

(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
2020 年 7 月 2 日 (02.07.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/135657 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 9/16 (2006.01) *C11B 3/00* (2006.01)
C12N 15/55 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/128970

(22) 国际申请日: 2019 年 12 月 27 日 (27.12.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201811620055.7 2018 年 12 月 28 日 (28.12.2018) CN

(71) 申请人: 丰益(上海)生物技术研发中心有限公司 (WILMAR (SHANGHAI) BIOTECHNOLOGY RESEARCH & DEVELOPMENT CENTER CO., LTD) [CN/CN]; 中国上海市浦东新区高东路 118 号, Shanghai 200137 (CN)。

(72) 发明人: 宣姚吉 (XUAN, Yaoji); 中国上海市浦东新区高东路 118 号, Shanghai 200137 (CN)。牛其文 (NIU, Qiwen); 中国上海市浦东新区高东路 118 号, Shanghai 200137 (CN)。徐正军 (XU, Zhengjun); 中国上海市浦东新区高东路 118 号, Shanghai 200137 (CN)。

(74) 代理人: 上海专利商标事务所有限公司 (SHANGHAI PATENT & TRADEMARK LAW OFFICE, LLC); 中国上海市桂平路 435 号, Shanghai 200233 (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, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,

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)。

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))。

(54) Title: PHOSPHOLIPASE C MUTANT WITH HIGH ENZYME ACTIVITY

(54) 发明名称: 一种高酶活的磷脂酶C突变体

(57) Abstract: Provided in the present invention is a phospholipase C mutant with high enzyme activity, a polypeptide with the sequence as shown in SEQ ID NO:7, or a polypeptide derived from the phospholipase C formed by performing substitution, deletion or addition of one or a plurality of amino acids on the polypeptide of SEQ ID NO:7 while retaining the phospholipase C activity provided by SEQ ID NO:7. The phospholipase C mutant of the present invention can improve degumming efficiency and increase the yield of diacylglycerol (DAG) during degumming.

(57) 摘要: 本发明提供一种高酶活的磷脂酶C突变体, 其序列如SEQ ID NO:7所示的多肽, 或在SEQ ID NO:7所述的多肽中经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸, 同时保留SEQ ID NO:7所具备的磷脂酶C活性的由其衍生的多肽。本发明的磷脂酶C突变体能提高脱胶效率, 增加脱胶过程中甘二酯(DAG)的得率。



WO 2020/135657 A1

一种高酶活的磷脂酶 C 突变体

5 技术领域

本发明涉及一种高酶活的磷脂酶 C 突变体。

背景技术

脱胶是油脂精炼的一个重要步骤，而传统的水化脱胶法经济成本高，物料能
10 耗大，环境污染重，所以近些年，很多努力致力于将酶法脱胶用于油脂精炼中的
脱胶环节，并取得了很大的进展。同传统方法相比，酶法脱胶能够提高经济效益，
做到节能减排，对生态环境污染少，在环保、经济、质量等方面具有较大的优势。
油脂脱胶所用的酶即为磷脂酶，并且同其他脱胶酶相比，磷脂酶 C(PLC)表现出
更大的优势，比如，增加甘二酯(DAG)的得率，以及减少得油量的损失。

15 *Bacillus cereus* 的 PC-PLC (BC-PC-PLC)是研究较早的一种磷脂酶 C。
BC-PC-PLC 全长为 283 个氨基酸，其中包含 24 个氨基酸的信号肽和 14 个氨基酸
的前导肽，成熟肽为 245 个氨基酸(Johansen et al. 1988)。BC-PC-PLC 的晶体结构
已经被报道，其由多个螺旋结构域组成，催化位点为 55 位天冬氨酸，并且含有
至少三个 Zn²⁺结合位点(Hough et al. 1989)。BC-PC-PLC 的异源表达研究较少目
20 前只在 *Bacillus subtilis* 和 *pichia pastoris* 中进行表达 (Durban et al.2007; Seo et al.
2004)。

在之前的研究中，发明人已经通过将 BC-PC-PLC 的四个氨基酸即 56 位，63
位，131 位和 134 位天冬酰胺分别突变为组氨酸，天冬氨酸，丝氨酸和天冬氨酸，
比酶活相比于野生型大大提高。为了进一步提高该磷脂酶 C 的比酶活力和脱胶效
25 率，发明人选择了 BC-PC-PLC 蛋白中第 6 位，第 8 位，第 10 位，第 104 位，第
205 位氨基酸进行随机饱和突变，对已有的磷脂酶 C 突变体进行定向进化，希望
能够得到比酶活进一步提高的突变体，从而能够得到更高效的磷脂酶 C，提高脱
胶效率，增加脱胶过程中甘二酯(DAG)的得率。

发明内容

本发明提供一种分离的多肽，所述多肽选自：

(1) SEQ ID NO:7 所示的多肽；和

- 5 (2) 与 SEQ ID NO:7 至少 80%，优选至少 85%，更优选至少 90%，更优选至少 95%，更优选至少 97%，更优选至少 98%，更优选至少 99% 的序列同一性，对应于 SEQ ID NO:7 第 6 位、第 8 位、第 10 位和第 104 位中的至少 1 个位置的氨基酸残基分别相应地与 SEQ ID NO: 7 第 6 位、第 8 位、第 10 位和/或第 104 位相同，同时保留 SEQ ID NO: 7 所具备的磷脂酶 C 活性的多肽。

- 10 在一个或多个实施方案中，SEQ ID NO:7 中，第 6 位氨基酸残基是脯氨酸或色氨酸；第 8 位氨基酸残基是丙氨酸、亮氨酸或异亮氨酸；第 10 位和第 104 位氨基酸各自独立为丝氨酸或苏氨酸。

在一个或多个实施方案中，所述分离的多肽如 SEQ ID NO:4 所示。

- 15 本发明还提供一种分离的多肽，所述多肽与 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列具有至少 80%，优选至少 85%，更优选至少 90%，更优选至少 95%，更优选至少 97%，更优选至少 98%，更优选至少 99% 的序列同一性，且所述分离多肽在对应于 SEQ ID NO:4 第 6、8、10 和 104 位上的氨基酸残基分别是脯氨酸、缬氨酸、丝氨酸和丝氨酸；优选的，所述多肽获自枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)。

本发明还提供一种多核苷酸序列，选自：

- 20 (1) 编码本文任一实施方案所述多肽的多核苷酸序列；和
(2) (1) 所述多核苷酸序列的互补序列；和
(3) (1) 或 (2) 所述序列的长 15-30 个碱基的片段；

优选地，所述多核苷酸序列如 SEQ ID NO:3 所示。

- 25 本发明还提供一种核酸构建体，该核酸构建体包含本文任一实施方案所述的多核苷酸序列和一条或多条与该多核苷酸序列操作性连接的调控序列。

在一个或多个实施方案中，所述核酸构建体为载体。

在一个或多个实施方案中，所述载体为表达载体或克隆载体。

本发明还提供一种遗传工程化的宿主细胞，所述宿主细胞含有本文任一实施方案所述的多核苷酸序列或核酸构建体。

本发明还提供一种组合物，所述组合物含有本文任一实施方案所述的多肽和任选的辅料，优选地，所述辅料为选自活性炭、氧化铝、硅藻土、多孔陶瓷、多孔玻璃的吸附材料。

5 本发明还提供本文任一实施方案所述的多肽、多核苷酸序列、核酸构建体、宿主细胞或组合物在油脂精炼、磷脂改性、饲料改良剂、食品工业和医药工业中的应用。

本发明还提供一种酶法脱胶方法，所述方法包括使用本文任一实施方案所述的多肽进行脱胶，优选的，所述方法包括将所述多肽与毛油接触的步骤，优选的，所述步骤包括将所述多肽与 50-70℃ 毛油接触。

10 在一个或多个实施方案中，所述方法包括以下特征中的一项或多项：

(1) 以毛油重量计，所述多肽的添加量为 10~1000ppm，优选为 50~500ppm，更优选为 100~300ppm；

(2) 所述脱胶包括：在 50~60℃ 下搅拌 1~3 小时，然后升温至 80~90℃ 保持 1~10 分钟；和

15 (3) 所述毛油选自：大豆油、葵花籽油、花生油、菜籽油、米糠油、玉米油、橄榄油、棕榈油、棕榈仁油、棕榈软脂、卡诺拉油、蓖麻油、椰子油、苧荬油、棉籽油、榛子油、大麻籽油、亚麻籽油、芒果仁油、白芒花油、牛蹄油、红花油、山茶花油、妥尔油和椿油。

20 **附图说明**

图 1：突变体的比酶活。

图 2：脱胶小试结果。

图 3：磷脂酶活力测定标准曲线。

25 **具体实施方式**

应理解，在本发明范围中，本发明的上述各技术特征和在下文（如实施例）中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合，从而构成优选的技术方案。

本发明提供氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示的分离的多肽，或与 SEQ ID NO:7 至少 80%，优选至少 85%，更优选至少 90%，更优选至少 95%，更优选至

少 97%，更优选至少 98%，更优选至少 99% 的序列同一性，且对应于 SEQ ID NO:7 第 6 位、第 8 位、第 10 位和第 104 位中的至少 1 个位置的氨基酸残基分别相应地与 SEQ ID NO: 7 第 6 位、第 8 位、第 10 位和/或第 104 位相同，同时保留 SEQ ID NO: 7 所具备的磷脂酶 C 活性的多肽。

5 本文中，“分离的”意指在自然界中不存在的一种形式或物质。分离的物质的非限制性例子包括任何非天然存在的物质和至少部分地从与其在自然界中相关联的一种或多种或全部天然存在的组分中除去的任何物质，包括但不限于任何酶、变体、核酸、蛋白质、肽或辅因子。SEQ ID NO:7 中，第 6 位和第 8 位氨基酸残基（Xaa）可以是具有非极性侧链的氨基酸残基，包括但不限于丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸；第 10 位和第 104 位氨基酸残基（Xaa）可以是具有不带电荷的极性侧链的氨基酸，包括但不限于甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸。优选地，SEQ ID NO:7 中，第 6 位氨基酸残基是脯氨酸或色氨酸；第 8 位氨基酸残基是丙氨酸、亮氨酸或异亮氨酸；第 10 位和第 104 位氨基酸各自独立为丝氨酸或苏氨酸。示例性的多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO:4 所示。

10 本发明还包括在 SEQ ID NO: 7 的基础上具有一个或多个（通常为 1-10 个，例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个）氨基酸突变（缺失、插入和/或取代）、同时保留了 SEQ ID NO:4 所示氨基酸序列的磷脂酶 C 活性的多肽。在某些实施方案中，所述氨基酸突变是在 SEQ ID NO:7 的 C 末端和/或 N 末端添加一个或数个（通常为 20 个以内，较佳地为 10 个以内，更佳地为 8 以内）氨基酸的多肽。应理解的是，所述的一个或多个氨基酸突变通常不包括 SEQ ID NO:7 第 6、8、10 和 104 位上的氨基酸（Xaa）全部发生突变的情况。

25 突变优选为保守性取代。例如，在本领域中，用性能相近或相似的氨基酸进行保守性取代时，通常不会改变蛋白质或多肽的功能。“性能相近或相似的氨基酸”包括例如，具有相似侧链的氨基酸残基的家族，这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸（例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸）、具有酸性侧链的氨基酸（例如天冬氨酸、谷氨酸）、具有不带电荷的极性侧链的氨基酸（例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸）、具有非极性侧链的氨基酸（例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸）、

具有 β -分支侧链的氨基酸（例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸）和具有芳香侧链的氨基酸（例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸）。因此，在本发明多肽中来自同一侧链类的另一氨基酸残基替换一个或几个位点，将不会在实质上影响其活性。

5 在本发明中，术语“随机饱和突变”指将需要突变的位点在 PCR 引物中以设计为 NNK 兼并密码子，从而能够覆盖所有 20 种氨基酸达到饱和突变的效果，又由于选择了多个位点进行突变，其组合方式具有随机性，因此作者将此方法称之为随机饱和突变。

10 此外，本领域技术人员公知，在基因克隆操作中，常常需要设计合适的酶切位点，这势必在所表达的蛋白末端引入了一个或多个不相干的残基，而这并不影响目的蛋白的活性。又如为了构建融合蛋白、促进重组蛋白的表达、获得自动分泌到宿主细胞外的重组蛋白、或利于重组蛋白的纯化，常常需要将一些氨基酸序列添加至重组蛋白的 N 末端、C 末端或该蛋白内的其它合适区域内，这类氨基酸序列包括但不限于接头肽、信号肽、前导肽、末端延伸、谷胱甘肽 S-转移酶(GST)、
15 麦芽糖 E 结合蛋白、蛋白 A、标签（如 6His 或 Flag）、或合适的蛋白水解酶位点等。应理解，这些氨基酸序列的存在不会影响到所得多肽的活性。因此，本发明也包括在本发明多肽的 C 末端和/或 N 末端或其蛋白内合适的区域内具有一个或数个利于该多肽表达载体的构建、该多肽的表达和/或纯化的氨基酸的多肽，这些多肽仍具有本文所述的磷脂酶 C 活性。

20 因此，在某些实施方案中，本发明包括与 SEQ ID NO:7 具有至少 80%、优选至少 85%、更优选至少 90%、更优选至少 95%、更优选至少 96%、更优选至少 97%、更优选至少 98%、更优选至少 99% 的序列同一性的氨基酸序列。更进一步地，本发明包括与 SEQ ID NO:4 具有至少 80%、优选至少 85%、更优选至少 90%、更优选至少 95%、更优选至少 96%、更优选至少 97%、更优选至少 98%
25 %、更优选至少 99% 的序列同一性的氨基酸序列；且与 SEQ ID NO:4 和 7 具有所述序列同一性的氨基酸序列在对应于 SEQ ID NO:4 和 7 第 6、8、10 和 104 位上的氨基酸残基未全部发生突变，优选为仍保持为 SEQ ID NO:4 和 7 相应位置上的氨基酸残基，例如仍保持为 SEQ ID NO:4 第 6、8、10 和 104 位上的脯氨酸、缬氨酸、丝氨酸和丝氨酸。更优选地，具有所述序列同一性的氨基酸序列获自枯

草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)。本文中，序列相同性用于描述两个氨基酸序列之间或两个核苷酸序列之间的相关性。可使用本领域周知的方法来计算序列相同性。例如，可使用 EMBOSS 包 (EMBOSS: 欧洲分子生物学开放软件套件，赖斯等，2000，遗传学趋势，16:276-277) 的尼德尔(Needle)程序中所实施的尼德尔曼-翁施 (Needleman-Wunsch) 算法 (Needleman 和 Wunsch, 1970, 分子生物学杂志, 48:443-453) 来确定两个氨基酸序列之间的序列相同性。或者，可使用 NCBI 上的 BLASTP 来计算两条氨基酸序列之间的序列相同性。

根据重组生产方案所用的宿主，本发明的多肽可以是糖基化的，或可以是非糖基化的。

多核苷酸

本申请包括编码本发明多肽的核苷酸序列或其互补序列。SEQ ID NO: 3 显示了本发明多肽的编码序列例子。所述“编码序列”包括编码本发明所述多肽 (尤其是 SEQ ID NO: 7) 的核酸序列。编码本发明多肽的序列可以与例如 SEQ ID NO: 3 所示的编码区序列相同或者是简并的变异体。如本文所用，“简并的变异体”在本发明中是指相同的氨基酸序列，但核苷酸序列有差别的核苷酸序列。

编码本发明多肽的序列包括：只编码成熟多肽的编码序列；成熟多肽的编码序列和各种附加编码序列；成熟多肽的编码序列 (和任选的附加编码序列) 以及非编码序列。

本发明还涉及上述多核苷酸的变异体，其编码与本发明有相同的氨基酸序列的片段、类似物、衍生物和变异形式。这些核苷酸变异体包括取代变异体、缺失变异体和插入变异体。如本领域所知的，等位变异体是一个多核苷酸的替换形式，它可能是一个或多个核苷酸的取代、缺失或插入，但不会从实质上改变其编码的蛋白的功能。

本发明也包括编码本发明多肽的核酸序列 (如 SEQ ID NO: 3 或其互补序列) 的片段。如本文所用，“核酸片段”的长度至少含 15 个核苷酸，较好是至少 30 个核苷酸，更好是至少 50 个核苷酸，最好是至少 100 个核苷酸以上。核酸片段可用于核酸的扩增技术 (如 PCR) 以确定和/或分离编码本发明多肽的多核苷酸。因此，在某些实施例中，核酸片段的长度在 15-30 个碱基。可采用现有技术从本

发明的核酸序列中挑选出适当的核酸片段，用作引物或探针。

本发明的多肽的编码序列或其片段通常可以用 PCR 扩增法、重组法或人工合成的方法获得。对于 PCR 扩增法，可根据本发明所公开的有关核苷酸序列，尤其是开放阅读框序列来设计引物，并用市售的 cDNA 库或按本领域技术人员已知的常规方法所制备的 cDNA 库作为模板，扩增而得有关序列。当序列较长时，常常需要进行两次或多次 PCR 扩增，然后再将各次扩增出的片段按正确次序拼接在一起。

核酸构建体

10 本发明也涉及包括与指导编码序列在合适宿主细胞中，在与该调控序列相适合的条件下表达的一个或多个调控序列可操作连接的本发明的分离多核苷酸的核酸构建体。术语“可操作连接”指调控序列位于适当的位置从而能控制、指导感兴趣的多核苷酸序列的表达。编码本发明多肽的多核苷酸可以多种方式被操作以保证该多肽的表达。

15 调控序列可以是合适的启动子序列，为用于表达编码本发明多肽的多核苷酸的宿主细胞识别的核苷酸序列。启动子序列包含接到多肽表达的转录调控序列。启动子可以是在所选择的宿主细胞中显示转录活性的任何核苷酸序列，包括突变的、截短的和杂合启动子，并且可以从编码与该宿主细胞同源或异源的胞外或胞内多肽的基因获得。

20 用于指导本发明的核酸构建体，特别是在细菌宿主细胞中转录的合适启动子的实例是从噬菌体 T7 启动子、大肠杆菌 lac 操纵子、天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*) 琼脂糖酶基因、枯草芽孢杆菌果聚糖蔗糖酶基因、地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶基因、解淀粉芽孢杆菌 α -淀粉酶基因、地衣芽孢杆菌青霉素酶基因等中获得的启动子序列。

25 用于指导本发明的核酸构建体在丝状真菌宿主细胞正转录的合适启动子的实例是从米曲霉 TAKA 淀粉酶、米黑根毛霉 (*Rhizomucor miehei*) 天冬氨酸蛋白酶、黑曲霉中性 α -淀粉酶、黑曲霉酸稳定的 α -淀粉酶、黑曲霉或泡盛曲霉糖化酶 (glaA)、里氏木霉纤维二糖水解酶 I、氏木霉纤维二糖水解酶 II、米曲霉碱性蛋白酶、米曲霉磷酸丙糖异构酶、里氏木霉葡聚糖内切酶等基因获得的启动子

及其突变、截短和杂合 (hybrid) 启动子。

在酵母宿主中，有用的启动子可获得自酿酒酵母烯醇酶 (ENO-1)、酿酒酵母半乳糖激酶 (GAL1)、酿酒酵母乙醇脱氢酶、3-磷酸甘油醛脱氢酶、酿酒酵母磷酸丙糖异构酶、酿酒酵母 3-磷酸甘油酸激酶的基因、巴斯德毕赤酵母醇氧化酶基因。用于酵母宿主细胞的其它有用启动子由 Romanos et al., 1992, Yeast 8:423-488 描述。

调控序列也可以是合适的转录终止子序列，为宿主细胞识别以终止转录的序列。终止子序列与编码该多肽的核苷酸序列的 3' 末端可操作连接。在选择宿主细胞中有功能的任何终止子都可用于本发明。

10 用于细菌宿主的优选终止子可以是来自 T7 噬菌体的终止子。

用于丝状真菌宿主细胞的优选终止子获得自米曲霉 TAKA 淀粉酶、黑曲霉葡萄糖淀粉酶、构巢曲霉邻氨基苯甲酸合酶、黑曲霉 α -葡萄糖苷酶的基因。

用于酵母宿主细胞的优选终止子获得自酿酒酵母烯醇酶、酿酒酵母细胞色素 C、酿酒酵母甘油醛-3-磷酸脱氢酶、巴斯德毕赤酵母醇氧化酶基因等。

15 调控序列也可以是合适的前导序列，对宿主细胞翻译重要的 mRNA 的非翻译区。签到序列与编码该多肽的核苷酸序列的 5' 末端可操作连接。在选择宿主细胞中有功能的任何终止子都可用于本发明。

调控序列也可以是编码与多肽的氨基酸末端连接的氨基酸序列并且指导该编码的多肽进入细胞分泌途径的信号肽编码区。核苷酸序列编码序列的 5' 端可固有地包含天然连接具有编码分泌多肽的编码区节段的翻译阅读框的信号肽编码区。备选地，编码序列的 5' 端可包含与该编码区外源的信号肽编码区。当编码序列非天然地包含信号肽编码区时，可能需要外来的信号肽编码区。备选地，外来的信号肽编码区可简单地替换天然的信号肽编码区以增强多肽的分泌。然而，指导表达的多肽进入选择的宿主细胞的分泌途径的任何信号肽编码区，即分泌进入培养基，都可用于本发明。

在某些实施方案中，本发明的核酸构建体为表达框。术语“表达框”是指表达一个基因所需的完整元件，包括启动子、基因编码序列、PolyA 加尾信号序列。

载体

本发明也涉及含有本发明多核苷酸或核酸构建体的载体，包括表达载体和克隆载体。表达载体可以是能够方便地经受重组 DNA 方法并且可导致感兴趣的核苷酸序列表达的任何载体（如质粒或病毒）。克隆载体通常在引入到宿主细胞中后能在宿主细胞中大量繁殖。

5 载体的选择一般取决于载体与其中被导入该载体的宿主细胞的相容性。该载体可以是线性或闭合的环形质粒。

载体可以是自主复制的载体，即作为染色体外实体存在，其复制不依赖于染色体复制的载体，例如质粒、染色体外元件、微型染色体或人工染色体。载体可包含用于保证自我复制的任何方式。备选地，载体可以是当被导入宿主细胞时，
10 整合到基因组中并且与其已经被整合进入的染色体一起复制的载体。此外，可使用一起包含将被导入宿主细胞基因组的总 DNA 的单个载体或质粒或两个或多个载体或质粒，或转座子。

本发明的载体优选包含一个或多个容许容易选择转化、转染、转导等细胞的可选择标记。可选择的标记是基因，其产物提供对抗生素或病毒的抗性、对重金属的抗性、原养型至营养缺陷型等。
15

本发明的载体优选包含容许该载体整合进入宿主细胞基因组或该载体在细胞中独立于基因组自主复制的元件。

一个以上拷贝的本发明的多核苷酸可被插入宿主细胞以增加该基因产物的产量。多核苷酸拷贝数的增加可通过将至少一个附加拷贝的序列整合进入宿主细胞基因组或通过包括可扩增的选择标记基因和该多核苷酸来获得，其中包含扩增
20 拷贝的选择标记基因并且由此包含附加拷贝多核苷酸的细胞可通过在存在适当的选择剂时培养该细胞来筛选。

本发明的载体优选包含人工合成的一段序列，含有多个限制内切酶识别位点，能为外源 DNA 提供多种可插入的位置或插入方案。

25 本发明的表达载体更为优选地选择可用于毕赤酵母中表达的载体。本发明的载体优选商品化的毕赤酵母中使用的载体如 pPIC、pPICZ、pAO、pGAP 或 pGAPZ 等一系列的载体。

宿主细胞

本发明也涉及包括被用于重组生产多肽的含有本发明多核苷酸或核酸构建体的重组宿主细胞。包括本发明多核苷酸的载体被导入宿主细胞以使得该载体如早先说明的作为染色体的组成部分或作为染色体外的自我复制载体来维持。宿主细胞的选择很大程度上取决于编码多肽的基因及其来源。

5 宿主细胞可以是单细胞微生物或非单细胞微生物。单细胞微生物例如革兰氏阳性细菌，包括但不限于芽孢杆菌细胞，例如，嗜碱芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、短芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌等；或链霉菌细胞，例如钱青紫链霉菌；或革兰氏阴性细菌，例如大肠杆菌和假单胞菌属。在优选的方面，细菌宿主是枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、地衣芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌和大肠杆菌细胞。

宿主细胞也可以是真核生物，例如哺乳动物、昆虫、植物、酵母或真菌细胞。在优选的方面，宿主细胞是真核细胞，如在此使用的“真核”包括子囊菌门（*Ascomycota*）、担子菌门（*Basidiomycota*）、壶菌门（*Chytridiomycota*）、接合菌门（*Zygomycota*）以及卵菌门等。

15 在更优选的方面，宿主细胞是子囊菌门的细胞如酵母属（*Saccharomyces*）、毕赤酵母属（*Pichia*）、耶氏酵母属（*Yarrowia*）、假丝酵母属（*Candida*）以及 *Komagataella* 属等。

在最优选的方面，宿主细胞是巴斯德毕赤酵母（*Pichia pastoris*）、酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）、解脂耶氏酵母（*Yarrowia lipolytica*）等。在另外最
20 优选方面，宿主细胞是巴斯德毕赤酵母（*Pichia pastoris*）细胞。

生产方法

在获得多肽的编码序列后，可采用如下方法生产本发明多肽，该方法包括：
（a）在有助于生产多肽的条件下培养含表达该多肽的表达载体的宿主细胞；以
25 及（b）回收该多肽。

本发明的生产方法中，细胞可以利用本领域已知的方法在适于生产多肽的培养基中培养。例如，细胞可通过在实验室或工业发酵罐中进行的摇瓶培养和小规模或大规模的发酵（包括连续的、分批的、分批补料或固态发酵），在合适的培养基和容许该多肽表达和/或分离的条件下进行培养。培养发生在利用本领域已知

的方法包括碳源和氮源和无机盐的合适培养基中。合适的培养基可获得自商业供应者或可根据公开的组合物来制备。如果该多肽分泌进入培养基，该多肽可从培养基直接回收。如果该多肽不分泌进入培养基，它可从细胞裂解物回收。

或者，也可采用本领域已知的化学合成方法来合成本发明的多肽。多肽化学合成方法包括固相合成法和液相合成法，其中以固相合成法常用。固相合成方法包括但不限于 Fmoc 和 tBoc 两种常用方法。通常，使用树脂作为不溶性的固相载体，通常从 C 端(羧基端)向 N 端(氨基端)逐个将氨基酸连接在肽链上，每个氨基酸连接循环由以下三步反应构成：1)脱保护：被保护的氨基酸必须用一种脱保护溶剂去除氨基的保护基团；2)活化：待连接的氨基酸的羧基被活化剂所活化；和
10 3) 偶联：活化的羧基与前一个氨基酸裸露的氨基反应，形成肽键。反复循环直到肽链延伸至所需长度时即可完成。最后用切割液切割肽链和固相载体之间的连接，就可获得所需的氨基酸序列。可以在程序控制的自动化多肽合成仪上进行上述化学合成，这类仪器包括但不限于 Protein Technologies 公司推出的 Tribute 双通道多肽合成仪、C S Bio 公司的 UV Online Monitor 系统、Aapptec 公司推出的 Focus
15 XC 三通道合成仪等。

本发明所描述的多肽可利用本领域已知的方法来回收。例如，多肽可通过常规方法，包括但不限于离心、过滤、超滤、萃取、层析、喷雾干燥、冷冻干燥、蒸发或沉淀等从培养基回收。

本发明的多肽可通过本领域已知的多种方法来纯化，包括但不限于色谱法
20 （如离子交换、亲和性、疏水性、色谱聚焦、分子排阻），电泳法（例如等电聚焦）、差异溶解度（如盐析沉淀）、SDS-PAGE 或萃取法以获得基本上纯的多肽。

多肽的性能及用途

本发明的多肽具有磷脂酶 C 活性，具有提高的比酶活。本发明的多肽可应用
25 于油脂精炼、磷脂改性、饲料改良剂、食品工业和医药工业等多个方面，包括但不限于用于烘烤、用于洗涤剂、改善水溶液或糖浆的过滤性等。在用于脱胶时，本发明的多肽能提高脱胶效率，增加脱胶过程中甘二酯(DAG)的得率。

本发明的多肽可以纯的酶制品的形式提供，也可以组合物的形式提供。组合物可以是粉末组合物，也可以是液体组合物，或糊状组合物。以组合物形式提供

时, 根据该含酶组合物的不同用途, 该组合物可含有不同的辅料。可将本领域已知的辅料添加到本发明的组合物中, 这类辅料包括但不限于山梨醇、山梨酸钾、苯甲酸甲酯、苯甲酸乙酯、蔗糖、甘露糖、海藻糖、淀粉、氯化钠、氯化钙等稳定剂或其他物质中的一种或多种。

5 本发明方法中使用的本发明多肽的量可根据实际情况加以确定。

酶法脱胶

本发明还提供一种酶法脱胶方法, 所述方法包括将本发明的多肽加到毛油中进行脱胶的步骤。具体而言, 可先将毛油加热至 50~70℃, 优选 50~60℃, 然后
10 再加入本发明的多肽, 即磷脂酶 C。

本发明的磷脂酶 C 通常以水溶液的形式加入。以毛油重量计, 酶的添加量为 10~1000ppm, 优选为 50~500ppm, 更优选为 100~300ppm。

脱胶条件一般包括: 在 50~60℃下搅拌 1~3 小时, 然后升温至 80~90℃保持 1~10 分钟。

15 适用于本发明方法脱胶的毛油包括但不限于大豆油、葵花籽油、花生油、菜籽油、米糠油、玉米油、橄榄油、棕榈油、棕榈仁油、棕榈软脂、卡诺拉油、蓖麻油、椰子油、芫荽油、棉籽油、榛子油、大麻籽油、亚麻籽油、芒果仁油、白芒花油、牛蹄油、红花油、山茶花油、妥尔油、椿油和其他植物油。

20 下文将以具体实施例的方式阐述本发明。下列实施例中未注明具体条件的实验方法, 通常按照常规条件如 Sambrook 等, 《分子克隆: 实验室指南》(美国纽约州: 冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press), 1989)所述的条
件, 或按照制造厂商所建议的条件进行。对于试剂的用法和用量, 除非另有说明, 否则按照常规的用法和用量使用。

25

实验材料

1、实验菌株和质粒

菌株: 毕赤酵母 SMD1168 (Invitrogen, 货号 C17500), 大肠杆菌 DH5a (TAKARA:Catalog#.D9057A)。

2、培养基和溶液

LB液体培养基：0.5%酵母提取物，1%胰化蛋白胨，1% NaCl，pH7.0。

LB固体培养基：在LB液体培养基中加入琼脂浓度1.5%。

5 YPD液体培养基：1%酵母提取物，2%蛋白胨，2%葡萄糖。

YPD固体培养基：在LB液体培养基中加入琼脂浓度2%。

MGYS固体培养基：1.34%酵母氮源碱（YNB）含硫酸铵不含氨基酸，1%甘油，1M山梨醇， $4 \times 10^{-5}\%$ D-生物素，2%琼脂。

10 BMM-大豆磷脂筛选培养基：1.34%酵母氮源碱（YNB）含硫酸铵不含氨基酸， $4 \times 10^{-5}\%$ D-生物素，0.5%甲醇(灭菌后加入)，2%大豆磷脂乳化液，0.1M柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液（pH6.6），2%琼脂，添加10uM的 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。

2%大豆磷脂乳化液：2g大豆磷脂，100ml H_2O ，用高速匀浆机8000rpm匀浆1min。

15 BMGY液体培养基：1%酵母提取物，2%蛋白胨，1.34%酵母氮源碱（YNB）含硫酸铵不含氨基酸，1%甘油， $4 \times 10^{-5}\%$ D-生物素，0.1M磷酸二氢钾-磷酸氢二钾缓冲液（pH6.0）。

BMMY液体培养基：1%酵母提取物，2%蛋白胨，1.34%酵母氮源碱（YNB）含硫酸铵不含氨基酸，0.3% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ，0.5%甲醇(灭菌后加入)， $4 \times 10^{-5}\%$ D-生物素(灭菌后加入)，0.1M 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液（pH6.6）。

20

3、酶活测定方法 pNPPC 法

磷脂酶活力测定标准曲线的绘制：

称取 0.01391g 对硝基苯酚，溶于 50ml 无菌水中配成 2mmol/L 工作液。各种试剂的加量见表制作标准曲线时的反应体积和反应条件与试验中测定样品酶活的条件相一致。

25

编号	1	2	3	4	5	6	7
2.0mmol/L pNP(ul)	0	7.5	15	22.5	30	37.5	45
ddH ₂ O (ul)	62.5	55	47.5	40	32.5	25	17.5

底物缓冲液(ml)	562.5	562.5	562.5	562.5	562.5	562.5	562.5
pNP 总量 (umol)	0	0.06	0.12	0.18	0.24	0.30	0.36

以上各种溶液混合后，在 37℃处理 15 分钟，加 500ul 0.5N 的 NaOH，410nm 测定吸光度。所得标准曲线如图 3 所示。

5 4、反应缓冲液

0.1M 硼酸-硼酸钠缓冲液(pH 7.6)，20mM pNPPC。

5、酶活计算

取 600ul 上述反应缓冲液，加入 25ul 待测酶液，37℃反应 15min，加 500ul 0.5N 的 NaOH 终止反应，410nm 测定吸光度。

样品酶活(U/ml)=A(410nm 吸光度)×0.1935×稀释倍数×10/15。

改良型 Bradford 法蛋白浓度测定试剂盒购自上海生工生物工程有限公司；PCR 酶为 PrimeSTAR®HS DNA Polymerase，购自宝生物工程(大连)有限公司；T4 DNA 连接酶购自富酶泰斯有限公司。

15

实施例 1：饱和突变体文库构建及筛选

以 pmAO-PLC-N63DN131SN134D-Y56H 载体（见 CN 201680072289.5，PLC-N63DN131SN134D-Y56H 的 DNA 序列如 SEQ ID NO:1 所示，其编码的氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示）为模板，委托苏州泓迅生物科技股份有限公司构建第 6 位，第 8 位，第 10 位，第 104 位，第 205 位氨基酸进行随机饱和突变文库。将质粒文库转化入大肠杆菌 DH5α 菌株，将所有大肠杆菌克隆洗至 LB 液体培养基中(含 100 μg/ml 氨苄青霉素)，37℃培养 4 h。抽提质粒，用 SalI 进行线性化，回收约 8.5 kb 的片段。取 500 ng 载体，用电转化法将载体转化至毕赤酵母 SMD1168 菌株的感受态细胞中。将转化物接种于 MGYS 平板上，30℃培养 3 天，得到 PLC-N63DN131SN134D-Y56H 的毕赤酵母突变体文库。挑取平板上的单克隆，至 BMM-大豆磷脂筛选平板上。选取白色沉淀圈相对较大的克隆之一，编号

31#。

实施例 2: 31#突变体序列分析

将 31#菌株接种于 3 ml YPD 液体培养基中, 30°C 培养过夜, 抽提基因组 DNA。

- 5 以 31#菌株的基因组 DNA 为模板, 使用 PrimeSTAR®HS DNA 聚合酶和引物对 AOX1-5/AOX1-3 进行 PCR 扩增, 得到 31#菌株中 PLC 的 DNA 序列。将得到的序列送往上海生工生物工程公司, 用引物对 AOX1-5/AOX1-3 进行测序:

AOX1-5: CGACTGGTTCCAATTGACAACG (SEQ ID NO: 5);

AOX1-3: GGCAAATGGCATTCTGACATCCTC (SEQ ID NO: 6)。

- 10 31#的 PLC 的 DNA 测序结果如 SEQ ID NO:3 所述, 根据测序结果, 31#的 PLC 的 DNA 序列有 5 个碱基发生了突变, 其编码氨基酸的序列如 SEQ ID NO:4 所述, 其氨基酸序列的第 6 位、第 8 位、第 10 位和第 104 位氨基酸分别由赖氨酸、赖氨酸、甘氨酸和赖氨酸突变为脯氨酸、缬氨酸、丝氨酸和丝氨酸。

15 实施例 3: 31#突变体摇瓶发酵酶活

取 31#菌株及母本菌株 (即转入了 pmAO-PLC-N63DN131SN134D-Y56H 载体的 SMD1168), 先在液体 YPD 中活化, 然后接种于 BMGY 培养基中, 在 30°C 下, 220 rpm 振荡培养过夜。将培养物转至 BMMY 培养基中, 初始 OD600 为 6。

- 20 首先, 用 2%甲醇进行诱导, 在 24 h 和 32 h 后各补加 1%甲醇, 48 h 和 56 h 后各补加 1%甲醇, 72 h 取样。将获得的样品用截留分子量为 10 kDa 的超滤管进行超滤脱盐浓缩 40 倍。将处理后的样品加入缓冲液中(20mM 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH6.6), 10uM ZnSO₄)。

- 25 取 0.5 μl 发酵液浓缩液至 600ul pNPPC 反应缓冲液中, 37°C 反应 15min, 加 500ul 0.5N 的 NaOH 终止反应, 410nm 测定吸光度。根据标准曲线, 计算得到各个发酵液样品的 PLC 活力。用 Bradford 试剂测定摇瓶发酵液的蛋白浓度, 从而得出比酶活。结果如图 1 所示, 31#突变体发酵液样品的比酶活较母本菌株发酵液样品的比酶活有 1.88 倍的提高。

实施例 4: 31#脱胶小试

- 取大豆毛油 100g，加热至 55℃，分别加入 50ppm 和 100ppm 实施例 3 获得的 31#突变体发酵液样品和母本菌株发酵液样品，使得体系中的水相为 3%，用高速剪切机高速剪切（10000r/min）1min，在 55℃ 下搅拌（750r/min）反应 2h，升温至 85℃，维持 5min，样品 12000rpm 离心 10min，取约 10g 上层油样，用
- 5 HPLC 检测其 DAG 含量。31#突变体发酵液样品和母本菌株发酵液样品相对于毛油的 DAG 增量如图 2 所示，31#突变体发酵液样品 50ppm 酶用量时的 DAG 增量与母本菌株发酵液样品 100ppm 时的 DAG 增量相同。因此 31#突变体发酵液样品脱胶时的酶用量可以较母本菌株发酵液样品减少 1 倍。

权 利 要 求 书

1、一种分离的多肽，其特征在于，所述多肽选自：

(1) SEQ ID NO:7 所示的多肽；和

(2) 与 SEQ ID NO:7 具有至少 80%，优选至少 85%，更优选至少 90%，更优选至少 95%，更优选至少 97%，更优选至少 98%，更优选至少 99% 的序列同一性，且对应于 SEQ ID NO:7 第 6 位、第 8 位、第 10 位和第 104 位中的至少 1 个位置的氨基酸残基分别相应地与 SEQ ID NO: 7 第 6 位、第 8 位、第 10 位和/或第 104 位相同，同时保留 SEQ ID NO: 7 所具备的磷脂酶 C 活性的多肽。

2、如权利要求 1 所述的分离的多肽，其特征在于，SEQ ID NO:7 中，第 6 位氨基酸残基是脯氨酸或色氨酸；第 8 位氨基酸残基是丙氨酸、亮氨酸或异亮氨酸；第 10 位和第 104 位氨基酸各自独立为丝氨酸或苏氨酸；优选地，所述分离的多肽如 SEQ ID NO:4 所示。

3、一种分离的多肽，其特征在于，所述多肽与 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列具有至少 80%，优选至少 85%，更优选至少 90%，更优选至少 95%，更优选至少 97%，更优选至少 98%，更优选至少 99% 的序列同一性，且所述分离多肽在对应于 SEQ ID NO:4 第 6、8、10 和 104 位上的氨基酸残基分别是脯氨酸、缬氨酸、丝氨酸和丝氨酸；优选的，所述多肽获自枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)。

4、一种多核苷酸序列，选自：

(1) 编码权利要求 1-3 中任一项所述多肽的多核苷酸序列；和

(2) (1) 所述多核苷酸序列的互补序列；和

(3) (1) 或 (2) 所述序列的长 15—30 个碱基的片段；

优选地，所述多核苷酸序列如 SEQ ID NO:3 所示。

5、一种核酸构建体，其特征在于，该核酸构建体包含权利要求 4 所述的多核苷酸序列和一条或多条与权利要求 4 所述的多核苷酸序列操作性连接的调控序列；优选地，所述核酸构建体为载体；更优选地，所述载体为表达载体或克隆载体。

6、一种遗传工程化的宿主细胞，其特征在于，所述宿主细胞含有权利要求

4 所述的多核苷酸序列或权利要求 5 所述的核酸构建体。

7、一种组合物，其特征在于，所述组合物含有权利要求 1-3 中任一项所述的多肽和任选的辅料，优选地，所述辅料为选自活性炭、氧化铝、硅藻土、多孔陶瓷、多孔玻璃的吸附材料。

8、权利要求 1-3 中任一项所述的多肽、权利要求 4 所述的多核苷酸序列、权利要求 5 所述的核酸构建体、权利要求 6 所述的宿主细胞或权利要求 7 所述的组合物在油脂精炼、磷脂改性、饲料改良剂、食品工业和医药工业中的应用。

9、一种酶法脱胶方法，其特征在于，所述方法包括使用权利要求 1-3 中任一项所述的多肽进行脱胶；优选的，所述方法包括将权利要求 1-3 中任一项所述的多肽与毛油接触的步骤；优选的，所述步骤包括将所述多肽与 50-70℃毛油接触。

10、如权利要求 9 所述的方法，其特征在于，所述方法包括以下特征中的一项或多项：

(1)以毛油重量计，所述多肽的添加量为 10~1000ppm，优选为 50~500ppm，更优选为 100~300ppm；

(2)所述脱胶包括：在 50~60℃下搅拌 1~3 小时，然后升温至 80~90℃保持 1~10 分钟；和

(3)所述毛油选自：大豆油、葵花籽油、花生油、菜籽油、米糠油、玉米油、橄榄油、棕榈油、棕榈仁油、棕榈软脂、卡诺拉油、蓖麻油、椰子油、荳蔻油、棉籽油、榛子油、大麻籽油、亚麻籽油、芒果仁油、白芒花油、牛蹄油、红花油、山茶花油、妥尔油和椿油。

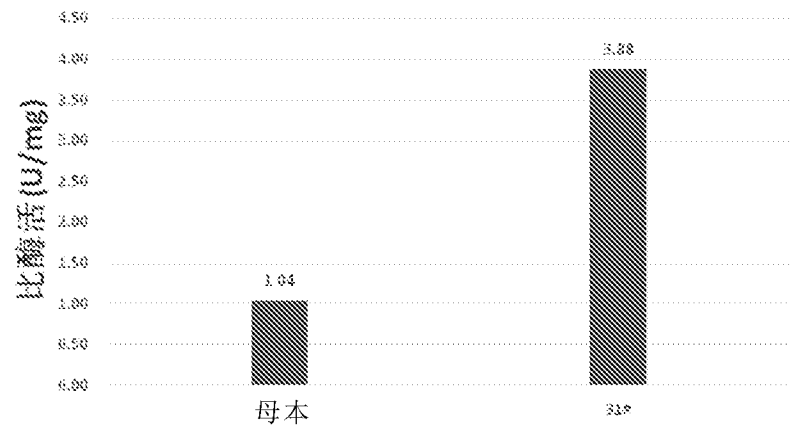


图 1

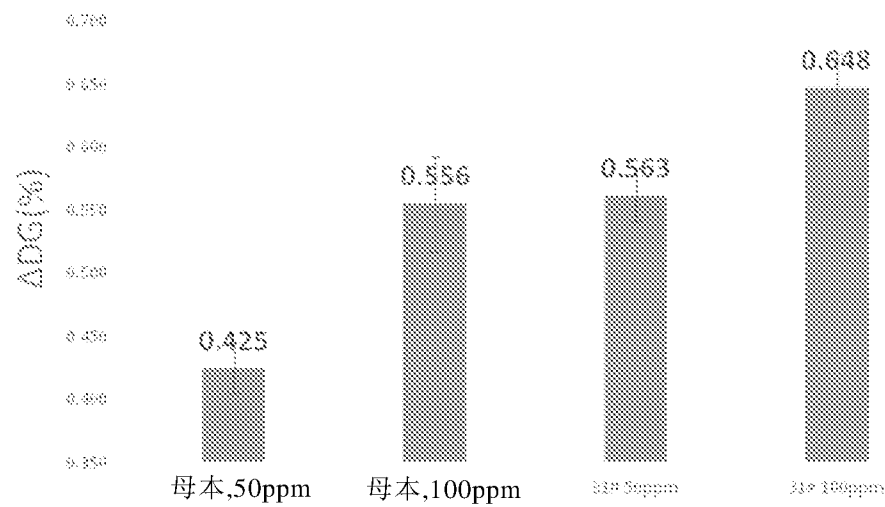


图 2

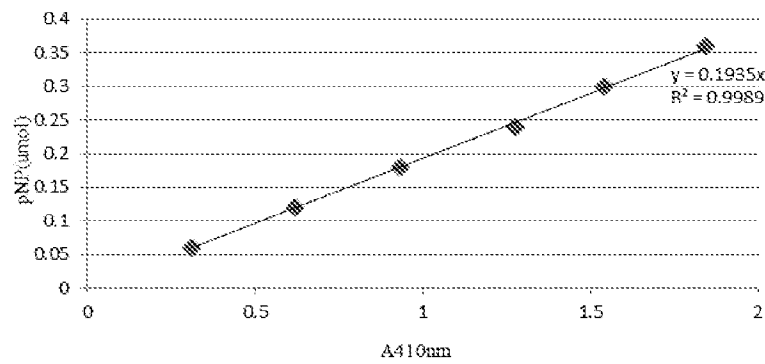


图 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/128970

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 9/16(2006.01)i; C12N 15/55(2006.01)i; C11B 3/00(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; C11B

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; CNABS; CNKI; ISI Web of Science; PubMed and key words: muta+, mutation, phospholipase, 突变, 磷脂酶c, bacillus cereus, et al. Genbank; EMBL和氨基酸序列: SEQ ID NO: 7

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 106459935 A (NOVOZYMES A/S) 22 February 2017 (2017-02-22) entire description	1-10
A	CN 108384768 A (JIANGSU ZHONGMEI BIOLOGICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 10 August 2018 (2018-08-10) entire description	1-10
A	CN 106884009 A (WILMAR (SHANGHAI) BIOTECHNOLOGY RESEARCH & DEVELOPMENT CENTER CO., LTD.) 23 June 2017 (2017-06-23) entire description	1-10
A	CN 104630174 A (WILMAR (SHANGHAI) BIOTECHNOLOGY RESEARCH & DEVELOPMENT CENTER CO., LTD.) 20 May 2015 (2015-05-20) entire description	1-10
X	"GenBank Accession number: WP_048557546, version number: WP_048557546.1, search on: 05 February 2020 (05.02.2020)" search from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/WP_048557546.1 , 07 July 2015 (2015-07-07), Amino Acid Sequence	1, 4-10



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

"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

11 February 2020

Date of mailing of the international search report

24 March 2020

Name and mailing address of the ISA/CN

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

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/128970

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:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
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 forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/128970

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	106459935	A	22 February 2017	US	2017096620	A1	06 April 2017
				EP	3122874	A4	16 August 2017
				WO	2015144092	A1	01 October 2015
				EP	3122874	A1	01 February 2017
CN	108384768	A	10 August 2018	None			
CN	106884009	A	23 June 2017	EP	3392336	A1	24 October 2018
				US	2018362942	A1	20 December 2018
				WO	2017101801	A1	22 June 2017
				CN	108431218	A	21 August 2018
				EP	3392336	A4	15 May 2019
CN	104630174	A	20 May 2015	WO	2015067161	A1	14 May 2015
				US	10144919	B2	04 December 2018
				US	2016362665	A1	15 December 2016
				CN	104630174	B	27 September 2019

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/128970

A. 主题的分类 C12N 9/16(2006.01)i; C12N 15/55(2006.01)i; C11B 3/00(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; C11B 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)) DWPI;CNABS;CNKI;ISI Web of Science;Pubmed和关键词: muta ⁺ , mutation, phospholipase, 突变, 磷脂酶c, bacillus cereus, 等 Genbank;EMBL和氨基酸序列: SEQ ID NO: 7																				
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>A</td> <td>CN 106459935 A (诺维信公司) 2017年 2月 22日 (2017 - 02 - 22) 说明书全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 108384768 A (江苏中酶生物科技有限公司) 2018年 8月 10日 (2018 - 08 - 10) 说明书全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 106884009 A (丰益上海生物技术研发中心有限公司) 2017年 6月 23日 (2017 - 06 - 23) 说明书全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 104630174 A (丰益上海生物技术研发中心有限公司) 2015年 5月 20日 (2015 - 05 - 20) 说明书全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>"Genbank登录号: WP_048557546, 版本号: WP_048557546.1, 检索于: 05.2月2020(05.02.2020)" 检索自: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/WP_048557546.1, 2015年 7月7日 (2015 - 07 - 07), 氨基酸序列</td> <td>1, 4-10</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	A	CN 106459935 A (诺维信公司) 2017年 2月 22日 (2017 - 02 - 22) 说明书全文	1-10	A	CN 108384768 A (江苏中酶生物科技有限公司) 2018年 8月 10日 (2018 - 08 - 10) 说明书全文	1-10	A	CN 106884009 A (丰益上海生物技术研发中心有限公司) 2017年 6月 23日 (2017 - 06 - 23) 说明书全文	1-10	A	CN 104630174 A (丰益上海生物技术研发中心有限公司) 2015年 5月 20日 (2015 - 05 - 20) 说明书全文	1-10	X	"Genbank登录号: WP_048557546, 版本号: WP_048557546.1, 检索于: 05.2月2020(05.02.2020)" 检索自: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/WP_048557546.1 , 2015年 7月7日 (2015 - 07 - 07), 氨基酸序列	1, 4-10
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
A	CN 106459935 A (诺维信公司) 2017年 2月 22日 (2017 - 02 - 22) 说明书全文	1-10																		
A	CN 108384768 A (江苏中酶生物科技有限公司) 2018年 8月 10日 (2018 - 08 - 10) 说明书全文	1-10																		
A	CN 106884009 A (丰益上海生物技术研发中心有限公司) 2017年 6月 23日 (2017 - 06 - 23) 说明书全文	1-10																		
A	CN 104630174 A (丰益上海生物技术研发中心有限公司) 2015年 5月 20日 (2015 - 05 - 20) 说明书全文	1-10																		
X	"Genbank登录号: WP_048557546, 版本号: WP_048557546.1, 检索于: 05.2月2020(05.02.2020)" 检索自: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/WP_048557546.1 , 2015年 7月7日 (2015 - 07 - 07), 氨基酸序列	1, 4-10																		
☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。																				
<table border="0"> <tr> <td> * 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 </td> <td> "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 </td> </tr> </table>			* 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																
* 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 2020年 2月 11日		国际检索报告邮寄日期 2020年 3月 24日																		
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		受权官员 贾涛 电话号码 86-(010)-62411993																		

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:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式 (细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式 (细则13之三. 1(b) 和行政规程第713段)

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作为申请一部分的序列表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/CN2019/128970

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	106459935	A	2017年 2月 22日	US	2017096620	A1		2017年 4月 6日	
				EP	3122874	A4		2017年 8月 16日	
				WO	2015144092	A1		2015年 10月 1日	
				EP	3122874	A1		2017年 2月 1日	
CN	108384768	A	2018年 8月 10日	无					
CN	106884009	A	2017年 6月 23日	EP	3392336	A1		2018年 10月 24日	
				US	2018362942	A1		2018年 12月 20日	
				WO	2017101801	A1		2017年 6月 22日	
				CN	108431218	A		2018年 8月 21日	
				EP	3392336	A4		2019年 5月 15日	
CN	104630174	A	2015年 5月 20日	WO	2015067161	A1		2015年 5月 14日	
				US	10144919	B2		2018年 12月 4日	
				US	2016362665	A1		2016年 12月 15日	
				CN	104630174	B		2019年 9月 27日	