(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
2012 年 12 月 13 日 (13.12.2012)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2012/167525 A1

(51) 国际专利分类号:
C12P 7/18 (2006.01) *C07C 59/08* (2006.01)
C12P 7/44 (2006.01) *C07C 55/10* (2006.01)
C12P 7/56 (2006.01) *C12R 1/22* (2006.01)
C07C 31/20 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2011/080589

(22) 国际申请日: 2011 年 10 月 9 日 (09.10.2011)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201110151311.4 2011 年 6 月 7 日 (07.06.2011) CN

(71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): **大连理工大学 (DALIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY)** [CN/CN]; 中国辽宁省大连市甘井子凌工路 2 号土木水利学院, Liaoning 116024 (CN)。

(72) 发明人; 及

(75) 发明人/申请人 (仅对美国): **孙亚琴 (SUN, Yaqin)** [CN/CN]; 中国辽宁省大连市甘井子区凌工路 2 号大连理工大学生命科学与技术学院, Liaoning 116024 (CN)。 **魏搏超 (WEI, Bochao)** [CN/CN]; 中国辽宁省大连市甘井子区凌工路 2 号大连理工大学生命科学与技术学院, Liaoning 116024 (CN)。 **李志刚 (LI, Zhigang)** [CN/CN]; 中国辽宁省大连市甘井子凌工路 2 号大连理工大学生命科学与技术学院, Liaoning 116024 (CN)。 **戴建英 (DAI, Jianying)** [CN/CN]; 中国辽宁省大连市甘井子区凌工路 2 号大连理工大学生命科学与技术学院, Liaoning 116024 (CN)。 **修志龙 (XIU, Zhilong)** [CN/CN]; 中国辽宁省大连市甘井子区凌工路 2 号大连理工大学生命科学与技术学院, Liaoning 116024 (CN)。

(74) 代理人: **大连理工大学专利中心 (PATENT CENTER OF DUT)**; 中国辽宁省大连甘井子凌工路 2 号大连理工大学专利中心, Liaoning 116024 (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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(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, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, 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))。

WO 2012/167525 A1

(54) **Title**: METHOD FOR CO-PRODUCING AND SEPARATING DIOL AND ORGANIC ACID

(54) **发明名称** : 一种二元醇与有机酸联产与分离方法

(57) **Abstract**: The present invention belongs to the field of bio-engineering technology, and provides a method for co-producing and separating diols and organic acids. The characteristics are that the object of study is Klebsiella pneumoniae for producing diols through bio-converting glycerol or glucose, etc., using pressurized fermentation and fermentation adjustment with carbonates, pH - salting out and extraction - CO_2 immobilization coupling to produce diols and organic acids; 1,3-propanediol and 2,3-butanediol are separated from lactic acid and succinic acid by a two-step salting out and extraction. The present invention can achieve the co-production of different diols and organic acids in the same culture system by controlling different fermentation conditions, and enhance the utilization of raw materials; and at the same time recycle carbon dioxide generated from tail gas in fermentation, and solve the common problem of carbon dioxide emission in the fermentation industry. The present invention establishes a new high-efficiency and low-cost process integrated with fermentation - separation - CO_2 immobilization, and provides references for CO_2 recycling and co-producing other chemicals.

(57) **摘要**: 本发明属于生物工程技术领域，提供了一种二元醇与有机酸联产与分离方法。其特征是以生物转化甘油或葡萄糖等产二元醇的 Klebsiella pneumoniae 为研究对象，通过加压发酵和碳酸盐调节发酵 pH-盐析萃取-CO_2 固定化耦合生产二元醇和有机酸，通过两步盐析萃取将 1，3-丙二醇和 2，3-丁二醇与乳酸和琥珀酸分离。本发明既可以通过控制不同的发酵条件，在同一培养体系中实现不同二元醇和有机酸的联产，提高原料利用率；同时对发酵中产生的尾气二氧化碳进行回收利用，解决了发酵行业二氧化碳排放的共性问题。本发明建立了高效、低成本的发酵-分离-CO_2 固定化集成的新工艺，为 CO_2 回用联产其它化学品提供借鉴。

说明书

发明名称：一种二元醇与有机酸联产与分离方法

[1] 技术领域

[2] 本发明属于生物工程技术领域，涉及到微生物发酵联产和二氧化碳回收利用技术，特别涉及一种二元醇与有机酸联产与分离的方法。

[3] 背景技术

[4] 在能源需求不断扩大、石油资源供应不稳定的情况下，以可再生生物质资源为原料的生物炼制技术越来越受到国内外研究学者的高度重视，尤其是利用工业生物技术生产的生物质能源和生物基大宗化学品，如燃料乙醇、生物柴油、生物气、生物氢气以及 1,3- 丙二醇、 2,3- 丁二醇、乳酸、琥珀酸、丁醇 / 丙酮等。其中， 1,3- 丙二醇、 2,3- 丁二醇、乳酸和琥珀酸等都备受关注、也是最有工业化前景的二元醇和二元酸类发酵产物。 1,3- 丙二醇和 2,3- 丁二醇都是重要的化工原料，具有广泛的应用领域，如用作溶剂、合成药物中间体、汽车抗冻剂、润滑剂、添加剂以及聚合物单体等。由于二者结构和性质存在差异，应用上也稍有区别。 1,3- 丙二醇主要用途是生产高品质的聚酯材料 -- 聚对苯二甲酸丙二酯（ PTT ）。 2,3- 丁二醇可以用于合成手性药物中间体，可以转化生成甲乙酮、 2- 丁烯、 1,3- 丁二烯、乙偶姻和二乙酰等重要化合物。近几年 1,3- 丙二醇与 2,3- 丁二醇的混合物与对苯二甲酸合成新的聚酯材料也已引起人们的关注。有机酸（甲酸、乙酸、乳酸、琥珀酸、柠檬酸、苹果酸、延胡索酸等）作为生产前景广阔的化工原料和中间体，在很多领域都有着广泛的应用。其中乳酸可用作防腐剂、调味料及酸味剂，而以乳酸为单体的聚乳酸（ PLA ）可广泛应用于医药、塑料、化妆品及农业中；琥珀酸是一种重要的 C_4 平台化合物，可以衍化生成 1,4- 丁二醇、四氢呋喃、 γ- 丁内酯等大宗化学品，琥珀酸也广泛用于医药、食品、农药、香料、橡胶、防护涂料、染料和照相材料等工业中。

[5] 目前 1,3- 丙二醇主要以石油裂解的乙烯和丙烯为原料化学合成，价格较高；而具有手性的 2,3- 丁二醇化学合成相当困难，因此微生物发酵法生产这两种二元醇具有相当大的优势。 2006 年杜邦公司完成了以基因工程大肠杆菌将葡萄糖一

步转化为 1,3- 丙二醇的中试研究，德国和国内的清华大学、大连理工大学也相继完成了用天然菌株将甘油转化为 1,3- 丙二醇的中试试验。 近几年甘油生物转化发酵生产 1,3- 丙二醇工艺研究主要包括两步发酵法、葡萄糖辅助发酵、混菌发酵 、 微氧发酵、生物柴油副产粗甘油的直接利用等。 微生物法生产 2,3- 丁二醇在二战期间的德国就实现了工业化生产，近几年又引起企业界的关注。相对于产 1,3- 丙二醇的菌种，用于生产 2,3- 丁二醇的菌株具有更宽的底物食谱，己糖、戊糖、特定的二糖、糖醛酸都可以作为底物，适合于非粮原料，如甘蔗汁（ Marilia et al, 2001 ）、木质纤维素 (Yu et al, 1985; Frazer and McCaskey, 1991) 、菊芋等的利用。

[6] 与化学法相比，生物法生产二元醇和有机酸利用的是绿色资源，是一条绿色化工路线，生产过程中排放的 CO_2 较少，并且琥珀酸生产还消耗 CO_2, 理论上每生成 l mol 琥珀酸要消耗 l mol CO_2。 尽管如此，微生物发酵过程中排放 CO_2 也是一个不容忽视的问题。仅乙醇、 1,3- 丙二醇、 2,3- 丁二醇、乳酸、丁醇 / 丙酮、谷氨酸等几种大宗发酵产品，二氧化碳的排放量就将达到 3.5-6 亿吨 / 年。每生产 1 吨 1,3- 丙二醇将产生约 0.3-0.5 吨 CO_2 ，其中甘油发酵约排放 0.1 吨 CO_2 ，其余部分来自发酵和分离的能源消耗。就发酵自身而言，二氧化碳排放实际上是浪费了原料，如果能将排放的 CO_2 回收用于生产琥珀酸，实现 1,3- 丙二醇与琥珀酸联产，就能提高原料利用率， 减少温室气体的排放 。利用 CO_2 生产琥珀酸通常采用高产琥珀酸的菌种（如 产琥珀酸厌氧螺菌 (*Anaerobiospirillum succiniproducens*) 和 产琥珀酸放线杆菌 (*Actinobacillus succinogenes*) ）或基因工程菌（如大肠杆菌），这样就需要不同的培养体系，实施起来比较麻烦。如何在同一培养体系中实现 CO_2 的回收利用和上述二元醇和有机酸的联产？已有的研究表明，甘油在 *Klebsiella pneumoniae* 内代谢的过程中，除 1,3- 丙二醇作为主要代谢产物外，琥珀酸作为三羧酸 中间产物以及厌氧代谢的终端还原产物，其它副产物包括 乙酸、乳酸、乙醇、 2,3- 丁二醇等。从经济效益角度看，乙酸、乙醇比较廉价，但却是主要副产物，而琥珀酸、乳酸和 2,3- 丁二醇经济性较好 ， 但 琥珀酸 产量较低。如果能通过代谢调控， 利用 *Klebsiella pneumoniae* 生产 1,3- 丙二醇的同时 将自身排放的 CO_2 再用于合成琥珀酸，那么就能实现二元醇

和有机酸的联产，减少廉价的副产物，提升甘油生物转化过程的整体经济效益。从 $NADH_2$ 和 ATP 平衡的角度分析，琥珀酸途径完全可以取代乙酸和乙醇途径。通过升高发酵罐压力、改用碳酸盐调节 pH，有望使代谢倾向琥珀酸途径。调高罐压就意味着增加发酵罐内 CO_2 和 H_2 的分压，从而抑制甲酸裂解酶的活性，进而影响丙酮酸的进一步代谢，丙酮酸积累将引发一系列代谢变化。 *K. pneumoniae* 的生长过程表现出先产酸后产醇的代谢生理特征，如果人为补加一些代谢有机酸，将会改变代谢的进程，有利于 1,3- 丙二醇的形成。甘油与糖类（葡萄糖、果糖、木糖或阿拉伯糖等）共发酵时有利于提高甘油的转化率，也有利于 乳酸、 2,3- 丁二醇、琥珀酸等副产物的形成。单独以糖类（葡萄糖、菊芋块茎水解液、菊芋等植物秸秆水解液等）为发酵底物时， *Klebsiella pneumoniae* 的主要代谢产物是 2， 3- 丁二醇，副产物是 乙酸、乙醇、乳酸、琥珀酸等。通过代谢调控同样有可能实现 2， 3- 丁二醇与乳酸和琥珀酸的联产。

[7] 产物分离是二元醇和有机酸联产面临的新问题。 盐析萃取或双水相萃取技术能够很好地解决现有的双二元醇和有机酸分离提取方法中存在的步骤多、收率低、成本高等突出问题。采用盐析萃取技术分离双二元醇和有机酸，即将无机盐和有机溶剂同时加入发酵液，在一定范围内发酵液可形成两相。上相即为富含目标产物的溶剂相或萃取相，下相为富盐相或萃余相。含有菌体的发酵液经盐析萃取后在两相之间形成固相层，由细胞、蛋白、核酸、多糖等组成。盐析萃取体系中所选用的无机盐包括可溶性磷酸盐、硫酸盐和碳酸盐等，有机溶剂包括甲醇、乙醇、丙醇、丁醇和丙酮等。前期的研究结果表明，盐析萃取体系适合于亲水性产物的提取分离，特别是二元醇和有机酸等生物基化学品，一步萃取收率通常在 90% 以上，而且可以将细胞和发酵液的分离与产物的萃取合二为一，是一种简单实用的分离集成技术。合理地设计萃取策略，采取不同的盐析萃取体系组合，第一步将 1， 3- 丙二醇和 / 或 2， 3- 丁二醇萃取在上相，乳酸和琥珀酸萃取在下相，第二步再将有机酸萃取到上相，这样就可以实现二元醇和有机酸的分离。第一步萃取上相中的 1， 3- 丙二醇和 / 或 2， 3- 丁二醇可以通过蒸馏、精馏等方法将有机溶剂回收，并将 1， 3- 丙二醇和 2， 3- 丁二醇分离开来；第二步萃取上相中的乳酸和琥珀酸可通过结晶、电渗析或酯化精馏等

方法将不同有机酸进行分离。可溶性碳酸盐与有机溶剂形成萃取体系的下相或萃余相可以用来调节发酵的 pH，发酵尾气中的 CO_2 可以用来回收萃余相中的碳酸盐，当然尾气中 CO_2 与相应碱或氧化物反应形成的产物（碳酸盐）也可以用来调节 pH 或者用作盐析剂。总之，发酵、萃取、 CO_2 回收利用可以藕合在一起。

[8] 本发明提出加压发酵和碳酸盐调节 pH- 盐析萃取 -CO_2 固定化耦合生产二元醇和有机酸的新思路，以期建立一个绿色、高效、低成本的联产新工艺。

[9] 发明内容

[10] 为解决现有海参有效成分提取中存在的目标产物单一、其它有效成分损失大、成本高、操作过程 繁琐 、生产周期长、溶剂耗量大等问题，本发明提供了一种亲水性低分子有机物 / 盐形成的新型双水相体系及疏水性有机物 / 亲水性低分子有机物 / 盐 / 水三液相体系从海参加工蒸煮液中同时提取分离多种有效成分的方法。

[11] 本发明的技术方案如下：

[12] 一种盐析萃取分离海参有效成分的方法，其操作步骤如下： 向海参提取液中，直接加入某些电解质和普通有机溶剂，利用盐离子的水化作用，形成有机溶剂 / 盐多相盐析萃取体系。根据溶解度差异，海参中极性不同的有效成分在各相中的分配不同，从而实现有效成分的分离与浓缩。如：将盐与 亲水性低分子有机物 按一定比例加入到海参提取液中，搅拌均匀，静置或离心，形成双水相：海参醇溶性有效成分富集在上相，蛋白质和多糖主要分配到上相和下相之间的固相中，重金属则被富集在下相；另外将盐、 亲水性低分子有机物以及疏水性有机物 按一定比例加入到海参提取液中，搅拌均匀，静置或离心，形成三液相盐析萃取体系： 海参油脂富集在上相，少量可溶性蛋白和多糖分配在中相， 绝大部分 蛋白和多糖分配在中相与下相之间的固相中，同时重金属被富集在下相。

[13] 其中双水相体系中盐的质量百分数为 10~30% ， 亲水性低分子有机物的质量百分数为 15~40% ， 萃取温度为 15~40℃，搅拌、静置分相的时间为0.1~4.0 h ，或者在 2000 ~ 8500 rpm 下离心 5 ~ 20 min ； 三液相体系盐的质量百分数为 10~30% ， 亲水性低分子有机物的质量百分数为 15~40% ，疏水性有机物的质量

百分数为 10~40% ， 搅拌均匀、静置分相 0.1~4.0 h 或者在 2000 ~ 8500 rpm 下离心 5 ~ 20 min ， 萃取温度为 15~40 ℃。

[14] 所适用的海参提取液是指含有海参有效成分的液体，包括鲜海参汁液或其浓缩液，也可以是海参加工蒸煮液或其浓缩液。海参加工蒸煮液是指蒸煮海参所得废液。

[15] 所选用的 亲水性低分子有机物 为 乙醇、乙二醇、正丙醇、异丙醇、 1 ， 2- 丙二醇、 1 ， 3- 丙二醇、正丁醇、异丁醇、叔丁醇 、 1, 2- 丁二醇、 1, 3- 丁二醇 、 1, 4- 丁二醇、 2, 3- 丁二醇、 丙酮中的一种或几种组合； 所选用的盐为氯化钠、氯化锂、硫酸铵、硫酸钠、碳酸钠、碳酸钾、醋酸钠、醋酸钾、磷酸钾、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、柠檬酸钠、柠檬酸钾、草酸钠、草酸钾中的一种或几种组合； 所选用的疏水性有机物为乙酸甲酯、乙酸乙酯、正己烷。

[16] 其中 萃取操作可以是一次萃取、多次萃取、连续萃取或逆流萃取。

[17] 本发明的有益效果是和现有的提取分离方法相比较，本发明利用多相盐析萃取体系对极性不同的多种有效成分进行同步提取与分离，获得了海参油、醇溶性有效成分（以乙醇为萃取剂可制作海参酒）、粗蛋白和多糖等多种产品，完成目标产物的初步纯化。经过萃取后获得的固相冷干粉中有害重金属离子（砷、汞、铅、镉）的含量显著降低， 有益离子（钙、铁，镁、锌）大部分保留。 整个生产工艺操作简单、生产成本低、 周期短、萃取条件温和、 有机溶剂廉价易回收、粘度低传质分相快、易于产业化 、产品符合食品安全的要求 。

[18] 本发明针对目前 1 ， 3- 丙二醇和 2 ， 3- 丁二醇发酵中二氧化碳排放、原料利用率低、发酵产品单一等问题，提出加压发酵 / 碳酸盐调节 pH- 盐析萃取 -CO_2 固定化耦合生产二元醇和有机酸的新方法。

[19] 本发明的技术方案如下：

[20] 本发明利用克雷伯氏杆菌（*Klebsiella pneumoniae*）在不同的原料下进行发酵，通过升高发酵罐压力为 0.01-0.5atm 、碳酸盐调节发酵 pH 6.0 或 7.0 、调控通气量 0.01-0.8vvm ， 气体为 CO_2 、发酵尾气或含 CO_2 的混合气，在同一培养体系中实现尾气二氧化碳的回收利用与二元醇和有机酸的联产。采用两步盐析萃取将二元醇和有机酸分开。

[21] 其中发酵原料可以为 95% 工业甘油、 60-85% 生物柴油副产甘油、葡萄糖、菊芋块茎、秸秆水解液等中的一种或者几种按比例混合。

[22] 碳酸盐为碳酸钠、碳酸钾、碳酸铵、碳酸钙、碳酸镁等，它们可以是发酵尾气中 CO_2 与对应碱或氧化物（氢氧化钠、氢氧化钾、氨水、氢氧化钙或氧化钙、氢氧化镁或氧化镁）反应的产物，或是可溶性碳酸盐（碳酸钠、碳酸钾或碳酸铵）与有机溶剂形成盐析萃取体系的萃余相。

[23] 二元醇是 1,3- 丙二醇、 2,3- 丁二醇，有机酸是乳酸、琥珀酸。

[24] 二元醇以 1,3- 丙二醇为主要产物时，调节发酵 pH 为 7.0 ；二元醇以 2,3- 丁二醇为主要产物时，调节发酵 pH 为 6.0 。

[25] 本发明可以采用间歇发酵、批式流加或连续发酵等方式生产。

[26] 盐析萃取体系中所选用的盐析剂包括可溶性磷酸盐、硫酸盐、碳酸盐或者它们的组合，有机溶剂包括甲醇、乙醇、丙醇、丁醇、丙酮或者它们的组合。两步萃取中第一步将 1 ， 3- 丙二醇和 / 或 2 ， 3- 丁二醇萃取在上相或有机相，乳酸和琥珀酸萃取在下相或富盐相，第二步再将有机酸从第一步的富盐相中萃取到上相，实现二元醇和有机酸的分离。

[27] 萃取可以采用单级、多级或连续萃取方式。

[28] 本发明的效果和益处：

[29] （一）同一株菌完成二元醇和有机酸的联产，实现 CO_2 零排放。

[30] 按照以往的工艺要完成二元醇和有机酸的联产通常需要两株不同的菌种，在不同的发酵罐和不同的培养条件下进行，这无疑增加了实施的难度。利用 *Klebsiella pneumoniae* 在转化甘油或葡萄糖生产 1,3- 丙二醇和 / 或 2 ， 3- 丁二醇的同时副产琥珀酸和乳酸，通过提高罐压、碳酸盐调节 pH 、回用副产有机酸等措施调控细胞代谢，增加琥珀酸和乳酸的产量，未被利用的 CO_2 再用碳酸盐吸收循环，达到 CO_2 零排放和原料充分利用的目的。

[31] （二）采用两步盐析萃取分离二元醇和有机酸，第一步萃取可以直接从发酵液中分离出二元醇，第二步萃取将 有机酸从第一步的富盐相中分离出来。

[32] 可溶性无机盐与有机溶剂形成的盐析萃取体系可将固液分离、浓缩、除蛋白和有机酸等多步工序整合为一，极大地简化分离工艺。合理地利用二元醇与有机

酸在不同盐析萃取体系中的不同分配行为，采取两步萃取的策略将两类产物分离开来。萃取操作易于放大和工业化，两步萃取前后紧密衔接，极易实施。

[33] 盐析萃取可以通过蒸馏和精馏的方式有效地克服萃取剂难回收的问题，但是其盐的用量较大，而盐的回收是阻碍盐析 - 萃取工业化的最重要因素之一。我们提出采用二氧化碳反应沉淀方法回收该盐析萃取体系中的碳酸盐，不仅可以降低分离能耗和成本，而且可以将生产过程中产生的大部分二氧化碳回收，极大的缓解了环境压力。

[34] （三）可溶性碳酸盐与有机溶剂盐析萃取的萃余相用于调节发酵 pH，调控二元醇和有机酸联产，实现了发酵 - 分离 -CO_2 固定的集成一体化。

[35] 用可溶性碳酸盐与有机溶剂盐析萃取时，其部分萃余相可回用于发酵过程的 pH 调节，实现发酵 - 分离 -CO_2 固定化的集成。一方面，利用部分富含碳酸盐的下相代替现有的氢氧化钠或氢氧化钾碱液调节发酵过程的 pH，节省除盐成本并有利于琥珀酸的生产；另一方面萃余相中还含有发酵剩余的底物和乙酸、琥珀酸等副产物，琥珀酸等有机酸的添加有助于提高 1,3- 丙二醇和 2，3- 丁二醇的浓度和转化率，这样既可以节约分离成本，又有利于提高原料利用率。

[36] 具体实施方式

[37] 以下结合技术方案详细叙述本发明的具体实施方式。

[38] 实施例 1：流加碳酸钠溶液调节发酵 pH 实现 1,3- 丙二醇、乳酸和琥珀酸联产

[39] （一）菌种：克雷伯氏杆菌（*Klebsiella pneumoniae* CGMCC 2028）

[40] （二）培养基组成：

[41] ① 种子培养基（1L）：

[42] 甘油：20g；KH_2PO_4：1.3g；$CaCO_3$：2g；$K_2HPO_4{\cdot}3H_2O$：4.454g；$(NH_4)_2SO_4$：2.0g；$MgSO_4{\cdot}7H_2O$：0.2g；酵母粉：1g；微量元素 A：2mL；Ca^{2+} 溶液：1mL；Fe^{2+} 溶液：1mL。

[43] ② 发酵培养基（1L）：

[44] 甘油：40g；KH_2PO_4：1.36g；柠檬酸：0.42g；$MgCl_2{\cdot}6H_2O$：0.26g；$(NH_4)_2SO_4$：6.61g；酵母粉：1g；微量元素 B：5mL。

[45] ③ Fe^{2+} 溶液组成（100 ml）：饱和盐酸：0.4 ml；$FeSO_4{\cdot}7H_2O$：0.5 g；

[46] ④ Ca^{2+} 溶液（100 ml）： $CaCl_2$： 2g。

[47] ⑤ 微量元素 A 组成（1L）：

[48] 饱和盐酸： 0.9mL； $MnCl_2·4H_2O$： 100mg； $NiCl_2·6H_2O$： 25mg； H_3BO_3： 60mg； $ZnCl_2$： 70mg； $NaMoO_4·2H_2O$： 35mg； $CuCl_2·2H_2O$： 20mg； $CoCl_2·6H_2O$： 200mg。

[49] ⑥ 微量元素 B 组成（1L）：

[50] 饱和盐酸： 10mL； $NaMoO_4·2H_2O$： 0.005g； $FeCl_3·6H_2O$： 5.4g； $CoCl_2·6H_2O$： 0.47g； H_3BO_3： 0.06g； $MnCl_2·4H_2O$： 0.17g； $ZnCl_2·6H_2O$： 0.68g； $CuCl_2·2H_2O$： 0.47g。

[51] （三）发酵控制： 5L 发酵罐，批式流加发酵，装液量 3L，发酵温度 37℃，罐压控制为 0.05atm，流加 85% 的生物柴油副产甘油，初始浓度为 40g /L，接种量为 10% （v/v），搅拌转速为 300 r/min， 通空气量为 0.04vvm，分别采用 5mol/L 的氢氧化钠溶 液和 2.5mol/L 碳酸钠溶液调节 pH 为 7.0。发酵开始 4 小时后检测甘油浓度，流加甘油，使甘油浓度控制在 20g /L 左右，发酵至 33 小时结束。

[52] （四）发酵结果：采用 5mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 时，发酵 33h，菌种在 8h 时生长最为旺盛， OD 为 8.26。产物 1,3- 丙二醇、琥珀酸、乳酸和 2,3- 丁二醇的终浓度分别为 52.32、 8.24、 30.23 和 10.02g /L； 1,3- 丙二醇、琥珀酸、乳酸和 2,3- 丁二醇的质量转化率分别为 37%、 6%、 22% 和 7%，甘油的总质量转化率为 72%。

[53] 采用 2.5mol/L 碳酸钠溶液调节 pH 时，发酵 33 小时，菌种在 9h 时生长最为旺盛， OD 为 9.77。产物 1,3- 丙二醇、琥珀酸、乳酸和 2,3- 丁二醇的终浓度分别为 46.67、 22.67、 56.13 和 8.09g /L。 1,3- 丙二醇、琥珀酸、乳酸和 2,3- 丁二醇的质量转化率分别为 30%、 14%、 36% 和 5%，甘油的总质量转化率为 85%。碳酸钠溶液调节发酵 pH 相对于氢氧化钠调节发酵 pH 而言， 1,3- 丙二醇和 2,3- 丁二醇的浓度略有下降，但琥珀酸和乳酸的浓度则分别提高了 175% 和 86%，甘油总转化率提高了 13%。

[54] 实施例 2： 流加碳酸钠溶液调节 pH 实现 1,3- 丙二醇、琥珀酸和乳酸联产

[55] （一）菌种：克雷伯氏杆菌（*Klebsiella pneumoniae* CGMCC 2028）

[56] （二）培养基组成：发酵培养基酵母粉： 2g ，其它 同实施例 1。

[57] （三）发酵控制： 5L 发酵罐，批式流加发酵，装液量 3L ，发酵温度 37℃，流加 95% 工业甘油，初始浓度为 40g /L ，接种量为 10% （ v/v ），搅拌转速为 300 r/min ， 通空气量为 0.02vvm ，分别采用 5mol/L 氢氧化钠溶液和 2.5mol/L 碳酸钠溶液调节 pH 为 7.0。发酵开始 4 小时后检测甘油浓度，流加甘油，使甘油浓度控制在 15-20g/L 左右，发酵至 36 小时结束。

[58] （四）发酵结果：采用 5mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 时，发酵 36h ，菌种在 14h 时生长最为旺盛， OD 为 9.47 ，发酵结束 OD 降至 6.51。产物 1,3- 丙二醇、琥珀酸、乳酸、 2,3- 丁二醇和乙醇的最终浓度分别为 65.50 、 9.65 、 43.76 、 10.79 和 6.86g /L ； 1,3- 丙二醇、琥珀酸、乳酸、 2,3- 丁二醇和乙醇的质量转化率分别为 36% 、 5% 、 24% 、 6% 和 4% ，甘油的总质量转化率为 75%。

[59] 采用 2.5mol/L 碳酸钠溶液调节 pH 时，发酵 36h ，菌种在 16h 时生长最为旺盛， OD 为 13.2 ，发酵结束 OD 降至 8.56。产物 1,3- 丙二醇、琥珀酸、乳酸、 2,3- 丁二醇和乙醇的最终浓度分别为 65.20 、 40.47 、 60.97 、 13.15 和 10.04g /L ； 1,3- 丙二醇、琥珀酸、乳酸、 2,3- 丁二醇和乙醇的质量转化率分别为 26% 、 16% 、 25% 、 5% 和 4% ，甘油的总质量转化率为 76%。碳酸钠溶液调节发酵 pH 相对于氢氧化钠调节发酵 pH 而言更有利于琥珀酸的生产，琥珀酸的浓度和转化率分别提高了 319% 和 207% ，乳酸的浓度提高了 39% ， 1,3- 丙二醇浓度相差不大， 2,3- 丁二醇浓度略有提高。

[60] 实施例 3 ：碳酸钠 / 乙醇萃余相调节 pH 值的 1,3- 丙二醇批式流加发酵

[61] （一）菌种：克雷伯氏杆菌（*Klebsiella pneumoniae* CGMCC 2028）

[62] （二）培养基组成：同实施例 1。

[63] （三）发酵控制： 5L 发酵罐，批式流加发酵，装液量 3L ，发酵温度为 37℃，搅拌转速为 200r/min ，接种量为 10%(v/v) ， 通空气量为 0.02vvm ，发酵过程中分别采用 5mol/L 氢氧化钠溶液和碳酸钠 / 乙醇盐析萃取体系萃余相调节 pH 为 7.0。 流加 95% 工业甘油，初始浓度为 40g /L ，待发酵液中甘油消耗至一定浓度时 (20g/ 左右) 开始流加甘油，发酵过程中控制甘油浓度在 15-25g/L ， 发酵至

36 h 结束。

[64] （四）发酵结果：采用 5mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 时，发酵 36h 后，产物浓度达到最佳，最终残余甘油浓度为 18.42g /L, 最大菌体 OD 值为 8.1 ，最终 1,3-丙二醇、琥珀酸、乳酸和 2,3- 丁二醇的浓度分别为 55.41 、 6.85 、 25.63 和 7.68g /L ； 1,3- 丙二醇、琥珀酸、乳酸和 2,3- 丁二醇的质量转化率分别为 49% 、 4% 、 19% 和 6% ，甘油的总质量转化率为 78% 。

[65] 采用碳酸钠 / 乙醇盐析萃取体系萃余相调节 pH 时， 发酵 36 h 后，残余甘油浓度为 18.40g /L, 最大菌体 OD 值为 12.4 ，最终 1,3- 丙二醇、琥珀酸、乳酸和 2,3-丁二醇的浓度分别为 64.29 、 10.34 、 57.92 和 8.08g /L ； 1,3- 丙二醇、琥珀酸、乳酸和 2,3- 丁二醇的质量转化率分别为 46% 、 4% 、 31% 和 5% ，甘油的总质量转化率为 86% 。碳酸钠 / 乙醇盐析萃取体系萃余相回用于 1,3- 丙二醇发酵过程相对于 氢氧化钠碱液调节 pH 而言， 1,3- 丙二醇和琥珀酸的转化率略有下降，但是二者的浓度分别上升了 16% 和 49% ；乳酸的浓度和转化率更是分别提高了 126% 和 60% ，浓度达到了 57.92g /L ；而甲酸和乙酸等其他主要杂质酸浓度分别下降了 123% 和 122% 。

[66] 实施例 4 ：碳酸钠 / 乙醇萃余相调节 pH 值的 2,3- 丁二醇批式流加发酵

[67] （一）菌种：克雷伯氏杆菌（*Klebsiella pneumoniae* CICC 10011 ）

[68] （二）培养基组成：

[69] ① 种子培养基（ 1L ）： 葡萄糖： 80g ； $(NH_4)_2HPO_4$ ： 6.0g ； KCl ： 1.8g ； EDTA ： 0.51g ； $MgSO_4·7H_2O$ ： 0.6g ； $FeSO_4·7H_2O$ ： 0.0225g ； $MnSO_4·7H_2O$ ： 0.0038g ； $ZnSO_4·7H_2O$ ： 0.0075g ； 柠檬酸 ： 0.21g ； 柠檬酸钠 ： 0.294g

[70] ② 发酵培养基（ 1L ）： 葡萄糖： 50g ； $(NH_4)_2SO_4$ ： 6.61g ； KH_2PO_4 ： 1.36g ； 酵母粉： 1g ； 微量元素 B ： 5ml ； $MgCl_2·6H_2O$ ： 0.26g ； 柠檬酸： 0.42g ；

[71] ③ 微量元素 B 组成（ 1L ）： 饱和盐酸： 10mL ； $NaMoO_4·2H_2O$ ： 0.005g ； $FeCl_3·6H_2O$ ： 5.4g ； $CoCl_2·6H_2O$ ： 0.47g ； H_3BO_3 ： 0.06g ； $MnCl_2·4H_2O$ ： 0.17g ； $ZnCl_2·6H_2O$ ： 0.68g ； $CuCl_2·2H_2O$ ： 0.47g 。

[72] （三）发酵控制： 5L 发酵罐，批式流加发酵，装液量 3L ，发酵温度为 37℃

，搅拌转速为 300 r/min，接种量为 5%(v/v)，通空气量为 0.1vvm，发酵过程中分别采用 5mol/L 的氢氧化钠溶液和碳酸钠 / 乙醇盐析萃取体系萃余相调节 pH 为 6.0。当葡萄糖浓度低于 50 g /L 时补加一定量固体葡萄糖，并通过定时补加葡萄糖使其浓度保持在 30-50g/L 之间。

[73] （四）发酵结果：采用 5mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 时，发酵 52h 时，产物浓度达到最佳，最终残糖浓度为 43.43g /L, 最大菌体 OD 值达到了 15.91；2,3- 丁二醇、乙偶姻、乳酸和琥珀酸的终浓度分别为 62.63、15.62、14.26 和 4.13g /L；2,3- 丁二醇、乙偶姻、乳酸和琥珀酸的质量转化率分别为 36%、9%、8% 和 2%，葡萄糖的总质量转化率为 55%。

[74] 采用碳酸钠 / 乙醇盐析萃取体系萃余相调节 pH 时，发酵 66 h 后，最终残糖浓度为 49.49g /L, 最大菌体 OD 值达到了 15.73，2,3- 丁二醇、乙偶姻、乳酸和琥珀酸的终浓度分别为 78.18、10.23、18.32 和 8.13g /L；2,3- 丁二醇、乙偶姻、乳酸和琥珀酸的质量转化率分别为 41%、5%、10% 和 4%，葡萄糖的总质量转化率为 60%。碳酸钠 / 乙醇盐析萃取体系萃余相回用于 2,3- 丁二醇发酵时，2,3- 丁二醇、乳酸和琥珀酸的浓度分别比选用氢氧化钠碱液调节 pH 时提高了 25%、28% 和 97%，三者的转化率分别提高了 14%、17% 和 79%。

[75] 实施例 5：1,3- 丙二醇、2,3- 丁二醇与乳酸和琥珀酸的盐析萃取

[76] 对 1,3- 丙二醇、2,3- 丁二醇、乳酸和琥珀酸联产的发酵液进行盐析萃取，发酵液中 1,3- 丙二醇、2,3- 丁二醇、乳酸和琥珀酸浓度分别为 46.67、8.36、56.13 和 22.67g /L，向 7.0g 的发酵液中加入 1.0g 碳酸钠和 2.0g 乙醇，搅拌均匀，室温静置，形成两相，上相为含有 1,3- 丙二醇和 2,3- 丁二醇的醇相，下相为富含乳酸和琥珀酸的盐相。1,3- 丙二醇的分配系数为 7.0，收率为 90%，2,3- 丁二醇的分配系数和收率分别为 8.0 和 94%；74% 乳酸和 95% 琥珀酸分配在盐相。向盐相中加入 0.5g 磷酸氢二钾和 2.5g 乙醇进行第二次萃取，上相中乳酸的收率为 75%，琥珀酸收率为 68%。

权利要求书

[权利要求 1]

1. 一种二元醇与有机酸联产与分离方法，是以工业甘油、生物柴油副产的甘油、葡萄糖、菊芋块茎、秸秆水解液中的一种或几种为原料，在同一培养体系中实现二元醇和有机酸的联产与 CO_2 的回收利用，采用两步盐析萃取将二元醇和有机酸分开，其特征是：

（1）菌种：克雷伯氏菌属（*Klebsiella pneumoniae*）；

（2）联产调控方式：利用碳酸盐调节发酵 pH 6.0 或 7.0，通 0.01-0.8vvm CO2、发酵尾气或含 CO2 的混合气，发酵罐压力为 0.01-0.5atm；

（3）产品分离方法：第一步盐析萃取将二元醇萃取在上相或有机相，有机酸萃取在下相或富盐相；第二步再将有机酸从第一步的富盐相中萃取到上相，从而实现二元醇和有机酸的分离。

2. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征是发酵原料为 95% 工业甘油、 60-85% 生物柴油副产甘油、葡萄糖、菊芋块茎、秸秆水解液中的一种或者几种混合。

3. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征是调节 pH 的碳酸盐为碳酸钠、碳酸钾、碳酸铵、碳酸钙、碳酸镁。

4 根据权利要求 1、 2 或 3 所述的 方法，其特征是二元醇是 1,3-丙二醇、 2,3- 丁二醇，有机酸是乳酸、琥珀酸。

5. 根据权利要求 1、 2 或 3 所述的 方法，其特征是发酵方式是间歇发酵、批式流加或连续发酵。

6. 根据权利要求 4 所述的 方法，其特征是 二元醇以 1,3- 丙二醇为主要产物时，调节发酵 pH 为 7.0；

7. 根据权利要求 4 所述的 方法，其特征是 二元醇以 2,3- 丁二醇为主要产物时，调节发酵 pH 为 6.0。

8. 根据权利要求 1、 2 或 3 所述的 方法，其特征是 盐析萃取体系所选用的无机盐是可溶性磷酸盐、硫酸盐和碳酸盐的一种或几种

组合。

9. 根据权利要求 1 、 2 或 3 所述的 方法 ， 其特征是 有机溶剂是甲醇、乙醇、丙醇、丁醇和丙酮的一种或几种组合。

10. 根据权利要求 3 所述的方法，其特征是碳酸盐是发酵尾气中 CO_2 与对应碱或氧化物反应的产物，或是可溶性 碳酸盐与有机溶剂形成萃取体系的萃余相。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2011/080589

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See the extra sheet

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)

IPC: C12P 7/-; C07C 31/-; C07C 59 /-; C07C 55/-; C12R 1/-

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)

WPI, EPODOC, CPRS, CNKI, STN

propanediol, propylenen w glycol, butanediol, succinic, butanedioic, lactic

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN102321680A (UNIV. DALIAN TECHNOLOGY), 07 Jun. 2011(07.06.2011), claims 1-10	1-10
A	CN1696297A (UNIV TSINGHUA), 16 Nov. 2005(16.11.2005), claim 1	1-10
A	JIANG Bo et al., Aqueous two-phase extraction of 2,3-butanediol from fermentation broths using an ethanol/phosphate system, Process Biochemistry, 2009, vol.44, No.1, pages 112-117, especially the abstract	1-10

☐ 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	Date of mailing of the international search report
27 Feb. 2012(27.02.2012)	22 Mar.2012(22.03.2012)

Name and mailing address of the ISA
State Intellectual Property Office of the P. R. China
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao
Haidian District, Beijing 100088, China
Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer
ZHOU, Yuan
Telephone No. (86-10) **62084583**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2011/080589

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Documents referred in the Report	Publication Date
CN102321680A	07.06.2011	none	
CN1696297A	16.11.2005	WO2006128381A1	07.12.2006
		AU2006254616A1	07.12.2006
		CA2610777A1	07.12.2006
		CN1327001C	18.07.2007
		EP1892300A1	27.02.2008
		NO20080001A	03.03.2008
		KR20080018936A	28.02.2008
		JP2008541738A	27.11.2008
		US2010028965A1	04.02.2010
		RU2404248C2	20.11.2010
		BRPI0613543A2	18.01.2011
		AU2006254616B2	00.08.2011

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2011/080589

Continue:
CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P 7/18 (2006.01) i
C12P 7/44 (2006.01) i
C12P 7/56 (2006.01) i
C07C 31/20 (2006.01) n
C07C 59/08(2006.01) n
C07C 55/10(2006.01) n
C12R 1/22 (2006.01) n

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2011/080589

A. 主题的分类

参见附加页

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)

IPC：C12P 7/-； C07C 31/-； C07C 59 /-；C07C 55/-； C12R 1/-；

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）)

WPI,EPODOC,CPRS,CNKI,STN

丙二醇，丁二醇，乳酸，琥珀酸，克雷伯氏，propanediol, propylenen w glycol, butanediol, succinic, butanedioic, lactic

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
PX	CN102321680A (大连理工大学), 07. 06 月 2011(07.06.2011), 权利要求 1-10	1-10
A	CN1696297A (清华大学), 16. 11 月 2005(16.11.2005), 权利要求 1	1-10
A	JIANG Bo et al. Aqueous two-phase extraction of 2,3-butanediol from fermentation broths using an ethanol/phosphate system, Process Biochemistry 2009,vol.44, No.1, pages 112-117, especially abstract	1-10

☐ 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	国际检索报告邮寄日期
27. 02 月 2012(27.02.2012)	~~22.3 月 2012 (22.03.2012)~~ ~~22.3 月 2012 (22.03.2012)~~
ISA/CN 的名称和邮寄地址： 中华人民共和国国家知识产权局 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 周元 电话号码：(86-10) **62084583**

国际检索报告

关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2011/080589

检索报告中引用的专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN102321680A	07.06.2011	none	
CN1696297A	16.11.2005	WO2006128381A1	07.12.2006
		AU2006254616A1	07.12.2006
		CA2610777A1	07.12.2006
		CN1327001C	18.07.2007
		EP1892300A1	27.02.2008
		NO20080001A	03.03.2008
		KR20080018936A	28.02.2008
		JP2008541738A	27.11.2008
		US2010028965A1	04.02.2010
		RU2404248C2	20.11.2010
		BRPI0613543A2	18.01.2011
		AU2006254616B2	00.08.2011

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2011/080589

续：

主题的分类

C12P 7/18 (2006.01) i

C12P 7/44 (2006.01) i

C12P 7/56 (2006.01) i

C07C 31/20 (2006.01) n

C07C 59/08(2006.01) n

C07C 55/10(2006.01) n

C12R 1/22 (2006.01) n