

文章编号: 1000-5013(2008)04-0554-05

# NaCS/ PDMDAAC 微囊化肺炎克雷伯氏菌 发酵产 1, 3-丙二醇

陈 国, 陈宏文, 彭益强, 方柏山

(华侨大学 工业生物技术福建省高等学校重点实验室, 福建 泉州 362021)

**摘要:** 研究一种新型的生物微胶囊体系——NaCS/ PDMDAAC, 包埋肺炎克雷伯氏菌(*K. pneumoniae* ZJU 5205) 产 1, 3-丙二醇. 比较不同初始菌体包埋量、胶囊/ 发酵液体积、发酵液 pH 值、初始甘油质量浓度等对微囊化细胞发酵结果的影响. 结果表明, 将细胞种子液稀释 5 倍后包埋, 当胶囊与发酵液的体积比为 1: 2、初始 pH 值为 7、初始甘油质量浓度为  $60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 得到较好的发酵结果. 考察肺炎克雷伯氏菌在囊内的生长曲线, 以及底物和产物质量浓度随发酵时间的变化, 发现由于胶囊引起的扩散限制, 可以持续维持囊内较低的底物质量浓度, 从而部分克服高质量浓度底物对菌体生长和生成产物的抑制.

**关键词:** 生物微胶囊; 细胞固定化; 肺炎克雷伯氏菌; 1, 3-丙二醇

**中图分类号:** Q 814. 2; TQ 923

**文献标识码:** A

生物微胶囊是一种简单、快速、无损化的细胞固定方式, 常应用于人工器官和细胞工程等研究领域. 近几年, 利用微生物法生产 1, 3-丙二醇(1, 3-PD) 已成为国内外研究的热点<sup>[1]</sup>. 目前, 更多的研究报道是关于批式/ 半批式发酵<sup>[2]</sup>、连续发酵<sup>[3]</sup>、微氧发酵<sup>[4]</sup>、共底物发酵<sup>[5]</sup>、两步发酵等, 而有关固定化细胞发酵的报道却相对较少. 由于 NaCS/ PDMDAAC(Sodium Cellulose Sulfate/ Poly[Imethyl(Diallyl) Ammonium Chloride]) 微胶囊在生物固定化领域具有生物相容性良好、机械强度高、膜性能稳定等突出优点, 并已成功应用于乳酸菌、酿酒酵母、P450 酶产生菌等的包埋<sup>[6-7]</sup>. 利用微胶囊包埋具有降低肺炎克雷伯氏菌(*K. pneumoniae*) 机会致病菌的危险性、可有效重复利用菌体、可不予考虑固定化导致的氧气传质限制问题, 以及有利于连续操作和后续分离. 本研究用 NaCS/ PDMDAAC 中空微胶囊包埋肺炎克雷伯氏菌, 发酵甘油生产 1, 3-丙二醇.

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种与试剂

肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae* ZJU 5205, 浙江大学生物工程研究所); 纤维素硫酸钠(NaCS, 浙江大学生物工程研究所, 取代度为 0.36); 聚二甲基二烯丙基氯化铵(PDMDAAC, 体积分数为 20% 的水溶液, 相对分子质量为 200 000~350 000, 美国 Aldrich 公司); 其余试剂均为市售分析纯.

### 1.2 培养基组成

(1) 斜面培养基( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ). 5.0 酵母粉, 10.0 蛋白胨, 10.0 NaCl, 20.0 琼脂. (2) 种子培养基( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ). 20 甘油, 3.4  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1.3  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2.0  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.2  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2.0  $\text{CaCO}_3$ , 1.0 酵母粉, 0.005  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.020  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 以及 2 mL 微量元素溶液 SL7. 每升微量元素溶液 SL7 含 70 mg  $\text{ZnCl}_2$ , 100 mg  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 60 mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 200 mg  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 25 mg  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 35 mg  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 20 mg  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.9 mL HCl (体积分数为 37%). (3) 发酵培养基( $\text{g} \cdot$

收稿日期: 2008-01-18

作者简介: 陈 国(1978-), 男, 讲师, 博士, 主要从事生物固定化的研究. E-mail: chenguo@hqu.edu.cn.

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目(E0810017); 福建省青年人才创新项目(2006F3080); 华侨大学高层次人才科研启动项目(06BS214)

$\text{L}^{-1}$ ). 1.36  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 6.61  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.26  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.29  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1.0 酵母粉, 0.42 水合柠檬酸, 以及 5 mL 微量元素溶液. 每升微量元素溶液含 0.68 g  $\text{ZnCl}_2$ , 2.0 g  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 60 mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0.47 g  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 5 mg  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.17g  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 5.4 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 10 mL  $\text{HCl}$  (体积分数为 37%). 培养基中的甘油质量浓度参照各部分实验设计要求. 如无特殊说明, 摇瓶培养的发 酵培养基均额外添加  $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{CaCO}_3$  以维持中性 pH 值. 以上培养基均用  $\text{KOH}$  溶液调节 pH 值到 7.0, 于  $121^\circ\text{C}$  下灭菌 20 min 后使用.

### 1.3 实验方法

1.3.1 微囊化 *K. pneumoniae* 的制备 微囊化 *K. pneumoniae* 的制备过程均在无菌环境下进行. 首先, 将 NaCS 与去离子水混合配成质量比为 5% 的溶液, 而将 PDMDAAC 配成质量比为 8% 的溶液, 充分搅拌直至完全溶解; 再将配好的 NaCS 溶液及 PDMDAAC 溶液于  $121^\circ\text{C}$  下灭菌 10 min 后冷却至室温; 然后将培养 18 h 的种子菌液与 5% 无菌 NaCS 溶液按 1: 4 比例混合均匀, 通过注射针头逐滴滴入 8% 的无菌 PDMDAAC 溶液中, 室温下温和搅拌; 反应 30 min 后, 用无菌水洗去表面残余的 PDM-DAAC, 即得待培养的包埋 *K. pneumoniae* 微胶囊. 制备装置如图 1 所示. 按该方法制备的微胶囊的平均直径为 2.6 mm. 制得的胶囊如图 2 所示.

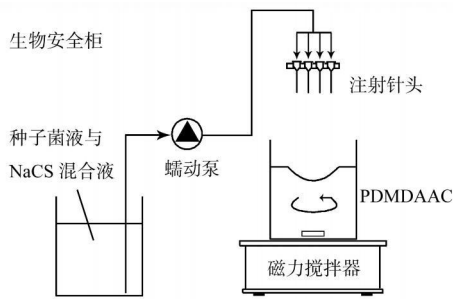


图 1 含菌微胶囊的制备装置示意图

Fig. 1 Schematic diagram of preparation equipment for encapsulated cells

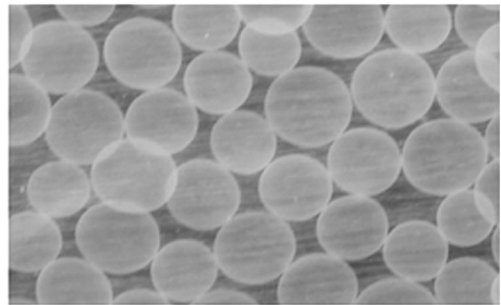


图 2 NaCS/PDMDAAC 胶囊照片

Fig. 2 Photographs of NaCS/ PDMDAAC capsules

1.3.2 固定化 *K. pneumoniae* 摇瓶发酵 在 250 mL 摇瓶中装入 50 mL 发酵培养基, 并加入 25 mL 含菌微胶囊(相当于 10% 接种量), 棉塞封口, 于  $37^\circ\text{C}$ ,  $160 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  的摇床上培养. 胶囊量按考察因素需要确定. 如无特殊说明, 初始甘油质量浓度为  $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ .

1.3.3 制备条件及培养条件的选择 从种子菌液稀释倍数、微胶囊与发酵培养基体积比、初始甘油质量浓度、发酵过程 pH 值中选择 1 个因素进行研究时, 其他因素及条件不变.

### 1.4 分析方法

1.4.1 菌体质量浓度的测定 从发酵液中随机取 50 粒微胶囊, 吸干表面液体, 放入试管中. 根据菌体质量浓度标准曲线估算的稀释倍数, 加入一定体积的无菌水, 完全破碎胶囊, 使内容物全部释放到水中, 得到按一定比例稀释后的囊内发酵液, 利用比浊法测得囊内菌体质量浓度.

1.4.2 甘油质量浓度的测定 发酵液在  $1.0 \times 10^4 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  转速下离心 10 min, 用移液管准确吸取一定量的上清液, 使用滴定法测定甘油质量浓度. 测定微胶囊内的甘油质量浓度时, 首先制得按一定比例稀释后的囊内发酵液. 具体测量方法参见文[ 8].

1.4.3 1, 3-PD、乙醇、乙酸质量浓度的测定<sup>[9]</sup> 发酵液在  $1.0 \times 10^4 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  转速下离心 10 min, 取上清液适当稀释, 使用气相色谱法测定 1, 3-PD、乙醇、乙酸的质量浓度. 气相色谱条件: FID 检测器,  $2 \text{ m} \times \Phi 3 \text{ mm}$  不锈钢填充柱, 填料为 Chromosorb 101, 载气为  $\text{N}_2$ , 进样口温度  $250^\circ\text{C}$ , 柱温  $180^\circ\text{C}$ , 检测器温度  $250^\circ\text{C}$ , 进样量  $1 \mu\text{L}$ .

## 2 结果与讨论

### 2.1 包菌量对摇瓶培养的影响

将培养好的种子液分别稀释 1 倍、5 倍、10 倍和 50 倍后, 按胶囊制备方法加入 NaCS 后滴制胶囊,

得到含不同初始包菌量的生物微胶囊. 经 13 h 发酵, 测定囊内的菌体质量浓度、发酵液中甘油质量浓度、1, 3-PD 质量浓度并计算转化率( $n$ ), 如图 3 所示(转化率  $n$  以 1, 3-PD 和甘油量的比表征, 下同略). 从图 3 中可以看出, 当种子液稀释 5 倍后实施包埋, 可获得较高的囊内菌体量、1, 3-PD 质量浓度和转化率, 以及较低的最终甘油质量浓度. 种子菌液稀释倍数( $k$ ) 过低, 虽然能够提高囊内初始菌浓, 但会导致囊内营养物质的缺乏及有害产物的积累, 不利于菌体的生长代谢, 造成最终菌体质量浓度、1, 3-PD 质量浓度及转化率相对较低. 这样底物限制成为主要因素. 菌体一直处于饥饿状态, 其生理代谢特性受影响, 甘油质量浓度随之提高. 种子液稀释倍数过高, 则使囊内初始菌浓较低, 初始甘油消耗速率和 1, 3-PD 生产速率下降, 在 13 h 的时间内, 固体对甘油的消耗有限, 故最终甘油质量浓度也会较高. 综合考虑, 选择稀释 5 倍作为制备微胶囊时种子菌液的最优稀释倍数, 既能保证一定的初始菌浓, 又不会使菌体消耗底物过快, 引起底物的限制.

2.2 胶囊与发酵液体积比对微囊化 *K. p. pneumoniae* 摇瓶培养的影响

胶囊和发酵液的总体积保持为 100 mL, 分别根据两者体积比 1: 1, 1: 2, 1: 4, 1: 8, 调节相应的发酵液和胶囊体积. 由于微胶囊内种子菌液均稀释 5 倍, 囊内的初始菌质量浓度基本一致, 所以发酵结束时, 囊内的菌浓基本相同. 但改变微胶囊与发酵培养基体积比( $\varphi$ ) 相当于改变了发酵液的初始平均菌体质量浓度, 造成甘油消耗和 1, 3-PD 生产的差异. 微胶囊与发酵培养基体积比不同时所对应的发酵结果, 如图 4 所示. 从图 4 可以看出, 最终的囊内菌体质量浓度和转化率变化不大, 表明菌体在囊内有相似的生理代谢特性, 改变胶囊与发酵液体积比对细胞的生长影响不大. 胶囊体积与发酵液体积比的改变(更多的是由于囊内底物质量浓度不同和发酵过程中传质推动力的变化) 而引起最终的 1, 3-PD 的质量浓度的不同. 从图 4 还可知, 胶囊与发酵液体积比为 1: 2 时甘油消耗最多, 1, 3-PD 最终质量浓度和转化率最高. 因此, 选择胶囊与发酵液体积比 1: 2 为固定化细胞培养比例.

2.3 pH 值对摇瓶培养的影响

据文[10]报道, *K. p. pneumoniae* 发酵过程中的 pH 值对 1, 3-PD 的生产有着重要的影响, 在游离发酵时, 最佳 pH 值的条件为 7.0. 为了确定细胞经微囊化后, 胶囊的传质阻力是否会引起 *K. p. pneumoniae* 菌对 pH 值适应性的变化. 考察不同 pH 值条件下, 发酵 13 h 后, 菌体质量浓度、甘油质量浓度及 1, 3-PD 质量浓度的变化情况, 结果如图 5 所示. 从图 5 可知, 当 pH 值为 7.0 时, 所得到的 1, 3-PD 质量浓度和转化率均高于其他 pH 值, 说明 pH 值为 7.0 最有利于 *K. p. pneumoniae* 生长代谢. 细胞经微囊化后, 其 pH 值适应性未发生改变, 反映了微胶囊包埋细胞不会对细胞本身的生理代谢产生较大的影响, 同时也说明, 用于调节 pH 值的 KOH 等小分子溶质扩散速度很快, 胶囊的传质阻力不会造成囊内外 pH 值的梯度. 所以 pH 值对微囊化细胞生长的影响与对游离细胞生长的影响类似.

2.4 初始甘油质量浓度对摇瓶培养的影响

据文[11]报道, *K. p. pneumoniae* 发酵过程中, 底物甘油的质量浓度会对菌体的生长和 1, 3-PD 的生成产生抑制作用. 为了考察细胞经包埋后其最适甘油质量浓度是否发生改变, 比较了不同初始甘油质量

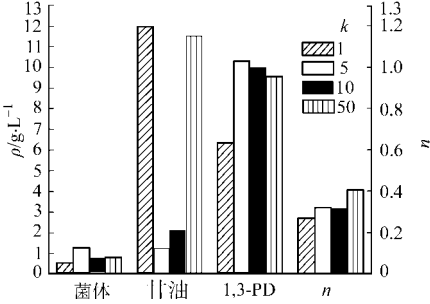


图 3 包菌量对发酵结果的影响  
Fig. 3 Effect of cell loading on fermentation results

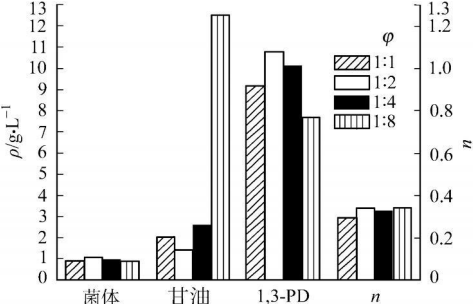


图 4 胶囊与发酵液体积比对摇瓶培养的影响  
Fig. 4 Effect of volume ratios between microcapsule and medium on results of shake flask culture

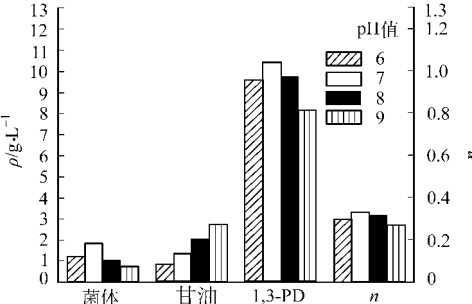


图 5 pH 值对发酵结果的影响  
Fig. 5 Effect of pH on fermentation results

浓度对 *K. p pneumoniae* 发酵的影响, 结果如图 6 所示. 由图 6 可知, 当初始甘油当初始甘油质量浓度分别为 80, 100, 120  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 发酵结束后残余甘油质量浓度较高, 不利于产品的分离. 当初始甘油质量浓度为 20  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 虽然其最终转化率最高, 但发酵液中 1, 3-PD 的质量浓度过低, 会增加产品分离的成本. 初始甘油质量浓度在 40~ 60  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  之间转化率较高, 并且 1, 3-PD 质量浓度较高, 因此, 微囊化 *K. p pneumoniae* 发酵过程中应优先选择初始甘油质量浓度为 40~ 60  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的发酵培养基. 在补料培养过程中, 也尽量维持甘油质量浓度低于 60  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 从而保证较高的 1, 3-PD/甘油转化率和 1, 3-PD 质量浓度.

### 2.5 微囊化 *K. pneumoniae* 摇瓶培养细胞生长曲线

将 *K. pneumoniae* 包埋于 NaCS/PDMDAAC 微胶囊中, 在摇瓶中进行培养, 初始甘油质量浓度为 40  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 测定囊内菌体质量浓度及底物、产物质量浓度随时间的变化, 如图 7, 8 所示. 图 7 的囊内菌体生长曲线显示, 囊内菌体经 12 h 培养可达 6.84  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 远远高于游离培养<sup>[9]</sup>时的 2.62  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ . 囊内菌体质量浓度的提高, 使得甘油消耗速率大大加快, 发酵液中的甘油质量浓度几乎以线性方式下降, 12 h 后基本耗尽, 而游离培养甘油完全消耗大约需要 27h. 由图 8 可知, 24 h 发酵结束时, 囊外发酵液中获得的 1, 3-PD 最终质量浓度为 12.8  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 转化率  $\eta$  为 41%. 若将囊内的 1, 3-PD 计算在内, 则固定化后的实际转化率为 63%. 此外, 固定化后的副产物生产情况也发生了明显的变化, 乙醇成为主要副产物, 最终质量浓度达 1.78  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ .

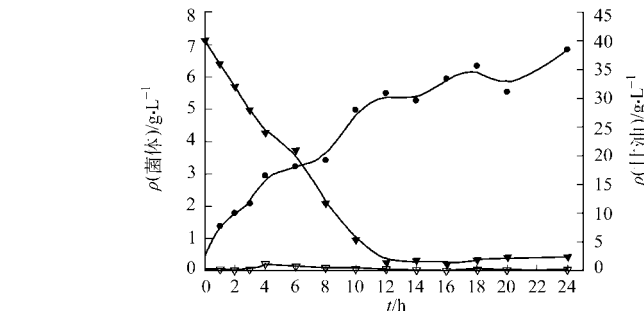


图 7 细胞生长曲线及底物质量浓度变化曲线

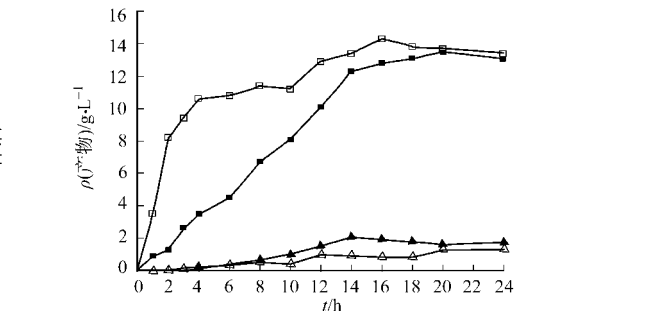


图 8 产物质量浓度变化曲线

Fig. 7 Time courses of cell growth and glycerol consumption Fig. 8 Time courses of 1,3-PD production

从图 7 囊内甘油消耗曲线还可看出, 在发酵过程中, 囊内的甘油质量浓度(0.1~ 0.3  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )一直保持在很低的质量浓度范围内. 造成囊内甘油质量浓度低的原因是, 微胶囊膜对甘油扩散具有限制作用, 以及囊内的菌体富集导致甘油消耗速率大于甘油从囊外扩散进入囊内的速率. 可见, 通过微胶囊包埋可以避免 *K. p pneumoniae* 发酵过程中存在的底物抑制问题, 因而可以采用提高初始底物质量浓度的方法来提高发酵液中的产品质量浓度. 由图 7 囊内 1, 3-PD 生成曲线可看出, 囊内 1, 3-PD 的质量浓度在发酵 3h 时迅速上升到 10.6  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 之后增长变缓, 相应的囊外发酵液中的 1, 3-PD 质量浓度一直缓慢积累, 直至发酵结束与囊内质量浓度持平. 这是由于微胶囊膜的存在影响了 1, 3-PD 向囊外扩散, 使得囊内 1, 3-PD 积累到较高质量浓度, 由此可能会产生产物抑制. 但摇瓶培养下的 1, 3-PD 仅有 13  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 远低于菌体忍受的临界产物质量浓度 71.4  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 故产物抑制在此处影响不大<sup>[12]</sup>.

NaCS/PDMDAAC 微胶囊具有良好的生物相容性<sup>[6]</sup>. 摇瓶培养实验中, 微囊化 *K. p pneumoniae* 1, 3-PD 质量浓度和转化率接近或超过游离细胞发酵, 并且囊内菌体质量浓度约是游离培养的 2.6 倍, 充分证明 NaCS/PDMDAAC 微胶囊对 *K. p pneumoniae* 具有良好的生物相容性, 适用于 1, 3-PD 的发酵生产. 固定化带来的菌体富集效应能够缩短发酵时间, 有望提高生产速率.

### 3 结束语

利用生物相容性良好的 NaCS/ PDMDAAC 生物微胶囊体系成功包埋了 *K. pneumoniae*, 其代谢特

性没有显著改变. 通过选择该微胶囊体系包埋 *K. pneumoniae*, 研究微囊化细胞发酵生产 1, 3-PD 的工艺参数, 为后续的微囊化细胞的反应器利用提供基础数据, 同时也为其他细胞的微囊化研究提供参考.

### 参考文献:

- [1] ZENG A P, BIEBL H. Bulk chemicals from biotechnology: The case of 1, 3-propanediol production and the new trends[J]. Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology, 2002, 74: 239-259.
- [2] SAINT-AMANS S, PERLIT P, GPMA G, et al. High production of 1, 3-propanediol from glycerol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 in a simply controlled fed-batch system[J]. Biotechnology Letters, 1994, 16: 832-836.
- [3] MENZEL K, ZENG A P, DECKWER W D. High concentration and productivity of 1, 3-propanediol from continuous fermentation of glycerol by *Klebsiella pneumoniae*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1997, 20: 82-86.
- [4] CHEN X, ZHANG D J, QI W T, et al. Microbial fed-batch production of 1, 3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* under micro-aerobic conditions[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003, 63: 143-146.
- [5] BIEBL H, MARTEN S. Fermentation of glycerol to 1, 3-propanediol: Use of cosubstrates[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1995, 44: 15-19.
- [6] 姚善泾. 新型生物微胶囊体系的生物相容性研究[J]. 生物工程学报, 1998, 14(2): 193-197.
- [7] 张俊, 姚善泾, 应小蛟, 等. 大孔型 NaCS-PDMDAAC 微胶囊固定化细胞在摇床和鼓泡塔中的培养研究[J]. 生物工程学报, 2005, 21(4): 633-637.
- [8] 王剑锋, 修志龙, 范圣第. 甘油转化生产 1, 3-丙二醇发酵液中甘油含量的测定[J]. 工业微生物, 2001, 31(2): 33-35.
- [9] MENZEL K, ZENG A P, BIEBL H, et al. Kinetic, dynamic, and pathway studies of glycerol metabolism by *Klebsiella pneumoniae* in anaerobic continuous culture: I. The phenomena and characterization of oscillation and hysteresis[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1996, 52: 549-560.
- [10] HOMANN T, TAG C, BIEBL H, et al. Fermentation of glycerol to 1, 3-propanediol by *Klebsiella* and *Citrobacter* strains[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1990, 33: 121-126.
- [11] 刘德华, 向波涛, 刘宏娟, 等. 1, 3-丙二醇发酵过程中底物抑制及其对策的研究[J]. 现代化工, 2002, 32(7): 34-38.
- [12] ZENG A P, ROSS A, BIEBL H, et al. Multiple product inhibition and growth modeling of *Clostridium butyricum* and *Klebsiella pneumoniae* in glycerol fermentation[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1994, 44: 901-911.

## Primary Study on Culture of Encapsulated *Klebsiella pneumoniae* for Production of 1, 3-Propanediol in Shaking Flask

CHEN Guo, CHEN Hong-wen, PENG Yi-qiang, FANG Bai-shan

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Fujian Province University, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

**Abstract:** A novel biocapsule system composed of NaCS/ PDMDAAC (sodium cellulose sulfate/ poly[ dimethyl( diallyl) ammonium chloride]) was used to encapsulate the *Klebsiella pneumoniae* ZJU 5205 for the production of 1, 3-propanediol. The effects of initial cell loading in capsules, volume ratio of capsules to medium, pH value of medium and initial glycerol concentration on the fermentation results were investigated. The better results were obtained at the following conditions: the concentration of seed culture was diluted to one fifth to encapsulate; volume ratio of capsules to medium was 1/2; initial pH was 7.0; initial concentration of glycerol was  $60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ . The cell growth, glycerol consumption, 1, 3-propanediol accumulation by encapsulated *Klebsiella pneumoniae* in capsules and in medium were described. The results showed that lower concentration of substrate in capsules which is caused by diffusion limitation of capsule membrane could partially overcome the inhibition of glycerol on cell growth and 1, 3-propanediol producing.

**Keywords:** biocapsule; cell immobilization; *Klebsiella pneumoniae*; 1, 3-propanediol

(责任编辑: 黄仲一 英文审校: 陈国华)