

(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
2024 年 3 月 7 日 (07.03.2024)



(10) 国际公布号
WO 2024/045796 A1

(51) 国际专利分类号:

C12N 9/10 (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)

C12N 15/54 (2006.01) *C12P 19/60* (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01) *C12P 19/18* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/102014

(22) 国际申请日: 2023 年 6 月 25 日 (25.06.2023)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

202211071304.8 2022年9月1日 (01.09.2022) CN

(71) 申请人: 江南大学 (JIANGNAN UNIVERSITY) [CN/
CN]; 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道
1800号, Jiangsu 214122 (CN)。

(72) 发明人: 韩瑞枝 (HAN, Ruizhi); 中国江苏省无锡市
滨湖区蠡湖大道1800号, Jiangsu 214122 (CN)。
倪晔 (NI, Ye); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡
湖大道1800号, Jiangsu 214122 (CN)。姜钰琳
(JIANG, Yulin); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖
大道1800号, Jiangsu 214122 (CN)。樊朝悦 (FAN,

Zhaoyue); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大
道1800号, Jiangsu 214122 (CN)。

(74) 代理人: 哈尔滨市阳光惠远知识产权代
理有限公司 (HARBIN SHINEIP INTELLECTUAL
PROPERTY AGENCY CO., LTD.); 中国黑龙江省
哈尔滨市松北区科技一街99号18栋E区
501, Heilongjiang 150028 (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

(54) Title: CYCLODEXTRIN GLUCOSYLTRANSFERASE WITH IMPROVED SOLVENT TOLERANCE AND PREPARATION THEREOF

(54) 发明名称: 一种溶剂耐受性提高的环糊精葡萄糖基转移酶及其制备

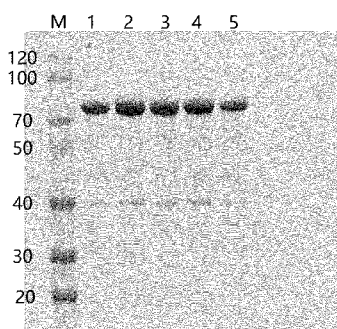


图 1

(57) Abstract: Disclosed are a cyclodextrin glucosyltransferase with improved solvent tolerance and preparation thereof, belonging to the technical field of enzyme engineering and genetic engineering. The present invention constructs four cyclodextrin glucosyltransferase mutants with improved organic solvent tolerance. The mutant with the best tolerance to DMSO and methanol is G539I/R146F/D147N, which has increased tolerance by 1.6 and 1.7 times compared with WT, respectively; the mutant with the best tolerance to ethanol is R146F, which has increased tolerance by 1.4 times compared with WT; the mutant with the best tolerance to acetone is G539I/R146F, which has increased tolerance by 1.5 times compared with the WT. The present invention helps to expand the application of glycosyltransferase in an organic reaction system, improves the enzymatic efficiency of CGTase on a natural hydrophobic substrate, and has great application prospects.

(57) 摘要: 本发明公开了一种溶剂耐受性提高的环糊精葡萄糖基转移酶及其制备, 属于酶工程和基因工程技术领域。本发明构建了四个有机溶剂耐受性提高的环糊精葡萄糖基转移酶突变体。其中, 对DMSO和甲醇耐受性最好的突变体为G539I/R146F/D147N, 较WT分别提高了1.6和1.7倍; 对乙醇耐受性最好的突变体为R146F, 较WT提高了1.4倍; 对丙酮耐受性最好的突变体为G539I/R146F, 较WT提高了1.5倍。本发明有助于拓展糖基转移酶在有机反应体系中的应用, 提高CGTase对天然疏水底物的酶促效率, 具有极大的应用前景。

(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))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

一种溶剂耐受性提高的环糊精葡萄糖基转移酶及其制备

技术领域

本发明涉及一种溶剂耐受性提高的环糊精葡萄糖基转移酶及其制备，属于酶工程和基因工程技术领域。

背景技术

环糊精糖基转移酶（Cyclodextrin glycosyltransferase，简称 CGTase，EC 2.4.1.19），属于 α -淀粉酶家族，因其具有多种转糖基活力（环化、歧化、耦合活力），极具商业价值，目前该酶在工业上主要用于生产环糊精，此外，该酶还含有部分水解活力，在短链糖基化反应过程中起到重要作用。近年来利用其转糖基活力改善天然底物的性质研究取得了较好的进展，如甜菊苷、芦丁、染料木素等。糖基化处理有效解决了这些物质在实际应用中溶解性差、不易储存、不稳定等多种问题，且糖基化产物多数保持了物质本身的优良性质和价值，因而在食品、化工等多个领域均有较好的应用。

然而，在应用过程中，新的问题也随之出现亟待解决。在实际应用中，直接依靠挖掘的天然环糊精糖基转移酶往往很难满足生产要求。究其原因，天然酶多数都存在酶活低，不稳定，底物混杂性差等问题，且由于环糊精糖基转移酶复杂的催化机理，常产生多种产物，产物特异性差，因此，目前对于该酶的分子改造多集中于催化活性，热稳定性，专一性等方面，并取得了不错的进展。然而，对于酶学反应，其催化效率除酶本身外，与酶所处环境也有很大的关系。在工业生产中，有机溶剂的使用是极为重要的一环，很多疏水底物的生物转化都依赖于有机溶剂，但有机溶剂往往对多数酶存在不利影响，使酶活性降低甚至失活，严重限制了生产效率。

与多数酶类似，天然的环糊精糖基转移酶在有机溶剂环境中的酶活及酶稳都会受到极大影响，因此，为了突破这一瓶颈，通过分子改造策略提高环糊精糖基转移酶的有机溶剂耐受性及其在有机溶剂中的酶活具有极大的意义。

发明内容

本发明的目的在于提供了一种对溶剂耐受性提高的环糊精葡萄糖基转移酶突变体，有利于扩大环糊精糖基转移酶对天然疏水性底物的糖基化应用。

所述突变体是将氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的环糊精葡萄糖基转移酶的第 146 位、第 147 位、第 539 位的氨基酸突变得到的。

在本发明的一种实施方式中，所述环糊精葡萄糖基转移酶来源于软化类芽孢杆菌

(*Paenibacillus macerans*)。

在本发明的一种实施方式中，所述环糊精葡萄糖基转移酶的核苷酸序列如 SEQ ID NO.2 所示。

在本发明的一种实施方式中，所述突变体是将氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的环糊精葡萄糖基转移酶的第 146 位的精氨酸突变为苯丙氨酸，命名为 R146F，其氨基酸序列如 SEQ ID NO.3 所示，核苷酸序列如 SEQ ID NO.4 所示。

在本发明的一种实施方式中，所述突变体是将氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的环糊精葡萄糖基转移酶的第 539 位的甘氨酸突变为异亮氨酸，命名为 G539I，其氨基酸序列如 SEQ ID NO.5 所示，核苷酸序列如 SEQ ID NO.6 所示。

在本发明的一种实施方式中，所述突变体是将氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的环糊精葡萄糖基转移酶的第 539 位的甘氨酸突变为异亮氨酸，同时将第 146 位的精氨酸突变为苯丙氨酸，命名为 G539I/R146F，其氨基酸序列如 SEQ ID NO.7 所示，核苷酸序列如 SEQ ID NO.8 所示。

在本发明的一种实施方式中，所述突变体是将氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的环糊精葡萄糖基转移酶的第 539 位的甘氨酸突变为异亮氨酸；同时将第 146 位的精氨酸突变为苯丙氨酸；同时将第 147 位的天冬氨酸突变为天冬酰胺；命名为 G539I/R146F/D147N，其氨基酸序列如 SEQ ID NO.9 所示，核苷酸序列如 SEQ ID NO.10 所示。

本发明还提供了一种编码上述突变体的基因。

本发明还提供了一种携带上述基因的重组载体。

在本发明的一种实施方式中，所述载体为：pET 系列载体、pUT 系列载体或 pBAD 系列载体。

本发明还提供了一种表达上述突变体，或携带上述基因，或携带上述重组载体的重组细胞。

在本发明的一种实施方式中，所述重组细胞是以真菌或细菌为宿主细胞。

在本发明的一种实施方式中，所述宿主细胞为：大肠杆菌或枯草芽孢杆菌。

本发明还提供了一种制备所述环糊精葡萄糖基转移酶突变体的方法，具体步骤包括：

(1) 首先设计定点突变的引物，以含有所述环糊精葡萄糖基转移酶基因的质粒为模板进行全质粒 PCR，经消化模板后获得携带突变基因的重组质粒，将其转入宿主菌，用卡那霉素抗性筛选后挑菌培养，并送样测序；

(2) 将测序正确的菌株进行培养，37 °C 培养 12 h 后按 1% 的接种量转接到 TB 培养基，

37 °C培养至 OD 长至 0.8 左右后诱导表达，诱导温度为 16 °C，诱导 18 h；

(3) 结束培养后将收集的发酵液进行离心收集菌体，进行超声破碎，再次离心，收集的上清液即为所述突变体的粗酶液。

在本发明的一种实施方式中，所述重组质粒以 pET-28a(+)为表达载体。

在本发明的一种实施方式中，所述宿主菌为 *E. coli* BL21(DE3)。

在本发明的一种实施方式中，所述有机溶剂包括：二甲基亚砜 (DMSO)、乙醇、甲醇及丙酮。

本发明还提供了一种提高环糊精葡萄糖基转移酶对有机溶剂的耐受性的方法，所述方法为，将氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的环糊精葡萄糖基转移酶的第 539 位的甘氨酸突变为异亮氨酸；

或将氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的环糊精葡萄糖基转移酶的第 539 位的甘氨酸突变为异亮氨酸，同时将第 146 位的精氨酸突变为苯丙氨酸；

或将氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的环糊精葡萄糖基转移酶的第 539 位的甘氨酸突变为异亮氨酸；同时将第 146 位的精氨酸突变为苯丙氨酸；同时将第 147 位的天冬氨酸突变为天冬酰胺。

在本发明的一种实施方式中，所述有机溶剂包括二甲基亚砜 (DMSO)、乙醇、甲醇及丙酮中的一种或多种。

本发明还提供了一种生产长链糖基化染料木素的方法，其特征在于，所述方法为，向含有可溶性淀粉和染料木素的反应体系中加入环糊精葡萄糖基转移酶突变体进行反应，得到反应液；将反应液进行分离，获得长链糖基化染料木素。

本发明还提供了上述突变体，或上述基因，或上述重组载体，或上述重组细胞，在天然疏水性底物的糖基化应用，或在部分有机溶剂反应体系中的糖基化应用。

有益效果

(1) 本发明构建了四个有机溶剂耐受性提高的环糊精葡萄糖基转移酶突变体，R146F、G539I、G539I/R146F、G539I/R146F/D147N，其在不含有有机溶剂的体系中直接测活的原始活力保持在 WT 活力的 90%~120%。

(2) 在对二甲基亚砜的耐受性测定中，WT 在 25%的 DMSO 体系中孵育 1h 后的残余活力剩 21.3%，而突变体 R146F、G539I、G539I/R146F、G539I/R146F/D147N 的耐受性均有提高，其中，最优突变体为 G539I/R146F/D147N，较 WT 的 DMSO 耐受性提高了 1.6 倍。

(3) 在对乙醇的耐受性测定中，WT 在 12%的乙醇中孵育 1 h 后的残余活力为 17.9%，对上述四种突变体在相同条件下进行测定发现，其中最优的突变体为 R146F，较 WT 的乙醇

耐受性提高了 1.4 倍。

（4）在对甲醇的耐受性测定中，WT 在 12%的甲醇中孵育 1 h 后的残余活力为 27.4%，对上述四种突变体在相同条件下进行测定发现，其中最优的突变体为 G539I/R146F/D147N，较 WT 的甲醇耐受性提高了 1.7 倍。

（5）在对丙酮的耐受性测定中，WT 在 15%的丙酮中孵育 1 h 后的残余活力为 22.3%，对上述四种突变体在相同条件下进行测定发现，其中最优的突变体为 G539I/R146F，较 WT 的丙酮耐受性提高了 1.5 倍。

（6）本发明获得了两个有机溶剂耐受性提高的环糊精糖基转移酶突变体，促进了对疏水性底物的糖基化效率，有助于拓展 CGTase 的工业应用范围，具有极大的应用前景。

附图说明

图 1：野生型及突变体纯酶的蛋白胶图；其中，M：Marker ；1：R146F；2：G539I；3：G539I/R146F；4：G539I/R146F/D147N；5：野生型 WT。

具体实施方式

本发明的具体实施例仅用作进一步的说明，不能作为本发明的限制内容和范围。

下述实施例中所涉及的引物序列如表 1 所示：

表 1：引物

名称	引物序列（5'→3'）
R146F	F: TCTCCGGCAGATTTTGACAATCCG R: CGGATTGTCAAATCTGCCGGAGA
G539I	F: ACCGCGGTCACCATTAGTGGTATT R: AATACCACTAATGGTGACCGCGGT
G539I/R146F	F1: TCTCCGGCAGATTTTGACAATCCG R1: CGGATTGTCAAATCTGCCGGAGA F2: ACCGCGGTCACCATTAGTGGTATT R2: AATACCACTAATGGTGACCGCGGT
G539I/R146F/D147N	F1: TCTCCGGCAGATTTTAAATATCCG R1: CGGATTATTAAATCTGCCGGAGA F2: ACCGCGGTCACCATTAGTGGTATT R2: AATACCACTAATGGTGACCGCGGT

pET-20b(+)-cgt 为模板利用 PCR 技术获得大量克隆目的片段,经胶回收后与经双酶切(BamH I 和 Xho I) 后的质粒 pET-28a(+)进行连接, 转入大肠杆菌 BL21 后进行涂布培养, 待菌落明显长出后挑取接入到 LB 液体培养基培养 10 h, 提取质粒并送样测序, 测序正确的质粒标记为 pET-28a(+)-cgt。

(2) 突变体的构建

本发明中的环糊精葡萄糖基转移酶的氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示(基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.2 所示), 根据选定的突变位点设计引物, 以提取的重组质粒 pET28a(+)-cgt 作为模板进行全质粒 PCR, 引物序列如下:

突变体 R146F 所用引物:

正向引物: 5'- TCTCCGGCAGATTTTGACAATCCG-3', 下划线为突变碱基;

反向引物: 5'- CGGATTGTCAAAATCTGCCGGAGA -3', 下划线为突变碱基。

突变体 G539I 所用引物:

正向引物: 5'- ACCGCGGTCACCATTAGTGGTATT -3', 下划线为突变碱基;

反向引物: 5'- AATACCACTAATGGTGACCGCGGT -3', 下划线为突变碱基。

突变体 G539I/R146F 所用引物:

正向引物 1: 5'- TCTCCGGCAGATTTTGACAATCCG-3', 下划线为突变碱基;

反向引物 1: 5'- CGGATTGTCAAAATCTGCCGGAGA -3', 下划线为突变碱基。

正向引物 2: 5'- ACCGCGGTCACCATTAGTGGTATT -3', 下划线为突变碱基;

反向引物 2: 5'- AATACCACTAATGGTGACCGCGGT -3', 下划线为突变碱基。

突变体 G539I/R146F/D147N 所用引物:

正向引物 1: 5'- TCTCCGGCAGATTTTAAATAATCCG-3', 下划线为突变碱基;

反向引物 1: 5'- CGGATTATTAATAATCTGCCGGAGA -3', 下划线为突变碱基。

正向引物 2: 5'- ACCGCGGTCACCATTAGTGGTATT -3', 下划线为突变碱基;

反向引物 2: 5'- AATACCACTAATGGTGACCGCGGT -3', 下划线为突变碱基。

PCR 反应体系均为: 5×PrimeSTAR Buffer (Mg²⁺ Plus) 5 μL, 2.5 mM dNTPs 4 μL, 10 μM 正向引物 1 μL, 10 μM 反向引物 1 μL, 模板 DNA 1 μL, 2.5 U/μL PrimeSTAR Taq HS 0.5 μL, 加双蒸水补足至 50 μL;

PCR 产物扩增条件均为: 98 °C 预变性 5 min; 98 °C 10 s, 50 °C 15 s, 68 °C 4 min, 25 个循环后 68 °C 保温 10 min, 最后 16 °C 保存。

用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 检测正确后加消化酶 (Dpn I) 消化模板, 37 °C

下消化 1 h，将消化后的产物转入感受态大肠杆菌 BL21，在含浓度为 50 mg/L 的卡那霉素的 LB 固体培养基上过夜培养，挑取阳性克隆接入 LB 液体培养基中培养 10 h 后，提取质粒送样测序，测序正确即获得可表达突变体的重组大肠杆菌，即制备得到重组大肠杆菌：*E. coli* BL21(DE3)/pET28a(+)-R146F，*E. coli* BL21(DE3)/pET28a(+)-G539I，*E. coli* BL21(DE3)/pET28a(+)-G539I/R146F，*E. coli* BL21(DE3)/pET28a(+)-G539I/R146F/D147N；

(3) 含有野生型 CGTase 的重组菌的构建

将重组质粒 pET28a(+)-cgt 按照上述方法导入 *E. coli* BL21(DE3) 中，即得到：*E. coli* BL21(DE3)/pET-28a(+)-cgt。

2、突变体的表达

分别将步骤 1 制备得到的含有突变体基因的重组大肠杆菌、及野生型菌株 *E. coli* BL21(DE3)/pET-28a(+)-cgt 接入 LB 液体培养基（含卡那霉素，50 mg/L），于 37 °C 培养 10 h，制备得到种子液；

将所得种子液按 1%（v/v）的接种量接入 TB 液体培养基（含卡那霉素，50 mg/L）中，37 °C 摇床培养至 OD₆₀₀ 达到 0.6~0.8，加终浓度为 0.1 mM 的 IPTG 诱导表达，温度为 16 °C，发酵培养 18 h 后，制备得到发酵液；

将制备得到的发酵液离心收菌，4 °C、8000 r/min 离心 10 min，倒掉上清液，剩余的沉淀用磷酸盐缓冲液（pH 6.0，50 mM）重悬后进行超声破碎，300W 破碎 10 min，将破碎液于 4 °C，8000 r/min 离心 30 min，所得上清液，即为含有突变体的粗酶液，即得到含有野生型 CGTase 的粗酶液、含有 R146F 的粗酶液，含有 G539I 的粗酶液，含有 G539I/R146F 的粗酶液，含有 G539I/R146F/D147N 的粗酶液。

分别将上述突变体粗酶液和野生酶粗酶液进行琼脂糖凝胶电泳，验证蛋白表达成功。

3、突变体和野生型酶的纯化

分别将上述粗酶液过膜处理，进行 Ni 柱亲和层析纯化。先用缓冲液 A（含 20 mM 磷酸钠、0.5 M 氯化钠、20 mM 咪唑、pH 7.4）平衡 Ni 柱，待平衡后进行蛋白样品上样，多次上样使之完全吸附后，依次用不同浓度（20~500 mM）的咪唑溶液进行梯度洗脱并收集流穿，结束后配置 10% 的蛋白胶检测目的蛋白，合并含有目的蛋白的咪唑溶液，并用超滤管及 pH 6.0 的磷酸缓冲液进行浓缩置换，最后将获得的蛋白样品进行分装，并用液氮速冻，于 -80 °C 保藏备用。

分别制备得到含有野生型 CGTase 的纯酶液、含有 R146F 的纯酶液、含有 G539I 的纯酶液、含有 G539I/R146F 的纯酶液、含有 G539I/R146F/D147N 的纯酶液。

分别将上述突变体和野生型的酶液进行琼脂糖凝胶电泳，结果如图 1 所示，在 74 kDa（Marker 的第三条带大小为 70 kDa）处有相应的条带。

实施例 2：环糊精葡萄糖基转移酶的有机溶剂耐受性检测

在本发明的实施方案中，环糊精葡萄糖基转移酶的有机溶剂耐受性通过测定其在不同浓度的有机溶剂中孵育一定时间后的残余酶活进行分析。

残余活力的计算 = 孵育后的酶活（含不同浓度的有机溶剂体系中测得的酶活）/ 未孵育的酶活（仅含 PBS 的体系中测得的酶活）

具体步骤如下：

1、环糊精葡萄糖基转移酶的有机溶剂二甲基亚砷（DMSO）耐受性检测

将二甲基亚砷（DMSO）的浓度分别选用 0%，25%（v/v），孵育时间控制在 1 h，利用甲基橙法（为方便检测，对甲基橙法进行了适当改进）对获得的纯酶进行测活。

具体方法如下：

（1）分别将实施例 1 制备得到的纯酶液、T599D/N600D/Y601H 突变体纯酶液稀释至酶活为 0.01-0.02 mg/mL 后，取 100 μ L，加入到装有 100 μ L 含 DMSO 的磷酸缓冲液（50 mM，pH 6.0）中，其中，含 DMSO 的磷酸缓冲液中 DMSO 的初始体积分数分别为 0%，50%；

（2）配制麦芽糊精溶液：用 50 mM 磷酸缓冲液（pH 6.0），将麦芽糊精配制成浓度为 40 g·L⁻¹ 的麦芽糊精溶液；

配制甲基橙溶液：用 50 mM 磷酸缓冲液将甲基橙配制成浓度为 0.5 mM 甲基橙溶液。

（3）分别将步骤（1）得到的体系于 4℃孵育 1 h 后，加入 50 μ L 步骤（2）制备得到的麦芽糊精溶液，在 40 °C下反应 10 min 后，立即加入 250 μ L 盐酸（1.0 M）终止反应，再加入 150 μ L 步骤（2）制备得到的甲基橙溶液后，室温静置 20 min，在 505 nm 下测定吸光度。

以 0%（v/v）的 DMSO 组中测得的酶活为原始活力，在 25%（v/v）的 DMSO 中孵育后测得的野生型 WT 和突变体的残余活力及相对活力列于表 2。

表 2 野生型 WT 与突变体的残余活力及相对活力比较

样品	相对活力(%)	残余活力 (%)
	0%DMSO	25%DMSO
WT	100	21.3±4.7
R146F	91.1±5.5	28.1±3.2
G539I	85.5±3.2	27.4±2.5
G539I/R146F	93.1±1.2	31.8±2.3
G539I/R146F/D147N	120.2±2.3	35.1±3.7
T599D/N600D/Y601H	75.4±4.3	33.7±2.9

从表 2 可以看出：在 25%的 DMSO 体系中于 4 °C 孵育 1 h 后测活，WT 的残余活力为 21.3%。相比于 WT，四个突变体的 DMSO 耐受性均有一定的提升，单突变体 R146F 及 G539I 相比于 WT 在 25%的 DMSO 中孵育 1 h 后耐受性提高了 6~7%，组合后的双突变体 G539I/R146F 的耐受性有所增加，较 WT 提高了 10.5%，最优的三突变体 G539I/R146F/D147N 在相同孵育条件下较 WT 提高了 13.8%，是 WT 的 1.6 倍。突变体 T599D/N600D/Y601H 在 25%的 DMSO 体系中也具有较好的耐受性，效果与最优的三突 G539I/R146F/D147N 相近。

此外，除突变体 G539I 外，其余三个突变体的相对活力较 WT 没有太大的影响，而对比突变体 T599D/N600D/Y601H，该突变体的 DMSO 抗性虽然也有较大提升，但其原始活力下降比较严重，而三突变体 G539I/R146F/D147N 的活力较 WT 提高了 20%，因此，三突变体 G539I/R146F/D147N 在实际应用中可能更具优势。

2、环糊精葡萄糖基转移酶的有机溶剂乙醇耐受性检测

将乙醇的浓度分别选用 0%，12% (v/v)。孵育时间控制在 1 h，利用甲基橙法（为方便检测，对甲基橙法进行了适当改进）对获得的纯酶进行测活。

具体方法如下：

（1）分别将实施例 1 制备得到的纯酶液、T599D/N600D/Y601H 突变体纯酶液稀释至酶活为 0.01-0.02 mg/mL 后，取 100 μ L，加入到装有 100 μ L 含乙醇的磷酸缓冲液（50 mM，pH 6.0）中，其中，含乙醇的磷酸缓冲液中乙醇的体积分数分别为 0%，24%；

（2）配制麦芽糊精溶液：用 50 mM 磷酸缓冲液（pH 6.0），将麦芽糊精配制成浓度为 40 g·L⁻¹ 的麦芽糊精溶液；

配制甲基橙溶液：用 50 mM 磷酸缓冲液将甲基橙配制成浓度为 0.5 mM 甲基橙溶液。

（3）分别将步骤（1）得到的体系于 4 °C 孵育 1 h 后，加入 50 μ L 步骤（2）制备得到的麦芽糊精溶液，在 40 °C 下反应 10 min 后，立即加入 250 μ L 盐酸（1.0 M）终止反应，再加入 150 μ L 步骤（2）制备得到的甲基橙溶液后，室温静置 20 min，在 505 nm 下测定吸光度。

以 0% (v/v) 的乙醇组中测得的酶活为原始活力，在 12% (v/v) 的乙醇中孵育后测得的野生型 WT 和突变体的残余活力及相对活力列于表 3。

表 3 野生型 WT 与突变体的残余活力及相对活力比较

样品	相对活力(%)	残余活力 (%)
	0%乙醇	12%乙醇
WT	100	17.9 $\pm$ 4.5
R146F	98.5 $\pm$ 2.7	25.3 $\pm$ 4.0
G539I	87.5 $\pm$ 4.1	23.8 $\pm$ 2.2

G539I/R146F	90.7±3.2	22.8±3.4
G539I/R146F/D147N	115.2±4.5	20.7±2.7
T599D/N600D/Y601H	72.2±3.6	21.9±3.0

从表 3 可以看出:在 12%的乙醇体系中于 4 °C 孵育 1 h 后测活,WT 的残余活力为 17.9%。相比于 WT,两个单突变体的乙醇耐受性有较为明显的提升,最优的单突变体 R146F 较 WT 提高了 7.4%,是 WT 的 1.4 倍,单突变体 G539I 较 WT 的乙醇耐受性提高了 5.9%,而两个组合突变在乙醇中的耐受性较 WT 没有明显改善。突变体 T599D/N600D/Y601H 在 12%的乙醇中的耐受性与上述两个组合突变类似,效果也不明显,这可能也与该突变体的原始活力下降较多有关。此外,对比 DMSO 的数据,发现该酶对乙醇的耐受性较差。

此外,在酶活方面,本发明中的四个突变体的相对活力较 WT 没有明显降低,相对活力保持在 87~115%,三突变体 G539I/R146F/D147N 的活力较 WT 有所提高。

3、环糊精葡萄糖基转移酶的有机溶剂甲醇耐受性检测

将甲醇的浓度分别选用 0%, 12% (v/v)。孵育时间控制在 1 h,利用甲基橙法(为方便检测,对甲基橙法进行了适当改进)对获得的纯酶进行测活。

具体方法如下:

(1) 分别将实施例 1 制备得到的纯酶液、T599D/N600D/Y601H 突变体纯酶液稀释至酶活为 0.01-0.02 mg/mL 后,取 100 μ L,加入到装有 100 μ L 含甲醇的磷酸缓冲液(50 mM, pH 6.0)中,其中,含甲醇的磷酸缓冲液中甲醇的体积分数分别为 0%, 24%;

(2) 配制麦芽糊精溶液:用 50 mM 磷酸缓冲液(pH 6.0),将麦芽糊精配制成浓度为 40 g·L⁻¹的麦芽糊精溶液;

配制甲基橙溶液:用 50 mM 磷酸缓冲液将甲基橙配制成浓度为 0.5 mM 甲基橙溶液。

(3) 分别将步骤(1)得到的体系于 4 °C 孵育 1 h 后,加入 50 μ L 步骤(2)制备得到的麦芽糊精溶液,在 40 °C 下反应 10 min 后,立即加入 250 μ L 盐酸(1.0 M)终止反应,再加入 150 μ L 步骤(2)制备得到的甲基橙溶液后,室温静置 20 min,在 505 nm 下测定吸光度。

以 0% (v/v) 的甲醇组中测得的酶活为原始活力,在 12% (v/v) 的甲醇中孵育后测得的野生型 WT 和突变体的残余活力及相对活力列于表 4。

表 4 野生型 WT 与突变体的残余活力及相对活力比较

样品	相对活力(%)	残余活力 (%)
	0%甲醇	12%甲醇
WT	100	27.4±2.3
R146F	89.2±3.4	40.1±2.7
G539I	90.6±4.6	23.4±3.0

G539I/R146F	94.8±3.2	38.7±3.6
G539I/R146F/D147N	113.2±2.3	46.3±4.5
T599D/N600D/Y601H	69.5±3.9	34.3±2.7

从表 4 可以看出:在 12%的甲醇体系中于 4 ℃ 孵育 1 h 后测活,WT 的残余活力为 27.4%。相比于 WT,单突变体 R146F,双突变体 G539I/R146F 及三突变体 G539I/R146F/D147N 的甲醇耐受性改善较为明显,其中三突的效果最好,较 WT 提高了近 1.7 倍,提高了 18.9%,其次是单突变体 R146F 及双突 G539I/R146F,较 WT 分别提高了 12.7%和 11.3%。然而,单突变体 G539I 对甲醇的耐受性不如 WT,此外,对比单突 R146F 及双突 G539I/R146F 的耐受性数据,叠加上 G539I 后,甲醇的耐受性有所下降,因此,对于甲醇的耐受性检验中,突变 R146F 起重要作用。对比突变体 T599D/N600D/Y601H,其在 12%的甲醇中耐受性较 WT 提升了 6.9%,但效果远不如最优的三突 G539I/R146F/D147N 明显。

在酶活方面,四个突变体的相对活力较 WT 没有明显降低,相对活力保持在 89~113%,三突变体 G539I/R146F/D147N 的活力较 WT 有所提高。

4、环糊精葡萄糖基转移酶的有机溶剂丙酮耐受性检测

将丙酮的浓度分别选用 0%, 15% (v/v)。孵育时间控制在 1 h,利用甲基橙法(为方便检测,对甲基橙法进行了适当改进)对获得的纯酶进行测活。

具体方法如下:

(1) 分别将实施例 1 制备得到的纯酶液、T599D/N600D/Y601H 突变体纯酶液稀释至酶活为 0.01-0.02 mg/mL 后,取 100 μL,加入到装有 100 μL 含丙酮的磷酸缓冲液(50 mM, pH 6.0)中,其中,含丙酮的磷酸缓冲液中乙醇的体积分数分别为 0%, 30%;

(2) 配制麦芽糊精溶液:用 50 mM 磷酸缓冲液(pH 6.0),将麦芽糊精配制成浓度为 40 g·L⁻¹ 的麦芽糊精溶液;

配制甲基橙溶液:用 50 mM 磷酸缓冲液将甲基橙配制成浓度为 0.5 mM 甲基橙溶液。

(3) 分别将步骤(1)得到的体系于 4℃孵育 1 h 后,加入 50 μL 步骤(2)制备得到的麦芽糊精溶液,在 40 ℃下反应 10 min 后,立即加入 250 μL 盐酸(1.0 M)终止反应,再加入 150 μL 步骤(2)制备得到的甲基橙溶液后,室温静置 20 min,在 505 nm 下测定吸光度。

以 0% (v/v) 的丙酮组中测得的酶活为原始活力,在 15% (v/v) 的丙酮中孵育后测得的野生型 WT 和突变体的残余活力及相对活力列于表 5。

表 5 野生型 WT 与突变体的残余活力及相对活力比较

样品	相对活力(%)	残余活力 (%)
	0%丙酮	15%丙酮

WT	100	22.3±3.2
R146F	92.8±2.4	30.7±3.8
G539I	87.2±4.9	26.4±2.5
G539I/R146F	97.1±3.7	34.3±3.2
G539I/R146F/D147N	117.2±4.4	29.4±4.6
T599D/N600D/Y601H	76.4±3.4	26.6±5.3

从表 5 可以看出:在 15%的丙酮体系中于 4 ℃ 孵育 1 h 后测活,WT 的残余活力为 22.3%。相比于 WT,四个突变体的丙酮耐受性均有提升,最优的是双突变体 G539I/R146F,较 WT 提高了 12%,是 WT 的 1.5 倍。此外,单突变体 R146F 及三突 G539I/R146F/D147N 的丙酮耐受性效果接近,较 WT 提高了 7~8.4%,而单突变体 G539I 及 T599D/N600D/Y601H 的丙酮耐受性较 WT 提升不明显,仅提高了 4%左右。

在酶活方面,与前面的结果一致,四个突变体的相对活力较 WT 没有明显降低,相对活力保持在 87~117%,三突变体 G539I/R146F/D147N 的活力较 WT 有所提高。

实施例 3:对染料木素的糖基化应用

以染料木素为例,分别将实施例 1 制备得到的突变体 R146F、G539I、G539I/R146F、G539I/R146F/D147N 纯酶液及野生型 WT 的纯酶液,以及突变体 T599D/N600D/Y601H 纯酶液进行适当稀释,分别以可溶性淀粉为糖基供体,以染料木素为糖基受体进行糖基化反应。

具体步骤如下:

- (1) 用磷酸缓冲液 (pH 6.0, 50 mM) 配制浓度为 40 g/L 的可溶性淀粉溶液;
- (2) 用 DMSO 溶液溶解染料木素,得到染料木素溶液,浓度为 7.5 g/L。
- (3) 按照可溶性淀粉溶液:染料木素溶液:纯酶液 (v:v:v) =6: 2: 2 的比例进行混合 (加酶量控制在 0.15~0.2 U/mL),在 40℃摇床中反应 16~18 h 后加热终止反应。

对样品进行离心过膜处理后进行高效液相色谱 (HPLC) 分析,具体结果如表 6 所示。

表 6 野生型 WT 与各突变体对染料木素的糖基化效率比较

样品	转化率 (%)
WT	45
R146F	57
G539I	54
G539I/R146F	58
G539I/R146F/D147N	61
T599D/N600D/Y601H	46

由上表可知:本发明中的四个突变体较 WT 对染料木素的糖基化效率均有一定的提升,其中,最好的是三突变体 G539I/R146F/D147N,转化率较 WT 提高了 16%,其余单突 R146F、

G539I, 双突 G539I/R146F 较 WT 分别提高了 12%, 9%及 13%, 突变体 T599D/N600D/Y601H 在 DMSO 中的耐受性虽然也有较大提升, 但可能是由于其酶活下降较多, 在转化率上表现不明显, 与 WT 差不多, 没有明显提升。

虽然本发明已以较佳实施例公开如上, 但其并非用以限定本发明, 任何熟悉此技术的人, 在不脱离本发明的精神和范围内, 都可做各种的改动与修饰, 因此本发明的保护范围应该以权利要求书所界定的为准。

权 利 要 求 书

1、一种环糊精葡萄糖基转移酶突变体，其特征在于，所述突变体是将氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的环糊精葡萄糖基转移酶的第 539 位的甘氨酸突变为异亮氨酸得到的；

或将氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的环糊精葡萄糖基转移酶的第 539 位的甘氨酸突变为异亮氨酸，同时将第 146 位的精氨酸突变为苯丙氨酸得到的；

或将氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的环糊精葡萄糖基转移酶的第 539 位的甘氨酸突变为异亮氨酸；同时将第 146 位的精氨酸突变为苯丙氨酸；同时将第 147 位的天冬氨酸突变为天冬酰胺得到的。

2、编码权利要求 1 所述突变体的基因。

3、携带权利要求 2 所述基因的重组载体。

4、如权利要求 3 所述的重组载体，其特征在于，以 pET 系列载体、pUT 系列载体或 pBAD 系列载体为表达载体。

5、表达权利要求 1 所述突变体，或携带权利要求 2 所述基因，或携带权利要求 3 或 4 所述重组载体的重组细胞。

6、如权利要求 5 所述的重组细胞，其特征在于，所述重组细胞以细菌或真菌为宿主细胞。

7、一种提高环糊精葡萄糖基转移酶对有机溶剂的耐受性的方法，其特征在于，所述方法为，将氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的环糊精葡萄糖基转移酶的第 539 位的甘氨酸突变为异亮氨酸；

或将氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的环糊精葡萄糖基转移酶的第 539 位的甘氨酸突变为异亮氨酸，同时将第 146 位的精氨酸突变为苯丙氨酸；

或将氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的环糊精葡萄糖基转移酶的第 539 位的甘氨酸突变为异亮氨酸；同时将第 146 位的精氨酸突变为苯丙氨酸；同时将第 147 位的天冬氨酸突变为天冬酰胺。

8、如权利要求 7 所述的方法，其特征在于，所述有机溶剂包括二甲基亚砜（DMSO）、乙醇、甲醇及丙酮中的一种或多种。

9、一种生产长链糖基化染料木素的方法，其特征在于，所述方法为，向含有可溶性淀粉和染料木素的反应体系中加入权利要求 1 所述的环糊精葡萄糖基转移酶突变体进行反应，得到反应液；将反应液进行分离，获得长链糖基化染料木素。

10、权利要求 1 所述的突变体，或权利要求 2 所述的基因，或权利要求 3 或 4 所述的重组载体，或权利要求 5 或 6 所述的重组细胞，在天然疏水性底物的糖基化应用，或在有机溶剂反应体系中的糖基化应用。

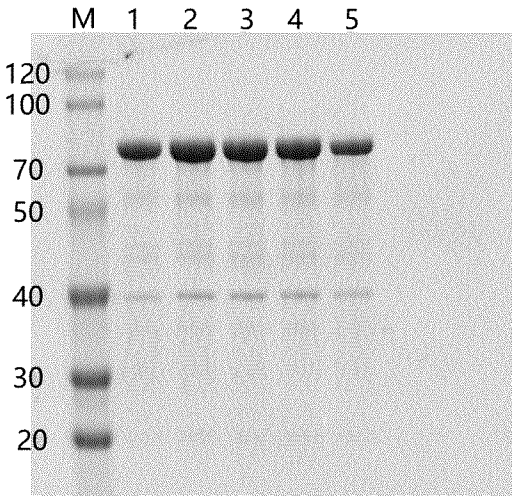


图 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/102014

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N9/10(2006.01)i; C12N15/54(2006.01)i; C12N15/70(2006.01)i; C12N1/21(2006.01)i; C12P19/60 (2006.01)i;
C12P19/18(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)

IPC: C12N9/-; C12N15/-; C12N1/-; C12P19/-

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)

CNTEXT; CNABS; ENTXT; ENTXTC; VEN; WOTXT; USTXT; EPTXT; JPTXT; KRTXT; CNKI; BING; Web of Science; pubmed; 万方, WANFANG; 百度, BAIDU; 百度学术, BAIDU SCHOLAR; 读秀 DUXIU; 环糊精糖基转移酶; 环糊精葡萄糖基转移酶; CGT酶; 突变; 有机溶剂; 二甲基亚砜; 乙醇; 酒精; 甲醇; 丙酮; Cyclodextrin glycosyltransferase; CGTase; EC 2.4.1.19; G539I; Gly539Ile; +539+; R146F; Arg146Phe; +146+; D147N; Asp147Asn; +147+; mutat+; mutant+; organic solvent; DMSO; dimethyl sulfoxide; alcohol; ethanol; methanol; acetone; GenBank; LENS; EMBL; 中国专利生物序列检索系统; SEQ ID NO: 1-10, China Patents Biological Sequence Search System SEQ ID NO: 1-10

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 116144622 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 23 May 2023 (2023-05-23) entire document	1-10
A	CN 113817704 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 21 December 2021 (2021-12-21) description, paragraph [0026]	1-10
A	CN 103484439 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 01 January 2014 (2014-01-01) entire document	1-10
A	WO 0202725 A1 (THE PROCTER & GAMBLE CO. et al.) 10 January 2002 (2002-01-10) entire document	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
 “D” document cited by the applicant in the international application
 “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

18 July 2023

Date of mailing of the international search report

31 July 2023

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District,
Beijing 100088

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/102014

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	柴宝成 等 (CHAI, Baocheng et al.). "环糊精葡萄糖基转移酶182位点定点改造催化合成糖基化染料木素 (Engineering the 182 Site of Cyclodextrin Glucosyltransferase for Glycosylated Genistein Synthesis)" <i>工业生物技术 (Industrial Biotechnology)</i> , Vol. 38, No. 2, 25 February 2022 (2022-02-25), pages 749-759 ISSN: 1000-3061, entire document	1-10
A	RONALD, M. A. K. et al. "Crystal Structure at 2.3 Å Resolution and Revised Nucleotide Sequence of the Thermostable Cyclodextrin Glycosyltransferase from <i>Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes</i> EM1" <i>J. Mol. Biol.</i> , Vol. 256, No. 3, 01 March 1996 (1996-03-01), pages 611-622 ISSN: 0022-2836, entire document	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/102014

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/102014

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	116144622	A	23 May 2023	None			
CN	113817704	A	21 December 2021	None			
CN	103484439	A	01 January 2014	None			
WO	0202725	A1	10 January 2002	CZ	20024166	A3	14 May 2003
				BR	0017277	A	06 May 2003
				AU	6063000	A	14 January 2002
				CA	2412371	A1	10 January 2002
				MXPA	03000119	A	20 January 2004
				HU	0300967	A2	28 July 2003
				JP	2004502831	A	29 January 2004
				EP	1294844	A1	26 March 2003

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2023/102014

A. 主题的分类

C12N9/10(2006.01)i; C12N15/54(2006.01)i; C12N15/70(2006.01)i; C12N1/21(2006.01)i; C12P19/60(2006.01)i; C12P19/18(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)

IPC: C12N9/-; C12N15/-; C12N1/-; C12P19/-

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))

CNXT; CNABS; ENTXT; ENTXTC; VEN; WOTXT; USTXT; EPTXT; JPTXT; KRTXT; CNKI; BING; Web of Science; PubMed; 万方; 百度; 百度学术; 读秀; 环糊精糖基转移酶; 环糊精葡萄糖基转移酶; CGT酶; 突变; 有机溶剂; 二甲基亚砷; 乙醇; 酒精; 甲醇; 丙酮; Cyclodextrin glycosyltransferase; CGTase; EC 2.4.1.19; G539I; Gly539Ile; +539+; R146F; Arg146Phe; +146+; D147N; Asp147Asn; +147+; mutat+; mutant+; organic solvent; DMSO; dimethyl sulfoxide; alcohol; ethanol; methanol; acetone; GenBank; LENS; EMBL; 中国专利生物序列检索系统; SEQ ID NO:1-10

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	CN 116144622 A (江南大学) 2023年5月23日 (2023 - 05 - 23) 全文	1-10
A	CN 113817704 A (江南大学) 2021年12月21日 (2021 - 12 - 21) 说明书第26段	1-10
A	CN 103484439 A (江南大学) 2014年1月1日 (2014 - 01 - 01) 全文	1-10
A	WO 0202725 A1 (PROCTER & GAMBLE et al.) 2002年1月10日 (2002 - 01 - 10) 全文	1-10
A	柴宝成 等. “环糊精葡萄糖基转移酶182位点改造催化合成糖基化染料木素” 《工业生物技术》, 第38卷, 第2期, 2022年2月25日 (2022 - 02 - 25), 第749-759页 ISSN: 1000-3061, 全文	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

“D” 申请人在国际申请中引证的文件

“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

2023年7月18日

国际检索报告邮寄日期

2023年7月31日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

授权官员

吴颖

电话号码 (+86) 028-62968532

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	Ronald M. A. Knegtel et al. "Crystal Structure at 2.3 Å Resolution and Revised Nucleotide Sequence of the Thermostable Cyclodextrin Glycosyltransferase from Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes EM1" 《J. Mol. Biol. 》，第256卷，第3期，1996年3月1日（1996 - 03 - 01），第611-622页 ISSN: 0022-2836, 全文	1-10

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的:

- a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的;
- b. ☐ 为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三. 1(a)),
☐ 附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。

2. ☐ 本报告是在没有收到符合WIPO ST. 26标准的序列表的情况下, 考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 在可进行有意义检索的范围内做出的。

3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/102014

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	116144622	A	2023年5月23日	无			
CN	113817704	A	2021年12月21日	无			
CN	103484439	A	2014年1月1日	无			
WO	0202725	A1	2002年1月10日	CZ	20024166	A3	2003年5月14日
				BR	0017277	A	2003年5月6日
				AU	6063000	A	2002年1月14日
				CA	2412371	A1	2002年1月10日
				MXPA	03000119	A	2004年1月20日
				HU	0300967	A2	2003年7月28日
				JP	2004502831	A	2004年1月29日
				EP	1294844	A1	2003年3月26日