

# (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  
2014年10月16日 (16.10.2014)



(10) 国际公布号  
WO 2014/166326 A1

- (51) 国际专利分类号:  
C12N 9/42 (2006.01) C12N 1/21 (2006.01)  
C12N 15/56 (2006.01) C12P 19/14 (2006.01)  
C12N 15/63 (2006.01) C12R 1/19 (2006.01)  
C12N 15/70 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2014/073502
- (22) 国际申请日: 2014年3月17日 (17.03.2014)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:  
201310125106.X 2013年4月11日 (11.04.2013) CN
- (71) 申请人: 山东大学 (SHANDONG UNIVERSITY)  
[CN/CN]; 中国山东省济南历城山大南路27号方翎,  
Shandong 250100 (CN)。
- (72) 发明人: 方翎 (FANG, Xu); 中国山东省济南历城山大南路27号, Shandong 250100 (CN)。高天龙 (GAO, Tianlong); 中国山东省济南历城山大南路27号, Shandong 250100 (CN)。王明钰 (WANG, Mingyu); 中国山东省济南历城山大南路27号, Shandong 250100 (CN)。刘奎美 (LIU, Kuimei); 中国山东省济南历城山大南路27号, Shandong 250100 (CN)。
- (74) 代理人: 济南金迪知识产权代理有限公司 (JINAN JINDI INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO.,

LTD.); 中国山东省济南历城山大南路27号朱家富, Shandong 250100 (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, 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, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, 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:  $\beta$ -GLUCOSIDASE AND EXPRESSION GENE AND USAGE THEREOF

(54) 发明名称: 一种 $\beta$ -葡萄糖苷酶及其表达基因与应用

(57) Abstract: Provided is a  $\beta$ -glucosidase and expression gene and usage thereof. The amino acid sequence of the  $\beta$ -glucosidase is represented by SEQ ID NO.1. The nucleotide sequence of the expression gene of the  $\beta$ -glucosidase is represented by SEQ ID NO.2. The  $\beta$ -glucosidase may be used for production of oligosaccharides.

(57) 摘要: 提供了一种 $\beta$ -葡萄糖苷酶及其表达基因与应用。该 $\beta$ -葡萄糖苷酶的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。该 $\beta$ -葡萄糖苷酶的表达基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示。该 $\beta$ -葡萄糖苷酶用于生产寡糖。



WO 2014/166326 A1

# 说明书

一种  $\beta$ -葡萄糖苷酶及其表达基因与应用

## 技术领域

本发明涉及一种  $\beta$ -葡萄糖苷酶及其表达基因与应用,特别是一种  $\beta$ -葡萄糖苷酶及其表达基因与利用该酶生产寡糖的方法,属于生物技术和生物化工技术领域。

## 背景技术

寡糖是一种由 2-10 个单糖组成的低聚糖,其有着非常广泛的应用价值。如目前广泛应用于食品、保健品、饮料、医药、饲料添加剂等领域。美国、日本、欧洲等地均有规模化生产,我国低聚糖的开发和应用起于 90 年代中期,近几年发展迅猛。常见的寡糖包括麦芽低聚糖葡萄糖( $\alpha$ -1,4 糖苷键结合),龙胆二糖葡萄糖( $\beta$ -1,6 糖苷键结合),低聚糖木糖( $\beta$ -1,4 糖苷键结合)等。目前制造龙胆二糖的技术方法主要包括以下两种:1、从天然原料中提取,但这种方法提取产量低,价格昂贵,无法满足工业化生产。2、酶法生产龙胆二糖,不过目前酶法生产龙胆二糖存在着酶活性效率低下,酶生产费用高昂等不便因素。

目前酶法生产寡糖,是将单糖作为底物,利用糖苷酶生产寡糖。如中国专利文献 CN101492661A(申请号 200910029055.4)公开了一种  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因的克隆、表达及用于龙胆低聚糖的制备,该发明由黑曲霉 WX-07 总 RNA 逆转录合成  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因(BGL)SEQ ID NO:1, BGL 的 CDNA 以质粒 PPIC9K 为表达载体,以毕赤酵母(P. PASTORIS)为表达宿主,实现 BGL 基因在胞外的可溶性表达; BGL 的 CDNA 全长 2523 个核苷酸,编码 841 个氨基酸,构建的 BGL/PPIC9K 转化 P. PASTORIS KM71 可表达 BGL 酶。BGL 酶具有转糖苷活性,能将葡萄糖转糖苷生成龙胆低聚糖。但是该文献公开的酶生产寡糖所用时间过长,产物得率过低,无法满足生产要求。

## 发明内容

本发明针对现有技术的不足,提供一种  $\beta$ -葡萄糖苷酶及其表达基因的高效生产与利用该酶生产寡糖的方法。

### 发明概述

本发明通过对里氏木霉菌株中产生的  $\beta$ -葡萄糖苷酶进行相关改造,发现其改造后的  $\beta$ -葡萄糖苷酶的作用产物的产量提高了 3.3 倍。而且与报道的同类技术相比,产生相同产量寡糖所需的时间缩短了 4.8 倍,最终产物得率提高了 25%。

### 发明详述

本发明技术方案如下:

一种  $\beta$ -葡萄糖苷酶,氨基酸序列如 SEQ ID NO. 1 所示。

一种  $\beta$ -葡萄糖苷酶的表达基因,核苷酸序列如 SEQ ID NO. 2 所示。

一种重组表达载体，是将如 SEQ ID NO. 1 所示核苷酸序列插入表达载体获得。

根据本发明优选的，所述表达载体为 pET-32A 表达载体。

一种重组细胞，是将上述重组表达载体转化入细胞中获得。

根据本发明优选的，所述细胞为大肠杆菌 BL21 (DE3)。

一种利用  $\beta$ -葡萄糖苷酶生产寡糖的方法，步骤如下：

将核苷酸序列如 SEQ ID NO. 2 所示的基因片段导入到 pET-32A 质粒载体中，然后转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 中，通过亲和层析色谱分离纯化制得  $\beta$ -葡萄糖苷酶，然后将  $\beta$ -葡萄糖苷酶加入以葡萄糖为底物的反应液中，在温度为 30 度，pH 为 6.0 的条件下反应，获得寡糖。

### 有益效果

1、利用本发明所述的  $\beta$ -葡萄糖苷酶生产寡糖，与现有  $\beta$ -葡萄糖苷酶相比，反应速度明显加快。

2、本发明所述的  $\beta$ -葡萄糖苷酶的最佳酶活温度更接近常温，在实际工业化生产中，有利于降低生产耗能。

3、本发明所述的  $\beta$ -葡萄糖苷酶在重组菌株中表达量高，纯化过程简单，易于大规模工业化生产。

### 附图说明

图 1 亲和层析纯化蛋白结果 SDS-PAGE 图谱；

其中：M、marker，1、大肠杆菌细胞破碎液，2、镍亲和层析柱洗脱峰，3、阴离子交换层析洗脱峰，4、阴离子交换层析洗脱峰。

图 2 薄层层析分析寡糖产物成分；

### 具体实施方式

下面通过实施例对本发明的技术方案做进一步的阐述，应该说明的是，本说明的保护范围不仅限于此。

里氏木霉 (*trichoderma reesei*) QM6a 购自美国标准生物品保藏中心，菌种保藏号 ATCC No. 13631；

Pet-32A 质粒载体购自 Novagen 公司。

#### 实施例 1：

(1) 里氏木霉 QM6a 总 RNA 的提取：

里氏木霉 QM6a 菌株在加有 2wt% 微晶纤维素的 MM 培养基中培养 2 天，用滤纸过滤收集菌丝。将收集的菌丝放入预冷的研钵中研磨，其中研磨时加入一定的液氮。将研磨成的菌丝粉末移至 1.5ml 离心管中，并加入 1ml RNAiso (购自生工生物工程有限公司 B6402-1) 于振荡器中震荡均匀，室温放 5min。然后 12000rpm 离心 10min。然后将上清吸到干净的 1.5ml 离心管中。然后加入 160  $\mu$ l 氯仿，震荡 15s 混匀，室温放置 5min，12000rpm，4 度离心 5min。然后吸上清至新的 1.5ml 离心管。然后再加入 800  $\mu$ l 异丙醇，上下颠倒 5 次。室温放置 10min，

12000rpm, 4度离心 10min。弃上清。加入 1ml 预冷的 75%乙醇清洗 RNA, 震荡后 7500rpm 离心 5min。加入 50  $\mu$ l DEPC 处理过的水, 溶解 RNA。

MM 培养基组分如下: 硫酸铵 3g, 磷酸二氢钾 4.5g, 硫酸镁 0.18g, 二水氯化钙 0.24g, 尿素 1.5g, 1000 $\times$ 微量元素(七水硫酸铁 5g/L, 一水硫酸锰 1.6g/L, 七水硫酸锌 1.4g/L, 氯化钴 2g/L) 30  $\mu$ l, 用水补足到 300ml。

(2)  $\beta$ -葡萄糖苷酶编码基因的克隆:

以里氏木霉 QM6a 总 RNA 为模板, 利用逆转录合成 cDNA (购自 takara 反转录试剂盒 BK1201):

①基因组 DNA 的去除反应

按以下比例配制反应液:

5 $\times$ gDNA Eraser Buffer	2 $\mu$ l
gDNA Eraser	1 $\mu$ l
Total RNA	0.5 $\mu$ g
RNAase Free ddH <sub>2</sub> O	up to 10 $\mu$ l

将上述反应液在 42 度条件下反应 2min。

②反转录反应:

按以下比例配制反应液:

5 $\times$ PrimeScript Buffer 2	4 $\mu$ l
PrimeScript RT Enzyme Mix I	1 $\mu$ l
RT Primer Mix	1 $\mu$ l
步骤①配制的反应液	10 $\mu$ l
RNase Free ddH <sub>2</sub> O	up to 20 $\mu$ l

将上述反应液在 37 度反应 15min, 接着在 85 度反应 5s。

以 F, R 为上下游引物扩增出 *bgI* 基因:

引物 F: CCGGAATTCATGCCCGAGTCGCTAGCTCTGCCC;

引物 R: CCCAAGCTTTGCCGCCACTTTAACCCCTCTGC;

PCR 反应在 50  $\mu$ l 体系中进行: 2 $\times$ PCR Buffer 25  $\mu$ l, 2mM dNTPs 10  $\mu$ l, 引物 F 1.5  $\mu$ l, 引物 R 1.5  $\mu$ l, 模板 DNA 1  $\mu$ l, KOD FX 聚合酶 1  $\mu$ l, 加双蒸水补足到 50  $\mu$ l。

PCR 反应体系: 在 94 度变性 2min 后开始循环, 然后 98 度变性 10s, 60 度退火 30s, 68 度延伸 90s, 共 35 个循环后, 再于 68 度延伸 10min, 扩增得到 PCR 片段, 割胶回收, 回收片段连接在 PET32A 质粒载体上, 连接位置在质粒载体的多克隆位点 EcoR1 和 HindIII 之间。连接产物转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 转化产物涂布于含 100mg/L 氨苄青霉素的 LB 平板, 经 37 度培养过夜, 挑选菌落, 接入 LB 液体培养基, 10 个小时后提取质粒。

(3)  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因的改造

将上述重组质粒中的  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因进行定点突变, 突变位点为 I177S, I174S。

首先突变位点 I177S。以 F1, R1 为反向引物进行定点突变 (试剂盒来源于东洋纺公司 KOD-PLUS-Mutagenesis Kit 167300), 序列如下:

F1: AGCTATGGATATGCCACCGGCAGCAACGC;

R1: GGCCTGAATCCAGGGTTCGTTGATGGTG;

①反向 PCR

按以下比例配制 PCR 反应液:

10×Buffer	5 μ l
2mM dNTPs	5 μ l
F1	1.5 μ l
R1	1.5 μ l
重组质粒 (PET32A-BGL)	1 μ l
KOD-PLUS-Mutagenesis Kit	1 μ l
ddH <sub>2</sub> O	up to 50 μ l

PCR 反应体系: 在 94 度变性 2min 后开始循环, 然后 98 度变性 10s, 65 度退火 30s, 68 度延伸 7min, 共 5 个循环。

②DPN I 对模板质粒的消化

在上述反应后的反应液中加入 1 μ l DPN I, 在 37°C 条件下反应 1 个小时;

③PCR 产物的自身环化

按以下比例配制反应液

Ligation high	5 μ l
ddH <sub>2</sub> O	7 μ l
②中的反应液	2 μ l
T4 Kinase	1 μ l

将上述反应液在 16 度条件下反应 1 小时

反应后转化大肠杆菌 DH5 α, 转化产物涂布于含 100mg/L 氨苄青霉素的 LB 平板, 经 37 度培养过夜, 挑选菌落, 接入 LB 液体培养基, 10 个小时后提取质粒。将此质粒进行序列测定。挑选出突变正确的质粒。

以上述突变位点 I177S 突变正确的质粒为模板, 突变 I174S 位点, 设计反向 PCR 引物 F2 和 R2, 按上述同样的方法挑选出突变正确的质粒。

F2: AGTCAGGCCAGCTATGGATATGCCACCG

R2: CCAGGGTTCGTTGATGGTGATCCAGTTCT

制得的 β-葡萄糖苷酶表达基因经华大基因生物工程公司测序验证, 核苷酸序列如 SEQ ID NO. 2 所示。

接着将重组质粒导入大肠杆菌 BL21 (DE3) 中。将得到的含有重组质粒的大肠杆菌扩大培养, 培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.6 时加入千分之一含量为 100 mM 的 IPTG, 16 度条件下诱导 16 个小时。

然后在 7000rpm 条件下离心, 收集菌体, 用 pH 为 6.0, 50mM PBS 缓冲液洗涤菌体两遍。通过超声破碎后, 用镍离子亲和层析和阴离子交换色谱的方式纯化出目的蛋白, 然后分别将破碎后的液体、镍离子亲和层析后的洗脱峰溶液及阴离子交换色谱纯化后的洗脱峰溶液经 SDS-PAGE 电泳后, 结果如图 1 所示, 将其与反应液按每 1ml 反应液添加 0.35mg 的酶量进行反应。反应条件为 30°C, pH 为 6.0, 反应液成分为 10ml 体系中加入 40%葡萄糖, 500  $\mu$ l 叠氮化钠, 1mL 的 pH6.0 的 50mM 磷酸氢二钠/磷酸二氢钠缓冲溶液。反应 10 小时后, 样品沸水浴 10min 灭酶活。然后通过 HPLC 和薄层层析(图 2) 鉴定产物浓度和种类。其氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示。

### 实施例 2:

将纯化出来的  $\beta$ -葡萄糖苷酶和野生型  $\beta$ -葡萄糖苷酶分别取 100 $\mu$ l 加入到含 5mM 的 p-nitrophenyl glucoside 的 50mM 的磷酸氢二钠/磷酸二氢钠缓冲溶液中(加入 10%甘油), pH 为 7.4, 温度为 30°C, 反应 30 分钟。用 10%碳酸氢钠 150 $\mu$ l 终止反应。取适量的体积在 420nm 光波长处测定 OD 值, 得出其水解酶活。使用 Bradford 试剂盒(上海生工生物工程 SK3041-1) 测定其蛋白质浓度。酶活定义如下: 每分钟转化产生 1mM pNP 为一个酶活单位(U)。结果如表 1 所示。

表 1

	蛋白 (mg/ml)	水解酶活 ( $\mu$ /ml)	$\beta$ -葡萄糖苷酶比酶活 ( $\mu$ /mg)
野生型 $\beta$ -葡萄糖苷酶	22.539	7618.866	338.025
本发明 $\beta$ -葡萄糖苷酶	24.250	306.333	12.632

### 实施例 3:

将实例 2 中的条件进行优化, 使转糖基活性达到较高水平. 分别设定不同的温度, pH 值优化本发明  $\beta$ -葡萄糖苷酶的转糖基作用. 通过实验得出在条件为 pH5.0, 温度为 30 度时, 转糖基活性最高, 并在 72 小时左右达到最高值. 在此条件下分别以 60%, 70%, 80%葡萄糖浓度为底物, 得到 72 小时的最高点, 如表 2 所示。

表 2

葡萄糖浓度(mg/100mL)	60	70	80
寡糖得率 (mg/mL)	45.237	56.615	64.743

### 实施例 4:

将纯化后目的蛋白与反应液按每 1ml 反应液添加 0.35mg 的酶量进行反应。反应条件为 30°C, pH 为 6.0, 反应液成分为 10ml 体系中加入 40%葡萄糖, 500  $\mu$ l 叠氮化钠, 1mL 的 pH6.0

的 50mM 磷酸氢二钠/磷酸二氢钠缓冲溶液。反应阶段定时取样，样品沸水浴 10min 灭酶活。结果如表 3。

表 3

反应时间	2h	5h	10h
野生型 $\beta$ -葡萄糖苷酶处理后产物得率(mg/mL)	3.891	6.530	8.520
本发明 $\beta$ -葡萄糖苷酶处理后产物得率(mg/mL)	5.634	10.012	15.763

## 权利要求书

---

- 1、一种  $\beta$ -葡萄糖苷酶，氨基酸序列如 SEQ ID NO. 1 所示。
- 2、一种  $\beta$ -葡萄糖苷酶的表达基因，核苷酸序列如 SEQ ID NO. 2 所示。
- 3、一种重组表达载体，是将如 SEQ ID NO. 1 所示核苷酸序列插入表达载体获得。
- 4、如权利要求 3 所述的重组表达载体，其特征在于，所述表达载体为 pET-32A 表达载体。
- 5、一种重组细胞，是将权利要求 3 或 4 所述的重组表达载体转化入细胞中获得。
- 6、如权利要求 5 所述的重组细胞，其特征在于，所述细胞为大肠杆菌 BL21 (DE3)。
- 7、一种利用  $\beta$ -葡萄糖苷酶生产寡糖的方法，其特征在于，步骤如下：  
将核苷酸序列如 SEQ ID NO. 2 所示的基因片段导入到 pET-32A 质粒载体中，然后转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 中，通过亲和层析色谱分离纯化制得  $\beta$ -葡萄糖苷酶，然后将  $\beta$ -葡萄糖苷酶加入以葡萄糖为底物的反应液中，在温度为 30 度，pH 为 6.0 的条件下反应，获得寡糖。

说明书附图

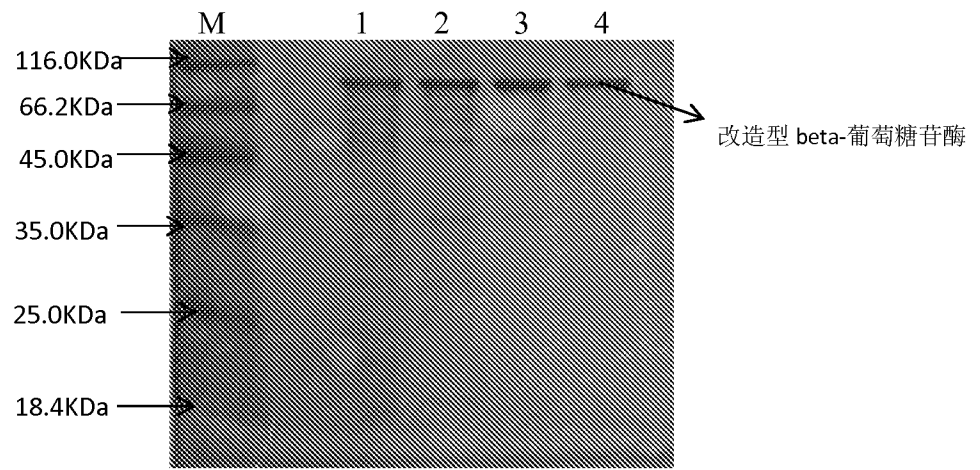


图 1

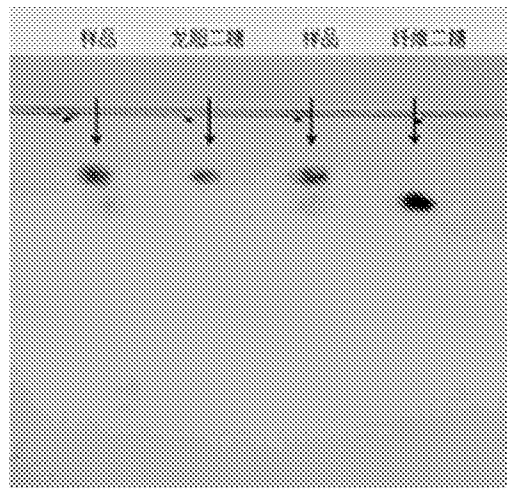


图 2

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/CN2014/073502

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 9/42 (2006.01) i; C12N 15/56 (2006.01) i; C12N 15/63 (2006.01) i; C12N 15/70 (2006.01) i; C12N 1/21 (2006.01) i; C12P 19/14 (2006.01) i; C12R 1/19 (2006.01) n

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; 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, CPEA, CNKI, ISI WEB OF KNOWLEDGE, GenBank, EMBL, DDBJ: glucosidase, glucosaccharase, trichoderma reesei, gene, sequence search on the sequences of SEQ ID NO:1 and 2

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 7727754 B2 (DANISCO US INC.) 01 June 2010 (01.06.2010), see the whole document	1-7
A	CN 102154344 A (UNIV TIANJIN et al.) 17 August 2011 (17.08.2011), see the whole document	1-7
A	CN 102220369 A (UNIV TIANJIN et al.) 19 October 2011 (19.10.2011), see the whole document	1-7
PX	CN 103160483 A (UNIV SHANDONG) 19 June 2013 (19.06.2013), see the whole document	1-7
A	ZHANG, Liang et al., Cloning and expression of bgl1 gene from Trichoderma reesei in Saccharomyces cerevisiae, Liquor-Making Science & Technology, no. 9, 18 September 2006 (18.09.2006), ISSN: 1001-9286, pp. 17-20, see the whole document	1-7

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&amp;” document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search  
30 May 2014

Date of mailing of the international search report  
18 June 2014

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  
XU, Yijun  
Telephone No. (86-10) 62411083

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**International application No.  
PCT/CN2014/073502

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Foreman P K et al., Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus <i>Trichoderma reesei</i> , JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, no. 34, vol. 278, 22 August 2003 (22.08.2003), ISSN: 0021-9258, pp. 31988-31997, see the whole document	1-7

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

International application No.  
PCT/CN2014/073502

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
US 7727754 B2	01 June 2010	JP 2005512534 A	12 May 2005
		CA 2470401 A1	26 June 2003
		US 2003114330 A1	19 June 2003
		US 7005289 B2	28 February 2006
		US 2008176282 A1	24 July 2008
		US 2005244878 A1	03 November 2005
		US 7344871 B2	18 March 2008
		AU 2002353923 A8	30 June 2003
		WO 03052054 A3	18 December 2003
		CA 2470401 C	17 September 2013
		WO 03052054 A2	26 June 2003
		EP 1453967 A2	08 September 2004
		EP 1453967 A4	21 September 2005
		AU 2002353923 A1	30 June 2003
CN 102154344 A	17 August 2011	CN 102154344 B	06 June 2012
CN 102220369 A	19 October 2011	CN 102220369 B	10 October 2012
CN 103160483 A	19 June 2013	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2014/073502

<p>A. 主题的分类</p> <p>C12N 9/42(2006.01)i; C12N 15/56(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12N 15/70(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12P 19/14(2006.01)i; C12R 1/19(2006.01)n</p> <p>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</p>																				
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C12N; C12P; C12R</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>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))</p> <p>数据库: CNABS, CPRSABS, DWPI, SIPOABS, CPEA, CNKI, ISI WEB OF KNOWLEDGE, GenBank, EMBL, DDBJ 检索词: 葡萄糖苷酶, 葡糖苷酶, 里氏木霉, 瑞氏木霉, 基因, glucosidase, glucosaccharase, trichoderma reesei, 关于SEQ ID NO:1-2的序列检索</p>																				
<p>C. 相关文件</p> <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>US 7727754B2 (DANISCO US INC) 2010年 6月 01日 (2010 - 06 - 01) 参见全文</td> <td>1-7</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 102154344A (天津大学等) 2011年 8月 17日 (2011 - 08 - 17) 参见全文</td> <td>1-7</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 102220369A (天津大学等) 2011年 10月 19日 (2011 - 10 - 19) 参见全文</td> <td>1-7</td> </tr> <tr> <td>PX</td> <td>CN 103160483A (山东大学) 2013年 6月 19日 (2013 - 06 - 19) 参见全文</td> <td>1-7</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>张梁等. "里氏木霉bg11基因的克隆及其在酿酒酵母中的表达" 酿酒科技, 第9期, 2006年 9月 18日 (2006 - 09 - 18), ISSN:1001-9286, 第17-20页, 参见全文</td> <td>1-7</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	US 7727754B2 (DANISCO US INC) 2010年 6月 01日 (2010 - 06 - 01) 参见全文	1-7	A	CN 102154344A (天津大学等) 2011年 8月 17日 (2011 - 08 - 17) 参见全文	1-7	A	CN 102220369A (天津大学等) 2011年 10月 19日 (2011 - 10 - 19) 参见全文	1-7	PX	CN 103160483A (山东大学) 2013年 6月 19日 (2013 - 06 - 19) 参见全文	1-7	A	张梁等. "里氏木霉bg11基因的克隆及其在酿酒酵母中的表达" 酿酒科技, 第9期, 2006年 9月 18日 (2006 - 09 - 18), ISSN:1001-9286, 第17-20页, 参见全文	1-7
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
A	US 7727754B2 (DANISCO US INC) 2010年 6月 01日 (2010 - 06 - 01) 参见全文	1-7																		
A	CN 102154344A (天津大学等) 2011年 8月 17日 (2011 - 08 - 17) 参见全文	1-7																		
A	CN 102220369A (天津大学等) 2011年 10月 19日 (2011 - 10 - 19) 参见全文	1-7																		
PX	CN 103160483A (山东大学) 2013年 6月 19日 (2013 - 06 - 19) 参见全文	1-7																		
A	张梁等. "里氏木霉bg11基因的克隆及其在酿酒酵母中的表达" 酿酒科技, 第9期, 2006年 9月 18日 (2006 - 09 - 18), ISSN:1001-9286, 第17-20页, 参见全文	1-7																		
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																				
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>"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)</p> <p>"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&amp;" 同族专利的文件</p>																				
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2014年 5月 30日</p>	<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2014年 6月 18日</p>																			
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 中国</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>	<p>授权官员</p> <p>徐益君</p> <p>电话号码 (86-10)62411083</p>																			

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	Foreman PK等. "Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus <i>Trichoderma reesei</i> " JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 第34期, 第278卷, 2003年 8月 22日 (2003 - 08 - 22), ISSN:0021-9258, 第31988-31997页, 参见全文	1-7

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2014/073502

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)
US	7727754B2	2010年 6月 01日	JP	2005512534A	2005年 5月 12日
			CA	2470401A1	2003年 6月 26日
			US	2003114330A1	2003年 6月 19日
			US	7005289B2	2006年 2月 28日
			US	2008176282A1	2008年 7月 24日
			US	2005244878A1	2005年 11月 03日
			US	7344871B2	2008年 3月 18日
			AU	2002353923A8	2003年 6月 30日
			WO	03052054A3	2003年 12月 18日
			CA	2470401C	2013年 9月 17日
			WO	03052054A2	2003年 6月 26日
			EP	1453967A2	2004年 9月 08日
			EP	1453967A4	2005年 9月 21日
			AU	2002353923A1	2003年 6月 30日
CN	102154344A	2011年 8月 17日	CN	102154344B	2012年 6月 06日
CN	102220369A	2011年 10月 19日	CN	102220369B	2012年 10月 10日
CN	103160483A	2013年 6月 19日		无	

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)