

(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 5 月 22 日 (22.05.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/097922 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 9/10 (2006.01) *C12P 19/00* (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/115937

(22) 国际申请日: 2018 年 11 月 16 日 (16.11.2018)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 邦泰生物工程(深圳)有限公司 (BONTAC BIO-ENGINEERING (SHENZHEN) CO., LTD) [CN/CN]; 中国广东省深圳市宝安区西乡街道铁岗桃花源科技创新园第三分园 1 栋厂房 1 层 A-2, Guangdong 518102 (CN)。江西邦泰绿色生物合成生态产业园发展有限公司 (JIANGXI BONTAC GREEN-BIOCATALYSIS ECOINDUSTRIAL PARK CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江西省南昌市南昌经济技术开发区桑海产业园新港商务中心 28 栋 1-2 楼, Jiangxi 330115 (CN)。江西安泽麦生物科技有限公司 (JIANGXI BONZYMES BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江西省樟树市福城医药物流园内环北路, Jiangxi 331200 (CN)。

(72) 发明人: 傅荣昭 (FU, Rongzhao); 中国广东省深圳市宝安区西乡街道铁岗桃花源科技创新园第三分园 1 栋厂房 1 层 A-2, Guangdong 518102 (CN)。刘文山 (LIU, Wenshan); 中国广东省深圳市宝安区西乡街道铁岗桃花源科技创新园第三分园 1 栋厂房 1 层 A-2, Guangdong 518102 (CN)。刘玉凤 (LIU, Yufeng); 中国广东省深圳市宝安区西乡街道铁岗桃花源科技创新园第三分园 1 栋厂房 1 层 A-2, Guangdong 518102 (CN)。李振伟 (LI, Zhenwei); 中国广东省深圳市宝安区西乡街道铁岗桃花源科技创新园第三分园 1 栋厂房 1 层 A-2, Guangdong 518102 (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: UDP-GLUCOSYLTRANSFERASE MUTANT, USE THEREOF AND METHOD FOR PREPARING REBAUDIOSIDE D

(54) 发明名称: 一种UDP-葡萄糖基转移酶突变体、其应用及其制备莱鲍迪苷D的方法

(57) Abstract: Provided are a UDP-glucosyltransferase mutant, the use thereof and a method for preparing rebaudioside D. A series of mutants comprising SEQ ID NO: 3 are obtained by subjecting gene sequences of wild-type UDP-glucosyltransferase to site-directed mutagenesis, and the enzyme activity and pH stability of these mutants are improved compared with the wild-type parent.

(57) 摘要: 提供了一种UDP-葡萄糖基转移酶突变体、其应用及制备莱鲍迪苷D的方法。对野生型UDP-葡萄糖基转移酶的基因序列进行定点突变, 获得了包括SEQ ID NO: 3在内的一系列突变体, 这些突变体的酶活性和pH稳定性较野生型亲本得到提高。



WO 2020/097922 A1

一种 UDP-葡萄糖基转移酶突变体、其应用及其制备莱鲍迪苷 D 的方法

技术领域

本发明涉及生物酶技术领域，特别涉及一种通过基因定点突变的方法人工获得的 UDP-葡萄糖基转移酶突变体及其用于催化制备莱鲍迪苷 D 的方法。

背景技术

葡萄糖基转移酶是在酶反应中只转移葡萄糖基的酶，该酶的作用机理是催化糖基供体的葡萄糖残基转移到糖基受体分子上，从而调节受体分子的活性。UDP-葡萄糖基转移酶（UDP- glucosyltransferase，简称 UGT）是葡萄糖基转移酶中的一种，以 UDP-葡萄糖作为糖基供体，几乎存在于所有有机体中。

UDP-葡萄糖是二磷酸尿苷葡萄糖（uridine diphosphate glucose）的简称，又简称为 UDP-葡糖或者 UDPG，是由尿苷二磷酸和葡萄糖组成的维生素，可看作“活性葡萄糖”，广泛分布于植物、动物和微生物的细胞内，在蔗糖、淀粉、糖原及其他寡糖和多糖合成中作葡萄糖基的供体，是最常见的一种糖基供体。

如今，随着天然甜味剂甜菊糖苷的广泛应用，以及生物催化技术的日益发展，UDP-葡萄糖基转移酶被越来越多地应用在甜菊糖苷的生物催化制备的领域中来。UDP-葡萄糖基转移酶的种类很多，目前甜菊糖苷的生物酶法制备领域中使用的酶多为来源于植物细胞中的野生酶，这种野生酶往往存在酶活低、稳定性差等缺点，从而导致应用于工业化大生产制备甜菊糖苷的成本较高。因此，有必要对 UDP-葡萄糖基转移酶的野生酶进行改造，从而获得酶活更高、稳定性更好的改造酶，以便更好地服务于工业化大生产。

发明内容

本发明的目的在于解决野生型 UDP-葡萄糖基转移酶酶活力低、稳定性差的技术问题，开发一种酶活力及稳定性更高的 UDP-葡萄糖基转移酶。

为实现上述目的，本发明提供了一种 UDP-葡萄糖基转移酶突变体，该突变体为如下 (a)、(b) 或 (c) 的蛋白质：

(a) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示的蛋白质；

(b) 在如 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列中经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸并且具有比氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示的 UDP-葡萄糖基转移酶亲本更高的催化莱鲍迪苷 A 转化为莱鲍迪苷 D 的酶活力的由 (a) 衍生的蛋白质；

(c) 与 (a) 限定的蛋白质的氨基酸序列具有 90% 以上同源性并且具有比氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示的 UDP-葡萄糖基转移酶亲本更高的催化莱鲍迪苷 A 转化为莱鲍迪苷 D 的酶活力的蛋白质。

优选地，与如 SEQ ID NO: 2 所示的 UDP-葡萄糖基转移酶亲本的氨基酸序列相比，本发明提供的 UDP-葡萄糖基转移酶突变体在至少一个如下位点处有突变：第 69 位、第 148 位、第 244 位、第 251 位、第 252 位、第 255 位、第 368 位、第 426 位和第 432 位。

更优选地，与如 SEQ ID NO: 2 所示的 UDP-葡萄糖基转移酶亲本的氨基酸序列相比，本发明提供的 UDP-葡萄糖基转移酶突变体具有至少一个如下突变：A69D、M148L、F244P、L251S、H252P、R255G、M368L、S426R、K432N。

更优选地，与如 SEQ ID NO: 2 所示的 UDP-葡萄糖基转移酶亲本的氨基酸序列相比，本发明提供的 UDP-葡萄糖基转移酶突变体的突变为 A69D、M148L、F244P、R255G、M368L、S426R、K432N 或 L251S/H252P。

同时，本发明还提供了一种生物材料，包括重组载体、重组细胞或者重组微生物，该生物材料含有编码本发明提供的上述 UDP-葡萄糖基转移酶突变体的基因序列，在合适的条件下，该生物材料能够表达分泌出本发明提供的上述 UDP-葡萄糖基转移酶突变体。

同时，本发明还提供了上述 UDP-葡萄糖基转移酶突变体的用途，该用途为将本发明提供的上述 UDP-葡萄糖基转移酶突变体应用于制备甜菊糖

苷中，特别地，将本发明提供的上述 UDP-葡萄糖基转移酶突变体应用于制备莱鲍迪苷 D 中。

优选地，本发明提供的上述 UDP-葡萄糖基转移酶突变体的用途为：在 UDPG 存在的条件下，用上述 UDP-葡萄糖基转移酶突变体催化莱鲍迪苷 A 转化成莱鲍迪苷 D。

另外，本发明还提供了一种制备莱鲍迪苷 D 的方法，该方法包括：在蔗糖、UDP 和蔗糖合成酶存在的条件下，用 UDP-葡萄糖基转移酶催化莱鲍迪苷 A 转化成莱鲍迪苷 D，其中，UDP-葡萄糖基转移酶为氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示的 UDP-葡萄糖基转移酶亲本或者是本发明提供的上述 UDP-葡萄糖基转移酶突变体，蔗糖合成酶来源于拟南芥<*Arabidopsis thaliana*>的 AtSUS 基因，该基因已被收录在 NCBI 数据库中，其登录号为 NP_197583。

上述方法中，UDP 是尿苷二磷酸（Uridine diphosphate）的英文缩写，是合成 UDPG 的物质之一。

优选地，本发明提供的上述方法中，催化反应过程在水环境中进行，催化反应的 pH 值为 4~9，催化反应的温度为 4~45℃。

更优选地，催化反应的 pH 值为 7~8，催化反应的温度为 35~45℃。

优选地，本发明提供的上述方法中，莱鲍迪苷 A 在反应体系中的终浓度为 10-50g/L。

有益效果：

1、与 UDP-葡萄糖基转移酶亲本相比，本发明提供的 UDP-葡萄糖基转移酶突变体在酶活力和 pH 稳定性方面均得到了较为明显的提高，特别是酶活力至少提高了 200%。

2、应用本发明提供的 UDP-葡萄糖基转移酶突变体开发的制备莱鲍迪苷 D 的方法，在确保底物莱鲍迪苷 A 的转化率高达 97%以上的同时可大大减少酶的使用量。

具体实施方式

下面结合具体实施例对本发明做进一步的详细说明，以下实施例是对本发明的解释，本发明并不局限于以下实施例，实施例中未注明具体条件

者，按常规条件或制造商建议的条件进行。若无特别说明，本发明实施例中所使用的原料及试剂皆为市售商品。

1、亲本质粒的制备

根据来源于水稻 (*Oryza sativa Japonica Group*) 的 UDP-葡萄糖基转移酶的氨基酸序列 (GenBank 登录号: XP_015629141.1) 合成所需基因片段，连入 pET28a 载体，两端酶切位点分别为 BamH I 和 Hind III，得到 UDP-葡萄糖基转移酶亲本质粒，再将获得的亲本质粒转化至大肠杆菌 Rosetta 感受态细胞 DE3，经 Amp 筛选后挑取菌落进行测序，确定该被克隆的 UDP-葡萄糖基转移酶亲本的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示，其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示。

2、突变体的制备

根据亲本基因序列设计引物，通过反向 PCR 技术分别对 UDP-葡萄糖基转移酶亲本的第 69 位、第 148 位、第 244 位、第 251、252 位、第 255 位、第 368 位、第 426 位和第 432 位进行定点突变。利用表 1 中各突变位点对应的上下游引物，以第 1 部分制备得到的亲本质粒为模板，分别进行反向 PCR 扩增，PCR 扩增反应体系和 PCR 扩增反应程序如下：

PCR 扩增反应体系：

TAKaRa EX Taq HS	0.25 μ L
10 $\times$ Ex Taq Buffer	5 μ L
亲本质粒	1 μ L
dNTP (2.5mM each)	4 μ L
上游引物	1 μ L
下游引物	1 μ L
无菌水	加至总体积 50 μ L

PCR 扩增反应程序：

98 $^{\circ}$ C 2min; 98 $^{\circ}$ C 10s; 50-65 $^{\circ}$ C 30s;72 $^{\circ}$ C 7min; 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 10min。

表 1

引物名称	引物序列 (5' 至 3')
A69D 上游	TGCCTTAGCACCGTTAGTGGATTTTGTGCCCCT
A69D 下游	ATCCACTAACGGTGCTAAGGCAGGACG
M148L 上游	G TTCCTTGCGCAATGCTGCTGCTGGGCA
M148L 下游	GCATTGCGCAAGGAACCTTATGTTCTAATGC
F244P 上游	GGCAAACCTATCACCCCGCTGGGTCTGATGCCGCC
F244P 下游	CGGGGTGATAGGTTTGCCGCGCAGGGTA
L251S+H252P 上游	GGTCTGATGCCGCCGAGCCCGAGGGTCGTC
L251S+H252P 下游	CGGGCTCGGCGGCATCAGACCCAGAAAGGTGATAGGT
R255G 上游	CCGTTACACGAGGGTGGCCGTGAAGATGGCGAAGATGC
R255G 下游	GCCACCCTCGTGTAACGGCGGCATCAGAC
M368L 上游	ACCATCGAGGGTCTGCTGTTCGGCCA
M368L 下游	GCAGACCCTCGATGGTGCTATTCCAG
S426R 上游	GTGGAAGAAGAAAGCCGTAAGGTTTTCC
S426R 下游	ACGGCTTTCTTCTTCCACTGCAACTGCG
K432N 上游	GGTTTTCCAGGCCAATGCCAAGAAAC
K432N 下游	ATTGGCCTGGAAAACCTTACGGCTTTCTTCT

将 PCR 扩增产物经 Dpn I 酶消化模板处理后转化到大肠杆菌 Rosetta 感受态细胞 DE3, 经 Amp 筛选后挑取菌落进行测序, 确定目标突变体。与第 1 部分制备的 UDP-葡萄糖基转移酶亲本的如 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列相比, 本部分制备得到的 UDP-葡萄糖基转移酶突变体的突变分别为 A69D、M148L、F244P、R255G、M368L、S426R、K432N 或 L251S/H252P。

3、UDP-葡萄糖基转移酶酶液的制备

将第 1、2 部分制备得到的含有 UDP-葡萄糖基转移酶亲本和突变体的重组大肠杆菌表达菌株以 1%比例分别接种到 4 mL 液体 LB 培养基中, 37℃ 振荡培养 (200rpm) 过夜, 取过夜培养物以 1%接种量转接于大体积液体

LB 培养基, 37℃ 振荡培养 (200rpm) 至 OD600 值达到 0.6-0.8, 加入终浓度 0.1mM~1mM IPTG 于 20~37℃ 振荡培养 12~16h。诱导结束后离心收集菌体, 并用 50mM 磷酸缓冲液(pH7.4) 重悬细胞, 于冰浴中超声波破碎细胞, 将破碎液离心, 收集上清液即可获得含有 UDP-葡萄糖基转移酶亲本或者突变体的粗酶液。

4、酶活力测定

以 100mg 莱鲍迪苷 A 为底物, 10mL 反应体系, 1.2g 蔗糖, 10mg UDP, 10mg AtSUS 蔗糖合成酶 (来自拟南芥<Arabidopsis thaliana>), 再分别加入 4mL 第 3 部分制备得到的 UDP-葡萄糖基转移酶亲本或者突变体的粗酶液, 调节 pH 至 7.4, 在 37℃、200rpm 下进行反应 2.5h。然后取样进行 HPLC 检测, 计算酶活力, 测定结果如表 2 所示。

表 2

类型	酶活力 U/mL	温度稳定性	pH 稳定性
亲本	53.0±3.3	4-45℃	7-8
A69D	123.5±1.1	4-45℃	6-8
M148L	128.9±2.6	4-45℃	6-8
F244P	165.7±1.8	4-45℃	4-9
L251S+H252P	158.1±4.3	4-45℃	4-9
R255G	151.9±1.5	4-45℃	4-9
M368L	140.4±3.2	4-45℃	7-8
S426R	118.5±2.4	4-45℃	6-9
K432N	157.6±2.9	4-45℃	4-8

5、莱鲍迪苷 D 的制备

莱鲍迪苷 A 100g、蔗糖 (MW.342) 1200g、UDP (MW.628) 10g, 加水至莱鲍迪苷 A 的终浓度为 10g/L, 搅拌使之完全溶解, 然后分别加入第 3 部分制备得到的 UDP-葡萄糖基转移酶亲本或者突变体的粗酶液和 10g AtSUS 蔗糖合成酶 (来自拟南芥<Arabidopsis thaliana>), 调节 pH 至 7-8。

在 37℃、200rpm 下进行反应 10h，测定转化率，反应结束后将反应液进行分离、纯化、干燥处理后即得莱鲍迪苷 D 产品。UDP-葡萄糖基转移酶的加入量以及各反应的转化率数据如表 3 所示。

表 3

类型	酶液投入量 (g)	转化率 (%)	反应温度	反应 pH
亲本	100.0	80.9	37℃	7.5
A69D	72.1	98.4	37℃	7.2
M148L	67.2	98.7	37℃	7.5
F244P	45.8	100.0	37℃	7.4
L251S+H252P	49.0	100.0	37℃	7.6
R255G	52.0	100.0	37℃	7.6
M368L	58.6	99.3	37℃	7.3
S426R	77.4	97.7	37℃	7.4
K432N	50.0	100.0	37℃	7.5

权 利 要 求 书

1、 一种 UDP-葡萄糖基转移酶突变体，其特征在于：所述突变体为如下 (a)、(b) 或 (c) 的蛋白质：

(a) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示的蛋白质；

(b) 在如 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列中经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸并且具有比氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示的 UDP-葡萄糖基转移酶亲本更高的催化莱鲍迪苷 A 转化为莱鲍迪苷 D 的酶活力的由 (a) 衍生的蛋白质；

(c) 与 (a) 限定的蛋白质的氨基酸序列具有 90% 以上同源性并且具有比氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示的 UDP-葡萄糖基转移酶亲本更高的催化莱鲍迪苷 A 转化为莱鲍迪苷 D 的酶活力的蛋白质。

2、 根据权利要求 1 所述的 UDP-葡萄糖基转移酶突变体，其特征在于，与如 SEQ ID NO: 2 所示的 UDP-葡萄糖基转移酶亲本的氨基酸序列相比，所述突变体在至少一个如下位点处有突变：第 69 位、第 148 位、第 244 位、第 251 位、第 252 位、第 255 位、第 368 位、第 426 位和第 432 位。

3、 根据权利要求 1 所述的 UDP-葡萄糖基转移酶突变体，其特征在于，与如 SEQ ID NO: 2 所示的 UDP-葡萄糖基转移酶亲本的氨基酸序列相比，所述突变体具有至少一个如下突变：A69D、M148L、F244P、L251S、H252P、R255G、M368L、S426R、K432N。

4、 根据权利要求 1 所述的 UDP-葡萄糖基转移酶突变体，其特征在于：与如 SEQ ID NO: 2 所示的 UDP-葡萄糖基转移酶亲本的氨基酸序列相比，所述突变体的突变为 A69D、M148L、F244P、R255G、M368L、S426R、K432N 或 L251S/H252P。

5、 一种生物材料，包括重组载体、重组细胞或者重组微生物，其特征在于：所述生物材料含有编码权利要求 1 至 4 任一项所述的 UDP-葡萄糖基转移酶突变体的基因序列。

6、 权利要求 1 至 4 任一项所述的 UDP-葡萄糖基转移酶突变体在制备甜菊糖苷中的应用。

7、 根据权利要求 6 所述的 UDP-葡萄糖基转移酶突变体在制备甜菊糖苷中的应用，其特征在于所述应用为：在 UDPG 存在的条件下，用所述 UDP-葡萄糖基转移酶突变体催化莱鲍迪苷 A 转化成莱鲍迪苷 D。

8、 一种制备莱鲍迪苷 D 的方法，其特征在于所述方法包括：在蔗糖、UDP 和蔗糖合成酶存在的条件下，用 UDP-葡萄糖基转移酶催化莱鲍迪苷 A 转化成莱鲍迪苷 D，所述 UDP-葡萄糖基转移酶为氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示的 UDP-葡萄糖基转移酶亲本或者是权利要求 1 至 4 任一项所述的 UDP-葡萄糖基转移酶突变体，所述蔗糖合成酶来源于拟南芥的 AtSUS 基因。

9、 根据权利要求 8 所述的制备莱鲍迪苷 D 的方法，其特征在于：所述方法中，催化反应的 pH 值为 4~9，催化反应的温度为 4~45℃。

10、 根据权利要求 8 所述的制备莱鲍迪苷 D 的方法，其特征在于：所述方法中，莱鲍迪苷 A 在反应体系中的终浓度为 10-50g/L。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/115937

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 9/10(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12P 19/00(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, 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)

CNABS, CPRSABS, DWPI, SIPOABS, CNKI, 万方, WANFANG, ISI Web of Knowledge, BAIDU: 尿苷二磷酸糖基转移酶, 二磷酸尿苷葡萄糖基转移酶, UDP-葡萄糖基转移酶, 突变, 莱鲍迪苷D, UDP-glycosyltransferase, UGT, OsUGT, uridine diphosphate glucose, mutant, rebaudioside D, RebD等; Genbank, EMBL, 中国专利生物序列检索系统和检索的序列: SEQ ID NOs: 2, 3, China Patents Biological Sequence Search System and searched sequences: SEQ ID NOs: 2, 3.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 107109453 A (MANUS BIOSYNTHESIS, INC.) 29 August 2017 (2017-08-29) entire document	1-10 (partially)
A	CN 101942424 A (BEIJING UNIVERSITY OF AGRICULTURE) 12 January 2011 (2011-01-12) entire document	1-10 (partially)
A	YAMAMOTO, K. et al. "Contribution of two missense mutations (G71R and Y486D) of the bilirubin UDP glycosyltransferase (UGT1A1) gene to phenotypes of Gilbert's syndrome and Crigler-Najjar syndrome type II" <i>Biochimica et Biophysica Acta</i> , Vol. 1406, No. 3, 28 April 1998 (1998-04-28), pp. 267-273	1-10 (partially)
A	US 2015315623 A1 (CONAGEN INC.) 05 November 2015 (2015-11-05) entire document	1-10 (partially)



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

08 July 2019

Date of mailing of the international search report

15 August 2019

Name and mailing address of the ISA/CN

National Intellectual Property Administration, PRC (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/CN2018/115937

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:

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- [1] Invention 1: claims 1-10 (partially); which relates to a UDP-glucanotransferase mutant, the amino acid sequence of the mutant is mutated at position 69 of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2; and corresponding recombinant vectors and recombinant cells or recombinant microorganisms and the application thereof in preparation of stevioside, and a corresponding method of preparing stevioside D.
- [2] Invention 2: claims 1-10 (partially); which has the same subject matter as Invention 1, but the mutation site involved is 148th;
- [3] Invention 3: claims 1-10 (partially); which has the same subject matter as Invention 1, but the mutation site involved is 244th;
- [4] Invention 4: claims 1-10 (partially); which has the same subject matter as Invention 1, but the mutation site involved is 251th;
- [5] Invention 5: claims 1-10 (partially); which has the same subject matter as Invention 1, but the mutation site involved is 252th;
- [6] Invention 6: claims 1-10 (partially); which has the same subject matter as Invention 1, but the mutation site involved is 255th;
- [7] Invention 7: claims 1-10 (partially); which has the same subject matter as Invention 1, but the mutation site involved is 368th;
- [8] Invention 8: claims 1-10 (partially); which has the same subject matter as Invention 1, but the mutation site involved is 426th;
- [9] Invention 9: claims 1-10 (partially); which has the same subject matter as Invention 1, but the mutation site involved is 432th;
- [10] The same or corresponding technical feature between claims 1-9 is: point mutation is performed on the UDP-glucanotransferase shown in SEQ ID NO: 2 to obtain a mutant with improved enzyme activity. However, UGT enzyme OsUGT1-2 shown in SEQ ID NO: 7 and a series of point mutants with improved enzyme activity of the rearrangement of the enzyme are disclosed in the prior art such as Document 1 (CN107109453 A, published on 09 August 2017) (see claim 7, description, paragraphs 158 and 159, and figures 24 and 25). Upon comparison, SEQ ID NO: 7 of Document 1 is completely the same as SEQ ID NO: 2 of the present application. Hence, the same or corresponding technical feature between claims 1-9 is disclosed in Document 1, and therefore, these inventions do not share the same or corresponding special technical feature, do not comply with the requirement of unity of invention, and therefore do not comply with PCT Rule 13.1.

- 1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
- 4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: **Claims 1-10 (partially); the invention relates to a UDP-glucanotransferase mutant, the amino acid sequence of the mutant is mutated at position 69 of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2; and corresponding recombinant vectors and recombinant cells or recombinant**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/115937

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

microorganisms and the application thereof in preparation of stevioside, and a corresponding method of preparing stevioside D.

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/115937

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	107109453	A	29 August 2017	EP	3215629	A1	13 September 2017
				US	2017332673	A1	23 November 2017
				EP	3215629	A4	27 June 2018
				WO	2016073740	A1	12 May 2016
				JP	2017532976	A	09 November 2017
CN	101942424	A	12 January 2011	CN	101942424	B	29 February 2012
US	2015315623	A1	05 November 2015	WO	2015171555	A1	12 November 2015
				US	2018051049	A1	22 February 2018
				US	2016208225	A1	21 July 2016
				BR	112016025147	A2	12 December 2017
				US	2018244709	A1	30 August 2018
				US	2018037600	A1	08 February 2018
				US	9765104	B2	19 September 2017
				EP	3140314	A4	18 October 2017
				EP	3418288	A1	26 December 2018
				KR	20160147994	A	23 December 2016
				MX	2016014506	A	23 February 2017
				CA	2982075	A1	12 November 2015
				US	10138263	B2	27 November 2018
				US	9522929	B2	20 December 2016
				US	9988414	B2	05 June 2018
				EP	3140314	A1	15 March 2017
				US	2018009835	A1	11 January 2018
				US	2016207954	A1	21 July 2016
				AU	2015256232	A1	24 November 2016
				CN	106536536	A	22 March 2017
				CN	106536536	A8	07 July 2017
				US	2016208303	A1	21 July 2016
				AR	100277	A1	21 September 2016
				JP	2017519812	A	20 July 2017
				US	9527880	B2	27 December 2016

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/115937

A. 主题的分类

C12N 9/10(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12P 19/00(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, 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))

CNABS, CPRSABS, DWPI, SIPOABS, CNKI, 万方, ISI Web of Knowledge, BAIDU和检索词: 尿苷二磷酸糖基转移酶, 二磷酸尿苷葡萄糖基转移酶, UDP-葡萄糖基转移酶, 突变, 莱鲍迪苷D, UDP-glycosyltransferase, UGT, 0sUGT, uridine diphosphate glucose, mutant, rebaudioside D, RebD等; Genbank, EMBL, 中国专利生物序列检索系统和检索的序列: SEQ ID NOs:2、3。

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 107109453 A (马努斯生物合成股份有限公司) 2017年 8月 29日 (2017 - 08 - 29) 全文	1-10 (部分)
A	CN 101942424 A (北京农学院) 2011年 1月 12日 (2011 - 01 - 12) 全文	1-10 (部分)
A	Kazuo Yamamoto等. "Contribution of two missense mutations (G71R and Y486D) of the bilirubin UDP glycosyltransferase (UGT1A1) gene to phenotypes of Gilbert's syndrome and Crigler-Najjar syndrome type II" 《Biochimica et Biophysica Acta》, 第1406卷, 第3期, 1998年 4月 28日 (1998 - 04 - 28), 第267-273页	1-10 (部分)
A	US 2015315623 A1 (CONAGEN INC) 2015年 11月 5日 (2015 - 11 - 05) 全文	1-10 (部分)

☐ 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

2019年 7月 8日

国际检索报告邮寄日期

2019年 8月 15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

马振莲

电话号码 62412131

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:

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明, 即:

- [1] 发明1: 权利要求1-10(部分); 涉及UDP-葡萄糖基转移酶突变体, 所述突变体的氨基酸序列是在SEQ ID NO: 2所示氨基酸序列的第69位发生突变, 以及相应的重组载体、重组细胞或重组微生物, 及其在制备甜菊糖苷中的应用以及相应的制备莱鲍迪苷D的方法;
- [2] 发明2: 权利要求1-10(部分); 与发明1的主题相同, 但所涉及的突变位点为第148位;
- [3] 发明3: 权利要求1-10(部分); 与发明1的主题相同, 但所涉及的突变位点为第244位;
- [4] 发明4: 权利要求1-10(部分); 与发明1的主题相同, 但所涉及的突变位点为第251位;
- [5] 发明5: 权利要求1-10(部分); 与发明1的主题相同, 但所涉及的突变位点为第252位;
- [6] 发明6: 权利要求1-10(部分); 与发明1的主题相同, 但所涉及的突变位点为第255位;
- [7] 发明7: 权利要求1-10(部分); 与发明1的主题相同, 但所涉及的突变位点为第368位;
- [8] 发明8: 权利要求1-10(部分); 与发明1的主题相同, 但所涉及的突变位点为第426位;
- [9] 发明9: 权利要求1-10(部分); 与发明1的主题相同, 但所涉及的突变位点为第432位。
- [10] 发明1-9之间相同或相应的技术特征是: 对SEQ ID NO: 2所示的UDP-葡萄糖基转移酶进行点突变, 以得到酶活提高的突变体。然而, 现有技术如文献1(CN107109453 A, 公开日2017年08月29日)公开了SEQ ID NO: 7所示的UGT酶OsUGT1-2, 以及该酶的重排体的一系列酶活提高的点突变体(参见权利要求7, 说明书第158-159段, 图24和25)。经比对, 文献1中的SEQ ID NO: 7与本申请的SEQ ID NO: 2完全相同。可见, 发明1-9之间相同或相应的技术特征已被文献1公开, 因此这些发明之间不具备相同或者相应的特定技术特征, 不满足发明单一性的要求, 因而不符合《PCT实施细则》13.1的规定。

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费, 本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。
2. ☐ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索, 本单位未通知缴纳任何加费。
3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费, 本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求, 具体地说, 是权利要求:
4. ☒ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此, 本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明; 包含该发明的权利要求是: 权利要求1-10(部分): 涉及UDP-葡萄糖基转移酶突变体, 所述突变体的氨基酸序列是对SEQ ID NO: 2所示氨基酸序列的第69位进行突变, 相应的重组载体、重组细胞或重组微生物, 以及所述突变体的应用、制备莱鲍迪苷D的方法。

对异议的意见

- ☐ 申请人缴纳了附加检索费, 同时提交了异议书, 适用时, 缴纳了异议费。
- ☐ 申请人缴纳了附加检索费, 同时提交了异议书, 但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。
- ☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/115937

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	107109453	A	2017年 8月 29日	EP	3215629	A1	2017年 9月 13日
				US	2017332673	A1	2017年 11月 23日
				EP	3215629	A4	2018年 6月 27日
				WO	2016073740	A1	2016年 5月 12日
				JP	2017532976	A	2017年 11月 9日
CN	101942424	A	2011年 1月 12日	CN	101942424	B	2012年 2月 29日
US	2015315623	A1	2015年 11月 5日	WO	2015171555	A1	2015年 11月 12日
				US	2018051049	A1	2018年 2月 22日
				US	2016208225	A1	2016年 7月 21日
				BR	112016025147	A2	2017年 12月 12日
				US	2018244709	A1	2018年 8月 30日
				US	2018037600	A1	2018年 2月 8日
				US	9765104	B2	2017年 9月 19日
				EP	3140314	A4	2017年 10月 18日
				EP	3418288	A1	2018年 12月 26日
				KR	20160147994	A	2016年 12月 23日
				MX	2016014506	A	2017年 2月 23日
				CA	2982075	A1	2015年 11月 12日
				US	10138263	B2	2018年 11月 27日
				US	9522929	B2	2016年 12月 20日
				US	9988414	B2	2018年 6月 5日
				EP	3140314	A1	2017年 3月 15日
				US	2018009835	A1	2018年 1月 11日
				US	2016207954	A1	2016年 7月 21日
				AU	2015256232	A1	2016年 11月 24日
				CN	106536536	A	2017年 3月 22日
				CN	106536536	A8	2017年 7月 7日
				US	2016208303	A1	2016年 7月 21日
				AR	100277	A1	2016年 9月 21日
				JP	2017519812	A	2017年 7月 20日
				US	9527880	B2	2016年 12月 27日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)