

甘肃莫高葡萄酒厂酵母种群的生态分布

徐艳文, 刘爱国, 刘延琳*, 王泽举

(西北农林科技大学葡萄酒学院/陕西省葡萄-葡萄酒工程中心, 陕西杨凌 712100)

摘要: 葡萄酒酵母的菌群组成和多样性对葡萄酒的化学成分和感观特性具有重要贡献, 因此葡萄产区酵母菌的生态研究成为国外近年来的研究热点。应用 WL 营养琼脂培养基聚类分析、26S rRNA 基因序列和 5.8S-ITS 区序列分析对甘肃莫高葡萄酒厂酵母菌群进行研究, 共分离到葡萄酒相关酵母 9 属 10 个种: *Saccharomyces cerevisiae*、*Issatchenkia orientalis*、*Rhodospodidium kratochvilovae*、*Pichia kluyveri* var. *kluyveri*、*Metschnikowia pulcherrima*、*Hanseniaspora uvarum*、*Cryptococcus magnus*、*Pichia fermentans*、*Rhodotorula mucilaginosa*、*Cryptococcus uzbekistanensis*。不同生态条件下的菌群分布各有不同, 在自然发酵过程中出现的菌种有 *M. pulcherrima*、*H. uvarum*、*P. kluyveri* var. *kluyveri* 和 *I. orientalis*。发酵初期 *Metschnikowia pulcherrima* 和 *Hanseniaspora uvarum* 为启动发酵的主要菌群, 3~4d 后至发酵中期 *Saccharomyces cerevisiae* 开始出现并逐渐取代 non-*Saccharomyces*, 随后主导发酵结束。在酒厂设备表面分离到的菌种以 *Rhodotorula mucilaginosa* 和 *Hanseniaspora uvarum* 为主, 分别占到 34% 和 26%, 其次 *C. magnus* 占 16%, *I. orientalis* 占 12%, *Pichia kluyveri* var. *kluyveri* 占 12%。葡萄园土壤中分离到的菌群 *R. mucilaginosa* 占 62.5%、*C. magnus* 占 21%、*S. cerevisiae* 和 *Rhodospodidium kratochvilovae* 分别占 12.5% 和 4%。

关键词: 葡萄酒酵母菌; 26S rRNA 基因序列; 5.8S-ITS 区序列; 酵母生态

文章编号: 1000-0933(2009)06-3090-06 中图分类号: Q145, Q938, TS261.1 文献标识码: A

The ecological population distribution of yeast in Mogao winery of Gansu Province

XU Yan-Wen, LIU Ai-Guo, LIU Yan-Lin*, WANG Ze-Ju

College of Enology, Northwest A & F University/Shaanxi Engineering Research Center for Viti-viniculture, Yangling, Shaanxi 712100, China

Acta Ecologica Sinica, 2009, 29(6): 3090~3095.

Abstract: The population and biodiversity of wine-related yeast can contribute significantly to the chemical composition and the sensory characteristics of wine. Therefore, research on the yeast ecology of viticultural areas has become topic of interest in recent years. The population dynamics of yeast at Mogao winery in Gansu Province was analyzed using WL nutrient medium, 26S rRNA gene D1/D2 domain sequencing, and 5.8S-ITS sequencing. Ten different species belonging to nine different genera were identified, including *Saccharomyces cerevisiae*, *Issatchenkia orientalis*, *Rhodospodidium kratochvilovae*, *Pichia kluyveri* var. *kluyveri*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Hanseniaspora uvarum*, *Cryptococcus magnus*, *Pichia fermentans*, *Rhodotorula mucilaginosa* and *Cryptococcus uzbekistanensis*. Yeast populations during spontaneous fermentation included *M. pulcherrima*, *H. uvarum*, *P. kluyveri* var. *kluyveri* and *I. orientalis*. Early fermentation was dominated by *H. uvarum* and *M. pulcherrima* but later in fermentation the population was replaced by *S. cerevisiae*, which finished the fermentation. *Rhodotorula mucilaginosa* and *Hanseniaspora uvarum* were predominant species presented on the surface of winery equipment, with proportions of 34% and 26% respectively. *C. magnus* (16%), *I. orientalis* (12%), *Pichia kluyveri* var. *kluyveri* (12%) were also found on winery surfaces. The species distribution found in soil consisted of *Rhodotorula mucilaginosa* at 62.5%, *Cryptococcus magnus* at 21%, *S. cerevisiae* at 12.5%, and *R. kratochvilovae* at 4%.

基金项目: 西北农林科技大学青年骨干支持计划资助项目[01140301]; 国家葡萄产业技术体系建设专项资助项目[Z225020801]; 国家“863”资助项目[2007AA10Z314]

收稿日期: 2008-01-03; 修订日期: 2008-06-27

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: lylsun@yahoo.com.cn

Key Words: Wine-related yeasts; 26S rRNA gene sequences; 5.8S-ITS gene sequences; yeast ecology

葡萄酒酿造的酒精发酵是包含了多个酵母菌种及菌株互作生长和发展变化的复杂生态学过程^[1]。在酒精发酵过程中不同的酵母菌代谢葡萄汁中的糖产生挥发类及非挥发类的副产物,特别是由有机酸、高级醇、酯类物质以及低乙醛所组成的发酵香对葡萄酒的香气和风味物质会产生重要的影响^[2,3]。这些酵母菌主要来源于葡萄浆果表面、酒厂设备和酒厂环境以及接种发酵用菌种。根据已有的报道,葡萄浆果的高含糖量促进了发酵型酵母菌如 *Hanseniaspora*、*Candida* 和 *Pichia* 等菌种的生长^[4]。通常是由低发酵力的柠檬形酵母如 *Kloeckera* 和 *Hanseniaspora* 及其它属的酵母 *Candida* 和 *Pichia* 启动发酵,随着发酵过程的进行,酒精耐受力高的酿酒酵母逐步取代非酿酒酵母,进而占据优势,并主导发酵的完成^[5]。而自然发酵过程中酵母菌的出现及其数量受产地、气候条件、年份、葡萄品种、葡萄浆果的成熟度、酒的类型及葡萄酒酿造方式等的影响^[6],其中生态条件的影响最为重要。目前,已报道的国外相关研究工作主要是在不同的葡萄酒产区^[7]以及同一葡萄酒产区不同酒窖和不同年份^[8,9]生态条件下进行的。

世界上一些葡萄产区已开始了自然发酵过程中酵母菌的生态学研究,而我国在酿酒酵母菌的生态研究上只在白酒上有零星的报道^[10,11],葡萄产区酵母菌的生态研究尚属空白。葡萄酒相关酵母迄今为止已发现有 20 多个属的百余种,几乎遍及酵母的主要属种^[12],但尚未有来自我国的系统报道。我国疆域辽阔,从北到南横跨寒温带、温带、亚热带、热带几个气候带,加上山、沟、滩、塬、川均有分布,地形复杂性和气候多样性的生态条件造就了天然的、类型丰富的葡萄栽培区,也势必蕴藏着丰富独特的酵母菌资源。本文通过 WL 培养基聚类分析、26S rDNA D1/D2 区和 5.8S-ITS 区基因序列分析对甘肃莫高葡萄酒厂的土壤、酒厂设备表面和葡萄酒自然发酵过程中的酵母菌分布进行调查,以探明此地区葡萄酒相关酵母的生态规律。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

采集于葡萄园土壤、酒厂设备表面以及自然发酵过程中的菌株共 255 株。

1.1.2 培养基

菌株的分离培养采用 YEPD 培养基(加入 100mg/L 氯霉素抑制细菌生长);菌株的初步形态分类采用 WL 营养培养基^[13,14]。

1.1.3 主要试剂

引物由上海生工生物工程技术有限公司合成,Taq 酶购自 Fermentas(MBI)。

1.2 菌株的分离

取 1L 葡萄醪在无菌玻璃瓶中进行自然发酵,在发酵前中后期取样,采用稀释涂布法接种于 YEPD 培养基上;采集葡萄园土壤和葡萄酒厂设备表面的菌株接种至 YEPD 培养基上。于 28℃ 下培养 3d,随机选择单菌落 25~30 个进行保存。

1.3 菌株的初步形态分类

将保藏的菌株活化后,划线接种于 WL 营养琼脂培养基,28℃ 培养 5d 后,观察记录菌落的颜色和形态。根据菌落不同表现特征对所采集的菌株进行初步分类。

1.4 菌株 26S rDNA D1/D2 区序列和 5.8S-ITS 区序列测定

根据 WL 营养培养基聚类分析结果,随机挑选每一种培养特征的菌株 2~3 株,制备 DNA 粗提液,-20℃ 保藏备用。使用引物 NL1(5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3')和 NL4(5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3')扩增菌株的 26S rRNA D1/D2 区基因^[15]。PCR 循环为:95℃ 5min,94℃ 1min,52℃ 1min,72℃ 1min 20s;循环 36 次;72℃ 8min^[16]。使用引物 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')扩增菌株的 5.8S-ITS 区序列^[17]。

所得产物使用凝胶回收试剂盒进行纯化后,由上海生工生物工程技术有限公司进行测序。

2 结果与分析

2.1 菌株的形态分类

WL 营养培养基是被设计用来监测饮料发酵过程中的微生物类群。Cavazza 和 Pallman^[13,14] 等研究表明,在葡萄酒自然发酵过程中出现的大多数典型的酵母菌种都可以用 WL 营养培养基进行区分,主要基于菌落颜色及菌落形态,并对不同葡萄酒酵母在 WL 营养琼脂上的菌落特征进行了详细的描述。

表 1 莫高酒厂菌株 WL 营养培养基聚类结果

Table 1 The types classed by WL nutrient medium of the stains isolated from MoGao winery

菌株类型 Culture type	菌落颜色及形态描述 Colony color and Colony topography	菌株编号 Strains
I	奶油色、带淡淡的红色、反面棕红色、菌落小、表面突起、面粉状 Cream with hint of red, red brown from bottom, small size, convex, consistency of flour	C32 ~ C38, C81 ~ C83, C281, C276 ~ C279
II	深绿色、边缘泛白、表面平坦、光滑、不透明黄油状 Intense green flat, surface: smooth, opaque consistency of butter	C1 ~ C12, C84 ~ C100, C241 ~ C247, C282 ~ C290, C441 ~ C450, C539 ~ C543, C521 ~ C525, C686 ~ C690
III	中部扁平泛绿、边白色粗糙毛绒状、表面突起、不透明 Center pea-green, chalkiness fringe, nipplelike, opaque	C111 ~ C120, C726 ~ 730, C391 ~ C400, C528-C530,
IV	奶油色到蓝色、呈火山状、具褶皱 Chalkiness to blue, volcanolike, roughness	C248-K, C275, C250
V	奶油色带绿色、球状突起、表面光滑、不透明、奶油状 Cream to green knoblike, surface: smooth, opaque, consistency of cream	C121 ~ C130, C266, C267, C296, C321 ~ C330, C401 ~ C410, C411 ~ C429, C526 ~ C527, C546 ~ C555, C653, C711 ~ C720,
VI	奶油色到蓝色、球状突起、表面光滑、奶油状 Cream to blue, knoblike, surface: smooth, consistency of cream	C67, C68, C268 ~ C271, C292, C297, C544 ~ C550, C644 ~ C646
VII	肉粉色、球形突起、表面粗糙 Pink, convex, consistency of flour	C272, C721 ~ C725
VIII	白色、平坦、具褶皱 Chalkiness, flat, wrinkled, fragrance	C731 ~ C735
IX	红色、表面平坦、粘稠、黄油状 Red knoblike, surface: smooth, mucoid, consistency of butter	C531 ~ C538, C671 ~ C675
X	蓝色、球形突起、干燥、不光滑 Blue, convex, consistency of flour	C654

依据表 1 的菌落颜色及形态记录与 Cavazza 和 Pallman 描述的菌落特征对照,菌落类型 I 为全美梅氏酵母(*Metschnikowia pulcherrima*);菌落类型 II 为葡萄汁有孢汉逊酵母(*Hanseniaspora uvarum*);菌落类型 III 为东方伊萨酵母(*Issatchenkia orientalis*);菌落类型 V 为酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*);菌落类型 VIII 为克鲁维毕赤氏酵母(*Pichia kluyveri* var. *kluyveri*);菌落类型 IV、VI、VII、IX、X 未能鉴定。

2.2 26S rDNA D1/D2 区和 ITS 区序列分析

从每个培养类型中挑取 2~3 个代表性的菌株,使用引物对 NL1 和 NL4 对 26S rDNA D1/D2 区序列进行扩增,测定其片段大小在 490~610bp 之间,共获得 21 个序列。经 BLAST 分析及 26Sr DNA D1/D2 基因序列相似性计算,与莫高酒厂的葡萄酿酒酵母菌 26S rDNA D1/D2 区序列相似性最大的酵母菌见表 2。

C645 与 *F. floriforme*、*F. magnus* 和 *C. magnus* 同源性都为 100%,所以可能为 *F. floriforme*、*F. magnus* 或者 *C. magnus*。对于 26S rDNA 序列分析不能确认的菌株 C645,使用通用引物对 ITS1 和 ITS4 进行 5.8S-ITS 区序列分析,结果表明其片段大小在 603bp, C645 与 *C. magnus* 的 5.8S-ITS 区序列同源性为 100%,为同一物种。经 BLAST 分析及 5.8S-ITS 区序列相似性计算,与 C645 的 5.8S-ITS 区序列相似性最大的酵母菌见表 3。

2.3 自然发酵液菌群特点

本试验通过 A、B、C、D 4 个自然发酵对发酵阶段进行考察,研究表明,自然发酵初期的葡萄酿酒酵母菌主要为 *M. pulcherrima*、*H. uvarum*、*Pichia kluyveri* var. *kluyveri*、*I. orientalis*,其中 *H. uvarum* 在 4 个发酵液的初期都有出现,为启动发酵的最主要菌种。而进行酒精发酵的主要菌种 *S. cerevisiae* 在自然发酵前期并不普遍存在。

自然发酵中期时 *H. uvarum* 比例较初期有所下降甚至不存在,而 *M. pulcherrima* 较初期有所增长,同时 *S. cerevisiae* 也渐渐成为主要发酵动力群体。此后,由于发酵基质中的氧和营养物质被各种酵母菌消耗产生酒精,非酿酒酵母全部死亡,这时 *S. cerevisiae* 为发酵的主要动力群体,主导发酵直至结束(图 1)。

表 2 被测序菌株 26S rDNA D1/D2 片段大小和与相关菌株的同序列相似性
Table 2 The sequenced strains 26S rDNA D1/D2 fragment size and the identity with related yeast

菌株 Strain	PCR 产物 Size(bp)	相关模式菌株 The related members of the family yeast	模式菌株编号* Type strain	相似性 Identity(%)	基因库登录号 GeneBank Accession Number
C296	588	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> U44806	Y-12632NT	100	EF116915
C717	589	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> U44806	Y-12632NT	100	EF116917
C545	575	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> U44806	Y-12632NT	99.5	EU368740
C117	587	<i>Issatchenkia orientalis</i> U76347	Y-5396T	100	EF126358
C396	505	<i>Issatchenkia orientalis</i> U76347	Y-5396T	99.0	EU368742
C120	561	<i>Issatchenkia orientalis</i> U76347	Y-5396T	99.8	EU368743
C272	502	<i>Rhodospiridium kratochvilovae</i> AF444778	PYCC 5580	99.2	EU368744
C722	594	<i>Rhodospiridium kratochvilovae</i> AF444778	PYCC 5580	99.8	EF116918
C721	511	<i>Rhodospiridium kratochvilovae</i> AF444778	PYCC 5580	99.2	EU368745
C732	589	<i>Pichia kluyveri</i> var. <i>kluyveri</i> U75727	Y-11519T	99.8	EF116919
C730	507	<i>Pichia kluyveri</i> var. <i>kluyveri</i> U75727	Y-11519T	99.6	EU368746
C735	504	<i>Pichia kluyveri</i> var. <i>kluyveri</i> U75727	Y-11519T	100	EU368747
C654	610	<i>Cryptococcus uzbekistanensis</i> AF181508	CBS 8683T	99.4	EF116916
C84	595	<i>Hanseniaspora uvarum</i> U84229	Y-1614T	100	EF116914
C541	569	<i>Hanseniaspora uvarum</i> U84229	Y-1614T	99.8	EU368748
C100	573	<i>Hanseniaspora uvarum</i> U84229	Y-1614T	100	EU368749
		<i>Filobasidium floriforme</i> AF075498	CBS 6241T	100	
C645	606	<i>Cryptococcus magnus</i> AF181851	CBS 140 T	100	EF126359
		<i>Filobasidium elegans</i> AF181548	CBS 7640	100	
C83	495	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> U45736	Y-7111 T	100	EU368752
C248-K	505	<i>Pichia fermentans</i> U75726	Y-1619T	99.0	EU368741
C672	505	<i>R. mucilaginosa</i> AF070432	CBS316 T	99.6	EU368750
C534	581	<i>R. mucilaginosa</i> AF070432	CBS316 T	99.8	EU368751

* T = 模式菌株; NT = 新型菌株; CBS: 霉菌中心保藏所, 荷兰 T = type strain; NT = neotype strain; CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Delft/Baarn, The Netherlands

表 3 被测序菌株 5.8S-ITS 区片段大小和与相关菌株的序列相似性
Table 3 The sequenced strains 5.8S-ITS fragment size and identity with related yeast

菌株 Strain	PCR 产物 Size(bp)	相关模式菌株 The related members of the family yeast	模式菌株编号 Type strain	相似性 Identity(%)	基因库登录号 GeneBank Accession Number
C645	603	<i>Cryptococcus magnus</i> AF190008	CBS 140 T	100	EF126366

2.4 土壤及发酵设备菌群特点

葡萄在秋季成熟后易从枝条上脱落下来,流出果汁,酵母随果汁一起进入土壤,因此在葡萄园的土壤中常检出酵母。本试验从葡萄园土样中所分离的酵母菌共 24 株,其中 *C. magnus* 和 *R. mucilaginosa* 为主要的菌种,各占 62.5% 和 21%,其次 *S. cerevisiae* 占 12.5%,*Rhodospiridium kratochvilovae* 所占比例最小,为 4%。在酿酒设备上所分离的 43 株菌,主要为 *R. mucilaginosa*、*H. uvarum*、*C. magnus*、*I. orientalis*、*Pichia kluyveri* var. *kluyveri*,所占比例分别为 34%、26%、16%、12% 和 12%。

3 讨论

本研究在自然发酵中发酵初期监测到启动发酵的菌种有 *H. uvarum*、*M. pulcherrima*、*Pichia kluyveri* var.

kluyveri、*I. orientalis*, 其中 *H. uvarum*、*M. pulcherrima* 为启动发酵的主要群体, 3~4d 后到发酵中期这些菌群开始减少和死亡, 同时 *S. cerevisiae* 由于其良好的酒精耐受性而开始在发酵液中生长。并在发酵末期成为主要发酵动力菌群主导发酵结束。本次研究没有监测到在国外葡萄酒产区自然发酵中常有出现的菌种 *S. bayanus*、*T. delbrueckii*、*C. stellata*, 而不常出现的 *I. orientalis* 却普遍存在。与国外研究结果^[18,19] 有所不同的主要原因是发酵过程中菌群的组成以及更替顺序, 受葡萄产地的气候、葡萄浆果的成熟度、葡萄园的管理情况和发酵工艺的影响^[20]。本研究中自然发酵初期的主要菌种是 *H. uvarum*、*M. pulcherrima*。广泛研究报道 *H. uvarum* 是新鲜葡萄汁中常有出现的菌种, 它能够产生一些挥发性的物质, 如乙醇、挥发酸、酯类、甘油等以及低的醋酸, 可用在葡萄酒的发酵中来增加葡萄酒风味的复杂性^[21]。*M. pulcherrima*、*Pichia kluyveri* var. *kluyveri* 也是新鲜发酵汁中常有出现的菌种。Pitt 和 Hocking 认为 *I. orientalis* 是发酵食品中引起食品腐败的 10 个酵母种之一^[22]。而 Clemente-Jimenez 在 2004 年研究报道指出 *I. orientalis* 是能够在 *S. cerevisiae* 和 *H. uvarum* 之后产生大量的高级醇, 并能够产生少量的乙醛, 可以用在酒精发酵过程的适当阶段^[23]。黄国清等从杨梅果肉中分离出来一株东方伊萨酵母(*I. orientalis*), 该酵母能进行柠檬酸-乙醇发酵, 将果汁中的柠檬酸降解为乙醇, 在降酸培养基中的降酸总量高达 90% 以上, 可用于果酒的降酸发酵^[24]。自然发酵中出现的 *S. cerevisiae* 很少能够从葡萄浆果表面和葡萄园土壤中分离到。它们在发酵过程中的出现与人为的环境如葡萄酒厂和发酵设备相关。Le Jeune 的研究报道指出自然发酵中出现的 *S. cerevisiae* 来源于葡萄园和酒窖环境^[25]。

近年来许多国家如西班牙、葡萄牙、希腊、匈牙利和意大利对自然发酵中菌种多样性都进行了研究, 但有关酒厂设备表面菌种多样性研究还很少。已有的研究报道指出 *S. cerevisiae*、*Hanseniaspora*、*Pichia*、*Candida* 和其他一些零星的酵母出现在酒厂设备表面^[26,27]。通常 *S. cerevisiae* 被认为是酒厂酿酒设备上存在的主要菌种^[28,29]。本研究在酿酒设备表面分离到的菌株有 *R. mucilaginosa*、*H. uvarum*、*C. magnus*、*I. orientalis* 和 *Pichia kluyveri* var. *kluyveri* 几个种, 但没有分离到 *S. cerevisiae*, 说明 *S. cerevisiae* 还没有成为该酒厂的主宰菌群, 该酒厂尚未受到商业进口工业酵母的影响或影响尚十分轻微, 因而是调查与研究葡萄酿酒酵母生物多样性的理想环境, 对该区域酵母菌的研究更有实际意义。而在设备上分离到的东方伊萨酵母(*I. orientalis*) 至今还没有相关的报道。目前已有的少量的研究报道, 在不同发酵阶段中曾分离到 *I. orientalis*^[3, 14, 23, 28]。葡萄酒相关酵母菌群组成及菌种的差异与生态条件有着密切的关系。

探明发酵过程中的菌群变化规律对葡萄酒的生产具有积极意义, 但有关发酵过程中不同的菌株产生不同的次生代谢产物对葡萄酒的化学成分和感观特性产生的影响还需进一步研究。

References:

- [1] Fleet G H, Heard G M. Yeasts-growth during fermentations in Wine. In: Fleet G. H ed. Microbiology and Biotechnology. Harwood Academic Pubs. Australia, 1993. 27-54.
- [2] Romano P, Fiore C, Paraggio M, et al. Function of yeast species and strains in wine flavour. International Journal of Food Microbiology, 2003, 86: 169-180.
- [3] Combina B M, Elfaa A, Mercado L, et al. Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. International Journal of Food Microbiology, 2005, 99: 237-243.

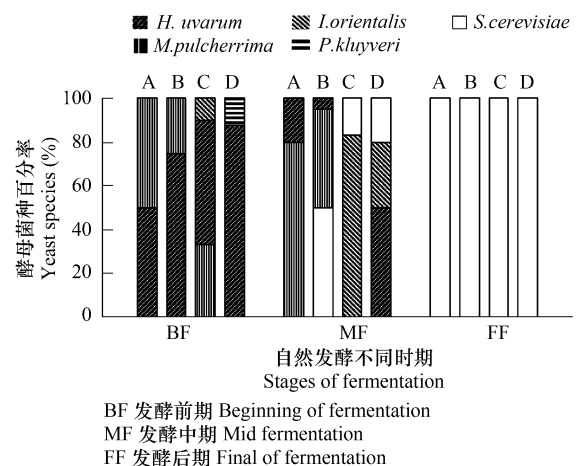


图1 自然发酵过程中前、中、后期菌群变化

Fig. 1 Biodiversity of yeast species during spontaneous fermentations
BF: 发酵前期; MF: 发酵中期; FF: 发酵后期 BF: Beginning of fermentation; MF: mid fermentation; FF: final of fermentation

- [4] Sabate J, Cano J, Esteve-Zarzoso B, *et al.* Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. *Microbiol. Res*, 2002, 157: 267 – 274.
- [5] Romano P, Suzzi G, Domizio P, *et al.* Secondary products formation as a tool for discriminating non-Saccharomyces wine strain. *Antonie Leeuwenhoek*, 1997, 71: 239 – 242.
- [6] Di Maro E, Ercolini D, Coppola S. Yeast dynamics during spontaneous wine fermentation of the Catalanese grape. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 117: 201 – 210.
- [7] Torija M J, Rozès N, Poblet M, *et al.* Yeast population dynamics in spontaneous fermentations; Comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2001, 79: 345 – 352.
- [8] Nurgel C, Erten H, Canbas A, *et al.* Yeast flora during the fermentation of wines made from *Vitis vinifera* L. cv. Emir and Kalecik Karasi grown in Anatolia. *Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2005, 21: 1187 – 1194.
- [9] Mercado L, Dalcerro A, Masuella R, *et al.* Diversity of Saccharomyces strains on grapes and winery surfaces; Analysis of their contribution to fermentative flora of Malbec wine from Mendoza (Argentina) during two consecutive years. *Food Microbiology*, 2007, 24: 403 – 412.
- [10] Qiao Z W, Zhang W X, Zhang L Y, *et al.* Analysis on microbes in brewing mass of strong aromatic spirits during fermentation. *Liquor Making*, 2005, 32 (1): 18 – 22.
- [11] Li G H. The study of the pH kind cluster of the distilled spirit yeast fungus. *Liquor-making*, 2005, 32 (1): 25 – 27.
- [12] Zhang C H, Li H. *Enological Microbiology*. Xian: Shaanxi People's Press, 2003.
- [13] Cavazza A, Grando M S, Zini C. Rilevazione della flora microbica dimosti evini. *Vignevini*, 1992, 9: 17 – 20.
- [14] Pallmann C L, Brown J A, Olineka T L, *et al.* Use of WL medium to profile native flora fermentations. *Am. J. Enol. Vitic*, 2001, 52 (3): 198 – 203.
- [15] O'Donnell, K. Fusarium and its near relatives. In: Reynolds D R and Taylor J W ed. *The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics*. CAB International, Wallingford, UK, 1993. 225 – 233.
- [16] Xu Y W, Yang Y, Xue J X, *et al.* 26S rDNA RFLP analysis as a tool to characterize non-Saccharomyces yeasts. *Journal of Microbiology*, 2007, 27 (4): 23 – 27.
- [17] White T J, Bruns T, Lee S, *et al.* PCR protocols. A guide to methods and applications. In: Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, *et al.* eds. *Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics*. San Diego: Academic Press, 1990. 315 – 322.
- [18] Longo E, Casado J, Agrelo D, *et al.* Effect of climatic conditions on yeast diversity in grape must from Northwest Spain. *Am. J. Enol. Vitic*, 1991, 42: 141 – 144.
- [19] Pardo I, Garcia M J, Zungina M, *et al.* Dynamics of microbial populations during fermentation of wines from the Utiel-Requena region of Spain. *Appl. Environ. Microbiol*, 1989, 55: 539 – 541.
- [20] Guillamon J M, Sabate J, Barrio E, *et al.* Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal ITS regions. *Arch Microbiol*, 1998, 169: 387 – 392.
- [21] Paraggio M. Biodiversity of a natural population of *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniopsis uvarum* from Aglianico del Vulture. *Food Technology and Biotechnology*, 2004, 42 (3): 165 – 168.
- [22] Clemente-Jimenez J M, Mingorance-Cazorla L, Martinez-Rodriguez S, *et al.* Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. *Food Microbiology*, 2004, 21: 149 – 155.
- [23] Pitt J I, Hocking A D. *Fungi and food spoilage*. Academic Press, 1985.
- [24] Huang G Q, Zhong R M, Xiao Z J. Application of a drop acid of yeast in Yangmei wine brewing. China. ShaoGuan University, 2007.
- [25] Le Jeune C, Erny C, Demuyter C, *et al.* Evolution of the population of *Saccharomyces cerevisiae* from grape to wine in a spontaneous fermentation. *Food Microbiology*, 2006, 23: 709 – 716.
- [26] Ciani M, Mannazzu I, Marinangeli P, *et al.* Contribution of winery-resident *Saccharomyces cerevisiae* strains to spontaneous grape must fermentation. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2004, 85: 159 – 164.
- [27] Sabate J, Cano J, Esteve-Zarzoso B, *et al.* Isolation and identification of yeasts associated with vineyard winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. *Microbiology Research*, 2002, 157: 1 – 8.
- [28] Santamaría P, Garijo P, López R, *et al.* Analysis of yeast population during spontaneous fermentation. Effect of the age of the cellar and the practice of inoculation. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 103: 49 – 56.
- [29] Sangorrín M P, Lopes C A, Giraudo M R, *et al.* Diversity and killer behaviour of indigenous yeasts isolated from the fermentation vat surfaces in four Patagonian wineries. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 119: 351 – 357.

参考文献:

- [10] 乔宗伟, 张文学, 张丽莺, 等. 浓香型白酒发酵过程中酒醅的微生物区系分析. *酿酒科技*, 2005, 32 (1): 18 ~ 22.
- [11] 李光辉. 白酒酵母的 pH 种群研究. *酿酒*, 2005, 32 (1): 25 ~ 27.
- [12] 张春晖, 李华著. *葡萄酒微生物学*. 西安: 陕西人民出版社, 2003.
- [16] 徐艳文, 杨莹, 薛军侠, 等. 26S rDNA ~ RFLP 分析在非酿酒酵母菌分类研究中的应用. *微生物学杂志*, 2007, 27 (4): 23 ~ 27.
- [24] 黄国清, 钟瑞敏, 肖子君. 一种降酸酵母及其在杨梅果酒酿造中的应用. *中国韶关学院*, 2007.