

研究报告

克雷伯氏肺炎杆菌 LDH526 产 1,3-丙二醇的甘油自动流加策略

黄金海, 陈振, 孙燕, 刘德华

清华大学化学工程系应用化学研究所, 北京 100084

黄金海, 陈振, 孙燕, 等. 克雷伯氏肺炎杆菌 LDH526 产 1,3-丙二醇的甘油自动流加策略. 生物工程学报, 2015, 31(10): 1520–1527.

Huang JH, Chen Z, Sun Y, et al. Automatically feeding strategy for 1,3-propanediol fermentation of *Klebsiella pneumoniae* LDH526. Chin J Biotech, 2015, 31(10): 1520–1527.

摘要: 1,3-丙二醇是一种重要的化工原料, 主要作为平台化合物用于合成聚酯, 如聚对苯二甲酸丙二醇酯。经基因工程改造的克雷伯氏肺炎杆菌 LDH526 能以甘油作为唯一碳源合成 1,3-丙二醇, 最终发酵浓度超过 90 g/L。甘油浓度是影响 1,3-丙二醇合成的关键因素。为了实现对甘油浓度的精确控制, 设计并优化了基于发酵动力学的甘油自动流加策略。通过将底物流加速率与易观察变量 pH 和发酵时间偶联, 实现了发酵过程中甘油流加的自启动和甘油浓度的动态控制。发酵 72 h, 1,3-丙二醇的浓度可稳定超过 95 g/L。自动控制甘油流加的发酵过程具有可重复性、连续性以及人工工作量少的特点, 有望从实验室规模扩大到生产规模。

关键词: 克雷伯氏肺炎杆菌, 1,3-丙二醇, 流加策略, 自动控制

Automatically feeding strategy for 1,3-propanediol fermentation of *Klebsiella pneumoniae* LDH526

Jinhai Huang, Zhen Chen, Yan Sun, and Dehua Liu

Institute of Applied Chemistry, Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China

Abstract: 1,3-propanediol is an important chemical used as building block for the synthesis of highly promising polyesters such as polytrimethylene terephthalate. A genetically modified *Klebsiella pneumoniae* LDH526 can use glycerol

Received: November 16, 2014; **Accepted:** February 26, 2015

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 21406131).

Corresponding author: Zhen Chen. Tel/Fax: +86-10-62782654; E-mail: zhenchen2013@mail.tsinghua.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 21406131) 资助。

网络出版时间: 2015-03-25

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20150325.1121.002.html>

as sole carbon source and produce 1,3-propanediol with the titer above 90 g/L. A key factor affecting the production of 1,3-propanediol by the mutant *K. pneumoniae* is the accurate control of the feeding of glycerol. To generate a robust and reproducible fermentation process of 1,3-propanediol, we designed and optimized an automatically feeding strategy of glycerol based on fermentation kinetics. By coupling the substrate feeding rate with easily observed variables -pH and fermentation time, we have achieved self-starting glycerol feeding and dynamic control of the glycerol concentration during the fermentation process. This automated system allowed us to generate a reproducible, consistent and operator-independent process from lab-scale to production scale. The final concentration of 1,3-propanediol was above 95 g/L after 72 h.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, 1,3-propanediol, feeding strategy, automatic control

1,3-丙二醇 (1,3-Propanediol, 简称 PDO) 是一种重要的平台化合物, 广泛应用于聚酯、食品、医药、化妆品、溶剂等行业^[1-2]。1,3-丙二醇最重要的用途是作为单体用于合成聚对苯二甲酸丙二醇酯 (PTT), PTT 是一种新型的聚酯化学纤维, 在工程塑料、纺织、家具和地毯等领域应用广泛, 发展前景广阔^[3-5]。1,3-丙二醇的合成方法有化学合成法和微生物发酵法^[6]。微生物发酵法利用可再生资源生产 1,3-丙二醇具有许多优点, 如反应条件温和、操作简单、原料可再生且价格低廉等, 受到国内外的广泛关注^[4-7]。

在天然的 PDO 生产菌株中, 克雷伯氏肺炎杆菌是最具生产潜力的菌株之一^[8-9]。本研究组自主筛选的克雷伯氏肺炎杆菌 HR526^[10]是目前文献报道的 PDO 高产菌株之一, PDO 最终发酵浓度可超过 90 g/L。在利用克雷伯氏肺炎杆菌发酵甘油生产 1,3-丙二醇的过程中, 甘油浓度的精确调控是影响 PDO 合成的重要因素之一^[11]。甘油浓度过高会引起中间代谢产物 3-羟基丙醛 (3-HPA) 的高浓度积累, 3-HPA 具有细胞毒性, 能抑制菌体的生长和甘油的代谢, 导致发酵过程的异常终止^[12-14]。降低甘油浓度可以降低 3-HPA 的积累, 但较低的甘油浓度同时会降低 PDO 的合成速率和最终产量。以 3-HPA 的浓度为指导, 可以控制甘油浓度在合适的范围内,

防止 3-HPA 的积累, 保证发酵过程的安全性并提高 PDO 的产量^[11]。由于甘油浓度不能在线检测, 人工反馈流加补料工作量大, 因此, 建立合适的甘油自动流加策略对于 PDO 的工业化生产具有重要意义。在补料分批发酵过程中, 常见的底物浓度控制策略有恒速流加、脉冲流加、指数流加^[15-16]等。相比于开环控制, 存在反馈作用的闭环模型可以精确控制底物浓度, 如 pH 反馈模型^[17-18]、生物量反馈模型^[17]、溶氧 (DO) 反馈模型^[18]、底物直接反馈模型^[19]及 pH 和生物量二元函数模型^[20]等。本文采用的菌株为克雷伯氏肺炎杆菌 HR526 乳酸缺陷菌株 LDH526^[21], 由于不同菌株发酵特性不同, 采用上述流加方式在 LDH526 的流加发酵过程中都不能很精确地控制甘油浓度, 满足发酵过程的要求。针对克雷伯氏肺炎杆菌 LDH526 的发酵特性, 本研究根据发酵动力学模型, 将甘油流加速率与碱液流加速率和发酵时间相偶联, 提出了甘油的自动流加策略并搭建了自动流加装置, 实现了甘油流加的自启动和甘油浓度的精确控制。

1 模型建立

1.1 底物流加自启动模型的建立

在补料分批发酵中, 底物流加通常是在初

始底物接近消耗完全时人工开启。由于甘油浓度不能快速在线检测，人工操作难以合适地把握甘油的流加时机。通过观察底物不足时的现象，本文建立了在特定甘油浓度下开启甘油流加的自启动模型。当甘油不足时，细胞生长代谢减缓，产酸速率降低，在 pH 恒定的发酵过程中，对应的碱液流加速率下降。通过在线检测碱泵开度值，当碱泵开度下降并且达到某个数值时开启甘油流加，实现在合适的甘油浓度范围内开启甘油流加。

1.2 底物流加速率模型的建立

根据微生物基质消耗动力学^[22]，基质消耗分别用于细胞生长、产物生成和维持代谢：

$$\frac{dS}{dt} = \frac{1}{y_{x/s}} \cdot \frac{dX}{dt} + m_x \cdot X + \frac{1}{y_{p/s}} \cdot \frac{dP}{dt} \quad (1)$$

其中 S 、 t 、 $y_{x/s}$ 、 X 、 m_x 、 $y_{p/s}$ 和 P 分别为底物消耗量(g/L)、发酵时间 (h)、菌体对基质的得率系数、总生物量 (g/L)、维持常数 (h)、产物对基质的得率系数 (g/g) 和总产物浓度 (g/L)。

根据宋志远等^[20]的推导和简化，底物流加速率 F_1 (g/h) 与碱液流加速率 F_2 (g/h) 和生物量的关系为：

$$F_1 = aF_2 + bX + c \frac{dX}{dt} \quad (2)$$

其中 a 、 b 、 c 为常数，通过发酵数据拟合得到。

在克雷伯氏杆菌发酵产 1,3-丙二醇的发酵过程中，98%以上的甘油用于维持细胞的生命活动和生成代谢产物，细胞生长所占比例很小^[20]，即 $c \frac{dX}{dt} = 0$ ，式 (2) 简化为：

$$F_1 = aF_2 + bX \quad (3)$$

在菌体对数生长期，生物量 X 可采用指数生长模型表示：

$$X = k \cdot \exp(d \cdot t) \quad (4)$$

在稳定期， X 为常数，令 $bX=m$ ，得到对数生长期和稳定期的底物流加模型：

$$\begin{cases} F_1 = aF_2 + bk \cdot \exp(d \cdot t) & (\text{对数期}) \\ F_1 = aF_2 + m & (\text{稳定期}) \end{cases} \quad (5)$$

2 材料与方法

2.1 实验材料

实验所用菌种为实验室自主筛选和改造的克雷伯氏肺炎杆菌乳酸缺陷株 LDH526。种子培养基和发酵培养基参照文献^[11]，发酵培养基初始甘油浓度为 20 g/L，使用前均在 121 °C 下灭菌 20 min。

2.1.1 种子培养

在 LB 斜面 30 °C 活化种子 12 h，再接种于含 100 mL 种子培养液的 250 mL 锥形瓶中，在 37 °C、150 r/min 摇床中培养 12 h。

2.1.2 发酵培养

发酵在 5 L 自控 pH 发酵罐中进行，装液量为 4 L，接种量 1% (V/V)，温度 37 °C，搅拌速度 250 r/min，采用质量分数为 30% 的 NaOH 溶液维持 pH 为 6.5，通气量 0.5 vvm。在人工反馈补料发酵实验中，每隔一段时间检测甘油浓度，根据甘油浓度和甘油消耗量调整甘油流加速率，控制甘油浓度在合适的范围内。

甘油自动流加发酵实验采用甘油流加与碱液流加和发酵时间相偶联的变速流加方式。流加装置简易图见图 1。发酵罐通过 pH 电极 2 在线检测 pH 值，碱液流加泵 4 自动流加碱液维持 pH 的恒定。计算机记录并存储碱泵开度值，通过流加模型自动控制底物流加泵 5，从而实现甘油流加的自动化。

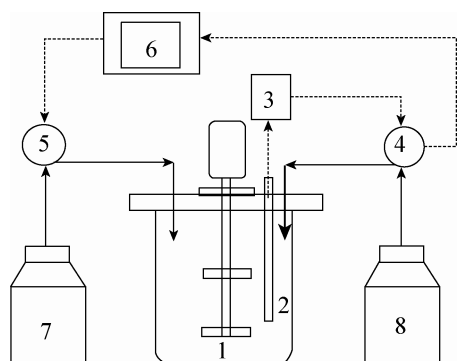


图 1 甘油自动流加发酵装置

Fig. 1 The device of automatically feeding fed-batch fermentation. 1: fermenter; 2: pH sensor; 3: electric control unit; 4: alkali liquor feeding pump; 5: glycerol feeding pump; 6: computer; 7: glycerol tank; 8: alkali liquor tank.

2.1.3 分析方法

菌体浓度以 OD_{650} 表示, 底物甘油及代谢产物 1,3-丙二醇、2,3-丁二醇、丁二酸、乳酸、乙酸和乙醇浓度采用高效液相色谱测定, 测定方法参考文献[23]。

发酵生产 PDO 的中间代谢产物 3-羟基丙醛采用比色法测定, 测定方法参考文献[24]。

3 结果与讨论

在克雷伯氏肺炎杆菌 LDH526 产 1,3-丙二醇的过程中, 发酵的顺利进行及 PDO 的最终浓度与甘油的流加速率和 3-HPA 的积累密切相关。以 3-HPA 的浓度为指导, 前期的人工补料发酵实验对发酵过程中合适的甘油浓度进行了探索, 结果表明, 甘油流加存在 3 个关键阶段: 在发酵前期 (6–10 h), 初始甘油接近消耗完成, 3-HPA 逐渐积累。菌体在该阶段对甘油浓度非常敏感, 稍高的甘油浓度即导致 3-HPA 的高浓度积累, 因此, 必须在合适的时间节点以合适

的速度开启甘油流加, 保证甘油浓度在 1–3 g/L 之间; 在发酵的第二阶段 (10–14 h), 3-HPA 积累接近峰值, 甘油浓度需要控制在较低的浓度 (6 g/L 以下); 在发酵的第三阶段 (14–24 h), 3-HPA 的积累减弱, 需要逐渐提高甘油浓度以促进 PDO 的合成。由于人工反馈控制存在延迟性, 无法保证每批次发酵的顺利进行, 并且存在重复性差、工作量大等问题, 本文针对甘油流加时机和流加速率进行深入的研究。

3.1 甘油流加的自启动

在甘油流加开启时 (6–7 h), 初始甘油接近消耗完成 (甘油浓度在 1 g/L 左右), 流加过早开启会导致甘油浓度维持在较高水平, 3-HPA 迅速积累。流加开启滞后, 较低浓度的甘油在极短时间内即消耗完成, 出现底物不足现象, 直接影响菌体的发酵性能和 PDO 的最终产量。在人工补料反馈调节中, 通过不断检测甘油浓度, 推断甘油消耗速率来开启甘油流加, 该方法不仅工作量大, 而且由于检测的延迟性以及不同批次发酵条件的不平行性, 不能实现甘油流加在合适的时机开启。

在发酵过程中发现, 当底物不足时, 菌体生长和代谢变缓, 产酸速率变慢, 碱液流加速度下降。当底物浓度为零时, 菌体停止产酸, 碱液流加泵停止加碱。碱液流加速度间接反映了发酵液中甘油浓度的变化。通过采集碱泵开度, 得到碱泵开度平均值随时间的变化曲线 (图 2)。从图中可以看出, 在批式发酵中, 随着产酸量的增大, 碱泵的开度随之增大, 在 6 h (360 min) 左右达到最大值; 当底物不足时, 碱泵的开度迅速下降; 随着甘油流加的开启, 碱泵的开度又迅速上升。

通过在流加开启时机 (6–7 h) 附近密集取样并检测甘油浓度,发现甘油浓度在 1 g/L 左右时,碱泵开度值下降到最大值的 80%–85%。因此,研究中设定当碱泵开度下降到最大值的 85%时,通过计算机控制,自动开启甘油流加。实验结果见图 3。多次重复实验显示,当发酵进行到 6.5–6.8 h,甘油流加自动开启,相应时刻的甘油浓度维持在 0.53–1.22 g/L 之间,从而保证了发酵的顺利进行。

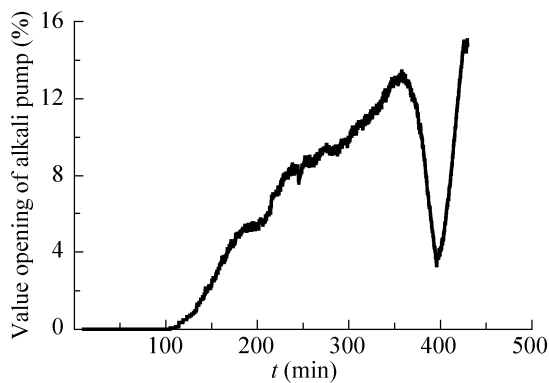


图 2 碱泵开度随时间变化曲线

Fig. 2 Time courses of valve opening of alkali liquor feeding pump.

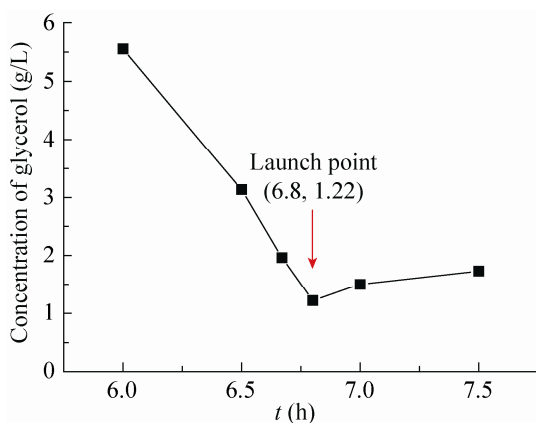


图 3 流加时机附近甘油浓度变化曲线

Fig. 3 Time courses of glycerol concentration nearby the launch point.

3.2 底物流加模型参数的确立

根据多批次人工反馈补料发酵数据,利用 0–14 h 的 OD 值,得到菌体指数增长的拟合公式为:

$$X = 2.462 \exp(0.132t) \quad (6)$$

不同时期的甘油消耗速率拟合公式为:

$$F_1 = 4.869F_2 + 6.356 \exp(0.132t) \text{ (对数期)} \quad (7)$$

$$F_1 = 18.95F_2 + 4.20 \text{ (稳定期)} \quad (8)$$

在发酵的稳定期,通过调整公式 (8) 中常数项的大小,可以实现甘油浓度以不同的速率增加。

3.3 对数生长期流加模型的验证

在对数生长期,3-HPA 极易积累,必须控制甘油的流加速度,使甘油维持在较低浓度 (6 g/L 以下)。甘油流加自动开启后,采用公式 (7) 流加甘油。在不同批次实验中,对数生长期甘油流加自动控制结果如图 4 所示。由图 4A 可知,甘油浓度在批式发酵的终点 (第 7 h 左右) 达到

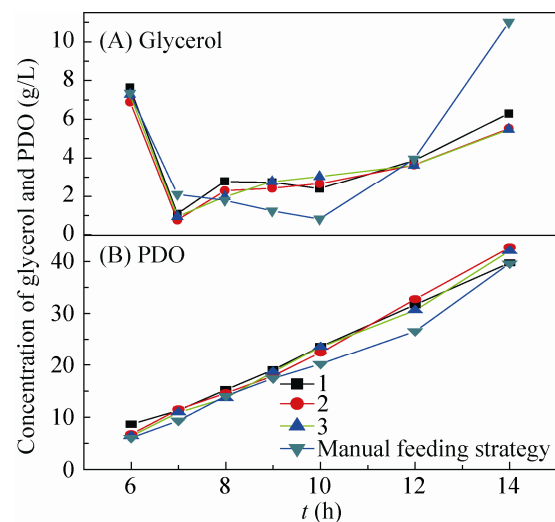


图 4 6–14 h 甘油浓度 (A) 和 PDO 浓度 (B) 随时间的变化

Fig. 4 Time courses of glycerol concentration (A) and PDO concentration (B) during 6–14 h. 1–3 represent different fermentation batches.

较低水平 (1 g/L 左右), 通过开启甘油流加, 甘油浓度逐渐上升, 7–12 h 维持在 1–3 g/L, 14 h 上升至 5–6 g/L。对比人工反馈调节结果, 自动流加控制的甘油浓度变化更加平稳, 3-HPA 的浓度 (数据未列出) 维持在较低水平, 保证了发酵过程的安全性。由图 4B 可以看出, 在对数生长期 PDO 以较快的速率增长, 实验结果超过人工反馈调节的最佳结果, 说明甘油浓度在对数生长期得到合理控制。

3.4 稳定期不同甘油浓度发酵实验

在发酵稳定期, 3-HPA 的积累下降, 甘油浓度的变化不会造成菌体的死亡, 但甘油浓度影响 PDO 的生成速率, 逐渐提高甘油浓度有利于促进 PDO 的合成。人工补料发酵实验表明, 发酵进行到 14–16 h, OD_{650} 达到最大值 (OD_{650} 为 12–14), 此后细胞即进入稳定期。为了研究发酵稳定期甘油流加合适速率, 调整式 (8) 中常数项的大小, 改变发酵液中的甘油浓度。以 OD_{650} 达到最大值的时间点为对数期和稳定期的分界点, 分别考察甘油以 3 种不同速率提高时 PDO 合成的变化。如图 5A 所示, 1、2、3 批次分别对应以下 3 种甘油流加速率: 1) 甘油浓度以恒定速率 1 g/(L·h) 提高, 即 $m=8.20$ 时; 2) 不断改变 m 值, 使甘油浓度以较快速率增长, 而又不致于出现 3-HPA 的积累; 3) 甘油浓度以恒定速率 2 g/(L·h) 提高, 即 $m=12.20$ 。图 5B 中 PDO 浓度的变化表明稳定期时逐渐提高甘油浓度有利于 PDO 的生成, 过低和过高的甘油浓度都不利于 PDO 的快速积累。当甘油浓度以恒定速率 2 g/(L·h) 提高, 稳定期甘油浓度维持在 20–40 g/L 时, PDO 增长速率较快, 72 h 时 PDO 的浓度达 95.25 g/L。以上实验结果表明, 通过合理地选择时间节点并调整式 (8) 中的常数

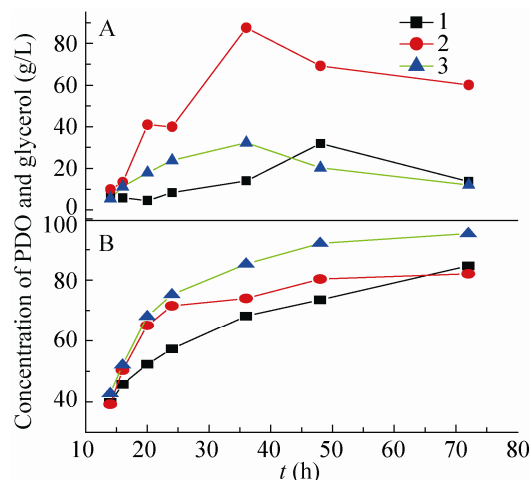


图5 甘油 (A) 及对应的 PDO (B) 浓度随时间的变化
Fig. 5 Time courses of glycerol concentration (A) and corresponding PDO concentration (B). 1–3 represent different feeding rate of glycerol.

项, 可以实现甘油浓度以合适的速率增加, 保证稳定期甘油浓度在合适的范围内。

3.5 甘油自调控条件下副产物的分布

整个发酵过程中, 采用自动控制装置分两阶段流加甘油, 在对数生长期 (7–14 h) 使甘油浓度保持在较低水平 (6 g/L 以下)。从对数生长期过渡到稳定期时, 甘油浓度稳步上升 (至 20 g/L 左右), 稳定期甘油浓度维持在 20–40 g/L, 最终 PDO 产量在 95 g/L 以上, 甘油的摩尔转化率达到 0.51–0.54, 与 Homann 等^[8]报道的值相当。整个发酵过程中, 各种主要产物 (PDO、2,3-BDO、乙酸、丁二酸、乙醇) 的合成如图 6 所示。结果显示, 副产物 2,3-BDO 的浓度在 33 g/L 左右, 丁二酸浓度和乙酸的浓度分别在 18 g/L 和 8 g/L 左右, 乙醇在 5 g/L 左右。前期发酵实验还表明, 稳定期控制甘油浓度在较低水平 (10–15 g/L), 乙醇的生成量增加, 最高可达 17 g/L 左右, 相应的甘油摩尔转化率降低为 0.47。因此, 在对数生长期后期至稳定期提高甘油浓度, 不仅有利于 PDO 的快速生成, 也有利于减少副产物的积

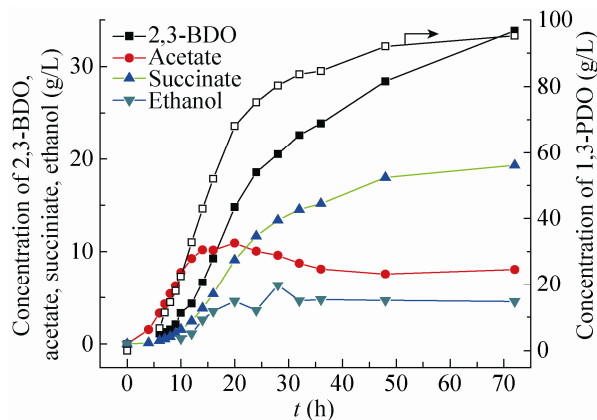


图6 自动控制甘油流加发酵过程中 PDO、2,3-BDO、乙酸、丁二酸和乙醇浓度随时间的变化

Fig. 6 Time courses of PDO, 2,3-BDO, acetate, succinate and ethanol concentration during fed-batch fermentation under automatic feeding strategy.

累, 提高甘油转化率。而在对数生长期, 必须防止 3-HPA 的积累, 故控制甘油浓度在较低水平。由于该时间段非常短 (7 h 左右), 因此对整个过程中副产物的分布影响很小。在对数生长期, 以 3-HPA 和 PDO 的浓度来指导甘油浓度的控制, 在稳定期, 以副产物和 PDO 生成速率来确定甘油的浓度范围, 既可以保证发酵过程的顺利进行, 又可以进一步降低副产物的产量, 提高甘油的转化率。

4 结论

本文基于对克雷伯氏肺炎杆菌 LDH526 发酵特性的研究, 提出了批式发酵过程中的甘油自动流加策略。根据碱液流加速率的变化, 设定碱泵开度下降到最大值的 80%–85% 时, 开启甘油流加, 实现了甘油流加的自启动。由于菌体在对数生长期和稳定期对甘油浓度要求不同, 采用两段流加模型自动控制甘油浓度在合适的范围内, 实现了整个发酵过程中甘油流加的全自动, 最终 PDO 的产量在 95 g/L 以上。与国内报道的甘油流加策略^[19-20]相比, 本文基于克

雷伯氏肺炎杆菌 LDH526 的发酵特性, 甘油流加分两段控制: 对数生长期要求较低的甘油浓度, 允许波动范围小 (1–3 g/L), 而其他文献报道的甘油浓度控制在较大范围 (10–20 g/L); 发酵稳定期通过提高甘油的流加速度, PDO 的终产量超过 95 g/L, 这一产量远高于其他文献报道值, 该实验结果将有望从实验室规模扩大到生产规模。

REFERENCES

- [1] Huang H, Gong CS, Tsao GT. Production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae*. Appl Biochem Biotechnol, 2002, 98–100: 687–698.
- [2] Saxena RK, Anand P, Saran S, et al. Microbial production of 1,3-propanediol: recent developments and emerging opportunities. Biotechnol Adv, 2009, 27(6): 895–913.
- [3] Zeng AP, Bieb H. Bulk chemicals from biotechnology: the case of 1,3-propanediol production and the new trends. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2002, 74: 239–259.
- [4] Feng JW, Zhang HL, Jiang LS, et al. The study on the synthesis of 1,3-propanediol. Sci Technol Chem, 2002, 10(6): 43–47 (in Chinese).
冯婧微, 张洪林, 蒋林时, 等. 1,3-丙二醇合成方法研究. 化工科技, 2002, 10(6): 43–47.
- [5] Feng KK, Lü ZG, Li Q. Research progress in synthesis technology of 1,3-propanediol. Chin Synth Fiber Ind, 2007, 30(4): 46–49 (in Chinese).
冯看卡, 吕志果, 李强. 1,3-丙二醇制备工艺技术研究进展. 合成纤维工业, 2007, 30(4): 46–49.
- [6] Summerfield FW, Tappel AL. Cross-linking of DNA in liver and testes of rats fed 1,3-propanediol. ChemBiol Inter, 1984, 50(1): 87–96.
- [7] Kurian JV. A new polymer platform for the future-Sorona® from corn derived 1,3-propanediol. J Polym Environ, 2005, 13(2): 159–167.
- [8] Homann T, Tag C, Biebl H, et al. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella* and *Citrobacter* strains. Appl Microbiol Biotechnol, 1990, 33 (2): 121–126.
- [9] Celińska E. *Klebsiella* spp. as a 1,3-propanediol

- producer-the metabolic engineering approach. *Cri Rev Biotechnol*, 2012, 32(3): 274–288.
- [10] Chen Z, Zheng ZM, Sun Y, et al. Fermentation characteristics of the fast conversion of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* HR526. *Microbiol China*, 2009, 36(6): 799–803 (in Chinese). 陈珍, 郑宗明, 孙燕, 等. 克雷伯氏肺炎杆菌 HR526 快速合成 1,3-丙二醇发酵特性研究. *微生物学通报*, 2009, 36(6): 799–803.
- [11] Hao J, Lin RH, Zheng ZM, et al. 3-Hydroxypropionaldehyde guided glycerol feeding strategy in aerobic 1,3-propanediol production by *Klebsiella pneumoniae*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2008, 35(12): 1615–1624.
- [12] Barbirato F, Grivet JP, Soucaille P, et al. 3-Hydroxypropionaldehyde, an inhibitory metabolite of glycerol fermentation to 1,3-propanediol by *Enterobacteriaceae* species. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62(4): 1448–1451.
- [13] Chen Z, Liu HJ, Liu DH. Regulation of 3-hydroxypropionaldehyde accumulation in *Klebsiella pneumoniae* by overexpression of *dhaT* and *dhaD* genes. *Enzyme Microb Technol*, 2009, 45(4): 305–309.
- [14] Chen Z, Liu HJ, Liu DH. Metabolic pathway analysis of 1,3-propanediol production with a genetically modified *Klebsiella pneumoniae* by overexpressing an endogenous NADPH-dependent alcohol dehydrogenase. *Biochem Eng J*, 2011, 54(3): 151–157.
- [15] Cheng KK, Sun Y, Liu WB, et al. Effect of feeding strategy on 1,3-propanediol fermentation with *Klebsiella pneumoniae*. *Food Ferm Ind*, 2004, 30(4): 1–5 (in Chinese). 程可可, 孙燕, 刘卫斌, 等. 底物流加策略对发酵法生产 1,3-丙二醇的影响. *食品与发酵工业*, 2004, 30(4): 1–5.
- [16] Aulicino J, Hermida M, Medina R, et al. Developing an automatically controlled feeding process in an *E. coli* fermentation process for recombinant protein production. *Biopharm Int*, 2010, 6: 2–7.
- [17] Lee SY. High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol*, 1996, 14(3): 98–105.
- [18] Duan SB, Shi ZP, Feng HJ, et al. An on-line adaptive control based on DO/pH measurements and ANN pattern recognition model for fed-batch cultivation. *Biochem Eng J*, 2006, 30(1): 88–96.
- [19] Tan TW, Wu JX, Li Z, et al. An intermediate metabolite feedback strategy to control the substrate concentration in the production of 1,3-propanediol: CN, 101153292B. 2008-04-02 (in Chinese). 谭天伟, 吴家鑫, 李政, 等. 一种中间代谢物反馈控制底物浓度生产 1,3-丙二醇的方法: 中国, 101153292B. 2008-04-02.
- [20] Song ZY, Teng H, Xiu ZL. Coupled-feeding strategy based on the cell growth and metabolism during 1,3-propanediol fermentation. *Chin J Process Eng*, 2012, 12(6): 996–1001 (in Chinese). 宋志远, 滕虎, 修志龙. 基于生长代谢耦联的 1,3-丙二醇发酵过程底物流加控制策略. *过程工程学报*, 2012, 12(6): 996–1001.
- [21] Xu YZ, Guo NN, Zheng ZM, et al. Metabolism in 1,3-propanediol fed-batch fermentation by a D-lactate deficient mutant of *Klebsiella pneumoniae*. *Biotechnol Bioeng*, 2009, 104(5): 965–972.
- [22] Yu JT, Gu QF, Ye Q. *Biochemical Engineering*. Beijing: Chemical Industry Press, 1991: 58–65 (in Chinese). 俞俊棠, 顾其丰, 叶勤. *生物化学工程*. 北京: 化学工业出版社, 1991: 58–65.
- [23] He L, Zhao XB, Sun Y, et al. Optimization of continuous fermentative production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae*. *Food Ferm Ind*, 2012, 38(8): 23–28 (in Chinese). 贺璐, 赵雪冰, 孙燕, 等. *Klebsiella pneumoniae* 连续发酵生产 1,3-丙二醇的工艺优化. *食品与发酵工业*, 2012, 38(8): 23–28.
- [24] Circle SJ, Stone L, Boruff CS. Acrolein determination by means of tryptophane: a colorimetric micro method. *Ind Eng Chem Anal Ed*, 1945, 17(4): 259–262.

(本文责编 郝丽芳)