

(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
2018 年 4 月 26 日 (26.04.2018)



(10) 国际公布号
WO 2018/072211 A1

(51) 国际专利分类号:
C12P 19/56 (2006.01) **C12R 1/865** (2006.01)
C12R 1/185 (2006.01) **C12R 1/84** (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2016/102942

(22) 国际申请日: 2016 年 10 月 21 日 (21.10.2016)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 苏州汉酶生物技术有限公司
(**ENZIMEWORKS, INC.**) [CN/CN]; 中国江苏省
苏州市张家港市港城大道 603 号, Jiangsu
215600 (CN)。百事可乐公司(**PEPSICO INC.**)
[US/US]; 美国纽约州霍桑镇天际线路 3
号, New York 10532 (US)。

(72) 发明人: 陶军华(**TAO, Alex**); 中国江苏省苏州市
张家港市港城大道 603 号, Jiangsu 215600 (CN)。
李国庆(**LI, Guoqing**); 中国江苏省苏州市张家
港市港城大道 603 号, Jiangsu 215600 (CN)。王
文霞(**WANG, Wenxia**); 中国江苏省苏州市张家
港市港城大道 603 号, Jiangsu 215600 (CN)。郑
雷雷(**ZHENG, Leilei**); 中国江苏省苏州市张家
港市港城大道 603 号, Jiangsu 215600 (CN)。朱
春磊(**ZHU, Chunlei**); 中国江苏省苏州市张家
港市港城大道 603 号, Jiangsu 215600 (CN)。梁晓
亮(**LIANG, Xiaoliang**); 中国江苏省苏州市张家
港市港城大道 603 号, Jiangsu 215600 (CN)。陈
车翹(**CHAN, Kuikui**); 中国江苏省苏州市张家
港市港城大道 603 号, Jiangsu 215600 (CN)。李
托马斯(**LEE, Thomas**); 美国纽约州霍桑镇天
际线路 3 号, New York 10532 (US)。芬纳蒂麦
克(**FINNERTY, Mike**); 美国纽约州霍桑镇天
际线路 3 号, New York 10532 (US)。

(74) 代理人: 苏州创元专利商标事务所有限公
司(**SUZHOU CREATOR PATENT & TRADEMARK
AGENCY LTD.**); 中国江苏省苏州市干将西
路 93 号, Jiangsu 215002 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家
保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP,
KE, KG, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU,
LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA,
RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST,
SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区
保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,
NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则 4.17 的声明:

— 发明人资格(细则 4.17 (iv))

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条 (3))。
— 包括说明书序列列表部分(细则 5.2 (a))。

(54) Title: METHOD FOR PREPARING REBAUDIOSIDE J USING ENZYMATIC METHOD

(54) 发明名称: 一种酶法制备瑞鲍迪甙 J 的方法

(57) Abstract: Provided is a method for preparing rebaudioside J using an enzymatic method, comprising using rebaudioside A as a substrate, and making the substrate, in the presence of a glycosyl donor, react under the catalysis of a UDP-glycosyltransferase-containing recombinant cell and/or UDP-glycosyltransferase prepared therefrom to generate rebaudioside J.

(57) 摘要: 提供了一种酶法制备瑞鲍迪甙 J 的方法, 该方法以瑞鲍迪甙 A 为底物, 在糖基供体存在下, 在有 UDP-糖基转移酶的重组细胞和/或其制备的 UDP-糖基转移酶的催化下, 反应生成瑞鲍迪甙 J。



WO 2018/072211 A1

一种酶法制备瑞鲍迪甙 J 的方法

技术领域

5 本发明涉及一种瑞鲍迪甙 J 的制备方法，特别涉及一种瑞鲍迪甙 J 的生物制备方法。

背景技术

甜味剂是一类广泛应用于饮料及糖果等食品生产的食品添加剂，其既可以在食品的生产过程中添加，也可以在家庭烘焙时经过适当稀释作为蔗糖的替代品使用。甜味剂包括天然甜味剂和人工甜味剂，前者包括蔗糖、高果糖玉米糖浆、蜜糖等，后者包括阿斯巴甜、糖精等。

10 甜菊糖是一类从植物甜菊中提取出来的天然甜味剂，目前已被广泛用在食品及饮料中。甜菊的提取物中具有包含瑞鲍迪甙在内的多种甜菊糖，天然提取的甜菊糖不同的批次成分差异较大，需要后续的提纯。

瑞鲍迪甙 J 在甜菊叶中甜菊糖的比例不超过 0.5%，用传统提取的方法得到高纯度的瑞鲍迪甙 J 极其困难，限制了对瑞鲍迪甙 J 的深入研究，也阻碍了其商业化的应用。

15 发明内容

本发明所要解决的技术问题是克服现有技术的不足，提供一种酶法制备瑞鲍迪甙 J 的方法，该方法可以较低的成本、较短的周期生产出高纯度的瑞鲍迪甙 J 产品。

为解决以上技术问题，本发明采取如下技术方案：

20 一种酶法制备瑞鲍迪甙 J 的方法，以瑞鲍迪甙 A 为底物，在糖基供体存在下，在含有 UDP-糖基转移酶的重组细胞和/或其制备的 UDP-糖基转移酶的催化下，反应生成瑞鲍迪甙 J。UDP-糖基转移酶即尿苷二磷酸糖基转移酶，简称 UGT，是已知的。

优选地，所述糖基供体为鼠李糖基供体。

更优选地，所述鼠李糖基供体为 UDP-鼠李糖。

优选地，所述 UDP-糖基转移酶为来自水稻（*Oryza sativa*）的 UGT-B。

25 优选地，所述来自水稻的 UGT-B 的氨基酸序列与序列表中所示的序列 2 具有至少 60% 的一致性。

更优选地，所述来自水稻的 UGT-B 的氨基酸序列与序列表中所示的序列 2 具有至少 70% 的一致性。

进一步地，所述来自水稻的 UGT-B 的氨基酸序列与序列表中所示的序列 2 具有至少 80% 的一致性。

更进一步地，所述来自水稻的 UGT-B 的氨基酸序列与序列表中所示的序列 2 具有至少 90% 的一致性。

5 根据一个具体实例，所述来自水稻的 UGT-B 的氨基酸序列与序列表中所示的序列 2 完全一致。

根据本发明，可以使所述反应在温度 4-50℃ 以及 pH 5.0-9.0 的水相体系中进行。优选地，反应在 35-45℃ 温度以及 pH 7.5-8.5 的水相体系中进行。更优选地，反应在温度 40℃ 下进行，反应在 pH 8.0 下进行。

10 更优选地，反应在磷酸缓冲溶液中进行。

更优选地，反应体系含有 UDP-糖基转移酶的重组细胞和细胞通透剂，是反应在细胞通透剂的存在下进行。进一步地，所述细胞通透剂为甲苯，且甲苯在反应体系中的体积比浓度为 1-3%。更进一步地，甲苯的体积比浓度为 2%。

更优选地，将反应所用全部原料加入到反应釜中，混合均匀后置于设定温度下，搅拌反
15 应。反应完毕后，通过提纯处理即可获得达到使用要求的瑞鲍迪甙 J 产品。一个具体的提纯方法是经包括树脂分离在内的后处理，按照该提纯方法，可获得纯度高达 95% 的瑞鲍迪甙 J 产品。

优选地，所述重组细胞为微生物细胞。

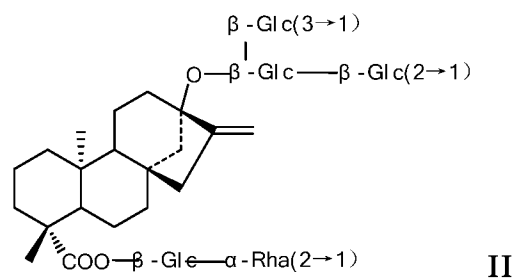
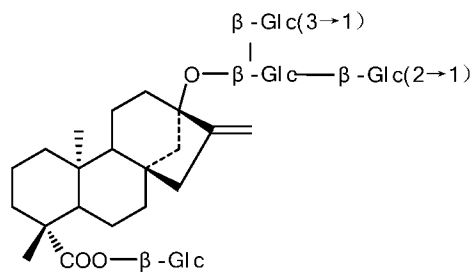
更优选地，所述微生物为大肠埃希氏杆菌、酿酒酵母或毕赤酵母。

20 由于以上技术方案的实施，本发明与已有技术相比具有如下优势：

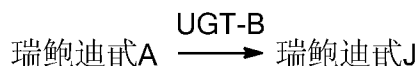
本发明提供的酶法制备瑞鲍迪甙 J 的方法具有重要的应用价值。由于酶法生产的底物瑞鲍迪甙 A 可大量获得，瑞鲍迪甙 J 的产量不受原材料的限制，极大的降低了生产成本。此外，植物中的甜菊糖含量低，且有较多不同结构的甜菊糖，很难提取较纯的产品，与已有从甜菊叶中提取瑞鲍迪甙 J 的技术相比，采用本发明的酶法合成方法能够提供纯度更高的产品，必将
25 推动对新型甜菊糖苷瑞鲍迪甙 J 的研究和应用。

具体实施方式

瑞鲍迪甙 A、瑞鲍迪甙 J 的结构式分别参见式 I 和 II。



本发明主要提供的瑞鲍迪甙 J 的合成路线如下：



本发明所用的 UGT-B 可以酶冻干粉形式存在或存在于重组细胞中。

5 UGT-B 的获得方法如下：

利用分子克隆技术、基因工程技术获得 UGT-B 的重组大肠埃希氏杆菌（或其它微生物菌）表达菌株，然后将重组大肠埃希氏杆菌发酵，制备得到含有 UGT-B 的重组细胞，或由上述重组细胞制备得到 UGT-B 的冻干粉。

10 本发明所述的分子克隆技术和基因工程技术均是已知的。分子克隆技术可参见《分子克隆实验指南》第三版（J.沙姆布鲁克著,2005）。

采用基因工程技术构建本发明重组菌株的表达步骤如下：

（1）（根据序列表中所示的序列 1 及序列 2）基因合成所需的基因片段，连入 pUC57 载体，两端分别加上 NdeI 和 BamHI 酶切位点；

15 （2）通过双酶切、连接，将各基因片段插入表达载体 pET30a 相应的酶切位点中，使各基因置于 T7 启动子的控制之下；

（3）将重组质粒转化进入大肠埃希氏杆菌 BL21（DE3）中，利用 IPTG 诱导目的蛋白表达，得到 UGT-B 的重组大肠埃希氏杆菌表达菌株。

利用含有 UGT-B 的重组大肠埃希氏杆菌表达菌株制备含有 UGT-B 的重组细胞、UGT-B 的冻干粉的步骤如下：

20 以 1%比例将含有 UGT-B 的重组大肠埃希氏杆菌表达菌株接种到 4ml 液体 LB 培养基中，37℃振荡培养（200 rpm）过夜，取过夜培养物以 1%接种量转接于 50 ml 液体 LB 培养基，37℃振荡培养（200 rpm）至 OD600 值达到 0.6-0.8，加入终浓度 0.4 mM IPTG 于 20℃振荡培养过夜。诱导结束后离心收集细胞（8,000 rpm，10 min），用 5 ml 2 mmol/L 磷酸缓冲液（pH7.0）重悬细胞，获得所述重组细胞，进一步于冰浴中超声波破碎细胞，将破碎液离心（8,000 rpm，

10 min), 收集上清液冻干 24 h, 获得所述冻干粉。

下面结合具体的实施例对本发明作更为详细的描述。

实施例 1: 制备含 UGT-B 的重组大肠杆菌细胞

根据序列 3 及序列 4, 基因合成 UGT-B 基因片段, 两端分别加上 *NdeI* 和 *BamHI* 酶切位点, 连入 pUC57 载体 (苏州金唯智生物技术有限公司生产)。将 UGT 基因片段用限制性内切酶 *NdeI* 和 *BamHI* 酶切, 回收纯化片段, 加入 T4 连接酶将片段连入 pET30a 对应酶切位点, 转化 BL21 (DE3) 菌株。

以 1% 比例将 UGT 菌种接种到 4 ml 液体 LB 培养基, 37 °C 振荡培养 (200 rpm) 过夜, 取过夜培养物以 1% 接种量转接于 50 ml 液体 LB 培养基, 37 °C 振荡培养 (200 rpm) 至 OD₆₀₀ 值达到 0.6-0.8, 加入终浓度 0.4 mM IPTG 于 20 °C 振荡培养过夜。诱导结束后离心收集细胞 (8,000 rpm, 10 min), 用 5 ml 2 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH7.0) 重悬细胞, 获得含 UGT-B 的重组细胞用于催化。

实施例 2: 制备 UGT-B 冻干粉

将实施例 3 中制得的 UGT-B 的重组细胞于冰浴中超声波破碎细胞, 将破碎液离心 (8,000 rpm, 10 min), 收集上清液冻干 24 h, 获得 UGT-B 的冻干粉。

实施例 3: 以瑞鲍迪甙 A 为底物在 UDP-糖基转移酶的催化下合成瑞鲍迪甙 J

在本实施例中, 按照实施例 2 方法制备的 UGT-B 冻干粉被用于催化合成瑞鲍迪甙 J。

在反应体系中依次加入 1 L 0.05 mol/L 磷酸缓冲液 (pH8.0), 2 g UDP 鼠李糖, 1 g 瑞鲍迪甙 A, UGT-B 冻干粉 10 g 混合均匀后置于 40 °C 水浴, 300 rpm 搅拌反应 24 h。反应结束后, 取 500 μl 反应液加入等体积无水甲醇混匀, 8,000 rpm 离心 10 min 取上清液过滤膜后用高效液相色谱检测 (色谱条件: 色谱柱: Agilent eclipse SB-C18 4.6×150mm; 检测波长: 210 nm; 流动相: 乙腈: 去离子水 = 24%: 76%; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 30 °C)。瑞鲍迪甙 A 的转化率为 90% 以上。经硅胶树脂分离、结晶等后处理纯化后得到瑞鲍迪甙 J 0.52 g, 纯度大于 95%。

实施例 4: 以瑞鲍迪甙 A 为底物在 UDP-糖基转移酶的重组细胞的催化下合成瑞鲍迪甙 J

在本实施例中, 按照实施例 1 方法制备的含 UGT-B 的重组细胞用于催化合成瑞鲍迪甙 J。

在反应体系中依次加入 1 L 0.05 mol/L 磷酸缓冲液 (pH8.0), 2 g UDP-鼠李糖, 1 g 瑞鲍迪甙 A, 20ml 甲苯, UGT-B 全细胞 40 g 混合均匀后置于 40 °C 水浴, 300 rpm 搅拌反应 24 h。

反应结束后，取 500 μ l 反应液离心，上清加入等体积无水甲醇混匀，8,000 rpm 离心 10 min 取上清液过滤膜后用高效液相色谱检测（色谱条件：色谱柱：Agilent eclipse SB-C18 4.6 $\times$ 150mm；检测波长：210 nm；流动相：乙腈：去离子水=24%：76%；流速：1.0 mL/min；柱温：30 $^{\circ}$ C）。瑞鲍迪甙 A 的转化率为 90%以上。经硅胶树脂分离、结晶等后处理纯化后得到瑞鲍迪甙 C 0.49 g，纯度大于 95%。

上述实施例只为说明本发明的技术构思及特点，其目的在于让熟悉此项技术的人士能够了解本发明的内容并据以实施，并不能以此限制本发明的保护范围，凡根据本发明精神实质所作的等效变化或修饰，都应涵盖在本发明的保护范围之内。

权利要求书

1. 一种酶法制备瑞鲍迪甙 J 的方法，其特征在于：以瑞鲍迪甙 A 为底物，在糖基供体存在下，在含有 UDP-糖基转移酶的重组细胞和/或其制备的 UDP-糖基转移酶的催化下，反应生成瑞鲍迪甙 J。
2. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于：所述糖基供体为鼠李糖基供体。
3. 根据权利要求 2 所述的方法，其特征在于：所述鼠李糖基供体为 UDP-鼠李糖。
4. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于：所述 UDP-糖基转移酶为来自水稻的 UGT-B。
5. 根据权利要求 4 所述的方法，其特征在于：所述来自水稻的 UGT-B 的氨基酸序列与序列表中所示的序列 2 具有至少 60% 的一致性。
6. 根据权利要求 5 所述的方法，其特征在于：所述来自水稻的 UGT-B 的氨基酸序列与序列表中所示的序列 2 具有至少 70% 的一致性。
7. 根据权利要求 6 所述的方法，其特征在于：所述来自水稻的 UGT-B 的氨基酸序列与序列表中所示的序列 2 具有至少 80% 的一致性。
8. 根据权利要求 7 所述的方法，其特征在于：所述来自水稻的 UGT-B 的氨基酸序列与序列表中所示的序列 2 具有至少 90% 的一致性。
9. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于：反应在 35-45℃ 温度以及 pH7.5-8.5 的水相体系中进行。
10. 根据权利要求 9 所述的方法，其特征在于：反应在磷酸缓冲溶液中进行。
11. 根据权利要求 9 所述的方法，其特征在于：反应体系含有 UDP-糖基转移酶的重组细胞和细胞通透剂。
12. 根据权利要求 11 所述的方法，其特征在于：所述细胞通透剂为甲苯，且甲苯在反应体系中的体积比浓度为 1-3%。
13. 根据权利要求 9 所述的方法，其特征在于：将反应所用全部原料加入到反应釜中，混合均匀后置于设定温度下，搅拌反应。
14. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于：所述重组细胞为微生物细胞。
15. 根据权利要求 14 所述的方法，其特征在于：所述微生物为大肠埃希氏杆菌、酿酒酵母或毕赤酵母。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2016/102942

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 filed or furnished:
 - a. (means)
 - ☐ on paper
 - ☒ in electronic form
 - b. (time)
 - ☒ in the international application as filed
 - ☐ together with the international application in electronic form
 - ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2016/102942

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P 19/56 (2006.01) i; C12R 1/185 (2006.01) i; C12R 1/865 (2006.01) i; C12R 1/84 (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)

C12P, C12R

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, CPRSABS, DWPI, SIPOABS, ISI Web of Knowledge, CNKI, BAIDU and search terms: 瑞鲍迪忒 J, 莱鲍迪忒 J, 莱鲍迪
昔 J, 甜菊醇糖苷, 瑞鲍迪忒 A, 莱鲍迪忒 A, 莱鲍迪昔 A, 糖基供体, 鼠李糖, 糖基转移酶, rebaudioside J, Reb J, RJ, steviol
glycosides, rebaudioside A, Reb A, RA, rhamnose, UDP-glycosyl transferase, UGT-B etc.;
NATIONAL BIO-SEQUENCE DATABASE OF CHINESE PATENT, Genbank, EMBL and sequence searched: SEQ ID NO: 2.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 103974628 A (PURECIRCLE SDN BHD; THE COCA-COLA COMPANY; MARKOSYAN, A.; PRAKASH, I.), 06 August 2014 (06.08.2014), see claims 1-10 and 13, and description, paragraphs 72, 97 and 126-137	1, 9-15
Y	CN 103974628 A (PURECIRCLE SDN BHD; THE COCA-COLA COMPANY; MARKOSYAN, A.; PRAKASH, I.), 06 August 2014 (06.08.2014), see claims 1-10 and 13, and description, paragraphs 72, 97 and 126-137	2-8
Y	王军, 侯丙凯. “植物小分子化合物的糖基化与糖基转移酶”, 植物生理学通讯, 44(5), 15 October 2008 (15.10.2008), see page 997, left-hand column, paragraph 2 to page 998, left-hand column, paragraph 1, (WANG, Jun; HOU, Bingkai; “Glycosylation and Glycosyltransferase of Small Molecular Compounds of Plant”, Plant Physiology Communications)	2, 3
A	王军, 侯丙凯. “植物小分子化合物的糖基化与糖基转移酶”, 植物生理学通讯, 44(5), 15 October 2008 (15.10.2008), see pages 997-1003, (WANG, Jun; HOU, Bingkai; “Glycosylation and Glycosyltransferase of Small Molecular Compounds of Plant”, Plant Physiology Communications)	1, 4-15
Y	CN 103757074 A (ENZYMWORKS, INC.; PEPSICO INC.), 30 April 2014 (30.04.2014), see claims 1-10, embodiments 3, 4, 8 and 10, and sequence 4	4-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	“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
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“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
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“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
“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)	“&” document member of the same patent family
“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	

Date of the actual completion of the international search 28 June 2017	Date of mailing of the international search report 12 July 2017
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer MA, Zhenlian Telephone No. (86-10) 62412131

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/CN2016/102942

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 103757074 A (ENZYMWORKS, INC.; PEPSICO INC.), 30 April 2014 (30.04.2014), see entire document	1-3, 9-15
Y	CN 105200098 A (ENZYMWORKS, INC.; PEPSICO INC.), 30 December 2015 (30.12.2015), see claims 1-13, embodiments 4-6, 11 and 13, and sequence 3	4-8
A	CN 105200098 A (ENZYMWORKS, INC.; PEPSICO INC.), 30 December 2015 (30.12.2015), see entire document	1-3, 9-15
Y	WO 2014193934 A1 (COCA COLA CO. et al.), 04 December 2014 (04.12.2014), see claims 1-10, 24 and 38, and sequence 8	4-8
A	WO 2014193934 A1 (COCA COLA CO. et al.), 04 December 2014 (04.12.2014), see entire document	1-3, 9-15
Y	CN 103397064 A (ENZYMWORKS, INC.; PEPSICO INC.), 20 November 2013 (20.11.2013), see claims 1-14, embodiments 3, 4, 6, 8 and 10, and sequence 4	4-8
A	CN 103397064 A (ENZYMWORKS, INC.; PEPSICO INC.), 20 November 2013 (20.11.2013), see entire document	1-3, 9-15
A	MOHAMED, A.A.A. et al., "UDP-dependent Glycosyltransferases Involved in the Biosynthesis of Steviol Glycosides", Journal of Plant Physiology, 168(10), 07 April 2011 (07.04.2011), see pages 1136-1141	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2016/102942

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 103974628 A	06 August 2014	WO 2013176738 A9 EP 2852296 A4 MX 2014014080 A US 2016192685 A1 US 2017112176 A1 WO 2013176738 A1 US 9243273 B2 EP 2852296 A1 JP 2015519059 A US 2015031869 A1	06 February 2014 22 June 2016 21 July 2015 07 July 2016 27 April 2017 28 November 2013 26 January 2016 01 April 2015 09 July 2015 29 January 2015
CN 103757074 A	30 April 2014	CN 103757074 B	02 December 2015
CN 105200098 A	30 December 2015	WO 2017000366 A1	05 January 2017
WO 2014193934 A1	04 December 2014	US 2014357588 A1 EP 3004128 A1 EP 3004127 A1 CA 2913252 A1 MX 2015016096 A MX 2015016362 A WO 2014193888 A1 US 2016198748 A1 CN 105408339 A CN 105492453 A	04 December 2014 13 April 2016 13 April 2016 04 December 2014 21 March 2016 13 February 2017 04 December 2014 14 July 2016 16 March 2016 13 April 2016
CN 103397064 A	20 November 2013	CN 103397064 B US 2016298159 A1 MX 2016001986 A AU 2013398146 A1 JP 2016527892 A CA 2921247 A1 WO 2015021690 A1 EP 3034614 A1 EP 3034614 A4	15 April 2015 13 October 2016 26 October 2016 07 April 2016 15 September 2016 19 February 2015 19 February 2015 22 June 2016 12 April 2017

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2016/102942

A. 主题的分类 C12P 19/56(2006.01)i; C12R 1/185(2006.01)i; C12R 1/865(2006.01)i; C12R 1/84(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) C12P, C12R 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)) CNABS, CPRSABS, DWPI, SIPOABS, ISI Web of Knowledge, CNKI, BAIDU和检索词: 瑞鲍迪甙J, 莱鲍迪甙J, 莱鲍迪苷J, 甜菊醇糖苷, 瑞鲍迪甙A, 莱鲍迪甙A, 莱鲍迪苷A, 糖基供体, 鼠李糖, 糖基转移酶, rebaudioside J, Reb J, RJ, steviol glycosides, rebaudioside A, Reb A, RA, rhamnose, UDP-glycosyl transferase, UGT-B等; 中国专利生物序列检索系统, Genbank, EMBL和检索的序列: SEQ ID NO: 2。																				
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>CN 103974628 A (谱赛科有限责任公司, 可口可乐公司, 阿韦季克 马尔科相, 因德拉普拉卡什) 2014年 8月 6日 (2014 - 08 - 06) 参见权利要求1-10、13, 说明书第72、97、126-137段</td> <td>1, 9-15</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 103974628 A (谱赛科有限责任公司, 可口可乐公司, 阿韦季克 马尔科相, 因德拉普拉卡什) 2014年 8月 6日 (2014 - 08 - 06) 参见权利要求1-10、13, 说明书第72、97、126-137段</td> <td>2-8</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>王军, 侯丙凯. “植物小分子化合物的糖基化与糖基转移酶” 《植物生理学通讯》, 第44卷, 第5期, 2008年 10月 15日 (2008 - 10 - 15), 参见第997页左栏第2段-第998页左栏第1段</td> <td>2, 3</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>王军, 侯丙凯. “植物小分子化合物的糖基化与糖基转移酶” 《植物生理学通讯》, 第44卷, 第5期, 2008年 10月 15日 (2008 - 10 - 15), 参见第997-1003页</td> <td>1, 4-15</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 103757074 A (苏州汉酶生物技术有限公司, 百事可乐公司) 2014年 4月 30日 (2014 - 04 - 30) 参见权利要求1-10、实施例3、4、8、10, 序列4</td> <td>4-8</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	CN 103974628 A (谱赛科有限责任公司, 可口可乐公司, 阿韦季克 马尔科相, 因德拉普拉卡什) 2014年 8月 6日 (2014 - 08 - 06) 参见权利要求1-10、13, 说明书第72、97、126-137段	1, 9-15	Y	CN 103974628 A (谱赛科有限责任公司, 可口可乐公司, 阿韦季克 马尔科相, 因德拉普拉卡什) 2014年 8月 6日 (2014 - 08 - 06) 参见权利要求1-10、13, 说明书第72、97、126-137段	2-8	Y	王军, 侯丙凯. “植物小分子化合物的糖基化与糖基转移酶” 《植物生理学通讯》, 第44卷, 第5期, 2008年 10月 15日 (2008 - 10 - 15), 参见第997页左栏第2段-第998页左栏第1段	2, 3	A	王军, 侯丙凯. “植物小分子化合物的糖基化与糖基转移酶” 《植物生理学通讯》, 第44卷, 第5期, 2008年 10月 15日 (2008 - 10 - 15), 参见第997-1003页	1, 4-15	Y	CN 103757074 A (苏州汉酶生物技术有限公司, 百事可乐公司) 2014年 4月 30日 (2014 - 04 - 30) 参见权利要求1-10、实施例3、4、8、10, 序列4	4-8
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
X	CN 103974628 A (谱赛科有限责任公司, 可口可乐公司, 阿韦季克 马尔科相, 因德拉普拉卡什) 2014年 8月 6日 (2014 - 08 - 06) 参见权利要求1-10、13, 说明书第72、97、126-137段	1, 9-15																		
Y	CN 103974628 A (谱赛科有限责任公司, 可口可乐公司, 阿韦季克 马尔科相, 因德拉普拉卡什) 2014年 8月 6日 (2014 - 08 - 06) 参见权利要求1-10、13, 说明书第72、97、126-137段	2-8																		
Y	王军, 侯丙凯. “植物小分子化合物的糖基化与糖基转移酶” 《植物生理学通讯》, 第44卷, 第5期, 2008年 10月 15日 (2008 - 10 - 15), 参见第997页左栏第2段-第998页左栏第1段	2, 3																		
A	王军, 侯丙凯. “植物小分子化合物的糖基化与糖基转移酶” 《植物生理学通讯》, 第44卷, 第5期, 2008年 10月 15日 (2008 - 10 - 15), 参见第997-1003页	1, 4-15																		
Y	CN 103757074 A (苏州汉酶生物技术有限公司, 百事可乐公司) 2014年 4月 30日 (2014 - 04 - 30) 参见权利要求1-10、实施例3、4、8、10, 序列4	4-8																		
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。																				
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件																				
国际检索实际完成的日期		国际检索报告邮寄日期																		
2017年 6月 28日		2017年 7月 12日																		
ISA/CN的名称和邮寄地址		受权官员																		
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		马振莲 电话号码 (86-10)62412131																		

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	CN 103757074 A (苏州汉酶生物技术有限公司, 百事可乐公司) 2014年 4月 30日 (2014 - 04 - 30) 参见全文	1-3, 9-15
Y	CN 105200098 A (苏州汉酶生物技术有限公司, 百事可乐公司) 2015年 12月 30日 (2015 - 12 - 30) 参见权利要求1-13、实施例4-6、11、13, 序列3	4-8
A	CN 105200098 A (苏州汉酶生物技术有限公司, 百事可乐公司) 2015年 12月 30日 (2015 - 12 - 30) 参见全文	1-3, 9-15
Y	WO 2014193934 A1 (COCA COLA CO等) 2014年 12月 4日 (2014 - 12 - 04) 参见权利要求1-10、24、38, 序列8	4-8
A	WO 2014193934 A1 (COCA COLA CO等) 2014年 12月 4日 (2014 - 12 - 04) 参见全文	1-3, 9-15
Y	CN 103397064 A (苏州汉酶生物技术有限公司, 百事可乐公司) 2013年 11月 20日 (2013 - 11 - 20) 参见权利要求1-14, 实施例3、4、6、8、10, 序列4	4-8
A	CN 103397064 A (苏州汉酶生物技术有限公司, 百事可乐公司) 2013年 11月 20日 (2013 - 11 - 20) 参见全文	1-3, 9-15
A	Amal A.A. Mohamed等. "UDP-dependent glycosyltransferases involved in the biosynthesis of steviol glycosides" 《Journal of Plant Physiology》, 第168卷, 第10期, 2011年 4月 7日 (2011 - 04 - 07), 参见第1136-1141页	1-15

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对要求保护的发明必要的核苷酸和/或氨基酸序列，国际检索是在下列基础上进行的：
- a. (提交提供)
- ☐ 纸件形式
- ☒ 电子形式
- b. (提交时间)
- ☒ 含在申请提交时的国际申请中
- ☐ 以电子形式与国际申请一起提交
- ☐ 为检索之用随后提交本单位
2. ☐ 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的申请中的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。
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/CN2016/102942

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	103974628	A	2014年 8月 6日	WO	2013176738	A9	2014年 2月 6日
				EP	2852296	A4	2016年 6月 22日
				MX	2014014080	A	2015年 7月 21日
				US	2016192685	A1	2016年 7月 7日
				US	2017112176	A1	2017年 4月 27日
				WO	2013176738	A1	2013年 11月 28日
				US	9243273	B2	2016年 1月 26日
				EP	2852296	A1	2015年 4月 1日
				JP	2015519059	A	2015年 7月 9日
				US	2015031869	A1	2015年 1月 29日
CN	103757074	A	2014年 4月 30日	CN	103757074	B	2015年 12月 2日
CN	105200098	A	2015年 12月 30日	WO	2017000366	A1	2017年 1月 5日
WO	2014193934	A1	2014年 12月 4日	US	2014357588	A1	2014年 12月 4日
				EP	3004128	A1	2016年 4月 13日
				EP	3004127	A1	2016年 4月 13日
				CA	2913252	A1	2014年 12月 4日
				MX	2015016096	A	2016年 3月 21日
				MX	2015016362	A	2017年 2月 13日
				WO	2014193888	A1	2014年 12月 4日
				US	2016198748	A1	2016年 7月 14日
				CN	105408339	A	2016年 3月 16日
				CN	105492453	A	2016年 4月 13日
CN	103397064	A	2013年 11月 20日	CN	103397064	B	2015年 4月 15日
				US	2016298159	A1	2016年 10月 13日
				MX	2016001986	A	2016年 10月 26日
				AU	2013398146	A1	2016年 4月 7日
				JP	2016527892	A	2016年 9月 15日
				CA	2921247	A1	2015年 2月 19日
				WO	2015021690	A1	2015年 2月 19日
				EP	3034614	A1	2016年 6月 22日
				EP	3034614	A4	2017年 4月 12日