(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118265773 A
(43)申请公布日 2024.06.28

(21)申请号 202280076741.0
(22)申请日 2022.10.24
(30)优先权数据
21204308.7 2021.10.22 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.05.17
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/NL2022/050601 2022.10.24
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/068934 EN 2023.04.27
(71)申请人 喜力供应链有限公司
地址 荷兰阿姆斯特丹
(72)发明人 贾斯珀·安德里斯·迪德里克
托马斯·佩里
玛丽亚·维塔利-瓦斯克斯
让-马克·乔治·达兰
(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限责任公司 11204
专利代理师 洪欣 伊硕
(51)Int.Cl.
C12C 11/00(2006.01)
C12C 11/02(2006.01)
C12C 12/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书32页 附图8页

(54)发明名称

高效生产发酵饮料的共培养物

(57)摘要

本发明涉及通过使用至少两种发酵性酵母菌株生产发酵饮料的方法,涉及可通过本发明的所述方法生产的发酵饮料,还涉及至少两种发酵性酵母菌株用于生产发酵饮料的用途。

CN 118265773 A

1.一种生产发酵饮料的方法,包括以下步骤:

-提供麦汁;

-向所述麦汁中添加啤酒花和至少两种发酵性酵母菌株,其中所述至少两种发酵性酵母菌株对所述麦汁中的糖类、特别是葡萄糖、果糖、麦芽糖和/或麦芽三糖的底物特异性不同;

-将所述麦汁与所述至少两种发酵性酵母菌株培养一定时间段;

-任选地从所发酵的麦汁中除去所述至少两种发酵性酵母菌株,

从而产生发酵饮料。

2.根据权利要求1所述的方法,其中所述麦汁是高比重麦汁,其比重大于16°P。

3.根据权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述至少两种发酵性酵母菌株同时或依次添加到所述麦汁中。

4.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述发酵饮料的表观发酵度至少为0.8。

5.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中高比重、例如大于16°P的麦汁的发酵在发酵的15天内产生最终比重小于2.5°P的发酵饮料。

6.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述至少两种发酵性酵母菌株是酿酒酵母菌株、巴斯德酵母菌株、真贝氏酵母菌株和/或其杂交混合物。

7.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中发酵在6℃-25℃、优选在8℃-15℃下进行。

8.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述发酵饮料是啤酒,优选为拉格啤酒。

9.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中具有麦芽糖底物偏好的发酵性酵母菌株是巴斯德酵母菌株CBS1483。

10.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中具有麦芽三糖底物偏好的发酵性酵母菌株是巴斯德酵母菌株CBS1513。

11.一种发酵饮料,优选为啤酒,更优选为拉格啤酒,其具有高乙醇含量,例如高于5体积%乙醇(ABV),或甚至高于6%ABV。

12.一种发酵饮料,优选为啤酒,更优选为拉格啤酒,其通过根据权利要求1-10中任一项所述的方法生产。

13.至少两种发酵性酵母菌株用于生产发酵饮料的用途,所述至少两种发酵性酵母菌株对麦汁中的糖、特别是葡萄糖、果糖、麦芽糖和/或麦芽三糖的底物特异性不同,所述发酵饮料优选为啤酒,最优选为拉格啤酒。

14.根据权利要求13所述的用途,其中所述至少两种发酵性酵母菌株同时或依次添加到所述麦汁中。

15.根据权利要求13或14所述的用途,其中所述至少两种发酵性酵母菌株包括:具有麦芽糖底物偏好的发酵性酵母菌株,例如巴斯德酵母菌株CBS1483;具有麦芽三糖底物偏好的发酵性酵母菌株,例如巴斯德酵母菌株CBS1513;或其组合。

高效生产发酵饮料的共培养物

技术领域

[0001] 本发明属于微生物学领域。特别是,本发明涉及对糖具有不同底物偏好和/或消耗能力的酵母菌株用于生产发酵产品、优选啤酒的用途。

1.背景技术

[0002] 啤酒酿造的麦汁糖发酵的第一步是糖类跨细胞膜转运。麦汁糖同化的效率和完备性取决于可发酵糖类葡萄糖、果糖、麦芽糖和麦芽三糖的转运蛋白的数量和特异性,也取决于糖类进入细胞后的新陈代谢。微生物对糖类混合物的转化通常是这样调节的:细胞会按顺序分配其细胞资源用于不同底物的转化,从最容易转化的糖类开始。在啤酒酿造麦汁的发酵过程中,尤其是在高比重麦汁发酵过程中,这将导致发酵度(attenuation)降低和相当高的残糖浓度。这至少部分是由于产生的乙醇会阻碍剩余糖类的发酵,而剩余糖类一般更难转化。

[0003] 在乙醇生产工艺中已经认识到了这一问题。例如,已公布的国际专利申请WO2013/181496建议采用不同酵母菌株的组合。由于WO2013/181496的目标是生产乙醇,因此所述组合包括一种或多种高乙醇耐受性酵母和一种或多种麦芽三糖阳性酵母。此外,发酵的优选底物包括马铃薯或小麦等淀粉,其中不添加啤酒花。优选的发酵温度在30℃至40℃之间。这些特征不能用于生产诸如啤酒、尤其是拉格啤酒等的发酵饮料。

[0004] 因此,有必要开发策略以至少部分地克服在生产诸如啤酒、尤其是拉格啤酒等的发酵饮料的方法中的残糖浓度。所述策略优选能实现高比重麦汁发酵。

2.发明内容

[0005] 通常在自然界、特别是微生物学中,营养偏好之间的权衡产生特化于麦汁糖同化的生物体。在此提供了一种方法,其可以利用特化(specialization)的多样性。与应用单一菌株(如泛化菌株)相比,通过具有不同底物特异性(如偏好麦芽糖或麦芽三糖)的特化菌株的联合对底物混合物进行转化将改善混合糖发酵动力学。特化菌株的联合将至少部分改善发酵度,并导致乙醇产量提高,尤其是在发酵高比重麦汁时更是如此。与WO2013/181496的公开内容不同的是,所述组合出乎意料地不必要包括一种或多种高乙醇耐受性酵母。

[0006] 因此,本发明提供了一种生产发酵饮料的方法,包括以下步骤:提供麦汁;向所述麦汁中添加啤酒花和至少两种发酵性酵母菌株,其中所述至少两种发酵性酵母菌株对所述麦汁中的糖类、尤其是葡萄糖、麦芽糖、果糖和/或麦芽三糖的底物特异性不同;将所述麦汁与所述至少两种发酵性酵母菌株培养一定时间段,从而产生发酵饮料。在培养期结束时,可任选地从所发酵的麦汁中除去所述至少两种发酵性酵母菌株。

[0007] 与采用单一非特化(non-specialist)酵母菌株的传统发酵相比,本发明的方法出乎意料地能够改进糖发酵动力学,从而在更早的时间点达到所需的最终比重。本领域技术人员可以理解,相比于单一酵母菌株(如非特化酵母菌株),即使在时间、接种量、发酵温度等所有其他条件基本相同的情况下,通过至少两种发酵性酵母菌株对特定麦汁进行发酵能

够实现此类时间缩短。

[0008] 此外,本发明的方法允许发酵高比重麦汁,甚至超高比重麦汁,其比重大于16°P(°Plato),例如17°P、18°P、19°P、20°P、21°P、22°P或23°P。这可能导致生产出具有高乙醇含量、例如大于5体积%乙醇(ABV)、大于6% ABV或甚至大于7% ABV的发酵饮料。

[0009] 所述至少两种发酵性酵母菌株可同时或依次添加到麦汁中。

[0010] 在本发明的一种优选方法中,高比重麦汁、例如具有大于16°P、包括17°P、18°P、19°P或20°P的麦汁的发酵可在减少的时间段内、例如在16-18°P麦汁发酵的15天内得到最终比重小于2.5°P的发酵饮料。

[0011] 在本发明的一种优选方法中,所述至少两种发酵性酵母菌株是酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)菌株、巴斯德酵母(S.carlsbergensis)(卡尔斯伯酵母(S.carlsbergensis))菌株、真贝氏酵母(S.eubayanus)菌株和/或其混合物或杂交种。所述至少两个发酵性酵母菌株可以是来自同一酵母菌种的菌株,如单一杂交菌种,也可以是来自两个或更多种酵母菌种的菌株,条件是这些菌株对糖类、特别是对葡萄糖、果糖、麦芽糖和/或麦芽三糖具有不同的底物特异性。

[0012] 在本发明的一种优选方法中,所述至少两种发酵性酵母菌株不会例如通过使推定黄素异戊烯基转移酶(PAD1)基因和/或阿魏酸脱羧酶(FDC1)基因失活而产生4-乙烯基愈创木酚。

[0013] 在本发明的优选方法中,发酵在6-25℃、优选在8-15℃下进行。

[0014] 在本发明的优选方法中,发酵饮料是啤酒,优选为拉格啤酒。

[0015] 在本发明的优选方法中,具有麦芽糖底物偏好的发酵性酵母菌株是巴斯德酵母菌株CBS1483。

[0016] 在本发明的优选方法中,具有麦芽三糖底物偏好的发酵性酵母菌株是巴斯德酵母菌株CBS1513。

[0017] 本发明进一步提供了一种发酵饮料,优选为啤酒,更优选为拉格啤酒,其具有高乙醇含量,例如大于5体积%乙醇(ABV)、大于6% ABV、甚至大于7%ABV。所述发酵饮料、优选啤酒、更优选拉格啤酒优选通过本发明的方法生产。

[0018] 本发明进一步提供了至少两种发酵性酵母菌株的组合用于生产发酵饮料的用途,所述至少两种发酵性酵母菌株对麦汁中的糖类、特别是对葡萄糖、果糖、麦芽糖和/或麦芽三糖的底物特异性不同,所述发酵饮料优选为啤酒,最优选为拉格啤酒。

[0019] 所述至少两种发酵性酵母菌株可同时或依次添加到麦汁中。

[0020] 所述至少两种发酵性酵母菌株优选包括:具有麦芽糖底物偏好的发酵性酵母菌株,如巴斯德酵母菌株CBS1483;具有麦芽三糖底物偏好的发酵性酵母菌株,如巴斯德酵母菌株CBS1513;或其组合。

3.附图说明

[0021] 图1:菌株WS34/70对麦芽糖(圆圈)和麦芽三糖(方格)的代表性糖消耗曲线。示出了生物学一式三份的平均值。用于计算各自消耗率的点对于麦芽糖以黑色圆圈示出且对于麦芽三糖以黑色方格示出。

[0022] 图2:所有测试菌株的M2/M3速率比分布。CBS1483、CBS1513和WS34/70的速率比分

别用白色圆圈、白色方格和白色三角形表示。

[0023] 图3:20°P麦汁的发酵。示出了使用WS34/70、CBS1513、CBS1483以及所示的CBS1513和CBS1483组合对20°P麦汁进行发酵期间的比重(°P)变化(A)、麦芽三糖含量(B)、麦芽糖含量(C)、期间的乙醇生产水平(D)和最终的乙醇生产水平(E)。

[0024] 图4:23°P麦汁的发酵。示出了使用CBS1513、CBS1483以及所示的CBS1513和CBS1483组合对23°P麦汁进行发酵期间的比重(°P)变化(A)、麦芽三糖含量(B)和麦芽糖含量(C)。

[0025] 图5:20°P麦汁发酵与23°P麦汁发酵的比较。示出了CBS1513和CBS1483组合的比重(°P)变化(A)和最终的乙醇生产水平(B)。

[0026] 图6:使用酿酒酵母属菌株(Saccharomyces strain)的共培养物的麦汁发酵。包含Superstart菌株和Thermosacc菌株(■)的酿酒酵母混合菌株的23°P麦汁发酵和包含CBS1483菌株和CBS1513菌株(□)的巴斯德酵母混合菌株的23°P麦汁发酵的A)柏拉图曲线、B)麦芽糖曲线、C)麦芽三糖曲线和D)最终的乙醇滴定度(ethanol titer)。数值表示来自独立的一式四份培养物的数据的平均值±平均偏差。

[0027] 图7:麦汁的二氧化碳曲线。包含Superstart菌株和Thermosacc菌株(Lallemand)(■)的酿酒酵母混合菌株的共培养物的发酵和包含CBS1483菌株和CBS1513菌株(□)的巴斯德酵母混合菌株的共培养物的发酵。所示曲线来自一组四份中的单个代表性实验。

4.具体实施方式

[0028] 4.1定义

[0029] 本文使用的术语“发酵饮料”是指通过发酵作物及其产品例如谷物、大米、葡萄和其他水果、坚果和/或来自例如龙舌兰、丝兰和仙人掌等的渗出物而生产的啤酒产品。优选的发酵饮料是啤酒。更优选的发酵饮料是拉格啤酒。

[0030] 本文使用的术语“基因”是指确保由该基因编码的产物被表达的任何及所有顺式作用基因组序列。所述顺式作用基因组序列包括增强子和启动子序列、外显子和内含子序列、终止子序列等。所述产物可以是RNA分子,例如mRNA分子或siRNA分子,和/或蛋白质。

[0031] 本文使用的术语“失活基因”是指不能发挥正常功能的基因。例如,对于编码蛋白质的基因来说,“失活”是指该蛋白质的基因表达量减少,和/或该基因编码失活蛋白质或编码活性降低的蛋白质。例如,这种失活可能是由于启动子序列发生了改变,导致启动子无法启动基因的转录;也可能是由于内含子的剪接位点发生了改变,这种改变干扰了转录的前mRNA的正确剪接;还可能是由于基因编码区发生了改变,导致编码的蛋白质活性降低甚至失去活性。与未失活的基因相比,所述失活优选至少为50%,更优选至少为60%,更优选至少为70%,更优选至少为80%,更优选至少为90%,更优选至少为99%,这意味着该基因的蛋白质产物的最大活性最多为野生型蛋白质的50%,更优选最多为40%,更优选最多为30%,更优选最多为20%,更优选最多为10%,更优选最多为1%。与野生型(即未失活基因)编码的蛋白质相比,该活性降低可能是由于由失活基因编码的蛋白质的表达量减少和/或活性降低。

[0032] 本文使用的术语“杂交体”或“杂交酵母”是指将两种不同品种或物种的酵母的基因组组合而成的酵母。杂交体优选为有性杂交的结果,也就是说,杂交酵母是两种不同性别

的细胞(如两种不同交配型的细胞,优选为两个配子)交配(也称融合)的结果。

[0033] 本文使用的术语“种间杂交体”是指将两个不同种甚至不同属的生物体的基因组组合而成的酵母。

[0034] 本文所用术语“酵母(yeast)”是指被归类为真菌界成员的真核、单细胞微生物。优选的酵母是狭义酿酒酵母属综合组(Saccharomyces sensu stricto complex)的酵母,包括其任何杂交种。狭义酿酒酵母属综合组目前包括八个不同的种:酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)、奇异酵母(S.paradoxus)、葡萄汁酵母(S.uvarum)、麦卡特酵母(S.mikatae)、库维酵母(S.kudriavzevii)、S.arboricola、真贝氏酵母(S.eubayanus)和最近发现的S.jurei(Hittinger,2013.Trends Genet 29:309-317;Naseeb等人,2017.Int J Syst Evol Microbiol 67:2046-2052)。

[0035] 本文所用的术语“发酵性酵母”是指狭义酿酒酵母菌综合组的酵母,优选为酿酒酵母或真贝氏酵母和/或其杂交体,如巴斯德酵母(S.pastorianus),也称卡尔斯伯酵母(S.carlsbergensis)。

[0036] 本文使用的术语“糖”是指麦汁中的糖。这些糖包括麦芽糖、麦芽三糖、葡萄糖、麦芽四糖、蔗糖、糊精和果糖。在普通麦汁中,麦芽糖占糖类的约40-50%,麦芽三糖和葡萄糖各占约5-15%,麦芽四糖和蔗糖各占约4-5%,糊精占约20-25%,果糖占约2.5%。在这些糖中,麦芽四糖和糊精被认为是不可发酵的。

[0037] 本文使用的术语“麦汁”是指从捣碎的粮谷中提取的含水液体。所述粮谷包括大麦或由大麦组成。未添加啤酒花的起始麦汁可称为“甜麦汁(sweet wort)”,而添加了啤酒花的麦汁可称为“苦麦汁(bitter wort)”。

[0038] 本文使用的术语“麦芽糖”是指由通过α-1,4糖苷键连接的两个葡萄糖分子组成的双糖。

[0039] 本文所用的“麦芽三糖”是指由通过α-1,4糖苷键连接的三个葡萄糖分子组成的三糖。

[0040] 本文使用的术语“麦芽四糖”是指一种四糖((2R,3R,4S,5S,6R)-2-[(2R,3S,4R,5R,6R)-6-[(2R,3S,4R,5R,6R)-4,5-二羟基-2-(羟甲基)-6-[(2R,3S,4R,5R,6S)-4,5,6-三羟基-2-(羟甲基)氧杂环己烷-3-基]氧基氧杂环己烷-3-基]氧基-4,5-二羟基-2-(羟甲基)氧杂环己烷-3-基]氧基-6-(羟甲基)氧杂环己烷-3,4,5-三醇),其被认为是不可发酵的。

[0041] 本文使用的术语“糊精”是指通过α-(1→4)或α-(1→6)糖苷键连接的D-葡萄糖单元的聚合物混合物。糊精是淀粉在糖化过程中被α-和β-淀粉酶降解而形成的。

[0042] 本文使用的术语“底物偏好(substrate preference)”是指酵母菌株转运和代谢底物的能力。在本申请的上下文中,所述底物是糖,优选选自麦芽糖、麦芽三糖、果糖和葡萄糖。酵母可以被选择为对特定底物(如麦芽糖、麦芽三糖、果糖或葡萄糖)的代谢作用增强的酵母,这意味着与参考酵母(如选择前的亲本酵母)相比,所述特定底物将优先被转运和代谢,优选甚至在有其他糖存在的情况下也是如此。例如,对麦芽三糖有底物偏好的酵母菌株将优先于麦芽糖转运和代谢麦芽三糖。底物偏好不同的至少两种酵母菌株的组合被认为是最佳的,尤其是在发酵高比重麦汁时更是如此。此外,底物偏好不同的至少两种酵母菌株的所述组合还能提高所得发酵饮料的发酵度。换言之,与单一酵母菌株(如单一普通菌株或标准菌株)相比,底物偏好不同的至少两种酵母菌株的所述组合可在减少的时间段内使发酵

饮料的表观发酵度(apparent attenuation)达到至少0.8。

[0043] 本文使用的术语“麦芽糖偏好”是指与亲本菌株相比,能够以更高的偏好转运和代谢麦芽糖的酵母菌株。所述术语优选地指具有3或更高、优选4至10之间或更高的麦芽糖/麦芽三糖速率比的酵母。

[0044] 本文使用的术语“麦芽三糖偏好”是指与亲本菌株相比,能够以更高的偏好转运和代谢麦芽三糖的酵母菌株。所述术语优选地指具有小于2、优选小于1、如0.01至1之间的麦芽糖/麦芽三糖速率比的酵母。

[0045] 本文使用的术语“泛化菌(generalist)”是指对麦芽糖或麦芽三糖的转化没有偏好的酵母菌株。所述术语优选地指具有在1至4之间、优选在1.6至2.2之间、如约2的麦芽糖/麦芽三糖速率比的酵母。

[0046] 本文使用的术语“麦芽糖速率(maltose rate)”是指酵母菌株发酵麦芽糖的速率。所述速率优选在麦芽糖消耗曲线的指数阶段确定。所述速率优选地通过将具有公式$Y_t = Y_0 \times e^{(k1 \times t)}$的线拟合到麦芽糖消耗曲线的指数阶段的点来确定,其中k1($g\ L^{-1}h^{-1}$)是速率常数,Y_t($g\ L^{-1}$)是时间t处的麦芽糖浓度,Y_0($g\ L^{-1}$)是t=0处的起始麦芽糖浓度,并且t(h)是时间。常数k1是针对特定菌株或菌株组合计算的值。

[0047] 本文使用的术语“麦芽三糖速率(maltotriose rate)”是指酵母菌株发酵麦芽三糖的速率。所述速率优选在麦芽三糖消耗曲线的指数阶段确定。所述速率优选地通过将具有公式$Y_t = Y_0 \times e^{(k2 \times t)}$的线拟合到麦芽三糖消耗曲线的指数阶段的点来确定,其中k2($g\ L^{-1}h^{-1}$)是速率常数,Y_t($g\ L^{-1}$)是时间t处的麦芽三糖浓度,Y_0($g\ L^{-1}$)是t=0处的起始麦芽三糖浓度,并且t(h)是时间。常数k2是针对特定菌株或菌株组合计算的值。

[0048] 术语“麦芽糖/麦芽三糖速率比(maltose/maltotriose rates ratio)”是指确定的麦芽糖速率除以确定的麦芽三糖速率(k1/k2)的值,从而得出无量纲值麦芽糖/麦芽三糖(M2/M3)速率比。比率可最大化至10。同样,常数k是针对特定菌株或菌株组合计算得出的值。

[0049] 本文在发酵乙醇饮料背景中使用的术语“比重(gravity)”是指流体与水相比的相对密度,其在很大程度上取决于流体的含糖量。比重可通过比重计、折射计、比重瓶或摆动式U型管电子测量仪来测定,如本领域的技术人员所已知的。

[0050] 本文使用的术语“特定比重”是指流体在参考温度下相对于水在参考温度下的密度的相对密度。可以使用带有适当刻度的比重计或折射计进行测量。

[0051] 本文使用的术语“原始提取物(original extract)”是指发酵前100克麦汁中糖分的质量(以克为单位),例如用°P、白利糖度(Brix)或溶解固体标度来测量。其可以在某些折射仪和比重计上直接测量,或根据原始比重换算。

[0052] 本文使用的术语“原始比重”是指发酵前在给定参考温度下特定比重的测量值。其可以在某些折射仪和比重计上直接测量,或根据原麦汁浓度换算。

[0053] 本文使用的术语“提取物(extract)”是麦汁中可发酵糖和不可发酵可溶性碳水化合物的总和的测量,其中提取物为X°P的溶液与100克溶液中含有X克蔗糖的水溶液具有相同的密度。

[0054] 本文使用的术语“表观提取物(apparent extract)”是指原始提取物中作为残糖存在的部分,所述残糖在发酵过程中没有转化为酵母生物质、乙醇或CO_2。其可以互换地表

示为°P、白利糖度或溶解固体,并且通常通过基于原始提取物的计算来确定,而不需要修正乙醇对密度的影响。表观提取物可以例如通过Analytica-EBC方法9.4(EBC-欧洲啤酒酿造协会.2004.Analytica-EBC.Verlag Hans Carl Getränke-Fachverlag,Nuremberg,Germany)从密度计算出来。

[0055] 本文使用的术语“发酵度(attenuation)”是指麦汁中存在的糖中已通过发酵转化为CO_2、乙醇和其他一些化合物(如酯类)的量。发酵度优选以柏拉图度(°P)来表示,指的是与开始时存在的糖的量相比,已经发酵的糖所占百分比。

[0056] 本文使用的术语“表观发酵度(apparent attenuation)”是指在不修正乙醇对密度的影响的情况下,起始麦汁中存在的糖的相对转化率。表观发酵度可以用此公式计算:(原始提取物-表观提取物]/原始提取物)。术语“实际发酵度”是指在修正乙醇对密度的影响的情况下,起始麦汁中存在的糖的相对转化率。

[0057] 本文使用的术语“最终比重”是指在给定的参考温度下,发酵结束时特定比重的测量,与表观提取物直接相关。当比重读数停止移动时,就表示发酵结束。最终比重可以直接在比重计上测量,或根据原始提取物和表观提取物计算。

[0058] 本文使用的术语“高比重麦汁”是指比重大于14°P、优选最大23°P的麦汁。高比重麦汁的发酵产生具有至少为6体积%乙醇(ABV)的啤酒。

[0059] 4.2不同层次底物偏好的酵母菌株

[0060] 如本领域技术人员所知,可通过多种方式产生对选自麦芽糖、麦芽三糖、果糖和葡萄糖的糖具有偏好的酵母菌株。例如,所述特化菌(specialist)可能是天然存在的,并且分离所述特化菌涉及在例如包含麦芽糖、麦芽三糖、果糖和葡萄糖中的一种作为唯一碳源的合成生长培养基上进行选择。可以在所述选择性生长培养基上进行连续选择,例如通过降低优选糖的浓度以迫使酵母针对所述糖调整非常高效的转运和代谢,从而选择出对麦芽糖、麦芽三糖、果糖和葡萄糖中的一种具有偏好的菌株。

[0061] 然而,所述特化菌可能不是天然存在的,并且分离所述特化菌可能涉及在选择之前对酵母菌株或多个酵母菌株进行诱变。酵母(如酿酒酵母属酵母(Saccharomyces yeast),优选为狭义酿酒酵母属酵母)的诱变可以使用本领域已知的任何方法进行,包括传统的随机诱变方法,如辐射和化学处理,以及DNA重组技术,如定点诱变或靶向诱变。因此,酵母细胞可以已进行随机诱变、包括用紫外线辐照、X射线辐照、伽马射线辐照和诱变剂处理,或已进行基因工程处理。

[0062] 术语“随机诱变”是指这样的诱变技术,其中确切的突变位点不可预测,并且可以发生在酵母细胞或孢子的染色体的任何位置。一般来说,这些方法涉及使用化学制剂或辐射来诱导至少一种突变。

[0063] “基因工程”在本领域是众所周知的,指的是利用生物技术方法改变酵母的基因组,从而引入酵母的基因组DNA的改变,优选在预定位点上并且以预定的改变引入,称为定点诱变。

[0064] 靶向诱变也称为定点诱变,可使用寡核苷酸定向诱变在感兴趣的基因组DNA序列中产生位点特异性突变。靶向诱变是指一种在体内改变特定基因的诱变方法,从而导致针对特定位点的遗传结构变化,所述方法例如通过可编程RNA引导的核酸酶如TALEN、CRISPR-Cas、锌指核酸酶或大范围核酸酶(meganuclease)技术来进行。

[0065] 所述诱变优选通过使酵母经受辐射处理如紫外线辐照、X射线辐照、伽马射线辐照和/或诱变剂、优选化学试剂如NTG(N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍)或EMS(乙基甲烷磺酸盐)来进行。特别优选的诱变程序包括紫外线照射,例如10秒到3分钟,优选大约1-2分钟。优选的方法包括在辐射峰值为253.7nm的紫外光(TUV 30W T8,飞利浦,荷兰埃因霍温)下暴露0.1-10分钟、优选0.5-5分钟、如约90分钟的时间段。

[0066] 所述诱变可导致一个或多个基因下调或失活,所述基因参与选自葡萄糖、麦芽糖、果糖和麦芽三糖的一种或多种糖的摄取和/或代谢。例如,细胞表面葡萄糖传感器Rgt2和/或Snf3的改变,以及或下游核转录因子Rgt1的改变会导致编码葡萄糖转运蛋白的基因受到抑制(Roy等人,2016.Mol Biol Cell 27:862-871)。因此,Rgt2、Snf3和Rgt1中的一个或多个突变可能产生无法发酵葡萄糖的突变酵母菌株。所述突变酵母菌株将偏好选自麦芽糖和麦芽三糖的糖。

[0067] 除了使参与选自葡萄糖、果糖、麦芽糖和麦芽三糖的一种或多种糖的摄取和/或代谢的一种或多种基因下调或失活外,所述诱变还可以导致编码葡萄糖、果糖、麦芽糖和/或麦芽三糖的摄取、发酵和/或有氧降解中的关键酶的基因上调或激活。所述上调或激活可导致例如麦芽三糖转运蛋白的活性增强,从而使所述突变酵母细胞可对麦芽三糖具有偏好。

[0068] 优选的是,所述诱变、优选随机诱变优选分两轮或多轮进行。每一轮优选包括诱变步骤,优选为温和的诱变步骤,优选为紫外线介导的诱变步骤,其导致20-60%、优选为40-50%的中等存活率。

[0069] 在第一轮中,可将突变酵母接种到含有葡萄糖、麦芽糖、果糖或麦芽三糖中的一种糖作为唯一碳源的合成培养基中,优选含有有限量的所述糖。这一步骤将富集能够高效消耗葡萄糖、果糖、麦芽糖或麦芽三糖中的至少一种的突变体。

[0070] 在第二轮中,对葡萄糖、麦芽糖、果糖或麦芽三糖中的一种糖(优选为麦芽糖或麦芽三糖)进行正选择的突变酵母,可以通过接种在含有其余两种糖作为唯一碳源的合成培养基中进行反选择。不能或几乎不能在剩余的两种糖上生长的酵母可被选择用于进一步分析。

[0071] 如有必要,第三轮诱变可包括在富含葡萄糖、果糖、麦芽糖或麦芽三糖中的一种的稀释啤酒酿造麦汁中生长。在这些条件下,对所述糖具有改善亲和力或更高转运速率的突变体受养分限制的程度会降低,从而与其他酵母相比具有选择性优势。为此,可将麦汁稀释2-10倍,例如六倍。可对稀释后的所述麦汁补充葡萄糖、麦芽糖、果糖或麦芽三糖,例如1-20g L^{-1},如10g L^{-1}葡萄糖、麦芽糖、果糖或麦芽三糖,以增加葡萄糖、麦芽糖、果糖或麦芽三糖的相对浓度。可补充麦角甾醇(例如1-100mg L^{-1})、TWEEN®80(例如100-1000mg L^{-1})和硫酸铵(例如1-20mg L^{-1}),以防止氧和氮限制。

[0072] 在富含葡萄糖、麦芽糖、果糖或麦芽三糖的啤酒酿造麦汁上的所述生长优选通过连续培养进行。所述连续培养可以0.001-0.2h^{-1}、优选0.01-0.1h^{-1}、例如0.03h^{-1}的稀释率进行。在葡萄糖、果糖、麦芽糖或麦芽三糖浓度降低的时间点,优选从培养物中分离出单细胞,例如通过FACS分选进行分离。分离出的细胞可以培养在含有葡萄糖、果糖、麦芽糖或麦芽三糖作为唯一碳源的合成培养基上,和/或在如上所述的富含葡萄糖、麦芽糖、果糖或麦芽三糖的啤酒酿造麦汁上,以进一步选择对选自麦芽糖、麦芽三糖、果糖和葡萄糖的糖具有偏好的酿酒酵母属突变体。

[0073] 必要时,可通过使所述突变体在包含一种或多种其余糖的培养基或平板上生长来反选择对选自麦芽糖、麦芽三糖、果糖和葡萄糖的糖具有偏好的酿酒酵母属突变体。优选的酿酒酵母属突变体将对选自麦芽糖、麦芽三糖、果糖和葡萄糖中的特定糖具有偏好,但可能显示在其他三种糖上减弱的生长。所述减弱的生长优选限制在小于非突变酿酒酵母属酵母的50%、小于非突变酿酒酵母属酵母的25%、小于非突变酿酒酵母属酵母的10%或最优选小于非突变酿酒酵母属酵母的5%。

[0074] 对选自麦芽糖、麦芽三糖、果糖和葡萄糖的糖具有偏好的酿酒酵母属突变体可以这样的酵母菌株产生,该酵母菌株随后与具有额外特性的第二酵母菌株杂交。例如,可以产生或不经突变而选择出对发酵麦芽糖具有偏好的酿酒酵母突变体。所述突变体可与不能发酵葡萄糖、果糖和/或麦芽三糖的真贝氏酵母菌株杂交。所产生的种间杂交体可以被选择为对发酵麦芽糖具有偏好,而所述杂交体不能或几乎不能发酵葡萄糖、果糖和/或麦芽三糖。

[0075] 所述发酵性酵母优选包含导致推定黄素异戊烯基转移酶(PAD1)基因和阿魏酸脱羧酶(FDC1)基因中的至少一者失活,和/或导致编码参与摄取酚酸(优选为阿魏酸)或参与输出脱羧酚类化合物(优选为4-乙烯基愈创木酚)的蛋白质的基因失活的突变。

[0076] 所生产的发酵啤酒产品优选为啤酒,优选为拉格啤酒。

[0077] 4.3具有不同糖消耗特征的酿酒酵母属酵母的鉴定

[0078] 如本领域技术人员所知,对选自麦芽糖、麦芽三糖、果糖和葡萄糖的糖具有偏好的酵母菌株可以通过多种方式产生。例如,可以产生包含麦芽糖、乳糖三糖、果糖和葡萄糖中的至少一种糖的培养基,优选无菌培养基。所述生长培养基可以是天然生长培养基、合成生长培养基或其组合。

[0079] 优选地,产生不同的培养基,每个培养基包含麦芽糖、麦芽三糖、果糖和葡萄糖中的至少一种糖。随后测定特定酿酒酵母属酵母菌株在每种糖上的生长,优选初始生长,更优选初始指数生长。所述生长速率可以通过确定指数生长曲线、优选初始指数生长曲线的斜率来确定。用于确定所述斜率的方法是本领域已知的,包括将生长曲线、优选指数生长曲线拟合到公式$X=X_0\times e^{\mu\tau}$,其中X_0是T=0时的酵母数量且μ是生长速率,并且确定在时间x时的对数。所述确定的生长速率优选地是特定酿酒酵母属酵母菌株在每种糖上生长的最大生长速率。

[0080] 作为替代,或另外地,提供包含糖组合的生长培养基,例如麦汁。所述生长培养基优选包含特定量的可发酵糖,例如在2至500g/L之间、在5至200g/L之间、包括50g/L、75g/L、100g/L、120g/L和150g/L的糖麦芽糖、麦芽三糖、果糖和葡萄糖。在用特定的酿酒酵母属酵母菌株接种所述生长培养基之后,以规则的间隔,例如每2小时、每5小时、每10小时、每12小时或每天一次,从生长培养基中取出样品一定时间段,例如1天至2周,包括1周。可以分析所述样品的酵母细胞数量(例如通过测定OD_{660})以及可发酵糖和/或其代谢产物的量。所述可发酵糖优选包括麦芽糖、麦芽三糖、果糖和葡萄糖,优选麦芽糖、麦芽三糖和葡萄糖,更优选麦芽糖和麦芽三糖。

[0081] 所述偏好优选通过确定单种糖的消耗速率来确定,所述消耗速率包括麦芽糖消耗速率、麦芽三糖消耗速率、葡萄糖消耗速率和/或果糖消耗速率。所述消耗速率优选在所述可发酵糖的消耗曲线的指数阶段中确定,例如通过将式$Y=Y_0\times e^{(k\times X)}$的指数曲线拟合到每种单独的可发酵糖的消耗曲线的指数阶段中的点。

[0082] 所述酵母菌株优选具有对麦芽糖或麦芽三糖具有偏好。所述偏好可以用无量纲值麦芽糖/麦芽三糖(M2/M3)速率比来表示。表1和图2中提供了单个酵母菌株的M2/M3速率比的示例。M2/M3速率比值的范围为从0.28至在所有样品中设置为10的最大值。麦芽糖特化菌巴斯德酵母CBS1483显示M2/M3速率比在4-10之间。麦芽三糖特化菌巴斯德酵母CBS1513(别名NCYC396)显示M2/M3速率比在0.28-0.40之间。泛化菌株WS34/70的M2/M3速率比在1.82至1.96之间。

[0083] 因此,具有麦芽糖偏好的酵母菌株能够以更高的偏好转运和代谢麦芽糖,其麦芽糖/麦芽三糖速率比为3或更大,优选在4至10之间或更高。具有麦芽三糖偏好的酵母菌株能够以更高的偏好转运和代谢麦芽三糖,其麦芽糖/麦芽三糖速率比小于2,优选小于1,例如在0.01至1之间。泛化酵母菌株对麦芽糖或麦芽三糖的转化没有偏好,其麦芽糖/麦芽三糖速率比在1至4之间,优选在1.6至2.2之间,例如约2。

[0084] 可以在没有任何发明技能的情况下确定单个酵母菌株的麦芽糖/麦芽三糖速率比。如表1所示,已经对总共139个单独的酵母菌株测定了所述麦芽糖/麦芽三糖速率比。

[0085] 4.4使用对麦芽糖、麦芽三糖、果糖和/或葡萄糖具有不同特异性的酿酒酵母属酵母的混合物生产发酵饮料的方法。

[0086] 酵母长期以来一直被用于烘焙、酿造和蒸馏,如面包生产、啤酒和葡萄酒发酵中。本发明的方法将实现比应用单一泛化菌株更好的混合糖发酵动力学,从而提高最终发酵度和乙醇产量。

[0087] 本发明的方法包括在水溶液中、优选在水中提供捣碎的粮谷、优选大麦,以释放麦芽糖。此制麦芽步骤之后,在啤酒花的存在下将所得到的麦汁煮沸,并在冷却后将所得到的煮沸的麦汁发酵。发酵完成后,可以对啤酒进行过滤和装瓶。本领域技术人员知道,啤酒(例如拉格啤酒)的完全发酵可能需要长达6周的时间,这取决于例如温度和酵母起始培养物。

[0088] 在发酵过程中,可发酵糖转化为醇类如乙醇、CO_2和风味化合物如酯类,例如乙酸异戊酯。如本领域技术人员所知,将影响所得到的产品的外观和味道的因素包括但不限于谷物的烘焙温度和烘焙时间,谷物的浸泡、发芽和烘干的温度和时间,谷物研磨和打浆的温度和时间,所得到的麦芽浆的过滤以产生麦汁,麦汁煮沸的温度和时刻,添加啤酒花的时机和量,所使用的特定啤酒花,发酵的温度和时间,酵母的类型,酵母的机械过滤或添加过滤剂以去除酵母,以及最后啤酒的碳酸化和包装。在发酵之后、过滤之前的调制过程中,酵母会有几天到几周的时间来吸收与调制不足或“绿色”啤酒有关的常见异味,包括硫磺、黄油和青苹果味。

[0089] 在本发明的方法中,发酵过程在常温下,优选低于30℃,例如6-25℃、6-24℃、6-23℃、6-22℃、6-21℃、6-20℃、6-19℃、6-18℃、6-17℃、6-16℃、6-15℃、6-14℃,更优选8-13℃,包括9℃、10℃、11℃和12℃下进行。拉格啤酒发酵通常在7-13℃的温度下进行。如本领域技术人员所知,温度可以取决于发酵过程中使用的特定酵母菌株。

[0090] 本发明的方法优选采用酵母菌株的组合,所述酵母菌株对将麦汁中存在的发酵麦芽糖、麦芽三糖、果糖和/或葡萄糖发酵成乙醇具有不同特异性。所述酵母菌株的组合优选包括狭义酿酒酵母属(Saccharomyces sensu stricto)、优选酿酒酵母、卡尔斯伯酵母、巴斯德酵母、真贝氏酵母和/或其杂交体的天然存在酵母;或来自狭义酿酒酵母属、优选酿酒酵母、卡尔斯伯酵母、巴斯德酵母、真贝氏酵母和/或其杂交体的突变体。

[0091] 所述酵母菌株中的每一种均已针对对麦芽糖、果糖、麦芽三糖和葡萄糖中的一种的发酵优于其他两种糖的增强偏好而被选择。优选的酵母是巴斯德酵母,优选天然存在的巴斯德酵母,如巴斯德酵母菌株CBS1483、巴斯德酵母菌株CBS 1513或巴斯德酵母菌株CBS1483和巴斯德酵母菌株CBS1513的组合。

[0092] 麦芽三糖特化菌可选自CBS1513、NCYC 452、NCYC 1269、NCYC 451、NCYC 457、NCYC 204、NCYC 185、NCYC 1239、NCYC 1146、NCYC 1297、NCYC 1073、NCYC 231、NCYC 1305、CBS 6903、NCYC 203、CBS2443、NCYC 2339、NCYC 1324、CBS2898、CBS 7240、NCYC 1526、NCYC 1544、NCYC 2359、NCYC 986、NCYC 1295、NCYC 1516、NCYC 1326、NCYC 2398、NCYC 669和NCYC 2921。

[0093] 麦芽糖特化菌可选自NCYC 1262、NCYC 227、NCYC 699、NCYC 487、NCYC 2340、NCYC 1296、NCYC 228、NCYC 534、NCYC 2801、NCYC 1365、NCYC 668、NCYC 450、NCYC 1236、NCYC 75、NCYC 112、NCYC 115、NCYC 177、NCYC 223、NCYC 224、NCYC 240、NCYC 340、NCYC 478、NCYC 479、NCYC 510、NCYC 530、NCYC 965、NCYC 969、NCYC 975、NCYC 987、NCYC 989、NCYC 1322、NCYC 1323、NCYC 229、NCYC 230、NCYC 242、NCYC 392、NCYC 397、NCYC 398、NCYC 511、NCYC 584、NCYC 3420、CBS12357、CBS 7001、CBS1174、CBS1177、CBS1245、CBS1386、CBS1488、CBS1502、CBS1504、CBS1548、CBS1550、CBS1551、CBS1552、CBS1603、CBS1605、CBS1606、CBS1608、CBS1665、CBS2165、CBS2442、CBS2945、CBS2954、CBS2986、CBS 5156、CBS 6017、yHDPN 421、yHKS210、yHKS212、yHKS 509、yHRVM 107、NCYC 966和CBS1483。

[0094] 酵母组合可包括具有最低M2速率/M3速率比的CBS1513、NCYC 452、NCYC 1269、NCYC 451、NCYC 457、和NCYC 204中的任一种和具有最高M2速率/M3速率比的NCYC 75、NCYC 112、NCYC 115、NCYC 177、NCYC 223、NCYC 224、NCYC 240、NCYC 340、NCYC 478、NCYC 479、NCYC 510、NCYC 530、NCYC 965、NCYC 969、NCYC 975、NCYC 987、NCYC 989、NCYC 1322、NCYC 1323、NCYC 229、NCYC 230、NCYC 242、NCYC 392、NCYC 397、NCYC 398、NCYC 511、NCYC 584、NCYC 3420、CBS12357、CBS 7001、CBS1174、CBS1177、CBS1245、CBS1386、CBS1488、CBS1502、CBS1504、CBS1548、CBS1550、CBS1551、CBS1552、CBS1603、CBS1605、CBS1606、CBS1608、CBS1665、CBS2165、CBS2442、CBS2945、CBS2954、CBS2986、CBS 5156、CBS 6017、yHDPN 421、yHKS210、yHKS212、yHKS 509、yHRVM 107、NCYC 966和CBS1483中的任一种。

[0095] 所述酵母组合可包括具有最低M2速率/M3速率比的CBS1513、NCYC 452、NCYC 1269、NCYC 451、NCYC 457、和NCYC 204中的任一种和泛化菌株NCYC 984、NCYC 529、NCYC 2347、NCYC 2837、NCYC 670、NCYC 2426、NCYC 531、WS34/70、NCYC 454、NCYC 73、NCYC 2337、NCYC 1250、NCYC 1056、NCYC 456、NCYC 985、NCYC 680、NCYC 2338、NCYC 1026、CBS1484、CBS 5832、NCYC 1341、CMB S33、NCYC 399、NCYC 1342、NCYC 400、NCYC 3419、NCYC 1048、NCYC 1116、NCYC 55、NCYC 453、NCYC 1057、NCYC 1047、CBS 8834、NCYC 967和NCYC 679中的任一种。

[0096] 所述酵母组合可包括具有最低M2速率/M3速率比的NCYC 75、NCYC 112、NCYC 115、NCYC 177、NCYC 223、NCYC 224、NCYC 240、NCYC 340、NCYC 478、NCYC 479、NCYC 510、NCYC 530、NCYC 965、NCYC 969、NCYC 975、NCYC 987、NCYC 989、NCYC 1322、NCYC 1323、NCYC 229、NCYC 230、NCYC 242、NCYC 392、NCYC 397、NCYC 398、NCYC 511、NCYC 584、NCYC 3420、CBS12357、CBS 7001、CBS1174、CBS1177、CBS1245、CBS1386、CBS1488、CBS1502、CBS1504、

CBS1548、CBS1550、CBS1551、CBS1552、CBS1603、CBS1605、CBS1606、CBS1608、CBS1665、CBS2165、CBS2442、CBS2945、CBS2954、CBS2986、CBS 5156、CBS 6017、yHDPN 421、yHKS210、yHKS212、yHKS 509、yHRVM 107、NCYC 966和CBS1483中的任一种和泛化菌株NCYC 984、NCYC 529、NCYC 2347、NCYC 2837、NCYC 670、NCYC 2426、NCYC 531、WS34/70、NCYC 454、NCYC 73、NCYC 2337、NCYC 1250、NCYC 1056、NCYC 456、NCYC 985、NCYC 680、NCYC 2338、NCYC 1026、CBS1484、CBS 5832、NCYC 1341、CMB S33、NCYC 399、NCYC 1342、NCYC 400、NCYC 3419、NCYC 1048、NCYC 1116、NCYC 55、NCYC 453、NCYC 1057、NCYC 1047、CBS 8834、NCYC 967和NCYC 679中的任一种。

[0097] 所述组合优选选自CBS1513和NCYC 1262、CBS1513和NCYC 227、CBS 1513和NCYC 699、CBS1513和NCYC 487、CBS1513和NCYC 2340、CBS1513和NCYC 1296、CBS1513和NCYC 228、CBS1513和NCYC 534、CBS1513和NCYC 2801、CBS1513和NCYC 1365、CBS1513和NCYC 668、CBS1513和NCYC 450、CBS1513和NCYC 1236、CBS1513和NCYC 75、CBS1513和NCYC 112、CBS1513和NCYC 115、CBS1513和NCYC 177、CBS1513和NCYC 223、CBS1513和NCYC 224、CBS1513和NCYC 240、CBS1513和NCYC 340、CBS1513和NCYC 478、CBS1513和NCYC 479、CBS1513和NCYC 510、CBS 1513和NCYC 530、CBS1513和NCYC 965、CBS1513和NCYC 969、CBS1513和NCYC 975、CBS1513和NCYC 987、CBS1513和NCYC 989、CBS1513和NCYC 1322、CBS1513和NCYC 1323、CBS1513和NCYC 229、CBS1513和NCYC 230、CBS1513和NCYC 242、CBS1513和NCYC 392、CBS1513和NCYC 397、CBS1513和NCYC 398、CBS1513和NCYC 511、CBS1513和NCYC 584、CBS1513和NCYC 3420、CBS1513和CBS12357、CBS1513和CBS 7001、CBS1513和CBS1174、CBS1513和CBS1177、CBS1513和CBS1245、CBS1513和CBS1386、CBS1513和CBS1488、CBS1513和CBS1502、CBS1513和CBS 1504、CBS1513和CBS1548、CBS1513和CBS1550、CBS1513和CBS1551、CBS1513和CBS1552、CBS1513和CBS1603、CBS1513和CBS1605、CBS1513和CBS1606、CBS1513和CBS1608、CBS1513和CBS1665、CBS1513和CBS 2165、CBS1513和CBS2442、CBS1513和CBS2945、CBS1513和CBS2954、CBS1513和CBS2986、CBS1513和CBS 5156、CBS1513和CBS 6017、CBS1513和yHDPN 421、CBS1513和yHKS210、CBS1513和yHKS212、CBS1513和yHKS509、CBS1513和yHRVM 107、CBS1513和NCYC 966、和CBS1513和CBS1483;NCYC 452和NCYC 1262、NCYC 452和NCYC 227、NCYC 452和NCYC 699、NCYC 452和NCYC 487、NCYC 452和NCYC 2340、NCYC 452和NCYC 1296、NCYC 452和NCYC 228、NCYC 452和NCYC 534、NCYC 452和NCYC 2801、NCYC 452和NCYC 1365、NCYC 452和NCYC 668、NCYC 452和NCYC 450、NCYC 452和NCYC 1236、NCYC 452和NCYC 75、NCYC 452和NCYC 112、NCYC 452和NCYC 115、NCYC 452和NCYC 177、NCYC 452和NCYC 223、NCYC 452和NCYC 224、NCYC 452和NCYC 240、NCYC 452和NCYC 340、NCYC 452和NCYC 478、NCYC 452和NCYC 479、NCYC 452和NCYC 510、NCYC 452和NCYC 530、NCYC 452和NCYC 965、NCYC 452和NCYC 969、NCYC 452和NCYC 975、NCYC 452和NCYC 987、NCYC 452和NCYC 989、NCYC 452和NCYC 1322、NCYC 452和NCYC 1323、NCYC 452和NCYC 229、NCYC 452和NCYC 230、NCYC 452和NCYC 242、NCYC 452和NCYC 392、NCYC 452和NCYC 397、NCYC 452和NCYC 398、NCYC 452和NCYC 511、NCYC 452和NCYC 584、NCYC 452和NCYC 3420、NCYC 452和CBS12357、NCYC 452和CBS 7001、NCYC 452和CBS1174、NCYC 452和CBS1177、NCYC 452和CBS1245、NCYC 452和CBS1386、NCYC 452和CBS1488、NCYC 452和CBS1502、NCYC 452和CBS1504、NCYC 452和CBS 1548、NCYC 452和CBS1550、NCYC 452和

CBS1551、NCYC 452和CBS1552、NCYC 452和CBS1603、NCYC 452和CBS1605、NCYC 452和CBS1606、NCYC 452和CBS1608、NCYC 452和CBS1665、NCYC 452和CBS2165、NCYC 452和CBS2442、NCYC 452和CBS2945、NCYC 452和CBS2954、NCYC 452和CBS2986、NCYC 452和CBS 5156、NCYC 452和CBS 6017、NCYC 452和yHDPN 421、NCYC 452和yHKS210、NCYC 452和yHKS212、NCYC 452和yHKS 509、NCYC 452和yHRVM 107、NCYC 452和NCYC 966、和NCYC 452和CBS1483;NCYC 1269和NCYC 1262、NCYC 1269和NCYC 227、NCYC 1269和NCYC 699、NCYC 1269和NCYC 487、NCYC 1269和NCYC 2340、NCYC 1269和NCYC 1296、NCYC 1269和NCYC 228、NCYC 1269和NCYC 534、NCYC 1269和NCYC 2801、NCYC 1269和NCYC 1365、NCYC 1269和NCYC 668、NCYC 1269和NCYC 450、NCYC 1269和NCYC 1236、NCYC 1269和NCYC 75、NCYC 1269和NCYC 112、NCYC 1269和NCYC 115、NCYC 1269和NCYC 177、NCYC 1269和NCYC 223、NCYC 1269和NCYC 224、NCYC 1269和NCYC 240、NCYC 1269和NCYC 340、NCYC 1269和NCYC 478、NCYC 1269和NCYC 479、NCYC 1269和NCYC 510、NCYC 1269和NCYC 530、NCYC 1269和NCYC 965、NCYC 1269和NCYC 969、NCYC 1269和NCYC 975、NCYC 1269和NCYC 987、NCYC 1269和NCYC 989、NCYC 1269和NCYC 1322、NCYC 1269和NCYC 1323、NCYC 1269和NCYC 229、NCYC 1269和NCYC 230、NCYC 1269和NCYC 242、NCYC 1269和NCYC 392、NCYC 1269和NCYC 397、NCYC 1269和NCYC 398、NCYC 1269和NCYC 511、NCYC 1269和NCYC 584、NCYC 1269和NCYC 3420、NCYC 1269和CBS12357、NCYC 1269和CBS 7001、NCYC 1269和CBS1174、NCYC 1269和CBS1177、NCYC 1269和CBS1245、NCYC 1269和CBS1386、NCYC 1269和CBS1488、NCYC 1269和CBS1502、NCYC 1269和CBS1504、NCYC 1269和CBS1548、NCYC 1269和CBS1550、NCYC 1269和CBS1551、NCYC 1269和CBS1552、NCYC 1269和CBS1603、NCYC 1269和CBS1605、NCYC 1269和CBS1606、NCYC 1269和CBS1608、NCYC 1269和CBS1665、NCYC 1269和CBS2165、NCYC 1269和CBS2442、NCYC 1269和CBS2945、NCYC 1269和CBS2954、NCYC 1269和CBS2986、NCYC 1269和CBS 5156、NCYC 1269和CBS 6017、NCYC 1269和yHDPN 421、NCYC 1269和yHKS210、NCYC 1269和yHKS212、NCYC 1269和yHKS 509、NCYC 1269和yHRVM 107、NCYC 1269和NCYC 966、和NCYC 1269和CBS1483;NCYC 451和NCYC 1262、NCYC 451和NCYC 227、NCYC 451和NCYC 699、NCYC 451和NCYC 487、NCYC 451和NCYC 2340、NCYC 451和NCYC 1296、NCYC 451和NCYC 228、NCYC 451和NCYC 534、NCYC 451和NCYC 2801、NCYC 451和NCYC 1365、NCYC 451和NCYC 668、NCYC 451和NCYC 450、NCYC 451和NCYC 1236、NCYC 451和NCYC 75、NCYC 451和NCYC 112、NCYC 451和NCYC 115、NCYC 451和NCYC 177、NCYC 451和NCYC 223、NCYC 451和NCYC 224、NCYC 451和NCYC 240、NCYC 451和NCYC 340、NCYC 451和NCYC 478、NCYC 451和NCYC 479、NCYC 451和NCYC 510、NCYC 451和NCYC 530、NCYC 451和NCYC 965、NCYC 451和NCYC 969、NCYC 451和NCYC 975、NCYC 451和NCYC 987、NCYC 451和NCYC 989、NCYC 451和NCYC 1322、NCYC 451和NCYC 1323、NCYC 451和NCYC 229、NCYC 451和NCYC 230、NCYC 451和NCYC 242、NCYC 451和NCYC 392、NCYC 451和NCYC 397、NCYC 451和NCYC 398、NCYC 451和NCYC 511、NCYC 451和NCYC 584、NCYC 451和NCYC 3420、NCYC 451和CBS12357、NCYC 451和CBS 7001、NCYC 451和CBS1174、NCYC 451和CBS1177、NCYC 451和CBS1245、NCYC 451和CBS1386、NCYC 451和CBS1488、NCYC 451和CBS1502、NCYC 451和CBS1504、NCYC 451和CBS1548、NCYC 451和CBS1550、NCYC 451和CBS1551、NCYC 451和CBS1552、NCYC 451和CBS1603、NCYC 451和CBS 1605、NCYC 451和CBS1606、NCYC 451和CBS1608、NCYC 451和CBS1665、NCYC 451和

CBS2165、NCYC 451和CBS2442、NCYC 451和CBS2945、NCYC 451和CBS2954、NCYC 451和CBS2986、NCYC 451和CBS 5156、NCYC 451和CBS 6017、NCYC 451和yHDPN 421、NCYC 451和yHKS210、NCYC 451和yHKS212、NCYC 451和yHKS 509、NCYC 451和yHRVM 107、NCYC 451和NCYC 966、和NCYC 451和CBS1483;NCYC 457和NCYC 1262、NCYC 457和NCYC 227、NCYC 457和NCYC 699、NCYC 457和NCYC 487、NCYC 457和NCYC 2340、NCYC 457和NCYC 1296、NCYC 457和NCYC 228、NCYC 457和NCYC 534、NCYC 457和NCYC 2801、NCYC 457和NCYC 1365、NCYC 457和NCYC 668、NCYC 457和NCYC 450、NCYC 457和NCYC 1236、NCYC 457和NCYC 75、NCYC 457和NCYC 112、NCYC 457和NCYC 115、NCYC 457和NCYC 177、NCYC 457和NCYC 223、NCYC 457和NCYC 224、NCYC 457和NCYC 240、NCYC 457和NCYC 340、NCYC 457和NCYC 478、NCYC 457和NCYC 479、NCYC 457和NCYC 510、NCYC 457和NCYC 530、NCYC 457和NCYC 965、NCYC 457和NCYC 969、NCYC 457和NCYC 975、NCYC 457和NCYC 987、NCYC 457和NCYC 989、NCYC 457和NCYC 1322、NCYC 457和NCYC 1323、NCYC 457和NCYC 229、NCYC 457和NCYC 230、NCYC 457和NCYC 242、NCYC 457和NCYC 392、NCYC 457和NCYC 397、NCYC 457和NCYC 398、NCYC 457和NCYC 511、NCYC 457和NCYC 584、NCYC 457和NCYC 3420、NCYC 457和CBS12357、NCYC 457和CBS 7001、NCYC 457和CBS1174、NCYC 457和CBS1177、NCYC 457和CBS1245、NCYC 457和CBS1386、NCYC 457和CBS1488、NCYC 457和CBS1502、NCYC 457和CBS 1504、NCYC 457和CBS1548、NCYC 457和CBS1550、NCYC 457和CBS1551、NCYC 457和CBS1552、NCYC 457和CBS1603、NCYC 457和CBS1605、NCYC 457和CBS1606、NCYC 457和CBS1608、NCYC 457和CBS1665、NCYC 457和CBS2165、NCYC 457和CBS2442、NCYC 457和CBS2945、NCYC 457和CBS2954、NCYC 457和CBS2986、NCYC 457和CBS 5156、NCYC 457和CBS 6017、NCYC 457和yHDPN 421、NCYC 457和yHKS210、NCYC 457和yHKS 212、NCYC 457和yHKS 509、NCYC 457和yHRVM 107、NCYC 457和NCYC 966、和NCYC 457和CBS1483;NCYC 204和NCYC 1262、NCYC 204和NCYC 227、NCYC 204和NCYC 699、NCYC 204和NCYC 487、NCYC 204和NCYC 2340、NCYC 204和NCYC 1296、NCYC 204和NCYC 228、NCYC 204和NCYC 534、NCYC 204和NCYC 2801、NCYC 204和NCYC 1365、NCYC 204和NCYC 668、NCYC 204和NCYC 450、NCYC 204和NCYC 1236、NCYC 204和NCYC75、NCYC 204和NCYC 112、NCYC 204和NCYC 115、NCYC 204和NCYC 177、NCYC 204和NCYC 223、NCYC 204和NCYC 224、NCYC 204和NCYC 240、NCYC 204和NCYC 340、NCYC 204和NCYC 478、NCYC 204和NCYC 479、NCYC 204和NCYC 510、NCYC 204和NCYC 530、NCYC 204和NCYC 965、NCYC 204和NCYC 969、NCYC 204和NCYC 975、NCYC 204和NCYC 987、NCYC 204和NCYC 989、NCYC 204和NCYC 1322、NCYC 204和NCYC 1323、NCYC 204和NCYC 229、NCYC 204和NCYC 230、NCYC 204和NCYC 242、NCYC 204和NCYC 392、NCYC 204和NCYC 397、NCYC 204和NCYC 398、NCYC 204和NCYC 511、NCYC 204和NCYC 584、NCYC 204和NCYC 3420、NCYC 204和CBS12357、NCYC 204和CBS 7001、NCYC 204和CBS1174、NCYC 204和CBS1177、NCYC 204和CBS1245、NCYC 204和CBS1386、NCYC 204和CBS1488、NCYC 204和CBS1502、NCYC 204和CBS1504、NCYC 204和CBS1548、NCYC 204和CBS1550、NCYC 204和CBS1551、NCYC 204和CBS1552、NCYC 204和CBS1603、NCYC 204和CBS1605、NCYC 204和CBS 1606、NCYC 204和CBS1608、NCYC 204和CBS1665、NCYC 204和CBS2165、NCYC 204和CBS2442、NCYC 204和CBS2945、NCYC 204和CBS2954、NCYC 204和CBS2986、NCYC 204和CBS 5156、NCYC 204和CBS 6017、NCYC 204和yHDPN 421、NCYC 204和yHKS210、NCYC 204和yHKS212、NCYC 204和yHKS

509、NCYC 204和yHRVM 107、NCYC 204和NCYC 966、和NCYC 204和CBS1483;NCYC 185和NCYC 1262、NCYC 185和NCYC 227、NCYC 185和NCYC 699、NCYC 185和NCYC 487、NCYC 185和NCYC 2340、NCYC 185和NCYC 1296、NCYC 185和NCYC 228、NCYC 185和NCYC 534、NCYC 185和NCYC 2801、NCYC 185和NCYC 1365、NCYC 185和NCYC 668、NCYC 185和NCYC 450、NCYC 185和NCYC 1236、NCYC 185和NCYC 75、NCYC 185和NCYC 112、NCYC 185和NCYC 115、NCYC 185和NCYC 177、NCYC 185和NCYC 223、NCYC 185和NCYC 224、NCYC 185和NCYC 240、NCYC 185和NCYC 340、NCYC 185和NCYC 478、NCYC 185和NCYC 479、NCYC 185和NCYC 510、NCYC 185和NCYC 530、NCYC 185和NCYC 965、NCYC 185和NCYC 969、NCYC 185和NCYC 975、NCYC 185和NCYC 987、NCYC 185和NCYC 989、NCYC 185和NCYC 1322、NCYC 185和NCYC 1323、NCYC 185和NCYC 229、NCYC 185和NCYC 230、NCYC 185和NCYC 242、NCYC 185和NCYC 392、NCYC 185和NCYC 397、NCYC 185和NCYC 398、NCYC 185和NCYC 511、NCYC 185和NCYC 584、NCYC 185和NCYC 3420、NCYC 185和CBS12357、NCYC 185和CBS 7001、NCYC 185和CBS1174、NCYC 185和CBS1177、NCYC 185和CBS1245、NCYC 185和CBS1386、NCYC 185和CBS1488、NCYC 185和CBS1502、NCYC 185和CBS1504、NCYC 185和CBS 1548、NCYC 185和CBS1550、NCYC 185和CBS1551、NCYC 185和CBS1552、NCYC 185和CBS1603、NCYC 185和CBS1605、NCYC 185和CBS1606、NCYC 185和CBS1608、NCYC 185和CBS1665、NCYC 185和CBS2165、NCYC 185和CBS2442、NCYC 185和CBS2945、NCYC 185和CBS2954、NCYC 185和CBS2986、NCYC 185和CBS 5156、NCYC 185和CBS 6017、NCYC 185和yHDPN 421、NCYC 185和yHKS210、NCYC 185和yHKS212、NCYC 185和yHKS 509、NCYC 185和yHRVM 107、NCYC 185和NCYC 966、和NCYC 185和CBS1483;NCYC 1239和NCYC 1262、NCYC 1239和NCYC 227、NCYC 1239和NCYC 699、NCYC 1239和NCYC 487、NCYC 1239和NCYC 2340、NCYC 1239和NCYC 1296、NCYC 1239和NCYC 228、NCYC 1239和NCYC 534、NCYC 1239和NCYC 2801、NCYC 1239和NCYC 1365、NCYC 1239和NCYC 668、NCYC 1239和NCYC 450、NCYC 1239和NCYC 1236、NCYC 1239和NCYC 75、NCYC 1239和NCYC 112、NCYC 1239和NCYC 115、NCYC 1239和NCYC 177、NCYC 1239和NCYC 223、NCYC 1239和NCYC 224、NCYC 1239和NCYC 240、NCYC 1239和NCYC 340、NCYC 1239和NCYC 478、NCYC 1239和NCYC 479、NCYC 1239和NCYC 510、NCYC 1239和NCYC 530、NCYC 1239和NCYC 965、NCYC 1239和NCYC 969、NCYC 1239和NCYC 975、NCYC 1239和NCYC 987、NCYC 1239和NCYC 989、NCYC 1239和NCYC 1322、NCYC 1239和NCYC 1323、NCYC 1239和NCYC 229、NCYC 1239和NCYC 230、NCYC 1239和NCYC 242、NCYC 1239和NCYC 392、NCYC 1239和NCYC 397、NCYC 1239和NCYC 398、NCYC 1239和NCYC 511、NCYC 1239和NCYC 584、NCYC 1239和NCYC 3420、NCYC 1239和CBS12357、NCYC 1239和CBS 7001、NCYC 1239和CBS1174、NCYC 1239和CBS1177、NCYC 1239和CBS1245、NCYC 1239和CBS1386、NCYC 1239和CBS1488、NCYC 1239和CBS1502、NCYC 1239和CBS1504、NCYC 1239和CBS1548、NCYC 1239和CBS1550、NCYC 1239和CBS1551、NCYC 1239和CBS1552、NCYC 1239和CBS1603、NCYC 1239和CBS1605、NCYC 1239和CBS1606、NCYC 1239和CBS1608、NCYC 1239和CBS1665、NCYC 1239和CBS2165、NCYC 1239和CBS2442、NCYC 1239和CBS2945、NCYC 1239和CBS2954、NCYC 1239和CBS2986、NCYC 1239和CBS 5156、NCYC 1239和CBS 6017、NCYC 1239和yHDPN 421、NCYC 1239和yHKS210、NCYC 1239和yHKS212、NCYC 1239和yHKS 509、NCYC 1239和yHRVM 107、NCYC 1239和NCYC 966、和NCYC 1239和CBS1483;NCYC 1146和NCYC 1262、NCYC 1146和NCYC 227、NCYC 1146和NCYC

699、NCYC 1146和NCYC 487、NCYC 1146和NCYC 2340、NCYC 1146和NCYC 1296、NCYC 1146和NCYC 228、NCYC 1146和NCYC 534、NCYC 1146和NCYC 2801、NCYC 1146和NCYC 1365、NCYC 1146和NCYC 668、NCYC 1146和NCYC 450、NCYC 1146和NCYC 1236、NCYC 1146和NCYC 75、NCYC 1146和NCYC 112、NCYC 1146和NCYC 115、NCYC 1146和NCYC 177、NCYC 1146和NCYC 223、NCYC 1146和NCYC 224、NCYC 1146和NCYC 240、NCYC 1146和NCYC 340、NCYC 1146和NCYC 478、NCYC 1146和NCYC 479、NCYC 1146和NCYC 510、NCYC 1146和NCYC 530、NCYC 1146和NCYC 965、NCYC 1146和NCYC 969、NCYC 1146和NCYC 975、NCYC 1146和NCYC 987、NCYC 1146和NCYC 989、NCYC 1146和NCYC 1322、NCYC 1146和NCYC 1323、NCYC 1146和NCYC 229、NCYC 1146和NCYC 230、NCYC 1146和NCYC 242、NCYC 1146和NCYC 392、NCYC 1146和NCYC 397、NCYC 1146和NCYC 398、NCYC 1146和NCYC 511、NCYC 1146和NCYC 584、NCYC 1146和NCYC 3420、NCYC 1146和CBS12357、NCYC 1146和CBS 7001、NCYC 1146和CBS1174、NCYC 1146和CBS1177、NCYC 1146和CBS1245、NCYC 1146和CBS1386、NCYC 1146和CBS1488、NCYC 1146和CBS1502、NCYC 1146和CBS1504、NCYC 1146和CBS1548、NCYC 1146和CBS1550、NCYC 1146和CBS1551、NCYC 1146和CBS1552、NCYC 1146和CBS1603、NCYC 1146和CBS1605、NCYC 1146和CBS1606、NCYC 1146和CBS1608、NCYC 1146和CBS1665、NCYC 1146和CBS2165、NCYC 1146和CBS2442、NCYC 1146和CBS2945、NCYC 1146和CBS2954、NCYC 1146和CBS2986、NCYC 1146和CBS 5156、NCYC 1146和CBS 6017、NCYC 1146和yHDPN 421、NCYC 1146和yHKS210、NCYC 1146和yHKS212、NCYC 1146和yHKS 509、NCYC 1146和yHRVM 107、NCYC 1146和NCYC 966、和NCYC 1146和CBS1483;NCYC 1297和NCYC 1262、NCYC 1297和NCYC 227、NCYC 1297和NCYC 699、NCYC 1297和NCYC 487、NCYC 1297和NCYC 2340、NCYC 1297和NCYC 1296、NCYC 1297和NCYC 228、NCYC 1297和NCYC 534、NCYC 1297和NCYC 2801、NCYC 1297和NCYC 1365、NCYC 1297和NCYC 668、NCYC 1297和NCYC 450、NCYC 1297和NCYC 1236、NCYC 1297和NCYC 75、NCYC 1297和NCYC 112、NCYC 1297和NCYC 115、NCYC 1297和NCYC 177、NCYC 1297和NCYC 223、NCYC 1297和NCYC 224、NCYC 1297和NCYC 240、NCYC 1297和NCYC 340、NCYC 1297和NCYC 478、NCYC 1297和NCYC 479、NCYC 1297和NCYC 510、NCYC 1297和NCYC 530、NCYC 1297和NCYC 965、NCYC 1297和NCYC 969、NCYC 1297和NCYC 975、NCYC 1297和NCYC 987、NCYC 1297和NCYC 989、NCYC 1297和NCYC 1322、NCYC 1297和NCYC 1323、NCYC 1297和NCYC 229、NCYC 1297和NCYC 230、NCYC 1297和NCYC 242、NCYC 1297和NCYC 392、NCYC 1297和NCYC 397、NCYC 1297和NCYC 398、NCYC 1297和NCYC 511、NCYC 1297和NCYC 584、NCYC 1297和NCYC 3420、NCYC 1297和CBS12357、NCYC 1297和CBS 7001、NCYC 1297和CBS1174、NCYC 1297和CBS1177、NCYC 1297和CBS1245、NCYC 1297和CBS1386、NCYC 1297和CBS1488、NCYC 1297和CBS1502、NCYC 1297和CBS1504、NCYC 1297和CBS1548、NCYC 1297和CBS1550、NCYC 1297和CBS1551、NCYC 1297和CBS1552、NCYC 1297和CBS1603、NCYC 1297和CBS1605、NCYC 1297和CBS1606、NCYC 1297和CBS1608、NCYC 1297和CBS1665、NCYC 1297和CBS2165、NCYC 1297和CBS2442、NCYC 1297和CBS2945、NCYC 1297和CBS2954、NCYC 1297和CBS2986、NCYC 1297和CBS 5156、NCYC 1297和CBS 6017、NCYC 1297和yHDPN 421、NCYC 1297和yHKS210、NCYC 1297和yHKS212、NCYC 1297和yHKS 509、NCYC 1297和yHRVM 107、NCYC 1297和NCYC 966、和NCYC 1297和CBS1483;NCYC 1073和NCYC 1262、NCYC 1073和NCYC 227、NCYC 1073和NCYC 699、NCYC 1073和NCYC 487、NCYC 1073和NCYC 2340、NCYC 1073和

NCYC 1296、NCYC 1073和NCYC 228、NCYC 1073和NCYC 534、NCYC 1073和NCYC 2801、NCYC 1073和NCYC 1365、NCYC 1073和NCYC 668、NCYC 1073和NCYC 450、NCYC 1073和NCYC 1236、NCYC 1073和NCYC 75、NCYC 1073和NCYC 112、NCYC 1073和NCYC 115、NCYC 1073和NCYC 177、NCYC 1073和NCYC 223、NCYC 1073和NCYC 224、NCYC 1073和NCYC 240、NCYC 1073和NCYC 340、NCYC 1073和NCYC 478、NCYC 1073和NCYC 479、NCYC 1073和NCYC 510、NCYC 1073和NCYC 530、NCYC 1073和NCYC 965、NCYC 1073和NCYC 969、NCYC 1073和NCYC 975、NCYC 1073和NCYC 987、NCYC 1073和NCYC 989、NCYC 1073和NCYC 1322、NCYC 1073和NCYC 1323、NCYC 1073和NCYC 229、NCYC 1073和NCYC 230、NCYC 1073和NCYC 242、NCYC 1073和NCYC 392、NCYC 1073和NCYC 397、NCYC 1073和NCYC 398、NCYC 1073和NCYC 511、NCYC 1073和NCYC 584、NCYC 1073和NCYC 3420、NCYC 1073和CBS12357、NCYC 1073和CBS 7001、NCYC 1073和CBS1174、NCYC 1073和CBS1177、NCYC 1073和CBS1245、NCYC 1073和CBS1386、NCYC 1073和CBS1488、NCYC 1073和CBS1502、NCYC 1073和CBS1504、NCYC 1073和CBS1548、NCYC 1073和CBS1550、NCYC 1073和CBS1551、NCYC 1073和CBS1552、NCYC 1073和CBS1603、NCYC 1073和CBS1605、NCYC 1073和CBS1606、NCYC 1073和CBS1608、NCYC 1073和CBS1665、NCYC 1073和CBS2165、NCYC 1073和CBS2442、NCYC 1073和CBS2945、NCYC 1073和CBS2954、NCYC 1073和CBS2986、NCYC 1073和CBS 5156、NCYC 1073和CBS 6017、NCYC 1073和yHDPN 421、NCYC 1073和yHKS210、NCYC 1073和yHKS212、NCYC 1073和yHKS 509、NCYC 1073和yHRVM 107、NCYC 1073和NCYC 966、和NCYC 1073和CBS1483;NCYC 231和NCYC 1262、NCYC 231和NCYC 227、NCYC 231和NCYC 699、NCYC 231和NCYC 487、NCYC 231和NCYC 2340、NCYC 231和NCYC 1296、NCYC 231和NCYC 228、NCYC 231和NCYC 534、NCYC 231和NCYC 2801、NCYC 231和NCYC 1365、NCYC 231和NCYC 668、NCYC 231和NCYC 450、NCYC 231和NCYC 1236、NCYC 231和NCYC 75、NCYC 231和NCYC 112、NCYC 231和NCYC 115、NCYC 231和NCYC 177、NCYC 231和NCYC 223、NCYC 231和NCYC 224、NCYC 231和NCYC 240、NCYC 231和NCYC 340、NCYC 231和NCYC 478、NCYC 231和NCYC 479、NCYC 231和NCYC 510、NCYC 231和NCYC 530、NCYC 231和NCYC 965、NCYC 231和NCYC 969、NCYC 231和NCYC 975、NCYC 231和NCYC 987、NCYC 231和NCYC 989、NCYC 231和NCYC 1322、NCYC 231和NCYC 1323、NCYC 231和NCYC 229、NCYC 231和NCYC 230、NCYC 231和NCYC 242、NCYC 231和NCYC 392、NCYC 231和NCYC 397、NCYC 231和NCYC 398、NCYC 231和NCYC 511、NCYC 231和NCYC 584、NCYC 231和NCYC 3420、NCYC 231和CBS12357、NCYC 231和CBS 7001、NCYC 231和CBS1174、NCYC 231和CBS1177、NCYC 231和CBS1245、NCYC 231和CBS1386、NCYC 231和CBS1488、NCYC 231和CBS1502、NCYC 231和CBS1504、NCYC 231和CBS1548、NCYC 231和CBS1550、NCYC 231和CBS1551、NCYC 231和CBS1552、NCYC 231和CBS1603、NCYC 231和CBS 1605、NCYC 231和CBS1606、NCYC 231和CBS1608、NCYC 231和CBS1665、NCYC 231和CBS2165、NCYC 231和CBS2442、NCYC 231和CBS2945、NCYC 231和CBS2954、NCYC 231和CBS2986、NCYC 231和CBS 5156、NCYC 231和CBS 6017、NCYC 231和yHDPN 421、NCYC 231和yHKS210、NCYC 231和yHKS212、NCYC 231和yHKS 509、NCYC 231和yHRVM 107、NCYC 231和NCYC 966、和NCYC 231和CBS1483;NCYC 1305和NCYC 1262、NCYC 1305和NCYC 227、NCYC 1305和NCYC 699、NCYC 1305和NCYC 487、NCYC 1305和NCYC 2340、NCYC 1305和NCYC 1296、NCYC 1305和NCYC 228、NCYC 1305和NCYC 534、NCYC 1305和NCYC 2801、NCYC 1305和NCYC 1365、NCYC 1305和NCYC 668、NCYC 1305和NCYC

450、NCYC 1305和NCYC 1236、NCYC 1305和NCYC 75、NCYC 1305和NCYC 112、NCYC 1305和NCYC 115、NCYC 1305和NCYC 177、NCYC 1305和NCYC 223、NCYC 1305和NCYC 224、NCYC 1305和NCYC 240、NCYC 1305和NCYC 340、NCYC 1305和NCYC 478、NCYC 1305和NCYC 479、NCYC 1305和NCYC 510、NCYC 1305和NCYC 530、NCYC 1305和NCYC 965、NCYC 1305和NCYC 969、NCYC 1305和NCYC 975、NCYC 1305和NCYC 987、NCYC 1305和NCYC 989、NCYC 1305和NCYC 1322、NCYC 1305和NCYC 1323、NCYC 1305和NCYC 229、NCYC 1305和NCYC 230、NCYC 1305和NCYC 242、NCYC 1305和NCYC 392、NCYC 1305和NCYC 397、NCYC 1305和NCYC 398、NCYC 1305和NCYC 511、NCYC 1305和NCYC 584、NCYC 1305和NCYC 3420、NCYC 1305和CBS12357、NCYC 1305和CBS 7001、NCYC 1305和CBS1174、NCYC 1305和CBS1177、NCYC 1305和CBS1245、NCYC 1305和CBS1386、NCYC 1305和CBS1488、NCYC 1305和CBS1502、NCYC 1305和CBS1504、NCYC 1305和CBS1548、NCYC 1305和CBS1550、NCYC 1305和CBS1551、NCYC 1305和CBS1552、NCYC 1305和CBS1603、NCYC 1305和CBS1605、NCYC 1305和CBS1606、NCYC 1305和CBS1608、NCYC 1305和CBS1665、NCYC 1305和CBS2165、NCYC 1305和CBS2442、NCYC 1305和CBS2945、NCYC 1305和CBS2954、NCYC 1305和CBS2986、NCYC 1305和CBS 5156、NCYC 1305和CBS 6017、NCYC 1305和yHDPN 421、NCYC 1305和yHKS210、NCYC 1305和yHKS212、NCYC 1305和yHKS 509、NCYC 1305和yHRVM 107、NCYC 1305和NCYC 966、和NCYC 1305和CBS1483;CBS 6903和NCYC 1262、CBS 6903和NCYC 227、CBS 6903和NCYC 699、CBS 6903和NCYC 487、CBS 6903和NCYC 2340、CBS 6903和NCYC 1296、CBS 6903和NCYC 228、CBS 6903和NCYC 534、CBS 6903和NCYC 2801、CBS 6903和NCYC 1365、CBS 6903和NCYC 668、CBS 6903和NCYC 450、CBS 6903和NCYC 1236、CBS 6903和NCYC 75、CBS 6903和NCYC 112、CBS 6903和NCYC 115、CBS 6903和NCYC 177、CBS 6903和NCYC 223、CBS 6903和NCYC 224、CBS 6903和NCYC 240、CBS 6903和NCYC 340、CBS 6903和NCYC 478、CBS 6903和NCYC 479、CBS 6903和NCYC 510、CBS 6903和NCYC 530、CBS 6903和NCYC 965、CBS 6903和NCYC 969、CBS 6903和NCYC 975、CBS 6903和NCYC 987、CBS 6903和NCYC 989、CBS 6903和NCYC 1322、CBS 6903和NCYC 1323、CBS 6903和NCYC 229、CBS 6903和NCYC 230、CBS 6903和NCYC 242、CBS 6903和NCYC 392、CBS 6903和NCYC 397、CBS 6903和NCYC 398、CBS 6903和NCYC 511、CBS 6903和NCYC 584、CBS 6903和NCYC 3420、CBS 6903和CBS12357、CBS 6903和CBS 7001、CBS 6903和CBS1174、CBS 6903和CBS1177、CBS 6903和CBS1245、CBS 6903和CBS1386、CBS 6903和CBS1488、CBS 6903和CBS1502、CBS 6903和CBS 1504、CBS 6903和CBS1548、CBS 6903和CBS1550、CBS 6903和CBS1551、CBS 6903和CBS1552、CBS 6903和CBS1603、CBS 6903和CBS1605、CBS 6903和CBS1606、CBS 6903和CBS1608、CBS 6903和CBS1665、CBS 6903和CBS2165、CBS 6903和CBS2442、CBS 6903和CBS2945、CBS 6903和CBS2954、CBS 6903和CBS2986、CBS 6903和CBS 5156、CBS 6903和CBS 6017、CBS 6903和yHDPN 421、CBS 6903和yHKS210、CBS 6903和yHKS212、CBS 6903和yHKS 509、CBS 6903和yHRVM 107、CBS 6903和NCYC 966、和CBS 6903和CBS1483;NCYC 203和NCYC 1262、NCYC 203和NCYC 227、NCYC 203和NCYC 699、NCYC 203和NCYC 487、NCYC 203和NCYC 2340、NCYC 203和NCYC 1296、NCYC 203和NCYC 228、NCYC 203和NCYC 534、NCYC 203和NCYC 2801、NCYC 203和NCYC 1365、NCYC 203和NCYC 668、NCYC 203和NCYC 450、NCYC 203和NCYC 1236、NCYC 203和NCYC 75、NCYC 203和NCYC 112、NCYC 203和NCYC 115、NCYC 203和NCYC 177、NCYC 203和NCYC 223、NCYC 203和NCYC

224、NCYC 203和NCYC 240、NCYC 203和NCYC 340、NCYC 203和NCYC 478、NCYC 203和NCYC 479、NCYC 203和NCYC 510、NCYC 203和NCYC 530、NCYC 203和NCYC 965、NCYC 203和NCYC 969、NCYC 203和NCYC 975、NCYC 203和NCYC 987、NCYC 203和NCYC 989、NCYC 203和NCYC 1322、NCYC 203和NCYC 1323、NCYC 203和NCYC 229、NCYC 203和NCYC 230、NCYC 203和NCYC 242、NCYC 203和NCYC 392、NCYC 203和NCYC 397、NCYC 203和NCYC 398、NCYC 203和NCYC 511、NCYC 203和NCYC 584、NCYC 203和NCYC 3420、NCYC 203和CBS12357、NCYC 203和CBS 7001、NCYC 203和CBS1174、NCYC 203和CBS1177、NCYC 203和CBS1245、NCYC 203和CBS1386、NCYC 203和CBS1488、NCYC 203和CBS1502、NCYC 203和CBS1504、NCYC 203和CBS 1548、NCYC 203和CBS1550、NCYC 203和CBS1551、NCYC 203和CBS1552、NCYC 203和CBS1603、NCYC 203和CBS1605、NCYC 203和CBS1606、NCYC 203和CBS1608、NCYC 203和CBS1665、NCYC 203和CBS2165、NCYC 203和CBS2442、NCYC 203和CBS2945、NCYC 203和CBS2954、NCYC 203和CBS2986、NCYC 203和CBS 5156、NCYC 203和CBS 6017、NCYC 203和yHDPN 421、NCYC 203和yHKS210、NCYC 203和yHKS212、NCYC 203和yHKS 509、NCYC 203和yHRVM 107、NCYC 203和NCYC 966、和NCYC 203和CBS1483;CBS2443和NCYC 1262、CBS2443和NCYC 227、CBS2443和NCYC 699、CBS2443和NCYC 487、CBS2443和NCYC 2340、CBS2443和NCYC 1296、CBS2443和NCYC 228、CBS2443和NCYC 534、CBS2443和NCYC 2801、CBS2443和NCYC 1365、CBS2443和NCYC 668、CBS2443和NCYC 450、CBS2443和NCYC 1236、CBS2443和NCYC 75、CBS2443和NCYC 112、CBS2443和NCYC 115、CBS2443和NCYC 177、CBS2443和NCYC 223、CBS2443和NCYC 224、CBS2443和NCYC 240、CBS2443和NCYC 340、CBS 2443和NCYC 478、CBS2443和NCYC 479、CBS2443和NCYC 510、CBS2443和NCYC 530、CBS2443和NCYC 965、CBS2443和NCYC 969、CBS2443和NCYC 975、CBS2443和NCYC 987、CBS2443和NCYC 989、CBS2443和NCYC 1322、CBS2443和NCYC 1323、CBS2443和NCYC 229、CBS2443和NCYC 230、CBS2443和NCYC 242、CBS2443和NCYC 392、CBS2443和NCYC 397、CBS 2443和NCYC 398、CBS2443和NCYC 511、CBS2443和NCYC 584、CBS2443和NCYC 3420、CBS2443和CBS12357、CBS2443和CBS 7001、CBS2443和CBS1174、CBS2443和CBS1177、CBS2443和CBS1245、CBS2443和CBS 1386、CBS2443和CBS1488、CBS2443和CBS1502、CBS2443和CBS1504、CBS2443和CBS1548、CBS2443和CBS1550、CBS2443和CBS1551、CBS2443和CBS1552、CBS2443和CBS1603、CBS2443和CBS1605、CBS2443和CBS 1606、CBS2443和CBS1608、CBS2443和CBS1665、CBS2443和CBS2165、CBS2443和CBS2442、CBS2443和CBS2945、CBS2443和CBS2954、CBS2443和CBS2986、CBS2443和CBS 5156、CBS2443和CBS 6017、CBS2443和yHDPN 421、CBS2443和yHKS210、CBS2443和yHKS212、CBS2443和yHKS 509、CBS2443和yHRVM 107、CBS2443和NCYC 966、和CBS2443和CBS 1483;NCYC 2339和NCYC 1262、NCYC 2339和NCYC 227、NCYC 2339和NCYC 699、NCYC 2339和NCYC 487、NCYC 2339和NCYC 2340、NCYC 2339和NCYC 1296、NCYC 2339和NCYC 228、NCYC 2339和NCYC 534、NCYC 2339和NCYC 2801、NCYC 2339和NCYC 1365、NCYC 2339和NCYC 668、NCYC 2339和NCYC 450、NCYC 2339和NCYC 1236、NCYC 2339和NCYC 75、NCYC 2339和NCYC 112、NCYC 2339和NCYC 115、NCYC 2339和NCYC 177、NCYC 2339和NCYC 223、NCYC 2339和NCYC 224、NCYC 2339和NCYC 240、NCYC 2339和NCYC 340、NCYC 2339和NCYC 478、NCYC 2339和NCYC 479、NCYC 2339和NCYC 510、NCYC 2339和NCYC 530、NCYC 2339和NCYC 965、NCYC 2339和NCYC 969、NCYC 2339和NCYC 975、NCYC 2339和NCYC 987、NCYC 2339和NCYC 989、

NCYC 2339和NCYC 1322、NCYC 2339和NCYC 1323、NCYC 2339和NCYC 229、NCYC 2339和NCYC 230、NCYC 2339和NCYC 242、NCYC 2339和NCYC 392、NCYC 2339和NCYC 397、NCYC 2339和NCYC 398、NCYC 2339和NCYC 511、NCYC 2339和NCYC 584、NCYC 2339和NCYC 3420、NCYC 2339和CBS12357、NCYC 2339和CBS 7001、NCYC 2339和CBS1174、NCYC 2339和CBS1177、NCYC 2339和CBS1245、NCYC 2339和CBS1386、NCYC 2339和CBS1488、NCYC 2339和CBS1502、NCYC 2339和CBS1504、NCYC 2339和CBS1548、NCYC 2339和CBS1550、NCYC 2339和CBS1551、NCYC 2339和CBS1552、NCYC 2339和CBS1603、NCYC 2339和CBS1605、NCYC 2339和CBS1606、NCYC 2339和CBS1608、NCYC 2339和CBS1665、NCYC 2339和CBS2165、NCYC 2339和CBS2442、NCYC 2339和CBS2945、NCYC 2339和CBS2954、NCYC 2339和CBS2986、NCYC 2339和CBS 5156、NCYC 2339和CBS 6017、NCYC 2339和yHDPN 421、NCYC 2339和yHKS210、NCYC 2339和yHKS212、NCYC 2339和yHKS 509、NCYC 2339和yHRVM 107、NCYC 2339和NCYC 966、和NCYC 2339和CBS1483;NCYC 1324和NCYC 1262、NCYC 1324和NCYC 227、NCYC 1324和NCYC 699、NCYC 1324和NCYC 487、NCYC 1324和NCYC 2340、NCYC 1324和NCYC 1296、NCYC 1324和NCYC 228、NCYC 1324和NCYC 534、NCYC 1324和NCYC 2801、NCYC 1324和NCYC 1365、NCYC 1324和NCYC 668、NCYC 1324和NCYC 450、NCYC 1324和NCYC 1236、NCYC 1324和NCYC 75、NCYC 1324和NCYC 112、NCYC 1324和NCYC 115、NCYC 1324和NCYC 177、NCYC 1324和NCYC 223、NCYC 1324和NCYC 224、NCYC 1324和NCYC 240、NCYC 1324和NCYC 340、NCYC 1324和NCYC 478、NCYC 1324和NCYC 479、NCYC 1324和NCYC 510、NCYC 1324和NCYC 530、NCYC 1324和NCYC 965、NCYC 1324和NCYC 969、NCYC 1324和NCYC 975、NCYC 1324和NCYC 987、NCYC 1324和NCYC 989、NCYC 1324和NCYC 1322、NCYC 1324和NCYC 1323、NCYC 1324和NCYC 229、NCYC 1324和NCYC 230、NCYC 1324和NCYC 242、NCYC 1324和NCYC 392、NCYC 1324和NCYC 397、NCYC 1324和NCYC 398、NCYC 1324和NCYC 511、NCYC 1324和NCYC 584、NCYC 1324和NCYC 3420、NCYC 1324和CBS12357、NCYC 1324和CBS 7001、NCYC 1324和CBS1174、NCYC 1324和CBS1177、NCYC 1324和CBS1245、NCYC 1324和CBS1386、NCYC 1324和CBS1488、NCYC 1324和CBS1502、NCYC 1324和CBS1504、NCYC 1324和CBS1548、NCYC 1324和CBS1550、NCYC 1324和CBS1551、NCYC 1324和CBS1552、NCYC 1324和CBS1603、NCYC 1324和CBS1605、NCYC 1324和CBS1606、NCYC 1324和CBS1608、NCYC 1324和CBS1665、NCYC 1324和CBS2165、NCYC 1324和CBS2442、NCYC 1324和CBS2945、NCYC 1324和CBS2954、NCYC 1324和CBS2986、NCYC 1324和CBS 5156、NCYC 1324和CBS 6017、NCYC 1324和yHDPN 421、NCYC 1324和yHKS210、NCYC 1324和yHKS212、NCYC 1324和yHKS 509、NCYC 1324和yHRVM 107、NCYC 1324和NCYC 966、和NCYC 1324和CBS1483;CBS2898和NCYC 1262、CBS2898和NCYC 227、CBS2898和NCYC 699、CBS2898和NCYC 487、CBS2898和NCYC 2340、CBS2898和NCYC 1296、CBS2898和NCYC 228、CBS2898和NCYC 534、CBS2898和NCYC 2801、CBS2898和NCYC 1365、CBS2898和NCYC 668、CBS2898和NCYC 450、CBS2898和NCYC 1236、CBS2898和NCYC 75、CBS 2898和NCYC 112、CBS2898和NCYC 115、CBS2898和NCYC 177、CBS2898和NCYC 223、CBS2898和NCYC 224、CBS2898和NCYC 240、CBS2898和NCYC 340、CBS2898和NCYC 478、CBS2898和NCYC 479、CBS2898和NCYC 510、CBS2898和NCYC 530、CBS2898和NCYC 965、CBS2898和NCYC 969、CBS2898和NCYC 975、CBS2898和NCYC 987、CBS2898和NCYC 989、CBS 2898和NCYC 1322、CBS2898和NCYC 1323、CBS2898和NCYC 229、CBS2898和NCYC 230、CBS2898和NCYC 242、

CBS2898和NCYC 392、CBS2898和NCYC 397、CBS2898和NCYC 398、CBS2898和NCYC 511、CBS2898和NCYC 584、CBS2898和NCYC 3420、CBS2898和CBS12357、CBS2898和CBS 7001、CBS2898和CBS1174、CBS2898和CBS1177、CBS2898和CBS1245、CBS2898和CBS1386、CBS2898和CBS1488、CBS2898和CBS1502、CBS2898和CBS 1504、CBS2898和CBS1548、CBS2898和CBS1550、CBS2898和CBS1551、CBS2898和CBS1552、CBS2898和CBS1603、CBS2898和CBS1605、CBS2898和CBS1606、CBS2898和CBS1608、CBS2898和CBS1665、CBS2898和CBS 2165、CBS2898和CBS2442、CBS2898和CBS2945、CBS2898和CBS2954、CBS2898和CBS2986、CBS2898和CBS 5156、CBS2898和CBS 6017、CBS2898和yHDPN 421、CBS2898和yHKS210、CBS2898和yHKS212、CBS2898和yHKS 509、CBS2898和yHRVM 107、CBS2898和NCYC 966、和CBS2898和CBS1483;CBS 7240和NCYC 1262、CBS 7240和NCYC 227、CBS 7240和NCYC 699、CBS 7240和NCYC 487、CBS 7240和NCYC 2340、CBS 7240和NCYC 1296、CBS 7240和NCYC 228、CBS 7240和NCYC 534、CBS 7240和NCYC 2801、CBS 7240和NCYC 1365、CBS 7240和NCYC 668、CBS 7240和NCYC 450、CBS 7240和NCYC 1236、CBS 7240和NCYC 75、CBS 7240和NCYC 112、CBS 7240和NCYC 115、CBS 7240和NCYC 177、CBS 7240和NCYC 223、CBS 7240和NCYC 224、CBS 7240和NCYC 240、CBS 7240和NCYC 340、CBS 7240和NCYC 478、CBS 7240和NCYC 479、CBS 7240和NCYC 510、CBS 7240和NCYC 530、CBS 7240和NCYC 965、CBS 7240和NCYC 969、CBS 7240和NCYC 975、CBS 7240和NCYC 987、CBS 7240和NCYC 989、CBS 7240和NCYC 1322、CBS 7240和NCYC 1323、CBS 7240和NCYC 229、CBS 7240和NCYC 230、CBS 7240和NCYC 242、CBS 7240和NCYC 392、CBS 7240和NCYC 397、CBS 7240和NCYC 398、CBS 7240和NCYC 511、CBS 7240和NCYC 584、CBS 7240和NCYC 3420、CBS 7240和CBS12357、CBS 7240和CBS 7001、CBS 7240和CBS1174、CBS 7240和CBS1177、CBS 7240和CBS1245、CBS 7240和CBS 1386、CBS 7240和CBS1488、CBS 7240和CBS1502、CBS 7240和CBS1504、CBS 7240和CBS1548、CBS 7240和CBS1550、CBS 7240和CBS1551、CBS 7240和CBS1552、CBS 7240和CBS1603、CBS 7240和CBS1605、CBS 7240和CBS1606、CBS 7240和CBS1608、CBS 7240和CBS1665、CBS 7240和CBS2165、CBS 7240和CBS2442、CBS 7240和CBS2945、CBS 7240和CBS2954、CBS 7240和CBS2986、CBS 7240和CBS 5156、CBS 7240和CBS 6017、CBS 7240和yHDPN 421、CBS 7240和yHKS210、CBS 7240和yHKS212、CBS 7240和yHKS 509、CBS 7240和yHRVM 107、CBS 7240和NCYC 966、和CBS 7240和CBS 1483;NCYC 1526和NCYC 1262、NCYC 1526和NCYC 227、NCYC 1526和NCYC 699、NCYC 1526和NCYC 487、NCYC 1526和NCYC 2340、NCYC 1526和NCYC 1296、NCYC 1526和NCYC 228、NCYC 1526和NCYC 534、NCYC 1526和NCYC 2801、NCYC 1526和NCYC 1365、NCYC 1526和NCYC 668、NCYC 1526和NCYC 450、NCYC 1526和NCYC 1236、NCYC 1526和NCYC 75、NCYC 1526和NCYC 112、NCYC 1526和NCYC 115、NCYC 1526和NCYC 177、NCYC 1526和NCYC 223、NCYC 1526和NCYC 224、NCYC 1526和NCYC 240、NCYC 1526和NCYC 340、NCYC 1526和NCYC 478、NCYC 1526和NCYC 479、NCYC 1526和NCYC 510、NCYC 1526和NCYC 530、NCYC 1526和NCYC 965、NCYC 1526和NCYC 969、NCYC 1526和NCYC 975、NCYC 1526和NCYC 987、NCYC 1526和NCYC 989、NCYC 1526和NCYC 1322、NCYC 1526和NCYC 1323、NCYC 1526和NCYC 229、NCYC 1526和NCYC 230、NCYC 1526和NCYC 242、NCYC 1526和NCYC 392、NCYC 1526和NCYC 397、NCYC 1526和NCYC 398、NCYC 1526和NCYC 511、NCYC 1526和NCYC 584、NCYC 1526和NCYC 3420、NCYC 1526和CBS12357、NCYC 1526和CBS 7001、NCYC 1526和CBS1174、NCYC 1526和CBS1177、NCYC

1526和CBS1245、NCYC 1526和CBS1386、NCYC 1526和CBS1488、NCYC 1526和CBS1502、NCYC 1526和CBS1504、NCYC 1526和CBS1548、NCYC 1526和CBS1550、NCYC 1526和CBS1551、NCYC 1526和CBS1552、NCYC 1526和CBS1603、NCYC 1526和CBS1605、NCYC 1526和CBS1606、NCYC 1526和CBS1608、NCYC 1526和CBS1665、NCYC 1526和CBS2165、NCYC 1526和CBS2442、NCYC 1526和CBS2945、NCYC 1526和CBS2954、NCYC 1526和CBS2986、NCYC 1526和CBS 5156、NCYC 1526和CBS 6017、NCYC 1526和yHDPN 421、NCYC 1526和yHKS210、NCYC 1526和yHKS212、NCYC 1526和yHKS 509、NCYC 1526和yHRVM 107、NCYC 1526和NCYC 966、和NCYC 1526和CBS1483;NCYC 1544和NCYC 1262、NCYC 1544和NCYC 227、NCYC 1544和NCYC 699、NCYC 1544和NCYC 487、NCYC 1544和NCYC 2340、NCYC 1544和NCYC 1296、NCYC 1544和NCYC 228、NCYC 1544和NCYC 534、NCYC 1544和NCYC 2801、NCYC 1544和NCYC 1365、NCYC 1544和NCYC 668、NCYC 1544和NCYC 450、NCYC 1544和NCYC 1236、NCYC 1544和NCYC 75、NCYC 1544和NCYC 112、NCYC 1544和NCYC 115、NCYC 1544和NCYC 177、NCYC 1544和NCYC 223、NCYC 1544和NCYC 224、NCYC 1544和NCYC 240、NCYC 1544和NCYC 340、NCYC 1544和NCYC 478、NCYC 1544和NCYC 479、NCYC 1544和NCYC 510、NCYC 1544和NCYC 530、NCYC 1544和NCYC 965、NCYC 1544和NCYC 969、NCYC 1544和NCYC 975、NCYC 1544和NCYC 987、NCYC 1544和NCYC 989、NCYC 1544和NCYC 1322、NCYC 1544和NCYC 1323、NCYC 1544和NCYC 229、NCYC 1544和NCYC 230、NCYC 1544和NCYC 242、NCYC 1544和NCYC 392、NCYC 1544和NCYC 397、NCYC 1544和NCYC 398、NCYC 1544和NCYC 511、NCYC 1544和NCYC 584、NCYC 1544和NCYC 3420、NCYC 1544和CBS12357、NCYC 1544和CBS 7001、NCYC 1544和CBS1174、NCYC 1544和CBS1177、NCYC 1544和CBS1245、NCYC 1544和CBS1386、NCYC 1544和CBS1488、NCYC 1544和CBS1502、NCYC 1544和CBS1504、NCYC 1544和CBS1548、NCYC 1544和CBS1550、NCYC 1544和CBS1551、NCYC 1544和CBS1552、NCYC 1544和CBS1603、NCYC 1544和CBS1605、NCYC 1544和CBS1606、NCYC 1544和CBS1608、NCYC 1544和CBS1665、NCYC 1544和CBS2165、NCYC 1544和CBS2442、NCYC 1544和CBS2945、NCYC 1544和CBS2954、NCYC 1544和CBS2986、NCYC 1544和CBS 5156、NCYC 1544和CBS 6017、NCYC 1544和yHDPN 421、NCYC 1544和yHKS210、NCYC 1544和yHKS212、NCYC 1544和yHKS 509、NCYC 1544和yHRVM 107、NCYC 1544和NCYC 966、和NCYC 1544和CBS1483;NCYC 2359和NCYC 1262、NCYC 2359和NCYC 227、NCYC 2359和NCYC 699、NCYC 2359和NCYC 487、NCYC 2359和NCYC 2340、NCYC 2359和NCYC 1296、NCYC 2359和NCYC 228、NCYC 2359和NCYC 534、NCYC 2359和NCYC 2801、NCYC 2359和NCYC 1365、NCYC 2359和NCYC 668、NCYC 2359和NCYC 450、NCYC 2359和NCYC 1236、NCYC 2359和NCYC 75、NCYC 2359和NCYC 112、NCYC 2359和NCYC 115、NCYC 2359和NCYC 177、NCYC 2359和NCYC 223、NCYC 2359和NCYC 224、NCYC 2359和NCYC 240、NCYC 2359和NCYC 340、NCYC 2359和NCYC 478、NCYC 2359和NCYC 479、NCYC 2359和NCYC 510、NCYC 2359和NCYC 530、NCYC 2359和NCYC 965、NCYC 2359和NCYC 969、NCYC 2359和NCYC 975、NCYC 2359和NCYC 987、NCYC 2359和NCYC 989、NCYC 2359和NCYC 1322、NCYC 2359和NCYC 1323、NCYC 2359和NCYC 229、NCYC 2359和NCYC 230、NCYC 2359和NCYC 242、NCYC 2359和NCYC 392、NCYC 2359和NCYC 397、NCYC 2359和NCYC 398、NCYC 2359和NCYC 511、NCYC 2359和NCYC 584、NCYC 2359和NCYC 3420、NCYC 2359和CBS12357、NCYC 2359和CBS 7001、NCYC 2359和CBS1174、NCYC 2359和CBS1177、NCYC 2359和CBS1245、NCYC 2359和CBS1386、NCYC 2359和CBS1488、

NCYC 2359和CBS1502、NCYC 2359和CBS1504、NCYC 2359和CBS1548、NCYC 2359和CBS1550、NCYC 2359和CBS1551、NCYC 2359和CBS1552、NCYC 2359和CBS1603、NCYC 2359和CBS1605、NCYC 2359和CBS1606、NCYC 2359和CBS1608、NCYC 2359和CBS1665、NCYC 2359和CBS2165、NCYC 2359和CBS2442、NCYC 2359和CBS2945、NCYC 2359和CBS2954、NCYC 2359和CBS2986、NCYC 2359和CBS 5156、NCYC 2359和CBS 6017、NCYC 2359和yHDPN 421、NCYC 2359和yHKS210、NCYC 2359和yHKS212、NCYC 2359和yHKS 509、NCYC 2359和yHRVM 107、NCYC 2359和NCYC 966、和NCYC 2359和CBS1483;NCYC 986和NCYC 1262、NCYC 986和NCYC 227、NCYC 986和NCYC 699、NCYC 986和NCYC 487、NCYC 986和NCYC 2340、NCYC 986和NCYC 1296、NCYC 986和NCYC 228、NCYC 986和NCYC 534、NCYC 986和NCYC 2801、NCYC 986和NCYC 1365、NCYC 986和NCYC 668、NCYC 986和NCYC 450、NCYC 986和NCYC 1236、NCYC 986和NCYC 75、NCYC 986和NCYC 112、NCYC 986和NCYC 115、NCYC 986和NCYC 177、NCYC 986和NCYC 223、NCYC 986和NCYC 224、NCYC 986和NCYC 240、NCYC 986和NCYC 340、NCYC 986和NCYC 478、NCYC 986和NCYC 479、NCYC 986和NCYC 510、NCYC 986和NCYC 530、NCYC 986和NCYC 965、NCYC 986和NCYC 969、NCYC 986和NCYC 975、NCYC 986和NCYC 987、NCYC 986和NCYC 989、NCYC 986和NCYC 1322、NCYC 986和NCYC 1323、NCYC 986和NCYC 229、NCYC 986和NCYC 230、NCYC 986和NCYC 242、NCYC 986和NCYC 392、NCYC 986和NCYC 397、NCYC 986和NCYC 398、NCYC 986和NCYC 511、NCYC 986和NCYC 584、NCYC 986和NCYC 3420、NCYC 986和CBS12357、NCYC 986和CBS 7001、NCYC 986和CBS1174、NCYC 986和CBS1177、NCYC 986和CBS1245、NCYC 986和CBS1386、NCYC 986和CBS1488、NCYC 986和CBS 1502、NCYC 986和CBS1504、NCYC 986和CBS1548、NCYC 986和CBS1550、NCYC 986和CBS1551、NCYC 986和CBS1552、NCYC 986和CBS1603、NCYC 986和CBS1605、NCYC 986和CBS1606、NCYC 986和CBS1608、NCYC 986和CBS1665、NCYC 986和CBS2165、NCYC 986和CBS2442、NCYC 986和CBS2945、NCYC 986和CBS2954、NCYC 986和CBS2986、NCYC 986和CBS 5156、NCYC 986和CBS 6017、NCYC 986和yHDPN 421、NCYC 986和yHKS 210、NCYC 986和yHKS212、NCYC 986和yHKS 509、NCYC 986和yHRVM 107、NCYC 986和NCYC 966、和NCYC 986和CBS1483;NCYC 1295和NCYC 1262、NCYC 1295和NCYC 227、NCYC 1295和NCYC 699、NCYC 1295和NCYC 487、NCYC 1295和NCYC 2340、NCYC 1295和NCYC 1296、NCYC 1295和NCYC 228、NCYC 1295和NCYC 534、NCYC 1295和NCYC 2801、NCYC 1295和NCYC 1365、NCYC 1295和NCYC 668、NCYC 1295和NCYC 450、NCYC 1295和NCYC 1236、NCYC 1295和NCYC 75、NCYC 1295和NCYC 112、NCYC 1295和NCYC 115、NCYC 1295和NCYC 177、NCYC 1295和NCYC 223、NCYC 1295和NCYC 224、NCYC 1295和NCYC 240、NCYC 1295和NCYC 340、NCYC 1295和NCYC 478、NCYC 1295和NCYC 479、NCYC 1295和NCYC 510、NCYC 1295和NCYC 530、NCYC 1295和NCYC 965、NCYC 1295和NCYC 969、NCYC 1295和NCYC 975、NCYC 1295和NCYC 987、NCYC 1295和NCYC 989、NCYC 1295和NCYC 1322、NCYC 1295和NCYC 1323、NCYC 1295和NCYC 229、NCYC 1295和NCYC 230、NCYC 1295和NCYC 242、NCYC 1295和NCYC 392、NCYC1295和NCYC 397、NCYC 1295和NCYC 398、NCYC 1295和NCYC 511、NCYC 1295和NCYC 584、NCYC 1295和NCYC 3420、NCYC 1295和CBS12357、NCYC 1295和CBS 7001、NCYC 1295和CBS1174、NCYC 1295和CBS1177、NCYC 1295和CBS1245、NCYC 1295和CBS1386、NCYC 1295和CBS1488、NCYC 1295和CBS1502、NCYC 1295和CBS1504、NCYC 1295和CBS1548、NCYC 1295和CBS1550、NCYC 1295和CBS1551、NCYC 1295和CBS1552、NCYC 1295和

CBS1603、NCYC 1295和CBS1605、NCYC 1295和CBS1606、NCYC 1295和CBS1608、NCYC 1295和CBS1665、NCYC 1295和CBS2165、NCYC 1295和CBS2442、NCYC 1295和CBS2945、NCYC 1295和CBS2954、NCYC 1295和CBS2986、NCYC 1295和CBS 5156、NCYC 1295和CBS 6017、NCYC 1295和yHDPN 421、NCYC 1295和yHKS210、NCYC 1295和yHKS212、NCYC 1295和yHKS 509、NCYC 1295和yHRVM 107、NCYC 1295和NCYC 966、和NCYC 1295和CBS1483;NCYC 1516和NCYC 1262、NCYC 1516和NCYC 227、NCYC 1516和NCYC 699、NCYC 1516和NCYC 487、NCYC 1516和NCYC 2340、NCYC 1516和NCYC 1296、NCYC 1516和NCYC 228、NCYC 1516和NCYC 534、NCYC 1516和NCYC 2801、NCYC 1516和NCYC 1365、NCYC 1516和NCYC 668、NCYC 1516和NCYC 450、NCYC 1516和NCYC 1236、NCYC 1516和NCYC 75、NCYC 1516和NCYC 112、NCYC 1516和NCYC 115、NCYC 1516和NCYC 177、NCYC 1516和NCYC 223、NCYC 1516和NCYC 224、NCYC 1516和NCYC 240、NCYC 1516和NCYC 340、NCYC 1516和NCYC 478、NCYC 1516和NCYC 479、NCYC 1516和NCYC 510、NCYC 1516和NCYC 530、NCYC 1516和NCYC 965、NCYC 1516和NCYC 969、NCYC 1516和NCYC 975、NCYC 1516和NCYC 987、NCYC 1516和NCYC 989、NCYC 1516和NCYC 1322、NCYC 1516和NCYC 1323、NCYC 1516和NCYC 229、NCYC 1516和NCYC 230、NCYC 1516和NCYC 242、NCYC 1516和NCYC 392、NCYC 1516和NCYC 397、NCYC 1516和NCYC 398、NCYC 1516和NCYC 511、NCYC 1516和NCYC 584、NCYC 1516和NCYC 3420、NCYC 1516和CBS12357、NCYC 1516和CBS 7001、NCYC 1516和CBS1174、NCYC 1516和CBS1177、NCYC 1516和CBS1245、NCYC 1516和CBS1386、NCYC 1516和CBS1488、NCYC 1516和CBS1502、NCYC 1516和CBS1504、NCYC 1516和CBS1548、NCYC 1516和CBS1550、NCYC 1516和CBS1551、NCYC 1516和CBS1552、NCYC 1516和CBS1603、NCYC 1516和CBS1605、NCYC 1516和CBS1606、NCYC 1516和CBS1608、NCYC 1516和CBS1665、NCYC 1516和CBS2165、NCYC 1516和CBS2442、NCYC 1516和CBS2945、NCYC 1516和CBS2954、NCYC 1516和CBS2986、NCYC 1516和CBS 5156、NCYC 1516和CBS 6017、NCYC 1516和yHDPN 421、NCYC 1516和yHKS210、NCYC 1516和yHKS212、NCYC 1516和yHKS 509、NCYC 1516和yHRVM 107、NCYC 1516和NCYC 966、和NCYC 1516和CBS1483;NCYC 1326和NCYC 1262、NCYC 1326和NCYC 227、NCYC 1326和NCYC 699、NCYC 1326和NCYC 487、NCYC 1326和NCYC 2340、NCYC 1326和NCYC 1296、NCYC 1326和NCYC 228、NCYC 1326和NCYC 534、NCYC 1326和NCYC 2801、NCYC 1326和NCYC 1365、NCYC 1326和NCYC 668、NCYC 1326和NCYC 450、NCYC 1326和NCYC 1236、NCYC 1326和NCYC 75、NCYC 1326和NCYC 112、NCYC 1326和NCYC 115、NCYC 1326和NCYC 177、NCYC 1326和NCYC 223、NCYC 1326和NCYC 224、NCYC 1326和NCYC 240、NCYC 1326和NCYC 340、NCYC 1326和NCYC 478、NCYC 1326和NCYC 479、NCYC 1326和NCYC 510、NCYC 1326和NCYC 530、NCYC 1326和NCYC 965、NCYC 1326和NCYC 969、NCYC 1326和NCYC 975、NCYC 1326和NCYC 987、NCYC 1326和NCYC 989、NCYC 1326和NCYC 1322、NCYC 1326和NCYC 1323、NCYC 1326和NCYC 229、NCYC 1326和NCYC 230、NCYC 1326和NCYC 242、NCYC 1326和NCYC 392、NCYC 1326和NCYC 397、NCYC 1326和NCYC 398、NCYC 1326和NCYC 511、NCYC 1326和NCYC 584、NCYC 1326和NCYC 3420、NCYC 1326和CBS12357、NCYC 1326和CBS 7001、NCYC 1326和CBS1174、NCYC 1326和CBS1177、NCYC 1326和CBS1245、NCYC 1326和CBS1386、NCYC 1326和CBS1488、NCYC 1326和CBS1502、NCYC 1326和CBS1504、NCYC 1326和CBS1548、NCYC 1326和CBS1550、NCYC 1326和CBS1551、NCYC 1326和CBS1552、NCYC 1326和CBS1603、NCYC 1326和CBS1605、NCYC 1326和CBS1606、NCYC 1326

和CBS1608、NCYC 1326和CBS1665、NCYC 1326和CBS2165、NCYC 1326和CBS2442、NCYC 1326和CBS2945、NCYC 1326和CBS2954、NCYC 1326和CBS2986、NCYC 1326和CBS 5156、NCYC 1326和CBS 6017、NCYC 1326和yHDPN 421、NCYC 1326和yHKS210、NCYC 1326和yHKS212、NCYC 1326和yHKS 509、NCYC 1326和yHRVM 107、NCYC 1326和NCYC 966、和NCYC 1326和CBS1483；NCYC 2398和NCYC 1262、NCYC 2398和NCYC 227、NCYC 2398和NCYC 699、NCYC 2398和NCYC 487、NCYC 2398和NCYC 2340、NCYC 2398和NCYC 1296、NCYC 2398和NCYC 228、NCYC 2398和NCYC 534、NCYC 2398和NCYC 2801、NCYC 2398和NCYC 1365、NCYC 2398和NCYC 668、NCYC 2398和NCYC 450、NCYC 2398和NCYC 1236、NCYC 2398和NCYC 75、NCYC 2398和NCYC 112、NCYC 2398和NCYC 115、NCYC 2398和NCYC 177、NCYC 2398和NCYC 223、NCYC 2398和NCYC 224、NCYC 2398和NCYC 240、NCYC 2398和NCYC 340、NCYC 2398和NCYC 478、NCYC 2398和NCYC 479、NCYC 2398和NCYC 510、NCYC 2398和NCYC 530、NCYC 2398和NCYC 965、NCYC 2398和NCYC 969、NCYC 2398和NCYC 975、NCYC 2398和NCYC 987、NCYC 2398和NCYC 989、NCYC 2398和NCYC 1322、NCYC 2398和NCYC 1323、NCYC 2398和NCYC 229、NCYC 2398和NCYC 230、NCYC 2398和NCYC 242、NCYC 2398和NCYC 392、NCYC 2398和NCYC 397、NCYC 2398和NCYC 398、NCYC 2398和NCYC 511、NCYC 2398和NCYC 584、NCYC 2398和NCYC 3420、NCYC 2398和CBS12357、NCYC 2398和CBS 7001、NCYC 2398和CBS1174、NCYC 2398和CBS1177、NCYC 2398和CBS1245、NCYC 2398和CBS1386、NCYC 2398和CBS1488、NCYC 2398和CBS1502、NCYC 2398和CBS1504、NCYC 2398和CBS1548、NCYC 2398和CBS1550、NCYC 2398和CBS1551、NCYC 2398和CBS1552、NCYC 2398和CBS1603、NCYC 2398和CBS1605、NCYC 2398和CBS1606、NCYC 2398和CBS1608、NCYC 2398和CBS1665、NCYC 2398和CBS2165、NCYC 2398和CBS2442、NCYC 2398和CBS2945、NCYC 2398和CBS2954、NCYC 2398和CBS2986、NCYC 2398和CBS 5156、NCYC 2398和CBS 6017、NCYC 2398和yHDPN 421、NCYC 2398和yHKS210、NCYC 2398和yHKS212、NCYC 2398和yHKS 509、NCYC 2398和yHRVM 107、NCYC 2398和NCYC 966、和NCYC 2398和CBS1483;NCYC 669和NCYC 1262、NCYC 669和NCYC 227、NCYC 669和NCYC 699、NCYC 669和NCYC 487、NCYC 669和NCYC 2340、NCYC 669和NCYC 1296、NCYC 669和NCYC 228、NCYC 669和NCYC 534、NCYC 669和NCYC 2801、NCYC 669和NCYC 1365、NCYC 669和NCYC 668、NCYC 669和NCYC 450、NCYC 669和NCYC 1236、NCYC 669和NCYC 75、NCYC 669和NCYC 112、NCYC 669和NCYC 115、NCYC 669和NCYC 177、NCYC 669和NCYC 223、NCYC 669和NCYC 224、NCYC 669和NCYC 240、NCYC 669和NCYC 340、NCYC 669和NCYC 478、NCYC 669和NCYC 479、NCYC 669和NCYC 510、NCYC 669和NCYC 530、NCYC 669和NCYC 965、NCYC 669和NCYC 969、NCYC 669和NCYC 975、NCYC 669和NCYC 987、NCYC 669和NCYC 989、NCYC 669和NCYC 1322、NCYC 669和NCYC 1323、NCYC 669和NCYC 229、NCYC 669和NCYC 230、NCYC 669和NCYC 242、NCYC 669和NCYC 392、NCYC 669和NCYC 397、NCYC 669和NCYC 398、NCYC 669和NCYC 511、NCYC 669和NCYC 584、NCYC 669和NCYC 3420、NCYC 669和CBS12357、NCYC 669和CBS 7001、NCYC 669和CBS1174、NCYC 669和CBS1177、NCYC 669和CBS1245、NCYC 669和CBS1386、NCYC 669和CBS1488、NCYC 669和CBS1502、NCYC 669和CBS1504、NCYC 669和CBS 1548、NCYC 669和CBS1550、NCYC 669和CBS1551、NCYC 669和CBS1552、NCYC 669和CBS1603、NCYC 669和CBS1605、NCYC 669和CBS1606、NCYC 669和CBS1608、NCYC 669和CBS1665、NCYC 669和CBS2165、NCYC 669和CBS2442、NCYC 669和CBS2945、NCYC 669和CBS2954、NCYC 669和

CBS2986、NCYC 669和CBS 5156、NCYC 669和CBS 6017、NCYC 669和yHDPN 421、NCYC 669和yHKS210、NCYC 669和yHKS212、NCYC 669和yHKS 509、NCYC 669和yHRVM 107、NCYC 669和NCYC 966、和NCYC 669和CBS1483;NCYC 2921和NCYC 1262、NCYC 2921和NCYC 227、NCYC 2921和NCYC 699、NCYC 2921和NCYC 487、NCYC 2921和NCYC 2340、NCYC 2921和NCYC 1296、NCYC 2921和NCYC 228、NCYC 2921和NCYC 534、NCYC 2921和NCYC 2801、NCYC 2921和NCYC 1365、NCYC 2921和NCYC 668、NCYC 2921和NCYC 450、NCYC 2921和NCYC 1236、NCYC 2921和NCYC 75、NCYC 2921和NCYC 112、NCYC 2921和NCYC 115、NCYC 2921和NCYC 177、NCYC 2921和NCYC 223、NCYC 2921和NCYC 224、NCYC 2921和NCYC 240、NCYC 2921和NCYC 340、NCYC 2921和NCYC 478、NCYC 2921和NCYC 479、NCYC 2921和NCYC 510、NCYC 2921和NCYC 530、NCYC 2921和NCYC 965、NCYC 2921和NCYC 969、NCYC 2921和NCYC 975、NCYC 2921和NCYC 987、NCYC 2921和NCYC 989、NCYC 2921和NCYC 1322、NCYC 2921和NCYC 1323、NCYC 2921和NCYC 229、NCYC 2921和NCYC 230、NCYC 2921和NCYC 242、NCYC 2921和NCYC 392、NCYC 2921和NCYC 397、NCYC 2921和NCYC 398、NCYC 2921和NCYC 511、NCYC 2921和NCYC 584、NCYC 2921和NCYC 3420、NCYC 2921和CBS12357、NCYC 2921和CBS 7001、NCYC 2921和CBS1174、NCYC 2921和CBS1177、NCYC 2921和CBS1245、NCYC 2921和CBS1386、NCYC 2921和CBS1488、NCYC 2921和CBS1502、NCYC 2921和CBS1504、NCYC 2921和CBS1548、NCYC 2921和CBS1550、NCYC 2921和CBS1551、NCYC 2921和CBS1552、NCYC 2921和CBS1603、NCYC 2921和CBS1605、NCYC 2921和CBS1606、NCYC 2921和CBS1608、NCYC 2921和CBS1665、NCYC 2921和CBS2165、NCYC 2921和CBS2442、NCYC 2921和CBS2945、NCYC 2921和CBS2954、NCYC 2921和CBS2986、NCYC 2921和CBS 5156、NCYC 2921和CBS 6017、NCYC 2921和yHDPN 421、NCYC 2921和yHKS210、NCYC 2921和yHKS212、NCYC 2921和yHKS 509、NCYC 2921和yHRVM 107、NCYC 2921和NCYC 966,以及NCYC 2921和CBS1483。

[0098] 在一个实施方案中,所述酵母组合不包括蒸馏酵母(distiller's yeast)、面包酵母、或蒸馏酵母和面包酵母。

[0099] 所述酵母还可在基因PAD1和FDC1中的至少一个基因、参与所述基因中的至少一个的转录控制的基因、和/或编码参与摄取酚酸(优选阿魏酸)或参与脱羧酚化合物(优选4-乙烯基愈创木酚)的输出的蛋白的基因、和/或参与所述基因的转录控制基因中包含一种或多种天然发生的突变和/或由诱变引起的突变。

[0100] 对将麦汁中存在的麦芽糖、麦芽三糖、果糖和/或葡萄糖发酵成乙醇具有不同特异性的酵母菌株的所述组合可以在发酵开始时在同一时间点添加到麦汁中,或者可以在不同时间点一种接一种地添加到麦汁中。

[0101] 在要发酵大量麦汁的情况下,可以对酵母菌株进行预培养,以获得足够量的每种酵母菌株,这些酵母菌株可以一起或在不同的时间点添加到麦汁中。单个菌株的预培养优选在特定的、成分明确培养基上或在成分未明确的培养基如麦汁上进行。这种预培养可以使用分离的菌株单独进行,也可以组合进行。在预培养对发酵麦芽糖、麦芽三糖、果糖和/或葡萄糖具有不同特异性的酵母菌株组合的过程中,必须注意的是,对发酵麦芽糖、麦芽三糖、果糖和/或葡萄糖具有不同特异性的至少两种酵母菌株的存在比例在预培养过程中不发生变化。这一点例如可以通过采用具有不同比例的选自麦芽糖、麦芽三糖、果糖和/或葡萄糖的糖的培养基来实现。在对发酵麦芽糖、麦芽三糖、果糖和/或葡萄糖具有不同特异性

的至少两种酵母菌株中的一种可能成为优势菌株的情况下,该组合可以在包含更多一种或多种非优势菌株所偏好的一种或多种糖的培养基上生长。

[0102] 作为麦芽糖、麦芽三糖、果糖或葡萄糖中的一种的特化菌的酵母菌株优选在包含所述酵母菌株所偏好的特定糖的成分明确的培养基上生长。

[0103] 所述预培养可以在多个步骤中进行。例如,可以将来自对发酵麦芽糖、麦芽三糖、果糖和/或葡萄糖具有不同特异性的至少两种酵母菌株的干燥或冷冻原料分别接种在包含所述特定糖的培养基或平板上,以产生“工作”母料。所述母料可以在进一步的培养物中生长以增加规模,直到产生足够的酵母以转移到繁殖设施(propagation plant)。转移步骤的数量取决于繁殖设施中接种麦汁所需的酵母菌株的数量,但通常保持在最低限度以降低感染风险。

[0104] 所述预培养可包括反选择步骤,在此期间,将每批特化酵母菌株接种在包含两种剩余糖的组合的培养基上。如果特化酵母菌株在包含其他两种糖的反选择培养基上表现出增强的生长,则可以丢弃所述批次。

[0105] 在繁殖设施中通过对发酵麦芽糖、麦芽三糖、果糖和/或葡萄糖具有不同特异性的至少两种酵母菌株接种麦汁可以同时进行或在时间上分开进行。对于对发酵麦芽糖、麦芽三糖、果糖和/或葡萄糖具有不同特异性的至少两种酵母菌株中的每一种,可以以20:1至1:20的比率进行接种。

[0106] 在一个优选的实施方案中,繁殖设施中的麦汁通过对发酵麦芽糖、麦芽三糖、果糖和/或葡萄糖具有不同特异性的两种酵母菌株进行接种,这两种酵母基于数量的比率为20:1、10:1、8:1、5:1、4:1、3:1、2:1或1:1。

[0107] 繁殖设施中麦汁通过对发酵麦芽糖、麦芽三糖、果糖和/或葡萄糖具有不同特异性的两种酵母菌株以基于数量的比率20:1、10:1、8:1、5:1、4:1、3:1、2:1或1:1进行的所述接种可以在发酵开始时或发酵过程中的不同时间点进行。例如,可以在时间点0时用对麦芽三糖偏好的酵母菌株开始进行发酵,然后在一定量的时间后,例如在1天、2天、3天或5天后,添加对麦芽糖偏好的酵母菌种。仅使用对发酵麦芽糖、麦芽三糖、果糖或葡萄糖具有偏好的酵母菌株中的一种开始发酵可能具有这样的优点,即该菌株的生长可能不会被其他一种或多种菌株超越。然而,如本领域技术人员将认识到,在不同时间点接种对发酵麦芽糖、麦芽三糖、果糖和/或葡萄糖具有不同特异性的酵母菌株可以等同于在发酵开始时一起接种对发酵麦芽糖、麦芽三糖、果糖和/或者葡萄糖具有不同特异性的酵母菌株,尽管其比例是在第0天用于接种的那一种酵母菌株超过一种或多种其他酵母菌株。

[0108] 5.实施例

[0109] 实施例1

[0110] 材料和方法

[0111] 143种酵母库储备

[0112] 将玻璃管中从公共酵母库(public yeast collections)获得的菌株(见表1)的冻干细胞重悬于无菌水中,之后将100μl细胞重悬液接种在YPD琼脂平板(10g L^{-1},Bacto酵母提取物,20g L^{-1}Bacto蛋白胨,20g L^{-1}葡萄糖和20g L^{-1}琼脂)上。将平板在20℃下孵育5天后,对每种菌株采集一个单菌落,并将其接种在装有35ml YPD培养基(10g L^{-1},Bacto酵母提取物,20g L^{-1}Bacto蛋白胨,20g L^{-1}葡萄糖)的500ml圆底烧瓶中。对于所有其他菌株,将具

有单个菌落的琼脂斜面或纯甘油储备培养物直接接种在装有35ml YPD的500ml圆底烧瓶中。将培养物在设定为20℃和200rpm的IInnova 44培养箱摇床(Eppendorf,Nijmegen,The Netherlands)中培养48小时。最后,用30%v/v甘油补充培养物并在-80℃下储存。

[0113] 麦汁培养基制备

[0114] 用1.5mg/L的$ZnSO_4$补充相当于约120g/L的可发酵糖的16.5柏拉图麦汁。然后,将经补充的麦汁在110℃下高压灭菌20分钟。这一过程导致了沉淀絮凝物的形成,可能是由于蛋白质聚集。无菌麦汁在4℃下储存,然后使用0.2μmNalgene Rapid Flow瓶顶过滤器(Thermo Fisher Scientific,Waltham,Massachusetts,United States)过滤,并通过添加无菌去矿化水稀释3倍,得到最终可发酵糖浓度约为40g/L的麦汁培养基。在实验之前,用1.2ml/L的20%Pluronic PE9200消泡剂(BASF,Ludwigshafen,Germany)补充麦汁培养液。

[0115] 微需氧培养

[0116] 如之前所述进行微需氧培养(Brouwers等人,2019.bioRxiv 679563;Brouwers等人,2019.PLoS Genet 15:e1007853)。所有菌株一式三份进行测试。在所有实验中均采用对照菌株CBS1483。将每种菌株的一根甘油储备管(约1ml)接种在装有20ml麦汁培养基的50ml CELLSTAR细胞培养管(Greiner Bio-One,Kremsmünster,Austria)中。将这些预培养物在设定为12℃、200rpm的摇床培养箱内以45°角培养3天,或直到OD_{660}>8。使用7200Jenway光谱仪(Jenway,Stone,UK)监测660nm处的光密度。每个预培养物用于接种三个装有200ml麦汁培养基且配备有橡胶隔膜盖的250ml无菌玻璃瓶至起始OD_{660}为0.2。将填充有无菌棉的针头插入每个烧瓶的隔膜中,以允许释放培养过程中可能积聚的CO_2压力。总的来说,这些条件确保了在整个实验过程中保持微需氧环境。将玻璃无菌瓶在12℃、200rpm下培养约5天。通过将针头穿过隔膜并用无菌注射器抽吸2-5ml,每天采集两个样品。对每个样品测定OD_{660},并且每个样品在过滤后在配备有Bio-Rad HPX 87H柱(Bio-Rad,Hercules,CA)的Agilent 1260HPLC(Agilent Technologies,Santa Clara,CA)上通过高压液相色谱法(HPLC)进行分析。在60 ℃下用0.5 g $L^{-1}$$H_2SO_4$以0.6 $mlmin^{-1}$流速洗脱柱。使用Agilent折射率检测器和Agilent 1260VWD检测器完成代谢物检测。

[0117] 结果

[0118] 麦芽糖和麦芽三糖消耗速率的比率分析

[0119] 麦芽糖和麦芽三糖消耗速率通过将公式$Y=Y_0\times e^{(k\times X)}$(其中k是速率常数)的指数曲线拟合到消耗曲线的指数阶段的点来确定(参见图1)。将麦芽糖的斜率值除以麦芽三糖的斜率值,得到无量纲值麦芽糖/麦芽三糖(M2/M3)速率比。比率最大化为10。所有测试菌株的M2/M3速率比的分布如图2所示。所有样品的M2/M3速率比值在0.28至10范围。对照菌株CBS1483的M2/M3速率比在4至10范围。菌株CBS1513(别名NCYC396)的M2/M3速率比在0.28至0.40范围。最后,菌株WS34/70的M2/M3速率比在1.82至1.96范围。

[0120] 实施例2.由两种特化菌(CBS1483和CBS1513)组成的联合体发酵

[0121] 材料和方法

[0122] 菌株

[0123] 表2中列出了本研究中使用的酵母菌株。储备培养物在20℃的YPD(10gL^{-1}Bacto酵母提取物、20g L^{-1}Bacto蛋白胨和20g L^{-1}葡萄糖)中生长至稳定期初期,补充无菌甘油[最终浓度30%(v/v)],并在-80℃下以1mL等分试样储存至进一步使用。

[0124] 表2.本研究中使用的酵母菌株

[0125]

名称	物种	参考
CBS1483	巴斯德酵母	van den Broek 等人, 2015. Appl Environ Microbiol 81: 6253–6267.
WS34/70	巴斯德酵母	Nakao et al., 2009. DNA Res 16: 115–129.
CBS1513	巴斯德酵母	van den Broek 等人, 2015. Appl Environ Microbiol 81: 6253–6267.

[0126] 培养基制备

[0127] 通过向用于生产拉格啤酒的通过浸出糖化工艺(infusion mash process)制备的来自大麦芽的包含β-淀粉酶和α-淀粉酶余留物(rest)的工业麦汁中(从荷兰Zoeterwoude的HEINEKEN Supply Chain B.V.获得)每升添加6.6mg $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$和每升每额外柏拉图度(°P)添加11.63g D-麦芽糖一水合物(Glentham Life Sciences Ltd,Wiltshire,UK)和3.80g商业糖混合物(干葡萄糖浆C plus 01987,Cargill,Haubourdin,France)来制备所需表观提取物(AE)的极高比重(VHG)麦汁。VHG麦汁在110℃下高压灭菌20分钟。

[0128] 高筒管标准(Tall tube characterization)

[0129] 酵母菌株和不同培养物组合的表征在3升不锈钢(E.B.C.Analytica Microbiologica(1977)Journal of the Institute of Brewing 83:109-118)高筒管(Tall tube)中进行,所述高筒管的工作容积为2.25升,并配有水冷套(Leemberg,Zwijndrecht,TheNetherlands)。使用20°P和23°P VHG麦汁对菌株进行表征。通过Lauda ECO RE 415G低温恒温器(Lauda Dr.R.Wobser GmbH&Co.,Lauda-Königshofen,Germany)将温度控制在12℃。

[0130] 将预培养物从冷冻储备培养物接种到100mL YPD中,并在转式培养箱中在12℃和200rpm条件下生长约3天。将来自这些摇瓶的培养物用于接种装有100mL YPM 6%(10g L^{-1}Bacto酵母提取物、20g L^{-1}Bacto蛋白胨和60g L^{-1}麦芽糖)的烧瓶至光密度达到0.8,并在12℃和200rpm下生长约2天。通过离心(4000rpm,10min,4℃)从这些预培养物中收获细胞,重悬于去矿化水中,并以5×10^6个细胞mL^{-1}的细胞浓度接种VHG麦汁。为了进行混合培养物表征,使不同菌株在单独的预培养物中生长,并在接种前按所需比率混合。将所接种的VHG麦汁搅拌30分钟,然后将其转移到重复的高筒管中。

[0131] 表1.测试菌株列表。巴斯德酵母、酿酒酵母、贝酵母(S.bayanus)和真贝氏酵母菌菌株来自公共来源,如英国国家酵母培养物保藏中心(National Collection of Yeast Cultures)(Norwich,England)、荷兰真菌生物多样性研究所(Westerdijk Fungal Biodiversity Institute)(Utrecht,the Netherlands)、德国慕尼黑工业大学(Technical University of Munich)(Munich,Germany)和美国威斯康星麦迪逊大学yH菌株保藏中心(University of Wisconsin-Madison,USA)。

[0132]

菌株 #	菌株名称	类型	M2 速率/M3 速率	菌株 #	菌株名称	类型	M2 速率/M3 速率
1	NCYC 73	泛化菌	2.1	24	NCYC 699	麦芽糖特化菌	4.3
2	NCYC 75	麦芽糖特化菌	10	25	NCYC 965	麦芽糖特化菌	10
3	NCYC 112	麦芽糖特化菌	10	26	NCYC 966	麦芽糖特化菌	5.2
4	NCYC 115	麦芽糖特化菌	10	27	NCYC 967	泛化菌	3.9
5	NCYC 177	麦芽糖特化菌	10	28	NCYC 969	麦芽糖特化菌	10
6	NCYC 223	麦芽糖特化菌	10	29	NCYC 975	麦芽糖特化菌	10
7	NCYC 224	麦芽糖特化菌	10	30	NCYC 984	泛化菌	1.6
8	NCYC 240	麦芽糖特化菌	10	31	NCYC 985	泛化菌	2.2
9	NCYC 340	麦芽糖特化菌	10	32	NCYC 986	麦芽三糖特化菌	1.5
10	NCYC 396	麦芽三糖特化菌	0.3	33	NCYC 987	麦芽糖特化菌	10
11	NCYC 456	泛化菌	2.2	34	NCYC 989	麦芽糖特化菌	10
12	NCYC 457	麦芽三糖特化菌	0.4	35	NCYC 1047	泛化菌	3.6
13	NCYC 478	麦芽糖特化菌	10	36	NCYC 1048	泛化菌	3
14	NCYC 479	麦芽糖特化菌	10	37	NCYC 1056	泛化菌	2.2
15	NCYC 487	麦芽糖特化菌	4.7	38	NCYC 1057	泛化菌	3.4
16	NCYC 510	麦芽糖特化菌	10	39	NCYC 1073	麦芽三糖特化菌	1.1
17	NCYC 529	泛化菌	1.6	40	NCYC 1116	泛化菌	3
18	NCYC 530	麦芽糖特化菌	10	41	NCYC 1146	麦芽三糖特化菌	0.8
19	NCYC 531	泛化菌	1.8	42	NCYC 1236	麦芽糖特化菌	8.2
20	NCYC 534	麦芽糖特化菌	5.7	43	NCYC 1239	麦芽三糖特化菌	0.7
21	NCYC 668	麦芽糖特化菌	7.6	44	NCYC 1250	泛化菌	2.2
22	NCYC 669	麦芽三糖特化菌	1.58	45	NCYC 1262	麦芽糖特化菌	4.1
23	NCYC 670	泛化菌	2.1	46	NCYC 1269	麦芽三糖特化菌	0.4

[0133] 表1(续)

[0134]

菌株 #	菌株名称	类型	M2 速率/M3 速率	菌株 #	菌株名称	类型	M2 速率/M3 速率
47	NCYC 1295	麦芽三糖特化菌	1.6	71	NCYC 2921	麦芽三糖特化菌	1.6
48	NCYC 1296	麦芽糖特化菌	5.6	72	NCYC 3419	泛化菌	2.9
49	NCYC 1297	麦芽三糖特化菌	0.8	73	CMB S33	泛化菌	2.7
50	NCYC 1305	麦芽三糖特化菌	1.1	74	NCYC 185	麦芽三糖特化菌	0.5
51	NCYC 1322	麦芽糖特化菌	10	75	NCYC 203	麦芽三糖特化菌	1.2
52	NCYC 1323	麦芽糖特化菌	10	76	NCYC 204	麦芽三糖特化菌	0.5
53	NCYC 1324	麦芽三糖特化菌	1.3	77	NCYC 227	麦芽糖特化菌	4.2
54	NCYC 1326	麦芽三糖特化菌	1.5	78	NCYC 228	麦芽糖特化菌	5.7
55	NCYC 1341	泛化菌	2.6	79	NCYC 229	麦芽糖特化菌	10
56	NCYC 1342	泛化菌	2.8	80	NCYC 230	麦芽糖特化菌	10
57	NCYC 1365	麦芽糖特化菌	6.5	81	NCYC 231	麦芽三糖特化菌	1.1
58	NCYC 1516	麦芽三糖特化菌	1.5	82	NCYC 242	麦芽糖特化菌	10
59	NCYC 1526	麦芽三糖特化菌	1.3	83	NCYC 392	麦芽糖特化菌	10
60	NCYC 1544	麦芽三糖特化菌	1.4	84	NCYC 397	麦芽糖特化菌	10
61	NCYC 2337	泛化菌	2.1	85	NCYC 398	麦芽糖特化菌	10
62	NCYC 2338	泛化菌	2.3	86	NCYC 399	泛化菌	2.8
63	NCYC 2339	麦芽三糖特化菌	**1.6**	87	NCYC 400	泛化菌	**2.9**
64	NCYC 2340	麦芽糖特化菌	**5.3**	88	NCYC 450	麦芽糖特化菌	**8.1**
65	NCYC 2347	泛化菌	**1.7**	89	NCYC 451	麦芽三糖特化菌	**0.4**
66	NCYC 2359	麦芽三糖特化菌	**1.4**	90	NCYC 452	麦芽三糖特化菌	**0.4**
67	NCYC 2398	麦芽三糖特化菌	**1.6**	91	NCYC 453	泛化菌	**3.3**
68	NCYC 2426	泛化菌	**1.8**	92	NCYC 454	泛化菌	**2.1**
69	NCYC 2801	麦芽糖特化菌	**6.1**	93	NCYC 455	泛化菌	**3.3**
70	NCYC 2837	泛化菌	**1.8**	94	NCYC 511	麦芽糖特化菌	**10**

[0135] 表1(续)

[0136]

菌株 #	菌株名称	类型	M2 速率/M3 速率	菌株 #	菌株名称	类型	M2 速率/M3 速率
95	NCYC 584	麦芽糖特化菌	10	**120**	CBS 1608	麦芽糖特化菌	10
96	NCYC 679	泛化菌	3.9	**121**	CBS 1665	麦芽糖特化菌	10
97	NCYC 680	泛化菌	2.3	**122**	CBS 2165	麦芽糖特化菌	10
98	NCYC 1026	泛化菌	2.4	**123**	CBS 2442	麦芽糖特化菌	10
99	NCYC 3420	麦芽糖特化菌	10	**124**	CBS 2443	麦芽三糖特化菌	1.2
100	CBS 12357	麦芽糖特化菌	10	**125**	CBS 2898	麦芽三糖特化菌	1.3
101	CBS 7001	麦芽糖特化菌	10	**126**	CBS 2906		
102	CBS 1483	麦芽糖特化菌	4 to 10	**127**	CBS 2945	麦芽糖特化菌	10
103	WS34/70-1			**128**	CBS 2954	麦芽糖特化菌	10
104	CBS 679			**129**	CBS 2986	麦芽糖特化菌	10
105	CBS 1174	麦芽糖特化菌	10	**130**	CBS 5156	麦芽糖特化菌	10
106	CBS 1177	麦芽糖特化菌	10	**131**	CBS 5832	泛化菌	2.5
107	CBS 1245	麦芽糖特化菌	10	**132**	CBS 6017	麦芽糖特化菌	10
108	CBS 1386	麦芽糖特化菌	10	**133**	CBS 6903	麦芽三糖特化菌	1.2
109	CBS 1484	泛化菌	2.5	134	CBS 7240	麦芽三糖特化菌	1.3
110	CBS 1488	麦芽糖特化菌	10	**135**	CBS 8834	泛化菌	3.6
111	CBS 1502	麦芽糖特化菌	10	**136**	WS34/70	泛化菌	2
112	CBS 1504	麦芽糖特化菌	10	**137**	CBS 1513	麦芽三糖特化菌	0.3
113	CBS 1548	麦芽糖特化菌	10	**138**	NCYC 396		
114	CBS 1550	麦芽糖特化菌	10	**139**	yHDPN 421	麦芽糖特化菌	10
115	CBS 1551	麦芽糖特化菌	10	**140**	yHKS 210	麦芽糖特化菌	10
116	CBS 1552	麦芽糖特化菌	10	**141**	yHKS 212	麦芽糖特化菌	10
117	CBS 1603	麦芽糖特化菌	10	**142**	yHKS 509	麦芽糖特化菌	10
118	CBS 1605	麦芽糖特化菌	10	**143**	yHRVM 107	麦芽糖特化菌	10
119	CBS 1606	麦芽糖特化菌	10				

[0137] 分析方法

[0138] 使用质量流量计(Bronkhorst,Veenendaal,The Netherlands)连续测量CO_2释放。用Libra S60分光光度计(Biochrom Ltd.,Cambridge,USA)测量光密度。用Nucleocounter YC-100(Chemometec A/S,Allerod,Denmark)测量总细胞浓度和存活性。用手持式密度计DMA 35Basic(Anton Paar GmbH,Graz,Austria)测量表观提取物(AE)。使用配备有Aminex HPX-87H色谱柱(BioRad Laboratories Inc.,Lunteren,The Netherlands)的Agilent Infinity 1260色谱系统(Agilent Technologies,Santa Clara,CA,USA),使用5mM H_2SO_4作为洗脱液以0.6mL min^{-1}流速在60℃下对糖和代谢物浓度进行HPLC分析。

[0139] 使用配备有用于分析酯类和高级醇类的DB-WAXetr色谱柱(Agilent)和火焰离子化检测器(FID)以及用于邻位二酮分析的CP-Sil 8CB色谱柱(Agilent)和电子捕获检测器(ECD)的Agilent 7890A系列气相色谱仪测量酯类、高级醇类和邻位二酮的浓度。

[0140] 结果

[0141] 在高筒管实验中,在20°P麦汁中分别测试了麦芽三糖特化菌巴斯德酵母CBS1513(也称为卡尔斯伯酵母型菌株E.C.Hansen)和麦芽糖特化菌巴斯德酵母CBS1483,证实了它们的糖特化菌行为。参见图3。

[0142] 在原理验证(proof-of-principle)混合物中,在高筒管中以1:1、4:1和1:4、10:1和1:10的比率在20°P麦汁中测试了CBS1483和CBS1513,并与标准泛化菌WS34/70进行了比较。结果显示,1:1和4:1(CBS1483:CBS1513)的混合物比20°P的W34/70发酵提前10天达到2.5°P密度的发酵度(图3A)。1:1、1:4和1:10(CBS1483:CBS1513)混合物的残留麦芽三糖浓度从大约10天开始低于10g/L,与麦芽三糖特化菌相当。W34/70的残留麦芽三糖浓度在10天时约为20g/L,而麦芽糖特化菌的残留麦芽三糖浓度在10天时约为30g/L(图3B)。1:1、4:1和10:1混合物在发酵10天后的残余麦芽糖浓度约为5g/L,而WS34/70和麦芽三糖特化菌都是在发酵20天后才达到这一数值,因此要晚10天(图3C)。

[0143] 与WS34/70相比,1:1、4:1和10:1(CBS1483:CBS1513)混合物的乙醇生产速度加快(图3D),而WS34/70和所有混合物中最终乙醇生产量相当(图3E)。

[0144] 所分析的其他变量,包括pH值、CO_2产生量、葡萄糖消耗量、果糖消耗量以及酯、高级醇和邻位二酮的生成量,在不同培养物之间没有显著差异。

[0145] 当在23°P麦汁中在高筒管对单个菌株和混合物进行测试时,也获得了可比较的数据。结果显示,1:1和4:1混合物比亲本菌株更早达到2.5°P的发酵度水平(图4A)。1:1、1:4和1:10混合物的残留麦芽三糖浓度与麦芽三糖特化菌相当,并且低于WS34/70和麦芽糖特化菌的残留麦芽三糖浓度,而1:1、4:1和10:1混合物的残留麦芽糖浓度与麦芽糖特化菌相当(图4B)。

[0146] 与单个菌株相比,4:1混合物的乙醇生产速度加快(未显示数据)。发现4:1混合物在其他菌株所需时间的约3/4内结束。

[0147] 在针对20°P和23°P比较具有不同底物特异性的菌株的混合物时,可以发现1:1和4:1混合物领先23°P起始麦汁达到2.5°P的发酵度。此外,使用23°P麦汁开始时,最终乙醇产量要高出约20%(参见图5A、图5B)。

[0148] 结论是,与单个菌株或行业标准菌株(W34/70)相比,具有不同底物特异性的菌株(如CBS1513和CBS1483)的混合物导致更快的生产乙醇。

[0149] 实施例3

[0150] 材料和方法

[0151] 酿酒酵母属菌株:Superstart™和Thermosacc®均由Lallemand Biofuels& Distilled Spirits,Milwaukee,WI慷慨提供。共培养在工作容积为2.25L的3L不锈钢高筒管中在23°P VHG麦汁中进行。通过Lauda ECO RE 415G低温恒温器将温度控制在12℃。用Nucleocounter YC-100(Chemometec A/S,Allerod,Denmark)测量总细胞浓度和存活性。用手持式密度计DMA 35Basic(Anton Paar GmbH,Graz,Austria)测量表观提取物(AE)。使用配备有Aminex HPX-87H色谱柱(BioRad Laboratories Inc.,Lunteren,The Netherlands)的Agilent Infinity 1260色谱系统(Agilent Technologies,Santa Clara,CA,USA),使用5mM H_2SO_4作为洗脱液以0.6mL min^{-1}流速在60℃下对糖和乙醇浓度进行HPLC分析。

[0152] 结果

[0153] 为了检验WO2013/181496中提出的Superstart™和Thermosacc®菌株的混合物是否能从麦汁中有效消耗葡萄糖、麦芽糖和麦芽三糖的混合物,使用1:1比率的这两种菌株的混合物接种23°P VHG麦汁。这些酿酒酵母菌株是用于燃料乙醇和饮料乙醇发酵的活性干酵母。Superstart是一种蒸馏酵母,其被选择用于快速发酵启动和对温度、pH和渗透胁迫的应激耐受。该菌株还被表征为麦芽三糖阳性菌株。

[0154] Thermosacc®是一种酿酒酵母蒸馏酵母,其被选择用于在高温、高糖和高乙醇浓度下的高比重发酵。其在高达38℃的温度、大于20%(按体积计算)(按重量计算为16%)的乙醇浓度下都能很好地发挥作用。

[0155] 发酵在3升不锈钢高筒管(E.B.C.Analytica Microbiologica(1977)Journal of the Institute of Brewing 83:109-118)中在12℃下进行,所述高筒管的工作容积为2.25升,并配有水冷套(Leemberg,Zwijndrecht,TheNetherlands)。将一式四份发酵的结果与初

始比率为1:1的特化菌CBS1483:CB 1513混合物的结果进行比较(图4)。正如预期的那样,最初被选择用于在高于30℃的高温下高效发酵的这两种商业菌株在低于30℃的低温下不能高效发酵。结果显示,1:1比率的Supersart™和Thermossac菌株在发酵19天后达到15.5°P的发酵度(图6A)。此时,菌株混合物的代谢不再活跃,如从CO_2曲线可以看出,所述CO_2曲线达到了基线(空)值(图7)。单种糖浓度显示,麦芽糖和麦芽三糖分别仅消耗了32%(44.8g L^{-1})和4.5%(4.5g L^{-1})(图6B和图6C)。这导致与CBS1483-CBS1513协同培养相比更低的乙醇浓度(图6D)。

[0156] 作为比较,在类似条件下,1:1比率的CBS1483:CBS1513混合物在20天时达到低于7°P的值,并且在40天后能够进一步衰减到2.5°P(图4)。在19天时,CBS菌株的共培养物消耗了最初存在的83%的麦芽三糖和76%的麦芽糖(图4)。

[0157] 这些结果表明,尽管Superstart和Thermosacc因其出色的发酵特征而被选择,但它们并不适用于在低温下进行麦汁发酵以生产发酵饮料,例如啤酒,优选拉格啤酒。

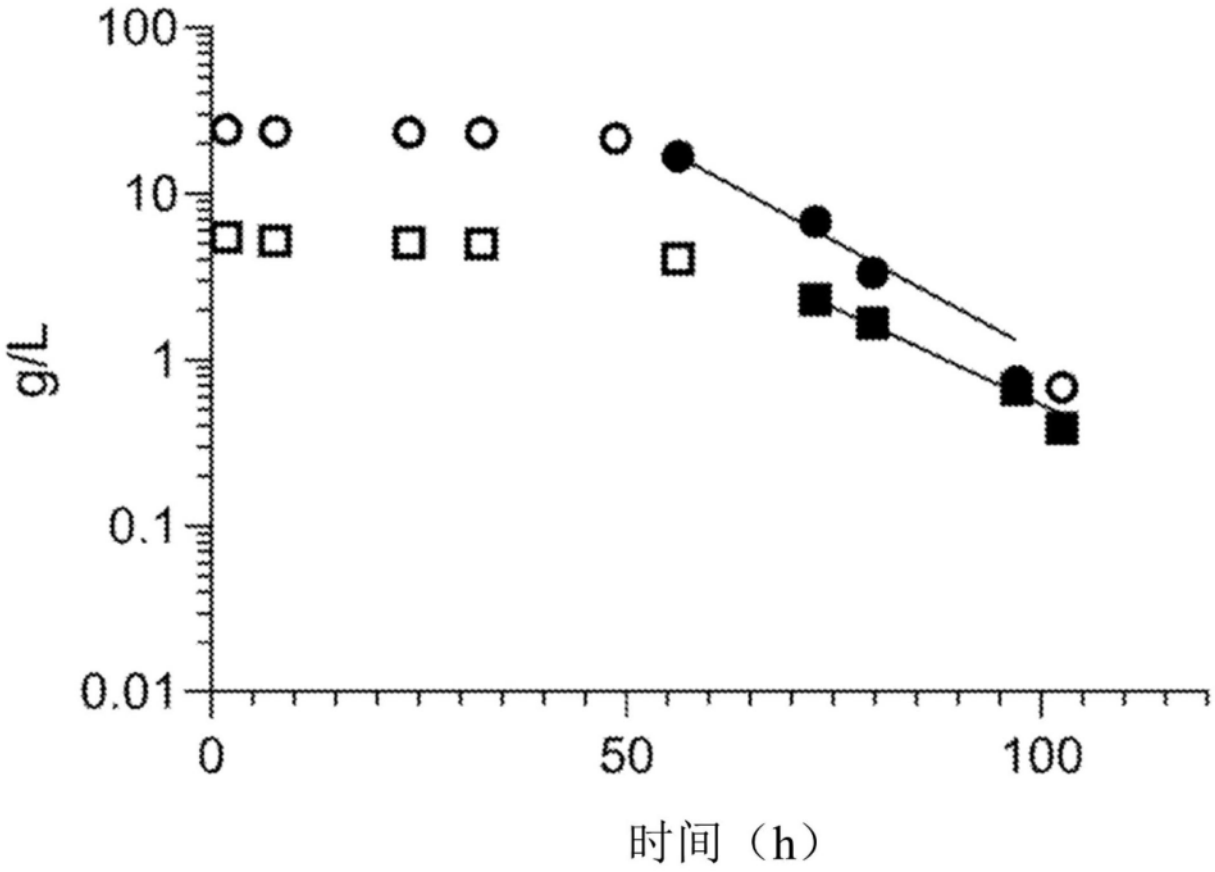


图1

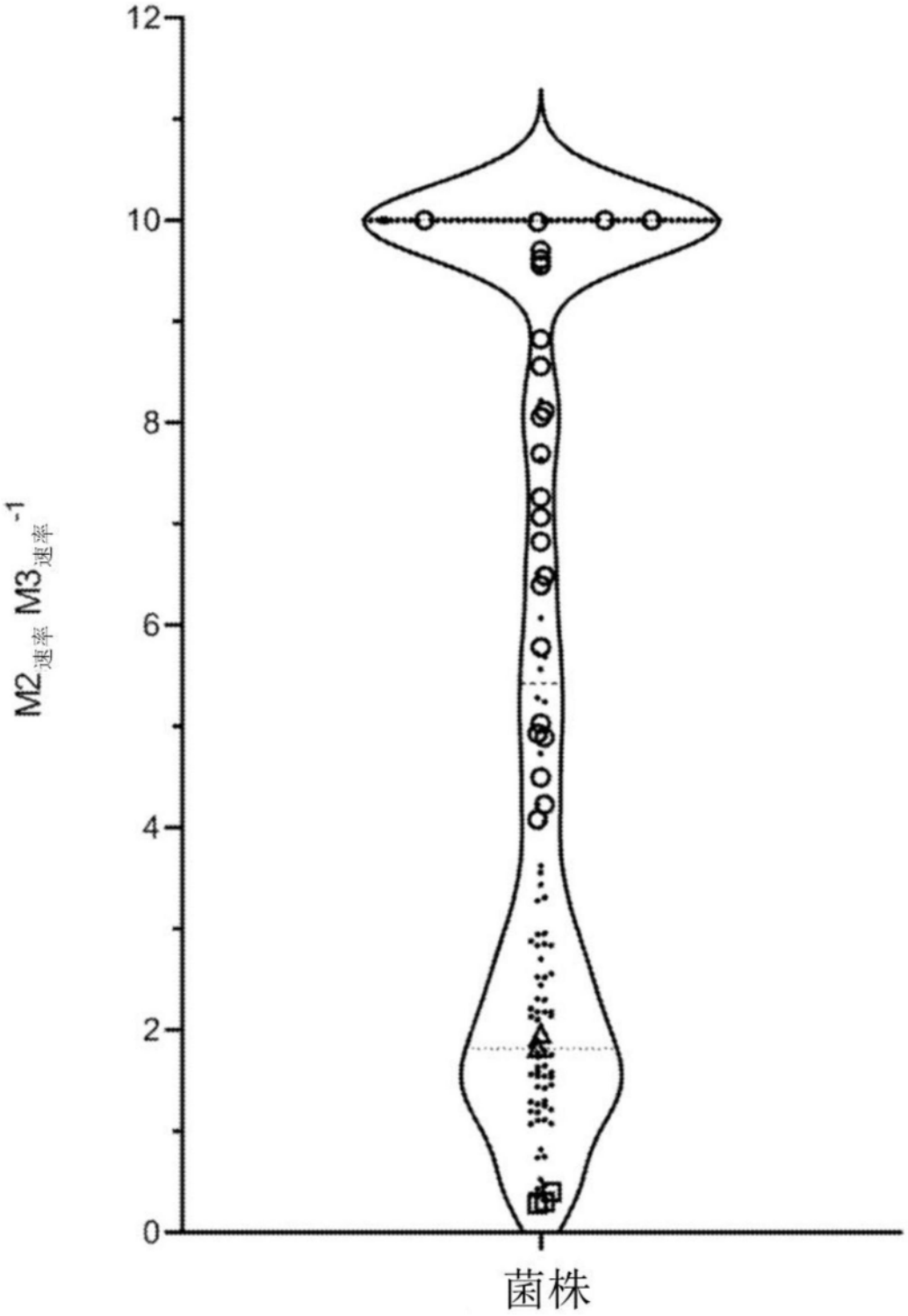


图2

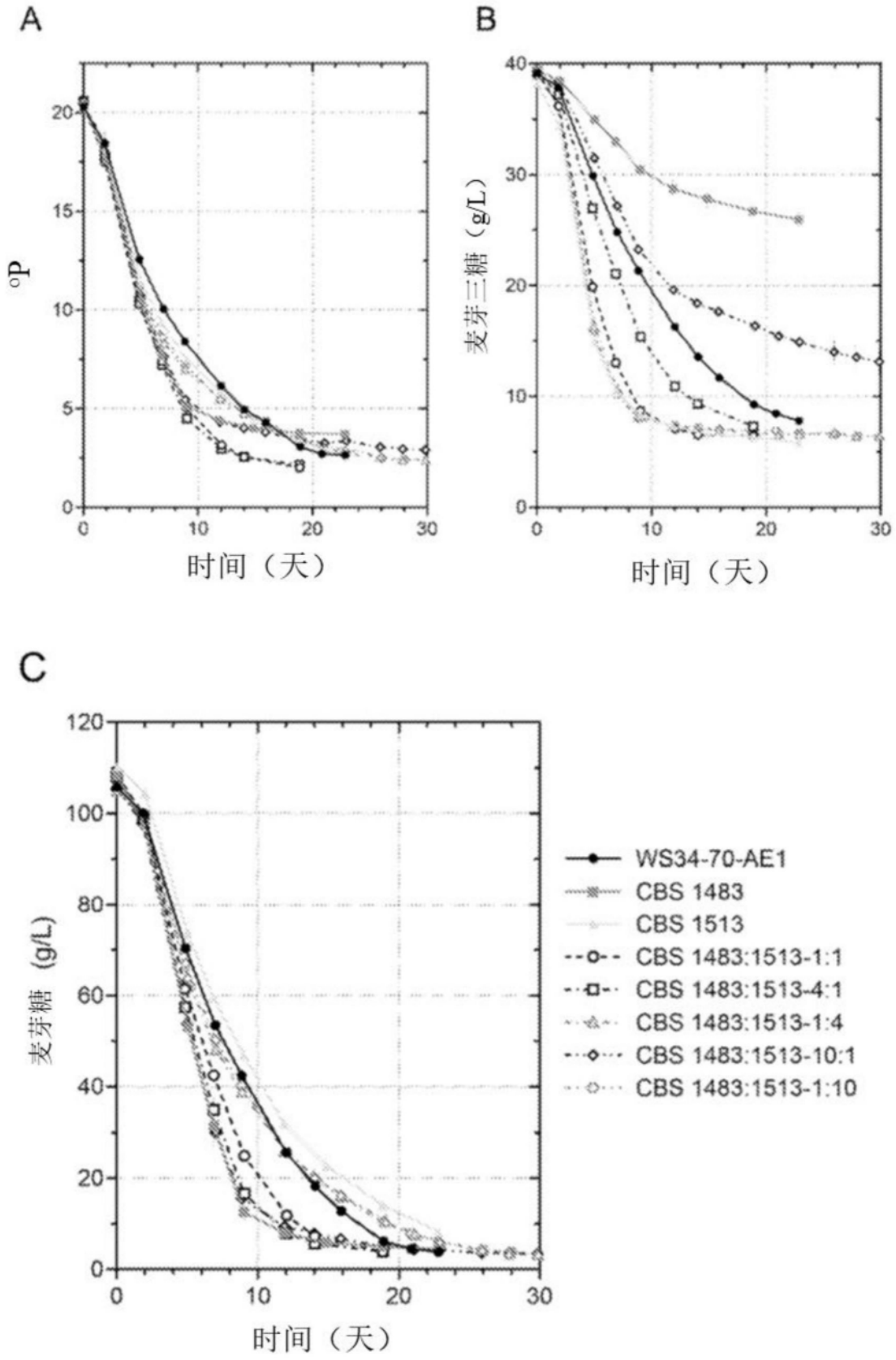
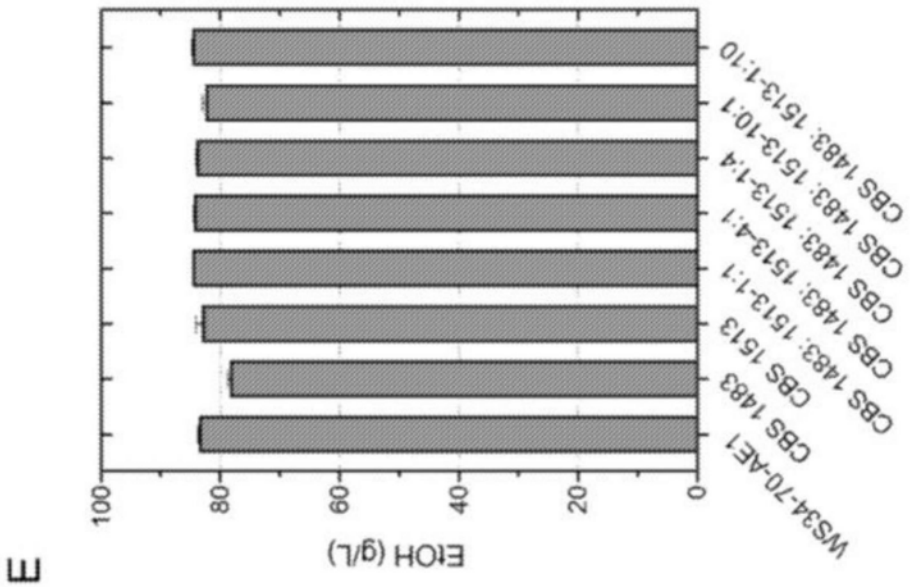

A
°P
时间（天）
B
麦芽三糖（g/L）
时间（天）
C
麦芽糖（g/L）
时间（天）
WS34-70-AE1
CBS 1483
CBS 1513
CBS 1483:1513-1:1
CBS 1483:1513-4:1
CBS 1483:1513-1:4
CBS 1483:1513-10:1
CBS 1483:1513-1:10

图3


E
EtOH (g/L)
0
20
40
60
80
100
WS34-70-AE1
CBS 1483
CBS 1513
CBS 1483:1513-1:1
CBS 1483:1513-4:1
CBS 1483:1513-1:4
CBS 1483:1513-10:1
CBS 1483:1513-1:10

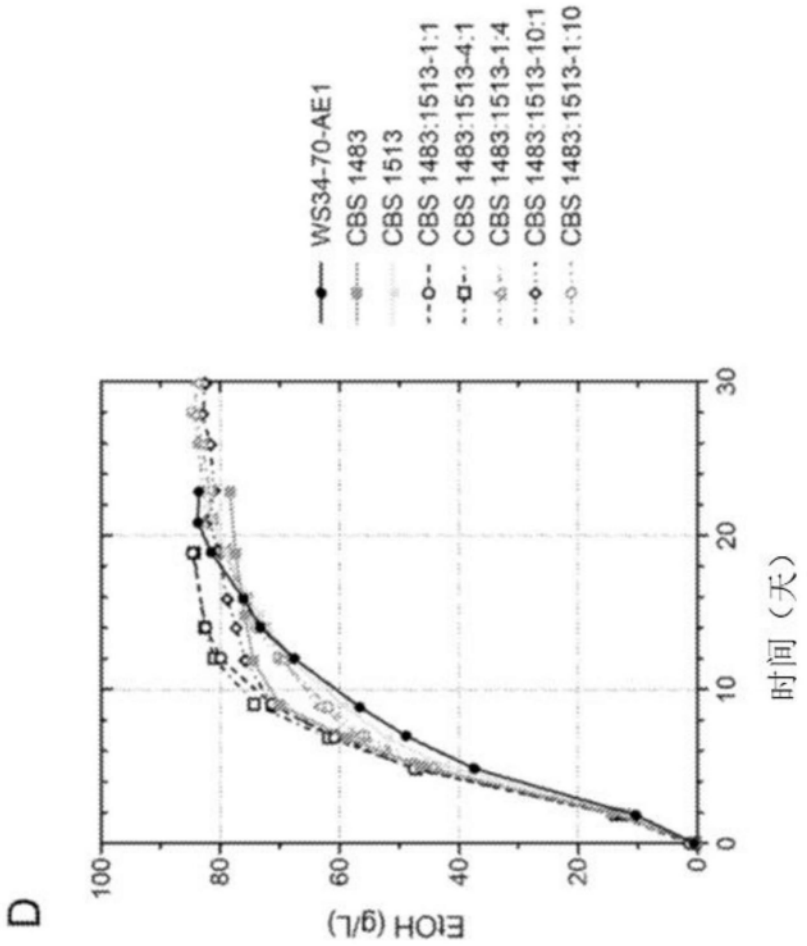

D
EtOH (g/L)
时间（天）
0
10
20
30
40
60
80
100
WS34-70-AE1
CBS 1483
CBS 1513
CBS 1483:1513-1:1
CBS 1483:1513-4:1
CBS 1483:1513-1:4
CBS 1483:1513-10:1
CBS 1483:1513-1:10

图3(续)

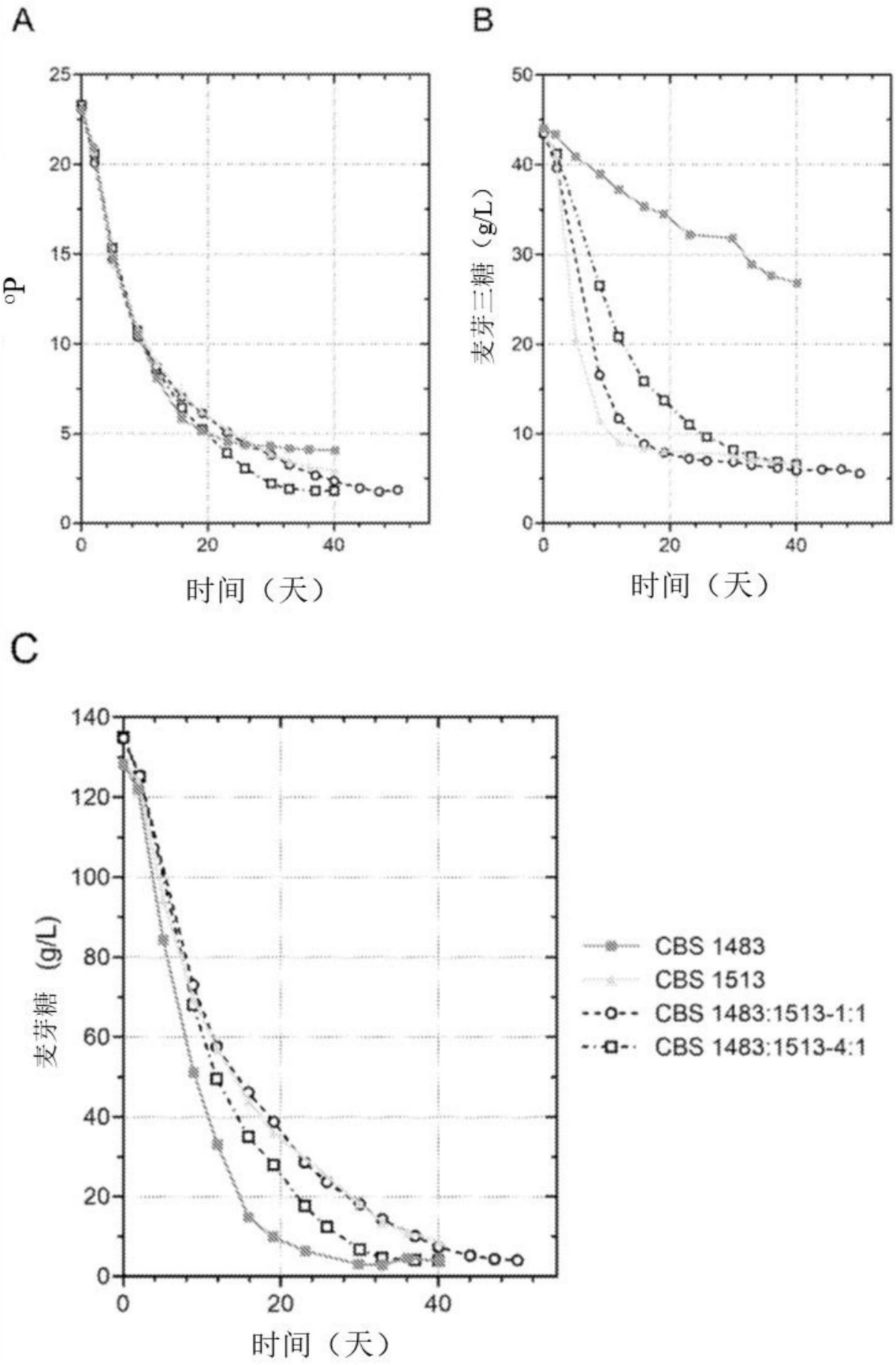

A
°P
时间（天）
B
麦芽三糖（g/L）
时间（天）
C
麦芽糖（g/L）
时间（天）
CBS 1483
CBS 1513
CBS 1483:1513-1:1
CBS 1483:1513-4:1

图4

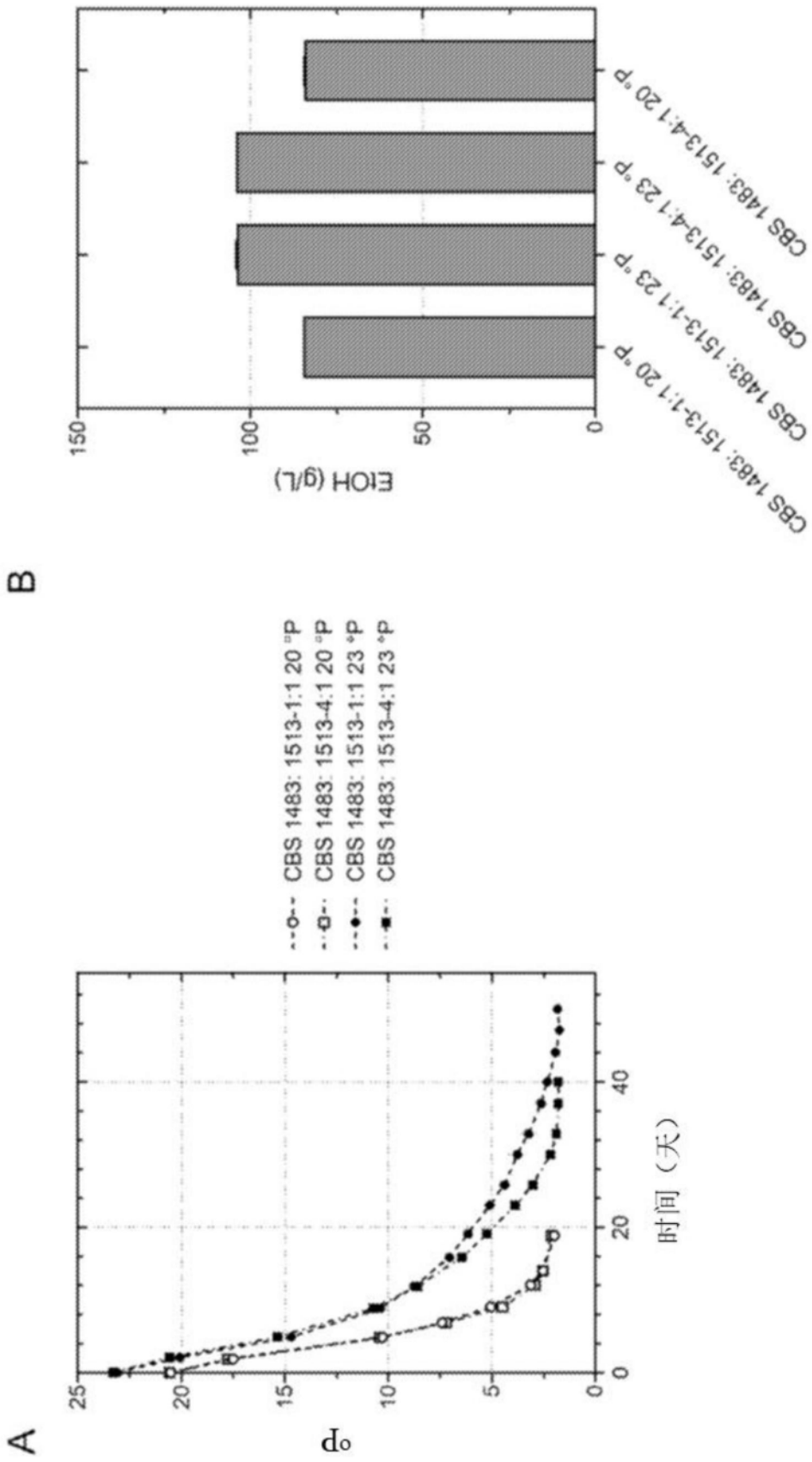

A
°P
时间（天）
CBS 1483: 1513-1:1 20 °P
CBS 1483: 1513-4:1 20 °P
CBS 1483: 1513-1:1 23 °P
CBS 1483: 1513-4:1 23 °P
B
EtOH (g/L)
CBS 1483: 1513-1:1 20 °P
CBS 1483: 1513-4:1 20 °P
CBS 1483: 1513-1:1 23 °P
CBS 1483: 1513-4:1 23 °P

图5

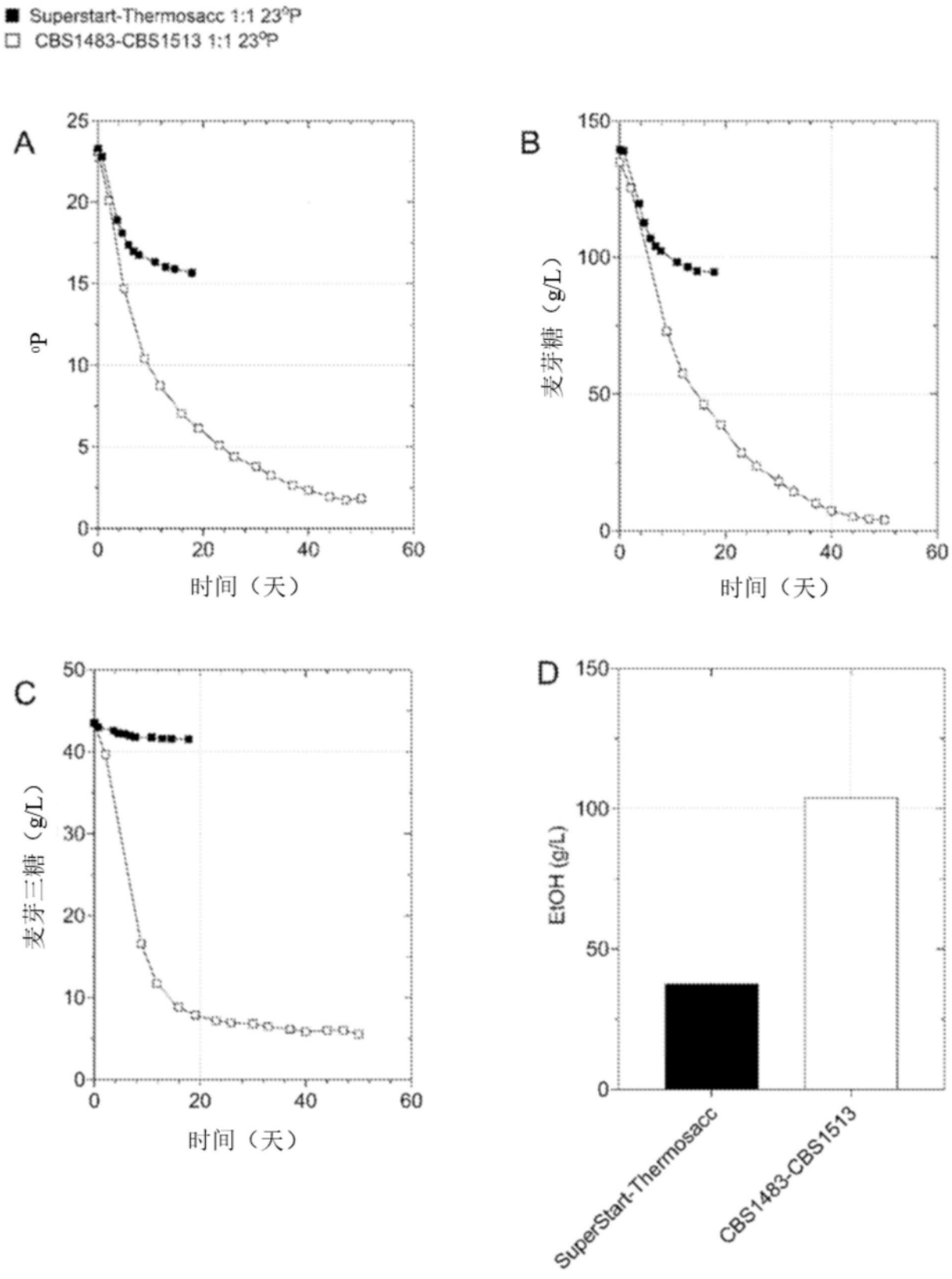

Superstart-Thermosacc 1:1 23°P
CBS1483-CBS1513 1:1 23°P
A
°P
时间（天）
B
麦芽糖（g/L）
时间（天）
C
麦芽三糖（g/L）
时间（天）
D
EtOH (g/L)
SuperStart-Thermosacc
CBS1483-CBS1513

图6

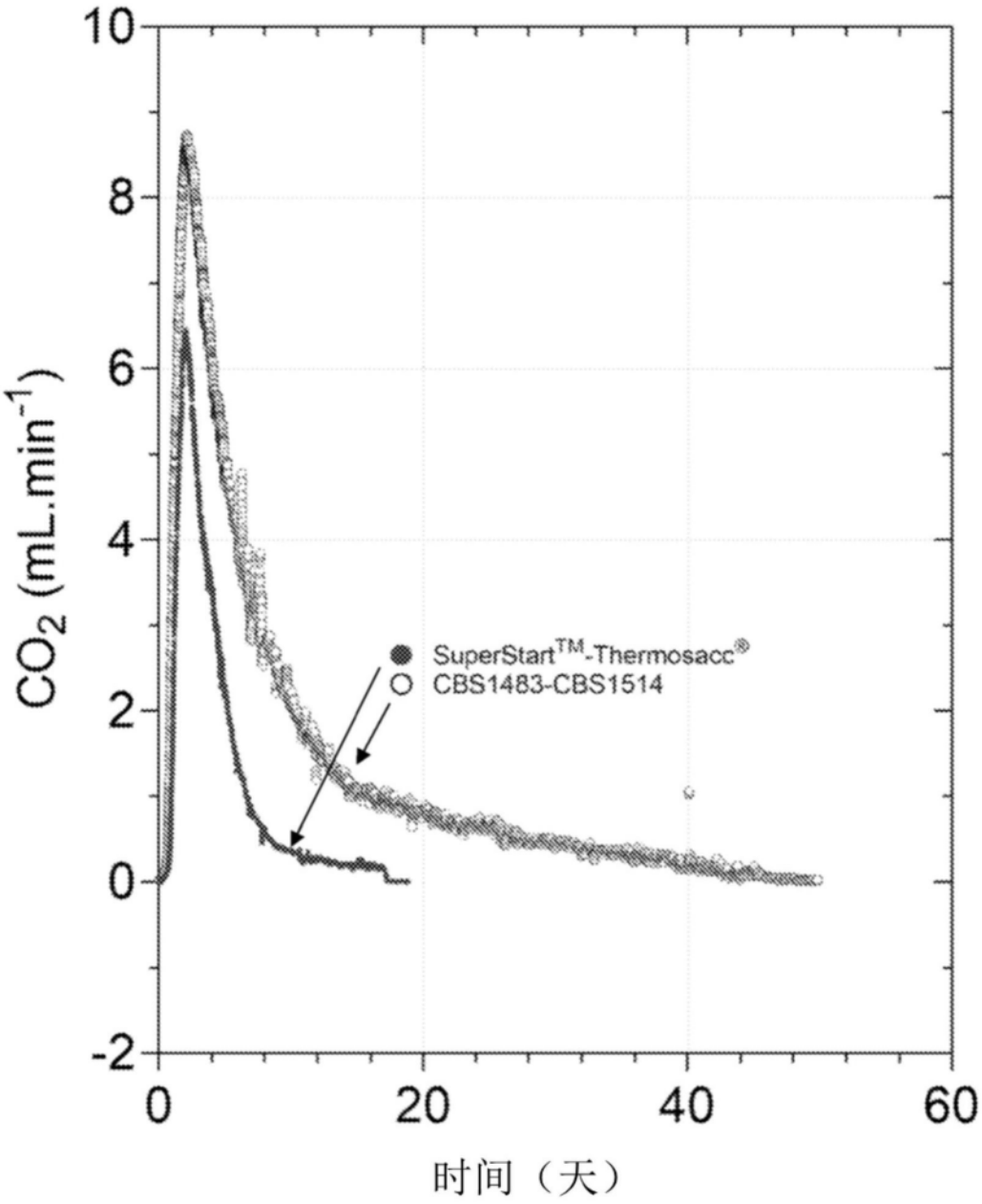

10
8
6
4
2
0
-2
0
20
40
60
CO_2 (mL.min^{-1})
时间（天）
SuperStart™-Thermosacc®
CBS1483-CBS1514

图7