

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2017 年 12 月 21 日 (21.12.2017)



(10) 国际公布号
WO 2017/214873 A1

(51) 国际专利分类号:

C12P 7/16 (2006.01) **C07C 45/81** (2006.01)
C12P 7/28 (2006.01) **C12R 1/19** (2006.01)
C07C 31/12 (2006.01) **C12R 1/145** (2006.01)
C07C 49/08 (2006.01)

TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(21) 国际申请号: PCT/CN2016/085818

(22) 国际申请日: 2016 年 6 月 15 日 (15.06.2016)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 大连理工大学(DALIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY) [CN/CN]; 中国辽宁省大连市高新区凌工路2号, Liaoning 116024 (CN)。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

(72) 发明人: 薛闯(XUE, Chuang); 中国辽宁省大连市高新区凌工路2号大连理工大学生命科学与技术学院215房间, Liaoning 116024 (CN)。 朱超(ZHU, Chao); 中国辽宁省大连市高新区凌工路2号大连理工大学生命科学与技术学院215房间, Liaoning 116024 (CN)。 陈丽杰(CHEN, Lijie); 中国辽宁省大连市高新区凌工路2号大连理工大学生命科学与技术学院215房间, Liaoning 116024 (CN)。

(74) 代理人: 中科专利商标代理有限责任公司(CHINA SCIENCE PATENT & TRADEMARK AGENT LTD.); 中国北京市海淀区西三环北路87号4-1105室, Beijing 100089 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH,

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR PRODUCING BUTANOL BY FERMENTATION COUPLING AND SEPARATION AND PURIFICATION

(54) 发明名称: 一种发酵耦合分离纯化生产丁醇的方法及装置

(57) Abstract: Provided is a method for separating and purifying butanol, acetone and ethanol or purifying butanol by fermentation coupling, comprising the following steps: 1) fermenting using an acetone and butanol-producing bacteria to obtain butanol, acetone and ethanol or using a butanol-producing bacteria to obtain butanol; and 2) separating and purifying butanol, acetone and ethanol on-line or purifying butanol from the fermentation broth by using a vaporization permeation method. The method of the present invention improves the production and separation and the purification efficiency of butanol, acetone and ethanol or butanol.

(57) 摘要: 提供了一种发酵耦合分离纯化丁醇、丙酮和乙醇或纯化丁醇的方法, 包括以下步骤: 1)利用丙酮丁醇生产菌发酵得到丁醇、丙酮和乙醇或利用丁醇生产菌得到丁醇; 2)采用汽化渗透法从发酵液在线分离纯化丁醇、丙酮和乙醇或纯化丁醇。本发明的方法提高了丁醇、丙酮和乙醇或丁醇的生产和分离提纯效率。



WO 2017/214873 A1

一种发酵耦合分离纯化生产丁醇的方法及装置

技术领域

本发明涉及一种发酵耦合分离纯化生产丁醇、丙酮和乙醇(或丁醇)的方法,属于生物技术领域。

背景技术

丁醇和丙酮作为一种潜在的液体能源和应用于医药和食品行业的重要化学品,可以通过微生物发酵法获得,详见文献:Dürre, P. Biobutanol: an attractive biofuel. *Biotechnol. J.* 2: 1525–1534, 2007。但是用丙酮丁醇梭菌或拜式梭菌发酵生产丁醇时,发酵液中终点的丁醇浓度通常不超过 2.0% (w/v)。并且,丁醇的沸点为 117.7℃,高于水的沸点 100℃。因此,如果利用传统的精馏或蒸馏分离法,其分离成本极高,经济上是不可行,很难实现工业化生产(Matsumura, M., Kataoka, H., Sueki, M., Araki, K. Energy saving effect of pervaporation using oleyl alcohol liquid membrane in butanol purification. *Bioprocess Eng.* 3: 93-100, 1988)。

可替代性分离技术如液-液萃取、气提、吸附和渗透汽化等,可以通过在发酵过程中不断移除并回收对细胞产生抑制的产物丁醇,可以提高发酵效率,是提高生物法生产丁醇的有效技术(Xue C, Zhao JB, Chen LJ, Bai FW, Yang ST, Sun JX. Integrated butanol recovery for an advanced biofuel: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98:3463–3474.; Qureshi, N., Meagher, M.M., Huang, J.C., Hutkins, R.W. Acetone butanol ethanol (ABE) recovery by pervaporation using silicalite-silicone composite membrane from fed-batch reactor of *Clostridium acetobutylicum*. *J. Membr. Sci.* 187: 93-102, 2001)。但是目前利用这些分离技术进行分离,主要的问题是分离效率低,分离产物浓度低,仍然需要进一步对技术进行优化和对产物进行脱水处理。

发明内容

基于现有技术中存在的上述问题,本发明利用汽化渗透法耦合发酵生产丁醇、丙酮和乙醇(或丁醇),在发酵的过程中在线分离纯化丁醇、丙酮和乙醇(或丁醇)。

本发明具体涉及以下各项:

1. 一种发酵耦合分离纯化丁醇、丙酮和乙醇或纯化丁醇的方法,所述方法包括以下步骤:

- 1) 利用丙酮丁醇生产菌或丁醇生产菌发酵得到丁醇、丙酮和乙醇或得到丁醇;
- 2) 采用汽化渗透法从发酵液在线分离纯化丁醇、丙酮和乙醇;

其中所述汽化渗透法包括以下步骤:

- a. 向发酵液中通入气泡,使丁醇、丙酮和乙醇或使丁醇汽化;
- b. 使气泡中的气体夹带汽化的丁醇、丙酮和乙醇或汽化的丁醇进入膜分离装置内并透过膜;
- c. 回收所述丁醇、丙酮和乙醇或回收所述丁醇,或进入下一级分离装置。

2. 根据 1 所述的方法, 其中所述气泡的来源为丙酮丁醇生产菌或丁醇生产菌的自产气体或外源气体, 所述自产气体优选为二氧化碳和/或氢气, 所述外源气体优选为氮气。

3. 根据 1 所述的方法, 其中所述丙酮丁醇生产菌优选选自丙酮丁醇梭菌 (*Clostridium acetobutylicum*)、拜式梭菌 (*Clostridium beijerinckii*)、大肠杆菌或酪丁酸梭菌 (*Clostridium tyrobutyricum*) 以及这些菌株的基因工程改造菌, 优选为丙酮丁醇梭菌, 所述丁醇生产菌为产丁醇的基因工程菌, 优选为产丁醇大肠杆菌或产丁醇梭菌。

4. 根据 1 所述的方法, 其中所述膜为汽化渗透膜, 优选为丁醇和丙酮高选择性有机疏水分离膜或有机无机复合膜, 更优选选自硅橡胶、聚三甲基硅丙炔、聚丙烯、聚丁二烯、聚偏氟乙烯、聚四氟乙烯或其衍生物、丁腈橡胶、或分子筛材料中的至少一种, 最优选为含 PDMS 的复合膜, 所述膜的类型优选为管式、卷式、平板或中空纤维膜形式。

5. 根据 1 所述的方法, 其中所述回收通过冷凝进行, 所述冷凝优选采用装置冷凝或液氮或冷凝水冷凝, 其中装置冷凝的温度为 -30-+15℃。

6. 根据 1 所述的方法, 其中所述气泡从生物反应器底部通入, 通气比为 0.5-5 vvm。

7. 根据 1 所述的方法, 所述膜分离装置的膜透过液一侧保持真空度为 0-10 kpa, 优选 <5 kpa。

8. 一种用于发酵耦合分离纯化丁醇、丙酮和乙醇或纯化丁醇的装置, 其包括:

培养基储罐(1), 用于向生物反应器提供培养基;

生物反应器(2), 与所述培养基储罐(1)连通, 用于发酵;

气体分散器(9), 用于向发酵液中提供气泡;

膜分离装置(4), 与所述生物反应器(2)气体连通, 接收来自生物反应器的夹带丁醇、丙酮和乙醇或夹带丁醇的气泡并膜分离所述丁醇、丙酮和乙醇或所述丁醇;

冷凝装置(5), 用于回收所述丁醇、丙酮和乙醇或所述丁醇;

真空表(6)和真空泵(8), 用于为气态形式的丁醇、丙酮和乙醇或气态形式的丁醇透过提供驱动力;

产品储罐(7), 用于接收产品。

9. 根据 8 所述的装置, 其还包括泵(3), 用于将膜分离装置(4)中的气体输送回所述生物反应器(2)。

10. 根据 8 所述的装置, 其中所述膜分离装置(4)中的膜为汽化渗透膜, 优选为丁醇和丙酮高选择性有机疏水分离膜或有机无机复合膜, 更优选选自硅橡胶、聚三甲基硅丙炔、聚丙烯、聚丁二烯、聚偏氟乙烯、聚四氟乙烯或其衍生物、丁腈橡胶、或分子筛材料中的至少一种, 最优选为含 PDMS 的复合膜, 所述膜的类型优选为管式、卷式、平板或中空纤维膜形式。

具体而言, 本发明的目的在于提供一种高效生产并分离纯化丁醇、丙酮和乙醇或高效生产并分离纯化丁醇的方法及相应装置。特别是一种能够实现上述目的的本发明一种发酵耦合汽化渗透技术分离纯化丁醇、丙酮和乙醇(或丁醇)的方法, 该方法先培养丙酮丁醇生产菌或丁醇生产菌, 再用上述生产菌发酵得到丁醇、丙酮和乙醇(或丁醇);

采用汽化渗透法从发酵液在线分离纯化丁醇、丙酮和乙醇(或丁醇)，其特征是汽化渗透法具体步骤如下：

发酵液中的丁醇、丙酮和乙醇(或丁醇)汽化方法采用向发酵系统中通入气泡提取丁醇、丙酮和乙醇(或丁醇)，使丁醇、丙酮和乙醇(或丁醇)汽化。其中气泡来源可以采用所述生产菌产生的自产气体在发酵系统和膜分离装置之间的循环；然后气体夹带汽化的丁醇、丙酮和乙醇或汽化的丁醇进入膜分离装置内与膜的一侧接触，在膜的另一侧抽真空，使汽化的丁醇、丙酮和乙醇(或丁醇)透过膜，冷凝回收或直接进入下一级分离装置。

在本发明的方法中，丙酮丁醇生产菌优选为丙酮丁醇梭菌、拜式梭菌或者其他丙酮丁醇生产菌株以及只产丁醇的基因工程菌。

优选丙酮丁醇生产菌或丁醇生产菌发酵系统包括生物反应器，生物反应器底部的气体分散器，其中气体分散器是可以与生物反应器为一体或放置在生物反应器底部的可使气体分散的部件。

在汽化渗透法中优选：所用的气体为发酵过程中生产菌产生的自产气体如二氧化碳和氢气，原料液为含有丁醇、丙酮和乙醇的丙酮丁醇生产菌的发酵液或含有丁醇的丁醇生产菌的发酵液，气体进入发酵系统中形成气泡使丁醇、丙酮和乙醇（或丁醇）汽化；也可以利用外源气体如氮气使丁醇、丙酮和乙醇（或丁醇）汽化。

在汽化渗透法中优选：汽化渗透膜为丁醇和丙酮高选择性有机疏水膜或有机无机复合膜，汽化渗透的原料液为含有丁醇、丙酮和乙醇(或丁醇)的发酵液，膜透过液用装置冷凝或液氮直接冷凝，装置冷凝时温度为-30-+15℃，在膜透过液一侧保持真空度在<5 kpa。

通过本发明的方法，在不增加设备投资和节省提纯能耗的前提下，有效提高了丁醇、丙酮和乙醇的生产和分离提纯效率，为目前以生物法生产丁醇和丙酮为主的液体生物燃料和生物基化学品的生产和分离提纯提供了新的技术支持。

本发明中的汽化渗透法耦合发酵技术的优势在于，1. 通过向生物反应器鼓泡，夹带出丁醇、丙酮和乙醇（或丁醇），不掺杂其他杂质如蛋白质，细胞，糖等原料；2. 汽化的含丁醇、丙酮和乙醇（或丁醇）的溶剂没有杂质，因此对膜没有污染，彻底解决膜污染问题；3. 汽化渗透耦合发酵技术比气提，渗透汽化等技术对丁醇有更高的选择性，因此可以分离纯化得到更高浓度的丁醇、丙酮和乙醇（或丁醇）的浓缩液；4. 能耗低于气提或渗透汽化等技术。到目前为止，未见使用汽化渗透法对丁醇和丙酮进行分离纯化的报道和相关专利。

附图说明

图1 为本发明中用于汽化渗透耦合发酵的生产和分离纯化丁醇、丙酮和乙醇(或丁醇)的装置结构示意图。其中1为培养基储罐，2为生物反应器，3为泵，4为膜分离装置，5为冷凝装置，6为真空表，7为产品储罐，8为真空泵，9为气体分散器。

图2 为本发明中安装在生物反应器底部的气体分散器示意图。

具体实施方式

本发明是一种生产和分离纯化丁醇、丙酮和乙醇（或丁醇）的方法，该方法先培养丙酮丁醇生产菌或丁醇生产菌，再用所述生产菌发酵得到丁醇、丙酮和乙醇（或丁

醇)；采用汽化渗透法从发酵液在线分离纯化丁醇、丙酮和乙醇(或丁醇)；通过向生物反应器(发酵罐)底部鼓气泡使丁醇、丙酮和乙醇(或丁醇)汽化，随气泡离开生物反应器，所述气泡为管路中的发酵过程中所述生产菌产生的自产气体或外源气体如氮气，气体夹带汽化的丁醇、丙酮和乙醇(或丁醇)进入膜分离装置，与膜的一侧接触，通过在膜的另一侧抽真空，使丁醇、丙酮和乙醇(或丁醇)通过膜，透过膜的丁醇、丙酮和乙醇(或丁醇)，冷凝回收或直接进入下一级分离装置。因此，分离膜的两侧均为气态形式的丁醇、丙酮和乙醇(或丁醇)。

下面，以丙酮丁醇生产菌为例结合附图1对发明进行详细说明。

<培养丙酮丁醇生产菌>

首先，在种子培养罐中，使用种子培养基来培养丙酮丁醇生产菌。

对所述丙酮丁醇生产菌没有特别限制，可列举丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*)、拜式梭菌(*Clostridium beijerinckii*)、大肠杆菌和酪丁酸梭菌(*Clostridium tyrobutyricum*)等生产丙酮丁醇的工程菌或其基因工程改造菌，优选丙酮丁醇梭菌。

所述种子培养基在使用之前，优选先通入氮气或其他惰性气体10分钟进行除氧处理后，再在121℃灭菌30分钟，冷却到室温后，接入丙酮丁醇生产菌。

优选将丙酮丁醇生产菌培养到生长最活跃的对数生长期。为了将丙酮丁醇生产菌培养到对数生长期，培养时间优选为12-18h；培养温度优选为35-39℃，更优选为37℃。

<丙酮丁醇生产菌发酵得到丁醇、丙酮和乙醇>

然后，将上述步骤中得到的含有丙酮丁醇生产菌的种子液从种子培养罐中接入到图1的生物反应器(发酵罐)中的发酵培养基后，开始发酵。

发酵培养基是为丙酮丁醇生产菌提供营养(碳源)的物质，可以葡萄糖作为发酵培养基中的碳源，也可以玉米淀粉、木薯淀粉、糖蜜、蔗糖、木薯或者秸秆纤维素水解液(例如秸秆水解液)等作为发酵培养基中的碳源。

所述发酵培养基在接入丙酮丁醇生产菌种子之前，优选在121℃灭菌30分钟后，通入氮气或其他惰性气体2h进行除氧处理，冷却到室温后，接入丙酮丁醇生产菌。

丙酮丁醇生产菌的接入量可依据发酵培养基的量适当调整，一般为培养基的5-10%(体积百分比)。

发酵温度优选为35-39℃，更优选为37℃。发酵过程中的pH优选控制在5.0以上，当pH低于5.0时，向培养基中加入氢氧化钠水溶液或氨水，当pH大于5.0时，不需要调整。也可以发酵过程中不控制pH，使发酵液中的pH随发酵时间自由变化。

<利用汽化渗透法耦合发酵从发酵液中在线分离纯化丁醇、丙酮和乙醇>

本发明中，对于汽化渗透法，第一，利用丁醇、丙酮和乙醇的挥发性和气体对丁醇、丙酮和乙醇的吸附原理，先通过气泡将发酵液中的丁醇、丙酮和乙醇夹带出生物反应器，从发酵液中在线分离纯化丁醇、丙酮和乙醇，即一边进行发酵产生丁醇、丙酮和乙醇，一边从发酵液中分离纯化丁醇和丁醇(发酵耦合汽化渗透)，从而使发酵液中的丁醇、丙酮和乙醇不断被移除，降低丁醇、丙酮和乙醇对细胞的毒害，使发酵反应的生产强度提高。第二，气泡夹带出来的汽化形式的丁醇、丙酮和乙醇可以使丁醇、丙酮和乙醇浓缩纯化；第三，利用丁醇、丙酮，乙醇和水在汽化渗透膜中溶解和

扩散能力的差别，汽化的丁醇、丙酮和乙醇较多的溶解在膜上，并扩散通过膜，在膜的另一侧被抽出，获得高浓度的丁醇、丙酮和乙醇；第四，汽化渗透膜的两侧均为气态形式的丁醇、丙酮和乙醇，因此对膜没有任何污染。

对于汽化渗透耦合发酵操作过程，当生物反应器中的丁醇达到一定浓度后，启动气泵使气泡进入生物反应器，使气体在生物反应器和膜分离装置中循环，使膜与气体接触，同时在膜的另一侧启动低温冷却装置冷却透过膜的气态形式的丁醇、丙酮和乙醇，启动真空装置为气态形式的丁醇、丙酮和乙醇透过提供驱动力。

进入发酵系统中用于提取丁醇和丙酮的气体优选为发酵过程中丙酮丁醇生产菌产生的任何自产气体，通常是二氧化碳和氢气，使气体在生物反应器和膜分离装置之间循环，通常不需要外源气体，这样就可节省投入成本。

这样，膜透过侧的分离得到的冷凝液中的丁醇浓度可提高到 20%-30% (w/v) 左右，丙酮浓度提高到 10%-15% (w/v) 左右。

气化渗透法中向生物反应器中鼓泡的条件优选如下：通气比为 0.5-5 vvm，气泡从生物反应器底部通入，气泡可通过气体分散器进入生物反应器，从反应器顶部出来，气泡夹带气化的丁醇、丙酮和乙醇进入膜分离装置。

膜分离装置中固定分离膜，膜的一侧为气化的丁醇、丙酮和乙醇；启动真空泵使膜的另一侧形成一定的真空度，丁醇、丙酮，乙醇和水等物质选择性地以蒸汽形式透过膜，透过的蒸汽在产品储罐中通过冷凝装置冷凝回收含有丁醇、丙酮和乙醇的浓缩液体。

气化渗透法得到的丁醇、丙酮和乙醇的浓缩液体，可通过精馏，膜分离，分子筛纯化等方法获得丁醇、丙酮和乙醇的纯品。

膜分离装置的温度条件为 0-80℃膜透过液的冷凝通常选取冷凝水或液氮，也可以选取冷凝装置进行冷凝，如果选取冷凝装置冷凝或冷凝水冷凝，冷凝温度在-30 - +15℃，膜透过液一侧的真空度优选 0-10 kpa。

如上所述，本发明的气化渗透法耦合发酵实现了发酵过程中毒性抑制产物丁醇、丙酮和乙醇（或丁醇）的不断移除和有效回收与浓缩的双重目的，并且膜两侧均为洁净的气化形式的丁醇、丙酮和乙醇（或丁醇），对膜没有任何污染。因此，该方法提高了丁醇、丙酮和乙醇（或丁醇）的生产效率，降低了丁醇、丙酮和乙醇（或丁醇）的回收成本，提高了发酵法生产丁醇、丙酮和乙醇（或丁醇）的经济收益，适合于推广应用。

实施例

下面以丙酮丁醇生产菌为例结合实施例对本发明作具体说明。但本发明不受下述实施例的限制，在符合本发明前后宗旨的范围内，可对本发明作适当变更。另外，下述实施例中，如无特殊说明，所使用的实验方法均为常规方法，所用材料、试剂等均可从生物或化学公司购买。

丙酮丁醇生产菌：丙酮丁醇梭菌（*Clostridium acetobutylicum*），购买于美国 ATCC 菌种库（ATCC number: 55025-E604）。

玉米秸秆的预处理方法：将玉米秸秆粉碎、过 0.4mm 筛子，取 200g 粉碎过筛后的玉米秸秆加入到 2L 的 2% (w/v) NaOH 溶液中，120℃反应 30min，冷却至室温，

过滤，将滤渣洗至中性，50℃烘干。将上述处理的玉米秸秆分两次按重量比 1: 10 分别添加到纤维素酶液中，所述纤维素酶液的浓度为 0.03 mol/L，使用的酶缓冲液为柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液，所述酶缓冲液的 pH 为 4.8，所述纤维素酶的酶活力为 20 FPU/g，转速 150r/min，50℃酶解 72h，酶解结束后 8000r/min 离心 5min，得到上清液，将上清液用浓氨水调节 pH 至 6.2，加入 0.115% (w/v) 的酵母浸粉和矿物质混合物，所述矿物质混合物含 7 水合硫酸镁 0.2g/L、7 水合硫酸亚铁 0.01g/L、1 水合硫酸锰 0.01g/L 和氯化钠 0.01g/L，通入氮气 5min 后灭菌。

玉米淀粉糖化液的制备：将玉米粉与 60-65℃左右的温水按 1:2.5 的比例配制成粉浆，按每公斤玉米粉 0.6ml 的比例加入 α-淀粉酶，升温至 85-90℃，液化 1-2 小时，然后降温至 60-65℃，按每公斤玉米粉 1.2ml 的比例加入糖化酶，糖化 10-15 小时，过滤得到糖化液。糖化液可按照 1:3 加水进行稀释，用于发酵。

种子培养基：每升培养基中含葡萄糖 30 g、酵母粉 2 g、胰蛋白胨 4 g、磷酸二氢钾 0.5 g、磷酸氢二钾 0.5 g、乙酸铵 2.2 g 和矿物质混合物。其中，矿物质混合物的组成为：每升培养基中含 7 水合硫酸镁 0.1 g、7 水合硫酸亚铁 0.015 g、2 水合氯化钙 0.015 g、1 水合硫酸锰 0.01 g、氯化钴 0.02 g 和硫酸锌 0.002 g。

发酵培养基：

1. 葡萄糖为碳源的培养基：每升培养基中含葡萄糖 80 g、酵母粉 1 g、磷酸二氢钾 0.5g、磷酸氢二钾 0.5 g、乙酸铵 2.2 g、矿物质混合物和维生素。其中，矿物质混合物的组成为：每升培养基中含 7 水合硫酸镁 0.2 g、7 水合硫酸亚铁 0.01 g、1 水合硫酸锰 0.01 g 和氯化钠 0.01 g；维生素的组成为：每升培养基中含对氨基苯甲酸 0.001 g、维生素 B1 0.001 g 和生物素 0.00001 g。

2. 玉米秸秆水解液为碳源的发酵培养基的组成：每升培养基中含葡萄糖 48.4g、木糖 15.6g、纤维二糖 4.8g、阿拉伯糖 2.4g、酵母粉 1g、磷酸二氢钾 0.5g、磷酸氢二钾 0.5g、乙酸铵 2.2g、7 水合硫酸镁 0.2g、7 水合硫酸亚铁 0.01g、1 水合硫酸锰 0.01g、氯化钠 0.01g、对氨基苯甲酸 0.001g、维生素 B1 0.001g 和生物素 0.00001g。

3. 玉米淀粉为碳源的发酵培养基组成：每升培养基中含还原糖 200g、磷酸二氢钾 0.5g、磷酸氢二钾 0.5g、乙酸铵 2.2g、7 水合硫酸镁 0.2g、7 水合硫酸亚铁 0.01g、1 水合硫酸锰 0.01g、氯化钠 0.01g、对氨基苯甲酸 0.001g、维生素 B1 0.001g 和生物素 0.00001g。发酵初始时玉米淀粉培养基的还原糖浓度可以在 60-100g/L，通过加水稀释调配。批式流加过程玉米淀粉发酵培养基中的还原糖浓度可以在 150-200g/L。

丙酮丁醇生产菌的培养和发酵：种子培养基在使用之前，通氮气除氧 10 分钟，然后在 121℃ 灭菌 30 分钟，冷却到室温后，接入生产菌。将生产菌在种子培养罐 1 中于 37℃ 的条件下培养 15h 后，准备接入到发酵培养基中。发酵培养基在使用之前，在 121℃ 灭菌 30 分钟，然后通入氮气除氧 2h，冷却到室温后，通过泵将含有生产菌的种子液（发酵培养基体积的 10%）泵入生物反应器中在 37℃ 的条件下开始发酵。发酵培养基初始不调节 pH 值，当发酵液 pH 低于 5.0 后，自动流加氢氧化钠水溶液或氨水，将 pH 调整到 5.0 以上。

生物反应器可以为搅拌式生物反应器、气升式生物反应器、或者静置式生物反应器。

气化渗透膜的制备：聚二甲基硅氧烷（PDMS）从购于美国道康宁公司（Dow Corning）。沸石纳米材料（ZSM-5）从美国 Zeolyst International 购买。ZSM-5 先在 80℃ 下烘干 24 小时。聚二甲基硅氧烷（PDMS）中的成胶剂基液和固化剂按 10:1 的比例混合。对于纯 PDMS 聚合膜的制备，直接在 8000 转/分钟下离心 5 分钟，进行后续操作。对于添加 ZSM-5 材料的 PDMS 混合膜，将指定重量比例（20%-80%）的 ZSM-5，与按 10:1 比例混合后的 PDMS 制膜液混合，在 8000 转下离心 5 分钟，进行后续操作。后续操作为先用超声处理制膜液 15 分钟，除去制膜液中的气泡，然后用刮刀将制膜液均匀涂抹在玻璃板上，将带有制膜液的玻璃板放到 100℃ 的烘箱中 3 小时成膜。最后从烘箱中取出玻璃板，剥离制备好的渗透气化膜，将其固定在膜分离装置中，用于气化渗透耦合分离纯化操作。

丁醇、丙酮、乙醇的分析使用常规气相色谱法，葡萄糖、还原糖和玉米秸秆水解液中的糖的浓度测定使用常规液相色谱法或 DNS 法。

比较例 1 未偶联分离装置的丁醇、丙酮和乙醇发酵（未分离）

按上述方法利用葡萄糖为碳源的发酵培养基进行丙酮丁醇生产菌的培养和发酵。当生产菌接入生物反应器后，开始发酵，直到发酵结束。结果如表 1 所示，丁醇、丙酮和乙醇在发酵液中的终点浓度为 14 g/L（1.4%），7 g/L（0.7%）和 2 g/L（0.2%）左右。

比较例 2 传统法进行气提耦合发酵生产丁醇、丙酮和乙醇

按上述方法进行丙酮丁醇生产菌的培养和发酵。当生产菌接入生物反应器后，开始发酵。传统法进行气提耦合发酵，发酵开始后，当发酵液中丁醇浓度大于 5 g/L，启动气提分离装置。传统气提耦合发酵过程，通过向生物反应器鼓泡，使丁醇，丙酮和乙醇汽化。随后，气体和汽化的丁醇，丙酮和乙醇通过冷凝管，使丁醇，丙酮和乙醇以液体形式冷凝回收，冷凝管无纯化浓缩作用。结果如表 1 所示。气提得到的冷凝液中回收到的丁醇浓度为 9.0%-11%（w/v），丙酮浓度为 3.5%-5.0 %（w/v），乙醇浓度为 0.5%-1.5 %（w/v）。气提回收得到的冷凝液中的丁醇、丙酮和乙醇浓度的变化主要是由发酵液中丁醇、丙酮和乙醇浓度的变化造成。

比较例 3 传统法进行渗透气化耦合发酵生产丁醇、丙酮和乙醇

按上述方法进行丙酮丁醇生产菌的培养和发酵。当生产菌接入生物反应器后，开始发酵。传统法进行渗透气化耦合发酵，采用发酵开始后，当发酵液中丁醇浓度大于 5 g/L，启动渗透气化膜分离装置，分离膜采用纯 PDMS 聚合膜。渗透气化耦合发酵过程使液体形式的发酵液在生物反应器和渗透气化膜分离装置之间循环。当发酵液经过分离膜的一侧时，液体形式的发酵液会以溶解扩散的方式通过分离膜，使发酵液得到浓缩纯化。传统结果如表 1 所示。结果表明传统的渗透气化分离得到的冷凝液中丁醇、丙酮和乙醇的浓度为 7.5%-9.0%（w/v），3.0%-4.0%（w/v）和 0.6%-1.0%（w/v）。分离膜如采用 PDMS/50%ZSM-5 混合膜进行分离纯化，渗透气化分离得到的冷凝液中丁醇、丙酮和乙醇的浓度为 14.0%-18.0%（w/v）、6.0%-9.0%（w/v）和 1.0%-2.0%（w/v）。渗透气化法回收得到的冷凝液中的丁醇、丙酮和乙醇浓度的变化主要是由发酵液中丁醇、丙酮和乙醇浓度的变化造成。

实施例 1 以葡萄糖为碳源的气化渗透耦合发酵生产丁醇、丙酮和乙醇

按上述方法进行丙酮丁醇生产菌的培养和发酵。当生产菌接入生物反应器后,开始发酵。当发酵液中的丁醇浓度达到 5 g/L 时,开启生物反应器与膜分离装置之间的泵,向生物反应器内鼓泡,泵使气体和气体夹带的气化状态的丁醇、丙酮和乙醇在生物反应器和膜分离装置所形成的密闭空间循环,当气化状态的丁醇、丙酮和乙醇经过分离膜的一侧时,会溶解扩散到膜的另一侧,被冷凝浓缩回收。当发酵培养基中的葡萄糖浓度降到 10g/L 以下时,向发酵培养基中补加 400 g/L 的浓缩葡萄糖,继续发酵。由于丁醇、丙酮和乙醇不断地被气化渗透法从生物反应器中回收,发酵培养基中有足够的葡萄糖碳源,发酵可以持续稳定运行 150 小时以上。采用纯的 PDMS 聚合膜,气化渗透法得到的冷凝液中丁醇、丙酮和乙醇的浓度为 20.0%-24.0% (w/v), 8.0%-12.0% (w/v) 和 0.8%-1.2% (w/v)。采用 PDMS/50%ZSM-5 混合膜进行分离纯化,气化渗透法得到的冷凝液中丁醇、丙酮和乙醇的浓度为 28.0%-32.0% (w/v), 11.0%-15.0% (w/v) 和 1.0%-2.0% (w/v)。可以看出,与比较例 2 的气提耦合发酵相比,气化渗透法得到的冷凝液中丁醇和丙酮浓度提高了 2 倍多,乙醇浓度提高了一倍左右。与比较例 3 渗透气化相比,气化渗透法得到的冷凝液中丁醇和丙酮浓度提高了 2 倍左右,乙醇浓度几乎没有变化。另外,添加疏水颗粒 ZSM-5 到 PDMS 膜中可以提高丁醇和丙酮的分离纯化浓度,提高膜的选择性。添加其他纳米疏水性颗粒到膜中,也可以达到提高丁醇和丙酮分离效率的作用。

实施例 2 以玉米秸秆水解液为碳源的气化渗透耦合发酵生产丁醇、丙酮和乙醇

按上述方法进行丙酮丁醇生产菌的培养和发酵。当生产菌接入生物反应器后,开始发酵。当发酵液中的丁醇浓度达到 5 g/L 时,开启生物反应器与膜分离装置之间的泵,向生物反应器内鼓泡,泵使气体和气体夹带的气化状态的丁醇、丙酮和乙醇在生物反应器和膜分离装置所形成的密闭空间循环,当气化状态的丁醇、丙酮和乙醇经过分离膜的一侧时,会溶解扩散到膜的另一侧,被冷凝浓缩回收。当发酵培养基中的还原糖浓度降到 10g/L 以下时,向发酵培养基中补加玉米秸秆水解液,继续发酵。由于丁醇、丙酮和乙醇不断地被气化渗透法从生物反应器中回收,发酵培养基中有足够的碳源补充,发酵可以持续稳定运行。采用纯的 PDMS 聚合膜,气化渗透法得到的冷凝液中丁醇、丙酮和乙醇的浓度为 14.0%-18.0% (w/v), 6.0%-9.0% (w/v) 和 0.6%-1.0% (w/v)。采用 PDMS/50%ZSM-5 混合膜进行分离纯化,气化渗透法得到的冷凝液中丁醇、丙酮和乙醇的浓度为 18.0%-22.0% (w/v), 7.0%-11.0% (w/v) 和 1.0%-1.5% (w/v)。可以看出,与比较例 2 的气提耦合发酵和比较例 3 渗透气化耦合发酵相比,气化渗透法得到的冷凝液中丁醇和丙酮浓度都提高很多,说明气化渗透法耦合发酵可以分离纯化得到更高浓度的丁醇和丙酮,对丁醇和丙酮产物有更高的选择性和更好的分离效果。和以葡萄糖为碳源的发酵培养基相比,玉米秸秆水解液中可能存在抑制性产物,对细胞有毒性,影响丁醇和丙酮的生成,发酵液中的丁醇和丙酮的浓度对气化渗透法分离纯化的丁醇和丙酮的浓度有密切影响,即如果发酵液中丁醇和丙酮的浓度低,气化渗透得到的冷凝液中的丁醇浓度也低。

实施例 3 以玉米淀粉糖化液为碳源的气化渗透耦合发酵生产丁醇、丙酮和乙醇

按上述方法进行丙酮丁醇生产菌的培养和发酵。当生产菌接入生物反应器后,开始发酵。当发酵液中的丁醇浓度达到 5 g/L 时,开启生物反应器与膜分离装置之间的

泵，向生物反应器内鼓泡，泵使气体和气体夹带的气化状态的丁醇、丙酮和乙醇在生物反应器和膜分离装置所形成的密闭空间循环，当气化状态的丁醇、丙酮和乙醇经过分离膜的一侧时，会溶解扩散到膜的另一侧，被冷凝浓缩回收。当发酵培养基中的还原糖浓度降到 10g/L 以下时，向发酵培养基中补加玉米淀粉糖化液，继续发酵。由于丁醇、丙酮和乙醇不断地被气化渗透法从生物反应器中回收，发酵培养基中有足够的碳源，发酵可以持续稳定运行。采用纯的 PDMS 聚合膜，气化渗透法得到的冷凝液中丁醇、丙酮和乙醇的浓度为 17.0%-22.0%% (w/v)，7.0%-11.0% (w/v) 和 0.7%-1.1% (w/v)。采用 PDMS/50%ZSM-5 混合膜进行分离纯化，气化渗透法得到的冷凝液中丁醇、丙酮和乙醇的浓度为 22.0%-30.0% (w/v)，9.0%-14.0% (w/v) 和 1.0%-1.7% (w/v)。可以看出，与比较例 2 的气提耦合发酵和比较例 3 渗透气化耦合发酵相比，气化渗透法得到的冷凝液中丁醇和丙酮浓度都提高很多，说明气化渗透法耦合发酵可以分离纯化得到更高浓度的丁醇和丙酮，对丁醇和丙酮产物有更高的选择性和更好的分离效果。

表 1

	分离膜	丁醇浓度 (%)	丙酮浓度 (%)	乙醇浓度 (%)
比较例 1		1.4	0.7	0.2
比较例 2		9.0-11.0	3.5-5.0	0.5-1.5
比较例 3	PDMS	7.5-9.0	3.0-4.0	0.6-1.0
	PDMS/50%ZSM-5	14.0-18.0	6.0-9.0	1.0-2.0
实施例 1	PDMS	20.0-24.0	8.0-12.0	0.8-1.2
	PDMS/50%ZSM-5	28.0-32.0	11.0-15.0	1.0-2.0
实施例 2	PDMS	14.0-18.0	6.0-9.0	0.6-1.0
	PDMS/50%ZSM-5	18.0-22.0	7.0-11.0	1.0-1.5
实施例 3	PDMS	17.0-22.0	7.0-11.0	0.7-1.1
	PDMS/50%ZSM-5	22.0-30.0	9.0-14.0	1.0-1.7

由上可知，传统不耦合分离的丙酮丁醇发酵，得到的发酵液中丁醇和丙酮浓度分别为 1.4%，0.7%和 0.2%。传统的一步气提法得到的冷凝液中的丁醇和丙酮浓度分别为 9.0%-11.0%，3.5%-5.0%和 0.5%-1.5%左右。渗透气化分离得到的冷凝液中丁醇、丙酮和乙醇的浓度为 14.0%-18.0% (w/v)，6.0%-9.0% (w/v) 和 1.0%-2.0% (w/v)。本发明利用气化渗透耦合发酵技术最终收集到的产物中含有丁醇、丙酮和乙醇浓度分别为 28.0%-32.0%，11.0%-15.0%和 1.0%-2.0%左右。可见，气化渗透耦合发酵技术可以得到最高纯化分离的产物浓度。由于最终产物中含有极高浓度的丁醇和丙酮，极易通过简单的脱水处理如精馏，蒸馏或膜分离获得纯丁醇和丙酮。本发明气化渗透过程对于提高丁醇提纯浓度，降低整个发酵分离工艺的能耗至关重要。和传统的精馏分离相比，气化渗透法需要的能量消耗为传统精馏分离的 30%左右。并且，保证后续丁醇和丙酮纯化分离可以在富含高浓度丁醇和丙酮的溶液中低能耗，高效率进行。更重要的是，和传统的汽化渗透耦合发酵相比，渗透汽化技术膜的一侧需要发酵液与膜接触，

发酵液中的微生物细胞，糖类物质，蛋白物质和其他大分子物质，在膜长期运行下会对膜造成污染，清洗和更换膜的成本非常高。本发明使用的汽化渗透技术耦合发酵，膜两侧均为汽化状态的有机溶剂，对膜没有任何污染，保证膜的使用寿命。因此，本发明可以提高丁醇和丙酮生产和回收效率并降低分离提纯的能耗，为生物法生产丁醇和丙酮提供新的技术，具有很大的工业应用价值。

权 利 要 求

1. 一种发酵耦合分离纯化丁醇、丙酮和乙醇或纯化丁醇的方法，所述方法包括以下步骤：

- 1) 利用丙酮丁醇生产菌或丁醇生产菌发酵得到丁醇、丙酮和乙醇或得到丁醇；
- 2) 采用汽化渗透法从发酵液在线分离纯化丁醇、丙酮和乙醇；

其中所述汽化渗透法包括以下步骤：

- a. 向发酵液中通入气泡，使丁醇、丙酮和乙醇或使丁醇汽化；
- b. 使气泡中的气体夹带汽化的丁醇、丙酮和乙醇或汽化的丁醇进入膜分离装置内并透过膜；
- c. 回收所述丁醇、丙酮和乙醇或回收所述丁醇，或进入下一级分离装置。

2. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述气泡的来源为丙酮丁醇生产菌或丁醇生产菌的自产气体或外源气体，所述自产气体优选为二氧化碳和/或氢气，所述外源气体优选为氮气。

3. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述丙酮丁醇生产菌优选选自丙酮丁醇梭菌 (*Clostridium acetobutylicum*)、拜式梭菌 (*Clostridium beijerinckii*)、大肠杆菌或酪丁酸梭菌 (*Clostridium tyrobutyricum*) 以及这些菌株的基因工程改造菌，优选为丙酮丁醇梭菌，所述丁醇生产菌为产丁醇的基因工程菌，优选为产丁醇大肠杆菌或产丁醇梭菌。

4. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述膜为汽化渗透膜，优选为丁醇和丙酮高选择性有机疏水分分离膜或有机无机复合膜，更优选选自硅橡胶、聚三甲基硅丙炔、聚丙烯、聚丁二烯、聚偏氟乙烯、聚四氟乙烯或其衍生物、丁腈橡胶、或分子筛材料中的至少一种，最优选为含 PDMS 的复合膜，所述膜的类型优选为管式、卷式、平板或中空纤维膜形式。

5. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述回收通过冷凝进行，所述冷凝优选用装置冷凝或液氮或冷凝水冷凝，其中所述装置冷凝或冷凝水冷凝的温度为-30~+15℃。

6. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述气泡从生物反应器底部通入，通气比为 0.5-5 vvm。

7. 根据权利要求 1 所述的方法，所述膜分离装置的膜透过液一侧保持真空度为 0-10 kpa，优选<5 kpa。

8. 一种用于发酵耦合分离纯化丁醇、丙酮和乙醇或纯化丁醇的的装置，其包括：
培养基储罐(1)，用于向生物反应器提供培养基；
生物反应器(2)，与所述培养基储罐(1)连通，用于发酵；
气体分散器(9)，用于向发酵液中提供气泡；
膜分离装置(4)，与所述生物反应器(2)气体连通，接收来自生物反应器的夹带丁醇、丙酮和乙醇或夹带丁醇的气泡并膜分离所述丁醇、丙酮和乙醇或所述丁醇；
冷凝装置(5)，用于回收所述丁醇、丙酮和乙醇或所述丁醇；

真空表(6)和真空泵(8)，用于为气态形式的丁醇、丙酮和乙醇或气态形式的丁醇透过提供驱动力；

产品储罐(7)，用于接收产品。

9. 根据权利要求 8 所述的装置，其还包括泵(3)，用于将膜分离装置(4)中的气体输送回所述生物反应器(2)。

10. 根据权利要求 8 所述的装置，其中所述膜分离装置(4)中的膜为汽化渗透膜，优选为丁醇和丙酮高选择性有机疏水分离膜或有机无机复合膜，更优选选自硅橡胶、聚三甲基硅丙炔、聚丙烯、聚丁二烯、聚偏氟乙烯、聚四氟乙烯或其衍生物、丁腈橡胶、或分子筛材料中的至少一种，最优选为含 PDMS 的复合膜，所述膜的类型优选为管式、卷式、平板或中空纤维膜形式。

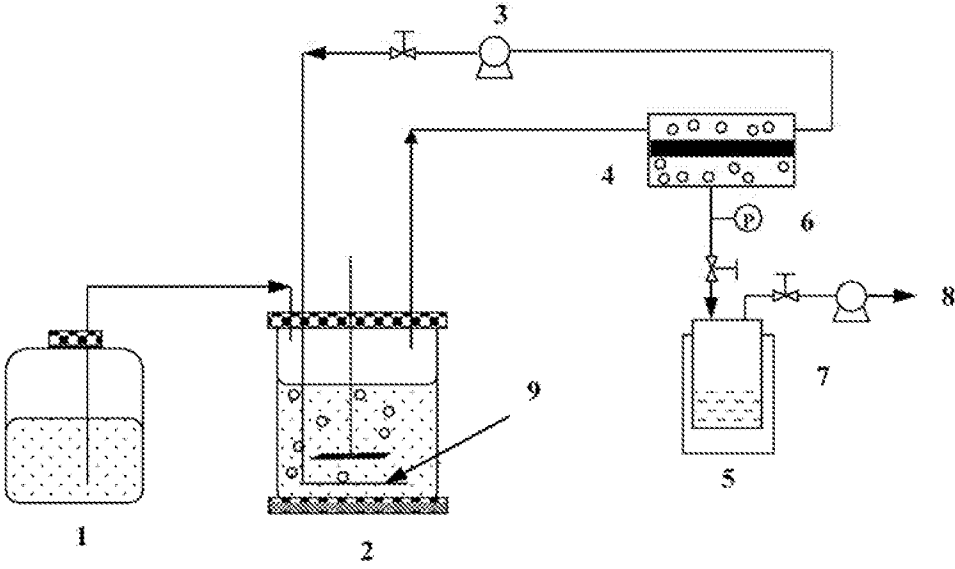


图 1

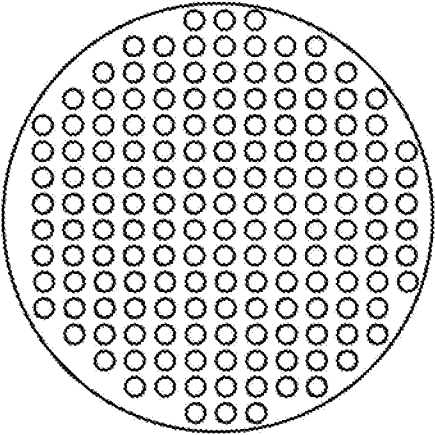


图 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2016/085818

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P 7/16 (2006.01) i; C12P 7/28 (2006.01) i; C07C 31/12 (2006.01) i; C07C 49/08 (2006.01) i; C07C 45/81 (2006.01) i; C12R 1/19 (2006.01) i; C12R 1/145 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12P, C07C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, CPRSABS, DWPI, SIPOABS, ISI Web of Knowledge, CNKI, BAIDU, google: evapomeation, coupling, membrane, separate, ferment+, ABE, butanol, acetone, ethanol, Clostridium acetobutylicum, Clostridium beijerinckii, gas stripping-pervaporation, hybrid membrane, PDMS, gas, bubble, purif+ etc.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHUANG, Xue et al. "A Novel In Situ Gas Stripping-Pervaporation Process Integrated With Acetone-Butanol-Ethanol Fermentation for Hyper n-Butanol Production" "Biotechnology and Bioengineering", vol. 113, no. 1, 31 January 2016 (31.01.2016), see pp. 120-128	1-7
X	CN 102911854 A (DALIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY) 06 February 2013 (06.02.2013) see claims 2-4 and 7	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim (s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 28 February 2017	Date of mailing of the international search report 15 March 2017
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimengqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer MA, Zhenlian Telephone No. (86-10) 62412131

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/CN2016/085818

C (Continuation) . DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Di Cai et al. "Gas stripping-pervaporation hybrid process for energy-saving product recovery from acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation broth" "Chemical Engineering Journal", vol. 287, 01 March 2016 (01.03.2016), see pp. 1-10	1-7
A	CN 101805754 A (NANJING TECHNOLOGY UNIVERSITY) 18 August 2010 (18.08.2010) see the whole document	1-7
A	CN 102676589 A (DALIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY) 19 September 2012 (19.09.2012) see the whole document	1-7
A	WO 2009097322 A1 (PROMERUS LLC. et al.) 06 August 2009 (06.08.2009) see the whole document	1-7
A	LUO, Jianquan et al. "Separation and concentration of butanol from acetone-butanol-ethanol mixed solution by pervaporation" Chemical Engineering (China), vol. 38, no. 2, 15 February 2010 (15.02.2010), see pp. 43-46	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2016/085818

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- [1] item 1: claims 1-7 relate to a method for separating and purifying butanol, acetone and ethanol or purifying butanol by fermentation coupling;
- [2] item 2: claims 8-10 relate to a device for separating and purifying butanol, acetone and ethanol or purifying butanol by fermentation coupling.
- [3] item 1 and item 2 do not clearly have the same or corresponding technical features, and therefore there is no specific technical feature that embodies the invention's contribution to the prior art between the two inventions, and therefore the applicant does not meet the requirement of unity of invention as defined in PCT Rule 13.1

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2016/085818

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 102911854 A	06 February 2013	CN 102911854 B	25 June 2014
CN 101805754 A	18 August 2010	CN 101805754 B	27 June 2012
CN 102676589 A	19 September 2012	CN 102676589 B	09 April 2014
WO 2009097322 A1	06 August 2009	JP 2011510805 A	07 April 2011
		TW I500448 B	21 September 2015
		CN 101970509 B	05 March 2014
		CN 101970509 A	09 February 2011
		US 8470944 B2	25 June 2013
		US 2013292872 A1	07 November 2013
		US 2009188863 A1	30 July 2009
		TW 200946216 A	16 November 2009
		EP 2238179 A4	27 July 2011
		US 8215496 B2	10 July 2012
		JP 5539228 B2	02 July 2014
		US 8678203 B2	25 March 2014
		KR 101274551 B1	18 June 2013
		US 2012283404 A1	08 November 2012
		EP 2238179 A1	13 October 2010
		KR 20100119778 A	10 November 2010

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2016/085818

A. 主题的分类

C12P 7/16(2006.01)i; C12P 7/28(2006.01)i; C07C 31/12(2006.01)i; C07C 49/08(2006.01)i; C07C 45/81(2006.01)i; C12R 1/19(2006.01)i; C12R 1/145(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12P, C07C

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNABS, CPRSABS, DWPI, SIPOABS, ISI Web of Knowledge, CNKI, BAIDU, google和检索词: 发酵, 丁醇, 丙酮, 乙醇, 丙酮丁醇梭菌, 拜式梭菌, 汽化渗透, 气体, 气泡, 耦合, 膜, 分离, 纯化, 提纯, ferment+, ABE, butanol, acetone, ethanol, Clostridium acetobutylicum, Clostridium beijerinckii, gas stripping-pervaporation, hybrid membrane, PDMS, gas, bubble, purif+等

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	Chuang Xue等. "A Novel In Situ Gas Stripping-Pervaporation Process Integrated With Acetone-Butanol-Ethanol Fermentation for Hyper n-Butanol Production" 《Biotechnology and Bioengineering》, 第113卷, 第1期, 2016年 1月 31日 (2016 - 01 - 31), 参见第120-128页	1-7
X	CN 102911854 A (大连理工大学) 2013年 2月 6日 (2013 - 02 - 06) 参见权利要求2-4、7	1-7
X	Di Cai等. "Gas stripping - pervaporation hybrid process for energy-saving product recovery from acetone - butanol - ethanol (ABE) fermentation broth" 《Chemical Engineering Journal》, 第287卷, 2016年 3月 1日 (2016 - 03 - 01), 参见第1-10页	1-7
A	CN 101805754 A (南京工业大学) 2010年 8月 18日 (2010 - 08 - 18) 参见全文	1-7

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2017年 2月 28日

国际检索报告邮寄日期

2017年 3月 15日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10) 62019451

受权官员

马振莲

电话号码 (86-10) 62412131

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 102676589 A (大连理工大学) 2012年 9月 19日 (2012 - 09 - 19) 参见全文	1-7
A	WO 2009097322 A1 (PROMERUS LLC等) 2009年 8月 6日 (2009 - 08 - 06) 参见全文	1-7
A	罗建泉等. "渗透汽化法从丙酮-丁醇-乙醇中分离浓缩丁醇" 《化学工程》，第38卷，第2期，2010年 2月 15日 (2010 - 02 - 15)， 参见第43-46页	1-7

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

- [1] 第1项：权利要求1-7，涉及一种发酵耦合分离纯化丁醇、丙酮和乙醇或纯化丁醇的方法；
- [2] 第2项：权利要求8-10，涉及一种用于发酵耦合分离纯化丁醇、丙酮和乙醇或纯化丁醇的装置。
- [3] 第1项与第2项发明之间显然不具备相同或相应的技术特征，因此这两项发明之间也不具备体现发明对现有技术作出贡献的特定技术特征，所以不满足发明单一性的要求，不符合《PCT实施细则》13.1的规定。

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。
2. ☐ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何加费。
3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求，具体地说，是权利要求：
4. ☒ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明：包含该发明的权利要求是： 1-7

对异议的意见

- ☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。
- ☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。
- ☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2016/085818

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	102911854	A	2013年 2月 6日	CN	102911854	B	2014年 6月 25日
CN	101805754	A	2010年 8月 18日	CN	101805754	B	2012年 6月 27日
CN	102676589	A	2012年 9月 19日	CN	102676589	B	2014年 4月 9日
WO	2009097322	A1	2009年 8月 6日	JP	2011510805	A	2011年 4月 7日
				TW	I500448	B	2015年 9月 21日
				CN	101970509	B	2014年 3月 5日
				CN	101970509	A	2011年 2月 9日
				US	8470944	B2	2013年 6月 25日
				US	2013292872	A1	2013年 11月 7日
				US	2009188863	A1	2009年 7月 30日
				TW	200946216	A	2009年 11月 16日
				EP	2238179	A4	2011年 7月 27日
				US	8215496	B2	2012年 7月 10日
				JP	5539228	B2	2014年 7月 2日
				US	8678203	B2	2014年 3月 25日
				KR	101274551	B1	2013年 6月 18日
				US	2012283404	A1	2012年 11月 8日
				EP	2238179	A1	2010年 10月 13日
				KR	20100119778	A	2010年 11月 10日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)