; Lodolo *et al.,* 2008; Olaniran *et al.,* 2017). Therefore, enhancing yeast VOCs with higher fruity character is of prime importance to satisfy this global trend of consumers for new and natural beverage.

A first manner to achieve this goal is through some genetic modifications of *Saccharomyces spp*. (Bellut and Arendt, 2019). For instance, Zhang *et al.,* (C.-Y. Zhang *et al.,* 2013) engineered a brewer's *S. cerevisiae* strain by overexpressing *ATF1* gene (encoding for alcohol acyltransferase) and deleting *BAT2* gene (encoding for cytosolic branched-chain amino acid aminotransferase), which led to an increase of two of the major flavouring esters in beer, namely ethyl acetate (solvent-like aroma) and 3-methylbutyl acetate (banana- flavour). Also Mertens *et al*., (Mertens *et al.,* 2015) showed that created hybrids of *S. cerevisiae* and *S. eubayanus* strain enriched the aroma profile of standard lager beer. However because of public's scepticism regarding to genetically modified organisms (GMO), such engineered

yeasts have not or will never been used for commercial brewing (Gibson *et al.,* 2017; Saerens *et al.,* 2010). Hence, a potential alternative to overcome this barrier is to carry out single-fermentation using non-conventional yeasts (NCY) specifically selected for such performance and harboring original fruity characters. The *Brettanomyces* genus (e.g., *B. anomalus* or *B. bruxellensis*) have been the most popular NCY involved in beer fermentation especially for the production of some lambic-style beers in which they bring smoky, barnyard, spicy and fruity flavours (Bokulich and Bamforth, 2013; Gibson *et al.,* 2017; Basso *et al.,* 2016; Daenen *et al.,* 2008; Serra Colomer *et al.,* 2019). More recently other yeast species such as *Lachancea thermotolerans*, *Pichia kluyveri*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Scheffersomyces shehatae*, *Torulaspora delbrueckii*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Williopsis saturnus*, *Lachancea thermotolerans* and *Zygosshacaromycodes rouxii* have been investigated in single-fermentation (Bellut and Arendt, 2019; Michel *et al.,* 2016; Petruzzi *et al.,* 2016; Steensels and Verstrepen, 2014; Varela, 2016). These attempts mainly resulted in nonalcoholic (0.00-0.50% alcohol by volume (ABV)) or low alcohol beer (0.60-3.50% ABV) as NCY generally show low abilities for ethanol production as compared to conventional *Saccharomyces* species.

A third method to generate fruity beer is to carry out mixed-fermentation by combining a *Saccharomyces cerevisiae* strain with another yeast (NCY) that can provide flavours notes during the brewing process, while enhancing ethanol production compared to mono-culture of NCY. For instance, van Rijswick *et al*. (van Rijswijck *et al.,* 2017) showed that co-cultures of *S. cerevisiae* with *Cyberlindnera fabanii* or *Pichia kudriavzevii* led to a reduced ethanol titer (3.80 % and 3.55 % ABV respectively) and a higher content of esters (0.43 and 0.60 relative abundance of total VOCs) compared to mono-culture of *S. cerevisiae* (4.19 % ABV, 0.19 relative abundance of total VOCs) but increased ethanol titer compared to mono-culture of *C. fabanii* or *P. kudriavzevii* (0.49 % and 0.53 % ABV respectively). Likewise, assays with *T. delbrueckii* showed that co-cultures with *S. cerevisiae* cause an increase of 86

% in ethanol content as compared to mono-culture of *T. delbrueckii,* and a raise of 44.6 % of the main VOCs as compared to mono-culture of *S. cerevisiae* (Canonico *et al.,* 2017). While this mixed-fermentation is seen as a promising alternative to produce *fruity beers*, most brewing industries are reluctant to use them in industrial processes as their implementation would require important changes in the process conditions (Gibson *et al.*, 2017).

Taking into account these considerations, we report that the introduction of the NCY *Saprochaete suaveolens* (former *Geotrichum fragrans*) in combination with *S. cerevisiae* provided natural fruity beer from industrial wort that did not require any major modification in the brewing process. The rational to investigate such mixed-fermentation came from previous works from our group and others showing that this NCY exhibits remarkable metabolic capacity to produce numerous esters associated with tropical fruit flavors such as ethyl propanoate (banana flavor), 3-methylbutyl butanoate (pineapple flavor) or ethyl 2-methylbutanoae (apple flavor) (Grondin *et al.,* 2015a;, 2015b; 2017; İşcan *et al.,* 2015; de Oliveira *et al.,* 2013; Zhu *et al.,* 2016). To get as close as possible to industrial conditions, we managed our fermentation assays in industrial wort during 14 days. We then investigated the fermentation performances and evaluated the influence of ratio of *S. suaveolens* versus *S. cerevisiae* (30 % and 90 % cell/cell of *S. suaveolens* completed to 100 % with *S. cerevisiae)* in the process leading to best condition for beers aroma production.

II. Materials and Methods

1. Yeast strains and preparation of the starter

Wild type *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK 112-2N (van Dijken *et al.,* 2000) and the wild strain of *Saprochaete suaveolens* previously isolated in our laboratory on Pitaya fruit (*Hylecereus polyrhisus*) from Reunion Island, France (Grondin *et al.,* 2015a) were used in this study. To prepare pure starter of culture, both *S. cerevisiae*

and *S. suaveolens* strains were pre-grown in malt-peptone-yeast extract-glucose pH 5.0 (MPYG; 2% dextrose, 0.25% bacteriological peptone, 0.25% malt extract and 0.25% yeast extract (w/v)). Then 100 µL of this culture were used to inoculate 50 mL of sterile MPYG-broth (250 mL shake flask). Cultures were carried out at 30°C, while adding 50 mL of sterile MPYG-broth every 24h for 3 days. The mixed starters of culture were prepared by mixing a given volume of both pure starters set at an initial cell concentration of 1.10^7 cells.mL^{-1} with a cell ratio of 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 90 or 100% of *S. suaveolens* completed to 100% with *S. cerevisiae*.

2. Beer fermentation set-up

Artisanal wort was prepared using the following preparation process: 5 kg of malt were crushed and supplemented with 15 L of water before heating (15 min at 45-50°C, 60 min at 60-65°C, 10 min at 78-80°C). Brew was then filtered and residues were rinsed with 1 L of water and added to the initial brew before cooking (30 min boiling). 3 pellets of hop were then added before sterilization (30 min ebullition) and filtration. The wort was then recovered in a 5 L sterile bottle and cooled at 12°C before use. The wort was characterized by pH 5.50 and a specific gravity of 13°Plato. Industrial wort, characterized by pH 5.00 and specific gravity of 13° Plato, was aseptically collected from local brewing industry (SOREBRA, Saint-Louis, Reunion).

Pitching was performed by inoculating wort with 1% of starter (v/v) to reach a concentration of 1.10^5 cells.mL^{-1} (corresponding to 5 Log CFU.mL^{-1}). For lab scale fermentation, artisanal wort was used. Assays were carried out in 500 mL Erlenmeyer flasks containing 250 mL of wort by addition of 2.5 mL of desired starter of culture and incubation at 20-25°C during 6 days. For large scale trials, industrial wort was used. Then, fermentations were performed during 14 days in 6 L sterile flasks containing 5 L of wort and 50 mL of desired starter of culture.

3. Total Cell enumeration and determination of ratio between the two yeast species along the brewing process.

The total living yeast population was determined during fermentation by spreading 100 µL of beer-sample (including serial dilutions with peptone water) on YPD-agar media (1 % yeast extract, 2 % peptone, 2 % dextrose w/v) and incubation during 48 h at 30°C. Considering the ability of *S. suaveolens* to use branched-chain amino acid as sole carbon source (Grondin *al.,* 2015b), *S. suaveolens* cell enumeration was done by spreading 100 µL of beer-sample (including serial dilution with peptone water) on YNB-Ile agar media containing 0.67 % yeast nitrogen base without amino acids and 0.1 % isoleucine w/v and incubation during 48 h at 30°C. The *S. cerevisiae* cell count was thus estimated by subtracting *S. suaveolens* population to the total yeast population.

4. Physicochemical parameters and non-volatile compounds

Total soluble solids (°Brix) and pH were measured using a refractometer (Euromex) and a portable pH-meter (Checker by HANNA, HANNA Instruments) respectively. For ethanol, sugars and organic acids analysis, samples were firstly centrifuged and filtered through 0.45 µm membranes (Sartorius Sedi, Minisart) prior to analysis using high performance liquid chromatography (HPLC) (Ultimate® 3000, Dionex, Thermo Scientific). Isocratic elution using 1.25 mM H_2SO_4 mobile phase at 40 °C, with a 0.5 $mL.min^{-1}$ flow rate was performed through an ion exclusion column (300 * 7.8 mm, Biorad-Aminex HPX-87H 125-0.140). Ethanol and sugars were detected with a refractive index detector (Shimadzu, RID-20A) while organic acids were measured using a diode array detector (Ultimate 3000, Dionex, Thermo Scientific) at 210 nm. Ethanol content was confirmed by conversion of the difference of specific densities between beers and initial wort measured with a densimeter (Brewferm). Sucrose and maltose co-eluted with this method. Thus, for sucrose, samples were enzymatically hydrolyzed using 48 $Units.L^{-1}$ of invertase

(SIGMA) during 30 min at 30°C prior to HPLC analysis. Then, glucose content of the hydrolyzed fractions was compared to non-hydrolyzed ones to determine sucrose concentration and maltose content was then deducted by calculating the difference.

5. Volatile compounds analysis

5 mL of each sample were introduced in a 15 mL sealed vial before addition of 10 µL of octan-1-ol (1g.L^{-1} in absolute ethanol) as internal standard prior to analysis. Then solid phase micro extraction (SPME) of the volatiles was performed using a 2 cm long fiber coated with 50/30 µm Divinylbenzene/Carboxen on polydimethylsiloxane (DVB/Car/PDMS) bonded to a flexible fused silica core (Supelco). The fiber was exposed to headspace for 10 min at 30°C and inserted into the injection port at 270°C for 2 min. Metabolites were separated by gas chromatography (GC), on a SPB5 columns (60m * 0.32mm * 0.25µm film thickness), coupled to a mass spectrometer (5973 Network mass selective detector, Agilent technologies). The carrier gas (He) was set at a flow rate of 1.4 mL.min^{-1}. The column temperature was maintained at 45°C for 2 min, raised to 230°C at 4°C/min and finally kept at this temperature for 12 min. Volatile organic compounds (VOCs) were identified by comparing their mass spectra and their Kovats index (DB-5 columns) with the NIST database (www.chemdata.nist.gov).

6. Stastistical analysis

Means and standard deviations (SD) were determined based on triplicate independent fermentations and were presented as mean ± SD. Experimental data were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) using XL Stat Applied Sensory at the 95% confidence level. Principal analysis component (PCA) was applied to discriminate among the means of the different volatile compounds and the ethanol content in the wort and the different beers after 7 and 14 days of

fermentation. PCA was also carried out using the XL Stat Applied Sensory software (2020.1.3) and the data are presented as a biplot graph.

III. Results

1. Determination of optimal starter of culture under laboratory process condition

1.1. Validation of the artisanal wort

For laboratory scale assays, we produced artisanal wort using our laboratory brewing process. To validate this artisanal, we measured its mains physicochemical parameters, *i.e.* pH, total soluble solids content (TSS) and ethanol content. Results of these assays showed that the artisanal wort presented similar characteristics with standard wort with respect to pH (comprise within 5.6 and 5.8), TSS content (comprised within 12 and 15°Brix) and of course ethanol (0 % ABV). Therefore, we concluded that our process to produce the laboratory wort was fully acceptable to manage our study at laboratory scale.

1.2. Optimal starter of culture determination

Previous studies found in the literature (Canonico *et al.,* 2017; van Rijswijck *et al.,* 2017) have shown that the ratio of the brewing yeast *Saccharomyces* to another yeast in the starter strongly influences the final composition of the beer. Therefore, we first determined which ratios led to a final beer product with characteristics as closed as possible to a standard beer (classically fermented with mono-culture of *S. cerevisiae*). We therefore produced fermented beers from artisanal wort with yeast starter of culture including 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 and 100% cell/cell of *S. suaveolens* completed to 100% with *S. cerevisiae* and measured key physicochemical parameters, namely pH, total soluble solids (TSS) and ethanol content. Results of this analysis are presented in Table 6.

Table 6 : Main characteristics of initial wort and beers obtained after 6 days of fermentation with different ratios of *S. suaveolens* and *S. cerevisiae*.

Trial	pH	TSS (°Brix)	Ethanol content (% ABV)
Wort[a]	5.57 ± 0.10	15.0 ± 0.4	Nd
0-GEC[b]	4.35 ± 0.12	8.0 ± 0.4	6.34 ± 0.33
10-GEC[b]	4.38 ± 0.12	8.0 ± 0.4	5.32 ± 0.33
20-GEC[b]	4.40 ± 0.12	8.0 ± 0.4	5.73 ± 0.33
30-GEC[b]	4.28 ± 0.12	8.4 ± 0.4	5.98 ± 0.33
40-GEC[b]	4.31 ± 0.12	7.6 ± 0.4	5.78 ± 0.39
50-GEC[b]	4.27 ± 0.12	7.2 ± 0.4	5.51 ± 0.39
60-GEC[b]	4.33 ± 0.12	7.6 ± 0.4	5.86 ± 0.38
70-GEC[b]	4.32 ± 0.12	7.8 ± 0.4	5.65 ± 0.38
80-GEC[b]	4.51 ± 0.10	6.7 ± 0.4	5.08 ± 0.33
90-GEC[b]	4.28 ± 0.12	7.8 ± 0.4	6.20 ± 0.39
100-GEC[c]	4.31 ± 0.12	11.8 ± 0.4	1.20 ± 0.38

[a,b,c] Beers belonging to the significant different group a, b and c, TSS: total soluble solids; Nd : Not detectable, ABV: Alcohol By Volume, 0-GEC, 10-GEC, 20-GEC, 30-GEC, 40-GEC, 50-GEC, 60-GEC, 70-GEC, 80-GEC, 90-GEC and 100-GEC corresponded to beers containing respectively 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 and 100% cell/cell of *S. suaveolens* c.s.p 100%. with *S. cerevisiae*.

After six days of fermentation, the wort inoculated with mono-culture of *S. cerevisiae* (0-GEC beer) showed high reduction of TSS content (46.7 %) which lead to the production of beers with satisfying characteristics (pH 4.35, TSS content 8.0°Brix and ethanol content 6.34 % ABV) comparable to average standard beers (4.00-5.00; 8-9 °Brix and 4.0-7.0 % ABV respectively). Contrariwise, the wort fermented with mono-culture of *S. suaveolens* (100-GEC beer) showed much lower reduction of TSS content (21.3 %) which lead to the production of low ethanol content beer (1.2 % ABV).

All the beers prepared using mixed-culture of *S. suaveolens* and *S. cerevisiae* led to beers with pH and TSS content comparable to those obtained for standard beer (0-GEC beer fermented with mono-culture of *S. cerevisiae*) but 30-GEC beer (fermented with 30 % cell/cell of *S. suaveolens* c.s.p *S. cerevisiae*) and 90-GEC beer (fermented with 90 % cell/cell of *S. suaveolens* c.s.p *S. cerevisiae*) showed the closest ethanol content with 0-GEC beer (5.98 % and 6.20 % ABV v.s 6.34 % ABV respectively) while displaying more fruity-like odour. Consequently, this small lab

scale study showed the possibility of aromatizing beers by fermenting wort with mixed-culture of *S. cerevisiae* and *S. suaveolens.*

2. Mixed-fermentation under industrial process conditions

Once we set up the optimal fermentation conditions from the artisanal wort under laboratory conditions, we wanted to perform a complete mixed fermentation under industrial process conditions using industrial wort (SOREBRA©) and in larger bioreactors. We therefore assessed this process with the starter conditions established previously (namely 30-GEC and 90-GEC beers) and compared it with beers generated from single fermentation with *S. cerevisiae* or *S. suaveolens* alone (0-GEC and 100-GEC beers respectively).

2.1. Monitoring cell population during mixed fermentation

Total yeast population and development of each yeast species was monitored during mixed-fermentation carried out with 30 and 90% of *S. suaveolens* at pitching with respect to *S. cerevisiae* (30-GEC and 90-GEC). As shown in Figure 24, a significant increase of the total yeast population occurred mainly during the first two days after pitching which reached a plateau at day 6 and remained constant until the 14th day of process (Figure 24a). The increase of cell population in both cases was actually due to *S. cerevisiae*, whose growth profile strictly matched that of the whole cell population starting. However, at higher initial *S. suaveolens* inoculum (90-GEC), the growth rate of cell population was slightly lower, although the *S. cerevisiae* species represented more than 95 % of the whole population. In contrast to *S. cerevisiae*, which showed a significant increase in cell population, *S. suaveolens* alone was not able to grow, and its specific cell population slowly declined along the process at an average rate of 0.06 LOG UFC.mL^{-1} in 30-GEC fermentation and 0.04 LOG UFC.mL^{-1} in 90-GEC fermentation. This phenomena is consistent with assays of mixed-fermentation with other NCY and could be

explained by cell competition and physiological combined factors such as oxygen limitation and ethanol toxicity in the wort (Bokulich and Bamforth, 2013; van Rijswijck *et al.*, 2017).

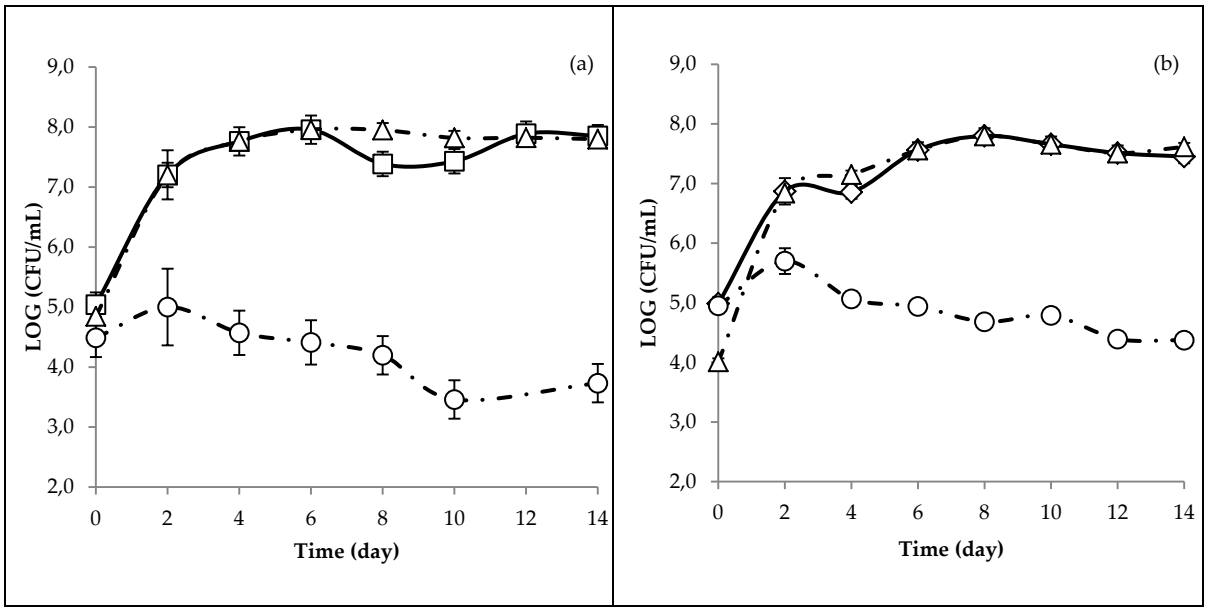


Figure 24. Cell growth of *S. suaveolens* and *S. cerevisiae* during wort mixed fermentation (a) 30-GEC (with starter of culture containing 70% of *S. cerevisiae* and 30% of *S. suaveolens* cell/cell) and (b) 90-GEC (with starter of culture containing 10% of *S. cerevisiae* and 90% of *S. suaveolens* cell/cell). □ : Total yeast growth; O: *S. suaveolens* growth; Δ : *S. cerevisiae* growth.

However, we found that *S. suaveolens* still kept over 17% (during 30-GEC mixed-fermentation) and 26% (during 90-GEC mixed-fermentation) of its population alive after 14 days of fermentation. We therefore concluded that *S. suaveolens* could maintain its metabolism throughout mixed-fermentation process.

2.2. Macro Kinetics studies of the 30 and 90-GEC mixed-fermentation

Cell population in single-fermentation with *S. cerevisiae* increased by about three log within 4 days and then remained stable, whereas *S. suaveolens* barely grew by less than one log over the entire period of the process (Figure 25a). Also, we show that total yeast population increased more slowly when *S. suaveolens* was added in the inoculum and that higher the proportion of *S. suaveolens* in the starter, higher was this inhibition of growth. Quite interestingly, we noticed an increase in

yeast population at the 8th day in non-inoculated raw wort. This result is not completely surprising as most industrial processes are carried out with sterilized wort that are brought into the fermentation tanks, which even they have been extensively clean up, yet may contain residual living yeast cells from a previous fermentation (Atwell *et al.,* 2017; Salo *et al.,* 2008) . This burst of yeast growth likely did disturb neither the single nor the mixed-fermentation since cell population in all cases have already reached a plateau at 4 to 6 days after pitching. Thus, it might be possible that such spontaneous fermentation did only occur when the wort is not inoculated.

The TSS content of 0-GEC beers decreased by 44 % up to the 6th day of fermentation (from 12.7 to 7.0 °Brix) while a relative high TSS content was maintained in the 100-GEC beer in the meantime (Figure 25b). The TSS content of the 30-GEC beer was comparable to what was observed for 0-GEC beer. On the other hand, during 90-GEC beer fermentation, TSS content was intermediate between the one obtained for 100-GEC beer fermentation and 0-GEC beer fermentation even if total yeast population and its relative proportion of *S. suaveolens* and *S. cerevisiae* were comparable to those of 30-GEC beer fermentation since the 2nd day of the process (Figure 24). Thus, introducing *S. suaveolens* in high proportion in the initial starter of culture *(i.e* 90-GEC) generates a delay in sugar consumption compared to introducing *S. suaveolens* in low proportion in the starter of culture (*i.e* 30-GEC). This delay subsists despite the inversion of proportion between *S. suaveolens* and *S. cerevisiae* observed when initial starter of culture contains high amount of *S. suaveolens* (*i.e.* 90-GEC).

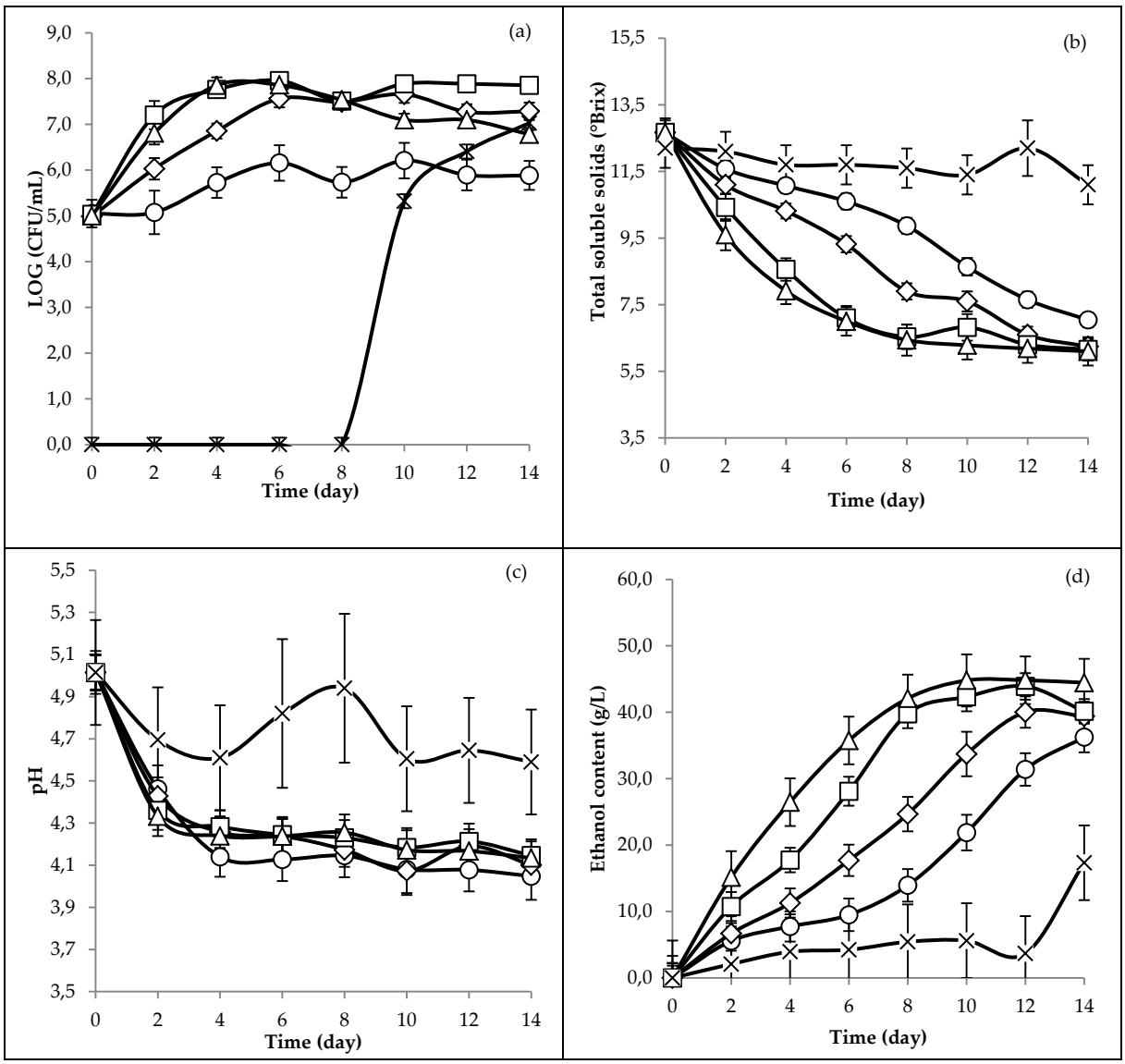


Figure 25. Kinetics of (a) total yeast content, (b) total soluble solids content, (c) pH and (d) ethanol content during fermentation. Raw non inoculated wort (X), 0-GEC (Δ , single-fermentation with *S. cerevisiae*), 30-GEC (□ , mixed-fermentation with starter of culture containing 70% of *S. cerevisiae* and 30% of *S. suaveolens*, 90-GEC (◊ , mixed-fermentation with starter of culture containing 10% of *S. cerevisiae* and 90% of *S. suaveolens*) and 100-GEC (○ , single-fermentation with *S. suaveolens*).

The pH globally decreased (from 5.0 to 4.3 units) during the 14 days of fermentation for all beer tested (Figure 25c). For 0-GEC this drop happened during the first two days and pH remained stable until the end of fermentation whereas for 100-GEC beer, the pH drop was observed about 2 days later. This was probably due to the slower growth rate of *S. suaveolens* in the wort media as compared to *S. cerevisiae*. Adjunction of *S. suaveolens* in the starter of culture then generated a delay

of the pH drop during the fermentation which increased with the proportion of *S. suaveolens* in the starter of culture (Figure 25d). However, this delay did not affect the final beers as we found no significant difference in pH for all tested beers after the 4th day of fermentation. On the contrary, the reduction in sugar consumption with increasing of *S. suaveolens* proportion in the starter of culture seemed to strongly affect the ethanol production during the process, the ethanol production being much slower with a high proportion of *S. suaveolens* (Figure 25d).

2.3. Kinetics of sugar mobilisation in single and mixed fermentation

To better understand the metabolism differences between *S. suaveolens* and *S. cerevisiae* which impart the fermentation, we monitored the utilization of glucose, maltose, sucrose and fructose (Figure 26). In the initial wort, fructose and maltose contents (1.8 g.L^{-1} and 41.5 g.L^{-1} respectively) were similar to the values reported in literature (3-4 g.L^{-1} and 45-50 g.L^{-1} respectively), while sucrose content (0.15 g.L^{-1}) and glucose content (6.4 g.L^{-1}) were much lower than the usual amount (3-5 g.L^{-1} and 20-25 g.L^{-1} respectively) (Callejo *et al.*, 2019; Toh *et al.*, 2018; Liu and Quek, 2016). The non-inoculated wort were relatively stable regarding maltose and sucrose content but glucose and fructose slightly decreased along the 14 days after innoculation of the wort (Figure 26). We concluded that this decrease can be attributed to the spoilage of the industrial brewing yeast in the non-inoculated wort (Figure 25a).

In our standard beer inoculated with *S. cerevisiae* alone (0-GEC beer fermentation), the glucose was almost completely consumed after 2 days of fermentation while consumption of fructose and maltose required about 4 days before stabilizing at very low levels (Figure 26). TSS continued to decrease after day 4 and was in accordance with sucrose assimilation which continued to slightly decrease after the 6th day of fermentation during 0-GEC beer fermentation (Figure 26). The kinetic of sugars consumption by *S. cerevisiae* generally correspond to our

prediction according to which glucose would be consumed first, before fructose and then maltose. However, the complete depletion of maltose in the wort (day 4) surprisingly occurred before the end of sucrose consumption by *S. cerevisiae.*

When compared to 0-GEC, beer inoculated with *S. suaveolens* alone (100-GEC beer) showed a significant delay in all sugar consumption profiles. Indeed, even if glucose and fructose uptake started from the first day of fermentation, the total consumption of glucose required at least 6 days, while only 53% of fructose was consumed in the same period (Figure 26).

Contrary to what was observed during the 0-GEC fermentation, significant catabolism of sucrose and maltose did not start until after the 6th day of fermentation, although the fructose still remained in the wort. This result was quite unexpected because the yeast *S. suaveolens* is known to assimilate mono-carbohydrates in priority and is not expected to consume maltose (Kurtzman *et al.*, 2011). The kinetics of sugars consumption of the co-fermented wort (30-GEC and 90-GEC beers) revealed intermediate profiles which were between those of 0-GEC and 100-GEC beers, with 90-GEC beers displaying lower carbohydrate consumption rates compared to 30-GEC beers. Likewise, these results highlight the influence of the initial starter of culture on maltose consumption which seems to slow down with the increase of the *S. suaveolens* proportion in the starter of culture (Figure 26d).

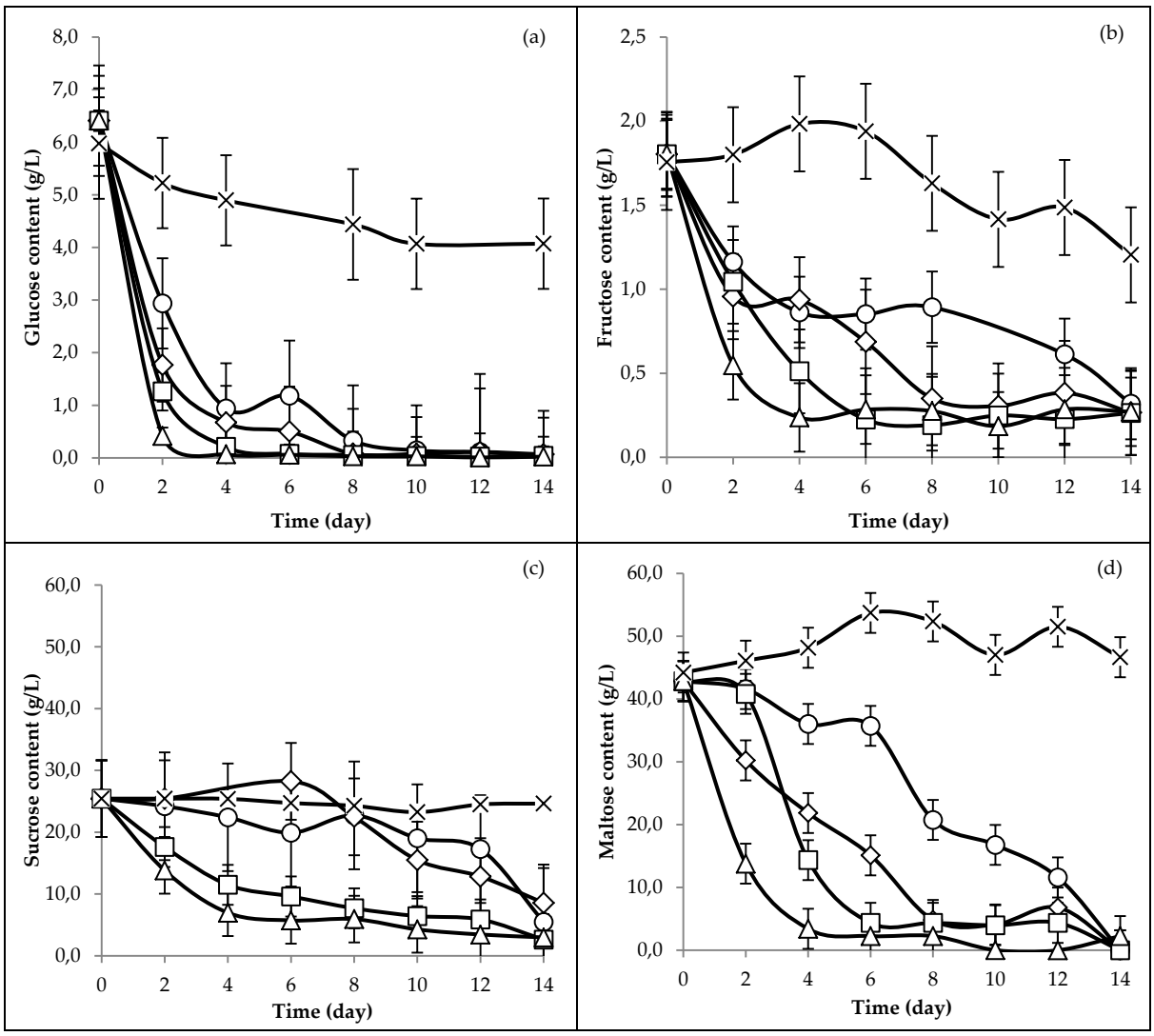


Figure 26. Kinetics of consumption of carbohydrates (in g/L) contained in the wort (a : glucose ; b : fructose; c : sucrose and d : maltose) during fermentation. Raw non inoculated wort (X), 0-GEC (Δ single-fermentation with *S. cerevisiae*), 30-GEC (□ , mixed-fermentation inoculated with 70% of *S. cerevisiae* and 30% of *S. suaveolens*, 90-GEC (◊ , mixed-fermentation inoculated with 10% of *S. cerevisiae* and 90% of *S. suaveolens*) and 100-GEC (○ , single-fermentation inoculated with *S. suaveolens* alone).

2.4. Changes in organic acids

We monitored the production of six common volatile organic acids (namely α-ketoglutaric, lactic, pyruvic, succinic, acetic and malic acid) during fermentation (Figure 27). In the initial wort, no succinic and lactic acid were detected but pyruvic and α-ketoglutaric acids were present at very low levels (3.51 mg.L^{-1} and 1.60 mg.L^{-1} respectively) while malic acid content was much higher with 334 mg.L^{-1}. Finally, in accordance with the literature (Liu and Quek, 2016; Toh *et al.*, 2018),

we found that acetic acid constituted the major organic acid as it content reached up to 1.36 $g.L^{-1}$ in the initial wort.

For all the beer tested, no lactic and succinic acid were produced during the 14 days of fermentation. On the other hand, we found that the use of *S. suaveolens* in co-culture with *S. cerevisiae* (30-GEC and 90-GEC) globally increased the production of α-ketoglutaric acid during the fermentation of wort as compared to the use of a mono-culture of *S. cerevisiae* (0-GEC), showing that *S. suaveolens* was favored the production of this organic acids during the beer production. This was probably due to the more extensive amino-acid catabolism of *S. suaveolens* than in *S. cerevisiae* (Grondin *et al.,* 2015b), which produce part of the α-ketoglutaric acid (Yin *et al.,* 2017). On the other hand, pyruvic acid and acetic acid were produced at higher level in 0-GEC than in 30-, 90- and 100-GEC beers, revealing the high impact of *S. cerevisiae* in the production of these organic acids. With respect to malic acid, no significant difference was found in all beers when compared to the initial wort, confirming that malic acid content is not related to the composition of the starter of culture (Li and Liu, 2015).

Finally, none of the organic acids reached their respective odor threshold values, suggesting that they could impart the sourness of the final beer produced without impacting their flavours whatever the composition of the starter of culture.

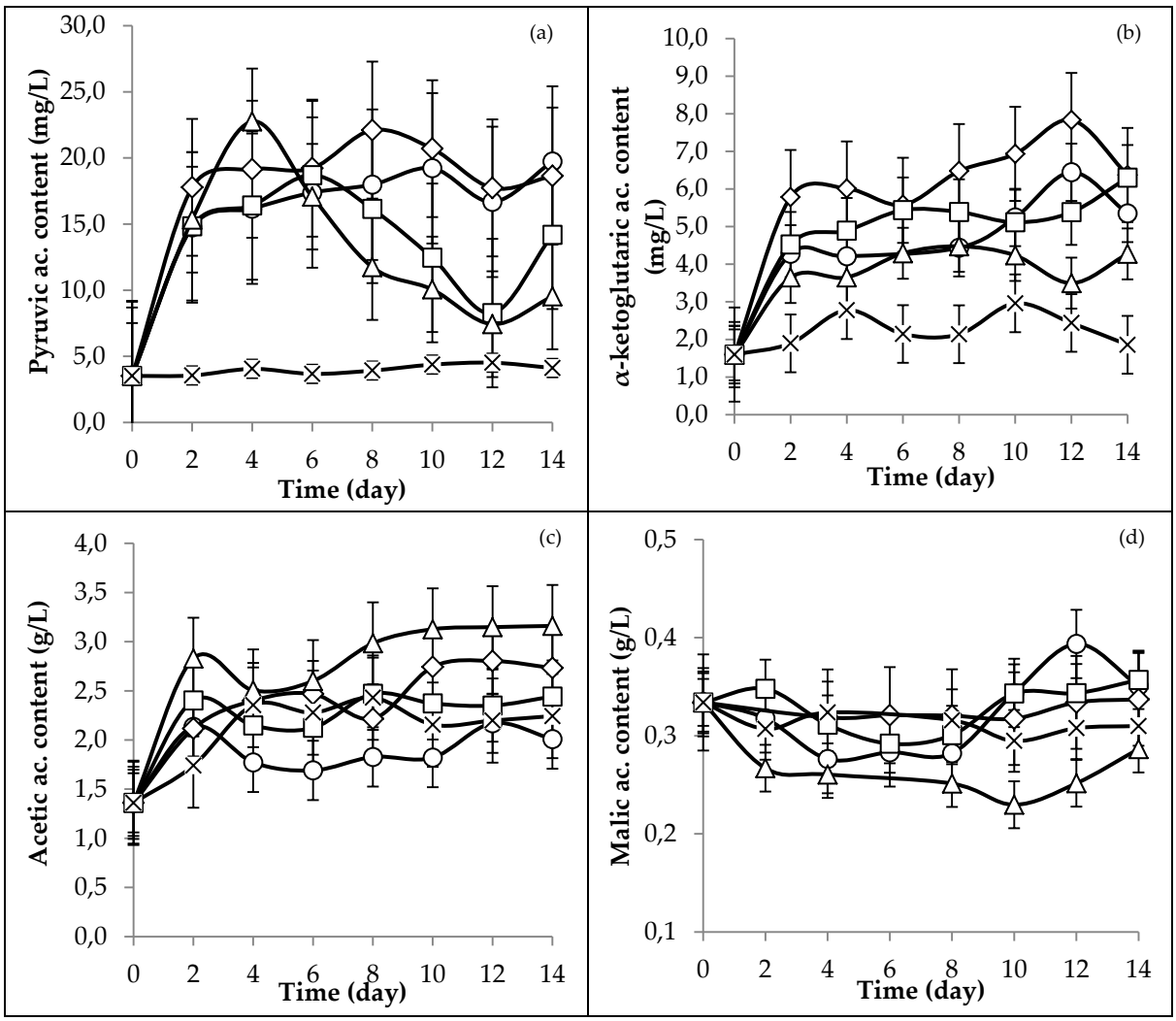


Figure 27. : Changes in major organic acids contained in the wort (a: pyruvic acid mg/L; b: α-ketoglutaric acid mg/L; c : acetic acid g/L and d malic acid content g/L) during fermentation. Raw non inoculated wort (X), 0-GEC (Δ single-fermentation with ***S. cerevisiae***), 30-GEC (□ , mixed-fermentation inoculated with 70% of *S. cerevisiae* and 30% of *S. suaveolens*, 90-GEC (◊ , mixed-fermentation inoculated with 10% of *S. cerevisiae* and 90% of *S. suaveolens*) and 100-GEC (○ , single-fermentation inoculated with *S. suaveolens* alone).

3. Contribution of *S. suaveolens* in the constitution of a new fruity aroma bouquet in beers after mixed fermentation using industrial wort

To assess the influence of *S. suaveolens* metabolism on the aromatic bouquet of the beers, we carried out large-scale batches (6 L) of beers using industrial wort (recipe of SOREBRA©) and we analyzed the volatile organic compounds (VOCs) using headspace-solid phase micro-extraction (HS-SPME) of the initial wort and the beers obtained after 14 days of fermentation (0-GEC-D14, 30-GEC-D14, 90-GEC-D14 and 100-GEC-D14 beers) by gas-chromatography coupled with a mass

spectrometry detector (GC-MS). Moreover, we also investigated VOCs produced in beers after 7 days of fermentation (0-GEC-D7, 30-GEC-D7, 90-GEC-D7 and 100-GEC-D7 beers). Based on this experiment, 22 major VOCs consisting of esters, alcohols and terpenoïds were detected in the beers.

3.1. Influence of the fermentation time on the aromatic bouquet of beers

To better illustrate the influence of the fermentation duration on the aromatic bouquet of the beers, a multivariate statistical analysis was carried out based on ethanol content and VOCs data for wort, and beers obtained after 7 and 14 days of fermentation (Figure 28). The first two principal components explained most of the variance (75.29 %) with first principal component (F1) and second principal component (F2) covering 42.86 and 32.44 % of the variation in the data, respectively. Hierarchical ascendant classification allowed distinguishing one group (Group 1 including all the beers fermented during 14 days) and five independent samples, namely non-inoculated wort, 0-GEC-D7, 30-GEC-D7, 90-GEC-D7 and 100-GEC-D7 beers. After 14 days of fermentation, beers obtained from single or mixed fermentation (Group 1) had a tendency to converge into the center of the graph, which indicates that the aromatic bouquets in these beers did not significantly differ from beers prepared with *S. cerevisiae* alone. Moreover, the VOCs content of these beers was between 38 % (for 0-GEC beer) to 70% lower (for 100-GEC beer) than in beers after 7 days of fermentation. This suggests that VOCs undergo volatilization or are re-used by the yeast(s) in the second period of fermentation. Moreover, the aromatic bouquets of beers fermented during 7 days were all significantly different from each other's, thus confirming that *S. suaveolens* have a strong impact on the aromatic bouquet of the beers already 7 days after inoculation. Thus, to produce beers with distinctive aromatic bouquet and that would benefit entirely of the VOCs production from *S. suaveolens*, we suggest to

stop the process of beers production after 7 days of fermentation.

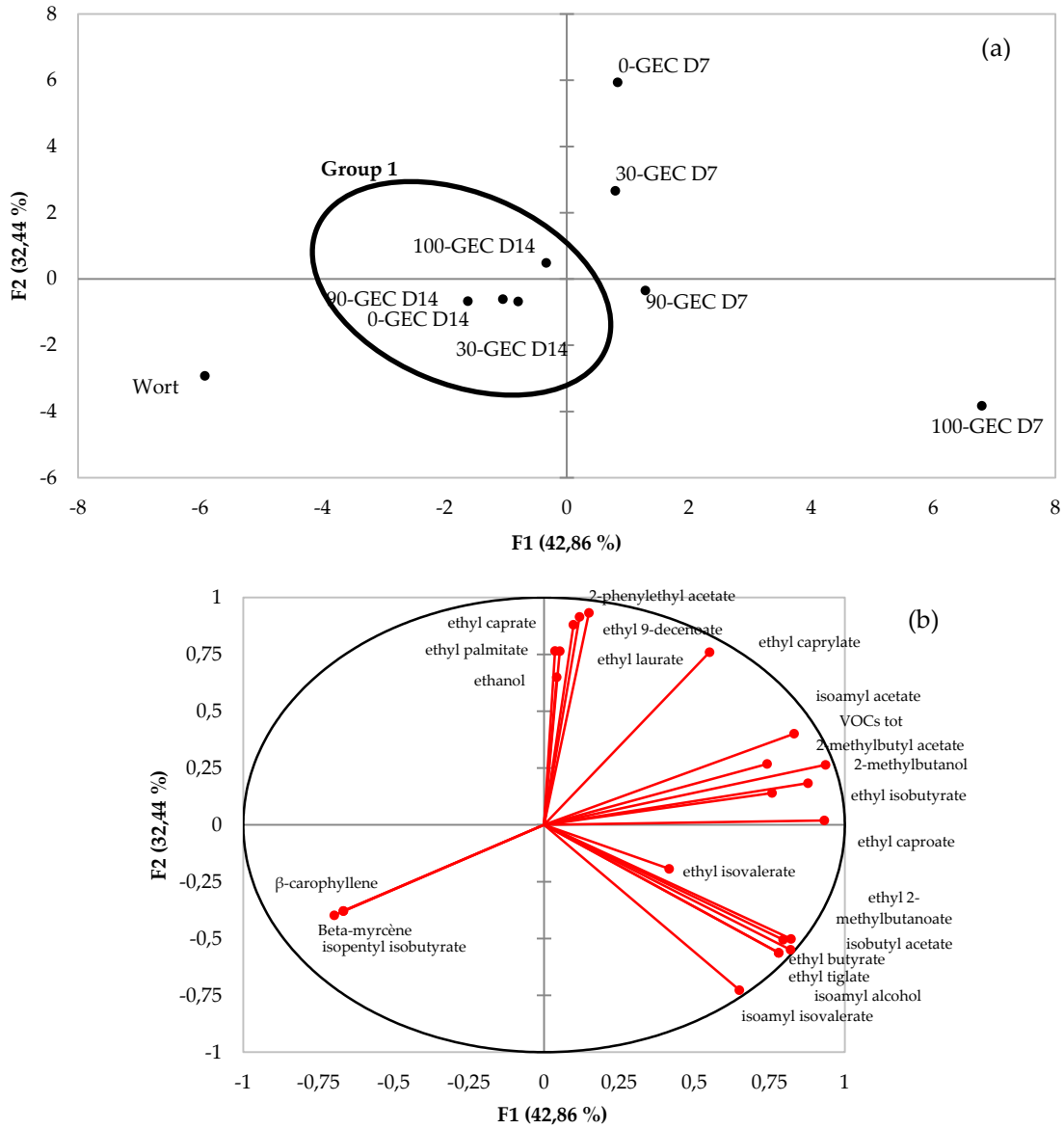


Figure 28. Score plot of F2 versus F1 for the main organic volatile compounds detected in initial and fermented wort analyzed after 7 days (D7) and 14 days (D14) of fermentation. 0-GEC (single-fermentation with *S. cerevisiae*), 30-GEC (mixed-fermentation inoculated with 70% of *S. cerevisiae* and 30% of *S. suaveolens*, 90-GEC (mixed-fermentation inoculated with 10% of *S. cerevisiae* and 90% of *S. suaveolens*) and 100-GEC (single-fermentation inoculated with *S. suaveolens* alone). Principal Component Analysis was performed using XLSTAT (Addinsoft). Predicted groups were correlated to CAH clusters.

3.2. Influence of *S. suaveolens* metabolism on the aromatic bouquet of beers after 7 days of simple- or mixed-fermentation.

The beer obtained after 7 days of simple-fermentation of wort with *S. cerevisiae* (0-GEC-D7 beer) was better described in the second principal component F2 where principle components are mainly defined by VOCs from lipid metabolism and glycolysis (such as ethyl caprate, ethyl dec-9-enoate and 2-phenylethyl acetate (Kobayashi *et al.,* 2008; Welsh *et al.,* 1989)) and a higher ethanol content (Figure 28). On the contrary, the beers obtained after 7 days of fermentation with *S. suaveolens* alone (100-GEC-D7 beer) was set in the first principal component F1, and found to accumulate a majority of VOCs, such as ethyl 3-methylbutanoate, isoamyl alcohol, ethyl 2-methylbutanoate or ethyl tiglate from the amino acids catabolism (Brányik *et al.*, 2008; Dickinson *et al.,* 2003; Hazelwood *et al.,* 2008; Chen, 1978). A 7 days beers from the co-culture of *S. cerevisiae* with *S. suaveolens* (30-GEC-D7 and 90-GEC-D7 beers) displayed intermediates VOCs profiles confirming that *S. suaveolens* was metabolically active during mixed-fermentation of wort, although it did not grow under these condition. Major type of VOCs detected in 0-, 30-, 90 and 100-GEC beers obtained in this condition are presented in Table 7.

The esters, including acetate and ethyl esters, were among the most abundant volatiles compounds detected in all beers (Supplementary data D). The concentration of these esters increased proportionally with the increase of *S. suaveolens* in the initial starter of culture. Similarly, the beers produced after 7 days of mono-culture with *S. suaveolens* (100-GEC-D7) displayed a significantly higher amount of acetate esters as compared to standard beers made with *S. cerevisiae* alone, confirming the higher esterification ability of *S. suaveolens* compared to *S. cerevisiae* (Zhu *et al.,* 2016; Grondin *et al.,* 2015b). However, the overall acetate ester production was lower in both mixed-fermentation beers (30-GEC-D7 and 90-GEC-D7) as compared to beers produced by mono-cultures (0-GEC-D7 and 100-GEC-

D7). This result suggests that an inhibition effect occurs on acetate esters production when both yeasts are present in the broth. Apart from ethyl acetate (that could not be detected using this analytical system), the most important flavor active acetate esters in beers were 3-methylbutyl acetate (banana-like), 2-methylpropyl acetate (fruit-like) and 2-phenyl-ethyl acetate (flower-like) (Verstrepen *et al.,* 2003; Pires *et al.,* 2014; Kobayashi *et al.,* 2008; Peddie, 1990). The concentration of 3-methylbutyl acetate (banana-like) was globally similar in all beers, despite the fact that its alcohol precursor, namely 3-methylbutanol (malt-like) was higher in 30-GEC, 90-GEC and 100-GEC beers. 2-methylpopryl acetate (fruit-like) was only detected in beers fermented by *S. suaveolens (3*0-GEC, 90-GEC and 100-GEC beers) but the associated fruity and flowery flavours (Leffingwell & Associates) can theoretically be detected in 100-GEC beer which harbored a concentration of this compounds that was about 3 to 4 time higher (0.23 $mg.L^{-1}$) than its odor threshold (0.07 $mg.L^{-1}$). Finally, 2-phenylethyl acetate (flower-like) was detected only in 0-GEC and 30-GEC-D7 beers.

Table 7 : Concentration ($mg.L^{-1}$) of the type of major volatile compounds (GC-MS) identified in wort and beers obtained after 7 days of mono-culture and mixed-fermentation of wort with *S. cerevisiae* and *S. suaveolens*.

Type of VOCs	Wort	0-GEC beer	30-GEC beer	90-GEC beer	100-GEC beer
Alcohols	0.04 ± 0.04	0.54 ± 0.94	1.08 ± 0.45	1.46 ± 0.29	1.62 ± 1.24
Esters	0.02 ± 0.02	3.06 ± 1.68	3.00 ± 0.88	4.20 ± 1.29	7.04 ± 4.40
Terpens	0.09 ± 0.06	-	-	-	-
Total volatiles	0.15 ± 0.12	3.61 ± 2.26	4.71 ± 1.02	4.29 ± 1.61	9.05 ± 5.20

Data are means ± standard deviations. **0-GEC-D7**, beer obtained after 7 days of wort inoculated with *S. cerevisiae* alone; **30-GEC-D7**, beer prepared during 7 days using a starter of culture containing 70% of *S. cerevisiae* and 30% of *S. suaveolens* (cell/cell); **90-GEC-D7**, beer obtained after 7 days of wort mixed-fermentation with starter of culture containing 10% of *S. cerevisiae* and 90% of *S. suaveolens* (cell/cell); **100-GEC-D7**, beer obtained after 7 days of wort inoculated with *S. suaveolens* alone

Ethyl esters, which are produced from esterification of medium chain fatty acid (MCFA) in the presence of ethanol (Stevens, 1960; Peddie, 1990), were the most abundant group of compounds detected in all the beers. This result is

consistent with literature in which most significant ethyl esters in beers are ethyl hexanoate (apple-like) and ethyl octanoate (apricot-like) (Verstrepen *et al.,* 2003; Peddie, 1990). In our study, both compounds were found above their odour thresholds in all beers and could then confer their fruity flavour to them. Most of the medium-chain fatty acid (MCFA) ethyl esters deriving from lipid metabolism (ethyl decanoate, ethyl dec-9-enoate, ethyl dodecanoate and ethyl hexadecanoate) were more abundant in beers fermented with a high ratio of *S. cerevisiae* (namely 0-GEC-D7 and 30-GEC-D7 beers). On the contrary, most of MCFA ethyl esters deriving from the metabolism of amino acids (ethyl 2-methylbutanoate, ethyl 3-methylbutanoate, ethyl tiglate) were mainly more abundant in beers fermented with high ratio of *S. suaveolens* in the starter of culture. Consistent with data from literature (Olaniran *et al.,* 2017), this result showed that the major part of ethyl ester production occurred within the first two days of fermentation, *i.e*, before *S. suaveolens* depletion (Figure 24a and b and Figure 25a).

Generally, yeasts produce higher alcohols and their corresponding acids by transforming amino-acids *via* the Ehrlich pathway (Pires *et al.,* 2014; Kobayashi, *et al.,* 2008). In our assays, only two higher alcohols, namely 2-methylbutanol and 3-methylbutanol, were detected in beers whereas their corresponding acids were not detected. This result suggests that a high rate of higher alcohols and acids esterification occurs in the fermentation media. The odor threshold of 2-methylbutanol (estimated at 1.90 $mg.L^{-1}$ (Chen *et al.,* 2006; Czerny *et al.,* 2008; Nagata, 2003)) was not reached in any beers whatever the starter of culture used suggesting that this compound was not produced enough to impact the beers with its balsamic, wine and onion-like off-flavour (Czerny *et al.,* 2008). With respect to 3-methylbutanol, its odor threshold of 0.3 $mg.L^{-1}$ (Leffingwell & Associates) was reached only in beers containing *S. suaveolens* (namely 30-GEC, 90-GEC and 100-GEC-D7 beers), while 100-GEC-D7 beers showed the highest amount of this compound. This suggested that *S. suaveolens* participates actively to the production

of 3-methylbutanol during the fermentation and allows its production at level above its odor threshold. When associated with *S. cerevisiae* which maintain a good fermentative activity in the wort, the use of *S. suaveolens* was therefore successful to improve the aromas of the beers and their drinkability because the heaviness of the flavor of the final product increased with the concentration of 3-methylbutanol (Olaniran *et al.,* 2017).

IV. Discussion

The use of *S. suaveolens* (former *Geotrichum fragrans*) in the brewing field had not been studied yet even if this non-conventional yeast (NCY) is well described as good aroma producer with high proportion of fruity esters (Grondin *et al.,* 2017; Grondin *et al.,* 2015a; 2015b; İşcan *et al.,* 2015; de Oliveira *et al.,* 2013; Damasceno *et al.,* 2003). In this study we studied the performance of *S. suaveolens* to impact on the aroma profile of beer. However, because *S. suaveolens* is known to display bad fermentative capacity, we investigated its performance in co-culture with *S. cerevisiae* and compared it to mono-culture of *S. suaveolens* and of *S. cerevisiae*. After determining the best ratio of the two strains resulting in aromatic beers with a satisfactory ethanol content, we performed beers using industrial wort in 6L batches with 0-GEC (mono-culture of *S. cerevisiae*), 30-GEC (co-culture of 70 % of *S. cerevisiae* and 30 % of *S. suaveolens* cell/cell), 90-GEC (co-culture of 10 % of *S. cerevisiae* and 90 % of *S. suaveolens*) and 100-GEC (mono-culture of *S. suaveolens*). *S. suaveolens* grew very poorly in the wort when inoculated alone and cell population even declined when it was inoculated together with *S. cerevisiae* (in 30-GEC and 90-GEC beers). Nonetheless, *S. suaveolens* was found to be metabolically active in all conditions tested as witnessed by continued production of volatiles metabolites which are specific to its metabolic network, such as ethyl tiglate or 2-methylpropyl acetate (Supplementary data D).

In accordance with other studies (Canonico *et al.,* 2017; Liu and Quek, 2016)

we noticed that the global fermentation speed decreased with the amount of *S. suaveolens* in the starter of culture. This was mainly due to the low assimilation of maltose (which constituted 70% of the TSS in the wort) by *S. suaveolens* contrary to *S. cerevisiae*. However, a decrease in the maltose content of the fermented wort with a NCY in mono-culture was rarely described in the literature, even when the NCY, such as *T. delbrueckii*, is known to assimilate it (Callejo *et al.,* 2019; Toh *et al.,* 2018; Liu and Quek, 2016). Even if sucrose was found to be metabolized by *S. suaveolens*, this consumption was found to be very limited. Most of the time, yeasts with limited capacities to consume sugars are particularly desirable for the production of aromatic beers, but they usually lead to low alcohol content beers when inoculated alone (Gibson *et al.,* 2017; De Francesco *et al.,* 2015; Saerens and Swiegers, 2014; Branyik *et al.,* 2012; Budroni *et al.,* 2017). In the present study we confirmed this result but we also demonstrated that varying the ratio of *S. suaveolens* and *S. cerevisiae* in the starter of culture could lead to production of beers with variable ethanol contents; this content increasing with the proportion of *S. cerevisiae* in the starter of culture.

At the same time, we showed that varying the ratio between *S. suaveolens* and *S. cerevisiae* in the starter of culture could also positively influence the aromatic bouquet of the beer; the aromatic bouquet being richer with the ratio of *S. suaveolens* in the starter of culture. We also found that the highest impact of *S. suaveolens* metabolism on VOCs was reach already after 7 days of fermentation. After 7 days of fermentation, the beer fermented with 30 % cell of *S. suaveolens* and 70 % of *S. cerevisiae* (30-GEC beer) displayed 23% more VOCs as compared to the standard beer. This result was quite surprising as it was expected that natural aromatization of beer in mixed-fermentation of wort would require a higher ratio of the NCY in the starter of culture (van Rijswijck *et al.,* 2017). Moreover, in all beer produced after 7 days of fermentation, the esters, which define fruity aroma of beers (Willaert and Nedovic, 2006; Zhang *et al.,* 2013; Verstrepen *et al.,* 2003; Michel

et al., 2016; Pires *et al.,* 2014; Engan, 1972; Peddie, 1990) constituted the major part of the VOCs and the proportion of the esters was increasing with the proportion of *S. suaveolens*. This was in accordance with the results of Zhu and collaborators (2016) who showed that some strains of *Geotrichum* species and assimilate (such as *S. suaveolens*) were applicable for increasing esters in fermented beverages including wine and liquors by decreasing their higher alcohols content. The esters were mostly found at concentration below their individual odor threshold in final beers. But, it is well known that even if their individual concentration is well under their odor threshold, esters can have a synergic effect and affect the overall flavour of the product then (Olaniran *et al.,* 2017; Verstrepen *et al.,* 2003). Therefore, as verify in our lab preliminary hedonic analysis use of *S. suaveolens* alone (100-GEC) or in co-culture with *S. cerevisiae* (30- and 90-GEC) in the starter of culture strongly impart the taste of the beers with high fruity aromas. This fruity taste increased with the proportion of *S. suaveolens* in the starter of culture, but at the same time the "alcoholic note" of standard beer was lost.

Thus, results of our monitoring and the preliminary hedonic analysis allowed highlighting the interest of (a) mixed-fermenting wort with 30% cell/cell *S. suaveolens* and 70% cell/cell of *S. cerevisiae* (30-GEC) during 7 days to produce fruity beers with characteristics (pH, ethanol content, TSS content) comparable to standard beers (b) mixed-fermenting wort with 90 % cell/cell *S. suaveolens* and 10 % cell/cell of *S. cerevisiae* during 7 days to produce low ethanol content fruity beers but associated to higher residual sugar.

V. Conclusions

In this study we demonstrated that the high aroma producer *S. suaveolens* strain could be used in mixed-fermentation with *S. cerevisiae* to produce beers enriched significantly in fruity flavors as compared to standard beers (*i.e.* produced in mono-culture with *S. cerevisiae*), even when the ratio of the NCY was low as

compared to *S. cerevisiae*. Beside its influence on VOCs production, we also demonstrated the possibility to control ethanol production in the final beer by varying the ratio of both strains in the starter of culture. A good compromise was found for wort inoculated with 30 % of *S. suaveolens* and 70 % of *S. cerevisiae* and fermented for 7 days which led to beers with ethanol content comparable to standard beers, but with an aromatic bouquet enriched in fruity flavours. Contrariwise, inoculating wort with 90 % of *S. suaveolens* and 10 % of *S. cerevisiae* for 7 days fermentation was shown as an interesting process to produce low-ethanol content fruity beers. This study confirms then that *S. suaveolens* is a good candidate to improve the aromatic properties of industrial beers. To complete these data, a sensorial comparative analysis of beers fermented during 7 days with simple or co-culture of *S. suaveolens* (30-, 90-, 100-GEC beers D7) with standard beer (0-GEC D7) will be published in another article specially turned to the sensorial properties of the novel beer.

VI. Supplementary data

Supplementary data D. Concentration (mg.L^{-1}) of the major volatile compounds (GC-MS) identified in wort and beers obtained after 7 days of mono-culture and mixed-fermentation of wort with *S. cerevisiae* and *S. suaveolens* (1/3).

Volatile compounds	IRR th*	IRR exp	Odour threshold**	Wort	0-GEC-D7-beer	30-GEC-D7-beer	90-GEC-D7-beer	100-GEC-D7-beer	Organoleptic properties**
ALCOHOLS									
2-methylbutanol	739 – 755	-	1.90 mg.L^{-1}	0.03 ± 0.02 ^{a}	0.40 ± 0.69 ^{a}	0.57 ± 0.07 ^{a}	0.48 ± 0.21 ^{a}	0.64 ± 0.33 ^{a}	Malt, balsamic, wine, onion, butter
3-methylbutanol	734 - 736	-	0.30 mg.L^{-1}	0.01 ± 0.02^{a}	0.14 ± 0.25^{a}	0.75 ± 0.16^{a,b}	0.70 ± 0.38^{a,b}	1.16 ± 0.79^{b}	Malt, balsamic, fruit, onion, whiskey, burnt, cheese, bitter, harsh
ESTERS									
2-methylbutyl acetate	876	859	0.50 µg.L^{-1}	n.d	0.11 ± 0.05^{a,b}	0,12 ± 0,01 ^{a,b}	0.14 ± 0.06^{b}	0.14 ± 0.05^{b}	Fruit, herb, ether, rum, banana
2-methylpropyl acetate	767 - 776	-	0.07 mg.L^{-1}	n.d	n.d	0,02 ± 0,00 ^{a,b}	0.05 ± 0.01 ^{a,b}	0.23 ± 0,02^{b}	Fruit, apple, banana, flower, pear
2-phenylethyl acetate	1260 - 1265	1267	0.65 mg.L^{-1}	n.d	0.11 ± 0.18^{a}	0.04 ± 0.05^{a}	n.d	n.d.	Rose, flower, fruit, honey, tobacco
3-methylbutyl 2-methylpropanoate	1013	1010	-	0.01 ± 0.02^{a}	n.d	n.d	n.d	n.d	Mixed fruit
3-methylbutyl 3-methylbutanoate	1103	1102	-	0.01 ± 0.01 ^{a}	n.d ^{a}	n.d ^{a}	0,02 ± 0,01 ^{a,b}	0.05 ± 0.04^{b}	
3-methylbutyl acetate	876	855	2.00 µg.L^{-1}	n.d	0.62 ± 0.43 ^{a}	0.48 ± 0.12 ^{a}	0.56 ± 0.22 ^{a}	0.61 ± 0.15 ^{a}	Banana, fresh

Supplementary data D. Concentration (mg.L^{-1}) of the major volatile compounds (GC-MS) identified in wort and beers obtained after 7 days of mono-culture and mixed-fermentation of wort with *S. cerevisiae* and *S. suaveolens* (2/3).

Volatile compounds	IRR th*	IRR exp	Odour threshold**	Wort	0-GEC-D7-beer	30-GEC-D7-beer	90-GEC-D7-beer	100-GEC-D7-beer	Organoleptic properties**
Ethyl 2-methylbutanoate	846	825	0.10 – 0.80 µg.L^{-1}	n.d	0.01 ± 0.03 ^{a}	0.08 ± 0.03 ^{a}	0.17 ± 0.04 ^{a}	0.69 ± 0.39^{b}	Sweet, fruit, strawberry, blackberry, green apple
Ethyl 2-methylpropanoate	756 - 762	-	0.01 - 0.02 µg.L^{-1}	n.d	0.20 ± 0.33 ^{a}	0.02 ± 0.01 ^{a}	0.05 ± 0.02 ^{a}	0.23 ± 0.19 ^{a}	Fruit, sweet, rubber blueberry
Ethyl 3-methylbutanoate	839 - 856	827	0.01 µg.L^{-1}	n.d	0.11 ± 0.19^{a}	0.72 ± 0.11	1.24 ± 0.30^{a}	4.00 ± 2.16^{b}	Cashew, fruit, anise, sweet, apple, blackcurrant
Ethyl dec-9-enoate	1387	1387		n.d	0.27 ± 0.33^{a}	0.22 ± 0.20^{a}	0.07 ± 0.06^{a}	n.d	Fruit, fat
Ethyl butanoate	771 - 804	-	0.04 – 1.00 µg.L^{-1}	n.d	0.02 ± 0.04^{a}	0.09 ± 0.09 ^{a}	0.07 ± 0.03 ^{a}	0.45 ± 0.70 ^{a}	Fruit, banana, strawberry, bubblegum, pineapple, acetone, caramel
Ethyl decanoate	1394 - 1397	1394	0.12 mg.L^{-1}	n.d	0.57 ± 0.44^{a}	0.56 ± 0,34^{a}	0.13 ± 0.19^{a}	n.d	Grape, fruit
Ethyl dodecanoate	1494 - 1595	1560		n.d	0.07 ± 0.06^{a}	0.09 ± 0,09^{a}	n.d	n.d	Mango, fruit leaf
Ethyl hexadecanoate	1902 - 1993	1993	> 2,00 mg.L^{-1}	n.d	0.02 ± 0.01^{a}	n.d	n.d	n.d	Wax, mild sweet
Ethyl hexanoate	996 - 1002	993	1.00 - 3.00 µg.L^{-1}	n.d	0.14 ± 0.07^{a,b}	0.12 ± 0.02^{a,b}	0.08 ± 0.01^{a,b}	0.27 ± 0.19^{b}	Fruit, strawberry, anise, green apple, pineapple, brandy, wine
Ethyl octanoate	1195 - 1198	1195	0.09 mg.L^{-1}	n.d	0.81 ± 0.52^{a}	0.80 ± 0.19^{a}	0.50 ± 0.25 ^{a}	0.45 ± 0.19 ^{a}	Apricot, flower, fruit, fat, green, leaf, menthol, anise, sweet, soap, fresh
Ethyl tiglate	949	931	0.07 mg.L^{-1}	n.d.	n.d	n.d	0.02 ± 0.03^{a,b}	0.12 ± 0.09^{a}	Fruit, sweet, topical, berry, flower

Supplementary data D. Concentration (mg.L^{-1}) of the major volatile compounds (GC-MS) identified in wort and beers obtained after 7 days of mono-culture and mixed-fermentation of wort with *S. cerevisiae* and *S. suaveolens* (3/3).

Volatile compounds	IRR th*	IRR exp	Odour threshold**	Wort	0-GEC-D7-beer	30-GEC-D7-beer	90-GEC-D7-beer	100-GEC-D7-beer	Organoleptic properties**
TERPENOIDS									
D-limonene	1030 - 1039	1026	0.01 mg.L^{-1}	0.03 ± 0.04^{a}	n.d	n.d.	n.d.	n.d.	Citrus, mint, licorice, green, ether, fruit
β-carophyllene	1418 - 1467	1468	0.06 mg.L^{-1}	0.03 ± 0.01^{a}	n.d	n.d	n.d	n.d	Wood, spice, must, terpen, fruit, sweet
β-myrcene	992	984	0.01 - 0.02 mg.L^{-1}	0.04 ± 0.01^{a}	n.d	n.d	n.d	n.d	Metal, must, geranium, sweet, fruit, ether, soap, lemon, wood, balsamic
VOCs tot				0.14 ±1.45	3.61 ± 2.26	4.71 ± 1.02	4.29 ± 1.61	9.05 ± 5.20	

Data are mean ± standard deviations. Data with different superscript letters within each file were found to be significantly different. *Data from "Flavornet and human odor space" (Acree and Arn 2020) and "Database of pheromones and semiochemicals." (The Pherobase, www.pherobase.com) **Data from Nagata, 2003 ; Chen *et al.*, 2006 ; Czerny *et al.*, 2008 and "Odor & flavor detection thresholds in water (in parts per billion)." (Leffingwell & Associates). **0-GEC-D7**, beer obtained after 7 days of wort inoculated with *S. cerevisiae* alone; **30-GEC-D7**, beer prepared during 7 days using a starter of culture containing 70% of *S. cerevisiae* and 30% of *S. suaveolens* (cell/cell); **90-GEC-D7**, beer obtained after 7 days of wort mixed-fermentation with starter of culture containing 10% of *S. cerevisiae* and 90% of *S. suaveolens* (cell/cell); **100-GEC-D7**, beer obtained after 7 days of wort inoculated with *S. suaveolens* alone.

VII. Acknowlegments

The authors wish to thank the management of the local brewing company SOREBRA (Saint-Louis, Reunion Island, France) for kindly provide industrial wort for our fermentation assays.

VIII. References

Acree T. and Arn H.. 2020. "Flavornet and human odor space." [Online]. Available on : https://www.flavornet.org/.

Atwell C., Martin E., Montague G., Swuste J., and Picksley M. 2017. "Optimization of cleaning detergent use in brewery fermenter cleaning." *Journal of the Institute of Brewing* 123 (1): 70–76.

Basso R.F., Alcarde A.R., and Portugal C.B. 2016. "Could non-*Saccharomyces* yeasts contribute on innovative brewing fermentations?" *Food Research International* 86: 112–1420.

Bellut K. and Arendt E.K. 2019. "Chance and challenge: Non- *Saccharomyces* yeasts in nonalcoholic and low alcohol beer brewing – A review." *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 77 (2): 77–91.

Bokulich N.A., and Bamforth C.W.. 2013. "The microbiology of malting and brewing." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 77 (2): 157–172..

Branyik T., Silva D.P., Braszczynski M., Lehnert R., and Silva J.A.. 2012. "A review of methods of low alcohol and alcohol-free beer production." *Journal of Food Engineering* 108: 493–506.

Brányik T., Vicente A.A., Dostálek P., and Teixeira J.A. 2008. "A review of flavour formation in continuous beer fermentations." *Journal of the Institute of Brewing* 114 (1): 3–13.

Budroni M., Zara G., Ciani M., and Comitini F.. 2017. "*Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* starter yeasts." In *Brewing Technology*, edited by Makoto Kanauchi. InTech.

Callejo M.J., Navas J.J.G., Alba R., Escott C., Loira I., González M.C., and Morata A. 2019. "Wort fermentation and beer conditioning with selected son-*Saccharomyces* yeasts in craft beers." *European Food Research and Technology* 245 (6): 1229–1238.

Canonico L., Comitini F. and Ciani M. 2017. "*Torulaspora delbrueckii* contribution in mixed brewing fermentations with different *Saccharomyces cerevisiae* strains." *International Journal of Food Microbiology* 259: 7–13.

Capece A., Romaniello R., Siesto G. and Romano P. 2018. "Conventional and non-conventional yeasts in beer production." *Fermentation* 4 (2): 38.

Chen E.C.H. 1978. "The relative contribution of Erhlich and biosynhetic pathways to the formation of fusel alcohols." *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 36: 39–43.

Chen J.L., Wu J.H, Wang J., Deng H., and Hu X.S.. 2006. "Changes in the volatile compounds and chemical and physical properties of Kuerle fragrant pear (*Pyrus Serotina* reld) during storage." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (23): 8842–8847.

Czerny M., Christlbauer M., Christlbauer M., Fischer A., Granvogl M., Hammer M., Hartl C., Hernandez N.M., and Schieberle P. 2008. "Re-Investigation on odour thresholds of key food aroma compounds and development of an aroma language based on odour qualities of defined aqueous odorant solutions." *European Food Research and Technology* 228 (2): 265–273.

Daenen L., Sterckx F., Delvaux F.R., Verachtert F., and Derdelinckx G. 2008. "Evaluation of the glycoside hydrolase activity of a *Brettanomyces* strain on glycosides from sour cherry (*Prunus cerasus* L.) used in the production of special fruit beers." *FEMS Yeast Research* 8: 1103–1114.

Damasceno S., Cereda M.P., Pastore G.M., and Oliveira J.G. 2003. "Production of volatile compounds

by *Geotrichum fragrans* using cassava wastewater as substrate." *Process Biochemistry* 39 (4): 411–414.

De Francesco G., Turchetti B., Sileoni V., Marconi O. and Perretti G. 2015. "Screening of new strains of *Saccharomycodes ludwigii* and *Zygosaccharomyces rouxii* to produce low-alcohol beer." *Journal of the Institute of Brewing* 121 (1): 113–121.

Dickinson J.R., Eshantha L., Salgado J. and 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.

Dijken J.P., Bauer, Brambilla, Duboc, Francois, Gancedo, Giuseppin. 2000. "An interlaboratory comparison of physiological and genetic properties of four *Saccharomyces cerevisiae* strains." *Enzyme and Microbial Technology* 26 (9–10): 706–714.

Engan S. 1972. "Organoleptic threshold values of some alcohols and esters in beer." *Journal of the Institute of Brewing* 78 (1): 33–36.

Fleck O. 2004. "DNA repair." *Journal of Cell Science* 117 (4): 515–517.

Gallone B., Mertens S., Gordon J.L., Maere S., Verstrepen K.J. and Steensels J. 2018. "Origins, evolution, domestication and diversity of *Saccharomyces* beer yeasts." *Current Opinion in Biotechnology* 49: 148–155.

Gallone B., Steensels J., Prahl T., Soriaga L., Saels V., Herrera-Malaver B., Merlevede A. 2016. "Domestication and divergence of *Saccharomyces cerevisiae* beer yeasts." *Cell* 166 (6): 1397–1410.

Gibson, B., Geertman J.-M. A., Hittinger C. T., Krogerus K., Libkind D., Louis E. J., Magalhães F., and Sampaio J. P.. 2017. "New Yeasts—New Brews: Modern approaches to brewing yeast design and development." *FEMS Yeast Research* 17 (4): 1–13.

Grondin E., Shum Cheong Sing A., Caro Y., Raherimandimby M., Randrianierenana A.L., James S., Nueno-Palop C., François J.M., and Petit T. 2015a. "A comparative study on the potential of epiphytic yeasts isolated from tropical fruits to produce flavoring compounds." *International Journal of Food Microbiology* 203: 101–8.

Grondin E., Shum Cheong Sing A., Caro Y., Billerbeck G.M., François J.M. and Petit T. 2015b. "Physiological and biochemical characteristics of the ethyl tiglate production pathway in the yeast *Saprochaete suaveolens*." *Yeast* 32 (1): 57–66.

Grondin E., Shum Cheong Sing A., James S, Nueno-Palop C., François J.M. and Petit T. 2017. "Flavour production by *Saprochaete* and *Geotrichum* yeasts and their close relatives." *Food Chemistry* 237: 677–684.

Hazelwood L. A., Daran J.-M, van Maris A. J. A., Pronk J. T., and Dickinson J. R.. 2008. "The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism." *Applied and Environmental Microbiology* 74 (12): 3920–3920.

İşcan G., Demirci B., Demirci F., and Başer K.H.C. 2015. "Headspace Solid Phase Microextraction (HS-SPME) and Analysis of *Geotrichum fragrans* volatiles." *Natural Volatiles & Essential Oils* 2 (2): 45–51.

Kao T.-H. 2018. "Health potential for beer brewing byproducts." In *Current Topics on Superfoods*, edited by Naofumi Shiomi. InTech.

Kobayashi M., Shimizu H. and Shioya S. 2008. "Beer volatile compounds and their application to low-malt beer fermentation." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 106 (4): 317–323.

Kurtzman C., Fell J.W. and Boekhout T.. 2011. *The Yeasts: A Taxonomic Study*. Elsevier.

Leffingwell & Associates. 2020. "Odor & Flavor Detection Thresholds in Water (in Parts per Billion)." [Online]. Available on : http://www.leffingwell.com/odorthre.htm.

Li G. and Liu F.. 2015. "Changes in organic acids during beer fermentation." *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 73 (3): 275–279.

Li H. and Liu F. 2015. "The chemistry of sour taste and the strategy to reduce the sour taste of beer." *Food Chemistry* 185: 200–204.

Libkind D., Hittinger C.T., Valério E., Gonçalves C., Dover J., Johnston M., Gonçalves P. and Sampaio J.P. 2011. "Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-

brewing yeast." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (35): 14539–14544.
Liu S.-Q. and Quek A.Y.H. 2016. "Evaluation of beer fermentation with a novel yeast *Williopsis saturnus*." *Food Technology and Biotechnology* 54 (4): 403–412.
Lodolo E., Johan J. Kock L.F., Axcell B.C. and Brooks M. 2008. "The yeast *Saccharomyces cerevisiae*–the main character in beer brewing." *FEMS Yeast Research* 8 (7): 1018–1036.
Mertens S., Steensels J., Saels V., De Rouck G., Aerts G., and Verstrepen K.J.. 2015. "A large set of newly created interspecific *Saccharomyces* hybrids increases aromatic diversity in Lager beers." Edited by D. Cullen. *Applied and Environmental Microbiology* 81 (23): 8202–8214.
Michel M., Meier-Dörnberg T., Jacob F., Methner F.-J, Wagner R.S. and Hutzler M. 2016. "Review: pure non- *Saccharomyces* starter cultures for beer fermentation with a focus on secondary metabolites and practical applications: non-conventional yeast for beer fermentation." *Journal of the Institute of Brewing* 122 (4): 569–587.
Nagata Y. 2003. "Measurement of odor threshold by triangle odor bag method," 10.
Olaniran A.O, Hiralal L., Mokoena M.P. and Pillay B. 2017. "Flavour-active volatile compounds in beer: production, regulation and control." *Journal of the Institute of Brewing* 123 (1): 13–23.
De Oliveira S.M., Damasceno Gomes S. Sene L., Machado S.R., Coelho S.C.B., Cereda M.P., Christ D., and Piechontcoski J. 2013. "Production of 2-phenylethanol by *Geotrichum fragrans*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus* in cassava wastewater." *Journal of Food Agriculural Environment* 11 (2): 158–163.
Peddie H.A.B. 1990. "Ester Formation in Brewery Fermentations." *Journal of Inst. Brew* 96: 327–331.
Petruzzi L., Corbo M.R., Sinigaglia M. and Bevilacqua A. 2016. "Brewer's yeast in controlled and uncontrolled fermentations, with a focus on novel, non-conventional, and superior strains." *Food Reviews International* 32 (4): 341–363.
Pires E.J., Teixeira J.A., Brányik T. and Vicente A.A. 2014. "Yeast: the soul of beer's aroma—a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast." *Applied Microbiology and Biotechnology* 98 (5): 1937–1949.
Qvirist L., Vorontsov E., Vilg J.V. and Andlid T. 2017. "Strain improvement of *Pichia kudriavzevii* TY13 for raised phytase production and reduced phosphate repression." *Microbial Biotechnology* 10 (2): 341–353.
van Rijswijck I.M.H., Wolkers - Rooijackers J.C.M., Abee T., and Smid E.J. 2017. "Performance of non-conventional yeasts in co-culture with brewers' yeast for steering ethanol and aroma production." *Microbial Biotechnology* 10 (6): 1591–1602..
Saerens S. and Swiegers J.H.. 2014. Production of low-alcohol or alcohol free beer with Pichia kluyveri yeast strains. World intellectual property organization WO 2014/135673 A2, filed 2013, and issued 2014.
Saerens S.M.G., Duong C.T., and Nevoigt E.. 2010. "Genetic improvement of brewer's yeast: current state, perspectives and limits." *Applied Microbiology and Biotechnology* 86 (5): 1195–1212.
Salo S., Friis A. and Wirtanen G. 2008. "Cleaning validation of fermentation tanks." *Food and Bioproducts Processing* 86 (3): 204–210.
Serra Colomer M., Funch B., and Forster J. 2019. "The raise of *Brettanomyces* yeast species for beer production." *Current Opinion in Biotechnology* 56: 30–35.
Steensels, Jan, Tim Snoek, Esther Meersman, Martina Picca Nicolino, Karin Voordeckers, and Kevin J. Verstrepen. 2014. "Improving Industrial Yeast Strains: Exploiting Natural and Artificial Diversity." *FEMS Microbiology Reviews* 38 (5): 947–95. https://doi.org/10.1111/1574-6976.12073.
Steensels J. and Verstrepen K.J. 2014. "Taming wild yeast : potential of conventional and non-conventional yeasts in industrial fermentations." *Annual Review of Microbiology* 68: 61–80.
Stewart G. 2016. "*Saccharomyces* species in the production of beer." *Beverages* 2.
TechNavio. 2019. "Global Fruit Beer Market 2019-2023."
The pherobase. 2020. "Database of Pheromones and Semiochemicals." 2020. [Online]. Available on : www.pherobase.com.
Toh D.W.K., Chua J.Y., and Liu S.Q. 2018. "Impact of simultaneous fermentation with *Saccharomyces*

cerevisiae and *Torulaspora delbrueckii* on volatile and non-volatile constituents in beer." *LWT* 91: 26–33.

Varela C.. 2016. "The impact of non-*Saccharomyces* yeasts in the production of alcoholic beverages." *Applied Microbiology and Biotechnology* 100 (23): 9861–9874.

Verstrepen K.J., Derdelinckx G., Dufour J.-P., Winderickx J., Thevelein J.M., Pretorius I.S. and Delvaux F.R.. 2003. "Flavor-active esters: adding fruitiness to beer." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 96 (2): 110–118.

Welsh F.W., Murray W.D., Williams R.E. and Katz I. 1989. "Microbiological and enzymatic production of flavor and fragrance chemicals." *Critical Reviews in Biotechnology* 9 (2): 105–169.

Willaert R. and Nedovic V.A. 2006. "Primary beer fermentation by immobilised yeast—a review on flavour formation and control Strategies." *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 81 (8): 1353–1367.

Yin H., Dong J.J., Yu J.-H., Zhong C., Liu L.-P., Liu M., Yang P.F., Hao J.-G., and Jia S.-R. 2017. "Intracellular metabolite profiling of industrial yeast and the synthesis of flavour compounds in beer: metabolic analysis of flavor during beer fermentation." *Journal of the Institute of Brewing* 123 (3): 328–336.

Zhang C.-Y., Liu Y.H., Qi Y.-N., Zhang J.-W., Dai L.-H., Lin X. and Xiao D.-G. 2013. "Increased esters and decreased higher alcohols production by engineered brewer's yeast strains." *European Food Research and Technology* 236 (6): 1009–1014.

Zhu J., Shi JL., Lu Y., Liu LP. and Liu YL. 2016. "Application of strains of *Geotrichum* spp. to decrease higher alcohols and to increase esters." *Journal of the Institute of Brewing* 122 (1): 147–155.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Le travail présenté dans ce mémoire avait pour objectif de poursuivre les investigations d'une étude réalisée au laboratoire dans le cadre de la thèse de Eric Grondin (2014) portant sur l'étude d'une souche de levure de *Saprochaete suaveolens*, isolée sur du pitaya (également connu sous le nom de fruit du dragon) de la Réunion. Cette levure présentait en effet un profil de composés organiques volatils (COVs) très original dont un travail de revue bibliographique a permis de confirmer l'intérêt en production d'arômes. Nous avons donc choisi dans le cadre de ce travail de caractériser et de valoriser la capacité de production d'arômes de l'espèce *S. suaveolens* selon trois axes :

Le premier axe de la thèse visait à cribler la biodiversité levurienne des fèces d'animaux sauvages d'Afrique du Sud pour la recherche de nouvelles souches productrices d'esters α-insaturés. Dans cette partie du travail, nous avons effectué notre criblage en nous basant sur nos connaissances métaboliques de la production d'arômes chez la levure *S. suaveolens*. Nous avons ainsi isolé 119 souches à partir de divers fèces d'animaux sauvages d'Afrique du Sud et sélectionné 43 souches qui, à l'instar de *S. suaveolens*, étaient capables de se développer sur des milieux ne contenant que des acides aminés branchés (isoleucine, leucine, valine) comme unique source de carbone (phénotype ILV^+). A partir de l'analyse des COVs de ces 43 souches, nous avons identifié 12 souches capables de produire des esters α-insaturés, dont 2 produisaient des esters α-insaturés atypiques que nous n'avions pas encore detectés chez les levures, en particulier chez notre souche de *S. suaveolens.* Ainsi, cette étude a confirmé que la méthode de criblage des souches est fonctionnelle pour faciliter la recherche de souches productrices d'esters α-insaturés.

Cependant, étant donné que la moitié des souches ILV^+ retenues ne produisait pas d'esters α-insaturés, cette étude n'a pas permis de conclure quant à une corrélation directe entre le caractère ILV^+ et la production d'esters α-insaturés. De plus, les résultats du chapitre III de la thèse ont montré qu'une surproduction

d'esters α-insaturés pouvait être obtenue par suppression du caractère ILV$^+$ induite par une perte d'activité de l'enoyl-CoA hydratase (ECH). Au vue de ces résultats, et bien que fonctionnelle, la méthode de criblage que nous avons mise au point dans ce travail mériterait d'être améliorée pour permettre d'isoler un plus grand nombre de variétés de souches de *S. suaveolens* surproductrices d'arômes. Etant donné le rôle central de l'intermédiaire enoyl-CoA dans la voie de production d'esters α-insaturés, il serait natamment intéressant de coupler notre méthode de criblage aux mesures des activités des deux enzymes impliquées dans son accumulation dans la voie de la β-oxydation. Ainsi, il faudrait mesurer à la fois les activités de l'acyl-CoA deshydrogénase (ACyD) produisant l'enoyl-CoA et l'activité de l'enoyl-CoA hydratase (ECH), utilisant l'enoyl-CoA comme substrat pour finalement retenir deux groupes de souches : (1) les souches ILV$^+$ présentant une forte activité de l'ACyD et (2) les souches ILV$^-$ ne présentant pas d'activité de l'ECH mais une forte activité de l'ACyD. Les méthodes de mesure d'activités enzymatiques pouvant être effectuées à haut débit, la determination des activités ACyD et ECH seraient potentiellement plus rapides que les méthodes traditionnelles de criblage basées sur la croissance des cellules sur des milieux gélosés. Néanmoins, étant donné la quantité de substrats nécessaires pour réaliser les mesures d'activité de ces deux enzymes, cette méthode serait potentiellement bien plus coûteuse que la méthode traditionnelle sur boite de Pétri.

Bien que nous n'ayons pu sélectionner des souches produisant davantages de COVs que la souche de *S. suaveolens,* en accord avec d'autres données de la littérature, cette étude a permis de souligner la nécessité de diversifier les zones géographiques de criblages pour obtenir des souches ayant des propriétés biotechnologiques particulières. C'est pourquoi, pour continuer ce travail, nous pensons qu'il est primordial d'identifier les souches productrices d'esters α-insaturés obtenues au cours du présent travail de thèse et d'élargir les zones d'investigations à d'autres animaux sauvages en prenant en compte la nouvelle méthode de criblage

proposée ci-dessus.

Le second axe de la thèse visait à optimiser la production d'arômes de la souche *S. suaveolens* par une approche basée sur la mutagenèse UV et la sélection de mutants ayant perdu la capacité à se développer sur des milieux ne comportant que des acides aminés branchés comme source de carbone (ILV^-). Parmi les 15 000 clones irradiés, nous avons ainsi pu isoler 9 souches ILV^-. Les analyses chromatographiques des composés d'arômes produits par ces mutants ont permis de mettre en évidence un mutant M10 dont la production d'arômes globale était multipliée par 8 comparée à la souche sauvage de *S. suaveolens*. Les mesures d'activités des enzymes majeures impliquées dans les voies de métabolisation des acides aminés branchés ont montré que la suraccumulation de COVs chez ce mutant M10 résultait d'une perte d'activité de l'enoyl-CoA hydratase et d'un dédoublement de l'activité de l'acyl-CoA hydrolase comparée à celle observée chez la souche sauvage de *S. suaveolens*. Cette étude, à notre connaissance, constitue le premier modèle d'optimisation de production d'arômes chez une souche levurienne par mutagenèse UV.

De plus, elle a permis de confirmer le rôle central de l'enoyl-CoA hydratase dans le catabolisme des acides aminés branchés chez la levure *S. suaveolens*. Pour continuer ce travail, nous pensons qu'il serait intéressant de comparer les séquences de la souche sauvage de *S. suaveolens* avec celle du mutant M10 afin de mieux déterminer l'origine de la mutation et d'identifier le gène impacté par cette ou ces mutations. Ce travail, qui se déroule actuellement en collaboration avec la plateforme GeT Biopuces de Toulouse, est en cours de réalisation et devrait permettre d'identifier les modifications nucléotidiques qui impactent la régulation des activités de l'ACyD et l'ECH. A terme, ce travail pourrait nous permettre de construire, par mutagenèse dirigée, des souches mutantes (*Saccharomyces ou* non-*Saccharomyces*) productrices d'esters α-insaturés à des concentrations suffisantes pour une production biotechnologique industrielle d'esters α-insaturés qui sont toujours

actuellement produits majoritairement par voie synthétique.

Enfin, le dernier axe de la thèse visait à valoriser les arômes de la levure sauvage de *S. suaveolens* dans une matrice agro-alimentaire. Pour cela nous avons étudié l'impact de l'introduction de notre souche de *S. suaveolens* en présence de *S. cerevisiae* (en fermentation mixte) sur un moût de brasserie industrielle et la production d'une bière naturellement fruitée. Les résultats ont montré que même si la levure *S. cerevisiae* avait une activité prépondérante dans le procédé de fermentation mixte, la levure *S. suaveolens* a su maintenir son métabolisme actif, ce qui a conduit à la production de bières significativement enrichies en arômes après seulement 7 jours de fermentation. L'étude a également montré la possibilité de moduler les teneurs en alcools finales dans la bière en fonction de la composition initiale du starter de culture. Ainsi, un starter de culture composé à 30% (cell/cell) de *S. suaveolens* et 70% (cell/cell) de *S. cerevisiae* a conduit à la production de bières fruitées ayant des teneurs en éthanol comparables à celles des bières standards, alors qu'un starter de culture composé de 90% (cell/cell) de *S. suaveolens* et 10% de *S. cerevisiae* a généré des bières fruitées à faible teneur en alcool.

Pour finaliser ce travail de thèse, il serait intéressant de réaliser une analyse sensorielle des bières obtenues par ce procédé et de les comparer à des bières produites par le même procédé, et bien sûr à remplacer la souche sauvage de *S. suaveolens* par le mutant M10 sélectionné pour sa capacité à surproduire des esters aromatiques. De plus, l'activité métabolique de *S. suaveolens* ayant été démontrée en production de boissons fermentées, il serait intéressant d'évaluer son activité sur d'autres matrices alimentaires telles que le vin ou le rhum.

Pour conclure, ce travail de thèse a permis de confirmer que les connaissances actuelles sur le métabolisme aromatique de la levure *S. suaveolens* pouvaient être utilisées pour le criblage de souches productrices d'esters α-insaturés. Il a, de

surcroît, permis de produire une souche de *S. suaveolens* surproductrice d'arômes et de générer des connaissances supplémentaires sur le rôle de certaines enzymes dans les voies de production d'arômes chez *S. suaveolens*. Enfin, l'évaluation de la souche de *S. suaveolens* en production de bière a montré la faisabilité d'une première application directe de la souche *S. suaveolens* en aromatisation dans un procédé agro-alimentaire en condition industrielle.

MATERIELS ET METHODES

I. Matériels biologiques

1. Souches de levures

Une souche sauvage de *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK 1122N (van Dijken *et al.*, 2000) et une souche de *Saprochaete suaveolens* (anciennement *Geotrichum fragrans*) isolée du fruit du pitaya (*Hylecereus polyrhisus*) à l'ile de La Réunion, France (Grondin *et al.*, 2015a) ont été utilisées dans cette étude.

2. Fèces d'animaux sauvages

Des fèces fraîches d'animaux sauvages ont été aseptiquement collectées dans différents Zoos, « Game Reserve » et parc nationaux d'Afrique du Sud (Tableau XI). Les collectes ont été réalisées à l'aide d'écouvillons ou de tubes stériles préalablement annotés puis scellés et maintenus à 4°C jusqu'utilisation. De plus, des échantillons lyophilisés d'excréments d'animaux sauvages ont été fournis par un donateur anonyme. En tout, 118 échantillons ont été recoltés et traités dans ce travail.

Tableau XI. Sites de collectes des différents fécès d'animaux sauvages

Noms des sites	Type de site and adresses
Moreleta Kloof Nature Reserve	Game Reserve (Helios Street, Moreletapark, Pretoria, Gauteng)
Kruger National Park	National Park (Kruger National Park, Mpumalang).
Lory Park Zoo	Zoo (180/1 Kruger Road, President Park, Midrand, Gauteng)
Mc Crindle Farm	Game Reserve (Gauteng)
Emoya big cat sanctuary	Zoo (Farm Milumbe, D1939, Lephalale, Limpopo)
Elephant Sanctuary	Zoo (Hartbeespoortdam, Plettenberg bay)
Moholoholo Animal Rehabilitation. center	Zoo (Limpopo)

3. Souches mutantes de *S. suaveolens*

Une mutagenèse UV de la souche *S. suaveolens* a été realisée selon une méthode légèrement modifiée par rapport à celle introduite par Winston (2008). La souche de *S. suaveolens* a été cultivée dans 10 mL de bouillon YPD (20g.L^{-1} de peptone, 20g.L^{-1} de

dextrose et 10g.L^{-1} d'extrait de levures) à 30°C toute une nuit, puis lavée avec 10 mL d'eau physiologique stérile après centrifugation à 13 000 rpm pendant 5 minutes. Des cultures à 5.10^{4} cellules.mL^{-1} ont ensuite été préparées dans de l'eau physiologique stérile. 100 µL de suspension ont été étalées sur milieu gelosé YNB complémenté de 2g.L^{-1} de glucose (YNB-Glu) avant exposition aux irradiations UV (254 nm, 30 cm de hauteur) pendant 180s. Ce temps d'irradiation a été calculé au laboratoire comme étant le temps nécessaire pour générer un taux de survie de 42.8 % de la population initiale. Après irradiation, les boites de Pétri (YNB-Glu) ont été incubées à 30°C pendant 15 h. A l'issu de la mutagénèse, 15 393 clones de la souche de *S. suaveolens* ont ainsi été isolés sur YNB-Glu.

4. Moût de brassage et fabrication des bières

Du moût de brassage artisanal a été préparé selon le procédé de préparation suivant : 5 kg de malt ont été broyés et ajoutés à 15 L d'eau puis chauffé pendant 15 min à 45-50°C, puis pendant 60 min à 60-65°C et enfin 10 min à 78-80°C. Le moût a ensuite été filtré et les résidus ont été rincés avec 1 L d'eau avant ajout de l'eau de rincage au moût initial avant cuisson (30 min à ébullition). Trois granulés de houblon y ont ensuite été rajoutés avant stérilisation (30 min à ébullition) et filtration. Le moût a ensuite été récupéré dans une bouteille stérile de 6 L et refroidi à 12°C avant utilisation. Le moût obtenu était caractérisé par un pH de 5.50 et une gravité spécifique de 13 °Plato. Le moût industriel, caractérisé par un pH de 5.00 et une gravité spécifique de 13° Plato, a été fourni par une brasserie industrielle locale (SOREBRA, Saint-Louis, La Réunion).

Pour préparer les bières, des starters de culture purs de *S. cerevisiae* et de *S. suaveolens* ont été préalablement préparés comme suit : une pré-croissance des souches a d'abord été réalisée dans un milieu malt-peptone-extrait de levure-glucose à pH 5.0 (2 % de dextrose, 0.25 % de peptone bactériologique, 0.25 % d'extrait de malt et 0.25% extrait de levure (v/v)). Ensuite, 100 µL de pré-culture ont été utilisés pour

inoculer 50 mL de bouillon stérile de malt-peptone-extrait de levure-glucose dans des Erlenmeyer de 250 mL. Les cultures ont été maintenues sous agitation à 30 °C et 50 mL de milieu stérile de malt-peptone-extrait de levure-glucose ont été rajoutés toutes les 24 h pendant 3 jours. Des starters de cultures mixtes ont été préparés en mélangeant des volumes donnés de chaque starter de cultures purs à des concentrations de 1.10^7 cell.mL^{-1} avec des ratios de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 90 et 100 % de *S. suaveolens* complétés à 100 % avec *S. cerevisiae*.

Le démarrage de la fermentation des bières a été réalisé en inoculant le moût avec 1% de starter (v/v) pour atteindre une concentration de 1.10^5 cellules.mL^{-1} (correspondant à 5 Log UFC.mL^{-1}). Pour les fermentations à l'échelle du laboratoire, le môut artisanal a été utilisé. Les essais ont été réalisés dans des Erlenmeyer de 500 mL contenant 250 mL de moût et innoculés par addition de 2.5 mL du starter désiré puis incubés pendant 6 jours à 20-25°C. Pour les essais à plus grande échelle, le moût industriel a été utilisé. Les fermentations ont ainsi été réalisées pendant 14 jours dans des bouteilles stériles de 6 L contenant 5 L de moût et 50 mL du starter de culture désiré.

II. Isolement et sélection des souches d'intérêts

1. Isolement des souches des fécès d'animaux sauvages

Pour les échantillons de fèces prélevés à l'aide d'écouvillons, ces derniers ont été directement introduits dans 10 mL de solution de Ringer. Pour les échantillons de fèces en tubes, 1 g de matière a été préalablement pesé. Les solutions ont ensuite été vortexées et diluées avant étalement de 100 µL à la surface des géloses de YPD (Biolab diagnostics LTD., Afrique du Sud) agrémentées de 0.1 g.L^{-1} de chloramphénicol (EMDQ Millipore Corp. Billerica, MA USA) (YPD-chloramphénicol) pour favoriser le développement des levures. Les boites ont été ensuite incubées à 30°C pendant 48 h jusqu'à ce que les colonies soient entièrement formées. Les colonies ont ensuite été isolées par épuisements répétitifs sur milieu gelosé YPD-

chloramphénicol et stockées à 4°C jusqu'utilisation. Pour les échantillons lyophylisés, 1 g de fèces a été resuspendu dans 10 mL de bouillon nutritif stéril (Merck, Afrique du Sud). Les tubes ont ensuite été vortexés et incubés à 25°C pendant 5 jours avant étalement sur milieu gelosé YPD-chloramphénicol.

2. Sélection des souches capables et incapables de se développer sur des milieux contenant uniquement des acides aminés branchés comme source de carbones (ILV^+ et ILV^-)

La sélection des souches ILV^+ a été réalisée à partir des souches isolées des fèces d'Afrique du Sud sur milieu sélectif. Une colonie de chaque souche à tester a été suspendue dans 5mL de milieu YPD bouillon et les tubes ont été incubés toute une nuit à 30°C. Les cultures ont ensuite été centrifugées (13 000 rpm, 5min) et les surnageants remplacés par 5 mL d'eau physiologique stérile. Ensuite, des cultures de concentration cellulaire 10^6, 10^5 and 10^4 cell.mL^{-1} ont été préparées dans de l'eau physiologique stérile. 5µL de chaque concentration ont ensuité été déposés en double sur 4 milieux gelosés à base de YNB, complété de 1 g.L^{-1} d'isoleucine, de leucine et de valine ou de 2 g.L^{-1} de glucose (milieux YNB-Ile, YNB-Leu, YNB-Val, ou YNB-Glu respectivement). Le même protocole a été utilisé pour ensemencer les souches de *S. suaveolens* et de *S. cerevisiae* qui ont été utilisés comme contrôles positif et négatif, respectivement. Les boites de Petri ont ensuite été incubées pendant 48 h à 30°C avant lecture.

La sélection des souches ILV^- (ayant perdu la capacité à croitre sur un milieu contenant uniquement de la leucine, de la valine et de l'isoleucine) a été réalisée à partir des clones de *S. suaveolens* ayant subi une irradiation UV selon le protocole présenté au chapitre I.3. Une pré-sélection des souches ILV^- a été réalisée par la méthode de répliques sur velour stérile des boites de Pétri pour les 15 393 clones de la souche *S. suaveolens* irradiés par les UVs. Les souches irradiées ont ainsi été répliquées sur milieu YNB-Ile, YNB-Leu, YNB-Val et YNB-Glu et incubées pendant 5 jours à 30°C. Les colonies poussant sur YNB-Glu et ne poussant pas sur YNB-Ile,

YNB-Leu et YNB-Val ont été sélectionnées et isolées sur milieu gelosé YPD pour confirmation. La confirmation des souches sélectionnées a été réalisée par test de croissance selon la même méthode présentée précédemment.

III. Analyses chimiques, physico-chimiques et biochimiques

1. Analyses des composés organiques volatiles

Les composés organiques volatiles (COVs) ont été extraits à partir des volumes des espaces de tête par micro-extraction en phase solide à l'aide d'une fibre de 2 cm de long recouverte de divinylbenzène/carboxène sur du polydiméthylsiloxane en silice fondue (Supelco). Pour les analyses de COVs des souches microbiennes (à savoir les souches isolées des fèces d'Afrique du Sud et les souches mutantes de *S. suaveolens*), la fibre a été exposée pendant 15 min à 30°C aux espaces de tête puis insérée pendant 2 min dans l'injecteur à 250°C d'un chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse (Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra) doté d'une colonne ZB-5MSI (30m * 0.32mm * 0.25µm d'épaisseur de film). Pour l'analyse des COVs des bières, la fibre a été exposée pendant 10 min à 30°C aux espaces de tête puis insérée pendant 2 min dans le port d'injection à 250°C d'un chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse (5973 Network mass selective detector, Agilent technologies) doté d'une colonne SPB5 (60m * 0.32mm * 0.25µm d'épaisseur de film). L'identification de tous les COVs a été réalisée par comparaison de leur spectre de masse et de leurs indices de rétention linéaire expérimentaux (colonnes DB-5) avec ceux proposés par la base de données « NIST database » (www.chemdata.nist.gov).

Pour l'analyse qualitative des COVs produits par les souches isolées des fécès d'animaux sauvages d'Afrique du Sud, les souches ont été ensemencées dans des tubes à vis scellés de 20 mL contenant 15 mL de milieu gelosé YPD incliné. Les tubes ont été incubés à 30°C pendant 24h avant extraction des COVs de l'espace de tête par

micro-extraction en phase solide. Pour la séparation des COVs en chromatographie gazeuse, le gaz vecteur (H_2) a été réglé à un débit constant de 1.4 mL.min^{-1}. La température de la colonne a été maintenue à 45°C pendant 2 min puis augmentée à 230°C à raison de 4°C.min^{-1}. Cette température a ensuite été maintenue pendant 5 min avant la fin de l'analyse.

Pour l'analyse semi-quantitative des souches mutantes de *S. suaveolens*, les souches ont été ensemencées dans des tubes à vis scellés de 20 mL contenant 15 mL de milieu gelosé incliné YNB-Glu, complété de 1 g.L^{-1} d'isoleucine (YNB-Glu-Ile). Les tubes ont été incubés à 30°C pendant 24h. Avant l'extraction de l'espace de tête par micro-extraction en phase solide, 10 µL d'octan-1-ol (1 g.L^{-1} dans du dichlorométhane) ont été ajoutés dans le tube comme standard interne. Pour la séparation des métabolites en phase gazeuse, le débit du gaz vecteur (H_2) a été réglé à 2 mL.min^{-1}. La température de la colonne a été maintenue à 40°C pendant 2 min et augmentée à 150°C à raison de 10 °C.min^{-1}, puis à 240°C à raison de 30 °C.min^{-1} avant la fin de l'analyse.

Enfin pour l'analyse des COVs des bières, 5 mL des échantillons de bière (ou de moût de brassage) ont été introduits dans des tubes scellés de 15 mL et 10 µL d'octan-1-ol (1 g.L^{-1} dans de l'éthanol absolu) ont été ajoutés comme étalon interne avant micro-extraction en phase solide des COVs de l'espace de tête. Pour l'analyse en chromatographie gazeuse, le flux du gaz vecteur (He) a été fixé à 1.4 mL.min^{-1}. La température a été maintenue à 45°C pendant 2 min, puis augmentée à 230°C à raison de 4°C.min^{-1}. Cette température a ensuite été maintenue pendant 12 min.

2. Préparation des extraits bruts et mesure des activités enzymatiques de la souche sauvage *S. suaveolens* et du mutant M10.

Les cellules de levures ont été cultivées dans des Erlenmeyer de 250 mL contenant 50 mL de bouillon YNB-Glu ou YNB-Glu-Ile pendant 24 h à 30°C. Ensuite, l'équivalent de 100 Unités de densité optique (UDO) mesurées à 600 nm de culture ont été collectées dans des tubes Falcons™ de 50 mL par centrifugation (2000 rpm,

4°C, 1 min). Le culot cellulaire a ensuite été resuspendu dans 1 mL d'eau froide, transféré dans un tube Eppendorf™ de 2 mL, lavé deux fois avec de l'eau froide déminéralisée par centrifugation (2 min à 10 000rpm) et finalement stocké à -20°C jusqu'à son utilisation.

Pour la souche de *S. cerevisiae,* des billes de verre (0.5 mm de diamètre) et 500 µL de solution tampon d'extraction phosphate pH 7.4 (50 mM de tampon phosphate potassium, 2 mM EDTA, 100 mM KCl et 1 mM DTT) ont été ajoutés au culot cellulaire. Les cellules ont ensuite été cassées à l'aide d'un FastPrep (MP BiomedicalsTM Instrument FastPrep-24TM 5G) *via* 6 cycles de 30 s à 6.5 $m.s^{-1}$ et 1 min dans la glace entre chaque cycle. Comme ce procédé ne fonctionnait par pour *S. suaveolens*, les cellules de cette souche ont été cassées en utilisant un TissueLyser (Qiagen Retsh Tissue Lyser II) pendant 3 min à 30Hz, avec une bille de tungstène froide introduite en présence de 500 µL de tampon d'extraction. Dans les deux cas, les tubes ont été centrifugés (4°C, 5 min, 1000g) et les surnageants purifiés sur colonne Amicon (Amicon Ultra-05 Centrifugal Filter devices 10K) selon le protocole proposé par le constructeur.

Toutes les activités enzymatiques ont été réalisées en utilisant un spectrophotomètre UV-Visible Agilent 8453 dans un volume final de 1 mL avec la quantité appropriée d'extrait brut. Pour la mesure d'activité de la déhydrogénase d'α-cétoacide à chaîne branchée (*branched-chain α-cetoacid dehydrogenase*, BCKAD), l'activité a été mesurée en suivant l'oxydation du NAD+ à 340 nm dans un milieu réactionnel contenant 50 mM de tampon phosphate pH 7.4, 2 mM EDTA, 0.2 mM DTT, 0.5 mM TPP, 5 mM $MgSO_4$, 0.5 mM CoA-SH et 1.5 mM NAD. La réaction a été amorcée par addition de 0.2 mM d'acide 2-oxo-4-methylpentanoïque (Patston P.A. *et al.* 1988). L'activité de l'Enoyl-CoA hydratase (ECH) sur le crotonoyl-CoA a été déterminée selon la méthode proposée par Park et Lee (2003) avec quelques modifications. La réduction de 0.225 mM de crotonoyl-CoA en 3-hydroxy-butanoyl-CoA a été suivie à 263 nm dans un milieu réactionnel contenant 45 mM de TrisCl pH

8.0. L'activité de la décarboxylase (DC) sur l'acide 2-oxo-4-méthylpentanoïque a été déterminée dans un milieu contenant 50 mM Na^+citrate à un pH de 6.2, 100 mM KCl, 0.2 mM DTT, 0.5 mM TPP, 5mM MgSO4, 0.2 mM NADH et 5 U/mL de yeast alcohol déhydrogénase. La réaction a été amorcée par addition de 0.2 mM d'acide 2-oxo-4-méthylpentanoïque et l'oxydation de NAD+ a été suivie à 340 nm. Pour l'alcool déhydrogénase (ADH), les essais ont été réalisés avec 2 mM de 2-méthylpropanol ou 100 mM d'éthanol. Dans le premier cas, la réduction de 0.2 mM de NADH en NAD+ a été suivie dans un milieu réactionnel contenant 50 mM de tampon Na+citrate à un pH de 6.2, 100 mM KCl, 0.2 mM DTT, 0.5mM TPP et 5mM MgSO4. Dans le second cas, l'oxydation de NAD+ en NADH a été suivie à 340 nm dans une solution contenant 50 mM de tampon phosphate à pH 8, 100 mM KCl, 0.2 mM DTT, 0.5 mM TPP, 5mM MgSO4 et 0.2 mM NAD. Pour les essais d'activité de l'aldéhyde déhydrogénase (AlDH), la réaction a été réalisée en présence de 50 mM de tampon citrate à pH 6.2, 100mM KCl, 0.2 mM DTT, 0.5 mM TPP, 5 mM MgSO4 et 1.5 mM NAD. La réaction a été amorcée par addition de 2 mM de 2-methylpropanal et suivie à 340 nm par l'oxydation de NAD+ en NADH. L'activité de l'acyl-CoA déhydrogénase (ACyD) a été déterminée en suivant la réduction de DCIP en $DCIPH_2$ à 655 nm. La réaction a été réalisée dans une solution contenant 50 mM de tampon KPi à pH 7.4, 2mM EDTA, 100 mM KCl, 0.1 mM FAD+, 0.5 mM DCIP et 0.2 mM DTT et a été amorcée par addition de 0.2 mM de 2-méthylbutanoyl-CoA. Les mesures d'activité de l'alcool acyltransférase (AAT) ont été réalisées dans un milieu réactionnel contenant 50 mM KPi à pH 7.4, 2 mM EDTA et 100 mM KCl. La réaction a été amorcée par addition de 2mM de p-nitrophénylbutyrate qui entraînait la formation de p-nitrophénol dont la production a été suivie à 415 nm. Finallement, les essais concernant l'activité de l'acyl-CoA hydrolase (ACyH) ont été réalisés dans 10 mM de tampon KPi à pH 6.5, 50mM $MgCl_2$ et 0.1 mM DTNB. La réaction a été amorcée par addition de 0.1 mM de 2-methylbutanoyl-CoA et la formation de CoA-SH a été suivie à 415 nm, ce qui correspond à la production de DNTB réduit. La

concentration en protéine a été determinée à 550 nm par la méthode de Bradford avec du BSA (Sigma-Aldrich) comme standard. Tous les essais ont été réalisés en triplicata.

3. Dénombrement des cellules et détermination des ratios entre les deux espèces de levure au cours de la fermentation des bières

La population totale de levure vivante a été determinée au cours de la fermentation par étalement de 100 µL de bière (incluant les dilutions en série dans de l'eau peptonée stérile) sur milieu gélosé YPD et incubation pendant 48h à 30°C. En considérant la capacité de *S. suaveolens* à utiliser les acides aminés branchés comme seule source de carbone (Grondin *et al.*, 2015b), le dénombrement spécifique des cellules de *S. suaveolens* a été fait en étalant 100 µL d'échantillon de bière (et des dilutions en série dans de l'eau peptonée stérile) sur milieu gelosé YNB-Ile et incubation pendant 48h à 30°C. La population de *S. cerevisiae* a été estimée en soustrayant la population de *S. suaveolens* à la population de levure totale présente dans les échantillons.

4. Détermination des paramètres physicochimiques et des composés non-volatils pendant le procédé de fermentation des bières.

Les solides solubles totaux (°Brix) et le pH ont été mesurés en utilisant un réfractomètre (Euromex) et un pH-mètre portable (Checker by HANNA, HANNA Instruments).

Pour l'analyse de l'éthanol, des sucres et des acides organiques, les échantillons ont été centrifugés et filtrés sur une membrane de 0.45 µm (Sartorius Sedi, Minisart) avant analyse en chromatographie liquide haute performance (CLHP, Ultimate® 3000, Dionex, Thermo Scientific). L'élution a été réalisée de façon isocratique en utilisant H_2SO_4 1.25 mM comme phase mobile à 40°C avec un flux de 0.5 $mL.min^{-1}$ sur une colonne d'exclusion ionique (300 * 7.8mm, Biorad-Aminex HPX-87H 125-0.140). L'éthanol et les sucres ont été détectés à l'aide d'un détecteur à indice de

réfraction (Shimadzu, RID-20A) et les acides organiques ont été détectés à l'aide d'un détecteur à barette de diode (Ultimate 3000, Dionex, Thermo Scientific) à 210 nm. La teneur en éthanol a été confirmée par la conversion de la différence de densité spécifique entre les bières et le moût initial à l'aide d'un densimètre (Brewferm). Comme le sucrose et le maltose co-éluaient avec cette méthode, pour la mesure du sucrose, les échantillons ont été hydrolysés enzymatiquement par mise en contact avec 48 $U.L^{-1}$ d'invertase (SIGMA) pendant 30 min à 30°C avand l'analyse en CLHP. Ensuite, la concentration en glucose des fractions hydrolysées a été comparée à celle des fractions non-hydrolysées pour déterminer les concentrations en sucrose. Les concentrations en maltose ont ensuite été déduites en calculant les différences.

IV. Analyses statistiques

Le calcul des moyennes et des déviations standards (SD) ont été effectuées en se basant sur des triplicatas indépendants. Les résultats sont présentés sous la forme de moyenne ± SD. Les analyses de variance à un niveau de confiance de 95% (ANOVA), les analyses en composantes principales (ACP) ainsi que les analyses de classifications hiérarchiques (ACH) ont été réalisées par l'intermédiaire du logiciel XL Stat Applied Sensory (2020.1.3).

V. Références bibliographiques

Dijken, Bauer, Brambilla, Duboc, Francois, Gancedo, Giuseppin. 2000. "An interlaboratory comparison of physiological andgenetic properties of four *Saccharomyces cerevisiae* strains." *Enzyme and Microbial Technology* 26 (9–10): 706–714.

Grondin E., Shum Cheong Sing A., Caro Y., Raherimandimby M., Randrianierenana A.L., James S., Nueno-Palop C., François J.M. and Petit T.. 2015a. "A comparative study on the potential of epiphytic yeasts isolated from tropical fruits to produce flavoring compounds." *International Journal of Food Microbiology* 203: 101–108.

Grondin E., Shum Cheong Sing A., Caro Y, Billerbeck G.M., François J.M. and Petit T. 2015b. "Physiological and biochemical ccharacteristics of the ethyl tiglate production pathway in the yeast *Saprochaete suaveolens*." *Yeast* 32 (1): 57–66.

Par S. J. and Lee S.Y. 2003. "Identification and characterization of a new enoyl Coenzyme A hydratase involved in biosynthesis of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates in recombinant *Escherichia coli*." *Journal of Bacteriology* 185 (18): 5391–5397.

Patston P.A., Espinal J., Beggs M. and Randle P.J. 1988. "Assay of total complex and activity state of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex and of activator protein in

mitochondria, cells, and tissues." In *Methods in Enzymoloy, Branched-Chain Amino Acids*, 166:175–189.

Caractérisation et valorisation de la production d'arômes par la levure non-conventionnelle *Saprochaete suaveolens* : analyse métabolique de souches sauvages et mutantes et application biotechnologique dans le domaine brassicole

Résumé : La grande diversité des composés d'arômes naturels produits par les levures est aujourd'hui décrite comme une option particulièrement intéressante du fait des métabolismes variés présents chez ces microorganismes et leur capacité à produire un large panel de composés organiques volatils (COVs). Parmi les levures non-*Saccharomyces* citées dans la littérature, la levure *Saprochaete suaveolens* (anciennement connue sous le nom de *Geotrichum fragrans*) se distingue des autres levures aromatiques pour sa haute productivité en COVs tant du point de vue qualitatif que quantitatif. *S. suaveolens* est notamment très prometteuse pour sa production en esters α-insaturés à haute valeur ajoutée, qui sont rarement retrouvés dans les bouquets aromatiques des souches levuriennes à l'instar du tiglate d'éthyle, et produits industriellement par voie synthétique pour le marché des arômes. Le métabolisme aromatique de *S. suaveolens* peut ainsi être perçu comme un modèle pour la production de COVs par les levures. Cette étude avait pour objectif de mieux caractériser et de valoriser la production d'arômes par une souche sauvage de *S. suaveolens* à l'aide de trois approches. La première approche est basée sur l'utilisation des connaissances du métabolisme aromatique de *S. suaveolens* pour développer une méthode de criblage permettant de sélectionner des souches de levure sauvages productrices de COVs, notamment sous forme d'esters α-insaturés. La seconde approche a consisté à optimiser la production d'arômes chez *S. suaveolens* en générant et en sélectionnant des mutants surproduisant des esters insaturés par mutagénèse UV. La dernière approche a permis d'évaluer le pouvoir aromatisant de la levure *S. suaveolens* en condition de fermentation brassicole. Globalement, les résultats de ces travaux ont montré que notre modèle basé sur le métabolisme de *S. suaveolens* a permis d'isoler de nouvelles souches de levures productrices d'esters α-insaturés à partir d'échantillons prélevés sur les déjections d'animaux sauvages en Afrique du Sud. Par ailleurs, l'approche mutagénique a permis de démontrer la possibilité d'améliorer très significativement la production de COVs chez *S. suaveolens* grâce à l'inactivation de l'une des enzymes clées de son métabolisme aromatique, à savoir l'enoyl-CoA hydratase. Enfin, des essais de fabrication de bière ont clairement montré que la levure *S. suaveolens* possède un pouvoir aromatisant particulièrement appréciable dans le cadre de fermentations mixtes de moûts réalisées en condition industrielle en présence de la levure *Saccharomyces cerevisiae.*

Mots-clés : Arômes naturels ; *Saprochaete suaveolens* ; levure non-*Saccharomyces* ; fèces d'animaux sauvages ; mutagenèse UV ; bière ; fermentation-mixte

---

Caracterisation and valorisation of aroma production by the non-conventional yeast *Saprochaete suaveolens*: metabolic analysis of wild and mutant strains and biotechnological application in the brewery field.

Abstract: The huge diversity of natural aroma compounds produced by yeast is described as an option particularly interesting because of the various metabolisms occurring in these microorganisms and their ability of producing a large panel of volatile organic compounds (VOCs). Among the non-*Saccharomyces* yeast cited in the literature, the yeast *Saprochaete suaveolens* (former known as *Geotrichum fragrans*) is distinguishable from the others aromatic yeasts for its high productivity in VOCs both from a quantitative and qualitative point of view. *S. suaveolens* is notably very promising for its production in high valuable α-unsaturated esters such as ethyl tiglate, which are rarely refund in the aromatic bouquet of yeast strains and which are industrially produced by synthetical way for the aroma market. Aromatic metabolism of *S. suaveolens* could therefore be seen as a modele for VOCs production by yeast. This study aimed at better characterizing and valorizing the aroma production by a wild strain of *S. suaveolens* by three approaches. First approach is based on the use of the knowledges on aromatic metabolism of *S. suaveolens* to develop a screening method allowing the selection of natural VOCs producing wild strains, notably under form of α-unsaturated esters. The second approach consisted in optimizing the aroma production by *S. suaveolens* while generating and selecting mutants overproducing unsaturated esters via UV mutagenesis. The last approach allowed evaluating the aromatization power of *S. suaveolens* in brewery fermentation condition. Globally, results of these works have shown that our model based on *S. suaveolens* metabolism allowed isolating news α-unsaturated esters producing strains from samples taken from dejections of wild animals in South-Africa. Moreover, the mutagenic approach allowed demonstrating the possibility of very significantly increasing the overall VOCs production of *S. suaveolens* thank to the inactivation of a key-enzyme of its aromatic metabolism, namely the enoyl-CoA hydratase. Finally, beer making trials clearly showed that *S. suaveolens* posseses an aromatizing power particularly appreciable in the context of mixed fermentation of musts carried out in industrial conditions in the presence of the yeast *Saccharomyces cerevisiae.*

Key-words: Natural aroma; *Saprochaete suaveolens*; non-conventional yeast, wild animal's faeces; UV mutagenesis; beer; mixte-fermentation