

**Ksenija Lopandic - Hansjörg Prillinger**

## **Monitoring der Hefepopulationsdynamik während der Spontanfermentation des Weines: Untersuchung der Sorten "Grüner Veltliner", "Welschriesling", "Sauvignon Blanc" und "Zweigelt" aus verschiedenen österreichischen Weinbaugebieten**

### **Zusammenfassung**

In dem vorliegenden Projekt wurde die Hefeflora während der spontan Fermentation des Traubenmosts in vier österreichischen Weinbaugebieten studiert (Wien, Donauland, Neusiedlersee-Hügelland, Südsteiermark). Um einen besseren Einblick über die Hefediversität zu gewinnen, wurde die Hefepopulationsdynamik in Weiß- und Rotweinen, die in sechs Standorten (Cobenzl, Stift Klosterneuburg, Agnes-Hof, Götzhof, St. Georgen, Silberberg) hergestellt wurden, untersucht. Die genomische Variabilität von nicht-*Saccharomyces* und *Saccharomyces* Arten und Stämmen wurden mittels der Sequenzanalyse des 26S rRNA codierenden Gens (D1/D2 Domain) und DNA-Fingerabdruckanalyse (PCR- und AFLP-fingerprinting) bewertet. Die Ergebnisse dieser Studie weisen darauf hin, dass die in die Weinfermentation involvierten Hefearten und *Saccharomyces* Stämme sehr heterogen sind. Innerhalb der identifizierten Arten waren *S. cerevisiae* und *Hanseniaspora uvarum* am häufigsten vertreten, während die Arten *Candida zemplinina*, *Issatchenkia occidentalis*, *Kregervanrija fluxuum*, *Lachancea thermotolerans*, *Metschnikowia viticola*, *Pichia kluyveri*, *S. bayanus* var. *uvarum* und *Zygoascus hellenicus* nur sporadisch gefunden wurden. Die nicht-*Saccharomyces* Arten, die in den ersten Fermentationsphasen dominierten, wurden bei höherer Ethanolkonzentration durch *Saccharomyces* Arten ersetzt. Manche *S. cerevisiae* Stämme wurden als ubiquitäre Hefen identifiziert, trotzdem konnten aber in verschiedenen Weinen und Standorten viele Stämme mit einzigartigen AFLP Mustern charakterisiert werden. Neben den *S. cerevisiae* Stämmen zeigten auch die *S. bayanus* var. *uvarum* Stämme eine beachtliche genomische Variabilität. Diese Biodiversitätsstudie, die zum ersten mal in österreichischen Weinbaugebieten durchgeführt wurde, stellt einen signifikanten Beitrag zur Erforschung und Erhaltung der genetischen Vielfalt der biotechnologisch relevanten Hefestämme dar. Das önologische und technologische Potential der untersuchten Hefen soll in weiteren Studien erforscht werden.

## Einleitung

Die Weinfermentation ist ein komplexer mikrobiologischer Prozeß, der die Transformation von Most zum Wein mit Hilfe verschiedener auf Beeren und Kellerzubehör vorhandener Hefespezies darstellt. Sensorische Qualität und technische Eigenschaften des Weines variieren wesentlich mit der Qualität des Weinmosts und mit den Hefestämmen, die einen Fermentationsprozeß durchführen. Verschiedene Studien über die Hefebiodiversität haben gezeigt, dass eine große Vielfalt von Hefearten an den frühen Stadien der Gärung teilnehmen. Die wenig Ethanoltoleranten Hefearten, die laut Literaturdaten während der Weinfermentation oft vorkommen, sind Vertreter der Gattungen *Candida*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Torulaspora*, *Hansenula*, *Metschnikowia*, *Cryptococcus* und *Rhodotorula* (Fleet, 1993; Pretorius et al., 1999). In einer späteren Phase der Fermentation, die durch einen erhöhten Alkoholgehalt charakterisiert ist, werden diese Arten durch die alkoholtoleranten Hefen der Gattung *Saccharomyces* ersetzt. Es ist bekannt, dass verschiedene Stämme von *S. cerevisiae* und *S. bayanus* in der stürmischen Fermentationsphase dominieren, obwohl neulich eine andere Art, *S. paradoxus* auch aus dem Wein isoliert und charakterisiert wurde (z.B. Fleet and Heard, 1993, Querol et al., 1994; Redzepovic et al., 2002).

Beträchtliche Fortschritte in der Entwicklung molekularbiologischer Methoden mit erhöhten Auflösungsmöglichkeiten haben zu einer zuverlässigen Hefecharakterisierung geführt. Außerdem haben diese Techniken es ermöglicht, aufgrund neuer molekularer Merkmale genomische Polymorphismen in *S. cerevisiae* zu entdecken. Techniken wie zum Beispiel Karyotyping (Chromosomenverteilungsmuster), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), PCR Amplifizierung spezifischer Gene (z.B. rRNA codierende Gene), RAPD Analyse (Randomly Amplified Polymorphic DNA) und AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) werden häufig verwendet um die Hefen auf Art- oder Stammebene zu differenzieren (z.B. Querol et al., 1992, 1996; Baleiras Couto et al., 1996; de Barros Lopes et al., 1998; Guillamón et al., 1998; Montrochar et al., 1998, Kurtzman and Robnett, 1998; Azumi & Goto-Yamamoto, 2001).

Mehrere Studien haben auf eine Heterogenität von aus verschiedenen Weinbaugebieten isolierten *S. cerevisiae* Stämmen hingewiesen, so dass eine starke Korrelation zwischen genomischen Eigenschaften und geographischer Herkunft festgestellt wurden (Versavaud et al., 1995; Nadal et al., 1996). Verschiedene Hefestämme beeinflussen die Weinqualität unterschiedlich, was andeutet, dass die Biodiversitätstudien von natürlichen Hefeisolaten aus diversen ökologischen Nischen und geographischen Regionen von großer Bedeutung für Grundlagen- und angewandte Forschung sind. Die autochthonen Hefen können neue

molekulare und önologische Attribute enthalten, die den Weinen einen regionalspezifischen Charakter geben. Aus diesen Gründen haben sich viele Studien mit der Charakterisierung der Hefepopulationen und mit einem Monitoring des Wachstums während der Spontanfermentation der Weine in verschiedensten geographischen Regionen beschäftigt (Esteve-Zarzoso et al., 2000; Pramateftaki et al., 2000; Rementería et al., 2003; Martínez et al., 2004; Combina et al., 2005; Raspor et al., 2006).

## **Ziele des Projekts**

In dem vorliegenden Projekt wurde die Biodiversität von in die Weinfermentation involvierten Hefearten und -stämmen studiert. Innerhalb von vier österreichischen Weinbaugebieten (Wien, Donauland, Neusiedlersee-Hügelland, Südsteiermark) wurden sechs Standorte (Cobenzl, Stift Klosterneuburg, Agnes-Hof, Götzhof, St. Georgen, Silberberg) ausgewählt um die autochthonen Hefen zu isolieren und genotypisch zu charakterisieren. Auf Sequenz- und Fingerabdruckanalysen basierende molekularbiologische Techniken wurden angewandt, um ein Monitoring der Spontanfermentation an verschiedenen Standorten durchzuführen. Auf diese Weise wurde die Substitution der Hefearten während der Alkoholgärung verfolgt und die genomische Verwandtschaft zwischen den Stämmen verschiedener Herkunft studiert. Diese Studie hat die Möglichkeit eröffnet, autochthone Hefestämme zu selektieren, die als Starterkulturen in der Weinproduktion verwendet werden könnten.

## **Methoden**

Sechs Standorte (Donauland/Agnes-Hof, Donauland/Götzhof, Wien/Cobenzl, Wien/Stift Klosterneuburg, Neusiedlersee-Hügelland/St. Georgen, Südsteiermark/Silberberg) wurden von der Höheren Bundeslehranstalt und dem Bundesamt für Wein- und Obstbau (HBLABA) Klosterneuburg und vom Bundesamt für Weinbau Eisenstadt, ausgewählt, um Hefestämme aus Spontanfermentation der regionalspezifischen Weine zu isolieren. Im Jahre 2004 wurden 284 Hefen aus Most bzw. Traubensaft der sechs Rebsorten "Grüner Veltliner", "Welschriesling", "Sauvignon blanc", "Zweigelt", "Blaufränkisch" und "Pinot Noir" isoliert. Die Probenahme erfolgte zu drei verschiedenen Zeitpunkten: am Beginn, in der Mitte und am Ende der Fermentation. Die Hefen wurden in mikrobiologischen Laboratorien der HBLABA Klosterneuburg und des Bundesamtes für Weinbau Eisenstadt isoliert und am Institut für Angewandte Mikrobiologie, Universität für Bodenkultur, Wien, genotypisch charakterisiert. Die selektierten Hefen wurden auf Art- und Stammebene charakterisiert und identifiziert. Identifizierung der Hefen auf Artebene wurde mittels Sequenzen der D1/D2 Domäne des

26S rRNA codierenden Gens und PCR-Fingerprinting nach Lopandic et al. (2006) durchgeführt. Die genomische Variabilität von *S. cerevisiae* and *S. bayanus* Stämmen wurde mit Hilfe der AFLP Technik (amplified fragment length polymorphism) nach Lopandic et al. (2005) untersucht.

## Ergebnisse und Diskussion

### Charakterisierung von Hefearten

Um die Hefepopulationsdynamik während der Spontanfermentation der Weiß- und Rotweine aus sechs Weinbaustandorte zu studieren, wurde eine polyphasische Methode angewandt, die eine Sequenzanalyse der D1/D2 Region des 26S rRNA codierenden Gens und PCR-fingerprinting beinhaltet. Den Großteil (87%) der Hefen wurde auf Artebene charakterisiert (Abbildung 1, Tabellen 1, 2). Innerhalb der identifizierten Arten wurden *S. cerevisiae* (181 Stämme) und *Hanseniaspora uvarum* (44 Stämme) am häufigsten isoliert, während die Arten *Candida zemplinina*, *Issatchenkia occidentalis*, *Kregervanrija fluxuum*, *Lachancea thermotolerans*, *Metschnikowia viticola*, *Pichia kluyveri*, *S. bayanus* var. *uvarum* und *Zygoascus hellenicus* sporadisch in einzelnen Proben festgestellt wurden (Tabellen 1, 2). Aufgrund der Sequenzanalysen der D1/D2 Region zeigten einige Hefeisolate eine nahe Verwandtschaft mit den Arten *Metschnikowia pulcherrima* und *Pichia membranifaciens*, aber die PCR-fingerprinting Analysen konnten die Konspezifität im Vergleich der resultierenden Muster mit denen von entsprechenden Typstämmen nicht bestätigen, die Ähnlichkeitswerte der DNA-Fingerabdrücke waren <80% (Abbildung 1). Da die Sequenzen der D1/D2 Domäne und DNA-Fragmentprofile sehr heterogen waren, handelt es sich bei diesen Hefen mit hoher Wahrscheinlichkeit um neue Arten der Gattungen *Metschnikowia* und *Pichia*. Deren vollständige Identifizierung bedarf der Verwendung zusätzlicher molekularer Merkmale. Die nicht-*Saccharomyces* Arten wurden am Beginn und in der mittleren Gärungsphase identifiziert, wenn die Zucker- und Ethanolkonzentrationen noch niedrig waren (Tabelle 1, 2). Die *S. cerevisiae* Stämme wurden in der Anfangsphase nur in den Mostproben von "Pinot Noir" (Stift Klosterneuburg), "Zweigelt" (Agnes-Hof) und "Grüner Veltliner" (Cobenzl) festgestellt. Interessanterweise wurden die *S. bayanus* Stämme nur im Most und Traubensaft von dem Standort St. Georgen nachgewiesen (Tabelle 2).

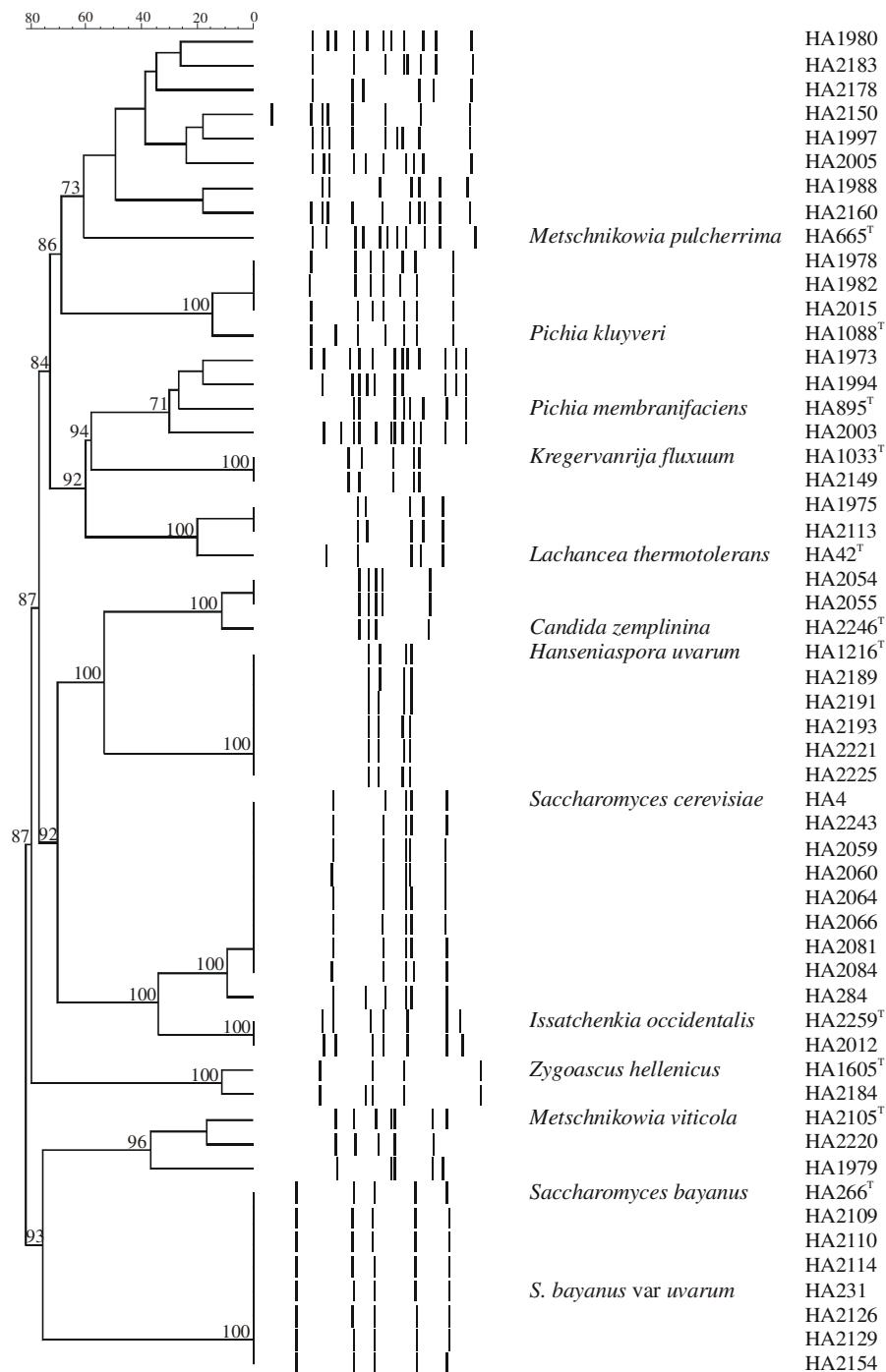


Abbildung 1. Clusteranalyse auf Basis von PCR-fingerprinting der Hefeisolate aus Traubenmost und Traubensaft

Tabelle 1. Zusammenstellung der aus drei Phasen der Spontanfermentation verschiedener Traubenmoste (BF=Beginn, MF=Mitte, EF=Ende) isolierten und charakterisierten Hefearten von den Standorten Stift Klosterneuburg, Agnes-Hof and Götzhof

Yeast species	No. of isolated colonies (Year 2004)														
	Wien, Stift Klosterneuburg			Donauland, Agnes-Hof						Donauland, Götzhof					
	Pinot Noir			Grüner Veltliner			Zweigelt			Grüner Veltliner			Blaufränkisch		
	BF	MF	EF	BF	MF	EF	BF	MF	EF	BF	MF	EF	BF	MF	EF
<i>C. zemplinina</i>	2														
<i>H. uvarum</i>				1			2			3			4		
<i>I. occidentalis</i>				1											
<i>Metschnikowia sp.</i>	2			7			1			2			2		
<i>M. viticola</i>										1					
<i>P. kluyveri</i>				1						2					
<i>Pichia sp.</i>	1						1						2		
<i>S. cerevisiae</i>	5	6	8	6	8		4	8	8		8	8		8	8
Sum of all investigated yeasts	24			24			24			24			24		

Tabelle 2. Zusammenstellung der aus drei Phasen der Spontanfermentation verschiedener Traubenmoste (BF=Beginn, MF=Mitte, EF=Ende) isolierten und charakterisierten Hefearten von den Standorten Cobenzl, St. Georgen and Silberberg

Yeast species	No. of isolated colonies (Year 2004)														
	Wien, Cobenzl			Neusiedlersee-Hügelland, St. Georgen						Südsteiermark, Silberberg					
	Grüner Veltliner			Welschriesling			Zweigelt			Zweigelt			Sauvignon blanc		
	BF	MF	EF	BF	MF	EF	BF	MF	EF	BF	MF	EF	BF	MF	EF
<i>Candida sp.</i>										2 1					
<i>H. uvarum</i>	2			6			5 6			2 6			7		
<i>K. fluxuum</i>				1											
<i>L. thermotolerans</i>	2						1								
<i>Metschnikowia sp.</i>	1			1 2						5			2		
<i>M. viticola</i>													1		
<i>Pichia sp.</i>	2						1								
<i>S. bayanus</i>				2			4 4 1								
<i>S. cerevisiae</i>	4	5	8	8	10		9	9		13	10		10	10	
<i>Z. hellenicus</i>										1					
Sum of all investigated yeasts	24			30			40			40			30		

## Charakterisierung von *Saccharomyces* Stämmen

Aufgrund der Ergebnisse der PCR-fingerprinting Analyse wurden 181 Hefeisolate als *S. cerevisiae* und 11 Hefen als *S. bayanus* identifiziert. Da PCR-fingerprinting die Hefen nur auf Artebene unterscheidet, war die Differenzierung der *S. cerevisiae* und *S. bayanus* Stämme nur mit Hilfe der AFLP Analyse möglich (Abbildung 1, 2, 3). Die AFLP Methode ist dadurch charakterisiert, eine höhere Anzahl an Loci als mit anderen PCR-basierenden Techniken analysieren zu können. Einige Autoren (De Barros Lopes et al., 1999; Azumi & Goto-Yamamoto, 2001) haben gezeigt, dass die AFLP-Analyse ein gutes Potential zur genetischen Abgrenzung von kommerziellen Stämmen besitzt. Um die Diversität der österreichischen *S. cerevisiae* Stämme aus spontangärendem Traubenmost mit den Hefestämmen aus anderen geographischen Regionen zu vergleichen, wurden auch drei aus Spanien (HA4), aus der Schweiz (HA284) und aus Westafrika (HA236) stammende *S. cerevisiae* Stämme, und zusätzlich einige direkt aus Trauben aus der Thermenregion (Perchtoldsdorf und Tattendorf) isolierte Stämme analysiert (Abbildung 3). Die Ergebnisse zeigten, dass die österreichischen *S. cerevisiae* Stämme aus Spontanfermentation verschiedener Traubenmoste eine homogene Population darstellen, welche signifikante Unterschiede zu Weinhefen aus anderen Ländern aufweist. Andererseits waren bei den aus allen österreichischen Standorten isolierten *S. cerevisiae* Stämmen sieben bis 11 verschiedene AFLP-Profile feststellbar, dies weist auf eine relativ hohe genomische Heterogenität hin. Außerdem konnte man nachweisen, dass in Weinen aus verschiedenen Standorten einerseits viele Hefen mit gleichen AFLP-Mustern vorhanden sind, aber auch Stämme mit einzigartigen AFLP Mustern vorkommen (Abbildung 3). Da eine beschränkte Hefeanzahl analysiert wurde, ist es notwendig, die Standortspezifität der Stämme durch eine mehrjährige Probenahme zu überprüfen. Eine detaillierte Analyse der AFLP-Fragmentmuster zeigte, dass sich die österreichischen *S. cerevisiae* Stämme in 18 AFLP-Fragmenten voneinander unterscheiden. Im Vergleich zu den Stämmen aus anderen Ländern konnte man vier informative AFLP-Fragmente feststellen (133, 240, 247, 378 bp), was darauf hinweist, dass diese DNA Segmente interessante genomische Eigenschaften enthalten könnten, welche die Stämme anderer geographischer Regionen nicht besitzen.



Abbildung 2. Genotypische Charakterisierung von *Saccharomyces* Arten und Stämmen mittels AFLP-Fingerabdruck Analyse



UPGMA



Abbildung 3. Clusteranalyse auf Basis von AFLP-Fingerprints, die die genomische Diversität der aus spontanfermentierten Moste und Traubensäfte isolierten *S. cerevisiae* and *S. bayanus* Stämme verschiedener österreichischen Weinbaugebieten zeigt. Die Standorte sind mit Großbuchstaben abgekürzt: AH-Agnes-Hof, GH-Götzhof, CO-Cobenzl, SK-Stift Klosterneuburg, SG-St. Georgen, SI-Silberberg. Weinsorten sind mit Kleinbuchstaben abgekürzt: gv-Grüner Veltliner, zw-Zweigelt, bf-Blaufränkisch, pn-Pinot Noir, wr-

Welschriesling, sb-Sauvignon blanc. Die drei Fermentationsphasen (Beginn, Mitte, Ende), in denen die Probenahmen stattgefunden haben sind durch die Nummern 1, 2, 3, gekennzeichnet.

Erhebliche Unterschiede zu allen untersuchten aus Spontanfermentationen isolierten Hefen konnten bei einigen direkt aus Trauben von der Thermenregion isolierten Hefen festgestellt werden (Abbildung 3). Die AFLP-Analyse hat darauf hingedeutet, dass diese Stämme Hybride zwischen *S. cerevisiae* und *S. kudriavzevii* Arten sind. Von 34 insgesamt amplifizierte AFLP-Fragmenten teilen sich die aus der Thermenregion isolierten Stämme 11 Fragmente mit *S. kudriavzevii*. Eine detaillierte Studie hat gezeigt, dass diese Stämme zwei verschiedene Sequenzen der D1/D2 und ITS1/ITS2 Regionen beinhalten, davon ist eine Sequenz mit der von *S. cerevisiae*, die zweite mit der von *S. kudriavzevii* homolog. Weitere Versuche haben gezeigt, dass es sich um aneuploide Stämme handelt, die keine wachstumsfähige Sporen bilden können, was eine typische Eigenschaft von Hybridstämmen ist. Erst in den letzten zwei Jahren wurden dank neuer hochsensitiver Methoden einige Hybridstämme innerhalb kommerziell angewandter Stämme entdeckt, bei denen *S. kudriavzevii* als ein Donor eines Teils des Genoms charakterisiert wurde (Naumova et al., 2005; Liti et al., 2005; Bradbury et al., 2006; González et al., 2006). Die Bedeutung dieser Hybride für die Qualität der Weine wurde noch nicht genauer untersucht, aber es ist bekannt, dass sich die genetischen Attribute solcher Hybridstämme auf die phänotypischen Eigenschaften auswirken (Masneuf et al., 1998). Erste Untersuchungen des Einflusses von Hybridstämmen auf die önologischen Eigenschaften des Weines haben gezeigt, dass die Hybride aus der Thermenregion (Standort Perchtoldsdorf) eine höhere Konzentration von Estern im Vergleich mit einigen *S. cerevisiae* Stämmen produzieren. Alle diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass weitere Untersuchungen der Hybridstämme für eine Grundlagen- und angewandte Forschung interessant sind und dass man die Erforschung der genomischen, technologischen und önologischen Eigenschaften dieser natürlichen Hefeisolate intensivieren muss.

Die AFLP-Analyse von *S. bayanus* Stämmen aus spontan fermentiertem Most und Traubensaft hat ergeben, dass alle Isolate der Art *S. bayanus* var. *uvarum* angehören (Abbildung 3). Elf untersuchte Stämme haben acht verschiedene AFLP-Muster gezeigt, was auf eine signifikante genomische Variabilität hindeutet. Im Vergleich mit dem *S. bayanus* Typstamm HA266 und dem *S. bayanus* var. *uvarum* Stamm HA231 können die österreichische Stämme aufgrund von neun Fragmenten (90, 138, 155, 219, 273, 284, 305, 310, 339 bp) unterschieden werden. Die *S. bayanus* var. *uvarum* Stämme wurden nur vom Standort St. Georgen isoliert, dies kann man als eine Anpassung dieser Stämme an umweltbedingte Gegebenheiten dieses Areals deuten. Genauere Informationen über die

genomischen und phänotypischen Eigenschaften, wie auch über das önologische Potential dieser Stämme können durch Vergleichsuntersuchungen mit natürlichen, aus Spontanfermentationen anderer geographischer Lokalitäten isolierten *S. bayanus* var. *uvarum* Stämmen erhalten werden.

## Schlussfolgerung

In der vorliegenden Studie wurden aus verschiedenen regionalspezifischen Mosten und Traubensäften isolierte Hefen auf Art und Stammebene genotypisch charakterisiert. Die Ergebnisse zeigen eine große Heterogenität von in den Fermentationsprozessen von Weiß- und Rotweinen involvierten Hefearten und Stämmen. Die Stämme von *S. cerevisiae* und *S. bayanus* var. *uvarum* haben signifikante genomische Unterschiede aufgewiesen, die aber im Vergleich zu der limitierten Anzahl von Stämmen aus anderen geographischen Gebieten und ökologischen Nischen als eine homogene Population charakterisiert wurden. Diese Studie hat auch ergeben, dass österreichische Weinbaugebiete interessante Hefehybride enthalten, die durch natürliche Hybridisierungsprozesse zwischen *S. cerevisiae* und *S. kudriavzevii* entstanden sind. Da diese Stämme eine erhöhte, für die Weinqualität bedeutende Esterkonzentration während der Fermentation freisetzen können, muss man zusätzliche Untersuchungen ihrer Verbreitung und ihrer technologischen und önologischen Eigenschaften durchführen, um deren Potential als Starterkulturen evaluieren zu können. Diese Hefebiodiversitätsstudie, die zum ersten mal in österreichischen Weinbaugebieten durchgeführt wurde, ist eine Basis für weitere mikrobiologisch und genetisch orientierte Studien und stellt einen wichtigen Beitrag zur Erforschung und Erhaltung der genetischen Vielfalt der biotechnologisch relevanten Hefestämme dar.

## Literatur:

- Azumi, M. and Goto-Yamamoto, N. (2001) AFLP analysis of type strains and laboratory and industrial strains of *Saccharomyces sensu stricto* and its application to phenetic clustering. *Yeast* **18**, 1145-1154.
- Baleiras Couto, M.M., Eijmsa, B., Hofstra, H., Huis in't Veld, J.H.J. and van der Vossen, J.M.B.M. (1996) Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 41-46.
- Bradbury, J.E., Richards, K.D., Niederer, H.A., Lee, S.A., Dunbar, P.R. and Gardner, R.C. (2006) A homozygous diploid subset of commercial wine yeast strains. *Antonie van Leeuwenhoek* **89**, 27-37.
- Combina, M., Elía, A., Mercado, L., Catania, C., Ganga, A. and Martinez, C. (2005) Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. *Int. J. Food. Microbiol.* **99**, 237-243.
- De Barros Lopes, M., Soden, A., Martens, A.L., Henschke, P.A. and Langridge, P. (1998) Differentiation and species identification of yeasts using PCR. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**, 279-286.

- De Barros Lopes, M., Rainieri, S., Henschke, P.A. and Langridge, P. (1999) AFLP fingerprinting for analysis of yeast genetic variation. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**, 915-924.
- Esteve-Zarzoso, B., Gostíncar, A., Bobet, R., Uruburu, F. and Querol, A. (2000) Selection and molecular characterisation of wine yeasts isolated from the "El Penedès" area (Spain). *Food Microbiol.* **17**, 553-562.
- Fleet, H. (1993) The microorganisms of winemaking-isolation, enumeration and identification. In: Wine microbiology and biotechnology. Fleet, G.H. ed., Harwood, pp. 1-27.
- Fleet, G.H. and Heard, G.N. (1993) Yeast: growth during fermentation. In: Wine Microbiology and Biotechnology. Fleet, G.H. ed., Harwood, pp.25-54.
- González, S.S., Barrio, E., Gafner, J. and Querol, A. (2006) Natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces kudriavzevii* in wine fermentations. *FEMS Yeast Res.* (in press) doi: 10.1111/j.1567-1364.2006.00126.x
- Guillamón, J.M., Sabaté, J., Barrio, E., Cano, J. and Querol, A. (1998) Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Aarch. Microbiol.* **169**, 387-392.
- Kurtzman, C.P. and Robnett, C.J. (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* **73**, 331-371.
- L  
iti G, Peruffo A, James SA, Roberts IN & Louis EJ (2005) Inferences of evolutionary relationships from a population survey of LTR-retrotransposons and telomeric-associated sequences in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Yeast* **22**, 177-192.
- Lopandic, K., Molnár, O. and Prillinger H. (2005) Application of ITS sequence analysis, RAPD and AFLP fingerprinting in characterizing the yeast genus *Fellomyces*. *Microbiol. Res.* **160**, 13-26.
- Lopandic, K., Zelger, S., Bánszky L.K., Eliskases-Lechner, F. and Prillinger, H. (2006) Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. *Food Microbiol.* **23**, 341-350.
- Martínez, C., Gac, S., Lavin, A. and Ganga, M. (2004) Genomic characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from wine-producing areas in South America. *J. Appl. Microbiol.* **96**, 1161-1168
- Masneuf I, Hansen J, Groth C, Piskur J & Dubourdieu D (1998) New hybrids between *Sacharomyces sensu stricto* yeast species found among wine and cider production strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3887-3892.
- Montrocher, R., Verner, M.-C., Briolay, J., Gautier, C. and Marmeisse, R. (1998) Phylogenetic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* group based on polymorphisms of rDNA spacer sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**, 295-303.
- Nadal, D., Colomer, B. and Piña, B. (1996) Molecular polymorphism distribution in phenotypically distinct populations of wine yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1944-1950).
- Naumova, E.S., Naumov, G.I., Masneuf-Pomarède, I. and Aigle, M. (2005) Molecular genetic study of introgression between *Saccharomyces bayanus* and *S. cerevisiae*. *Yeast* **22**, 1099-1115.
- Pramateftaki, P.V., Lanaridis, P. and Typas, M.A. (2000) Molecular identification of wine yeasts at species or strain level: a case study with strains from two vine-growing areas of Greece. *J. Appl. Microbiol.* **89**, 236-248.
- Pretorius, I.S., Van der Westhuizen, T.J. and Augustyn, O.P.H. (1999) Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the South African industry-a review. *S. Afr. J. Enol. Viticul.* **20**, 61-74.
- Querol, A., Barrio, E. and Ramón, D. (1992) A comparative study of different methods of yeast strain characterisation. *Syst. Appl. Microbiol.* **15**: 439-446.
- Querol, A., Barrio, E. and Ramón, D. (1994) Population dynamics of natural *Saccharomyces* strains during wine fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **21**, 315-323.

- Querol, A. and Ramón, D. (1996) The application of molecular techniques in wine microbiology. *Trends Food Sci. Tech.* **7**, 3-78.
- Raspor, P., Miklič Milek, D., Polanc, J., Smole Možina, S. and Čadež. N. (2006) Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region, Slovenia. *Int. J. Food. Microbiol.* **109**, 97-102.
- Redzepovic, S., Orlic, S., Sikora, S., Majdak, A. and Pretorius, I.S. (2002) Identification and characterisation of *Saccharomyces paradoxus* strains isolated from Croatian vineyards. *Lett. Microbiol.* **35**, 305-310.
- Rementeria, A., Rodriguez, J.A., Cadaval, A., Amenabar, R., Muguruza, J.R., Hernando, F.L. and Sevilla, M.J. (2003) Yeast associated with spontaneous fermentations of white wines from the "Txakoli de Bizkaia" region (Basque Country, North Spain). *Int. J. Food. Microbiol.* **86**, 201-207.
- Versavaud, A., Couroux, P., Roulland, C., Dulau, L. and Hallet, J.N. (1995) Genetic diversity and geographical distribution of wild *Saccharomyces cerevisiae* strains from wine-producing area of Charentes, France. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3521-3529.

## **Autoren:**

### **Ksenija Lopandic und Hansjörg Prillinger**

Universität für Bodenkultur

Institut für angewandte Mikrobiologie

Muthgasse 18

A-1190 Wien

[ksenija.lopandic@boku.ac.at](mailto:ksenija.lopandic@boku.ac.at), Tel. 0043-1-36006-6210

[hansjoerg.prillinger@boku.ac.at](mailto:hansjoerg.prillinger@boku.ac.at), Tel. 0043-1-36006-6207