



610000

成都市天府新区华阳华府大道1段1号蓝润ISC2栋1单元2008号 成都天汇致远知识产权代理事务所(普通合伙)  
陆岩(028-87763797)

发文日:

2023年09月16日



申请号: 201910848577.0

发文序号: 2023091600248990

申请人: 四川农业大学

发明创造名称: 一种糠醛等抑制物耐受酵母工程菌株及其构建方法与应用

### 驳 回 决 定

1. 根据专利法第38条及其实施细则第53条的规定, 决定驳回上述专利申请, 驳回的依据是:

- 申请不符合专利法第2条第2款的规定。
- 申请属于专利法第5条或者第25条规定的不授予专利权的范围。
- 申请不符合专利法第9条第1款的规定。
- 申请不符合专利法第19条第1款的规定。
- 申请不符合专利法第22条的规定。
- 申请不符合专利法第26条第3款或者第4款的规定。
- 申请不符合专利法第26条第5款或者实施细则第26条的规定。
- 申请不符合专利法第31条第1款的规定。
- 申请的修改不符合专利法第33条的规定。
- 申请不符合专利法实施细则第20条第2款的规定。
- 分案申请不符合专利法实施细则第43条第1款的规定。
- \_\_\_\_\_

详细的驳回理由见驳回决定正文部分(共4页)。

2. 本驳回决定是针对下列申请文件作出的:

- 原始申请文件。
- 分案申请递交日提交的文件。
- 下列申请文件:

申请日提交的摘要附图、说明书摘要、说明书附图图1-13、说明书第1-113段、说明书核苷酸和氨基酸序列表; 2023年7月14日提交的权利要求第1-9项。

3. 根据专利法第41条及实施细则第60条的规定, 申请人对本驳回决定不服的, 可以在收到本决定之日起3个月内向专利局复审和无效审理部请求复审。根据专利法实施细则第96条的规定, 复审费应在上述期限内缴纳, 期满未缴纳或者未缴足的, 视为未提出请求。

审查员: 马颖

联系电话: 010-62411543

审查部门: 医药生物发明审查部





## 驳回决定

申请号：2019108485770

本决定涉及的是申请号为 2019108485770 的名称为“一种糠醛等抑制物耐受酵母工程菌株及其构建方法与应用”的发明专利申请（下称“本申请”），申请人为四川农业大学，申请日为 2019 年 09 月 09 日。

### 一、案由

本申请原申请文件权利要求书包括 4 项独立权利要求 1-3、10 以及 6 项从属权利要求 4-9。

应申请人于 2019 年 09 月 09 日提出的实质审查请求，审查员对本申请进行了实质审查，并于 2022 年 07 月 15 日发出了第一次审查意见通知书，指出权利要求 2 不具备专利法第 22 条第 3 款规定的创造性，权利要求 1-10 不符合专利法第 31 条第 1 款的规定。通知书中引用了如下对比文件：

对比文件 1：CN 105199974A，公开日为 2015 年 12 月 30 日。

申请人于 2022 年 08 月 17 日针对第一次审查意见通知书提交了意见陈述书和修改的权利要求书，将权利要求 3 步骤 4 的出发菌株修改为引用权利要求 1 的菌株，权利要求 10 中糠醛等抑制物耐受酵母工程菌修改为引用权利要求 3-8 任一权利要求所述的糠醛等抑制物耐受酵母工程菌，删除原权利要求 2 并相应地修改其他权利要求的编号和引用关系。意见陈述认为：对比文件 1 没有公开糠醛等抑制物耐受酵母出发菌株命名为 YB-A-6-1 (YBA\_08)，本发明基于糠醛等抑制物耐受酵母出发菌株，通过转录调控基因联合过表达构建酿酒酵母工程菌，为从基因表达层面改造酵母菌株提供了技术手段；能够制备得到糠醛等抑制物耐受酵母工程菌，对比文件 1 没有上述技术效果。

审查员继续审查，并于 2022 年 10 月 13 日发出第二次审查意见通知书，指出权利要求 1 不具备专利法第 22 条第 3 款规定的创造性，权利要求 1 和权利要求 2-8、3-9 之间不符合专利法第 31 条第 1 款的规定。通知书没有引用新的对比文件。

针对上述审查意见通知书，申请人于 2022 年 11 月 10 日递交了意见陈述书和修改的权利要求书，将原权利要求 1、3-4 中的附加技术特征并入原权利要求 2 中修改为权利要求 1。意见陈述认为：本申请工程菌对糠醛耐受能力的提高具体表现为细胞壁抗性的明显增强，依赖于 NADH 作为辅酶的醛还原酶比活力的显著提高，以及一系列与有毒物质外排、细胞壁和细胞膜成分合成、蛋白质折叠、核苷酸合成等相关基因的显著上调转录表达；通过上述方法构建的工程菌对 5-羟甲基糠醛、乙酸、苯酚、乙醇以及玉米秸秆水解液 10 中的抑制物等的耐受能力均有所增强，可作为较良好的工业发酵底盘菌株，具有用于第二代生物燃料乙醇以及以木质纤维素水解液为原料的其它生物基化学品工业化生产的应用潜力；本申请通过转录调控基因联合过表达构建酿酒酵母工程菌，为从基因表达层面改造酵母菌株提供了技术手段。

审查员继续审查，并于 2023 年 01 月 11 日发出第三次审查意见通知书，指出权利要求 1-5 不具备专利法第 22 条第 3 款规定的创造性。通知书中增加引用了如下对比文件：

对比文件 2：ADH7 启动子精细调控表达 MSN2 酿酒酵母菌株对糠醛耐受的研究，《微生物学通报》，赵鲜仙等，第 42 卷第 10 期，第 1903-1911 页，公开日为 2015 年 3 月 24 日。

针对上述审查意见通知书，申请人于递交了意见陈述书和修改的权利要求书，在申请日提交的权利要求书的基础上将原权利要求 2 作为新权利要求 1，将原权利要求 1 并入原权利要求 3 后形成新权利要求 2 并将其他权利要求作相应的适应性修改。意见陈述认为：本申请与对比文件 1-2 的酵母工程菌株不同，且对比文件 1-2 并未教导如何获得本申请的酵母工程菌 PYR；本申请的技术效果应该是不差于对比文件 1。

审查员认为，本案事实已经清楚，因此针对申请日提交的摘要附图、说明书摘要、说明书附图图 1-13、说明书第 1-113 段、说明书核苷酸和氨基酸序列列表；2023 年 7 月 14 日提交的权利要求第 1-9 项作出本驳回决定。

### 二、驳回理由

（一）权利要求 1-8 不具备专利法第 22 条第 3 款的规定。

1，权利要求 1 要求保护一株糠醛等抑制物耐受酵母工程菌。对比文件 1 (CN105199974A, 20151230) 公开了一种酿酒酵母 ScBG (保藏号为 CCTCC NO:M2015488)；该菌株具有低营养需求、高抗逆和高产醇



性能,同时能稳定、高效分泌表达 $\beta$ -葡萄糖苷酶,以工业废料糠醛渣为底物、添加尿素使乙醇转化率达理论值的90.89%,对清洁有效的利用废弃纤维素资源生产能源有意义;该菌株的获得包括如下步骤:从商品化安琪酵母生孢、分离、筛选得到具有高纤维素料耐受和发酵产醇能力、尿嘧啶营养缺陷型选择标记的单倍体菌株Sc-URA(其中包括划线含有0.8g/100mL乙酸和0.6g/100mL糠醛的YPD培养基平板,密封,30°C培养数天至菌落长出,重复进行前述玉米芯酸碱预处理料的同步糖化发酵评价,最后筛出 $\alpha$ 型单倍体菌株Sc的步骤),整合载体pGEM- $\delta$ R-URA-AaBG- $\delta$ L酶切线性化片段转化菌株Sc-URA感受态细胞得到重组工业菌株,4 $\beta$ -葡萄糖苷酶基因表达工业菌株的进一步筛选,菌株ScBG表达 $\beta$ -葡萄糖苷酶基因的稳定性考察、利用玉米芯酸碱预处理料同步糖化发酵产醇评价、利用玉米秸秆汽爆料同步糖化发酵产醇评价和利用玉米芯工业废料糠醛渣同步糖化发酵产醇评价(参见全文,尤其是摘要、说明书第35-79段)。权利要求1和对比文件1的区别在于:菌株不同。因此权利要求1实际解决的技术问题是提供了另一株能耐受糠醛等抑制物的酿酒酵母。如前所述,本领域技术人员有动机利用常规的筛选或基因工程技术获得其他耐受糠醛等物质的酿酒酵母。虽然对比文件1没有记载所述菌株醛还原酶比活力,对5-羟甲基糠醛、苯酚和无水乙醇的耐受性实验,但是对比文件1使用同时含有0.8g/100mL乙酸和0.6g/100mL糠醛YPD培养基平板进行筛选(属于两种抑制物联用)Sc-URA,并且ScBG可以利用糠醛渣进行乙醇发酵,本领域技术人员可以合理预期其具备耐受乙醇等物质的性质;本申请所述菌株对乙酸和糠醛的耐受实验所用最大浓度分别为5.2g/L(即约0.52g/100mL)和55mM(即约0.53g/100mL),因此本申请的技术效果是本领域技术人员可以合理预期的。因此,权利要求1相对于对比文件1和本领域常规技术的结合不具备专利法第22条第3款规定的创造性。

2,权利要求2要求保护权利要求1所述的一株糠醛等抑制物耐受酵母工程菌的构建方法。对比文件1(CN105199974A,2015年12月30日)是其最接近的现有技术,其公开了一种酿酒酵母ScBG(保藏号为CCTCC NO:M2015488);该菌株具有低营养需求、高抗逆和高产醇性能,同时能稳定、高效分泌表达 $\beta$ -葡萄糖苷酶,以工业废料糠醛渣为底物、添加尿素使乙醇转化率达理论值的90.89%,对清洁有效的利用废弃纤维素资源生产能源有意义;该菌株的获得包括如下步骤:从商品化安琪酵母生孢、分离、筛选得到具有高纤维素料耐受和发酵产醇能力、尿嘧啶营养缺陷型选择标记的单倍体菌株Sc-URA(其中包括划线含有0.8g/100mL乙酸和0.6g/100mL糠醛的YPD培养基平板,密封,30°C培养数天至菌落长出,重复进行前述玉米芯酸碱预处理料的同步糖化发酵评价,最后筛出 $\alpha$ 型单倍体菌株Sc的步骤),整合载体pGEM- $\delta$ R-URA-AaBG- $\delta$ L酶切线性化片段转化菌株Sc-URA感受态细胞得到重组工业菌株,4 $\beta$ -葡萄糖苷酶基因表达工业菌株的进一步筛选,菌株ScBG表达 $\beta$ -葡萄糖苷酶基因的稳定性考察、利用玉米芯酸碱预处理料同步糖化发酵产醇评价、利用玉米秸秆汽爆料同步糖化发酵产醇评价和利用玉米芯工业废料糠醛渣同步糖化发酵产醇评价(参见全文,尤其是摘要、说明书第35-79段)。权利要求1和对比文件1的区别在于:菌株及其构建方法不同。因此权利要求1实际解决的技术问题是:提供了另一种糠醛等抑制物耐受的酿酒酵母的构建方法。

对比文件2(ADH7启动子精细调控表达MSN2酿酒酵母菌株对糠醛耐受的研究,《微生物学通报》,赵鲜仙等,第42卷第10期,第1903-1911页,2015年3月24日)公开了ADH7启动子精细调控表达MSN2酿酒酵母菌株对糠醛耐受的研究,并具体公开了建了在ADH7启动子控制下表达MSN2的酿酒酵母基因工程菌株AM01,该菌株对糠醛耐受能力明显增强,MSN2基因的转录得到了自我精细调控,并提高了其调控基因的转录水平(参见第1903页摘要部分),同时公开了其构建方法包括:(1)DNA提取及纯化:采用E.Z.N.A.TMYeast DNA Kit提取酿酒酵母BY4742全基因组DNA,胶回收DNA片段,纯化PCR及酶切目的DNA片段;(2)PCR扩增:采用DNASar5.0软件设计ADH启动子、MSN2基因及CYC1终止子扩增引物,以酿酒酵母BY4742基因组DNA为模板,用引物对ADH7p\_F和ADH7p\_R扩增ADH7启动子;用引物对CYC1t\_F和CYC1t\_R扩增CYC1终止子;以ADH7p\_F和CYC1t\_R为引物进行融合PCR扩增ADH7p-CYC1t片段;(3)重组酵母表达质粒pUG6-AM的构建:将pUG6质粒和ADH7p-CYC1t融合片段经EcoRV和HpaI双酶切电泳纯化后,用T4DNA连接酶16°C连接过夜,转化E.coli DH5 $\alpha$ 感受态细胞。转化细胞涂布于含氨苄青霉素(100mg/L)的LB固体培养基上,37°C培养18h,挑选转化子,提取质粒,进行酶切及PCR验证。阳性质粒命名为pUG6-ADH7p。将MSN2扩增纯化后的DNA产物经SpeI和SacII双酶切电泳纯化后,与经同样处理的pUG6-ADH7p质粒混合,采用T4DNA连接酶16°C连接过夜,转化E.coli DH5 $\alpha$



感受态细胞。转化细胞涂布于含氨苄青霉素(100mg/L)的 LB 固体培养基上, 37°C 培养 18h, 挑选转化子, 提取质粒, 进行酶切及 PCR 验证。阳性质粒即为重组酵母表达质粒 pUG6-AM; (4) 重组质粒转化酿酒酵母菌: 用 Kpn I 内切酶线性化酶切处理重组质粒 pUG6-AM, 转化酿酒酵母 BY4742 感受态细胞。在含 G418(200mg/L) 的 YEPD 固体培养基上 28°C 培养 3-5d, 挑选转化子, 划线纯化培养, 并提取重组菌的基因组 DNA, 采用引物对 ADH7\_F 和 MSN2\_R 进行 ADH7p-MSN2 表达盒的 PCR 鉴定。重组酿酒酵母基因工程菌命名为 AM01。qRT-PCR 扩增引物采用引物设计软件 Primer3([http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3\\_www.cgi](http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi)) 设计, 引物序列及相关信息见表 1 (参见第 1904-1907 页 1.2.1-1.2.4、1.2.6 及表 1), 公开了“线性化后的重组酵母表达质粒 pUG6-AM, 转化酿酒酵母 BY4742 后, 在 G418 抗性平板上筛选到了阳性转化子”(参见第 1908 页 2.3)。因此, 对比文件 2 公开了在 ADH7 启动子、CYC1 终止子控制下表达 MSN2 的酿酒酵母基因工程菌株 AM01 的构建方法、引物设计方法及具体细节。

对于具体转录调控基因的选择, 对比文件 2 还公开了“酿酒酵母对木质纤维素水解醛类抑制因子的脱毒及耐受涉及多基因、多层次的复杂的相互作用, 至少还有 7 个转录调控基因(YAP1、YAP5、YAP6、PDR1、PDR3、RPN4 和 HSF1)参与其中。因此, 采用自我精细调控的启动子来实现这些基因的联合调控表达, 有望获得对木质纤维素水解醛类耐受性更为增加的基因工程菌株”(参见第 1910 页最后一段), 因此, 本领域技术人员在对比文件 2 的教导下, 有动机选择这 7 个转录调控基因或其中几个进行联合调控表达获得对木质纤维素水解醛类耐受性更为增加的基因工程菌株。

对于启动子, 本领域公知, TEF1 是酵母常用启动子(参见:《生物制药工艺》, 胡莉娟、李存法主编, 第 146 页, 重庆大学出版社, 2016 年 02 月), 本领域技术人员可以根据需要进行选择。

对于限制性内切酶的选择、转化时片段的质量比例等构建过程中的其他细节则属于本领域技术人员的常规技术手段。

从技术效果的角度来说, 虽然对比文件 1 没有记载所述菌株醛还原酶比活力, 对 5-羟甲基糠醛、苯酚和无水乙醇的耐受性实验, 但是对比文件 1 使用同时含有 0.8g/100mL 乙酸和 0.6g/100mL 糠醛的 YPD 培养基平板进行筛选(属于两种抑制物联用) Sc-URA, 并且 ScBG 可以利用糠醛渣进行乙醇发酵, 本领域技术人员可以合理预期其具备耐受乙醇等物质的性质; 本申请所述菌株对乙酸和糠醛的耐受实验所用最大浓度分别为 5.2g/L (即约 0.52g/100mL) 和 55mM (即约 0.53g/100mL), 因此, 对比文件 1 中重组工程菌株 ScBG 在乙酸和糠醛的耐受浓度比本申请中构建得到的工程菌 PYR 的耐受浓度更高。并且, 对比文件 2 公开了“在相同糠醛浓度下, 酿酒酵母重组菌株 AM01 总是比对照菌株 BY4742 提前恢复生长, 并且随着糠醛浓度的增加优势更为明显。在糠醛应激状态下, 采用 ADH7 启动子调控 MSN2 的转录能增强酿酒酵母对糠醛的耐受能力”(第 1908 页 2.4)、“在有糠醛存在的情况下, AM01 菌株中 MSN2 的转录水平明显高于对照菌株, 二者的比值随着糠醛浓度的增加而增大。其调控的下游代表基因转录水平的比值也随之相应增大”(参见第 1908-1909 页 2.5)、“采用自我精细调控的启动子来实现这些基因的联合调控表达, 有望获得对木质纤维素水解醛类耐受性更为增加的基因工程菌株”(参见第 1910 页最后一段), 因此, 对比文件 2 已经公开了通过转录调控基因的联合调控表达获得对木质纤维素水解醛类耐受性更为增加的基因工程菌株, 因此, 权利要求 1 所述技术效果是本领域技术人员可以合理预期的。

因此, 在对比文件 1 的基础上结合对比文件 2 及本领域常规技术手段得到权利要求 1 要求保护的技术方案对本领域技术人员来说是显而易见的。因此, 权利要求 1 不具备专利法第 22 条第 3 款规定的创造性。

2, 权利要求 3-8 是权利要求 2 的从属权利要求, 并对基因片段和表达盒的扩增引物和重组质粒的阳性克隆子的鉴定引物作进一步限定。对比文件 2 公开了 qRT-PCR 扩增引物采用引物设计软件 Primer3([http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3\\_www.cgi](http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi)) 设计, 引物序列及相关信息见表 1 (参见第 1907 页 1.2.6 及表 1), 因此对比文件 2 已经公开了引物设计的一般方法, 而酵母菌株 BY4742 是常用的商业化的工程菌株, 本领域技术人员根据对比文件 2 公开的方法针对已知基因设计扩增引物以及针对构建的重组质粒设计鉴定引物是本领域技术人员的常规技术手段。因此, 在其所引用的权利要求 2 不具备创造性的基础上, 权利要求 3-8 也不具备专利法第 22 条第 3 款规定的创造性。

## (二) 对于申请人意见陈述的回复



申请人认为：

1, 本申请与对比文件 1-2 的酵母工程菌株不同, 且对比文件 1-2 并未教导如何获得本申请的酵母工程菌 PYR; 本申请所获得的酵母工程菌 PYR 对 5-羟甲基糠醛、乙酸、苯酚、乙醇以及玉米秸秆水解液中的抑制物等的耐受能力较比出发菌株 YB-A-6-1 (从酒醅样品中提取的酵母菌株) 均有所增强, 本申请可以耐受的糠醛浓度为 0.107g/100mL (对比文件 1 为 0.6g/100mL), 乙酸浓度为 0.52g/100mL (对比文件 1 为 0.8g/100mL), 本申请的技术效果应该是不差于对比文件 1。

2, 对比文件 1 的菌株是从商品化安琪酵母生孢、分离、筛选得到, 对比文件 2 菌株的构建方法和本申请不同; 对比文件 2 公开了采用 ADH7、CYC1、MSN2 这 3 种基因联合过表达构建酿酒酵母工程菌, 本申请采用的是 PDR1、YAP1、RPN4 基因; 本领域技术人员更有动机在对比文件 2 的基础上加入这 7 种基因 (YAP1、YAP5、YAP6、PDR1、PDR3、RPN4 和 HSF1) 中的某个或者多个启动子来研究这些基因联合调控表达来获得对木质纤维素水解醛类耐受性更为增加的基因工程菌株, 而非单独研究 PDR1、YAP1、RPN4 这 3 种基因; 本申请所构建的过表达 PDR1、YAP1 和 RPN4 工程菌 PYR 增强了其对糠醛的耐受能力, 且对其正常生长未产生显著影响。并且该工程菌对 5-羟甲基糠醛、乙酸、苯酚、乙醇以及玉米秸秆水解液中的抑制物等的耐受能力均有所增强, 可作为较良好的工业发酵底盘菌株, 具有用于第二代生物燃料乙醇以及以木质纤维素水解液为原料的其它生物基化学品工业化生产的应用潜力。

对此, 审查员认为:

1, 根据正文评述, 对比文件 2 公开了采用 ADH7、CYC1、MSN2 这 3 种基因联合过表达构建酿酒酵母工程菌, 并公开了酿酒酵母对木质纤维素水解醛类抑制因子的脱毒及耐受涉及多基因、多层次的复杂的相互作用, 至少还有 7 个转录调控基因(YAP1、YAP5、YAP6、PDR1、PDR3、RPN4 和 HSF1)参与其中。因此, 本领域技术人员在对比文件 2 的教导下, 有动机选择这 7 个转录调控基因或其中几个进行联合调控表达获得对木质纤维素水解醛类耐受性更为增加的基因工程菌株。对比文件 1 公开的一种酿酒酵母 ScBG (保藏号为 CCTCC NO:M2015488); 该菌株具有低营养需求、高抗逆和高产醇性能, 同时能稳定、高效分泌表达  $\beta$ -葡萄糖苷酶, 以工业废料糠醛渣为底物、添加尿素使乙醇转化率达理论值的 90.89%, 对清洁有效的利用废弃纤维素资源生产能源有意义。本申请菌株与对比文件 1 相比, 并未取得预料不到的技术效果。

2, 对比文件 2 明确公开了采用 3 种基因联合过表达构建酿酒酵母工程菌, 并明确公开了至少还有 7 个转录调控基因(YAP1、YAP5、YAP6、PDR1、PDR3、RPN4 和 HSF1)参与其中, 因此有动机使用这 7 个转录调控基因的 3 个或者多个进行联合调控表达获得对木质纤维素水解醛类耐受性更为增加的基因工程菌株。

对于技术效果, 虽然对比文件 1 没有记载所述菌株醛还原酶比活力, 对 5-羟甲基糠醛、苯酚和无水乙醇的耐受性实验, 但是对比文件 1 使用同时含有 0.8g/100mL 乙酸和 0.6g/100mL 糠醛 YPD 培养基平板进行筛选 (属于两种抑制物联用) Sc-URA, 并且 ScBG 可以利用糠醛渣进行乙醇发酵, 本领域技术人员可以合理预期其具备耐受乙醇等物质的性质; 本申请所述菌株对乙酸和糠醛的耐受实验所用最大浓度分别为 5.2g/L (即约 0.52g/100mL) 和 55mM (即约 0.53 g/100mL), 因此本申请的技术效果是本领域技术人员可以合理预期的。

因此, 申请人的意见陈述不具备说服力。

### 三、决定

综上所述, 本发明专利申请不符合专利法第 22 条第 3 款关于创造性的规定, 属于专利法实施细则第五十三条第二项的情况, 因此根据专利法第三十八条予以驳回。

根据专利法第四十一条第一款的规定, 申请人如果对本驳回决定不服, 可以在收到本驳回决定之日起三个月内, 向专利局复审和无效审理部请求复审。

审查员姓名:马颖  
审查员代码:20090162