

代谢工程在可再生资源生产燃料酒精中的研究进展

徐桂转¹,常春²,张百良¹

(1.河南农业大学,农业部可再生资源重点实验室 2.郑州大学化学工程学院,河南 郑州 450002)

摘要: 代谢工程是指通过某些特定生化反应的修饰来定向改善细胞的特性或运用 DNA 重组技术创造新的化合物。利用生物技术的代谢工程构建发酵型基因工程菌,将可再生生物质资源转化生产燃料酒精,是解决人类能源紧缺、走可持续发展道路的有效途径。利用代谢工程构建可发酵生物质资源,转化生产燃料酒精的基因工程菌有酿酒酵母(*S.cerevisiae*)基因工程菌、大肠杆菌(*E.coli*)细菌基因工程菌和运动发酵单孢菌(*Zymomonas mobilis*)基因工程菌。(孙悟)

关键词: 代谢工程; 可再生资源; 燃料酒精

中图分类号:Q819;Q78;TS262.2 文献标识码:B 文章编号:1001-9286(2005)09-0043-05

Research Progress of Metabolism Engineering in the Production of Fuel Alcohol by Renewable Resources

XU Gui-zhuan¹, CHANG Chun² and ZHANG Bai-liang¹

(1.Key Lab of Renewable Resource of Agriculture Ministry, Henan Agriculture University; 2. Chemistry Engineering College of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450002, China)

Abstract: Metabolism engineering referred to the improvement of cellular properties by special biochemical reactions or the construction of new compounds by DNA recombination techniques. The construction of fermenting gene-engineering bacteria by biotech that could transfer renewable resources into fuel alcohol was considered as an effective approach for sustainable development to settle the problem of energy scarcity. Such gene-engineering strains include *S.cerevisiae* gene-engineering strain, *E.coli* gene-engineering bacteria strains and *Zymomonas mobilis* gene-engineering strains. (Tran, by YUE Yang)

Key words: metabolism engineering; renewable resource; fuel alcohol

随着石油、煤炭等不可再生资源的大量消耗,能源危机和环境污染已经成为影响人类可持续发展的最大障碍。以中国为例,按已探明储量和年开采量计算,中国的石油资源有可能在 20 余年内枯竭。面对日益增加的危机,大力开发新的可再生性资源已经成为人类走可持续发展道路的前提条件^[1]。生物质资源是地球上数量最丰富的可再生资源,全球每年光合作用的生物质高达 1500~2000 亿吨,其中 80% 以上为木质纤维素类物质,估计其年产量相当于目前所需能源的 10 倍,但这些可再生资源被作为能源利用的还不到 1%。所以,开发利用生物质可再生资源是十分必要和迫切的^[2]。在可再生资源的开发利用中,现代生物技术是一种行之有效的转化手段,利用生物技术可以把可再生资源转化为新的能源和化工产品。目前,利用生物质可再生资源转化生产

燃料酒精已经成为研究的热点,此外,利用生物技术降解纤维素的研究也取得了很大的进展。但由于纤维素的组成和结构非常复杂,使得在纤维素的生物降解和纤维素水解产物的生物转化上,都还存在着一些问题,如纤维素酶活力低、微生物对纤维素水解底物利用率低等。为此,人们尝试利用代谢工程手段,对微生物进行定向改造来促进可再生资源的生物转化。

代谢工程(Metabolic engineering)又称途径过程,是由美国加州理工学院化学工程系教授、著名生化工程专家 Bailey J E 于 1991 年首先提出的。代谢工程的一般定义为:通过某些特定生化反应的修饰来定向改善细胞的特性或运用 DNA 重组技术创造新的化合物^[3]。代谢工程在细胞水平上阐明代谢途径与代谢网络之间局部与整体的关系,胞内代谢过程与胞外物质运输之间的偶联

收稿日期:2005-03-30

作者简介:徐桂转(1972-),女,博士研究生,讲师,从事可再生资源的开发和利用研究。

以及代谢流流向与控制的机制,并以此为基础通过工程和工艺操作达到优化细胞性能的目的,它综合了基因工程、生物化学、生化工程等领域的最新成果,是目前定向改造生物的有效手段。利用代谢工程可以帮助人们实现对可再生资源高效利用的目的,从而为生物技术可再生资源的利用开辟更加广阔的领域。本文主要介绍代谢工程在生物技术转化可再生资源中的应用及研究进展。

1 代谢工程在可再生资源生产燃料酒精中的应用

燃料酒精是一种具有重要战略意义的能源,作为一种可再生的燃料在能源缺乏的21世纪将占据重要的比例。目前,我国陆续在吉林、黑龙江、河南等地推广使用燃料酒精,并将陆续在更多的省市普及。生产燃料酒精多以糖类和陈化粮为原料,由于粮食价格较高和资源有限,利用纤维素和半纤维素来转化酒精就成为必然的趋势,一方面它可以降低原料成本,节约粮食资源;另一方面可充分利用可再生资源,缓解对自然环境的压力。

纤维素和半纤维素必须经过水解分别形成六碳糖和五碳糖后,才能被微生物利用,发酵生产酒精。然而,传统上用于酒精发酵生产的微生物如酿酒酵母和运动发酵单孢菌虽然能够很好地利用六碳糖(葡萄糖),但均不能代谢五碳糖,这就意味着半纤维素不能被有效地利用。大量的研究表明,对半纤维素的有效利用能够降低酒精生产成本的25%,这就需要微生物必须同时具备发酵六碳糖和五碳糖的能力。为了实现这个目的,只有通过代谢工程手段构建基因工程菌来赋予微生物这些新的能力。

2 酿酒酵母(*S.cerevisiae*)基因工程菌

酿酒酵母(*S.cerevisiae*)是生产酒精的最佳菌株。它具有许多优良的特性,是一种安全的微生物,在厌氧条件下可以良好地生长并能够发酵葡萄糖获得较高的酒精得率,同时还具有很好的酒精耐受性。此外,对一些生长抑制因子如乙酸、糠醛等也具有较高的抗性^[4]。酿酒酵母不能直接利用木糖,但能够利用木酮糖,所以利用这个特点,通过代谢工程手段引入木糖向木酮糖的代谢途径可以构建能够利用木糖的酿酒酵母重组菌株。

引入由木糖向木酮糖的代谢途径可以采取两种途径:一是在酿酒酵母菌中克隆并表达利用木糖的2个基因,即木糖还原酶基因XYL1和木糖醇脱氢酶基因XYL2。它们分别编码木糖还原酶(XR)和木糖醇脱氢酶(XDH)。酵母木糖代谢的第一步由XR催化生成木糖醇,第二步由XDH催化得到木酮糖,因为酿酒酵母具有木酮糖代谢的完整酶系,木酮糖经过木酮糖激酶(XK)磷酸

化生成5-磷酸木酮糖,而进入磷酸戊糖途径(PPP),然后以中间产物6-磷酸葡萄糖和3-磷酸甘油醛进入糖酵解途径(EMP),最终在厌氧条件下产生酒精。

目前,木糖还原酶基因XYL1已从毕赤酵母(*P.stipitis*)中克隆获得并测序^[5-7],它以NAD(P)H为辅酶,在*P.stipitis*中此酶显示出70%的活力。木糖脱氢酶基因XYL2也可从*P.stipitis*中克隆获得,该基因编码的木糖脱氢酶依赖NAD⁺为辅酶。许多研究表明^[8-10],在酿酒酵母中同时表达真菌的木糖还原酶基因(XYL1)和木糖醇脱氢酶基因(XYL2)可以使酿酒酵母获得利用木糖的能力,单独表达XYL1不能使酵母充分发酵甚至不能利用木糖生长。Kotter的研究表明,在厌氧条件下,带有*P.stipitis*来源的XYL1,XYL2的酿酒酵母转化子将木糖转化成大约等摩尔的木糖醇和酒精,这可能是在重组酿酒酵母中表达的XR和XDH所需辅助因子不平衡的结果和非氧化的戊糖磷酸途径的有效性下降造成的^[11,12]。Metzger尝试修饰XDH辅因子的专一性,将从*Thermoanaerobiumbrockii*的酒精脱氢酶基因中得到的NADP识别序列ADH基因引入到XDH基因上,可使突变株的酶以相同的K_m来利用NADP和NAD作为辅因子,含XYL2基因的突变株在与XYL1基因同时表达时,可使酿酒酵母转化子在木糖培养基上生长^[13]。芬兰技术研究中心小组为了改变XR和XDH之间的氧化还原不平衡,在酿酒酵母中引入人工转氢酶循环,从而实现了酵母在木糖培养基上的生长。Tantirungkij将*P.stipitis*XYL1,XYL2基因克隆到酿酒酵母的突变株中,突变株具有抗XR活性,但XDH与XR的酶活比较高,结果显示菌株在木糖培养基上具有快速生长的能力。Southern杂交显示携带两个基因的载体整合到染色体中,基因的稳定性上升,酒精的产量和产率分别提高了1.6倍和2.7倍^[14]。

实验发现,仅仅表达XYL1和XYL2基因,尚不能使酿酒酵母重组菌株发酵木糖产生酒精,推测是木糖到酒精整个代谢途径上的其他环节有障碍。转酮酶(TKL)和转醛酶(TAL)是磷酸戊糖途径(PPP)上的关键酶,研究表明,TKL和TAL对木酮糖的代谢影响较大,但酿酒酵母中两种酶活力很低。Schaaf-Gerstenschlager等^[15]将酿酒酵母的转酮酶基因(TKL1)和转醛酶基因(TAL1)克隆到酵母多拷贝载体GS42上,两个基因均在自身的启动子下表达。在超表达TKL1,TAL1基因的酿酒酵母重组菌株中两种酶活均提高10~15倍。Walfridsson等^[16]在研究转酮酶及转醛酶对含有XYL1和XYL2基因的酿酒酵母重组菌株利用木糖发酵的影响时发现,超表达TKL1基因对利用木糖影响不大,TAL1基因的超表达可

以增强重组菌株对木糖的利用。这些结果进一步验证转醛酶是酿酒酵母重组菌株代谢木糖以及野生菌株代谢木酮糖的限制因素。

虽然得到了高效表达 XYL1, XYL2 和 TAL1 等基因的酿酒酵母,可以加强重组酿酒酵母菌株对木糖的利用,但木糖消耗的增加主要表现在木糖醇得率的提高,依然没有酒精产生。山东大学鲍晓明等^[17]报道,同时具有 XYL1 和 XYL2 以及超表达基因 TAL1 和 TKL1 的酿酒酵母重组菌株可以在木糖为唯一碳源的平板上生长。摇瓶发酵实验结果表明,当 XR/XDH 比值为 0.06 时,产物中检测不到木糖醇,其他副产物如甘油、乙酸盐等也有所下降,而酒精得率却有所提高。

近年来,人们发现木酮糖激酶(XK)催化木酮糖磷酸化形成 5-磷酸木酮糖也是木糖代谢的限速步骤之一。美国普度大学的 Ho 等人在上述的基础上,又将木酮糖激酶(XK)引入到宿主细胞中,用带有 XYL1, XYL2 和 XYL3(编码 XK)的用重组多拷贝质粒转化细胞,被复制的载体将拷贝的外源 DNA 整合进宿主细胞中得到具有耐高温、发酵速率快、产率高的工程菌,在 1:1 的木糖和葡萄糖的混合液中可产生 47 g/L 的酒精,为最大理论值的 84 %^[18]。

引入细菌木糖异构酶基因(xylA)是使酿酒酵母转化木糖为木酮糖的又一途径,目的均是在酿酒酵母菌中引入转化木糖形成木酮糖的代谢途径,然后进一步代谢木酮糖产生酒精。细菌的木糖异构酶因不需要任何辅助因子,最初被认为是构建利用木糖酿酒酵母代谢工程菌株的便利途径。

早期的工作是将多种来源的木糖异构酶克隆表达至酿酒酵母中,但均没有得到活性表达。直到 1996 年, Walfridsson 等选择与真核生物亲缘关系更近的古细菌——嗜热细菌 *Thermusthermophilus* 的木糖异构酶基因(xylA),首次在酿酒酵母中得到活性表达^[19]。鲍晓明^[20]采用 PCR 技术,克隆得到嗜热细菌 *Clostridium thermohydrosulfuricum* 木糖异构酶基因 xylA,并在酿酒酵母 H158 中得到活性表达,其最高酶活条件是 85 °C, pH7.0,在接近酵母生长温度的 30 °C 和 40 °C 时,其相对酶活分别下降 37 % 和 11 %。为了使木糖代谢流向酒精形成的方向进行,在酵母转化子中又引入磷酸戊糖途径中的转酮酶基因 TKL 及转醛酶基因 TAL1,同时表达 xylA 和超表达 TAL1 基因,含 TKL1 基因的酿酒酵母工程菌株可以在木糖为唯一碳源的平板上生长;摇瓶发酵实验结果表明,该工程菌株可以发酵木糖,形成 13 g/L 酒精。

3 大肠杆菌(*E.coli*)细菌基因工程菌

大肠杆菌(*Escherichia coli*)的野生菌株能够利用非常广泛的碳源,其中包括六碳糖(葡萄糖,果糖,甘露糖)和五碳糖(木糖,阿拉伯糖)以及糖酸等物质,即大肠杆菌可以利用木质纤维素降解产生的各种糖类。但是野生型大肠杆菌缺少强有力的产醇发酵酶系统,厌氧发酵时糖代谢的主要产物是各种有机酸,酒精含量很低,故大肠杆菌菌种改造的重点是增强其酒精能力。酒精合成由两种关键酶 PDC(丙酮酸脱羧酶)、ADH(酒精脱氢酶)催化,在 *E.coli* 中存在微弱的 ADH 活性^[21]。为了实现糖酵解时碳的通量流向酒精,可引入这两个关键酶基因到大肠杆菌中,促使丙酮酸(糖代谢的中间产物)定向转化成酒精。

Ohta 等人将 *Z. mobilis* 的 PDC 基因 pdc 和 ADH II 基因 adhb 引入 *E. coli* 中,重组菌株表现出较好的发酵木糖产生酒精的能力,但产物中仍有不少的副产物^[22]。Brau 等人将 pdc 基因导入到 *E. coli* 中,结果发现重组菌产酒精的量是空载质粒产酒精量的 6 倍,但是对酒精的耐受能力下降^[23]。Ingram 小组构建的操纵子 PET 在 PUC18 的 lac 启动子控制下进行转录,表达出高水平的 PDC 和 ADH 的酶活。发酵实验表明,含有构建质粒的大肠杆菌菌株,由于 pdc 和 adh 基因均有高水平的表达,其在含有 10 % 葡萄糖的丰富培养基中 30 °C 培养 48 h,酒精的累积浓度可达 750 mmol(4.3 % v/v),这相当于被代谢的葡萄糖有 95 % 以上的转化率^[24]。典型的酒精发酵从 10 % 的葡萄糖、8 % 的木糖中可分别获得 54.4 g/L, 41.6 g/L 的酒精。最近的研究集中在利用重组菌 KO11 发酵富含戊糖的基质方面,在预处理之后,可产生 45 g/L 的糖浓度。经济分析预测酒精的生产费用为 0.48 美元/L,在戊糖发酵中被认为较为经济。

经重组的大肠杆菌菌株虽然具有很好的发酵性能,但由于所引入的基因存在于质粒上,稳定性较差,经连续发酵后质粒容易丢失而使发酵能力下降。为了保证质粒的存在,需向培养基中加入抗生素以增加环境的选择压力而抑制质粒的丢失。Hespell 等人设计出了一种巧妙利用无氧发酵环境作为维持重组菌株性能稳定的基因重组方案^[25]。目前,国内也在按照上述思路,尝试克隆 pdc 和 adh 基因到 *E. coli* 中的研究^[26-27]。

4 运动发酵单孢菌(*Zymomonas mobilis*)基因工程菌

Z.mobilis 是一种能够用于酒精生产的优良菌种。它具有独特的 ED 糖酵解途径和有高效的将丙酮酸转化成酒精的丙酮酸脱羧酶(PDC)和酒精脱氢酶(ADH)酶系统,此外它对酒精及纤维材料水解物中毒性因子有较高的耐受性,能够比传统酵母生产的酒精高出 5 %~10 %,体积浓度高出 5 倍。但由于缺乏同化木糖的代谢途径而不能利用木糖,所以可以通过代谢工程的手段引入木糖

代谢途径。

Feldmann 及其同事曾尝试将木糖异构酶基因 *xylA* 和木酮糖激酶基因 *xylB* 用穿梭质粒引入到运动发酵单胞菌中,使其表达。实验结果表明,虽然木糖异构酶基因(*xylA*)和木酮糖激酶基因(*xylB*)都能够在转化后的细胞内成功地表达,但由于缺乏完整的木糖代谢途径,转化后的菌株仍然不能在以木糖为唯一碳源的培养基上生长^[28]。

为了弥补完整的代谢途径,Zhang 等人将 *E. coli* 的木糖异构酶基因(*xylA*)、木酮糖激酶基因(*xylB*)、转醛酶基因(*tal*)和转酮酶基因(*tktA*)克隆到 *Z. mobilis* 中,经转化重组的运动发酵单胞菌菌株 CP4(PZB5)显示出所有 4 种酶的活性,在由木糖和葡萄糖各 25 g/L 组成的混合培养基中,经过 30 h 的发酵,*Z. mobilis* 重组菌株可以发酵木糖产生酒精,得率为 0.44 g/g^[29],两种糖的转化率都可以达到 95%。Deanda 及其同事将来自大肠杆菌的 5 个基因:*araA*、*araB*、*araD*、*talB*、*tktA* 移入到运动发酵单胞菌细胞中,构成重组菌株 ATCC39676(PZB206)^[30],此菌株在以阿拉伯糖为唯一碳源(25 g/L)的培养基中的发酵试验表明,其产醇率可达到理论值的 98%(按消耗糖量计算)或 84%(按发酵总糖量计算),而在由含有阿拉伯糖和葡萄糖各 25 g/L 的混合糖培养基中,在 37℃ 下发酵 40 h 后的酒精转化率为理论值的 84%(按发酵糖量计),其中的葡萄糖被完全利用,阿拉伯糖则有部分剩余。

继上面的工作之后,Chou 和 Zhang 等人分别于 1997 年和 1998 年报道了能同时发酵葡萄糖、木糖和阿拉伯糖的工程菌株 206C(PZB301)的构建,此菌株中包含有由质粒引入 *xylA*、*xylB*、*araA*、*araB*、*araD*、*talB* 和 *tktA* 的 7 个关键代谢基因。由这些基因编码的酶构成了完整的五碳糖代谢途径。在混合糖的培养基(葡萄糖 30 g/L,木糖 30 g/L,阿拉伯糖 20 g/L)中经 80~100 h 的发酵,酒精的总产率达到理论值的 82%~84%(以培养基中的总糖量计算)^[29]。

为了进一步完善运动发酵单胞菌的基因改造,维持其发酵性能的稳定,Zhang 等人于 2001 年申请的两篇专利中详细阐述了将运动发酵单胞菌进行戊糖发酵所需要的 7 个基因进行染色体整合的方案。运用同源重组技术,将含有上述 7 个基因的操纵子插入到染色体上乳酸脱氢酶基因(*ldh*)所在的位点。这样一方面增加了外源基因的稳定性,另一方面造成乳酸脱氢酶失活,从而减少了酒精发酵副产物乳酸的生成^[29,31]。

5 总结

在可再生资源的利用中,利用现代生物技术是行之有效的。代谢工程无论在纤维素、半纤维素原料的

降解,还是在燃料酒精的生产方面都发挥着重要的作用,相信在可再生资源利用的其他方面也会发挥日益重要的作用。目前,人们在利用可再生资源的研究中还处在探索的阶段,如何经济、高效、科学地利用开发可再生资源仍然是摆在人们面前的难题。随着现代生物技术的飞速发展,相信会有更多更好的技术出现,最终使人类能够充分利用可再生资源,走可持续发展的道路。

参考文献:

- [1] 曲音波. 开发生物质资源,实现可持续发展[J].国际技术经济研究,1999,2(2):29-34.
- [2] 吴创之,马隆龙. 生物质能现代化利用技术[M]. 北京:化学工业出版社,2003(5):15-17.
- [3] 赵学明,王靖宇,陈涛,等. 后基因组时代的代谢工程:机遇与挑战[J].生物加工工程,2004,2(2):1-7.
- [4] 鲍晓明,高东,王祖农. 木糖代谢工程菌的研究进展[J].生物工程学报,1998,14(4):355-358.
- [5] Takuma S,Nakashima N,Tantirungkij M,Kinoshita S.Isolation of xylose reductase gene of *Pichia stipitis* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. [J]. Appl Biochem Biotechnol,1991,28-29:327-340.
- [6] Amore R,Kotter P,Kuster C,Ciriacy M et al. Cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of the NAD(P)H-dependent xylose reductase-encoding gene(XYL1) from the xylose-assimilating yeast *Pichia stipitis*. [J].Gene,1991,109:89-97.
- [7] Hallborn J,Walfridsson M,Airaksinen U, et al. Xylitol production by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biotechnology,1991,9:1090-1095.
- [8] 鲍晓明,高东,曲音波. 木糖代谢基因表达水平对酿酒酵母重组菌株产物形成的影响[J].生物工程学报,1997,13(4):225-231.
- [9] Aristos A,Penttila M. Metabolic engineering application to renewable resource utilization. [J]. Curr Opin Biotechnol,2000,1(2):187-198.
- [10] Ligthelm M.E,Prior B,A,Preez J.C.et al. The oxygen requirements of yeast for the fermentation of D-xylose and D-glucose to ethanol. [J]. Appl Microbiol Biotechnol,1988,28:63-68.
- [11] Kotter P,Ciriacy M. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. [J].Appl Microbiol Biotechnol,1993,38:776-783.
- [12] Senac T,Hahn-Hagerdal B. Effects of increased transaldolase activity on D-xylulose and D-glucose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* cell extracts. [J].Appl Environ Microbiol,1991,57:1701-1706.
- [13] Metzger M.H,Hollenberg C.P. Amino acid substitutions in the yeast *Pichia stipitis* xylitol dehydrogenase coenzyme binding domain affect the coenzyme specificity [J].Eur J

- Biochem, 1995, 228:50-54.
- [14] Tantirungkij M, Izuishi T, Seki T, et al. Fed-batch fermentation of xylose by a fast growing mutant of xylose-assimilating recombinant *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1994, 41:8-12.
- [15] Schaaf-Gerstenschlager I, Miosga T, Zimmermann F K. Genetics of the pentose-phosphate pathway enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Biores Technol, 1994, 50: 59-64.
- [16] Walfridsson M, Hallborn J, Penttilla M, et al. Xylose-metabolizing *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressing the TKL1 and TAL1 genes encoding the pentose phosphate pathway enzymes transketolase and transaldolase [J]. Appl Environ Microbiol, 1995, 61:4184-4190.
- [17] 鲍晓明, 高东, 曲音波, 等. 木糖代谢基因表达水平对酿酒酵母重组菌株产物形成的影响[J]. 生物工程学报, 1997, 13(4):355-361.
- [18] Ho NW, Chen Z, Brainard AP. Genetically engineered *saccharomyces yeast* capable of effective cofermentation of glucose and xylose [J]. Appl Environ Microbiol 1998, 64: 1852-1859.
- [19] Walfridsson M, Xiaoming B, Hahn Hagerda B, et al. Ethanolic fermentation of xylose with *Saccharomyces cerevisiae* harboring the *Thermus thermophilus xyl A* gene, which expresses an active xylose(glucose) isomerase.[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1996, 62:4648-4651.
- [20] 鲍晓明, 高东, 王祖农. 嗜热细菌木糖异构酶基因 *xylA* 在酿酒酵母中的高效表达[J]. 微生物学报, 1999, 39(1):49-54.
- [21] 高卫华, 张敏华, 刘成, 等. 能利用五碳糖和六碳糖生产乙醇的基因工程菌株的构建[J]. 工业微生物, 2004, 34(1):56-61.
- [22] Ohta K, Beall D S, Meija J P, et al. Fermentation of sweet whey by recombinant *Escheichia coli* KO11[J]. Appl Environ Microbiol, 1991, 57: 893-900.
- [23] Brau B, Sham H, Zhang M. Cloning and expression of the structural gene for pyruvate decarboxylase of *Zy-momonas mobilis* in *Escherichia coli* [J]. Arch Microbiol, 1986, 144: 296-301.
- [24] Ingram L.O, Conway.T. Genetic engineering of ethanol production in *Escherichia coli*. [J]. Appl. Environ Microbiol, 1987;53: 2420-2425.
- [25] Hespell R.B, Wyckoff H.A, Dien B.S, et al. Stabilization of petoperon plasmids and ethanol production in *Escherichia coli* strains lactate dehydrogenase and pyruvate formate lyase activities.[J]. Appl Environ Microbiol, 1996;62:4594-4597.
- [26] 谢丽萍, 诸葛健, 王正祥. 大肠杆菌中乙醇合成途径的构建[J]. 无锡工业大学学报, 2002;21(2):116-119.
- [27] 陆坚, 韦宇拓, 黄鲲, 等. 运动发酵单胞菌乙醇脱氢酶基因的克隆及在大肠杆菌中的表达[J]. 工业微生物, 2004, 34(1): 17-20.
- [28] Feldmann S.D, Sahn H, Sprenger G.A. Pentose metabolism in *Zymomonas mobilis* wild type and recombinant strains. [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1992;38:354-361.
- [29] Zhang M, Chou Y. Single *Zymomonas mobilis* strain for xylose and arabinose fermentation[P]. US5,843,760, 1998-12-01.
- [30] Deanda K, Zhang M, Eddy M, et al. Development of an arabinose fermenting *Zymomonas mobilis* strain by metabolic pathway engineering.[J]. Appl Environ Microbiol, 1996;62:4465-4470.
- [31] Zhang M, Chou Y. Method of site specific insertion in *Zy-momonas mobilis*[P]. WO0183784A2, 2003-12-03.

全国酿酒品酒师名单通报(第二批)

各省、自治区、直辖市酿酒(白酒)协会、白酒企业:

根据《白酒品酒师管理细则》规定,金凤兰等 17 名同志符合酿酒高级品酒师条件,陈颖等 240 名同志符合酿酒品酒师条件,唐希国等 74 名同志符合酿酒品酒员条件,现批准,予以通报。

附件:第二批酿酒高级品酒师、品酒师、品酒员名单

中国酿酒工业协会
二〇〇五年八月十二日

注:第一批高级品酒师名单见本刊 2005 年第 5 期第 128 页,第一批、第二批品酒师、品酒员名单见酿酒科技网站(<http://www.LMST.com.cn>)

第二批酿酒高级品酒师名单

序号	姓名	注册证书编号	工作单位	发证日期
1	金凤兰	ZJ-110056	燕潮酩酿酒(三河)有限公司	2005-8-1
2	武光路	ZJ-110057	河北古顺酒业有限公司	2005-8-1
3	宋书玉	ZJ-110058	邯郸市高开九波生物酿酒技术研究所	2005-8-1
4	姚红梅	ZJ-110059	河北衡水老白干酿酒(集团)有限公司	2005-8-1
5	李泽霞	ZJ-110060	河北衡水老白干酿酒(集团)有限公司	2005-8-1
6	程宏连	ZJ-110061	重庆市太白酒厂	2005-8-1
7	龙运川	ZJ-110062	重庆市酒协	2005-8-1
8	文明运	ZJ-110063	重庆军神酒业有限公司	2005-8-1
9	潘建军	ZJ-110064	四川省食品发酵工业研究设计院	2005-8-1
10	刘念	ZJ-110065	四川省食品发酵工业研究设计院	2005-8-1
11	林勇	ZJ-110066	中国四川仙潭酒厂	2005-8-1
12	郎定常	ZJ-110067	四川省酒类研究所	2005-8-1
13	钟杰	ZJ-110068	国家酒类产品质量监督检验中心	2005-8-1
14	李家民	ZJ-110069	四川沱牌集团有限公司	2005-8-1
15	李家顺	ZJ-110070	四川沱牌集团有限公司	2005-8-1
16	赵东	ZJ-110071	宜宾市食品工业协会	2005-8-1
17	黄蜀生	ZJ-110072	四川省邛崃市龙井酒业有限公司	2005-8-1