

渗透压对酿酒酵母胞内代谢关键酶活性的影响

汤佳鑫, 王继花, 俞志敏, 赵长新

(辽宁省发酵工程重点实验室, 大连工业大学生物与食品工程学院, 辽宁 大连 116034)

摘要: 对耐高渗酵母与普通酿酒酵母在丙酮酸激酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶、异柠檬酸脱氢酶、乙醇脱氢酶的酶活性特征的差异进行比较分析, 建立酶活力测定方法。发现耐高渗酵母在高渗环境的诱导下, 其 EMP 途径、磷酸戊糖途径的关键酶活力都高于普通酿酒酵母。耐高渗酵母具有高活力的乙醇脱氢酶, 其能高效地将丙酮酸转化成乙醇。并且三羧酸循环中的关键酶异柠檬酸脱氢酶和苹果酸脱氢酶的活性也得到加强。这些酶活力的增强维持了耐高渗酵母在高渗、高酒精环境下的生长需要与能量代谢的平衡。

关键词: 酿酒酵母; 丙酮酸激酶 PYK; 6-磷酸葡萄糖脱氢酶 G6PDH; 异柠檬酸脱氢酶 ICDH; 乙醇脱氢酶 YADH

中图分类号: TS261.1; Q55; TQ920

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286(2008)05-0045-05

Effects of Hyperosmosis on the Activities of Key Metabolic Enzymes in *Saccharomyces Cerevisiae*

TANG Jia-xin, WANG Ji-hua, YU Zhi-min and ZHAO Chang-xin

(Liaoning Provincial Key Lab of Fermentation Engineering, Bio & Food Engineering College of Dalian Polytechnic University, Dalian, Liaoning 116034, China)

Abstract: The enzyme activities of some key metabolic enzymes (pyruvate kinase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, isocitrate dehydrogenase and ethanol dehydrogenase) in *Saccharomyces cerevisiae* FCC2146 (osmophilic yeast) were compared with those in *Saccharomyces cerevisiae* FCC2144 (common yeast) and the relative enzyme activity measurement methods were established. The results indicated that pyruvate kinase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, ethanol dehydrogenase, malate dehydrogenase and isocitrate dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae* FCC2146 had higher activities than those in *Saccharomyces cerevisiae* FCC2144. That's why the osmophilic yeast under hypertonic and high-alcohol conditions could maintain the balance between energy metabolism and growth needs.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*; pyruvate kinase; glucose-6-phosphate dehydrogenase; isocitrate dehydrogenase; ethanol dehydrogenase

浓醪发酵是利用耐高渗酵母在较高的底物浓度条件下进行的发酵。高浓度发酵具有许多优点, 例如: 提高设备利用率; 提高单位时间产品的产出量; 减少热能和用水的消耗; 降低生产成本^[1]。随着酒精发酵工业的发展, 浓醪发酵技术获得普遍的成功和认可。浓醪发酵可以使企业获得更大的生产效率, 提高生产能力, 同时可以相应地降低生产成本。但是浓醪发酵也会带来一些问题, 比如由于渗透压的提高会影响酵母的生长和繁殖, 这就要求菌株具有好的耐高渗性能。另一方面, 由于浓醪发酵所得到的酒精浓度较高, 酵母菌的发酵也会受到影响。以往的研究表明, 乙醇浓度超过 8% 就会对酵母产生抑制作用^[2]。所以, 有必要对酵母在高渗透压和高酒精度的环境下的生物应答进行深入的研究。目前, 对于酵母耐高渗及耐酒精机理的研究主要集中在酵母细胞膜中脂肪酸、磷脂、海藻糖、甘油等的含量对细胞耐高渗

及耐酒精性能的影响上。但实际上, 酵母细胞是一个有生命的整体, 酵母细胞不但能察觉营养物的存在与否, 还能根据外界营养物的变化来调节自身的各种酶的表达水平和活性, 从而使细胞呈现不同的代谢模式。葡萄糖作为酵母细胞最重要的碳源物质, 同时也是重要的初期信号分子, 它的浓度的变化必然诱导细胞对胞内主要代谢途径的酶活力水平作出一系列的调节。本实验从酵母细胞代谢关键酶的活性入手, 研究耐高渗酵母与普通酿酒酵母在代谢途径关键酶活性方面的差异, 从而为探寻酵母耐高渗的内在原因提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌种

酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*): FCC2144 和 FCC2146, FCC2146 为耐高渗菌株。由大连工业大学食

收稿日期: 2008-01-25

作者简介 汤佳鑫 (1982-), 男, 河北唐山人, 发酵工程硕士。

品发酵菌种保藏所提供。

1.2 培养基

YEPD 培养基: 葡萄糖 2 %, 蛋白胨 2 %, 酵母膏 2 %, pH 5.6。

低糖度发酵培养基: 葡萄糖 2 %, 蛋白胨 1 %, 酵母膏 1 %, pH 5.6。

高渗发酵培养基: 葡萄糖 45 %, 蛋白胨 1 %, 酵母膏 1 %, pH 5.6。

1.3 发酵试验

种子液: 2 株酵母菌种经复壮后, 分别挑取 1 菌环置于含有 50 mL YEPD 液体培养基的 250 mL 锥形瓶中, 于 30 °C、120 r/min 下振荡培养 12 h, 制备处于对数生长期的细胞悬浊液。

发酵液: 按 1 % (体积分数) 的接种量接种于上述低糖度发酵培养基和高渗发酵培养基中, 30 °C、120 r/min 下在往复式振荡摇床培养。定时无菌操作移取发酵液用于分析。

1.4 检测方法

细胞干重的测定: 称出的干燥 1.5 mL Eppendorf 空管重量, 取 1 mL 发酵液于管中, 10000 r/min 离心 10 min, 去上清液, 洗涤 2 次后于 80 °C 烘干至恒重, 用电子天平称重, 计算得出毫升发酵液中的细胞干重。

葡萄糖浓度的测定: 3, 5- 二硝基水杨酸法。

乙醇含量的测定: 气相色谱法 (GC122 上海分析仪器厂)。

1.5 细胞的收获

取 40 mL 发酵液, 4000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 加入 20 mL 100 mM Tris- HCl pH7.0 缓冲液洗涤 2 次, 洗涤后的细胞直接进行酶蛋白提取及活性检测。

1.6 酶蛋白提取

将收集到的酵母细胞悬浮在 10 mL 缓冲液 (100 mM Tris- HCl, pH7.0, 1 mM DTT, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA) 中; 冰浴条件下超声破碎细胞 (工作 1 s, 间歇 2 s, 全程时间 10 min, 功率 80 W); 4 °C 10000 r/min 离心 5 min, 取上清液即为酶蛋白溶液, 置于冰上待测各酶活性。

1.7 酶蛋白定量

以牛血清白蛋白 (BSA) 作标准, Bradford 法测定^[3]。

1.8 酶活性检测

酶活性检测在可控温度的紫外分光光度计上进行, 测量 340 nm 下 NADH 或 NADPH 的浓度的变化。所有测量都是在 25 °C 条件下进行的。反应所需混合物加入 1 cm 光程的石英比色皿中, 最后加入 50 μ L 细胞抽提液, 使反应总体积为 1 mL, 并启动反应。记录吸光度值

随时间的变化。每个样品平行测定 3 次。具体测定条件如下:

丙酮酸激酶: 通过检测 NADH 在 340 nm 时的氧化速度来测定。酶活力单位定义为每分钟催化 1 μ mol NADH 氧化所需要的酶量^[4]。

葡萄糖- 6- 磷酸脱氢酶: 于 340 nm 处检测 NAD⁺ 的还原速度。酶活力单位定义为每分钟催化 1 μ mol NAD⁺ 还原需要的酶量^[5]。

苹果酸脱氢酶: 于 340 nm 处检测 NADP⁺ 的还原速度。酶活力单位定义为每分钟催化 1 μ mol NADP⁺ 还原需要的酶量^[6]。

异柠檬酸脱氢酶: 于 340 nm 处检测 NAD⁺ 的还原速度。酶活力单位定义为每分钟催化 1 μ mol NAD⁺ 还原需要的酶量^[7]。

乙醇脱氢酶: 于 340 nm 处检测 NAD⁺ 的还原速度。酶活力单位定义为每分钟催化 1 μ mol NAD⁺ 还原需要的酶量^[8]。

1.9 酶比活力计算

经酶活力测定获得样品中各种酶的活力值, 再根据 Bradford 法测定的蛋白质含量计算酶比活力。

2 结果与分析

2.1 不同发酵环境下酵母生长曲线的变化

将新鲜种子液接入发酵培养基中, 发酵不同时间, 定时取样分析, 菌体生长、底物消耗及乙醇的积累结果见图 1、图 2。

从图 1 中可看出, 在葡萄糖含量为 2 % 的 YEPD 培养基中, 2 种酵母都可以迅速地进入对数生长期 (5~12 h), 此时葡萄糖被迅速地消耗, 菌体浓度迅速提高的同时主要积累了乙醇等代谢产物。在发酵后期, 即便是在葡萄糖含量为 2 % 的 YEPD 培养基中, FCC2146 发酵葡萄糖生产酒精的速率要比 FCC2144 的快, 在成熟发酵液中 FCC2146 产生的酒精的含量比 FCC2144 高 1 g/L。

从图 2 可以看出, 在葡萄糖含量为 45 % 的高渗培养基中, 2 种酵母都产生了 8 h 的延滞期, 延滞期过后 FCC2146 开始快速增殖, 而 FCC2144 的初始生长速度较慢, 经 48 h 的生长, FCC2146 的菌体浓度达 13.6 g/L, 而 FCC2144 的菌体浓度仅为 10.6 g/L。直到 96 h, 两者的菌体浓度都保持基本稳定。可以看出, 在高浓度的葡萄糖培养基中, 2 种酵母发酵生产乙醇的差异。FCC2146 比 FCC2144 发酵葡萄糖生产乙醇的速度要快。在成熟发酵液中, 由 FCC2146 产生的乙醇浓度为 110.4 g/L, 而 FCC2144 产生的乙醇浓度为 95.2 g/L。耐高渗酵母产生了更高浓度的乙醇。

2.2 糖酵解和磷酸戊糖途径中关键酶活性变化

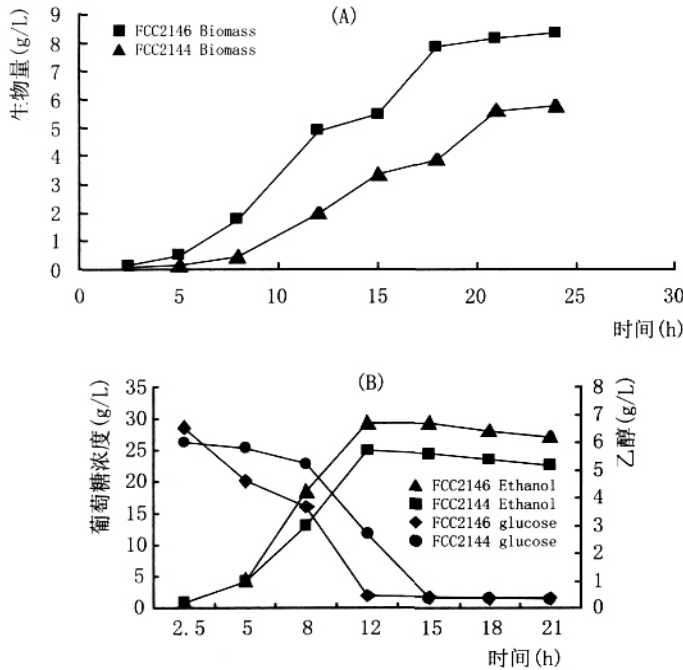


图1 低糖度发酵培养基中菌体生长、底物消耗及乙醇的积累与消耗曲线

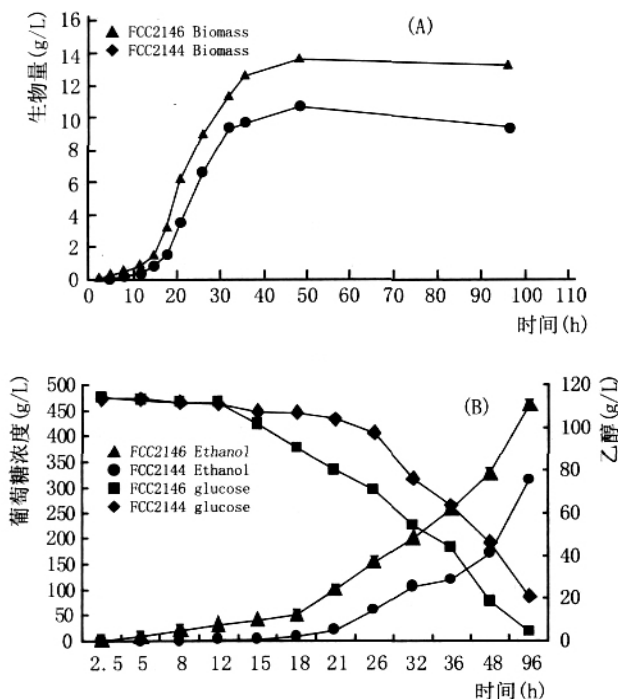


图2 高渗发酵培养基中菌体生长、底物消耗及乙醇的积累与消耗曲线

分别以 2 %葡萄糖和 45 %葡萄糖为碳源,连续培养 *Saccharomyces cerevisiae* 2144 和 2146,在它们各自的对数期取样,测定中间代谢途径中的一些关键酶活性,包括糖酵解途径(丙酮酸激酶, pyk)、磷酸戊糖途径(6-磷酸葡萄糖脱氢酶, G6PDH)、柠檬酸循环(异柠檬酸脱氢酶, ICDH; 苹果酸脱氢酶 MDH) 以及乙醇脱氢酶 YADH

活性。检测结果见图 3。

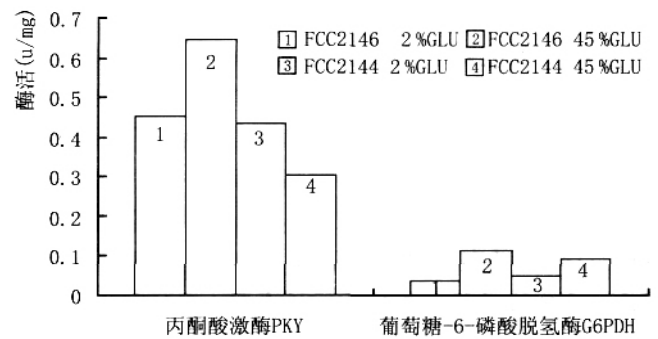


图3 糖酵解和磷酸戊糖途径中关键酶活性变化

图 3 显示,在 2 %的葡萄糖培养基中,2 种酵母的丙酮酸激酶含量基本处于相同的水平上。当培养基中葡萄糖含量提升到 45 %的高渗条件后, FCC2146 胞内的丙酮酸激酶活力水平由 0.453 u/mg 升高到 0.647 u/mg, 活性提升了 42.8 %。而 FCC2144 胞内的丙酮酸激酶活力水平则由 0.432 u/mg 降低为 0.303 u/mg, 活性减少了 29.8 %。丙酮酸激酶(PK)是 EMP 途径中重要的限速酶之一,它的作用是催化磷酸烯醇式丙酮酸转化成丙酮酸,同时生成一个 ATP。PK 活性的提高有利于糖酵解途径的顺利进行。反之该酶活性的降低会导致细胞能量的供应受到影响。它在细胞内含量的多少直接反映了细胞内流经糖酵解过程的通量的大小。在葡萄糖作碳源的对数期,为了能有效地利用葡萄糖,就需要较高的表达量。对比 FCC2144 和 FCC2146,发现,在 2 %葡萄糖条件下,它们胞内的丙酮酸激酶含量处于基本相同的水平,这也就说明了在这种条件下,它们利用葡萄糖的能力比较接近。而 FCC2146 在高渗条件下能迅速诱导出比一般条件下更多的丙酮酸激酶,这就意味着其整个糖酵解过程得到了加强,从而能更好地适应高渗环境。而 FCC2144 缺乏这种诱导更多的丙酮酸激酶的表达的能力,所以它的生长受到了高渗环境的抑制。

当 FCC2146 处于高渗培养条件下,细胞内葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活力从 0.036 u/mg 增长到 0.112 u/mg, 活性是低糖度培养条件下的 3.11 倍。而 FCC2144 的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活力也有一定的增长,从低糖度条件下的 0.05 u/mg 增长到了 0.089 u/mg。这说明高浓度的葡萄糖对 2 种酵母体内的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶都有正向的诱导作用。不过耐高渗酵母对葡萄糖更敏感,酶活性增长幅度也更大。

己糖激酶将胞内的葡萄糖磷酸化为葡萄糖-6-磷酸,产生的葡萄糖-6-磷酸可以流向不同的途径。一路走向乙醇;另一路走向多糖、糖原和海藻糖。FCC2146 在 45 %葡萄糖培养条件下的 6-磷酸葡萄糖脱氢酶活性比

2%葡萄糖培养条件下增长了 3 倍多。这说明,磷酸戊糖的氧化阶段比较活跃,磷酸戊糖途径是细胞内重要的还原性物质 NADPH 的重要来源。同时提供合成 DNA、RNA、色氨酸、苯基丙氨酸、酪氨酸等生物合成的前提物质 4-磷酸赤藓糖和 5-磷酸核糖。正是由于 6-磷酸葡萄糖脱氢酶活性的增强使得耐高渗酵母有更多的合成细胞的原料,才使得 FCC2146 在高渗培养基中有比 FCC2144 更大的菌体生长速率。

2.3 三羧酸循环中关键酶活性变化

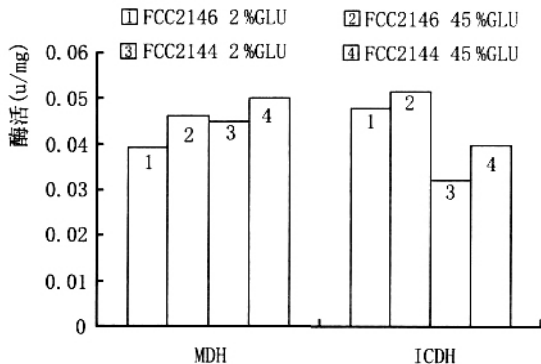


图 4 苹果酸脱氢酶和异柠檬酸脱氢酶活性变化

由图 4 可知,培养基中高浓度的葡萄糖对苹果酸脱氢酶和异柠檬酸脱氢酶都有正向诱导作用, FCC2146 中 MDH 和 ICDH 的增长幅度分别为 17.8 %和 12.2 %; FCC2144 中 MDH 和 ICDH 的增长幅度分别为 8.3 %和 23 %。可以看出,异柠檬酸脱氢酶和苹果酸脱氢酶的活性有所上升,但上升的幅度与丙酮酸激酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活力的增长程度相比要小很多。异柠檬酸脱氢酶是三羧酸循环中的重要限速酶,它的活性的变化会影响到整个 TCA 循环的活跃程度。三羧酸循环作为能量代谢的重要途径对生物体的生命活动起着重要的作用,不仅影响到糖代谢,也是脂质、蛋白质等物质代谢的重要途径。因此,胞内 TCA 循环中,关键酶活性能够保持基本稳定,对整个细胞的生长代谢具有重要意义。

2.4 乙醇脱氢酶活性的变化

乙醇脱氢酶(YADH)在酵母细胞内催化由丙酮酸到乙醇支路的转化,它的活性大小直接关系着乙醇的转化率。对 YADH 的酶学性质研究表明,其最适反应温度是 26℃,等电点 5.4,在 pH8.6~9.0 下催化乙醇氧化生成乙醛,在 pH7.0 下催化乙醛还原成乙醇^[9]。在酵母细胞内部 pH 值稳定在 5.72~6.15 的范围内^[10],所以,乙醇脱氢酶在正常生理状况下肯定是催化乙醛到乙醇的还原反应。从图中发现,随着培养基中葡萄糖浓度由 2%提升到 45%,酵母细胞中的乙醇脱氢酶的含量都有了显著增长, FCC2146 的乙醇脱氢酶含量从 0.545 u/mg 增长到 1.84 u/mg,增长幅度为 237 %; FCC2144 的乙醇

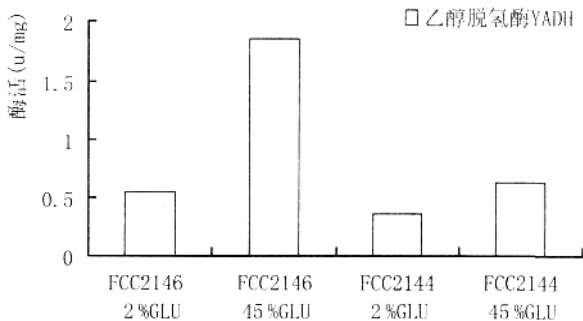


图 5 乙醇脱氢酶活性的变化

脱氢酶含量从 0.358 u/mg 增长到 0.613 u/mg,增长幅度为 71.2 %。FCC2144 中的乙醇脱氢酶含量即使在增长后仍与 FCC2146 有很大的差距。综合 2 株酵母在糖酵解过程中的关键酶丙酮酸激酶含量的差异,发现 FCC2146 由于有高活力的丙酮酸激酶和乙醇脱氢酶的共同作用,可以以很高的速率将葡萄糖转化为乙醇,从而使得它能更好地适应高渗环境,具有了更大的菌体生长速率和乙醇转化率。

3 讨论

酿酒酵母的主要代谢途径包括:糖酵解途径(EMP)、戊糖磷酸途径(PP)、三羧酸循环(TCA)和一些物质合成的分支途径。由于酵母细胞具有感知周围环境并做出应答的能力,所以,在高渗透压及高酒精含量的培养环境下,细胞内部主要代谢途径中的酶的活性会做出相应的调整。在葡萄糖作为碳源的整个代谢过程中,首先是由己糖激酶将胞内的葡萄糖磷酸化为葡萄糖-6-磷酸。同时,葡萄糖-6-磷酸又是己糖激酶的反馈抑制剂,所以要想快速利用葡萄糖,葡萄糖-6-磷酸是一个重要的调控点。在细胞内,葡萄糖-6-磷酸可以流向 2 条不同的途径。一条是经过 EMP 途径由丙酮酸生成乙醇;另一条是经由磷酸戊糖途径走向多糖、糖原和海藻糖^[11]。葡萄糖-6-磷酸脱氢酶催化的磷酸戊糖途径的第一步反应实质上是不可逆的、是重要的调节位点,它控制了细胞内重要的还原性物质 NADPH 的生成的多少。由上面的分析可看出,在高渗环境下同时提高糖酵解途径的关键酶活力,磷酸戊糖途径关键酶活力和乙醇脱氢酶的活力才可以消除代谢过程中的反馈抑制加速葡萄糖的吸收速率,高效的生产乙醇。

葡萄糖在经过磷酸化和醛缩酶的作用下,分解成 3-磷酸甘油醛和磷酸二羟基丙酮,前者经 EMP 途径进入三羧酸循环,后者在 3-磷酸甘油酯酶的作用下脱磷酸根形成甘油^[12]。当酵母处于高渗环境中时,甘油的诱导合成可以提高细胞内的渗透压,这一过程即 HOG 途径(High Osmolarity Glycerol respinse pathway)^[13]。而甘

油合成的前体物质 3- 磷酸甘油醛是由 EMP 途径中的 1, 6- 二磷酸果糖合成的, 所以 EMP 途径活力的加强也有利于细胞内产生能抵抗外界高渗环境的物质甘油的生成, 从而保证了细胞膜功能的完整, 促进了菌体的生长繁殖。

乙醇脱氢酶能迅速地把 EMP 途径产生的丙酮酸转化为乙醇, 这个过程受 1, 6- 二磷酸果糖的激活^[14]。而且细胞内由 EMP 产生的丙酮酸越多就越需要酵母细胞有高活力的乙醇脱氢酶, 耐高渗菌株由于在胞内合成了高活力水平的乙醇脱氢酶, 使得它的 EMP 途径才可以顺利进行, 从而产生高浓度的乙醇。

以上分析使我们了解了酿酒酵母细胞在高渗环境下是如何对细胞内主要代谢通路做出调节的。本试验研究表明, 高活力的 EMP 途径、磷酸戊糖途径、以及高活力的乙醇脱氢酶使得细胞能顺畅地吸收外界的葡萄糖并把它加工成乙醇。保持了细胞功能的完整性, 从而维持了在高渗、高酒精环境下生长需要与能量代谢的平衡。对于酵母细胞耐高渗的机理还需要更深入的研究, 随着各种研究方法、结果的相互借鉴和新的研究手段的出现, 有望在不远的将来能更加明确酵母对于高渗环境的耐性的整个机理。

参考文献:

- [1] 林秋叶, 赵长新, 金凤雯. 两株耐高渗酿酒酵母的生理特性比较[J]. 酿酒, 2003, 30(2): 27- 30.
- [2] A.N.格拉泽, 著; 陈守文, 译. 微生物生物技术[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [3] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of

- protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248- 254.
- [4] Sridhar J, Eiteman M, Wiegel JW. Elucidation of enzymes in fermentation pathways used by *Clostridium thermosuccino* genes growing on inulin[J]. Environ Microbiol, 2000, 66: 246- 251.
- [5] Rossi FG, Ribeiro MZ., Converti A, Vitolo M, Pessoa J, Adalberto. Kinetic and thermodynamic aspects of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and synthesis[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2003, 32: 107-113.
- [6] 张丰德. 现代生物技术(第二版)[M]. 天津: 南开大学出版社, 2001.
- [7] Plaut GWE. Isocitrate dehydrogenase in[J]. Lowenstein JM Methods in Enzymology, 1969, 34- 41.
- [8] 柳畅先, 吴士筠, 胡卫钊. 从酵母细胞中分离纯化醇脱氢酶[J]. 化学研究与应用, 2004, 16(2): 243- 244.
- [9] 许松伟, 姜忠义, 吴洪. 醇脱氢酶结构和作用机理研究进展[J]. 有机化学, 2005, 25(6): 629- 633.
- [10] 刘树臣, 谢澜漪, 李春. 热带假丝酵母细胞内 pH 的测定及其与生长代谢活性的关系[J]. 生物工程学报, 2004, 20(2): 279- 283.
- [11] Galazzo J.L., and J.E Bailey. Fermentation pathway kinetics and metabolic flux control in suspended and immobilized *S.cerevisiae*[J]. Enzyme microbeol. Technol. 1990, 12: 162- 172.
- [12] 王正祥, 诸葛健, 曹钰. 产甘油假丝酵母甘油代谢关键酶的研究[J]. 微生物学报, 2000, 40(2): 180- 187.
- [13] Brewster J.L., Devaloir T, Dwyer N C[M]. Science, 1993, 259: 1760- 1763.
- [14] Galazzo J.L., and J.E. Bailey: In vivo nuclear magnetic resonance analysis of immobilization effects on glucose metabolism of yeast *S.cerevisiae*[J]. Biotechnol. Bioeng. 1989, 33: 1283- 1289.

中国酿酒工业协会啤酒分会第三届会员大会暨理事会在武汉召开

本刊讯: 中国酿酒工业协会啤酒分会第三届会员大会暨理事会于 2008 年 4 月 9 日在武汉江城明珠豪生大酒店召开, 啤酒分会秘书长杜绿君主持会议。啤酒分会应到会员单位 177 个, 实到会员单位 127 个 150 人。中国酿酒工业协会理事长王延才到会并做重要讲话, 他充分肯定了上一届啤酒分会所做的工作, 并希望全体会员认真选举产生新一届团结务实的领导班子, 做好啤酒分会的工作。湖北酿酒工业协会会长到会并讲话, 祝贺大会顺利召开并取得圆满成功。中国酿酒工业协会副理事长、啤酒分会理事长肖德润做工作报告, 2003~2007 年, 我国啤酒产量增加了 1426 万 kL, 增长 56.9%; 销售收入增加 455.2 亿元, 增长 88.6%; 税金增加 47.04 亿元, 增长 47.7%; 利润增加 35.83 亿元, 增长 137.8%。5 年来, 啤酒工业的发展是健康的, 变化令人瞩目。2007 年, 全国啤酒产量 3931.37 万 kL, 较上年增长 13.8%; 完成工业总产值 1031.2 亿元, 较上年增长 18.6%; 完成销售收入 968.61 亿元, 较上年增长 16.3%; 利税总额 207.6 亿元, 较上年增长 10.4%。存在的主要问题是产量增长率低, 产量大, 但经济实力不强。提出了 2008 年的努力方向。

会议讨论并通过了“中国酿酒工业协会啤酒分会二届理事会工作报告”、“中国酿酒工业协会啤酒分会 2008 年工作计划”、“《中国酿酒工业协会章程》啤酒分会实施细则”, 选举产生了中国酿酒工业协会啤酒分会第三届理事会理事、常务理事、理事长、副理事长和秘书长。肖德润再次当选为啤酒分会理事长, 杜绿君当选为副理事长, 何勇当选为秘书长。会议完成各项议程, 圆满结束。(小雨)



中国酿酒工业协会理事长王延长讲话



啤酒分会第三届会员大会