

doi:10.6041/j.issn.1000-1298.2013.12.031

# 产香酵母分离鉴定与苹果酒发酵中的应用\*

叶萌祺 袁亚宏 岳田利 甄 帆

(西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西杨凌 712100)

**摘要:** 为获得可用于苹果酒发酵的产香酵母,提高苹果酒的香气质量,采集苹果果库空气样和苹果样品,经分离纯化、产酯试验筛选得到6株具有产香能力的酵母,对其进行形态观察及相关生理生化特性研究,对ITS rDNA序列进行扩增和克隆测序,结合与标准菌株的ITS同源性分析和系统发育树的构建,明确了6株分离菌株的遗传学位置,其中菌株YN6被鉴定为*Wickerhamomyces anomalus*,该菌株产香能力较强,且能提高苹果酒的感官质量。苹果酒的GC-MS分析结果表明,与对照菌株WLS21独立发酵结果相比,接种YN6混合发酵后,主要挥发性香气物质的质量浓度由248.09 mg/L提高到496.14 mg/L。

**关键词:** 产酯酵母 分离鉴定 ITS序列 苹果酒 挥发性成分

中图分类号: TS261.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2013)12-0187-06

## Isolation and Identification of Aroma-producing Yeasts and Its Application in Cider Fermentation

Ye Mengqi Yuan Yahong Yue Tianli Zhen Zhen

(College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** Air samples were taken from an apple granary in order to find aroma-producing yeasts for cider fermentation. After performing separation, purification and ester production tests, six yeasts were obtained, which showed ester-producing abilities. The colony morphology, cell morphology, liquid cultural characteristics, physiological and biochemical characteristics and ITS complete sequences of the six tested yeasts were analyzed. The six yeast stains were identified by sequence homology comparison with known sequences in GenBank and by constructing phylogenetic tree. Among the six yeasts, the strain YN6 identified as *Wickerhamomyces anomalus*, had the strongest aroma-producing ability, and could improve the sensory quality of cider. The results of GC-MS showed that, the cider the amounts of volatile compounds in the cider fermented by control cider yeast WLS21 was 248.09 mg/L. But when mixed with YN6, the volatile compounds increased to 496.14 mg/L.

**Key words:** Ester-producing yeasts Isolation and identification ITS sequence Cider Volatile compounds

### 引言

产香酵母,又称产酯酵母,是一类能产生挥发性香味物质的非酿酒酵母。此类酵母在白酒、葡萄酒、黄酒、食醋、酱油和香精香料等行业的应用已有较多

研究<sup>[1-8]</sup>,尤其是近年来对各种酒类的研究发现,产香酵母能分泌葡萄糖苷酶、蛋白酶、果胶酶以及脂肪水解酶等酶类,从而在代谢过程中产生大量的酯类和醇类等香味物质,使酒体协调,赋予酒体浓郁的发酵香味,提高产品质量<sup>[9-11]</sup>。将其与酿酒酵母混合

收稿日期: 2013-07-02 修回日期: 2013-07-15

\*“十二五”国家科技支撑计划资助项目(2012BAD31B01)、国家自然科学基金资助项目(31071550)和农业部“948”资助项目(2011-G8-3)

作者简介: 叶萌祺,博士生,主要从事食品发酵工程研究,E-mail: yemengqi@nwsuaf.edu.cn

通讯作者: 岳田利,教授,博士生导师,主要从事食品生物技术及食品安全控制研究,E-mail: yuetl@nwsuaf.edu.cn

构成发酵菌群,是目前的研究热点<sup>[12-13]</sup>。

随着我国苹果产业的不断发展,苹果酒成为果酒行业的新贵<sup>[14]</sup>。苹果酒营养丰富,风味独特,具有很好的保健作用,发展苹果酒产业具有广阔的市场前景。苹果酒产业在我国起步相对较晚,生产工艺尚不成熟,且发酵用的菌种大多直接使用葡萄酒活性干酵母,缺乏专一性,造成产品同质化现象严重,而大自然的野生酵母资源却没有得到充分的利用。因此,产香酵母的开发将是苹果酒产业的一个重要研究方向。

本文从苹果果库中采集空气样和不同品种的苹果样品,对产香酵母进行分离纯化,对得到的菌株进行形态观察及生理生化特性研究,结合 ITS 序列鉴定及系统发育树的构建,对分离菌株进行种属鉴定;将其应用于苹果酒发酵,筛选出产香性能优良的菌株,研究其产香特性。

## 1 材料与方 法

### 1.1 样 品

采自西北农林科技大学食品学院苹果贮藏库。

空气样品采集:将事先准备好的 YPD 固体培养基平板按照五点采样法放置在果库中,打开培养皿盖,在空气中放置 10 min,每个采样点设重复采样皿和空白对照皿各 1 个,收集后的样品立即带回实验室处理。

苹果样品采集:从果库中选取红富士、黄元帅和秦冠 3 个品种的健康果子各 2 kg,装入无菌自封袋中,迅速带回进行处理。

### 1.2 菌种和培养基

菌种:苹果酒酵母 WLS21,西北农林科技大学发酵动力学实验室保存。

YPD 培养基:酵母浸粉 10 g/L,蛋白胨 20 g/L,葡萄糖 20 g/L(固体培养基加入琼脂粉 15~20 g/L)。

PDA 培养基:马铃薯 200 g/L,葡萄糖 20 g/L,琼脂 15~20 g/L。

产酯培养基:葡萄糖 50 g/L,用 100 g/L 豆芽汁配置,分装于 50 mL 三角瓶中,每瓶 20 mL,115℃ 灭菌。

苹果酒发酵培养基:浓缩苹果汁稀释至 22°Brix,100℃ 灭菌 15 min。

### 1.3 主要仪器和设备

HH-6 型恒温水浴锅(上海福玛实验设备有限公司),HWS-80 型智能恒温恒湿箱(宁波海曙赛福实验仪器厂),HC-3018R 型高速冷冻离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司),CX31 型显微镜(日本奥林巴斯),PCR 反应扩增仪(加拿大 BBI 公司),

DYY-8 型稳压稳流电泳仪(上海琪特分析仪器有限公司),凝胶成像系统(美国 Gene Genius 公司),移液器(德国 Eppendorf 公司),Trace DSQ 气象色谱-质谱联用仪(美国热电公司)。

### 1.4 酵母菌的分离与纯化

#### 1.4.1 空气样品中酵母菌的分离纯化

将采集样品的平皿置于 28℃ 恒温培养箱中培养 2~4 d,挑取不同形态的单菌落反复多次划线进行分离纯化。

#### 1.4.2 苹果样品中酵母的分离纯化

在无菌条件下,取适量苹果皮加入盛有 100 mL YPD 液体培养基的 250 mL 三角瓶中,28℃,150 r/min,摇床培养 1~2 d 进行富集,将培养液逐级稀释,取合适的梯度涂布于添加青霉素的 YPD 培养基平板上。置于 28℃ 恒温培养箱中培养 2~4 d,挑取单菌落反复多次划线分离纯化。

经过多次分离纯化,得到典型酵母菌种,保藏于 YPD 斜面上。

### 1.5 产香酵母的筛选

将分离得到的酵母菌株分别接入产酯培养基中进行产酯试验,28℃ 培养 2~4 d,筛选出风味柔和、有发酵香气的菌株。

### 1.6 酵母菌的形态观察及生理生化特性

选取培养 24 h 的酵母菌纯培养物,对其进行细胞形态、菌落培养特征、假菌丝和子囊孢子观察<sup>[15-16]</sup>;并进行碳源同化试验、氮源同化试验、硝酸盐还原试验、石蕊牛乳试验、明胶液化试验和尿素分解试验等生理生化试验<sup>[15-16]</sup>。

### 1.7 ITS rDNA 序列鉴定

#### 1.7.1 模板 DNA 的提取

根据生工 SK1375 真菌基因组 DNA 抽提试剂盒说明书提取酵母菌的 DNA。

#### 1.7.2 ITS rDNA 的 PCR 扩增及切胶纯化

PCR 扩增引物为:上游引物 ITS1:5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3',下游引物 ITS4:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3',由上海生工生物工程股份有限公司合成。

PCR 反应体系(25 μL):模板 DNA 1 μL,引物 ITS1/ITS4 (10 μmol/L)各 0.5 μL,dNTP mix (10Mm each) 0.5 μL,10×Taq Reaction Buffer 2.5 μL,Taq 酶(5 U/μL)0.2 μL,加双蒸水至 25 μL。

PCR 反应程序:预变性 94℃、5 min;循环:变性 94℃、30 s,退火 55℃、35 s,延伸 72℃、1 min,35 个循环,延伸 8 min。

用质量分数为 2% 的琼脂糖凝胶电泳对 PCR 扩增产物进行检测,使用上海生工的 UNIQ-10 柱式

PCR 产物回收试剂盒对 PCR 产物进行纯化。

### 1.7.3 目的片段 TA 克隆、连接产物转化以及蓝白斑筛选

使用上海生工的 T-载体 PCR 产物克隆试剂盒对 PCR 产物进行 pUCm-T 克隆连接,再用 SK2301 一步法制备高效感受态细胞试剂盒进行产物转化。选择 IPTG/X-gal 平板上生长的白色菌落,用牙签挑至含有氨苄青霉素的液体培养基,37℃ 培养过夜。

### 1.7.4 质粒提取及 DNA 测序

使用上海生工的质粒提取试剂盒 SK1191 UNIQ-10 柱式质粒小量抽提试剂盒提取 DNA,交由上海生工生物工程股份有限公司进行序列测定。

### 1.7.5 ITS rDNA 序列同源性分析及系统发育树的构建

测序获得 ITS rDNA 片段的基因序列,通过 NCBI 的 BLAST 比对,获得同源性较高的已知标准菌株信息,利用 Mega 5.1 软件进行多序列比对分析及系统发育树的构建。

## 1.8 苹果酒的酿造

将分离得到的产香酵母与实验室保存的苹果酒酵母 WLS21 同时接种到发酵培养基进行苹果酒的

混合发酵,测定苹果酒的总酯含量以及总酸含量、pH 值和可溶性固形物等基本理化指标<sup>[17-18]</sup>;挥发性香气成分的测定采用 SPME-GC-MS 的方法<sup>[19]</sup>,以 WLS21 酵母单独发酵的苹果酒作为对照。

## 1.9 苹果酒的感官评定

采用百分制法,由 15 名具有相关经验并经过培训的专家组成感官评定小组,从外观(20 分)、香气(30 分)、滋味(40 分)、典型性(10 分)4 个方面分别对各个酒样进行感官评定,酒样的得分为 4 项得分之和<sup>[18,20]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 酵母菌的分离纯化和产香酵母的筛选

从苹果样品和果库空气样品共分离得到 18 株具有代表性的典型酵母菌株。将各菌株接入产酯培养基中,经 28℃、5 d 培养,筛选到 6 株酵母的培养液有较好的香味,初步确定其为产香酵母,编号分别为 YN1、YN2、YN3、YN4、YN5、YN6。

### 2.2 酵母菌的形态观察

对 6 株产香酵母的菌落形态、细胞形态、繁殖方式以及液体培养特征进行观察,结果如表 1 所示。

表 1 分离菌株的形态、繁殖方式及液体培养特征鉴定结果

Tab. 1 Identification of morphology, reductive pattern and cultural characteristics of tested yeasts

菌种 编号	菌落形态					细胞形态			繁殖方式		液体培养特征			
	形状	侧面	边缘	颜色	表面	形状	大小/nm	假菌丝	无性繁殖	子囊孢子	清浊	菌蹼	气泡	沉淀
YN1	圆形	突起	整齐	淡黄	水样	椭圆	2~3	有	两端芽殖	有	浊	无	无	有
YN2	圆形	突起	整齐	白色	水样	椭圆	2~4	无	周身芽殖	有	清	无	无	有
YN3	圆形	突起	整齐	白色	水样	卵圆	2~3	无	周身芽殖	有	浊	无	无	有
YN4	圆形	突起	整齐	白色	蜡样	卵圆	2~5	有	周身芽殖	无	浊	有	有	有
YN5	圆形	突起	整齐	粉白	蜡样	卵圆	3~6	有	周身芽殖	无	浊	有	有	有
YN6	圆形	突起	整齐	白色	蜡样	椭圆	2~4	有	周身芽殖	有	浊	有	有	有

### 2.3 生理生化特性研究结果

对分离菌株进行生理生化特性研究,结果如表 2~5 所示。

从表 2 和表 3 可以看出,所有分离菌株均能同化碳源葡萄糖、蔗糖和果糖,均不能同化乳糖、肌醇、木糖醇、阿拉伯醇、柠檬酸和苹果酸;所有菌株均能同化氮源  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 。从石蕊牛乳试验的结果(表 4)可以看出,菌株 YN1、YN2、YN3 可产生凝乳酶使凝乳蛋白凝固,菌种 YN4、YN5、YN6 可以代谢产生碱类物质,使石蕊颜色变成蓝色。此外,在硝酸盐还原试验、明胶水解等试验中(表 5),所有分离菌株表现出一致的性状。

## 2.4 ITS rDNA 序列鉴定

### 2.4.1 PCR 产物电泳结果

以 ITS1 和 ITS4 为扩增引物对分离菌株的模板

DNA 进行特异性扩增得到各分离菌株 ITS rDNA 序列,PCR 产物经电泳检测可知片段长度为 607 ~ 842 bp(碱基对)左右,如图 1 所示。

### 2.4.2 ITS rDNA 序列同源性分析及系统发育树的构建

对所有菌株的 ITS rDNA 片段的基因序列进行克隆测序,将其与 Genbank 数据库中已知标准酵母菌 ITS 基因序列进行比对,结合构建系统发育树的结果可知,YN1、YN4、YN6 与标准菌株 GQ376076.1 的 ITS 同源性大于 99%,判定为 *Wickerhamomyces anomalus*,菌株 YN2、YN3 与标准菌株 KC183729.1 的 ITS 同源性大于 99%,判定为 *Saccharomyces cerevisiae*,YN5 与标准菌株 AY939792.1 的 ITS 同源性大于 99%,判定为一株 *Pichia guilliermondii*。

表2 分离菌株的碳源同化特性

Tab.2 Carbon assimilation characteristics of tested yeasts

碳源	菌株编号					
	YN1	YN2	YN3	YN4	YN5	YN6
葡萄糖	+	+	+	+	+	+
乳糖	-	-	-	-	-	-
麦芽糖	-	+	+	+	+	+
蔗糖	+	+	+	+	+	+
酒石酸钠	-	-	-	-	-	-
果糖	+	+	+	+	+	+
淀粉	+	-	-	+	-	-
D-山梨醇	-	-	-	-	-	-
D-甘露醇	+	-	-	-	-	-
肌醇	-	-	-	-	-	-
木糖醇	-	-	-	-	-	-
阿拉伯糖	-	-	-	-	-	-
柠檬酸	-	-	-	-	-	-
乙酸	-	-	-	+	+	+
苹果酸	-	-	-	-	-	-

注：“+”表示可同化，“-”表示不可同化。

表3 分离菌株的氮源同化特性

Tab.3 Nitrogen assimilation characteristics of tested yeasts

氮源	菌株编号					
	YN1	YN2	YN3	YN4	YN5	YN6
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	+	+	+	+	+	+
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	+	+	+	+	+
KNO <sub>3</sub>	-	-	-	+	+	+
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	-	+	+	+

注：“+”表示可同化，“-”表示不可同化。

表4 分离菌株的石蕊牛乳试验特性

Tab.4 Litmus milk tests of tested yeasts

现象	菌株编号					
	YN1	YN2	YN3	YN4	YN5	YN6
颜色反应	淡紫	淡紫	淡紫	蓝	蓝	蓝
凝乳	+	+	+	-	-	-
胨化	-	-	-	-	-	-
酸凝固	-	-	-	-	-	-
氧化还原	-	-	-	白色	白色	白色

注：“+”表示阳性，“-”表示阴性。

表5 分离菌株的其他生理生化特性

Tab.5 Other biochemical properties of tested yeasts

项目	菌株编号					
	YN1	YN2	YN3	YN4	YN5	YN6
硝酸盐还原试验	+	+	+	+	+	+
产氨试验	-	-	-	-	-	-
脲酶试验	-	-	-	-	-	-
甲基红(M.R)试验	+	+	+	+	+	+
明胶水解试验	-	-	-	-	-	-
淀粉水解试验	+	+	+	+	+	+

注：“+”表示阳性，“-”表示阴性。

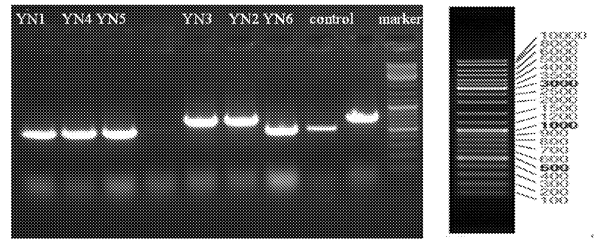


图1 分离菌株和两株阳性对照的PCR产物琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of PCR products of tested yeasts and positive control

### 2.5 苹果酒的酿造

分别测定不同菌株与 WLS21 混合发酵得到的苹果酒中酯类物质的总量,判断各个分离菌株的产香能力,以苹果酒酵母 WLS21 单独发酵得到的苹果酒作为对照,不同菌株发酵得到的苹果酒的各项理化指标及感官得分如表 6 所示。

从表 6 可以看出,YN6 和 WLS21 混合发酵得到的苹果酒可溶性固形物含量最低,其发酵最完全;接种产香酵母进行混合发酵,总酯含量较之对照中的 3.21 g/L,均有不同程度的提高,其中菌株 YN6 与 WLS21 混合发酵后,总酯含量高达 4.66 g/L,提高了 45.1%。说明菌种 YN6 产酯能力最强,可以改善苹果酒酯香不足的问题。综合外观、香气、滋味和典型性等感官指标,YN6 与 WLS21 混合发酵所得苹果酒的感官得分最高,说明菌株 YN6 可以从不同方面综合提高苹果酒的质量。进一步对 YN6 的产香特性进行研究,用 SPME-GC-MS 的方法检测苹果酒的挥发性香气成分,结果如表 7 所示。

从 GC-MS 的测定结果可以看出(表 7),苹果酒的挥发性香气成分主要是酯类、高级醇类、脂肪酸类以及少量的醛类、酮类等。接种产香酵母 YN6 对苹果酒的挥发性香气影响较大,香气物质的种类和含量都有所增加,其中 YN6 产生的特有物质包括丙酸乙酯、乙酸丙酯、乙酸-2-甲基丙基酯、乙酸异丁酯、乙酸丁酯和壬醛。苹果酒酵母 WLS21 单独发酵时,挥发性香气成分的总量为 248.09 mg/L,而接种产香酵母 YN6 后,挥发性香气成分的总量提高到 496.14 mg/L,说明菌株 YN6 具有较高的产香能力,且产生的香气物质相互综合,赋予苹果酒浓郁的酒香,有很大的应用潜力。因此, *Wickerhamomyces anomalus* YN6 有望开发成新型的苹果酒专用产香酵母。

### 3 结论

(1)从 3 个品种的苹果样品以及果库空气中分离纯化得到 18 株酵母菌,初步筛选出 6 株酵母菌具

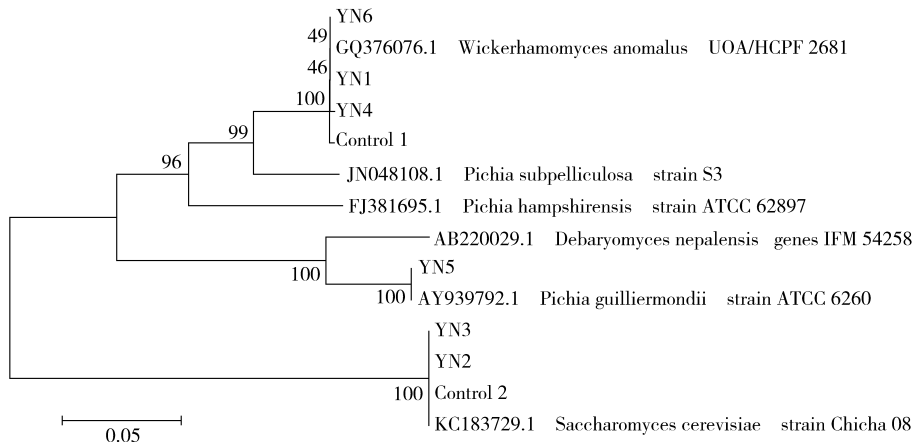


图 2 基于 ITS 全序列的标准菌和分离菌的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree according to ITS complete sequences

表 6 苹果酒的指标测定结果和感官评定结果

Tab. 6 Parameters and sensory analysis of different ciders

测定指标	酒样						
	WLS21	YN1&21	YN2&21	YN3&21	YN4&21	YN5&21	YN6&21
pH 值	3.95	4.01	4.03	4.03	4.03	3.98	4.01
可溶性固形物含量/°Brix	6.90	6.95	6.9	6.95	6.85	6.95	6.7
总酸质量浓度/g·L <sup>-1</sup>	4.91	4.54	4.68	4.45	4.71	4.63	4.84
总酯质量浓度/g·L <sup>-1</sup>	3.21	4.09	4.37	4.18	4.22	4.21	4.66
感官评分	81.5	83.5	79	85	90	82	90.5

注：WLS21：苹果酒酵母 WLS21 单独发酵的苹果酒；YN6&21：产香酵母 YN6 和 WLS21 混合发酵的苹果酒。

表 7 苹果酒中主要挥发性香气物质含量的比较

Tab. 7 Main volatile compounds of ciders

mg/L

编号	香气组分	酒样		编号	香气组分	酒样	
		WLS21	YN6&21			WLS21	YN6&21
1	乙酸乙酯	26.659	355.070	22	壬酸乙酯	0.001	0.001
2	乙酸异戊酯	0.867	0.666	23	乙酸丁酯	N D	0.011
3	乙酸丙酯	N D	0.151	24	乙酸己酯	0.002	0.002
4	乙酸苯乙酯	0.183	0.120	25	异戊醇	120.124	77.633
5	丙酸乙酯	N D	1.628	26	异丁醇	4.579	3.957
6	乙酸-2-甲基丙基酯	N D	0.060	27	苯乙醇	22.555	12.722
7	己酸乙酯	0.559	0.264	28	2,3-丁二醇	60.531	25.883
8	辛酸乙酯	0.394	0.140	29	1-己醇	0.027	0.055
9	月桂酸乙酯	0.003	0.023	30	橙花叔醇	0.053	0.034
10	癸酸乙酯	0.036	0.044	31	3,4,5-三甲基-4-庚醇	0.180	0.193
11	丁酸乙酯	0.254	0.207	32	香茅醇	0.056	0.017
12	辛酸异戊酯	0.006	0.002	33	乙酸	3.444	4.163
13	肉豆蔻酸甲酯	0.056	0.026	34	癸酸	0.225	0.695
14	棕榈酸甲酯	0.069	0.037	35	己酸	2.759	3.483
15	十五烷酸-3-甲基丁酯	0.220	0.206	36	辛酸	2.763	3.844
16	己酸异戊酯	0.015	0.003	37	壬醛	N D	0.009
17	2-甲基丁酸乙酯	0.043	0.017	38	大马酮	0.053	0.083
18	月桂酸甲酯	0.001	0.002	39	香叶基丙酮	0.006	0.015
19	乙酸异丁酯	N D	0.060	40	丁子香酚	0.870	1.217
20	癸酸甲酯	0.002	0.004	41	4-乙烯基愈创木酚	0.446	3.328
21	肉豆蔻酸乙酯	0.001	0.001	42	2,3-二氢香豆酮	0.051	0.069
		总量				248.09	496.14

注：N D 指未检出；WLS21：苹果酒酵母 WLS21 单独发酵的苹果酒；YN6&21：产香酵母 YN6 和 WLS21 混合发酵的苹果酒。

有较好的产香性能。

(2)对6株产香酵母进行ITS序列的扩增及克隆测序,经过ITS序列的同源性分析和系统发育树的构建,判定其中3株为*Wickerhamomyces anomalus*,2株为*Saccharomyces cerevisiae*,1株为*Pichia guilliermondii*。

(3)通过苹果酒发酵试验,筛选出*Wickerhamomyces anomalus*YN6产酯能力最强,对其

产生的挥发性香气成分测定结果表明:YN6产生的特有物质包括丙酸乙酯、乙酸丙酯、乙酸-2-甲基丙基酯、乙酸异丁酯、乙酸丁酯和壬醛。接种YN6后,挥发性香气物质的种类和含量都有明显增加,挥发性香气物质的质量浓度由248.09 mg/L提高到496.14 mg/L。因此,*Wickerhamomyces anomalus* YN6的分离具有重要意义,有望将其开发成新型的苹果酒专用产香酵母。

#### 参 考 文 献

- 胡文浪. 关于提高液态发酵食醋质量的探讨[J]. 中国酿造,2005(8): 40~43.  
Hu Wenlang. Discussion on improvement quality of vinegar produced with submerged fermentation [J]. China Brewing,2005(8): 40~43. (in Chinese)
- 施庆珊,陈仪本,欧阳友生,等. 酱油酿造中的生香酵母及生香过程[J]. 中国酿造,2006(1): 57~60.  
Shi Qingshan, Chen Yiben, Ouyang Yousheng, et al. Flavour development resulted in the derivation of yeasts in soy sauce brewing [J]. China Brewing,2006(1): 57~60. (in Chinese)
- 周世水,熊建春. 酒曲中生香酵母的分离鉴定与产酯工艺优化[J]. 现代食品科技,2010,26(1): 98~99, 108.  
Zhou Shishui, Xiong Jianchun. Isolation and identification of ester-producing yeast in wine starter and its application in ester production [J]. Modern Food Science and Technology,2010,26(1): 98~99, 108. (in Chinese)
- 余伟民,徐小明,林培,等. 生香酵母对特香型白酒风味风格的影响研究[J]. 酿酒科技,2012(1): 24~27.  
Yu Weimin, Xu Xiaoming, Lin Pei, et al. Effects of aroma-producing yeast on the style and the flavor of site liquor [J]. Liquor-Making Science & Technology,2012(1): 24~27. (in Chinese)
- 陈一,潘婷婷,彤霖,等. 生香酵母发酵无花果制备特色烟用香料的研究[J]. 湖北农业科学,2011,50(23): 4 923~4 926.  
Chen Yi, Pan Tingting, Rong Lin, et al. Research on preparation of characteristic tobacco flavors from ficus carica by fermentation [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2011,50(23): 4 923~4 926. (in Chinese)
- 赵惠明,蔡丽玲. 生香酵母在黄酒生产中的应用研究[J]. 当代生态农业,2001(增刊2): 122~125.
- 肖阳,孙宝国,廖永红,等. 一株葡萄酒*Pichia sp.*菌的分离鉴定及其产香成分分析[J]. 食品工业科技,2010,31(8): 164~166, 169.  
Xiao Yang, Sun Baoguo, Liao Yonghong, et al. Identification and aroma components analysis of *Pichia sp.* yeast separated from grape wine mud [J]. Science and Technology of Food Industry, 2010,31(8): 164~166, 169. (in Chinese)
- Lee P R, Saputra A, Yu B, et al. Effects of pure and mixed-cultures of *Saccharomyces cerevisiae* and *Williopsis saturnus* on the volatile profiles of grape wine [J]. Food Biotechnology,2012,26(4): 307~325.
- 范广璞. 白酒中生香酵母的筛选及培养条件的研究[J]. 中国酿造,2008(14): 44~47.  
Fan Guangpu. Screening of aroma yeast in liquor and research on culture conditions [J]. China Brewing,2008(14): 44~47. (in Chinese)
- Pando Bedriñana R, Lastra Queipo A, Suárez Valles B. Screening of enzymatic activities in non-*Saccharomyces* cider yeasts [J]. Journal of Food Biochemistry,2012,36(6): 683~689.
- 崔艳,刘金福. 非酿酒酵母在葡萄酒酿造中应用的研究现状[J]. 中国酿造,2010(11): 13~16.  
Cui Yan, Liu Jinfu. Research progress of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking [J]. China Brewing, 2010(11): 13~16. (in Chinese)
- Ciani M, Comitini F. Non-*Saccharomyces* wine yeasts have a promising role in biotechnological approaches to winemaking [J]. Annals of Microbiology,2011,61(1): 25~32.
- Ciani M, Comitini F, Mannazu I, et al. Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking [J]. FEMS Yeast Research,2010,10(2): 123~133.
- 阮仕立,王西锐,刘德兵,等. 苹果酒的开发研究进展[J]. 食品与发酵工业,2001,27(4): 75~78.  
Ruan Shili, Wang Xirui, Liu Debing, et al. Research and development prospect of cider production technology [J]. Food and Fermentation Industries, 2001,27(4): 75~78. (in Chinese)
- 沈萍,陈向东. 微生物学实验[M]. 北京:高等教育出版社,2007.
- 杨文博. 微生物学实验[M]. 北京:化学工业出版社,2004.
- 黄晓东,程巢宣. 白酒中总酸、总酯、总醛含量的常规连续测定[J]. 食品科技,2004(5): 70~72.  
Huang Xiaodong, Cheng Chaoxuan. Traditional continuous determine the total of acid and ester and aldehyde in Chinese distill sprits [J]. Food Science and Technology, 2004(5): 70~72. (in Chinese)
- GB/T 5038—2006 葡萄酒、果酒通用分析方法[S]. 2006.
- Demyttenaere J C R, Dagher C, Sandra P, et al. Flavour analysis of Greek white wine by solid-phase microextraction-capillary gas chromatography-mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2003, 985(1~2): 233~246.
- 彭帮柱,岳田利,袁亚宏,等. 基于模糊综合评判的苹果酒酵母优选技术研究[J]. 农业工程学报,2005,21(12): 163~166.