

啤酒酿造用凝集性酵母融合育种的研究*

江慧修 张金玲 周 坚 戈 琳 王 丽 李景昆

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

用红霉素抗性突变和小菌落呼吸缺陷突变, 标记一株非凝集性啤酒酿造用酵母 *Saccharomyces carlsbergensis* B8 然后与凝集性酵母 *Saccharomyces carlsbergensis* A43 进行电诱导融合, 获得五株稳定的凝集性酵母融合株。其中, F6、F7 具有与亲株 A43 同等强的凝集特性, 同时还保留了另一亲株 B8 的发酵力强, 酿造风味好等生产性状。经测定细胞的 DNA 含量, 五株融合株分别属于二、三、四倍体。用 Octyl-sepharose CL-4B 疏水柱层析法测定细胞表面的疏水性表明, A43 和全部融合株的细胞表面疏水性能都比非凝集性亲株 B8 强, 并与细胞的凝集性能呈正相关。

关键词 凝集性; 啤酒酿造酵母; 融合; 育种

对于现时应用最为广泛的大容积锥形罐一罐法的啤酒酿造工艺而言, 理想的酵母菌株除了同传统工艺那样要求具有发酵力强、代谢产物的组成能赋予啤酒以良好的口味等性能以外, 突出的一点是对菌体凝集性能的要求更高, 即要求酵母细胞在发酵终了的特定环境下, 大部分细胞能靠细胞间自身相互的凝集作用从原先的悬浮状态下沉到大罐的底部, 以利于后面的工艺、酒的清亮度及口味。

酵母菌凝集性能的遗传控制背景十分复杂, 不仅受控于染色体上多个基因位点^[1-3], 并且也在一定程度上受线粒体 DNA 的影响^[6,7]。由于长期的人为培养使用等原因, 啤酒酵母又多已丧失生孢子的能力或成为孢子不育株^[8], 这也使得育种手段的选择范围受到一定的限制。基于这些原因, 原生质体融合技术被认为是对工业酵母育种非常有潜力的手段^[9]。电诱导原生质体融合在酵母中的成功运用^[10]则提供了更为简单易行和有效的方法。但是关于改进生产上应用的啤酒酿造酵母凝集性的成功报道尚未见到。

本研究针对啤酒生产用酵母的育种必须权衡多种性能的特点, 运用红霉素抗性和小菌落呼吸缺陷突变等标记手段, 将一株发酵力强、酿酒风味好的非凝集性酵母 *Saccharomyces carlsbergensis* B8 与强凝集性酵母 A43 融合, 获得了五株具有双亲本优势的稳定菌株。

材料与方 法

(一) 菌株

1. *Saccharomyces carlsbergensis* A43: 系本组保藏菌株, 强凝集性, 在 McClary^[11]等九种生孢培养基上均不生孢子。

本文于 1991 年 3 月 19 日收到。

* 本工作得到徐浩教授的关心和帮助, 并提供菌株 *S. Carlsbergensis* B8, 特此致谢。

2. *S. carlsbergensis* B8 啤酒生产菌株, 发酵力强, 非凝集性, 用本斯值法测定无明显分层, 在 McClary 等九种生孢培养基上都不生孢子。

(二) 培养基^[12]

1. YPD 完全培养基。
2. YPG 非发酵性碳源固体培养基。
3. YPDG 固体培养基。
4. YPGE 固体培养基: 临用前于 YPG 固体培养基中加入红霉素至 1.5—2.0mg/ml。
5. 用于原生质体再生的各种高渗培养基, HYPD, HYPG, HYPGE: 分别于 YPD, YPG 和 YPGE 培养基中加山梨醇至 0.8mol/L。

(三) 酵母发酵力测定

分别以菌体释放 CO₂ 的量或发酵液比重的减少^[13]来衡量。

CO₂ 释放量的测定参照方心芳的发酵栓法^[14]进行。于 50ml 三角瓶中装 25ml 12°BX 的麦芽汁, 0.7kg/cm² 灭菌 30 分钟, 接入 0.25ml 经在 28℃ 生理盐水中振荡、饥饿 2 小时的酵母液, 终浓度约为 9 × 10⁴ 个细胞/ml, 发酵栓中装浓度为 5mol/L 的硫酸以阻止水分蒸发。

(四) 酵母细胞凝集性能的测定

1. 微孔培养板单菌落凝集性粗测法: 用于筛出融合子中凝集性好的菌落。每个培养孔内加 50μl YPD 液体培养基, 从菌落上接入一针尖酵母, 置 28℃ 静置培养 16 小时后, 将酵母摇起, 再静置 2 分钟, 观察和记录有无凝集反应。每次用亲本作对照。

2. 悬液透光率测定法: 称取 200mg 经 16 小时摇床培养, 并经蒸馏水洗涤的菌体, 悬于 10ml pH 4.5 的 Helm^[15] 含钙离子的醋酸-醋酸钠缓冲液中 (装在 10ml 刻度离心管中), 放置 20 分钟, 上下摇动离心管 20 次, 再静置 2 分钟后从液面 4.5ml 处小心吸取悬液 4ml, 用于测定波长 600nm 处的透光率。

3. 本斯值法:^[16] 菌体按本斯试验处理, 记录静置 10 分钟时酵母沉淀的毫升数称为本斯值。沉淀量在 1.0ml 以上者为强凝集性, 在 0.5ml 以下的为弱凝集性。

(五) 细胞表面的疏水性测定

用疏水柱层析法^[17], 于 0.57 × 14.6cm 的微型玻璃柱中, 加 2cm 高的 Octyl-sepharose CL-4B, 用含 4mol/L NaCl 的 pH 7.0 磷酸缓冲液平衡后, 将 0.1ml 经上述缓冲液洗涤的对数期酵母菌 (浓度为 1 × 10⁸ 个细胞/ml) 上柱, 以不含 NaCl 的磷酸缓冲液洗柱三次, 合并洗脱液并测定其光密度 A₆₀₀(AI), 以同样方法测定经 Sepharose CL-4B 柱层析洗脱液的 A₆₀₀(AII) 作为对照。

疏水柱与细胞的结合率:

$$HP = \frac{AII - AI}{AII} \times 100\%$$

(六) 亲本标记株的获得^[18]

1. 红霉素抗性突变: 于 YPD 液体培养基中加 MnCl₂ 溶液至终浓度为 80μg/ml, 接种后于 28℃ 摇床 150r/min 培养三天, 菌液涂含红霉素 (1.5—2.0mg/ml) 的 YPGE 平

板,待菌落长出,再复测其对红霉素的抗性。

2.呼吸缺陷型 [ρ^-] 突变: 将菌体接入含不同浓度 (10—100 $\mu\text{g/ml}$) EB 的 YPD 培养基中,细胞终浓度为 1×10^7 个/ml, 28 $^{\circ}\text{C}$ 震荡培养 16 小时后涂 YPDG 平板,数日后将长出的小菌落挑出,用 YPG 平板复测。

(七) 电融合

用 Baekon 2000 型基因转移仪进行电激发原生质体融合。选用参数如下,电激时间: 0.1s; 脉冲数: 128; 脉冲幅度: 6 或 7; 循环次数: 2×50 ; 脉冲宽度: 62.5 μs 。

(八) 双乙酰含量测定

用邻苯二胺法^[19]。

(九) 细胞 DNA 含量

用 HClO₄ 提取,二苯胺比色法测定^[20-22]。

结果与讨论

(一) 亲本株遗传标记的建立

1. 红霉素抗性: 由于酿酒酵母系兼性好氧菌,在不具备进行呼吸生长的条件下,也可借无氧发酵进行生长。因此只在像 YPG 这些用甘油等非发酵性碳源作为唯一碳源的培养基中对红霉素等抗生素敏感。Wilkie^[23] 首先在酵母中发现线粒体和一些药物的抗性有关。现在知道酵母产生对红霉素等抗生素的抗性是由于改变了其线粒体核糖体上 21s rRNA 所致。^[24]

我们将 *S. carlsbergensis* B8 用 MnCl_2 处理,共获得六株红霉素抗性菌 (BE1—BE6)。经过在红霉素平板上复测,除 BE2 外,其余均稳定,现已传 20 多代。

2. 呼吸缺陷型: 1981 年 Spencer 等人^[25] 发现酿酒酵母经 MnCl_2 作用形成的抗氯霉素突变株,当再诱变成线粒体呼吸缺陷型 [ρ^-] 后,原来对氯霉素的抗性仍以隐蔽形式存在,当把此菌与一呼吸完全型酵母杂交或融合成呼吸完全型时,对氯霉素的抗性也同时得到恢复。即这些编码在线粒体 DNA 上的抗性突变片段在形成呼吸缺陷株时没有随之丧失。我们用不同浓度的 E. B. 处理 BE1 和 BE5, 得到了各自的呼吸缺陷株 [$\rho^- \text{Ery}^r$], 其突变频率如表 1 所示。

表 1 呼吸缺陷型突变

Table 1 E. B. induced respiratory deficient mutation

菌株 Strain	E. B 浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	突变频率 Mutation frequency
BE1	10	7.4×10^{-3}
	20	3.68×10^{-2}
	100	9.73×10^{-1}
BE5	10	1.18×10^{-2}
	20	8.85×10^{-2}
	100	9.53×10^{-1}

(二) 红霉素抗性呼吸缺陷株的凝集和发酵性能

任意取 6—7 株红霉素抗性呼吸缺陷株进行测定, 其中 BEM1103 和 BEM1106 均

系 BE1 的突变株,其余为 BE5 的突变株。

1. 凝集性: 用本斯值法测定,所有呼吸缺陷株及其亲株 B8、BE1、BE5 均无分层,属于非凝集性株。用悬液透光率法测,可以看出它们的沉降程度是有差别的(表 2),即突变为呼吸缺陷株后更加难以沉降。而原始菌株经 $MnCl_2$ 处理突变为抗性株后沉降情况无明显改变。

表 2 菌株的凝集性比较

Table 2 Flocculence comparison of different strains

菌株 Strain	上部悬液透光率(%) Transmittancy of supernatant (T = 600)
B8	7.2
BE1	7.9
BE5	8.3
BEM1103	0.8
BEM1106	0
BEM5101	0
BEM5102	1.2
BEM5105	1.2
BEM5106	1.2
BEM513	1.6

2. 发酵力: 用发酵栓法测定,结果见表 3。

表 3 CO_2 释 放 量Table 3 Weight loss by CO_2 (mg) discharge

天数 (d)	CO_2 (mg)									
	BE1	1102	1103	1106	BE5	513	5101	5102	5105	5106
1	7	4	5	5	6	4	5	5	6	4
2	12	6	8	6	7	8	6	4	8	3
3	22	10	9	11	20	8	8	9	10	10
4	205	59	65	62	189	49	46	63	68	66
5	218	82	91	80	206	68	67	92	99	96
6	307	157	179	159	296	128	176	175	179	185
7	199	158	165	152	202	145	177	157	156	163
8	80	155	157	156	89	150	173	154	158	156
9	24	136	132	138	24	141	146	139	132	130
10	13	130	130	128	10	118	131	115	106	117
11	13	105	99	108	9	107	97	101	78	77
总计 Total	1100	1002	1040	1005	1058	926	1032	1014	1000	1007

呼吸缺陷株的发酵力明显下降,达到发酵高峰期的时间比突变前的抗性株迟两天。分别算出 1102 等 (RDS1) 和 513 等 (RDS5) 两组呼吸缺陷株的 CO_2 释放量的平均值和标准偏差与各自的亲株相比较,如图 1 和 2 所示,可更清楚地看出这两组酵母与其原株的差别。

表4 电融合结果

Table 4 The results obtained by electrofusion

实验批次 Exp. No.	脉冲幅度 Pulse amplitude	抗性融合子数 Number of fusant	抗性融合频率 Fusion frequency	微孔板测定凝集 阳性菌落数 Number of flocculence colony
I	6	27	1.35×10^{-6}	4
II	6	33	1.65×10^{-7}	5
III	7	21	1.05×10^{-6}	2
IV	6	18	0.9×10^{-6}	4

表5 亲株与融合株的凝集性比较

Table 5 Flocculence comparison between parent strains and their fusants

菌株 Strain	悬液透光率 Transmittancy of supernatant (T = 600)		本斯值 Burus value (ml)
	(%)	$\bar{x} \pm SD$	
A43	35.1 33.2 38.9	35.7 ± 2.9	2.6
BEM513	1.5 0 0	0.5 ± 0.87	不形成絮片 无明显分界 因而测不出 Non-flocculence
BE5	4.1 3.6 2.9	3.5 ± 0.60	测不出 Non-flocculence
B8	2.5 1.8 0	1.4 ± 1.3	测不出 Non-flocculence
F1-1	14.0 18.6 15.1	15.9 ± 2.4	2.1
F1-2	11.8 13.6 19.5	15.0 ± 4.0	2.4
F1-3	27.9 21.3 28.5	25.9 ± 3.9	2.9
F4	32.5 34.1 37.1	32.8 ± 1.5	2.7
F6	32.9 35.2 31.0	33.0 ± 2.1	2.5
F7	36.8 38.1	37.5 ± 0.7	2.6
F8	21.3 29.8 20.0	23.7 ± 5.3	2.9

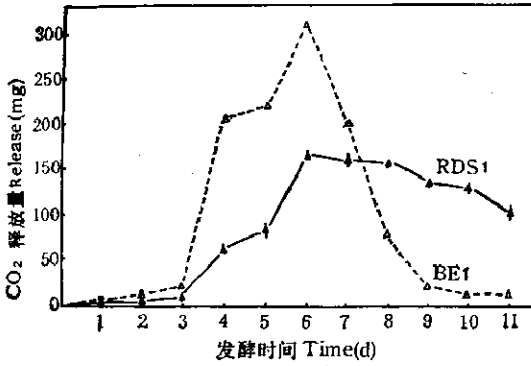


图1 BE1 及其呼吸缺陷株 1102 等 (RDS1) 的 CO₂ 释放曲线

Fig. 1 CO₂ release curve of BE1 and its respiratory deficient strains (RDS1)

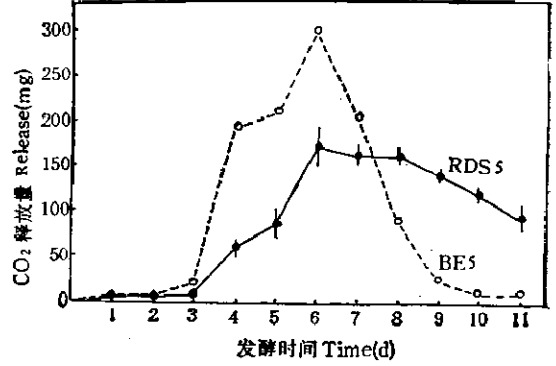


图2 BE5 及其呼吸缺陷株 513 等 (RDS5) 的 CO₂ 释放曲线

Fig. 2 CO₂ release curve of BE5 and its respiratory deficient strains (RDS5)

3. 原生质体电融合：根据预实验的结果，两个亲本株对蜗牛酶的敏感程度差别很大，因此分别用 1% 和 3% 的蜗牛酶液处理 A43 和 BEM513，以制备原生质体。融合时反应器内加浓度约为 5×10^7 个/ml 的原生质体液 400 μ l，融合完毕涂 HYPGE (含红霉素 1.5mg/ml) 平皿，结果见表 4。

将经过微孔培养板测定得到的 15 株凝集性阳性菌用透光率法比较筛选，有 7 株凝集性比亲株 BEM513 和原始株 B8 有显著增强，经过多次传代性状稳定。

(三) 融合株的主要性能及其与亲株的比较

1. 凝集性：表 5 列出融合株经过约 20 代传代以后，与亲株相比较的结果。用本斯值法测定，七株融合株都在 2ml 以上，均属于强凝集株。用测定透光率的方法，则可进一步将其划分为三档，即透光率分别在 15%、25% 和 35% 左右，其中 F4、F6 和 F7 与亲株 A43 接近。

表 6 发酵柱法测定 CO₂ 释放量 (mg)

Table 6 Weight loss in fermentation hung by CO₂ discharge

菌株 Strain	CO ₂ (mg)	天数 Time (d)							总计 Total
		1	2	3	4	5	6	7	
A43	6	36	265	397	277	163	21	1162	
BEM513	4	29	210	384	292	195	41	1155	
B8	6	62	449	428	219	86	18	1268	
BE5	6	52	454	427	224	79	29	1271	
F1-1	6	65	493	425	134	43	24	1190	
F1-2	7	43	413	410	222	78	30	1203	
F1-3	5	53	430	458	162	39	22	1169	
F4	7	119	464	429	119	41	26	1200	
F6	5	81	444	370	245	109	27	1281	
F7	8	93	467	429	232	82	30	1341	
F8	7	67	513	448	155	56	34	1280	

表 7 细胞疏水性柱层析

Table 7 Hydrophobic interaction chromatography of yeast cells

菌株 Strain	All (A ₆₀₀)	AI (A ₆₀₀)	$\frac{All-AI}{All} \times 100\%$
F6	0.285	0.04	85.96%
F4	0.290	0.04	86.20%
F1-2	0.331	0.210	36.50%
F1-1	0.342	0.215	37.13%
F1-3	0.262	0.146	44.27%
F7	0.276	0.035	87.32%
F8	0.271	0.135	50.18%
B8	0.283	0.215	24.03%
A43	0.111	0.005	95.5%

AI:疏水柱洗脱液的吸光率

AI: Absorbance at 600 nm of eluate from Octyl-sepharose CL-4B Column.

All:对照柱吸光率

All: A₆₀₀ of eluate from sepharose CL-4B column, as control.

表 8 细胞 DNA 含量

Table 8 DNA content in cell

菌株 Strain	DNA ($\mu\text{g}/10^4$ cells)	$\bar{x} \pm \text{SD}$	\bar{x} 2.08	倍性 Ploidy
单倍体对照株 Control Haploid DX	2.12	2.08 \pm 0.21	1.0	n
	1.85			
	2.27			
B8	4.54	4.24 \pm 0.37	2.04	2n
	3.82			
	4.36			
BEM513	4.46	4.09 \pm 0.59	1.97	2n
	3.41			
	4.40			
A43	6.98	6.75 \pm 0.51	3.25	3n
	7.10			
	6.17			
F6	5.1	4.76 \pm 0.43	2.29	2n
	4.28			
	4.9			
F4	8.06	7.50 \pm 0.68	3.61	4n
	7.70			
	6.64			
F8	5.95	5.27 \pm 0.72	2.53	3n
	5.35			
	4.51			
F7	7.75	7.36 \pm 0.60	3.54	4n
	7.66			
	6.67			
F1-1	8.62	8.11 \pm 0.45	3.90	4n
	7.78			
	7.97			

2. 发酵力: 用发酵栓法测定在 20℃ 时对 12°BX 麦芽汁的发酵速度见表 6。融合子的发酵力比其亲株都高, 一般介于原始株 B8 和 A43 之间, 其中 F6、F7 和 F8 高于 B8。

3. 细胞表面的疏水性能: 将酵母菌体通过疏水柱层析, 比较它们在疏水柱上的被吸附率, 即以普通琼脂糖凝胶 Sepharose CL-4B 柱为对照, 计算被疏水胶 Octyl-sepharose CL-4B 柱吸附的百分比(表 7)。

全部融合株的细胞表面疏水性都比 B8 强, 且介于两亲株之间, 其中 F4、F6、F7 三株近似于 A43。

4. 细胞 DNA 含量: 共测定三批, 以每个细胞含 DNA 的微克数表示(表 8)。

五株融合株的 DNA 含量都不是两个亲株 DNA 之和, 而且分别是 2n、3n 和 4n, 可能是部分 DNA 片段的插入所致。

5. 稳定性测定: 为了进一步证明菌株的稳定性, 我们将每株酵母接入 12°BX 麦芽汁液体培养基, 于 28℃ 培养 16 小时后, 稀释涂 YPD 平板, 待菌落长出, 任意挑取 50 个菌落做微孔板菌落凝集性测定, 结果见表 9。

表 9 融合子稳定性测定

Table 9 Flocculence stability test of fusants

菌株 Strain	凝集性阳性菌落数 Number of flocculence colony
F1-1	49
F4	50
F6	48
F7	50
F8	49

从单菌落的凝集性看, 这五株菌的阳性率分别为 94%—100%, 说明是稳定的。

6. 2L 柱发酵试验: 为进一步证明所选育酵母的发酵性能和测试其还原双乙酰的能力, 用 6×100cm 的玻璃柱进行了扩大发酵试验。柱内装 1.5L 12°BX 麦芽汁, 酵母接种量 1%, 于 10℃ 发酵, 每天定时取样测定比重, 当外观发酵度达到 68% 左右时, 将发酵液装

表 10 2L 柱发酵结果

Table 10 Fermentation in two liter vessel

菌株 Strain	发酵液中浸出物含量 Extract content in fermented broth (% w/w)				10℃ 加盖保温 6 天后 Bottle capped incubated at 10℃ for 6 days	
	Time (d)				浸出物含量 Extract content (% w/w)	双乙酰 Diacetyl (ppm)
	1	2	3	3.5		
A43	11.315	9.194	5.455	3.321	1.846	0.29
B8	10.138	7.828	3.245		1.385	0.23
F4	10.307	8.073	3.624		1.411	0.27
F6	10.210	8.171	3.800		1.385	0.22
F7	10.162	7.926	3.295		1.360	0.24
F8	10.283	8.830	4.077		1.462	0.29

入啤酒瓶中,加盖于 12℃ 保温一周,然后测定比重和双乙酰,结果如表 10。

这四株融合株不仅凝集性好,在扩大发酵中,发酵力也很强。特别是 F6 和 F7,发酵力和双乙酰还原能力均与 B8 相当,具备了两个亲本株的优势。其中, F6 株的这些性能已在生产规模的啤酒酿造中得到了验证。^[28]

上述结果表明,诱发线粒体 DNA 突变标记亲株,进行原生质体融合是一条有效可行的工业酵母育种途径。

参 考 文 献

- [1] Stewart, G. G. et al.: *Can. J. Microbiol.*, 23: 441—447, 1977.
- [2] Lewis, C. W. et al.: *J. Inst. Brew.*, 83: 158—160, 1976.
- [3] Holgsn, J. A. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 131: 3219—3227, 1985.
- [4] Yamashita, I. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 47: 2889—2896, 1983.
- [5] Lipke, D. M. et al.: *J. Bacteriol.*, 159: 797—799, 1984.
- [6] Holmberg, S. et al.: *Carlsberg. Res. Commun.*, 43: 37—47, 1978.
- [7] Esser, K. et al.: *Flocculation in Biotechnology and separation systems* (ed. Attia, Y. A.) p. 383—398. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, 1987.
- [8] Stewart, G. G.: *Can. J. Microbiol.*, 27: 973, 1981.
- [9] Spencer D. M. et al.: *Yeast Technology* (ed. Spencer J. F. T., D. M. spencer) p. 348—365, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, 1990.
- [10] Halfmann, H. J. et al.: *Arch. Microbiol.*, 134: 1—4, 1983.
- [11] McClary, D. O. et al.: *J. Bacteriol.*, 73: 362, 1959.
- [12] Sherman, F. et al.: *Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics*, P. 163, Cold Spring Harbor Laboratory, 1986.
- [13] 管敦仪等: 啤酒工业手册(中),第213—215页,轻工业出版社,北京,1982年。
- [14] 方心芳等: 应用微生物实验法,第72—74页,中国财政经济出版社,北京,1962年。
- [15] Helm, E. et al.: *Wallerstein laboratory Communications*, 16: 315, 1953.
- [16] 管敦仪等: 啤酒工业手册(上),第439页,轻工业出版社,北京,1982年。
- [17] Jiang, H. X. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 129: 3075—3084, 1983.
- [18] Sherman, F. et al.: *Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics*, P. 75—85, Cold Spring Harbor Laboratory, 1986.
- [19] 管敦仪等: 啤酒工业手册(中),第234—236页,轻工业出版社,北京,1982年。
- [20] Ogur, M.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 49: 178—184, 1952.
- [21] Stewart, P. R. *Methods in Cell Biology*, 12: 121—123, (ed. prescott D. M.) Academic Press, New York, 1975.
- [22] 吴鹤龄等主编: 遗传学实验方法和技术,第68—70页,高等教育出版社,北京,1983年。
- [23] Wilkie, D. et al.: *Gener. Res.*, 10: 199—203, 1967.
- [24] Cui Z et al.: *Currens Genetics*, 16: 273—279, 1989.
- [25] Spencer J. F. T. et al.: *ibid.*, 4: 177—180, 1981.
- [26] 江慧修等: 微生物学通报,19(1): 21—23,1992。

STUDIES ON THE FUSION BREEDING OF FLOCCULENT YEASTS FOR BEER MANUFACTURING

Jiang Huixiu Zhang jinling Zhou jian Ge lin Wang li Li jingkun

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Five flocculent brewery yeast fusants were obtained by protoplast fusion method. The fusants were obtained from a strain of *Saccharomyces carlsbergensis* A43 and a respiratory deficient petites of *S. carlsbergensis* B8 with erythromycin-resistant property. The later is a Burns Value Test negative non-flocculent brewing yeast. The fusants F6, F7 acquired the flocculent capacity as its parent A43 and retaining the industrial fermentative merit of another parent strain B8.

The cell DNA content determination of the fusants showed their ploidies are $2n$, $3n$ and $4n$ respectively. The cell surface hydrophobicity has been determined by Octyl-sepharose CL-4B hydrophobic interaction chromatography. The results showed A43 and all of the fusants as well displayed stronger hydrophobic property than their parent strain B8. And the cell hydrophobicity is in accordance with their flocculence intensity.

Key words Flocculence; *Saccharomyces carlsbergensis* and *Saccharomyce cerevisiae*; Fusion; Breeding