

(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12月14日 (14.12.2023)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号  
WO 2023/236718 A1

- (51) 国际专利分类号:  
*C08J 3/16* (2006.01) *C08L 67/04* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2023/093510
- (22) 国际申请日: 2023年5月11日 (11.05.2023)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:  
202210635146.8 2022年6月6日 (06.06.2022) CN
- (71) 申请人: 北京蓝晶微生物科技有限公司 (BEIJING BLUEPHA MICROBIOLOGY TECHNOLOGY CO., LTD.) [CN/CN]; 中国北京市昌平区生命科学园生命园路20号院4号楼1层, Beijing 102206 (CN)。
- (72) 发明人: 汪东升(WANG, Dongsheng); 中国北京市昌平区生命科学园生命园路20号院4号楼1层, Beijing 102206 (CN)。马文彦(MA, Wenyan); 中国北京市昌平区生命科学园生命园路20号院4号楼1层, Beijing 102206 (CN)。吴雅琨(WU, Yakun); 中国北京市昌平区生命科学园生命园路20号院4号楼1层, Beijing 102206 (CN)。张进城(ZHANG, Jincheng); 中国北京市昌平区生命科学园生命园路20号院4号楼1层, Beijing 102206 (CN)。王杰鹏(WANG, Jiepeng); 中国北京市昌平区生命科学园生命园路20号院4号楼1层, Beijing 102206 (CN)。孙强(SUN, Qiang); 中国北京市昌平区生命科学园生命园路20号院4号楼1层, Beijing 102206 (CN)。曹钰(CAO, Yu); 中国北京市昌平区生命科学园生命园路20号院4号楼1层, Beijing 102206 (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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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。
- (84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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))。

(54) Title: PREPARATION METHOD FOR POLYHYDROXYALKANOATE AGGREGATE

(54) 发明名称: 一种聚羟基脂肪酸酯凝集体的制备方法

(57) Abstract: The present invention relates to the technical field of bioengineering, and specifically relates to a preparation method for a polyhydroxyalkanoate aggregate. The preparation method for a polyhydroxyalkanoate aggregate provided in the present invention comprises the step of making a polyhydroxyalkanoate suspension reach and maintain a turbulent flow state so as to agglomerate polyhydroxyalkanoate. By means of the preparation method of the present invention, a polyhydroxyalkanoate aggregate having a particle size of 50  $\mu\text{m}$  or above can be prepared, and the prepared polyhydroxyalkanoate aggregate has relatively high purity and yield. The method has mild process conditions, simple steps and simple wastewater treatment, low cost, low requirements regarding equipment, and can realize large-scale industrial production.

(57) 摘要: 本发明涉及生物工程技术领域, 具体涉及一种聚羟基脂肪酸酯凝集体的制备方法。本发明提供的聚羟基脂肪酸酯凝集体的制备方法包括使聚羟基脂肪酸酯悬浮液达到并维持湍流状态, 以使得聚羟基脂肪酸酯凝聚的步骤。本发明的制备方法能够制得粒径 $50\mu\text{m}$ 以上的聚羟基脂肪酸酯凝集体, 且制得的聚羟基脂肪酸酯凝集体具有较高的纯度和收率; 该方法的工艺条件温和、步骤简单、废水处理简单, 成本低廉、对设备要求低, 可实现大规模工业化生产。

WO 2023/236718 A1

## 一种聚羟基脂肪酸酯凝集体的制备方法

### 交叉引用

本申请要求2022年6月6日提交的专利名称为“一种聚羟基脂肪酸酯凝集体的制备方法”的第202210635146.8号中国专利申请的优先权，其全部  
5 公开内容通过引用整体并入本文。

### 技术领域

本发明涉及生物工程技术领域，具体涉及一种聚羟基脂肪酸酯凝集体的制备方法。

### 背景技术

10 聚羟基脂肪酸酯(polyhydroxyalkanoates, 简称 PHA)是微生物在其他营养限制而碳源过剩条件下合成的一种储藏性颗粒物，是一种生物高分子聚酯化合物。PHA 具有普通热塑性塑料的特性，但有别于传统的石油化工塑料，具备良好的生物相容性、可降解性、压电性和光学活性，使其在工业、农业、医药卫生、食品等领域有着广阔的应用前景。在可降解农用地膜领域和可降解塑料用品和医学领域，PHA 作为目前最佳的生物可降解材料已经  
15 显现出巨大的潜力。

由于微生物产生的 PHA 通常以包涵体的形式积累在微生物的细胞体中，因此需要将细胞内部的 PHA 颗粒进行分离回收。PHA 颗粒用于塑料制备时，需要具有良好的加工性能，因此对 PHA 颗粒的纯度要求较高，以  
20 尽量减少无机盐或细胞裂解物等杂质的干扰。

然而，由于微生物细胞内成分相当复杂，PHA 的提取难度相当大。在 PHA 发展的漫长历程中，研究者们对其提取方法进行了大量的研究。已有的提取工艺包括有机溶剂抽提法、机械破碎法、次氯酸钠-表面活性剂法、酶法等。其中，有机溶剂法的缺点是溶剂回收困难，生产环境危险，只适合  
25 实验室提取；机械破碎法主要包括超声波破壁或者高压匀浆破壁，能耗大，放大生产难度大；次氯酸钠-表面活性剂法的缺点是次氯酸钠刺激性强，

工作环境差，对 PHA 分子量破坏严重，且含有表面活性剂的废水处理难度大；酶法的缺点是要用到多种昂贵的酶类，成本很高。上述方法存在的各种问题阻碍 PHA 的工业化生产。

5 将含有 PHA 的微生物细胞破碎得到 PHA 悬浮液，在从 PHA 悬浮液中回收 PHA 颗粒时均会遇到由于 PHA 颗粒太小，无法进行过滤或者离心分离得到 PHA 颗粒的问题。现有技术虽然公开了一些使 PHA 颗粒粒径增大以便于分离的方法，但是均有不同的缺点，具体如下：

公开号 EP1609868B1 的发明专利公开了一种从微生物细胞中收集高纯度聚羟基链烷酸酯的方法，该方法包括通过在含有 PHA 的微生物细胞的含水悬浮液中进行物理破碎处理和低温碱添加以有效地破坏细胞以回收 PHA，然后用酶和/或表面活性剂处理 PHA，随后用一种亲水性溶剂洗涤 PHA 颗粒以进行脱脂，除臭和脱色后，通过加热和搅拌使 PHA 颗粒聚集，随后进行抽滤和干燥。该方法虽然反应条件温和，回收率较高，但是需要大量使用大量的有机溶剂进行 PHA 颗粒的洗涤，导致下游废水处理困难，且需要防爆车间和防爆设备，使得工业化生产较为困难。

公开号 EP2357247B1 的发明专利公开了聚 3-羟基链烷酸酯的制备方法，该方法包括通过在含有 PHA 的微生物细胞的含水悬浮液中进行物理破碎处理和低温碱添加以有效地破坏细胞以回收 PHA，然后用酶和/或表面活性剂处理 PHA，随后用大量水清洗 PHA 颗粒，通过将含有聚-3-羟基链烷酸的水性悬浮液中的有机氮的含量调节至低于 1500ppm 每重量的聚-3-羟基链烷酸，再通过加热和搅拌使 PHA 颗粒聚集，随后进行抽滤和干燥。该方法虽然反应条件温和，回收率较高，但是需要大量使用大量的水通过离心的方式进行颗粒的洗涤，制备过程产生大量废水，增加了下游废水处理的难度。

25 公开号 EP3027761B1 的发明专利公开了从细胞培养物中回收和纯化聚羟基链烷酸酯的方法，从细胞培养物中回收和纯化 PHA 的方法，包括酸化细胞培养物并物理破碎细胞以获得 PHA 悬浮液。随后将 PHA 悬浮液碱

化至 pH 值等于或高于 8, 稀释后进行切向过滤。然后将 PHA 悬浮液漂白, 稀释并再次进行切向过滤, 然后干燥得到成品。该方法可以在不使用有机溶剂的情况下连续进行, 并以纯净形式获得 PHA 而不会导致分子量降低, 但是由于 PHA 颗粒较小, 在切向过滤时容易发生设备堵塞, 需要加入氧化钙、硫酸铝、磷酸及其混合物作为絮凝剂, 使 PHA 颗粒发生聚集, 增大 PHA 颗粒粒径。由于絮凝剂得到的颗粒强度并不总是很高, 而且金属盐以及残留的细胞碎片会污染 PHA 聚合物, 降低了成品 PHA 的纯度, 为下游材料加工增加了困难。

公开号 US9683076B2 的发明专利将 PHA 悬浮液通过喷雾干燥的方式得到 PHA 颗粒, 但是喷雾干燥能耗大, 且会将悬浮液中残留的无机盐和细胞裂解物混合在 PHA 颗粒中, 降低了成品 PHA 的纯度, 为下游材料加工增加了困难。

综上所述, 现有技术公开的方法或需要使用大量有机溶剂或者水进行 PHA 颗粒的清洗, 或需要使用絮凝剂进而降低了成品的纯度, 或存在工艺流程复杂、生产成本高等问题。

## 发明内容

本发明的目的是提供一种聚羟基脂肪酸酯凝集体的制备方法以及由该方法制备得到的聚羟基脂肪酸酯凝集体。

为解决现有技术公开的使聚羟基脂肪酸酯凝聚以增大粒径的方法中需要使用大量有机溶剂或水清洗聚羟基脂肪酸酯颗粒才能使其凝聚、以及能耗高、工艺复杂等问题, 本发明对聚羟基脂肪酸酯的凝聚过程进行了大量研究。在研发过程中, 本发明意外地发现, 聚羟基脂肪酸酯悬浮液处于湍流状态是促进聚羟基脂肪酸酯颗粒凝聚的关键因素: 在不对聚羟基脂肪酸酯悬浮液中的聚羟基脂肪酸酯颗粒进行清洗的情况下, 低转速的搅拌、甚至达到涡流状态均很难实现聚羟基脂肪酸酯的凝聚, 而一旦达到湍流状态, 聚羟基脂肪酸酯悬浮液中的聚羟基脂肪酸酯开始快速自发发生聚集, 粒径明显增大, 在较短时间内即可获得大粒径的聚羟基脂肪酸酯凝集体。

虽然现有技术公开的凝聚方法中也涉及了搅拌，但是从其凝聚工艺和结果来看，这些方法使用的搅拌并没有使得聚羟基脂肪酸酯悬浮液达到湍流状态，从未有现有技术发现湍流状态对聚羟基脂肪酸酯凝聚的重要性。

基于上述发现，本发明提供以下技术方案：

5 本发明提供一种聚羟基脂肪酸酯凝集体的制备方法，所述方法包括使聚羟基脂肪酸酯悬浮液达到并维持湍流状态，以使得聚羟基脂肪酸酯凝聚的步骤。

以上所述的湍流状态为聚羟基脂肪酸酯悬浮液的雷诺系数大于聚羟基脂肪酸酯悬浮液在其所处设备中达到湍流的临界雷诺系数时所处状态。

10 上述湍流状态可在反应器中进行，也可在管道中进行。

以反应器为例，反应器中的雷诺系数的计算公式如下：

$$Re_m = \frac{D^2 N \rho}{\mu}$$

其中，D：涡轮直径（m）；N：搅拌器转速（r/s）； $\rho$ ：料液密度（ $kg/m^3$ ）； $\mu$ ：料液粘度（ $N \cdot s/m^2$ ）。

15 当在管道中进行湍流时，雷诺系数的计算公式为： $Re = \rho v d / \mu$ ，

其中，v：流体流速（m/s）、 $\rho$ ：料液密度（ $kg/m^3$ ）、 $\mu$ ：料液粘度（ $N \cdot s/m^2$ ），d：特征长度。

优选地，当聚羟基脂肪酸酯悬浮液所处设备为反应器时，湍流状态为聚羟基脂肪酸酯悬浮液的雷诺系数大于1000时，悬浮液所处状态。

20 当聚羟基脂肪酸酯悬浮液所处设备为管道时，湍流状态为聚羟基脂肪酸酯悬浮液的雷诺系数大于4000时，悬浮液所处状态。

在本发明的一些实施方式中，聚羟基脂肪酸酯的凝聚在反应器中进行，所述湍流状态为雷诺系数大于1000，优选大于1200，更优选大于4000。

25 对于反应器，本发明没有特殊限制，可以是任何能够使料液处于湍流状态的设备。

在本发明的一些实施方式中，通过对聚羟基脂肪酸酯悬浮液进行不断

的搅拌以使得悬浮液达到并维持湍流状态。

对于聚羟基脂肪酸酯悬浮液，优选其中的聚羟基脂肪酸酯颗粒的含氮量低于 7000ppm (相对于每单位质量聚羟基脂肪酸酯)，悬浮液清液的含氮量低于 3000ppm (相对于每单位质量悬浮液清液)。

5 以上所述的聚羟基脂肪酸酯颗粒和悬浮液清液的含氮量的检测方法如下：将聚羟基脂肪酸酯悬浮液在 10000rpm 条件下离心 5min，上清即为悬浮液清液，将沉淀水洗两次离心烘干后，得到聚羟基脂肪酸酯颗粒，分别检测悬浮液清液和聚羟基脂肪酸酯颗粒的含氮量。

10 若聚羟基脂肪酸酯颗粒、悬浮液清液的含氮量高于上述目标值，会明显抑制聚羟基脂肪酸酯凝集体的产生，甚至导致不会出现凝集体，或者成品杂质含量过高，聚羟基脂肪酸酯凝集体的纯度降低。

以上所述的聚羟基脂肪酸酯悬浮液以聚羟基脂肪酸酯的生物发酵液为原料，经细胞破碎、固液分离收集聚羟基脂肪酸酯沉淀，再以水悬浮得到。

15 上述生物发酵液可为采用任意能够发酵产生聚羟基脂肪酸酯的生物体经发酵培养制得的含有用于发酵的生物体的发酵液。

对于生物体，只要是能够在细胞内积累聚羟基脂肪酸酯的生物体均可使用，没有特别的限定。优选为微生物，可以举出，例如，气单胞菌属 (Aeromonas)、产碱菌属 (Alcaligenes)、固氮菌属 (Azotobacter)、芽孢杆菌属 (Bacillus)、梭菌属 (Clostridium)、盐杆菌属 (Halobacterium)、诺卡氏菌属 (Nocardia)、红螺菌属 (Rhodospirillum)、假单胞菌属 (Pseudomonas)、罗尔斯通氏菌属 (Ralstonia)、动胶菌属 (Zoogloea) 等微生物。

25 具体地，作为气单胞菌属，可以举出，例如豚鼠气单胞菌 (Aeromonas caviae) 等；作为产碱菌属，可以举出，例如解脂产碱菌 (Alcaligenes lipolytica)、广泛产碱菌 (Alcaligenes latus) 等；作为罗尔斯通氏菌属 (Ralstonia)，可以举出，例如罗氏真养菌 (Ralstonia eutropha) 等。

上述聚羟基脂肪酸酯悬浮液的制备过程中，对于细胞破碎的方法没有

特别的限定，只要能将细胞内的聚羟基脂肪酸酯释放出来的方法均可使用，可采用化学法、机械法、生物法等。

5 本发明的凝集体制备方法对于悬浮液的制备工艺要求较为简单，可采用将发酵液调节至碱性后，再进行机械法破碎细胞的方法释放细胞内的聚羟基脂肪酸酯颗粒。

在本发明的一些实施方式中，将发酵液的 pH 调节至碱性(优选为 10.5-11.5)后，放置 1-3h，再采用机械法破碎细胞。

10 对于固液分离的方法也没有特别的限定，只要能将聚羟基脂肪酸酯和非聚羟基脂肪酸酯分离开来的方法均可以使用，可采用离心方式、过滤方式等，其中，非聚羟基脂肪酸酯物质包括但不限于细胞碎片、蛋白质、核酸等杂质。

本发明对于聚羟基脂肪酸酯悬浮液中聚羟基脂肪酸酯的浓度并不特别限定，若想要提高聚羟基脂肪酸酯凝集体的产量，优选使用较高浓度的聚羟基脂肪酸酯悬浮液。

15 在本发明的一些实施方式中，优选聚羟基脂肪酸酯悬浮液中聚羟基脂肪酸酯的含量不低于 20 g/L。更优选为 50g/L 以上。

与现有技术公开的聚羟基脂肪酸酯凝聚的方法不同，本发明对于用于凝聚的聚羟基脂肪酸酯悬浮液的 pH 没有特别限制，聚羟基脂肪酸酯悬浮液可为酸性、中性或碱性。

20 若采用将发酵液调节至碱性后，再进行细胞破碎释放细胞内的聚羟基脂肪酸酯颗粒，经固液分离收集聚羟基脂肪酸酯沉淀，再以水悬浮的方法制备聚羟基脂肪酸酯悬浮液，无需对复水后的悬浮液进行 pH 调节，此时悬浮液的 pH 为 8.5-10.5，该悬浮液可直接用于聚羟基脂肪酸酯的凝聚。在聚羟基脂肪酸酯凝聚过程中，保持温度不低于 20℃有利于促进凝集的进行。

25 优选地，在维持湍流状态的过程中，同时维持聚羟基脂肪酸酯悬浮液的温度不低于 20℃。

在本发明的一些实施方式中，在维持湍流状态的过程中，同时维持聚

羟基脂肪酸酯悬浮液的温度不低于 30℃。

在本发明的一些实施方式中，在维持湍流状态的过程中，同时维持聚羟基脂肪酸酯悬浮液的温度不低于 40℃。

5 优选地，在维持湍流状态的过程中，同时维持聚羟基脂肪酸酯悬浮液的温度为 20-70℃，更优选为 20-40℃。

以上所述的凝集体制备方法中，维持湍流状态的时间可根据优选地，在维持湍流状态的过程中，同时维持聚羟基脂肪酸酯悬浮液的温度不低于 20℃。

10 想要得到的凝集体的粒径大小而定，所需聚羟基脂肪酸酯凝集体粒径越大，所需维持时间越长。在凝集过程中，通过对凝集体进行粒径监测，在达到所需粒径时，收集凝集体。粒径监测可通过目测或在线实时检测等方式进行。

15 对于聚羟基脂肪酸酯凝集体的粒径并没有特别限定，适用于工业分离的粒径均可，一般优选为 5 μm 以上，更优选为 50 μm 以上，以更好地适用于工业化固液分离。为了得到适用于固液分离的聚羟基脂肪酸酯凝集体，凝聚直至得到合适粒径的聚羟基脂肪酸酯凝集体，再经固液分离收集聚羟基脂肪酸凝集体。

对于固液分离的方法没有特殊限制，包括但不限于离心、过滤等。

20 以上所述的凝集体制备方法中，通常在 0.1-3h 的时间内出现聚羟基脂肪酸酯颗粒的聚集，聚羟基脂肪酸酯凝集体的粒径明显增大，优选维持湍流状态的时间为 40-180min。

通过本发明的方法，可以得到聚羟基脂肪酸酯凝集体的平均粒径为 10μm 或 10μm 以上，50μm 或 50μm 以上，甚至 100μm 或 100μm 以上的凝集体。对于粒径的上限没有特别的限定，但优选平均直径为 5000μm 或 25 5000μm 以下，优选 3000μm 或 3000μm 以下。

在本发明的一些实施方式中，所述凝集体的制备方法包括：以聚羟基脂肪酸酯悬浮液为原料，对聚羟基脂肪酸酯悬浮液进行搅拌以使得聚羟基

脂肪酸酯悬浮液达到并维持湍流状态，同时维持温度不低于 20°C，获得粒径增大的聚羟基脂肪酸酯凝集体。

进一步地，为更好地去除悬浮液中的杂质、促进凝集体的形成，所述凝集体的制备方法还包括以酶去除聚羟基脂肪酸酯悬浮液中的杂质的步骤。

所述酶用于对聚羟基脂肪酸酯颗粒表面附着的肽聚糖、脂质类、多糖类、核酸类杂质进行处理，包括但不限于蛋白质分解酶、脂质类分解酶、细胞壁分解酶、DNA 分解酶中的一种或多种。在具体应用时，上述酶可以单独使用，也可以两种或两种以上并用。对于酶的来源没有特殊限制，可为市售的酶制剂，或市售的洗涤用酶洗涤剂。

所述酶的添加量依赖于酶的种类以及活性，虽然没有特别的限定，但是为了降低成本，优选采用酶活力为 10 万-200 万 U/mL，酶的添加量为 0.001mL/L-10mL/L（相对于聚羟基脂肪酸酯悬浮液）。

当向凝聚体系中添加酶进行除杂处理时，温度和 pH 可根据所用酶的最适温度和最适 pH 进行调整，例如控制温度在 20-70°C，pH 为 5-10。由于酶的最适温度和最适 pH 属于本领域技术人员的公知常识，本发明不再赘述。

进一步优选地，为了保证最终凝集体成品的质量（主要指产品的纯度），以使其更好地适用于下游材料加工，还可在加入酶的同时以表面活性剂去除聚羟基脂肪酸酯悬浮液中的杂质，以更进一步地去除附着在 PHA 颗粒表面的杂质。

以上所述的表面活性剂为选自阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、两性表面活性剂、非离子表面活性剂中的一种或多种，优选为阴离子表面活性剂。

对于表面活性剂的添加量虽无需特别限定，优选的添加量为 1g/L~20g/L（相对于聚羟基脂肪酸酯悬浮液）。

在本发明的一些实施方式中，所述表面活性剂为 SDS，SDS 的用量优

选为 5-20 g/L。

在本发明的一些实施方式中，所述表面活性剂为十二烷基苯磺酸钠，十二烷基苯磺酸钠的用量优选为 2-10 g/L。

5 与现有技术公开的先以酶和/或表面活性剂除杂，再清洗、分离聚羟基脂肪酸酯后，再进行聚羟基脂肪酸酯的凝聚的方法不同，本发明的凝集体的制备方法可实现凝聚和除杂（利用酶和/或表面活性剂除杂）在同一反应体系中进行，极大地简化了制备工艺，同时减少了废液产生。

优选地，所述凝集体的制备方法中，上述去除聚羟基脂肪酸酯悬浮液中的杂质的步骤与聚羟基脂肪酸酯的凝聚在同一反应体系中进行。

10 现有技术公开的方法多涉及采用有机溶剂洗涤聚羟基脂肪酸酯颗粒后再进行凝聚反应，或在含有有机溶剂的体系中进行凝集反应，本发明的凝集体的制备方法可实现不使用有机溶剂清洗、且在不含有机溶剂的体系中进行聚羟基脂肪酸酯的有效凝聚。

优选地，所述聚羟基脂肪酸酯的凝聚体系中不包含有机溶剂。

15 在本发明的一些实施方式中，所述聚羟基脂肪酸酯凝集体的制备方法包括：以聚羟基脂肪酸酯悬浮液为原料，对聚羟基脂肪酸酯悬浮液进行搅拌以使得聚羟基脂肪酸酯悬浮液达到湍流状态，加入酶，维持湍流状态，同时维持温度不低于 20°C，获得粒径增大的聚羟基脂肪酸酯凝集体，达到目标粒径时，收集聚羟基脂肪酸酯凝集体。

20 在本发明的一些实施方式中，所述聚羟基脂肪酸酯凝集体的制备方法包括：以聚羟基脂肪酸酯悬浮液为原料，对聚羟基脂肪酸酯悬浮液进行搅拌以使得聚羟基脂肪酸酯悬浮液达到湍流状态，加入酶和表面活性剂，维持湍流状态，同时维持温度不低于 20°C，获得粒径增大的聚羟基脂肪酸酯凝集体，达到目标粒径时，收集聚羟基脂肪酸酯凝集体。

25 收集聚羟基脂肪酸酯凝集体可通过固液分离进行。伴随着聚羟基脂肪酸酯凝集体粒径的增大，聚羟基脂肪酸酯凝集体固液分离的难度明显降低，在工业生产上可以减少设备费用。因此对固液分离方法和设备没有特别的

限定，可以使用过滤（板框过滤机、篮袋式过滤机等）或离心（卧螺离心机等）等方法。

为了使聚羟基脂肪酸酯凝集体中的杂质去除更为彻底，优选对收集的聚羟基脂肪酸酯凝集体进行清洗后再进行固液分离，收集清洗后的聚羟基脂肪酸酯凝集体。

在本发明的一些实施方式中，以水对收集的聚羟基脂肪酸酯凝集体进行清洗后，经固液分离收集聚羟基脂肪酸酯凝集体。

对于上述聚羟基脂肪酸酯凝集体，还可进行干燥以制得干燥的凝集体，干燥方法没有特别限定，可以为常温通风干燥、加热通风干燥等。

进一步地，本发明提供采用以上所述的聚羟基脂肪酸酯凝集体的制备方法制备得到的聚羟基脂肪酸酯凝集体。

优选地，所述聚羟基脂肪酸酯凝集体的粒径为至少  $5\ \mu\text{m}$ ，更优选为至少  $50\ \mu\text{m}$ 。

在本发明的一些实施方式中，聚羟基脂肪酸酯凝集体的粒径为  $50\sim 100\ \mu\text{m}$ 。

在本发明的一些实施方式中，聚羟基脂肪酸酯凝集体的粒径为  $100\sim 300\ \mu\text{m}$ 。

本发明中，所述聚羟基脂肪酸酯（PHA）可为各种聚羟基脂肪酸酯产品，包括但不限于聚羟基丁酸(PHB)、聚 3-羟基丁酸和 3-羟基戊酸共聚酯(PHBV)、聚 3-羟基丁酸和 3-羟基己酸共聚酯(PHBH)、聚 3-羟基丁酸和 4-羟基丁酸共聚酯(P3HB4HB)等。

本发明的有益效果至少在于：本发明提供的聚羟基脂肪酸酯凝集体的制备方法能够制得粒径  $50\ \mu\text{m}$  以上的聚羟基脂肪酸酯凝集体，以适合工业化固液分离设备，且制得的聚羟基脂肪酸酯凝集体具有较高的纯度和收率；该方法的工艺条件温和、步骤简单、废水处理简单，成本低廉、对设备要求低，可实现大规模工业化生产。

具体而言，与现有的增大聚羟基脂肪酸酯颗粒粒径的方法相比，本发

明的方法至少具有以下优势：

1、本发明提供的聚羟基脂肪酸酯凝集体的制备方法，在制备过程中不使用任何有机溶剂，生产环境简单、安全，且制得的聚羟基脂肪酸酯凝集体中不存在有机溶剂残留。

5 2、本发明提供的聚羟基脂肪酸酯凝集体的制备方法，在制备过程中不使用无机盐、无需使用絮凝剂，有效减少了制备的试剂成本。

3、本发明提供的聚羟基脂肪酸酯凝集体的制备方法，在较低温度条件下即可实现聚羟基脂肪酸酯的高效凝聚，不依赖高温操作，有效降低了能耗，且提取设备简单，节约了成本。

10 4、本发明提供的聚羟基脂肪酸酯凝集体的制备方法，无需先对聚羟基脂肪酸酯颗粒进行清洗再进行凝聚，酶解除杂过程可与凝聚过程在同一反应体系中进行，无需先酶解除杂后再进行凝聚，有效简化了制备工艺，减少了废水量。

### 具体实施方式

15 以下实施例用于说明本发明，但不用来限制本发明的范围。

以下实施例中，PHA纯度的检测方法如下：

取30mg干燥后的待测样品，加入2mL酯化液和2mL三氯甲烷，100°C加热4h，反应结束后，待样品冷却至室温后，加入1mL去离子水，涡旋振荡，静置30-60min，使其分层，上层为水相，下层为有机相；取1mL下层有机相，使用岛津气相色谱仪进行气相色谱（GC）检测，并计算PHA纯度。其中，酯化液的配制方法为：称取0.5g苯甲酸加入装有485mL的甲醇试剂瓶中，取15mL浓硫酸缓慢加入至甲醇试剂瓶中，混匀后完成酯化液的配制。

含氮量的测定方法如下：按照GB/T-32019-2013中4.3的方法，使用凯式定氮仪进行含氮量的测定。

25 PHA凝集体粒径的检测方法如下：使用真理光学LT2100激光粒度分析仪测定粒度大小。

以下实施例中使用的PHA悬浮液的制备方法如下：利用PHA生产菌株

发酵后，获得生物量为200~220g/L的含80%~85%PHA的发酵液；将发酵液pH调节至11后，维持2h，机械法破碎细胞。使用杯式离心机离心，10000rpm离心5min后，倒掉上清液，加水复溶至原体积，得到PHA悬浮液，其中PHA含量为163g/L，PHA颗粒含氮量为6530ppm，清液中含氮量为2459ppm。

### 5 实施例1

本实施例提供一种PHA凝集体的制备方法，该方法的步骤如下：将PHA悬浮液倒入搅拌反应器中，开启搅拌600r/min，升温至40°C，加入终浓度为8g/L的SDS，终浓度为1mL/L的中性蛋白酶，开始纯化反应，期间每隔10min检测PHA凝集体粒径，直至粒径不再继续增加。

10 其中，涡轮直径6 cm，料液粘度0.0075 N.s/m<sup>2</sup>，料液密度1030 kg/m<sup>3</sup>，利用雷诺系数计算公式得到，启动搅拌后，反应器中的料液雷诺系数为4944，达到了充分的湍流状态。

上述方法中，纯化阶段PHA颗粒聚集时粒径变化情况如表1所示。

表1

| 纯化时间<br>(min) | 0     | 10    | 20    | 30    | 40      | 50      | 60      |
|---------------|-------|-------|-------|-------|---------|---------|---------|
| 粒径(μm)        | 1.367 | 1.494 | 1.622 | 1.734 | 164.639 | 208.321 | 216.782 |

15 当PHA凝集体粒径增加至100μm以上时，使用布氏漏斗抽滤，将得到的滤饼复水水洗两次后，过滤，使用鼓风干燥箱80°C烘干，检测PHA纯度为99.1%，回收率98.5%。

### 实施例2

20 本实施例提供一种PHA凝集体的制备方法，该方法的步骤如下：将PHA悬浮液倒入搅拌反应器中，开启搅拌150r/min，升温至40°C，加入终浓度为8g/L的SDS，终浓度为1mL/L的中性蛋白酶，开始纯化反应，期间每隔10min检测PHA凝集体粒径，直至粒径不再继续增加。

其中，涡轮直径6 cm，料液粘度0.0075 N.s/m<sup>2</sup>，料液密度1030 kg/m<sup>3</sup>，利用雷诺系数计算公式得到，启动搅拌后，反应器中的料液雷诺系数为

1236, 达到了湍流状态。

上述方法中, 纯化阶段PHA颗粒聚集时粒径变化情况如表2所示。

表2

| 纯化时间<br>(min)       | 0     | 10    | 20    | 30    | 40      | 50      | 60      |
|---------------------|-------|-------|-------|-------|---------|---------|---------|
| 粒径( $\mu\text{m}$ ) | 1.373 | 1.368 | 1.345 | 1.379 | 159.775 | 204.854 | 205.324 |

5 当PHA凝集体粒径增加至100 $\mu\text{m}$ 以上时, 使用布氏漏斗抽滤, 将得到的滤饼复水水洗两次后, 过滤, 使用鼓风干燥箱80 $^{\circ}\text{C}$ 烘干, 检测PHA纯度为99.2%, 回收率98.4%。

### 实施例3

10 本实施例提供一种PHA凝集体的制备方法, 该方法的步骤如下: 将PHA悬浮液倒入搅拌反应器中, 开启搅拌150r/min, 升温至40 $^{\circ}\text{C}$ , 加入终浓度为8g/L的SDS, 终浓度为1mL/L的木瓜蛋白酶, 开始纯化反应, 期间每隔10min检测PHA凝集体粒径, 直至粒径不再继续增加。

其中, 涡轮直径6 cm, 料液粘度0.0075 N.s/m<sup>2</sup>, 料液密度1030 kg/m<sup>3</sup>, 利用雷诺系数计算公式得到, 启动搅拌后, 反应器中的料液雷诺系数为1236, 达到了湍流状态。

15 上述方法中, 纯化阶段PHA颗粒聚集时粒径变化情况如表3所示。

表3

| 纯化时间<br>(min)       | 0     | 10    | 20    | 30    | 40      | 50      | 60      |
|---------------------|-------|-------|-------|-------|---------|---------|---------|
| 粒径( $\mu\text{m}$ ) | 1.334 | 1.358 | 1.353 | 1.356 | 138.733 | 177.235 | 179.431 |

当PHA凝集体粒径增加至100 $\mu\text{m}$ 以上时, 使用布氏漏斗抽滤, 将得到的滤饼复水水洗两次后, 过滤, 使用鼓风干燥箱80 $^{\circ}\text{C}$ 烘干, 检测PHA纯度为98.4%, 回收率98.3%。

### 20 实施例4

本实施例提供一种PHA凝集体的制备方法, 该方法的步骤如下: 将

PHA悬浮液倒入搅拌反应器中，开启搅拌150r/min，升温至40°C，加入终浓度为10g/L的SDS，终浓度为0.5mL/L的木瓜蛋白酶，开始纯化反应，期间每隔10min检测PHA凝集体粒径，直至粒径不再继续增加。

其中，涡轮直径6 cm，料液粘度0.0075 N.s/m<sup>2</sup>，料液密度1030 kg/m<sup>3</sup>，利用雷诺系数计算公式得到，启动搅拌后，反应器中的料液雷诺系数为1236，达到了湍流状态。

上述方法中，纯化阶段PHA颗粒聚集时粒径变化情况如表4所示。

表4

| 纯化时间<br>(min) | 0     | 10    | 20    | 30    | 40      | 50      | 60      |
|---------------|-------|-------|-------|-------|---------|---------|---------|
| 粒径(μm)        | 1.326 | 1.328 | 1.245 | 1.349 | 146.378 | 153.894 | 162.432 |

当PHA凝集体粒径增加至100μm以上时，使用布氏漏斗抽滤，将得到的滤饼复水水洗两次后，过滤，使用鼓风干燥箱80°C烘干，检测PHA纯度为98.7%，回收率98.4%。

### 实施例5

本实施例提供一种PHA凝集体的制备方法，该方法的步骤如下：将PHA悬浮液倒入反应器中，开启搅拌150r/min，升温至40°C，加入终浓度为4g/L的十二烷基苯磺酸钠，终浓度为0.8mL/L的中性蛋白酶，开始纯化反应，期间每隔10min检测PHA凝集体粒径，直至粒径不再继续增加。

其中，涡轮直径6 cm，料液粘度0.0075 N.s/m<sup>2</sup>，料液密度1030 kg/m<sup>3</sup>，利用雷诺系数计算公式得到，启动搅拌后，反应器中的料液雷诺系数为1236，达到了湍流状态。

上述方法中，纯化阶段PHA颗粒聚集时粒径变化情况如表5所示。

表5

| 纯化时间<br>(min) | 0     | 10    | 20    | 30    | 40      | 50      | 60      |
|---------------|-------|-------|-------|-------|---------|---------|---------|
| 粒径(μm)        | 1.324 | 1.358 | 1.328 | 1.461 | 144.746 | 149.785 | 157.789 |

当PHA凝集体粒径增加至100 $\mu\text{m}$ 以上时，使用布氏漏斗抽滤，将得到的滤饼复水水洗两次后，过滤，使用鼓风干燥箱80 $^{\circ}\text{C}$ 烘干，检测PHA纯度为98.6%，回收率98.5%。

### 实施例6

5 本实施例提供一种PHA凝集体的制备方法，该方法的步骤如下：将PHA悬浮液倒入反应器中，开启搅拌150r/min，温度20 $^{\circ}\text{C}$ ，开始纯化反应，期间每隔10min检测PHA凝集体粒径，直至粒径不再继续增加。

其中，涡轮直径6 cm，料液粘度0.0075 N.s/m<sup>2</sup>，料液密度1030 kg/m<sup>3</sup>，利用雷诺系数计算公式得到，启动搅拌后，反应器中的料液雷诺系数为  
10 1236，达到了湍流状态。

上述方法中，纯化阶段PHA颗粒聚集时粒径变化情况如表6所示。

表6

|                     |       |       |       |        |        |        |        |
|---------------------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|
| 纯化时间<br>(min)       | 0     | 30    | 60    | 90     | 120    | 150    | 180    |
| 粒径( $\mu\text{m}$ ) | 1.322 | 1.313 | 3.457 | 10.276 | 50.734 | 53.342 | 57.789 |

当PHA凝集体粒径增加至50 $\mu\text{m}$ 以上时，使用布氏漏斗抽滤，将得到的滤饼复水水洗两次后，过滤，使用鼓风干燥箱80 $^{\circ}\text{C}$ 烘干，检测PHA纯度为  
15 94.6%，回收率87.3%。

### 实施例7

本实施例提供一种PHA凝集体的制备方法，该方法的步骤如下：将PHA悬浮液倒入搅拌反应器中，开启搅拌600r/min，升温至40 $^{\circ}\text{C}$ ，加入终浓度为1mL/L的中性蛋白酶，开始纯化反应，期间每隔10min检测PHA凝集体  
20 粒径，直至粒径不再继续增加。

其中，涡轮直径6 cm，料液粘度0.0075 N.s/m<sup>2</sup>，料液密度1030 kg/m<sup>3</sup>，利用雷诺系数计算公式得到，启动搅拌后，反应器中的料液雷诺系数为4944，达到了充分的湍流状态。

上述方法中，纯化阶段PHA颗粒聚集时粒径变化情况如表7所示。

表7

| 纯化时间<br>(min)       | 0     | 10   | 20    | 30    | 40      | 50      | 60      |
|---------------------|-------|------|-------|-------|---------|---------|---------|
| 粒径( $\mu\text{m}$ ) | 1.367 | 1.57 | 1.358 | 1.346 | 172.782 | 184.373 | 201.252 |

当PHA凝集体粒径增加至100 $\mu\text{m}$ 以上时，使用布氏漏斗抽滤，将得到的滤饼复水水洗两次后，过滤，使用鼓风干燥箱80 $^{\circ}\text{C}$ 烘干，检测PHA纯度为97.1%，回收率98.3%。

### 5 实施例8

本实施例提供一种PHA凝集体的制备方法，该方法的步骤如下：将实施例1中使用的PHA悬浮液，加入2倍体积的水稀释，使得悬浮液中PHA的含量约为50g/L，倒入搅拌反应器中，开启搅拌600r/min，升温至40 $^{\circ}\text{C}$ ，加入终浓度为8g/L的SDS，终浓度为1mL/L的中性蛋白酶，开始纯化反应，期间每隔10min检测PHA凝集体粒径，直至粒径不再继续增加。

其中，涡轮直径6 cm，料液粘度0.0075 N.s/m<sup>2</sup>，料液密度1030 kg/m<sup>3</sup>，利用雷诺系数计算公式得到，启动搅拌后，反应器中的料液雷诺系数为4944，达到了充分的湍流状态。

上述方法中，纯化阶段PHA颗粒聚集时粒径变化情况如表8所示。

15

表8

| 纯化时间<br>(min)       | 0     | 10    | 20    | 30    | 40    | 50     | 60     |
|---------------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|
| 粒径( $\mu\text{m}$ ) | 1.321 | 1.294 | 1.452 | 1.368 | 1.743 | 54.321 | 58.754 |

当PHA凝集体粒径增加至50 $\mu\text{m}$ 以上时，使用布氏漏斗抽滤，将得到的滤饼复水水洗两次后，过滤，使用鼓风干燥箱80 $^{\circ}\text{C}$ 烘干，检测PHA纯度为99.1%，回收率97.4%。

### 对比例1

20

将PHA悬浮液（PHA悬浮液与实施例1相同）倒入搅拌反应器中，开启搅拌100r/min，升温至40 $^{\circ}\text{C}$ ，加入终浓度为8g/L的SDS，终浓度为1mL/L的

中性蛋白酶，开始纯化反应，期间每隔10min检测PHA颗粒粒径，直至颗粒粒径不再继续增加。

其中，涡轮直径6 cm，料液粘度0.0075 N.s/m<sup>2</sup>，料液密度1030 kg/m<sup>3</sup>，利用雷诺系数计算公式得到，启动搅拌后，反应器中的料液雷诺系数为824，未达到湍流状态。

纯化阶段PHA颗粒的粒径变化情况如表9所示。结果显示，纯化维持3h以上，PHA颗粒粒径未出现明显增大。

表9

| 纯化时间<br>(min) | 0     | 30    | 60    | 90    | 120   | 150   | 180   |
|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 粒径(μm)        | 1.378 | 1.338 | 1.332 | 1.356 | 1.387 | 1.382 | 1.383 |

### 对比例2

10 将PHA悬浮液（PHA悬浮液与实施例1相同）倒入搅拌反应器中，开启搅拌100r/min，温度20°C，开始纯化反应，期间每隔10min检测PHA颗粒粒径，直至颗粒粒径不再继续增加。其中，涡轮直径6 cm，料液粘度0.0075 N.s/m<sup>2</sup>，料液密度1030 kg/m<sup>3</sup>，利用雷诺系数计算公式得到，启动搅拌后，反应器中的料液雷诺系数为824，未达到湍流。

15 纯化阶段PHA颗粒的粒径变化情况如表10所示。结果显示，纯化3h以上PHA颗粒未出现粒径增加。

表10

| 纯化时间<br>(min) | 0     | 30    | 60    | 90    | 120   | 150   | 180   |
|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 粒径(μm)        | 1.367 | 1.326 | 1.362 | 1.321 | 1.343 | 1.378 | 1.384 |

20 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畴。

## 工业实用性

本发明提供一种聚羟基脂肪酸酯凝集体的制备方法。本发明提供的聚羟基脂肪酸酯凝集体的制备方法包括使聚羟基脂肪酸酯悬浮液达到并维持湍流状态，以使得聚羟基脂肪酸酯凝聚的步骤。本发明的制备方法能够制得粒径  $50\ \mu\text{m}$  以上的聚羟基脂肪酸酯凝集体，且制得的聚羟基脂肪酸酯凝集体具有较高的纯度和收率；该方法的工艺条件温和、步骤简单、废水处理简单，成本低廉、对设备要求低，可实现大规模工业化生产，具有较好的经济价值和应用前景。

# 权 利 要 求 书

1. 一种聚羟基脂肪酸酯凝集体的制备方法，其特征在于，所述方法包括使聚羟基脂肪酸酯悬浮液达到并维持湍流状态，以使得聚羟基脂肪酸酯凝聚的步骤。

5        2. 根据权利要求 1 所述的聚羟基脂肪酸酯凝集体的制备方法，其特征在于，所述湍流状态为所述聚羟基脂肪酸酯悬浮液的雷诺系数大于所述聚羟基脂肪酸酯悬浮液在其所处设备中达到湍流的临界雷诺系数时所处状态；

      优选地，所述设备为反应器，所述湍流状态为所述聚羟基脂肪酸酯悬浮液的雷诺系数大于 1000 时所处状态；

      或者，所述设备为管道，所述湍流状态为所述聚羟基脂肪酸酯悬浮液的雷诺系数大于 4000 时所处状态。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的聚羟基脂肪酸酯凝集体的制备方法，其特征在于，所述聚羟基脂肪酸酯悬浮液中，聚羟基脂肪酸酯颗粒的含氮量  
15 低于 7000ppm，悬浮液清液的含氮量低于 3000ppm。

4. 根据权利要求 3 所述的聚羟基脂肪酸酯凝集体的制备方法，其特征在于，所述聚羟基脂肪酸酯悬浮液以聚羟基脂肪酸酯的生物发酵液为原料，经细胞破碎、固液分离收集聚羟基脂肪酸酯沉淀，再以水悬浮得到；

      优选地，所述聚羟基脂肪酸酯悬浮液中，聚羟基脂肪酸酯的含量不低  
20 于 20 g/L。

5. 根据权利要求 1~4 任一项所述的聚羟基脂肪酸酯凝集体的制备方法，其特征在于，在维持湍流状态的过程中，同时维持聚羟基脂肪酸酯悬浮液的温度不低于 20℃。

6. 根据权利要求 1~5 任一项所述的聚羟基脂肪酸酯凝集体的制备方法，其特征在于，所述方法还包括以酶去除聚羟基脂肪酸酯悬浮液中的杂质的步骤；

      优选地，所述酶为选自蛋白质分解酶、脂质类分解酶、细胞壁分解酶、

DNA 分解酶中的一种或多种。

7. 根据权利要求 6 所述的聚羟基脂肪酸酯凝集体的制备方法，其特征在于，所述方法还包括以表面活性剂去除聚羟基脂肪酸酯悬浮液中的杂质的步骤。

5 8. 根据权利要求 6 或 7 所述的聚羟基脂肪酸酯凝集体的制备方法，其特征在于，所述去除聚羟基脂肪酸酯悬浮液中的杂质的步骤与聚羟基脂肪酸酯的凝聚在同一反应体系中进行。

9. 根据权利要求 1~8 任一项所述的制备方法，其特征在于，聚羟基脂肪酸酯凝聚的反应体系中不包含有机溶剂。

10 10. 权利要求 1~9 任一项所述的聚羟基脂肪酸酯凝集体的制备方法制备得到的聚羟基脂肪酸酯凝集体；

优选地，所述聚羟基脂肪酸酯凝集体的粒径为至少 5  $\mu\text{m}$ ，更优选为至少 50  $\mu\text{m}$ 。

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/093510

| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>   |   |   |
|--|---|---|
| C08J3/16(2006.01)i; C08L67/04(2006.01)i  |   |   |
| 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)<br>C08J, C08L, C08G, C12P  |   |   |
| 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)<br>CNTXT, WPABSC, ENTXTC, VEN, CNKI, ISI, 百度学术, BAIDU SCHOLAR: 聚羟基脂肪酸酯, 聚-3-羟基链烷酸, PHA, 生物高分子聚酯, 凝聚体, 悬浮液, 湍流, 雷诺系数, 酶, 表面活性剂, 粒径, polyhydroxyalkanoate, poly-3-hydroxyalkanoic acid, biopolymeric polyester, aggregate, suspension, turbulent flow, Reynolds coefficient, enzyme, surfactant, particle size  |   |   |
| <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 116144046 A (BEIJING BLUEPHA MICROBIOLOGY TECHNOLOGY CO., LTD.) 23 May 2023 (2023-05-23)<br>claims 1-10                                | 1-10  |
| X  | CN 1694963 A (KANEKA CORP.) 09 November 2005 (2005-11-09)<br>description, p. 5, lines 7-8 and 16-29, p. 6, lines 6-31, p. 2, lines 6-11   | 1-6, 8-10   |
| Y  | CN 1694963 A (KANEKA CORP.) 09 November 2005 (2005-11-09)<br>description, p. 5, lines 7-8 and 16-29, p. 6, lines 6-31, p. 2, lines 6-11   | 7-10  |
| Y  | CN 111393625 A (COFCO NUTRITION AND HEALTH RESEARCH INSTITUTE CO., LTD. et al.) 10 July 2020 (2020-07-10)<br>description, paragraphs 4-11 | 7-10  |
| A  | CN 111349218 A (JILIN COFCO BIO-CHEMICAL CO., LTD. et al.) 30 June 2020 (2020-06-30)<br>description, paragraphs 10, 14, 19, 22-23, and 27 | 1-10  |
| A  | JP 2019041606 A (KANEKA CORP.) 22 March 2019 (2019-03-22)<br>description, embodiment 1  | 1-10  |
| <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:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"D" document cited by the applicant in the international application<br>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>"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)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"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<br>"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<br>"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<br>"&" document member of the same patent family |   |   |
| Date of the actual completion of the international search<br><b>10 July 2023</b>   |   | Date of mailing of the international search report<br><b>08 August 2023</b> |
| Name and mailing address of the ISA/CN<br><b>China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)<br/>China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District,<br/>Beijing 100088</b>   |   | Authorized officer<br><br>Telephone No.                                     |



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

International application No.

**PCT/CN2023/093510**

| Patent document cited in search report |            |    | Publication date (day/month/year) | Patent family member(s) |            |    | Publication date (day/month/year) |
|--|------------|----|-----------------------------------|-------------------------|------------|----|-----------------------------------|
| CN                                     | 116144046  | A  | 23 May 2023                       | None                    |            |    |                                   |
| CN                                     | 1694963    | A  | 09 November 2005                  | WO                      | 2004033700 | A1 | 22 April 2004                     |
|  |            |    |                                   | AU                      | 2003266709 | A1 | 04 May 2004                       |
|  |            |    |                                   | CA                      | 2499607    | A1 | 22 April 2004                     |
|  |            |    |                                   | JPWO                    | 2004033700 | A1 | 09 February 2006                  |
|  |            |    |                                   | BR                      | 0314749    | A  | 26 July 2005                      |
|  |            |    |                                   | EP                      | 1550724    | A1 | 06 July 2005                      |
|  |            |    |                                   | PL                      | 376044     | A1 | 12 December 2005                  |
|  |            |    |                                   | RU                      | 2005113285 | A  | 20 January 2006                   |
|  |            |    |                                   | US                      | 2008118963 | A1 | 22 May 2008                       |
| CN                                     | 111393625  | A  | 10 July 2020                      | CN                      | 111393625  | B  | 01 September 2020                 |
| CN                                     | 111349218  | A  | 30 June 2020                      | US                      | 2021340316 | A1 | 04 November 2021                  |
|  |            |    |                                   | US                      | 11203663   | B2 | 21 December 2021                  |
|  |            |    |                                   | CN                      | 111349218  | B  | 09 February 2021                  |
| JP                                     | 2019041606 | A  | 22 March 2019                     | JP                      | 6864585    | B2 | 28 April 2021                     |
| WO                                     | 2010116681 | A1 | 14 October 2010                   | JP                      | 2012115145 | A  | 21 June 2012                      |



| 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 2010116681 A1 (KANEKA CORP et al.) 2010年10月14日 (2010 - 10 - 14)<br>说明书第0032-0033段, 实施例1-2 | 1-10    |

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/093510

| 检索报告引用的专利文件 |            |    | 公布日<br>(年/月/日) | 同族专利 |            |    | 公布日<br>(年/月/日) |
|-------------|------------|----|----------------|------|------------|----|----------------|
| CN          | 116144046  | A  | 2023年5月23日     | 无    |            |    |                |
| CN          | 1694963    | A  | 2005年11月9日     | WO   | 2004033700 | A1 | 2004年4月22日     |
|             |            |    |                | AU   | 2003266709 | A1 | 2004年5月4日      |
|             |            |    |                | CA   | 2499607    | A1 | 2004年4月22日     |
|             |            |    |                | JPWO | 2004033700 | A1 | 2006年2月9日      |
|             |            |    |                | BR   | 0314749    | A  | 2005年7月26日     |
|             |            |    |                | EP   | 1550724    | A1 | 2005年7月6日      |
|             |            |    |                | PL   | 376044     | A1 | 2005年12月12日    |
|             |            |    |                | RU   | 2005113285 | A  | 2006年1月20日     |
|             |            |    |                | US   | 2008118963 | A1 | 2008年5月22日     |
| CN          | 111393625  | A  | 2020年7月10日     | CN   | 111393625  | B  | 2020年9月1日      |
| CN          | 111349218  | A  | 2020年6月30日     | US   | 2021340316 | A1 | 2021年11月4日     |
|             |            |    |                | US   | 11203663   | B2 | 2021年12月21日    |
|             |            |    |                | CN   | 111349218  | B  | 2021年2月9日      |
| JP          | 2019041606 | A  | 2019年3月22日     | JP   | 6864585    | B2 | 2021年4月28日     |
| WO          | 2010116681 | A1 | 2010年10月14日    | JP   | 2012115145 | A  | 2012年6月21日     |