

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-536444

(P2019-536444A)

(43) 公表日 令和1年12月19日(2019.12.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 P 19/56 (2006.01)</b>	C 1 2 P 19/56	Z N A 4 B O 6 4
C 1 2 N 15/54 (2006.01)	C 1 2 N 15/54	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2019-521072 (P2019-521072)	(71) 出願人	591235706 ペプシコ・インク
(86) (22) 出願日	平成28年10月21日 (2016.10.21)		アメリカ合衆国・ニューヨーク・パーチェス・アンダーソン・ヒル・ロード・700
(85) 翻訳文提出日	令和1年5月14日 (2019.5.14)	(74) 代理人	100106518 弁理士 松谷 道子
(86) 国際出願番号	PCT/CN2016/102942	(74) 代理人	100156144 弁理士 落合 康
(87) 国際公開番号	W02018/072211	(72) 発明者	陶 軍華 中華人民共和国215600江蘇省蘇州市 張家港市港城大道603号
(87) 国際公開日	平成30年4月26日 (2018.4.26)	(72) 発明者	李 国慶 中華人民共和国215600江蘇省蘇州市 張家港市港城大道603号

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 酵素的方法を使用してレバウディオサイドJを調製するための方法

## (57) 【要約】

酵素的方法を使用してレバウディオサイドJを調製するための方法であって、基質としてレバウディオサイドAを使用することと、グリコシル供与体の存在下、UDP-グリコシルトランスフェラーゼを含有する組み換え細胞及び/又はそこから調製されたUDP-グリコシルトランスフェラーゼの触媒作用下で基質を反応させて、レバウディオサイドJを生成することと、を含む方法が提供される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

酵素的方法を使用してレバウディオサイド J を調製するための方法であって、前記方法において、レバウディオサイド A が、基質として使用され、グリコシル供与体の存在下で、レバウディオサイド J が、UDP - グリコシルトランスフェラーゼを含有する組み換え細胞及び / 又はそこから調製された UDP - グリコシルトランスフェラーゼの触媒作用下での反応によって産生される、方法。

## 【請求項 2】

前記グリコシル供与体が、ラムノシル供与体である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記ラムノシル供与体が、UDP - ラムノースである、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記 UDP - グリコシルトランスフェラーゼが、*Oryza sativa* 由来の UGT - B である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 5】

*Oryza sativa* 由来の UGT - B のアミノ酸配列が、配列表に示される配列 2 と少なくとも 60% 一致している、請求項 4 に記載の方法。

## 【請求項 6】

*Oryza sativa* 由来の UGT - B の前記アミノ酸配列が、配列表に示される配列 2 と少なくとも 70% 一致している、請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 7】

*Oryza sativa* 由来の UGT - B の前記アミノ酸配列が、配列表に示される配列 2 と少なくとも 80% 一致している、請求項 6 に記載の方法。

## 【請求項 8】

*Oryza sativa* 由来の UGT - B の前記アミノ酸配列が、配列表に示される配列 2 と少なくとも 90% 一致している、請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記反応が、水性系中 35 ~ 45 の温度及び 7.5 ~ 8.5 の pH で実行される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記反応が、リン酸緩衝液中で実行される、請求項 9 に記載の方法。

## 【請求項 11】

前記反応系が、UDP - グリコシルトランスフェラーゼの組み換え細胞及び細胞透過剤を含有する、請求項 9 に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記細胞透過剤が、トルエンであり、前記反応系中のトルエンの体積比濃度が、1 ~ 3% である、請求項 11 に記載の方法。

## 【請求項 13】

前記反応に使用される全ての原料を反応ケトルに添加して均一に混合した後、攪拌しながら反応のために設定温度で配置する、請求項 9 に記載の方法。

## 【請求項 14】

前記組み換え細胞が、微生物細胞である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 15】

前記微生物が、大腸菌 (*Escherichia coli*)、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 又はピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) である、請求項 14 に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、レバウディオサイド J を調製するための方法に関し、具体的には、レバウディオサイド J を調製するための生物学的方法に関する。

10

20

30

40

50

## 【背景技術】

## 【0002】

甘味剤は、食品、飲料及びキャンディーの製造において広範な用途を有する食品添加剤の部類である。それらは、食品製造プロセスにおいて添加されてもよく、あるいは家庭でのベーキングにおいてスクロースの代用物として適切な希釈を通して使用されてもよい。甘味剤としては、天然甘味剤、例えば、スクロース、高果糖コーンシロップ、ハチミツ等、及び人工甘味剤、例えば、アスパルテム、サッカリン等が挙げられる。ステビオサイドは、植物 *Stevia rebaudiana* から抽出された天然甘味剤の部類であり、存在する食品及び飲料において広く使用されている。*Stevia rebaudiana* の抽出物は、レバウディオサイドを含む様々なステビオサイドを含有する。天然に抽出されたステビオサイドは、異なるバッチにわたって成分の大きな違いを有し、その後の精製を必要とする。

10

## 【0003】

ステビア葉のステビオサイドに見られるレバウディオサイドJの含有量は、0.5%を超えない。したがって、従来の方法を使用して、高い純度を有するレバウディオサイドJの抽出物を得ることは極めて困難である。したがって、レバウディオサイドJの詳細な研究は限られ、またレバウディオサイドJの商業用途が妨げられている。

## 【発明の概要】

## 【0004】

本発明によって解決される技術的問題は、先行技術における欠陥を克服することである。本発明は、酵素的方法を使用してレバウディオサイドJを調製するための方法を提供することによってそれを達成する。そのような方法では、高い純度を有するレバウディオサイドJ製品を、より低いコストで、かつより短い製造サイクルで製造することができる。

20

## 【0005】

本発明では、上記の技術的問題を解決するために、以下の技術的解決策が用いられる。

## 【0006】

酵素的方法を使用してレバウディオサイドJを調製するため提供され、この方法において、レバウディオサイドAが、基質として使用され、グリコシル供与体の存在下で、レバウディオサイドJが、UDP-グリコシルトランスフェラーゼを含有する組み換え細胞及び/又はそこから調製されたUDP-グリコシルトランスフェラーゼの触媒作用下での反応によって産生される。UGTとも呼ばれるUDP-グリコシルトランスフェラーゼ(すなわち、ウリジンジホスホグリコシルトランスフェラーゼ)は、既に周知である。

30

## 【0007】

好ましくは、グリコシル供与体は、ラムノシル供与体である。

## 【0008】

より好ましくは、ラムノシル供与体は、UDP-ラムノースである。

## 【0009】

好ましくは、UDP-グリコシルトランスフェラーゼは、*Oryza sativa* (米)由来のUGT-Bである。

## 【0010】

好ましくは、*Oryza sativa*由来のUGT-Bのアミノ酸配列は、配列表に示される配列2と少なくとも60%一致している。

40

## 【0011】

より好ましくは、*Oryza sativa*由来のUGT-Bのアミノ酸配列は、配列表に示される配列2と少なくとも70%一致している。

## 【0012】

更に、*Oryza sativa*由来のUGT-Bのアミノ酸配列は、配列表に示される配列2と少なくとも80%一致している。

## 【0013】

更に*Oryza sativa*由来のUGT-Bのアミノ酸配列は、配列表に示される

50

配列 2 と少なくとも 90% 一致している。

【0014】

一実施例によると、*Oryza sativa* 由来の UGT - B のアミノ酸配列は、配列表に示される配列 2 と完全に同一である。

【0015】

本発明によると、反応は、水性系中 4 ~ 50 の温度及び 5.0 ~ 9.0 の pH で実行される。好ましくは、反応は、水性系中 35 ~ 45 の温度及び 7.5 ~ 8.5 の pH で実行される。より好ましくは、反応は、40 未満の温度及び 8.0 未満の pH で実行される。

【0016】

より好ましくは、反応は、リン酸緩衝液中で実行される。

【0017】

より好ましくは、反応系は、UDP - グリコシルトランスフェラーゼの組み換え細胞及び細胞透過剤を含有し、反応は、細胞透過剤の存在下で実行される。更に、細胞透過剤は、トルエンであり、反応系中のトルエンの体積比濃度は、1 ~ 3% である。更に、トルエンの体積比濃度は、2% である。

【0018】

より好ましくは、反応において使用される全ての原料を反応ケトルに添加して均一に混合した後、攪拌しながら反応のために設定温度で配置する。反応が完了した後、使用要件を満たすことができるレバウディオサイド J 産生物を精製処理を通して得ることができる。特定の精製方法は、樹脂単離を含む後処理によるものであり、95% もの高い純度を有するレバウディオサイド J 産生物を得ることができる。

【0019】

好ましくは、組み換え細胞は、微生物細胞である。

【0020】

より好ましくは、微生物は、大腸菌 (*Escherichia coli*)、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 又はピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) である。

【0021】

前述の技術的解決策により、本発明は、先行技術と比較して以下の利点を有する。

【0022】

本発明によって提供される酵素的方法を使用するレバウディオサイド J を調製する方法は、重要な適用価値を有する。基質レバウディオサイド A は、酵素的方法を使用することにより大量に得ることができるため、レバウディオサイド J の産生は、原料の量によって制限されない。このため、製造コストが大幅に削減される。また植物におけるステビオサイドの含有量が低いため、及び異なる構造を有する多くのステビオサイドが存在するため、高い純度を有する産生物を抽出することはむしろ困難であると考えられるべきである。ステビア葉からレバウディオサイド J を抽出するための先行技術と比較すると、本発明は、新規のステビオサイドレバウディオサイド J の研究及び適用を促進する酵素合成方法を採用することによって、より高い純度を有する産生物を提供する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0023】

レバウディオサイド A 及びレバウディオサイド J の構造式については、それぞれ式 I 及び II を参照されたい。

【0024】

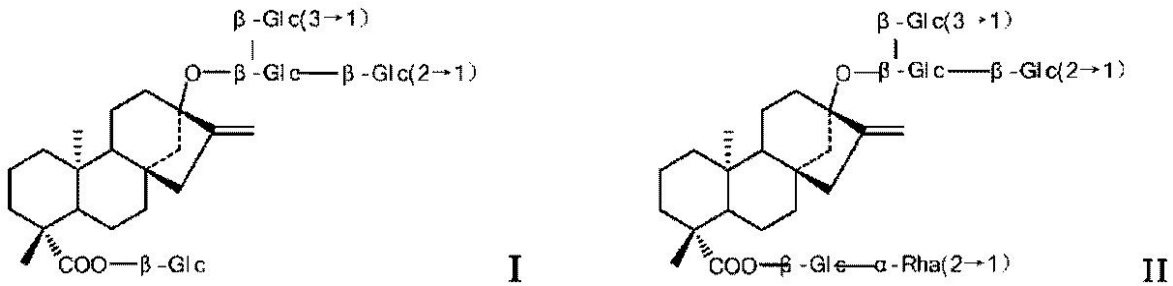
10

20

30

40

## 【化 1】



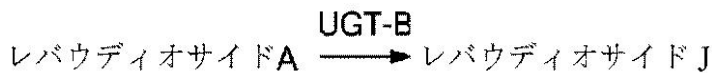
## 【 0 0 2 5 】

10

本発明により提供されるレバウディオサイドJの主要合成経路は、以下のとおりである。

## 【 0 0 2 6 】

## 【化 2】



## 【 0 0 2 7 】

本発明において採用されるUGT-Bは、凍結乾燥酵素粉末の形態で、又は組み換え細胞中に存在し得る。

## 【 0 0 2 8 】

20

UGT-Bを得るための方法は、以下のとおりである。

UGT-Bの組み換え大腸菌（又は他の微生物）発現株は、分子クローニング技法及び遺伝子工学技法を利用することによって得られる。次いで、組み換え大腸菌を発酵させて、UGT-Bを含有する組み換え細胞を得るか、又は上記組み換え細胞由来のUGT-Bの凍結乾燥粉末を調製し、取得する。

## 【 0 0 2 9 】

本発明において記載される分子クローニング技法及び遺伝子工学技法の両方は、既に周知されている。分子クローニング技法は、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd Edition) (J. Sambrook, 2005)に見出すことができる。

30

## 【 0 0 3 0 】

遺伝子工学技法を用いることによって構築された本明細書における組み換え株の発現ステップは、以下のとおりである。

(1) (配列表に示される配列1及び配列2に従って)必要な遺伝子断片を遺伝的に合成し、pUC57ベクターにライゲーションする一方で、2つの末端にNdeI及びBamHI酵素切断部位をそれぞれ付加する。

(2) 各遺伝子断片を、発現ベクターpET30aの対応する酵素切断部位に二重消化及びライゲーションにより挿入し、それにより各遺伝子を、T7プロモーターの制御下で配置する。

(3) 組み換えプラスミドを、大腸菌BL21(DE3)に形質転換する。標的タンパク質の発現は、IPTGを利用することによって誘導され、次いでUGT-Bの組み換え大腸菌の発現株が得られる。

40

## 【 0 0 3 1 】

UGT-Bを含有する組み換え大腸菌の発現株を利用することによって、UGT-Bを含有する組み換え細胞及びUGT-Bの凍結乾燥粉末を調製するためのステップは、以下のとおりである。

UGT-Bを含有する組み換え大腸菌発現株を、1%の割合に従って4mLの液体LB培地に接種した。振盪培養を、37°Cで(200rpmで)一晚実行した。一晚培養した物質を採取し、1%の割合に従って50mLの液体培地に接種した。OD<sub>600</sub>値が0.6~0.8に達するまで、振盪培養を、37°Cで(200rpmで)一晚実行した。次い

50

で、0.4 mMの最終濃度を有するIPTGを、一晚の振盪培養にわたって20 で添加した。誘導が完了した後、細胞を遠心分離(8,000 rpm、10分)によって回収した。次いで、細胞を5 mLの2 mmol/Lリン酸緩衝液(pH 7.0)で再懸濁して、組み換え細胞を得た。次いで、細胞を氷浴中で超音波的に破壊した。ホモジネートを遠心分離した(8,000 rpm、10分)。また上清を回収し、凍結乾燥粉末を得るために24時間凍結乾燥した。

#### 【0032】

本発明は、特定の実施例と組み合わせて更に詳述される。

#### 【0033】

実施例1：UGT-Bを含有する組み換え大腸菌細胞の調製

配列3及び配列4に従って、UGT-B遺伝子断片を遺伝的に合成し、一方で2つの末端にNdeI及びBamHI酵素切断部位をそれぞれ付加し、pUC57ベクター(Suzhou Jin Wei Zhi Biotech. Co., Ltd.製)にライゲーションした。UGT遺伝子セグメントを、制限エンドヌクレアーゼNdeI及びBamHIで酵素切断した後、セグメントを回収し、精製した。BL21(DE3)株を形質転換するために、T4リガーゼを付加して、セグメントをpET30aの対応する酵素切断部位にライゲーションした。

10

#### 【0034】

UGT株を、1%の割合に従って4 mLの液体LB培地に接種した。振盪培養を、37 で(200 rpmで)一晚実行した。一晚培養した物質を採取し、1%の割合に従って50 mLの液体LB培地に接種した。OD<sub>600</sub>値が0.6~0.8に達するまで、振盪培養を、37 で(200 rpmで)一晚実行した。次いで、0.4 mMの最終濃度を有するIPTGを、一晚の振盪培養にわたって20 で添加した。誘導が完了した後、細胞を遠心分離(8,000 rpm、10分)によって回収した。回収した細胞を、5 mLの2 mmol/Lリン酸緩衝液(pH 7.0)で再懸濁して、触媒作用のためにUGT-Bを含有する組み換え細胞を得た。

20

#### 【0035】

実施例2：UGT-Bの凍結乾燥粉末の調製

実施例3で調製したUGT-Bを含有する組み換え細胞を、氷浴中で超音波的に破壊した。ホモジネートを遠心分離した(8,000 rpm、10分)。また上澄みを回収し、24時間凍結乾燥して、UGT-Bの凍結乾燥粉末を得た。

30

#### 【0036】

実施例3：基質としてのレバウディオサイドAによるUDP-グリコシルトランスフェラーゼの触媒作用下でのレバウディオサイドJの合成

この実施例では、実施例2の方法に従って調製したUGT-Bの凍結乾燥粉末を、レバウディオサイドJの触媒作用及び合成に使用した。

#### 【0037】

1 Lの0.05 mol/Lのリン酸緩衝液(pH 8.0)、2 gのUDPラムノース、1 gのレバウディオサイドA、10 gのUGT-Bの凍結乾燥粉末を反応系に順次添加し、均一に混合した後40 の水浴に入れ、300 rpmで攪拌しながら24時間にわたって反応させた。反応が完了した後、500 µLの反応液を等量の無水メタノールに添加し、均一に混合した。次いで、それを8,000 rpmで10分間遠心分離し、高性能液体クロマトグラフィを使用して上清濾過膜を検出した(クロマトグラフ条件：カラム：Agilent eclipse sb-C18 4.6×150 mm、検出波長：210 nm、移動相：アセトニトリル：脱イオン水=24%：76%、流速：1.0 mL/分、カラム温度：30 )。レバウディオサイドAの変換率は、90%を超えた。シリカ樹脂による単離及び結晶化などの後処理によって上清を精製した後、0.52 gのレバウディオサイドJを得て、その純度は95%を超えた。

40

#### 【0038】

実施例4：基質としてのレバウディオサイドAによるUDP-グリコシルトランスフェ

50

ラーゼの組み換え細胞の触媒作用下でのレバウディオサイドJの合成

この実施例では、実施例1の方法に従って調製したUGT-Bを含有する組み換え細胞を、レバウディオサイドJの触媒作用及び合成に使用した。

【0039】

1 Lの0.05 mol/Lのリン酸緩衝液(pH 8.0)、2 gのUDPラムノース、1 gのレバウディオサイドA、20 mLのトルエン、40%のUGT-B全細胞を反応系に順次添加し、均一に混合した後40℃の水浴に入れ、300 rpmで攪拌しながら24時間にわたって反応させた。反応が完了した後、500 µLの反応液を取り、上清を等量の無水メタノールと共に添加し、均一に混合した。次いで、それを8,000 rpmで10分間遠心分離し、高性能液体クロマトグラフィを使用して上清濾過膜を検出した(クロマトグラフ条件：カラム：Agilent eclipse sb-C18 4.6×150 mm、検出波長：210 nm、移動相：アセトニトリル：脱イオン水=24%：76%、流速：1.0 mL/分、カラム温度：30℃)。レバウディオサイドAの変換率は、90%を超えた。シリカ樹脂による単離及び結晶化などの後処理によって上清を精製した後、0.49 gのレバウディオサイドCを得て、その純度は95%を超えた。

10

【0040】

上述の実施例は、単に、本発明の技術的概念及び特徴の説明のためのものである。実施例を提供する目的は、当業者が本発明を理解し、それを適宜実施することを可能にすることだけである。本発明の範囲は、これに限定されない。本発明の本質から誘導されるいかなる同等の変更又は修正も、本発明の保護範囲内に包含されるものとする。

20

【配列表】

2019536444000001.app

## 【 国際調査報告 】

**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:



<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. PCT/CN2016/102942
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
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>B. FIELDS SEARCHED</b>		
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.		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
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
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 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 REPORT**

International 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", <i>Journal of Plant Physiology</i> , 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	06 February 2014		
		EP 2852296 A4	22 June 2016		
		MX 2014014080 A	21 July 2015		
		US 2016192685 A1	07 July 2016		
		US 2017112176 A1	27 April 2017		
		WO 2013176738 A1	28 November 2013		
		US 9243273 B2	26 January 2016		
		EP 2852296 A1	01 April 2015		
		JP 2015519059 A	09 July 2015		
		US 2015031869 A1	29 January 2015		
		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	04 December 2014
EP 3004128 A1	13 April 2016				
EP 3004127 A1	13 April 2016				
CA 2913252 A1	04 December 2014				
MX 2015016096 A	21 March 2016				
MX 2015016362 A	13 February 2017				
WO 2014193888 A1	04 December 2014				
US 2016198748 A1	14 July 2016				
CN 105408339 A	16 March 2016				
CN 105492453 A	13 April 2016				
CN 103397064 A	20 November 2013			CN 103397064 B	15 April 2015
		US 2016298159 A1	13 October 2016		
		MX 2016001986 A	26 October 2016		
		AU 2013398146 A1	07 April 2016		
		JP 2016527892 A	15 September 2016		
		CA 2921247 A1	19 February 2015		
		WO 2015021690 A1	19 February 2015		
		EP 3034614 A1	22 June 2016		
		EP 3034614 A4	12 April 2017		

## 国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2016/102942

<b>A. 主题的分类</b>		
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>B. 检索领域</b>		
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.		
<b>C. 相关文件</b>		
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 (清赛科有限责任公司, 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 (清赛科有限责任公司, 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
<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。		
* 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		
"B" 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		马振莲
传真号 (86-10)62019451		电话号码 (86-10)62412131

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2009年7月)

## 国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2016/102942

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

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2009年7月)

## 国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2016/102942

## 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

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

## フロントページの続き

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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

(72)発明者 王 文霞

中華人民共和国 2 1 5 6 0 0 江蘇省蘇州市張家港市港城大道 6 0 3 号

(72)発明者 鄭 雷雷

中華人民共和国 2 1 5 6 0 0 江蘇省蘇州市張家港市港城大道 6 0 3 号

(72)発明者 朱 春磊

中華人民共和国 2 1 5 6 0 0 江蘇省蘇州市張家港市港城大道 6 0 3 号

(72)発明者 梁 曉亮

中華人民共和国 2 1 5 6 0 0 江蘇省蘇州市張家港市港城大道 6 0 3 号

(72)発明者 陳 車翹

中華人民共和国 2 1 5 6 0 0 江蘇省蘇州市張家港市港城大道 6 0 3 号

Fターム(参考) 4B064 AF48 CA02 CA19 CA21 CC24 DA10