

# ẢNH HƯỞNG CỦA VIỆC THAY ĐỔI MÔI TRƯỜNG ÔXY HÓA KHỬ BẰNG SỰC KHÍ ĐẾN TIÊU THỤ ĐƯỜNG Ở NẤM MEN BIA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Impact of Modification of Redox Environment by Gases on Sugar Consumption by the Brewing Yeast *Saccharomyces cerevisiae*

Phạm Thu Hà<sup>1</sup>, Geneviève Mauvais<sup>2</sup>, Catherine Vergoignan<sup>2</sup>, Rémy Cachon<sup>2</sup>, Gilles Feron<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Khoa Công nghệ thực phẩm, Đại học Nông nghiệp Hà Nội, Trâu Quỳ, Gia Lâm, Hà Nội

<sup>2</sup>Laboratoire de Génie des Procédés Microbiologiques et Alimentaires, INRA, 17 rue Sully, F-21065 Dijon, Cộng hoà Pháp

<sup>3</sup>UMR1129 FLAVIC, ENESAD/INRA, Université de Bourgogne, 17 rue Sully, F-21065 Dijon, Cộng hoà Pháp

Địa chỉ email tác giả liên lạc: [phamthuha@hva.edu.vn](mailto:phamthuha@hva.edu.vn)

## TÓM TẮT

Mục đích của nghiên cứu này là xem xét ảnh hưởng của việc thay đổi môi trường oxy hóa khử bằng cách sục các loại khí khác nhau (H<sub>2</sub>, He, O<sub>2</sub> hay không sục khí) đến sự tiêu thụ cơ chất trong quá trình lên men gián đoạn của nấm men bia *Saccharomyces cerevisiae* BRAS 291. Các thông số được theo dõi bao gồm pH, thế oxy hóa khử (Eh), tiêu thụ các loại đường (maltose, maltotriose, glucose và fructose). Việc sục khí đã thay đổi đáng kể Eh của môi trường và dẫn đến ảnh hưởng nhất định đến tiêu thụ cơ chất của nấm men, đặc biệt là tiêu thụ maltose – cơ chất chính trong quá trình lên men bia.

Từ khóa: Lên men bia, *Saccharomyces cerevisiae*, sục khí, tiêu thụ đường, thế oxy hóa khử.

## SUMMARY

The purpose of this study was to investigate the impact of modification of redox environmental (Eh) by different gases (H<sub>2</sub>, He, O<sub>2</sub> or gas-free) on sugar consumption by the brewing yeast *Saccharomyces cerevisiae* BRAS291 during batch fermentation. The different parameters followed were: pH, Eh, consumption of sugars (maltose, maltotriose, glucose and fructose). Gas atmospheres induced strong modification on environmental Eh and sugar consumption by yeast, particularly consumption of maltose – the major substrate of brewing fermentation.

Key words: Brewing fermentation, gases, redox potential, *Saccharomyces cerevisiae*, sugar consumption.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Việc thay đổi các thông số của một quá trình lên men sẽ dẫn đến những thay đổi về chất lượng của sản phẩm nhận được. Quá trình trao đổi chất ở nấm men *S. cerevisiae* bị ảnh hưởng khi thay đổi pH và nồng độ acid citric (Nielsen và Arneborg, 2007) hay

lượng nitơ đồng hóa được trong môi trường (Bohlscheid & cs., 2007). Tương tự, một mô hình động học lên men rượu vang mô tả tương tác nhiệt độ - nồng độ nitơ bổ sung cũng đã được xây dựng để kiểm soát tốt hơn chất lượng lên men (Malherbe & cs., 2004). Việc thêm các trung tâm nhận electron cũng

đã ảnh hưởng đến các sản phẩm phụ của quá trình lên men rượu (Roustan và Sablayrolles, 2002). Thay đổi nồng độ oxy hòa tan trong quá trình lên men rượu vang làm ảnh hưởng đến nồng độ sterol ở nấm men *S. cerevisiae* (Fornairon-Bonnefond & cs., 2003).

So với các thông số môi trường như pH, nhiệt độ, hoạt độ nước, v.v., thế oxy hóa khử (Eh) đã được nghiên cứu từ rất sớm ở vi khuẩn (Andreeva và Rabotnova, 1978). Mới đây, các nghiên cứu về thế oxy hóa khử tập trung chủ yếu vào vi khuẩn *Escherichia coli* (Bagramyan & cs. 2000; Riondet & cs., 2000) và vi khuẩn lactic (Kieronczyk & cs. 2006).

Ở nấm men, có một số nghiên cứu mô tả ảnh hưởng của thế oxy hóa khử đến sinh lý của *S. cerevisiae* (Cachon & cs., 2002), *Yarrowia lipolytica* (Husson & cs., 2006) và gần đây nhất là *Sporidiobolus ruinenii* (Feron & cs., 2007). Các nghiên cứu này cho thấy, Eh môi trường có ảnh hưởng đến sinh lý tế bào và do đó dẫn đến thay đổi quá trình trao đổi chất (TĐC). Với vị trí quan trọng của *S. cerevisiae* trong nhiều quy trình sản xuất thực phẩm khác nhau (rượu, rượu vang, bánh mì, v.v...), việc đánh giá tác động của Eh môi trường đến quá trình TĐC của nấm men này được đặt ra như một vấn đề hết sức quan trọng.

Một trong những kỹ thuật phổ biến để thay đổi Eh môi trường là sử dụng các tác nhân oxy hóa khử bằng các hợp chất hóa học. Các tác nhân phổ biến là dithiothreitol (DTT), potassium ferricyanide ( $\text{FeK}(\text{CN})_6$ ) hay 2,6-dichloroindophenol (DPIP) (Roustan and Sablayrolles, 2003; Husson & cs., 2006). Tuy nhiên, kỹ thuật này chỉ phù hợp trong phòng thí nghiệm, khó áp dụng ở quy mô công nghiệp. Một phương pháp thay đổi Eh môi trường linh hoạt hơn là sử dụng các tác nhân oxy hóa khử bằng các loại khí (nitrogen, oxy, hydro) (Riondet & cs., 2000; Ouvry & cs., 2002; Alwazeer & cs., 2003; Feron & cs., 2007). Kỹ thuật này dễ dàng áp dụng ở quy mô công nghiệp.

Một nghiên cứu trước của nhóm tác giả đã chỉ ra các tác động khác nhau của việc thay đổi Eh môi trường bằng các loại khí khác nhau đến tăng trưởng và hình thái của *S. cerevisiae* (Pham & cs., 2008). Nghiên cứu này sẽ tập trung vào tác động đến trao đổi chất ở nấm men bia tập trung vào sự tiêu thụ đường trong quá trình lên men.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1. Chủng nấm men

Chủng nấm men bia *Saccharomyces cerevisiae* BRAS291 (chủng lên men chìm) được cung cấp từ bộ sưu tập BRAS của Khoa Công nghệ bia và công nghiệp thực phẩm, Trường Đại học Tổng hợp Luvain (Louvain), Vương quốc Bỉ. Chủng được bảo quản ở  $-8^{\circ}\text{C}$  trong dung dịch glycerol 10%, v.v...

### 2.2. Các loại khí sử dụng

Các loại khí nén (oxy, hydro và helium) được cung cấp bởi Air Liquide (France). Độ tinh khiết của các khí này đạt khoảng 99,99%. Hydro và oxy được chọn tương ứng là hai tác nhân khử và oxy hóa. Helium được chọn nhờ tính oxy hóa khử trung tính và tính tương đồng với hydro về kích thước phân tử và khả năng khuếch tán (Air Liquide, 2002).

### 2.3. Các điều kiện lên men

*S. cerevisiae* BRAS291 được nhân giống trong môi trường YPGM (1% w/v yeast extract, 05% w/v peptone, 5% w/v glucose và 5% w/v maltose) ở 28C, khuấy 120 v/p, nuôi cấy trong 24h. Tỷ lệ cấy truyền ban đầu cho lên men là  $1 \times 10^6$  cells/ml. Môi trường lên men là môi trường có thành phần hoàn toàn xác định và tương tự thành phần dịch đường malt trong sản xuất bia (Pham & cs., 2008) trong đó thành phần cơ chất cacbonhydrate bao gồm glucose: 10,4 g/l, fructose: 4,6 g/l, maltotriose: 3,5 g/l và maltose: 115,5 g/l (đường tổng: 134 g/l). Các axit amin cũng

được bổ sung vào môi trường. Lên men được tiến hành với hệ thống lên men gián đoạn BIOSTAT Q ở 28°C, khuấy 120 v/p, lên men trong 13 ngày.

Ba điều kiện sục khí được áp dụng hydro ( $H_2$ ), helium (He) và oxy ( $O_2$ ). Các khí được sục liên tục trong suốt quá trình lên men với lưu lượng là 0,03 vvm (Pham & cs., 2008). Điều kiện kiểm chứng là lên men không sục khí. Giá trị pH của điều kiện sục  $O_2$  được điều chỉnh nhờ hệ thống điều chỉnh pH tự động của hệ thống BIOSTAT Q với dung dịch NaOH 10M. Mục đích là để đạt động thái pH trong suốt quá trình lên men tương tự như trong các điều kiện kiểm chứng và sục khí khác (pH 4,0 trong ngày lên men thứ 2 và pH 3,8 vào cuối quá trình lên men).

Để đo nồng độ oxy hòa tan, thiết bị đo được chuẩn với không khí. Điều kiện kiểm chứng khởi động với 100%  $O_2$  hòa tan, nồng độ này giảm về 0% sau 4h lên men. Các điều kiện  $H_2$  và He khởi động với 0%  $O_2$  hòa tan và điều kiện  $O_2$ : 400%, các giá trị này không đổi trong suốt quá trình lên men.

#### 2.4. Ghi nhận số liệu

Các điện cực đo nhiệt độ, pH (405-DPAS-SC K8S/200, Mettler Toledo SARL, Paris, France), Eh (Pt 4805-DPAS-SC K8S/200, Mettler Toledo SARL, Paris, France) và oxy hòa tan (InPro 6100/1200/T/N, Mettler-Toledo SARL, Paris, France) của từng bình lên men trong hệ thống lên men nhiều bình BIOSTAT Q (B. Braun Biotech International, Melsungen, Germany) được kết nối với bộ ghi nhận cho phép theo dõi đồng thời và hiển thị các giá trị nhiệt độ, pH, thế oxy hóa khử đo ( $E_m$ , mV) và nồng độ  $O_2$  hòa tan của môi trường trong suốt quá trình lên men. Toàn bộ hệ thống được kết nối với máy tính và phần mềm MFCS win 2.0 (B. Braun Biotech International, Melsungen, Germany) cho phép ghi lại tự động các giá trị trên theo thời gian trong suốt quá trình lên men.

Dựa trên giá trị điện cực chuẩn ( $E_{ref}$ ) ở nhiệt độ lên men ( $E_{ref} = 205$  mV), giá trị điện cực đo được ( $E_m$ , so với điện cực Ag/AgCl) được chuyển thành giá trị Eh (thế oxy hóa khử, so với điện cực hydro,  $E_h = E_m + E_{ref}$ ). Từ mối tương quan giữa pH và Eh theo phương trình Nernst, Eh sẽ được quy thành Eh tại pH 7 ( $E_{h_7}$ ) theo phương trình  $E_{h_7} = E_h - \alpha \times (7 - pH_x)$ , trong đó  $\alpha$  là hệ số tương quan Eh - pH được xác định bằng thực nghiệm là 41, 52, 59, 42 tương ứng lần lượt với các điều kiện kiểm chứng,  $H_2$ , He và  $O_2$ ; pH<sub>x</sub> là giá trị pH của môi trường.

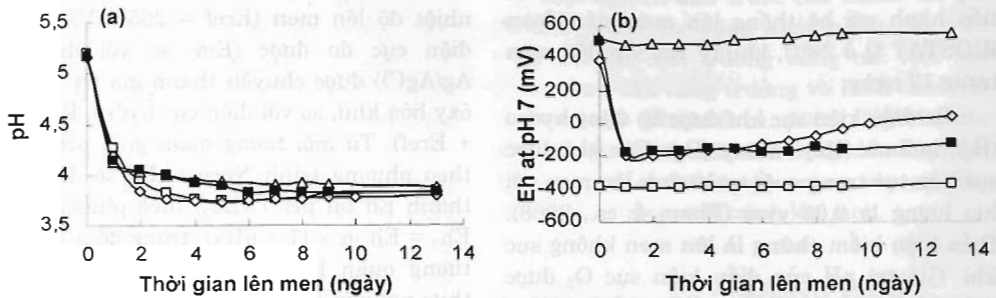
#### 2.5. Xác định nồng độ các loại đường bằng HPLC

Các mẫu canh trường được ly tâm ở 4°C - 5000 g trong 10 phút và dịch trong thu được dùng để xác định nồng độ đường trong dịch lên men. Các loại đường có khả năng lên men được (maltose, glucose, fructose, maltotriose) được xác định bằng hệ thống sắc ký lỏng cao áp HPLC (Merck, France) với cột sắc ký Aminex HPX 87H (Biorad, France). Cột sắc ký được chạy ở 65°C với dung dịch  $H_2SO_4$  0,5 mmol/l với lưu lượng 0,6 ml/p. Thiết bị phát hiện là khúc xạ kế Bischoff IR 8110.

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Ảnh hưởng của việc sục khí đến thay đổi pH và Eh trong quá trình lên men bởi *Saccharomyces cerevisiae*

Thay đổi của pH trong suốt quá trình lên men là tương tự nhau trong các điều kiện khác nhau (Hình 1a). Trên thực tế, nếu không điều chỉnh pH thì trong điều kiện sục  $O_2$ , pH giảm nhanh chóng trong vòng 3 ngày đầu từ 5,2 đến 3,0. Sự giảm pH này dẫn đến tỷ lệ chết của nấm men tăng mạnh (số liệu không biểu diễn). Do đó, để đảm bảo tăng trưởng của nấm men trong điều kiện sục  $O_2$ , pH của môi trường được điều chỉnh để có diễn biến tương tự như các điều kiện lên men khác (xem mục Vật liệu và phương pháp).



**Hình 1. Biến đổi của pH (a) và Eh<sub>7</sub> (b) trong quá trình lên men của *Saccharomyces cerevisiae* BRAS291 trong các điều kiện sức khí khác nhau: hydro (◻); heli (◇); oxy (△); không sức khí (●)**

Số liệu biểu diễn trung bình của 3 thí nghiệm lặp lại độc lập. Sai số không được biểu diễn trên đồ thị để tránh sự rườm rà. Sai số lớn nhất quan sát được với pH là 0,1 đơn vị pH và với Eh<sub>7</sub> là 29 mV

Nhìn chung, pH giảm mạnh trong hai ngày đầu của quá trình lên men, từ 5,2 đến khoảng 3,8 – 4,0 và sau đó ổn định đến cuối quá trình lên men. Diễn biến này phù hợp với diễn biến của pH trong những quá trình lên men bia thông thường (Moll, 1991). Sự giảm pH được giải thích là do sự hình thành CO<sub>2</sub> và một lượng lớn các axit hữu cơ trong quá trình lên men, sự tiêu thụ các ion phosphate trong con đường đường phân, tiêu thụ các ion NH<sub>4</sub><sup>+</sup> và ions K<sup>+</sup> và sự giải phóng các ion H<sup>+</sup> ra môi trường cùng hàng loạt các biến đổi của các axit amin dẫn đến giải phóng glutamate and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ra môi trường (Kunze, 1996). Như vậy, với điều kiện kiểm chứng, việc sức O<sub>2</sub> đã ảnh hưởng mạnh đến pH ngoại bào trong khi H<sub>2</sub> và He không ảnh hưởng đến diễn biến pH của *S. cerevisiae* BRAS291.

Đối với Eh, H<sub>2</sub> (tác nhân khử) and O<sub>2</sub> (tác nhân oxy hóa) cho phép tạo ra và giữ Eh ổn định trong suốt quá trình lên men: -385 mV với H<sub>2</sub> và +515 mV với O<sub>2</sub> (Hình 1b). Trong điều kiện kiểm chứng, Eh giảm mạnh sau ngày đầu tiên từ khoảng +500 mV xuống khoảng -175 mV và sau đó giảm từ từ cho đến cuối quá trình lên men (đạt xấp xỉ -128 mV). Diễn biến tương tự được ghi nhận với

điều kiện He: Eh<sub>7</sub> giảm từ +383 mV đến -195 mV sau 2 ngày đầu lên men và sau đó giảm từ từ và đạt đến +40 mV vào cuối quá trình lên men. Như vậy, 3 mức thế oxy hóa khử đã được tạo ra (i) môi trường oxy hóa mạnh với O<sub>2</sub>: +515 mV; (ii) môi trường khử mạnh với H<sub>2</sub>: -385 mV; và (iii) môi trường từ khử nhẹ với điều kiện kiểm chứng đến xấp xỉ trung tính với He: (-195) – (+40) mV.

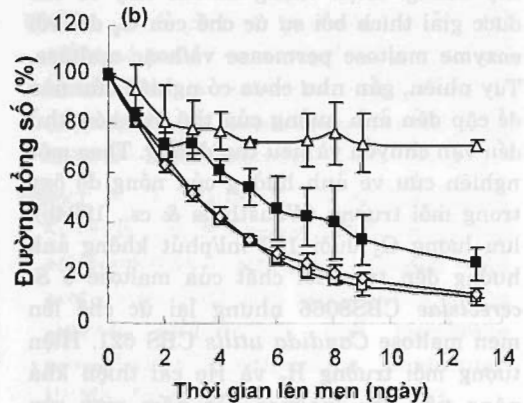
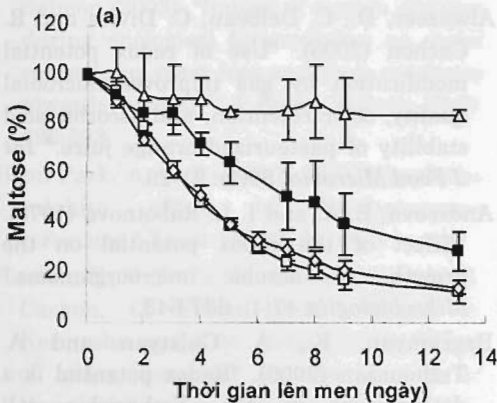
Kết quả này tương tự những kết quả của Roustan và Sablayrolles (2003) nhận được trong quá trình lên men rượu vang bởi *Saccharomyces cerevisiae* K1 ICV-INRA trong điều kiện bổ sung hoặc không bổ sung ferricyanide. Eh (+400 mV ở điều kiện bổ sung ferricyanide và +70 mV ở điều kiện kiểm chứng) giảm liên tục trong pha tăng trưởng (trong khoảng 35 h lên men) và sau đó ổn định ở khoảng giá trị (-100) – (-150) mV trong điều kiện bổ sung ferricyanide và khoảng (-220) – (-250) mV trong điều kiện kiểm chứng đến hết quá trình lên men. Mới đây, Husson và cs. (2006) đã quan sát thấy khi nuôi cấy nấm men *Yarrowia lipolytica* trong điều kiện bổ sung ferricyanide hay không, Eh giảm trong vòng 12 h lên men, sau đó ổn định và tăng nhẹ vào cuối quá trình lên men. Cơ chế thay đổi Eh trong môi

trường nuôi cấy vi sinh vật vẫn chưa được làm sáng tỏ. Tuy nhiên, sự giảm Eh có thể do nấm men tiêu thụ ôxy hòa tan trong môi trường, đồng thời tổng hợp và giải phóng ra môi trường các hợp chất khử như sulphite (Hoon Park, 2000; Ouvry & cs., 2002). Hiện tượng Eh ổn định trong điều kiện He và không sục khí có thể là kết quả của cân bằng các dạng khử và dạng ôxy trong môi trường. Hiện tượng tăng nhẹ của Eh vào cuối quá trình lên men có thể do sự giảm trao đổi chất và nấm men bắt đầu tự phân (Jacob, 1970).

### 3.2. Ảnh hưởng của việc sục khí và thế ôxy hóa khử đến tiêu thụ đường của *Saccharomyces cerevisiae*

Do maltose là cơ chất cacbonhydrate chính trong môi trường lên men (chiếm 82.5% đường tổng) nên diễn biến tiêu thụ đường tổng được quyết định bởi maltose. Các kết quả trình bày trong phần này tập trung chủ yếu vào maltose và đường tổng (Hình 2).

Các đường đơn được nấm men tiêu thụ hoàn toàn sau 3 đến 4 ngày lên men trong mọi điều kiện (số liệu không biểu diễn). Trong điều kiện O<sub>2</sub> (+515 mV), nồng độ maltose giảm nhẹ trong vòng 5 ngày đầu đến 17% so với nồng độ ban đầu và giữ không đổi đến hết quá trình lên men. Trong khi đó, lượng maltose tiêu thụ trong môi trường H<sub>2</sub> (-385 mV) và He (-195) – (+40) mV cao hơn so với điều kiện kiểm chứng (-175) – (-128) mV. Sau 13 ngày lên men, 86% maltose được tiêu thụ trong môi trường H<sub>2</sub> và He so với 72% trong điều kiện kiểm chứng (Hình 2a). Diễn biến tương tự cũng được quan sát thấy với matotriose (số liệu không biểu diễn). Tổng cộng, nấm men tiêu thụ 89% đường tổng số trong điều kiện H<sub>2</sub> (môi trường khử mạnh) và He (môi trường khử nhẹ đến trung tính) so với 76% trong điều kiện kiểm chứng (môi trường khử nhẹ). Ở điều kiện O<sub>2</sub> (môi trường ôxy hóa mạnh), chỉ có 29% lượng đường tổng số ban đầu được tiêu thụ (Hình 2b).



Hình 2. Tiêu thụ maltose (a) và đường tổng số (b) trong quá trình lên men bởi *Saccharomyces cerevisiae* BRAS291 trong các điều kiện môi trường khác nhau: hydro (□); heli (○); ôxy (△); không sục khí (■).

Số liệu biểu diễn giá trị trung bình và sai số từ 3 thí nghiệm lặp lại độc lập

Nhiều nghiên cứu về tiêu thụ đường ở nấm men và tập trung chủ yếu vào glucose và maltose (Lagunas, 1993; van Dijken và cs., 1993; Weusthuis và cs., 1994 a,b; Brondijk và cs., 2001). Ở nấm men, các đường đơn như glucose và fructose được vận chuyển vào tế bào nhờ chênh lệch nồng độ đường trong và ngoài tế bào. Trong khi đó, lên men maltose bởi *S. cerevisiae* đòi hỏi trước hết enzyme maltose permease vận chuyển maltose vào tế bào và tiếp theo là maltase thủy phân maltose thành glucose – đường có khả năng lên men được đối với nấm men. Thêm vào đó, hệ thống vận chuyển maltose là hệ thống kết hợp proton (proton-symport) cần năng lượng trao đổi chất để có thể vận hành được (Lagunas, 1993).

Trong nghiên cứu của chúng tôi, so với điều kiện không sức khí – môi trường khử nhẹ, môi trường từ trung tính đến khử mạnh tạo thành do sức khí He hay H<sub>2</sub> đều tạo thuận lợi cho tiêu thụ maltotriose và maltose của nấm men. Ngược lại, môi trường oxy hóa mạnh tạo thành do sức khí O<sub>2</sub> đã ức chế tiêu thụ chúng. Hiện tượng ức chế này có thể được giải thích bởi sự ức chế của O<sub>2</sub> đối với enzyme maltose permease và/hoặc maltase. Tuy nhiên, gần như chưa có nghiên cứu nào đề cập đến ảnh hưởng của thế oxy hóa khử đến vận chuyển và tiêu thụ đường. Theo một nghiên cứu về ảnh hưởng của nồng độ oxy trong môi trường (Weusthuis & cs., 1994b), lưu lượng O<sub>2</sub> dưới 100 ml/phút không ảnh hưởng đến trao đổi chất của maltose ở *S. cerevisiae* CBS8066 nhưng lại ức chế lên men maltose *Candida utilis* CBS 621. Hiện tượng môi trường H<sub>2</sub> và He cải thiện khả năng tiêu thụ maltose của nấm men còn chưa có lời giải đáp. Nó có thể liên quan đến sự giảm kích thước tế bào nấm men 50% so với trong điều kiện không sức khí (Pham & cs., 2008). Vì diện tích trao đổi giữa môi trường ngoài và trong tế bào tăng khi kích thước tế bào giảm, trao đổi chất của tế bào có thể được cải thiện.

#### 4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã chỉ ra khả năng thay đổi môi trường oxy hóa khử bằng cách sử dụng các loại khí khác nhau như các tác nhân oxy hóa khử ở lưu lượng rất nhỏ (0.03 vvm): (i) môi trường oxy hóa mạnh với O<sub>2</sub>: +515 mV; (ii) môi trường khử mạnh với H<sub>2</sub>: -385 mV; và (iii) môi trường từ khử nhẹ đến xấp xỉ trung tính với không sức khí và He: (-195) – (+40) mV. Sự thay đổi tiêu thụ đường bởi nấm men *S. cerevisiae* BRAS291 bị ảnh hưởng nhiều bởi bản chất khí sử dụng hơn là bởi thế oxy hóa khử của môi trường: so với điều kiện không sức khí – môi trường khử nhẹ, tổng lượng đường tiêu thụ trong môi trường từ trung tính đến khử mạnh tạo thành do sức khí He hay H<sub>2</sub> tăng 13% và trong môi trường oxy hóa mạnh tạo thành do sức khí O<sub>2</sub> giảm 47%.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- AirLiquide (2002). Gas encyclopedia. Amsterdam: Elsevier Science B.V.
- Alwazeer, D., C. Delbeau, C. Divies and R. Cachon (2003). "Use of redox potential modification by gas improves microbial quality, color retention, and ascorbic acid stability of pasteurized orange juice." *Int J Food Microbiol* 89(1): 21-29.
- Andreeva, E. A. and I. L. Rabotnova (1978). "Effect of the redox potential on the growth of aerobic microorganisms." *Mikrobiologiya* 47(4): 637-643.
- Bagramyan, K., A. Galstyan and A. Trchounian (2000). "Redox potential is a determinant in the *Escherichia coli* anaerobic fermentative growth and survival: effects of impermeable oxidant." *Bioelectrochemistry* 51(2): 151-156.
- Bohlscheid, J. C., J. K. Fellman, X. D. Wang, D. Ansen and C. G. Edwards (2007). "The influence of nitrogen and biotin interactions on the performance

- of *Saccharomyces* in alcoholic fermentations." *J. Appl Microbiol* 102(2): 390-400.
- Brondijk, H., W. Konings and B. Poolman (2001). "Regulation of maltose transport in *Saccharomyces cerevisiae*." *Arch Microbiol* 176(1 - 2): 96-105.
- Cachon, R., N. Capelle, C. Divies and L. Prost (2002). Method for culturing microorganisms in reducing condition obtained by a gas stream. World patent 0,202,748, 10 Jan 2002.
- Feron, G., G. Mauvais, J. Lherminier, J. Michel, X.-D. Wang, C. Viel and R. Cachon (2007). "Metabolism of fatty acid in yeast: Addition of reducing agents to the reaction medium influences beta-oxidoreduction activities, gamma-decalactone production and cell ultrastructure in *Sporidiobolus ruinenii* cultivated on ricinoleic acid methyl ester." *Can J Microbiol* 53: 738-749.
- Fornairon-Bonnefond, C., E. Aguera, C. Deytieux, J. M. Sablayrolles and J. M. Salmon (2003). "Impact of oxygen addition during enological fermentation on sterol contents in yeast lees and their reactivity towards oxygen." *J Biosci Bioeng* 95(5): 496-503.
- Hoon Park, A. T. B. (2000). "SSU1 mediates sulphite efflux in *Saccharomyces cerevisiae*." *Yeast* 16(10): 881-888.
- Husson, F., V. P. Tu, M. Santiago-Gomez, R. Cachon, G. Feron, J.-M. Nicaud, S. Kermasha and J.-M. Belin (2006). "Effect of redox potential on the growth of *Yarrowia lipolytica* and the biosynthesis and activity of heterologous hydroperoxide lyase." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, Proceedings of the 7th. International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations* 39(1-4): 179-183.
- Jacob, H.-E. (1970). "Redox Potential." *Methods in Microbiology*, Norris J.R. & Ribbons D.W., Academic Press London & New York 2: 91-123.
- Kieronczyk, A., R. Cachon, G. Feron and M. Yvon (2006). "Addition of oxidizing or reducing agents to the reaction medium influences amino acid conversion to aroma compounds by *Lactococcus lactis*." *J Appl Microbiol* 101(5): 1114-1122.
- Kunze, W. (1996). "Technology of brewing and malting." VLB Berlin Germany.
- Lagunas, R. (1993). "Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*." *FEMS Microbiol Lett* 104(3-4): 229-242.
- Malherbe, S., V. Fromion, N. Hilgert and J. M. Sablayrolles (2004). "Modeling the effects of assimilable nitrogen and temperature on fermentation kinetics in enological conditions." *Biotechnol Bioeng* 86(3): 261-272.
- Moll, M. (1991). "Bières & coolers." *Collection Sciences & Techniques Agro-Alimentaire Tec & Doc - Lavoisier*: 198-199.
- Nielsen, M. K. and N. Arneborg (2007). "The effect of citric acid and pH on growth and metabolism of anaerobic *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii* cultures." *Food Microbiol* 24(1): 101-105.
- Ouvry, A., Y. Wache, R. Tourdot-Marechal, C. Divies and R. Cachon (2002). "Effects of oxidoreduction potential combined with acetic acid, NaCl and temperature on the growth, acidification, and membrane properties of *Lactobacillus plantarum*." *FEMS Microbiol Lett* 214(2): 257-261.
- Pham, T.-H., Mauvais, G., Vergoignan, C., Lherminier, J., Dumont, F., De Coninck, J., Cachon, R., Feron, G. (2008). Gaseous environments modify physiology in the brewing yeast *Saccharomyces cerevisiae* during batch alcoholic fermentation. *J Appl Microbiol*, 105 (3): 858-874.

- Riondet, C., R. Cachon, Y. Wache, G. Alcaraz and C. Divies (2000). "Extracellular oxidoreduction potential modifies carbon and electron flow in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* 182(3): 620-626.
- Roustan, J.-L. and J.-M. Sablayrolles (2003). "Feasibility of measuring ferricyanide reduction by yeasts to estimate their activity during alcoholic fermentation in wine-making conditions." *J Biosci Bioeng* 96(5): 434-437.
- Roustan, J. L. and J. M. Sablayrolles (2002). "Impact of the addition of electron acceptors on the by-products of alcoholic fermentation." *Enz Microb Technol* 31 (1-2): 142-152.
- van Dijken, J. P., R. A. Weusthuis and J. T. Pronk (1993). "Kinetics of growth and sugar consumption in yeasts." *Antonie Van Leeuwenhoek* 63(3-4): 343-352.
- Weusthuis, R. A., J. T. Pronk, P. J. Van den Broek and J. P. Van Dijken (1994a). "Chemostat cultivation as a tool for studies on sugar transport in yeasts." *Microbiol Rev* 58(4): 616-630.
- Weusthuis, R. A., W. Visser, J. T. Pronk, W. A. Scheffers and J. P. van Dijken (1994b). "Effects of oxygen limitation on sugar metabolism in yeasts: a continuous-culture study of the Kluyver effect." *Microbiology* 140(4): 703-715.