

复 审 请 求 书

		此框内容由国家知识产权局填写	
② 专 利 申 请	申请号 2019108485770		①案件编号
	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		
③ 复 审 请 求 人	申 请 人 (1)	姓名或名称 四川农业大学	申请人类别 大专院校
		国籍或注册国家（地区） 中国	电子邮箱
		公民身份号码或统一社会信用代码 12510000450718925E	
		经常居所地或营业所所在地 中国	电话 028-86290111
		详细地址 四川省成都市温江区惠民路 211 号	邮政编码 611130
	申 请 人 (2)	姓名或名称	申请人类别
		国籍或注册国家（地区）	电子邮箱
		公民身份号码或统一社会信用代码	
		经常居所地或营业所所在地	电话
		详细地址	邮政编码
④ 收 件 人	姓 名		电 话
	邮政编码		电子邮箱
	省、自治区、直辖市		
	市县		
	城区（乡）、街道、门牌号		
⑤ 专 利 代 理 机 构	名称 成都天汇致远知识产权代理事务所（普通合伙）		机构代码 51264
	代 理 师 (1)	姓 名 陆岩	代 理 师 (2)
		执业证号 5126418826.8	姓 名
		电 话 13551134124	执业证号
			电 话

复 审 请 求 书

⑥根据专利法第 41 条第 1 款及专利法实施细则第 60 条第 1 款的规定,对国家知识产权局于 2023 年 09 月 16 日发出的对上述专利申请的驳回决定不服,请求复审。

⑦请求复审的理由:

尊敬的审查员:

本意见陈述是针对国家知识产权局于 2023 年 09 月 16 日发出的关于申请号: 201910848577.0、专利名称《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》的驳回决定的复审意见陈述。对于审查员在驳回通知书中的论述,申请人在仔细阅读、认真研究驳回意见,并重新阅读本申请文件所记载的相关内容后,作出以下修改和意见陈述。

一、修改说明

在三审意见陈述修改的权利要求基础上,将原权利要求 1 和 2 合并成新权利要求 1,并将主题改为:一株糠醛等抑制物耐受酵母工程菌;并在新权利要求 1 中补充出发菌株 YB-A-6-1 的相关保藏信息;

将剩余权利要求作相应的适应性修改。

以上修改均未超出原说明书和原权利要求书所记载的范围,符合专利法第三十三条的规定,且上述修改也是针对审查意见通知书所指出的缺陷进行修改,符合专利法实施细则第五十一条三款规定。

具体的修改内容详见权利要求书替换页。

二、意见陈述

1、修改后的权利要求 1 具有创造性

权利要求 1 请求保护一株糠醛等抑制物耐受酵母工程菌。对比文件 1 公开

复 审 请 求 书

的是分泌表达 β - 葡萄糖苷酶的重组酿酒酵母工业菌株及应用。权利要求 1 与对比文件 1 相比具有以下区别技术特征：

区别 1，菌株不同：本申请的工程菌 PYR，分类命名为酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)，于 2019 年 6 月 14 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏号为 CGMCCNo.17930。

对比文件 1 的工业菌株分类命名为酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)ScBG，保藏于中国典型培养物保藏中心，保藏号为 CCTCC NO:M 2015488。

区别 2，具体的构建方法不相同。

针对上述区别技术特征，本申请实际解决的技术问题为：提供可另一种耐受糠醛等抑制物的酵母工程菌。

进一步地，驳回通知中指出：1、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。2、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

复 审 请 求 书

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。此外,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。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。权利要求 1 不具备专利法第 22 条第 3 款规定的创造性。

对此,申请人仍然无法赞同,理由如下:

首先,从本申请与两篇对比文件对于重组菌株的构建方法来看: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,然后将整合载体 pGEM- δ R-URA-AaBG- δ 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。对比文件 2 的菌株是以酿酒酵母 BY4742 基因组 DNA 为模板,对 ADH7、CYC1、MSN2 基因进行扩增,将 ADH7 启动子和 CYC1 终止子 PCR 扩增产物经胶回收后按等比例混合作为模板 DNA,进行融合 PCR 扩增 ADH7p-CYC1t 片段。将 pUG6 质粒和 ADH7p-CYC1t 融合片段构建重组酵母表达质粒 pUG6-ADH7p,再将 MSN2 扩增纯化后的 DNA 产物与 pUG6-ADH7p 质粒混合构建重组酵母表达质粒 pUG6-AM。用 Kpn I 内切酶线性化酶切处理重组质粒 pUG6-AM,采用醋酸锂法转化酿酒酵母 BY4742 感受态细胞,培养后获得重组酿酒酵母基因工程菌命名为 AM01。而本申请的酵母工程菌的构建方法包括:提取酵母单倍体菌株 BY4742 的基因

复 审 请 求 书

组并扩增 PDR1、YAP1、RPN4 基因，构建重组质粒 pUG6-TEF1p-CYC1t，将双酶切的 pUG6-TEF1p-CYC1t 片段与双酶切的 YAP1 片段进行粘性末端连接体外构建重组质粒，转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞，挑选出含重组质粒 pUG6-TEF1p-YAP1-CYC1t 的阳性克隆子；将 pUG6-TEF1p-CYC1t 片段与 PDR1、RPN4 片段按照分子质量比为 2: 6~2: 8 混合后，分别转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞体内重组构建重组质粒，挑选出含重组质粒 pUG6-TEF1p-PDR1-CYC1t 与 pUG6-TEF1p-RPN4-CYC1t 的阳性克隆子；将 PstI 酶切线性化的 pUG6-TEF1p-PDR1-CYC1t 通过同源重组方式整合进出发菌株 YB-A-6-1 染色体中，获得阳性菌株命名为 P 菌株；将线性化 pRS42H 片段与 TEF1p-YAP1-CYC1t 过表达盒，按照分子质量比为 2: 6~2: 8 混合转化大肠杆菌 DH5 α 细胞，体内重组构建重组质粒，挑选出含重组质粒 pRS42H-TEF1p-YAP1-CYC1t 的阳性克隆子；将 EcoRV 线性化的 pRS42H-TEF1p-YAP1-CYC1t 与 TEF1p-RPN4-CYC1t 过表达盒，按照分子质量比为 2: 6~2: 8 混合转化大肠杆菌 DH5 α 细胞，体内重组构建重组质粒，挑选出含重组质粒 pRS42H-TEF1p-YAP1-CYC1t-TEF1p-RPN4-CYC1t 的阳性克隆子；将最后所得的环状 pRS42H-TEF1p-YAP1-CYC1t-TEF1p-RPN4-CYC1t 重组质粒转化到 P 菌株细胞浆中，在含 300 μ g/mL 潮霉素的抗性平板上挑选阳性工程菌 PYR。

尽管对比文件 1、对比文件 2 都是通过重组方式获得新的工程菌株，但是关于目标基因、载体、酶切方式等的选择则与本申请完全不同，而且也未给出针对 PDR1、YAP1、RPN4 基因扩增并构建重组表达载体，然后通过同源重组方式整合到出发菌株 YB-A-6-1 的技术启示和教导。至于对比文件 2 给出的

复 审 请 求 书

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，那么试问，在设计转录调控基因的联合调控表达方式过程中，具体怎么选择调控基因、怎么联合调控表达，进而可以获得较比出发菌具有更好糠醛耐受能力、细胞壁抗性能力、醛还原酶比活力，还具有合成核苷酸替代 DNA 链中受损的核苷酸分子从而维持正常的生物学功能，以及其它有毒抑制物耐受性功能，诸如乙酸、苯酚、无水乙醇、13%的玉米秸秆水解液等，这整个过程难道不是创造性劳动过程吗？

最后，本申请和对比文件的技术效果对比如下：

1) 本申请中，如图 11 所示，在无糠醛应激条件下，工程菌 PYR 与出发菌 CK 均未出现生长迟滞期，并且生长曲线几乎重合，表明通过转录调控基因联合过表达方式构建的工程菌不会对正常的生长造成显著影响。在不同浓度糠醛抑制物下，工程菌与出发菌均出现相应的迟滞期，工程菌的生长迟滞期明显比出发菌短。在 25mM 糠醛浓度下，工程菌的迟滞期比出发菌缩短了约 6h；在 35mM 糠醛浓度下，工程菌的迟滞期比出发菌缩短了约 12h；而在 45mM 糠醛浓度下，工程菌的迟滞期比出发菌缩短了约 24h。试验结果表明，工程菌能够明显缩短糠醛应激条件下的迟滞期，从而更快地恢复生长进入对数期，并且随着糠醛浓度的增加效果更加明显。

见表 2 所示，在未经糠醛应激处理下的酵母细胞，lyticase 裂解作用 1h 后，出发菌 CK 细胞 OD600 的变化值约 0.629，工程菌 PYR 细胞 OD600 的变化值约 0.610；在经过 55mM 糠醛应激处理下的酵母细胞，lyticase 裂解作用 1h 后，出发菌细胞 OD600 的变化值约 1.044，工程菌细胞 OD600 的变化值约 0.902。出发菌 OD600 的变化值在糠醛处理与未处理情况下差值约 0.415，而工程菌

复 审 请 求 书

OD600 的变化值在糠醛处理与未处理情况下差值约 0.293，二者之间差异极显著($p < 0.01$)。试验结果表明，出发菌细胞壁对 lyticase 的敏感程度相比于出发菌强，即出发菌细胞壁相比工程菌的裂解程度较严重，工程菌细胞壁的抗性能力相比于出发菌提高了约 29.4%。说明工程菌 PYR 的细胞壁抗性能力明显强于出发菌 YB-A-6-1。

见图 12 所示，以 NADH 作为辅酶，45mM 糠醛处理 0h 时，出发菌 PYR 与工程菌 CK 之间的醛还原酶比活力值几乎无差异，它们的醛还原酶比活力约为 0.024U/mg；处理 4h 后，工程菌的醛还原酶比活力强于出发菌，出发菌和工程菌的醛还原酶比活力分别约为 0.038U/mg，0.044U/mg，工程菌的醛还原酶比活力相比于出发菌提高了约 1.4 倍，二者之间表现出显著差异($p < 0.05$)；处理 8h 后，出发菌和工程菌的醛还原酶比活力分别约为 0.035U/mg，0.057U/mg，工程菌的醛还原酶比活力相比于出发菌提高了约 1.6 倍，二者之间表现出极显著差异($p < 0.01$)。说明工程菌在糠醛应激条件下，依赖于 NADH 作为辅酶的醛还原酶表达水平相比出发菌得到显著提高。

通过工程菌与出发菌在糠醛应激条件下转录组水平的显著差异表达基因的功能注释，挖掘到了工程菌发挥糠醛耐受性的重要基因，见表 3 所示。主要是膜外排蛋白基因、细胞壁和细胞膜成分合成基因、蛋白质折叠分子伴侣基因以及磷酸戊糖途径相关的基因。膜外排蛋白基因 AZR1 具有将细胞内有毒物质(进入细胞内的过量糠醛和细胞代谢产生的有毒物质)外排到细胞外的功能。细胞壁和细胞膜成分合成基因主要涉及几丁质、麦角固醇、脂肪酸和磷脂等脂类的合成。几丁质在细胞壁重塑和拯救途径中能起到弥补受损细胞壁的作用，麦角固醇、脂肪酸、磷脂等脂类成分能起到维持细胞膜的完整性、流动性等重要

复 审 请 求 书

作用。蛋白质分子伴侣基因 SSB1 和 SSB2 能够帮助新生蛋白质多肽链在糠醛应激条件下的正常折叠,从而发挥其正常的功能。磷酸戊糖途径相关的基因 SOL3、GND2、RKI1、PRS3 在磷酸戊糖途径构成了一条链式催化反应,能将 6-磷酸葡萄糖酸通过上述基因所对应的代谢途径酶转变为 5-磷酸核糖-1-焦磷酸(PRPP),而 PRPP 参与嘌呤核苷酸和嘧啶核苷酸的补救途径以及从头合成,工程菌能通过更多地合成核苷酸替代 DNA 链中受损的核苷酸分子从而维持正常的生物学功能。

如图 13 所示,在 85mM 的 5-羟甲基糠醛应激的液体摇瓶培养下,工程菌 PYR 的生长迟滞期明显短于出发菌 CK,工程菌比出发菌提前了约 32h 恢复生长;在 5.2g/L 的乙酸应激条件下,工程菌比出发菌提前了约 6h 先恢复生长;在 2.0g/L 的苯酚应激条件下,两株菌均未出现明显的生长迟滞期,但是工程菌的生长速率明显大于出发菌,并且工程菌最后到达稳定期的细胞总量也明显多于出发菌;在 10.5%的无水乙醇应激条件下,出发菌在测定的 72h 内,没有出现生长,而工程菌在经过约 12h 的迟滞期后进入对数生长期;在 13%的玉米秸秆水解液应激条件下,工程菌的迟滞期约为 12h,出发菌的迟滞期约为 24h,工程菌比出发菌提前了约 12h 恢复生长。综上,工程菌 PYR 对于其它有毒抑制物也具有较好的耐受性。

本申请从工程菌的糠醛耐受能力、细胞壁抗性能力、醛还原酶比活力,合成核苷酸替代 DNA 链中受损的核苷酸分子从而维持正常的生物学功能,以及其它有毒抑制物耐受性功能这几个方面均进行了完整的考量,来证实所获得的工程菌的突出效果。

2) 对比文件 1 的工程菌技术效果则是从菌株 ScBG 表达 β -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、利用玉米芯工业废料糠醛渣同步糖化发酵产醇评价、催化合成烷基糖苷，侧重点和本申请完全不同，或者说，本申请和对比文件 1 要解决的技术问题、技术方案以及最终的技术效果均不相同。

3)对比文件 2 第 2.5 节最后一段公开了：“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。同时，其调控的下游 代表基因转录水平的比值也随之相应增大。该结果表明：在糠醛应激状态下，ADH7 启动子开始发挥作用，并表现出自我精细调控的能力”，其对照菌株选择的是 BY4742，对于糠醛浓度最高只做到 30mmol/L，而且也并未对其 AMO1 菌株进行多方面的完整考量。

综上所述，通过对比文件 1 和对比文件 2 公开的内容，本领域技术人员无法显而易见地获得本申请权利要求 1 的整体技术方案，本申请权利要求 1 具有突出的实质性特点和显著的进步，具备专利法第 22 条第 3 款规定的创造性。

3、修改后的权利要求 2-7 具有创造性

修改后的权利要求 2-7 为权利要求 1 的从属权利要求，在其引用的主权项具备创造性的前提下，权利要求 2-7 也具备创造性。

4、权利要求 8 具有创造性

权利要求 8 请求保护权利要求 1~7 任一项所述的糠醛等抑制物耐受酵母工程菌在制备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中的应用。是基于权利要求 1~7 所述的工程菌实现。在权利要求 1 具备创造性的前提下，权利要求 8 也具备创造性。

申请人认为，以上陈述克服了驳回通知中所指出的所有缺陷，希望审查员

复 审 请 求 书

以此为基础重新审查并撤销驳回决定。如果审查员认为本申请仍有不符合专利法规定之处，恳请再给予修改/陈述意见的机会，申请人愿意积极配合审查员的审查工作。

最后对审查员认真细致的工作再次表示感谢。

⑧附件清单

【附件名称】:权利要求书

⑨复审请求人或专利代理机构

成都天汇致远知识产权代理事务所（普通合伙）