

## (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  
2023年2月9日 (09.02.2023)



(10) 国际公布号  
**WO 2023/010787 A1**

(51) 国际专利分类号:

*C12P 7/62* (2022.01) *C12R 1/23* (2006.01)  
*C12P 39/00* (2006.01) *C12R 1/225* (2006.01)  
*C12R 1/46* (2006.01) *C12R 1/01* (2006.01)  
*C12R 1/25* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/142357

(22) 国际申请日: 2021年12月29日 (29.12.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:  
202110878525.5 2021年8月2日 (02.08.2021) CN

(71) 申请人: 中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所 (INSTITUTE OF ENVIRONMENT AND SUSTAINABLE DEVELOPMENT IN AGRICULTURE, CHINESE ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES) [CN/CN]; 中国北京市海淀区中关村南大街12号, Beijing 100081 (CN)。

(72) 发明人: 董红敏 (DONG, Hongmin); 中国北京市海淀区中关村南大街12号, Beijing 100081 (CN)。王顺利 (WANG, Shunli); 中国北京市海淀区中关村南大街12号, Beijing 100081 (CN)。张万钦 (ZHANG, Wanqin); 中国北京市海淀区中关村南大街12号, Beijing 100081 (CN)。尹福斌 (YIN,

Fubin); 中国北京市海淀区中关村南大街12号, Beijing 100081 (CN)。曹起涛 (CAO, Qitao); 中国北京市海淀区中关村南大街12号, Beijing 100081 (CN)。连天境 (LIAN, Tianjing); 中国北京市海淀区中关村南大街12号, Beijing 100081 (CN)。周谈龙 (ZHOU, Tanlong); 中国北京市海淀区中关村南大街12号, Beijing 100081 (CN)。朱志平 (ZHU, Zhiping); 中国北京市海淀区中关村南大街12号, Beijing 100081 (CN)。

(74) 代理人: 北京路浩知识产权代理有限公司 (CN-KNOWHOW INTELLECTUAL PROPERTY AGENT LIMITED); 中国北京市海淀区中关村大街11号9层965, Beijing 100086 (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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING POLYHYDROXYALKANOATE BY FERMENTATION OF AGRICULTURAL WASTES

(54) 发明名称: 农业废弃物发酵生产聚羟基脂肪酸酯的方法

(57) Abstract: The present invention provides a method for producing a polyhydroxyalkanoate (PHA) by fermentation of agricultural wastes. In the present invention, a fermentation substrate is agricultural wastes, comprising a mixture of livestock and poultry manure and a planting industry waste. The method comprises: at a primary fermentation stage, a zymophyte is a lactic acid bacterium, a fermentation temperature is 35-55°C, a pH value is 3.0-6.0, and oxidation-reduction potential in a system is maintained at -250 to -450 mV by means of intermittent aeration; and at a secondary fermentation stage: aerobic fermentation is performed by using acclimated sludge, a fermentation temperature is 20-40°C, and a pH value is 7.0-9.0. According to the present invention, under the condition that an exogenous carbon source and an exogenous nitrogen source are not additionally added, an organic carbon source in the livestock and poultry manure and the planting industry waste is efficiently converted into the PHA, and thus, the production source of the PHA can be broadened, the production cost of the PHA can be reduced, and the potential pollution of the livestock and poultry manure and the planting industry waste is reduced.

(57) 摘要: 本发明提供了一种农业废弃物发酵生产聚羟基脂肪酸酯的方法。本发明中发酵底物为农业废弃物, 包括畜禽粪污和种植业废弃物的混合物, 该方法包括: 一级发酵阶段: 发酵菌为乳酸菌, 发酵温度为35-55°C, pH值为3.0-6.0, 间歇曝气使系统中氧化还原电位维持在-250~-450mV; 二级发酵阶段: 采用驯化的污泥进行好氧发酵, 发酵温度为20-40°C, pH值为7.0-9.0。本发明在不额外添加外源碳源和氮源的情况下, 将畜禽粪污和种植业废弃物中有机碳源高效转化为PHA, 不仅可拓宽PHA的生产来源, 降低PHA生产成本, 而且减少畜禽粪污和种植业废弃物的潜在污染。

WO 2023/010787 A1

(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))。

## 农业废弃物发酵生产聚羟基脂肪酸酯的方法

### 交叉引用

本申请要求2021年8月2日提交的专利名称为“农业废弃物发酵生产聚羟基脂肪酸酯的方法”的第202110878525.5号中国专利申请的优先权，其全部公开内容通过引用整体并入本文。

### 技术领域

本发明属于农业废弃物利用领域，具体涉及一种农业废弃物发酵生产聚羟基脂肪酸酯的方法。

### 背景技术

聚羟基脂肪酸酯（Polyhydroxyalkanoates, PHA）是一种可生物降解的新型可塑原料，它具备传统塑料制品相似的材料学特性。不同于传统塑料，PHA可在自然环境（如土壤、海水）或生物处理（如厌氧消化、好氧堆肥）条件下被完全降解为CO<sub>2</sub>/CH<sub>4</sub>和水，是环境友好的可降解材料。PHA的推广应用是解决白色污染和改善生态环境的有效途径，为此PHA的高效生产和应用也得到了广泛关注。

当前PHA发酵生产工艺主要通过葡萄糖、植物油等为碳源，在高碳低氮的失衡条件下进行合成。原料成本高制约了PHA的规模化生产和应用，为降低生产成本，学者们研究了系列利用废弃生物质生产PHA的方法，如中国专利CN 111394398 A公开了一种以高盐糖蜜为原料进行发酵制备PHA的方法，以糖蜜废水替代葡萄糖降低碳源成本；CN 104357496B公开了一种利用玉米浆水解液合成PHA的方法，采用水解玉米浆提供氮源降低了PHA合成中外加氮源的成本；CN 111892699A公开了一种利用餐厨垃圾合成PHA的设备和方法，其将餐厨垃圾首先酸化再进一步合成PHA。畜禽粪便相对餐厨垃圾而言，资源量大且物料特性稳定，但N/P含量更高，易使PHA培养过程达到营养平衡状态，造成PHA被转化利用，不利于PHA的累积，这就导致了采用畜禽粪便生产PHA相对于其他物料

的难度更大，目前尚没有理想的方法。

鉴于此，有必要摸索出一种新的更利于推广的，适于以含有高氮、磷、有机物和矿物质等复杂成分的废弃物为原料合成 PHA 的方法。

## 发明内容

5 本发明为解决PHA生产过程中原料成本高，提供了一种利用畜禽粪污等农业废弃物两阶段发酵生产PHA的方法。

具体地，本发明的技术方案如下：

一种农业废弃物发酵生产聚羟基脂肪酸酯（PHA）的方法，其发酵底物为农业废弃物，所述农业废弃物包括畜禽粪污和种植业废弃物的混合物，所述种植业废弃物为农作物秸秆和/或果蔬废弃物；所述方法包括：  
10 物，所述种植业废弃物为农作物秸秆和/或果蔬废弃物；所述方法包括：

A、一级发酵阶段：发酵菌为乳酸菌，发酵温度为35-55℃，pH值为3.0-6.0，间歇曝气使发酵系统中氧化还原电位（ORP）维持在-250mV~-450mV；

B、二级发酵阶段：采用驯化的污泥进行好氧发酵，发酵温度为  
15 20-40℃，pH值为7.0-9.0。

本发明在现有PHA合成技术研究基础上，提出了利用畜禽粪污与其他种植源农业废弃物为原料通过两阶段发酵工艺生产PHA的方案。其中PHA的主要成分为PHB和PHV。

具体地，本发明通过各阶段不同功能菌种的选择，配合各发酵阶段的  
20 特定条件控制，使得在一级发酵阶段可定向生成具有特定比例关系的乳酸和多种挥发性脂肪酸，进而在后续的二级发酵阶段实现PHA的高效生产。

优选，一级发酵阶段的发酵温度为35-45℃，pH值为4.5-5.5。这一条件可提高优势产乳酸菌的底物竞争能力，同时发酵产生的乳酸会降低系统pH，进一步抑制其他微生物的代谢活性，进而促进优势乳酸菌的富集，  
25 于实现粪污等农业废弃物中有机碳源向特定比例关系的乳酸和多种挥发性脂肪酸的定向转化。

本发明所述挥发性脂肪酸为乙酸、丙酸、丁酸等（还可能有少量的异

丁酸、戊酸、异戊酸、己酸等)。

优选,二级发酵阶段的发酵温度为22-28°C, pH值为7.5-8.5, 以提升PHA合成菌对乳酸等有机碳源的利用效率。

本发明中,所述发酵底物为畜禽粪污和果蔬废弃物的混合物,所述混  
5 合物的碳氮比为(30-50):1, 优选为(35-40):1;

或,所述发酵底物为畜禽粪污和农作物秸秆的混合物,所述混合物的  
碳氮比为(30-40):1。

本发明发现,当进一步控制发酵底物中畜禽粪污和种植业废弃物的比  
例,使其处于本发明限定的碳氮比时,可有助于废弃物中有机碳源向特定  
10 比例的乳酸和多种挥发性脂肪酸的定向转化,并结合发酵液中的N、P及其他  
微量元素含量,进而保证二级发酵阶段PHA的生产。

本发明所述果蔬废弃物为水果或蔬菜种植过程中产生的腐烂的果实、  
秧、藤、叶以及加工过程中的尾料;农作物秸秆为玉米秸秆、小麦秸秆、  
水稻秸秆中的一种或多种;所述果蔬废弃物的总固体含量2-20%,挥发性  
15 固体含量90-98%TS(基于总固体含量),总糖含量为10-20%(基于鲜重),  
碳氮比为(40-100):1;农作物秸秆的总固体含量为30-70%,挥发性固体  
含量为85-95%TS(基于总固体含量),粗纤维含量为35-55%,碳氮比为  
(45-60):1。

本发明中,作为一个具体实施方式,一级发酵阶段的曝气量为0-2000  
20 mL/L/d;

优选,一级发酵阶段的具体曝气强度为0-400 mL/L/min,曝气时间为  
0-10 min/d。

本发明中,二级发酵阶段为连续空气曝气好氧发酵,空气曝气强度为  
0.8-1.2 L/L/min。

本发明中,所述乳酸菌包括双歧杆菌、嗜热链球菌、植物乳杆菌、嗜  
25 酸乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、保加利亚乳杆菌中的一种或多种。

本发明中,所述驯化的污泥的制备方法为:

以乙酸为碳源，氯化铵为氮源，将污水处理厂好氧曝气池底泥在室温（20-30℃）、空气连续曝气及pH值为6.5-9.5的发酵体系下驯化；

和/或，空气连续曝气的强度为0.8-1.2 L/L/min。

经驯化后的污泥中主要微生物种类为可合成PHA的菌。一般驯化时间为4个月左右，以实现富集可高效产PHA的菌群的目的为准。

优选，经驯化后，所述驯化的污泥中主要菌群为副球菌属(*Paracoccus*)和芽殖杆菌属(*Gemmobacter*)，PHA含量占细菌细胞干重的27-42%。

本发明中，一级发酵阶段的发酵浓度为2%VS-15%VS（以挥发性固体计）；菌液接种量为2%-10%（V/V），菌液中的活菌数为 $10^6$ - $10^9$  CFU/mL；

和/或，二级发酵阶段的发酵浓度为60-120 mmol C/L，优选为100-120 mmol C/L；驯化的污泥的接种量为40%-80%（V/V），水力停留时间（HRT）为5-36 h。上述条件相互配合，有助于保证最终的发酵效果。

本发明的有益效果：

本发明提供了一种利用畜禽粪污与其他农业废弃物两阶段混合发酵产PHA的方法，PHA产量高，且发酵底物为畜禽粪污、农作物秸秆、果蔬废弃物等，不额外添加外源碳源和氮源，原料来源广泛，拓宽了PHA的生产来源，并显著降低PHA生产过程的原料成本；同时还实现了畜禽粪污等农业源有机废弃物的无害化处理和高值化利用，具有良好的应用前景。

## 具体实施方式

下面将结合实施例对本发明的优选实施方式进行详细说明。需要理解的是以下实施例的给出仅是为了起到说明的目的，并不是用于对本发明的范围进行限制。本领域的技术人员在不背离本发明的宗旨和精神的情况下，可以对本发明进行各种修改和替换。

本发明具体实施方式部分，乳酸和挥发性脂肪酸含量分别采用液相色谱仪和气相色谱仪测定，具体的仪器配置及测定方法参见：Lian T, Zhang W, Cao Q, et al. Enhanced lactic acid production from the anaerobic co-digestion

of swine manure with apple or potato waste via ratio adjustment [J].  
Bioresource Technology, 2020, 318: 124237.

PHA 含量采用气相色谱仪测定，具体仪器配置和测试方法参见：  
Pinto-Ibieta F, et al. Strategy for biological co-production of levulinic acid and  
5 polyhydroxyalkanoates by using mixed microbial cultures fed with synthetic  
hemicellulose hydrolysate [J]. Bioresource Technology, 2020, 309: 123323.

### 实施例 1 猪粪-果蔬混合发酵生产 PHA

本实施例包括如下步骤：

1、乳酸菌培养：配置乳酸菌培养基—MRS肉汤（青岛高科技工业园  
10 海博生物技术有限公司），接种佰生优乳酸菌粉（4 g/L，购自善恩康生物  
科技(苏州)有限公司），控制培养温度和pH分别为35-45°C和6.0-7.0，培养  
36 h。

2、将培养后的乳酸菌的菌液（活菌数约为 $10^7$  CFU/mL）接种到以猪  
粪、苹果废弃物为底物的厌氧发酵罐中，混合物料的碳氮比为（35-40）:1，  
15 接种量为10%（V/V）。发酵浓度为4%VS（以挥发性固体计），pH控制在  
4.5-5.5，发酵温度控制为35-40°C，间歇曝气使环境（发酵系统）中氧化还  
原电位（ORP）维持在-250mV~-450mV，具体曝气强度为200 mL/L/min，曝  
气时间5 min/d。经过2周连续厌氧发酵，物料的总羧酸产量、乳酸产量和  
挥发性脂肪酸产量分别为932.6、880.3和52.3 mg/gVS，其中挥发性脂肪酸  
20 中乙酸、丙酸、丁酸的产量分别为16.6、1.6和25.9 mg/gVS。

3. 污泥驯化：以乙酸为碳源，氯化铵为氮源，以污水处理厂好氧曝气  
池底泥为初始PHA菌种来源，在室温（20-30°C）、连续曝气（1 L/L/min）  
及pH条件下（6.8-9.3）驯化4个月；本发明中经驯化后，污泥中的优势PHA  
合成菌属为*Paracoccus* (30%)和*Gemmobacter* (36%)，PHA含量占细菌细胞  
25 干重的27-42%。

4. 以步骤 2 发酵获得的酸化液为原料，接种步骤 3 驯化后的污泥，  
初始接种量为 70%（V/V），后续连续运行过程不再补充；发酵浓度为 108

mmol C/L, pH 控制在 7.8-8.3, 发酵温度控制为 22-28℃, 连续曝气 0.8 L/L/min, HRT 控制在 24 h。经过 3 周连续发酵, 系统中 PHA 浓度达 328 mg/L, 产量为 348 mg PHA/g VS, 其中具体成分为 PHB (97%) 和 PHV (3%)。

## 5 实施例 2 猪粪-秸秆混合发酵生产 PHA

本实施例的生产步骤与实施例1相同, 区别仅在于: 步骤2中发酵原料为猪粪与玉米秸秆废弃物, 混合物料的碳氮比为35: 1。经过2周连续厌氧酸化发酵后, 发酵原料单位VS的总羧酸产量、乳酸产量和挥发性脂肪酸产量分别为640.8、609.4和31.4 mg/gVS, 其中挥发性脂肪酸中乙酸和丁酸的产量分别14.4和17.0 mg/gVS。

该酸化液经过二级好氧发酵(工艺参数同实施例1中步骤3和4), 经过3周连续发酵, 系统中PHA浓度达314 mg/L, 产量为326 mg PHA/g VS, 其中具体成分为PHB (96.9%) 和PHV (3.1%)。

## 实施例 3

15 本实施例的生产步骤与实施例1相同, 区别仅在于: 步骤2中发酵pH控制在3.5, 发酵温度控制为55℃。

一级发酵结果: 经过2周连续厌氧发酵, 物料的总羧酸产量、乳酸产量和挥发性脂肪酸产量分别为373.4、342.5和30.9 mg/gVS, 其中挥发性脂肪酸中乙酸、丙酸和丁酸的产量分别为5.0、2.7和23.2 mg/gVS。

20 二级发酵结果: 经过3周连续发酵, 系统中PHA浓度达277 mg/L, 产量为275 mg PHA/g VS, 其中具体成分为PHB (96.5%) 和PHV (3.5%)。

## 实施例 4

本实施例的生产步骤与实施例 1 相同, 区别仅在于: 步骤 4 中发酵浓度控制在 60 mmol C/L。经过 3 周连续发酵, 系统中 PHA 浓度达 286 mg/L, 产量为 217 mg PHA/g VS, 其中具体成分为 PHB (94%) 和 PHV (6%)。

## 实施例 5

本实施例的生产步骤与实施例 1 相同，区别仅在于：步骤 4 中发酵温度控制在 40 °C。经过 3 周连续发酵，系统中 PHA 浓度达 252 mg/L，产量为 267mg PHA/g VS，其中具体成分为 PHB (95.5%) 和 PHV (4.5%)。

### 对比例 1

5 参照实施例1中酸化液中乳酸浓度，以人工配置的仅含乳酸的酸化液为碳源合成PHA，PHA合成条件同实施例1步骤3和4，经过3周连续发酵，系统中PHA浓度达157 mg/L，产量为173 mg PHA/g VS，其中主要成分为 PHB (99.4%)。比实施例1和实施例2中PHA单位产量分别降低了50.3%和46.9%，表明本发明获得的农业废弃物酸化液在合成PHA方面有显著优势。

### 10 对比例 2

本实施例的生产步骤与实施例 1 相同，区别仅在于：步骤 4 中 HRT 控制在 4 h。

二级发酵结果：经过 3 周连续发酵，系统中 PHA 浓度达 174 mg/L，产量为 106 mg PHA/g VS，其中具体成分为 PHB (95.1%) 和 PHV (4.9%)。

### 15 对比例 3

本实施例的生产步骤与实施例 1 相同，区别仅在于：步骤 2 中发酵 pH 控制在 6.5，发酵温度控制为 60 °C。

一级发酵结果：经过2周连续厌氧发酵，物料的总羧酸产量、乳酸产量和挥发性脂肪酸产量分别为192.7、174.2和18.5 mg/gVS，其中挥发性脂肪  
20 肪酸组分中只检测到丁酸，产量为18.5 mg/gVS。

二级发酵结果：经过 3 周连续发酵，系统中 PHA 浓度达 158 mg/L，产量为 106 mg PHA/g VS，其中具体成分为 PHB (95.4%) 和 PHV (4.6%)。

### 对比例 4

本实施例的生产步骤与实施例 1 相同，区别仅在于：步骤 2 中猪粪、  
25 苹果废弃物为底物，混合物料的碳氮比为 55: 1。

一级发酵结果：经过2周连续厌氧发酵，物料的总羧酸产量、乳酸产量和挥发性脂肪酸产量分别为127.4、119.5和7.9 mg/gVS，其中挥发性脂肪

酸组分中只检测到丁酸，产量为7.9 mg/gVS。

二级发酵结果：经过3周连续发酵，系统中PHA浓度达168 mg/L，产量为120 mg PHA/g VS，其中具体成分为PHB(95.5%)和PHV(4.5%)。

### 对比例 5

5 本实施例的生产步骤与实施例1相同，区别仅在于：步骤2中间歇曝气使系统中的ORP保持在-220 mV，具体曝气强度为500 mL/L/min，曝气时间10 min/d。

一级发酵结果：经过2周连续厌氧发酵，物料的总羧酸产量、乳酸产量和挥发性脂肪酸产量分别为320.6、150.8和169.8 mg/gVS，其中挥发性脂  
10 肪酸中乙酸、丙酸和丁酸的产量分别为85.2、33.6和51.0 mg/gVS。

二级发酵结果：经过3周连续发酵，系统中PHA浓度达162 mg/L，产量为151 mg PHA/g VS，其中具体成分为PHB(94.7%)和PHV(5.3%)。

虽然，上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述，但在本发明基础上，可以对之作一些修改或改进，这对本领域技术  
15 人员而言是显而易见的。因此，在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进，均属于本发明要求保护的范围。

### 工业实用性

本发明属于农业废弃物利用领域，具体涉及农业废弃物发酵生产聚羧基脂肪酸酯的方法。本发明中发酵底物为农业废弃物，包括畜禽粪污和种植业废弃物的混合物，所述方法包括：一级发酵阶段：发酵菌为乳酸菌，  
20 发酵温度为35-55℃，pH值为3.0-6.0，间歇曝气使系统中氧化还原电位维持在-250~-450mV；二级发酵阶段：采用驯化的污泥进行好氧发酵，发酵温度为20-40℃，pH值为7.0-9.0。本发明在不额外添加外源碳源和氮源的情况下，将畜禽粪污和种植业废弃物中有机碳源高效转化为PHA，  
25 不仅可拓宽PHA的生产来源，降低PHA生产成本，而且减少畜禽粪污和种植业废弃物的潜在污染，为它们的高值化利用提供了新途径。

## 权 利 要 求 书

1、一种农业废弃物发酵生产聚羟基脂肪酸酯的方法，其特征在于，所述聚羟基脂肪酸酯包括 PHB 和 PHV；发酵底物为农业废弃物，所述农业废弃物包括畜禽粪污和种植业废弃物的混合物，所述种植业废弃物为农作物秸秆和/或果蔬废弃物；所述方法包括：

一级发酵阶段：发酵菌为乳酸菌，发酵温度为35-40°C，pH值为4.5-5.5，间歇曝气使发酵系统中氧化还原电位维持在-250mV~-450mV；

二级发酵阶段：采用驯化的污泥进行好氧发酵，发酵温度为22-28°C，pH值为7.8-8.3，二级发酵阶段为连续空气曝气好氧发酵，空气曝气强度为0.8-1.2 L/L/min；

所述驯化的污泥的制备方法为：

以乙酸为碳源，氯化铵为氮源，将污水处理厂好氧曝气池底泥在室温、空气连续曝气及pH值为6.5-9.5的发酵体系下驯化；空气连续曝气的强度为0.8-1.2 L/L/min；

经驯化后，所述驯化的污泥中主要菌群为副球菌属 (*Paracoccus*) 和芽殖杆菌属 (*Gemmobacter*)，聚羟基脂肪酸酯含量占细菌细胞干重的27-42%；

所述发酵底物为畜禽粪污和果蔬废弃物的混合物，所述混合物的碳氮比为 (30-50) : 1；

或，所述发酵底物为畜禽粪污和农作物秸秆的混合物，所述混合物的碳氮比为 (30-40) : 1。

2、根据权利要求1所述的方法，其特征在于，一级发酵阶段的曝气量为0-2000 mL/L/d；一级发酵阶段的曝气强度为0-400 mL/L/min，曝气时间为0-10 min/d。

3、根据权利要求1所述的方法，其特征在于，所述乳酸菌包括双歧杆菌、嗜热链球菌、植物乳杆菌、嗜酸乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、保加利亚乳杆菌中的一种或多种。

4、根据权利要求3所述的方法，其特征在于，一级发酵阶段的发酵浓度为2%VS-15%VS；菌液接种量为2%-10% V/V，菌液中的活菌数为 $10^6$ - $10^9$  CFU/mL；

和/或，二级发酵阶段的发酵浓度为 60-120 mmol C/L；驯化的污泥的  
5 接种量为 40%-80% V/V，水力停留时间为 5-36 h。

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/142357

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
C12P 7/62(2022.01)i; C12P 39/00(2006.01)i; C12R 1/46(2006.01)n; C12R 1/25(2006.01)n; C12R 1/23(2006.01)n; C12R 1/225(2006.01)n; C12R 1/01(2006.01)n		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12P; C12R		
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; CNTXT; DWPI; WPABS; ENTXT; OETXT; CNKI; WEB OF SCIENCE: 发酵, 聚羟基脂肪酸酯, PHA, PHB, PHV, 废弃物, 曝气, 氧, 乳酸, 乙酸, 副球菌, 芽殖杆菌, ferment+, polyhydroxyalkanoate+, aeration, oxygen, lactic acid, acetic acid, paracoccus, gemmobacter等.		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 113337550 A (INSTITUTE OF ENVIRONMENT AND SUSTAINABLE DEVELOPMENT IN AGRICULTURE, CHINESE ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES) 03 September 2021 (2021-09-03) see entire document	1-4
Y	CN 112063661 A (INSTITUTE OF ENVIRONMENT AND SUSTAINABLE DEVELOPMENT IN AGRICULTURE, CHINESE ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES) 11 December 2020 (2020-12-11) see claims 1-7, and description, paragraphs 9-10	1-4
Y	黄媛媛 (HUANG, Yuanyuan). "活性污泥合成聚羟基脂肪酸脂的研究进展 (Study of Polyhydroxyalkanoates Production by Activated Sludge)" <i>生物技术通报 (Biotechnology Bulletin)</i> , No. 6, 26 June 2009 (2009-06-26), see section 2.2	1-4
Y	杨卫国 (YANG, Weiguo). "pH值对有机废水厌氧产酸发酵影响研究 (Study on Anaerobic Acid-producing Fermentation of Organic Wastewater by pH)" <i>环境工程 (Environmental Engineering)</i> , Vol. 26, 30 December 2008 (2008-12-30), see abstract, section 2.3	1-4
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 <b>21 April 2022</b>		Date of mailing of the international search report <b>07 May 2022</b>
Name and mailing address of the ISA/CN <b>China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088, China</b> Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer  Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/142357

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 101735440 A (HARBIN INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 16 June 2010 (2010-06-16) see claim 1	1-4
A	WO 2015110518 A1 (EVON EVONIK DEGUSSA GMBH et al.) 30 July 2015 (2015-07-30) see entire document	1-4
A	WO 2014089436 A1 (GINKGO BIOWORKS INC.) 12 June 2014 (2014-06-12) see entire document	1-4

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2021/142357**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN	113337550	A	03 September 2021	None	
CN	112063661	A	11 December 2020	None	
CN	101735440	A	16 June 2010	None	
WO	2015110518	A1	30 July 2015	DE 102014201384	A1 30 July 2015
				AR 100302	A1 28 September 2016
WO	2014089436	A1	12 June 2014	US 2018216120	A1 02 August 2018
				US 2015315599	A1 05 November 2015

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/142357

<p><b>A. 主题的分类</b></p> <p>C12P 7/62(2022.01)i; C12P 39/00(2006.01)i; C12R 1/46(2006.01)n; C12R 1/25(2006.01)n; C12R 1/23(2006.01)n; C12R 1/225(2006.01)n; C12R 1/01(2006.01)n</p> <p>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</p>																							
<p><b>B. 检索领域</b></p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C12P; C12R</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>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))</p> <p>CNABS;CNTXT;DWPI;WPABS;ENTXT;OETXT;CNKI;WEB OF SCIENCE和关键词: 发酵, 聚羟基脂肪酸酯, PHA, PHB, PHV, 废弃物, 曝气, 氧, 乳酸, 乙酸, 副球菌, 芽殖杆菌, ferment+, polyhydroxyalkanoate+, aeration, oxygen, lactic acid, acetic acid, paracoccus, gemmobacter等。</p>																							
<p><b>C. 相关文件</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX</td> <td>CN 113337550 A (中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所) 2021年9月3日 (2021 - 09 - 03) 参见全文</td> <td>1-4</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 112063661 A (中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所) 2020年12月11日 (2020 - 12 - 11) 参见权利要求1-7、说明书第9-10段</td> <td>1-4</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>黄媛媛. “活性污泥合成聚羟基脂肪酸酯的研究进展” 生物技术通报, 第6期, 2009年6月26日 (2009 - 06 - 26), 参见第2.2节</td> <td>1-4</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>杨卫国. “pH值对有机废水厌氧产酸发酵影响研究” 环境工程, 第26卷, 2008年12月30日 (2008 - 12 - 30), 参见摘要, 第2.3节</td> <td>1-4</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 101735440 A (哈尔滨工业大学) 2010年6月16日 (2010 - 06 - 16) 参见权利要求1</td> <td>1-4</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2015110518 A1 (EVON EVONIK DEGUSSA GMBH等) 2015年7月30日 (2015 - 07 - 30) 参见全文</td> <td>1-4</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PX	CN 113337550 A (中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所) 2021年9月3日 (2021 - 09 - 03) 参见全文	1-4	Y	CN 112063661 A (中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所) 2020年12月11日 (2020 - 12 - 11) 参见权利要求1-7、说明书第9-10段	1-4	Y	黄媛媛. “活性污泥合成聚羟基脂肪酸酯的研究进展” 生物技术通报, 第6期, 2009年6月26日 (2009 - 06 - 26), 参见第2.2节	1-4	Y	杨卫国. “pH值对有机废水厌氧产酸发酵影响研究” 环境工程, 第26卷, 2008年12月30日 (2008 - 12 - 30), 参见摘要, 第2.3节	1-4	Y	CN 101735440 A (哈尔滨工业大学) 2010年6月16日 (2010 - 06 - 16) 参见权利要求1	1-4	A	WO 2015110518 A1 (EVON EVONIK DEGUSSA GMBH等) 2015年7月30日 (2015 - 07 - 30) 参见全文	1-4
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																					
PX	CN 113337550 A (中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所) 2021年9月3日 (2021 - 09 - 03) 参见全文	1-4																					
Y	CN 112063661 A (中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所) 2020年12月11日 (2020 - 12 - 11) 参见权利要求1-7、说明书第9-10段	1-4																					
Y	黄媛媛. “活性污泥合成聚羟基脂肪酸酯的研究进展” 生物技术通报, 第6期, 2009年6月26日 (2009 - 06 - 26), 参见第2.2节	1-4																					
Y	杨卫国. “pH值对有机废水厌氧产酸发酵影响研究” 环境工程, 第26卷, 2008年12月30日 (2008 - 12 - 30), 参见摘要, 第2.3节	1-4																					
Y	CN 101735440 A (哈尔滨工业大学) 2010年6月16日 (2010 - 06 - 16) 参见权利要求1	1-4																					
A	WO 2015110518 A1 (EVON EVONIK DEGUSSA GMBH等) 2015年7月30日 (2015 - 07 - 30) 参见全文	1-4																					
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																							
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“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)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&amp;” 同族专利的文件</p>																							
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2022年4月21日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2022年5月7日</p>																					
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>王颖</p> <p>电话号码 86-(10)-62412197</p>																					

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	WO 2014089436 A1 (GINKGO BIOWORKS INC) 2014年6月12日 (2014 - 06 - 12) 参见全文	1-4

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/142357

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	113337550	A	2021年9月3日	无			
CN	112063661	A	2020年12月11日	无			
CN	101735440	A	2010年6月16日	无			
WO	2015110518	A1	2015年7月30日	DE	102014201384	A1	2015年7月30日
				AR	100302	A1	2016年9月28日
WO	2014089436	A1	2014年6月12日	US	2018216120	A1	2018年8月2日
				US	2015315599	A1	2015年11月5日