

(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 5 月 19 日 (19.05.2023)

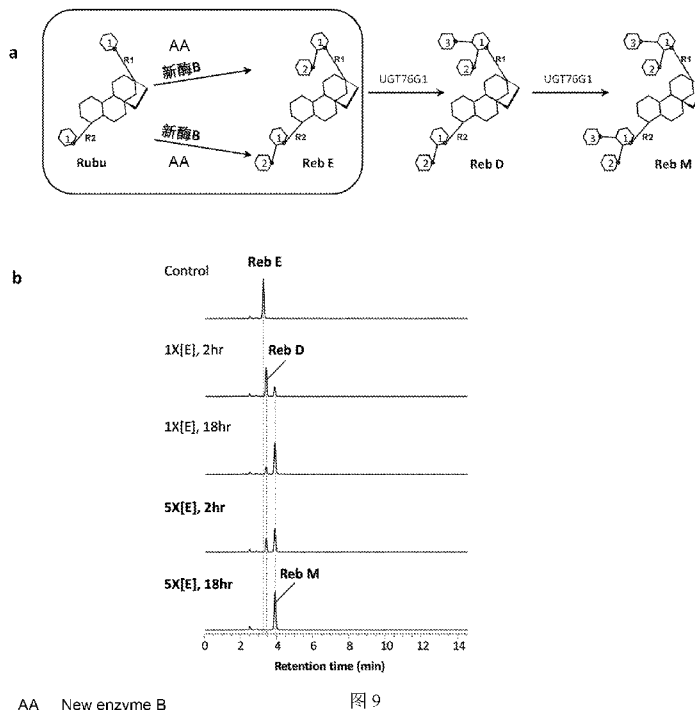


(10) 国际公布号
WO 2023/083359 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12N 9/10 (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) *C12P 33/20* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2022/131774
- (22) 国际申请日: 2022 年 11 月 14 日 (14.11.2022)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
202111350045.8 2021 年 11 月 15 日 (15.11.2021) CN
- (71) 申请人: 四川大学 (SICHUAN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国四川省成都市一环路南一段 24 号, Sichuan 610065 (CN)。
- (72) 发明人: 朱晓峰 (ZHU, Xiaofeng); 中国四川省成都市一环路南一段 24 号四川大学生命科学学院, Sichuan 610065 (CN)。
- (74) 代理人: 成都方圆聿联专利代理事务所 (普通合伙) (CHENGDU FANGYU UNION PATENT AGENCY (GENERAL PARTNERSHIP)); 中国四川省成都市锦江区下东大街段 216 号喜年广场 A 座 2202 室, Sichuan 610000 (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,

(54) Title: GLYCOSYLTRANSFERASE OSUGT91C1 MUTANT AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 糖基转移酶 OsUGT91C1 突变体及其应用



AA New enzyme B

图 9

(57) Abstract: Provided are a glycosyltransferase OsUGT91C1 mutant and the use thereof. An amino acid sequence as shown in SEQ ID NO: 1 is obtained by means of mutating an amino acid at position 208 from Phe to Met on the basis of the amino acid sequence of glycosyltransferase OsUGT91C1; and an amino acid sequence as shown in SEQ ID NO: 2 is obtained by means of mutating an amino acid at position 208 from Phe to Met and mutating an amino acid at position 379 from Phe to Ala on the basis of the amino acid sequence of glycosyltransferase OsUGT91C1, wherein the amino acids at positions 1-14 of the above-mentioned two mutants are

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, 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))。
- 包括说明书序列表部分 (细则5.2(a))。

redundant, and can be completely removed or changed without affecting normal enzyme activity. The mutant has an improved ability of catalyzing the same normal reaction, further removes the disadvantages of side reaction of the original OsUGT91C1 enzyme, and can catalyze the generation of a series of stevioside products including Reb E.

(57) 摘要: 提供了糖基转移酶OsUGT91C1突变体及其应用, SEQ ID No.1所示氨基酸序列是在糖基转移酶OsUGT91C1氨基酸序列的基础上将第208位氨基酸由Phe突变为Met; SEQ ID No.2所示氨基酸序列是在糖基转移酶OsUGT91C1氨基酸序列的基础上将第208位氨基酸由Phe突变为Met, 且第379位氨基酸由Phe突变为Ala, 其中上述两个突变体的第1-14位氨基酸具有冗余性, 可以完全去除或改变而不影响正常酶活性。该突变体, 提高了催化相同正常反应的能力, 进一步去除了OsUGT91C1原始酶所存在的副反应劣势, 可催化生成包括Reb E的一系列甜菊糖苷产物。

糖基转移酶 OsUGT91C1 突变体及其应用

技术领域

本发明属于酶学领域，具体涉及一种糖基转移酶 OsUGT91C1 突变体及其应用。

背景技术

近年来高热量糖的危害逐步得到重视，但由于甜味可刺激产生内源性阿片、多巴胺等奖励性神经递质，使人难于戒除对甜味的依赖。几种量产的人造甜味剂虽可满足热量低的需求，但口感、安全性和心理接受度仍存在争议，难以有效替代传统高热量甜味剂。原产于南美的甜叶菊在当地作为天然甜味来源已有超过百年的历史。2006 年世界卫生组织（WHO）和联合国粮农组织（FAO）联合食品添加剂专用委员会（JECFA）通过了甜菊糖健康无害的安全评价。2008 年美国 FDA 正式批准允许甜菊糖在食品中使用。2011 年甜菊糖取得了欧洲的食品安全局安全性检验证书。随着消费者对低糖、低热量的食品和饮料的需求持续增长，甜菊糖已成为全球使用量增长最快的天然甜味剂之一。

甜菊糖是多种甜菊糖苷的总称。所有甜菊糖苷具有相似的化学结构模式，即在通用的甜菊醇（Steviol，CAS 471-80-7）核心骨架 C13-羟基（为了简化，在附图中也用 R1 代表）和（或）C19-羧基（为了简化，在附图中也用 R2 代表）存在不同的葡萄糖基修饰（图 1 中 a）。根据 C13-羟基和 C19-羧基的糖基组成和糖苷键的组合情况，可对甜菊糖苷分子进行命名，但目前市场上的甜菊糖产品以甜菊苷（Stevioside，CAS 57817-89-7 占比 57%，用 ST 表示）和甜菊糖苷 A（Rebaudioside A，CAS 58543-16-1，含量可达甜菊糖苷的 32%，用 Reb A 表示）为代表，二者存在口感不佳的劣势，影响了甜菊糖苷的市场接受度。研究发现甜菊糖苷 D（Rebaudioside D，CAS 63279-13-0，Reb D 代表）和 M（Rebaudioside M，CAS 1220616-44-3，Reb M 代表）甜度是蔗糖的 200-300 倍，口感非常接近于甜味标准品蔗糖，被认为是甜菊糖苷品质最好的组分，也是甜菊糖苷生产商研发的重点。百事可乐和可口可乐都获得了在饮料中使用甜菊糖苷 D 和 M 的专利。

然而，甜菊糖苷 D 和 M 在天然甜叶菊叶片中的含量低于 1%，难于直接从天然种植的甜叶菊提取。由于含量低，从甜叶菊提取过程繁琐，成本高，限制了口感最好的甜菊糖苷 D 和 M 的市场化应用。研究表明甜叶菊自身缺少在甜菊糖苷的 C19-羧基方向添加 2 号葡萄糖基的催化能力，不能有效合成 Reb D 和 Reb M，导致了二者天然含量低的现象；同时 Reb D 和 Reb M 在 C19-羧基方向的 2 号葡萄糖基，使二者同其他甜菊糖苷相比，口感得以显著提升的原因。因此，利用异源酶促转化的方法弥补甜叶菊催化在甜菊糖苷的 C19-羧基方向添

加 2 号葡萄糖基的能力不足，是规模化制备甜菊糖苷 D 和 M 的解决手段。一种水稻来源的糖基转移酶 OsUGT91C1（也可称为 EUGT11），可催化在甜菊糖苷的 C13-羟基和 C19-羧基方向添加 2 号葡萄糖基（2 号葡萄糖基是与 1 号葡萄糖基形成 β （1-2）糖苷键的葡萄糖基，1 号葡萄糖基特指直接与 C13-羟基或 C19-羧基形成 β -糖苷键的葡萄糖基）（图 1 中 b, c, d）。利用糖基转移酶 OsUGT91C1 在甜菊糖苷的 C13-羟基和 C19-羧基两个方向都可添加 2 号葡萄糖基的能力，弥补甜叶菊自身在甜菊糖苷的 C19-羧基方向添加 2 号葡萄糖基能力的不足，是能否规模化生产甜菊糖苷 D 和 M 的决定因素。通过包含糖基转移酶 OsUGT91C1 的一系列酶促反应，在生物体内（不一定是甜叶菊）或生物体外利用前体物质进行甜菊糖苷的全合成转化，或通过酶促反应对甜叶菊天然提取物，特别是在自然含量较为丰富的甜菊苷（ST）、甜菊糖苷 A（Reb A）或其他可利用的甜菊糖苷分子的特定位置添加葡萄糖基，转化生成甜菊糖苷 D 和 M（Reb D 和 Reb M）。

由于在甜菊糖苷的 C19-羧基方向添加 2 号葡萄糖基是生成 Reb D 和 Reb M 的关键，发明人希望能进一步提高糖基转移酶 OsUGT91C1 在甜菊糖苷 C19-羧基方向催化添加 2 号葡萄糖基（与 1 号葡萄糖基形成 β （1-2）糖苷键）的能力，用于更加高效地转化生成甜菊糖苷 D 和 M。同时，发明人发现糖基转移酶 OsUGT91C1 在催化甜菊糖苷 D、M 酶促转化过程中的特异性不好，除了添加 2 号葡萄糖基外（这是酶促转化生成甜菊糖苷 D、M 所需的反应，称为正常反应），还存在明显的副反应，即在 C13-羟基方向或 C19-羧基方向添加 6 号葡萄糖基（或 4 号葡萄糖基），二者与 1 号葡萄糖基形成 β （1-6）糖苷键（或 β （1-4）糖苷键）（本专利提及的副反应均指添加 6 号葡萄糖基（或 4 号葡萄糖基）的反应）（图 1 中 b, c, d）。副反应将浪费酶催化资源和底物，形成明显的副产物，既影响了甜菊糖苷 D 和 M 的生成效率，还带来杂质，给获得高品质甜菊糖苷 D、M 纯品带来很大困难。

发明内容

本发明所要解决的技术问题为：如何提高糖基转移酶 OsUGT91C1 在催化甜菊糖苷的 C13-羟基或/和 C19-羧基方向添加 2 号葡萄糖基的能力，另一方面，在提高催化能力的前提下消除副反应。

基于发明人独立发现的糖基转移酶 OsUGT91C1 三维空间结构，理性优化糖基转移酶 OsUGT91C1 原有氨基酸序列，发明人将第 208 位的苯丙氨酸改为甲硫氨酸(Phe208Met)，得到新酶 A。通过大肠杆菌蛋白表达系统，纯化制备新酶 A，实施例验证新酶 A 可增强糖基转移酶 OsUGT91C1 在 C13-羟基，特别是在 C19-羧基位添加 2 号葡萄糖基的能力。

经前期研究发现，通过改变糖基转移酶 OsUGT91C1 第 379 位的苯丙氨酸为丙氨酸

(Phe379Ala)，可完全消除副反应。发明人综合新酶 A (Phe208Met) 催化能力得到增强的特点，组合 Phe208Met 和 Phe379Ala 两个位点的氨基酸改变，成功构建了一个既消除副反应又能增强目标催化能力（添加 2 号葡萄糖基）的新酶 B (Phe208Met/Phe379Ala)。验证了新酶 B (Phe208Met/Phe379Ala) 既消除了添加 6 号葡萄糖基（形成 β (1-6) 糖苷键）的副反应，又对添加 2 号葡萄糖基的正常反应有约 3-7 倍的增强作用，可更高效和更加专一地参与甜菊糖苷的酶促转化。

进一步地研究发现，在上述突变的基础上，删除或改变糖基转移酶 OsUGT91C1 前端 1-14 个氨基酸 (MDSGYSSSYAAAAG) 均不影响突变后的酶性质。说明前端的 14 个氨基酸具有冗余性，可以完全去除或改变。

本发明的技术方案为：糖基转移酶 OsUGT91C1 突变体，其氨基酸序列为以下 a、b、c、d 中的任一种：

- a、SEQ ID No.1 所示；
- b、SEQ ID No.2 所示；
- c、SEQ ID No.1 所示氨基酸序列的基础上任意删除或改变第 1-14 位氨基酸；
- d、SEQ ID No.2 所示氨基酸序列的基础上任意删除或改变第 1-14 位氨基酸。

SEQ ID No.1 所示氨基酸序列是在糖基转移酶 OsUGT91C1 氨基酸序列的基础上将第 208 位氨基酸由 Phe 突变为 Met；SEQ ID No.2 所示氨基酸序列是在糖基转移酶 OsUGT91C1 氨基酸序列的基础上将第 208 位氨基酸由 Phe 突变为 Met，且第 379 位氨基酸由 Phe 突变为 Ala。

一种表达基因，编码上述所述的糖基转移酶 OsUGT91C1 突变体。

一种表达载体，含有上述所述表达基因。

携带上述所述表达载体的重组菌或细胞。

上述所述的糖基转移酶 OsUGT91C1 突变体在甜菊糖苷 D 或 M 及其他甜菊糖苷分子的酶促合成或转化过程的用途。

进一步地，所述糖基转移酶 OsUGT91C1 突变体在甜菊糖苷 D 或 M 及其他甜菊糖苷分子的酶促合成或转化过程是指在甜菊糖苷的 C13-羟基或/和 C19-羧基方向添加 2 号葡萄糖基，所述 2 号葡萄糖基是与 1 号葡萄糖基形成 β (1-2) 糖苷键的葡萄糖基，1 号葡萄糖基特指直接与 C13-羟基或 C19-羧基形成 β -糖苷键的葡萄糖基。

催化在 C13-羟基或 C-19 羧基方向添加 2 号葡萄糖基的正常反应的底物不唯一，包括但不限于，Rubi (Rubusoside, CAS 64849-39-4)、S13G (Steviol-13-O-monoglucoside, CAS

60129-60-4) 及 Reb A (Rebaudioside A, CAS 58543-16-1) 等甜菊糖苷底物, 只要在 C13-羟基或 C-19 羧基方向存在 1 号葡萄糖基, 但不存在 3 号葡萄糖基, 就可发生在 C13-羟基或 C-19 羧基方向添加 2 号葡萄糖基的正常反应。

除了可在大肠杆菌中表达、纯化、制备天然状态 OsUGT91C1 或本发明的两个新酶, 还可在其他生物系统、非生物系统、细胞、非细胞 (Cell-free) 等其他表达体系中进行表达和制备; 将这些消除了副反应的新酶, 通过转基因或其他基因导入手段, 引入生物体、非生物体、细胞、非细胞 (cell-free) 进行甜菊糖苷的酶促转化, 以及在酶、酶固定化等体外体系, 用于在甜菊糖苷添加 2 号葡萄糖基的酶促转化, 包括制备但不限于甜菊糖苷 D 和 M 的酶促转化过程, 达到消除副反应的目的。

本专利的副反应定义为, 在甜菊醇或甜菊糖苷的 C13-羟基, C19-羧基两个方向添加 6 号葡萄糖基 (或 4 号葡萄糖基), 与 1 号葡萄糖基形成 β (1-6) 糖苷键 (或 β (1-4) 糖苷键) 的副反应; 本专利的正常反应的定义是在甜菊醇或甜菊糖苷的 C13-羟基, C19-羧基两个方向添加 2 号葡萄糖基, 与 1 号葡萄糖基形成 β (1-2) 糖苷键的反应。

利用了液相色谱-质谱联用验证了新酶 A (Phe208Met) 增强了催化添加 2 号葡萄糖基, 特别是在 C19-羧基位添加 2 号葡萄糖基的能力。新酶 B (Phe208Met/Phe379Ala) 在增强添加 2 号葡萄糖基能力的同时, 无副反应的出现。通过液相色谱-质谱联用、荧光转化法等方法测定了两个新酶催化反应的米氏动力学参数, 验证了新酶 B (Phe208Met/Phe379Ala) 既消除了添加 6 号葡萄糖基 (形成 β (1-6) 糖苷键) 的副反应, 又对添加 2 号葡萄糖基的正常反应有约 3-7 倍的增强作用, 可更高效和更加专一地参与甜菊糖苷的酶促转化。新酶 B 催化酶促转化, 得到的添加了 2 号葡萄糖基的正常产物不含副产物, 可用于合成甜菊糖苷 D 和 M。

与现有技术相比, 本发明具有以下有益效果:

本发明解决了水稻来源的糖基转移酶 OsUGT91C1 在甜菊糖苷转化中的酶学缺陷, 同时显著提升了对目标催化反应的催化能力。新酶 B (Phe208Met/Phe379Ala) 可更为高效和专一地完成对甜菊糖苷添加 2 号葡萄糖基的正常酶促反应, 用于转化获得高品质、高纯度的健康甜味剂甜菊糖苷 D 和 M。

附图说明

图 1 与本专利相关的部分甜菊糖苷结构, 结构的简化表示及 OsUGT91C1 酶促转化生成甜菊糖苷 D 和 M 过程中正常反应和副反应的示意图

a 部分甜菊糖苷的结构, 包括甜菊醇、甜菊糖苷 D 和 M 的结构及结构的简化形式。甜

菊醇用完整的化学结构表示，甜菊糖苷 D 和 M 用完整的化学结构和简化图两种方法表示，括号内为二者相比于蔗糖的甜度倍数。简化图中 C13-羟基（用 R1 简化表示），C19-羧基（用 R2 简化表示）。葡萄糖基用六边形表示，每个葡萄糖的 1-羟基用黑点标注，每个葡萄糖中间的数字代表是几号葡萄糖基，同时也表示该葡萄糖基与 1 号葡萄糖基形成的糖苷键的类型，如 2 代表 β (1-2) 糖苷键，3 代表 β (1-3) 糖苷键，4 代表 β (1-4) 糖苷键，6 代表 β (1-6) 糖苷键。

b OsUGT91C1 在甜菊糖苷底物 C13-羟基（用 R1 简化表示）或（和）C19-羧基（用 R2 简化表示）两端催化添加 2 号葡萄糖基正常反应及添加 6 号葡萄糖基（或 4 号葡萄糖基）副反应的示意图。

c OsUGT91C1 在甜菊糖苷底物 C13-羟基（用 R1 简化表示）催化添加 2 号葡萄糖基正常反应及添加 6 号葡萄糖基（或 4 号葡萄糖基）副反应的示意图。

d OsUGT91C1 在甜菊糖苷底物 C19-羧基（用 R2 简化表示）催化添加 2 号葡萄糖基正常反应及添加 6 号葡萄糖基（或 4 号葡萄糖基）副反应的示意图。

图 2 新酶 A (Phe208Met)、天然状态 OsUGT91C1、新酶 B (Phe208Met/Phe379Ala) SDS-PAGE 分析

a 新酶 A (Phe208Met) 的 SDS-PAGE 分析。M, Marker; 1, 诱导后样品; 2, 菌体裂解液; 3, 菌体裂解液上清; 4, 菌体裂解液沉淀; 5, Ni 柱流穿样品; 6-12, Ni 柱洗脱蛋白样品。

b 天然状态 OsUGT91C1 和新酶 B (Phe208Met/Phe379Ala) 的 SDS-PAGE 分析。M, Marker; WT, 天然状态 OsUGT91C1; 2, Q 柱流穿样品; 3-7, Q 柱洗脱蛋白样品。两个图右侧箭头表示目的蛋白条带的位置。

图 3 天然状态 OsUGT91C1 和新酶 A (Phe208Met) 催化在底物 Rubu 的 C13-羟基 (R1) 和 C19-羧基 (R2) 两端添加 2 号葡萄糖基，形成 β (1-2) 糖苷键正常酶促反应的对比

a, b 天然状态 OsUGT91C1、新酶 A (Phe208Met) 与 Rubu 反应的液相分析。液相图从上至下的反应条件依次为：加 0.25 mg/mL 酶反应 0 小时作为对照，0.05 mg/mL 酶反应 2 小时和 18 小时，0.25 mg/mL 酶反应 2 小时和 18 小时。显示天然状态的 OsUGT91C1 在 Rubu 的 C13-羟基 (R1) 和 C19-羧基 (R2) 端分别添加 2 号葡萄糖基的产物随时间和酶量的增加而增多，新酶 A (Phe208Met) 同样可在底物 Rubu 的 C13-羟基、C19-羧基两个方向添加 2 号葡萄糖基，而且可催化得到更多的在 C19-羧基方向添加 2 号葡萄糖基的产物，具有增强的在 C19-羧基方向的目标催化能力，最终得到在 C13-羟基和 C19-羧基两个方向都加有 2 号

葡萄糖基的产物 Reb E 也多于天然状态的 OsUGT91C1；c, d 天然状态 OsUGT91C1 和新酶 A (Phe208Met) 催化底物 Rubu 的 C13-羟基 (R1) 和 C19-羧基 (R2) 端分别添加 2 号葡萄糖基, 生成 Reb E 的反应示意图, 新酶 A (Phe208Met) 显示具有在 C19-羧基方向增强的目标催化能力。

图 4 天然状态 OsUGT91C1 和新酶 A (Phe208Met) 催化在底物 Reb A 的 C19-羧基 (R2) 端添加 2 号葡萄糖基, 形成 β (1-2)糖苷键正常酶促反应的对比

a, b 天然状态 OsUGT91C1、新酶 A (Phe208Met) 与 Reb A 反应的液相分析。液相图从上至下的反应条件依次为: 加 0.25 mg/mL 酶反应 0 小时作为对照, 0.05 mg/mL 酶反应 2 小时和 18 小时, 0.25 mg/mL 酶反应 2 小时和 18 小时。显示天然状态的 OsUGT91C1 在 Reb A 的 C19-羧基 (R2) 端添加 2 号葡萄糖基, 生成产物 Reb D 随时间和酶量的增加而增多, 而新酶 A (Phe208Met) 可明显率先将底物 Reb A 完全消耗并生成目标产物 Reb D, 具有增强的在 C19-羧基方向的目标催化能力; **c, d** 天然状态 OsUGT91C1 和新酶 A (Phe208Met) 催化底物 Reb A 的 C19-羧基 (R2) 端添加 2 号葡萄糖基, 生成 Reb D 的反应示意图, 新酶 A (Phe208Met) 该反应得到增强。

图 5 天然状态 OsUGT91C1 和新酶 B (Phe208Met/Phe379Ala) 在底物 STB 的 C13-羟基 (R1) 端添加 6 号 (或 4 号) 葡萄糖基副反应的情况对比

天然状态的 OsUGT91C1 (**a**)、新酶 B (Phe208Met/Phe379Ala) (**b**) 与底物 STB 反应的液相分析。液相图从上至下的反应条件依次为: 加 0.75 mg/mL 酶反应 0 小时作为对照, 0.15 mg/mL 酶反应 2 小时和 18 小时, 0.75 mg/mL 酶反应 2 小时和 18 小时。显示天然状态的 OsUGT91C1 副反应产物随时间和酶量的增加而增多, 而新酶 B (Phe208Met/Phe379Ala) 无副反应产物的生成。a 液相图下方为 OsUGT91C1 催化 STB 反应生成副产物的示意图, b 液相图下方为新酶 B 催化 STB 反应示意图, 无副产物生成, 无副反应的发生。

图 6 天然状态 OsUGT91C1 和新酶 B (Phe208Met/Phe379Ala) 催化在底物 S13G 的 C13-羟基 (R1) 端添加 2 号葡萄糖基, 形成 β (1-2)糖苷键正常酶促反应, 以及随后发生添加 6 号 (或 4 号) 葡萄糖基副反应的情况对比

天然状态的 OsUGT91C1 (**a**)、新酶 B (Phe208Met/Phe379Ala) (**b**) 与底物 S13G 反应的液相分析。液相图从上至下的反应条件依次为: 加 0.75 mg/mL 酶反应 0 小时作为对照, 0.15 mg/mL 酶反应 2 小时和 18 小时, 0.75 mg/mL 酶反应 2 小时和 18 小时。显示天然状态的 OsUGT91C1 先催化在底物 S13G 的 C13-羟基 (R1) 端添加 2 号葡萄糖基的正常酶促反应生成 STB, 然后在 STB 发生副反应, 添加 6 号 (或 4 号) 葡萄糖基, 生成副产物; 与之相

反, 新酶 B (Phe208Met/Phe379Ala) 只催化在底物 S13G 的 C13-羟基 (R1) 端添加 2 号葡萄糖基的正常反应生成 STB, 不催化副反应, 无副产物生成; a 液相图下方为天然状态 OsUGT91C1 催化 S13G 先催化正常反应生成 STB, 然后催化副反应产生副产物的示意图, b 液相图下方为新酶 B (Phe208Met/Phe379Ala) 只催化 S13G 正常反应生成 STB, 不生成副产物的示意图。

图 7 天然状态 OsUGT91C1 和新酶 B (Phe208Met/Phe379Ala) 催化在底物 Rubu 的 C13-羟基 (R1) 端和 C19-羧基 (R2) 端添加 2 号葡萄糖基, 形成 β (1-2)糖苷键正常酶促反应的对比

a, b 天然状态 OsUGT91C1、新酶 B (Phe208Met/Phe379Ala) 与 Rubu 反应的液相分析。液相图从上至下的反应条件依次为: 加 0.25 mg/mL 酶反应 0 小时作为对照, 0.05 mg/mL 酶反应 2 小时和 18 小时, 0.25 mg/mL 酶反应 2 小时和 18 小时。显示天然状态的 OsUGT91C1 在 Rubu 的 C13-羟基 (R1) 和 C19-羧基 (R2) 端分别添加 2 号葡萄糖基的产物随时间和酶量的增加而增多, 而新酶 B (Phe208Met/Phe379Ala) 可催化得到更多的在 C19-羧基方向添加 2 号葡萄糖基的产物, 具有增强的在 C19-羧基方向的目标催化能力, 而且最终得到在 C13-羟基和 C19-羧基两个方向都加有 2 号葡萄糖基的产物 Reb E 也多于天然状态的 OsUGT91C1; **c, d** 天然状态 OsUGT91C1 和新酶 B (Phe208Met/Phe379Ala) 催化底物 Rubu 的 C13-羟基 (R1) 和 C19-羧基 (R2) 端分别添加 2 号葡萄糖基, 生成 Reb E 的反应示意图, 新酶 B (Phe208Met/Phe379Ala) 显示具有更高的目标催化能力。

图 8 天然状态 OsUGT91C1 和新酶 B (Phe208Met/Phe379Ala) 催化在底物 Reb A 的 C19-羧基 (R2) 端添加 2 号葡萄糖基, 形成 β (1-2)糖苷键, 生成 Reb D 的正常酶促反应的对比

a, b 天然状态 OsUGT91C1、新酶 B (Phe208Met/Phe379Ala) 与 Reb A 反应的液相分析。液相图从上至下的反应条件依次为: 加 0.25 mg/mL 酶反应 0 小时作为对照, 0.05 mg/mL 酶反应 2 小时和 18 小时, 0.25 mg/mL 酶反应 2 小时和 18 小时。显示天然状态的 OsUGT91C1 在 Reb A 的 C19-羧基 (R2) 端添加 2 号葡萄糖基, 生成产物 Reb D 随时间和酶量的增加而增多, 而新酶 B (Phe208Met/Phe379Ala) 可明显率先将底物反应完全, 具有增强的在 C19-羧基方向的目标催化能力; **c, d** 天然状态 OsUGT91C1 和新酶 B (Phe208Met/Phe379Ala) 催化底物 Reb A 的 C19-羧基 (R2) 端添加 2 号葡萄糖基, 生成 Reb D 的反应示意图, 其中新酶 B (Phe208Met/Phe379Ala) 的该反应得到增强。

图 9 利用新酶 B (Phe208Met/Phe379Ala) 催化获得的甜菊糖苷底物 Reb E (不产生副

产物), 通过糖基转移酶 UGT76G1 在 C13-羟基或 (和) C-19 羧基方向继续添加 3 号葡萄糖基, 获得甜菊糖苷 D 和 M

a, 以新酶 B (Phe208Met/Phe379Ala) 催化获得的甜菊糖苷底物 Reb E (不产生副产物) 的基础上, 再利用糖基转移酶 UGT76G1 转化形成 Reb D 和 Reb M 的反应示意图。方框显示两个新酶不发生副反应, 只在 C13-羟基或 (和) C-19 羧基方向正常添加 2 号葡萄糖基, 形成甜菊糖苷 E (Reb E); 然后糖基转移酶 UGT76G1 接力, 继续催化在 C13-羟基或 (和) C-19 羧基方向添加 3 号葡萄糖基, 形成甜菊糖苷 D 和 M (Reb D 和 Reb M) 的过程。b, 利用新酶 B (Phe208Met/Phe379Ala) 催化获得的甜菊糖苷底物 Reb E (不产生副产物), 进一步利用糖基转移酶 UGT76G1 催化从 Reb E 到 Reb D 和 Reb M 的转化过程。在液相图从上至下的反应条件依次为: 加 0.03 mg/mL 的糖基转移酶 UGT76G1 反应 0 小时作为对照, 0.03 mg/mL 糖基转移酶 UGT76G1 反应 2 小时和 18 小时, 0.15 mg/mL 糖基转移酶 UGT76G1 反应 2 小时和 18 小时。

图 10 新酶 B (Phe208Met/Phe379Ala) 去除第 1-14 位氨基酸后的截短体的 SDS-PAGE 分析;

新酶 B (Phe208Met/Phe379Ala) 和新酶 B 去除第 1-14 位氨基酸后的截短体的 SDS-PAGE 比较分析。M, Marker; 1, 新酶 B; 2, 新酶 B 的截短体从 Q 柱流穿的样品; 3-8, 新酶 B 的截短体从 Q 柱洗脱的样品

图 11 天然状态 OsUGT91C1、新酶 B 去除第 1-14 位氨基酸后的截短体催化在底物 Rubu 的 C13-羟基 (R1) 和 (或) C19-羧基 (R2) 端分别添加 2 号葡萄糖基, 形成 β (1-2) 糖苷键正常酶促反应的对比;

天然状态的 OsUGT91C1 (a)、新酶 B 去除第 1-14 位氨基酸后的截短体 (b) 与 Rubu 反应的液相分析比较。液相图从上至下的反应条件依次为: 加 0.25 mg/mL 酶反应 0 小时作为对照, 0.05 mg/mL 酶反应 2 小时和 18 小时, 0.25 mg/mL 酶反应 2 小时和 18 小时。显示天然状态的 OsUGT91C1 在 Rubu 的 C13-羟基 (R1) 和 C19-羧基 (R2) 端分别添加 2 号葡萄糖基的产物随时间和酶量的增加而增多, 而新酶 B 截短体具有同样的酶促催化反应, 且同新酶 B 一样, 具有比天然状态 OsUGT91C1 更好的催化能力。c, 天然状态 OsUGT91C1 和新酶 B 截短体可进行同样催化在底物 Rubu 的 C13-羟基 (R1) 和 C19-羧基 (R2) 端分别添加 2 号葡萄糖基的正常目标反应, 生成 Reb E 的反应示意图, 进一步验证第 1-14 位氨基酸的冗余性, 可以完全去除或改变。

具体实施方式

下述实施例中的实验方法，如无特殊说明，均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料，如无特殊说明，均为从商业渠道购买得到的。

一、天然状态 OsUGT91C1 蛋白表达载体的构建

(1) 获取 OsUGT91C1 的氨基酸序列 (NCBI Reference Sequence: XP_015629141.1)，根据蛋白表达系统的要求对 OsUGT91C1 编码密码子进行优化和合成。发明人根据大肠杆菌的表达体系优化后的编码密码子如下。由于密码子的兼并性，密码子优化的选择可有多种。

为了防止通过替换 OsUGT91C1 的非重要氨基酸序列，达到规避本专利权利要求的目的，本专利认为只要翻译后的蛋白氨基酸序列和 OsUGT91C1 的氨基酸序列相同度在 50%及以上，则认为属于 OsUGT91C1。

不管是在 OsUGT91C1 的氨基酸序列还是空间结构上，通过改变同 208 和 379 位氨基酸等效的位点或其他位点（由于氨基酸冗余性的原因，通过去除第 1-14 位的一个或任意个氨基酸，导致第 208 和 379 位氨基酸不一定一直是第 208 和 379 位的编号），达到提升 OsUGT91C1 添加 2 号葡萄糖基的正常反应或（和）消除 OsUGT91C1 副反应的目的，都属于本专利的权利要求。

OsUGT91C1 的氨基酸序列（加粗的氨基酸是本专利进行改动的氨基酸位点，划线部分是人为添加的氨基酸序列，其中 LE 是为了方便连接进入大肠杆菌表达载体 pET21b，HHHHHH（6 个组氨酸标签）是为了方便后期的纯化）：

MDSGYSSSYAAAAGMHVVICPWLAFGHLLPCLDLAQRLASRGHRVSFVSTPRNISRLP
PVRPALAPLVAFAVALPLPRVEGLPDGAESTNDVPHDRPDMVELHRRAFDGLAAPFSEFLGTA
CADWVIVDVFHFWAAAAALEHKVPCAMMLLGSAHMIASADRRLERAETESPAAAGQGR
PAAAPTFEVARMKLIRTKGSSGMSLAER**F**SLTLSSSLVVGRSCVEFEPETVPLLSTLRGKPI
TFLGLMPPLHEGRREDGEDATVRWLDAQPAKSVVYVALGSEVPLGVEKVHELALGLELAG
TRFLWALRKPTGVSDADLLPAGFEERTRGRGVVATRWVPQMSILAHAAVGAFLTHCGWNS
TIEGLMFGHPLIMLP**I**FGDQGPNARLIEAKNAGLQVARNDGDGSFDREGVAAAIRAVAVEEE
SSKVFQAKAKKLQEIVADMACHERYIDGFIQQLRSYKDLEHHHHHHH

OsUGT91C1 密码子优化后的核苷酸序列（划线序列为上述人为添加氨基酸序列的编码区）：

atgGATAGCGGTTATAGTAGCAGTTATGCCGCAGCCGCCGGCATGCATGTTGTGATTT
GCCCCGTGGCTGGCCTTTGGTCATCTGCTGCCGTGCTTAGACCTGGCCCAGCGTCTGGCC
AGCCGTGGTCACCGTGTTAGCTTTGTGAGCACCCCGCGTAATATCAGCCGTCTGCCGCC
GGTTCGTCCGGCATTAGCCCCGCTGGTGGCATTGTGGCCTTACCGCTGCCGCGTGTTGA

GGGTCTGCCTGATGGCGCCGAAAGTACCAACGACGTGCCGCATGACCGCCCGGATATGG
TGGAGCTGCATCGTCGCGCCTTTGATGGTCTGGCAGCCCCGTTTAGCGAGTTTCTGGGC
ACAGCCTGCGCCGATTGGGTGATCGTTGACGTGTTTCATCACTGGGCAGCCGCAGCCGC
CCTGGAACATAAAGTTCCGTGCGCAATGATGCTGCTGGGTAGCGCCCACATGATTGCCA
GCATTGCCGATCGTCGCCTGGAACGCGCAGAGACCGAAAGCCCGGCAGCAGCAGGTCA
AGGTCGTCCTGCCGCAGCCCCGACCTTTGAAGTGGCCCGCATGAAACTGATCCGTACCA
AAGGTAGTAGCGGCATGAGCCTGGCCGAACGCTTTAGCCTGACCCTGAGCCGCAGTAGC
CTGGTGGTTGGTCGCGAGTTGTGTGGAATTCGAGCCGGAAACAGTGCCGCTGCTGAGCA
CCCTGCGCGGCAAACCGATCACCTTTCTGGGCCTGATGCCGCCGTTACATGAAGGCCGT
CGTGAAGATGGTGAAGATGCCACAGTGCGTTGGCTGGATGCACAGCCGGCCAAAAGCG
TTGTGTACGTTGCCCTGGGTAGCGAAGTTCCTCTGGGTGTGGAAAAGGTGCACGAACTG
GCACTGGGTCTGGAAGTGGCCGGTACCCGCTTCCTGTGGGCCTTACGTAAACCTACCGG
TGTTAGCGATGCCGATCTGCTGCCGGCAGGTTTTGAGGAACGTACCCGTGGTCGCGGTG
TTGTGGCAACACGCTGGGTTCGCGAGATGAGCATTCTGGCCCATGCCGCCGTGGGTGCC
TTTCTGACCCATTGTGGCTGGAATAGCACCATCGAAGGCCTGATGTTTCGGCCATCCTCTG
ATCATGCTGCCTATCTTCGGTGATCAGGGTCCGAACGCACGCCTGATTGAAGCAAAGAA
TGCCGGTCTGCAGGTGGCACGTAACGATGGCGACGGTAGCTTCGATCGTGAAGGCGTTG
CCGCCGCAATTGCGCGCCGTTGCAGTTGAAGAAGAGAGCAGCAAGGTGTTCCAGGCCAA
AGCCAAAAAACTGCAGGAGATCGTGGCCGATATGGCATGCCATGAGCGCTACATCGATG
GCTTCATCCAGCAGCTGCGCAGCTATAAAGATctcgagcaccaccaccaccaccac

(2) 对合成得到的 OsUGT91C1 编码区用表 1 所列的引物进行扩增，扩增片段的 5'和 3'端将分别带上 Nde I 和 Xho I 的限制酶位点。

表 1 pET21b-OsUGT91C1 的引物序列

引物名称	引物序列 (5'-3')
OsUGT91C1-F	GAAGGAGATATACATATGGATAGCGGTTATAG
OsUGT91C1-R	TGGTGGTGGTGGTGTCTCGAGATCTTTATAGCTG

(3) 用 Nde I 和 Xho I 对 pET21b 表达载体和步骤 2 的 OsUGT91C1 编码区扩增片段进行双酶切，将 OsUGT91C1 编码区用 T4 连接酶连接进 pET21b 载体的 Nde I 和 Xho I 酶切位点之间，组成在大肠杆菌可表达糖基转移酶 OsUGT91C1 的表达载体 pET21b-OsUGT91C1。

(4) 将连接产物全部转入 100 μ L *E.coli* DH5 α 感受态细胞中，挑取平板上的阳性单克隆菌落接种于 10 mL 的 LB 培养基中，200 rpm 37 $^{\circ}$ C 培养 12-16 小时后提取质粒，测序验证

表达质粒的正确性，完成天然状态 OsUGT91C1 糖基转移酶表达载体的构建。

二、为了增强添加 2 号葡萄糖基的正常反应，构建新酶 A (Phe208Met) 的表达载体；为了既提升酶促添加 2 号葡萄糖基的目标催化活性，又消除副反应，构建新酶 B (Phe208Met/Phe379Ala) 的表达载体

1、新酶 A (Phe208Met) 表达载体的构建

(1) 以天然状态 pET21b-OsUGT91C1 为模板，设计新酶 A (Phe208Met) 和新酶 B (Phe208Met/Phe379Ala) 所使用的定点突变引物如表 2。

表 2 突变体引物序列如下：(下划线部分表示突变位点)

引物名称	引物序列 (5'-3')
OsUGT91C1-Phe208Met-F	TGAGCCTGGCCGAACGCATGAGCCTGACCCTGAGC
OsUGT91C1-Phe208Met-R	GCTCAGGGTCAGGCTCATGCGTTCGGCCAGGCTCA
OsUGT91C1-Phe379Ala-F	CGTTCGGACCCTGATCACCGGCGATAGGCAGCATGATCAGA
OsUGT91C1-Phe379Ala-R	CTGATCATGCTGCCTATCGCCGGTGATCAGGGTCCGAACG

(2) 用 ddH₂O 溶解表 2 的引物，稀释引物浓度为 10 μM。用 Phe208Met 的一对突变引物以 pET21b-OsUGT91C1 为模板进行 PCR 扩增，体系同为：dNTP 4 μL，5×PS buffer 10 μL，上下游引物各 2 μL，模板 1 μL (约 10 ng)，PCR 扩增酶 Primer star 0.5 μL，剩余用 ddH₂O 补齐至 50 μL。混匀后用 PCR 扩增，扩增程序：98 °C 预变性 2 min，98 °C 变性 30 s，69 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 8 min，扩增 20 个循环，72 °C 再延伸 10min，最后 4 °C 保存。

(3) 从上述扩增产物取出 10 μL 进行琼脂糖胶验证 PCR 的扩增效果，剩余的 40 μL 体系里各加 1 μL DpnI 酶，37 °C 孵育 1-2 小时后取 10 μL 分别转入 100 μL *E.coli* DH5α 感受态细胞中，冰浴 30 min，42 °C 热激 2 min，再冰浴 3 min 后加入新鲜 LB 300 μL，200 rpm 37 °C 摇床孵育 1 小时后，分别取 150 μL 均匀涂布于 Amp 抗性的固体 LB 平板上，37 °C 静置培养过夜。

(4) 挑取两个平板上的单克隆菌落接种于 10 mL 的 LB 培养基中，200 rpm 37 °C 培养 12-16 小时后提取质粒，DNA 测序验证突变位点 Phe208Met 的正确性，编码的氨基酸序列如 SEQ ID No.1 所示。

2、新酶 B (Phe208Met/Phe379Ala) 表达载体的构建

(1) 获得上述 2.2.2.1 第 4 步经过测序验证的新酶 A (Phe208Met) 的表达载体为模板，进行新酶 B (Phe208Met/Phe379Ala) 表达载体的构建；

(2) 用 ddH₂O 溶解表 2 的引物，稀释引物浓度为 10 μM。用 Phe379Ala 的一对突变引物以新酶 A (Phe208Met) 的表达载体为模板进行 PCR 扩增，体系同上：dNTP 4 μL，5×PS

buffer 10 μL , 上下游引物各 2 μL , 模板 1 μL (约 10 ng), PCR 扩增酶 Primer star 0.5 μL , 剩余用 ddH₂O 补齐至 50 μL 。混匀后用 PCR 扩增, 扩增程序: 98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min, 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 8 min, 扩增 20 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸 10min, 最后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

(3) 从上述扩增产物取出 10 μL 进行琼脂糖胶验证 PCR 的扩增效果, 剩余的 40 μL 体系里各加 1 μL DpnI 酶, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1-2 小时后取 10 μL 分别转入 100 μL *E.coli* DH5 α 感受态细胞中, 冰浴 30 min, 42 $^{\circ}\text{C}$ 热激 2 min, 再冰浴 3 min 后加入新鲜 LB 300 μL , 200 rpm 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育 1 小时后, 分别取 150 μL 均匀涂布于 Amp 抗性的固体 LB 平板上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养过夜。

(4) 挑取两个平板上的单克隆菌落接种于 10 mL 的 LB 培养基中, 200 rpm 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12-16 小时后提取质粒, DNA 测序验证两个突变位点 Phe208Met 和 Phe379Ala 的正确性, 编码的氨基酸序列如 SEQ ID No.2 所示。

三、天然状态 OsUGT91C1 和新酶 A, 新酶 B 的诱导表达和纯化

(1) 将上述三种酶对应的表达质粒转化至 *E.coli* BL21(DE3)表达菌株, 第二天挑取单克隆接种于 10 mL 新鲜的 LB 培养基中, 200 rpm 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜后加入终浓度为 8 % 的甘油保种, 该菌种可在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 长期保存。

(2) 挑取上一步保存的 *E.coli* BL21(DE3)甘油菌接种于含 Amp 50 $\mu\text{g/mL}$ 的 100 mL 新鲜 LB 培养基中, 200 rpm 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养。第二天以 1% 的接种比例接种于含 Amp 50 $\mu\text{g/mL}$ 的 1 L 新鲜 LB 培养基, 180 rpm 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至 OD₆₀₀ = 1.0 后, 菌液降温至 16 $^{\circ}\text{C}$, 添加终浓度为 0.5 mM 的 IPTG, 160 rpm 16 $^{\circ}\text{C}$ - 20 $^{\circ}\text{C}$ 诱导表达 18 小时。

(3) 完成诱导表达后, 4000 rpm 离心 15 min 弃上清, 收集菌体。菌体用重悬缓冲液 (20 mM Tris-HCl buffer pH 7.8, 0.5 M NaCl, 30 mM imidazole) 重悬后, 用高压破碎仪在 1000 bar 压力下反复破碎 3 次。13500 rpm 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 60 min, 离心后的上清上样到 NTA-Ni 柱, 用上述重悬缓冲液洗去非特异性结合的杂蛋白, 带组氨酸标签的目的蛋白可被洗脱缓冲液 (20 mM Tris-HCl buffer pH 7.8, 0.5 M NaCl, 250 mM imidazole) 洗脱下来。洗脱下来的蛋白进一步置换到 20 mM HEPES buffer pH 7.2, 50 mM NaCl 里, 经液氮速冻后, 可长期保存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 。上述步骤可纯化得到天然状态的 OsUGT91C1、新酶 A、新酶 B, 并通过 SDS-PAGE 检测纯度 (图 2)。

四、新酶 A (Phe208Met) 和新酶 B (Phe208Met/Phe379Ala) 的酶活性测定

1、酶促产物分析, 表明新酶 A (Phe208Met) 提升了在 C13-羟基, 特别是 C19-羧基方

向添加 2 号葡萄糖基（与 1 号葡萄糖基形成 β (1-2) 糖苷键）的催化能力

(1) 以 OsUGT91C1 的底物 Rubu (Rubusoside, CAS 64849-39-4) 为实施例, 天然状态的 OsUGT91C1 可在底物 Rubu 的 C13-羟基、C19-羧基两个方向添加 2 号葡萄糖基（与 1 号葡萄糖基形成 β (1-2)糖苷键）（正常反应）（图 3 中 a），而新酶 A (Phe208Met) 同样可在底物 Rubu 的 C13-羟基、C19-羧基两个方向添加 2 号葡萄糖基，而且可催化得到更多的在 C19-羧基方向添加 2 号葡萄糖基的产物，具有增强的在 C19-羧基方向的目标催化能力，最终得到在 C13-羟基和 C19-羧基两个方向都加有 2 号葡萄糖基的产物 Reb E (Rebaudioside E, CAS 63279-14-1) 也多于天然状态的 OsUGT91C1（图 3 中 b）。

实施例的反应体系如下：在 20 °C - 40 °C，200 μ L 反应体系包括：1 mM UDP-Glucose, 20 mM Tris-HCl 缓冲液 pH 7.2，浓度分别为 0.05mg/mL (1 $\times$)和 0.25mg/mL (5 $\times$) 的酶样品（天然状态或者新酶 A (Phe208Met)），0.3 mM 底物 Rubu。通过加入酶样品启动反应，分别于 0, 2, 18 小时取样 60 μ L，与等体积的正丁醇混合涡旋振荡，终止反应并萃取对应的酶促反应产物，室温 17000 rpm 离心 10 min，室温静置 1 min，取上层正丁醇的萃取相 50 μ L 真空干燥后，用等体积的 25 %乙腈重悬后，利用 HPLC 检测酶促产物。本实施例所列的反应条件不唯一，只要能使 OsUGT91C1 发生酶促反应，都可得到同样的结果。检测手段也不唯一，只要能区分每个酶促产物，可得到相同的检测结果。

天然状态的 OsUGT91C1 和新酶 A (Phe208Met) 催化在 C13-羟基或 C-19 羧基方向添加 2 号葡萄糖基的正常反应的底物不唯一，包括但不限于，Rubu (Rubusoside, CAS 64849-39-4)、S13G (Steviol-13-O-monoglucoside, CAS 60129-60-4) 及 Reb A (Rebaudioside A, CAS 58543-16-1) 等甜菊糖苷底物，只要在 C13-羟基或 C-19 羧基方向存在 1 号葡萄糖基，但不存在 3 号葡萄糖基，就可发生在 C13-羟基或 C-19 羧基方向添加 2 号葡萄糖基的正常反应。

(2) 以 OsUGT91C1 的底物 Reb A (Rebaudioside A, CAS 58543-16-1) 为实施例, 天然状态的 OsUGT91C1 可在底物 Reb A 的 C19-羧基方向添加 2 号葡萄糖基（与 1 号葡萄糖基形成 β (1-2)糖苷键）（正常反应）（图 4 中 a），而新酶 A (Phe208Met) 可明显率先将底物 Reb A 完全消耗并生成目标产物 Reb D (Rebaudioside D, CAS 63279-13-0)，具有增强的在 C19-羧基方向的目标催化能力，提高在 C19-羧基方向添加 2 号葡萄糖基形成对应产物的能力（图 4 中 b）。

实施例的反应体系如下：在 20 °C - 40 °C，200 μ L 反应体系包括：1 mM UDP-Glucose, 20 mM Tris-HCl 缓冲液 pH 7.2，浓度分别为 0.05mg/mL (1 $\times$)和 0.25mg/mL (5 $\times$) 的酶样品

(天然状态或者新酶 A (Phe208Met)), 0.3 mM 底物 Reb A。通过加入酶样品启动反应, 分别于 0, 2, 18 小时取样 60 μ L, 与等体积的正丁醇混合涡旋振荡, 终止反应并萃取对应的酶促反应产物, 室温 17000 rpm 离心 10 min, 室温静置 1 min, 取上层正丁醇的萃取相 50 μ L 真空干燥后, 用等体积的 25 %乙腈重悬后, 利用 HPLC 检测酶促产物。本实施例所列的反应条件不唯一, 只要能使 OsUGT91C1 发生酶促反应, 都可得到同样的结果。检测手段也不唯一, 只要能区分每个酶促产物, 可得到相同的检测结果。

天然状态的 OsUGT91C1 和新酶 A 催化在 C13-羟基或 C-19 羧基方向添加 2 号葡萄糖基的正常反应的底物不唯一, 包括但不限于, Rubu (Rubusoside, CAS 64849-39-4)、S13G (Steviol-13-O-monoglucoside, CAS 60129-60-4) 及 Reb A (Rebaudioside A, CAS 58543-16-1) 等甜菊糖苷底物, 只要在 C13-羟基或 C-19 羧基方向存在 1 号葡萄糖基, 但不存在 3 号葡萄糖基, 就可发生在 C13-羟基或 C-19 羧基方向添加 2 号葡萄糖基的正常反应。

2、酶促产物分析, 表明新酶 B (Phe208Met/Phe379Ala) 消除了添加 6 号葡萄糖基 (或 4 号葡萄糖基) 的副反应, 但不影响在 C13-羟基和 C19-羧基方向添加 2 号葡萄糖基 (与 1 号葡萄糖基形成 β (1-2) 糖苷键) 的催化能力

(1) 以 OsUGT91C1 的底物 STB (Steviolbioside, CAS 41093-60-1) 为实施例, 天然状态的 OsUGT91C1 可分别在底物 STB 上催化添加 6 号葡萄糖基 (或 4 号葡萄糖基) 的副反应 (图 5 中 a), 天然状态的 OsUGT91C1 副反应产物随时间和酶量的增加而增多, 而新酶 B (Phe208Met/Phe379Ala) 无副反应产物的生成, 已经消除添加 6 号葡萄糖基 (或 4 号葡萄糖基) 的副反应 (图 5 中 b)。

副反应的实施例如下: 在 20 $^{\circ}$ C - 40 $^{\circ}$ C, 200 μ L 反应体系包括: 1 mM UDP-Glucose, 20 mM Tris-HCl 缓冲液 pH 7.2, 浓度分别为 0.15mg/mL (1 $\times$)和 0.75mg/mL (5 $\times$) 的酶样品 (天然状态或者新酶 B (Phe208Met/Phe379Ala)), 0.3 mM STB。通过加入酶样品启动反应, 分别于 0, 2, 18 小时取样 60 μ L, 与等体积的正丁醇混合涡旋振荡, 终止反应并萃取对应的酶促反应产物, 室温 17000 rpm 离心 10 min, 室温静置 1 min, 取上层正丁醇的萃取相 50 μ L 真空干燥后, 用等体积的 25 %乙腈重悬后, 利用 HPLC 检测酶促产物。本实施例所列的反应条件不唯一, 只要能使 OsUGT91C1 发生酶促反应, 都可得到同样的结果。检测手段也不唯一, 只要能区分每个酶促产物, 可得到相同的检测结果。

天然状态的 OsUGT91C1 催化副反应的底物不唯一, 包括但不限于对以下甜菊糖苷底物发生副反应, STB (Steviolbioside, CAS 41093-60-1), Reb E (Rebaudioside E, CAS 63279-14-1) 等, 只要在 C13-羟基或 C-19 羧基方向存在 1 号和 2 号葡萄糖基, 但不存在 3 号葡萄糖基,

糖基（3 号葡萄糖基指与 1 号葡萄糖基形成 β （1-3）糖苷键的葡萄糖基），就可发生在对应的 C13-羟基或 C-19 羧基方向添加 6 号葡萄糖基（或 4 号葡萄糖基）的副反应。

（2）以 OsUGT91C1 的底物 S13G（Steviol-13-O-monoglucoside, CAS 60129-60-4）为实施例，天然状态的 OsUGT91C1 先催化在底物 S13G 的 C13-羟基（R1）端添加 2 号葡萄糖基的正常酶促反应生成 STB，然后对 STB 发生副反应，添加 6 号（或 4 号）葡萄糖基，生成副产物（图 6 中 a）；与之相反，新酶 B（Phe208Met/Phe379Ala）只催化在底物 S13G 的 C13-羟基（R1）端添加 2 号葡萄糖基的正常反应生成 STB，不催化副反应，无副产物生成（图 6 中 b）。

实施例的反应条件如下：在 20 °C - 40 °C，200 μ L 反应体系包括：1 mM UDP-Glucose, 20 mM Tris-HCl 缓冲液 pH 7.2，浓度分别为 0.15mg/mL (1 $\times$)和 0.75mg/mL (5 $\times$) 的酶样品（天然状态或者新酶 B（Phe208Met/Phe379Ala）），0.3 mM 底物 S13G。通过加入酶样品启动反应，分别于 0，2，18 小时取样 60 μ L，与等体积的正丁醇混合涡旋振荡，终止反应并萃取对应的酶促反应产物，室温 17000 rpm 离心 10 min，室温静置 1 min，取上层正丁醇的萃取相 50 μ L 真空干燥后，用等体积的 25 %乙腈重悬后，利用 HPLC 检测酶促产物。本实施例所列的反应条件不唯一，只要能使 OsUGT91C1 发生酶促反应，都可得到同样的结果。检测手段也不唯一，只要能区分每个酶促产物，可得到相同的检测结果。

天然状态的 OsUGT91C1 和新酶 B（Phe208Met/Phe379Ala）催化在 C13-羟基或 C-19 羧基方向添加 2 号葡萄糖基的正常反应的底物不唯一，包括但不限于，Rubu（Rubusoside, CAS 64849-39-4）、S13G（Steviol-13-O-monoglucoside, CAS 60129-60-4）及 Reb A（Rebaudioside A, CAS 58543-16-1）等甜菊糖苷底物，只要在 C13-羟基或 C-19 羧基方向存在 1 号葡萄糖基，但不存在 3 号葡萄糖基，就可发生在 C13-羟基或 C-19 羧基方向添加 2 号葡萄糖基的正常反应；天然状态的 OsUGT91C1 催化副反应的底物不唯一，包括但不限于对以下甜菊糖苷底物发生副反应，STB（Steviolbioside, CAS 41093-60-1），Reb E（Rebaudioside E, CAS 63279-14-1）等，只要在 C13-羟基或 C-19 羧基方向存在 1 号和 2 号葡萄糖基，但不存在 3 号葡萄糖基（3 号葡萄糖基指与 1 号葡萄糖基形成 β （1-3）糖苷键的葡萄糖基），就可发生在对应的 C13-羟基或 C-19 羧基方向添加 6 号葡萄糖基（或 4 号葡萄糖基）的副反应。

3、酶促产物分析，表明新酶 B（Phe208Met/Phe379Ala）提升了在 C13-羟基，特别是 C19-羧基方向添加 2 号葡萄糖基（与 1 号葡萄糖基形成 β （1-2）糖苷键）的催化能力

（1）以 OsUGT91C1 的底物 Rubu（Rubusoside, CAS 64849-39-4）为实施例，天然状态

的 OsUGT91C1 可在底物 Rubu 的 C13-羟基、C19-羧基两个方向添加 2 号葡萄糖基（与 1 号葡萄糖基形成 $\beta(1-2)$ 糖苷键）（正常反应）（图 7 中 a），而新酶 B（Phe208Met/Phe379Ala）同样可在底物 Rubu 的 C13-羟基、C19-羧基两个方向添加 2 号葡萄糖基，而且可催化得到更多的在 C19-羧基方向添加 2 号葡萄糖基的产物，具有增强的在 C19-羧基方向的目标催化能力，最终得到在 C13-羟基和 C19-羧基两个方向都加有 2 号葡萄糖基的产物 Reb E（Rebaudioside E, CAS 63279-14-1）也明显多于天然状态的 OsUGT91C1（图 7 中 b）。

实施例的反应体系如下：在 20 °C - 40 °C，200 μ L 反应体系包括：1 mM UDP-Glucose, 20 mM Tris-HCl 缓冲液 pH 7.2，浓度分别为 0.05mg/mL (1 $\times$)和 0.25mg/mL (5 $\times$) 的酶样品（天然状态或者新酶 B（Phe208Met/Phe379Ala）），0.3 mM 底物 Rubu。通过加入酶样品启动反应，分别于 0，2，18 小时取样 60 μ L，与等体积的正丁醇混合涡旋振荡，终止反应并萃取对应的酶促反应产物，室温 17000 rpm 离心 10 min，室温静置 1 min，取上层正丁醇的萃取相 50 μ L 真空干燥后，用等体积的 25 %乙腈重悬后，利用 HPLC 检测酶促产物。本实施例所列的反应条件不唯一，只要能使 OsUGT91C1 发生酶促反应，都可得到同样的结果。检测手段也不唯一，只要能区分每个酶促产物，可得到相同的检测结果。

天然状态的 OsUGT91C1 和新酶 B（Phe208Met/Phe379Ala）催化在 C13-羟基或 C-19 羧基方向添加 2 号葡萄糖基的正常反应的底物不唯一，包括但不限于，Rubu（Rubusoside, CAS 64849-39-4）、S13G（Steviol-13-O-monoglucoside, CAS 60129-60-4）及 Reb A（Rebaudioside A, CAS 58543-16-1）等甜菊糖苷底物，只要在 C13-羟基或 C-19 羧基方向存在 1 号葡萄糖基，但不存在 3 号葡萄糖基，就可发生在 C13-羟基或 C-19 羧基方向添加 2 号葡萄糖基的正常反应。

（2）以 OsUGT91C1 的底物 Reb A（Rebaudioside A, CAS 58543-16-1）为实施例，天然状态的 OsUGT91C1 可在底物 Reb A 的 C19-羧基方向添加 2 号葡萄糖基（与 1 号葡萄糖基形成 $\beta(1-2)$ 糖苷键）（正常反应）（图 8 中 a），而新酶 B（Phe208Met/Phe379Ala）可明显率先将底物 Reb A 完全消耗并生成目标产物 Reb D（Rebaudioside D, CAS 63279-13-0），具有增强的在 C19-羧基方向的目标催化能力，提高在 C19-羧基方向添加 2 号葡萄糖基形成对应产物的能力（图 8 中 b）。

实施例的反应体系如下：在 20 °C - 40 °C，200 μ L 反应体系包括：1 mM UDP-Glucose, 20 mM Tris-HCl 缓冲液 pH 7.2，浓度分别为 0.05mg/mL (1 $\times$)和 0.25mg/mL (5 $\times$) 的酶样品（天然状态或者新酶 B（Phe208Met/Phe379Ala）），0.3 mM 底物 Reb A。通过加入酶样品启动反应，分别于 0，2，18 小时取样 60 μ L，与等体积的正丁醇混合涡旋振荡，终止反应并

萃取对应的酶促反应产物，室温 17000 rpm 离心 10 min，室温静置 1 min，取上层正丁醇的萃取相 50 μ L 真空干燥后，用等体积的 25 %乙腈重悬后，利用 HPLC 检测酶促产物。本实施例所列的反应条件不唯一，只要能使 OsUGT91C1 发生酶促反应，都可得到同样的结果。检测手段也不唯一，只要能区分每个酶促产物，可得到相同的检测结果。

天然状态的 OsUGT91C1 和新酶 B (Phe208Met/Phe379Ala) 催化在 C13-羟基或 C-19 羧基方向添加 2 号葡萄糖基的正常反应的底物不唯一，包括但不限于，Rubu (Rubusoside, CAS 64849-39-4)、S13G (Steviol-13-O-monoglucoside, CAS 60129-60-4) 及 Reb A (Rebaudioside A, CAS 58543-16-1) 等甜菊糖苷底物，只要在 C13-羟基或 C-19 羧基方向存在 1 号葡萄糖基，但不存在 3 号葡萄糖基，就可发生在 C13-羟基或 C-19 羧基方向添加 2 号葡萄糖基的正常反应。

4、通过荧光转化的方法，测定新酶 A (Phe208Met) 和新酶 B (Phe208Met/Phe379Ala) 催化在甜菊糖苷底物添加 2 号葡萄糖基 (与 1 号葡萄糖基形成 $\beta(1-2)$ 糖苷键) 正常反应的速度。

新酶 A (Phe208Met) 增强了催化正常所需的在甜菊糖苷底物添加第 2 号葡萄糖基 (与 1 号葡萄糖基形成 $\beta(1-2)$ 糖苷键) 的反应速度，是天然状态 OsUGT91C1 活性的 2 倍以上；新酶 B (Phe208Met/Phe379Ala) 消除添加 6 号 (或 4 号) 葡萄糖基副反应的同时，增强了催化正常所需的在甜菊糖苷底物添加第 2 号葡萄糖基 (与 1 号葡萄糖基形成 $\beta(1-2)$ 糖苷键) 的反应速度，是天然状态 OsUGT91C1 活性的 3-7 倍 (表 3)。

表 3 天然状态 OsUGT91C1、新酶 A (Phe208Met)、新酶 B (Phe208Met/Phe379Ala) 催化在底物 C13-羟基 (R1) 和 C19-羧基 (R2) 端分别添加 2 号葡萄糖基 (正常所需的催化反应) 的动力学参数

substrate	enzyme	k_{cat}/K_m ($s^{-1} M^{-1}$)	Fold (相比天然状态的倍数变化)
Rubu (C13-羟基和 C19-羧基两端的反应)	WT (天然状态)	673.33	1
	Phe208Met (新酶 A)	1944.50	2.9
	Phe379Ala/Phe208Met (新酶 B)	4912.33	7.3
S13G (C13-羟基单端的反应)	WT (天然状态)	1974.25	1
	Phe208Met (新酶 A)	3440.42	1.7
	Phe379Ala/Phe208Met (新酶 B)	6065.14	3.1
Reb A (C19-羧基单端的反应)	WT (天然状态)	444.85	1
	Phe208Met (新酶 A)	1930.13	4.3
	Phe379Ala/Phe208Met (新酶 B)	2885.39	6.5

(1) 该测定直接利用商品化的糖基转移酶活性试剂盒完成，实施例使用 Promega 公司的 UDP-Glo™ Glycosyltransferase Assay 试剂盒，其他可用于糖基转移酶反应速度检测方法可得到同样结果。

Promega 公司的 UDP-Glo™ Glycosyltransferase Assay 试剂盒用于检测以 UDP-Glucose 为糖基供体的葡萄糖基转移酶反应速度，OsUGT91C1 及本发明涉及的两个突变新酶均适用。

在葡萄糖基转移酶的作用下，糖基供体 UDP-Glucose 将葡萄糖转移给底物后生成 UDP。该检测方法将生成 UDP 等物质的量 (1:1) 转化为 ATP，ATP 可使荧光素酶发出定量的荧光，因此通过测定荧光量可检测酶促糖基转移反应生成 UDP 的量。当生成 UDP 在 0-25 μM 浓度范围内，产生的荧光强度和 UDP 的摩尔浓度成线性关系。根据 UDP 浓度和荧光强度对应关系的标准曲线，计算 UDP 的生成量，可转化为糖基转移酶的催化反应速度。

(2) 配制 UDP 不同浓度的一系列溶液，根据上述转化的反应，测定对应的荧光强度。天然状态 OsUGT91C1 及本发明涉及的两个新酶，以不同底物检测各种催化反应的速度及酶动力学常数等信息，用于评价本发明的新酶 A (Phe208Met) 和新酶 B (Phe208Met/Phe379Ala) 在促进添加 2 号葡萄糖基正常反应上的效果。利用 Rubu (Rubusoside, CAS 64849-39-4)、S13G (Steviol-13-O-monoglucoside, CAS 60129-60-4) 及 Reb A (Rebaudioside A, CAS 58543-16-1) 为底物分别检测新酶 A (Phe208Met) 和新酶 B (Phe208Met/Phe379Ala) 在 C13-羟基，C19-羧基添加 2 号葡萄糖基的催化能力，并和天然状态 OsUGT91C1 的催化能力进行比较。天然状态的 OsUGT91C1 及新酶 A (Phe208Met)、新酶 B (Phe208Met/Phe379Ala) 催化在 C13-羟基或 C-19 羧基方向添加 2 号葡萄糖基的正常反应的底物不唯一，包括但不限于，Rubu (Rubusoside, CAS 64849-39-4)、S13G (Steviol-13-O-monoglucoside, CAS 60129-60-4) 及 Reb A (Rebaudioside A, CAS 58543-16-1) 等甜菊糖苷底物，只要在 C13-羟基或 C-19 羧基方向存在 1 号葡萄糖基，但不存在 3 号葡萄糖基，就可发生在 C13-羟基或 C-19 羧基方向添加 2 号葡萄糖基的正常反应。

(3) 天然状态 OsUGT91C1 与新酶 A (Phe208Met) 和新酶 B (Phe208Met/Phe379Ala) 针对不同底物的酶动力学常数表 3 所示，新酶 A (Phe208Met) 增强了催化正常所需的在甜菊糖苷底物添加第 2 号葡萄糖基 (与 1 号葡萄糖基形成 $\beta(1-2)$ 糖苷键) 的反应速度，是天然状态 OsUGT91C1 活性的 2 倍以上；新酶 B (Phe208Met/Phe379Ala) 消除添加 6 号 (或 4 号) 葡萄糖基副反应的同时，增强了催化正常所需的在甜菊糖苷底物添加第 2 号葡萄糖基 (与 1 号葡萄糖基形成 $\beta(1-2)$ 糖苷键) 的反应速度，是天然状态 OsUGT91C1 活性的 3-7 倍 (表 3)。

五、新酶 B (Phe208Met/Phe379Ala) 既无副反应的发生又提升了目标催化能力，可催

化完成在甜菊糖苷底物 C13-羟基或（和）C-19 羧基方向添加 2 号葡萄糖基的正常反应，生成包括 Reb E（Rebaudioside E, CAS 63279-14-1）的一系列甜菊糖苷产物。在此条件下，利用糖基转移酶 UGT76G1 在 C13-羟基或（和）C-19 羧基方向继续添加 3 号葡萄糖基，则可获得甜菊糖苷 D 和 M（Rebaudioside D, CAS 63279-13-0 和 Rebaudioside M, CAS 1220616-44-3）（图 9）。

六、新酶 A（Phe208Met）、新酶 B（Phe208Met/Phe379Ala）的氨基酸序列具有冗余性，可以去除或改变第 1-14 位的任一氨基酸。

以新酶 B（Phe208Met/Phe379Ala）为实施例，对新酶 B 去除第 1-14 位的全部氨基酸（MDSGYSSSYAAAAG）得到新酶 B 截短体，该截短体仍能正常表达、纯化，并显示出在甜菊糖苷底物 C13-羟基或 C-19 羧基方向添加 2 号葡萄糖基的正常反应的活性。

1、为了验证第 1-14 位氨基酸（MDSGYSSSYAAAAG）的冗余性，在新酶 B（Phe208Met/Phe379Ala）的表达载体上构建去除第 1-14 位的全部氨基酸（MDSGYSSSYAAAAG）（新酶 B 截短体）的表达载体

（1）以新酶 B（Phe208Met/Phe379Ala）的表达质粒为模板，设计去除第 1-14 位的全部氨基酸的截短体的引物如表 4。

表 4 突变体引物序列如下：

引物名称	引物序列（5'-3'）
去除 1-14-F	AAGAAGGAGATATACATATGCATGTTGTGATTGCCCCG
去除 1-14-R	CGGGCAAATCACAACATGCATATGTATATCTCCTTCTT

（2）用 ddH₂O 溶解表 4 的引物，稀释引物浓度为 10 μM。用去除 1-14-F 和去除 1-14-R 的一对引物分别以新酶 B（Phe208Met/Phe379Ala）的表达质粒为模板进行 PCR 扩增，体系同为：dNTP 4 μL，5×PS buffer 10 μL，上下游引物各 2 μL，模板 1 μL（约 10 ng），PCR 扩增酶 Primer star 0.5 μL，剩余用 ddH₂O 补齐至 50 μL。混匀后用 PCR 扩增，扩增程序：98 °C 预变性 2 min，98 °C 变性 30 s，69 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 8 min，扩增 20 个循环，72 °C 再延伸 10min，最后 4 °C 保存。

（3）从上述扩增产物各取出 10 μL 进行琼脂糖胶验证 PCR 的扩增效果，剩余的 40 μL 体系里各加 1 μL DpnI 酶，37 °C 孵育 1-2 小时后取 10 μL 分别转入 100 μL *E.coli* DH5α 感受态细胞中，冰浴 30 min，42 °C 热激 2 min，再冰浴 3 min 后加入新鲜 LB 300 μL，200 rpm 37 °C 摇床孵育 1 小时后，分别取 150 μL 均匀涂布于 Amp 抗性的固体 LB 平板上，37 °C 静

置培养过夜。

(4) 挑取两个平板上的单克隆菌落接种于 10 mL 的 LB 培养基中, 200 rpm 37 °C 培养 12-16 小时后提取质粒, DNA 测序验证新酶 B 截短体的表达质粒, 成功去除了第 1-14 位的全部氨基酸, 除了第 1-14 位氨基酸被去除, 其余位点氨基酸序列同 SEQ ID No.2 维持一致。

2、新酶 B (Phe208Met/Phe379Ala) 去除第 1-14 位的全部氨基酸后截短体的诱导表达和纯化

(1) 将对应的表达质粒转化至 *E.coli* BL21(DE3) 表达菌株, 第二天挑取单克隆接种于 10 mL 新鲜的 LB 培养基中, 200 rpm 37 °C 培养过夜后加入终浓度为 8 % 的甘油保种, 该菌种可在 -80 °C 长期保存。

(2) 挑取上一步保存的 *E.coli* BL21(DE3) 甘油菌接种于含 Amp 50 µg/mL 的 100 mL 新鲜 LB 培养基中, 200 rpm 37 °C 过夜培养。第二天以 1% 的接种比例接种于含 Amp 50 µg/mL 的 1 L 新鲜 LB 培养基, 180 rpm 37 °C 培养至 OD₆₀₀ = 1.0 后, 菌液降温至 16 °C, 添加终浓度为 0.5 mM 的 IPTG, 160 rpm 16 °C - 20 °C 诱导表达 18 小时。

(3) 完成诱导表达后, 4000 rpm 离心 15 min 弃上清, 收集菌体。菌体用重悬缓冲液 (20 mM Tris-HCl buffer pH 7.8, 0.5 M NaCl, 30 mM imidazole) 重悬后, 用高压破碎仪在 1000 bar 压力下反复破碎 3 次。13500 rpm 4 °C 离心 60 min, 离心后的上清上样到 NTA-Ni 柱, 用上述重悬缓冲液洗去非特异性结合的杂蛋白, 带组氨酸标签的目的蛋白可被洗脱缓冲液 (20 mM Tris-HCl buffer pH 7.8, 0.5 M NaCl, 250 mM imidazole) 洗脱下来。洗脱下来的蛋白进一步置换到 20 mM HEPES buffer pH 7.2, 50 mM NaCl 里, 经液氮速冻后, 可长期保存于 -80 °C。上述步骤可纯化得到新酶 B 的截短体, 并通过 SDS-PAGE 检测纯度 (图 10)。由图 10 可见, 当新酶 B 去除第 1-14 位氨基酸的截短体可以进行正常的表达和纯化。由于新酶 A 和新酶 B 具有同样的第 1-14 位氨基酸, 对新酶 B 完全去除第 1-14 位氨基酸的实施例, 显示第 1-14 位氨基酸具有冗余性。同理, 新酶 A 的第 1-14 位氨基酸也具有冗余性。

3、新酶 B 的截短体不影响在甜菊糖苷底物的 C13-羟基和 C-19 羧基两个方向添加第 2 号葡萄糖基的正常反应, 其活性和新酶 B 一样, 比天然转态糖基转移酶 OsUGT91C1 的催化活性更高, 进一步显示第 1-14 位氨基酸在新酶 A 和新酶 B 中的冗余性。

(1) 以甜菊糖苷底物 Rubu (Rubusoside, CAS 64849-39-4) 为实施例, 天然状态的 OsUGT91C1 可在底物 Rubu 的 C13-羟基、C19-羧基两个方向添加 2 号葡萄糖基 (与 1 号葡萄糖基形成 β (1-2) 糖苷键) (正常反应) (图 11 中 a), 新酶 B 的截短体同样可在底物 Rubu 的 C13-羟基、C19-羧基两个方向添加 2 号葡萄糖基 (图 11 中 b)。

(2) 实施例的反应体系如下：在 20 °C - 40 °C，200 μ L 反应体系包括：1 mM UDP-Glucose, 20 mM Tris-HCl 缓冲液 pH 7.2，浓度分别为 0.05mg/mL (1 $\times$)和 0.25mg/mL (5 $\times$) 的酶样品（天然状态或者新酶 B 截短体），0.3 mM 底物 Rubu。通过加入酶样品启动反应，分别于 0, 2, 18 小时取样 60 μ L，与等体积的正丁醇混合涡旋振荡，终止反应并萃取对应的酶促反应产物，室温 17000 rpm 离心 10 min，室温静置 1 min，取上层正丁醇的萃取相 50 μ L 真空干燥后，用等体积的 25 %乙腈重悬后，利用 HPLC 检测酶促产物。本实施例所列的反应条件不唯一，只要能使 OsUGT91C1 发生酶促反应，都可得到同样的结果。检测手段也不唯一，只要能区分每个酶促产物，可得到相同的检测结果。

(3) 天然状态的 OsUGT91C1 和新酶 B 截短体催化在 C13-羟基或 C-19 羧基方向添加 2 号葡萄糖基的正常反应的底物不唯一，包括但不限于，Rubu (Rubusoside, CAS 64849-39-4)、S13G (Steviol-13-O-monoglucoside, CAS 60129-60-4) 及 Reb A (Rebaudioside A, CAS 58543-16-1) 等甜菊糖苷底物，只要在 C13-羟基或 C-19 羧基方向存在 1 号葡萄糖基，但不存在 3 号葡萄糖基，就可发生在 C13-羟基或 C-19 羧基方向添加 2 号葡萄糖基的正常反应。

权 利 要 求 书

1. 糖基转移酶 OsUGT91C1 突变体，其氨基酸序列为以下 a、b、c、d 中的任一种：
 - a、如 SEQ ID No.1 所示氨基酸序列；
 - b、如 SEQ ID No.2 所示氨基酸序列；
 - c、删除第 1-14 位氨基酸的 SEQ ID No.1 所示氨基酸序列；
 - d、删除第 1-14 位氨基酸的 SEQ ID No.2 所示氨基酸序列。
2. 一种表达基因，编码权利要求 1 所述的糖基转移酶 OsUGT91C1 突变体。
3. 一种表达载体，含有权利要求 2 所述表达基因。
4. 携带权利要求 3 所述表达载体的重组菌。
5. 权利要求 1 所述的糖基转移酶 OsUGT91C1 突变体在甜菊糖苷 D 或 M 的酶促合成或转化过程的用途。
6. 根据权利要求 5 所述的用途，其特征在于，所述糖基转移酶 OsUGT91C1 突变体在甜菊糖苷 D 或 M 的酶促合成或转化过程是指在甜菊糖苷的 C13-羟基或/和 C19-羧基方向添加 2 号葡萄糖基，所述 2 号葡萄糖基是与 1 号葡萄糖基形成 β (1-2)糖苷键的葡萄糖基，1 号葡萄糖基特指直接与 C13-羟基或 C19-羧基形成 β -糖苷键的葡萄糖基。

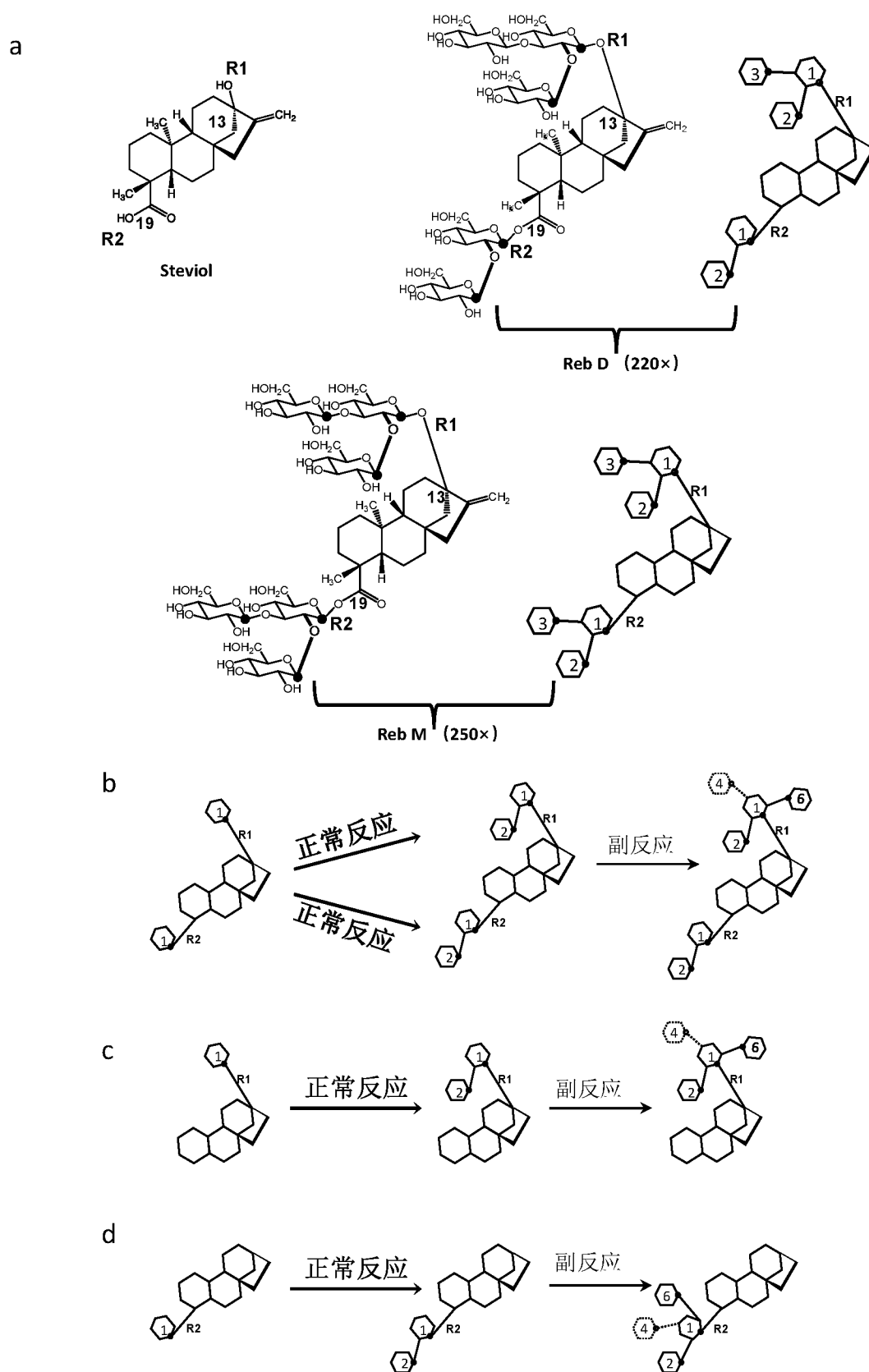


图 1

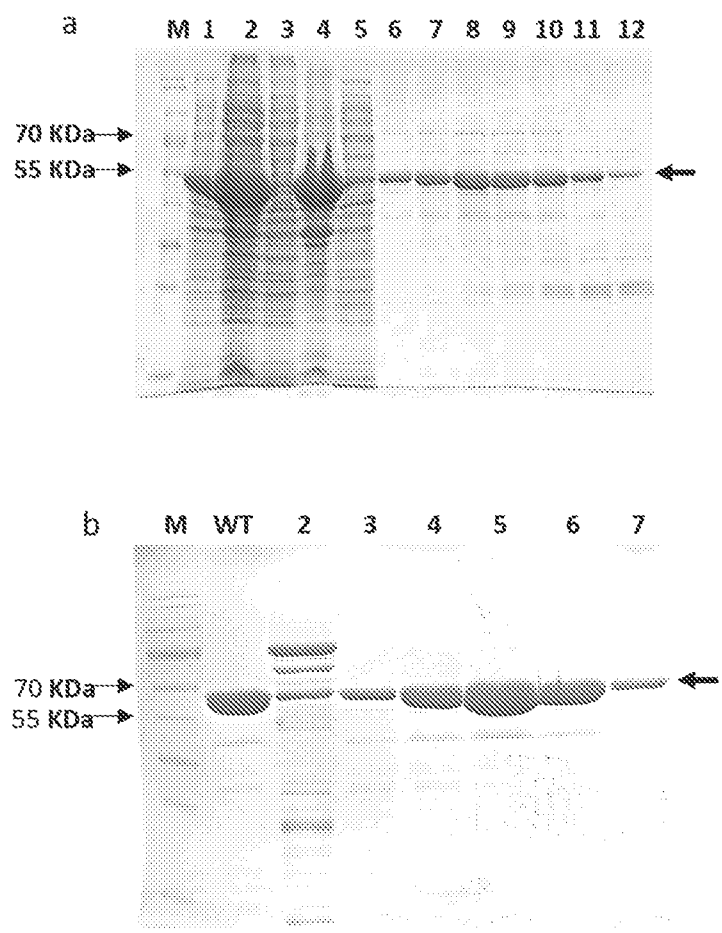


图 2

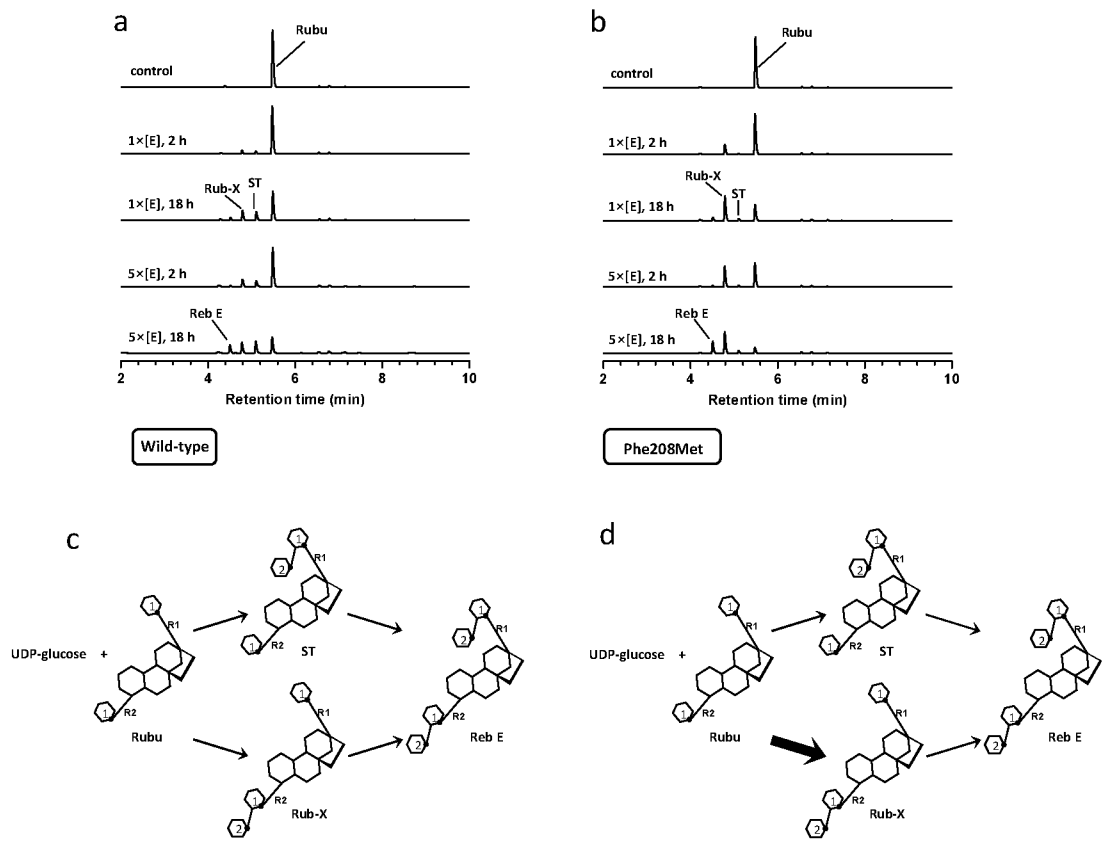


图 3

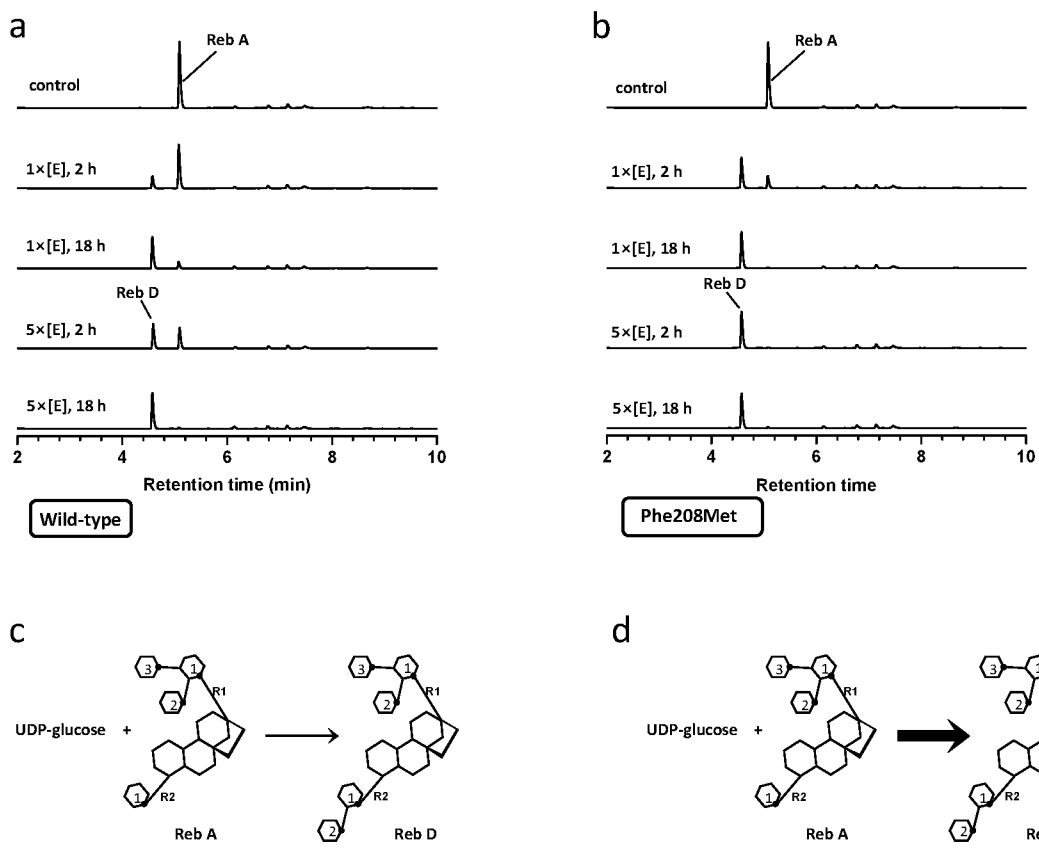


图 4

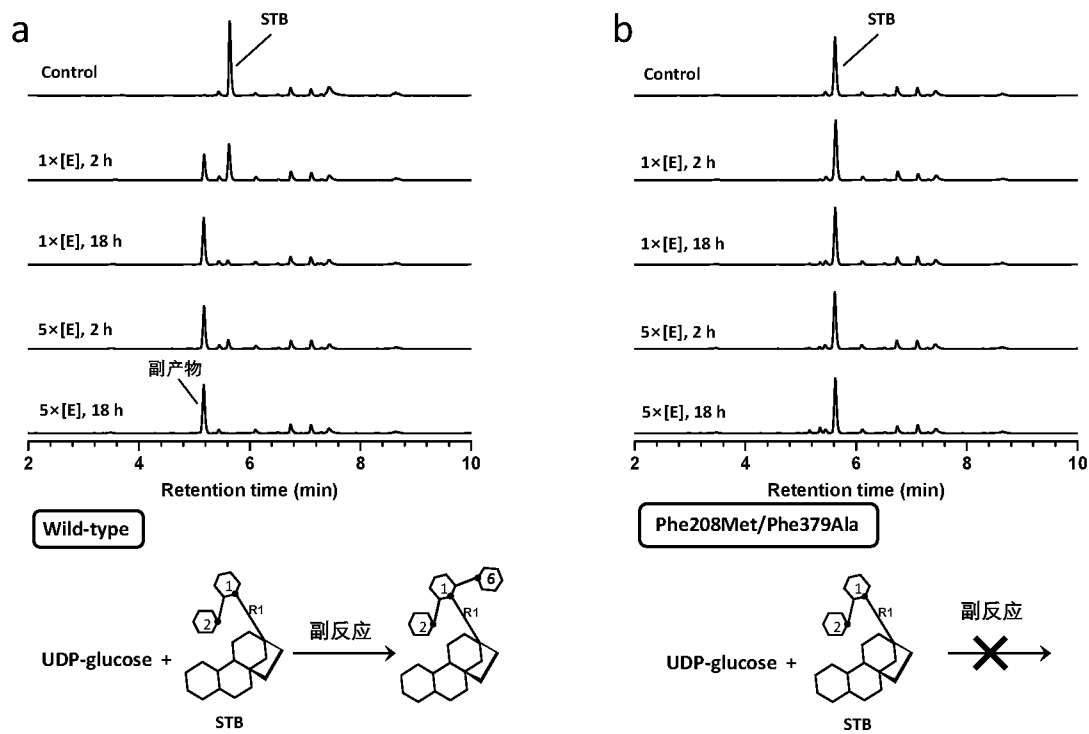


图 5

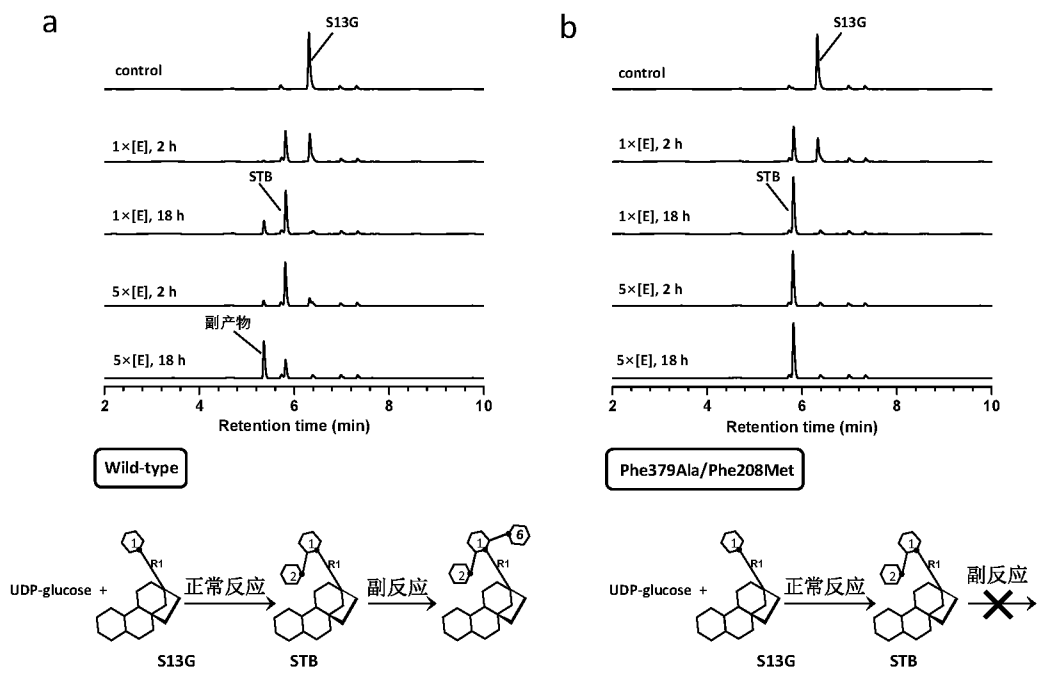


图 6

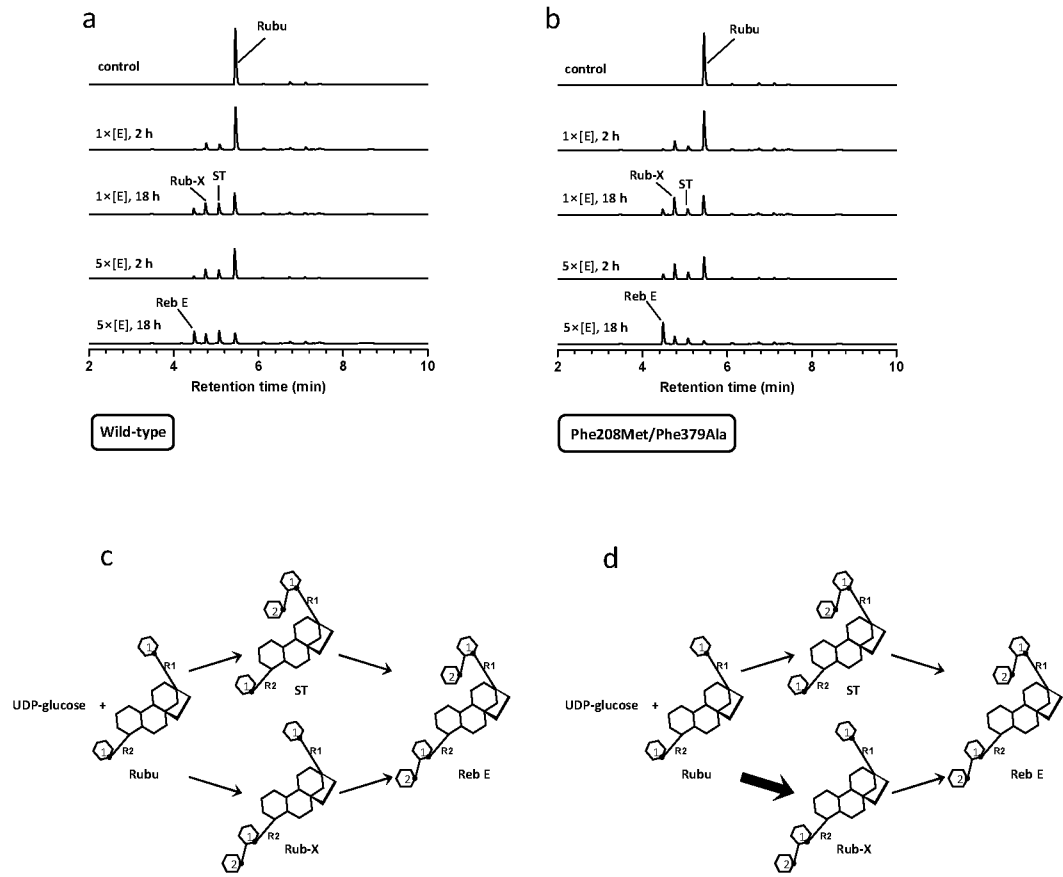


图 7

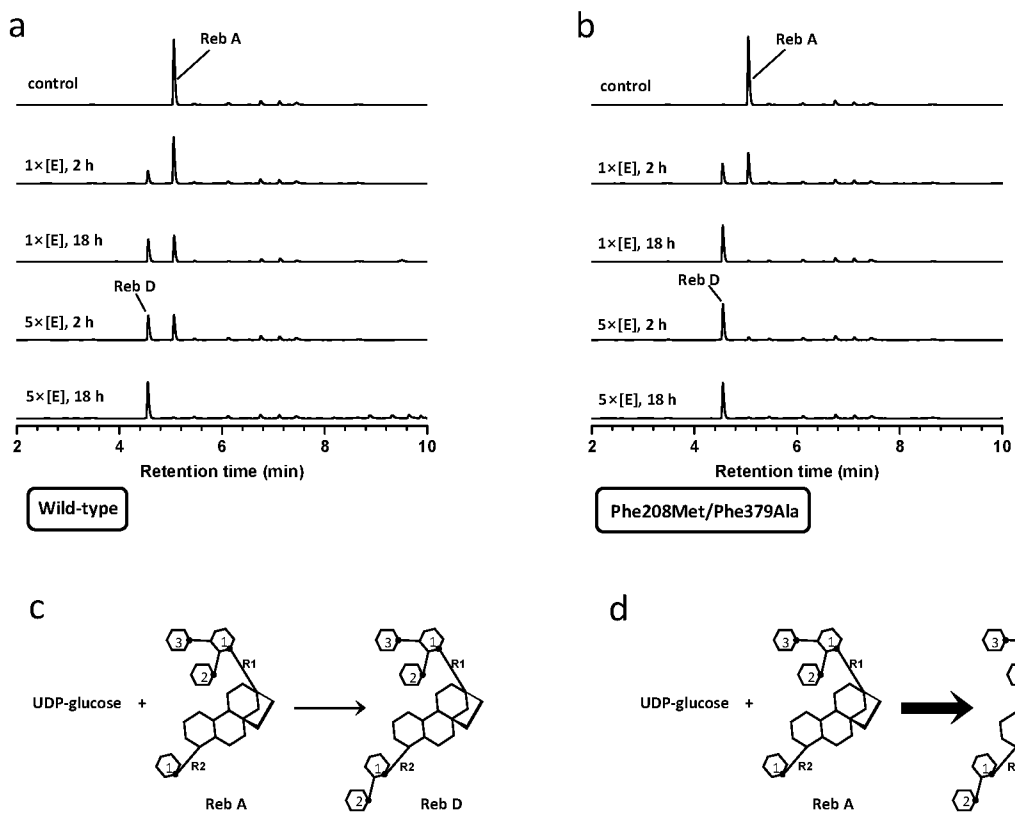


图 8

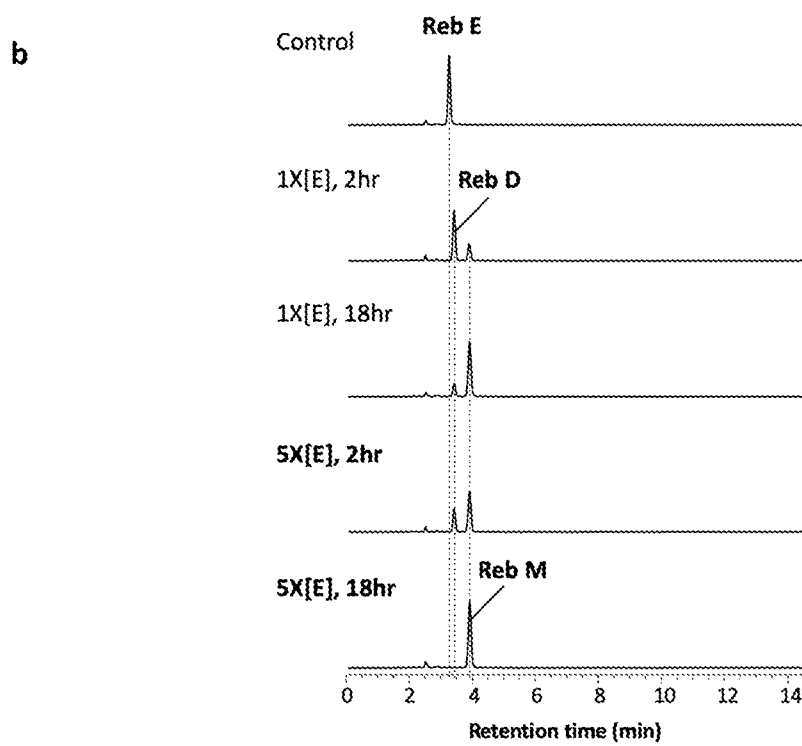
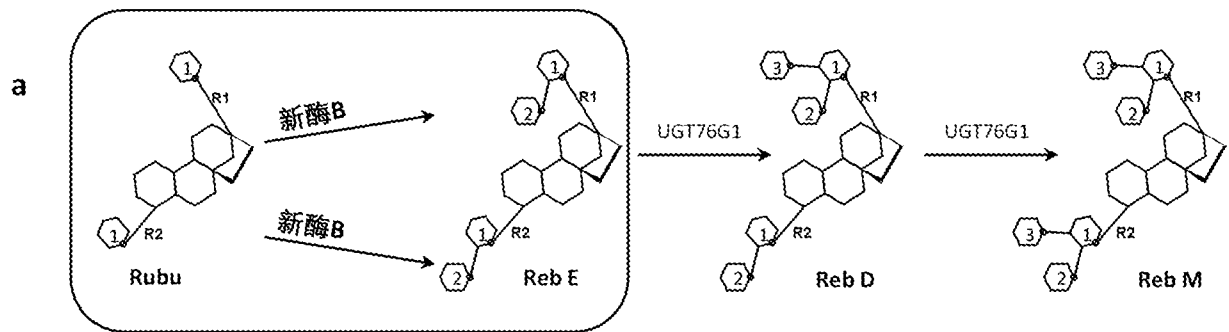


图 9

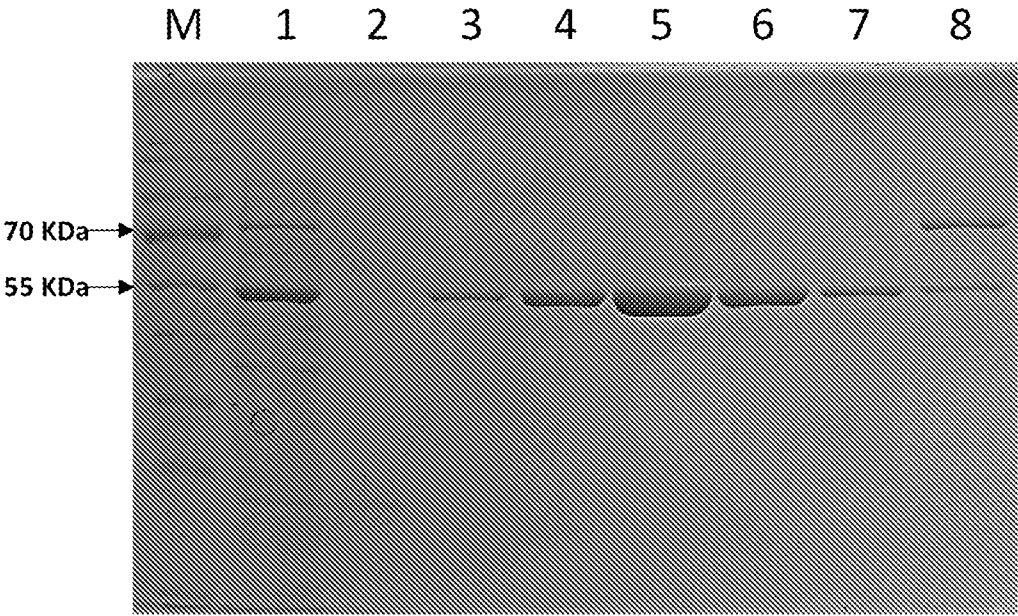


图 10

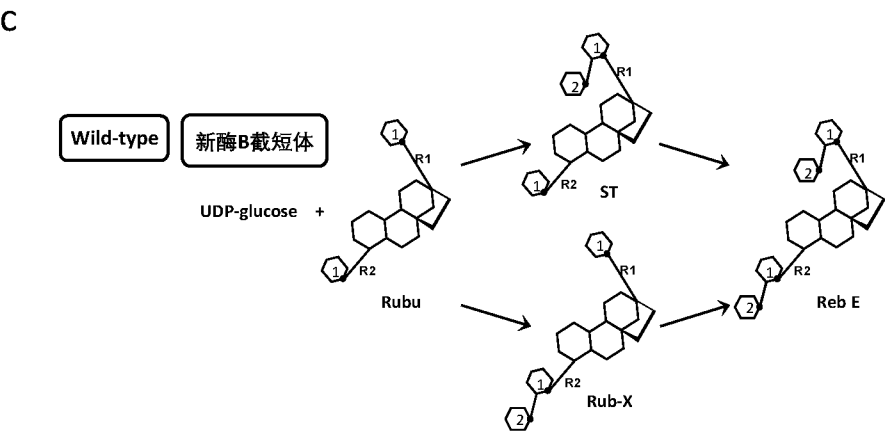
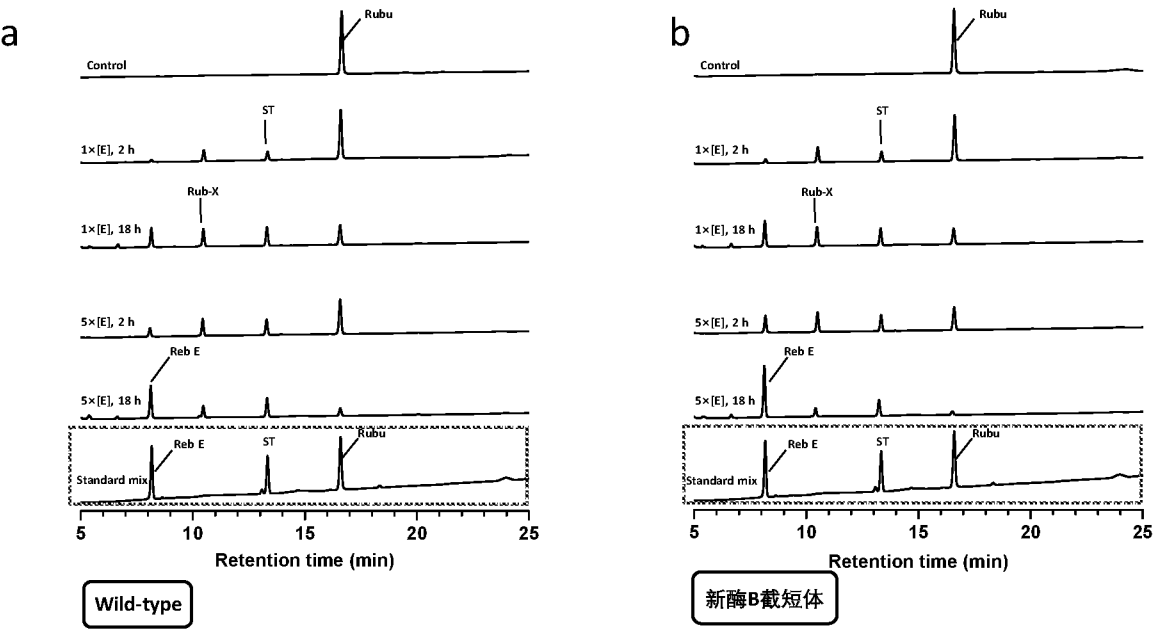


图 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/131774

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N9/10(2006.01)i;C12N15/63(2006.01)i;C12N1/21(2006.01)i;C12P33/20(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)

C12N,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)

DWPI, CNTXT, WPABSC, ENTXT, OETXT, CNKI, PubMed, Elsevier Science, ISI WEB of Science; GenBank+中国专利生物序列检索系统, Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System: 对SEQ ID NOs: 1-2的检索, search conducted on SEQ ID NOs: 1-2, 糖基转移酶, UGT91C1, EUGT11, 突变, 变体, mutant, 莱鲍迪苷, 莱鲍迪甙, Rebaudioside, 甜菊糖苷, 甜菊糖甙, rebA, rebD, rebM, F208M, F208

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 114045273 B (SICHUAN UNIVERSITY) 22 July 2022 (2022-07-22) see claims 1-6	1-6
A	US 2015315623 A1 (CONAGEN INC.) 05 November 2015 (2015-11-05) see abstract, and SEQ ID NO: 5	1-6
A	CN 113584016 A (ANHUI JINHE INDUSTRIAL CO., LTD.) 02 November 2021 (2021-11-02) see abstract	1-6
A	GenBank. "UDP-glycosyltransferase 91C1 [Oryza sativa Japonica Group]" NCBI Reference Sequence: XP_015629141.1, 07 August 2018 (2018-08-07), see amino acid and related information	1-6



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

02 February 2023

Date of mailing of the international search report

08 February 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

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/131774

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WANG, Zhenyang et al. "Heterologous expression of EUGT11 from <i>Oryza sativa</i> in <i>Pichia pastoris</i> for highly efficient one-pot production of rebaudioside D from rebaudioside A" <i>International Journal of Biological Macromolecules</i> , Vol. 163, 22 September 2020 (2020-09-22), see abstract	1-6
A	HUANG, Xuxu et al. "A novel UDP-glycosyltransferase 91C1 confers specific herbicide resistance through detoxification reaction in <i>Arabidopsis</i> " <i>Plant Physiology and Biochemistry</i> , 27 December 2020 (2020-12-27), see abstract	1-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/131774

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/CN2022/131774

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	114045273	B	22 July 2022	None			
US	2015315623	A1	05 November 2015	CA	2982075	A1	12 November 2015
				EP	3140314	A1	15 March 2017
				EP	3140314	A4	18 October 2017
				EP	3140314	B1	31 July 2019
				MX	2016014506	A	23 February 2017
				MX	367883	B	10 September 2019
				DK	3140314	T3	21 October 2019
				US	9522929	B2	20 December 2016
				JP	2017519812	A	20 July 2017
				JP	6641357	B2	05 February 2020
				WO	2015171555	A1	12 November 2015
				HUE	045937	T2	28 January 2020
				AU	2015256232	A1	24 November 2016
				AU	2015256232	B2	26 September 2019
				US	2018009835	A1	11 January 2018
				US	10597418	B2	24 March 2020
				KR	20160147994	A	23 December 2016
				KR	102378988	B1	28 March 2022
				EP	4023660	A1	06 July 2022
				US	2016208225	A1	21 July 2016
				US	10138263	B2	27 November 2018
				EP	3418288	A1	26 December 2018
				EP	3418288	B1	19 January 2022
				US	2016208303	A1	21 July 2016
				US	9765104	B2	19 September 2017
				US	2018051049	A1	22 February 2018
				US	9988414	B2	05 June 2018
				US	2018244709	A1	30 August 2018
				US	10450339	B2	22 October 2019
				US	2018037600	A1	08 February 2018
				US	10654881	B2	19 May 2020
				ZA	201607592	B	27 February 2019
				BR	112016025147	A2	12 December 2017
				US	2016207954	A1	21 July 2016
				US	9527880	B2	27 December 2016
				ES	2750373	T3	25 March 2020
				AR	100277	A1	21 September 2016
				US	2020361978	A1	19 November 2020
				US	10941174	B2	09 March 2021
CN	113584016	A	02 November 2021	None			

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/131774

A. 主题的分类

C12N9/10(2006.01)i;C12N15/63(2006.01)i;C12N1/21(2006.01)i;C12P33/20(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)

C12N, C12P

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))

数据库: DWPI, CNTXT, WPABSC, ENTXT, OETXT, CNKI, PubMed, Elsevier Science, ISI WEB of Science; GenBank+中国专利生物序列检索系统; 检索词: 对SEQ ID NOs: 1-2的检索, 糖基转移酶, UGT91C1, EUGT11, 突变, 变体, mutant, 莱鲍迪苷, 莱鲍迪甙, Rebaudioside, 甜菊糖苷, 甜菊糖甙, rebA, rebD, rebM, F208M, F208

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 114045273 B (四川大学) 2022年7月22日 (2022 - 07 - 22) 参见权利要求1-6	1-6
A	US 2015315623 A1 (CONAGEN INC) 2015年11月5日 (2015 - 11 - 05) 参见摘要, SEQ ID NO: 5	1-6
A	CN 113584016 A (安徽金禾实业股份有限公司) 2021年11月2日 (2021 - 11 - 02) 参见摘要	1-6
A	GenBank. "UDP-glycosyltransferase 91C1 [Oryza sativa Japonica Group]" NCBI Reference Sequence: XP_015629141.1, 2018年8月7日 (2018 - 08 - 07), 参见氨基酸及相关信息	1-6
A	Zhenyang Wang等. "Heterologous expression of EUGT11 from Oryza sativa in Pichia pastoris for highly efficient one-pot production of rebaudioside D from rebaudioside A" Int J Biol Macromol ., 第163卷, 2020年9月22日 (2020 - 09 - 22), 参见摘要	1-6

☒ 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2月2日

国际检索报告邮寄日期

2023年2月8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

传真号 (86-10)62019451

授权官员

邵旭倩

电话号码 (+86) 010-62411298

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	Xu-Xu Huang等. "A novel UDP-glycosyltransferase 91C1 confers specific herbicide resistance through detoxification reaction in Arabidopsis" Plant Physiol Biochem, 2020年12月27日 (2020 - 12 - 27), 参见摘要	1-6

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/CN2022/131774

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	114045273	B	2022年7月22日	无			
US	2015315623	A1	2015年11月5日	CA	2982075	A1	2015年11月12日
				EP	3140314	A1	2017年3月15日
				EP	3140314	A4	2017年10月18日
				EP	3140314	B1	2019年7月31日
				MX	2016014506	A	2017年2月23日
				MX	367883	B	2019年9月10日
				DK	3140314	T3	2019年10月21日
				US	9522929	B2	2016年12月20日
				JP	2017519812	A	2017年7月20日
				JP	6641357	B2	2020年2月5日
				WO	2015171555	A1	2015年11月12日
				HUE	045937	T2	2020年1月28日
				AU	2015256232	A1	2016年11月24日
				AU	2015256232	B2	2019年9月26日
				US	2018009835	A1	2018年1月11日
				US	10597418	B2	2020年3月24日
				KR	20160147994	A	2016年12月23日
				KR	102378988	B1	2022年3月28日
				EP	4023660	A1	2022年7月6日
				US	2016208225	A1	2016年7月21日
				US	10138263	B2	2018年11月27日
				EP	3418288	A1	2018年12月26日
				EP	3418288	B1	2022年1月19日
				US	2016208303	A1	2016年7月21日
				US	9765104	B2	2017年9月19日
				US	2018051049	A1	2018年2月22日
				US	9988414	B2	2018年6月5日
				US	2018244709	A1	2018年8月30日
				US	10450339	B2	2019年10月22日
				US	2018037600	A1	2018年2月8日
				US	10654881	B2	2020年5月19日
				ZA	201607592	B	2019年2月27日
				BR	112016025147	A2	2017年12月12日
				US	2016207954	A1	2016年7月21日
				US	9527880	B2	2016年12月27日
				ES	2750373	T3	2020年3月25日
				AR	100277	A1	2016年9月21日
				US	2020361978	A1	2020年11月19日
				US	10941174	B2	2021年3月9日
CN	113584016	A	2021年11月2日	无			