

混合培养条件下酵母菌菌株生长影响因素的初步研究

刘茜, 吴祖芳, 范三微, 翁佩芳

(宁波大学食品科学与工程系, 应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江宁波 315211)

摘要:为研究两种酵母菌在混合培养条件下各菌株生长相互影响的因素, 本文考察了初糖浓度及 pH 对两种酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae* (简称 Sc) 和 *Issatchenkia orientalis* (简称 Io) 生长的影响, 以纯培养作对比, 研究了混合培养条件下两种酵母菌有机酸代谢的差异性。结果表明, 低糖浓度、低 pH 以及有机酸代谢的差异是造成混合培养条件下 Sc 生长受到抑制的主要因素; Io 代谢葡萄糖速率较 Sc 快, 在初糖浓度为 1% 的混合培养中, Io 优先竞争性地消耗葡萄糖, 混合培养体系中 Io/Sc (菌落数量比值) 为 70; Io 较 Sc 耐酸, 在 pH3.5 下, Io/Sc 达 56; 有机酸代谢中, Io 可特异性地生成 2.52 g/L 的乳酸, Sc 可特异性地生成 1.14 g/L 的乙酸, 混合培养中, Io 可吸收代谢 Sc 产生的乙酸, 而 Io 产生的乳酸则对 Sc 的生长产生抑制作用。从细胞生长与有机酸代谢角度分析果酒酵母菌混合培养细胞行为影响的因素, 为多菌种混合发酵在果酒产业中的应用提供理论基础。

关键词: 混合培养; 初糖浓度; pH; 乙酸; 乳酸

文章编号: 1673-9078(2016)07-176-181

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.7.028

A Primary Study on the Factors Affecting Yeast Growth in a Mixed Culture

LIU Qian, WU Zu-fang, FAN San-wei, WENG Pei-fang

(Department of Food Science and Engineering, Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: To investigate the factors affecting the growth of different yeast strains in a mixed culture, the effects of initial glucose concentration and pH value on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) and *Issatchenkia orientalis* (Io) were investigated. The differences in organic acid metabolism of the two types of yeasts in a mixed culture were compared using pure cultures as controls. The results showed that low initial glucose concentration, low pH, and differences in organic acid metabolism were the main factors inhibiting the growth of Sc. The glucose consumption rate of Io was faster than that of Sc; in the mixed culture with an initial glucose concentration of 1%, Io consumed glucose preferentially, and the Io/Sc (the ratio of colony numbers) value was 70. Io was more acid tolerant than Sc, and the Io/Sc was 56 in pH 3.5. Regarding organic acid metabolism, Io produced 2.52 g/L lactic acid specifically, and Sc produced 1.14 g/L acetic acid specifically. In a mixed culture, Io could absorb the acetic acid produced by Sc, whereas the lactic acid produced by Io could inhibit the growth of Sc. The factors influencing cell behavior of wine yeasts in a mixed culture were analyzed in terms of cell growth and organic acid metabolism, and this study provides a theoretical basis for the application of multi-strain mixed fermentation in the wine industry.

Key words: mixed cultivation; initial glucose concentration; pH; acetic acid; lactic acid

葡萄酒自然发酵是多菌种混合发酵的过程, 根据发酵中酵母菌的不同作用, 可将其分为两大类, 一类是酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*, 主要完成酒精发酵, 且发酵速率快, 发酵力强; 另一类是非酿酒酵母 non-*Saccharomyces*, 这类酵母虽然发酵效率较低, 但能够合成多种酶类物质, 将果汁原料中的前体物质

收稿日期: 2015-08-16

基金项目: 国家自然科学基金 (31471709)

作者简介: 刘茜 (1990-), 女, 硕士研究生, 主要从事食品生物技术研究

通讯作者: 吴祖芳 (1963-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事食品生物技术研究

转化成风味物质, 如酯、酸、高级醇等产物, 对最终酒体风味、色泽产生积极影响^[1-5]。但目前的研究^[6-8]多集中于非酿酒酵母与酿酒酵母混合培养时工艺优化及风味形成贡献方面, 对发酵过程中酿酒酵母与非酿酒酵母相互影响规律及机制的研究很少见文献报道。

现有研究表明^[9], 自然发酵初期由一些酒精耐受能力较弱的非酿酒酵母如假丝酵母、汉逊酵母、圆酵母等完成; 但随着酒精浓度的不断升高, 非酿酒酵母的这种优势逐渐被酒精耐受能力较强的酿酒酵母所替代。一般认为^[10]酿酒酵母和非酿酒酵母之间的这种接替关系是由菌种对外界环境抵抗能力的差异造成的,

如酒精浓度升高、有机酸积累、pH 降低以及营养物质的消耗等。但随着细胞与细胞间相互作用的研究受到越来越多的关注^[11-15], 除以上影响因素外, 还有研究证明^[16-20], 酿酒酵母在发酵过程中产生的除酒精外的代谢产物, 如中长链脂肪酸、一些有毒化合物(如糖蛋白、分泌肽等)会抑制其它菌种的生长。然而, 自然界中非酿酒酵母种类繁多, 不同种属的非酿酒酵母自身特性有所差异, 与酿酒酵母混合培养时相互作用关系也有所不同。至今为止, 国内外还没有一个统一的结论能解释酿酒酵母与非酿酒酵母之间相互影响的本质。

本文以前期研究筛选获得的具有较好发酵风味的非酿酒酵母 *Issatchenkia orientalis* (简称 Io) 和酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* (简称 Sc) 为研究对象进行混合培养, 从发酵环境变化及代谢产物的相互影响角度考察两种酵母菌混合培养过程中对各自菌株生长的影响, 研究影响其生长变化的主要因素, 为下一步探索多菌种混合发酵相互作用的分子本质以及酵母菌混合发酵在果酒产业中的应用提供基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种与培养基

实验菌种: *Saccharomyces cerevisiae* (Sc)、*Issatchenkia orientalis* (Io) 均保藏于宁波大学海洋学院食品生物技术实验室。

麦芽浸膏琼脂培养基 MEA (L): 麦芽浸粉 30 g, 大豆蛋白胨 3 g, 琼脂 15 g, pH 值 5.6±0.2; 麦芽浸膏汤培养基 MEB(L): 麦芽浸粉 15 g, pH 值 4.7±0.2; SGJ^[21] (synthetic grape juice media) (L): 葡萄糖 200 g, 酵母浸膏 2 g, (NH₄)₂SO₄ 2 g, 柠檬酸 0.3 g, L-苹果酸 5 g, L-酒石酸 5 g, MgSO₄ 0.4 g, KH₂PO₄ 5 g, pH 值 3.5。

1.1.2 实验药品

麦芽浸膏琼脂 (MEA)、麦芽浸膏汤 (MEB): 青岛高科园海博生物技术有限公司; 酵母浸膏: 杭州微生物试剂有限公司; NaOH、HCl、(NH₄)₂SO₄、MgSO₄、KH₂PO₄、NaH₂PO₄、葡萄糖、三氯甲烷、硫酸、酒石酸、苹果酸、乳酸、冰乙酸、柠檬酸、丙酮酸: 国药集团化学试剂有限公司。

1.1.3 仪器与设备

LDZX-40B I 型立式蒸汽灭菌器, 上海申安医疗器械厂; XPX 智能型生化培养箱, 宁波江南仪器厂; 高速冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; 紫外可见分

光光度计, 上海美谱达仪器有限公司; 超净工作台, 苏州净化设备有限公司; PHS-3C pH 计, 上海精密科学仪器有限公司; 电子天平, 上海民桥精密科学仪器有限公司; 安捷伦 1260 infinity LC, 配备真空脱气机、四元泵、VWD 检测器, 美国 Agilent 公司; 超声波振荡仪, 昆山市淀山湖检测仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种的活化

取实验室甘油保藏菌种, 划线于 MEA 培养基上, 于 30 °C 的恒温培养箱中培养 48 h, 取一环平板活化的菌体于 50 mL MEB 培养基中, 30 °C, 150 r/min 恒温培养 24 h 后于 4 °C 的冰箱中保藏备用。

1.2.2 混合培养方法

将活化好的两种酵母菌以 1:1 的浓度比例接种于装有 50 mL 灭菌 MEB 的锥形瓶中, 并分别接种两种酵母菌作为纯培养对照, 30 °C、150 r/min 恒温培养。混合培养及纯培养接种后培养液起始浓度均为 2×10⁵ CFU/mL。

1.2.3 初糖浓度对混合培养酵母菌生长的影响

以 SGJ 为基础发酵培养基, 调节葡萄糖浓度为 1%、5%、10%、15% 和 20%, 将活化好的两种酵母菌, 按 1.2.2 所述分别接种到 50 mL 灭菌的不同葡萄糖浓度的 SGJ 培养基中, 150 r/min, 30 °C 恒温培养 24 h 后测定各菌株生长量。

1.2.4 pH 变化对混合培养酵母菌生长的影响

以 SGJ 为基础培养基, 选择一合适的初糖浓度, 调节 pH 值为 2.5、3.5、4.5、5.5 和 6.5, 将活化好的两种酵母菌, 按 1.2.2 所述分别接种到 50 mL 灭菌的不同 pH 值的 SGJ 培养基中, 150 r/min, 30 °C 恒温培养 24 h 后测定各菌株生长量。

1.2.5 分析方法

1.2.5.1 混合培养各菌株生长的测定

按 1.2.2 所述方法培养, 每隔 4h 取样, 采用平板计数法并结合各菌株在 MEA 培养基上的不同形态, 测定各菌株生长的数量。

1.2.5.2 还原糖的测定: 3,5-二硝基水杨酸法测定残糖量

1.2.5.3 有机酸分析

色谱柱为 C18 柱 5 μm, 250×4.6 mm (i.d., Phenomenex, USA); 进样体积: 10 μL; 流动相: NaH₂PO₄ 溶液 (1.0 mol/L 磷酸调节 pH 值至 2.8)。等度洗脱程序: 0~25 min NaH₂PO₄ 缓冲液, 流速 0.3 mL/min。检测波长为 210 nm, 柱温 30 °C。

样品前处理: 取发酵样液 4 mL, 离心 5 min (10000

r/min), 取上清液 2 mL 并加入等体积氯仿以除去发酵液中的蛋白, 离心 5 min (10000 r/min), 取上清液 1 mL 并加入 50% H₂SO₄ 70 μL, 离心 5 min (10000 r/min), 取上清液 100 μL, 稀释至 600 μL, 经 0.22 μm 滤膜过滤后进行 HPLC 分析, 相同的色谱条件下检测标准溶液与样品, 样品中待测组分用保留时间和峰面积增量法定性, 标准曲线法定量。

1.2.5.4 数据处理

所有试验平行进行三次, 利用 SAS8.1 软件进行统计分析, $p < 0.05$ 为显著性差异。

2 结果与分析

2.1 酵母菌混合培养生长量测定

如图 1 所示, MEA 培养基上两种酵母菌菌落形态均为白色圆形, Io 菌落直径较大, 表面湿润平坦无光泽。Sc 菌落直径较小, 表面湿润凸起有光泽, 边缘整齐。

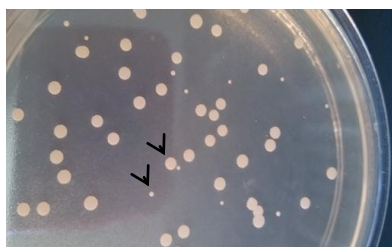


图 1 两种酵母菌在 MEA 平板上的形态

Fig.1 Morphology of strains Sc and Io in an MEA plate

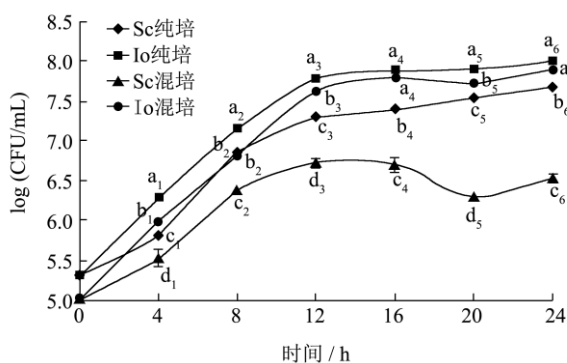


图 2 不同培养方式下两种酵母菌生长动态变化

Fig.2 Changes in the dynamic growth of two yeasts under different culture methods

两种酵母菌混合培养时生长动态变化如图 2 所示, 为考察混合培养菌种间相互作用而引起的两菌种生长量的变化, 引入 Io/Sc (菌落数量之比), 结果如图 3 所示。从图 2 可看出, 在纯培养中非酿酒酵母 Io 生长速率较酿酒酵母 Sc 快, Io 生长量最高值为 1.04×10^8 CFU/mL, 而酿酒酵母 Sc 最高值为 4.7×10^7 CFU/mL。培养 12 h 后两种酵母菌进入稳定期。混合

培养时, 前 12 h 两种酵母菌生长量均未达到纯培养时的量, 12 h 后 Io 生长逐渐加快, 至 24h 时基本达到了纯培养时的生长量, 为 9.8×10^7 CFU/mL, 而 Sc 在混合培养中受到了抑制, 生长量最高值仅为 5×10^6 CFU/mL。Io/Sc 初始值为 1, 由于 Io 生长速率较 Sc 快, 因此无论是纯培养还是混合培养该比值都大于 1, 从图 3 可看出, 纯培养与混合培养前 8h, Io/Sc 差异不显著, 但 8h 时后, 混合培养 Io/Sc 开始大于纯培养时 Io/Sc 的值; 其可能的原因是前 8 h 两菌种在混合培养体系中发生相互作用, 如对营养物质的竞争, 对混合培养体系环境的适应能力不同等; 随着发酵的进行, 混合体系中该比例逐渐增大, 发酵 20 h, 该比例已达 28。结合图 2、图 3 可推测, 混合培养中酿酒酵母 Sc 和非酿酒酵母 Io 之间存在相互作用, 且该种作用会导致 Sc 生长受到抑制。实验结果与文献报道不同^[13], 非酿酒酵母 Io 在培养过程中并未受到抑制, 相反酿酒酵母 Sc 在混合培养中受到明显抑制。本试验所用的东方伊萨酵母 Io 是一种既耐酸又耐乙醇且可利用低浓度乙醇为唯一碳源生长的酵母菌^[22]; 已有文献表明^[23]在高温连续发酵中, 至发酵末期也能分离到非酿酒酵母 Io。结果的差异主要是因为不同种属非酿酒酵母特性不同, 其与酿酒酵母混合培养生长相互的影响也不同。

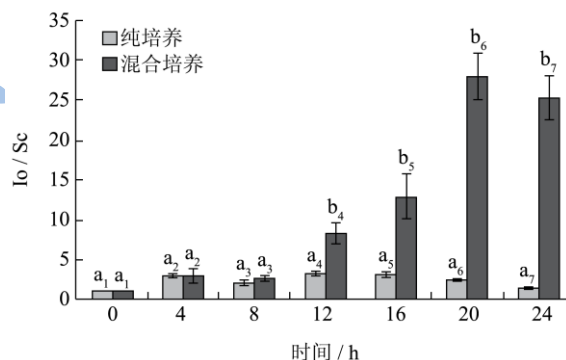


图 3 不同培养方式下两种酵母菌生长比率变化

Fig.3 Changes of Io/Sc ratio under different culture methods

注: 图 2 中 Sc 混培、Io 混培指混合培养条件下各菌种的数量; 图 3 中纯培养指 Sc、Io 分别纯培养时 Io/Sc 比值; 混合培养指混合培养条件下两菌种的 Io/Sc 比值; 图中同一时间点不同字母表示差异显著($p < 0.05$)。

2.2 初糖浓度对混合培养两菌种生长的影响

在 1%、5%、10%、15% 和 20% 五种不同葡萄糖浓度下培养, 两种酵母菌纯培养及混合培养时各自生长情况及生长量比率如图 4、5 所示。

从图 4 中可看出, 不同初糖浓度下, Io 在混合体系中生长与纯培养相比差异不显著。而 Sc 在混合体系

中生长处于抑制状态。由图 5 可知,随着初糖浓度的升高,Sc 受抑制程度减小,故 Io/Sc 逐渐减小;当初糖浓度为 1%时,Sc 受抑制程度最大,Io/Sc 高达 70。同时测定培养 24 h 后,各培养液的残糖量,结果如表 3 所示。

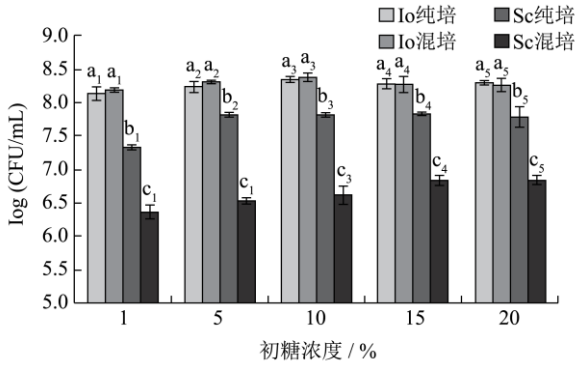


图 4 初糖浓度对酵母菌混合培养生长的影响

Fig.4 Effects of initial glucose concentrations on the yeast growth in

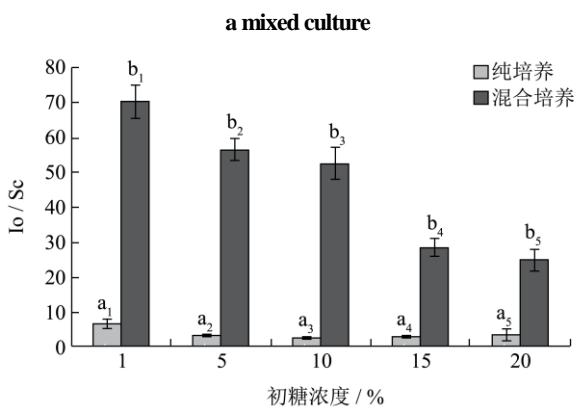


图 5 不同初糖浓度下两种酵母菌生长比率

Fig.5 Io/Sc ratio under different initial glucose concentrations

注: 图中同一初糖浓度不同字母表示差异显著($p < 0.05$)。

表 3 不同初糖浓度下的残糖量

Table 3 Residual glucose concentrations under different initial glucose concentrations

初糖浓度/(g/L)	残糖量/(g/L)		
	Sc 纯培养	Io 纯培养	Sc 与 Io 混合培养
10	3.34±0.02 ^a	0.16±0.04 ^b	0.16±0.05 ^b
50	20.51±0.24 ^a	1.31±0.05 ^b	1.56±0.04 ^c
100	80.35±0.08 ^a	46.32±0.11 ^b	40.36±0.13 ^c
150	132.29±0.15 ^a	102.78±0.14 ^b	100.47±0.22 ^c
200	186.30±0.21 ^a	153.35±0.31 ^b	149.14±0.31 ^c

注: 同行不同字母表示差异显著($p < 0.05$)。

从表 3 可知, Io 纯培养时残糖量低于 Sc, 即 Io 消耗葡萄糖的速率较 Sc 快, 且在 1%和 5%初低糖浓度下尤为明显。由图 2 得知, Io 生长速率快于 Sc 可能也与 Io 消耗葡萄糖的速率较快有关。由此可推知, 在初糖浓度较低的混合培养中, 两种酵母菌竞争

性地消耗碳源, Sc 竞争碳源的能力弱于 Io 从而使其生长受到抑制。因此在糖浓度为 1%时, 混合体系中 Io/Sc 高达 70。但随着葡萄糖浓度的升高, Io/Sc 逐渐减小, 在葡萄糖浓度为 20%时, 该比值为 25, 但仍大于纯培养时的值, 证明除对碳源的竞争外, 还有其它因素影响混合体系中 Sc 的生长。

2.3 pH 对混合培养两菌种生长的影响

与初糖浓度相比, pH 是影响酵母菌生长与代谢的又一重要因素。为降低初糖浓度对 Sc 生长造成的竞争性抑制, 在 10%的葡萄糖浓度下设计了不同 pH (2.5、3.5、4.5、5.5、6.5) 对两菌株生长的影响, 两种酵母菌纯培养与混合培养的生长比率结果如图 6、7 所示。

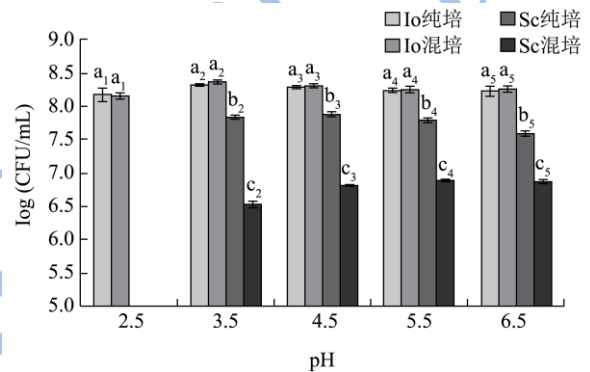


图 6 pH 对酵母菌混合培养生长的影响

Fig.6 Effects of pH on yeast growth in a mixed culture

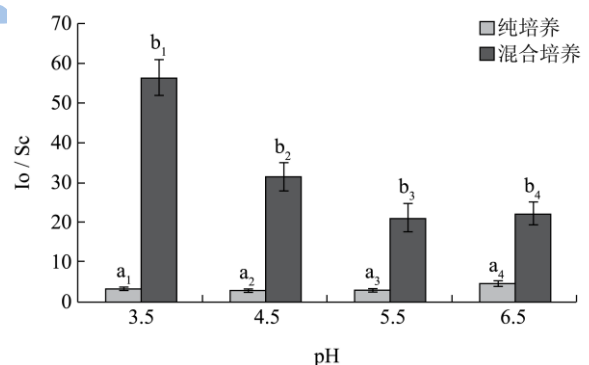


图 7 不同 pH 下两种酵母菌生长比率

Fig.7 Io/Sc ratio under different pH values

注: 图中同一 pH 不同字母表示差异显著($p < 0.05$)。

从图 6 可以看出, Io 较 Sc 耐酸, 在 pH2.5 下仍能正常生长, 且数量可达 10^8 CFU/mL; 而 Sc 在该 pH 下已出现菌体死亡现象, 该结论与 Hisamatsu^[24]结果相似, 非酿酒酵母 Io 可在 pH 低至 2 的环境中正常生长且进行酒精发酵。尽管酵母菌在微酸性 (pH=4) 的环境下最适于生长繁殖, 但较低的 pH 值可以保证添加的 SO_2 以较多的游离态存在, 更好地抑制有害微生物作用, 但 pH 过低会促使乙酸酯类物质水解, 生成

挥发酸,影响果酒口感,故实际果酒生产中 pH 值控制在 3.3~3.5 之间^[25]。由此可见,果酒发酵的低酸性环境更适于 Io 生长。故在 pH 3.5 时,混合培养 Io/Sc 最大,为 56。随着 pH 的增大,嗜酸酵母菌 Io 生长量稍有减少;降低低 pH 的胁迫,Sc 生长量也有所增加,故在 pH 5.5 及 6.5 时,混合培养 Io/Sc 变小,分别为 21 和 22。Sc 耐酸性弱于 Io,也是混合体系中 Sc 生长处于劣势的主要原因。

2.4 有机酸代谢对混合培养两菌种生长的影响

有机酸含量的多少关系到葡萄酒最终的口感和稳定性,同时也对酵母菌的生长产生重要影响^[26]。为降低低糖浓度及低 pH 对 Sc 生长的影响,选择在 10% 初糖浓度, pH4.5 条件下测定不同培养条件下有机酸代谢情况,结果如表 4 所示。

表 4 不同培养条件下有机酸代谢情况

Table 4 Organic acid metabolism under different culture conditions

培养方式	有机酸/(g/L)				
	酒石酸	丙酮酸	苹果酸	乳酸	乙酸
Sc 纯培	3.84±0.02 ^a	0.36±0.02 ^a	4.26±0.03 ^a	未检出	1.14±0.01
Io 纯培	3.82±0.03 ^a	0.18±0.01 ^b	3.18±0.02 ^b	2.52±0.01 ^a	未检出
Sc + Io 混培	3.42±0.01 ^b	0.24±0.01 ^c	3.16±0.03 ^b	2.49±0.03 ^a	未检出

注: 同列不同字母表示差异显著($p < 0.05$)。

酒石酸、苹果酸是葡萄果实中的主要有机酸,酵母菌对这两种有机酸的降解能力,不仅关系到酒体的最终质量,更对发酵环境的 pH 变化有重要影响。SGJ 培养基中这两种酸的浓度均为 5 g/L。从表 4 中可看出,两种酵母菌纯培养 60 h 后,酒石酸降解能力差异不显著,均约为 23.20%,混合培养时,降酸率提高,达 31.60%。Io 对苹果酸的降解能力强于 Sc,发酵 60 h 降酸率为 36.40%,而 Sc 仅为 14.80%。两种酵母菌混合培养,对酒石酸及苹果酸的降解率均有提高,不仅对酒体的品质形成产生积极影响,更为酵母菌的生长提供更为合适的 pH 环境。丙酮酸是酵母菌糖代谢的关键分支点,在有氧及无氧情况下随即进一步代谢为不同产物,故发酵过程检测到的丙酮酸含量均较少。

由表 4 可知,两种酵母菌对乳酸及乙酸的代谢差异最明显。Io 在纯培养时可特异性地产生 2.52 g/L 的乳酸,Sc 在纯培养时可特异性地产生 1.14 g/L 的乙酸;但在混合培养中只检出 2.49 g/L 乳酸,并未检测出乙酸。据此,可推测混合培养中的非酿酒酵母 Io 可降解

Sc 代谢产生的乙酸。事实上,早有研究证明部分酵母可直接通过乙酸运载系统将乙酸运输到细胞内进行利用^[27]。Io 产生的乳酸不能被两种酵母菌代谢分解,故造成对 Sc 生长的抑制,而对 Io 本身并无影响。乙酸和乳酸都是果酒酿造中常见的副产物,发酵过程若积累过多,不仅会对最终酒体质量产生严重影响,且对酵母菌的生长繁殖造成抑制。Narendranath^[28]研究证明在 30 °C 基础培养基中添加醋酸或乳酸会使得酿酒酵母的生长率呈指数级减少,醋酸的最低抑菌浓度为 0.60% (m/V),乳酸为 2.50%,但当乙酸浓度低至 0.05~0.10%,乳酸浓度低至 0.20~0.80% 会对酿酒酵母造成胁迫,且随着这两种酸浓度的升高,酵母菌生长速率减慢,糖耗减慢。因此可推断,混合培养产生的 2.49 g/L (约 0.25%, m/V) 的乳酸对酿酒酵母 Sc 生长造成了抑制。为进一步证实乳酸对酿酒酵母生长产生的影响,在单独接种酿酒酵母的情况下,添加 2.50 g/L 的乳酸,与未添加乳酸组相比,酿酒酵母的数量减少近 55% (数据未列),进一步证实乳酸对 Sc 的生长产生了抑制作用。

4 结论

4.1 通过比较酿酒酵母 Sc 和非酿酒酵母 Io 在纯培养与混合培养时的生长差异,可知低糖浓度、低 pH 以及有机酸代谢的差异是造成酿酒酵母 Sc 生长受到抑制的主要因素。混合培养中,随着起始糖浓度及 pH 的增加,Sc 生长抑制程度减小,初糖浓度为 1% 时,混合培养 Sc 受抑制程度最明显, Io/Sc 为 70; pH 为 3.5 时,混合培养 Sc 受抑制程度最明显, Io/Sc 为 56; 非酿酒酵母 Io 在混合培养中产生的 2.49 g/L 乳酸,对 Sc 生长造成抑制。

4.2 本文研究结果表明,初糖浓度和 pH 对试验所涉的菌株在混合培养条件下的生长行为产生影响,同时由于所筛选菌株的生理生化特性,其代谢产物有机酸的差异性对混合培养条件下菌株的生长产生不同程度的影响。除此之外,对于如分泌肽、细胞间接触等对混合培养中各菌种生长的影响将在后续作进一步的探讨。与此同时,从蛋白质组学与基因组学角度研究混合培养体系细胞生长行为的变化将与这些研究结果的解释得到相互补充。

4.3 酿酒酵母 Sc 与非酿酒酵母 Io 混合培养时各菌株生长的影响因素研究结果,可为进一步研究酵母菌混合培养过程中不同影响因素下菌种间相互作用的分子机制奠定基础,从而对酵母菌株影响果酒质量的规律认识及加工过程控制手段提供科学依据。

参考文献

- [1] 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
- [2] Andorrà I, Berradre M, Mas A, et al. Effect of mixed culture fermentations on yeast populations and aroma profile [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2012, 49(1): 8-13
- [3] Gobbi M, Comitini F, Domizio P, et al. Non-Saccharomyces yeasts in controlled mixed culture fermentation in winemaking: the role of metabolic interactions [J]. *Journal of Biotechnology*, 2010, 150(Suppl 1): 299-300
- [4] Lee P R, Ong Y L, Yu B, et al. Profile of volatile compounds during papaya juice fermentation by a mixed culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Williopsis saturnus* [J]. *Food Microbiology*, 2010, 27(7): 853-861
- [5] Maturano Y P, Assaf L A R, Toro M E, et al. Multi-enzyme production by pure and mixed cultures of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts during wine fermentation [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2012, 155(1): 43-50
- [6] Sadoudi M, Tourdot-Marechal R, Rousseaux S, et al. Yeast-yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermentation by single or co-culture of non-*Saccharomyces* yeasts [J]. *Food Microbiology*, 2012, 32: 243-253
- [7] 周元, 贲浩, 傅虹飞. 酵母菌株对猕猴桃果酒香气成分的影响[J]. 现代食品科技, 2014, 30(12): 263-240
ZHOU Yuan, BEN Hao, FU Hong-fei. Effect of yeast strains on the aromatic composition of kiwifruit wine [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 30(12): 263-240
- [8] 周春丽, 刘伟, 李慧, 等. 混合菌株发酵南瓜汁及香气分析[J]. 现代食品科技, 2014, 30(5): 301-310
ZHOU Chun-li, LIU Wei, LI Hui, et al. Mixed culture fermentation of pumpkin juice and its aroma analysis [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 30(5): 301-310
- [9] Ciani M, Picciotti G. The growth kinetics and fermentation behaviour of some non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making [J]. *Biotechnology Letters*, 1995, 17(11): 1247-1250
- [10] Pretorius I S. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking [J]. *Yeast*, 2000, 16(8): 675-729
- [11] Ciani M, Pepe V. The influence of pre-fermentative practices on the dominance of inoculated yeast starter under industrial conditions [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2002, 82(5): 573-578
- [12] Nissen P, Arneborg N. Characterization of early deaths of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Archives of Microbiology*, 2003, 180(4): 257-263
- [13] Nissen P, Nielsen D, Arneborg N. Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell-cell contact-mediated mechanism [J]. *Yeast*, 2003, 20(4): 331-341
- [14] Arneborg N, Siegumfeldt H, Andersen G H, et al. Interactive optical trapping shows that confinement is a determinant of growth in a mixed yeast culture [J]. *FEMS microbiology letters*, 2005, 245(1): 155-159
- [15] Pérez-Nevado F, Albergaria H, Hogg T, et al. Cellular death of two non-*Saccharomyces* wine-related yeasts during mixed fermentations with *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2006, 108(3): 336-345
- [16] Fleet G H. Yeast interactions and wine flavor [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 86(1): 11-22
- [17] Edwards C G, Beelman R B, Bartley C E, et al. Production of decanoic acid and other volatile compounds and the growth of yeast and malolactic bacteria during vinification [J]. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1990, 41(1): 48-56
- [18] Enrique M, Marcos J F, Yuste M, et al. Antimicrobial action of synthetic peptides towards wine spoilage yeasts [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 118(3): 318-325
- [19] Albergaria H, Francisco D, Gori K, et al. *Saccharomyces cerevisiae* CCMI 885 secretes peptides that inhibit the growth of some non-*saccharomyces* wine-related strains [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 86(3): 965-972
- [20] 翟明昌, 朴永哲, 王祥余, 等. 葡萄酒发酵过程中酵母菌之间相互抑制作用的研究[J]. 中国微生态学杂志, 2011, 23(1): 18-21
ZHAI Ming-chang, PIAO Yong-zhe, WANG Xiang-yu, et al. The mutual inhibition between yeasts in the fermentation process of wine [J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2011, 23(1): 18-21
- [21] Nehme N, Mathieu F, Taillandier P. Impact of the co-culture of *Saccharomyces cerevisiae*-*Oenococcus oeni* on malolactic

- fermentation and partial characterization of a yeast-derived inhibitory peptidic fraction [J]. Food Microbiology, 2010 (27): 150-157
- [22] Okuma Y, Endo A, Iwasaki H, et al. Isolation and properties of ethanol-using yeasts with acid and ethanol tolerance[J]. Journal of Fermentation Technology, 1986, 64(5): 379-382
- [23] Gallardo J C M, Souza C S, Cicarelli R M B, et al. Enrichment of a continuous culture of *Saccharomyces cerevisiae* with the yeast *Issatchenkia orientalis* in the production of ethanol at increasing temperatures [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2011, 38(3): 405-414
- [24] Hisamatsu M, Furubayashi T, Karita S, Mishima, et al. Isolation and identification of a novel yeast fermenting ethanol under acidic conditions [J]. Journal of Applied Glycoscience, 2006, 53(2): 111-113
- [25] 杨幼慧,张莉萍,郑素霞.影响果酒发酵质量的因素及其控制办法[J].中国酿造,2002,1:28-31
- YANG You-hui, ZHANG Li-ping, ZHENG Su-xia. Effect factors and control methods in wine fermentation [J]. China Brewing, 2002, 1:28-31
- [26] Ullah A, Orij R, Brul S, et al. Quantitative analysis of the modes of growth inhibition by weak organic acids in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(23): 8377-8387
- [27] Sousa M J, Rodrigues F, Corte R M, et al. Mechanisms underlying the transport and intracellular metabolism of acetic acid in the presence of glucose in the yeast *Zygosaccharomyces bailii* [J]. Microbiology, 1998, 144: 665-670
- [28] Narendranath N V, Thomas K C, Ingledew W M. Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium [J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2001, 26(3): 171-177